

## 三种李斯特菌菌体蛋白提取方法的比较

徐宗凯, 林青青, 周梦莹, 刘思静, 黄耀, 李文熙, 李兴桥, 余倩, 汪川\*

(四川大学 华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系, 中国四川 成都 610041)

**摘要:** 通过对3种李斯特菌菌体蛋白提取方法主要是破壁方式的比较, 找到一种可高效提取李斯特菌菌体蛋白的方法, 为该菌的深入研究提供可靠技术。以绵羊李斯特菌新鲜液体培养物为材料, 收集菌沉淀, 分别选用3种破壁方式破除细胞壁, 三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA)-丙酮沉淀法沉淀破壁液中的菌体蛋白, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和 Western-blot 分析所得菌体蛋白。溶菌酶-超声破壁-TCA-丙酮沉淀法提取得到的李斯特菌菌体蛋白 SDS-PAGE 条带清晰丰富, Western-blot 条带特异。溶菌酶-超声破壁-TCA-丙酮沉淀法可有效提取李斯特菌菌体蛋白, 满足常用蛋白分析技术的要求, 是一种提取李斯特菌菌体蛋白的可靠方法。

**关键词:** 李斯特菌; 蛋白质; 提取; 超声破壁

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)01-0029-05

## Comparison of Three Methods for Extraction of Non-secreted Proteins from *Listeria*

XU Zong-kai, LIN Qing-qing, ZHOU Meng-ying, LIU Si-jing, HUANG Yao,  
LI Wen-xi, LI Xing-qiao, YU Qian, WANG Chuan\*

(Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China)

**Abstract:** Three methods of extracting non-secreted proteins from *Listeria* were compared, mainly different in lysis process, to obtain an efficient non-secreted proteins extracting method for *Listeria*, to provide a reliable technique for the further study of *Listeria*. Fresh broth culture of *Listeria ivanovii* was used as study material. Bacteria deposit was collected by centrifugation, and three lysing approaches were adopted separately. Non-secreted proteins were obtained through the method of trichloroacetic acid (TCA)-acetone precipitation in the lysis solution, and verified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western-blot. SDS-PAGE bands of non-secreted proteins extracted via the method of lysozyme-ultrasonication-TCA-acetone precipitation were distinct and sufficient, and the Western-blot results were specific. The method of lysozyme-ultrasonication-TCA-acetone precipitation can be used to extract *Listeria* non-secreted proteins efficiently, which is qualified for common protein experiments, and is a reliable method for extracting non-secreted proteins from *Listeria*.

**Key words:** *Listeria*; protein; extraction; ultrasonication

(*Life Science Research*, 2015, 19(1): 029~033)

李斯特菌是一类革兰阳性无芽孢杆菌, 包括单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM)、绵羊李斯特菌 (*Listeria ivanovii*, LI) 等 7 个菌种, 具有独

特的胞内增殖规律: 进入胞内, 逃逸胞吞泡, 在细胞浆内增殖, 以细胞-细胞的传播方式扩大感染细胞范围<sup>[1,2]</sup>。李斯特菌在吞噬细胞等抗原递呈细

收稿日期: 2014-04-18; 修回日期: 2014-08-06

基金项目: 四川省科技厅基础研究计划项目(2013JY0143); 国家大学生创新训练计划项目(201310610086)

作者简介: 徐宗凯 (1987-), 男, 四川广元人, 硕士研究生, 主要从事微生物生态学、微生物检验研究, E-mail: 271670203@qq.com; \* 通讯作者: 汪川(1974-), 女, 四川成都人, 四川大学华西公共卫生学院教授, 博士, 主要从事重组疫苗研究, Tel: 028-85502097, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn。

胞胞浆内增殖的生物学特点,是该菌诱导机体产生特异性 T 细胞免疫应答的最主要因素,也是其作为 T 细胞免疫应答研究工具的生物学基础<sup>[3,4]</sup>。由于李斯特菌能诱导机体特异性细胞免疫应答,使得该菌被越来越多地用于减毒活菌载体重组疫苗的构建<sup>[5-7]</sup>。在构建以李斯特菌为载体的重组疫苗研究中,重组菌蛋白质表达的验证是关键的一步,同时研究者还需了解目的蛋白是存在于菌体内还是分泌到胞外。目前发表的文献中,尚未查到成熟的、重复性好,且适用于李斯特菌菌体蛋白的提取方法。本研究采用几种方法分别提取李斯特菌菌体蛋白,然后用 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 进行检测,希望能为该菌的深入研究提供一种获取菌体蛋白的可靠手段。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株及培养条件

绵羊李斯特菌野生株 (LI) 和重组株 LI-HA (能分泌表达带 HA 抗原标签的结核杆菌 Ag85C 蛋白,约 43 kD),单增李斯特菌重组株 LM-OVA (能分泌表达带 HA 抗原标签的卵白蛋白,约 35 kD),由四川大学华西公共卫生学院卫生检验与检疫系实验室提供。所有菌株均用脑心浸液培养基(brian heart infusion, BHI)于 37 °C 培养。

### 1.2 主要试剂及仪器

HA-单克隆抗体、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、预染蛋白质相对分子质量标准、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、考马斯亮蓝染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),三氯乙酸(TCA)(美国 Sigma 公司), $\beta$ -巯基乙醇、0.1% (W/V) 溴酚蓝(美国 Amresco 公司)、HRP 化学发光底物显色反应液(美国 Thermo Fisher 公司),PVDF 膜(美国 Millipore 公司),超声破碎仪(美国 SONICS 公司),低温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司),TS-A 型脱色摇床(江苏金坛金城国胜实验仪器厂),分光光度计(美国 Unico 公司),PAGE 垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司),DY-CZ-40D 型转移电泳槽(北京六一仪器厂),Chemi-Doc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司),DYY-III 2 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),恒温气浴摇床(美国 Thermo Fisher 公司)。

### 1.3 主要试剂的配制

#### 1.3.1 重悬液

称取 1 g 蔗糖和 10 mg 溶菌酶,溶解于 3.7 mL

ddH<sub>2</sub>O,加入 0.5 mL 0.1 mol/L PBS pH 7.0,滤过除菌,分装,-20 °C 保存。

#### 1.3.2 裂解液 1

取 300  $\mu$ L 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0 溶液,6 mL 10% SDS 溶液,加 ddH<sub>2</sub>O 至 10 mL,滤过除菌,分装,-20 °C 保存。

#### 1.3.3 裂解液 2

取 300  $\mu$ L 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0 溶液,60  $\mu$ L 0.5 mol/L EDTA pH 8.0 溶液,6 mL 10% (W/V) SDS 溶液,10 mg/mL 蛋白酶 K,加 ddH<sub>2</sub>O 至 10 mL,滤过除菌,分装,-20 °C 保存。

#### 1.3.4 蛋白溶解液

称取 4 g SDS 粉末,溶解于 10 mL 0.5 mol/L Tris-HCl pH 8.0 溶液,滤过除菌,分装,-20 °C 保存。

#### 1.3.5 2 $\times$ loading buffer

加入 2.5 mL 0.5 mol/L Tris-HCl pH 6.8、2 mL 甘油、4 mL 10% (W/V) SDS、0.5 mL 0.1% (W/V) 溴酚蓝,用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 10 mL,分装,-20 °C 保存,临用时加入  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度为 5%。

#### 1.3.6 TBST

称取 3.52 g NaCl,加入 4 mL 1 mol/L Tris-HCl pH 7.5,纯水定容至 400 mL,然后加入 0.2 mL Tween-20。

#### 1.3.7 封闭液

称取 1.5 g 脱脂奶粉,用 TBST 30 mL 溶解。

## 1.4 细菌菌体蛋白样品提取

### 1.4.1 溶菌酶-SDS-TCA-丙酮沉淀法

将细菌接种 5 mL BHI 肉汤,37 °C 200 r/min 摇育过夜,取 500  $\mu$ L 增菌液转移至另一支 10 mL BHI 肉汤中,37 °C 200 r/min 摇育,以 BHI 肉汤为空白调零,测定细菌培养液 OD<sub>600</sub>,当 OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.8 时,取 5 mL 菌液,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加入 2 mL 无菌 PBS,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加入 300  $\mu$ L 重悬液,吹打使菌体重悬,37 °C 水浴 2 h,加入 300  $\mu$ L 裂解液 1,37 °C 水浴 30 min,加入 500  $\mu$ L 4 °C 预冷的饱和三氯乙酸(500 g 三氯乙酸用 227 mL 纯水溶解),冰浴 45 min,4 °C 13 000 r/min 离心 30 min,弃上清。加入已于 -20 °C 预冷的丙酮 20 mL,4 °C 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 100  $\mu$ L 蛋白溶解液溶解沉淀,将溶液转移至 EP 管,加入等体积 2 $\times$ loading buffer,沸水浴煮 5 min,-20 °C 保存。

### 1.4.2 溶菌酶-SDS-蛋白酶 K-TCA-丙酮沉淀法

细菌培养和收集步骤同上,加入重悬液 37 °C 水

浴 2 h 后,加入 300  $\mu\text{L}$  裂解液 2, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min, 加入 500  $\mu\text{L}$  4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的饱和三氯乙酸, 后续步骤同上。

#### 1.4.3 溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法

细菌培养和收集步骤同上, 加入重悬液 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h 后, 加入 5 mL 无菌水, 超声波破碎菌体细胞 (振幅 100%, 脉冲 5 s, 停歇 5 s, 总共脉冲 4 min), 加入 500  $\mu\text{L}$  4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的饱和三氯乙酸, 后续步骤同上。

#### 1.5 细菌分泌蛋白样品提取

细菌接种 5 mL BHI 肉汤, 37  $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 摇育过夜, 将 5 mL 增菌液转移至 60 mL BHI 肉汤中, 37  $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 摇育, 以 BHI 肉汤为空白调零, 测定细菌培养液  $OD_{600}$ , 当  $OD_{600} \approx 1$  时, 取 40 mL 菌液于 13 000 r/min 离心 2 min, 取上清液 35 mL 置于 50 mL 离心管中, 加入 3.5 mL 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的饱和三氯乙酸, 冰浴 30 min 后, 4  $^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 加入已 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的丙酮 20 mL, 4  $^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入 100  $\mu\text{L}$  蛋白溶解液溶解沉淀, 将溶液转移至 EP 管, 加入等体积 2 $\times$ loading buffer, 沸水浴煮 5 min, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.6 SDS-PAGE 检测

按试剂盒说明书配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 上样量 10  $\mu\text{L}$ , 平行上样, 浓缩电压 80 V, 分离电压 120 V, 电泳 1.5 h, 考马斯亮蓝染色, 脱色至背景清晰。

#### 1.7 Western-blot

蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后, 恒流 200 mA 转 PVDF 膜 1.5 h, 将膜于 30 mL 封闭液中, 20  $^{\circ}\text{C}$  摇床上封闭 1 h, 将膜置于 30 mL TBST 中, 20  $^{\circ}\text{C}$  摇床上洗膜 10 min, 加入用 TBST 稀释的 HA 单抗 (1:5 000) 10 mL, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 将膜置入 30 mL TBST 中, 20  $^{\circ}\text{C}$  摇床上洗膜 10 min, 重复 3 次, 加入用 TBST 稀释的二抗 (HRP 标记羊抗鼠 IgG) (1:1 000) 10 mL 20  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 将膜置入 30 mL TBST 中, 20  $^{\circ}\text{C}$  摇床上洗膜 10 min, 重复 3 次, 将 HRP 化学发光底物显色反应液滴加于膜表面, ChemiDoc XRS 凝胶成像系统采集图像。

## 2 结果

### 2.1 SDS-PAGE 检测结果

图 1 可见, 溶菌酶-SDS-TCA-丙酮沉淀法提取李斯特菌菌体蛋白只能在小于 19 kD 处见到一

明显条带, 其余位置仅可见少量极淡条带, 丰度和清晰度皆不够。图 2 可见, 溶菌酶-SDS-蛋白酶 K-TCA-丙酮沉淀法提取的李斯特菌菌体蛋白仅能在约 35 kD 处见到明显条带, 其余条带几乎不可见。图 3 可见, 溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法提取的李斯特菌菌体蛋白, 电泳条带丰度较高, 条带清晰。图 4 可见, TCA-丙酮沉淀法提取的李斯特菌分泌蛋白, 电泳条带较清晰, 丰度较高。

以上结果表明, 溶菌酶-超声破壁-TCA-丙酮沉淀法提取李斯特菌菌体蛋白质丰度最高。

### 2.2 Western-blot 检测结果

图 5 可见, 溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法提取的 LI-HA 菌体蛋白在约 43 kD 处有清

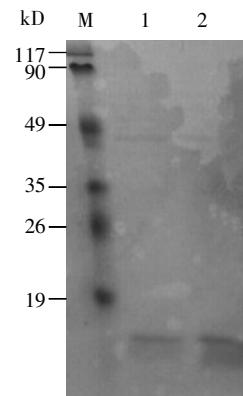


图 1 溶菌酶-SDS-TCA-丙酮沉淀法提取菌体蛋白 SDS-PAGE 结果

M: Marker; 1、2: LI-HA 菌体蛋白。

Fig.1 SDS-PAGE result of non-secreted proteins extracted via lysozyme-SDS-TCA-acetone precipitation

M: Marker; 1, 2: Non-secreted proteins of LI-HA strain.

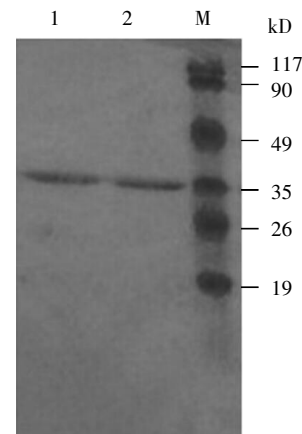


图 2 溶菌酶-SDS-蛋白酶 K-TCA-丙酮沉淀法提取菌体蛋白 SDS-PAGE 结果

M: Marker; 1、2: LI-HA 菌体蛋白。

Fig.2 SDS-PAGE result of non-secreted proteins extracted via lysozyme-SDS-proteinase K-TCA-acetone precipitation

M: Marker; 1, 2: Non-secreted proteins of LI-HA strain.

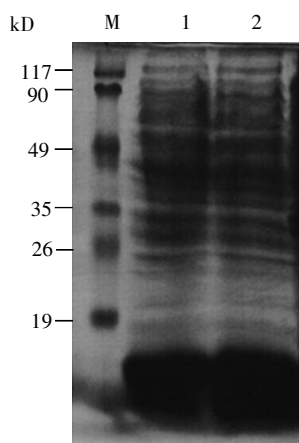


图3 溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀提取菌体蛋白 SDS-PAGE 结果

M: Marker; 1、2: LI-HA 菌体蛋白。

Fig.3 SDS-PAGE result of non-secreted proteins extracted via lysozyme-ultrasonication-TCA-acetone precipitation

M: Marker; 1, 2: Non-secreted proteins of LI-HA strain.

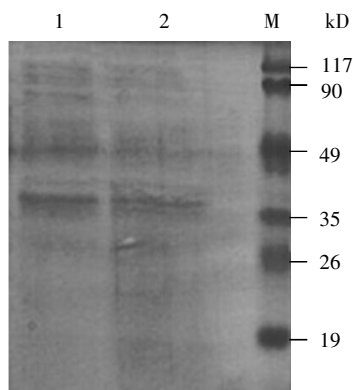


图4 TCA-丙酮沉淀法提取分泌蛋白 SDS-PAGE 结果

M: Marker; 1、2: LI-HA 分泌蛋白。

Fig.4 SDS-PAGE result of secreted proteins extracted via TCA-acetone precipitation

M: Marker; 1, 2: Secreted proteins of LI-HA strain.

晰条带, LM-OVA 菌体蛋白 (菌体蛋白阴性对照) 及 LI 菌体蛋白(菌体蛋白阴性对照)均无条带。图6可见, TCA-丙酮沉淀法提取的 LI-HA 分泌蛋白在约 43 kD 处有清晰条带, LM-OVA 分泌蛋白(分泌蛋白阳性对照)在约 35 kD 处有清晰条带, LI 分泌蛋白(阴性对照)无条带。

### 3 讨论

以李斯特菌为载体的重组疫苗是当前 T 细胞免疫疫苗的一个研究热点, 对该类型疫苗免疫学价值的研究需要以重组抗原的良好表达作为前提, 常用的 Western-blot 法和 SDS-PAGE 法都建立在成功从李斯特菌中提取蛋白的基础之上。根据细菌生长曲线, 当细菌处于生长对数期, 即将

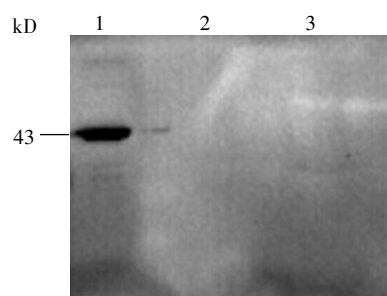


图5 溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法提取李斯特菌菌体蛋白 Western-blot 结果

1: LI-HA 菌体蛋白; 2: LM-OVA 菌体蛋白; 3: LI 菌体蛋白。

Fig.5 Western-blot result of *Listeria* non-secreted proteins extracted via lysozyme-ultrasonication-TCA-acetone precipitation

1: Non-secreted proteins of LI-HA strain; 2: Non-secreted proteins of Lm-OVA strain; 3: Non-secreted proteins of LI strain.

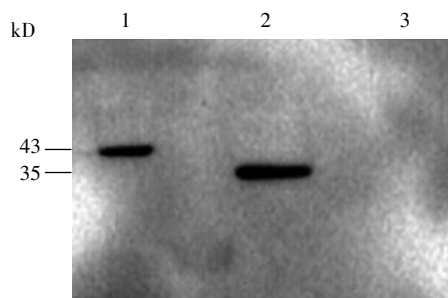


图6 TCA-丙酮沉淀法提取李斯特菌分泌蛋白 Western-blot 结果

1: LI-HA 分泌蛋白; 2: LM-OVA 分泌蛋白; 3: LI 分泌蛋白。

Fig.6 Western-blot result of *Listeria* secreted proteins extracted via TCA-acetone precipitation

1: Secreted proteins of LI-HA strain; 2: Secreted proteins of Lm-OVA strain; 3: Secreted proteins of LI strain.

进入稳定期( $OD_{600} \approx 0.8$ )时, 此时细菌数量基本已至最大, 且对外界环境因素的影响最敏感, 最适于提取菌体蛋白, 而当细菌完全进入稳定期后( $OD_{600} \approx 1.0$ ), 此时积累大量分泌蛋白, 适于提取。

细菌分泌蛋白主要存在于培养物的上清液中, 可以通过 TCA-丙酮沉淀的方法收集。菌体蛋白的提取需要充分裂解李斯特菌, 释放胞内蛋白。由于李斯特菌属于革兰阳性菌, 细胞壁厚, 常规方法不易破壁, 故作为本研究的重点。

常用裂解细菌的方法有机械法、化学法和酶法<sup>[8]</sup>。本研究中分别采用了 SDS、蛋白酶 K 和超声破碎结合溶菌酶的破膜方式。溶菌酶-SDS-TCA-丙酮沉淀法对李斯特菌的裂解效果不理想, 蛋白释放不完全, 结果中小于 19 kD 处的条带疑似为溶菌酶(约 14 kD)条带; 溶菌酶-SDS-蛋白酶 K-TCA-丙酮沉淀法由于蛋白酶 K 水解作用具有高

效的酶活性和底物广谱性,对细菌所有蛋白都有降解作用,故只在约 35 kD 处出现一条疑似蛋白酶 K (约 30 kD)的条带。上述两种方法均不能满足分析李斯特菌菌体蛋白的要求,而经本研究证实,溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法能够有效地裂解李斯特菌,充分释放细菌细胞内蛋白并保证蛋白质完整性。

根据 LM-OVA 菌体蛋白与分泌蛋白 Western-blot 结果分析可知,该种将细菌培养物先离心后再取沉淀提取菌体蛋白的方法,可有效避免细菌分泌蛋白的干扰,从而对细菌蛋白表达方式的研究具有一定的意义。

溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法具有操作简单、耗时短、成本低、不引入干扰物质等特点,能够满足对李斯特菌蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析的要求。分析 3 种方法,可认为其中超声破碎起主要作用<sup>[9-12]</sup>。值得注意的是,溶菌酶-超声破碎-TCA-丙酮沉淀法中超声强度尤为重要,可根据具体的样品量和仪器进行适当调整,超声强度一般控制在略低于产生泡沫的水平。在超声破碎的过程中需要将样品置于冰上,避免超声产生的高温使蛋白质变性;并适当调整探头位置,避免产生泡沫。

本研究中的李斯特菌菌体蛋白提取方法一次可收集蛋白约 100  $\mu$ L,足够进行多次 SDS-PAGE 或 Western-blot 分析。该方法易受 TCA 浓度的影响,故实验过程中应严格控制饱和 TCA 加入量为反应总体积的 10%。其次,蛋白质充分释放后应保证操作全程低温,避免蛋白质变性或降解。

#### 参考文献(References):

- [1] VÁZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, *et al.* *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(3): 584-640.
- [2] CAMEJO A, CARVALHO F, REIS O, *et al.* The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle[J]. *Virulence*, 2011, 2(5): 379-394.
- [3] ZENEWICZ L A, SHEN H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview[J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1208-1215.
- [4] GUIRNALDA P, WOOD L, PATERSON Y. *Listeria monocytogenes* and its products as agents for cancer immunotherapy[J]. *Advances in Immunology*, 2012, 113: 81-118.
- [5] BRUHN K W, CRAFT N, MILLER J F. *Listeria* as a vaccine vector[J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1226-1235.
- [6] le GOUELLEC A, CHAUCHET X, POLACK B, *et al.* Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2012, 8(10): 1454-1458.
- [7] 李文桂, 陈雅棠. 重组单核细胞增生性李斯特菌疫苗的研制现状[J]. 中国病原生物学杂志(LI Wen-gui, CHEN Ya-tang. The state of research on recombinant vaccines of *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Pathogen Biology*), 2013, 8(1): 80-86.
- [8] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社(WANG Jia-zheng. *Handbook of Protein Techniques*[M]. Beijing: Science Press), 2000. 21-29.
- [9] 张鹭, 王庆忠, 路福平, 等. 结核分枝杆菌菌体蛋白双向电泳技术的优化[J]. 现代生物医学进展(ZHANG Lu, WANG Qing-zhong, LU Fu-ping, *et al.* Optimizing of two dimensional chromatography technology about cytosolic protein of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2006, 6(10): 8-10, 17.
- [10] 何永红, 田晓蓓, 万呼春, 等. 变异链球菌蛋白质提取方法研究[J]. 华西口腔医学杂志(HE Yong-hong, TIAN Xiao-bei, WAN Hu-chun, *et al.* Study on protein extraction methods for *Streptococcus mutans*[J]. *West China Journal of Stomatology*), 2009, 27(1): 100-103.
- [11] 李胜军, 阎雪晶, 王舰. 单核细胞增生性李斯特菌 *fbpa* 基因敲除菌株的构建[J]. 中国医科大学学报(LI Sheng-jun, YAN Xue-jing, WANG Jian. Construction of *fbpa*-deletion mutant of *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of China Medical University*), 2009, 27(1): 100-103.
- [12] 杨捷琳, 魏黎明, 顾鸣, 等. 食源性李斯特菌蛋白质双向电泳图谱及稳定生长期细菌蛋白质分析[J]. 中国卫生检验杂志(YANG Jie-lin, WEI Li-ming, GU Ming, *et al.* Two-dimensional electrophoresis map of *Listeria monocytogenes* proteome and proteomic analysis of stationary growth phase cells[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2009, 19(3): 491-494.