Стандартная операционная процедура

«Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши»

Составлено: А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол получения индуцированных стволовых клеток американкой норки

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 году Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 году Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc [1]. Получение ИПСК поставило вопрос о полноте репрограммирования: остаются ли активными гены, экспрессирующиеся в исходных фибробластах? И насколько характеристики ИПСК соответствует эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам, которые в данном случае являются стандартом. Получение ИПСК мышей открывает широкие возможности изучения репрограммирования и моделирования заболеваний человека. В настоящей СОП описан подробный протокол получения ИПСК мыши с использованием векторов, несущих гены *OCT4, KLF4, SOX2* и *c-MYC* человека.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК мыши для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Ламинарный шкаф II класса защиты.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100–0001).
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Водяная баня.
- Проточный цитофлуориметр.

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан.

- Среда DMEM с 4,5 г/мл глюкозы и GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32430-100).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда MEM α с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32571-093).
- FBS (fetal bovine serum, сыворотка крови телят) для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079).
- FBS (Thermo Fisher Scientific, 10270106).
- KSR (knockout serum replacement, нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828-028).
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038).
- NEAA (non-essential amino acid, не незаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Трипсин-ЭДТА 0,5 % (X10) (Thermo Fisher Scientific, 15400054).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- LIF (PolyGene, PG-A1140-0100).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).
- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- Планшет 12-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 721.110).
- Планшет 6-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 720.113).
- Чашка Петри диаметром 100 мм, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 702.115).

- Стерильные серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,45 микрометра (Jet Biofil, FPV403030).
- Шприц пластиковый стерильный, 10 мл.
- Шприц пластиковый стерильный, 1 мл, с иглой 26GX5/8.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1,8 мл (SSIbio, 6222-S0).
- Гипохлорит натрия («Белизна», «Domestos гель»).
- Пакеты для отходов автоклавируемые, класс «Б».
- Обработанные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Приготовление материалов).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Эмбриональные фибробласты мыши (линии мышей 129, C57BL, BALB и гибриды с участием этих линий).
- Лентивирусные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pLeGO-G2 (Addgene, 25917), pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2 и pLeGO-hc-MYC.

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования клеток линии Phoenix (среда для Phoenix): среда DMEM/F12, 10 % инактивированной 30 мин при 56 °C FBS, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.
- Среда для культивирования эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.

- Среда для культивирования ИПСК мыши (среда для ИПСК): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Трипсин-ЭДТА 0,05 %: развести трипсин-ЭДТА 0,5 % в 10 раз в стерильном НФБ.
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавировать. Рабочий раствор – 0,1 % в НФБ. Покрыть пластиковые чашки Петри или планшеты 0,1 % желатином и поместить на 37 °С не менее чем на 30 мин. Убрать желатин и добавить среду для культивирования клеток.
- Среда для заморозки клеток млекопитающих: 90 % KSR и 10 % ДМСО. Вместо KSR можно использовать FBS. Среду для заморозки можно однократно замораживать на –20 °С, при +4 °С хранить не более двух недель.
- Вальпроевая кислота: развести 81,31 мг в 5 мл автоклавированной бидистиллированной воды (100 мМ), профильтровать через фильтр 0,22 мкм, аликвотировать и заморозить на –20 °С. Рабочая концентрация 1 мМ.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- Гипохлорит натрия (дезинфицирующий раствор): приготовить 20 % раствор «Белизны» или «Domestos гель», хранить не более недели.
- Приготовление фидерных клеток: развести митомицин С в воде до 200 мкг/мл, рекомендуемая рабочая концентрация 10 мкг/мл, мы используем 5 мкг/мл. Обработать эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 из эмбрионов стадии 13,5 дней (получены из ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ ИЦиГ СО РАН) на 2–3 пассаже митомицином С в течение 2–3 ч. Трижды промыть клетки НФБ, снять трипсином-ЭДТА, инактивировать трипсин средой с FBS (не менее чем одним объемом), подсчитать количество клеток, центрифугировать, заморозить аликвоты в среде для заморозки (от 1 до 5 млн кл./мл). За день до использования фидерных клеток разморозить в среде для ЭФМ, рассадить на желатинизированные чашки Петри в концентрации 15 тыс кл./см^2.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши

День –6. Разморозка ЭФМ; Разморозка клеток Phoenix

Разморозка ЭФМ

1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

2) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

3) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, например при заморозке ЭФМ с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (около 10 $см^2$) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка клеток Phoenix

5) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для Phoenix.

6) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с клетками Phoenix и поместить на водяную баню на 37 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

7) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку (или чашку Петри с 10 мл среды). Площадь рассадки может соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, или быть больше.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ЭФМ; Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ЭФМ

9) ЭФМ должны иметь плотность 70–95 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 °C. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

10) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для ЭФМ до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:2–1:4.

Пересадка клеток Phoenix

11) Убрать культуральную среду, аккуратно промыть НФБ не допуская открепления клеток, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 °C. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

12) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для клеток Phoenix до образования суспензии единичных клеток и рассадить по 0,7–1,3 млн кл./10 $см^2$ на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

День –2. Трансфекция клеток Phoenix

13) Добавить в 1,5 мл пробирку 625 мкл Opti-MEM I и 28 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

14) Добавить в пять 1,5 мл пробирок по 125 мкл Opti-MEM I, смесь упаковочных плазмид pMDLg/pRRE, pRSV-Rev и pCMV-VSV-G и, в индивидуальные пробирки, векторы: pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2, pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hc-MYC и pLeGO-G2 (всего 2,5 мкг ДНК), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать. Добавить по 5 мкл реагента P3000 (входит в комплект Lipofectamine 3000), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро сбросить на центрифуге. Соотношение количества ДНК плазмид следующее: pRSV-Rev:pMDLg/pRRE:pCMV-VSV-G:Vector = 5:10:2:10. На лунку 6-луночного планшета необходимо 2,5 мкг ДНК и 5 мкл P3000.

15) Добавить смесь ДНК и P3000 к раствору Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд, подождать 10–15 мин.

16) Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на среду для Phoenix без добавления пенициллина-стрептомицина (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

17) По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO_2-инкубатор.

День –1. Пересадка ЭФМ; смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ЭФМ

18) Рассадить ЭФМ на три (или больше) лунок 6-луночного планшета в концентрации 15 тыс кл./$см^2$ (150 тыс кл./лунку). Остатки заморозить. Одна лунка будет использоваться для определения MOI (multiplicity of infection, «число вирусов на клетку») по свечению GFP, вторая лунка – как отрицательный контроль свечения GFP и, при желании, как отрицательный безвирусный контроль получения ИПСК, остальные лунки – для получения ИПСК.

19) Заморозка ЭФМ: после снятия клеток и центрифугирования осадок ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на –80 °C. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

Смена среды клеткам Phoenix

20) Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для Phoenix без пенициллина-стрептомицина. Не допускать пересушивания и отслоения клеток. Для дезинфекции вирусов необходимо среды и пластик, контактировавшие с вирусами, помещать в 1 % раствор гипохлорита натрия (20 % разведение «Белизны» или «Доместос» в воде, готовить свежий раствор каждую неделю). После дезинфекции необходимо проводить автоклавирование. Автоклавирование всех выбрасываемых материалов проводится до дня 7 культивирования.

День 0. Трансдукция ЭФМ; смена среды клеткам Phoenix

21) Собрать среду с лентивирусами, несущими OCT4, KLF4, SOX2 и c-MYC (OKSM), в пробирку 50 мл, среду с GFP – в пробирку 5 мл. Поменять среду клеткам Phoenix, если планируется повторная трансдукция на день 1.

22) Профильтровать среду с лентивирусными векторами OKSM через фильтр 0,45 мкм в 50 мл пробирку, добавить равный объем среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

23) Профильтровать среду с лентивирусным вектором GFP через фильтр 0,45 мкм в 5 мл пробирку, отобрать в новую пробирку 0,2 мл, добавить 1,8 мл среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

24) В лунке (лунках) с ЭФМ для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для Phoenix. Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ЭФМ

25) Однократной трансдукции клеток лентивирусами может быть достаточно для получения ИПСК, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится также, как и в день 0, с минимальными изменениями: собрать среду с лентивирусами, несущими OCT4, KLF4, SOX2, но не c-MYC, среда с GFP не требуется.

26) В лунке (лунках) с ЭФМ для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунках для тестирования MOI и отрицательном контроле – на среду для Phoenix.

День 2. Смена среды

27) Поменять среду во всех лунках на среду для ЭФМ.

День 4. Смена среды; разморозка фидерных клеток; определение MOI

Смена среды

28) Поменять среду во всех лунках на среду для ИПСК с 1 мМ вальпроевой кислоты.

Разморозка фидерных клеток

29) Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. разделе Подготовка реагентов).

30) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

31) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 °С. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

32) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные чашки Петри с 10 мл среды на лунку с плотностью 15 тыс кл./см^2.

33) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Определение MOI

34) Интеграция вектора, содержащего GFP, позволяет провести грубую оценку эффективности трансдукции остальными вирусами. Для определения MOI необходимо провести проточную цитофлуорометрию на присутствие белка GFP. Клетки с контрольной и обработанной вирусом с GFP лунок снять трипсином-ЭДТА, центрифугировать, промыть НФБ, центрифугировать, фиксировать в 1 % парафармальдегиде 5 мин, центрифугировать, ресуспендировать в НФБ и определить процент клеток, имеющих GFP, на проточном цитофлуориметре.

35) Подсчет MOI: MOI = –Ln(1 – [доля GFP+ клеток]). Например, если 63,2 % клеток имели флуоресценцию GFP, MOI = –Ln (1 – 0,632) = 1, то есть в среднем один вирус на клетку или, точнее, соотношение числа вирусов к числу клеток – единица. Так как использовалось 10 % разведение вируса, реальный MOI = 10. Сделаем качественную оценку MOI, предположим, что MOI для вирусов OKSM не отличается от такового для GFP, тогда MOI в опыте также равен 10. Разбавление среды вдвое соответственно уменьшило MOI, а вторая трансдукция – увеличила в два раза, итого, по грубой оценке, в клетках должно быть около 10 вирусных частиц. Для получения ИПСК MOI должен быть более 4. Из-за токсичности вирусов подсчет выше неверен. Оптимально определять MOI по смеси 50% вирусных частиц с GFP, 50% среды и полибрена. Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удается достичь необходимого титра вируса можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 °С.

День 5. Пересадка ЭФМ

36) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 мМ.

37) ЭФМ, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки с 1 лунки 6-луночного планшета перенести на 2 чашки Петри.

Дни 7–11. Смена среды

38) Каждый второй день смена среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

День 13. Смена среды; разморозка фидерных клеток

39) Сменить среду на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

40) Разморозить фидерные клетки на необходимое число желатинизированных 12-луночных планшетов.

День 14. Снятие колоний ИПСК

41) Ко дню 14 на чашках Петри должны быть десятки-сотни колоний, часть с морфологией, соответствующей ИПСК. Отметить тонким маркером снизу чашки Петри колонии с морфологией ИПСК для снятия.

42) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить по 1 мл среды для ИПСК без вальпроевой кислоты на лунку 12-луночного планшета.

43) Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (около 50 мкл) и трипсина-ЭДТА 0,05 % (около 20 мкл).

44) Обвести выбранные колонии иглой шприца на 1 мл, сковырнуть индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА 0,05 % и инкубировать 5–10 мин при 37 °C.

45) Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ИПСК и перенести в лунку с фидерными клетками. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа ИПСК с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение и характеризация ИПСК

46) Менять среду на среду для ИПСК каждый день.

47) При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний проводить пересадку ИПСК. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА 0,05 %, поместить на 10 мин на 37 °C.

48) Добавить один объем среды для ИПСК, ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин, рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2–1:12 в зависимости от плотности клеток.

49) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ИПСК: после снятия клеток и центрифугирования осадок с лунки 12- или 6-луночного планшета ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на –80 °С. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. 126(4). 663–676.