

羊棘球蚴(包虫)间接 ELISA 抗体检测试剂盒的研制

邓灿新¹, 田东升¹, 李春燕², 赵扬扬², 曾仁权^{1*}, 曹政^{2*} (1. 西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆 402460; 2. 重庆澳龙生物制品有限公司, 重庆 402460)

摘要 [目的] 研制基于 Eg95 重组蛋白为检测抗原的羊棘球蚴(包虫)间接 ELISA 抗体检测试剂盒。[方法] 以细粒棘球蚴 Eg95 重组蛋白为检测抗原, 筛选间接 ELISA 的最佳反应条件, 确定 ELISA 的判定标准, 检测敏感性和重复性, 组成、包装试剂盒并初步应用。[结果] 建立的 ELISA 方法特异性强、敏感性高、重复性好, 检测阳性血清和阴性血清的准确率均为 100%。[结论] 研制的羊棘球蚴(包虫)病 ELISA 抗体检测试剂盒可用于细粒棘球蚴 Eg95 亚单位疫苗抗体水平的检测。

关键词 细粒棘球蚴; Eg95 蛋白; 试剂盒; ELISA

中图分类号 S859.79*5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)30-105-04

The Development of the Indirect ELISA Test Kit for *Echinococcus granulosus* Antibody

DENG Can-xin¹, TIAN Dong-sheng¹, LI Chun-yan², ZENG Ren-quan^{1*}, CAO Zheng^{2*} et al (1. Department of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460; 2. Chongqing Auleon Biological Company Limited, Chongqing 402460)

Abstract [Objective] This study was designed to develop an indirect ELISA kit for detecting antibodies against *Echinococcus granulosus* using recombinant EG95 protein as antigen. [Method] Eg95 recombinant protein as antigen, determined the optimal reaction conditions and criterion of indirect ELISA, detection sensitivity, repeatability, detected its sensitivity and repeatability. [Result] The ELISA method is high specificity, sensitivity, accuracy (100%) and good repeatability. [Conclusion] This ELISA kit could be used to monitor the immune status of the echinococcosis Eg95 genetic engineering subunit vaccine.

Key words *Echinococcus granulosus*; Eg95 protein; Kit; ELISA

我国是世界上棘球蚴病最严重的国家之一, 我国西北地区(如甘肃、宁夏、内蒙古、青海、四川、陕西、西藏等), 棘球蚴病尤为严重^[1]。棘球蚴病是我国卫生部规划防治的五大寄生虫病之一, 现已证实全国有 31 个省(市、区)存在包虫病感染病例, 有 100 多万包虫病现症患者, 受威胁人口达几千万, 包虫病畜超过 4 000 万头, 每年新发病畜达 800 多万头, 年经济损失超过 10 亿元。该病已成为西部牧区群众因病致贫、因病返贫的主要原因^[2-3]。对动物棘球蚴病的生前诊断比较困难, 疫苗免疫已成为预防与控制棘球蚴病的重要途径, 但是国内还没有相应的检测试剂盒来评价疫苗的免疫效果, 这就亟需准确、有效的诊断方法的出现。为了建立简单、有效的 ELISA 抗体检测试剂盒, 用于对疫苗的免疫效果进行及时监测, 为羊棘球蚴(包虫)病基因工程亚单位苗提供了配套的检测方法以评价疫苗的免疫效果, 利用 Eg95 抗原的特异性和 ELISA 方法的快速、灵敏特点相结合研制出间接 ELISA 抗体检测试剂盒, 旨在为促进细粒棘球蚴(包虫)病基因工程亚单位苗的应用及包虫病的预防发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 重组 Eg95 蛋白和绵羊血清 细粒棘球蚴 Eg95 重组蛋白, 保存于 -70℃ 冰箱中备用; 绵羊血清均采自四川省邛崃市非疫区, 保存于 -20℃ 备用^[4]。

1.2 主要试剂 HRP 酶稳定剂和 proclin300 防腐剂均购自

上海闪晶分子生物科技有限公司; 包被缓冲液(pH9.6、0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液、TMB 底物溶液、25×洗涤缓冲液(PBST)、样品稀释液、终止液、酶标二抗、标准阴性血清和阳性血清。

1.3 阴性血清和阳性血清的制备 取未注射 Eg95 基因工程亚单位苗、未感染包虫病的绵羊血清, 经 Western blot 方法鉴定为阴性, 即为阴性血清。SDS-PAGE 电泳加样时, 仅加入蛋白 Mark 与纯化后 Eg95 重组蛋白, 转膜、分割后用于后续试验, 第 7 步用 1:600 倍稀释的待检血清作为一抗替代 HRP 标记的抗 His 标签鼠单克隆抗体溶液, 37℃ 摇动(70 r/min)孵育 1 h 后, 用 PBST 漂洗 3 次, 用封闭液 1:2 000 稀释的 HRP 标记的兔抗绵羊 IgG 作为二抗, 37℃ 摇动(70 r/min)孵育 1 h 后, 用 PBST 漂洗 3 次, 加入 TMB 底物显色。

用 Eg95 基因工程亚单位苗对绵羊进行二次免疫, 二免后 1 个月采血分离血清, 作为备选血清, 选取 60 份备选血清和 30 份阴性血清用间接 ELISA 法测其 OD_{450} 值。

1.4 间接 ELISA 最佳反应条件的筛选

1.4.1 棋盘法确定抗原包被量及血清稀释度。 用包被缓冲液将纯化到的重组 Eg95 蛋白分别作 0.5、1、2、4 $\mu\text{g/ml}$ 4 个倍比稀释度, 包被酶标板, 37℃ 温育 1 h, 然后 4℃ 下过夜。用血清稀释液将阳性血清及阴性血清分别进行 1:50、1:100、1:200、1:400 倍比稀释, 组成方阵。其余条件不变, 按照 ELISA 程序操作。结果判定以阳性血清 OD_{450} 值(P)为 1.000 左右, 阴性血清 OD_{450} 值(N)低, 且 P/N 值最大时的重组 Eg95 蛋白包被浓度和血清稀释度为最佳条件。

1.4.2 血清最佳作用时间的确定。 在最适抗原浓度和血清稀释度的基础上, 将血清作用时间分别设定为 30、45、60 min, 其他步骤按照 ELISA 程序操作, 测定 OD_{450} 值, 按照判断

基金项目 重庆市农业科技成果转化资金项目(cstc2015jcsf-nycgzhA10002)。

作者简介 邓灿新(1990-), 男, 广西梧州人, 硕士研究生, 研究方向: 动物病原生物学。* 通讯作者, 曾仁权, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事动物药物化学研究。* 通讯作者, 曹政, 研究员, 博士, 从事微生物分子生物学研究。

收稿日期 2015-08-31

标准比较分析数据,以确定血清作用的最佳时间^[5-6]。

1.4.3 酶标二抗稀释度及作用时间的确定。已确定的条件不变,将酶标二抗进行 1:5 000、1:10 000、1:15 000 稀释(即将二抗保护剂稀释后的二抗进行 1:50、1:100、1:150 稀释),分别于 37 ℃条件下反应 30、45、60 min,进行 ELISA 试验,测定 OD_{450} 值,以确定酶标二抗的稀释度和作用的最佳时间。

1.4.4 显色时间的确定。已确定的条件不变,将底物于 37 ℃条件下作用时间设定为 5、10、15、20 min,进行 ELISA 试验,终止反应后,比较分析数据,以确定底物作用的最佳时间。

1.5 ELISA 判定标准的确定 用 60 份阴性绵羊血清为样本按照已建立的方法进行检测,对检测结果进行分析,确定阴性和阳性的判定标准。

1.6 敏感性检测 用 ELISA 方法检测 1 份阳性血清,从 1:200 开始进行一系列稀释后作为一抗,确定能够检测出阳性的最高血清稀释度。

1.7 阻断试验 选取 3 份按 1:100 稀释阳性血清各 100 μ l,分别加入 100 μ l 10 μ g/ml 重组 Eg95 蛋白,37 ℃下温育 1 h,然后 8 000 r/min 离心 5 min,取 100 μ l 上清作为一抗应用该 ELISA 方法进行检测。同时,设置未阻断的 1:200 稀释的阳性血清作为对照,比较 2 组血清的 OD_{450} 值,观察重组蛋白能否阻断阳性血清反应。

1.8 重复性检测

1.8.1 批内重复性检测。取 3 份不同效价的绵羊阳性血清和 3 份绵羊阴性血清,每份血清作 8 个孔,用同一批包被的酶

变异系数。

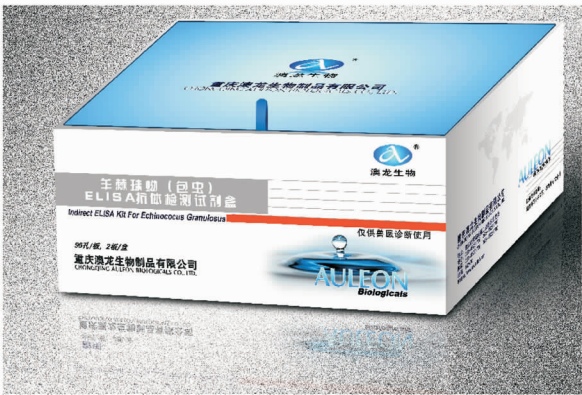
1.8.2 批间重复性检测。取 3 份不同效价绵羊阳性血清和 1 份绵羊阴性血清,每份绵羊血清作 2 个重复,用 5 个不同批次包被的酶标板,在相同条件下同时进行批间重复试验,计算标准差和变异系数。

1.9 ELISA 方法的初步应用 随机选取 45 份 Eg95 亚单位苗二免四周后绵羊血清用建立的 ELISA 方法进行检测;随机选取 30 份未免疫未患棘球蚴病绵羊血清 30 份进行 ELISA 检测。

1.10 羊棘球蚴(包虫)间接 ELISA 抗体检测试剂盒的组成及包装 酶标板室温晾干后,用锡箔袋真空干燥(加干燥剂)包装酶标板,血清稀释版为没有包被抗原酶标板。试剂盒的组成如表 1 所示,试剂盒示意图见图 1。

表 1 试剂盒的组成

成分	数量	规格
抗原包被板	2 块	96 孔/块
阴性对照血清	1 管	50 μ l/管
阳性对照血清	1 管	50 μ l/管
兔抗羊酶标二抗	2 管	0.2 ml/管
25 倍浓缩洗涤液	1 瓶	25 ml/瓶
底物液 A	1 瓶	10 ml/瓶
底物液 B	1 瓶	10 ml/瓶
终止液	1 瓶	10 ml/瓶
样品稀释液	2 瓶	30 ml/瓶
血清稀释板	2 块	96 孔/块
说明书	1 张	



A



B

注:A.外观示意图;B.展示图。

图 1 试剂盒示意

1.11 试剂盒的保存期试验 将同一批次制备的试剂盒置于 4 ℃下保存,每月各取 1 个试剂盒,按照试剂盒说明书作标准阴阳性对照,并对同一份阳性血清进行敏感性测定,观察其敏感性的变化,以确定试剂盒的保存期限。

2 结果与分析

2.1 间接 ELISA 最佳反应条件的筛选结果

2.1.1 Eg95 重组蛋白的包被量和抗血清稀释度的确定。由表 2 可知,包被抗原浓度为 2 μ g/ml、血清 1:200 稀释时,阳性血清 OD_{450} 值在 1.000 左右,阴性血清 OD_{450} 值较低, P/N

值最高。因此,试验确定抗原的最佳包被浓度为 2 μ g/ml,血清的最佳稀释度为 1:200。

2.1.2 血清最佳作用时间的确定。由表 3 可知,当血清作用时间为 45 min 时,阳性血清 OD_{450} (P)值在 1.000 左右,阴性血清 OD_{450} 值(N)较低,且 P/N 值最大。因此,确定 45 min 为待测血清的最佳作用时间。

2.1.3 酶标二抗稀释度及作用时间的确定。由表 4 可知,当酶标二抗以 1:10 000 稀释作用 30 min 时,阳性血清 OD_{450} 值(P)在 1.000 左右,阴性血清 OD_{450} 值(N)较低,且 P/N 值

最大。因此,确定酶标二抗以 1:10 000 稀释,作用时间为 30 min。

表 2 抗原最适包被浓度及血清最佳稀释度的确定

血清稀 释度	抗原包被 浓度// $\mu\text{g/ml}$	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>P/N</i>
1:50	0.5	0.813	0.087	9.341
	1.0	0.981	0.086	11.403
	2.0	1.142	0.107	10.677
	4.0	1.255	0.138	8.879
1:100	0.5	0.737	0.068	10.840
	1.0	0.839	0.069	12.159
	2.0	1.049	0.077	13.623
	4.0	1.113	0.096	11.594
1:200	0.5	0.726	0.066	10.993
	1.0	0.826	0.066	12.520
	2.0	1.023	0.067	15.264
	4.0	1.129	0.079	14.288
1:400	0.5	0.705	0.060	11.743
	1.0	0.805	0.059	13.650
	2.0	0.943	0.064	14.733
	4.0	1.130	0.069	16.374

表 3 血清最佳作用时间的确定

血清作用 时间//min	阳性血清 <i>OD</i> 值(<i>P</i>)	阴性血清 <i>OD</i> 值(<i>N</i>)	<i>P/N</i>
30	0.936	0.062	15.097
45	1.016	0.066	15.394
60	1.016	0.066	15.394

表 4 酶标抗体工作浓度及作用时间的确定

二抗稀 释度	作用时间 min	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>P/N</i>
1:5 000	30	1.585	0.108	14.748
	45	1.670	0.117	14.314
	60	1.740	0.136	12.810
1:10 000	30	1.053	0.068	15.406
	45	1.205	0.079	15.227
	60	1.296	0.088	14.816
1:15 000	30	0.814	0.065	12.517
	45	0.929	0.071	13.117
	60	1.144	0.09	11.532

2.1.4 底物最佳显色时间的确定。由表 5 可知,当显色时间为 10 min 时,*P/N* 值最大,且阳性血清 *OD*₄₅₀ 值(*P*)也在 1.000 左右,阴性血清 *OD*₄₅₀ 值(*N*)较低。因此确定底物最佳显色时间为 10 min。

表 5 底物显色时间的确定

底物作用 时间//min	阳性血清 <i>OD</i> 值(<i>P</i>)	阴性血清 <i>OD</i> 值(<i>N</i>)	<i>P/N</i>
5	0.787	0.058	13.569
10	1.053	0.065	16.200
15	1.178	0.074	15.919
20	1.279	0.082	15.598

2.2 重组蛋白 ELISA 判定标准的确定 用 60 份阴性血清为样本按建立的方法进行检测,结果表明阴性血清的平均值 $\bar{x}$ 为 0.085,标准差 *SD* 为 0.037。根据统计学原理确定临界值,若 *OD*₄₅₀ 值 $\geq \bar{x} + 3SD = 0.196$ 时,则判为阳性;则 *OD*₄₅₀ 值

$\leq \bar{x} + 2SD = 0.159$ 时,则判为阴性;若 *OD*₄₅₀ 值介于二者之间者判为可疑,则需重新检测,若重新检测结果仍小于 0.196 则判定为阴性。

2.3 敏感性检测结果 取 1 份绵羊阳性血清从 1:200 倍开始倍比稀释,进行间接 ELISA 检测。从图 3 可以看出,当血清稀释度为 1:25 600 时结果仍为阳性。这表明建立的方法具有较好的敏感性。

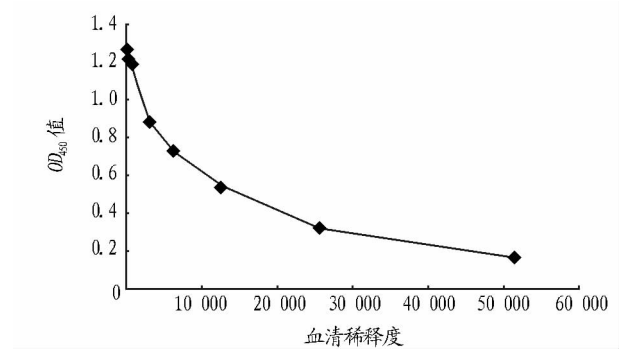


图 3 阳性血清最低抗体检出价

2.4 阻断试验结果 用包被抗原蛋白和已知阳性血清进行阻断反应,结果表明,经重组 Eg95 蛋白处理过的 3 份阳性血清 *OD*₄₅₀ 值分别下降 90.76%、90.53% 和 89.95%,表明该试验建立的间接 ELISA 方法具有良好的特异性。

2.5 重复性检测结果

2.5.1 批内重复试验结果。针对建立的间接 ELISA 方法进行批内重复性试验,结果表明 6 份绵羊血清测得 *OD*₄₅₀ 值的变异系数为 2.24%~5.56%,均低于 10%,表明该间接 ELISA 方法批内重复性良好。

2.5.2 批间重复试验结果。针对建立的间接 ELISA 方法进行批内重复性试验,结果表明 4 份绵羊血清测得 *OD*₄₅₀ 值的变异系数为 5.40%~8.67%,均小于 10%,表明该间接 ELISA 方法的批间重复性良好。

2.6 ELISA 方法的初步应用结果 用建立的 ELISA 方法对 45 份二免后绵羊血清和 30 份未免疫健康绵羊血清进行检测,结果表明二免后绵羊血清 *OD*₄₅₀ 值为 0.595~1.608,均大于临界值,判定为阳性;未免疫绵羊血清 *OD*₄₅₀ 值为 0.060~0.147,均小于临界值,判定为阴性。

2.7 羊棘球蚴(包虫)间接 ELISA 抗体检测试剂盒的使用方法 ①取抗原包被板,分别将稀释好的待检血清和标准对照各取 100 μl 加入到酶标板孔中,阴性对照和阳性对照各设 2 孔,轻轻振匀孔中样品(勿溢出),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育 45 min;②取出 96 孔酶标板,倾去孔内液体,在吸水纸上拍干后每孔加入稀释过的 1 $\times$ 洗涤液 200 μl ,轻轻振匀孔中液体(勿溢出),每次洗板 2 min,每次洗完在干净吸水纸上拍干,共计洗板 3 次;③将兔抗绵羊酶标二抗用稀释液稀释 100 倍,混匀,每孔加酶标二抗 100 μl ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育 30 min;④洗板,方法同上,但需洗 4 次;⑤将底物 A、底物 B 按 1:1 的

例混匀后,每孔加入 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光显色 10 min;
⑥每孔加入终止液 50 μl ,10 min 内在酶标仪上测各孔 OD_{450} 值;
⑦结果判定:标准阳性血清血清 OD_{450} 值 ≥ 0.6 ,标准阴性血清 OD_{450} 值 ≤ 0.159 ,ELISA 试验成立,样品 OD_{450} 值 ≥ 0.196 时,判为阳性;当 OD_{450} 值 ≤ 0.159 时,判为阴性;若样品 OD_{450} 值介于二者之间则判为可疑,需重新检测,若检测结果仍小于 0.196 则判定为阴性。

表 6 试剂盒保存期的测定结果

标准	不同保存时间的敏感性变化						
样品	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月
阳性	1:25 600	1:25 600	1:256 00	1:25 600	1:25 600	1:25 600	1:12 800
阴性	-	-	-	-	-	-	-

3 讨论

ELISA 检测试剂盒包被所用的抗原要求必须有优质和稳定等特点,纯度较高,抗原的纯度直接关系到 ELISA 试验的特异性和敏感性。抗原包被的浓度也对试验结果有着较大的影响。若抗原包被浓度过低,就会留下未吸附的抗原固相载体影响试验效果;若抗原包被浓度过高,就会使蛋白分子产生多层化现象,使蛋白容易被洗掉,从而出现非特异反应及造成抗原的浪费。通过对比 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g/ml}$ 4 个包被浓度的试验结果,确定的最佳包被浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 。

若要得到准确而且重复性好的试验结果,就要求血清样品必须以一个最佳的稀释度来进行试验。经过对比 1:50、1:100、1:200 和 1:400 4 个稀释度和 30、45、60 min 3 个作用时间的试验结果发现 1:200 倍稀释血清、作用 45 min 效果最佳。因此,试验选用 1:200 来稀释血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 45 min。另外,待测血清的保存对 ELISA 试验也非常关键,若对血清的保存不当将会导致假阳性和假阴性的结果出现,保存血清应添加防腐剂,少量分装后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,避免反复冻融。

酶标二抗也是影响试验结果的重要因素。若酶标二抗浓度太低,不足以充分与血清中抗体结合;若酶标二抗浓度太高,又会造成非特异性吸附。经过对比 1:5 000、1:10 000 和 1:15 000 3 个稀释度和 30、45 及 60 min 3 个作用时间的试验结果发现 1:10 000 稀释酶标二抗及二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min 效果最佳,因此试验选用 1:10 000 来稀释酶标二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 min。

关于判定标准,笔者测定了 60 份阴性血清的 OD_{450} 值。根据统计学原则,约有 95.45% 的观测值在 $\bar{x} \pm 2SD$ 范围内;约有 99.73% 的观测值在 $\bar{x} \pm 3SD$ 范围内^[7]。笔者取阴性样本 OD 均值($\bar{x}$) + 3SD 为置信区间上限,取阴性样本 OD 均值($\bar{x}$) + 2SD 为置信区间下限,由此可得到判定标准,样本的 OD_{450} 值 $\geq$ 阴性样本 OD 均值($\bar{x}$) + 3SD 时,判为阳性;样本的 OD_{450} 值 $\leq$ 阴性样本 OD 均值($\bar{x}$) + 2SD 时,判为阴性;若 OD_{450} 值介于二者之间,则定为可疑,则需要重检^[8-9]。

敏感性、特异性与重复性是建立 ELISA 方法时必须检测的项目,是 ELISA 方法能否成功建立的关键。笔者将阳性

2.8 试剂盒保存期的试验结果 由表 6 可知,7 次 ELISA 试验标准阳性血清及标准阴性血清均成立,且保存 6 个月后检测标准阳性血清能检出为阳性的最高稀释度为 1:25 600,到第 7 个月标准阳性血清能检出为阳性的最高稀释度下降到 1:12 800,说明试剂盒的检测效果略有下降。这表明试剂盒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下至少可以保存 6 个月。

血清稀释 25 600 倍时,仍能检测为阳性,说明建立的 ELISA 敏感性高。该试验用阻断试验来反应 ELISA 的特异性,所用 Eg95 蛋白对阳性血清的阻断率在 90% 左右,说明 Eg95 蛋白能特异性阻断阳性血清,表明该 ELISA 方法的特异性强;该试验的批内及批间重复性试验表明变异系数均在 2.24% ~ 8.67%,均不超过 10%,与张先锋、吴洋、王芳等建立的 ELISA 方法的重复性相符,说明建立的 ELISA 方法的重复性良好^[10]。试剂盒保存期的长短是影响试剂盒产业化的重要因素之一,也是试剂盒能否过关的关键因素。该试验建立的间接 ELISA 试剂盒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月后,敏感性无变化,表明试剂盒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可以保存 6 个月,与其他 ELISA 商品化试剂盒的保存期相近。

该 ELISA 方法对 45 份二免后绵羊血清进行检测,结果均为阳性;对 30 份来自非疫区未免疫的健康绵羊血清进行检测,结果均为阴性。这说明该 ELISA 方法可用于细粒棘球绦 Eg95 亚单位疫苗抗体水平的检测。但是,由于目前还没有检测细粒棘球绦 Eg95 亚单位疫苗抗体的商品化试剂盒问世,所以笔者的建立 ELISA 方法还不能与其他 ELISA 检测方法相比。

参考文献

[1] 王颖旺,杨光友,蒋忠荣,等.细粒棘球绦虫基因型与抗原研究进展[J].中国动物传染病学报,2010,18(1):79-86.
[2] WANG Z,WANG X,LIU X.Echinococcosis in China,a review of the epidemiology of Echinococcus spp.[J].Ecohealth,2008,5(2):115-126.
[3] 张先军.包虫病危害与预防[J].畜牧兽医杂志,2012(1):114-116.
[4] 贾海英,马秀敏,丁剑冰,等.细粒棘球绦 Eg95 重组蛋白表达及其血清学反应的研究[J].中国人兽共患病学报,2009,25(4):344-347.
[5] 刘红霞,张德祯,闫鸿斌,等.细粒棘球绦虫重组 EG95 抗原在绵羊绦虫病血清抗体检测中的应用[J].中国兽医科学,2012(9):911-915.
[6] 贾红,刘丹,侯绍华,等.羊细粒棘球绦病抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J].畜牧兽医学报,2011,42(1):65-70.
[7] 明道绪.生物统计附试验设计[M].4 版.北京:中国农业出版社,2009:32.
[8] 胡小华,李刚,史利军,等.猪圆环病毒 2 型间接 ELISA 抗体检测试剂盒的研制及初步应用[J].中国畜牧兽医,2011,38(3):120-123.
[9] 吴忆春.猪繁殖与呼吸综合征病毒重组 M 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立及应用[J].中国畜牧兽医,2013,40(7):51-55.
[10] 王芳,雷震,于力,等.山羊痘病毒 p32 基因原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2009,31(12):945-948.