

β -伴大豆球蛋白 β 亚基的纯化及免疫活性鉴定

郑树贵^{1,2}, 曹松屹³, 孙泽威¹, 秦贵信¹

(¹吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130118; ²沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161; ³沈阳农业大学生物技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:等电点沉淀法和凝胶过滤层析提纯的 β -伴大豆球蛋白经 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲变性后解聚为游离亚基, 利用 DEAE 琼脂糖凝胶 F F 离子交换层析分离纯化 β -伴大豆球蛋白亚基, 并对纯化亚基进行透析复性。同时将 β -伴大豆球蛋白免疫家兔制备抗血清, 利用免疫印迹方法检测纯化的亚基与 β -伴大豆球蛋白抗血清是否发生免疫反应。结果表明: 利用 DEAE 琼脂糖凝胶 F F 阴离子交换层析可以纯化出高纯度的 β -伴大豆球蛋白 β 亚基, 纯化的 β 亚基可以与抗 β -伴大豆球蛋白抗体结合, 具有免疫活性。

关键词: β -伴大豆球蛋白; β 亚基; 纯化; 免疫活性

中图分类号: TQ936.21+2

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)02-0301-04

Purification of β Subunit from β -conglycinin and Identification of Immunological Activity of the Prepared Subunit

ZHENG Shu-gui^{1,2}, CAO Song-yi³, SUN Ze-wei¹, QIN Gui-xin¹

(¹College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin; ²College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning; ³College of Biological Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Purified β -conglycinin prepared by electric-point precipitation and filtration chromatography was denatured by $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea and separated into free subunits. The subunits of β -conglycinin were isolated and purified by DEAE-Sepharose F F anion exchange chromatography and the prepared subunits were renatured by dialysis. The rabbits were immunized by β -conglycinin to produce β -conglycinin special antiserum. The immune responses between purified subunits and the antiserum were determined by immunoblotting. The results indicated: pure β subunit could be prepared from β -conglycinin by DEAE-Sepharose F F anion exchange chromatography, and the purified β subunit could specially bind to β -conglycinin antiserum and this proved that the subunit had immunological activity.

Key words: β -conglycinin; β subunit; Purification; Immunological activity

大豆蛋白是人和动物的优质植物蛋白源, 具有较高的营养价值。但同时大豆蛋白又是抗原性极强的植物蛋白, 可引起婴儿和幼龄动物发生消化道过敏反应。长期以来, 学者们已对大豆抗原对人和动物的致敏反应做了深入研究, 研究表明大豆的致敏性主要是由其中的蛋白质引起的^[1-5]。大豆蛋白中引起过敏反应的抗原蛋白有二种: 大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白^[6]。据报道, 生大豆中具有抗原活性的大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白含量分别占大豆总蛋白质含量的 10% ~ 20% 和 1% ~ 2%^[7]。尽管

β -伴大豆球蛋白的含量低于大豆球蛋白, 但 β -伴大豆球蛋白是大豆蛋白质的主要过敏原^[8-10]。

β -伴大豆球蛋白是 7S 球蛋白的主要组成成分, 是由 α 、 α' 和 β 三种亚基按不同组合方式聚合而成的寡聚蛋白。其中 β 亚基由 416 个氨基酸残基组成, 分子量为 52kD^[11], 等电点为 5.66 ~ 6.0^[12]。目前还没有分离纯化具有免疫活性的 β 亚基的报道。试验建立了分离纯化 β -伴大豆球蛋白 β 亚基的层析方法, 并在纯化的过程中保持了 β 亚基的免疫学活性。

收稿日期: 2008-08-25

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30430520)。

作者简介: 郑树贵 (1972-), 男, 讲师, 博士研究生, 现从事大豆抗营养因子研究。E-mail: zhengshugui1001@163.com。

通讯作者: 秦贵信, 教授, 博士生导师。E-mail: guixin@public.cc.jl.cn。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及设备

大豆购于吉林省春雨种子有限公司,品种为丰交 7607;琼脂糖凝胶 CL-6B 和 DEAE 琼脂糖凝胶 F F 购自 GE Healthcare 公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自北京鼎国生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔 IgG 抗体购自北京邦定泰克生物技术有限公司;ECL 显色发光试剂购自华特生生物技术有限公司。

H-21-2 型紫外检测仪,上海青浦沪西仪器厂;LM17 型记录仪,永青示波器厂;MINICOLDLAB2023 型层析柜,瑞典 LKB 公司;3-Star 酸度计,美国 Thermo 公司;双垂直板式电泳仪,大连竞迈科技有限公司;JD801 凝胶电泳图像分析系统,江苏省捷达科技发展有限公司。

1.2 β-伴大豆球蛋白的分离提纯

参照文献[13]的等电点沉淀法分离 7S 球蛋白,脱脂大豆粉利用 Tris-HCl(pH8.0)缓冲液室温搅拌提取 1h,离心($9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,30 min,4℃),所得的上清液加亚硫酸氢钠至 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,调 pH 至 6.4,4℃ 冷沉。离心($6\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,20 min,4℃)后弃沉淀,上清液加氯化钠至 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,调 pH 至 5.5,再次离心($9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,30 min,4℃)。所得上清液调 pH 至 4.8,离心($9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,30 min,4℃)后的沉淀即粗 7S 球蛋白。β-伴大豆球蛋白的纯化参照文献[14]的方法,首先将粗 7S 球蛋白溶于磷酸盐缓冲液(pH7.6),利用琼脂糖凝胶 CL-6B 进行凝胶过滤层析,磷酸盐缓冲液洗脱,收集各分离峰。经过纯化的 7S 球蛋白就是 β-伴大豆球蛋白。

1.3 离子交换层析分离 β-伴大豆球蛋白亚基

纯化的 β-伴大豆球蛋白对含 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲的磷酸缓冲液(pH7.0)透析 48 h,其间多次换液,使 β-伴大豆球蛋白在强变性剂 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲的作用下变性解聚,获得游离亚基。透析变性后的 β-伴大豆球蛋白溶液利用已充分平衡的 DEAE 琼脂糖凝胶 F F 柱层析分离, $0\sim 0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠梯度洗脱。收集各分离峰依次对含 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲的磷酸缓冲液及蒸馏水分别透析 48 h,逐渐除去脲,使变性的蛋白质亚基恢复天然构象。梯度透析后,样品经冷冻干燥,-20℃ 保存备用。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及纯度分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(5%浓缩胶,12%分离胶)分离蛋白质样品,经考马斯亮蓝染色,利用凝胶电泳图像分析系统分析电泳条带的光密度值,以目标条带的光密度值占该泳道各条带的总光密度值的百分比表示目标蛋白的纯度^[13]。

Σ 目标蛋白条带光密度值

即:

目标蛋白的纯度 =

$$\frac{\Sigma \text{目标蛋白条带光密度值}}{\Sigma \text{该泳道各条带光密度值}} \times 100\%$$

1.5 免疫血清的制备

利用成年家兔制备 β-伴大豆球蛋白的抗血清,将纯化的 β-伴大豆球蛋白抗原与等量弗氏完全佐剂乳化后于足内侧皮下注射,每次 2 点,每点 0.5 mL。14 d 后,同样方法背部皮下 4 点注射经弗氏不完全佐剂乳化的相应抗原组分,以后每 10 d 重复 1 次。血清效价达到要求后采血,分离血清,-80 保存备用。

1.6 纯化 β-伴大豆球蛋白亚基的免疫活性鉴定

利用免疫印迹鉴定纯化的 β-伴大豆球蛋白亚基的免疫活性,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将凝胶上的电泳条带转移至 PVDF 膜,3% 牛血清白蛋白封闭,加入抗 β-伴大豆球蛋白血清,4℃ 过夜。经洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG,室温温育 2 h。洗膜后,加入 ECL 显色发光试剂,曝光 3 s 显影。

2 结果与分析

2.1 β-伴大豆球蛋白的分离提纯

等电点沉淀法分离的粗 7S 球蛋白经琼脂糖凝胶 CL-6B 进行凝胶过滤层析得到 5 个分离峰(图 1)。其中 2 峰为纯化的 β-伴大豆球蛋白(图 2)。

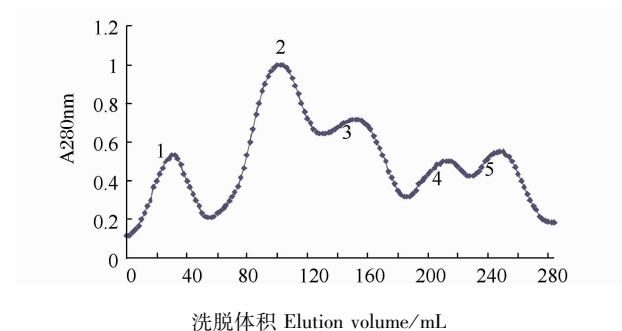
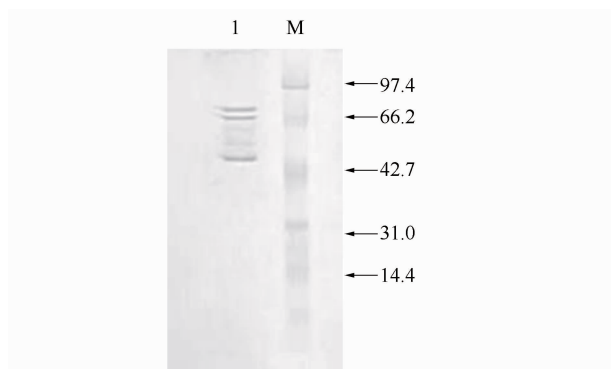


图 1 粗 7S 球蛋白的凝胶过滤层析曲线

Fig. 1 Gel filtration chromatographic diagram of crude 7S globulin



1 为凝胶过滤层析 2 峰;M 为蛋白质分子量标准

1 indicated peak 2 of Gel filtration chromatography; M indicated protein molecular marker

图 2 纯化 β -伴大豆球蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 SDS-PAGE of purified β -conglycinin

2.2 β -伴大豆球蛋白亚基的离子交换层析分离

纯化的 β -伴大豆球蛋白经对含 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲的磷酸盐缓冲液透析后,利用 DEAE-琼脂糖凝胶 F F 离子交换层析分离得到 2 个主要分离峰(图 3)。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明 2 个分离峰分别为纯化的 β 亚基及 α, α' 亚基混合物(图 4),表明 DEAE 琼脂糖凝胶 F F 阴离子交换层析可以分离纯化 β 亚基,但 α 和 α' 亚基形成一个峰。

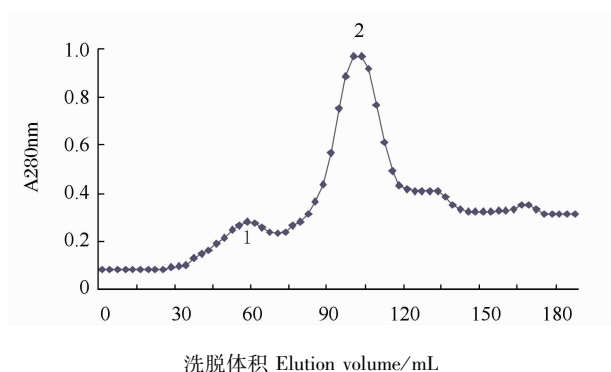


图 3 β -伴大豆球蛋白亚基的离子交换层析曲线

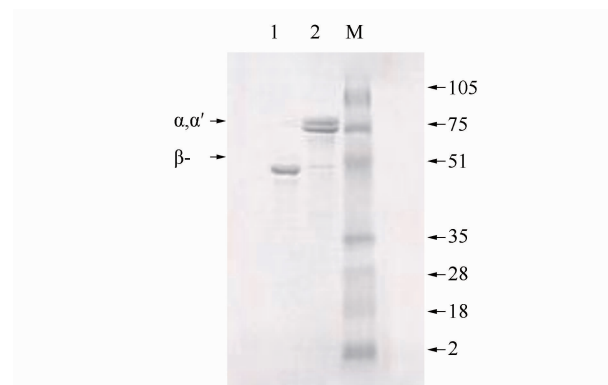
Fig. 3 Ion exchange chromatographic diagram of β -conglycinin subunits

2.3 β -伴大豆球蛋白亚基的纯度分析

利用凝胶电泳图像分析系统对离子交换层析纯化的 β -伴大豆球蛋白亚基电泳条带进行光密度分析(图 5),表明纯化的 β 亚基纯度可达 96.08%,而离子交换层析 2 峰中 α 亚基占 51.19%, α' 亚基占 36.90%。

2.4 纯化 β 亚基的免疫活性鉴定

以 β -大豆球蛋白免疫家兔获得抗血清利用免疫印迹方法检测纯化 β 亚基的免疫活性,结果如图

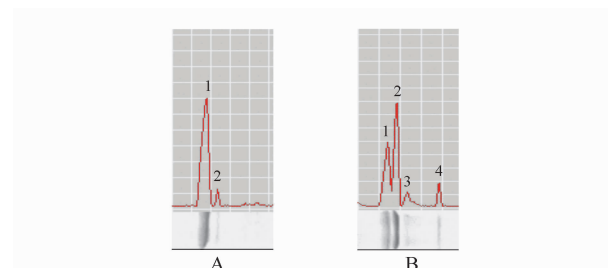


1 为离子交换层析 1 峰;2 为离子交换层析 2 峰;M 为蛋白质分子量标准

1 indicated peak 1 of ion exchange chromatography; 2 indicated peak 2 of ion exchange chromatography; M indicated protein molecular marker

图 4 β -伴大豆球蛋白亚基的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 4 SDS-PAGE of β -conglycinin subunits



A 为离子交换层析 1 峰的 SDS-PAGE 电泳条带光密度分析;B 为离子交换层析 2 峰的 SDS-PAGE 电泳条带光密度分析

A indicated SDS-PAGE band densitogram of peak 1 of ion exchange chromatography; B indicated SDS-PAGE band densitogram of peak 2 of ion exchange chromatography

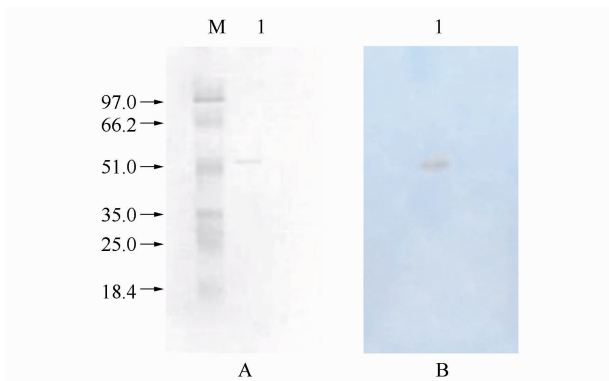
图 5 β -伴大豆球蛋白亚基的电泳条带光密度分析

Fig. 5 Densitogram analysis of SDS-PAGE band of β -conglycinin subunits

6. 纯化的 β 亚基可以与抗 β -伴大豆球蛋白抗体结合,表明纯化的亚基保持原有的抗原表位,具有免疫活性。

3 讨论

β -伴大豆球蛋白是大豆蛋白质的主要过敏原,分子量为 180 kD,为含糖量约 5% 的糖蛋白。 β 伴大豆球蛋白是由三种亚基按不同组合方式构成的三聚体球蛋白。各亚基通过次级键聚合而成。在进行亚基分离纯化之前必需使寡聚蛋白解聚。利用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲解聚 β -伴大豆球蛋白,尿素为强变性剂,可断裂蛋白质分子内和分子间的各种次级键,使多肽链伸展,获得游离亚基。



A 为纯化β亚基的 SDS-PAGE;B 为β亚基的免疫印迹

1 为纯化的β亚基;M 为蛋白质分子量标准

A indicated SDS-PAGE of purified β subunit;B indicated immunoblotting of β subunit

1 indicated purified β subunit;M indicated protein molecular marker

图6 纯化β亚基的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹

Fig. 6 SDS-PAGE and immunoblotting of purified β subunits

构成β伴大豆球蛋白的三种亚基分别为α、α'和β亚基,α和α'亚基由核心区域(含418个氨基酸残基)和扩展区域(α扩展区域含125个氨基酸残基;α'含141个氨基酸残基)构成,而β亚基仅有核心区域(含416个氨基酸残基)^[12]。各亚基间核心区具有高度的相似性,α和α'之间相似程度达90.4%,α和β之间相似程度达76.2%,而α'和β之间相似程度达75.5%^[12]。由于构成β伴大豆球蛋白的各亚基氨基酸组成的差异,三种亚基的等电点不同:α亚基的等电为4.90,α'亚基的等电为5.18,而β亚基等电点为5.66~6.0^[11]。当将β伴大豆球蛋白溶于含6 mol·L⁻¹脲的中性(pH=7.0)缓冲溶液时,由于溶液pH大于各亚基的等电点,三种亚基均带负电荷,但所带电荷量不同。β亚基因等电点较高,所带负电荷少于α和α'亚基,当利用阴离子交换剂进行层析时,β亚基会被首先洗脱下来,而α和α'亚基随后洗脱下来,因此可以将β-伴大豆球蛋白的不同亚基进行分离。试验表明DEAE琼脂糖凝胶FF阴离子交换层析可以制备高纯度的β亚基,但因为α和α'亚基氨基酸组成相似程度高,等电点相近,在缓冲液中所带的带电荷量近似,层析性质相同,离子交换层析中α和α'亚基形成一个峰。

变性的蛋白质当变性因素被除去后又可以恢复到天然状态。在试验中,经6 mol·L⁻¹脲变性后层析纯化获得的β亚基,通过对含依次递减的脲浓度

的缓冲溶液进行梯度透析实现复性。利用β-伴大豆球蛋白的抗血清通过免疫印迹方法鉴定纯化的β亚基的免疫活性。利用天然状态的β-伴大豆球蛋白免疫动物获得的β伴大豆球蛋白的抗血清中包含了针对β-伴大豆球蛋白各个亚基所有抗原表位的全部抗体,利用免疫印迹的方法检测分离纯化获得的亚基与这一多克隆抗体的结合活性,可以对纯化亚基的免疫活性进行判断。结果表明,β-伴大豆球蛋白经变性后利用DEAE琼脂糖凝胶FF阴离子交换层析获得的β亚基,经透析复性后可以与β伴大豆球蛋白的多克隆抗体特异性结合,表明获得的β亚基具有免疫活性。

4 结论

利用DEAE琼脂糖凝胶FF阴离子交换层析可以纯化出高纯度的β-伴大豆球蛋白的β亚基,纯化的β亚基可以与抗β-伴大豆球蛋白血清中的特异性抗体结合,具有免疫学活性。分离纯化大豆抗原亚基是在亚基水平上进行抗原研究的前提和基础,为进一步在亚基水平上进行β-伴大豆球蛋白的抗原性研究提供了可能。

参考文献

- [1] Mowat A M, Ferguson A. Hypersensitivity in the small intestine, induction of cell mediated immunity to a dietary antigen[J]. Clinical and Experimental Immunology, 1981, 43: 574-578.
- [2] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient sensitivity to soybean meal in the early weaned pig[J]. Journal of Animal Science, 1990, 68: 1790-1799.
- [3] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Measuring suitability of soybean products for early weaned pigs with immunological criteria[J]. Journal of Animal Science, 1991, 69: 3299-3307.
- [4] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. α-subunit of β-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(5): 831-833.
- [5] Sissons J W, Smith R H. The effect of different diets, including those containing soybean products, on digesta movement and water and nitrogen absorption in the small intestine of the preruminant calf[J]. British Journal of Nutrition, 1976, 36: 421-426.
- [6] Castimpoalas N, Ekenstam C. Isolation of α-conglycinin, β-conglycinin and γ-conglycinin[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1969, 129: 490-497.
- [7] 李德发. 大豆抗营养因子[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003. (Li D F. Soybean antinutritional factors[M]. Beijing: Science and technology press of China, 2003.)

(下转第309页)

特异性强、稳定性好的优点为快速检测转基因大豆及豆制品提供了新的发展方向,并有望成为简明的常规检测手段,尤其适用于基层检验检疫机构。使用 LAMP 技术快速检测转基因大豆及加工品对于提高食品卫生水平、保证食品安全和推动食品国际贸易发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 黄亚东,白卫滨,孙建霞,等. 抗草甘膦转基因大豆加工品的 PCR 检测研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):119-122. (Huang Y D, Bai W B, Sun J X, et al. Study on the detection of genetically modified soybean products by polymerase chain reaction [J]. Food Research and Development, 2006, 27(3):119-122.)
 - [2] Lipp M, Brodamann P, Pietsch K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder[J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(4):923-928.
 - [3] van Hoef A M, Kok E J, Bouw E, et al. Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products[J]. Food Additives and Contaminants, 1998, 15(7):767-774.
 - [4] Hurst C D, Knight A, Bruce I J. PCR detection of genetically modified soya and maize in food stuffs[J]. Molecular Breeding, 1999, 5:579-586.
 - [5] Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, et al. Genetically modified organisms in food screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 5038-5043.
 - [6] 郑文杰,刘烜,刘伟,等. 转基因大豆加工品的定性 PCR 检测[J]. 农业生物技术学报,2003,11(5):467-471. (Zheng W J, Liu Q, Liu W et al. Qualitative analysis of the processed genetically modified soybean products by PCR-based methods[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(5):467-471.)
 - [7] 吕山花,常汝镇,陶波,等. 抗草甘膦转基因大豆 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国农业科学,2003,36(8):883-887. (Lü S H, Chang R Z, Tao B, et al. Methodological research on PCR based detection of genetically modified soybean resistant to glyphosate[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(8):883-887.)
 - [8] Ahmed F E. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(5):215-223.
 - [9] 周颖,黎源倩,苏宁,等. 双重 PCR-毛细管电泳法快速检测大豆中的转基因成分[J]. 四川大学学报,2005,36(1):119-123. (Zhou Y, Li Y Q, Su N, et al. Rapid analysis of genetically modified soybean by a duplex PCR-capillary electrophoresis system with Laser-induced fluorescence detection[J]. Journal of Sichuan University, 2005, 36(1):119-123.)
 - [10] 岳志芹,梁成珠,吕朋,等. LAMP 技术及其在水生动物疫病诊断中的应用[J]. 检验检疫科学,2006,16(5):70-74. (Yue Z X, Liang C Z, Lü P, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the diagnosis of Aquatic Animals diseases[J]. Inspection and Quarantine Science, 2006, 16(5):70-74.)
 - [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28:E63.
 - [12] 蔡哲钧,冯杰雄,朱圣禾. 核酸环介导等温扩增技术[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(12):1092-1096. (Cai Z J, Feng J X, Zhu S H. Loop-mediated isothermal amplification method[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(12):1092-1096.)
 - [13] 高宏伟,梁成珠,岳志芹,等. 使用 EVA Green 染料的荧光 PCR 定性检测转基因产品[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006, 37(2):319-324. (Gao H W, Liang C Z, Yue Z Q et al. Fluorescence PCR for detection genetically modified products by a novel EVA Green dye[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2006, 37(2):319-324.)
 - [14] 大豆中转基因成分的定性 PCR 检测方法[S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1195—2003. (Protocol of the qualitative polymerase chain reaction (PCR) for detecting genetically modified component in soybeans[S]. SN/T 1195—2003)
 - [15] 食品中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1195—2003. (Protocol of the qualitative polymerase chain reaction (PCR) for detecting foods [S]. SN/T 1195—2003)
 - [16] Meyer R, Chardonens F, Hübner P, et al. Polymerase chain reaction in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in pressed meat products[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1996, 203: 339-344.
-
- (上接第 304 页)
- [8] Fukushima D. Review: Recent progress in research and technology on soybeans[J]. Food Science and Technology Research, 2001, 7(1):8-16.
 - [9] Shibasaki M, Suzuki S, Tajima S, et al. Allergenicity of major components of soybean[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1980, 61:441-448.
 - [10] Bush R K, Schroekenstein, D, Meier-Davis S, et al. Soybean flour asthma; detection of allergens by immunoblotting[J]. Journal Allergy and Clinical Immunology, 1988, 82:251-255.
 - [11] Thanh V H, Shibasaki K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 490(2):370-384.
 - [12] Maruyama N, Katsube T, Wade Y. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean beta-conglycinin in folding, assembly and structural features[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 258:854-862.
 - [13] Chun Liu, Hongling Wang, Zhumei Cui. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4):1310-1316.
 - [14] Iwabuchi S, Yamauchi F. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean protein by immunological methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35:200-205.