

综述

核酸适配体及其在病原微生物学中的应用

梁红茹^{1,2}, 杨松涛², 张涛², 胡桂秋², 夏咸柱²

1 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

2 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

摘要: 核酸适配体指利用指数富集配体系统进化技术筛选出的寡聚核苷酸片段, 它可以特异性地识别靶标并与之结合, 已经广泛应用于基础研究、临床诊断、纳米技术等。以下综述了适配体在微生物学方面的应用。

关键词: 适配体, 病毒, 细菌, 指数富集配体系统进化技术

Aptamers: characteristics and applications in pathogenic microorganism

Hongru Liang^{1,2}, Songtao Yang², Tao Zhang², Guiqiu Hu², and Xianzhu Xia²

1 College of Animal Science and Veterinary, Jilin University, Changchun 130062, China

2 Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China

Abstract: Aptamers are a group of artificial oligonucleotides identified by exponential enrichment system evolution technology (Selective expansion of ligands by exponential enrichment, SELEX). Aptamers have been widely used in basic research, clinical diagnostics, and nano-technology. In this article we will introduce the technology of aptamer and summarize its applications in medical microbiology.

Keywords: aptamer, virus, bacteria, selective expansion of ligands by exponential enrichment (SELEX)

早在 1988 年至 1989 年, 按照生物化学性质从人工合成的核苷酸库中分离筛选核苷酸就已经有广泛的报道。1990 年, Robertson 等通过亲和层析的方法从人为构建的 RNA 文库中筛选到能够高特异性和高亲和力地结合小分子 ATP 的 RNA 序列, 此段序列即为适配体^[1]; 同年, Tuerk 等在试验室成功地从带有 8 个随机序列的 RNA 文库中筛选出可特异性结合噬菌体 T4 DNA 聚合酶的序列^[2]。

适配体 (Aptamer) 是一种经体外筛选技术得到的寡核苷酸序列 (RNA 或 DNA), 与相应的配体有严格的识别能力和高度的亲和力^[3], 大小一般约 6~40 kDa。单链寡核苷酸, 特别是 RNA 的一些二级结构, 如发夹、茎环、假节、凸环、G-四聚体等, 可使核酸分子形成多种三维结构, 成为适配体与靶物质特定区域结合的基础, 二者之间的结合主要通过“假碱基对”的堆积作用、氢键作用、静电作用

和形状匹配等产生高特异性的结合力。适配体具有高特异性、靶分子广、易于体外合成和修饰等优点,已经在基础研究、临床诊断和治疗中显示了广阔的应用前景。本文主要对于适配体的基本特点及其在微生物学中的应用进行综述。

1 核酸适配体的特点

大量适配体的结构已经通过酶学或化学探测,原子核磁共振 (NMR) 和 X 衍射探测确定。由于它们的分子量相对比较小, NMR 方法相对更加适合检测适配体的结构。

1.1 适配体的大小

大多数情况下,应用的适配体应尽可能的小,以使成本更低,可以更容易和靶标结合等。因为功能 RNA 折叠能力是有限的,适配体的最小长度通常比可控的空间序列大,而且,从体外筛选过程最初得到的适配体约 50 个碱基,包括用于扩增和转录的两侧固定序列区和中间随机序列。重组缺失分析、印记和体外合成法可以用于确定绑定于靶标所需的最短核苷酸的大小。最小的适配体长度范围相当广泛,例如在血管内皮生长因子内最小的长度在 23~35 个碱基;最小的黄嘌呤和鸟嘌呤配体有 32 个碱基;链霉素配体有 46 个碱基;与血液丝氨酸蛋白酶 (蛋白 C) 结合的最小部分配体可达 99 个碱基。适配体分子量的范围在 7.5~32 kDa,一般标准大小是 10 kDa,标准适配体的暴露面积一般为 50~60 nm²。

1.2 适配体的靶标物质

大量的体外筛选已经表明筛选出的适配体可以特异地结合任何靶标,包括小的离子 (例如 Zn²⁺)、核苷酸 (例如 ATP)、肽、大的糖蛋白 (例如 CD4)、病毒粒子、细胞、甚至组织^[4],结合的靶标的大小可以为 65 Da 到 150 kDa,理论上没有上限。

适配体结合靶标有一定的特点: 1) 适配体绑定蛋白质的位点有一定的偏嗜性,大量报道表明适配体结合于蛋白质的多聚阴离子位点,例如核酸或者葡糖氨基聚糖类,包括凝血酶和其他凝血级联中的

蛋白酶、大量的肝素结合生长因子、细胞转录因子、病毒调节蛋白等; 2) 适配体即使为不同的结构,它们在大蛋白上的结合位点有高度的相似性。例如,研究发现 6 种针对血管内皮生长因子的适配体都结合在相同的区域,它们与肝素和其他天然配体竞争结合并交联与同一个半胱氨酸,4 个结构不同的适配体与反转录酶结合在同一位置。例如用 3 种 RNA 库,不同的筛选程序,不同的筛选方法针对 HIV-1 的反转录酶筛选的适配体,它们都具有假结结构并且都绑定于酶的共同位点^[5]。

1.3 适配体的亲和力

已报道的适配体和靶标的亲和力变化范围很大,一般和小分子的亲和力相对较低,例如适配体与氨基酸结合,如瓜氨酸和精氨酸,亲和力范围在 0.3~65 μmol 之间;与 ATP、黄嘌呤结合的亲和力分别为 6 μmol、3.3 μmol;与多巴胺结合的亲和力是 2.8 μmol;与维生素 B12 结合的亲和力是 9.0 nmol;适配体与典型核酸分子结合的亲和力在纳摩尔范围,适配体与反转录病毒整合酶结合的亲和力为 10~800 nmol;与反转录酶结合的亲和力为 0.3~20 nmol;与核蛋白结合的亲和力约为 2 nmol;与核糖体 RNA 绑定氨基酸糖苷抗生素结合亲和力大约是 0.8 nmol;免疫球蛋白家族所包括的蛋白质筛选出的适配体亲和力在 2~40 nmol 之间,这可能与免疫球蛋白和细胞表面糖蛋白的作用有关。

1.4 适配体的特异性

研究发现与靶标有高亲和力的适配体多数可以表现为高特异性,可以区别有相似酶活性的不同酶类,例如区分 α-凝血酶和 γ-凝血酶;区分猫免疫缺陷病毒和其他 3 种反转录病毒的反转录酶;区分仅有 23 个残基不同的蛋白激酶 C 的同工酶;区分结构仅仅是 1 个甲基的差别的咖啡因和茶碱。

然而,适配体也只是在一定程度上具有特异性,有时也可以非特异地识别非靶标物质。例如辅酶 A 的适配体也能够识别 AMP;识别黄嘌呤的适配体可以识别鸟嘌呤,但是不能识别腺苷胞嘧啶或尿

嘧啶。

2 核酸适配体的筛选方法

适配体的体外筛选过程称为指数富集配体系统进化技术 (Selective expansion of ligands by exponential enrichment, SELEX), 指模拟自然进化人工筛选技术, 首先体外化学合成一个随机碱基数为 n 的单链寡核苷酸文库, 该文库则含 4^n 个不同的寡核苷酸序列, 常用的寡核苷酸随机序列含 30 个碱基, 库容量高达 $4^{30}(10^{18})$; 随机序列的两端为随后 PCR 循环时结合引物所必需的固定序列, 由于这种随机序列, 而决定了库中每条链自然形成的空间构象, 即二级结构的多样性, 决定了库中潜在地存在能与各种蛋白和低分子靶物质有亲和力的核酸配体^[6]。一般筛选文库的容量巨大 (可达 10^{15} 左右), 理论上应用 SELEX 技术能筛选到自然界几乎所有靶分子的适配子^[7]。

筛选过程包含和达尔文进化理论一样的 3 个过程, 分别是自发突变、自然选择、大量增殖, 一般包括几轮筛选, 每轮循环包括 3 个主要步骤: 1) 寡核苷酸库和靶标分子孵育; 2) 寡核苷酸复合物和未结合的寡核苷酸分离; 3) 结合的序列用 PCR 扩增^[8], 再进入下轮的筛选过程, 通过重复的筛选与扩增那些与靶物质不结合或与靶物质有低亲和力、中亲和力的 DNA 或 RNA 分子被洗去, 而与靶物质有强亲和力的 DNA 或 RNA 分子从非常大的随机库中分离出来且纯度随 SELEX 过程的进行而增高, 从 pmol 到 nmol, 有的甚至到 μmol , 最后占据库的大多数 ($>90\%$ 左右)^[9], 随着寡核苷酸库的逐渐富集对靶标的亲和性增加。一般经过 6~15 次的循环就可以获得特异性的适配体。

3 核酸适配体在病毒方面的应用

SELEX 技术发展至今, 已针对广泛类型的病毒靶分子如逆转录酶、解螺旋酶、核衣壳蛋白和调节因子等筛选出了各自的适体。

目前 SELEX 技术已经被广泛地应用到临床医学的各项研究领域当中, 包括疾病的诊断和治疗。在多种病毒病研究中显示适配体能够识别和结合到病毒的特定部位上, 适配体可以作为功能阻断剂直接影响病毒的复制、翻译中特定步骤, 从而中断疾病发生; 适配体也可以特异性的识别被病毒感染的细胞, 从而用于诊断^[10]。

3.1 在流感病毒方面的应用

流感病毒表面血凝素蛋白 (HA) 呈柱状, 能与、鸟、豚鼠等动物红细胞表面的受体相结合引起凝血, 血凝素蛋白水解后分为轻链和重链两部分, 后者可以与宿主细胞膜上的唾液酸受体相结合, 前者则可以协助病毒包膜与宿主细胞膜相互融合, 血凝素是流感病毒最重要的抗原成分, 也是抗体最重要的结合位点。

2004 年, Jeon 等筛选的 ssDNA 适配体作用于 HA 的受体绑定区域, 阻断了病毒-宿主细胞的结合, 而抑制流感病毒的感染, 并且在细胞培养的试验证明筛选出的适配体可以阻断病毒感染细胞^[11]。2006 年, Gopinath 等针对 A/Panama/2007/1999 (H3N2) 株 HA 区域筛选出的适配体, 和 HA 的亲中性比单克隆抗体的亲和性高约 15 倍, 可以用于鉴定 A 型流感病毒的不同亚型, 并且可以有效地抑制 HA 介导的膜融合^[12]。

3.2 在肝炎病毒方面的应用

肝炎病毒是指引起病毒性肝炎的病原体。甲型肝炎病毒 (HAV) 呈球形, 无包膜, 核酸为单链 RNA; 乙型肝炎病毒 (HBV) 呈球形, 具有双层外壳结构, 外层相当一般病毒的包膜, 核酸为双链 DNA; 丙型肝炎病毒 (HCV) 是一种具有脂质外壳的 RNA 病毒, 直径 50~60 nm, 其基因组为 10 kb 单链 RNA 分子。

2001 年, Butz 等针对 HBV 核心抗原筛选的适配体在细胞内和 HBV 核心蛋白结合, 能有效地干扰病毒衣壳的形成和病毒的生成^[13]。2002 年, Biroccio 等筛选出针对 HCV 亚型 1a 的 RNA 适配

体^[14]; 2003年, Bellecave等筛选出针对HCV亚型1b的DNA适配体^[15]; 2006年, Tomai等筛选出针对HCV亚型3a的DNA适配体, 主要作用位点是RNA依赖的RNA聚合酶, 抑制聚合酶的活性, 从而干扰病毒的复制^[16]。2009年, Kikuchi等筛选出针对HCV的IRES区域II的适配体, IRES对于mRNA的转录很重要, 因此适配体通过影响病毒的转录, 从而影响病毒的复制^[17]。2006年, Fukuda等筛选出针对HCV NS3的适配体, NS3为一种多功能酶, 对于HCV的复制和病毒扩增非常重要, 筛选出的适配体在细胞水平上显示能抑制病毒的繁殖^[18]。

3.3 在艾滋病毒方面的应用

艾滋病, 又称获得性免疫缺陷综合症 (Acquired immune deficiency syndrome, AIDS), 是由人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 引起的人体细胞免疫功能缺陷, 导致一系列条件致微生物感染和肿瘤发生的致命性综合征。

研究发现, 在艾滋病毒的反转录酶上与适配体结合的裂隙是酶与病毒模板及引物结合的部位。Pheroze等筛选针对反转录酶的适配体可以形成类似假结结构的二级结构, 细胞水平上在病毒反转录的早期可以有效地干扰HIV的复制, 阻碍病毒基因的延伸, 并且毒性很小, 较少形成耐药株。2000年Yamamoto等筛选的针对Tat蛋白的RNA适配体, 可以明显抑制HIV的活性, 在细胞水平上可以使HIV-1的复制减少70%^[19]。

3.4 细胞-SELEX病毒方面的应用

病毒感染时, 在复制、组装、释放过程中, 病毒蛋白会插入到细胞的表面从而修饰细胞表面成分, 细胞这种表面的改变或者产生的标志物使细胞产生特异性的抗原, 因此针对这种特异性的抗原设计探针可以检测病毒感染的细胞。而且, 病毒感染细胞产生的标志物在未知的情况下, 也可以用SELEX技术筛选出适配体, 而这种识别特异性靶标的适配体一旦筛选出可以用于检测病毒感染的细胞。2009年, Tang等利用细胞-SELEX技术, 筛选

出识别牛痘病毒感染的A549细胞的适配体, 它不仅识别病毒感染细胞, 而且识别细胞质膜上病毒修饰成分^[28]。

4 核酸适配体在细菌方面的应用

4.1 在细菌检测方面的应用

适配体检测抗原是近年来发展起来的新技术, 将一个适配体末端交联到固相载体上作为捕获分子, 去捕获待测标本中的靶物质, 另一个适配体的5'端标有相应的指示剂, 如荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金等标记转化为检测分子, 当检测分子与相应的待测标本结合后就会产生信号, 以达到检测的目的。

结核分枝杆菌的基因编码的早期分泌蛋白ESAT-6, 仅存于结核杆菌和少数几种非结核杆菌中, 而所有的分支杆菌卡介苗菌株和非致病性分支杆菌中均缺失该基因, 因此ESAT-6作为区分MTB感染和卡介苗接种或环境分枝杆菌感染的特异性抗原, 2007年, 马占忠等以ESAT-6为靶蛋白, 通过SELEX技术筛选获得ESAT-6的适配体, 为结核病诊断和治疗试剂的开发奠定基础^[21]。2010年, 蔡江丽等获得结核分枝杆菌分泌蛋白64抗体的适配体并进行血清学检测方面的研究^[22]。2004年, 潘勤等针对preppilS蛋白运用SELEX筛选特异亲和伤寒杆菌WB型纤毛的RNA适配子, 并进行了初步RNA适配子库的亲和力以及生物学作用的检测, 为进一步研究伤寒杆菌的致病机制和预防、治疗伤寒热症的新型药物提供了基础^[23]。

现在研究认为细菌是一个含有多种成分的综合物, 以整个细菌作为靶分子进行筛选就可以在未知细菌的内部结构、功能的情况下筛选出与其特异性结合的一组适配体, 与单个适配体相比, 一组特异性的适配体必定能提高检出的敏感性和特异性; 更重要的是组合应用能够提高适配体的通用性。

4.2 在细菌治疗方面的应用

虽然SELEX技术的研究应用依然在初级阶段,

但是适配子作为直接蛋白配体、抑制剂以及临床疾病的治疗药物已展现出潜在的应用前景, SELEX 技术出现 8 年后就已经有应用于临床试验的产品。适配体可以直接结合于靶物质表位, 使病原不能和机体结合而使疾病得到控制。因此在理论上, 适配体可以被用于治疗任何由有害基因的表达而引起的疾病, 例如细菌感染、病毒感染、炎性疾病等。

2008 年, 杨清武等为获得内毒素 (LPS) 的抑制性适配子运用于临床脓毒症的防治, 建立了从随机单链 DNA (ssDNA) 文库筛选寡核苷酸的适配子的 SELEX 技术平台, 为后续的治疗性研究提供了平台^[24]。

适配体折叠后形成的特定三维结构能与生物靶标如蛋白质结合, 因此适配体可以直接作为蛋白配体, 占据了致病因子的靶物质表位, 从而控制疾病的发生。

5 其他

原生动物锥虫 *cruzi* 是导致 Chaga 病的病原虫, 这种疾病通常侵犯神经系统和心脏, 未经治疗的死亡率很高。针对锥虫成虫期的 RNA 适配子能够使平均受侵害的细胞中的锥虫数目呈剂量依赖方式减少。1 $\mu\text{mol/L}$ 的适配子能够抑制 50%~70% 的锥虫的入侵。

此外, 适配体可以作为分子探针用于很多疾病的诊断, 例如通过筛选出特异性的适配体, 可以用于肿瘤的诊断。

6 展望

适配体自问世以来取得了令人鼓舞的进步, 特别是一些 SELEX 衍生技术的发展, 使核酸适配体作为诊断和治疗药物的想法逐渐变为事实, 迄今已有适配体药物进入临床前期或临床期试验, 并逐步成为一类新型药物。Merck Serono 的董事 Bernhard Kirschbaum 认为 Aptamers 将在下一代的治疗药物

中起着非常关键的作用。

2004 年末, Pifzer 和 Eyetech 公司共同研制的用于治疗湿性老年黄斑变性的核酸适配子药物 “Macugen” (又名 Pegaptanib) 在美国被批准上市, 适配子在治疗方面的研究越来越深入。Aptamera 公司研制的 AGRO100 是一种新型的核酸适体药物, 临床前试验表明 AGRO100 可在癌细胞表面与 Nucleolin 结合, 抑制癌细胞 DNA 的复制并诱导细胞凋亡, 并对多种癌细胞均有抑制作用, 如肺癌、宫颈癌、恶性黑色素瘤及白血病等, 该药已于 2003 年第 3 季度进入 I 期临床试验。

适配体作为一种新型的核酸药物正迅速发展, 但是也存在一些不足之处, 例如适配体虽然能与靶分子高亲合强特异性结合, 但它难以穿透细胞膜与靶分子接近; 适配体的半衰期大多较短。为了克服适配体难以接近和穿透靶组织的缺点, 位点特异的传递系统成为药物合成研究的热点, 而采用基因治疗的方法, 构建重组病毒然后在体内表达外源的 RNA 适体也成为一种新思路。相信随着适配体研究的深入, 以及适配体筛选制备技术水平的提高, 以上问题将逐步得到解决。而且由于适配体的高特异性、高亲合力、可修饰性, 它不但在疾病的治疗诊断上有十分广阔的前景, 而且在人类基因组学、蛋白组学的研究中也将成为极为重要的研究工具之一。

REFERENCES

- [1] Robertson DL, Joyce GF. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 1990, 344(6265): 467-468.
- [2] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.
- [3] Li T, Wang E, Dong SJ. A grafting strategy for the design of improved G-quadruplex aptamers and high-activity DNazymes. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5126.
- [4] Wang JO, Wang F, Dong SJ. Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of

- adenosine based on aptamer switch. *J Electroanal Chem*, 2009, 626(1/2): 1–5.
- [5] Kulbachinskiy AV. Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry*, 2007, 72(13): 1505–1518.
- [6] Huang SM, Xu Y. Aptamers and SELEX. *Chin J Public Health*, 2008, 24(1): 112–113.
黄思敏, 许杨. 核酸适配体 SELEX 技术筛选研究进展. *中国公共卫生*, 2008, 24(1): 112–113.
- [7] Zhang HY, Fang N, Zhang KH. Methodology for aptamer selection. *China Biotechnol*, 2008, 28(1): 113–118.
张慧卿, 方念, 张焜和. 适配子筛选技术. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(1): 113–118.
- [8] Kulbachinskiy AV. Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry*, 2006, 72(13): 1505–1518.
- [9] Wang HM, Yu RZ, Quan ZJ, et al. Perspective on research and application of nucleic acid aptamers in environment toxicology. *J Environ Health*, 2008, 25(6): 558–560.
王红梅, 余若祯, 全占军, 等. 核酸适配体的研究进展与应用展望. *环境与健康杂志*, 2008, 25(6): 558–560.
- [10] Tang ZW, Parekh P, Turner P, et al. Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 813–822.
- [11] Jeon SH, Kayhan B, Ben-Yedidia T, et al. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 48410–48419.
- [12] Gopinath SC, Misono TS, Kawasaki K, et al. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Gen Virol*, 2006, 87: 479–487.
- [13] Butz K, Denk C, Fitscher B, et al. Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Nature*, 2001, 20(45): 6579–6586.
- [14] Biroccio A, Hamm J, Incitti I, et al. Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 2002, 76(8): 3688–3696.
- [15] Bellecave P, Andreola ML, Ventura M, et al. Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis *in vitro*. *Oligonucleotides*, 2003, 13(6): 455–463.
- [16] Tomai E, Butz K, Lohrey C, et al. Peptide aptamer-mediated inhibition of target proteins by sequestration into aggresomes. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21345–21352.
- [17] Kikuchi K, Umehara T, Nishikawa F, et al. Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 118–123.
- [18] Fukuda K, Nishikawa F, Umehara T, et al. RNA aptamers specific for the HCV NS3 protease and helicase domains. *Viva Origino*, 2006, 34: 133–138.
- [19] Yamamoto R, Baba T, Kumar PK. Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes Cells*, 2000, 5(5): 389–396.
- [20] Tang Z, Parekh P, Turner P, et al. Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 813–822.
- [21] Mang ZZ, Qin LH, Wang YT, et al. Screening and affinity analysis of aptamers to ESAT-6 protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chin J Clinicians*, 2007, 1(5): 383–390.
马占忠, 秦莲花, 王玉炯, 等. 结核分枝杆菌 ESAT-6 抗原适体的筛选与亲和性分析. *中华临床医师杂志*, 2007, 1(5): 383–390.
- [22] Cai JL, Qin LH, Liu ZH, et al. Mycobacterium tuberculosis secreted protein 64 antibody obtained aptamers and serological testing. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2010, 33(4): 309–311.
蔡江丽, 秦莲花, 刘忠华, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 64 抗体适体的获得及血清学检测. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33(4): 309–311.
- [23] Pan Q, Zhang XL, Wang FB, et al. Selection of RNA aptamer to type IVB Pili structural protein of *Salmonella typhi* by SELEX technique. *Chin J Biologicals*, 2004, 17(5): 280–283.
潘勤, 章晓联, 汪付兵, 等. 运用 SELEX 技术筛选特异性高亲和 IVB 型纤毛结构蛋白 RNA 适配子. *中国生物制品学杂志*, 2004, 17(5): 280–283.
- [24] Yang QW, Weng AQ, Lv FL, et al. A procedure for SELEX screening aptamers of LPS from ssDNA random library. *Chongqing Med J*, 2008, 37(16): 1773–1775.
杨清武, 文爱清, 吕凤林, 等. SELEX 筛选 LPS 寡核苷酸适配子方法的建立. *重庆医学*, 2008, 37(16): 1773–1775.