

中国小尾寒羊 FSHR 基因部分序列的克隆与分析

魏伍川¹ 许尚忠² 辛宏量^{*}

¹西北农林科技大学畜牧兽医学院 陕西杨凌 712100 ²中国农业科学院畜牧研究所 北京 100094

^{*}黑龙江省齐齐哈尔市富拉尔基区畜牧局 齐齐哈尔 161041

摘要 利用 PCR 技术扩增了中国小尾寒羊 FSHR 基因 5' 端调控区和部分结构区序列, 并通过克隆进行了序列测定。比较研究结果: 中国小尾寒羊与澳洲绵羊的 FSHR 基因在 5' 端有 4 个位点发生了单碱基插入/缺失(或缺失/插入)突变, 序列间的保守性为 97.99%; 碱基变异率相应为 2.01%。而二者在结构基因扩增区域的碱基变异率仅 0.36%。有 2 个位点的碱基变异引起了氨基酸密码改变。

关键词 小尾寒羊 FSHR 基因 5' 端区 克隆测序 序列分析

根据 Singer 和 Berg(1991)从分子水平上定义的基因概念, 基因是构成一个表达单位的 DNA 片段的组合, 表达导致一个或多个专一功能的 RNA 分子或多肽链的形成。按照这一对基因的定义, 基因从长度上实际包括 3 个片段: ① 基因结构区, 也称结构基因, 指为蛋白质多肽链上氨基酸编码的 DNA 区段。如果基因为断裂基因, 则其中还有外显子与内含子区段的区别。② 前导序列。指与基因结构区相连, 对基因转录起调控作用的 5' 端上游区。③ 终止序列, 指结构基因 3' 端外侧的转录终止信号及相关序列。

羊与牛多为单胎家畜, 这在肉用生产上极为不利, 因为家畜产仔率的高低与生产成本相关, 如鸡的维持需要仅占日粮成本的 3%, 而肉牛却在 50% 以上^[1]。因此, 通过提高产仔率来降低肉羊肉牛的生产成本一直是人们努力的目标之一。

要提高家畜的产仔率首先需从提高卵巢的排卵率入手, 因为卵巢排卵率的高低是决定动物产仔率最重要的因素^[2]。众所周知, 促卵泡素(FSH)是调控动物繁殖活动的重要繁殖激素之一, 其对动物卵巢卵泡的生长、发育、分化、成熟和排卵更起着必不可少的作用。FSH 的生物学信息必须经由位于卵巢卵泡靶细胞膜上的促卵泡素受体(FSHR)的介导, 将信息传递到靶细胞内, 才能发挥其生物学功能^[3]。已有多项研究指出: 多胎的绵羊和牛对促性腺激素反应的敏感性较高^[4,5,6,7]。Fry RC(1988)通过切除垂体研究 Booroola 羊与普通美利奴羊对促性腺激素诱发排卵的差异, 结果发现, 多胎的 Booroola 母羊对激素诱发排卵反应的效果要远远高于普通美利奴羊(排卵母羊率 63% vs 41%, 母羊排卵数 8.0 ± 1.7 vs 3.6 ± 1.2 枚)^[8]。Abdennebi 等(1999)的研究也发现: 多胎罗曼

诺夫绵羊不仅发育卵泡的 FSHR mRNA 水平要高于单胎的法兰西岛羊, 而且对相同剂量促性腺激素的反应性(cAMP 的生成量)也高于法兰西岛羊^[7]。这些研究结果说明: FSH 的作用强度可能受到了 FSHR 表达数量或活性高低的调控。基因的表达是遗传信息转录和翻译的过程, 转录受基因 5' 端序列与细胞中存在的转录因子相互作用的调控。这也是基因表达调控的主要方式。因此, 本研究对我国独特的多胎小尾寒羊的 FSHR 基因 5' 端区序列和结构基因区部分序列进行了测序分析, 并将其与澳洲绵羊的同源序列进行了比较。以期探索该基因在家畜多胎中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小尾寒羊血样采自北京市兴绿原农牧发展有限责任公司养殖中心。实验用 Taq DNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶、限制性内切酶、RNA 酶、蛋白酶 K 及苯酚、氯仿、琼脂糖、dNTPs 等药品和试剂分别购自上海生工生物工程技术有限公司或北京鼎国生物技术发展中心。PCR 引物由中国科学院微生物研究所合成。克隆用载体为 PUCm-T 质粒载体, 菌株为 E. coli JM109。

1.2 实验设计和方法

扩增小尾寒羊 FSHR 基因 5' 端区序列的引物以 Sairam 和 Subbarayan(1997)^[9]报导的澳洲绵羊(或新西兰绵羊)的 FSHR 基因 5' 端序列和第 1 外显子序列为模板设计; 对结构基因区选择扩增第 10 外显子序列, 引物设计参照 Yarney 等(1993)报导的绵羊 FSHR 基因 cDNA 序列^[10]。FSHR 基因在人是一个长达 54kb 的基因, 由 10 个外显子和 9 个内含子组成, 内含子长度达 52kb, FSHR 贯通细胞膜, 其中前 9 个外显子的编码产物构成受体的细胞膜外部分; 起与 FSH 耦合的作用; 第 10 外显子的编码产物构成 FSHR 的跨细胞膜部分和胞内部分, 起转导信息的作用。设计的 2 对引物如下。

第 1 对引物(扩增基因 5' 端序列):

上游引物:5'AATTC ATTG TGCCA GCATCC 3'
 下游引物:5'AGTTC GACCG CATCC CTG 3'

设计的上游引物位于 Sairam 等报导的绵羊 FSHR 基因翻译起始点上游-815→-795 位点;下游引物位于翻译起始点下游基因结构区+135→-152 位点。扩增长度(包括引物)为 967bp。

第 2 对引物(扩增基因结构区部分序列):

上游引物:5'CTGGA AAGAT GGCAT ACC 3'
 下游引物:5'TGICA TTCAA CACTC AGAAAC 3'

上游引物位于 Yarney 等报导的绵羊 FSHR 基因 cDNA +1393→+1410 位点;下游引物位于-2105→+2125 位点。扩增长度(包括引物)为 733bp。

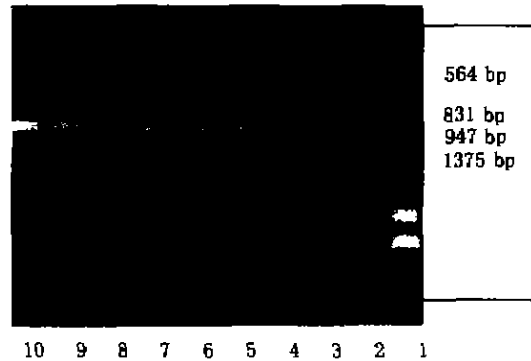
从血样中提取 DNA 采用苯酚:氯仿法。PCR 反应采用 50ul 反应体系,反应液的组成为:含 20 mmol/L MgCl₂ 的 10 × Taq 酶 buffer 5.0ul、10mmol/L dNTPs 1.0ul、20pmol/ul 的上游引物和下游引物各 2.5ul、基因组 DNA 500ng、Taq DNA 聚合酶 2.5U、加双蒸去离子水至 50ul。PCR 反应退火温度经实验确定为:使用第一对引物为 65℃,使用第二对引物为 58℃。反应程序为:94℃变性 5min 后,按 94℃ 1min 变性、65℃ 1min 退火、72℃ 1min 延伸循环 30 次,最后在 72℃ 延伸 10min,降温度至 4℃ 保存。扩增目的 DNA 片段的分离应用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳,然后用 glassmilk 作吸附剂、GeneClean kit 法从琼脂糖凝胶中回收、纯化。选用 T₄ DNA 连接酶将目的 DNA 片段克隆于 PUCm-T 质粒载体,转化受体菌 E.coli JM109。蓝白斑筛选和对白斑质粒大小进行凝胶电泳分析后,再经限制性酶切、鉴定出阳性克隆。碱裂解法提取重组质粒,用 370A DNA 序列自动分析仪测序。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物及阳性克隆鉴定

使用 2 对引物分别扩增,PCR 产物的特异性均好,没有出现任何杂带(图 1,图 2),这说明笔者使用的 PCR 反应条件正确。将扩增产物应用琼脂糖凝胶分离,GeneClean kit 法回收后,克隆进 PUCm-T 质粒载体,转化 JM109 受体菌扩繁。通过蓝白斑筛选计数,克隆的阳性重组率为 6.7%。根据计算机对 Sairam 等和 Yarney 等发表的绵羊 FSHR 基因相应于本研究所扩增区域 2 段序列酶切位点的检索,确定使用 EcoR I 和 BamH I 作为鉴定第一对引物扩增产

物的克隆阳性质粒筛选的内切酶;Pst I 作为鉴定第二对引物扩增产物克隆阳性质粒筛选的内切酶。酶切鉴定结果见图 3 和图 4。

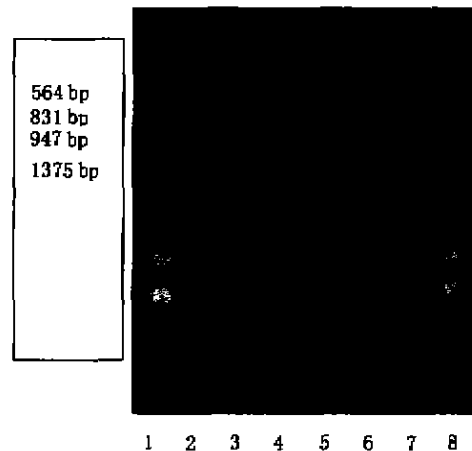


1 λ/EcoR I /Hind I Marker;2-10 PCR 扩增产物

2~10 Amplification product by PCR

图 1 第一对引物扩增结果

Fig 1 Amplification result by PCR with the first pair of primers



1 λ/EcoR I /Hind I Marker;2-7 PCR 扩增产物

2~7 Amplification product by PCR.

图 2 第二对引物扩增结果

Fig 2 Amplification result by PCR with the second pair of primers

2.2 序列测定

测序反应使用 Taq Dye System Cycle Sequencing Core Kit 试剂盒,正、反双向测序,重复 2 次。核苷酸顺序应用 370A 自动序列分析仪确定。由于第一对引物的扩增产物较长,一次测序不能测通全长。因此在第一轮测序完后,设计出第二轮测序引物,测通全长。测序结果见图 5,图 6。



1 λ /EcoR I /Hind III Marker,
2~3 克隆白斑质粒 EcoR I 酶切
4~5 克隆白斑质粒的 EcoR I、BamH I 双酶切
6 未经酶切的白斑质粒

图 3 第一对引物扩增产物的克隆白斑质粒酶切鉴定
2~3 Digestion verify to white-spot clone by endonuclease EcoR I
4~5 Digestion verify to white-spot clone
by endonuclease EcoR I and BamH I
6 No endonuclease-digestion white-spot clone
Fig 3 Digestion verify to white-spot clone
with amplification product by the first pair of primers



1,7 λ /EcoR I /Hind III Marker
2~5 克隆白斑质粒的 Pst I 酶切
6 蓝斑质粒 Pst I 酶切(阴性对照)

图 4 第二对引物扩增产物的克隆白斑质粒酶切鉴定
2-5 Digestion verify to white-spot clone
by endonuclease Pst I
6 Digestion to blue-spot clone
by endonuclease Pst I (contrast)

Fig 4 Digestion verify to white-spot clone with
amplification product by the first pair of primers

2.3 序列分析

由于本研究设计的第一对引物的下游引物在 FSHR 基因翻译起始点下游的基因结构区,因此,第一对引物的扩增产物包括基因结构区部分序列。测序结果,5'端区长度不包括引物为 794bp。将我们测定的小尾寒羊 5'端序列与 Sairam 和 Subbarayan^[9]报导的澳洲绵羊同源区段序列作对准比较,二者的长度一致,序列间的保守性为 97.99%。但在 4 个位点,二者的序列有插入/缺失突变。在-97 和-626 两个位点,小尾寒羊各发生 1 个碱基插入;在-524 和-790 位点,小尾寒羊各发生 1 个碱基缺失。

第二对引物扩增片段为小尾寒羊 FSHR 基因结构区第 10 外显子部分序列,将测序结果与 Yarney 等发表的绵羊 FSHR 基因 cDNA 同源区段序列^[10]比较,二者之间出现 3 个碱基变异,分别位于+1446、+1447 和+1650 位点。其中-1446 位点在 Yarney 等发表的序列为 C,小尾寒羊变为 G;+1447 位点的碱基 G 则在小尾寒羊变为 C,结果导致编码肽链第 482 位组氨酸的密码 CAC 在小尾寒羊变为谷氨酰胺密码 CAG;编码肽链第 483 位缬氨酸的密码 GTC 在小尾寒羊变为亮氨酸密码 CTC。-1650 位的碱基变异(T 变为 C)则是一个同义突变,因为小尾寒羊突变后的密码 ACC 与 ACT 同为苏氨酸密码。

第一对引物的扩增产物,包含有 134bp 的基因结构区序列,在该段序列,小尾寒羊的碱基与 Yarney 等发表的序列完全一致,没有差异。将该段序列与第二对引物的扩增区域合并计算,二品种绵羊在基因结构区的碱基变异率仅 0.36%。

3 讨论

与澳洲绵羊(或新西兰绵羊)的 FSHR 基因 5'端序列相比,小尾寒羊该段序列的保守性为 97.99%,碱基变异率达 2.01%,而且在 4 个位点发生了碱基的插入/缺失(或缺失/插入)突变。对转录调控元件序列的检索,没有发现二品种在潜在的转录调控元件序列,如 CRE、ERE、Y-box type 等位置有碱基变异,但在 2 个 Half ERE(雌激素反应元件一半序列)特征性序列位点,二品种间出现了单碱基变异(图 5)。第一个变异位点位于-530→-526 位点,澳洲绵羊序列为 TGACC,这是雌激素反应元件序列(GGT-CAnnnTGACC)的 3'端一半序列,而在小尾寒羊突变为 TGATC;另一个位点在-679→-675 位点,在该位点的 5'Half ERE(雌激素反应元件 5'端一半序

```

寒羊① ATTTCA777GTGCCACATCTAAAGGCAAGGCAATCTTCAGAGACTGAAATGAGAGAGCCAG -750
绵羊② *****

寒羊 AAGGACATGTGACAGADGCTGGATNCTTGTCTACTAAGCCAGTG -700
绵羊 *****

寒羊 AAAACCCAGCCGACCTGTGGTCACTCAGCTGAGTCAAGTATCTCTGTA -650
绵羊 *****
      5' Half ERE
寒羊 GACTACTCTCTTAAAGTGGCT-CCTACCATCTGTCCAGGGCTCACTAAC -600
绵羊 *****

寒羊 CCACTGCTCTCTCTGAGCTGACCAATGTTGGTGTATTTAATTCAGCAA -550
绵羊 *****

寒羊 GAAAGAGATCAGTCACTTGTATCCAGAGTCTCTGTTTGTATCAAGCA -500
绵羊 *****
      3' Half ERE
寒羊 GCTTGAGAGAGACATTCACACAGACTGGAACAGGTCCTGACCTTC -450
绵羊 *****

寒羊 ACTGAGCACTCTTAATGATGTTTCAGACTGAGATTGCACCTGTTT -400
绵羊 *****

寒羊 GGACAAGTCAAGGCTGCTACTCTGTGTTGAGAAAAAATAATGTCACC -350
绵羊 *****

寒羊 CACAGGACAGTCTTACAGGAAATTAATAAGCTATCTAGACATGCA -300
绵羊 *****

寒羊 TCAAGTTTCAATTTGCAAAACCAACCAAAAAGGTAAAGGACACCGTAT -250
绵羊 *****

寒羊 CTTGCCAGGCGCTCTACCTCTCCACCTCCAGCCCAACCAAGTCACTGCT -200
绵羊 *****

寒羊 CTCCTCAGAAATCTCTCTATTTGCTGGAAGTCAAGGATAAAAAGAAA -150
绵羊 *****

寒羊 AAAAAAGAAAGCGCGCTGGCGGGTCAAGTCAAGCTTACCTACAGCTCCAAC -100
绵羊 *****

寒羊 GCA-GAAGCTCTTCTCAAAAGGGCTGAGTGTGAGCCCTGAAATCTGGCA -50
绵羊 *****

寒羊 GGATTGGTCTGCGAAGCAGAACCAATGGCTGGATGGATAGTAAAC -1
绵羊 *****

```

注：-代表该位点碱基缺失。①小尾寒羊。②Sairam 等报导的澳洲绵羊
 图 5 小尾寒羊 FSHR 基因 5'端区测序结果及与 Sairam 等报导的澳洲绵羊序列的比较

-Base-deletion ① Sequence of small-tail Han sheep
 ② Sequence of Australian sheep

Fig 5 Comparison of the sequences of 5'-flanking region of FSHR gene between the small-tail Han sheep and anstrahan sheep

列)左外侧的紧邻碱基,小尾寒羊变为了C,而 Sairam 等的发表序列为T。由于基因转录调控的复杂性,有时几个碱基的改变也会造成表达效率的差异,而调控元件序列的碱基变异,通常来说,比一般序列有更大的作用。不过,有关 Half ERE 序列对转录调控是否有作用目前还不知道。但重要的是,在小尾寒羊与澳洲绵羊 FSHR 基因 5'端发现的碱基变异,为在畜种内搜寻大效基因位点、应用于动物育种奠基了基础。因为品种间 DNA 上出现碱基变异的位点很可能成为区分不同生产性能种群间的多态位点,为进一步的基因效应分析和标记辅助选择铺垫条

件。另一方面,据李祥龙等(2000)根据对 mtDNA 多样度的研究,认为我国的绵羊与国外的绵羊可能母系起源不同^[11]。薄吾成也认为:我国的绵羊起源于青藏高原的古驯羊,黄牛起源于青藏高原的古驯牛,而与国外的羊、牛起源不同^[12]。因此,小尾寒羊与澳洲绵羊在 FSHR 基因 5'端区的变异,哪些属于系统性的起源差异、哪些属于品种间的差异还需作进一步的研究分析。

```

寒羊① ATGGCCTTGTCTGCTGGCTTGGCTTCTGCTGCTTCTAAGCCTGGGCTCAGG -50
绵羊② *****

寒羊 ATGCGACCATGCACTCTGCTACTGCTCTAATGGAGTCTTCTCTGGCAGG -100
绵羊 *****

寒羊 ACAGCAAGGTGACAGAGATGCCCTCCGACCTCCCGGGATGCGGTCCAA +150
绵羊 *****
      +153 -1393
寒羊 CT ***** CTGGAAAG +1401
绵羊 * *****

寒羊 ATGGCATACCATCACCCAGGCAATGCAGCTCGAATGCAAGTGCAGCTCC +1450
绵羊 *****

寒羊 GCCATGCTGCCAGCATCATGCTGGTGGGCTGGGTCTTTGCTTTTGCAGTT -1500
绵羊 *****

寒羊 GCGCTCTTTTCCATCTTTGGCATCAGCAGCTACATGAGGTGAGCATCTG +1550
绵羊 *****

寒羊 OCTGCCATGGACATGACAGCCCTTGTACAGCTCTATGTTATGTCCTC +1600
绵羊 *****

寒羊 TCCTGTGCTCAATGTCTGGCTTTGTGGTCACTCTGTGGCTGCTATAACC +1650
绵羊 *****

寒羊 CACATCTACCTCACGGTGGGAACCCCAACATCACATCTCTCTAGTGA +1700
绵羊 *****

寒羊 CACCAAGATAGCCAAGGCGCATGGCCATGCTCATCTTCACCGACTTCTCT +1750
绵羊 *****

寒羊 GCATGGCGCCATCTCTCTTTGGCCATCTCTGCTCCCTCAAGGTGCC +1800
绵羊 *****

寒羊 CTCATCACTGTGTCCAAAGTCAAGATCTCTGCTGCTGTTCTTACCCCAT +1850
绵羊 *****

寒羊 CAACTCTGTGCCAACCCCTTCTCTAAGCCATCTTCACAGGAAGTCTCC +1900
绵羊 *****

寒羊 GCAGGGATTTCTTCAATCTGCTGAGTAAAGTTGGCTGCTATGAAGTCAA +1950
绵羊 *****

寒羊 GCCAGACCTACAGGTGAGAAAGCTCATTCACTGCCCACAACTTTTCATCC +2000
绵羊 *****

寒羊 AAGGAAATGGGCACTGCCGCCAGCTCCAGGGTTACCAATGGTTCCAAAT +2050
绵羊 *****

寒羊 ACACACTCATCCCTAAGACATTTAGCCAAAAGTAAACACAAATGTCG +2100
绵羊 *****

寒羊 AATGTTCTGAGTGTGAATGACA
绵羊 *****

```

注:斜体字母表示引物位置。①小尾寒羊。②Yarney 等报导的绵羊
 图 6 小尾寒羊 FSHR 基因结构区部分序列的测定结果及与 Yarney 等发表序列的比较

Italic characters represent primers ①Partial sequences of structure region of FSHR gene of the small-tail Han sheep
 ②Partial sequences of structure region of Ovine FSHR gene sequenced by Yarney, T. A. et al

Fig 6 Comparison of partial sequence of FSHR gene between small-tail Han sheep sequenced by us and sheep by Yarney, T. A. et al

在基因结构区,小尾寒羊与澳洲绵羊在-1446和+1447位点的碱基变异引起了编码FSHR第482位和第483位氨基酸的改变,但小尾寒羊在这两个位点的碱基与Hould等报导的牛FSHR基因cDNA序列^[1]该位点的碱基相同。由于小尾寒羊为多胎物种,而牛基本为单胎,这意味着小尾寒羊和澳洲绵羊在这两个位点的碱基变异引起的氨基酸替换,可能对FSHR介导FSH信息的生物学功能没有大的影响。

参 考 文 献

- 1 Gregory, K. E. and Dickon, G. E. Sampling, evaluation and utilization of animal genetic resources in: L. Knutson and A. K. Stone (Ed) Proc Beltsville Symp. VII. Biotic diversity and germplasm presentation-global imperatives. P185. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1989
- 2 Hanrahan, J. P. Contribution of variation in ovulation rate and embryo survival to within breed variation in litter size. In Land RB Robinson DW(eds). Genetics of Reproduction in Sheep. London: Butterworths, 1985:193~201
- 3 Raanik, A. S., Zhang, F. P., Huhtaniemi, I. T. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene-expression in the rat testis and ovary. Mol. Cell. Endocrinol. 1995,107:199~208
- 4 Kelly, R. W. et al. Influence of Booroola Merino genotype on the responsiveness of ewes to pregnant mare's serum gonadotrophin, luteinizing weights and peripheral progesterone concentration. Anim. Reprod. Sci. 1983,6:199~207
- 5 Bindon, B. M. et al. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. Theriogenology. 1986, 25(1): 53~70
- 6 Snyder, D. A. Superovulation of cows and heifers selected for twinning. Theriogenology 1986,25:200
- 7 Abdennebi, L., Monget P. et al. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. Biology of Reproduction. 1999, 60: 845~854
- 8 Fry, R. C. et al. Induction of ovulation in chronically hypophysectomized Booroola ewes. J. Reprod. Fertil. 1988,82: 711
- 9 Sairam, M. R. and Subbarayan, V. S. R. Characterization of the 5'-flanking region and potential control elements of the ovine follicle-stimulating hormone receptor gene. Mol. Reprod. Develop. 1997,48(4): 480~487
- 10 Yarney, T. A. et al. Molecular cloning and expression of the ovine testicular follicle stimulating hormone receptor. Mol. Cell. Endocrinol. 1993,93:219~226
- 11 李祥龙, 郝桂茹等. 绵羊, 山羊和岩羊 mtDNA 的 RFLP 及其遗传分化研究. 畜牧兽医学报, 2000, 31(4): 289~295
- 12 薄吾成著. 中国家畜起源论文集. 天则出版社, 1993
- 13 Hould, A. et al. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. Mol. Reprod. Dev. 1994,39: 127~135

Cloning and Analysis of Partial Sequence of Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Gene of Chinese Small-tail Han Sheep

Wei Wuchuan¹ Xu Shangzhong² Xin Hongliang³

¹ Academy of Animal and Veterinary Science, North-Western University of Agriculture and Forestry Science and Technology

Yangling Shaanxi 712100 ² Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science Beijing 100094

³ Bureau of Animal Science, District of Fulaeru, Qiqihaer Heilongjiang 161041

Abstract 5'-flanking region and partial structural sequence of FSHR gene of Chinese small-tail Han sheep were amplified by PCR technique, cloned and sequenced. Sequence comparison showed that the sequence homology in 5'-flanking region was 97.99% between Chinese small-tail Han sheep and Australian sheep, and the base-variability was 2.01% accordingly. The base-variability between two species at the structural gene region sequenced was only 0.36%. 2 base variation at that region caused the change of amino acid codes.

Key words Chinese small-tail Han sheep 5'-flanking region of FSHR gene Clone Sequence analysis

“五大作物”攻关虽取得了很大的成绩,但还存在着一些问题和差距,主要表现在:一是创新能力还比较薄弱,虽然已达到了产量目标,研究提出了一些综合配套技术,但单项突破不多,单项技术的起爆效应还不够;二是产后加工技术研究滞后于生产,仍然

处在十分薄弱时期;三是市场应变能力比较差;四是宣传力度还不够,只注意了学术论文的发表,而不注意新闻媒体的宣传,不注意扩大社会影响。因此,今后的工作要按中央农村工作会议要求,把重点放在发展优质、高效农业和增加农民收入上来。