

利用 Illumina MiSeq 测序平台分析野生树鼩粪便 微生物多样性

张飞燕¹, 金洁¹, 马玉华¹, 王芸¹, 张庆宇¹, 赵玲¹, 邬继文¹, 吕龙宝^{1,2*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650000; 2. 中国科学院昆明灵长类研究中心, 昆明 650223)

【摘要】 目的 应用高通量测序技术分析野生树鼩粪便菌群的结构与组成, 为进一步开发利用这种新型实验动物奠定基础。方法 在云南昆明野外捕捉3只野外成年雄性树鼩, 采取粪便, 用细菌16S rRNA通用引物扩增V3~V4区, 采用Illumina MiSeq测序平台对树鼩粪便微生物进行研究。结果 共测序获得181 657条有效序列与624个OTU, Shannon 稀释曲线证明此次测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种。树鼩粪便中的细菌共鉴定出9个门、17个纲、31个目、56个科、124个属和172个种。其中, (1) 优势门是厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 分别为68.38%和20.52%; (2) 丰度最高的纲为芽孢杆菌纲(Bacilli)54.81%和拟杆菌纲(Bacteroidia)20.52%; (3) 乳杆菌目(Lactobacillales)和拟杆菌目(Bacteroidales)的丰度最高, 为50.01%和20.52%; (4) 优势菌科为链球菌科(Streptococcaceae)和普雷沃氏菌科(Prevotellaceae), 为40.52%和12.13%; (5) 乳杆菌属(*Lactobacillus*)和链球菌属(*Streptococcus*)的丰度最高, 分别为20.03%和19.62%; (6) 有益菌群如乳酸杆菌属、乳球菌属丰度相对较高, 双歧杆菌属丰度较低, 但在所检测样本中都含有; (7) 16S功能预测发现: 氨基酸转运与代谢、碳水化合物转运与代谢等功能丰度较高。结论 应用高通量测序技术, 第一次较全面的检测了野生树鼩粪便菌群, 野生树鼩粪便细菌组成具有丰富的多样性, 其中还有许多未被分类鉴定且相对丰度较高的细菌, 需要进一步研究。

【关键词】 野生树鼩; 粪便; 高通量测序; 优势菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018)06-0786-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.018

Diversity of fecal microbiota in the wild tree shrew assessed using the Illumina MiSeq sequencing platform

ZHANG Feiyan¹, JIN Jie¹, MA Yuhua¹, WANG Yun¹, ZHANG Qingyu¹, ZHAO Ling¹, WU Jiwen¹, LYU Longbao^{1,2*}

(1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650000, China.

2. Kunming Primate Research Center, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Corresponding author: LYU longbao. E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the structure and composition of the intestinal flora of the wild tree shrew using the Illumina MiSeq sequencing platform. **Methods** The feces of three wild tree shrews were collected and investigated for diversity using the Illumina MiSeq sequencing platform. **Results** In total, 181,657 sequences and 624 OTU were collected after sequencing. According to the Shannon-Wiener curve, the sequencing data were reliable for all bacteria of the samples. The bacteria in the tree shrew feces were from 9 phyla, 17 classes, 31 orders, 56 families, 124 genera, and 172 species. Among them, 1) Firmicutes and Bacteroidetes had the highest abundance, 68.38% and 20.52%, respectively. 2) The dominant classes were Bacilli and Bacteroidia, at 54.81% and 20.52%. 3) The abundance of Lactobacillales and Bacteroidales was higher, at 50.01% and 20.52%. 4) Dominant families were Streptococcaceae and Prevotellaceae, at 40.52% and 12.13%. 5) *Lactobacillus* and *Streptococcus* were dominant (20.03%, 19.62%). 6) Beneficial bacteria, such as *Lactobacillus* and *Lactococcus*, were relatively common, while *Bifidobacterium* was relatively rare. 7) 16S functional prediction showed an abundance of functional genes, such as those involved in amino acid transport and metabolism,

[作者简介] 张飞燕(1993-),女,硕士,研究方向:主要从事动物质量控制与检测。Email: 1175905001@qq.com

[通信作者] 吕龙宝(1974-),男,研究员,研究方向:主要从事实验动物学研究。Email: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

carbohydrate transport, and metabolism. **Conclusions** The composition of tree shrew fecal microbiota shows a rich diversity. Many bacteria that are relatively abundant remain unidentified, so further study is warranted.

【Keywords】 wild tree shrew; feces; Illumina MiSeq; dominant microbiota

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

随着生物医学、药学及生命科学的诸多研究领域发展,灵长类动物模型是跨越基础和临床研究之间所必需的、有时甚至是唯一的桥梁。目前,临床前新药评估因缺乏灵长类动物疾病模型验证而导致失败率极高,因此,发达国家医学界均在致力于解决这一关键问题。树鼩作为新型实验动物,通常被认为是低等的灵长类动物,具有鲜明的特色,值得科研工作者推广^[1]。树鼩自身具有的独特特点,如体型小、繁殖周期短、饲养成本低,具有比高等灵长类动物更适合大规模应用的优势,如各种类型的病毒性肝炎、流感病毒、轮状病毒、细菌、寄生虫感染及糖尿病、肿瘤等人类疾病的动物模型在树鼩身上的成功研究,树鼩将会成为与灵长类动物一样的实验动物^[2],其树鼩实验动物化、资源推广对研究人类疾病及新药研发具有极其重要的价值。这意味着制定出完善的树鼩携带微生物的国家标准迫在眉睫。虽然已有 2012 年云南省发布的树鼩地方标准,但还缺乏对树鼩肠道菌群的系统性研究报道。特别是对野生树鼩肠道微生物的携带情况缺乏系统研究^[3],目前有的研究也是主要采用的是传统的培养技术,以及以克隆/测序为主要手段的分子生物学技术,缺乏有关野生树鼩肠道细菌的高通量测序研究^[4-7]。因此,作为野生树鼩的实验动物化过程中,微生物检测很重要。本试验旨在应用高通量测序技术研究野生树鼩细菌结构与组成,为进一步开发利用这一新型实验动物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

3 只 10~12 月龄的雄性野生树鼩捕捉于云南昆明西郊野外,体重 100~110 g,捕捉后饲养于中国科学院昆明灵长类中心普通级环境【SCXK(滇)K2017-003】,动物实验在中国科学院昆明灵长类研究中心进行【SYXK(滇)K2017-0008】,无菌操作采取粪便,编号 Y1 Y2 Y3,迅速放到液氮罐中,带回实验室 -80℃ 冰箱。

1.1.2 主要试剂和仪器

TransStart Fastpfu DNA Polymerase; AxyPrepDNA

凝胶回收试剂盒 (Axygen 公司); PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型。

1.2 方法

1.2.1 细菌总 DNA 提取

使用 omega ezna 试剂盒,按照说明书步骤抽提细菌基因组。基因组 DNA 抽提完成后,琼脂糖凝胶电泳和核酸检测仪检测总 DNA 质量。

1.2.2 PCR 扩增

针对 16sRNA 的 V3-V4 区 (338F-806R),合成特异性引物。每个样本设置 3 个重复,PCR 扩增,PCR 扩增产物混合后,脂糖凝胶电泳检测产物质量。PCR 产物质量合格后,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen 公司)切胶回收 PCR 产物,琼脂糖电泳检测质量。

1.2.3 荧光定量

利用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司)定量检测 PCR 产物,检测 PCR 产物的均一化。

1.2.4 Miseq 文库构建及测

通过 PCR 链接“Y”字形接头,去除自连片段,PCR 扩增进行文库模板富集,氢氧化钠变性,产生单链 DNA 片段。测序工作在美吉生物完成。

1.3 统计学方法

测序后的数据进行统计优化分析,OTU 聚类分析,计算 Chao 指数、Ace 指数、Sobs 指数和覆盖指数 (Coverage) 等多样性指数。每个样本都做了稀释性曲线和 Shannon 指数曲线。并从各个分类水平上进行物种组成分析及 16 s 功能预测。

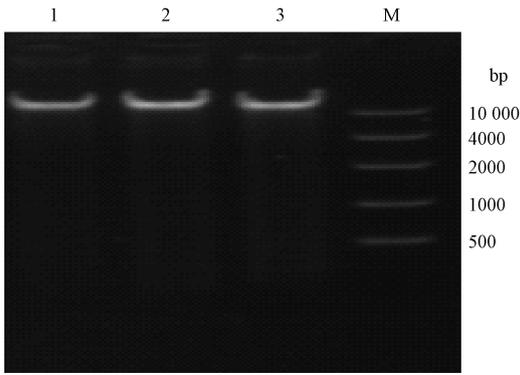
2 结果

2.1 粪便基因组 DNA 提取

粪便 DNA 提取后,经琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 核酸检测仪检测 DNA 的纯度、浓度和完整性。三个样本的浓度 (> 7 μg),OD_{260/280} 的比值在 1.8-2.0 之间,表提取的示 DNA 基因组的浓度和纯度都比较高,无杂质污染;从电泳图看出样本无杂带,完整性较好,均满足后续 PCR 和测序要求(图 1)。

2.2 测序水平

本研究利用 Illumina MiSeq 测序平台对 3 个树



注: M: DL 1 Kb; 1-3: 野生树鼩粪便样品。

图 1 DNA 电泳检测图

Note. M: DL 1 Kb; 1-3: wild tree shrew fecal samples.

Figure 1 Results of DNA electrophoresis

鼩粪便样本的 V3-V4 区进行测序研究, 测序数据经过优化分析, 共得到 181 657 条有效序列, 平均每个样本有 $(60\ 552 \pm 3897)$ 条序列, 其中样本获得序列数最高与最低相差 8370 条; 通过对测序数据按 97% 的相似水平进行聚类分析, 共获得 624 个 OTU, 平均每个样本 (208 ± 21) 个 OTU。样本 OTUs 含量最高与最低相差 52 个。

2.3 α 多样性指数的分析

基于 OUT 聚类分析结果, 对 OUT 进行 Alpha 多样性分析, 树鼩大肠埃希菌的 chao 指数是 229, Shannon 指数是 3.19, simpson 指数为 0.09, 通过 Shannon 稀释曲线分析(图 2), 曲线趋近平缓, 并且覆盖度 Good's coverage 达到 99.97%, 两者共同说明了对所取样本微生物群落的检测比率接近饱和, 目前的测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种。

2.4 聚类分析

基于 Unweighted UniFrac 距离, 对所有样本进行聚类分析(图 3), 结果表明, 根据样本层级聚类分析结果, Y2 样本与 Y3 样本聚到一起, Y1 与 Y2、Y3 分开, 表示 Y1 样品与 Y2、Y3 的组成差异较大。

2.5 物种组成分析

本研究野生组树鼩肠道细菌鉴定出有 9 个门、17 个纲、31 个目、56 个科、124 个属和 172 个种。

2.5.1 在门水平上的菌群组成

在门水平上, 物种组成分析共获得 9 个门, 细菌(Bacteria): 99.07%, 为微生物群落的主要组成部分, 只有极小一部分微生物(0.93%)未被鉴定到。相对丰度大于 1% 的有厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放

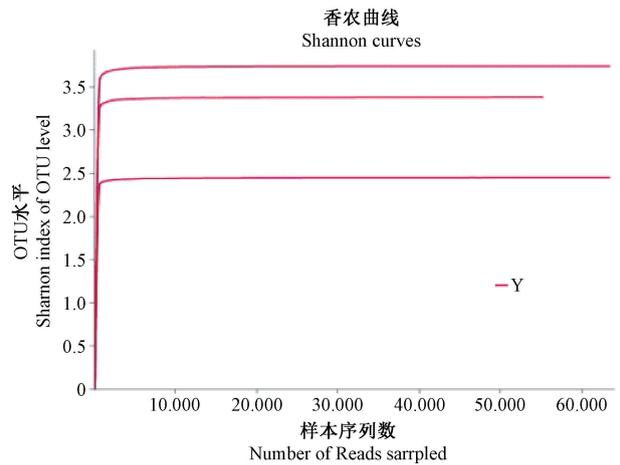


图 2 shannon 指数稀释曲线

Figure 2 Shannon rarefaction curves

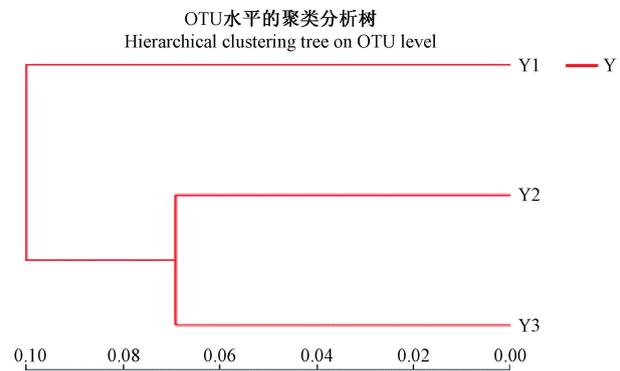


图 3 样本层级聚类分析

Figure 3 Hierarchical clustering tree on OTU level

线菌门(Actinobacteria)、螺旋体门(Spirochaetae), 这 5 个菌门占到总体群落的 99.01%。其余相对丰度小于 1% 的各菌门为梭杆菌门(Fusobacteria)、柔膜菌门(Tenericutes)脱铁杆菌门(Deferribacteres)和 Saccharibacteria 门(图 4)。

2.5.2 在纲水平上的菌群组成

在纲水平上, 共获得 17 个纲。丰度最高的为芽孢杆菌纲(Bacilli)和拟杆菌纲(Bacteroidia), 其次丰度大于 1% 的纲还有梭菌纲(Clostridia)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、厌氧菌纲(Negativicutes)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、丹毒丝菌纲(Erysipelotrichia)、放线菌纲(Actinobacteria)和螺旋体纲(Spirochaetes)(图 5)。

2.5.3 在目水平上的菌群组成

在目水平上, 共获得 31 目, 乳杆菌目(Lactobacillales)和拟杆菌目(Bacteroidales)的丰度最高。其次丰度大于 1% 的有梭菌目

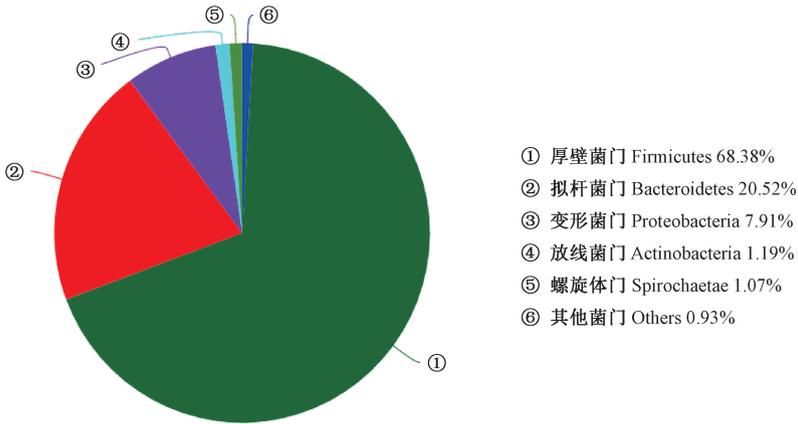


图 4 门水平上的菌群组成

Figure 4 Community analysis pie chart at phylum level

(Clostridiales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、Selenomonadales 目、假单胞菌目(Pseudomonadales)、肠杆菌目(Enterobacteriales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、丹毒丝菌目(Erysipelotrichales)、螺旋体目(Spirochaetales)(图 6)。

2.5.4 在科水平上的菌群组成

在科水平上,共获得 56 个科,链球菌科(Streptococcaceae)和普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)所占的丰度最高,。其次丰度大于 1% 的有拟杆菌科(Bacteroidaceae)、明串珠菌科(Leuconostocaceae)、动球菌科(Planococcaceae)、瘤胃菌科(Ruminococcaceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)、韦荣氏球菌科(Veillonellaceae)、莫拉菌科(Moraxellaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、肠球菌科(Enterococcaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、丹毒丝菌科(Erysipelotrichaceae)和消化链球菌科

(Peptostreptococcaceae)(图 7)。

2.5.5 在属水平上的菌群组成

在属水平上,124 个属中,23 个属(1.7%),尚未被注释出具体菌属名。相对丰度大于 1% 的菌属被定义为优势菌属,共有 15 属。优势菌群乳球菌属(Lactococcus)、链球菌属(Streptococcus)、普雷沃菌属(Prevotella 9)、拟杆菌属(Bacteroides)、魏斯氏菌属(Weissella)、库特氏菌属(Kurthia)、不动杆菌属(Acinetobacter)、巨单胞菌属(Megamonas)、拟普雷沃菌属(Alloprevotella)、Faecalibacterium 属、Blautia 属、丛毛单胞菌属(Comamonas)、肠球菌属(Enterococcus)、Peptoclostridium 属、短小芽孢杆菌属(Lysinibacillus)。通结果分析 分析发现有益细菌乳球菌属(Lactococcus)和双歧杆菌属(Bifidobacterium)的丰度相对较高,而乳酸杆菌属(Lactobacillus)的相对丰度较低 0.04%,这 3 种菌在所检测样本中都含有(图 8)。

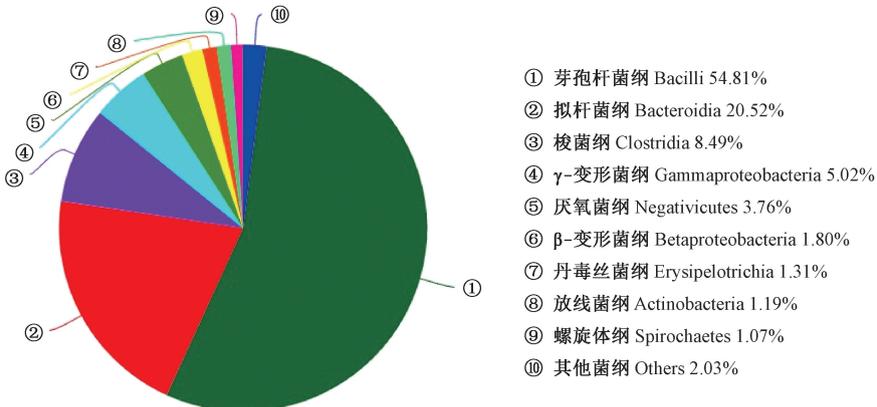


图 5 纲水平上的菌群组成

Figure 5 Community analysis pie chart at class level

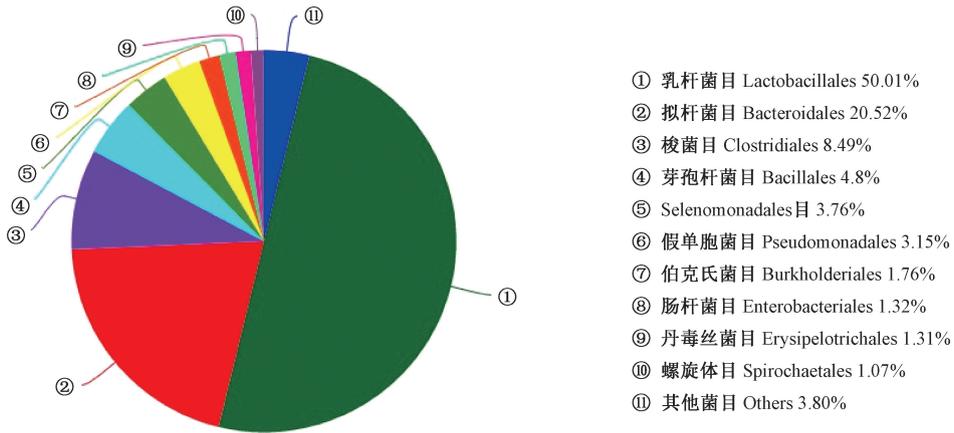


图 6 目水平上的菌群组成

Figure 6 Community analysis pie chart at order level

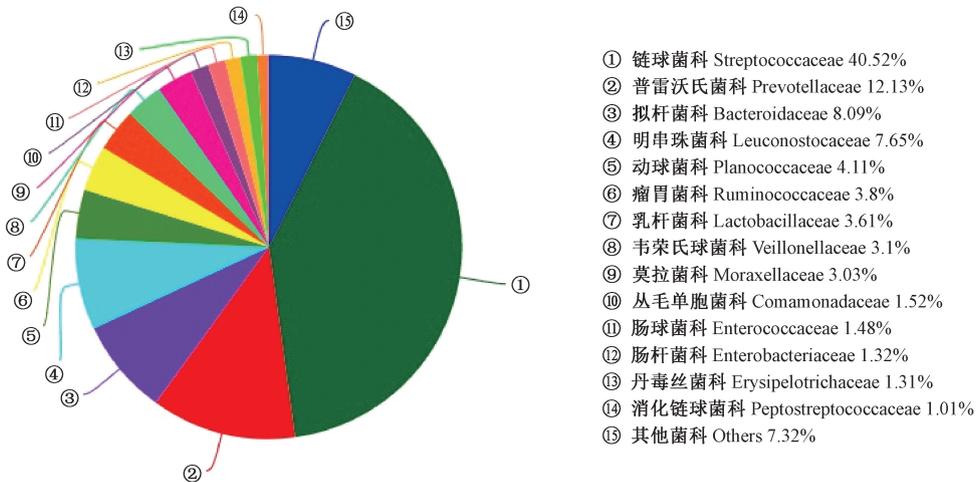


图 7 科水平上的菌群组成

Figure 7 Community analysis pie chart at family level

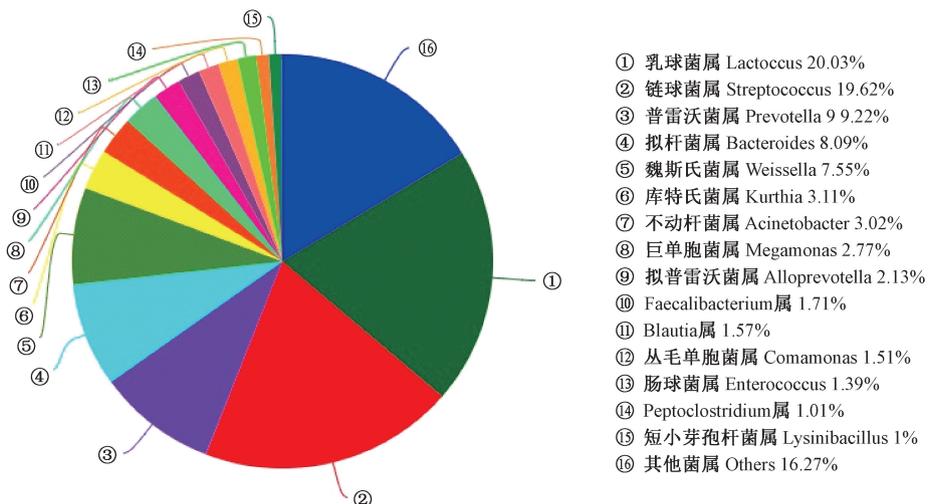


图 8 属水平上的菌群组成

Figure 8 Community analysis pie chart at genus level

2.6 16 s 功能预测分析

通过 COG 功能分类统计,微生物主要的 COG 功能包括:氨基酸转运与代谢、碳水化合物转运与代谢、DNA 重组修复、核苷酸转运与代谢、

能量生产与转换、辅酶转运与代谢、脂质转运与代谢、无机离子转运与代谢核糖体生物合成(图 9),该分析结果表明,树鼯样本中的微生物代谢功能非常丰富。

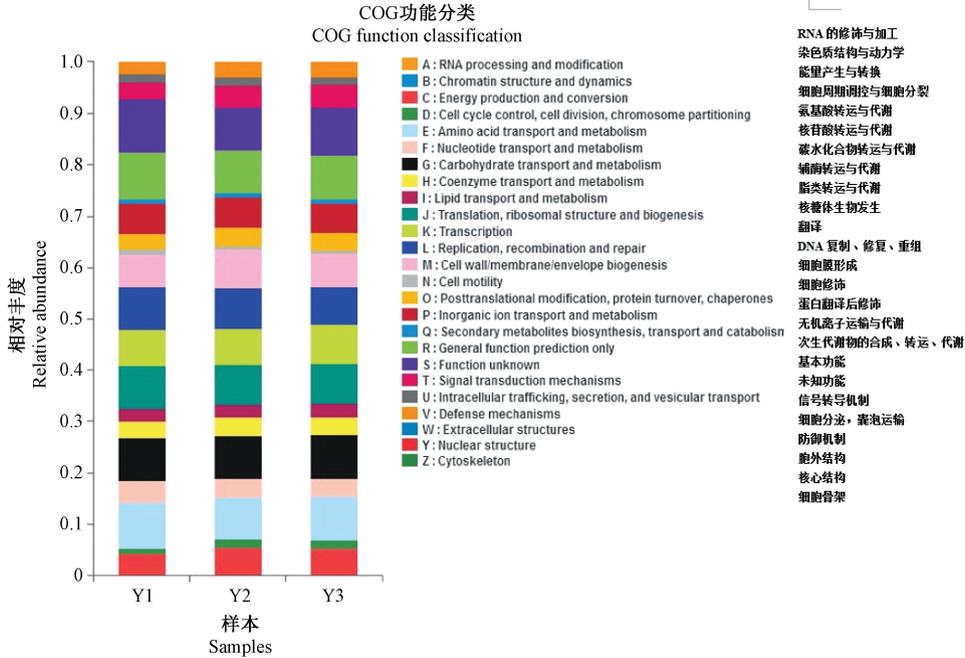


图 9 COG 功能分类

Figure 9 COG functional classification

3 讨论

本试验利用 Illumina MiSeq 测序技术,对 16sRNA 的 V3-V4 进行扩增研究树鼯粪便菌群组成及多样性。与传统分离培养方法相比克服了野生树鼯肠道不可培养细菌的难题,同时高通量测序能全面检测样品,数据量大、测序快速。本试验的 Shannon 稀释曲线分析表明本试验的覆盖度(Good's coverage)达到 99.97%,说明了对所取样本微生物群落的检测比率接近饱和,目前的测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种。邢进等^[8]利用细菌分离培养、分子克隆鉴定技术从野生树鼯粪便中分离得到 16 个科、32 个属、56 种细菌。本试验分离得到 9 个门、17 个纲、31 个目、56 个科、124 个属和 172 个种,较真实全面的反映了树鼯肠道菌群的组成情况。3 只健康野生树鼯微生物的种类和数量不完全相同,推测可能由于 3 只野生树鼯的饮食差异,本身的状况差异等因素造成的。研究表明,肠道微生物的种类和数量与所处环境和饮食有关。但高通量测序技术也存在不足,虽然会得到大量数据,但后续数据处理费时费力^[9];对于小范围测序所用的费用

相对较高^[10]

通过物种组成分析可,发现含量相对较高的是厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门,这三种门占据到 96.01%。邢进等发现厚壁菌门的鸡葡萄球菌和变形菌门的埃希氏菌是野生树鼯的主要寄生菌群,与我们检测到的优势门相似。赵哈旭^[11]等研究表明厚壁菌门为野生动物肠道内的优势菌群,也这与本次研究的结果一致。在目水平优势菌群主要为乳杆菌目(Lactobacillales)和拟杆菌目(Bacteroidales)。在科水平上,共获得 56 个科,链球菌科(Streptococcaceae)和普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)所占的丰度最高。在属水平上,乳酸乳球菌属和链球菌属的丰度最高。在科、属的水平与邢进、刘丽君等^[12]的研究报道有所差异。在属的水平上,发现乳酸乳球菌是一种有益的益生菌,定植在动物胃肠道起防病保护宿主健康的作用。另外益生菌如乳酸杆菌属和双歧杆菌属在树鼯肠道中也发挥着重要的作用。乳酸杆菌和双歧杆菌具有调节肠道微生态平衡,改善营养等功能^[13-15]。本研究这两种益生菌都在树鼯粪便中检测,但丰度不高,都小于 1%。针对双歧杆菌属和乳酸杆菌属(Lactobacillus)的相对丰度

较低,可以深入研究添加双歧杆菌、乳酸杆菌的添加剂饲料,来调节树鼩肠道疾病。

肠道微生物对宿主的生理,能量代谢起重要作用,并影响免疫系统等多种作用^[16-17]。大量研究表明人类疾病与肠道菌群的失调有关,例如炎症肠炎(IBD)、肥胖、糖尿病、心脏病等疾病^[18-20]。由此可见,肠道微生物对人的生理作用具有一定的影响。因此,本研究通过 16sRNA 预测功能分析发现树鼩粪便中的绝大部分细菌与转运代谢功能有关。破坏正常菌群的结构可能会对这些代谢通路产生阻碍。同时也发现还有一大部分功能未知,也是未来的一个研究方向。这可能与树鼩特定的生物学特性有关。其他如辅酶转运与代谢、蛋白修饰等功能,也表明肠道菌群发挥着重要的作用。

参 考 文 献(References)

- [1] 沈培清,郑红,刘汝文,等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究, 2011, 32(1):109-114.
Shen PQ, Zhen H, Liu RW, et al. Progress and prospect in research on laboratory tree shrew in China[J]. Zool Res, 2011, 32(1):109-114.
- [2] 许凌,范宇,蒋学龙,等. 树鼩进化分类地位的分子证据[J]. 动物学研究, 2013, 34(2):70-76.
Xu L, Fan Y, Jiang XL, et al. Molecular evidence on the phylogenetic position of tree shrews[J]. Zool Res, 2013, 34(2):70-76.
- [3] 沈培清,刘美芳,刘汝文,等. 树鼩的应用和标准化产业化研究[J]. 实验动物科学, 2008, 25(1):49-52.
Shen PQ, Liu MF, Liu RW, et al. Application and standardization industrialization of tree shrew[J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(1):49-52.
- [4] 高家红,江勤芳,罗志武,等. 树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12):24-26.
Gao JH, Jiang QF, Luo ZW, et al. Culture, isolation and identification of normal intestinal bacterial flora and their antibiotic susceptibility in tree shrew[J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(12):24-26.
- [5] 刘丽君,余柄廷,胡凝珠,等. 树鼩粪便细菌分离培养与鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2015(10):64-68.
Liu LJ, Yu BT, Hu NZ, et al. Isolation, culture and identification of bacterial strains from tree shrews feces[J]. Chin J Comp Med, 2015(10):64-68.
- [6] 张才军,施明,陈芳,等. 中缅树鼠常见病原菌的分离鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2009(12):899-900.
Zhang CJ, Shi M, Chen F, et al. Isolation and identification of common bacteria in tree shrews[J]. J Pathog Biol, 2009(12):899-900.
- [7] 王映坤,金炜翔,唐永明,等. 健康树鼩肠道致病菌的调查[J]. 实验动物科学, 1988(2):43-49.
Wang YC, Jin WX, Tang YM, et al. The survey of enteric pathogens in healthy tree shrew[J]. Lab Anim Sci, 1988(2):43-49.
- [8] 邢进,冯育芳,付瑞,等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J]. 实验动物科学, 2012, 29(3):34-38.
Xing J, Feng YF, Fu R, et al. The survey of culturable bacteria and fungi in wild tree shrews[J]. Lab Anim Sci, 2012, 29(3):34-38.
- [9] Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data[J]. Bioinformatics, 2015, 31(2):166-169.
- [10] Friedensohn S, Khan TA, Reddy ST. Advanced methodologies in high-throughput sequencing of immune repertoires[J]. Trends Biotechnol, 2017, 35(3):203-214.
- [11] 赵旭晗. 不同野生动物肠道微生物多样性分析及功能初步研究[D]. 吉林农业大学, 2015.
Zhao HX. Diversity and functional analysis of intestinal microflora in different wild animals[D]. Jilin Agricultural University, 2015.
- [12] Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, et al. Worlds within worlds; evolution of the vertebrate gut microbiota[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(10):776-788.
- [13] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR[J]. J Appl Microbiol, 2010, 97(6):1166-1177.
- [14] Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. [J]. Appl Environ Microb, 2013, 79(17):5112-5120.
- [15] Martin R, Nauta AJ, Ben AK, et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy[J]. Benef Microbes, 2010, 1(4):367-382.
- [16] Torok VA, Allison GE, Percy NJ, et al. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10):3380-3390.
- [17] Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan TA, et al. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e91941.
- [18] Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan T, et al. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons; effects of extraction procedure, primer length and annealing temperature[J]. PLoS One, 2012, 7(5):e38094.
- [19] Fu J, Liu H, Xing H, et al. Comparative analysis of glucuronidation of ethanol in tree shrews, rats and humans[J]. Xenobiotica, 2014, 44(12):1067-1073.
- [20] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. Nature, 2011, 472(7341):57-63.