

羊乳中环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)变化规律的研究

于玲玲, 张富新*, 候院林, 云丹, 葛萍, 艾对, 苏伟丽, 杜远华

(陕西师范大学, 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安, 710119)

摘要: 采用酶联免疫法检测羊乳中环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)质量浓度及变化规律。结果表明, 羊初乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度变化较大, cAMP 质量浓度在产羔后第 4 d 时较高, 而 cGMP 在产羔第 1 d 时质量浓度较高; 常乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度显著高于初乳和末乳 ($p<0.05$); 日泌乳量越大, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度越高; 每天挤奶 2 次的羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度显著高于每天挤奶 1 次的羊乳 ($p<0.05$); 奶山羊在产羔 2~5 胎时羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度显著高于产羔第 1、6、7 胎的质量浓度 ($p<0.05$)。

关键词: 羊乳; 环腺苷酸; 环鸟苷酸

中图分类号: TS 252.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)01—0041—05

Variation Study of cAMP and cGMP in Goat Milk

YU Lingling, ZHANG Fuxin*, HOU Yuanlin, YUN Dan, GE Pin, AI Dui, SU Weili, DU Yuanhua

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: The concentration and variation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in goat milk were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that the concentrations of cAMP and cGMP in colostrum exhibited considerable variation. The concentration of cAMP reached the highest value at 4-day postpartum check, while that of cGMP at the first day. The concentration of either cAMP or cGMP in mature milk was significantly higher than that in colostrum and late lactation milk ($p<0.05$) and increased when daily milk yield enhanced. The higher contents of cAMP and cGMP in goat milk milking twice a day were remarkably observed in that milking once a day ($p<0.05$). The concentrations of cAMP and cGMP in milk from second to fifth parities' goat were extremely higher than the 1st/6th/7th parities ($p<0.05$).

Keywords: goat milk, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP)

收稿日期: 2015-03-09

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(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)。

* 通信作者: 张富新(1962—), 男, 陕西咸阳人, 教授, 主要从事乳品科学研究。E-mail: fuxinzh@snnu.edu.cn

引用本文: 于玲玲, 张富新, 候院林, 等. 羊乳中环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)变化规律的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(01): 41-45.

环核苷酸(cyclic nucleotides, CNT)是由单核苷酸中磷酸与戊糖的 3、5 位羟基通过磷酸酯键连接而成的一类环状小分子有机化合物^[1],主要有环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、环肌苷酸(cyclic inosine monophosphate, cIMP)、环尿苷酸(cyclic uridine monophosphate, cUMP)、环胞苷酸(cyclic cytidine monophosphate, cCMP)等十多种,其中环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)在动植物体内广泛存在^[2],它们作为含氮激素的“第二信使”^[1],对人体糖代谢、脂肪代谢、蛋白质代谢、细胞增殖与分化等具有重要的调节作用^[3-4]。动物体内的 cAMP 和 cGMP 主要存在于脑、心脏、肝脏、肾脏等组织和血液、乳汁等体液中^[5],其含量差别较大,具有广泛性和不平衡性^[6],其中乳中的 cAMP 和 cGMP 含量远高于其他部位^[7]。目前,有关 cAMP 和 cGMP 对哺乳动物的产乳性能方面的研究报道较多^[7-8],而对乳中 cAMP 和 cGMP 含量变化少有报道。羊乳中不仅富含蛋白质、脂肪、乳糖、维生素、矿物质等丰富的营养物质^[9],还有许多生物活性物质^[10-11],其中 cAMP 和 cGMP 受到人们广泛关注,尤其是在羊乳婴幼儿配方奶粉中^[12]。大量研究表明 cAMP 和 cGMP 对婴幼儿生长发育及智力发展有重要作用^[13-14],一些婴幼儿奶粉已通过强化 cAMP 和 cGMP 来增强产品的功能性。由于羊乳的化学组成不稳定^[5],乳中的各种营养成分变化较大^[9],其 cAMP 和 cGMP 也随之变化。因此,作者对影响羊乳中 cAMP 和 cGMP 的因素进行系统研究,为羊乳功能性产品的开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

羊乳:采取西北农林科技大学羊场健康萨能奶山羊的乳样。采取人工挤奶方式取样,采样时弃去前 3 把奶,取挤奶中段的乳样。采样后立即将乳样在-40℃下冷冻储存。

试剂盒:山羊环腺苷酸酶联免疫试剂盒和山羊环鸟苷酸酶联免疫试剂盒;美国 R&D 公司产品。

1.2 主要设备

电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司产品;TGL-16B 型台式离心机:上海安亭科学仪器厂产品;GSP-9080MBE 型隔水式恒温培养箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品;Multiskan Go 型

全波长酶标仪:美国热电公司产品;移液器:德国 Eppendorf 公司产品。

1.3 测定方法

1.3.1 样品处理 样品处理按 Skala^[11]、Blatchford^[17]和 Angel^[18]的方法并加以改进。将冷冻的乳样在 4℃下解冻后,用移液器吸取 0.5 mL 乳样置于 2 mL 离心管中,向其加入等体积的质量分数 1%的高氯酸和 10%的三氯乙酸(TCA),混合均匀,然后在 3 000 g 下离心 15 min,去除上层脂肪和沉淀,取上清液,向其加入 0.45 mL 1 mol/L 的 KOH 溶液将 pH 值调至 6.5~7.0,用于试剂盒检测。

1.3.2 cAMP 和 cGMP 的检测 cAMP 和 cGMP 采用酶联免疫(ELISA)试剂盒测定。将试剂盒在室温(20℃)下平衡 20 min 后,取出试剂盒中板条。取 10 μL 处理后的样品加入板条反应孔中,接着加入样品稀释液 40 μL,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体液 50 μL,用封板膜封住反应孔后,在 37℃下保温 60 min。然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,如此重复 5 次。在洗涤后的板条反应孔中加入底物 A、B 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 cAMP 和 cGMP 含量计算 将山羊环腺苷酸(cAMP)酶联免疫试剂盒中浓度为 500 ng/mL 的 cAMP 标准品用试剂盒中的标品稀释液依次稀释成浓度为 500、250、125、62.5、31.2、0 ng/mL 的溶液。用 1.3.2 方法检测不同浓度 cAMP 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 cAMP 标准曲线。以同样的方法,将酶联免疫试剂盒中浓度为 1 600 pg/mL 的 cGMP 标准品稀释成浓度为 1 600、800、400、200、100、0 pg/mL 的溶液,测定不同浓度 cGMP 的吸光度,绘制 cGMP 的标准曲线。计算线性回归方程,按回归方程计算各样品 cAMP 和 cGMP 浓度。

表 1 cAMP 和 cGMP 的回归方程及相关系数

Table 1 Linear equations and their correlation coefficients of cAMP and cGMP

环核苷酸	回归方程	相关系数(R^2)
cAMP	$Y=0.0041X+0.086$	0.999 6
cGMP	$Y=0.0014X+0.093$	0.999 6

1.4 数据处理

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

2 结果与分析

2.1 羊初乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的变化

选取健康的萨能奶山羊 5 只,取其产羔后 1~7 d 的初乳,测定其 cAMP 和 cGMP 的质量浓度,结果见图 1。

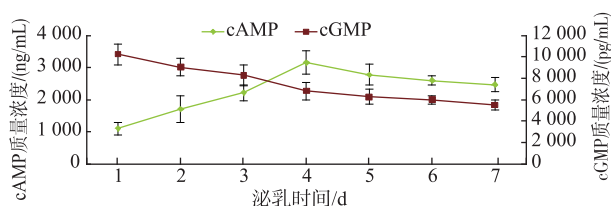


图 1 羊初乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的变化

Fig. 1 Changes of cAMP and cGMP concentration in goat colostrum

由图 1 可以看出,羊初乳中的 cAMP 和 cGMP 质量浓度变化较大。对于 cAMP,分娩后第 1 d 时,羊乳中 cAMP 含量较低,之后 cAMP 逐渐增加,在第 4 d 时达到最大,为(3 157.11±359.950) ng/mL,之后随着泌乳时间延长,羊乳中 cAMP 又逐渐下降。cGMP 在羊分娩第 1 d 时质量浓度最高为(10 261.07±973.81) pg/mL,之后随着泌乳时间延长,cGMP 一直呈下降趋势,到第 7 d 时其质量浓度为(5 523.69±434.99) pg/mL。总体来看,羊初乳中 cAMP 质量浓度高于 cGMP 大约 1 000 倍。有研究发现乳腺细胞将部分环核苷酸分泌到乳中^[19],且发现血液、尿液等其他体液中环核苷酸质量浓度远低于乳中^[6],表明乳中环核苷酸质量浓度与乳腺细胞的分泌机能有关;随着泌乳过程的推进,乳腺激素水平发生变化引起分泌机能改变^[20],影响分泌到乳中的环核苷酸的含量。作者研究结果与 Blatchford^[17]所测羊乳中 cAMP 和 cGMP 水平基本一致,但高于豚鼠和人乳中 cAMP 和 cGMP 水平^[13,20]。

2.2 泌乳期对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响

选取健康的萨能奶山羊 5 只,分别取其产羔后第 1 d(初乳)、第 90 d(常乳)和第 210 d(末乳)乳样,测定其 cAMP 和 cGMP 的质量浓度。结果见图 2、图 3。

由图 2 可以看出,不同泌乳期的羊乳(初乳、常

乳、末乳)中 cAMP 和 cGMP 质量浓度差异较大($p<0.05$)。分娩第 60、90、150 d 的常乳均为泌乳高峰期的乳,其 cAMP 和 cGMP 质量浓度相近,其中分娩第 90 d 的羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度最高,分别为(2 395.75±139.93) ng/mL 和(11 694.83±382.70) pg/mL,显著高于分娩第 1 d 的初乳中 cAMP 和 cGMP 含量,分别为(1 105.85±97.38) ng/mL 和(10 261.07±973.81) pg/mL 泌乳第 210 d 的末乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度分别为(1 548.85±111.64) ng/mL 和(8 796.86±143.11) pg/mL($p<0.05$)。有报道,乳腺因激素水平改变而发生机能的改变^[19,21-22],导致不同泌乳期的乳腺合成分泌到乳中的 cAMP 和 cGMP 水平差异较大^[23]。鲁安太^[8]和王秋芳^[23]对不同泌乳阶段羊乳中环核苷酸的研究也发现泌乳高峰期 cAMP 和 cGMP 水平最高,泌乳初期和泌乳末期 cAMP 和 cGMP 水平较低,与本研究结果一致。

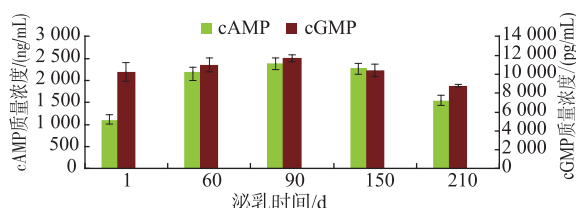


图 2 泌乳期对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响

Fig. 2 Effects of lactation on cAMP and cGMP concentration in goat milk

2.3 泌乳量对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响

选择日泌乳量分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 kg 泌乳中期的西农萨能奶山羊各 5 只,取样后测定羊乳中 cAMP 和 cGMP 的质量浓度。结果见表 2。

表 2 泌乳量对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响

Table 2 Effects of goat milk yield on cAMP and cGMP concentration in goat milk

日泌乳量/kg	环腺苷酸/(ng/mL)	环鸟苷酸/(pg/mL)
1.0	1 677.70±103.43 ^c	4 572.72±195.48 ^d
1.5	1 746.12±138.68 ^c	5 461.40±210.04 ^{cd}
2.0	2 042.74±145.24 ^b	6 162.41±355.98 ^b
2.5	2 581.15±162.46 ^{ab}	6 591.76±252.23 ^b
3.0	2 778.42±235.52 ^a	8 034.14±299.92 ^a

注:同一列中标注不同上标字母(a,b,b,d)表示差异显著($p<0.05$)。表 3 同。

由表 2 可知,随着奶山羊日泌乳量的增加,羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度有逐渐增大的趋势。

日泌乳量在 1.0~1.5 kg 时, 羊奶中 cAMP 和 cGMP 质量浓度差别不大($p>0.05$); 但当日泌乳量大于 1.5 kg 时, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度显著增加($p<0.05$); 当日泌乳量达到 3.0 kg 时, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度最高, 分别达到 $(2\ 778.42\pm 235.52)$ ng/mL 和 $(8\ 034.14\pm 299.92)$ pg/mL。羊乳中 cAMP 和 cGMP 主要由乳腺细胞合成分泌^[17,22], 泌乳量越大, 合成分泌到乳中的 cAMP 和 cGMP 量较多^[24]。鲁安太^[8]在对羊奶中环核苷酸含量与产奶性能关系研究发现随着产奶量的增加, 羊乳中的 cAMP 和 cGMP 质量浓度也随之增加, 这与作者研究结果一致。

2.4 挤奶间隔对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响

选择泌乳中期的萨能奶山羊 10 只, 其中 5 只在每天 6:00 挤奶一次(挤奶间隔为 24 h), 其余 5 只在每天 6:00 和 18:00 各挤奶一次(挤奶间隔为 12 h), 取样后测定羊乳中 cAMP 和 cGMP 的质量浓度。结果见图 3。

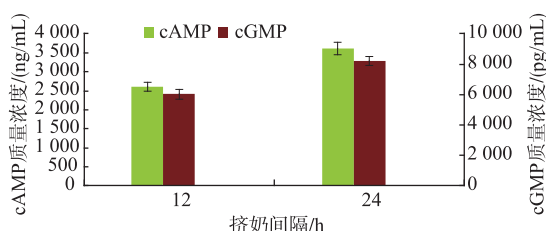


图 3 挤奶间隔对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响
Fig. 3 Effects of milking intervals on cAMP and cGMP concentration in goat milk

由图 3 可知, 挤奶间隔对羊乳中的 cAMP 和 cGMP 含量有一定的影响。挤奶间隔时间为 12 h 的羊乳中 cAMP 和 cGMP 的质量浓度分别为 $(2\ 609.33\pm 120.58)$ ng/mL 和 $(6\ 023.76\pm 335.67)$ pg/mL; 间隔时间为 24 h 的羊乳中 cAMP 和 cGMP 的质量浓度分别为 $(3\ 611.06\pm 152.74)$ ng/mL 和 $(8\ 184.91\pm 290.92)$ pg/mL。统计分析表明, 挤奶间隔时间为 12 h 的羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度显著低于间隔时间为 24 h 的羊乳中含量($p<0.05$)。有关挤奶间隔对乳中 cAMP 和 cGMP 含量的影响目前未见报道, 但挤奶间隔对乳成分的影响已有报道, Lyons 研究挤奶间隔对乳中蛋白质和脂肪的影响, 发现随着挤奶间隔延长, 乳中蛋白质和脂肪质量浓度增加。由于 cAMP 和 cGMP 是由乳腺合成分泌到乳中^[17], 由此推测, 随

着挤奶间隔延长, 乳腺中合成并分泌到乳中的 cAMP 和 cGMP 的含量也会增大。

2.5 胎次对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响

选择第 1~7 胎泌乳中期的萨能奶山羊各 5 只, 取样后测定羊乳中 cAMP 和 cGMP 的质量浓度。结果见表 3。

表 3 胎次对羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度的影响
Table 3 Effects of goat parity on cAMP and cGMP concentration in goat milk

胎次	环腺苷酸/(ng/mL)	环鸟苷酸/(pg/mL)
1	$1\ 704.99\pm 287.88^b$	$5\ 965.01\pm 467.33^c$
2	$2\ 067.50\pm 246.82^a$	$7\ 054.65\pm 316.81^a$
3	$2\ 105.73\pm 332.65^a$	$7\ 190.33\pm 532.08^a$
4	$2\ 019.96\pm 367.86^a$	$6\ 820.78\pm 567.37^{ab}$
5	$2\ 038.82\pm 252.98^a$	$6\ 920.43\pm 341.99^{ab}$
6	$1\ 821.47\pm 205.99^{ab}$	$5\ 720.36\pm 405.37^c$
7	$1\ 412.68\pm 172.76^c$	$5\ 008.22\pm 247.77^c$

由表 3 可以看出, 奶山羊在产羔第 1 胎时, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度较低($p<0.05$), 在产羔第 2~5 胎时, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度显著增大, 其产羔第 3 胎时, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度达到最高, 分别为 $(2\ 105.73\pm 332.65)$ ng/mL 和 $(7\ 190.33\pm 532.08)$ pg/mL, 但在产羔第 5 胎后, 羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度逐渐降低, 显著低于第 2~5 胎羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度($p<0.05$)。cAMP 和 cGMP 主要由乳腺细胞合成分泌到乳中, 乳腺细胞的发育程度与合成分泌乳成分密切相关, 奶山羊在第 1 胎产羔后, 其乳腺细胞发育不完全; 在第 2 胎产羔后, 乳腺细胞发育趋于成熟, 不仅产奶量增加, 乳中合成分泌的生理活性物质的量也随之增大, 但在奶山羊在产羔第 5 胎后, 其乳腺细胞趋于老化, 分泌合成能力降低, 对乳成分也有一定影响。

3 结 语

通过对影响羊乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度因素的研究, 发现羊初乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度变化较大, cAMP 质量浓度在产羔后第 4 天时较高, 而 cGMP 在产羔第 1 天时质量浓度较高; 对于不同泌乳阶段的羊乳, 常乳中 cAMP 和 cGMP 质量浓度较高, 而初乳和末乳中质量浓度较低; 奶山羊日泌

乳量越大,乳中cAMP和cGMP质量浓度越高;每天挤奶2次的羊乳中cAMP和cGMP质量浓度高于每天挤奶1次的羊乳;第2~5胎的羊乳中cAMP和cGMP质量浓度较高。

参考文献:

- [1] RUSSELL P. Newton, CHRISTOPHER J. Smith. Cyclic nucleotides[J]. **Phytochemistry**, 2004, 65: 2423-2437.
- [2] LI Yuan, ZHANG Anmin, JIA Huijuan. Review of sport and cyclic nucleotides [J]. **Science & Technology Information**, 2010 (2): 24-26. (in Chinese)
- [3] WANG Qiu Huang, OUYANG Wuqing, LI minsheng, et al. cGMP in the milk of dairy goat and lactation[J]. **Heilongjiang Animal Science And veterinary Medicine**, 1993(4): 4-6. (in Chinese)
- [4] MOU Dehua, ZHU Yanli, ZHANG Yanfang, et al. The cyclic AMP within ziziphus jujube and its biological properties [J]. **Food Science and Technology**, 2007(5): 273-275. (in Chinese)
- [5] ZAN Linsen, LV Jinyin, MA Zhike. Distribution of endogenous CNT in animal [J]. **Acta Agriculturae Nucleatae Sinica**, 1999, 13(6): 343-346. (in Chinese)
- [6] ZAN Linsen, QIU Huai, YUAN Zhifa. Studies on vivo metabolic law of CNT in guinea pigs[J]. **Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences**, 2000, 31(2): 124-130. (in Chinese)
- [7] ZHAO Haobin, LU Antai. Research on the relationship between cyclic nucleotides and other biochemical markers and milk performance[J]. **Shaanxi Journal of Agricultural Sciences**, 1992(2): 21-22. (in Chinese)
- [8] LU Antai, WANG Shupe, SONG Jiuzhou, et al. The contents of cAMP/cGMP in goat milk and milk producing performance[J]. **Journal of Northwest Agricultural University**, 1988, 16(3): 41-48. (in Chinese)
- [9] AI Dui, ZHANG Fuxin, YU Lingling, et al. Optimization of head space solid phase micro-extraction conditions for volatile components in goat milk[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 1(34): 40-46. (in Chinese)
- [10] HAENLEIN W G F. Goat milk in human nutrition[J]. **Small Ruminant Research**, 2004, 51(2): 155-163.
- [11] LI Linqiang, ZAN Linsen. A comparison of milk volatile free fatty acids from Xinong aanen goat and holstein cattle and the molecular mechanism analysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(6): 822-826. (in Chinese)
- [12] COSGROVE M, DAVIES D P, JENKINS H R. Nucleotide supplementation and the growth of term small for gestational age infants[J]. **Arch Disease Child Fetal, Neon edition**, 1996, 74(2): 122-125.
- [13] JOSEF P. Skala, M. D. , Ph. D. Cyclic nucleotides in breast milk [J]. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1981, 34: 343-350.
- [14] MICHAELIDOU A, STEIJNS J. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides[J]. **International Dairy Journal**, 2006, 16: 1421-1426.
- [15] PARK Y W, JUAREZ M, HAENLEIN G F W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk [J]. **Small Ruminant Research**, 2007, 68(1-2): 88-113.
- [16] SANCHEZ-MACIAS D, MORENO-INDIAS I, CASTRO N, et al. From goat colostrum to milk: Physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum[J]. **Journal of Dairy Science**, 2014, 97(1): 10-16.
- [17] BLATCHFORD D R, ANNE Faulkner, HENDERSON A J. Cyclic nucleotides in goats' milk: changes with physiological state[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1984, 78(1): 203-206.
- [18] ANGEL Gil, FERMIN Sanchez-Medina. Acid-soluble nucleotides of cow's, goat's and sheep's milks, at different stages of lactation[J]. **Journal of Dairy Research**, 1981, 48: 35-44.
- [19] 郑广华. 环核苷酸与临床[M]. 天津: 科学技术出版社, 1985.
- [20] LOIZZI R F. Cyclic AMP changes in guinea pig mammary gland milk[J]. **Physiologist**, 1978, 21: 73.
- [21] SAPAG-HAGAR M, LEWS D L, HALLOWES R C, et al. The effects of dibutyl cAMP on enzymatic and metabolic changes in explants of rat mammary tissue[J]. **Biochem Biophys Res**, 1975, 59: 261-268.
- [22] RILLEMA J A. Possible role of prostaglandin F_{2α} in mediating effect of prolactin on RNA synthesis in mammary gland explants of mice[J]. **Nature**, 1975, 253: 466-467.
- [23] WANG Qiufang, OUYANG Wuqing, LI Zhirong. Milk cyclic nucleotide changes with variant lactation stages [J]. **Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica**, 1993, 2(4): 81-84. (in Chinese)
- [24] NEVILLE M C. Physiology of lactation[J]. **Clin Perinatol**, 1999, 26: 251-279.