

侯院林, 张富新, 李龙柱, 等. 羊乳中类胰岛素生长因子 I 的变化规律[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 843-847.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.020

## 羊乳中类胰岛素生长因子 I 的变化规律

侯院林, 张富新, 李龙柱, 于玲玲, 云丹, 雷飞燕  
(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119)

**摘要:** 为研究羊乳中类胰岛素生长因子 I (IGF-I) 的浓度变化, 并采集富含 IGF-I 的羊乳原料, 采用双抗体夹心酶联免疫法测定羊乳中 IGF-I 的浓度。在供试的 4 种奶山羊(萨能羊、努比羊、垚山羊和关中羊)中, 关中奶山羊乳中 IGF-I 的浓度最高, 并且所有山羊乳品中 IGF-I 的浓度都显著高于牛乳中的 IGF-I 浓度 ( $P < 0.05$ )。奶山羊初乳的 IGF-I 浓度变化较大, 泌乳第 1 d 的羊乳中 IGF-I 浓度最高, 随泌乳时间的延长, 其浓度显著下降 ( $P < 0.05$ )。常乳中 IGF-I 浓度比较稳定, 但浓度值较低。山羊日泌乳量越小, 羊乳中 IGF-I 浓度越大。经产奶山羊乳比初产奶山羊乳具有更高的 IGF-I 浓度, 其中, 第 4 胎的山羊乳中 IGF-I 浓度最高 ( $P < 0.05$ )。挤奶间隔时间 24 h 的山羊乳比间隔 12 h 的山羊乳具有更高的 IGF-I 浓度。

**关键词:** 羊乳; 类胰岛素生长因子 I; 变化规律

**中图分类号:** TS252.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2016)04-0843-05

## Variations of insulin-like growth factor I (IGF-I) in goat milk

HOU Yuan-lin, ZHANG Fu-xin, LI Long-zhu, YU Ling-ling, YUN Dan, LEI Fei-yan  
(College of Food Engineering and Nutrition Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

**Abstract:** Variations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in goat milk were studied for the collection of goat milk rich in IGF-I by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. The concentration of IGF-I in Guanzhong goat milk was the highest, and IGF-I concentrations in four goat breeds were higher than that in cow milk ( $P < 0.05$ ). IGF-I concentrations decreased significantly during colostrum, and stayed steady at low concentrations in its late lactation. The concentrations of IGF-I decreased with increased daily milk yield, and were higher in multiparous goat's milk than that in its primiparous goat's milk. The fourth parity had the highest IGF-I concentrations. The concentrations of IGF-I in the milk of goat milked twice a day were markedly lower than that milked once a day.

**Key words:** goat milk; insulin-like growth factor-I; variation

乳是人类营养物质的重要来源, 不仅含有人体所需的各种营养成分, 还含有多种生物活性物质<sup>[1]</sup>, 如表皮生长因子 (Epidermal growth factor,

EGF)、转化生长因子 (Transforming growth factor, TGF)、类胰岛素生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF) 等。IGF 在生命体中具有非常重要的生理功能<sup>[2-3]</sup>, 可以影响多种细胞的增殖与分化<sup>[4]</sup>, 具有细胞增生的长期性效应<sup>[5]</sup>, 对新生儿胃肠道的发育具有重要的生理作用<sup>[6-10]</sup>。乳中的 IGF 主要以类胰岛素生长因子 I (Insulin-like growth factor-I, IGF-I) 和类胰岛素生长因子 II (Insulin-like growth factor-II, IGF-II) 2 种形式存在, 其中 IGF-I 在乳中的浓度和生理活性远高于 IGF-II。IGF-I 是由 70 个氨基酸组成的单链多肽, 等电点 (PI) 为 8.2, 3 个二硫键分别

收稿日期: 2015-11-05

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目 (2013BAD18B00); 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (201103038); 陕西省农业攻关项目 (2014K01-17-05)。

作者简介: 侯院林 (1990-), 男, 陕西咸阳人, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。(E-mail) 891685945@qq.com

通讯作者: 张富新, (E-mail) fuxinzhang@snnu.edu.cn

在6-48、47-52、18-61位置相互交联<sup>[11-15]</sup>。影响乳中IGF-I浓度的因素较多,如品种、泌乳期、胎次、泌乳量等。目前关于乳中的IGF-I存在于牛奶中的报道较多,尤其是牛初乳中,而对羊乳中IGF-I浓度的影响因素研究较少<sup>[16-18]</sup>。因此,本试验系统地研究了奶山羊品种、泌乳期、胎次、泌乳量、挤奶间隔对羊乳中IGF-I浓度的影响,为进一步利用与开发羊乳资源,生产具有功能活性的羊乳制品奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

羊乳乳样采集自西北农林科技大学畜牧场的健康奶山羊,试验山羊的饲养条件一致(喂养的饲料品种及数量一致,定期给予充足的饮水)。采用人工挤奶,挤奶时弃去前50 ml乳样,采集中段的乳样,采样后立即将其置于-40℃下冷冻储存。

山羊IGF-I酶联免疫试剂盒购自美国R&D公司。

### 1.2 主要设备

电子天平由北京赛多利斯仪器系统有限公司生产,TGL-16B型台式低温高速离心机由上海安亭科学仪器厂生产,GSP-9080MBE型隔水式恒温培养箱由上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产,Multiskan Go型全波长酶标仪由美国热电公司生产,移液器(量程:0.5~10.0 μl、10.0~100.0 μl、100.0~1 000.0 μl)由德国Eppendorf公司生产。

### 1.3 测定方法

**1.3.1 样品处理** 样品处理按Castigliego<sup>[19]</sup>的方法并加以改进。将冷冻的乳样在冰水混合浴中缓慢解冻,用移液器吸取1 ml乳样置于2 ml离心管中,3 000 g离心15 min,吸取400 μl的离心中层液,加入40 μl 2 mol/L的盐酸,充分混匀,室温下静置30 min后,10 000 g离心30 min。吸取100 μl的上清液,添加264 μl的缓冲溶液[由11.7 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、36.2 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、60 mmol/L Tris-base、0.07%(体积比)Tween 20、250 ng/ml IGF-II组成],充分混匀,10 000 g离心10 min,取上清液,用于检测IGF-I浓度。

**1.3.2 IGF-I的检测** 用双抗体夹心酶联免疫(ELISA)法测定IGF-I浓度。将试剂盒在室温下平衡20 min后,取出试剂盒中板条。取10 μl处理后的乳样加入板条反应孔中,然后加入样品稀释液40

μl,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体50 μl,用封板膜封住反应孔后,在37℃下保温60 min。保温结束后弃去反应孔中液体,将板条翻转,在滤纸上拍干。在反应后的反应孔中加入350 μl洗涤液,静置1 min后,弃去洗涤液,在滤纸上拍干,重复5次。在洗涤后的反应孔中加入底物A、B(试剂盒中配套试剂)各50 μl,37℃避光保温15 min。最后在反应孔中加入终止液50 μl,15 min内在450 nm波长处测定各孔吸光度。每个样品重复3次。

**1.3.3 IGF-I浓度的计算** 将山羊IGF-I酶联免疫试剂盒中浓度为10 ng/ml的IGF-I标准品用试剂盒中的标品稀释液依次稀释成浓度为0 ng/ml、0.625 ng/ml、1.250 ng/ml、2.500 ng/ml、5.000 ng/ml、10.000 ng/ml的溶液。用方法1.3.2的方法检测不同浓度IGF-I标准品的吸光度,然后以浓度为横坐标(*x*),OD值为纵坐标(*Y*),绘制IGF-I标准曲线,计算线性回归方程,按回归方程计算测试样品中IGF-I浓度。

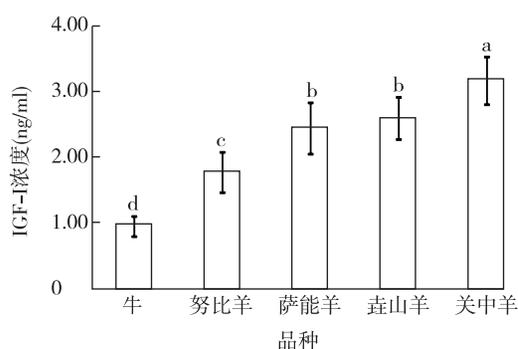
### 1.4 数据统计与分析

数据用DPS统计软件进行分析,并采用Duncan's新复极差法进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 奶山羊品种对乳中IGF-I浓度的影响

选取中国饲养量较多的萨能羊、努比羊、垚山羊和关中羊4个品种,每个品种随机选取10只健康的奶山羊采集羊乳,同时用荷斯坦奶牛乳样作对照。从图1可以看出,4个品种奶山羊乳中IGF-I的浓度均显著高于牛乳中IGF-I的浓度(0.97±0.16) ng/ml(*P*<0.05)。不同品种的山羊乳中IGF-I的浓度也有较大差别,其中努比羊乳中IGF-I浓度最低(1.78 ng/ml),关中羊乳中IGF-I浓度最高(3.19 ng/ml)(*P*<0.05),萨能羊乳和垚山羊乳中IGF-I浓度居中,分别为2.45 ng/ml和2.61 ng/ml。有关不同品种奶山羊的乳中IGF-I浓度的研究报道较少,Sejrsen<sup>[20]</sup>的研究结果表明,牛乳中的IGF-I浓度低于2 ng/ml;Grosvenor<sup>[21]</sup>的研究结果表明羊乳中IGF-I的浓度显著高于牛乳中IGF-I的浓度,与本试验结果一致。本试验中不同品种的山羊生长环境相同,饲养方式及饲养条件均一致,所以不同羊乳中IGF-I的浓度差异是由于品种之间的差异导致的,可能与山羊品种之间的基因型等因素有关,与山羊的饲养和管理条件等因素无关。



图中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图1 品种对羊乳中 IGF-I 浓度的影响

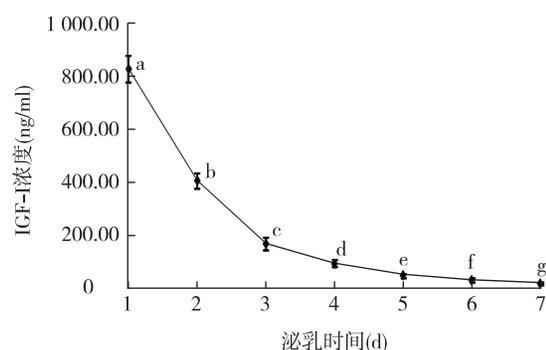
Fig.1 Effects of goat breeds on the concentrations of IGF-I in milk

## 2.2 泌乳期对羊乳中 IGF-I 浓度的影响

泌乳期乳样分别采集 10 只奶山羊的初乳样品、常乳样品。初乳样品在奶山羊产羔后第 1~7 d 连续每天在上午 7:00 进行乳样采集。萨能奶山羊初乳中的 IGF-I 浓度变化如图 2 所示。

从图 2 中可以看出,萨能奶山羊初乳中 IGF-I 浓度随泌乳时间延长呈急剧下降 ( $P < 0.05$ ),尤其是第 1~3 d 下降趋势最显著 ( $P < 0.01$ ),4 d 后下降趋缓。在羊产羔后的第 1 d,羊乳中 IGF-I 的浓度最高,到泌乳第 7 d 仅为第 1 d 的 1.9%。Dehnhar 等<sup>[22-27]</sup>发现 IGF-I 浓度在羊初乳中急剧下降,这与本研究结果基本一致。初乳 IGF-I 浓度急剧下降可能是与羊崽出生后的特殊生理机能有关。由于刚出生的羊崽肠道尚未闭合,初乳中大量的 IGF-I 通过进入血液循环或是直接在肠道局部作用,发挥其促进胃肠道发育的生理功能。随着羊崽肠道闭合,胃肠道功能逐渐完善,IGF-I 的需要量逐渐减小,造成初乳的 IGF-I 浓度急剧下降。

从图 3 中可以看出,萨能奶山羊常乳中 IGF-I 浓度较低,但相对稳定。随着泌乳天数的增加,IGF-I 浓度稍有波动。在奶山羊泌乳第 30~180 d 的常乳中,羊乳中 IGF-I 的浓度为 4.78~6.29 ng/ml,差异不显著 ( $P > 0.05$ )。Blum<sup>[4]</sup>测定牛常乳中 IGF-I 浓度小于 2.00 ng/ml,与有关文献报道羊乳比牛乳中 IGF-I 浓度高的研究结果相一致。IGF-I 在乳中有 2 种存在形式:游离态和结合态,常乳中的 IGF-I 浓度能够保持相对稳定可能是与 IGF-I 在乳中的存在形式有关:当乳中 IGF-I 的浓度较高时,则大部分游离态的 IGF-I 会转化成结合态的 IGF-I 形式存在,

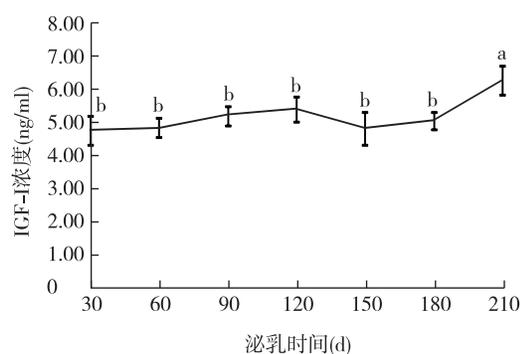


图中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图2 萨能奶山羊初乳中 IGF-I 浓度变化

Fig.2 The changes of IGF-I concentrations in goat colostrum over lactation time

反之,则结合态的 IGF-I 会转化成游离态的 IGF-I,通过不同形态之间的相互转化,使常乳中的 IGF-I 浓度保持相对稳定。



图中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图3 萨能奶山羊常乳中 IGF-I 浓度随泌乳天数的变化规律

Fig.3 Effects of lactation time on the concentrations of IGF-I in goat milk

## 2.3 泌乳量对山羊乳中 IGF-I 浓度的影响

分别选取日泌乳量平均在 1.0 kg (0.8~1.2 kg)、1.5 kg (1.3~1.7 kg)、2.0 kg (1.8~2.2 kg)、2.5 kg (2.3~2.7 kg)、3.0 kg (2.8~3.2 kg) 的奶山羊各 10 只进行乳样采集。不同日泌乳量的萨能奶山羊乳中的 IGF-I 浓度如表 1 所示。从表 1 中可以看出,随着奶山羊泌乳量的增大,羊乳中的 IGF-I 浓度呈缓慢下降趋势,统计分析结果表明泌乳量对羊乳中 IGF-I 浓度影响不显著 ( $P > 0.05$ )。这与 Collier<sup>[28]</sup>的研究结果一致。

## 2.4 胎次对山羊乳 IGF-I 浓度的影响

分别选取第 1 胎至第 5 胎泌乳中期的奶山羊各

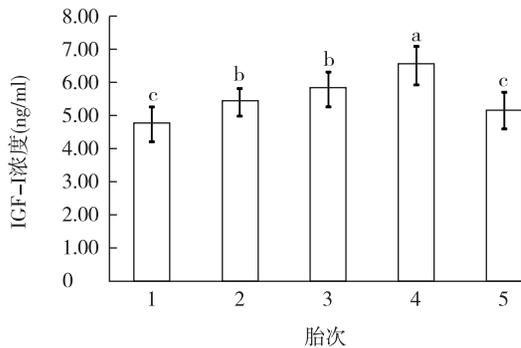
表1 泌乳量对山羊乳中 IGF-I 浓度的影响

Table 1 Effects of milk yield on the concentrations of IGF-I in goat milk

泌乳量 (kg/d)	平均泌乳量 (kg/d)	IGF-I 浓度 (ng/ml)
0.8~1.2	1.0	5.02 ± 0.26a
1.3~1.7	1.5	4.61 ± 0.29a
1.8~2.2	2.0	4.45 ± 0.29a
2.3~2.7	2.5	4.43 ± 0.43a
2.8~3.2	3.0	4.39 ± 0.11a

同一列数据后相同小写字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

10 只进行乳样采集。从图 4 中可以看出,不同胎次的山羊乳中 IGF-I 浓度具有一定的差异。在奶山羊产羔第 1 胎时,羊乳中 IGF-I 浓度最低,到产羔第 4 胎时达到最大值 ( $P<0.05$ )。胡志耘等<sup>[29]</sup>研究胎次对牦牛初乳中 IGF-I 浓度影响的结果表明,经产牦牛初乳中的 IGF-I 浓度高于初产牦牛。Campbell 等<sup>[5]</sup>和 Collier 等<sup>[28]</sup>的研究结果表明:经产乳牛乳中的 IGF-I 浓度高于初产乳牛,并且在整个泌乳时期均存在这一规律。这与本试验的研究结果一致。这一规律的原因可能与哺乳动物中每个细胞所含的 IGF-I 受体数目、乳房上皮细胞内 IGF-I 摄取或代谢速率以及乳房大小等因素有关。



图中不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

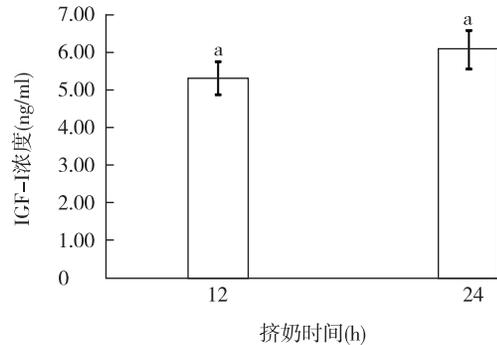
图4 胎次对山羊乳中 IGF-I 浓度的影响

Fig. 4 Effects of parity on the concentrations of IGF-I in goat milk

### 2.5 挤奶间隔时间对山羊乳中 IGF-I 浓度的影响

选择泌乳中期的萨能奶山羊 10 只,第 1~5 只在每天早上 6:00 挤奶 1 次 (挤奶间隔为 24 h),第 6~10 只在每天早上 6:00 和下午 18:00 各挤奶 1 次 (挤奶间隔为 12 h),取样后测定羊乳中 IGF-I 的含量,结果见图 5。从图 5 可以看出,挤奶间隔对羊乳中的 IGF-I 浓度有一定的影响。挤奶间隔时间为 24

h 的羊乳比 12 h 具有更高的 IGF-I 浓度,但差异不显著 ( $P>0.05$ )。这是由于血清转移或者乳腺细胞分泌到乳中的 IGF-I 浓度至少需要经过 21 h 的积累,才有可能使挤奶间隔对羊乳中 IGF-I 的浓度有显著性的影响。Wu 等<sup>[30-31]</sup>研究了挤奶间隔对山羊乳中生长因子的影响,结果表明不同挤奶间隔的样品之间 IGF-I 浓度差异也不显著 ( $P>0.05$ )。



图中相同小写字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

图5 挤奶间隔时间对山羊乳中 IGF-I 浓度的影响

Fig. 5 Effects of milking interval on the concentrations of IGF-I in goat milk

## 3 结论

本研究结果表明,不同日泌乳量和挤奶时间间隔的山羊乳中 IGF-I 浓度稍有差异,但差异不显著。品种和胎次对山羊乳中的 IGF-I 浓度具有显著影响,其中,关中羊乳中的 IGF-I 浓度最高,第 4 胎次羊乳中的 IGF-I 浓度比其他胎次羊乳中的 IGF-I 浓度都高。在山羊产羔后的第 1~7 d,初乳中 IGF-I 浓度随泌乳时间的延长呈急剧下降趋势,随着泌乳天数的增加,进入常乳期后,IGF-I 浓度降低,但保持相对稳定。本试验的研究结果可以为采集富含 IGF-I 的羊乳原料提供指导,为乳制品加工厂生产富含 IGF-I 的产品提供帮助。

### 参考文献:

- [1] HAENLEIN W G F. Goat milk in human nutrition[J]. Small Ruminant Research, 2004, 51(2): 155-163.
- [2] BAXTER R C, ZALTSMAN Z, TURTLE J R. Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk[J]. Clin Endocrinol Metab, 1984, 58: 955-959.
- [3] BLUM J W, HAMMOM H. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves [J]. Livestock Production Science, 2000, 66:

- 151-159.
- [4] BLUM W F, BREIER B H. Radioimmunoassays for insulin-like growth factors and their binding proteins [J]. *Growth Regulation*, 1994, 4: 93-100.
- [5] CAMPBELL P G, BAUMRUCKER C R. Insulin-like growth factor I and its association with binding proteins in bovine milk [J]. *Journal of Endocrinology*, 1989, 120 (1): 21-29.
- [6] CLEMMONS D R, UNDERWOOD L E. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins [J]. *Annu Rev Nutr*, 1991, 11: 393-412.
- [7] COLLIER R J, MILLER M A, MCLAUGHLIN C L, et al. Effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) and season on plasma and milk insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in lactating dairy cows [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2008, 35: 16-23.
- [8] YOUNG G P, TARANTO T M, JONAS H A, et al. Insulin-like growth factor and the developing and mature rat small intestine: receptor and biological actions [J]. *Digestion*, 1990, 46: 240-252.
- [9] ZHANG W, FRANKEL W L, ADAMSON W T, et al. Insulin-like growth factors I improves mucosal structure and function in transplanted rat small intestine [J]. *Transplantation*, 1995, 59 (5): 755-761.
- [10] ZUMKELLER W. Relationship between insulin-Like growth factor I and IGF-II and IGF-binding proteins in milk and the gastrointestinal tract: growth and development of the gut [J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 1992, 15(4): 357-369.
- [11] GALL C. Goat breeds of the world [M]. Weikersheim: ACP-EU-CTA Technical Centre Agricultural & Rural Co-operation, 1996.
- [12] GAUTHIER S, POULIOT Y, MAUBOIS J. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities [J]. *Dairy Science and technology*, 2006, 86 (2): 99-125.
- [13] FRANCIS G L, UPTON F M, BALLARD F J. Insulin-like growth factors 1 and 2 in bovine colostrums: sequences and biological activities compared with those of a potent truncated form [J]. *Biochemistry*, 1988, 251:95-103.
- [14] FROESCH E R, SCHMID C, SCHWANDER J. Function of insulin-like growth factor [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1991, 11: 393-412.
- [15] GINJALA V, PAKKANEN R. Determination of transforming growth factor-beta I (TGF-beta I) and insulin-like growth factor (IGF-I) in bovine colostrum samples [J]. *Journal of Immunoassay*, 1998, 19: 195-207.
- [16] OH S, KIM J U, KANG S H, et al. The effects of dairy process and storage on insulin-like growth factor-I (IGF-I) content in milk and in model IGF-I-Fortified dairy products [J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(2): 402-409.
- [17] OLLIKAINEN P, RIIHIMAKI A M. Effects of heat-treatment on insulin-like growth factor-I in bovine milk [J]. *International Dairy Journal*, 2012, 23: 73-78.
- [18] OLLIKAINEN P, MUURONEN K. Determination of insulin-like growth factor-I and bovine insulin in raw milk and its casein and whey fractions after microfiltration and ultrafiltration [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 28: 83-87.
- [19] CASTIGLIEGO L, Li X N, ARMANI A, et al. An immunoenzymatic assay to measure insulin-like growth factor I (IGF-I) in buffalo milk with an IGF binding protein blocking pre-treatment of the sample [J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21: 421-426.
- [20] SEJRSEN K, PEDERSEN L, VESTERGARRDM, et al. Biological activity of bovine milk contribution of IGF-I and IGF binding proteins [J]. *Livestock Production Science*, 2001, 70: 79-85.
- [21] GROSVENOR C E, PICCIANO M F, BAUMRUCKER C R. Hormones and growth factors in milk [J]. *Endocrine Reviews*, 1992, 14(6): 710-728.
- [22] HADSELL D L, BAUMRUCKER C R, KENSINGER R S. Effects of elevated blood insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration upon IGF-I in bovine mammary secretions during the colostrum phase [J]. *Journal of Endocrinology*, 1993, 137: 223-230.
- [23] DEHNHARD M, CLAUS R, MUNZ O, et al. Course of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in mammary secretions of the goat during end-pregnancy and early lactation [J]. *J Vet Med*, 2000, 47: 533-540.
- [24] ERIKSSON U, DUC G, FROESCH E R, et al. Insulin-like growth factors (IGF) I and II and IGF binding proteins (IGFBPs) in human colostrum/transitory milk during the first week postpartum: comparison with neonatal and maternal serum [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 196: 267-273.
- [25] ONTSOUKA C E, BRUCKMAIER R M, BLUM J W. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(6): 2005-2011.
- [26] PAKKANEN R, AALTO J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum [J]. *International Dairy Journal*, 1997, 7: 285-297.
- [27] SKAAR T C, VEGA J R, PYKE S N, et al. Changes in insulin-like growth factor-binding proteins in bovine mammary secretions associated with pregnancy and parturition [J]. *Endocrinology*, 1991, 131(1): 127-133.
- [28] COLLIER R J, MILLER M A, HILDEBRANDT J R. Factors affecting insulin-like growth factor-I concentration in bovine milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(9): 2905-2911.
- [29] 胡志耘, 梁琪, 文鹏程, 等. 胎次及天数对牦牛初乳活性成分的影响 [J]. *食品工业科技*, 2013(9): 94-96.
- [30] WU F Y, TSAO P H, WANG D C, et al. Factors affecting growth factor activity in goat milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89 (1): 1951-1955.
- [31] WU F Y, ELSASSER T H. Studies on cell growth promoting activity in goat milk [J]. *Journal of the Chinese Agricultural Society*, 1995, 33: 326-332.