

دورگه سازی در محل بر روی جنین جوجه

محسن سقا*^۱، آزاده اقوامی تهرانی^۱، محمد قاسم گل محمدی^۱

۱-آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: تکنیک دورگه سازی در محل، بر روی جنین (wmISH) یکی از ابزار های قدرتمند در بررسی جایگاه بیان رونوشت ژن در بافت های جنینی است. این مطالعه با هدف راه اندازی این تکنیک با استفاده از کاوش گر ضد الگوی آنزیم RALDH₂ که با دیگوکسی ژنین نشاندار شده بود انجام شد.

مواد و روش ها: پس از جداسازی جنین جوجه در مراحل ابتدایی تکوین، آن ها فیکس و آبگیری شدند و پس از بی رنگ شدن و تاثیر پروتئین کیناز K بر آن ها ابتدا محلول دورگه سازی و بعد محلول دورگه سازی حاوی کاوش گر ضد الگوی آنزیم RALDH₂ به مدت ۳۶ ساعت بر آن ها تاثیر داده شد. در نهایت پس از شستشو با محلول SSC و انکوبه شدن با آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین به آن ها محلول NBT/BCIP افزوده شد و جنین ها به محیط بافری NTMT منتقل شدند. به دسته از جنین ها کاوش گر الگوی این آنزیم اضافه شد و به جنین های کنترل منفی نیز هیچ گونه کاوش گری افزوده نشد.

یافته ها: پس از گذشت ۳۶ ساعت به دنبال اتصال کاوش گر ضد الگوی آنزیم RALDH₂ به رونوشت های این آنزیم در سومایت های جنینی و نیز لوله های عصبی و قلبی جنین جایگاه حضور این رونوشت ها در بافت های مذکور به رنگ آبی مشاهده شدند. در گروه هایی که کاوش گر الگو اضافه شده بود و نیز گروه کنترل منفی سومایت ها و بافت عصبی رنگ نگرفته بودند.

نتیجه گیری: با استفاده از تکنیک wmISH می توان ارزیابی دقیقی از مکان و میزان بیان رونوشت ژن ها در جنین به دست آورد.

کلمات کلیدی: دورگه سازی در محل بر روی جنین، کاوش گر RNA نشاندار شده با دیگوکس ژنین

مقدمه:

PCR و اشکال مختلف انجام آن از جمله RT-PCR و qRT-PCR امروزه کاربرد بسیار وسیعی در حوزه علوم زیست پزشکی پیدا کرده است چرا که با استفاده از این روش ها می توان مقادیر بسیار کم DNA الگو را به کمک واکنش های وابسته به آنزیم، همانندسازی نمود و نحوه بیان ژن ها را هم به صورت کیفی و هم کمی مورد مطالعه قرار داد (۱۰، ۱۱). استفاده از روش های لکه گذاری مانند وسترن بلات و نورترن بلات نیز امکان بررسی بیان پروتئین ها و RNA را تنها پس از جداسازی از سلول ها فراهم می سازد (۳). تمام روش های مولکولی فوق الذکر وابسته به استخراج مولکول های زیستی از سلول ها و بافت ها است که امکان رویت بیان ژن ها را نمی دهد. در عوض، با استفاده از تکنیک های رایجی چون ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی

روش های مختلفی جهت بررسی بیان ژن ها در سطح DNA، RNA و پروتئین وجود دارد. از جمله روش های ارزیابی بیان ژن استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) است. در این روش پس از استخراج DNA و یا RNA و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی می توان بیان ژن ها را مورد بررسی قرار داد.

* نویسنده مسئول:

آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران
پست الکترونیکی: m.sagha@arums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۱

نشاندار شده با دیگوسی ژنین برای این منظور استفاده گردید.

مواد و روش ها:

جداسازی، فیکس و آگیری از جنین جوجه

تخم مرغ های نطفه دار تهیه شده از مرغداری های صنعتی در داخل انکوباتور جوجه کشی در شرایط دمایی ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵۵-۶۰٪ به مدت ۳۲-۳۶ ساعت نگه داری شدند تا جنین های حاصل به مراحل ۷-۱۰ مطابق با جدول تکاملی هامبورگر-هامیلتون برسند. سپس به کمک یک قیچی و پنس استریل پوسته تخم مرغ ها را شکافته و جنین ها از سطح زرده خارج شدند. سپس جنین ها به دیش های باکتریال حاوی DEPC-PBS سرد منتقل شدند. پس از جداسازی پرده های خارج رویانی و آمیون از اطراف جنین، آن ها به درون یک دیش باکتریال حاوی DEPC-PBS سرد و تازه منتقل شده و سپس در محلول پارافرمالدئید ۴٪ به مدت یک شب در یخچال فیکس شدند.

جهت انجام عمل آب گیری پس از تعویض پارافرمالدئید با DEPC-PBS، ناحیه تیره رنگ اطراف جنین (Area Opaca) برش داده شده و از منطقه روشن حاوی جنین (Area Lucida) جدا شدند و بعد به داخل لوله های شیشه ای درب پیچ دار حاوی PBT منتقل شدند. پس از دو بار شستشو در محلول PBT جهت انجام آب گیری، جنین ها در معرض درجات صعودی متانول حل شده در PBT با نسبت های ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت بر روی آن ها متانول ۱۰۰٪ تازه و سرد ریخته شد و جنین ها به درون فریزر ۲۰^{oC} منتقل شدند.

مرحله قبل از دوره سازی:

در این مرحله جنین ها ابتدا در درجات نزولی متانول (۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از دو بار شستشو در محلول PBT، جهت انجام عمل بی رنگ شدن (Bleaching) به آن ها محلول H₂O₂ ۶٪ به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه افزوده شد. پس از خارج کردن محلول پراکسید هیدروژن و افزودن سه میلی لیتر پروتئین کیناز K به مدت ۵-۳۰ دقیقه (بسته به مرحله رشد جنینی)، به جنین ها محلول ۲٪ گلیسین اضافه شد و پس از دو بار شستشو با PBT، جنین ها مجدداً با محلول پارافرمالدئید ۴٪ و گلو تار آلدئید ۲٪ به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال فیکس شدند. در نهایت پس از برداشتن محلول فیکساتیو، جنین ها دو بار در محلول PBT شستشو داده شدند.

می توان محصولات ژن ها یعنی پروتئین ها را به ترتیب در سطح سلولی و بافتی مورد شناسایی قرار داد و محققین قادرند که مکان بروز پروتئین ها را به طور دقیق بررسی نمایند (۴).

تکنیک دوره سازی در محل (In situ hybridization=ISH) ابزاری قدرتمند و استاندارد جهت تجزیه و تحلیل بیان ژن ها و تعیین موقعیت مکانی mRNA (رونوشت ژن ها) در سلول ها و بافت ها می باشد. این تکنیک کاربرد وسیعی در مطالعات سلولی و سرطان دارد و می توان با استفاده از آن به تحلیل بیان نشان گرهای زیستی (Biomarkers) در سلول های سرطانی پرداخت (۸). Fluorescence ISH یا FISH نمونه دیگری از این تکنیک است که در مطالعات کروموزومی سلول ها (سیتوژنتیک) کاربرد فراوانی دارد (۵). دوره سازی در محل بر روی کل جنین (whole-mount In situ hybridization=wmISH) نیز نوع دیگری از تکنیک ISH است که روش بسیار دقیقی در مشاهده محل بیان رونوشت ژن ها در سلول ها و بافت های یک جنین کامل می باشد. بروز ژن ها در سلول ها و بافت های جنینی همواره یکی از موضوعات جذاب در حوزه زیست شناسی تکوینی بوده و هست. استفاده از این شیوه، این امکان را فراهم می سازد تا درک بهتری از الگوی بیان ژن ها به هنگام تعاملات بین سلولی به دست آورد و می توان مشخص نمود که ژن ها با یک الگوی وابسته به زمان در کدام سلول ها و بافت های جنینی و با چه میزانی بیان می شوند (۲، ۷). با استفاده از این روش محققین قادر خواهند بود تا تاثیر عوامل مختلف درون زاد و برون زاد را بر روی جنین مورد کاوش قرار دهند. هم چنین این امکان فراهم می شود تا الگوی زمانی - مکانی بیان ژن ها طی دوره تکوین جنینی مورد ارزیابی قرار گیرد و تاثیر افزایش بیان برخی ژن ها و یا حذف عملکرد آن ها را در میزان و نحوه بیان ژن های دیگر در جنین مورد مطالعه قرار داد (۱۳).

اساس تکنیک wmISH بر پایه اتصال یک کاوش گر (Probe) الیگونکلئوتیدی نشاندار با mRNA مکمل در سلول های جنینی می باشد. این کاوش گر می تواند از نوع DNA و یا RNA (ریبوپروب) باشد که پس از نفوذ به داخل سلول با mRNA هدف هیبرید DNA-RNA و یا هیبرید RNA-RNA ایجاد نماید. کاوش گرهای الیگونکلئوتیدی را می توان با ترکیبات رادیواکتیو و یا غیر رادیواکتیو نظیر دیگوسی ژنین نشاندار نمود و سپس با استفاده از آنتی بادی های ضد این نشان گرها آن ها در سلول و یا بافت جنینی ردیابی نمود (۷). مطالعه حاضر با هدف راه اندازی تکنیک wmISH بر روی جنین جوجه برای نخستین بار در کشور انجام گرفت و از ریوپروب RALDH₂

مرحله دورگه سازی:

منتقل شدند و بعد از آن محلول/NBT (Roche, ۱۶۸۱۴۵۱) به جنین ها اضافه شد. سپس BCIP حل شده در بافر NTMT به جنین ها اضافه شد. جنین ها به مدت ۳۶ ساعت تا ظهور رنگ آبی در بافت های جنینی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آن جهت جلوگیری از ادامه واکنش و ایجاد رنگ پس زمینه، جنین ها با بافر PBT به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند و سپس به محلول PBT تازه تا زمان عکس برداری منتقل شدند.

تهیه برش های انجمادی از جنین:

جهت تهیه برش های انجمادی ابتدا جنین هایی که تکنیک wISH روی آن ها انجام شد در قالب های مخصوص قرار داده شدند و بر روی آن ها چسب (Tissue-OCT compound Tek, ۴۵۸۳) ریخته شد. پس از انجماد جنین در سرمای 20°C - دستگاه کرایوستات (مدل Sakura, Tissue-Tek) از آن ها برش ۱۰ میکرومتری تهیه گردید و برش های به دست آمده روی لام قرار داده شد و پس از خشک شدن عکس های مورد نیاز از آن تهیه شد.

نتایج:

نتایج حاصل از دورگه سازی در محل کاوش گر ضد الگوی آنزیم RALDH₂ نشاندار شده با دیگوکسی ژنین بر روی جنین جوجه نشان داد که این آنزیم بیان خوبی در ناحیه سومیت های جنینی دارد (شکل A۱). در حالی که کاوش گر الگوی همین آنزیم که دیگوکسی ژنین نشاندار شده بود هیچ گونه بیانی را در سومیت های جنین جوجه نشان نداد (شکل B۱). هم چنین جنین هایی که به آن ها کاوش گری افزوده نشده بود و به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شده بودند هیچ گونه بیانی را در سومیت های جنینی نداشتند (شکل C۱). شکل های E و D۱ بیان خوب آنزیم RALDH₂ را در سلول های سومیتی به تصویر می کشد که در حضور کاوش گر ضد الگوی mRNA این آنزیم سلول های سومیتی به رنگ آبی درآمدند. بیان آنزیم فوق در مراحل بالاتر جنینی علاوه بر سومیت در سلول های لوله قلبی و نیز ناحیه سری لوله عصبی جنین نیز مشاهده شد (شکل F۱). در گروه کاوش گر الگو سلول های سومیتی با کاوش گر الگو رنگ چندانی نگرفتند (شکل G۱). در گروه کنترل منفی نیز هیچ گونه بیانی از آنزیم مذکور مشاهده نشد (شکل H۱).

جهت انجام دورگه سازی کاوش گر با mRNA بافت جنینی هدف، جنین ها به مدت ۱۰ دقیقه در مخلوط ۱:۱ از محلول دورگه سازی و PBT قرار داده شدند و پس از افزودن محلول دورگه سازی به مدت ۴-۵ ساعت در دمای 65°C به آن ها محلول دورگه سازی تازه حاوی کاوش گر RALDH₂ نشاندار شده با دیگوکسی ژنین افزوده شد. سپس جنین ها به مدت ۲۴-۳۶ ساعت در دمای 65°C قرارداده شدند. به برخی از جنین ها نیز هیچ گونه کاوش گری افزوده نشد و فقط محلول دورگه سازی اضافه شد این گروه به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. جهت بررسی میزان اختصاصی بودن کاوش گر در یگ گروه به جای کاوش گر نشاندار ضد الگوی مکمل با mRNA هدف از کاوش گر نشاندار شده (رشته الگو) غیر مکمل با رونوشت مورد نظر استفاده گردید.

مرحله پس از دورگه سازی:

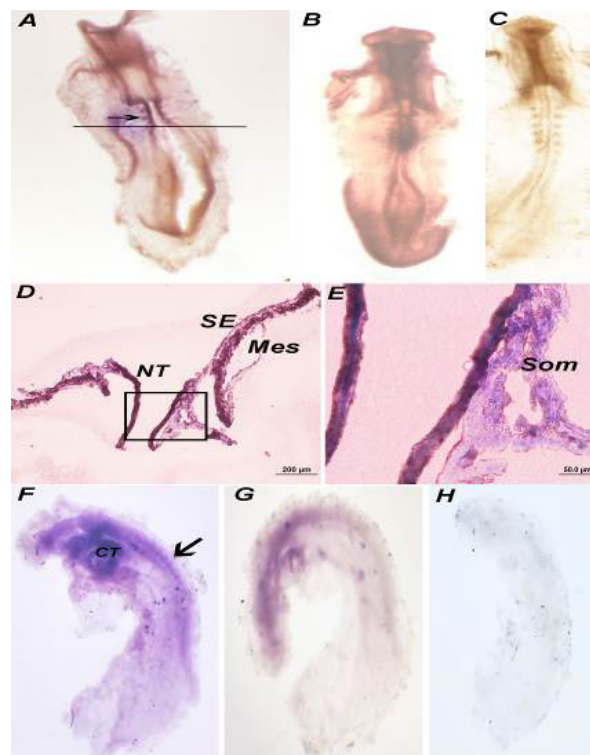
در این مرحله محلول دورگه سازی حاوی کاوش گر از جنین ها خارج شدند و به آن ها به مدت ۱۰ دقیقه محلول دورگه سازی تازه اضافه شد. سپس جنین ها سه بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۱٪ CHAPS / ۲٪ SSC در دمای 65°C درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس به جنین ها محلول ۱٪ CHAPS / ۲٪ SSC حاوی RNase A به مدت یک ساعت در 37°C درجه سانتی گراد اضافه شد و در نهایت جنین ها سه بار و هر دفعه به مدت ۲۰ دقیقه در معرض محلول ۱٪ CHAPS / ۲٪ SSC در دمای 65°C قرار گرفتند. سپس جنین ها به ظروف کشت ۶ خانه ای منتقل شده و به آن ها بافر اسید مالئیک (MABT) به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. آنگاه جنین ها در معرض مخلوط ۲٪ BBR / MABT (BBR=Boehringer-Mannheim Blocking Reagent, Roche, ۱۰۹۶۱۷۶۰۰۱) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. بعد از بلوکه کردن جنین ها به مدت ۳ ساعت با بافر بلوکه کننده حاوی ۲۰٪ سرم گوسفند (Sigma S۲۲۶۳) و ۱٪ سرم آلبومین گاو، آن ها در معرض دو میلی لیتر آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین (Roche, ۱۱۰۹۳۲۷۴۰۰۱) به مدت یک شب در دمای 4°C قرار داده شدند.

مرحله ظهور رنگ:

پس از برداشتن آنتی بادی، جنین ها سه بار و هر مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه در بافر MABT قرار داده شدند. به دنبال آن جنین ها مجدداً دو بار و این بار هر مرتبه به مدت ۳۰ دقیقه با بافر MABT شستشو داده شدند. سپس جنین ها به بافر NTMT

جنینی دارد (۶). در مطالعه حاضر بیان ژن مربوط به آنزیم RALDH γ در سلول های سومایت جنینی با استفاده از این تکنیک مورد بررسی قرار گرفت. این آنزیم در تبدیل رتینول به اسید رتینوئیک نقش دارد و یک مورفوژن قوی در الگو دهی به نورون های تمایز یافته از لوله عصبی جنین در حال تکوین محسوب می شود (۱). آنزیم RALDH γ به طور عمده در سلول های مزانشیمی سومایت های جنینی ترشح می شود؛ از همین رو بیان آن در این سلول ها زیاد است (۹). بررسی wmISH مطالعه حاضر نیز به خوبی بیان رونوشت این ژن را نشان داد. بیان آنزیم RALDH γ در سومایت های جنینی نشان دهنده اتصال کاوش گر ضدالگوی نشاندار شده با دیگوکسی ژنین به رونوشت های این آنزیم است. بررسی های انجام شده نشان می دهد که لوله عصبی (به خصوص مغز قدامی) و ناحیه قلبی جنین نیز در مراحل بالاتر تکوینی می تواند از جمله کانون های ترشحی آنزیم RALDH γ باشند (۱۲ و ۱۴). در این تحقیق نیز مشخص شد که با استفاده از تکنیک wmISH می توان موقعیت مکانی بیان آنزیم مذکور را در لوله عصبی در حال تکوین و نیز لوله قلبی ردیابی نمود.

از جمله مشکلاتی که در این روش ممکن است وجود داشته باشد وجود رنگ پس زمینه است که باید با غربالگری ممتد جنین ها پس از پایان انجام تکنیک آن را کنترل نمود (۲ و ۶). در این تکنیک چون آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین به نشاندار آنزیمی آلکالین فسفاتاز متصل است از بافر این آنزیم که NTMT نام دارد استفاده گردید. واکنش بیش از اندازه این آنزیم در محیط بافری NTMT می تواند سبب ایجاد رنگ پس زمینه گردد. به طور احتمال تیرگی منطقه سری جنین در مراحل بالاتر تکوین در گروهی که از کاوش گر الگو استفاده شد به همین علت می باشد. در هر صورت، عدم بیان کاوش گر الگوی نشاندار شده با دیگوکسی ژنین به خصوص در مراحل ابتدایی تر تکوین جنین نشان دهنده آن است که هیچ پیوندی بین دو رونوشت الگوی این آنزیم نمی تواند صورت گرفته باشد و در نتیجه به دنبال عدم اتصال کاوش گر الگو به رونوشت آنزیم در بافت های جنینی این کاوش گر ها به تدریج با انجام عمل شستشو از محیط درون سلول محو شده و یا به دنبال تاثیر آنزیم RNAase پس از انجام هیبریداسیون تجزیه می گردند. عدم بیان آنزیم RALDH γ در گروه کنترل منفی خود نشان دهنده حساسیت بالای این روش در تشخیص دقیق محل بیان رونوشت های این آنزیم است.



شکل ۱. استفاده از تکنیک wmISH در ارزیابی بیان رونوشت ژن RALDH γ در جنین جوجه. (A) بیان رونوشت ژن RALDH γ با استفاده از کاوش گر ضدالگوی نشان دار شده با دیگوکسی ژنین در جنین جوجه در مرحله ۷. علامت پیکان سومایت جنین را نشان می دهد. (B) عدم بیان رونوشت ژن RALDH γ با استفاده از کاوش گر الگوی نشان دار شده با دیگوکسی ژنین در جنین جوجه در مرحله ۹. (C) عدم بیان رونوشت ژن RALDH γ در جنین جوجه در مرحله ۸ در گروه کنترل منفی. (D) برش انجمادی از مقطع عرضی جنین جوجه نشان داده در شکل A (خط افقی). (E) مقطع عرضی سومایت (Som) با درشت نمایی بالا (کادر ترسیم شده در شکل D) که بیان رونوشت آنزیم RALDH γ را به خوبی نشان می دهد (سلول های آبی رنگ). (F) بیان رونوشت ژن RALDH γ با استفاده از کاوش گر ضدالگوی نشان دار شده با دیگوکسی ژنین در جنین جوجه در مرحله ۱۰ در سومایت ها (علامت پیکان) و لوله قلبی جنین (CT=Cardiac Tube). (G) عدم بیان رونوشت ژن RALDH γ با استفاده از کاوش گر الگوی نشان دار شده با دیگوکسی ژنین در جنین جوجه در مرحله ۱۰. (C) عدم بیان رونوشت ژن RALDH γ در جنین جوجه در مرحله ۱۰ در گروه کنترل منفی.

بحث:

دوره سازی در محل بر روی کل جنین (WmISH) تکنیک دقیق و بسیار قوی جهت بررسی و مشاهده مکان بیان رونوشت ژن ها در سلول ها و بافت های جنین است که کاربرد بسیار وسیعی در مطالعات جنین شناسی و از جمله تاثیر فاکتورهای رشد و مورفوژن ها بر بافت های خاص جنینی و نیز بررسی تغییر الگوی بیان ژن ها به دنبال تعاملات بین سلولی طی تکوین

نتیجه گیری:

تکنیک wmISH روش موفق و دقیقی در مشاهده و ردیابی مکان بیان رونوشت ژن ها در بافت های جنینی بوده و می توان از آن در ارزیابی و تجزیه و تحلیل بیان ژن هایی که در تکوین جنینی نقش دارند بهره برد. هم چنین از تکنیک دورگه سازی در محل می توان جهت بررسی بیان mRNA سلول ها در روش کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) بهره برد.

سپاسگزاری:

این مطالعه با استفاده از منابع مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و از این معاونت به عمل می آورند.

منابع:

- ۱- سقا، م.، اسفندیاری، ا.، رضوی، ش.، تنهایی س.، نصر اصفهانی، م.ح.، بهاروند، ح. نقش اسید رتینوئیک در الگویابی عصبی سلول های بنیادی جنینی موش، مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک، ۱۳۹۲، ۱۶(۷۳)، ص ۱۶-۲۶
- 2- Acloque, H., Wilkinson, D.G., Nieto, M.A. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole-mount and tissue sections. *Methods Cell Biol.* 2008 87:169-85.
- 3- Brown, T.A., 2009. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, 6th edition, John Wiley & Sons.
- 4- Cregger, M., Berger, A.J., Rimm, D.L, Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression, *Arch. Pathol. Lab. Med.* . 2006,130(7):1026-30.
- 5- Garimberti, E., Tosi, S., Fluorescence in situ hybridization (FISH), basic principles and methodology, *Meth Mol. Biol.* 2010, 659:3-20.
- 6- Hargrave, M., Bowles, J., Koopman, P In Situ Hybridization of Whole-Mount Embryos. *Methods Mol. Biol.* . 2006, 326,103-113.
- 7- Irving, C. In-situ hybridization and immunohistochemistry in whole embryos, *Methods Mol. Biol.* 2008,461:687-95.
- 8- Jin, L., Lloyd, R.V. In Situ Hybridization: Methods and Applications, *J. Clinic. Lab. Anal.* 1997,11:2-9
- 9- Maden, M., Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 2007, 8(10):755-65.
- 10- McPherson, M., Moller, S.G. 2006, *PCR*, 2nd edition, Taylor & Francis group,.
- 11- O'Connel, J., RT-PCR, *Methods Mol Biol*, 2002,193:213-226
- 12- Ribes, V., Wang, Z., Dollé, P., Niederreither, K., Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling, *Development*, 2006,133: 351-361.
- 13- Sauka-Spengler, T., Barembaum, M., Gain- and loss-of-function approaches in the chick embryo, *Methods Cell Biol.* 2008, 87:237-56.
- 14- Sirbu, I.O., Zhao, X., Duester, G., Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by downregulating *Isl1* through the *Fgf8* pathway, *Dev Dyn*, 2008, 237(6):1627-1635.