

防止混淆。由于经过超薄切片，在透射电镜下看到的每个细胞附着的支原体较少。在严重污染时也通常只有10—50个左右。

扫描电镜检查：

将生长有待检查的细胞的盖玻片小条在2%戊二醛溶液(配制方法与透射电镜相同)中固定15—30分钟。系列乙醇脱水。最后用乙酸异戊酯置换。经在临界点干燥器用液体CO<sub>2</sub>干燥后，真空喷镀金膜，置扫描电镜下观察。整个样品制备过程可在一天内完成。

在扫描电镜下，支原体的形态多呈不规则的圆球形，大小也很不一致。通常在0.15—0.5 μm(图版图3)。支原体在细胞上的聚集总的来说是随机的，但散布不均匀，常形成一些密集区(图版图4)。常常在细胞的一侧附着大量

的支原体，而另一侧则几乎完全看不到。同样，一个细胞被严重污染而相邻的细胞却完全没有支原体的现象也常可见到。这也许可以表明，多数支原体在细胞表面附着一脱离一再附着的活动至少是不活跃的。观察还表明，支原体似乎特别容易在细胞交界处和微绒毛丰富的地方附着。根据这些分布特点，即使是轻度污染也很容易被扫描电镜检出。但在观察时应注意区分支原体与细胞本身的泡状物以及注意识别由于细胞微绒毛尖端电荷积累而显出的“颗粒”假象。

扫描电镜与透射电镜的检查可以结合使用。通常是用扫描电镜做初步检查，继而是用透射电镜加以证实，这就使结果更加可靠。

(未完待续)

## 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的

### Ti 质粒 (二)

白永廷 唐 惕 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所 细胞生理室)

#### 转移 DNA—T-DNA

Chilton 等人利用同位素标记的 Ti 质粒做探针，发现加入高浓度烟草肿瘤 DNA 后 Ti 质粒 DNA 的复性速度有加快的趋势，表明肿瘤 DNA 中有 Ti 质粒的顺序，但该顺序不多，而且没有检测到完整的 Ti 质粒。以后这些作者将章鱼碱型的 Ti 质粒 B6—806 用内切酶 SmaI 分解成 19 个片段，分别用同位素标记做成探针，然后与肿瘤进行分子杂交，结果有二段 Ti 质粒的 DNA (3b 和 10c) 能和肿瘤 DNA 杂交，这是二个相邻近的片段，称为 T-DNA (图 4)。Ti 质粒中与肿瘤 DNA 同源的 DNA 部分叫 T 区 DNA。这是首次证明了在高等植物的细胞内存在有微生物的 DNA 顺序。

Ti 质粒的 T 区 DNA 的长度约为 23 kb(千碱基对)。章鱼碱型和胭脂碱型的 T 区 DNA

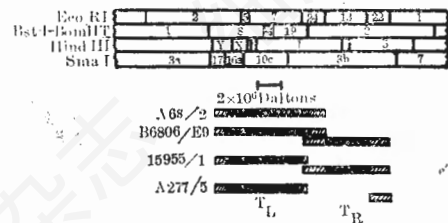


图 4 T-DNA 与 Ti 质粒 DNA 的片段的杂交试验<sup>[21]</sup>。

上方—包含 T-DNA 区的 Ti 质粒的一部分；

下方—几个肿瘤系 DNA 与 Ti 质粒 DNA 片段杂交部分(黑色区)；

TL—T-DNA 左区；TR—T-DNA 右区

都有 8—9 kb 长的一段 DNA，即为保守区(或称核心区)，而且在几乎所有的肿瘤系中都有这一段 DNA。章鱼碱型和胭脂碱型的保守区 DNA 顺序中同源性达 90%。T 区 DNA 包含有激发和保持肿瘤状态所必需的基因<sup>[32]</sup>。没有测到 T 区 DNA 和植物 DNA 之间有同源性，叶绿体

和线粒体的 DNA 中未发现 T-DNA 的存在, T-DNA 仅存在于植物肿瘤细胞的核 DNA 中<sup>[23]</sup>。

胭脂碱型肿瘤中的 T-DNA 比较简单, T 37 和 C 58 菌株诱发的肿瘤系中的 T-DNA 均为 23.4 kb 长的连续的一段顺序。有的肿瘤系仅有一个拷贝的 T-DNA, 也有些肿瘤系的 T-DNA 是多拷贝的<sup>[24]</sup>。章鱼肉碱型肿瘤的 T-DNA 分为左、右两部, 称 TL-DNA 和 TR-DNA, 左区的顺序变化不大, 长度约为 13 kb, 也有稍短的<sup>[25]</sup>。TL-DNA 通常为一个拷贝, 但也有几个拷贝首尾相连的排列情况<sup>[26]</sup>。TR-DNA 较短, 约 6 kb 长, 在肿瘤细胞中它们扩增为数个至数十个拷贝, 但有些肿瘤系中没有 T-DNA 的右区<sup>[27]</sup>。章鱼肉碱型的 Ti 质粒中 TL-DNA 与 TR-DNA 接近, 但不紧密相连(见图 4)。

#### T-DNA 上编码的基因

在转化的植物细胞中 T-DNA 进行活跃的转录和翻译, 所有的肿瘤组织中都可检测到 T-DNA 的特异转录产物 mRNA, 其量仅占植物总 mRNA 的百万分之一左右, 需用 <sup>32</sup>P 标记的 Ti 质粒片段与肿瘤细胞中分离得到的多聚腺嘌呤核苷酸——RNA (poly(A<sup>+</sup>)——RNA) 杂交的方法进行检测。章鱼肉碱型肿瘤有 12 个 mRNA, 8 个为 TL-DNA 转录产物, 4 个为

TR-DNA 转录产物。胭脂碱型肿瘤系有 13 个 mRNA。这些转录产物的相对含量和大小均不相同, 但都带有 polyA 顺序, 它们是由植物的 RNA 聚合酶 II 负责转录, 因为低浓度的  $\alpha$ -鹅膏蕈肽抑制该过程。每个转录产物独立地转录, 表明它们各有自己的启动子(promoter)和转录信号。已知 T-DNA 的保守区转录 6 个 mRNA, 章鱼肉碱型和胭脂碱型的肿瘤中这些转录产物相同(图 5), 它们的转录方向和转录位置均已确定<sup>[28]</sup>。分离出的 mRNA 能在麦胚无细胞系统中进行翻译, 有三个 T-DNA 转录的 mRNA 在体外翻译成了不同的蛋白质<sup>[29]</sup>。其中章鱼肉碱型 TL-DNA 的右端编码的蛋白质的分子量为 39000, 与章鱼肉碱合成酶大小相同, 并能被该酶的抗血清中和, 证明它就是章鱼肉碱合成酶<sup>[30]</sup>。另外二个蛋白质的功能还不清楚。其它的 mRNA 的翻译产物量极少, 难以检测。最近分析了编码章鱼肉碱合成酶基因的核苷酸顺序。

用遗传学方法在 T-DNA 区中引入转座子, 使特定的基因发生突变, 从而在肿瘤细胞中 T-DNA 的一个或多个转录产物也随之消失。基因突变后不能转录它所编码的 mRNA, 可观察带有突变基因的 T-DNA 的植物细胞的表型, 从而确定这些基因转录产物的功能。用上述方法证明了编码二类转录产物的基因<sup>[31]</sup>: 第一类编码冠瘿碱合成酶。章鱼肉碱型肿瘤含

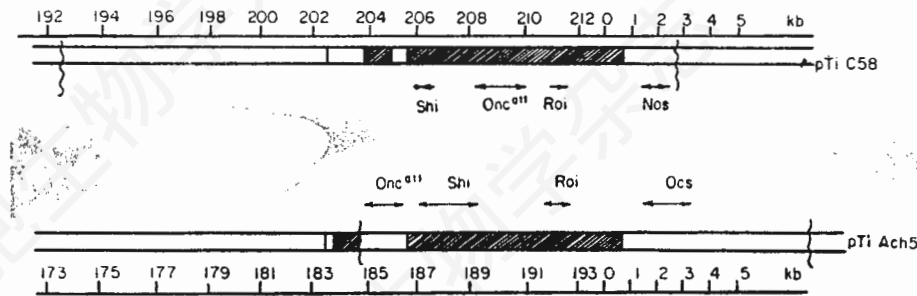


图 5 胭脂碱型(pTi C58)和章鱼肉碱型(pTi Ach5)Ti 质粒转化的植物细胞中 T-DNA 编码的基因;

Shi 抑制长芽, Roi 抑制长根, Nos 胭脂碱合成, Ocs 章鱼肉碱合成, Onc<sup>ttt</sup> 肿瘤形成(//)——同源区

有一个或二个冠瘿碱合成酶基因, 一个位于 TL-DNA 右端, 编码章鱼肉碱合成酶, 另一个基因位于 TR-DNA 的右端编码农杆菌和甘露碱合成酶。胭脂碱型肿瘤也有二个基因, 一个

位于 T-DNA 右端, 编码胭脂碱合成酶, 另一个位于 T-DNA 的左端, 编码农杆菌素碱合成酶。第二类是诱发肿瘤的基因。T-DNA 的保守区的转录产物具有致瘤功能, 已确定有 6 个

和线粒体的 DNA 中未发现 T-DNA 的存在, T-DNA 仅存在于植物肿瘤细胞的核 DNA 中<sup>[23]</sup>。

胭脂碱型肿瘤中的 T-DNA 比较简单, T 37 和 C 58 菌株诱发的肿瘤系中的 T-DNA 均为 23.4 kb 长的连续的一段顺序。有的肿瘤系仅有一个拷贝的 T-DNA, 也有些肿瘤系的 T-DNA 是多拷贝的<sup>[24]</sup>。章鱼肉碱型肿瘤的 T-DNA 分为左、右两部, 称 TL-DNA 和 TR-DNA, 左区的顺序变化不大, 长度约为 13 kb, 也有稍短的<sup>[25]</sup>。TL-DNA 通常为一个拷贝, 但也有几个拷贝首尾相连的排列情况<sup>[26]</sup>。TR-DNA 较短, 约 6 kb 长, 在肿瘤细胞中它们扩增为数个至数十个拷贝, 但有些肿瘤系中没有 T-DNA 的右区<sup>[27]</sup>。章鱼肉碱型的 Ti 质粒中 TL-DNA 与 TR-DNA 接近, 但不紧密相连(见图 4)。

#### T-DNA 上编码的基因

在转化的植物细胞中 T-DNA 进行活跃的转录和翻译, 所有的肿瘤组织中都可检测到 T-DNA 的特异转录产物 mRNA, 其量仅占植物总 mRNA 的百万分之一左右, 需用 <sup>32</sup>P 标记的 Ti 质粒片段与肿瘤细胞中分离得到的多聚腺嘌呤核苷酸——RNA (poly(A<sup>+</sup>)——RNA) 杂交的方法进行检测。章鱼肉碱型肿瘤有 12 个 mRNA, 8 个为 TL-DNA 转录产物, 4 个为

TR-DNA 转录产物。胭脂碱型肿瘤系有 13 个 mRNA。这些转录产物的相对含量和大小均不相同, 但都带有 polyA 顺序, 它们是由植物的 RNA 聚合酶 II 负责转录, 因为低浓度的  $\alpha$ -鹅膏蕈肽抑制该过程。每个转录产物独立地转录, 表明它们各有自己的启动子(promoter)和转录信号。已知 T-DNA 的保守区转录 6 个 mRNA, 章鱼肉碱型和胭脂碱型的肿瘤中这些转录产物相同(图 5), 它们的转录方向和转录位置均已确定<sup>[28]</sup>。分离出的 mRNA 能在麦胚无细胞系统中进行翻译, 有三个 T-DNA 转录的 mRNA 在体外翻译成了不同的蛋白质<sup>[29]</sup>。其中章鱼肉碱型 TL-DNA 的右端编码的蛋白质的分子量为 39000, 与章鱼肉碱合成酶大小相同, 并能被该酶的抗血清中和, 证明它就是章鱼肉碱合成酶<sup>[30]</sup>。另外二个蛋白质的功能还不清楚。其它的 mRNA 的翻译产物量极少, 难以检测。最近分析了编码章鱼肉碱合成酶基因的核苷酸顺序。

用遗传学方法在 T-DNA 区中引入转座子, 使特定的基因发生突变, 从而在肿瘤细胞中 T-DNA 的一个或多个转录产物也随之消失。基因突变后不能转录它所编码的 mRNA, 可观察带有突变基因的 T-DNA 的植物细胞的表型, 从而确定这些基因转录产物的功能。用上述方法证明了编码二类转录产物的基因<sup>[31]</sup>: 第一类编码冠瘿碱合成酶。章鱼肉碱型肿瘤含

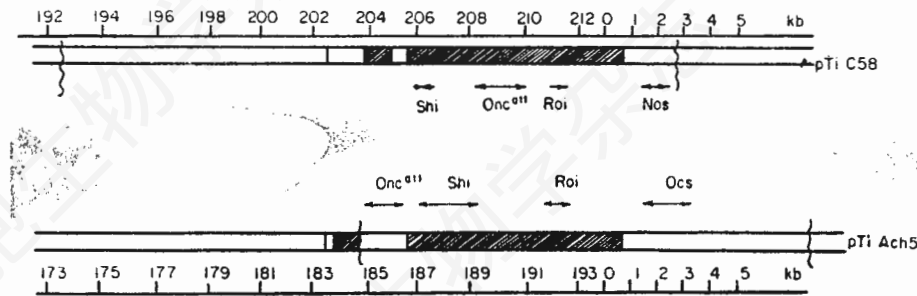


图 5 胭脂碱型(pTi C58)和章鱼肉碱型(pTi Ach5)Ti 质粒转化的植物细胞中 T-DNA 编码的基因;

Shi 抑制长芽, Roi 抑制长根, Nos 胭脂碱合成, Ocs 章鱼肉碱合成。Onc<sup>ttt</sup> 肿瘤形成 ——同源区

有一个或二个冠瘿碱合成酶基因, 一个位于 TL-DNA 右端, 编码章鱼肉碱合成酶, 另一个基因位于 TR-DNA 的右端编码农杆菌和甘露碱合成酶。胭脂碱型肿瘤也有二个基因, 一个

位于 T-DNA 右端, 编码胭脂碱合成酶, 另一个位于 T-DNA 的左端, 编码农杆菌素碱合成酶。第二类是诱发肿瘤的基因。T-DNA 的保守区的转录产物具有致瘤功能, 已确定有 6 个

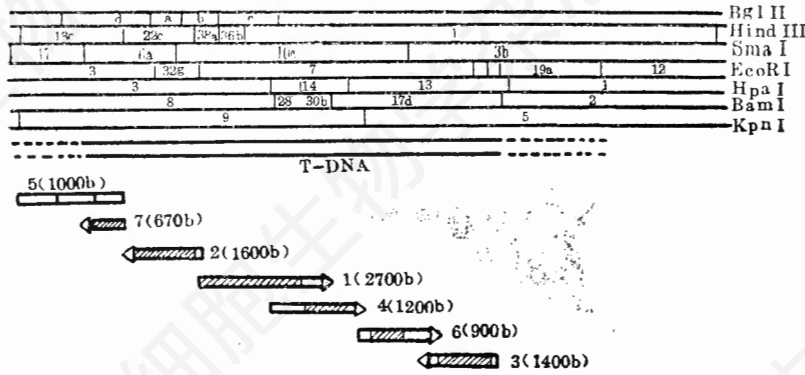


图6 T-DNA在植物肿瘤细胞中的转录产物。  
 上面是Ti质粒的T区限制图。下面是TL-DNA转录的7个mRNA。括号内数字表示mRNA的长度，箭头表示转录方向和和在T-DNA上转录的位置<sup>[28]</sup>

不同的mRNA,二个mRNA(图6中1和2)的作用是抑制芽的形成,它们的作用与组织培养中高浓度的生长素的效应相似。另一个mRNA(图6中4)抑制根的形成,和高浓度的细胞分裂素的效应类似。这几个基因的功能可能是影响细胞中植物激素的合成,因为野生型肿瘤中细胞分裂素与生长素的比值为0.22,而T-DNA基因4突变株诱导的长根的转化细胞中该值为

0.02,而T-DNA基因1或2突变体诱导的长茎的肿瘤中此比值为14.4。

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染植物后,也有一段Ri质粒整合进发根细胞的基因组<sup>[12]</sup>。发根农杆菌T-DNA的某些区域与章鱼肉碱型和胭脂碱型的冠瘿瘤的T-DNA有顺序同源性,但没有T区基因4<sup>[32]</sup>。

另外,最近发现根瘤菌(*Rhizobium*)的质

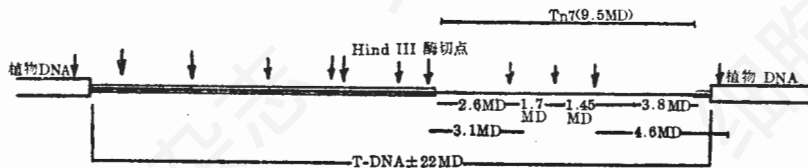


图7 烟草肿瘤组织中含有外来DNA(Tn7)的T-DNA

粒中也含有与根癌农杆菌Ti质粒的T-DNA某些区域同源的DNA顺序<sup>[33]</sup>。

整合进植物的基因组内。

**Ti质粒作为植物基因载体的前景**

Schell实验室最近建立了外来DNA定向地插入T-DNA的方法<sup>[34]</sup>。他们先将T-DNA片段克隆在其他质粒中,建成“过渡”质粒,它们在大肠杆菌和农杆菌中都能增殖。然后利用重组DNA技术,把外来DNA片段插到T-DNA片段的特定限制酶的切点中,再将这些重组的质粒引入根癌农杆菌,使带有外来DNA的T-DNA片段和野生型Ti质粒的同源片段通过体组进行交换,外来DNA进入Ti质粒,在转化内重植物细胞时T-DNA中的外来DNA就可

利用T-DNA区中嵌有转座子Tn7的Ti质粒转化植物细胞时,转座子Tn7和T-DNA一起整合进了植物基因组,利用分子杂交技术在转化的植物细胞DNA中检测到了Tn7(图7)<sup>[35]</sup>。

由于转化的植物细胞中发现了冠瘿碱合成酶,从而证明细胞基因组中整合有T-DNA。从转化细胞再生的植株以及由这些植株的种子繁殖的后代均含有冠瘿碱合成酶,表明该酶的基因可通过减数分裂过程传递给后代,在后代中此性状分离的情况符合孟德尔遗传规则<sup>[36]</sup>。

目前已获得一些Ti质粒的突变体,它们的T-DNA区中某些诱发肿瘤的基因失活,这

些“解除了武装的”Ti质粒仍能转化植物细胞，但转化的细胞无肿瘤特征，能正常再生植株、开花和结籽<sup>[37]</sup>。

近年来通过Ti质粒把转座子携带的某些抗菌素抗性基因引入植物细胞，如转座子Tn5编码的抗G418基因，G418是一种对植物有毒的抗菌素，利用在T区中插入有Tn5的Ti质粒转化植物细胞，后者表现出了对G418的抗性。此外，在美国迈阿密冬季讨论会上，三个研究小组报告了通过Ti质粒将修饰后的编码抗菌素抗性的基因引进了植物细胞。为使抗性基因能在植物细胞中表达，需将nopaline合成酶基因的启动子与外来基因结合，建成一种能在植物细胞内发生表达的嵌合基因(chimeric gene)。美国Monsanto公司的St. Louis实验室和华盛顿大学Chilton的小组用卡那霉素抗性基因，西欧Schell和Montagu小组将编码抗氨甲喋呤(methotrexate)、卡那霉素<sup>[38]</sup>或氯霉素<sup>[39]</sup>的结构基因以及章鱼肉碱合成酶基因<sup>[39]</sup>建成嵌合基因引入植物细胞，结果敏感的植物细胞对相应的抗菌素表现有抗性，或检测到了章鱼肉碱合成酶。Hall实验室将菜豆G1蛋白基因通过Ti质粒引进了向日葵细胞，在转化的植物细胞中测到了微量的菜豆G1蛋白<sup>[40]</sup>。

以上是近年来利用Ti质粒作为载体将外源DNA引入植物细胞的初步尝试，结果是鼓舞人心的，预期不久的未来Ti质粒可改造成为安全而高效的外源DNA的载体，同时也可作为研究植物细胞的基因调节机理的重要手段，一个利用基因工程技术有目的地改造植物的新时期必将到来！

#### 参 考 文 献

- [1] Smith, E. F. & Townsend, C. O., (1907). *Science*, 25: 671-673.
- [2] Braun, A. C. & Mandle, R. J., (1958). *Growth*, 12: 255.
- [3] Menage, A. & Morel, G., (1965). *C. R. Soc. Biol., Paris*, 159: 561-562.
- [4] Petit, A. & Tempe, J., (1978). *Mol. Gen. Genet.*, 167: 147-155.
- [5] Kerr, A., (1969). *Nature*, 223: 1175-1176.

- [6] Zaenen, I., et al., (1974). *J. Mol. Biol.*, 86: 109-127.
- [7] Chilton, M. D., et al., (1977). *Cell*, 11: 263-271.
- [8] Schell, J., (1979). "Nucleic Acids in Plants", Eds. T. Hall & J. Davies, Vol. 11, pp. 195-210.
- [9] 罗士韦等, 1982, 细胞生物学杂志, 4(4): 1-6.
- [10] 唐惕, 1982, 植物生理学通讯, 1: 17-21.
- [11] 唐惕, 1984, 植物生理学通讯.
- [12] Chilton, M. D., et al., (1982). *Nature*, 295: 432-434.
- [13] Currier, T. C. & Nester, E. W., (1976). *Anal. Biochem.*, 76: 431-441.
- [14] Holsters, M., et al., (1980). *Plasmid*, 3: 212-230.
- [15] Holsters, M., et al., (1978). *Mol. Gen. Genet.*, 163: 181-187.
- [16] Petit, A., et al., (1983). *Mol. Gen. Genet.*, 190: 204-214.
- [17] Schell, J. et al., (1982) In "The molecular Biology of Plant Development" p. 500.
- [18] Chilton, M. D., et al., (1978). *Plasmid*, 1: 254-269.
- [19] De Beuckeleer M. et al., (1981) *Mol. Gen. Genet.*, 183: 283-288.
- [20] Depicker, A., et al., (1980). *Plasmid*, 3: 193-211.
- [21] Thomashow, M. F., et al., (1980). *Cell*, 19: 729-739.
- [22] Depicker, A., et al., (1978). *Nature*, 275: 150-153.
- [23] Chilton, M. D., et al., (1980). *PNAS*, 77: 4060-4064.
- [24] Zambryski, P., et al., (1982). *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 361-370.
- [25] De Beuckeleer, M., et al., (1981). *Mol. Gen. Genet.*, 183: 283-288.
- [26] Holster, M., et al., (1983). *Mol. Gen. Genet.*, 190: 35-41.
- [27] Merlo, D. J., et al., (1980). *Mol. Gen. Genet.*, 177: 637-645.
- [28] Willmitzer, L., et al., (1982). *EMBO J.*, 1: 139-146.
- [29] Schroder, G. & Schroder, J., (1982). *Mol. Gen. Genet.*, 1: 51-55.
- [30] Schroder, J., et al., (1981). *FEBS Lett.* 129(1): 166-168.
- [31] Leemans, J., et al., (1982). *EMBO J.*, 1(1): 147-152.
- [32] Willmitzer, L., et al., (1982). *Mol. Gen. Genet.*, 186: 16-22.

- [33] Hadley, R. G. & Szalay, A. A., (1982). *Mol. Gen. Genet.*, 188: 361-369.
- [34] Leemans, J., et al., (1981). *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 149-164.
- [35] Hernalsteens, J. P., et al., 1980 *Nature*, 287(5783): 654-656.
- [36] Otten, L., et al., (1981). *Mol. Gen. Genet.*, 183: 209-213.
- [37] De Greve, H., (1982). *Nature*, 300: 752-755.
- [38] Herrera-Estrella, L., et al., (1983). *EMBO J.*, 2(6): 987-995.
- [39] Herrera-Estrella, L., et al., (1983). *Nature*, 303(5914): 209-213.
- [40] Murai, N., et al., (1983). *Science*, 222: 476-482.

## 探索癌基因的成熟年代

J. Michael Bishop

1866年, Paul Broca从他妻子家系的略图中,领悟到癌症的遗传因素。这一洞察所见,在他那时代似乎没有引起人们的注意(实际上,他的想法直至当代仍被 Carl Segen 所忽视)。不过一个世纪以来,生物学家们都开始对肿瘤发生寻找遗传方面的解释。目前这个问题所获得的成果是:关于长期设想的“癌基因”已出现在我们的眼前。癌基因的发现首先是由于逆转病毒有转导细胞基因的偏好——正是在正常细胞 DNA 中寻找逆转病毒的癌基因使它实体化了。由此两个进一步的设想又增添到活跃的想法中去:一是逆转病毒 DNA 的整合能够触动细胞基因,后者的激活明显地有引起肿瘤发生的作用;二是从各种肿瘤取得的 DNA 能够使啮齿类细胞发生瘤性生长,这种 DNA 似乎含有活化的癌基因。这种基因,我们过去仅在病毒中发现过。

逆转病毒的癌基因曾经显示,显性的遗传位点能够使正常细胞转变为瘤性生长,但由于病毒癌基因实验的简单性,有可能使人误入歧途。因为自然发生的肿瘤,被认为是由形成中的肿瘤细胞内几个不连续的活动所产生的。然而我们已经从肿瘤病毒获得了可能导致瘤性生长最有希望的生化机制的痕迹。目前已在逆转病毒中发现了,借助多种机制引起不同肿瘤的 18 种癌基因。由这些基因编码的蛋白质显示了使人棘手的多样性:有些是位于质膜上的酪氨酸特异的蛋白质激酶;有些是可能结合到染色质内 DNA 的核蛋白;有些是在整个生存期间令人费解地游动在细胞内膜上的糖蛋白;有些是具有结构特征和生化特性带电子的核苷三磷酸酶;有些还完全没有确定其特性,从而使有提供更加多样性的机会。这个多样性意味着什么?当然,那就是不只一种途径产生癌细胞。但是实际情况可

能还远不止于此。细胞的生长和分裂很可能是由一种从细胞表面到细胞核交错对插的网状物所控制的。假使该网状物的任何一点为有害影响所触及并破坏其平衡,则瘤性生长就可能接着发生。也许各种类型的癌基因能反映出这种受调节的网状物的成份,给我们揭示网状物所执行的重要功能。

当我们开始探索病毒癌基因时,唯一的希望就是它们的作用机制可能预示着多种来源的癌瘤的异常性。随着发现逆转病毒的癌基因是在脊椎动物,也许在所有的后生动物中所存在的“原癌基因”或“细胞癌基”的有危害的复制品,这个希望就接近于现实了。逆转病毒的癌基因起源于细胞,对许多人来说都感到意外;但回顾既往,却已经有异于一般的研究结果在充分预示着这一现象的存在。首先,逆转病毒的复制并不需要癌基因,所以难以设想它们是同病毒基因组的其余结构在进化中一起出现的。其次,许多类型的肿瘤是由不同的逆转病毒所引起,以及每种病毒又有其诱生一种或一组类型肿瘤的特性,这与 DNA 肿瘤病毒的特性形成明显的对比。第三,早期文献明确的提示,逆转病毒在动物体内复制时能够获得新的致瘤性能。

从另文所总结的证据,细胞癌基因具有真核基因的特征,而不是隐蔽的病毒基因;它们在漫长的进化过程中仍保存着明显的真实性;同时它们又以新颖的分子活动插入到逆转病毒的基因组中,其细节则正是目前人们注视的所在。逆转病毒的转导作用很可能是自然界的偶见事件,同时也毫无理由认为这种偶然事件是仅限于细胞癌基因。但是此种现象对癌基因的研究是有深远意义的。逆转病毒的转导作用已揭示的细胞基因的活性,对自然的肿瘤发生可能是极其重要的,