

牛 IL-18 真核表达载体的构建及其对 FMD 疫苗的免疫增强作用

邢秀娟¹,田夫林²,梁成珠³,杨 林⁴,冯 涛⁴,赵宏坤¹

(1 山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018; 2 山东省畜牧兽医总站检验中心,山东 济南 250022;
3 山东出入境检验检疫局,山东 青岛 266000; 4 山东省畜产品质量检测中心,山东 济南 250000)

【摘 要】 **【目的】**探讨牛 IL-18(BoIL-18)对口蹄疫(FMD)灭活疫苗的免疫增强作用。**【方法】**PCR 扩增 BoIL-18 蛋白基因片段,将其定向克隆至 pcDNA3.1 载体中,构建牛 IL-18 真核表达质粒 pcDNA3.1-BoIL18。将 pcDNA3.1-BoIL18 与 FMD 灭活疫苗联合免疫小白鼠,同时设空载体和单纯接种 FMD 灭活苗组为对照,通过对口蹄疫抗体效价的检测、T 淋巴细胞转化试验及 NK 细胞活性检测试验,研究 BoIL18 对 FMD 灭活疫苗的免疫增强作用。**【结果】**同时接种 FMD 灭活疫苗和 IL-18 真核表达质粒的小白鼠 T 淋巴细胞转化率和 NK 细胞活性,从接种第 21 天开始均明显高于单纯 FMD 灭活苗接种组($P<0.05$),所产生的中和抗体效价从第 28 天开始与单纯接种 FMD 灭活疫苗组差异显著($P<0.05$);空载体组与单纯 FMD 灭活疫苗组上述 3 项指标间无显著差异。**【结论】**牛 IL-18 真核表达质粒在小白鼠体内得到了良好表达,且表达产物对 FMD 灭活疫苗的免疫效果具有明显的增强作用。

【关键词】 牛 IL-18;真核表达载体;免疫增强作用;口蹄疫疫苗

【中图分类号】 S852.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2009)01-0034-05

Construction of eukaryotic expression plasmids coding BoIL-18 and its immunoenhancement on Foot-and-Mouth Disease virus vaccine

XING Xiu-juan¹, TIAN Fu-lin², LIANG Cheng-zhu³, YANG Lin⁴,
FENG Tao⁴, ZHAO Hong-kun¹

(1 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 2 Animal Diseases Testing Center Shandong Provincial Husbandry and Veterinary General Station, Jinan, Shandong 250022, China; 3 Shandong Enter and Leave Border Checkout & Quarantine Office, Qingdao, Shandong 266000, China; 4 Shandong Province Quality of Livestock Service Station, Jinan, Shandong 250000, China)

Abstract: **【Objective】** The research was to ascertain the immunoenhancement effect on vaccine. **【Method】** The coding region sequence of complete BoIL-18 gene was first inserted into pcDNA3.1 vector, resulting in the construction of IL-18 gene eukaryotic expression plasmids (pcDNA3.1-BoIL18). Immunoenhancement of the pcDNA3-BoIL18 plasmid on Foot-and-Mouth Disease (FMD) Virus Vaccine was observed by the test of neutralizing antibody, proliferation response of the T lymphocytes from spleen, and the cytotoxicity of NK cells. At the same time, the pcDNA3.1-BoIL18 plasmid was distinguished from empty pcDNA3.1 vector and FMD virus vaccine only. **【Result】** Proliferation responses of T and the cytotoxicity of NK cells were stronger than those of control group after 21st day plasmids and vaccines were significantly higher than those of mice only inoculated with vaccines after 28th day inoculation. But the mice inoc-

* **【收稿日期】** 2008-03-10
【基金项目】 山东省重大科技专项“畜禽产品质量安全生产关键技术研究与示范”专题“动物重大疫病控制技术研究”(SDSP2005-04-10-05)
【作者简介】 邢秀娟(1982—),女,山东高密人,在读硕士,主要从事动物传染病防制研究。Email:xxj2887@126.com
【通信作者】 赵宏坤(1957—),男,内蒙古通辽人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病防制研究。E-mail:hkzhao@sdau.edu.cn

ulated with empty pcDNA3.1 vector and vaccines and vaccines only were not discrepant. 【Conclusion】 BoIL-18 has obvious immunoenhancement effects on Foot-and-Mouth Disease Virus Vaccine.

Key words: BoIL-18; Eukaryotic expression plasmid; Immunoenhancement; Foot-and-Mouth Disease virus vaccine

白细胞介素 18(IL-18),又称为 IFN- γ 诱导因子,是一种新发现的细胞因子^[1]。IL-18 是细胞因子网络中的重要成员,具有复杂的生物学功能,在抗肿瘤、抗感染及免疫调节等方面具有重要作用^[2-4]。将 IL-18 开发作为免疫增强剂,可能是解决众多疫苗免疫效果不佳的有效途径之一,因此 IL-18 有着广阔的应用前景。

目前,国内对牛 IL-18(BoIL-18)的研究还处于起步阶段。2005 年,刘文强等^[5]应用 RT-PCR 技术分别从脂多糖(LPS)活化的牛脾细胞和肺泡巨噬细胞中,克隆到 BoIL-18 的成熟蛋白基因,并在大肠杆菌 BL21 中获得了表达。2006 年,张林等^[6]从刀豆蛋白刺激的牛外周血淋巴细胞中,扩增出了 BoIL-18 全长 cDNA,并将其克隆到 pMD18-T 载体上,进行了序列分析;2007 年,中国农大的 Shi 等^[7]将 BoIL-18 基因与口蹄疫病毒 VP1 基因进行融合,在毕赤酵母中进行表达,并将表达产物用作口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)疫苗增强剂免疫小鼠,结果表明,表达产物能大幅度提高口蹄疫疫苗的免疫效果,由此作者推论,该表达产物能增强口蹄疫疫苗的预防效果。同年,田兆菊等^[8]将 BoIL-18 基因亚克隆至昆虫杆状病毒表达载体,并在昆虫细胞获得了高效表达,经生物学活性检测发现,所表达的 BoIL-18 蛋白能促进牛外周血单核细胞增殖、诱导牛脾细胞产生 IFN- γ ,结果为进一步研究 BoIL-18 的应用奠定了基础。现阶段我国在口蹄疫防制上,还主要依靠口蹄疫疫苗的免疫接种,但 IL-18 对口蹄疫疫苗的免疫增强作用如何尚不清楚。为此,本研究构建了牛 IL-18 真核表达载体,并研究了该表达载体对 FMD 灭活疫苗的免疫增强作用,以期为进一步深入研究牛 IL-18 的功能活性及其作为一种免疫增强剂的进一步开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 口蹄疫灭活疫苗 由中牧实业股份有限公司兰州生物药厂生产,批号 0703012,规格 100 mL/瓶。

1.1.2 试验动物 昆明小白鼠,洁净级,雌性,6~

8 周龄,共 90 只,购自山东大学实验动物中心。

1.1.3 载体与受体菌 牛 IL-18 重组质粒 pGEX6p-1-BoIL18,由山东农业大学动物科技学院传染病实验室构建;真核表达载体 pcDNA3.1,由山东农业大学动物科技学院姜世金副教授惠赠;靶细胞 SP/20,由山东农业大学动物科技学院孙淑红博士惠赠;受体菌 DH5 α 感受态细胞,购自北京天根生物科技公司。

1.1.4 主要试剂 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I、DNA Marker 及 T4 DNA 连接酶,均购自宝生物工(大连)有限公司。口蹄疫 ELISA 检测试剂盒,为中国农科院兰州兽医研究所生产;质粒快速抽提纯化试剂盒,购于北京天根生物科技公司。刀豆蛋白 A(ConA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)和 RP-MI1640 培养基,均购自济南博亚生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 BoIL-18 真核表达载体的构建

1.2.1 引物的设计与合成 根据 BoIL-18 序列设计 1 对特异性引物,上游引物 p1: 5'-ACG GGA TCC CAG ATA ATA CCA TGG ATT AC-3',设有 *Bam*H I 酶切位点(下划线部分)及起始密码子(ATG);下游引物 p2: 5'-TAT GCG GCC GCC TAG TCC TGC TTT TGA ACA-3',带有 *Not* I 酶切位点(下划线部分)及终止密码子(CTA)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.2 真核质粒的构建 以质粒 pGEX6p-1-BoIL18 为模板,对 BoIL-18 的成熟蛋白基因进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μ L: 10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 4.0 μ L, Mg²⁺ 3.0 μ L, 引物 P₁(25 μ mol/L) 1.5 μ L, 引物 P₂(25 μ mol/L) 1.5 μ L, pGEX6p-1-BoIL18 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 34 μ L。在 PCR 仪上执行如下反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。将 PCR 产物全部上样电泳,回收 BoIL-18 目的片段。将载体 pcDNA3.1 和 BoIL-18 片段分别用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切,电泳回收 5.5 kb 和 480 bp 目的片段,在 T4 DNA 连接酶的作用下,于 16 $^{\circ}$ C 进行过夜定向连接。将连接产物按常规方法转化至 DH5 α 感受态细胞中,接种于含有 AMP(100

μg/mL)的 LB 琼脂平板上,37 ℃培养 18~24 h。挑取单个菌落于液体 LB 培养基中振荡培养。

1.3 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定

参考文献[9],提取上述疑似阳性菌的重组质粒,以其为模板进行 PCR,并用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳检测。阳性质粒命名为 pcDNA3.1-BoIL18 重组质粒。

1.4 pcDNA3.1-BoIL18 的测序

取酶切鉴定和 PCR 鉴定均为阳性的 pcDNA3.1-BoIL18 真核表达质粒,送宝生物工程(大连)有限公司进行测序,以确定插入片段的核苷酸序列和阅读框架的正确性。

1.5 pcDNA3.1-BoIL18 的大量制备

挑取转化有 pcDNA3.1-BoIL18 重组真核表达质粒的单菌,落于 5 mL 含 Amp(100 μg/mL)的 LB 培养基中,37 ℃振荡培养过夜。次日菌液按体积分数 1%的比例,加入 500 mL LB 培养基,37 ℃快速振荡 2 h,用质粒大量提取试剂盒提取质粒 DNA,紫外光吸收法测质粒浓度。

1.6 pcDNA3.1-BoIL18 对 FMD 灭活疫苗免疫效果的影响

将 90 只小白鼠随机均分成 3 组,Ⅰ组为单纯疫苗免疫组,将 FMD 灭活疫苗腹腔注射小白鼠,剂量为 0.1 mL/只;Ⅱ组为空白质粒对照组,在注射与Ⅰ组相同剂量 FMD 灭活疫苗的同时,于腿部肌肉多点注射空白 pcDNA3.1 质粒,剂量为 100 μg/只;Ⅲ组为联合免疫组,在注射与Ⅰ组同剂量 FMD 灭活疫苗的同时,将提取的 pcDNA3.1-BoIL18 质粒于腿部肌肉多点注射小白鼠,剂量为 100 μg/只。3 组均于接种后第 7,14,21,28,35 和 42 天,随机抽取

5 只小鼠采血,分离血清,并断颈处死,无菌取脾脏,用 MTT 法测定 T 淋巴细胞的增殖情况及 NK 细胞的活性,用 ELISA 检测试剂盒测定血清抗体效价。

2 结果与分析

2.1 牛 IL-18 蛋白基因的 PCR 扩增

将 PCR 反应产物电泳,得到约 480 bp 的片段(图 1),与预期结果基本一致。

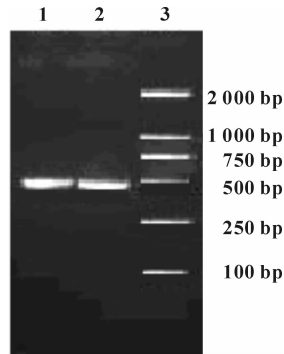


图 1 牛 IL-18 蛋白基因的 PCR 扩增结果

1,2. pGEX6p-1-BoIL18 的 PCR 扩增结果;3. DNA 标准 DL2000

Fig. 1 Amplified product of pGEX6p-1-BoIL18 by PCR

1,2. PCR product of pcDNA3.1-BoIL18;3. DNA Marker DL2000

2.2 pcDNA3.1-BoIL18 重组质粒的鉴定

将筛选的阳性重组质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切,可切出长约 5.5 kb 和 480 bp 的 2 条条带(图 2)。应用扩增 BoIL-18 的引物,从该阳性重组质粒中扩增出了 480 bp 的特异性片段(图 3),与设计的结果长度基本一致。阳性重组质粒经进一步测序后证明,所插入片段的核苷酸序列与 pGEX6p-1-BoIL18 质粒相应基因的序列完全一致,阅读框也正确无误。

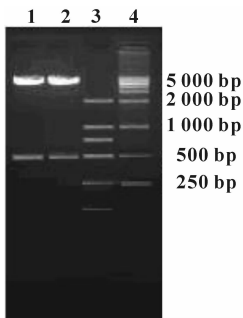


图 2 重组质粒 pcDNA3.1-BoIL18 的酶切鉴定

1,2. pcDNA3.1-BoIL18 经 *Bam*H I、*Not* I 双酶切产物;

3. DNA 标准 DL2000;4. DNA 标准 10000

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid

1,2. pcDNA3.1-BoIL18 digested with *Bam*H I

and *Not* I ;3. DNA Marker DL2000;4. DNA Marker 10000

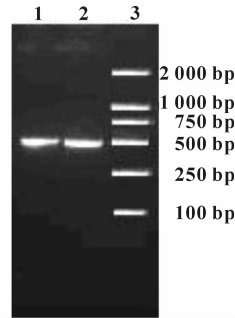


图 3 重组质粒 pcDNA3.1-BoIL18 的 PCR 鉴定

1,2. pcDNA3.1-BoIL18 的 PCR 扩增结果;3. DNA 标准 DL2000

Fig. 3 Amplified product of recombinant plasmid by PCR

1,2. PCR product of pcDNA3.1-BoIL18;3. DNA Marker DL2000

2.3 pcDNA3.1-BoIL18 真核表达质粒对 FMD 灭活疫苗的免疫增强作用

2.3.1 对脾脏 T 淋巴细胞增殖的影响 由图 4 可看出,各组小白鼠的脾脏 T 淋巴细胞对 ConA 均有明显的反应性,其中Ⅲ组的 T 淋巴细胞 OD₄₉₀ 值除在接种后第 7,14 天外,其他时间均显著高于 I、Ⅱ组($P<0.05$),而Ⅱ组与对照组 I 组相比差异不显著($P>0.05$)。

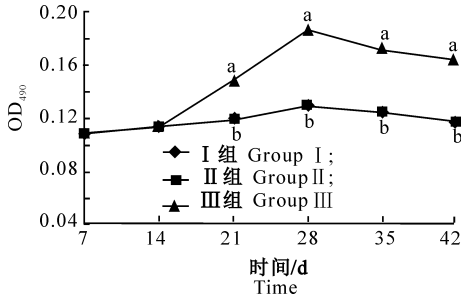


图 4 pcDNA3.1-BoIL18 真核表达载体对 T 淋巴细胞增殖的影响

图中不同小写字母表示组间差异显著。下同
Fig. 4 Kinetic changes of T lymphocyte proliferative response post-inoculation days
Different small letters in the same time indicated the significant difference

2.3.2 对脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响 由图 5 可见,各组小白鼠的脾脏 NK 细胞对靶细胞均有杀伤性,Ⅲ组的 NK 细胞对靶细胞的杀伤率在除接种后第 7,14 天外,其他时间均显著高于 I、Ⅱ组($P<0.05$),而Ⅱ组与 I 组相比差异不显著($P>0.05$)。

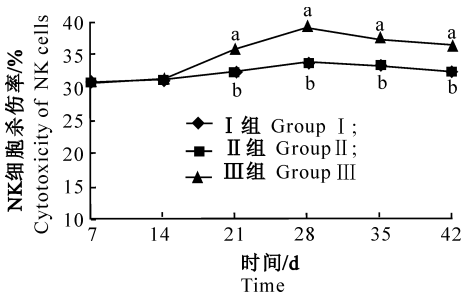


图 5 pcDNA3.1-BoIL18 真核表达载体对 NK 细胞杀伤活性的影响

Fig. 5 Kinetic changes of cytotoxicity of NK cells

2.3.3 对中和抗体效价的影响 图 6 表明,3 组小白鼠的中和抗体效价均呈先逐渐上升而后又逐渐下降的变化过程;Ⅲ组中和抗体效价虽然在接种后前 21 d 内与另外 2 组相比无显著差异($P>0.05$),但在接种后第 28,35 及 42 天时均差异显著($P<0.05$)。

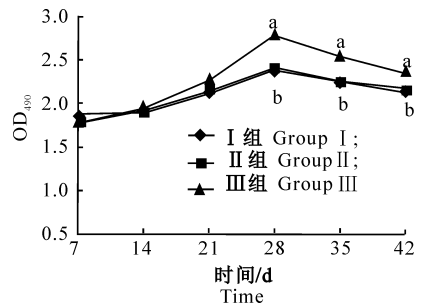


图 6 pcDNA3.1-BoIL18 真核表达载体对中和抗体的影响
Fig. 6 Kinetic changes of antibody post-inoculation

3 讨论

细胞因子质粒 DNA 注射动物体后,在动物体内相当长的时间内都会表达该细胞因子,因此当细胞因子被应用于增强疫苗的免疫应答时,就具有非常明显的优势^[6]。有研究表明,重组白细胞介素作为疫苗佐剂可以提高细菌、病毒和寄生虫等疫苗的免疫效果^[10-11]。白细胞介素的免疫增强作用不同于化学及微生物源佐剂,其能特异高效地调节动物对疫苗的反应,包括免疫细胞向接种部位移动、抗原提呈、促进前 T 细胞的产生,T 细胞及 B 细胞的增殖、分化成熟与激活。

目前,在如何提高口蹄疫疫苗免疫效果的研究中,关于牛 IL-18 真核表达质粒分子佐剂对口蹄疫疫苗免疫效果影响的研究国内还未见报道。本研究成功构建了 BoIL-18 真核表达质粒,并与口蹄疫灭活疫苗同时接种小白鼠,研究了 BoIL-18 对口蹄疫灭活疫苗的免疫增强效果。结果表明,BoIL-18 真核表达质粒能显著提高口蹄疫灭活疫苗的中和抗体效价,而且对于 T 淋巴细胞的增殖和 NK 细胞的杀伤活性也具有一定的促进作用,说明 BoIL-18 能显著提高动物机体的细胞免疫和体液免疫应答水平,与 Shi 等^[7]报道的结果吻合。本研究结果不仅进一步证实了细胞因子作为免疫佐剂的作用,而且为采用细胞因子类分子佐剂提高口蹄疫疫苗免疫效果的进一步研究提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Okamura H, Nagata K, Koatsn T, et al. Anovel costimulatory factor for gamma interferon found in the livers of mice causes endotoxshock [J]. Infect Immun, 1995, 63(10): 3966.
[2] Kohno K J, Kataoka T, Ohtsuki Y, et al. IFN-gamma-inducing factor(IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12 [J]. J Immunol, 1997, 158: 1541-1550.
[3] Micallef M J, Ohtsuki K, Kohno F, et al. Interferon-gamma-in-

- ducing factor enhances T helper1 cytokine production by stimulated human T cells; synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production [J]. J Eur Immunol, 1996, 26(7): 1647-1651.
- [4] 陈开森. IL-18 生物学作用研究进展 [J]. 九江学院学报: 自然科学版, 2004, 4(2): 81-84.
- Chen K S. Advanced research on biological function of interleukin-18 [J]. Journal of Jiujiang College: Natural Science Edition, 2004, 4(2): 81-84. (in Chinese)
- [5] 刘文强, 胡敬东, 杨少华, 等. 牛白细胞介素 18 成熟蛋白 cDNA 基因的克隆和表达 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 39(9): 873-876.
- Liu W Q, Hu J D, Yang S H, et al. cDNA Cloning and expression of Mature Bovine Interleukin-18 gene [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2005, 39(9): 873-876. (in Chinese)
- [6] 张林, 金宁一, 马鸣潇, 等. 牛 IL-18 基因的克隆及遗传进化分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 26(1): 68-71.
- Zhang L, Jin N Y, Ma M X, et al. cloning and sequence analysis of bovine interleukin-18 [J]. Chinese Journal of Immunology, 2006, 26(1): 68-71. (in Chinese)
- [7] Shi X J, Wang B, Wang M, et al. Immune enhancing effects of recombinant bovine IL-18 on foot-and-mouth disease vaccination in mice model [J]. Vaccine, 2007, 25(7): 1257-1264.
- [8] 田兆菊, 郑玉姝, 胡敬东, 等. 牛 IL-18 成熟蛋白基因在昆虫细胞中的表达及其活性 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 277-279.
- Tian Z J, Zheng Y S, Hu J D, et al. The gene expression and biological activity assay of BoIL-18 mature protein in baculovirus expression vector [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2007, 23(3): 277-279. (in Chinese)
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉赛尔 DW. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 北京科学出版社, 2002: 468-471.
- Sarm Brook J, Lasaer DW. Molecule cloning guidebook [M]. 3rd Edition. Beijing: Beijing Science Press, 2002: 468-471. (in Chinese)
- [10] Wood P R, H F Seow, T Cellcutkines and diseases prevention [J]. Vet immunol Immunopathl, 1998, 54: 33-44.
- [11] 陈芳, 孙红立, 李震, 等. 细胞因子的应用研究进展 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2003(5): 6-8.
- Chen F, Sun H L, Li Z, et al. Advanced research on application of monokine [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2003(5): 6-8. (in Chinese)

(上接第 33 页)

[参考文献]

- [1] Wilmut I. The low temperature preservation of mammalian embryos [J]. J Reprod Fertil, 1972, 31(3): 513-4.
- [2] Isachenko V, Isachenko E, Michenlmann H W, et al. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes [J]. Anat Histol Embryol, 2001, 30: 333-338.
- [3] Huang W T, Holtz W. Effects of meiotic stages, cryoprotectants, cooling and vitrification on the cryopreservation of porcine oocytes [J]. J Anim Sci, 2002, 15(4): 485-493.
- [4] Dobrinsky J R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos [J]. Theriogenology, 2002, 57: 285-302.
- [5] Wu C, Rui R, Dai J, et al. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes [J]. Mol Reprod Dev, 2006, 73(11): 1454-62.
- [6] Isachenko V, Soler C, Isachenko E, et al. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant [J]. Cryobiology, 1998, 36(3): 250-3.
- [7] Devireddy R V. Predicted permeability parameters of human ovarian tissue cells to various cryoprotectants and water [J]. Mol Reprod Dev, 2005, 70(3): 333-43.
- [8] Yamada C, Caetano H V, Simões R, et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide [J]. Anim Reprod Sci, 2007, 99(3/4): 384-8.
- [9] Amorim C A, Rondina D, Lucci C M, et al. Cryopreservation of sheep primordial follicles [J]. Reprod Domest Anim, 2007, 42(1): 53-7.
- [10] Paynter S J, Fuller B J. Cryopreservation of mammalian oocytes [J]. Methods Mol Biol, 2007, 368: 313-24.
- [11] 武彩红, 芮荣, 戴建军, 等. 猪卵母细胞玻璃化冷冻后细胞骨架的变化 [J]. 动物学研究, 2006, 27(4): 382-388.
- Wu C H, Rui R, Dai J J, et al. Cytoskeletal changes of vitrified porcine oocytes [J]. Zoological Research, 2006, 27(4): 382-388. (in Chinese)
- [12] Haim B, Gili C, Sara R. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction [J]. Reproduction, 2005, 129: 263-268.
- [13] Fujihira T, Kishida R, Fukui Y. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants [J]. Cryobiology, 2004, 49(3): 286-90.
- [14] Silvestre M A, Yáñez J, Salvador I, et al. Vitrification of prepubertal ovine cumulus-oocyte complexes: effect of cytochalasin B pre-treatment [J]. Anim Reprod Sci, 2006, 93(1/2): 176-82.
- [15] Hara K, Abe Y, Kumada N, et al. Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: Centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification [J]. Cryobiology, 2005, 50: 216-222.