

# 核移植技术克隆动物胚胎研究的现状及展望

刘林 安民

(北京农业大学畜牧系动物繁殖教研室, 100094)

胚胎克隆,即建立胚胎的无性繁殖系,最有效的方法是通过用核移植技术将一枚多细胞胚胎的每一细胞核移植到一个去核的、激活的成熟卵母细胞中,重新构成新的胚胎,重组胚胎移植后,发育成与供体胚胎基因型相同的后代。Spemann 最先提出将多细胞胚的每一细胞核分别转移到去核的卵母细胞中这一想法。Briggs 和 King 沿用 Spemann 的想法及实验技术,首次获得了两栖动物美洲豹蛙胚胎核移植后代。这一成果为哺乳动物胚胎克隆奠定了基础。80年代中后期,应用核移植技术相继获得了绵羊<sup>[21, 27]</sup>、牛<sup>[3, 13, 28]</sup>、小鼠<sup>[24]</sup>、兔<sup>[5, 23]</sup>、猪<sup>[14]</sup>及山羊<sup>[30]</sup>的胚胎核移植后代(见图1)。该图中系统

## 一、胚胎克隆的意义及原理

核移植技术克隆动物胚胎对于畜牧业生产,科学实验及生物学基础研究均有重要意义。首先,可使遗传性状优良的个体在群体中大量增殖,大大加速遗传改良和育种进程;其次,可用于扩增转基因动物的后代数量,提高转基因技术的效能;第三,胚胎通过性别鉴定,再克隆,可以获得大量的期望性别的动物,对于性别控制具有现实意义;第四,可用于珍稀动物的扩繁和保存。另外,对于实验动物科学也有很大意义。基因型相同个体可提高实验统计的有效性,大大减少试验样本数目。除了上述实用价值外,对于哺乳动物胚胎细胞中核-质相互关系的基础研究也十分有用。

应用核移植技术克隆动物胚胎的理论基础在于:(1)胚胎的每一卵裂球的核具有相同的遗传物质;(2)已发生早期分化的胚胎细胞核移植到成熟卵母细胞中,可因其中特殊因子的作用,植入核基因表达被重新编排,“发育钟”可拨回到受精时状态,即恢复“全能性”。因而,重组胚可以正常发育为具有相同遗传物质的新生个体。重新编排植入核基因表达的能力看来只限于成熟卵母细胞<sup>[12, 23]</sup>。而原核期合子或2-细胞期胚胎无此能力<sup>[1, 18]</sup>。

## 二、应用核移植技术克隆胚胎的研究概况

(一)兔 Stice 和 Robl<sup>[23]</sup>首次获得8-16-细胞胚核移植兔后代,成功率为3.7%。Collas 和 Robl<sup>[5]</sup>经改进技术,使兔16-细胞胚核移植成功率提高到10%。已经获得32-64-细胞胚胎

图1 胚胎核移植生产克隆动物的方法(引自 Smitb)<sup>[22]</sup>

地展示了用核移植技术生产克隆动物的方法。本文讨论了该项研究的最近进展、存在的主要问题、解决途径及其应用前景。

北京农业大学孙拓教授提出了宝贵意见。特表感谢!

核移植兔后代<sup>[6]</sup>

(二) 绵羊 Willadsen<sup>[27]</sup>用 8-16-细胞胚胎作核供体,首次在哺乳动物中获得了 3 只核移植羊羔,其中 2 只为来自同一胚胎的克隆绵羊。Smith 和 Wilmut<sup>[21]</sup>用绵羊 16-细胞胚和早期囊胚的内细胞团(ICM)细胞作核供体,将 22 枚发育至桑椹胚或囊胚期的重组胚移植到受体母羊中,生下 4 只羔羊,具有核供体的表现型。

(三) 山羊 被认为是不易成功的山羊中,Zhong, Y 等<sup>[46]</sup>获得了 4-32-细胞胚核移植山羊后代。

(四) 猪 目前只有 Prather 等<sup>[13]</sup>将获自 4-细胞期核的 88 枚重组胚移植给受体母猪,仅生下 1 头仔猪,成功率不到 1%。有几位其他研究者都未能获得核移植仔猪。

(五) 牛 牛的胚胎克隆研究进展较快。Prather 等<sup>[13]</sup>首次获得了 2 头核移植牛犊,核移植成功率为 1%。Bondioli 等<sup>[3]</sup>用 16-64-细胞胚作核供体,核移植胚胎移植成功率达 20%,还获得了 8 头来自同一核供体胚胎表型相同的克隆公牛犊。Willadsen 等<sup>[28]</sup>将 8-64-细胞期核获得的重组胚移植后,平均妊娠率达 42.4%,产犊率为 33.1%。其中,优秀与良好重组胚的妊娠率达 60%,产犊率近 50%。Westhusin 等<sup>[26]</sup>表明:5 和 6 日龄胚胎、冷冻-解冻的 5 日龄胚胎及核移植胚胎进行核移植后,发育能力相互间无明显差异。已获得牛二次克隆后代。总之,牛胚胎克隆技术具有极大潜力,并发展最快,已经步入商业化生产时代。美国至少已成立了四家商业化牛胚胎克隆公司。

(六) 小鼠 原核交换进行核转移,大多情况下,可发育到附植阶段,甚至生下后代<sup>[11,18]</sup>。早期 2-细胞胚核移植到去核合子中可发育至扩张囊胚,然而,超过 2-细胞胚核移植后,则不能发育到胚泡期<sup>[19]</sup>。另一方面,如将晚期胚细胞核移植到保留有 1 个或 2 个原核的合子中,则可获得正常的附植前发育。表明存留的原核继续活跃地支持重组胚中植入核的发育。将 4-或 8-细胞胚胎的核移植到去核的 2-细胞胚卵裂球中,移植核能维持发育至囊胚期,甚至发育

至分娩<sup>[24]</sup>。但移植核并未发生基因表达重新编排,这可能是细胞功能重叠的结果。Kono 等<sup>[9]</sup>用第 1 次减数分裂末期的卵母细胞去核后作受体,用 2-4-细胞期胚、ICM 细胞作核供体。结果,只有 2-细胞胚核构成的重组胚发育至胚泡期,移植后,生下活后代。有人用成熟卵母细胞作核受体,也未获得很好结果。

研究表明,哺乳类的核移植研究,用“小鼠模型”是不合适的。小鼠胚胎细胞在发育很早阶段开始分化,在 2-细胞期出现转录活性。而兔、绵羊、牛胚胎细胞核约在 8-16-细胞阶段才出现转录活性。从上面结果可以看出,牛、绵羊、兔 64-细胞胚细胞核,甚至囊胚期 ICM 细胞核也不发生不可逆性分化。说明 RNA 转录开始后,某些种类的胚胎细胞基因表达仍可逆转并恢复全能性。

### 三、胚胎核移植技术的改进

胚胎核移植技术基本上是沿用 McGrath 和 Solter<sup>[11]</sup>所建立的非穿刺去核移核法(见图 1)。基本步骤为:(1)MI(第 2 次分裂中期)卵母细胞的去核(准备胞质受体);(2)从胚胎中分离卵裂球或核体(核供体选择);(3)将卵裂球或核体移到卵母细胞卵周隙内;(4)诱导细胞融合与卵母细胞激活;(5)在体内或体外培养发育。最后将重组胚移植给受体直至产仔。由于当前核移植技术成功率低,结果不稳定,不少研究者对上述技术进行了方法学上改进。

(一) 卵母细胞去核方法 1“盲吸”法<sup>[1,13,21,23]</sup>:先用细胞骨架抑制剂,细胞松弛素,或秋水仙胺处理卵母细胞,卵质膜不易破裂,且具有伸缩性。将一根直径为 30 $\mu$ m 尖头斜面的微细玻管,通过透明带插入到第 1 极体处,在一步操作中,将极体,连同质膜覆盖下的染色体及少量胞质(称核体)一起“挟”入玻管内,移去;2.“半卵”法<sup>[3,26,27,29]</sup>:用一微细玻针在透明带上作一切口,然后用一根钝端直径 30 $\mu$ m 微玻管通过切口插到透明带下,移去一半细胞质至另一准备好的空透明带内,这样将卵母细胞分成两半,用一种活体荧光染料 Hoechst 33342 染

色,以确定哪一半含有染色体。Hoechst 染色不会降低“去核”半卵的存活力。容量减少的卵母细胞并不降低重排植入核基因表达(核膨胀)的能力<sup>[15]</sup>;3、功能性去核<sup>[25,29]</sup>:将受体卵母细胞置于 Hoechst DNA 特异染液中,用紫外线照射,使核丧失功能,因而称为功能性去核。上述去核方法中,“盲吸”法,是对极体下一定区域盲吸。因卵黄颗粒干扰,往往看不见染色体,因而去核并不总是成功的。Prather 和 First 将 DNA 用荧光特异染料染色,在紫外光下去核时使核可见,提高了去核成功率<sup>[6]</sup>。然而,对以后发育是否有影响尚不清楚。“半卵”法,除了机械损伤外,还移去了一半细胞质,对以后发育的影响仍有待证实。功能性去核,虽然避免了机械损伤,但紫外线照射对细胞质及重组胚以后发育的影响,值得进一步研究。

(二)分离单个卵裂球或核体 供体卵裂球可取自 2-细胞至囊胚期不同时期胚胎。先用酶,如链霉蛋白酶或胰酶,或在酸性 PBS(PH=2.5)中去除供体胚透明带,用吸管轻轻吹打,使卵裂球分离出来。如卵裂球之间连结紧密,可将胚胎放入无  $Ca^{2+}$  溶液中作短时间温育,以促进卵裂球分散。

(三)细胞融合与卵母细胞激活 融合有两种方法。1. 仙台病毒诱导融合:在羊和鼠中取得了成功<sup>[11,27]</sup>。但该病毒为感染性病毒,且融合率不高(鼠中例外),不稳定。融合后,一般还要用 7% 乙醇激活卵母细胞。2. 电融合:效果好,被广泛采用。电融合是在一种非电解质溶液,如 0.3mol/L 甘露醇,及两根平行细微电极所组成的融合小室中进行<sup>[18,21,27]</sup>,由直流脉冲所诱发。适宜的脉冲强度及脉程时程对电融合至关重要,且因种间而异<sup>[13,23,27]</sup>。这些参数还随电极间距离、融合液种类、卵母细胞不同来源、仪器等而作适当调整。还随每天不确定的原因而改变。为了使细胞易于融合,需将卵质膜与卵裂球紧密接触,使电场垂直通过卵/卵裂球界面。适宜的交流脉冲可使细胞定向排列。也可人工用微细玻管定向排列细胞。一般认为电诱导融合同时,可激活卵母细胞,但激活率并不

高<sup>[33]</sup>。因而,必须确保有足够的融合脉冲激活卵母细胞。有人从另一卵母细胞中取少量胞质置于待激活卵母细胞质膜上,再用电刺激,激活率明显提高。增加脉冲次数,延长脉冲时程可提高激活率<sup>[5]</sup>。体外成熟的猪卵母细胞用高压电刺激,激活率明显增高<sup>[17]</sup>。然而,提高了激活率后,对以后重组胚发育能力的影响有待证明。

#### 四、核移植克隆动物胚胎现状与问题

虽然,用核移植技术生产克隆动物已取得很大成就,但有许多因素影响其在畜牧生产中的商业化应用。

(一)供体胚胎和受体卵母细胞 在商业化生产克隆动物中,希望供体胚胎来自遗传上优秀的个体。牛可采用超数排卵和非手术法从子宫中收集优良动物的胚胎,如此得到最早阶段是在 32 至 64-细胞期。用作胚胎克隆时,核仍具有全能性<sup>[10]</sup>,并可发育至分娩<sup>[27]</sup>。在兔、羊和猪等动物中,常用手术法收集胚胎,可以在较大范围内选择胚胎发育阶段。一般而言,胚胎发育早期构成重组胚的效果越好,越晚则效果越差。这与细胞分化及分化程度可能有一定关系。在不同动物中,从 2 至 64-细胞期及 ICM 细胞核移植后均有成功报道。然而,胚胎克隆意义在于大量生产优秀个体的同质胚。因而供体胚所含的卵裂球数愈多,越有商业价值。也就是希望能够充分利用发育较晚期的胚胎。但又与上述分化程度发生矛盾。解决这一矛盾,具有重要的实际意义。实验还表明,冷冻胚胎克隆、克隆胚胎再次克隆与鲜胚克隆相比,发育能力和妊娠率都无明显差别<sup>[2,26]</sup>。Granada 生物技术公司已成功地将冷冻胚胎及二次重组胚胎用于生产胚胎克隆动物群。

受体卵母细胞不必来自有价值动物,可从超排动物中手术收集体内成熟卵母细胞,或从屠宰动物的卵巢中收集卵母细胞通过体外培养成熟获得。手术法收集的卵母细胞,质量较理想,但既昂贵又费时,不利于商业化应用。体外培养成熟卵母细胞来源经济又易控制,然而融合与发育能力较差<sup>[13]</sup>。在将体外成熟卵母细胞

## 五、动物胚胎克隆的前景展望

用于日常核移植之前,有必要改进卵母细胞体外成熟培养技术,找到简单方法鉴定具有良好融合及发育能力的卵母细胞。在改进了培养条件,提高卵母细胞成熟能力,基于对卵泡大小选择,提高激活能力后,用于核移植的效果与用体内成熟卵母细胞的效果几乎相同<sup>[2]</sup>。新近排卵卵母细胞比老龄卵母细胞去核率及融合率高,形成重组胚后发育能力强,但不易被激活,不过已有些方法可提高其激活率。

对于核移植成功影响的关键,在于将何时期的供体核移植到何时期的受体胞质中?细胞质对植入核究竟起怎样的调控作用?其相互作用如何?这些细胞学基础理论问题,有待于从分子水平上加以阐明。

(二)显微操作 见“三”。

(三)重组胚的培养及移植受体后的发育

至今,大多数体外培养系统不能很好地维持重组胚在体外发育。虽然,一些胚胎,如兔胚胎,在体外容易发育到囊胚阶段。但将这些胚胎移植后的发育率很低。兔眼前房液可使兔重组胚囊胚发育率显著提高<sup>[7]</sup>。在母牛中,出于商业化实用需要,须用非手术法将晚期桑椹胚或早期胚泡移植到受体子宫中。为此,大多采用了体内培养系统(如寄养母兔、羊的输卵管内)。虽然胚胎能正常发育,但体内过渡培养并不理想,因要消耗大量劳力和经费,且相当部分胚胎在操作中丢失<sup>[18]</sup>。

有报道,兔重组胚的发育率比基于染色体移去、融合、激活,及胚胎移植等带来损失所预计的发育率要低(4%、10%)<sup>[23]</sup>。兔重组胚移植受体后发育至分娩的比率与未操作胚所得比率无差异<sup>[1]</sup>。牛的重组桑椹胚或囊胚所得的移植妊娠率很低(11%)<sup>[13]</sup>,其中,26%受体牛发情周期延长,意味胚胎早期死亡。另一方面,一些移植有核移植胚胎的受体妊娠期延长,需要助产。不过,已有报道,牛核移植胚胎移植妊娠率可达60%<sup>[28]</sup>。可以认为,重组胚发育异常的原因,不一定归于重组胚内存在问题,而更可能是由于核移植技术因素所造成。

胚胎克隆在畜牧业生产及科学研究上有着重大意义。核移植技术每一环节都会有损失。在适当条件下,融合率可达约90%,体内培养胚胎收集率为60%,在绵羊中约有40%的重组胚发育至桑椹胚或胚泡阶段<sup>[20]</sup>。因此,如果1枚供体胚有20个卵裂球可用于核移植,经上述步骤后,将产生5枚同质胚( $20 \times 0.9 \times 0.6 \times 0.4$ )。其效率远远高于胚胎分割。可以肯定,今后,效率更加提高。如果每一步骤上的效率可达90%,用体外培养系统取代体内寄母培养,且1枚胚胎内含有60个可用于核移植的卵裂球,那么就可获得近50枚同质胚( $60 \times 0.9 \times 0.9$ )。此外,还可利用胚胎的系列克隆,即使核移植效率相对地低些,也可获得无限数量的同质胚胎。

另外,小鼠、绵羊、猪及牛的胚胎干细胞(ESC)培养获得了成功。ESC来自于ICM。牛、羊ICM细胞核移植成功<sup>[20]</sup>,提示,或许可利用来自ICM的ESC作为核供体来源,能产生很大的克隆动物家族。其应用潜力巨大。此外,用基因改变了的胚胎干细胞进行核移植,可能为改变基因组DNA提供最有效的手段。这在将来研究中无疑是一个很重要领域。

除了上述供体核来源上数量巨大外,核移植与其它相关技术结合,潜力更大。如研究者在获得牛克隆胚胎后,将其中的一部分冷冻保存,将另一部分移植到受体中,对其后代的奶、肉等生产性能进行分析,才知道同一克隆其余胚胎的遗传潜力。如证明有价值,仍冷冻保存,为再次克隆提供胚胎库。或解冻后,进行胚胎移植。在克隆前,还可进行性别鉴定,生产大量的目的性别同质胚,以满足顾客需要。

未来研究中还有许多问题有待解决,如,改进卵母细胞体外成熟系统,提高细胞质成熟能力,从而提高发育率。对于正在成熟卵母细胞中促成熟因子(MPF)周期性本质,以及卵裂第一细胞周期的研究,必定对植入核基因表达重编排的机制有深入了解。对于供体胚胎细胞周期

的详细研究,将有助于分析细胞周期不同步对于以后重组胚发育的影响。研究表明,供体核所处细胞周期时期对核移植胚胎发育有重要影响<sup>[7,9,19]</sup>。改进早期胚胎冷冻方法,除了用形态学方法外评定胚胎存活力的研究,必将给商业化生产带来益处。最近,通过改进条件和技术,能利用作为屠宰场副产品的卵母细胞获得更经济、更方便的胞质受体来源。另一方面,利用屠宰的优良母畜的卵母细胞体外培养成熟、体外受精、发育的胚胎作为核供体来源,也具有同等重要意义,不过目前用体外受精、发育的胚胎作核供体比体内收集的胚胎所获得的核移植胚胎发育能力低<sup>[4]</sup>。在核移植技术方面,还需进一步完善去核、融合、激活及培养等技术。目前最大问题就是结果的不稳定性。提高结果的一致性,避免随机偶然性,可能是今后要解决的最重要的问题。

顺便提及,核移植概念本身是出于简单化,或用词不恰当。因为供体胚胎细胞质的全部或部分被转移到受体胞质中。供体胞质对胚胎发育的影响或对后代性状的影响不了解。但在用转移无细胞质的纯核的方法创立之前,对上述假设不可能进行实质性实验研究。另外,还必须考虑胞质遗传(线粒体DNA),特别是当用体外成熟卵母细胞来源不清时,更应考虑。

现在,不是能否进行胚胎克隆的问题,而是如何最大限度地提高其效率的问题。可以预料,随着核移植技术的逐步完善和克隆胚胎系的建立,将可能生产大批的来自同一优秀个体的基因型相同的后代。另外,如将转基因技术、胚胎干细胞培养技术、核移植技术结合起来,即使是有限数量的新品种、优良品种,也可产生无限数量的基因型相同的动物克隆群。这势必对畜牧生产及生物科学研究发展产生深远的变革性影响。

### 参 考 文 献

1 Barnes F. L. Robl J. M. and N. L. First 1987 Nuclear transplantation in mouse embryo; assessment of nuclear function. *Biol. Reprod.* **36**:1267-1274.

2 Barnes F. L. Westhusin M. E. and C. R. Looney 1990 Embryo cloning; principles and progress. in: *Proceedings of the 4th world congress on genetics applied to livestock production.* 323-333.

3 Bondioli K. R. Westhusin M. E. and C. R. Looney 1990 Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* **33**:165-174.

4 Clement-S. A. Palma G. A. Berg U. and G. Brem 1992 Comparison between in vitro produced and in vivo flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology* **37**:196.

5 Collas P. & J. M. Robl 1990 Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryos. *Biol. Reprod.* **43**:877-884.

6 Collas P. & J. M. Robl 1991 Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* **35**:190.

7 Colla P. Balise J. J. and J. M. Robl 1992 Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* **46**:492-500.

8 Kono T. Kwon O. Y. and T. Nakahara 1991 Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fert.* **93**:165-172.

9 Kono T. Kwon O. Y. Watanabe T. and T. Nakahara 1992 Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stage of the second cell cycle. *Theriogenology* **37**:239.

10 Marek D. E. Pryor J. H. Whitesell T. H. et al 1990 Nuclear transplantation in the bovine; effect of donor embryo age on subsequent embryo production. *Theriogenology* **33**:283.

11 McGrath J. & D. Solter 1983 Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and fusion. *Science* **220**:1300-1302.

12 Modlinski J. A. & Z. Smorag 1991 Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.* **28**:361-372.

13 Prather R. S. Barnes F. L. Sims M. M. et al. 1987 Nuclear transplantation in the bovine embryo; assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* **37**:859-866.

14 Prather R. S. Sims M. M. and N. L. Frist 1989 Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* **41**:414-418.

15 Prather R. S. Sims M. M. and N. L. Frist 1990 Nuclear transplantation in the pig embryo; nuclear swelling. *J.*

- Exp. Zool. 255:355-358.
- 16 Prather R. S. & N. L. First 1990 The cloning of embryos. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* **140**:227-243.
- 17 Prather R. S. Eichen P. A. Nicks D. K. and M. S. Pettets 1991 Artificial activation of porcine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **28**:405-409.
- 18 Robl J. M. Prather R. S. Barnes F. L. et al 1987 Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* **67**:642-647.
- 19 Smith L. C. Wilmut I. and R. H. F. Hunter 1988 Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* **84**:619-624.
- 20 Smith L. C. & I. Wilmut 1988 Factors influencing nuclear transplantation in sheep embryos. *J. Reprod. Fert. Abstracts*, 1,10.
- 21 Smith L. C. & I. Wilmut 1989 Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryo after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* **40**:1027-1035.
- 22 Smith L. C. 1991 Production of multiple genetically identical farm animals by nuclear transplantation. *Can. vet. j.* **32**:94-96.
- 23 Sticess. L. & J. M. Robl 1988 Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* **39**:657-664.
- 24 Tsunoda Y. Yasui T. Shioda Y. et al. 1987 Full term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J. Exp. Zool.* **242**:147-151.
- 25 Tsunoda Y. Shioea Y. Onodera M. et al. 1988 Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J. Reprod. Fert.* **82**:173-178.
- 26 Westhusin M. E. Pryor J. H. and K. R. Bondioli et al 1991 Nuclear transfer in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **28**:119-123.
- 27 Willadsen S. M. 1986 Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**:63-65.
- 28 Willadsen S. M. Janzen R. E. McAlister R. J. et al. 1991 The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* **35**:161-169.
- 29 Yang X. Zhang L. Kovacs A. et al. 1990 Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation. *Mol. Reprod. Dev.* **27**:118-129.
- 30 Zhong Y. Jianchen W. Jufen Q. et al. 1991 Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology* **35**:289.