

مقایسه میزان تولید پروتئین نوترکیب در دو رده سلولی CHO و MCF7

حسام میرشهبابی^۱، حوریه سلیمان جاهی^{۲*}، زهرا مشکات^۲، الهام احمدی^۱

۱- کارشناسی ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- دکتری تخصصی، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

یافته / دوره شانزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۳ / مسلسل ۶۰

چکیده

دریافت مقاله: ۹۳/۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۴/۱۰

* مقدمه: هدف از مطالعه‌ی حاضر، مشخص نمودن رده سلولی مناسب‌تر، جهت مطالعات تولید پروتئین در سیستم‌های یوکاریوتی می‌باشد. پس از ترانسفکشن، تغییرات ایجاد شده در سطوح بیانی RNA و پروتئین نوترکیب هدف ارزیابی شد.

* مواد و روش‌ها: به منظور بررسی بیان ژن مورد نظر و تولید پروتئین نوترکیب E6 پاپیلوما ویروس انسانی تیپ ۱۶ در سلول‌های مورد آزمایش، از پلاسمید نوترکیب pcDNA3-E6 و نیز دو رده سلولی متفاوت MCF7 و CHO استفاده گردید. به این منظور به دنبال ترانسفکشن، بیان RNA و پروتئین هدف بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) و آزمایش لکه‌گذاری وسترن با استفاده از ژل SDS-PAGE و مونوکلونال آنتی بادی Anti-E6 ارزیابی گردید.

* یافته‌ها: در این مطالعه به دلیل غلظت بسیار پایین پروتئین تولیدی در سلول‌های MCF7، آزمایش RT-PCR مثبت و آزمایش وسترن بلاتینگ آن منفی شد، این در حالی است که در رده سلولی CHO هر دو آزمایش ذکر شده مثبت شدند.

* بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده توصیه می‌شود از سلول CHO به منظور ترانسفکشن و تولید پروتئین نوترکیب در سیستم‌هایی که تولید بالای پروتئین امکان پذیر نیست استفاده گردد.

* واژه‌های کلیدی: ترانسفکشن، MCF7، CHO، RT-PCR، وسترن بلاتینگ.

* آدرس مکاتبه نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی.

پست الکترونیک: soleim_h@modares.ac.ir

مقدمه

انتقال ژن، زمینه‌ای مهم در درمان بیماریهای ژنتیکی و اکتسابی است و به این منظور ورود DNA خارجی به درون سلول (ترانسفکشن)^۱، به عنوان ابزاری مهم در زیست شناسی ساختمانی و عملکردی سلول مطرح می‌باشد (۱،۲). معمولاً ترانسفکشن ژن‌های ویروسی با بکارگیری سلول‌های مختلف انجام می‌گیرد، از این میان رده‌های سلولی CHO و MCF7 به طور جداگانه در مطالعات زیادی استفاده شده است، که با توجه به ویژگی‌های ذاتی سلول و نوع مطالعه، سلول‌ها انتخاب می‌شوند. روش‌های مرسوم ترانسفکشن سلول‌ها عبارتند از:

الف) روش‌های شیمیایی: کلسیم فسفات، DEAE-dextran و انتقال DNA بوسیله لیپوزم‌های^۲ مصنوعی.
ب) روش‌های فیزیکی: الکتروپوریشن^۳، میکروانجکشن^۴ و انتقال توسط ذرات بیولیستیک^۵.

ج) استفاده از ناقل‌های نوترکیب ویروسی (۱).

صرف نظر از روش انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی، برای بیان ژن سه مرحله باید انجام پذیرد. در ابتدا مواد ژنتیکی باید از غشاء سلولی عبور کرده و وارد سلول شوند. سپس باید این مواد در سلول رها شده تا بتوانند به محل اثر خود که می‌تواند سیتوپلاسم یا هسته باشد منتقل شوند. جهت بیان پروتئین و در مرحله آخر انتقال ژن، DNA آزاد شده باید فعال شود (۳،۴).

کاربرد روش‌های شیمیایی از جمله لیپیدهای کاتیونی برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ گزارش شد (۵-۷). در این روش

با استفاده از لیپیدهای کاتیونی وزیکولهای غشایی مصنوعی به نام لیپوزوم و با بار مثبت ایجاد می‌شود. ترکیب کاتیونی حاصل قادر به اتصال به مولکول DNA بوده و توانایی اتصال به غشاء با بار منفی را دارد و با آندوسیتوز یا فیوژن با غشاء وارد سلول می‌شود (۸،۹). از مزایای لیپوزوم‌ها می‌توان بازده نسبتاً بالا و توانایی ترانسفکشن رده‌های سلولی که به دکستران و کلسیم فسفات سازش ناپذیر هستند، نام برد (۱۰،۱۱).

در ضمن لیپوزوم این توانایی را دارد که DNA را در اندازه‌های مختلف از الیگو نوکلئوتید گرفته تا کروموزوم مصنوعی مخمر انتقال دهد (۸). سلول‌ها معمولاً ۷۲-۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، جهت مطالعات بیان گذرا جمع‌آوری می‌شوند. بهترین زمان بسته به نوع سلول، زمان تقسیم سلول و خصوصیات خاص بیانی ژن ترانسفکشن شده فرق می‌کند.

در این مطالعه از وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3 استفاده شده است. سپس با مقایسه روش‌های موجود ترانسفکشن، روش مناسب انتخاب می‌گردد. به دلیل اینکه تولید پروتئین E6 با مشکلات ویژه همراه بوده و در مقیاس محدود انجام می‌گیرد، در این مطالعه سعی شده است از بین سلول‌های موجود و با قدرت بالا به منظور ترانسفکشن، دو سلول CHO و MCF7 برای تولید و بررسی میزان پروتئین مورد نظر استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه پلاسمید

به منظور بررسی بیان ژن مورد نظر و تولید پروتئین نوترکیب E6 پاپیلوما ویروس انسانی تیپ ۱۶ در سلول‌های مورد آزمایش، از پلاسمید نوترکیب pcDNA3-E6 استفاده شد. پروتئین E6 پاپیلوما ویروس تقریباً از ۱۵۰ اسید آمینه تشکیل شده است (۱۳) و وزن تقریبی آن ۱۸ KDa می‌باشد

1. Transfection
2. Liposomes
3. Electroporation
4. Microinjection
5. Biolistic particles

۳۷ °C قرار داده شد و محیط کشت سلول‌ها پس از گذشت زمان ذکر شده با محیط حاوی ۱۰٪ سرم تعویض شد. البته به طور همزمان عمل ترانسفکشن برای سلول‌های کنترل منفی نیز انجام شد که در آنها از DNA استفاده نشد.

بررسی بیان ژن به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR)

اولین مرحله از بیان ژن نسخه برداری است. اگر RNA تولید شده باشد، یعنی ژن بیان شده و اگر بیان نشود RNAی نیز ساخته نمی‌شود. RT-PCR یک روش سریع، و فوق‌العاده حساس می‌باشد که می‌تواند بیان ژن مورد نظر را تأیید کند و قادر است یکسری اطلاعات نیمه کمی در مورد میزان بیان ژن نشان دهد. بررسی بیان ژن نیاز به شناسایی دقیق میزان mRNA دارد. PCR بر پایه تکثیر زنجیره‌های DNA می‌باشد. بنابراین ابتدا RNA توسط فرایند شناخته شده رونویسی معکوس تبدیل به DNA می‌شود. سپس واکنش PCR بر روی DNA مکمل (cdNA)^۱ انجام می‌شود (۱۵). بر این اساس، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن استخراج RNA صورت گرفت. برای استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده از کیت استخراج RNA رن‌آکس-پلاس (سیناژن) استفاده شد. جهت حذف DNA از آنزیم DNase استفاده شد تا پلاسمیدهای احتمالی موجود، باعث ایجاد پاسخ مثبت کاذب نشوند. برای ساختن cdNA در این پژوهش از آنزیم MO-MLV (Fermentase) استفاده شد. همچنین پرایمرهای الیگوتایمیدین به کار گرفته شد تا فقط از روی mRNA های موجود cdNA ساخته شود. در ادامه بر روی cdNA به

(۱۴). پلاسمید مورد استفاده در این پژوهش pcDNA3 (Invitrogen) بود. این پلاسمید حاوی پروموتور ژن‌های اولیه CMV، SV40 و باکتریوفاژ T7 و توالی‌های پلی A مربوط به BGH و SV40 می‌باشد. همچنین منشأ همانندسازی آن مربوط به Cole1 است. پلاسمید نوترکیب ذکر شده تهیه و ژن مورد نظر با تعیین توالی تأیید گردید.

کشت سلول و ترانسفکشن

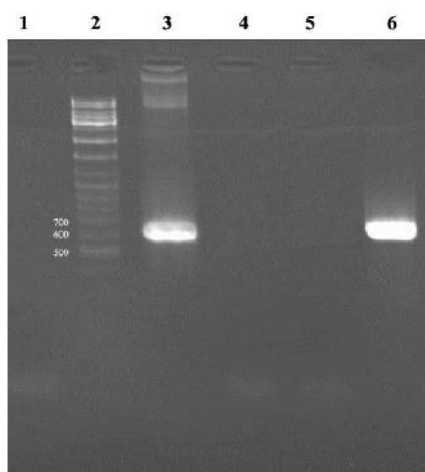
در این مطالعه از دو رده سلولی متفاوت سلول‌های CHO با منشأ اپی تلیالی هامستر چینی و همچنین MCF7 از منشأ آدنوکارسینومای پستان استفاده گردید. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ °C با ۵٪ CO₂ کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده RPMI 1640 غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاو بود که با غلظت ۱۰۰ g/ml آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسن و پنی سیلین به آن افزوده شده بود. یک روز قبل از ترانسفکشن سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه حاوی محیط بدون آنتی بیوتیک کشت داده شدند به طوریکه در هر خانه ۱۰^۵ - ۲ × ۱۰^۵ سلول وجود داشته باشد. تعداد سلول‌ها باید در حدی باشد که در زمان ترانسفکشن به اندازه ۹۵-۹۰ درصد پر شده باشد. به میزان ۴ g/μ DNA پلاسمیدی به ۲۵۰ lμ محیط کشت بدون سرم از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) به میزان ۱۰ lμ به ۲۵۰ lμ از محیط بدون سرم افزوده شد و به همراه رقت تهیه شده از DNA مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. رقت‌های (DNA و لیپوفکتامین) با هم ترکیب و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. در این مرحله کمپلکس DNA-لیپوفکتامین تشکیل می‌شود. پس از انکوباسیون، ۵۰۰ lμ از مخلوط فوق به هر خانه پلیت افزوده شد و از طریق حرکت جلو و عقب با محیط رویی سلول‌ها مخلوط گردید. پلیت ۶ خانه به مدت ۵-۴ ساعت در انکوباتور

1. Complementary DNA

بر روی سلول‌های CHO و MCF7 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

بررسی بیان ژن به وسیله RT-PCR

پس از استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده و ساخت cDNA آن، بر روی cDNA بدست آمده PCR انجام شد. پس از انجام PCR، محصول آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در کنار مارکر DNA الکتروفورز گردید و قطعه حدود ۶۰۰ جفت بازی مشخص گردید. در این بررسی آزمایش RT-PCR در هر دو رده سلولی CHO و MCF7 مثبت مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج RT-PCR. ۱- کنترل منفی، ۲- نشانگر ۱ کیلو بازی، ۳-۶- به ترتیب عبارتند از رده‌های سلولی CHO و MCF7 ترانسفکت شده با وکتور بیانی حاوی ژن و ۴ و ۵- به ترتیب همان لیزات سلول‌ها هستند که با وکتور بیانی فاقد ژن ترانسفکت شده‌اند.

نتایج بررسی بیان پروتئین به روش SDS-PAGE

برای بررسی بیان، لیزات بدست آمده از سلول‌های ترانسفکت شده را پس از تیمار با بافر نمونه و قرار دادن آن به مدت ۱۰-۵ دقیقه در آب در حال جوش در ژل پلی آکریل آمید در حضور SDS الکتروفورز شد (شکل ۲).

دست آمده توسط پرایمرهای اختصاصی ژن E6 پاپیلوما ویروس انسانی تیپ ۱۶، PCR انجام شد.

وسترن بلاتینگ

هفتاد و دو ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها جمع آوری شدند و برای انجام آزمایش SDS-PAGE^۱ آماده سازی شدند. روش کار بدین صورت بود که سلول‌ها پس از چندین بار شستشو با PBS در کمی بافر فسفات به همراه آنتی پروتئاز PMSF (با غلظت ۱۰۰ mM/ml) به میزان ۰/۱ حجم نمونه، مخلوط و در تیوب تمیز قرار داده شد. در مرحله بعد محتوی تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه تحت امواج ماوراء صوت با فرکانس ۶۰H قرار گرفتند. رسوب حاصل برای ارزیابی پروتئین موجود در آن در ۷۰- نگه‌داری شد. از سوسپانسیون سلولی تهیه شده جهت آزمایش SDS-PAGE استفاده شد که ژل ۱۲ درصد برای قسمت جداکننده و ژل ۵ درصد برای قسمت متراکم کننده استفاده شد. رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی آبی R-۲۵۰ صورت گرفت، که با این روش می‌توان ۰/۲ تا ۰/۵ میکروگرم پروتئین را در هر باند تشخیص داد (۱۶).

در این مطالعه، ابتدا با روش SDS-PAGE باندهای پروتئین‌های سلولی از یکدیگر جدا شدند. سپس در وسترن بلاتینگ با آنتی بادی منوکلونال Anti-E6 (Abcam) مجاور شد و نتایج بررسی گردید.

یافته‌ها

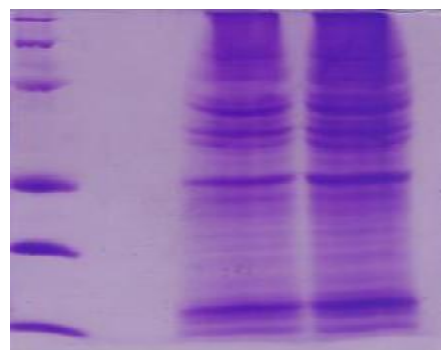
ترانسفکشن سلول‌های CHO و MCF7 با پلاسמיד بیانی pcDNA3-E6 برای ورود پلاسמיד نوترکیب به داخل سلول یوکاریوتی و تأیید بیان پروتئین تولید شده، ترانسفکشن

1. Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis proteins

بحث و نتیجه گیری

تحت شرایط مناسب، سلول‌های یوکاریوتی این توانایی را دارند که DNA خارجی را دریافت کنند، که قسمتی از این DNA می‌تواند در هسته لوکالیزه شود (۵). عواملی مانند سلامت سلول، درصد پر شدگی^۱ سلول، تعداد پاساژ سلول و آلودگی (DNA خالص شده باید عاری از پروتئین، RNA و آلودگی‌های شیمیایی باشد) تأثیر مهمی در افزایش بازده ترانسفکشن (با هر روش و موادی) و در میزان بیان پروتئین توسط یک سل لاین دارند.

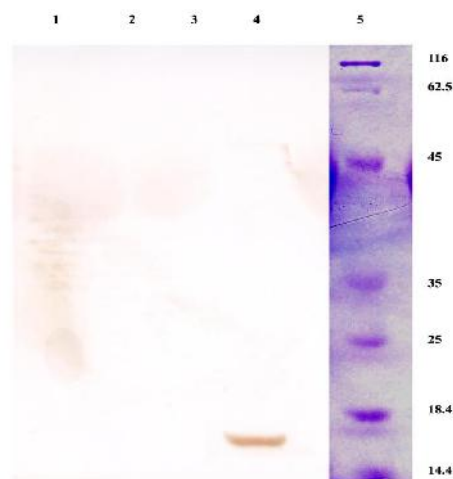
امروزه بیان پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم بیانی یوکاریوتی اهمیت بسیار زیادی دارد. از بین فاکتورهای مختلف تأثیر گذار، انتخاب رده سلولی مناسب جهت انجام ترانسفکشن دارای اهمیت بوده می‌تواند باعث موفقیت در تولید و تشخیص پروتئین‌های نو ترکیب گردد. بنابراین در این مطالعه دو رده سلولی مختلف جهت ترانسفکشن انتخاب و تولید پروتئین نو ترکیب با دو روش RT-PCR و وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور وکتور بیانی حاوی ژن مورد نظر به درون سلول‌های یوکاریوتی CHO و MCF7 ترانسفکت شد و بیان پروتئین در این سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. در ترانسفکشن، انتخاب روش ترانسفکشن بستگی به نوع سلول و نوع وکتور بیانی دارد. در حال حاضر لیپیدهای کاتیونی مانند لیپوفکتامین ۲۰۰۰، ترانسفکشن پلاسمید در سلول‌های یوکاریوتی را تسهیل کرده‌اند. در هنگام استفاده از این روش ترانسفکشن، وجود آنتی بیوتیک در محیط، باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. بنابراین باید توجه داشت که روش کار، کاملاً منطبق بر توصیه‌های شرکت سازنده باشد. تولید پروتئین در سلول‌های ترانسفکت شده را می‌توان ۴۸ تا ۷۲



شکل ۲. نتایج SDS-PAGE. ۱- مارکر پروتئینی و ۲ و ۳- به ترتیب سلول‌های CHO و MCF7 ترانسفکت شده با وکتور بیانی حاوی ژن.

وسترن بلاتینگ

ژل SDS-PAGE با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی Anti-E6 برای آزمایش وسترن بلاتینگ (لکه گذاری وسترن) استفاده گردید. در این مطالعه به دلیل غلظت بسیار پایین پروتئین تولیدی در سلول‌های MCF7، آزمایش وسترن بلاتینگ آن منفی شد، این در حالی است که در رده سلولی CHO آزمایش ذکر شده مثبت گزارش شد (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج وسترن بلاتینگ. ۱- رده سلولی MCF7 ترانسفکت شده با وکتور بیانی حاوی ژن، ۲ و ۳- به ترتیب رده‌های سلولی MCF7 و CHO ترانسفکت شده با وکتور بیانی فاقد ژن، ۴- رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور بیانی حاوی ژن، ۵- مارکر پروتئینی.

1. Confluency

ساعت پس از ترانسفکشن بررسی کرد. سنجش و ارزیابی نسخه‌های mRNA تولید شده از ژن هدف بوسیله آزمایش RT-PCR یک تست تأییدی مناسب برای بررسی بیان پروتئین می‌باشد. در این پژوهش از RT-PCR به عنوان یک مرحله میانی از تکثیر ژن تا تولید پروتئین هدف مورد استفاده قرار گرفت. در سیستم‌های یوکاریوتی به دلیل مقدار کم پروتئین نوترکیب تولید شده و نیز به دلیل وجود پروتئین‌های سلولی در محیط، تشخیص باند پروتئینی نو ترکیب تولید شده در زمینه ژل SDS-PAGE مشکل و در بیشتر موارد غیر ممکن است. بنابراین پس از انجام SDS-PAGE، باندهای پروتئینی مورد نظر به غشا (نیتروسلولز یا PVDF) انتقال می‌یابد تا شناسایی آنها با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی مورد نظر انجام گیرد (۲۰-۱۷).

با این حال میزان پروتئینی که توسط یک ژن در سلول‌های یوکاریوت تولید می‌شود، تقریباً ۱۰۰-۱۰۰۰ برابر کمتر از میزان پروتئین تولید شده توسط همان ژن در سلول‌های پروکاریوت (E.coli) یا حشرات می‌باشد. این در حالی است که در بالاترین میزان بیان ژن در سلول‌های

یوکاریوت، پروتئین تولید شده فقط ۲/۵ درصد کل پروتئین تولید شده در سلول را به خود اختصاص می‌دهد (۲۱، ۲۲). در این پژوهش از رده‌های سلولی CHO و MCF7 جهت ترانسفکشن و بررسی تولید پروتئین نوترکیب استفاده گردید. با توجه به غلظت بسیار پایین پروتئین تولیدی در سلول‌های MCF7، آزمایش RT-PCR مثبت و آزمایش وسترن بلاتینگ آن منفی شد. این در حالی است که در رده سلولی CHO هر دو آزمایش ذکر شده مثبت شدند. با توجه به نتایج بدست آمده توصیه می‌شود از سلول CHO به منظور ترانسفکشن و تولید پروتئین نو ترکیب استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

References

1. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473: 337-342.
2. Brunner S, Furtbauer E, Sauer T, Kursa M, Wagner E. Overcoming the Nuclear Barrier: Cell Cycle Independent Nonviral Gene Transfer with Linear Polyethylenimine or Electroporation. *Mol Ther*. 2002;5(1): 80-86.
3. Twyman RM. Gene Transfer to Animal Cells. First ed, BIOS Scientific Publishers, 2005.
4. Xu Y, Szoka FC. Mechanism of DNA release from cationic/DNA complex used in cell transfection. *Biochemistry*. 1996; 35:5616-5623.
5. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7413-7417.
6. Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection, *Nature*. 1989; 337:387-388.
7. Daniels-McQueen S, Goessling LS, Thach RE. Inducible expression bovine papillomavirus shuttle vectors containing ferritin transitional regulatory elements. *Gene*. 1992;122: 271-279.
8. Pines J. GFP in mammalian cells. *Trends Genet*. 1995;11:326-327.
9. Macdonald RC, Ashly GW, et al. Physical and biological properties of cationic trimesters of phosphatidylcholine. *Biophysical J*. 1999;77:2612-2629.
10. Wong FM, Reimer DL, Bally MB. *Biochemistry*. 1996;35:5756-5763.
11. Bally MB, Harvie P, Wong FMP, Kong S, Wasan EK, Reimer DL. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999; 38:291-315.
12. Dunn KW, Maxfield FR. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol*. 1992;117: 301-310.
13. Rapp L, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1378: F1-F19.
14. Masson M, Hindelang C, Sibler AP, Schwalbach G, Trave G, Weiss E. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*. 2003;84:2099-2104.
15. McPherson MJ, Moller SG. The basis of PCR. Oxford BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000.
16. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin- embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prevent*. 2003;27:397-404.
17. Mirshahabi H, Solimanjahi H, Meshkat Z, Bamdad T, Hassan ZM. Isolation of Iranian human Human papillomavirus Papilloma Virus type 16 gene and construction of its cloning vector. *Pak J Biol Sci*. 2006;9:2652-2656.
18. Muller K, Engesser R, Schulz S, Steinberg T, Tomakidi P, Weber C, et al. Multichromatic control of mammalian gene

- expression and signaling. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(12):129-140.
19. Johnson A, Jurcisek JA. A method to monitor DNA transfer during trasfection. *AAPS Pharmsci.* 1999;1(3):1-7.
20. Deans TL, Cantor CR, Collins JJ. A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. *Cell.* 2007;130:363-372.
21. Tabor JJ, Levskaya A, Voigt CA. Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 2011;405: 315-324.
22. Kaufman RJ. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Molecul Biotechnology.* 2000;16:151-160.