



细胞核的移植

吴尚勳

(中国科学院海洋研究所)

遗传、发育和进化是生物学中的重要课题，也是个体发育牵涉的问题。自从 DNA 双螺旋结构学说问世以后，遗传方面的问题解决了不少，分化的问题就突出了。细胞是生命的结构单位，它的两个组成部分——细胞质和细胞核之间的相互关系是分化过程中的重要问题。细胞核的移植是研究这个问题的很好的方法之一。利用不同年龄的或不同种的核质配合来探讨它们各自的功能、分化情况和两者之间的相互影响，比一般方法明确得多。

细胞核的移植已有几十年的历史。童第周^[1]和 Gurdon^[2]先后做过综合性的论述。由于技术的不断改进，最近十几年又有了很大发展，因此再略述于后。特别是脊椎动物中的核移植。

(一) 细胞核的移植方法

细胞核的移植，就是将一个细胞的核放进另一个细胞里去。前者称为供体，后者为受体。到目前为止，受体大多是一个动物的卵子。原因是它体积较大，操作容易，而且通过发育，可以把特性表现出来。

卵子在接受另一个细胞核之前，先要被激活以获得发育能力。原有的核可以去掉也可以不去掉，视具体需要来决定。供体是各种组织或器官的细胞。一般并不是将核吸出来放进另一细胞里去，而是先把细胞想办法使之分散，然后用微吸管把细胞吸进去。靠着吸管壁的压力把细胞膜挤破，细胞核连同它外面裹的一层细胞质一起注入受体。为此，微吸管的直径要稍大于核的直径，又略小于细胞的直径。移植过程中要避免核与外界接触。核外面的一薄层

细胞质起着很重要的保护作用，因为直到今天，我们还没有找到一种培养液可以代替细胞质使核免受损伤。这些被带进的细胞质的量与受体的细胞质相比是极微的。细胞吸入微吸管时要注意避免损伤它的核。微吸管事先需洗净消毒。上面所述系一般原则，要达到上述目的，还需按各种卵子的具体情况来解决。

(1) 两栖类的核移植手术：在脊椎动物中，首先在两栖类卵子中获得成功。Briggs 和 King^[3]在 *Rana pipiens* 和其他蛙类上用针刺卵子动物极达到激动的目的。10—15 分钟后，产生第二极体。这是一个标记，卵核就在它下面，可用玻针在它旁边斜着插入，往上一挑，使少许细胞质流出，核也随着流出。割断挑出的细胞质与卵子的联系，将卵子放入培养液中即可接受移核了。去核的成功率可达 99%。供体的准备是把组织块放在缺钙和镁的 Niu-Twitty 液里，加 $5 \times 10^{-4} M$ Versene，放置十余分钟。细胞分散。再将细胞放入正常的 Niu-Twitty 溶液中待用。

在有尾两栖类的卵子上，可用紫外线照射来激活卵子并杀死卵核。剂量合适可使细胞质不受损伤。

在非洲爪蟾上，受体卵子不用激活，也不用去核就可移核。卵核逐渐消失，绝大部分不会与移过来的核合并。采用 Barth 和 Barth 缺钙镁溶液加上 $5 \times 10^{-4} M$ Versene 分离供体细胞。

(2) 海鞘卵子除了受精之外未找到其他激活的办法。先使卵子受精，待精子和卵原核结合后，将卵子切成两份，其一包含核，不久进行卵裂；另一部分无核、不分裂。这不分裂的部分可以作为受体。海鞘胚胎的细胞粘着很紧，

可用玻针逐个分开作为供体。

(3) 硬骨鱼的成熟卵子挤入水中即被激动, 出现围卵间隙, 细胞质流向动物极, 形成胚盘。在 18°C 大约 20 分钟后在动物极出现第二极体。可先去膜, 然后将玻针靠近极体插入上挑, 卵核即连带少许细胞质一起被挑掉了。去核率可达 100%。要注意在极体刚放出时进行, 否则核向下沉入细胞质内, 去核就不易了。供体组织放在缺钙的 Holtfretor 溶液中, 10—15 分钟后细胞即逐渐分散, 然后用吸管移入 Holtfretor 溶液中待用。一般不需药物。如用红血球作为供体, 可用柠檬酸钠作为抗凝剂, 再将抗凝的血放在缺钙的二倍 Holtfretor 溶液中待用。由于红血球与白血球在形状和大小上都不一样, 可以认辨, 不需事先分离。

(4) 哺乳动物的核移植: 目前正处于萌芽阶段, 原则上可以进行, 但实际上由于手术烦琐, 报道甚少。Bromhall^[4] 在兔卵上进行过, 先诱导母兔排卵, 从它输卵管中寻找未受精的卵子。在 5°C 小室内冷冻激活作为受体。另一个体的桑椹期卵子作为供体, 压碎透明带将细胞块取出, 在冻膜上用吸管打吸几次, 细胞即分散。注核的方法与两栖类同。注入后再一次将卵放入输卵管内进行发育和着床。他一共注射了 539 个卵子, 仅 30 个可以找到供体的核, 证明它确已进入受体卵子。最好的情况是进行了分裂, 其速度与对照卵子一样。有些卵核与移入的核独立分裂; 有些两者合并成一个纺锤体。最大的一个发育了 42 小时、桑椹期。大部分只有 18—26 个细胞。Jacek A. Modlinski^[5] 曾将小鼠的受精卵中移进另一个细胞核。用常规法诱导小鼠排卵, 与一雄性交配。在输卵管中取受精卵。用透明质酸酶去除卵丘细胞。供体是 12—18 细胞时期的胚胎, 用蛋白酶去除透明带, 置于缺钙和镁的缓冲液内 20 分钟, 待细胞分散即可待用。移核后, 把卵放还输卵管内。共得 5 个胚泡, 其中 3 个桑椹期, 由于受体是双倍体, 因而其中有 2 个是四倍体。用标记的核作试验, 证明注入的核确已参

加到分裂的中期染色体组里去了。虽然这些结果是初步的, 但它证明在哺乳类动物中, 细胞核是可以移植的。没有见到用体细胞作为供体的移核报道。

(二) 移核后解决的问题

1. 细胞核的分化问题:

细胞分化以后, 究竟核起不起变化? 如果有变化, 是什么时候开始的? 怎样变的? 关于这个问题, 目前有二种意见。

Briggs, King 和 DiBerardino 等^[6-9] 在 *Rana pipiens* 把不同发育时期和不同地区的细胞核移植到卵子, 特别对内胚层细胞核的发育能力做了系统的实验。有的还做了连续移核。他们发现在发育过程中, 细胞核促进分裂活动的能力和促使正常发育的能力有显著的降低。这种降低从原肠期开始。他们还移植了成体肾脏细胞和肾癌细胞的核到去核卵子里去, 除了少量幼虫外, 没有得到过正常的成体。因此他们认为细胞分化过程中, 细胞核的发育能力也逐步受到限制, 由全能逐渐特化。他们对上述实验中发育不正常的胚胎或卵子作了细胞学的分析, 有些染色体的数目不正常; 有的在染色体图谱上有缺陷。他们认为由于核的发育能力受限制导致这些异常, 而这些异常又使发育不正常或者发育完全停止。

Brun^[10] 在非洲爪蟾卵子上移植了红血球和红血球母细胞的核。他发现前者只能形成囊胚或早期原肠胚而后者有极少数可发育到早期蝌蚪, 因而他也认为分化了的细胞的核是存在改变的。

Fischberg, Gurdon, 和 Elsdale^[11] 则持另外一种意见, 他们在非洲爪蟾的卵子上进行了实验, 认为这种卵子的内胚层细胞核在囊胚、原肠早期和晚期都没有分化。游泳的蝌蚪的内胚层细胞核经移植后, 总还有少数有能力发育成小蝌蚪。Gurdon 将非洲爪蟾已经摄食的蝌蚪的肠子细胞的核移入去核的卵子, 这种肠子细胞有纹状缘, 是已经分化的细胞。在 726

个例子中有 10 个(1.5%)发育成正常的、能够摄食蝌蚪。如果在分裂不正常的囊胚中挑选一半细胞质分裂一半细胞质不分裂的所谓部分囊胚的细胞核进行连续移植,又可得到一些正常的蝌蚪。连同上面的 1.5% 一起计算,发育成完整的胚胎就占全数的 7%。有些手术过的卵子不分裂,经过检查,主要是由于供体细胞的膜没有破。扣除这一部分,有能力发育成完整胚胎的就增加到 24% 了。另有一部分胚胎,虽不完整。但也包含着各种组织。与上面的 24% 一起算,70% 的肠子细胞核是有能力承担起全部组织的形成的。他认为能够促成肠子细胞分化的核同时也包含着可以形成一个完全正常的蝌蚪的全部遗传信息。因此细胞分化,并不能认为它的核已经没有形成其他细胞的能力了。分化了的细胞的核并没有特化。他们又从上述肠子细胞核和去核卵子配合,培养得到了可从繁殖的青蛙。说明这种细胞核还能形成生殖细胞的核。

他们又将成体的肾脏、肺、皮肤角质细胞等经过培养作为供体,将其核移至去核卵子里,发育全部不正常,但是如果检查这些囊胚,可以发现有的卵子一半分裂一半不分。将这样的囊胚细胞作为供体再一次移入去核卵子,也得到了正常的蝌蚪。

这些实验都说明,能够促成肠子、皮肤、肾脏分化的细胞核,同时也包含着可以形成一个完整个体的全部潜能,不存在核内不可逆的失活或永久性的变化。

由于上述成体细胞都是经过培养的,可能使核与在体内时的情况不同。为此童第周等移植了黑斑蛙的红血球的核到本种的去核卵子里去,得到了正常的蝌蚪。我们把鲤鱼的红血球的核移到金鱼的去核卵子里,也得到了少数能够摄食的小鱼。所得小鱼,带有鲤鱼的性状。所以用鲤鱼的细胞核,主要是排除金鱼去核失败的可能性。这些实验说明象红血球这样的高度分化的细胞,它的核还保存着发育的全能。

但是在成体细胞的移植实验中,往往出现

大量不正常胚胎,完全正常的幼体总是极少数。这是什么原因?可能因为:①成体细胞较小,移植时易受损伤;②分化的细胞,大多分裂较慢或者不分裂。它的核移到卵子中后,很难与受体细胞的分裂周期同步。如果它的 DNA 尚未复制而卵子已要开始分裂,移入的核的染色体就可能被拉散到两个子细胞里去,即产生异常。如果上述核的 DNA 未经复制而全部分到了两个子细胞中的一个,这个子细胞将继续分裂而另一个无核的将不分裂,结果就形成部分囊胚。分裂那部分的核基本完整,仅比细胞质少分一次。如果再一次移植,就有可能得到完整的胚胎。Gurdon^[12] 等的实验也证明了这一点。

培养的成体细胞的核移植后比原来组织的细胞核较易得到正常的胚胎,主要是因为细胞经过培养获得了分裂状态,比较容易与受体细胞质取得同步。

上面 Briggs 等所描述的染色体的异常情况,可能也是由于手术所致。

2. 细胞质对核的影响:

(1) 关于细胞分裂及 DNA 的合成 上面已提到,分化了的,不再分裂的细胞的核移到去核的成熟卵子里,核即开始膨大,然后进行 DNA 合成,细胞随即进行分裂。它没有种间、科间、甚至纲间的特异性。*Rana pipiens* 的核可以在 *R. sylvatica* 的卵子细胞中分裂;鲟鱼的核可以在金鱼卵子内分裂,人的细胞核也可以在金鱼卵子里分裂。

但是上述情况只能在成熟的卵子中出现。在非洲爪蟾上,如果把核移入卵母细胞的细胞质中,它不会出现 DNA 合成,也不会分裂。例如将神经细胞的核放进卵母细胞,即使耽上三天也不会出现 DNA 合成。但是如果卵母细胞受到垂体激素的诱导,开始成熟,只要胚泡开始破裂,引进的核就开始合成 DNA。这一系列的活动是成熟的卵子细胞质的因素引起的。它至少维持到卵子被激动后一小时。这个因素无种、属或纲的特异性。Graham^[13] 等认为这个诱导因素可能是 DNA 多聚酶。它在胚

泡破裂之前是不存在,或者是不活动的。由于垂体激素的作用,增加了卵子异源型 RNA 和蛋白质的合成。此时合成的分子中包含着 DNA 多聚酶或酶的激活因素。

这种酶虽然在成熟的卵子中存在,却并不对卵子本身的核起作用,因为卵子里还存在着另一个因素称为细胞稳定因素。在脊椎动物或一些无脊椎动物的卵子,成熟时停留在第二次成熟分裂的中期,只有在受精或被激动后,消除了这个稳定因素,放出第二极体,卵原核变得疏松了, DNA 多聚酶才能发挥作用。

细胞分裂的速度和 DNA 合成在每次分裂周期中所占的时间(S相)各种细胞是各不相同的。象神经细胞那样基本不分裂的细胞核移到去核卵子中后,基本上按照受体原来的速度分裂,可见细胞质对分裂速度的影响是很大的。在非洲爪蟾的受精卵内移入几个外源核,这些引进去的核的 DNA 合成就会被调整到与原有的核同步。可见 DNA 合成和分裂,是由细胞质控制的。

关于分裂周期中 S 相的长短,有的成体细胞的核移入卵子后, S 相缩短,有的甚至缩短到原来的二十五分之一,调整到与受体细胞一样与之同步。但是并不是所有的核都能做到这一步。这也就是为什么分化了的细胞核移入卵子后不能很好发育的主要原因之一。因此可以认为 S 相的长短,一方面取决于细胞的特性;另一方面也受细胞核本身甚至染色体的组成部分的影响。

细胞内 DNA 多聚酶在 S 相和分裂相都是存在的,只是有时它变得不活动,只有在 S 相才出现 DNA 合成。它受两方面的控制,细胞质因素负责 DNA 合成的起动;细胞核因素,它可避免当染色体在前一轮分裂尚未完成前 DNA 开始复制。

(2) 关于 RNA 的合成 在胚胎发育过程中,各类 RNA 的出现是有一定次序的。在非洲爪蟾,刚受精的卵子基本没有 RNA 合成。囊胚中期出现异源型 RNA,囊胚后期开

始合成 tRNA,原肠初期出现 rRNA。但是把合成 tRNA 旺盛的原肠后期的细胞的核、合成 rRNA 旺盛的晚期神经胚内胚层细胞的核以及合成异源型 RNA 旺盛的蝌蚪肠子上皮细胞或成体神经细胞的核分别移进去核的卵子细胞质后,它们合成 RNA 的能力就全部被抑制。这种抑制是可逆的。等卵子发育到一定阶段,按照正常胚胎的顺序,又依次出现各种 RNA。

非洲爪蟾的囊胚中期细胞的核,有旺盛的 DNA 合成能力。注入 RNA 合成旺盛而不合成 DNA 的卵母细胞中,1小时内,仍继续合成 DNA,但是 2—3 小时后,这个核膨大, DNA 合成停止, RNA 合成开始并以与受体细胞核同样的速度进行。

这说明核的活力,可以从 DNA 合成转向合成 RNA,也可以从合成 RNA 转向合成 DNA。

究竟什么因素使它有这样的变化? Shick-awa 和 Yamana^[14]从非洲爪蟾的囊胚和神经胚上分别将细胞分离出来培养。这些细胞群落与它们完整的胚胎同时出现特异的 RNA。神经胚的细胞单独培养可以得到 rRNA。但囊胚细胞单独培养则无。如果两者放在一起培养, rRNA 的量就减少。在神经细胞的培养液里加进一些囊胚细胞的培养液,也可以使 rRNA 的量减少。可见分离的囊胚细胞放出了一个 rRNA 合成的抑制因子。它是一个细胞质因子,可以透析出来,而且有耐热性。

Thompson 等^[15]在离体的鸡的红血球或鼠的肝细胞中加入 DNA 复制旺盛的腹水癌细胞的细胞质,很快就出现 DNA 的合成。如果在上述两种细胞中加入再生的肝脏的细胞质,就出现 RNA 合成的增加。这两个因素都是抗热的。前者还抗冷冻,后者冷冻后失效。它们都无种和属的特异性。可见细胞内 DNA 和 RNA 的合成也受细胞质的影响。

De Robertis^[16]等将人的 HeLa 细胞的核注入非洲爪蟾的卵母细胞里,不管卵母细胞的

核是否去除, 都能出现 DNA 的转录和 RNA 的翻译, 得到了三种蛋白质。但是 HeLa 细胞的蛋白质总共有 25 种之多, 可见这种转录和翻译是有选择性的。经过注射 mRNA 的试验, 证明这种选择性决定于从 DNA 转录到 mRNA。从所产生的蛋白质的性质看来, 所活化的基因是正常在卵子里表达的, 不是在培养的细胞里所表达的。在培养的细胞里活跃的基因到了卵子里后而不活动了。这个实验说明细胞分化过程中变得不活动的基因, 可以重新被细胞质内的成份所激活。卵母细胞的细胞质内包含着一些成份, 它可以高度选择性地激活某些基因。这也说明为什么分化了的细胞的核移入卵子细胞质后可以再引起发育。

(3) 细胞质对性状表达和核的发育能力的影响 不同种类的核质配合, 一般说来, 亲缘关系比较近的, 发育就好些。凡是能够进行杂交的种, 大多都能发育到幼体或成体阶段。有的还能进行繁殖。分析它们的性状, 可以了解细胞核和细胞质各自对性状表达的作用。有些亲缘关系比较远的核质配合, 不能形成个体, 发育到一定阶段就停止了。也可利用这些在异种细胞质中分裂了多次的核的发育能力来探讨细胞质的影响。

Sambuichi^[17] 将 *Rana nigromaculata brevipoda* 的囊胚的细胞核移入去核的 *R. nigromaculata nigromaculata* 卵子里, 所得个体的神经褶, 牙齿、尾巴的形状和尾鳍上的色型都类似 *brevipoda*, 即受核的控制。

在黑白两种美西螈的核质配合实验里也得到了类似的结果。

但是童第周等^[18] 用金鱼和鲮鱼进行核质配合, 虽然仅有极少数发育到原肠作用完成以后的各个时期, 却明显地显示了细胞质的影响。

我们在不同品系金鱼上也进行了核质配合并进行了多次移核。将双尾的核放在单尾鱼卵的细胞质内。第一次配合后, 所得个体基本上都象供体种。这些雄性鱼长大繁殖, 与雌性双

尾受精。把它们的卵子的细胞核再一次移入单尾细胞质内。即有极少数出现单尾或不标准的单尾。随着移核次数的增加, 单尾的数量也逐渐增加。这也显示了细胞质对性状分化的影响。而且这种尾型的变化是可以遗传的。

因此我们认为个体的性状, 并不完全由核来控制, 在发育的过程里, 细胞质也确实发挥着作用。

童第周等^[19] 在海鞘卵子上进行了核移植, 海鞘卵子的细胞质分化甚早, 在受精卵上可以看到五种不同的细胞质分布在一定的地区, 即预定神经、脊索、外胚层、中胚层和内胚层。如将受精卵切成二份; 将另一个胚胎时期的细胞(预定肌肉、表皮或肠子)的核移入无核的一半, 这半卵子发育成一个不完整的胚胎。移入的细胞核分裂后进入那一种细胞质便成为那一种的细胞核, 如肠子细胞的核进入肌肉细胞质便成为肌肉细胞的核, 这肌细胞有收缩的功能。因此, 在海鞘细胞分化过程中, 细胞质起着很大的作用。

在亲缘关系较远的种间的核质配合, 虽然不能形成完整个体, 但细胞质对核的影响也是明显的, 例如 *Rana pipiens* 与 *R. sylvatica* 是不能杂交的两个种。Moore^[20] 将前者囊胚的细胞核移到后者去核的卵子里, 一般发育停止在原肠早期。将这样的囊胚期的细胞核移回到 *R. pipiens* 的去核卵子里, 也只能使本种卵子发育到囊胚或原肠早期, 不能再继续下去了。

Fischberg 等^[21] 进行了相似的实验似乎可以解释不能发育的原因。他将 *R. temporaria* 的核移到 *Xenopus* 的卵子里, 发育到囊胚就停止了。他发现 *temporaria* 的核仁变小了。将这样的囊胚细胞的核移回到 *R. temporaria* 的卵子里, 也只能发育到囊胚。但是如果将它在本种卵子里连续移植几次, 它的发育能力会渐渐加强。从第五代开始, 一部分卵子发育到了原肠后期, 核仁也恢复增大。如果 *R. temporaria* 的核在 *Xenopus* 里经过二三代的连续移

植,再移回本种卵子时,即使经过许多次移植,也不能恢复。

可是 Hennen^[22] 在 *Rana pipiens* 和 *Rana palustris* 间作了移回试验。他发现核质杂种仅能发育到囊胚期,但是如把它的核移回本种细胞质内,则仍能发育成正常个体,似乎它们在异种细胞质内复制多次,在发育能力上却未受到影响。他认为可能是由于这两个种的亲缘关系较近的缘故。

童第周等^[23] 曾在硬骨鱼的两个亚科中进行了类似的试验。金鱼的核移到鲮鱼的去核卵子里,大部分不能发育,只有极少数形成胚胎,性状完全象鲮鱼。如果把核移回金鱼卵子,绝大部分停止在囊胚期。有极少数形成胚胎,有的还带着鲮鱼的性状。

这些例子都说明,细胞核在异种细胞质内分裂,就会受到它的影响,改变其发育能力。

(4) 生殖细胞形成过程中的核质关系

从上面介绍的核移植的结果中可以看到:1) 分化了的体细胞的核,如摄食的 *Xenopus* 蝌蚪的肠上皮细胞的核,移入去核的卵子,可以发育成为能繁殖的个体,表明体细胞的核可以做成生殖细胞的核;2) Smith^[23] 将蛙的预定生殖细胞的核移到去核的卵子里去,得到了正常的蝌蚪。这说明生殖细胞的核也是全能的。

如果把昆虫的生殖质,从植物极附近部分地移到动物极附近则两处都形成生殖细胞,可见生殖细胞主要先由生殖质来决定的。

总之,细胞核的移植给我们提供了一个探讨核质关系的良好手段。对了解分化、遗传等方面起了一定作用,但是这个技术本身仍需进一步改善。各类卵子移核时的最适条件也需摸索,希望能够不断改进,更好地为了解生命现象作出贡献。

参 考 文 献

- [1] 童第周、叶毓芬, 1963, 动物学报, 15: 151—167.
- [2] Gurdon J. B., 1964. *Advances in Morphogenesis Vol. 4*: 1—41 Academic Press Ed. M. Aberchrombie, J. Brachet.
- [3] Briggs, R. & T. J. King, 1952. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38: 455—463.
- [4] Bromhall J. D., 1975. *Nature* 258 No 5537.
- [5] Jacek A. Modlinski, 1978. *Nature* 273: 466—467.
- [6] Briggs R. & T. J. King, 1960. *Develop. Biol.* 2: 252—270.
- [7] King T. J. & R. Briggs, 1954. *Anat. Rec.* 120: 723—724.
- [8] King T. J. & R. Briggs, 1955. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 41: 321—325.
- [9] DiBerardino M. A. and T. J. King, 1969. *Develop. Biol.* 15: 102—128.
- [10] Rudolf Bernhard Brum, 1978. *Develop. Biol.* 65: 271—284.
- [11] Fischberg, J. B. Gurden and T. R. Elsoale, 1958. *Nature* 181: 424.
- [12] Gurdon J. B., 1962. *J. Embryo. Exp. Morph.* 10: 622—640.
- [13] Graham C. F., K. Arms and J. B. Gurdon, 1966. *Develop. Biol.* 14: 349—381.
- [14] Shickawa and Yamana, 1967. *Develop Biol.* 16: 368—369.
- [15] Thompson L. R. & J. B. McCarthy, 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30: 166—172.
- [16] De Robertis E. M., G. A. Partington & J. B. Gudon, 1977. *J. Embryol. Exp. Morph.* 40: 199—214.
- [17] Sambulchi H., 1957. *J. Sci. Hiroshinia Univ. B. L.* 17: 33—41.
- [18] 童第周、叶毓芬、陆德裕、童凤明、杜森, 1973, 动物学报, 19: 201—212.
- [19] T. C. Tung (童第周), S. C. Wu (吴尚勳) F. F. Yeh (叶毓芬), K. C. Li (李光三), and M. C. Hsu (许梅青), 1977. *Scientia Sinica* 20: 222—233.
- [20] Moore J. A., 1958. *Exp Cell Res.* 14: 532—540.
- [21] Fischberg M., 1958. *Exp Cell Res Suppl.* 6: 161—178.
- [22] Hennen S., 1963. *Develop. Biol.* 11: 243—267.
- [23] Smith L. D., 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54: 101—107.