

O 型口蹄疫病毒 VP3 蛋白的可溶性表达与反应原性分析

刘运超¹,冯丽丽²,赵宝磊^{1,3},陈玉梅^{1,4},姬鹏超¹,王聚财^{1,3},邓瑞广¹,张改平^{1,3*}

(1.河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室/农业部动物免疫学重点开放实验室,河南 郑州 450002;
2.河南省农业科学院 农业经济与信息研究所,河南 郑州 450002; 3.河南农业大学 牧医工程学院,
河南 郑州 450002; 4.郑州大学 基础医学院,河南 郑州 450001)

摘要:按照大肠杆菌密码子偏爱性优化合成了 O 型口蹄疫病毒(FMDV)结构蛋白 VP3 基因,将该基因亚克隆到原核表达载体 pE-SUMO 中,构建重组表达质粒 pSUMO-VP3,将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)并诱导 SUMO-VP3 融合蛋白表达,在 IPTG 浓度 0.1 mmol/L、温度 16℃、诱导 8 h 时融合蛋白表达量最高。SDS-PAGE 电泳及 Western blot 结果表明,pESUMO-VP3 重组表达载体获得的融合蛋白以可溶性表达为主,且融合蛋白均可被 FMDV 阳性血清识别,反应原性良好。

关键词:口蹄疫病毒;结构蛋白 VP3;蛋白可溶性表达;SUMO 标签

中图分类号:S852.65 文献标志码:A 文章编号:1004-3268(2015)11-0124-05

Soluble Expression and Immuneoreactivity Analysis of FMDV VP3 Protein

LIU Yunchao¹,FENG Lili²,ZHAO Baolei^{1,3},CHEN Yumei^{1,4},JI Pengchao¹,WANG Jucan^{1,3},
DENG Ruiguang¹,ZHANG Gaiping^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Animal Immunology of Ministry of Agriculture/Hennan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Agricultural Economics and Information, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 4. College of Basic Medical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The O-type FMDV VP3 gene was optimized and synthesized according to the preference codon usage of *E. coli*. Plasmid pE-SUMO-VP3 was constructed by cloning the VP3 gene into pE-SUMO vector, and then the plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells. When the recombinant fusion protein SUMO-VP3 was induced by 0.1 mmol/L IPTG, and incubated at 16℃ for 8 h, the expression level was the highest. The results from SDS-PAGE and Western blot showed that the FMDV VP3 protein was expressed as a soluble recombinant fusion protein with a SUMO-tag, and fusion protein could be recognized by FMDV positive serum.

Key words: FMDV; structural protein VP3; soluble protein expression; SUMO-tag

口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、烈性传染病,主要感染猪、牛、羊等偶蹄类动物^[1]。目前,全球流行的 FMDV 可分为 7 个血清型,我国主要流行株为 O、A 和 Asia 1 型,各型之间没有交叉保护,因此防控难度较大。

收稿日期:2015-07-21
基金项目:中国博士后科学基金项目(2013M541980);河南省重大科技专项(141100110100);河南省基础前瞻类项目(非粮油)(20141644)
作者简介:刘运超(1982-),男,河南周口人,助理研究员,博士,主要从事动物疫病与疫苗研究。
E-mail: yunchaoliu2012@163.com
* 通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,院士,博士,主要从事动物疫病免疫机制与疫苗研究。
E-mail: zhanggaiping2003@163.com

FMDV 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 口疮病毒属 (*Aphthovirus*), 无囊膜病毒, 基因组 8.5 kb 左右^[2-3]。FMDV 基因组可以分为 P1、P2、P3 三个区, 主要有编码病毒的 4 种结构蛋白和 8 种非结构蛋白^[4]。P1 区依次编码 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种结构蛋白, VP1、VP2、VP3 结构蛋白位于病毒颗粒的表面, VP4 蛋白位于病毒粒子的内部^[5]。在病毒装配过程中, VP0、VP3、VP1 首先形成 5S 聚集体, 5 个 5S 聚集体形成 14S 颗粒, 12 个 14S 颗粒形成 75S 病毒空衣壳蛋白。在病毒粒子的最后形成阶段 VP0 蛋白成熟并裂解为 VP2 和 VP4, 病毒 RNA 组装进入 75S 的空衣壳形成完整的病毒粒子。其中, VP1、VP2、VP3 蛋白位于衣壳表面, 是楔形的, 具有相似的结构, 均由 8 个 β -折叠桶和 2 个 α -螺旋组成, 每个 β -折叠桶由 2 个 4 条链组成的 β 片层结构组成, 是构成病毒衣壳的主要蛋白, 也是主要抗原蛋白^[4-5]。FMDV 的 VP3 全长为 654 个核苷酸, 编码 218 个氨基酸^[6], 其蛋白三维空间结构主要由 β -折叠片和无规卷曲组成, 可被划分为 A、B 和 C 3 个功能区, VP3 位于病毒粒子表面, 这些具有柔性的无规则卷曲在蛋白质的其他结构没有明显改变时, 会采取不同的构象, 表现为物理上的可动性和生化上的多功能性, 这在很大程度上增加了病毒的抗原性^[7]。VP3 蛋白同样具有多段抗原决定簇, 理论上也应该是机体免疫攻击的对象, 同时也应该在影响病毒衣壳组装和分解中起重要作用。

SUMO (small ubiquitin-like modifier) 是一种小分子泛素样修饰蛋白, 广泛存在于真核细胞中, 在分子和细胞层面参与生物体的多种生命过程。同时 SUMO 蛋白具有增加重组蛋白表达量以及促进目的蛋白正确折叠、提高可溶性等功能。在大肠杆菌表达系统中, SUMO 作为融合表达标签或者分子伴侣促进了多种蛋白质的高效和可溶性表达^[8-9]。国内研究表明, 应用现有的原核表达系统对 FMDV 3 种结构蛋白进行重组表达, 目的蛋白均以无活性的包涵体形式存在。本研究采用 pE-SUMO 原核表达载体对 FMDV VP3 蛋白进行融合表达, 旨在获得大量有较高活性的重组 VP3 蛋白, 为进一步研究 FMDV VP3 蛋白的功能提供材料, 同时也为探索结构蛋白 VP1、VP0 的可溶性表达和研发 FMDV 疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株

重组蛋白表达载体 pE-SUMO 购自 Life Seneors 公司。大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 和 JM109 菌株购自大连宝生物工程有限公司。FMDV 病毒结构蛋白 VP3 基因按照大肠杆菌密码子偏爱性进行优化后由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Bsa* I、*Xho* I 购自 NEB (New

England Biolabs, Inc.) 公司, 抗组氨酸标签单抗、HRP 标记的羊抗猪二抗均购自 Abcam 公司。T4 DNA 连接酶购自 Promege 公司, IPTG 购自 INALCO 公司, 质粒抽提试剂盒购自 Omega, DNA 凝胶纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司, 标准分子量蛋白 Marker、Ex *Taq* DNA 聚合酶、DNA 切胶回收试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司, AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) 显色试剂盒购自中杉金桥公司。

1.3 FMDV 病毒结构蛋白 VP3 基因优化及其表达引物的设计与合成

根据 GenBank 中公布的猪 O 型 FMDV VP3 蛋白序列 (EF175732.1), 利用密码子优化工具 Codon-Adaptation-Tool (JCAT, <http://www.jcat.de>) 按照大肠杆菌密码子偏爱性及 mRNA 结构等信息优化 FMDV 病毒结构蛋白 VP3 基因^[10-11], 设计表达用引物 (表 1) 并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成。利用 DNASTAR 软件中 Protean 功能分析重组蛋白的亲水性。

表 1 VP3 基因的 PCR 扩增引物

引物名称	酶切位点	引物序列 (5'—3')
VP3-F	<i>Bsa</i> I	TTGGTCTCTAGGTTTCCTGTGGCGTGTAGT
VP3-R	<i>Xho</i> I	AATCTCGAGTTACTGTGTTCGGGCGCTCAA

注: 下划线为酶切位点。

1.4 原核表达载体构建

以合成的 VP3 基因为模板, 使用引物 VP3-F/VP3-R 进行 PCR 扩增获得 VP3 基因片段, 反应条件为: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。扩增结束后取 5 μ L PCR 产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。回收目的基因并用限制性内切酶 *Bsa* I 和 *Xho* I 酶切消化基因片段和 pE-SUMO 载体。将消化后的基因片段和 pE-SUMO 按照 3:1 比例用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 JM109, 挑取单菌落接种于含氨苄青霉素 (Amp^+) 的液体 LB 培养基中培养, 经菌液 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。测序正确的阳性菌株命名为 pE-SUMO-VP3, 将阳性质粒转化大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3), 经菌液 PCR 鉴定后用于重组蛋白表达。

1.5 重组蛋白诱导表达与 Western blot 鉴定

选择测序正确的 pE-SUMO-VP3 按照 1:1 000 接种至含有 50 μ g/mL Amp^+ 的 5 mL LB 液体培养基中, 37 ℃ 培养过夜。次日以 1:100 接种到 50 mL 含有 50 μ g/mL Amp^+ 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 培养至 $OD_{450}=0.6$ 左右加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 转入 25 ℃ 继续诱导表达 8 h。收集细菌培养液, 12 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清, 向沉淀中加入 2 mL PBS 重悬菌体沉淀。将重悬的重组菌体

进行超声波破碎,Φ2 变幅杆,工作时间 5 s,间歇时间 10 s,工作 10 min。破碎后菌体 12 000 r/min 离心 10 min,分离上清及沉淀。分别取超声上清 40 μL,加入 10 μL 5 × SDS - PAGE 上样缓冲液,超声沉淀经等比例的 PBS 重悬后加入 5 × SDS - PAGE 上样缓冲液,上述样品经沸水水浴 10 min 后,以 10 μL/孔的上样量用 12% 分离胶进行 SDS - PAGE 检测。用电转仪 15 V、1 h 将分离胶转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)进行 Western blot 检测。转移后用 5% 脱脂奶 4 ℃ 封闭过夜,以 1:5 000 倍稀释的 His 标签单抗孵育 60 min,1:5 000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗孵育 30 min,用 AEC 显色试剂盒显色。

1.6 重组蛋白的诱导表达条件优化

取 pSUMO - VP3 阳性菌分别在添加 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中振荡培养,至 OD₄₅₀ 为 0.6 时,加入 IPTG 进行诱导表达。分别对 IPTG 浓度、诱导时间及诱导温度进行优化。诱导时间分别选择 4、6、8、10 h 及过夜 5 个时间点,收获菌液(在 IPTG 终浓度 0.5 mmol/L、温度 37℃ 条件下筛选);IPTG 浓度分别选择 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L 6 个梯度(在温度 37 ℃、诱导 8 h 条件下筛选);诱导温度分别选择 16、20、25、37 ℃(在 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L、诱导时间 8 h 条件下筛选)。表达产物分别用 12% 凝胶进行 SDS - PAGE 电泳鉴定,以确定重组蛋白的最佳诱导条件。

1.7 Western blot 检测重组蛋白的反应原性

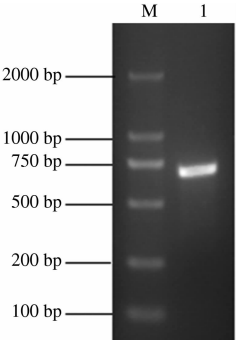
将分离的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶封闭,以 1:200 倍稀释的 O 型 FMDV 猪阳性血清为一抗孵育 60 min,1:5 000 倍稀释的 HRP 标记的兔抗猪二抗孵育 30 min,用 AEC 显色试剂盒显色,观察蛋白质反应情况。

2 结果与分析

2.1 VP3 基因的 PCR 扩增及原核表达质粒鉴定

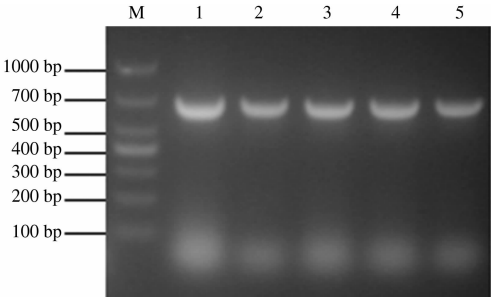
引物 VP3 - F1/VP3 - R 分别在 VP3 的氨基端和羧基端引入 *Bsa* I 和 *Xho* I 酶切位点,使用引物 VP3 - F/VP3 - R 进行 PCR 扩增获得 VP3 基因片段(图 1)。经 *Bsa* I 和 *Xho* I 双酶切的 VP3 目的片段和载体 pE - SUMO 用 T4 连接酶连接,并转化大肠杆菌 JM109。用 PCR 方法鉴定随机挑取的单克隆,电泳结果显示在 654 bp 左右有目的条带(图 2),初步

证明 VP3 基因已经成功插入载体 pE - SUMO。经 PCR 鉴定为阳性的克隆,提取质粒 DNA 并做进一步鉴定。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 引物 VP3 - F/VP3 - R 扩增产物

图 1 VP3 基因 PCR 扩增电泳结果



M. DL1000 DNA Marker;

1—5. pE - SUMO - VP3 菌液 PCR 扩增产物

图 2 重组质粒的菌液 PCR 鉴定

因 pE - SUMO 载体经 *Bsa* I、*Xho* I 双酶切连入目的片段 VP3 之后,酶切位点 *Bsa* I 消失,故不能用 *Bsa* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,故直接选取 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行测序。利用 DNASTAR 相关软件对测序结果进行分析发现,插入的目的片段与合成序列一致,表明原核表达质粒构建成功,命名为:pE - SUMO - VP3(图 3)。DNASTAR 软件 Protean 功能分析蛋白亲水性,结果显示,融合蛋白 SUMO - VP3 与 VP3 相比具有更好的亲水性(图 4)。

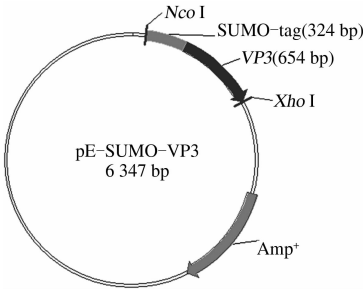


图 3 重组质粒 pE - SUMO - VP3 的构建

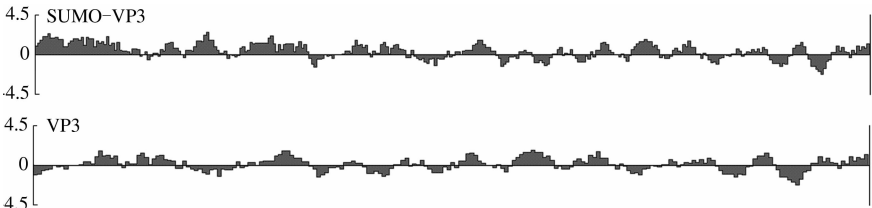
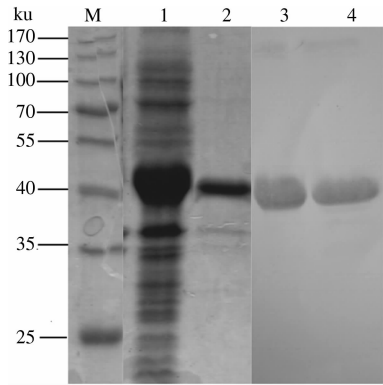


图 4 重组蛋白 SUMO - VP3 和 FMDV VP3 亲水性预测结果

2.2 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

分别取经超声破碎处理的菌体上清及沉淀进行 SDS - PAGE 电泳及 Western blot 鉴定,结果表明,重组表达质粒 pE - SUMO - VP3 在约 43 ku 处有 1 条特异的蛋白质条带,且大部分蛋白质以可溶性形式存在;SUMO - VP3 重组蛋白可以与 His 单抗特异性的结合(图 5)。

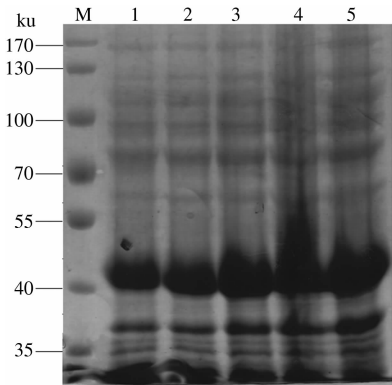


M. 蛋白质 Marker; 1,3. pE - SUMO - VP3 在 25 ℃ 诱导表达的超声沉淀;
2,4. pE - SUMO - VP3 在 25 ℃ 诱导表达的超声上清

图 5 重组蛋白 pE - SUMO - VP3 的 SDS - PAGE 及 Western blot 鉴定

2.3 重组蛋白的诱导表达条件优化

分别对 pE - SUMO - VP3 菌液的诱导温度、诱导时间及 IPTG 浓度进行优化发现,诱导 8 h 和 10 h 时,目的蛋白表达量基本一致,且明显比 4 h 和 6 h 表达量高;过夜诱导的目的蛋白表达量较 8 h 有所富集,但杂蛋白质富集量更高,故选择 8 h 作为最佳诱导时间(图 6)。

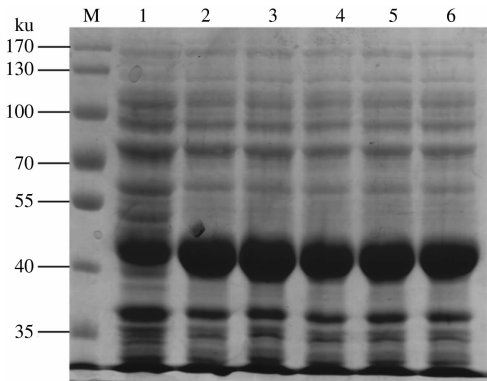


M. 蛋白质 Marker; 1—5. 经 4、6、8、10 h 过夜诱导表达的 SUMO - VP3

图 6 pE - SUMO - VP3 经不同时间的诱导表达情况

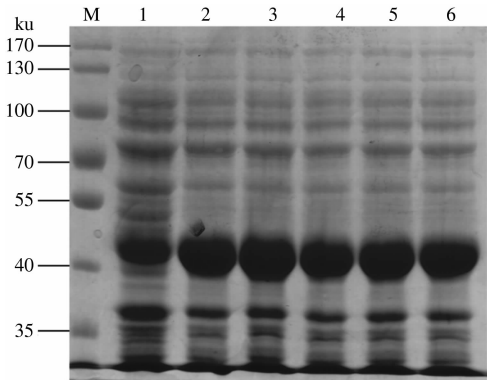
当 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L 时,目的蛋白的表达量明显低于 0.1 mmol/L 处理;超过 0.1 mmol/L 之后的浓度梯度变化不是很明显,故选择最低浓度的 0.1 mmol/L 作为最佳诱导剂浓度(图 7)。在 37 ℃ 诱导时,重组蛋白主要以包涵体形式存在,超声上清中仅有少量可溶性的目的蛋白,随着诱导温度的降低,

可溶性蛋白量明显增高,沉淀中目的蛋白量明显降低,诱导温度在 16 ℃ 时,上清中目的蛋白量最高,沉淀中目的蛋白量最低,故选择 16 ℃ 作为最佳诱导温度(图 8)。



M. 蛋白质 Marker; 1—6. 分别用终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导表达的 SUMO - VP3

图 7 pE - SUMO - VP3 经不同浓度 IPTG 诱导表达的情况

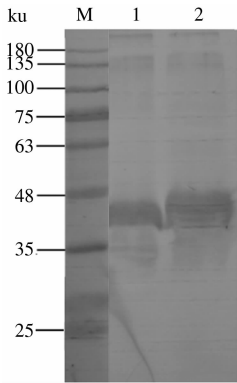


M. 蛋白质 Marker; 1—6. 分别用终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导表达的 SUMO - VP3

图 8 pE - SUMO - VP3 在不同温度条件下的诱导表达情况

2.4 Western blot 鉴定重组蛋白的反应原性

Western blot 检测结果发现,诱导的 SUMO - VP3 蛋白在 40 ku 处出现特异性反应条带,即所表达的蛋白质产物能被 O 型 FMDV 猪阳性血清所识别,表明表达产物均具有良好的反应原性(图 9)。



M. 蛋白质 Marker; 1. pE - SUMO - VP3 在 16 ℃ 诱导表达的超声沉淀;
2. pE - SUMO - VP3 在 16 ℃ 诱导表达的超声上清

图 9 SUMO - VP3 的反应原性分析

3 结论与讨论

SUMO 是一种小分子泛素样修饰蛋白,在分子和细胞层面参与生物体的多种生命过程。在大肠杆菌表达系统中,SUMO 作为融合标签或者分子伴侣促进了多种蛋白质的高效和可溶性表达。本研究选用 pE-SUMO 作为表达载体对 VP3 进行重组表达,该表达载体带有 6×His 和 SUMO 蛋白标签,有利于目的蛋白的进一步纯化,另外由于 pE-SUMO 载体巧妙地利用 *Bsa*I 限制性内切酶的性质,经酶切消化后产生 AGGT 突出,而 GGT 编码的 Gly 则是 SUMO 蛋白标签的最后一个氨基酸,使得表达的重组蛋白经蛋白酶 SUMO protease 1 实现 N 端无残留切割,从而可以得到完整无多余氨基酸的 VP3 蛋白。SUMO 标签共 108 个氨基酸,分子质量约为 12.4 ku;FMDV VP3 蛋白共 218 个氨基酸,分子质量约 23.6 ku;重组蛋白 SUMO-VP3 共 326 个氨基酸,分子质量约 36 ku;而根据 SDS-PAGE 结果分析重组菌 pE-SUMO-VP3 在 43 ku 处有 1 条明显的目的蛋白条带。有研究结果表明,融合蛋白在进行 SDS-PAGE 分析时由于 His 融合标签的存在造成分子质量比实际偏大,分析原因可能是由于 His 融合标签中存在 6 个连续的 His 碱性氨基酸,带有较强的正电荷,导致融合蛋白在 SDS-PAGE 中泳动速度降低,故表观分子质量变大^[12]。因此,本研究中 SDS-PAGE 分析结果显示,重组蛋白分子质量比理论值偏大 7 ku,符合预期实验结果。同时,PAGE 电泳结果也显示了重组表达的融合蛋白 SUMO-VP3 具有较好的水溶性。DNASTAR 预测结果显示融合蛋白 SUMO-VP3 比 VP3 有更强的亲水性,推测这种亲水性的增强也是融合蛋白水溶性较好的原因之一。另外,经 Western blot 鉴定分析证实,经 pE-SUMO-VP3 表达载体获得的重组蛋白能被 His 单抗及 FMDV 阳性血清所识别,表明表达产物具有良好的反应原性。

目前,口蹄疫亚单位疫苗的研究热点仍然以 VP1 蛋白为主,其接种动物后均可在一定程度上抵抗 FMDV 的攻击,但单独的 VP1 蛋白无法像全病毒一样能刺激很强的机体免疫反应。VP3 蛋白作为 FMDV 衣壳中的关键蛋白应该引起研究人员的足够重视,其 A 区的游离多肽链和 B 区的 β -折叠桶均可以成为机体产生的多克隆抗体攻击的靶标。VP1 蛋白自身无法诱导机体产生如同由完整的衣壳蛋白所诱导机体产生的“健全的”免疫应答,但是结合 VP2 和 VP3 蛋白形成相对完整的病毒衣壳能起到更好的免疫效果。因此,研究 FMDV VP3 蛋白有助

于研制更为有效的 FMDV 疫苗。本研究利用 pE-SUMO 表达载体成功表达了 FMDV VP3 蛋白,且该重组蛋白与阳性血清有良好的反应原性,为进一步研究 FMDV VP3 蛋白的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wekesa S N, Namatovu A, Sangula A K, *et al.* A serological survey for antibodies against foot-and-mouth disease virus (FMDV) in domestic pigs during outbreaks in Kenya[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2014, 46(3): 575-581.
- [2] Belsham G J. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family, aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1993, 60(3): 241-260.
- [3] Zhang H, Li Y, Huang X, *et al.* Global transcriptional analysis of model of persistent FMDV infection reveals critical role of host cells in persistence[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2/3/4): 321-329.
- [4] Mason P W, Grubman M J, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV[J]. *Virus Res*, 2003, 91(1): 9-32.
- [5] Chai Z, Wang H, Zhou G, *et al.* Adenovirus-vectored type Asia foot-and-mouth disease virus (FMDV) capsid proteins as a vehicle to display a conserved, neutralising epitope of type O FMDV[J]. *J Virol Methods*, 2013, 188(1/2): 175-182.
- [6] 周建华, 丛国正, 高闪电, 等. FMDV OA/58 病毒株 VP3 蛋白结构的模拟与分析[J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 28-31.
- [7] 陈启伟, 王永录, 张永光, 等. 口蹄疫病毒株 AF72 VP3 的结构模拟与分析[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(11): 1716-1722.
- [8] Wang Z, Li N, Wang Y, *et al.* Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 82(1): 174-178.
- [9] Panavas T, Sanders C, Butt T R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 497: 303-317.
- [10] Chen D, Texada D E. Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*[J]. *Gene Ther Mol Biol*, 2006, 10: 1-12.
- [11] Grote A, Hiller K, Scheer M, *et al.* JCat: A novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(2): W526-W531.
- [12] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因[J]. *植物生理学报*, 2000, 26(1): 65-69.