

# 动物种群遗传多态性研究中的 PCR 技术\*

宋铭晶<sup>①</sup> 张知彬<sup>①\*\*</sup> 徐来祥<sup>①②</sup>

(① 中国科学院动物研究所 北京 100080; ② 曲阜师范大学生命科学学院 山东曲阜 273165)

**摘要:** 基因组 DNA 的变异是种群遗传多态性研究的基础。PCR 技术可以在反应管内经济快速地扩增特定 DNA 序列,在动物种群遗传多态性研究中的应用主要包括三个方面:(1)种群遗传多态位点的检测;(2)基因定位或利用已经定位的单拷贝基因设计染色体位点特异的分子标记;(3)与 DNA 测序技术相结合,高效经济地获取特定基因座位的全部遗传变异。

**关键词:** PCR 技术;动物种群;遗传多态性;分子标记

**中图分类号:** Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)01-93-05

## The Application of the PCR Technique in the Study of Genetic Polymorphism in Animal Populations

SONG Ming-Jing<sup>①</sup> ZHANG Zhi-Bin<sup>①</sup> XU Lai-Xiang<sup>①②</sup>

(① Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;

② College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

**Abstract:** Genetic polymorphism of populations is based on variation in genomic DNA. The PCR technique can quickly and inexpensively amplify the specific DNA segments to ample quantities for further genetic analysis. Therefore, this technique is appropriate to the population genetics study. The application of this technique in population genetics mainly involves the following three aspects: (1) PCR-based molecular markers were widely used to detect the genetic polymorphic loci of a population; (2) locate gene in the chromosome, or screen some kinds of individuals with sequence-tagged sites markers; (3) the combination of PCR amplification and DNA sequencing make it easy to obtain the nucleotide sequences of some specific genes.

**Key words:** PCR technique; Animal populations; Genetic polymorphism; Molecular marker

基因组 DNA 的变异是种群遗传多态性的基础,生物因素和环境因素引起的 DNA 序列的变化(包括 DNA 的插入、缺失、重复、易位、倒位、修饰、碱基的替换和基因的重组)造成了种群内与种群间不同个体的遗传差异,而动物个体的遗传差异组成了动物种群的遗传多态性。近年来由于 PCR 技术可以在反应管内大量扩增特定的 DNA 片段,极大地推动了种群遗传多态性的研究。

PCR 即聚合酶链式反应(polymerase chain reaction),是一种体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术。它以待扩增的两条 DNA 链为模板,通过 DNA 聚合酶的酶促作用,用一对人工合成的寡核苷酸引物快速引导

DNA 合成,扩增出特定的 DNA 片段。经过 30~40 个循环反应,能把极少量的目标基因在几小时内扩增上百万倍<sup>[1]</sup>,成为大量的可用于进一步分析的 DNA 片段。与传统的基因克隆技术相比较,PCR 技术耗费较低,易于操作,克隆速度快,需要的模板 DNA 量少且质量要求

\* 中国科学院重要创新方向(No. KSCX2-1-03, KSCX2-SW-103),国家自然科学基金重点项目(No. 39730090)资助;

\*\* 通讯作者, E-mail: zhangzb@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 宋铭晶,女,27岁,博士研究生;研究方向:分子生态学。

收稿日期:2002-03-02,修回日期:2002-11-10

不高,这些优点使对大量个体的遗传变异进行筛选成为可能,解决了种群遗传多态性研究的难题。例如,在进行种群遗传结构分析时,一些珍稀动物或凶猛兽类的个体取材困难,组织样品的质量或数量常难以满足实验的要求,而应用 PCR 技术对动物种群内不同个体特定位点遗传变异的检测,只需要很少量的生物组织,甚至可以利用微卫星侧翼序列设计的特异性引物进行 PCR 反应,从动物的排泄物中或毛发中扩增出这种动物的 DNA 序列,实现在不伤害动物或不干扰动物正常活动的情况下,研究动物种群的遗传结构;采用该技术还可以从陈旧的微量生物组织或博物馆长期保存的标本扩增出 DNA 序列<sup>[2,3]</sup>,使已经灭绝了的生物种群的遗传结构得到深入研究。此外,种群遗传多态性研究要求检测出种群内及种群间不同个体的遗传差异和遗传相似性,从遗传本质上分析种群的动态变化规律与种群时空、种群内个体的行为、种群大小的变动等方面的关系,进而实施对种群的控制或保护策略。而传统的形态标记、细胞学标记和蛋白质标记可以检测到的多态位点极其有限,在研究种群遗传变异规律方面有一定局限性。PCR 技术的出现极大地促进了 DNA 分子标记技术的发展,DNA 水平的遗传多态性几乎遍及整个基因组,表现为核苷酸序列所包含的任何差异,甚至小到单个核苷酸的变异,因此,理论上 DNA 标记在数量上极其丰富。目前 PCR 技术与其它分子生物学技术相结合,已经衍生出一系列有效的对生物种群进行遗传结构分析的方法,本文就 PCR 技术在这些方面的应用作以概括地介绍。

## 1 以 PCR 技术为基础的 DNA 分子标记

根据 PCR 引物类型的不同,这类 DNA 分子标记可分为随机引物 PCR 标记、一端具有选择性核苷酸引物 PCR 标记和特异引物 PCR 标记。

**1.1 随机引物 PCR 标记** 这种标记的特点是所用引物的核苷酸序列是随机的。应用这种标记技术可以在不知道模板序列的情况下,用较低的退火温度随机扩增模板 DNA,获得大量的扩增片段,从而快速地找到较多的多态位点作为新的 DNA 标记。这个反应过程的基本原理是:寡核苷酸引物与变性的两条 DNA 模板链复性,如果引物分别与模板结合,其结合位点之间的距离在 PCR 扩增的长度范围内(通常不多于 4 kb),就可以扩增出 DNA 片段,因为基因组中可能有多个与这个寡核苷酸引物互补的序列,而且距离在 PCR 扩增范围之内,所以通常一个随机引物 PCR 可以扩增出多个 DNA 片段。种群中不同个体扩增出的 DNA 片段呈现多态性的

原因一般认为是:(1)种群中的某些个体的 DNA 序列在随机引物的结合位点发生变异,引物不能与之结合,使这些个体不能扩增出这个 DNA 片段,于是个体间出现扩增片段有无的差异,因此产生的分子标记是显性遗传的;(2)引物结合的位点之间的 DNA 序列发生重复、插入、缺失突变等,如重复序列的拷贝数在不同个体之间的变异导致个体间扩增片段大小的差异,由此产生标记是共显性遗传的,可以鉴别出杂合体和纯合体。

在种群遗传多态性研究中,这种 PCR 标记方法又可以分为随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记、AP-PCR (arbitrarily primed PCR) 标记和 DAF (DNA amplification fingerprinting) 标记。

**1.1.1 RAPD 标记** RAPD 标记通常所用的引物是 8~10 个碱基的寡核苷酸序列。用一个筛选出的随机单引物可以快速地检测到较多的多态位点,并且所需模板 DNA 的量较少,引物价格较低,操作方法简单<sup>[4]</sup>。以上优点使这种技术被广泛地应用到种群大量个体遗传结构的比较研究中<sup>[5]</sup>。但 RAPD 标记有以下三个主要缺点使它的应用受到限制:(1)一般是显性标记,对扩增产物的记录通常是条带的有/无,难以区分纯合和杂合基因型;(2)扩增片段中少数是共显性条带,多数则为显性条带,而且电泳时二者同时出现,使统计分析工作难度增大;(3)扩增反应的结果受模板浓度、模板质量、PCR 反应条件的影响大,实验难以重复。第三个缺点可以通过实验条件的标准化来进行克服。汪永庆等<sup>[6]</sup>严格规范用于 PCR 反应的各种条件,可得到较好的重复结果。而前两个缺点可以通过对有多态性的特定扩增条带进行进一步研究得以解决,如利用微卫星探针对 RAPD 扩增片段 Southern 杂交,将该标记转化为 RAMP (random amplified microsatellite polymorphism) 标记<sup>[7]</sup>或 RAHM (random amplified hybridization microsatellites) 标记<sup>[8]</sup>,这样就能筛选出由于微卫星重复单位不同而产生的共显性标记;或者将特定 RAPD 片段测序,根据序列设计较长的特异引物,将 RAPD 标记转化为 SCAR (sequence-characterized amplified regions) 标记或微卫星标记,再进行 PCR 反应,得到原 RAPD 标记对应的单一位点。

**1.1.2 AP-PCR 标记** AP-PCR 标记使用的引物较长,一般是大于 15 个碱基的寡核苷酸序列。由于反应过程的前两个循环严谨度较低,产生了较多的非特异性扩增产物,后十几个循环的严谨度较高,退火温度是 60℃<sup>[9]</sup>,产生的扩增产物稳定性比 RAPD 的好。

**1.1.3 DAF 标记** DAF 标记使用的引物更短,一般是 5~8 个碱基的寡核苷酸序列,因此与模板随机结合的

位点更多,检测多态性的能力更强。DAF会产生很复杂的带型,由于使用了更短的引物,因此其PCR结果的稳定性比RAPD更低<sup>[10]</sup>。

## 1.2 一端具有选择性核苷酸引物的PCR标记

### 1.2.1 AFLP标记

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记的基本步骤是:首先用两种限制性内切酶把DNA酶切,形成大小不同的片段,在连接酶的作用下,与其末端互补的双链人工接头连接,作为PCR扩增的模板。所用引物的5'端与接头和酶切位点序列互补,3'端在酶切位点后增加1~3个选择性核苷酸,由于反应开始以高温复性(一般是65℃),以后逐步降到普通复性温度(一般是56℃)。因此只有那些与3'端严格配对的片段才能得到扩增,选择性很强,只有一定比例的限制性片段被选择性地扩增,实验结果稳定、重复性好。AFLP揭示的DNA多态性是酶切位点和其后的选择性核苷酸的变异,一次可以获得50~100条谱带的信息<sup>[11]</sup>,同时具有随机引物PCR的优点和特异引物PCR的稳定性,十分有利于种群内个体间遗传多态性的筛选。但它也有不足之处:(1)不是共显性标记,扩增片段的谱带少数是共显性条带,多数为扩增片段有/无的显性条带,条带的统计分析工作难度很大;(2)标记引物需要用同位素或其他化学试剂,相对费时,且对操作人员的实验技术有较高的要求;(3)对模板DNA的质量要求较高,且需模板DNA的量多于2 μg。

### 1.2.2 ISSR标记

1994年Zietkiewicz等提出ISSR(Inter-simple sequence repeat)标记。他们根据在基因组中广泛存在的二核苷酸微卫星重复序列,设计出能与之结合的PCR引物,其长度是20个碱基左右的寡核苷酸序列。在引物的5'或3'端一般有2~4个随机选择的核苷酸,通过这些随机选择的核苷酸,来对许多有相同重复形式的微卫星座位进行筛选。所扩增的不是重复序列本身而是两个相距在PCR可扩增范围内,方向相反的微卫星重复序列之间的DNA区段<sup>[12]</sup>。这类标记稳定性比RAPD好,如果一侧引物是ISSR引物,另一侧是随机引物,则转化为RAMP(random amplified microsatellite polymorphism)标记,可以产生更丰富的扩增谱带<sup>[13]</sup>。但不足之处是这两种标记都不是共显性标记,得到的一系列谱带是来自多个位点的扩增产物,不能分辨出每条带对应的单一位点。

以上所介绍的遗传标记又被统称为基于PCR的DNA指纹图谱技术。它们的共同特点是应用PCR反应对模板DNA进行扩增,同时得到大量多态位点。这些位点的变异有的是点突变导致的,有的是重复单位

类型或数目的改变造成的。它们产生的扩增图谱与传统的DNA指纹图谱很相象,都是多条长条型片段形成的图谱,片段都是来自基因组的多个位点,但它们之间有本质的不同。传统的DNA指纹图谱是由Jeffrey等在1985年首先提出来的,是用来检测小卫星序列的串联重复数目的高度变异的技术<sup>[14]</sup>,这项技术十余年来被广泛应用于动植物种群研究中<sup>[15]</sup>,为种群内个体间遗传多态性分析提供了一个有力的工具。它与新发展的基于PCR的DNA指纹图谱技术的不同之处在于:(1)使用的技术手段不同,传统的DNA指纹图谱技术需要经过Southern杂交和用放射性标记探针来检测,技术难度较高、耗时较多;基于PCR的DNA指纹图谱技术操作简单、快速,经过PCR反应后电泳分离,就可以获得反映生物个体间差异的电泳图谱;(2)在组成图谱的谱带的性质方面也不相同。以上所介绍的基于PCR的DNA指纹图谱技术,可以在一次PCR反应中,同时扩增获得大量多态位点,适用于对不了解其具体遗传背景的种群内个体间多种变异的快速筛选,能敏感地检测出个体间的微小差异,还常被用来鉴定品种的纯度。但它产生的扩增产物的个体特异性不如传统的DNA指纹图谱技术,在没有亲缘关系的个体之间产生大量共有条带,不适于应用在野生动物种群内个体间的亲缘关系、个体的识别等方面的研究。而传统的DNA指纹图谱技术产生的谱带平均有一半来自父亲,一半来自母亲,没有亲缘关系的个体间随机产生的共有条带数所占的比例较低。有较高的种系稳定性,同时又有高度的个体特异性,除了同卵双生子外,个体间的谱带都有差异,检出的多态性较高,适于种群内的个体识别、近缘亲属亲权关系的鉴定和繁殖行为的研究。

## 1.3 特异引物PCR标记

### 1.3.1 微卫星多态性标记

微卫星DNA是由几个核苷酸(通常1~6个)为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列如(GAA)<sub>n</sub>、(AC)<sub>n</sub>等,它们在染色体上随机分布,由于重复单位重复次数的不同或重复程度的不完全而造成每个座位的多态性。用于检测微卫星多态性(simple sequence repeat polymorphism, SSR)的引物是根据微卫星两翼的保守序列设计的,通过PCR扩增出不同个体的微卫星座位,含有微卫星序列的扩增产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,能检测出单核苷酸的差异。通常微卫星座位PCR引物的获得,首先需要建立基因组文库或部分基因组文库,并从中筛选出含有微卫星座位的克隆,再测序得到微卫星位点及其侧翼的序列。微卫星标记是共显性的遗传标记,可以鉴别杂合体和纯合体。微卫星DNA在基因组中非常丰

富、分布的比较均匀、而且多态性高、检测的是单一的多等位基因的位点,因此物种的 SSR 标记,是种群遗传多态性检测的一种比较理想的分子标记。到目前为止微卫星标记已经应用在许多自然种群的遗传结构的研究中,一些动物种群已经建立了成套的 SSR 标记<sup>[16,17]</sup>。由于一些研究发现了许多微卫星座位的侧翼序列在近缘种中比较保守,所以直接应用已有的近缘种的微卫星引物扩增另一物种的微卫星序列的研究越来越多<sup>[18]</sup>。虽然这样做既可以避免繁琐的建库和杂交等工作,又节约开支和时间,但能否有效地扩增出同源的微卫星位点,还依赖于侧翼序列在种间的保守程度。

**1.3.2 MP-PCR 标记和 DAMD 标记** MP-PCR (microsatellite-primed PCR) 标记和 DAMD (directed amplification of minisatellite region DNA) 标记是在知道含微卫星座位和小卫星座位的序列的基础上,以微卫星和小卫星的核心序列设计特异引物,如:用(TA)做引物扩增的是不同(TA)<sup>[10]</sup>座位之间的 DNA 序列<sup>[19]</sup>,这两种标记稳定性较好,扩增产物来自基因组的多个位点。

**1.3.3 SCAR 标记** 1993 年,Paran 提出了 SCAR (sequence-characterized amplified regions) 标记。他在分析 RAPD 扩增片段的基础上,将特定 RAPD 片段切下来回收纯化,连到载体上进行克隆和测序,根据序列信息设计特异引物(一般是 24 个碱基的寡核苷酸),将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记。SCAR 标记一般为一种显性标记,但有时也表现为长度的多态性呈共显性遗传,得到原 RAPD 标记对应的单一位点<sup>[20]</sup>。与 RAPD 技术相比,SCAR 标记所用引物较长,与模板 DNA 完全互补,在严谨的条件下扩增出的条带重复性和稳定性都较好。

## 2 基因定位或利用染色体位点特异的分子标记快速筛选某类个体

在种群遗传多态性研究中,有时需要把含有微卫星序列的单拷贝基因或其它类型的单拷贝基因定位在某条染色体上或某条染色体的特定区域,目的是研究染色体不同位点对微卫星变异程度的影响或对某一特定基因表达的影响。应用 PCR 技术根据已知的基因序列设计特异引物,用染色体的微小片段做为模板进行 PCR 反应,通过对 PCR 扩增产物的鉴定把基因定位在染色体的某一微小片段内。另一方面,利用已经定位在某一染色体上的某一单拷贝基因设计一对特异引物,如已经定位在哺乳动物 Y 染色体上的 SRY 基因,或鸟类雌性 W 染色体上的某些性别相关基因。以设计的特异引物进行 PCR 反应扩增不同个体的基因组 DNA,扩增出的基因片段只在哺乳动物的雄性中出现,或只

在鸟类的雌性中出现,利用某些扩增条带的有无就可以对难以辨别的个体进行性别鉴定<sup>[21]</sup>。

## 3 与 DNA 测序技术相结合获取特定座位的遗传变异

在 PCR 技术产生以前,对难以取材的珍稀野生动物种群和微小生物个体组成的种群进行遗传多态性的比较研究,通常由于模板 DNA 量太少或质量太差不能对目的基因进行测序。由于 PCR 技术可以通过极少量模板 DNA 扩增出大量的 DNA 片段,使得这一问题迎刃而解,如从动物的毛发细胞、少量组织细胞中提取 DNA 并作为模板,建立 PCR 扩增片段 DNA 文库,进而再测序获得特定研究座位的全部遗传变异的信息,解决了少量模板 DNA 的测序问题,极大地促进了种群遗传多态性的研究。经过 PCR 扩增后,某一特定位点的扩增产物经过回收纯化,可以直接热变性成单链,作为测序用的模板,再以原来一对引物中的某一条作为引物,应用双脱氧核苷酸末端终止法进行测序。也可以把所选择的特定 PCR 产物与 T-载体连接,再转化入细菌进行克隆,铺平板选择阳性单克隆菌落,随后提取载体 DNA,酶切鉴定是否含有原 PCR 产物大小的插入片段,选择鉴定为阳性的克隆经碱变性,使之成为单链模板,用插入片段一侧的载体序列为引物进行测序。第二种方法虽然较直接 PCR 产物测序增加了许多步骤,但避免了直接回收的 PCR 产物不纯,含有共迁移带的缺点,所筛选的阳性单克隆菌落只含有同一克隆的特异性 PCR 产物。而且利用这种单链模板进行测序,由于模板更纯,引物特异性结合更好,测序结果一般较第一种方法所得结果好。总之,用 PCR 扩增的产物进行测序,与过去的酶切片段克隆测序相比,所需的模板 DNA 量显著减少,而且可以获得特定研究座位的全部遗传变异的信息,包括同义替换、非同义替换、插入变异、缺失变异、重复序列长度的变异。这样既发挥测序技术的优越性检测到更多遗传多态性,又把测序工作限定于某些特定的研究座位上,如 PCR 扩增条带在个体间呈现出多态性的研究座位<sup>[8,20]</sup>,避免了大量测序的浪费。

综上所述,每种技术都有其优点又存在不足,PCR 技术凭借其操作简单、所需模板 DNA 量少、模板质量要求较低以及可以快速获得大量特异性扩增产物等优点,使它成为动物分子生态学的重要工具,解决了动物种群研究中一系列技术难题。但操作过程中一旦受到微量异源 DNA 污染,就有可能使研究工作彻底失败,因此在应用 PCR 技术进行动物种群遗传多态性研究时,必须避免 DNA 的污染才能保证扩增产物的可靠

性,进一步的分析研究才有意义。

## 参 考 文 献

- [1] Mullis K B, Fallona F A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol*, 1987, **155**: 335 ~ 350.
- [2] Constable J J, Packer C, Collins D A, *et al.* Nuclear DNA from primate dung. *Nature*, 1995, **373**: 393.
- [3] Cano R J, Poinar H N, Pieniazek N J, *et al.* Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*, 1993, **363**: 536 ~ 538.
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**: 6 531 ~ 6 535.
- [5] Vucetich L M, Vucetich J A, Joshic P, *et al.* Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in a naturally fragmented landscape. *Mol Ecol*, 2001, **10**: 35 ~ 40.
- [6] 汪永庆, 徐来祥, 张知彬. RAPD 技术的标准化问题. 动物学杂志, 2000, **35**(4): 57 ~ 60.
- [7] Richardson T, Cato S, Ramser J, *et al.* Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic marker. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 3 798 ~ 3 799.
- [8] Cifarelli R A, Gallitelli M, Cellini F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 3 802 ~ 3 803.
- [9] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18** (24): 7 213 ~ 7 218.
- [10] Caetano-Anolles G, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biol Technology*, 1991, **9**: 553 ~ 557.
- [11] Vos P, Hogers R, Bleer M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23** (21): 4 407 ~ 4 414.
- [12] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction. *Genomics*, 1994, **20**: 176 ~ 183.
- [13] Cheng H Y, Yang W C, Hsiao J Y. Genetic diversity and relationship among peach cultivars based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2001, **42**: 201 ~ 206.
- [14] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, **314**: 67 ~ 73.
- [15] Ji W, Sarre S D, Aitken N, *et al.* Sex-biased dispersal and a density-independent mating system in the Australian brushtail possum, as revealed by minisatellite DNA profiling. *Molecular Ecology*, 2001, **10**: 1 527 ~ 1 537.
- [16] Beaumont M, Barratt E M, Gottelli D, *et al.* Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*, 2001, **10**: 319 ~ 336.
- [17] Jeffrey A M, Patrick D D, Matthew E A. New markers for new species: microsatellite loci and the East African cichlids. *Trends Ecol Evol*, 2001, **16** (2): 100 ~ 106.
- [18] Pepin L, Amigues Y, Lepingle A, *et al.* Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity*, 1995, **74**: 53 ~ 61.
- [19] Gupta P K, Balyan H S, Sarma P C, *et al.* Microsatellites in plants: a new class of molecular marker. *Current Science*, 1996, **70**: 45 ~ 54.
- [20] Paran I, Michelmore R M. Development of reliable PCR-based marker linkers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, 1993, **85**: 985 ~ 993.
- [21] 李明, 丁长青, 魏辅文等. 朱鹮性别相关基因及其性别鉴定. 科学通报, 2001, **46**(2): 129 ~ 131.