

CNP2线粒体定位信号以及磷酸酯酶活性对抑制HIV-1 Gag蛋白组装作用的影响

梁顺涛 戴国瑞 李蕊 蒋栋 曾辉

【摘要】目的 研究CNP2在线粒体上的定位以及磷酸酯酶活性是否参与抑制HIV-1病毒颗粒组装。**方法** 采用RT-PCR扩增野生型CNP2编码区,插入到真核表达载体pcDNA5,构建融合蛋白Flag-CNP2的表达质粒pcDNA5-Flag-CNP2。应用融合PCR诱导突变法构建CNP1及CNP2突变表达载体。CNP表达载体分别与HIV-1假病毒包装质粒pLP1、pLP2、pLP/VSVG、pLenti6-EGFP共同瞬时转染293T细胞。集落形成实验检测上清病毒滴度,Western blot检测细胞中Gag蛋白p55、p24以及细胞培养上清中p24的表达情况。**结果** 与对照组比较,CNP2、CNP1、CNP2-S9/22A可以显著抑制细胞中病毒的释放,培养上清中病毒滴度显著降低(滴度分别为5.66、4.20、5.75、6.63 Log₁₀ IU/ml,NC组为7.65 Log₁₀ IU/ml; $t = 58.23、17.24、12.77、6.131, P = 0.0035、0.0066、0.0004、0.0039$)。CNP1抑制HIV-1病毒颗粒组装作用更强,Western blot检测培养上清中病毒蛋白完全p24消失。磷酸酯酶结构域(2HM)突变后CNP2抑制HIV-1病毒颗粒组装的作用显著降低。**结论** CNP2抑制HIV-1病毒颗粒组装需要磷酸酯酶结构域(2HM)的参与,CNP2的线粒体定位信号可能会影响其抑制HIV病毒颗粒组装的作用。

【关键词】 2', 3'-环核苷酸磷酸二酯酶; HIV-1病毒颗粒组装; 线粒体定位信号; 磷酸二酯酶活性。

Effect of mitochondrial targeting signal and phosphodiesterase activity of CNP2 on its inhibitory property against HIV-1 assembly Liang Shuntao, Dai Guorui, Li Rui, Jiang Dong, Zeng Hui. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zeng Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To confirm whether the mitochondrial targeting and phosphodiesterase activity of CNP2 affect its inhibitory ability against HIV-1 assembly. **Methods** Vector expressing wild type CNP2 with N-terminal FLAG tag was constructed by RT-PCR of CNP2 coding region from Huh7 cell and subsequently inserted into eukaryotic expressing vector pcDNA5 to get pcDNA5-Flag-CNP2. CNP1 and CNP2 mutants CNP2-S9/22A, CNP-2HM was constructed by PCR based mutagenesis and inserted into the same vector. CNP constructs was respectively transfected into 293T cell with pseudotyped HIV-1 particle assemble vectors pLP1, pLP2, pLP/VSVG, pLenti6-EGFP. Pseudotyped HIV-1 particle titer was tested by foci formation after infection of 293T cell and also estimated particle p24 by Western blot. TP55 gag precursor and p24 in transfected cell were tested by Western blot. **Results** CNP2, CNP1 and CNP2-S9/22A could potentially inhibit HIV titers in transfection supernatant ($t = 58.23, 17.24, 12.77, 6.131; P = 0.0035, 0.0066, 0.0004, 0.0039$). The inhibitory property of CNP1 without mitochondrial targeting signal was more potentially than CNP2. 2HM mutant losing phosphodiesterase activity could only minimally inhibit HIV-1 assembly.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.03.028

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31170853); 教育部留学回国启动基金(No. jwsl453); 北京市自然科学基金(No. 5162011)

作者单位: 100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所; 新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者: 曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

Conclusions CNP2 inhibition of HIV-1 assembly needs the phosphodiesterase activity, and mitochondrial targeting signal could modulate the inhibitory function.

【Key words】 2', 3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP); HIV-1 particle assembly; Mitochondrial targeting signal; Phosphodiesterase activity.

HIV感染机体后, 机体通过多种途径诱导干扰素(interferon, IFN)的表达, IFN可激活不同干扰素刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs)^[1-9]。多种ISGs通过不同的机制, 作用于HIV复制的不同阶段, 抑制HIV复制^[10-14]。

2', 3'-环核苷酸磷酸二酯酶(2', 3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, CNP)2是一种重要的ISG。CNP有两种亚型CNP1和CNP2。CNP2的N-端比CNP1多20个氨基酸残基, 具有线粒体定位信号(mitochondrial targeting signal, MTS)的能^[15-16]。有文献报道CNP2通过在细胞膜上定位干扰HIV-1 Gag蛋白组装, 抑制HIV-1病毒颗粒生成。这一作用依赖于CNP上C-端CAAX异戊二烯化结构域, 以及第72位的天冬氨酸(Asp, D), 但与磷酸二酯酶活性无关^[17]。关于线粒体定位对CNP2抑制HIV-1 Gag蛋白组装的作用是否有影响尚无研究报道。

为探讨CNP2的线粒体定位^[16]和磷酸酯酶结构域^[18-19]对其抑制HIV-1组装的作用是否有影响, 本研究采用分子克隆的方法构建CNP2野生型及其突变型真核表达载体, 分别和HIV-1假病毒包装质粒共同瞬时转染293T细胞, 通过Western blot检测p55加工情况以及上清病毒滴度变化, 比较不同CNP对HIV-1组装的影响, 研究CNP2的线粒体定位和磷酸酯酶结构域对其抑制HIV-1组装作用的影响, 报道如下。

材料与方法

一、主要试剂

Bam H I 和 *Not* I 限制性内切酶(Promega公司), T4 DNA连接酶(Promega公司); 逆转录试剂盒(Life Technologies公司)高保真PCR试剂盒Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies公司); DNA凝胶回收与纯化试剂盒(ROCHE公司); RNA提取试剂-TRIzol (Life Technologies公司); 逆转录试剂盒(ABI公司); 小提质粒试剂盒(QIAGEN公司); 质粒中提试剂盒(Machery-Nagel公司); 抗-HIV-1 p24 (Abcam公司); 抗-FLAG (SIGMA公司); 抗-GAPDH

(Santa Cruz公司); HRP标记羊抗兔抗体(Bio-Rad公司); ECL显影液(Bio-Rad公司); 转染试剂TurboFect (Thermo公司); PCR引物由北京鼎盛生物技术有限公司合成; DMEM培养基(PAN公司); FBS (Life Technologies公司)。带有FLAG序列的pcDNA5 (Life Technologies公司)质粒由本单位改建并保存。

二、实验方法

1. 野生型CNP2全长编码基因表达载体和突变载体构建

(1) 野生型CNP2全长编码基因的扩增和克隆: Huh7细胞系 2×10^6 于6孔板内, 贴壁后用IFN- α 500 IU/ml处理12 h, Trizol Reagent提取细胞总RNA。利用ABI逆转录试剂盒进行cDNA合成。以逆转录产物为模版, 采用高保真PCR试剂盒扩增CNP2野生型基因全长编码基因。在上游引物起始密码子前添加*Bam* H I 酶切位点, 下游引物终止密码子后添加了*Not* I 酶切位点, 同时添加保护碱基, 引物序列见表1。

采用DNA凝胶回收与纯化试剂盒回收PCR产物。*Bam* H I 和 *Not* I 双酶切PCR产物, 采用T4 DNA连接酶将CNP2全长基因插入至带有FLAG序列的pcDNA5质粒。连接产物转化DH5 α 感受态细菌, 挑取Amp抗性菌落扩增培养, 提取质粒酶切鉴定阳性克隆测序后, 得到重组野生型全长质粒pcDNA5-FLAG-CNP2。

(2) 融合PCR法定点诱导CNP2突变克隆: 以构建好的CNP2野生型全长编码基因载体pcDNA5-FLAG-CNP2为模版, 按照图1中CNP2突变位置, 利用表1中引物和高保真PCR试剂盒, 采用突变引物扩增来获得CNP1、CNP2-S9/22A突变片段。采用融合PCR法定点诱变磷酸酯酶2HXT结构域, 先用两个诱变引物进行扩增, 得到含有两个HXT突变位点的中间片段。凝胶回收后再用中间片段和上下游引物分别扩增, 得到上下游诱变片段。诱变片段进行融合PCR得到全长磷酸酯酶2HXT诱变片段。扩增片段经纯化, 插入质粒pcDNA5, 步骤同前, 测序后挑选序列突变正确的克隆扩增后提取质粒。

2. 细胞培养与质粒转染: 293T细胞于含10% FBS和青霉素和链霉素的DMEM培养基中, 37 °C、

5% CO₂细胞培养箱中培养。转染前1天,按照2 × 10⁶细胞/孔接种于六孔板,次日待细胞密度达到90%后转染质粒。转染方法按照试剂说明操作,将pcDNA5-FLAG-CNP2质粒以及突变质粒分别与HIV-1假病毒包装质粒pLP1、pLP2、pLP/VSVG和pLenti6-EGFP共同转染。24 h后,更换新鲜培养基,48 h后收获细胞以及上清。

3. Western blot检测细胞裂解液及培养上清中p24蛋白表达情况:转染48 h后收获细胞,采用含PMSF的RIPA裂解液裂解后,4 ℃、12 000 r/min(离心半径r = 5 cm)离心15 min,获得细胞裂解产物。将含假病毒颗粒的转染细胞培养上清750 μl缓慢置于含400 μl 20%蔗糖的PBS上,20 000 r/min、4 ℃离心、2 h弃上清,获得假病毒颗粒沉淀。细胞裂解产物以及假病毒颗粒沉淀变性后,经10% SDS-PAGE电泳分离,转移至PVDF膜上,利用抗-FLAG、抗-HIV-1 p24,检测野生型及突变型CNP2和p24的表达情况。

4. 上清病毒滴度检测:感染前1天将293T细胞接种于24孔板。第2天将含HIV-1假病毒颗粒的转染细胞上清用培养基10倍梯度稀释至1:1 000、1:10 000、1:100 000。各取200 μl病毒稀释液感染293T细胞。感染48~72 h后,荧光显微镜下计数最后两个荧光阳性孔荧光阳性细胞集落数,换算成病毒滴度,单位为TU/ml(Transducing Units per milliliter)。病毒滴度计算公式:假设后两个空内克隆数分别为X、Y则:

病毒滴度 (TU/ML) =
$$\frac{(X+10Y)0.5 \times 5}{X \text{ 孔的稀释倍数}}$$

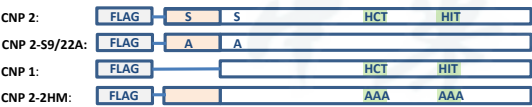


图1 CNP 2 MTS和2HXT结构域与突变型载体模式图

三、统计学处理

实验数据使用软件GraphPad Prism 5进行统计分析并绘图,各实验组上清中病毒滴度为呈正态分布的计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

结 果

一、CNP 2野生型及其突变型真核表达载体构建

CNP 2野生型及其突变型真核表达载体模式见图1。以pcDNA5-FLAG-CNP2载体为模版,采用融合PCR法进行定点诱变,获得的CNP 2突变载体pcDNA5-FLAG-CNP1、pcDNA5-FLAG-CNP2-S9/22A和pcDNA5-FLAG-CNP2-2HM突变型载体,经过Bam H I、Not I限制性内切酶酶切后,凝胶电泳,酶切片段大小与预测大小一致(图2)。测序鉴定证实诱变序列与预期突变一致且没有其他突变引入(图3)。

二、CNP2以及突变载体抑制HIV-1 Gag蛋白组装的影响

为研究CNP2抑制Gag蛋白组装的影响,本研究将pcDNA5-Flag-CNP2质粒以及突变质粒分别与HIV-1假病毒包装质粒pLP1、pLP2、pLP/VSVG、pLenti6-EGFP共同转染293T细胞。稀释法检测细胞上清中的病毒滴度发现(图4):CNP2、CNP1和CNP2-S9/22A可以显著抑制细胞中病毒的释放,培养上清中病毒滴度显著降低, ($t = 58.23、17.24、12.77, P = 0.0035、0.0066、0.0004$)。不含线粒体定位信号的CNP1抑制HIV-1组装作用显著增强,而磷酸酯酶结构域突变后(2HM),CNP2抑制细胞中病毒释放作用显著降低(图4)。

本研究同时采用Western blot检测转染细胞上清和细胞裂解液,发现CNP1转染细胞上清HIV-1

表 1 扩增 CNP2、CNP2-S9/22A、CNP1 和 CNP2-2HM 等片段所需引物

引物名称	序列
Bam H I -CNP2+	5'-CACGGATCCATGAACAGAGGCTTCTCCCG-3'
Bam H I -CNP2-S9/22A+	5'-CACGGATCCATGAACAGAGGCTTCTCCCGAAAAAGCCACACATTCCTGCCCAAGATCTTCTTC CGCAAGATGGCATCCTCAGGGGCCAAGGACAAG-3'
Bam H I -CNP1+	5'-CACGGATCCATGTCATCCTCAGGGGCCAAG-3'
CNP2-2HM+	5'-GGAAAGAGACCCCCAGGCGTGCTGGCTGCGCAACCAAGTTTGTGACTACGGG-3'
CNP2-2HM-	5'-CTACGTCAGTGCACAGCCGAGGGCGGCGCGGCGCGGCTCCCCCGCGGCAAG-3'
Not I -CNP2-	5'-CACGCGCGCGCTCATATGATGGTGCAGGACT-3'

注:引入的内切酶位点和突变碱基以下划线表示,序列参考 GenBank: NM_033133

p24显著减少(图5)。而CNP1转染细胞内p55最多,提示Gag蛋白组装被明显抑制而滞留在细胞内。由于Western blot的定量功能不理想,其他各组间差异不明显,但与上清中病毒滴度实验结论基本一致。磷酸酯酶活性结构域突变后(2HM)抑制HIV-1组装能力显著降低,提示CNP2的抑制能力依赖于磷酸酯酶2HXT结构域。

讨 论

干扰素可以诱导多种ISGs,作用于HIV复制的不同阶段,最终抑制HIV复制^[10, 12, 20-23]。如SAMHD1可降低细胞内dNTP浓度并降解HIV逆转录产物;BST2可阻止HIV病毒颗粒的释放^[24];

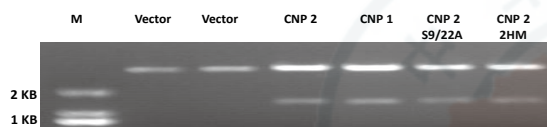


图2 阳性克隆质粒酶切鉴定结果

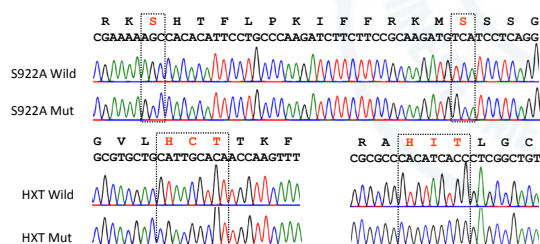


图3 阳性克隆质粒代表性测序结果

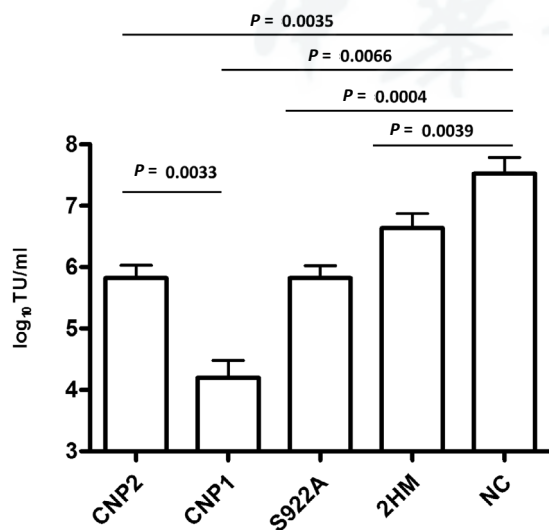


图4 CNP2及突变型载体对细胞上清中病毒滴度的影响

APOBEC3G可对HIV负链DNA合成过程中使胞嘧啶脱氨基而使病毒基因突变;而TRIM5a可通过CypA与CA相作用,抑制病毒的脱壳^[25]。

CNP作为一种ISG,其抗病毒结构效应关系还不十分明确,关于线粒体定位信号对CNP2抑制HIV-1 Gag蛋白组装的作用是否有影响未有研究报道。本研究发现CNP2、CNP1、CNP2-S9/22A可以显著抑制细胞中病毒的释放,CNP1抑制HIV组装作用最强;而磷酸酯酶结构域突变后(2HM),CNP2抑制细胞中病毒释放作用显著降低。

HIV-1假病毒颗粒包装模型是研究HIV包装的理想模型,能够模拟Gag蛋白定位、聚合、不成熟病毒颗粒包装和病毒颗粒成熟等HIV复制过程^[26]。既往研究利用该模型证明CNP2有抑制HIV-1病毒颗粒组装的作用^[17]:①CNP2在细胞膜上通过直接和Gag蛋白的基质蛋白MA结构域相互结合结合,抑制Gag蛋白聚合组装成病毒颗粒,进而抑制HIV-1的成熟与释放。②CNP2抗病毒作用依赖于CNP上C-端CAAX异戊二烯化结构域(该结构域帮助CNP结合到膜结构),也依赖于第72位的天冬氨酸(Asp, D)(该氨基酸直接与HIV Gag蛋白相互作用),而与磷酸二酯酶(2HM)活性无关。

CNP有两种亚型CNP1和CNP2。CNP1(401 aa, 46 kD)表达于神经细胞,参与髓鞘的形成。CNP2(421 aa, 48 kD)N-端较CNP1多20个氨基酸,在神经细胞和其他细胞中均表达。CNP2 N-端的20个氨基酸残基具有MTS的功能,CNP2进入线粒体后MTS被切除,大小和CNP1无法区分。N-端9号、22号磷酸化位点可被蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)磷酸化,磷酸化后导致CNP2无法进入线粒体^[16]。

本研究初步发现,不含线粒体定位信号的CNP1抑制HIV-1 Gag蛋白组装的作用最强(图4~5),原因可能与CNP2进入线粒体后无法再转运至细胞膜与Gag蛋白结合有关,而CNP1不定位到线粒体,直接定位到细胞膜参与对HIV-1病毒颗粒

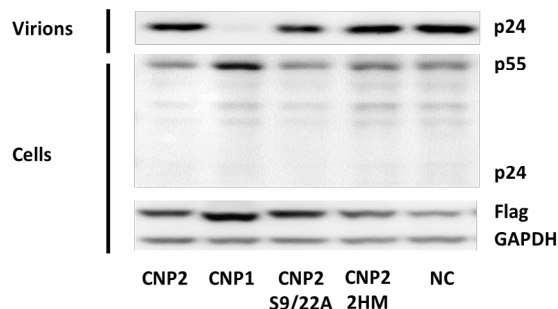


图5 转染CNP2及其突变载体对抑制Gag蛋白组装的影响

组装的抑制作用。但CNP1在细胞内的来源尚未明确:①CNP1来自与自身mRNA和CNP2 mRNA的翻译。网织红细胞裂解液体外翻译研究证实,CNP2的mRNA不仅能表达CNP2还能表达CNP1^[27]。②CNP1来自CNP2在线粒体内的加工^[16]。在Hela细胞系中转染CNP2载体后行Western blot检测有46 kD和48 kD两条带,用CCCP阻断其进入线粒体后无46 kD的条带,所以认为CNP1来自CNP2的加工。CNP2 mRNA的21号氨基酸(CNP1的起始密码子)突变后仍然能够在转染细胞内出现CNP1,是因CNP2在线粒体内加工生成CNP1。关于CNP1在细胞内的来源和加工定位还有待进一步研究。考虑到CNP2线粒体定位信号前有FLAG标签蛋白,可能会影响CNP2与线粒体的定位,以上结论还需进一步研究证实。

本研究还发现,磷酸酯酶活性结构域也会影响CNP2抑制HIV-1假病毒颗粒组装的作用,与文献报道矛盾;虽然本研究重复的实验结果均保持一致结论,但是研究结论还需进一步确认。

参 考 文 献

- Nasr N, Maddocks S, Turville SG, et al. HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production[J]. *Blood*,2012,120(4):778-788.
- Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells[J]. *Cell*,2009,139(3):499-511.
- Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions[J]. *Curr Opin Viro*,2011,1(6):519-925.
- Rosa A, Chande A, Ziglio S, et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation[J]. *Nature*,2015,526(7572):212-217.
- Powell RD, Holland PJ, Hollis T, et al. Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase[J]. *J Bio Chem*,2011,286(51):43596-43600.
- Pincetic A, Kuang Z, Seo EJ, et al. The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process[J]. *J Virol*,2010,84(9):4725-4736.
- Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV[J]. *Science*,2014,343(6169):428-432.
- Goncalves A, Karayel E, Rice GI, et al. SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to aicardi-goutieres syndrome-associated mutations[J]. *Hum Mutat*,2012,33(7):1116-1122.
- Gao P, Ascano M, Wu Y, et al. Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase[J]. *Cell*,2013,153(5):1094-1107.
- Yu J, Li M, Wilkins J, et al. IFITM proteins restrict HIV-1 infection by antagonizing the envelope glycoprotein[J]. *Cell Rep*,2015,13(1):145-156.
- White TE, Brandariz-Nunez A, Valle-Casuso JC, et al. Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1[J]. *Virology*,2013,436(1):81-90.
- Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef[J]. *Nature*,2015,526(7572):218-223.
- Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway[J]. *Science*,2013,339(6121):786-791.
- Seo JY, Yaneva R, Hinson ER, et al. Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity[J]. *Science*,2011,332(6033):1093-1097.
- Wu CY, Lu J, Cao Q, et al. Expression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the amoeboid microglial cells in the developing rat brain[J]. *Neuroscience*,2006,142(2):333-341.
- Lee J, O'Neill RC, Park MW, et al. Mitochondrial localization of CNP2 is regulated by phosphorylation of the N-terminal targeting signal by PKC: implications of a mitochondrial function for CNP2 in glial and non-glial cells[J]. *Mol Cell Neurosci*,2006,31(3):446-462.
- Wilson SJ, Schoggins JW, Zang T, et al. Inhibition of HIV-1 particle assembly by 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase[J]. *Cell Host Microbe*,2012,12(4):585-597.
- Gravel M, Robert F, Braun PE. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a novel RNA-binding protein that inhibits protein synthesis[J]. *J Neurosci Res*,2009,87(5):1069-1079.
- Mylykoski M, Itoh K, Kangas SM, et al. The N-terminal domain of the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: direct molecular interaction with the calcium sensor calmodulin[J]. *J Neurochem*,2012,123(4):515-524.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood[J]. *Science*,1999,284(5421):1835-1837.
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. *Nature*,2011,472(7344):481-485.
- Esper L, Degols G, Mechti N. Interferon-induced exonuclease ISG20 exhibits an antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1[J]. *J Gen Virol*,2005,86(Pt 8):2221-2229.
- Doitsh G, Galloway NL, Geng X, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection[J]. *Nature*,2014,505(7484):509-514.
- Gao D, Wu J, Wu YT, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses[J]. *Science*,2013,341(6148):903-906.
- Denner J, Eschricht M, Lauck M, et al. Modulation of cytokine release and gene expression by the immunosuppressive domain of gp41 of HIV-1[J]. *PloS One*,2013,8(1):e55199.
- Beloglazova N, Flick R, Tchigvintsev A, et al. Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction[J]. *J Bio Chem*,2013,288(12):8101-8110.
- Ryan C, O'Neill JM, Peter EB. CNP2 mRNA Directs Synthesis of Both CNP1 and CNP2 Polypeptides[J]. *J Neurosci Res*,1997,50(2):248-257.

(收稿日期: 2015-08-27)

(本文编辑: 孙荣华)

梁顺涛, 戴国瑞, 李蕊, 等. CNP2线粒体定位信号以及磷酸酯酶活性对抑制HIV-1 Gag蛋白组装作用的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(3):380-384.