

犬黑皮质素受体4真核表达载体的构建及表达

王光川, 巴彩凤*, 苏荣健, 张轶博, 赵微, 宋慧娟, 武洁

(1. 辽宁医学院实验动物中心, 辽宁锦州 121001; 2. 辽宁医学院省高校分子细胞生物学与新药开发重点实验室, 辽宁锦州 121001; 3. 辽宁医学院免疫与病原生物学教研室, 辽宁锦州 121001; 4. 辽宁医学院附属第一医院病理科, 辽宁锦州 121001)

摘要 [目的] 构建带myc和Hs标签的犬黑皮质素受体4真核表达载体并在MDCK细胞中进行表达。[方法] 以犬MC4R基因组DNA为模板PCR扩增目的基因编码区, 将扩增产物进行T-A克隆; 酶切、测序鉴定成功后将目的基因亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1-myc-Hs/A。重组体pcDNA3.1-myc-Hs/A-cMC4R经酶切和测序鉴定; 采用FuGENE HD介导转染技术将重组体导入MDCK细胞; 转染后继续培养72 h, 提取细胞内总RNA, RT-PCR鉴定目的基因的表达; 提取细胞总蛋白, Western Blot检测蛋白表达。[结果] 构建带标签的pcDNA3.1-myc-Hs/A-cMC4R重组真核表达载体, 测序结果与GenBank公布的序列相似性为99%。RT-PCR和Western Blot检测到目的基因表达。[结论] 成功构建犬真核表达载体pcDNA3.1-myc-Hs/A-MC4R, 重组体能在MDCK细胞中表达。

关键词 犬; 黑皮质素受体4; 真核表达载体; MDCK细胞

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13564-04

Construction and Expression of Eukaryotic Expression Vector of Canine Melanocortin Receptor-4

WANG Guangchuan et al (Experimental Animal Center, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001)

Abstract [Objective] The research aimed to construct the eukaryotic expression vector of canine melanocortin receptor-4 with myc and Hs tags and express in MDCK cells. [Method] With the genomic DNA of canine MC4R as template, the coding region of target gene was amplified by using PCR and T-A clone was made on the amplification products. After successful identification by enzyme digestion and sequencing, the target gene was subcloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1-myc-Hs/A vector. The recombinant pcDNA3.1-myc-Hs/A-Caris MC4R was identified by enzyme digestion and sequencing. The recombinant was introduced into MDCK cells by using FuGENE HD transfecting technique. After 72 h culture, total RNA was extracted from cells and the expression of target gene was identified by using RT-PCR. Total cellular protein was extracted and the protein expression was detected by Western Blot. [Result] The recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1-myc-Hs/A-Caris MC4R with tags was constructed. The similarity between the sequenced results and the reported sequence on GenBank website was 99%. The expression of target gene was detected by RT-PCR and Western Blot. [Conclusion] The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-myc-Hs/A-Caris MC4R was successfully constructed and the recombinant could express in MDCK cell.

Key words Caris; Melanocortin receptor 4; Eukaryotic expression vector; MDCK cell

黑素皮质素受体(Melanocortin receptor, MCR)包括5种亚型(MC1R-MC5R), 均属于G蛋白耦联受体超家族成员, 具有7次跨膜结构。其中MC4R(Melanocortin receptor 4)主要分布在下丘脑腹内侧核、弓状核和脑干等部位; 另外大鼠的心脏、肺肾和生殖器官也有表达^[1]。MC4R的功能主要是控制食欲和维持体重稳态。犬MC4R基因位于1号染色体上(CFA1q1.1), 由单一外显子组成, 编码332个氨基酸^[2]。自从1993年Gantz等成功克隆出人MC4R基因以来, 小鼠、大鼠、猪、鸡、牛、犬、狐狸等MC4R基因也相继被克隆; 研究发现MC4R基因在各物种之间具有高度的同源性^[2-3]。

肥胖是一个全球性健康问题, 已对人类构成严重威胁。肥胖能增加罹患很多常见疾病的危险, 包括糖尿病、心脏病、代谢综合征、高血压、中风和某些癌症^[4]。据国际肥胖调查小组统计, 全世界有11亿超重成年人, 其中包括3.2亿肥胖人^[5]。寻找人类肥胖的遗传背景成为治疗和预防肥胖发生的重要内容。由于犬品种表型多样性, 使得犬成为研究人类肥胖发生的较理想动物模型^[2]。为了探讨犬MC4R基因信号通路和肥胖的关系, 该研究成功构建了真核表达载体pcDNA3.1-myc-Hs/A-cMC4R, 并将重组体转染到MDCK细胞内进行表达, 为犬MC4R信号传导研究奠定了基础。

基金项目 辽宁省科技基金项目(2007408001-6)。

作者简介 王光川(1981-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向: 细胞分子生物学。* 通讯作者, 硕士生导师, 教授, E-mail: bacaifeng@163.com。

鸣谢 赵微、李宏丹、武洁在实验工作中提供帮助, 宋慧娟在论文初稿修改中提出宝贵意见。

收稿日期 2008-08-15

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞系。真核表达载体pcDNA3.1-myc-Hs/A由辽宁医学院科学实验中心苏荣健博士馈赠; 大肠杆菌DH5及克隆载体pMD18-T购自宝生物工程(大连)有限公司; MDCK细胞株购自北京协和医科大学细胞中心。

1.1.2 主要试剂。Beagle犬新鲜血液由沈阳药科大学提供; rTaq DNA聚合酶、X-Gal、IPTG、限制性内切酶Xho、BamHI、DNA Marker(100、100~6000 bp)、T₄ DNA连接酶、RNA PCR Kit (AMM) Ver.3.0购自TaKaRa公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自英国Oxoid公司; 琼脂糖购自Promega公司; AxyPrep血基因组DNA小量试剂盒、AxyPrep质粒小量提取试剂盒、AxyPrep凝胶回收试剂盒购自Axygen公司; Trizol Reagent、DMEM培养基、Anti-myc Antibody购自Invitrogen公司; G418抗生素、FuGENE HD转染试剂盒购自Roche公司; 胎牛血清购自Hydrolone公司; 其余试剂均由辽宁医学院科学实验中心提供。PCR引物、RT-PCR引物、重组质粒上目的基因的序列测定由上海生物工程技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。根据GenBank上犬MC4R基因(登录号: DQ084210)序列, 利用生物软件Primer 5.0和Oligo 6.0设计扩增犬MC4R编码区的引物。引物序列如下, 上游引物P1: 5'-CGGGATCCGCCAGGATGAACCTCCACCCCTTCAGC-3'; 下游引物P2: 5'-CCGCTCGAGGATCTGCTAGACAAGTCAC-3'。上游引物包含BamHI酶切位点(斜体)、Kozak序列(下划线)和起始密码子ATG; 下游引物包含XhoI酶切位点(斜体), 去除终止密码子TAG; 扩增基因长度为1019 bp。

1.2.2 犬基因组 DNA 的提取及目的基因的扩增。应用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒提取犬基因组 DNA。以犬基因组 DNA 为模板,用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增犬 MC4R 基因编码区,反应体系为 20.0 μ l,其中上下游引物各 1.0 μ l (4 μ mol/L),dNTP 1.0 μ l (10 mmol/L),模板 DNA 0.5 μ g,10 \times PCR Buffer 2.0 μ l,MgCl₂ 1.0 μ l (25 mmol/L),rTaq DNA 聚合酶 1 U,超纯水补齐。反应条件为:94 预变性 5 min,94 30 s,60 30 s,72 70 s,共 30 个循环,最后 72 延伸 10 min。反应完毕后取 20.0 μ l 扩增产物,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并利用 Axygen 公司的凝胶回收试剂盒进行凝胶回收和纯化,回收后取 2.0 μ l 电泳检测。

1.2.3 PCR 产物的 TA 克隆及测序。将回收的 PCR 产物克隆到 pMD18-T Vector 上,命名为 pMD18-T-cMC4R,并把 pMD18-T-cMC4R 转化到 DH5 感受态细胞,经蓝白斑筛选挑取白色菌落;质粒提取试剂盒提取质粒后,用 BamHI 和 Xho I 进行双酶切鉴定,将阳性质粒送上海生工生物工程有限公司测序。测序结果与 GeneBank 公布的犬 MC4R 编码基因序列比较。

1.2.4 重组真核表达载体的构建及测序。把 T-A 克隆的阳性质粒和真核表达载体 pcDNA3.1/myc-Hs A 分别用 BamHI 和 Xho I 进行双酶切、电泳、胶回收目的片段。在 T₄ DNA 连接酶作用下,将 pcDNA3.1/myc-Hs A 和 MC4R 目的片段在 16 反应 14 h。连接产物转化到 DH5 感受态细胞,在氨苄青霉素抗性平板上筛选生长,挑取单克隆菌落进行鉴定。鉴定成功的阳性菌送上海生工生物工程有限公司测序。测序正确后扩大培养,抽提重组质粒 DNA。

1.2.5 MDCK 细胞的基因转染。将处于对数生长期的 MDCK 细胞重悬于完全培养基中,以 6×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h,使细胞达到约 80% 融合。用 FuGENE HD 试剂盒介导空质粒及重组质粒转染细胞。具体方法按 FuGENE HD 转染试剂说明书进行。转染 24 h 后,再向每孔加入 2 ml 完全培养液,继续培养 24~48 h,弃培养液,收集细胞检测。

1.2.6 RT-PCR 检测基因表达。转染 72 h 后,利用 Trizol 试剂盒法分别提取未转染的 MDCK 细胞、空载体转染的细胞和 MC4R 重组体转染的细胞的总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。RNA PCR Kit (AMM) Ver.3.0 试剂盒进行 RNA 反转录,具体操作步骤按说明书进行。以 cDNA 为模板用 P1 和 P2 为引物进行 PCR 反应,反应体系和反应条件同前。反应完毕后取 20 μ l 扩增产物,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 Western Blot 检测蛋白表达。转染 72 h 后,用 EDTA-胰酶分别消化未转染的 MDCK 细胞、空质粒转染的细胞及 MC4R 重组体转染的细胞并提取蛋白质。用分光光度计对蛋白质进行定量检测。按常规方法灌胶,每道点样 20 μ l (50 μ g) 蛋白质,100 V 电压电泳 1.5 h,然后将凝胶上的蛋白质转印至 PVDF 膜上 (100 V,1 h),用含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST (含 5 ml/L Tween-20 的 PBS 溶液) 室温封闭 2 h。在 5 ml 含 20 g/L 脱脂奶粉的 PBST 中,加入 50 μ l 的 Hs 抗体 (1:5 000 稀释),将转印过的膜置于其中,4 摇床 (100 r/min) 孵育过夜,然后与碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗 (1:3 000 稀释) 室温反应 1.5 h,BCIP/NBT 显色液显色 10 min。

2 结果与分析

2.1 犬基因组 DNA 的获取 取 Beagle 犬新鲜全血,用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒提取基因组 DNA。1% 的琼脂糖凝胶电泳结果显示 (图 1),犬基因组 DNA 条带清晰、完整、无拖尾现象。

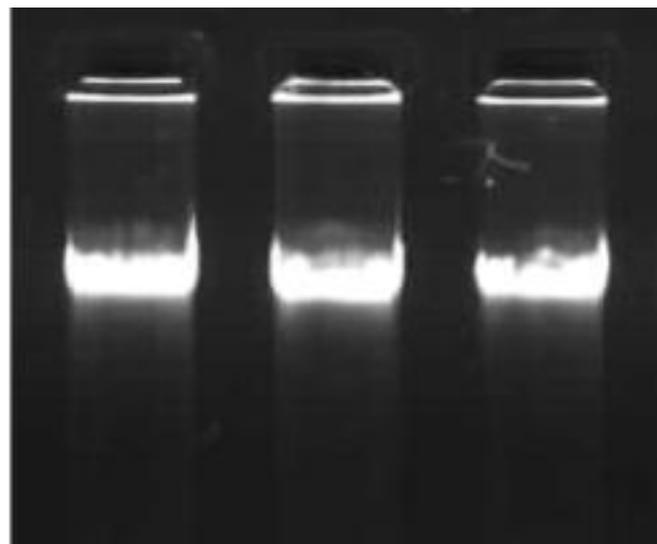
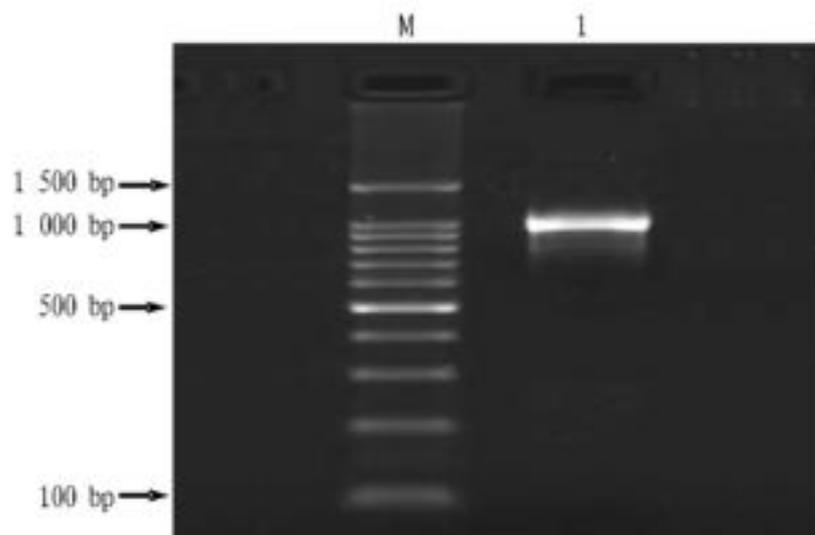


图1 1%琼脂糖凝胶分离犬基因组 DNA 结果

Fig.1 The results of the genomic DNA separated from caris by 1% agarose gel electrophoresis



注:1 为犬 MC4R 编码序列;M 为 100 bp DNA 分子量对照。

Note:1, Coding sequence of caris MC4R; M, 100 bp DNA molecular weight maker.

图2 犬 MC4R PCR 产物电泳分析

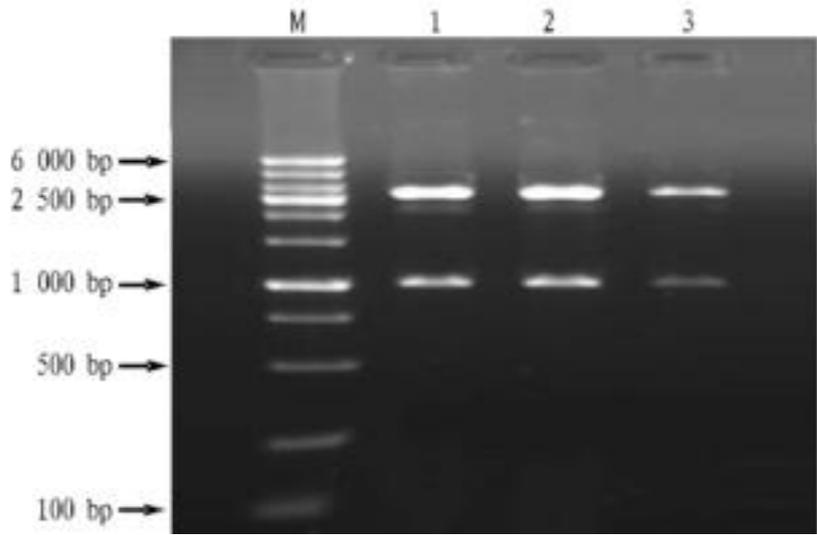
Fig.2 The electrophoresis analysis of PCR product of caris MC4R

2.2 犬 MC4R 编码基因的 PCR 产物电泳分析 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示 (图 2),PCR 产物为约 1 000 bp 的均一条带,与预期扩增产物大小基本一致,且无非特异性扩增条带。

2.3 pMD18-T-cMC4R 载体的酶切鉴定及测序 pMD18-T 载体的分子量为 2.7 kb 左右,PCR 扩增产物为 1.0 kb 左右,可以预测 pMD18-T-cMC4R 的大小约为 3.7 kb,提取的 pMD18-T-cMC4R 质粒用 BamHI 和 Xho I 进行双酶切,经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果与预测结果一致 (图 3)。测序结果证实扩增的目的基因片段与 GenBank 上公布的犬 MC4R 基因序列的相似性达 99%,仅 1 个碱基不同 (第 777 位碱基 T C)。基因序列用 Primer5.0 翻译成蛋白质后,再与 GenBank 公布的蛋白质序列比较,氨基酸序列完全相同。测序结果说明目的基因片段是犬 MC4R 编码基因序列。

2.4 重组真核表达载体 pcDNA3.1-myc-Hs/A-cMC4R 酶切鉴定及测序 pcDNA3.1-myc-Hs/A 分子量为 5.5 kb 左右,T-A 克隆回收目的片段为 1 000 bp 左右,可以预测 pcDNA3.1-myc-Hs/A-cMC4R 的大小约为 6.5 kb。提取的重组表达载体

用 BamHI 和 Xho I 进行双酶切,经1%琼脂糖凝胶电泳结果与预测结果一致(图4)。测序结果同T A 克隆测序结果,仅1个碱基不同(第777 位碱基T C)(图5)。测序结果说明重组真核表达载体构建成功。

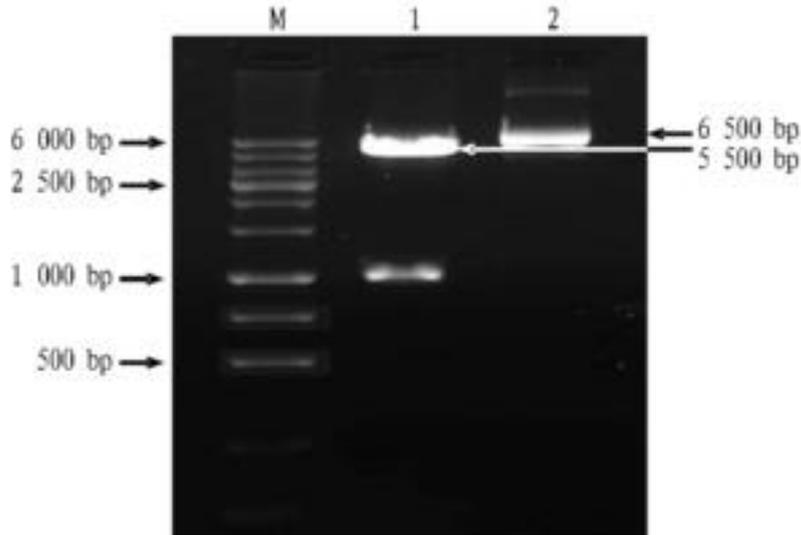


注:M为100~6000 bp DNA 分子量对照;1,2,3 为 pMD18-T-MC4R 经 Xho I/ BamHI 酶切产物。

Note:M,100-6000 bp DNA molecular weight marker;1,2 and 3 are the enzyme digestion products of pMD18-T-MC4R with Xho I/ BamHI.

图3 pMD18-T-MC4R 酶切检测结果

Fig.3 The enzyme digestion results of pMD18-T-MC4R



注:1 为 pcDNA3.1-myc-Hs/AcMC4R 经 Xho I/ BamHI 酶切产物;2 为 pcDNA3.1-myc-Hs/AcMC4R 重组质粒;M 为 100~6000 bp DNA 分子量对照。

Note:1,The enzyme digestion products of pcDNA3.1-myc-Hs/AcMC4R with Xho I/ BamHI;2,The recombinant plasmid pcDNA3.1-myc-Hs/AcMC4R;3,100-6000 bp DNA molecular weight marker.

图4 重组质粒 pcDNA3.1-myc Hs/AcMC4R 检测结果

Fig.4 The detection results of the recombinant plasmid pcDNA3.1-myc Hs/AcMC4R

```

Query 661 CTGCACATCAAGAGAATCGCCGTCCTCCCGGGCACCGGCACCATCCGCCAAGGGGCCAAC 720
          |||
Sbjct 779 CTGCACATCAAGAGAATCGCCGTCCTCCCGGGCACCGGCACCATCCGCCAAGGGGCCAAC 838

Query 721 ATGAAGGGTGCCATTACCTTGACCATACTCATTGGGGTCTTCGTCGTCTGCTGGGGCCCA 780
          |||
Sbjct 839 ATGAAGGGTGCCATTACCTTGACCATACTCATTGGGGTCTTCGTCGTCTGCTGGGGCCCA 898

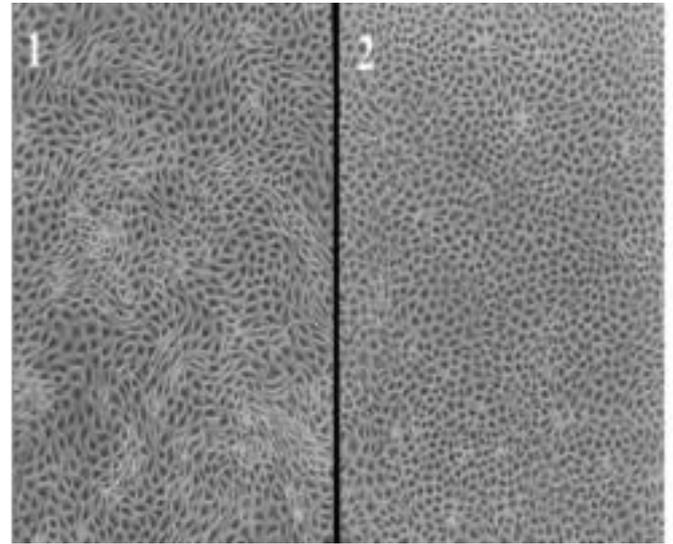
Query 781 TTCTTCCTCCACTTGATATTCTACATCTCTTGTCCCCAGAAATCCATACTGTGTGTGCTTC 840
          |||
Sbjct 899 TTCTTCCTCCACTTGATATTCTACATCTCTTGTCCCCAGAAATCCATACTGTGTGTGCTTC 958
    
```

图5 犬 MC4R 测序结果

Fig.5 The sequencing results of canis MC4R

2.5 重组体转染 MDCK 细胞及 RT-PCR 检测目的基因的表达 重组真核表达载体 pcDNA3.1-myc-Hs/AcMC4R 经 FuGENE HD 转染试剂导入 MDCK 细胞(图6);培养72 h 后,提取细胞的总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测(图7),条带规则,无拖

尾现象,说明提取的 RNA 质量较好,满足进一步实验要求;利用 RNA PCR Kit (AMM) Ver.3.0 试剂盒进行 RT-PCR 检测,1%琼脂糖凝胶电泳结果显示(图8),未转染细胞组和空载体转染细胞组在1000 bp 处未发现明显条带,说明目的基因未表达;转染重组体组在1000 bp 左右处有亮带,说明目的基因获得表达,这和文献报道的 MC4R 主要在下丘脑表达一致。

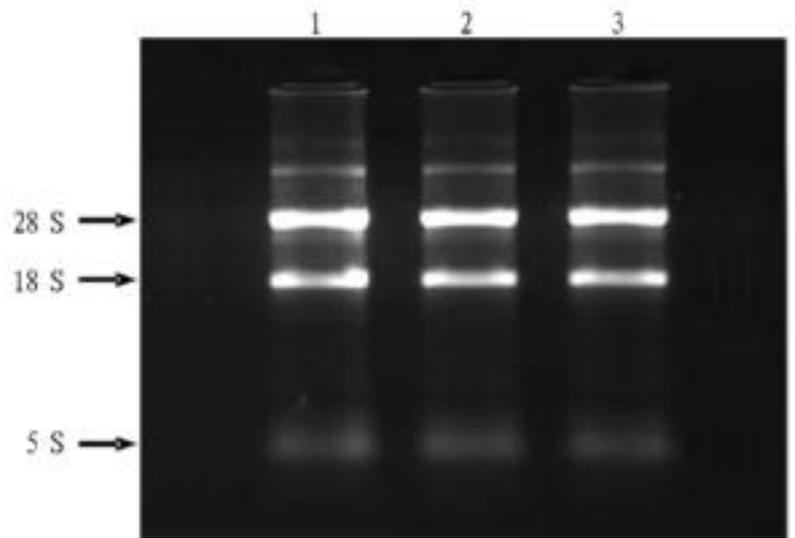


注:1 为普通光下未转染的细胞(100 x);2 为普通光下转染72 h 以后的细胞(100 x)。

Note:1,The non-transfected cells under ordinary light(100 x);2,The transfected cells under ordinary light after 72 h(100 x).

图6 MDCK 细胞

Fig.6 MDCK cells



注:1 为转染重组体的 MDCK 细胞的总 RNA;2 为转染空载体的 MDCK 细胞的总 RNA;3 为未转染的 MDCK 细胞的总 RNA。

Note:1,Total RNA from the transfected MDCK cells with recombinant;2,Total RNA from the transfected MDCK cells with empty vector;3,Total RNA from non-transfected MDCK cells.

图7 MDCK 细胞总 RNA 电泳分析

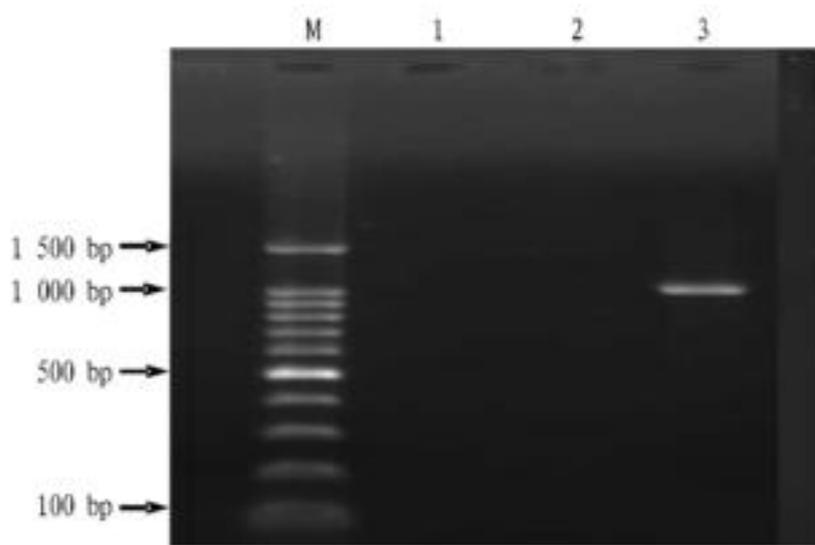
Fig.7 The electrophoresis analysis of total RNA from MDCK cells

2.6 Western Blot 检测蛋白表达 犬 MC4R 基因编码蛋白为332 个氨基酸,分子量为36.9 kDa。载体上面的融合标签大小约为3 kDa,推测重组体表达的融合蛋白大小为40 kDa 左右。Western Blot 检测蛋白表达结果见图9,融合蛋白在40 kDa 处显示亮带,空载体和未转染组没有亮带,由于 myc 基因为癌基因,细胞本身也有少量表达,所以空载体和未转染细胞组在40 kDa 处有暗带。

3 讨论

近年来从基因水平上寻找导致肥胖发生的机制越来越受到人们的关注。现已报道127 个基因编码的蛋白质或多肽与该病发生相关^[5]。其中 MC4R 突变是人类单基因突变肥胖病中最常见的病因,重度肥胖中发病率在3.0%~

6.3%,且大部分呈显性遗传^[6]。自从1998年Yeo等^[7-8]先后报道了2例人MC4R移码突变导致的严重肥胖以来,到目前为止大量MC4R编码区突变位点被报道与肥胖有关。

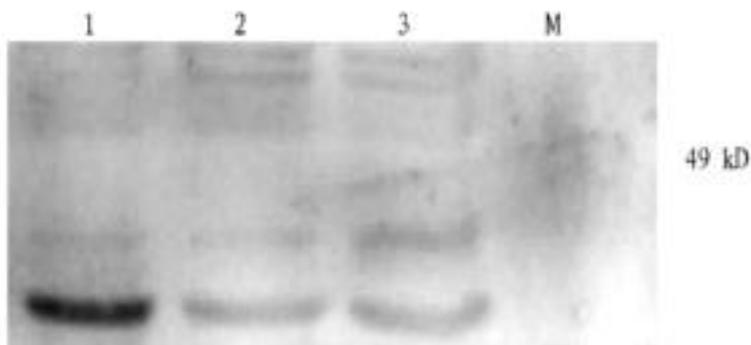


注:M为100 bp DNA分子量对照;1为未转染的MDCK细胞RT-PCR结果;2为转染空载体的MDCK细胞RT-PCR结果;3为转染重组体的MDCK细胞RT-PCR结果。

Note: M, 100 bp DNA molecular weight maker; 1, RT-PCR results of non-transfected MDCK cells; 2, RT-PCR results of the transfected MDCK cells with empty vector; 3, RT-PCR results of the transfected MDCK cells with recombinant.

图8 犬MC4R RT-PCR产物电泳分析

Fig.8 The electrophoresis analysis of RT-PCR products of canine MC4R



注:1为转染重组体的细胞;2为转染空载体的细胞;3为未转染的细胞;M为蛋白分子量标准。

Note: 1, The transfected cells with recombinant; 2, The transfected cells with empty vector; 3, Non-transfected cells. M, Protein molecular weight marker.

图9 Western Blot检测融合蛋白表达结果

Fig.9 The detection of fusion protein expression by Western Blot

MC4R参与体重调节的信号通路主要有cAMP途径和p44/42MAPK途径。目前研究较多的是G蛋白介导的经典信号传导途径。当配体(如激动剂或拮抗剂)与MC4R结合激活腺苷酸环化酶(AC),影响cAMP的含量。当cAMP增加时,体重减少,抑制肥胖的发生;而cAMP减少时,体重增加。MC4R基因突变以后,使cAMP的含量降低,体重增加,从而导致肥胖^[9]。Daniels等研究报道,无论是在大鼠下丘脑内的MC4R还是体外的MC4R都参与激活p44/42MAPK激酶过程^[10-11]。p44/42MAPK可以激活转录因子改变基因表达^[12]。最近的研究表

明,黑皮质素介导的2h食物摄取过程中,p44/42MAPK是必需的。而且p44/42MAPK参与由MC4R介导的减少食物摄入过程^[13]。

尽管研究已经证实MC4R突变是导致严重肥胖的单基因效应,信号传导途径也有报道,但是信号通路之间存在许多联系,人MC4R激活p44/42MAPK途径不依赖PKA,使用腺苷酸环化酶的抑制剂2,5-DDA不仅使cAMP途径失活,也阻断了有激动剂诱导的p44/42MAPK途径^[12]。cAMP通路和MAPK通路之间是如何联系的?他们之间信号是怎么传递的?对于这两个通路之间的相互关系研究尚未透彻。由于没有商品化的犬MC4R单克隆抗体,只能通过检测标签的表达来检测目的基因的表达水平,因此该实验中,笔者选择了带标签的真核表达载体pcDNA3.1-myc-Hs/A,利用基因克隆和载体构建技术成功构建了真核表达载体pcDNA3.1-myc-Hs/A-cMC4R,经测序比对证实基因序列正确,满足进一步实验要求;同时选择了与目的基因具有种属一致性的MDCK细胞,利用基因转染技术将目的基因转染到该细胞内,通过RT-PCR、Western Blot检测基因表达,证实重组基因能够在MDCK细胞内表达,这为下一步探讨MC4R信号通路研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 聂茹,巴彩凤,李会,等.犬黑皮质素受体4真核表达载体的构建及在COS7细胞中的表达[J].安徽农业科学,2007,35(33):10608-10610.
- [2] SKORCZYK A, STACHOWAK M, SZCZERBAL I, et al. Polymorphism and chromosomal location of the MC4R (melanocortin-4 receptor) gene in the dog and red fox[J]. Gene, 2007, 392: 247-252.
- [3] 张轶博,巴彩凤,苏玉虹,等.黑素皮质素受体-4的研究进展[J].中国实验动物学报,2005,13(1):59-63.
- [4] FRAYLING T M, TIMPSON N J, WEEDON M N, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity[J]. Science, 2007, 316: 889-894.
- [5] YANG W J, KELLY T, JIANG H. Genetic epidemiology of obesity[J]. Epidemiol Rev, 2007, 29: 49-61.
- [6] 邵新宇,贾伟平,蔡妹冰,等.人黑皮质素4受体F261S突变基因的克隆和功能验证[J].中华医学杂志,2005,85(6):366-369.
- [7] YEOGS, FAROOQI S, AMINANS, et al. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity[J]. Nat Genet, 1998, 20: 111-112.
- [8] VASSE C, CLEMENT K, GUY-GRAND B, et al. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity[J]. Nat Genet, 1998, 20: 113-114.
- [9] SHINYAMA H, MASUZAKI H, FANG H, et al. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: Agonist-mediated desensitization and internalization[J]. Endocrinology, 2003, 144(4): 1301-1314.
- [10] DANIELS D, PATTEN C S, ROITH J D, et al. Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus[J]. Brain Res, 2003, 986: 1-11.
- [11] VONCS A, LYNN N M, ROSENBLUM C I. Activation of MAP kinase by MC4R through H3 kinase[J]. Regul Pept, 2004, 120: 113-118.
- [12] PATTEN C S, DANIELS D, SUZUKI A, et al. Structural and signaling requirements of the human melanocortin-4 receptor for MAP kinase activation[J]. Regul Pept, 2007, 142: 111-122.
- [13] SUTTON G M, DUCS B, PATTERSON L M, et al. Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus[J]. Endocrinology, 2005, 146: 3739-3747.