

不同海拔区域内牦牛肠道菌群结构组成多样性研究

王保宁^{1,2}, 陈昱作¹, 贡 嘎², 罗润波², 周赛赛², 李天娇², 索朗斯珠²
(1. 四川大学华西基础医学与法医学院, 成都 610041;
2. 西藏农牧学院, 林芝 860000)

摘 要: 探索不同海拔牦牛肠道菌群结构组成, 为不同海拔区域间牦牛的饲养交流提供帮助. 本研究随机采集海拔 2 897~4 717 m 的 12 头牦牛的新鲜粪便样本, 用 16s rDNA 技术对样本宏基因组测定, 比较分析高低海拔牦牛肠道菌群的 OTU 丰度差异, 研究高低海拔区域的牦牛肠道微生物菌群结构组成. 结果显示, 高海拔与低海拔地区牦牛肠道菌群在门、纲、目、科、属、种层面菌群结构组成不同. 高低海拔区域的牦牛肠道菌群有 8 个菌在属水平差异显著($P < 0.05$). 结果表明, 高海拔与低海拔牦牛肠道菌群结构组成存在一定差异, 低海拔地区牦牛肠道菌群 OTU 丰度比高海拔的更为丰富.

关键词: 牦牛; 不同海拔; 肠道菌群; 结构组成多样性; 高通量测序

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.056003

Study on diversity of structural composition of yaks intestinal flora in different altitudes

WANG Bao-Ning^{1,2}, CHEN Yu-Zuo¹, GONG Ga², LUO Run-Bo²,
ZHOU Sai-Sai², LI Tian-Jiao², SUOLANG Si-Zhu²

(1. West China School of Basic Medical Science and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China)

Abstract: Exploring the structure composition of the intestinal microflora of yaks in different altitudes will be to provide help for the breeding and communication of yaks in different altitudes. In this study, fresh fecal samples of 12 yaks were randomly collected at an altitude of 2 897 to 4 717 m. Using 16S rDNA technology to determine the metagenome of samples, and the OTU abundance of intestinal microflora of yaks at high and low altitudes was compared and analyzed, and then the structural composition of the intestinal microflora of yaks at high and low altitudes also be studied. The results showed that the composition of the intestinal microflora of yak in the phylum, class, order, family, genus and species levels is different between high and low altitude areas. The intestinal flora of yak in high and low altitude areas had 8 bacteria that had significant differences at the genus level ($P < 0.05$). In conclusion, there were certain differences in the composition of the intestinal microflora of yaks at high and low altitudes, and the OTU abundances of intestinal microflora of yaks at low altitude displayed higher species richness than those in high altitude.

Keywords: Yak; Different altitudes; Intestinal flora; Diversity of structural composition; High throughput sequencing

收稿日期: 2020-12-16
基金项目: 西藏农牧学院柔性引进人才项目(RXYJ1905); 财政部和农业农村部项目(CARS-37); 西藏自治区科技厅 2019 年度重点项目(XZZD19018)
作者简介: 王保宁(1972—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为分子微生物学与疾病防治技术. E-mail: 345182273@qq.com
通讯作者: 索朗斯珠. E-mail: xzslsz@163.com

1 引言

牦牛(Yak, *Bosgrunniens*)是高寒地区的特有牛种,草食性反刍动物,也是我国的主要牛种之一,其大多数集中于青藏高原中心地带及东部边缘的青海、甘肃和四川西北部^[1]. 不同地区的牦牛分布的海拔存在较大的差异^[2]. 牦牛是高寒牧区畜牧业中最重要的畜种之一^[3]. 由于高海拔地区低温高寒、草木结构单一、季节不平衡,寒冷季节饲草饲料储备缺乏等原因,牦牛常常表现出营养不良,体重出现负增长^[4]. 近年来,高海拔牦牛向低海拔迁徙,在低海拔地区建设圈舍,采用舍饲培育牦牛,正成为发展牦牛产业的一个创新措施^[5]. 本文采用宏基因组测定分析技术对不同海拔地区的牦牛肠道菌群组成结构进行比较研究,初步探索了高低不同海拔区域内的牦牛肠道菌群结构组成,为高低不同海拔区域内的牦牛迁徙和饲喂提供了肠道微生物研究基础.

2 材料与方法

2.1 样本采集

随机采集西部不同海拔区域的 12 头成年牦牛的新鲜粪便,其中海拔 3 000 m 以下地区归为低海拔组(LA),平均海拔 2942.5,样本 4 例,海拔 4 000 m 以上地区归为高海拔组(HA),平均海拔 4 372.5,样本 8 例. 取样后立即存于液氮中. 样本信息见表 1.

表 1 样本来源
Tab. 1 Sample source

分组	编号	来源地区	海拔/m
LA(n=4)	L-1	甘肃甘南	2 897
	L-2	甘肃甘南	2 897
	L-3	西藏林芝	2 988
	L-4	西藏林芝	2 988
平均海拔			2 942.5
HA(n=8)	H-1	青海湟源县	4 255
	H-2	青海临泽县	4 255
	H-3	西藏班戈县	4 717
	H-4	西藏班戈县	4 717
	H-5	西藏阿里地区	4 259
	H-6	西藏阿里地区	4 259
	H-7	西藏阿里地区	4 259
	H-8	西藏阿里地区	4 259
平均海拔			4 372.5

2.2 方法

2.2.1 样品处理与 DNA 提取 将待测样本中加入 1 mL 65 ℃预热的 CTAB 提取液,震荡混匀,常规乙醇法提取 DNA,加入 50~100 μL 含 10 mg/mL RNase 的无菌 ddH₂O,溶解 DNA 沉淀,37 ℃水浴锅消化 1 h 后保存在-20 ℃冰箱.

2.2.2 16s rDNA 扩增与扩增产物回收纯化 采用细菌 16s rDNA V3+V4 区域通用引物^[6]:上游 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3',下游 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3',25 μL 体系:模板 50 ng,上下游引物各 2.5 μL, Pusion Hot start flex 2×Master Mix 12.5 μL. 扩增条件:98 ℃预变性 30 s;98 ℃ 10 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,于 4 ℃保存. PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行回收,回收采用 AxyPrep PCR Cleanup Kit 回收.

2.2.3 扩增产物定量混样上机测序及物种分析 对纯化后的 PCR 产物采用 Quant-iTPicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统上对文库进行定量,合格的文库浓度应在 2 nmol/L 以上. 将合格的各上机测序文库(Index 序列不可重复)梯度稀释后,根据所需测序量按相应比例混合,并经 NaOH 变性为单链进行上机测序;使用 MiSeq 测序仪进行 2×300 bp 的双端测序,相应试剂为 MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles). 将获得的序列在 NCBI BLAST 数据库中比对后获得物种信息.

2.2.4 数据分析 基于操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU)的统计结果,计算样品的 alpha 多样性,用来分析物种变化趋势. 根据物种特异基因丰度表和物种注释表,从门、纲、目、科、属、种水平,对相对 OTU 丰度进行聚类分析,用 t 检验对高低海拔组间相对丰度的进行差异分析.

3 结果

3.1 高低不同海拔牦牛肠道菌群结构总体差异 分析测序 12 个样本的 OTU,高低海拔 OTU 共有 5 322 个,其中高海拔 4 237 个,低海拔 4 824 个,高低海拔共有的为 3 739 个,高海拔牦牛特有的肠道菌群为 498 个,低海拔牦牛特有的微生物为 1 085 个,低海拔牦牛肠道菌群比高海拔牦牛肠道菌群种类高出 587 个.

3.2 不同分类水平对高低不同海拔牦牛肠道菌群结构成分分析

3.2.1 门水平肠道菌群结构成分分析 牦牛粪便样本中共有 19 个门的细菌. 从门水平对肠道菌群种 12 个样本的 OTU 丰度进行物种聚类统计分析显示,低海拔牦牛前三的菌群以厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria),为主,其平均丰度分别为 69.38%、15.37%和 7.74%;高海拔牦牛以厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria),其平均丰度分别为 73.21%、14.56%和 4.06%.

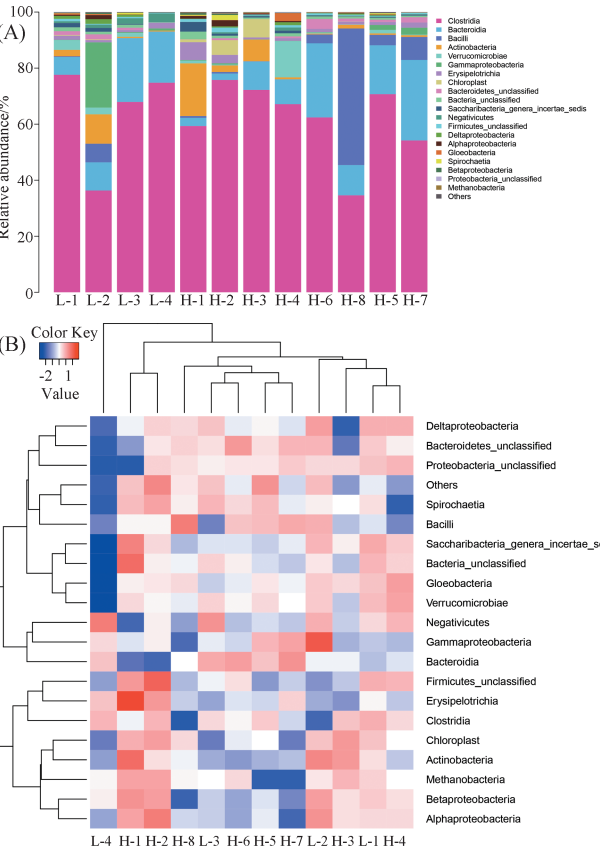


图 1 牦牛肠道菌群在纲水平的分布图(A)及分布热度图(B)

Fig. 1 The community structure map (A) and the community structure heatmap(B) of samples at the class level in intestinal tract of yaks

3.2.2 纲水平肠道菌群结构成分分析 牦牛粪便样本中共有 21 个纲的细菌,如图 1. 从纲水平对 12 个样本的 OUT 丰度进行物种聚类统计分析显示,低海拔牦牛粪便样本中前三菌群为梭菌纲(Clostridia)拟杆菌纲(Bacteroidia)和以及变形菌纲(Gammaproteobacteria),其平均丰度分别为 64.17%、14.36%和 6.12%;高海拔样本中前三菌

群为梭菌纲(Clostridia)、拟杆菌纲(Bacteroidia)和杆菌纲(Bacilli),其平均丰度分别为 13.46%、62.04%和 8.12%.

3.2.3 目水平肠道菌群结构成分分析 牦牛粪便样本中共有 21 个目的细菌,如图 2. 从目水平对不同海拔牦牛肠道菌群种 12 个样本的 OTU 进行物种分类统计分析显示,低海拔牦牛粪便样本中前三菌群分别为梭菌目(Clostridiales)、拟杆菌目(Bacteroidales)和假单胞菌目(Pseudomonadales),其平均丰度分别为 14.36%,平均丰度 64.16%和 5.72%;高海拔前三菌群分别为梭菌目(Clostridiales)拟杆菌目(Bacteroidales)和芽孢杆菌目(Bacillales),其平均丰度分别为 62.02%、13.46%和 8.02%.

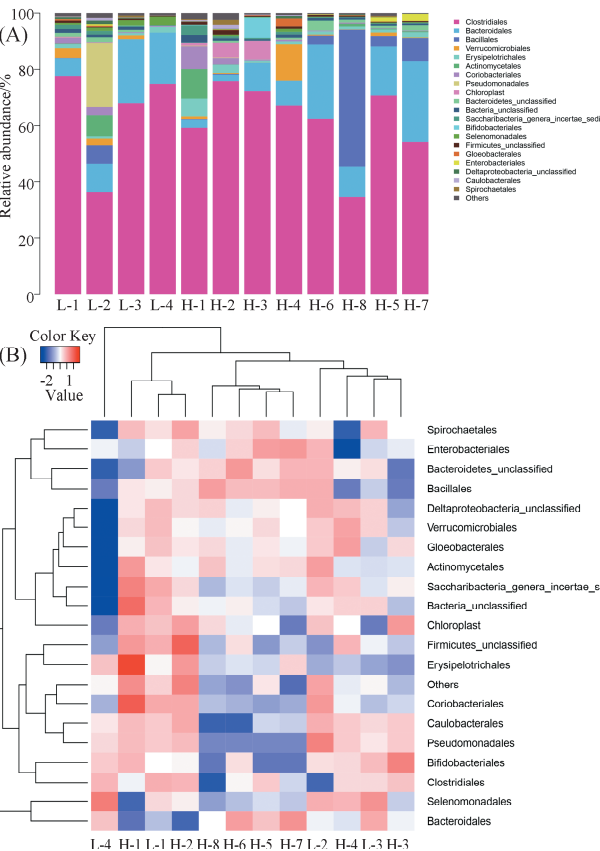


图 2 牦牛肠道菌群在目水平的分布(A)及分布热度图(B)

Fig. 2 The community structure map (A) and the community structure heatmap (B) of samples at the order level in intestinal tract of yaks

3.2.4 科水平肠道菌群结构成分分析 牦牛粪便样本中共有 21 个科的细菌,如图 3. 从科水平对不同海拔牦牛肠道菌群种 12 个样本的 OTU 进行物种聚类统计分析显示,低海拔样本中前三的菌群分别为瘤胃菌科(Ruminococcaceae)、毛螺菌科

(*Lachnospiraceae*)和梭菌科(*Clostridiaceae*),其平均丰度分别为 36.35%, 12.59%和 6.43%;高海拔牦牛粪便样本中前三的菌群分别为瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)和活性性球菌科(*Planococcaceae*),其平均丰度分别为 29.04%、15.14%和 6.64%。

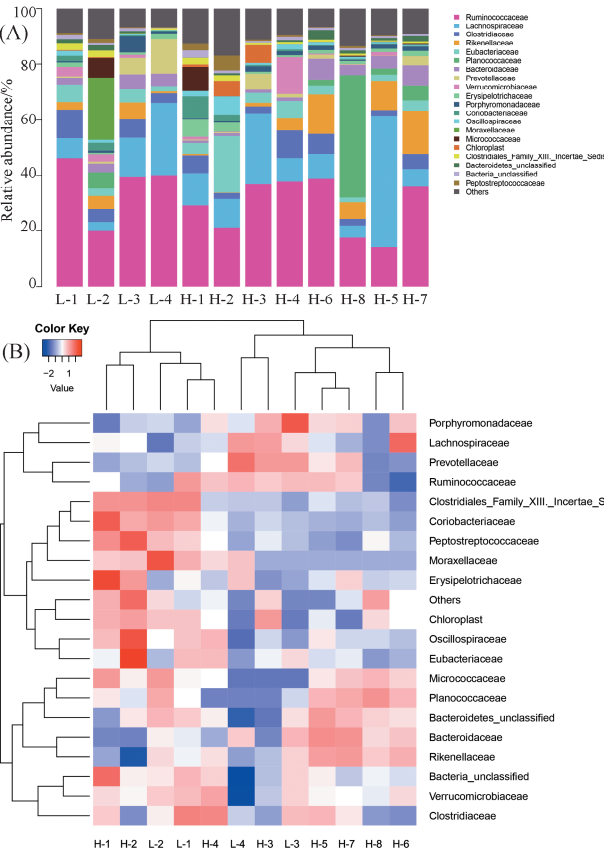


图 3 牦牛肠道菌群在科水平的分布(A)及分布的热度图(B)

Fig. 3 The community structure map (A) and the community structure heatmap(B) of samples at the family level in intestinal tract of yaks

3.2.5 属水平肠道菌群结构成分分析 牦牛粪便样本中共有 21 个属的细菌,如图 4。从属水平进行物种聚类统计分析显示,低海拔牦牛样本中前三的菌群分别为瘤胃菌属(*Ruminococcaceae_unclassified*)、梭菌属(*Clostridium*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*),其平均丰度分别为 24.45%、6.30%和 5.60%;高海拔样本中前三的菌群分别为瘤胃菌属(*Ruminococcaceae_unclassified*)、活性性球菌属(*Planococcaceae_unclassified*)和理研菌属(*Rikenella*),其平均丰度分别为 20.27%、

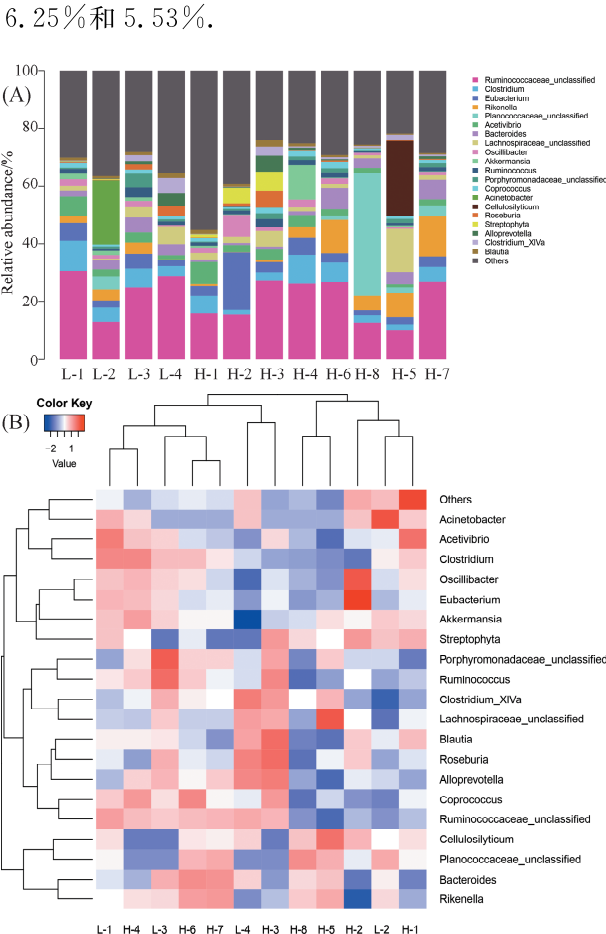


图 4 牦牛肠道菌群在属水平的分布(A)及分布的热度图(B)

Fig. 4 The community structure map (A) and the community structure heatmap (B) of samples at the genus level in intestinal tract of yaks

从属水平对高低海拔牦牛样本的 OTU 丰度分析显示,低海拔牦牛肠道菌群前 30 菌群丰度总量为 83.41%,而高海拔同类菌群丰度总量为 58.29%。低海拔牦牛样本中前三的菌群分别为瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae_UCG-005*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae_UCG-013*)和克里斯滕森氏菌群(*Christensenellaceae_R-7_group*)。高海拔样本中前三的菌群分别为瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae_UCG-005*)、瘤胃解纤维素菌属(*Cellulosilyticum*)和理研菌科胃肠菌群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*),数据显示除瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae_UCG-005*)外,高低海拔牦牛肠道菌群属 OTU 丰度各不相同,具体见表 2。

表 2 高、低海拔牦牛肠道菌群 Top 30 菌群丰度
Tab. 2 Top 30 microflora abundance of intestinal microorganisms in high and low altitude Yaks

Top 30 Genus	LA(<i>n</i> =4)		HA(<i>n</i> =8)	
	平均值%	标准差	平均值%	标准差
<i>Ruminococcaceae</i> _ UCG-005	17.13	2.68	16.79	2.38
<i>Ruminococcaceae</i> _ UCG-013	8.48	1.64	2.97	2.81
<i>Christensenellaceae</i> _ R-7_ group	6.71	0.63	3.68	1.97
<i>uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae</i>	5.74	5.60	3.36	3.40
[<i>Eubacterium</i>]_ <i>oxidoreducens</i> _ group	5.33	0.81	1.58	1.37
<i>Ruminococcaceae</i> _ UCG-014	4.63	1.00	2.50	1.48
[<i>Eubacterium</i>]_ <i>coprostanoligenes</i> _ group	2.91	0.77	2.96	2.04
<i>Bacteroides</i>	2.86	1.81	1.93	1.60
<i>Rikenellaceae</i> _ RC9_ gut_ group	2.77	1.95	5.63	5.45
<i>Akkermansia</i>	2.27	1.16	0.59	0.65
<i>uncultured_bacterium_f_Ruminococcaceae</i>	2.18	0.55	1.65	0.76
<i>Arthrobacter</i>	2.14	3.70	1.39	3.31
<i>uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae</i>	2.05	1.67	1.25	0.72
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.96	0.53	0.49	0.60
<i>Ruminococcaceae</i> _ UCG-010	1.71	1.14	2.04	1.47
<i>Ruminococcaceae</i> _ NK4A214_ group	1.69	0.75	1.41	1.40
<i>uncultured_bacterium_o_Gastranaerophilales</i>	1.62	0.56	0.51	0.78
<i>Alloprevotella</i>	1.56	1.89	1.19	1.91
<i>Ruminococcaceae</i> _ UCG-002	1.30	0.29	0.42	0.61
<i>Family_XIII</i> _ UCG-001	1.29	1.26	0.62	0.82
<i>Olsenella</i>	0.80	0.86	0.60	1.42
<i>Candidatus_Saccharimonas</i>	0.77	0.85	0.78	1.09
<i>Blautia</i>	0.77	0.40	0.28	0.31
<i>Lachnospiraceae</i> _ AC2044_ group	0.75	0.70	0.33	0.56
<i>Lachnospiraceae</i> _ NK4A136_ group	0.73	0.88	0.76	0.79
<i>Prevotella_9</i>	0.71	1.06	0.00	0.00
<i>uncultured_bacterium_o_Mollicutes</i> _ RF39	0.71	0.40	1.23	1.28
<i>Coprococcus_3</i>	0.65	0.32	0.24	0.36
<i>Alistipes</i>	0.61	0.35	1.13	0.98
<i>Prevotella_2</i>	0.60	1.00	0.00	0.00
合计	83.41		58.29	

从属水平对前 30 种菌 OTU 的丰度分析显示,高低海拔牦牛的肠道菌群有 8 个菌属的差异比较显著($P<0.05$),具体为:瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*_ UCG-013,OTU 丰度低海拔 8.48%,高海拔 2.97%)、克里斯滕森氏菌群(*Christensenellaceae*_ R-7_ group,低海拔 6.71%,高海拔 3.68%)、氧化还原菌属([*Eubacterium*]_ *oxidoreducens*_ group,低海拔 5.33%,高海拔 1.58%)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*_ UCG-014,低海拔 4.63%,高海拔 2.50%)、阿克曼菌属(*Akkermansia*,低海拔 2.27%,高海拔 0.59%)、

考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*,低海拔 1.96%,高海拔 0.49%)、难培养菌属(*uncultured_bacterium_o_Gastranaerophilales*,低海拔 1.62%,高海拔 0.51%)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*_ UCG-002,低海拔 1.30%,高海拔 0.42%)。低海拔区域牦牛肠道菌群 OTU 整体丰度较高海拔高,其中瘤胃球菌和氧化还原菌属的 OTU 丰度比高海拔高 2 倍多。

4 讨 论

肠道菌群种类的丰富性和多样性对维持肠道

微生态平衡起着重要作用^[7]。而生活在高、低海拔的牦牛肠道菌群的差异目前尚无报道。牦牛正常的肠道菌群在进化过程中与宿主和环境相互适应且成动态平衡,容易受到食物、环境等因素的影响,加之肠道菌群数量较大,结构复杂,因此其研究存在一定难度。随着高通量测序技术的发展,使得 16s rDNA 测序成为研究肠道菌群的重要工具。本研究采用 16 s RNA 高通量测序首次对高、低海拔两种环境下的牦牛肠道菌群结构组成进行分析,发现低海拔和高海拔地区牦牛肠道菌群 OTU 数量分别为 4 824 个和 4 237 个,说明低海拔地区牦牛肠道菌群多样性较高海拔地区牦牛肠道菌群多样性更高,可能是因为低海拔地区植被更丰富,环境中细菌多样性更高造成的。

在门水平上,高低海拔牦牛肠道菌群中最多的均为厚壁菌门(Firmicutes, OTU 丰度低海拔 69.38%,高海拔 73.21%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, OTU 丰度低海拔 15.37%,高海拔 14.56%),这一研究与 Guo 等人(2015)对牛瘤胃微生物的菌群结构研究结果相似^[8]。

本研究显示高低海拔牦牛肠道菌群存在较大差异,其中瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*_ UCG-013)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*_ UCG-014)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*_ UCG-002)、克里斯滕森菌科(*Christensenellaceae*_ R-7_group)、氧化还原菌属([*Eubacterium*])_ *oxidoreducens*_ group)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、难培养菌属(*uncultured*_ *bacterium*_ o_ *Gastranaerophilales*)等差异显著,低海拔地区牦牛肠道菌群中瘤胃球菌属和氧化还原菌属的 OTU 丰度比高海拔高 2 倍多。瘤胃球菌属是反刍动物胃中严格厌氧不运动的革兰氏阳性菌,主要含白色瘤胃球菌和生黄瘤胃球菌两类,广泛分布于牦牛的瘤胃中^[9],是牦牛肠道中的优势菌群,与牦牛消化功能有着密切的关系。研究证实,瘤胃球菌产生的纤维素酶能够吸附并降解植物细胞壁,有效提高牦牛消化高纤维植物的能力^[10]。本研究发现高海拔地区牦牛的肠道菌群中,瘤胃球菌丰度显著低于低海拔地区牦牛。若高海拔地区的牦牛向低海拔地区迁徙时,由于高海拔地区牦牛肠道内瘤胃球菌等优势菌的丰度较低,高海拔地区牦牛肠道微生态短时间内无法适应低海拔的环境条件,可能导致牦牛对纤维素的消化不良,进而引起牦牛腹泻。这与 Han 等人发现的腹泻的牦牛肠

道菌群中瘤胃球菌明显下降一致^[11]。事实证明,当高海拔地区的牦牛向低海拔地区引进时,牦牛常常会出现腹泻的现象,可能与不同海拔地区牦牛肠道菌群结构组成差异有关,其具体原因及机制还需进一步研究。

我国 2008 年批准了 16 种微生物添加剂,乳酸菌、芽孢杆菌、酵母、双歧杆菌、肠球菌、链球菌等均是名录上微生物添加剂中的菌种,这些益生菌对维护动物肠道健康、缓解不良应激反应、改善畜舍环境、调节机体脂肪代谢、替代抗生素和改善畜产品品质有着重要的作用^[12]。在高海拔地区的牦牛向低海拔地区引进时,在牦牛的日粮中补充益生菌,是否有助于牦牛尽快适应低海拔地区环境需进一步研究。另外,不同海拔地区牦牛的交流,可能有助于提升某一区域牦牛肠道菌群多样性,本研究表明了高、低海拔牦牛肠道菌群结构存在较大的差异,为高海拔地区的牦牛向低海拔迁徙提供了微生态结构的参照,有利于牦牛饲养业、畜牧业探索不同海拔区域间牦牛的物种交流。

参考文献:

- [1] 郭应杰,拉多,罗黎明,等. 放牧对青藏高原草地植被群落影响研究进展 [J]. 西藏科技, 2018 (1): 62.
- [2] 孟庆辉,陈永杏,董红敏,等. 牦牛分布特点及其种群数量 [J]. 家畜生态学报, 2017, 38: 80.
- [3] Ding X Z, Liang C N, Guo X, *et al.* Physiological insight into the high-altitude adaptations in domesticated yaks (*Bos grunniens*) along the Qinghai-Tibetan Plateau altitudinal gradient [J]. *Livest Sci*, 2014, 162: 233.
- [4] 杨昌福,柏雪,高彦华,等. 全放牧与舍饲育肥对牦牛肉品质及安全性的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51: 23.
- [5] 杨勤,官久强,柴志欣,等. 低海拔舍饲对牦牛肌肉品质的影响研究 [J]. 草业学报, 2020, 29: 33.
- [6] Fadrosch D, Ma B, Gajer P, *et al.* An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform [J]. *Microbiome*, 2014, 2: 6.
- [7] Yu X M, Wu X L, Qiu L, *et al.* Analysis of the intestinal microbial community structure of healthy and long-living elderly residents in Gaotian village of Liuyang city [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 9085.
- [8] Guo W, Li Y, Wang L Z, *et al.* Evaluation of com-

position and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology [J]. Anaerobe, 2015, 34: 74.

[9] 高巍. 瘤胃微生物对植物细胞壁降解的相对贡献及其附着与降解的关系研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.

[10] Li H, Yu Q L, Li T T, *et al.* Rumen microbiome and metabolome of tibetan sheep (*Ovis aries*) reflect animal age and nutritional requirement [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 609.

[11] Han Z Q, Li K, Shahzad M, *et al.* Analysis of the intestinal microbial community in healthy and diarrheal perinatal yaks by high-throughput sequencing [J]. Microb Pathog, 2017, 111: 60.

[12] 徐鹏, 董晓芳, 佟建明. 微生物饲料添加剂的主要功能及其研究进展 [J]. 动物营养学报, 2012, 24: 1397.

引用本文格式:

中 文: 王保宁, 陈昱作, 贡嘎, 等. 不同海拔区域内牦牛肠道菌群结构组成多样性研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 056003.

英 文: Wang B N, Chen Y Z, Gong G, *et al.* Study on diversity of structural composition of yaks intestinal flora at different altitudes [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 056003.