

大黄鱼中期染色体面积和物理长度的测定

陈紫莹, 王志勇, 刘贤德, 姜永华, 蔡明夷*

(集美大学水产学院,农业部东海海水健康养殖重点实验室,福建 厦门 361021)

摘要:为获知大黄鱼染色体的物理长度,实验采用流式细胞术测定了大黄鱼基因组大小,并利用显微图像分析技术测定了大黄鱼 24 对染色体的面积和累积光密度(IOD),据此估算了大黄鱼染色体的物理长度。结果显示,大黄鱼基因组大小约为(725.25 ± 14.65) Mb;染色体相对面积最小为 2.26% ± 0.08%,最大为 4.83% ± 0.08%;染色体相对 IOD 最小为 1.80% ± 0.32%,最大为 5.04% ± 0.15%;物理长度最小的是 24 号染色体,为(13.1 ± 3.37) Mb,其他染色体的物理长度为(24.4 ± 6.21) ~ (36.6 ± 1.62) Mb。染色体的物理长度与相对面积、相对长度分别成正线性相关。其中,物理长度-相对面积的相关系数大于物理长度-相对长度。显微图像还显示,同一基因组中的染色体碘化丙啶(PI)着色不完全均一,非同源染色体间、部分同源染色体间以及染色体不同位置均存在荧光强度的差异。研究结果为大黄鱼染色体识别与配对提供了新的数量标记,也为深入解析大黄鱼基因组结构提供基础数据。

关键词: 大黄鱼; 染色体; 基因组大小; 染色体的物理长度; 图像分析

中图分类号: Q 343.2; S 965.322

文献标志码: A

染色体的形态结构是遗传学研究的重要内容之一。染色体分析的起源和发展离不开其他科学领域的技术进步。近年来,染色体分析的技术变革主要是由分子生物学和信息学领域的技术发展推动。其中,图像分析软件的出现与发展丰富了染色体的测量内容,提高了测量水平,为细胞遗传学研究提供更丰富、更准确的基础数据,拓展了该领域研究的深度和广度^[1-2]。目前,图像分析技术已在人类、畜禽和植物的细胞遗传学研究中广泛应用^[3-5],在水产生物中也开始有少量尝试^[6-7]。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属于鲈形目(Perciformes),石首鱼科(Scieanidae),黄鱼属(*Larimichthys*),是我国近海特有鱼种,也是我国重要的海水养殖鱼类。为了支持大黄鱼养殖产业的可持续发展,我国研究人员分别以厦门火烧屿养殖大黄鱼^[8]、连江养殖大黄鱼^[9]、官井洋野生大黄鱼^[10]和舟山野生大黄鱼^[11]子 1 代为材料,得到了 4 种不同的核型公式:2n = 48t、2n = 2st +

46t、2n = 6st + 42t 和 2n = 6m + 6sm + 36t。这些报道初步揭示了大黄鱼染色体组的基本特征,为染色体操作育种提供了基础数据。然而,这些研究多采用人工测量和比对,测量参数范围和结果的准确性均存在较大局限性,已很难满足结构基因组学和功能基因组学研究快速发展的需要。因此,本研究利用荧光染色和软件辅助分析大黄鱼染色体,测量了染色体的面积和累积光密度(integrated optical density, IOD),并基于 IOD 估测了染色体的物理长度,拓展染色体测量的参数并提高测量的准确性,以期为染色体识别与配对提供新的标记,并为正在进行的大黄鱼基因组组装工作提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 总 DNA 含量测定

大黄鱼总 DNA 含量的测定参考蔡明夷等^[12]的方法,并作少许修改,具体为取 30 尾大黄鱼苗(体长约 1 cm),剪下尾柄,放入 1 mL DAPI 染色

收稿日期:2013-12-01 修回日期:2014-03-16

资助项目:国家自然科学基金(31272653);国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A403);福建省自然科学基金(2013J01135,2011J01228)

通信作者:蔡明夷,E-mail:myicai@jmu.edu.cn

液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 5 mg/L DAPI, 146 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.005% 小牛血清); 轻轻震荡让细胞游离到染色液中, 过筛网, 染色操作全程共 3 min。然后, 用流式细胞仪(PAS-II, Partec, German)检测荧光强度平均值。基因组大小参照品采用鸡(*Gallus gallus*)红细胞, 其单倍体基因组大小为 1 046.93 Mb^[13-14], 约合 1.07 pg^[15]。鸡血细胞的制备参考童金苟等^[16]描述的方法。参照品用外定标法, 与大黄鱼样品间隔测量。取 1 μL 鸡血红细胞样品加入 1 mL DAPI 染色液, 其他程序同大黄鱼细胞荧光强度测量。计算大黄鱼与鸡血红细胞荧光强度比值, 根据比值计算大黄鱼总 DNA 含量(=1.07 pg × 比值)和基因组大小(=1 046.93 Mb × 比值)。

1.2 染色体物理长度测定

染色体制备 用于制备染色体的大黄鱼取自宁德市横屿岛水产有限公司, 共 10 尾, 雌性 5 尾, 雄性 5 尾, 平均体质量约 500 g。大黄鱼的头肾细胞有丝分裂染色体标本的制备方法参考王德祥等^[17]的方法。染色体制片滴加 20 μL 含 1 μg/mL 碘化丙啶(PI, Roche)的抗褪色剂, 用指甲油封片。使用 Olympus BX53 荧光显微镜完成显微观察与拍照。通过绿光荧光滤片组(GW)观察 PI 荧光, 利用显微镜相连的 DP73 电荷耦合器件图像传感器(CCD)拍摄图像, 使用 cellSens 软件控制摄像机并采集数字图像。

核型排列与图像分析 选取 5 个染色体完整、分散良好的中期相数码图像, 应用 Image-pro plus 6.0(IPP 6.0)软件的自动排列工具初步排列染色体, 再利用 Photoshop CS 5.0 软件调整染色体完成配对与排列。配对根据形态、大小和荧光强度目测, 染色体核型图按染色体相对长度降序排列。利用 Image-pro plus 6.0 软件自动测量功能测量每条染色体的面积和 IOD, 再用软件的手工测量功能沿染色体中轴测量染色体的相对长度。染色体的臂比用 CHIAS IV 系统^[18]测量。

数据分析 染色体相对长度按“染色体绝对长度/单倍体染色体组总长度 × 100%”计算。染色体相对 IOD 按“染色体绝对 IOD/单倍体染色体组 IOD × 100%”计算。根据相对 IOD 计算每条染色体的估测物理长度(大黄鱼基因组大小 × 相对 IOD)。用 Origin 8.0 分别作物理长度 - 相对

长度、物理长度 - 相对面积的线性拟合。

2 结果

2.1 基因组大小

30 尾大黄鱼的细胞悬液经 DAPI 染色后, 用倍性分析仪测定。结果显示, 大黄鱼细胞的荧光强度与作为参考的鸡血细胞荧光强度相比, 比值的平均值为 0.693 ± 0.014 。据此估算, 大黄鱼基因组大小约为 (725.25 ± 14.65) Mb, DNA 含量约为 (0.74 ± 0.01) pg。

2.2 染色体估测物理长度

5 个大黄鱼中期相染色体根据形态、大小和荧光强度目测配对, 然后按染色体相对长度降序排列(图 1)。基于 IPP 6.0 测定数据, 计算各对染色体相对长度、臂比、相对面积和相对 IOD(表 1)。结果显示, 除 24 号染色体外, 大黄鱼染色体相对长度、相对面积和相对 IOD 的分布均比较连续。

根据大黄鱼基因组大小 $[(725.25 \pm 14.65)$ Mb] 及各对染色体相对 IOD, 估测每条染色体的物理长度, 结果显示, 1 号染色体物理长度最大 $[(36.6 \pm 1.62)$ Mb], 24 号染色体物理长度最小 $[(13.1 \pm 3.37)$ Mb]。除 24 号染色体外, 其他染色体的物理长度为 $(24.4 \pm 6.21) \sim (36.6 \pm 1.62)$ Mb 之间较均匀分布, 35 ~ 37 Mb 有 5 对, 30 ~ 35 Mb 有 8 对, 24 ~ 30 Mb 有 9 对。

此外, 3D 光强度图(图 1-c)可以直观显示染色体荧光强度的二维分布。大黄鱼染色体 PI 着色不完全均匀, 主要表现在 3 个方面: (1) 非同源染色体间存在荧光强度差异, 如 1 号染色体平均荧光强度比 24 号染色体高; (2) 部分同源染色体间存在荧光强度差异, 如 21 号和 24 号染色体同源染色体间荧光强度存在明显差异; (3) 染色体不同位置存在荧光强度差异, 具体表现为中间高周边低、着丝粒高端部低。

2.3 染色体估测物理长度与相对长度、相对面积的关系

染色体估测物理长度与相对长度之间、染色体估测物理长度 - 相对面积之间均存在正线性相关, 但两对数据之间的相关系数均小于 1, 存在离散点。例如, 7 号染色体在染色体组中, 按降序相对长度排在第 7 位, 相对面积排在第 8 位, 而物理长度排在第 3 位(图 2)。

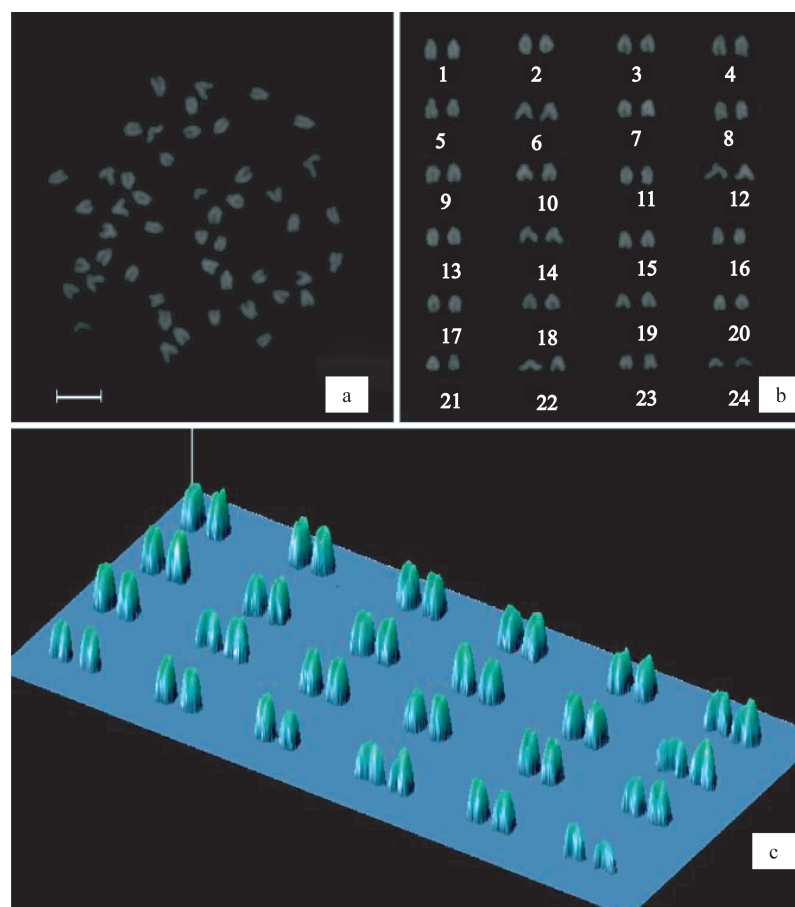


图1 大黄鱼染色体中期相、核型图和染色体的3D光强度图

(a)中期相;(b)染色体核型;(c)3D光强度图。标尺=5 μm

Fig. 1 Metaphase, karyotype and 3D optical density histogram of chromosomes in *L. crocea*

(a) metaphase; (b) karyotype; (c) 3D optical density histogram. Scale bar = 5 μm

表1 大黄鱼染色体相对长度、相对面积、相对 IOD 和估测物理长度

Tab. 1 Relative length, relative area, relative IOD and estimated physical length of chromosomes in *L. crocea*

编号 no.	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	相对面积/% relative area	相对 IOD/% relative IOD	物理长度/Mb physical length
1	4.82 \pm 0.14	∞	4.83 \pm 0.08	5.04 \pm 0.15	36.6 \pm 1.62
2	4.71 \pm 0.20	∞	4.49 \pm 0.22	4.90 \pm 0.21	35.5 \pm 2.18
3	4.68 \pm 0.32	∞	4.67 \pm 0.09	4.66 \pm 0.04	33.8 \pm 0.44
4	4.59 \pm 0.17	∞	5.02 \pm 0.10	4.87 \pm 0.21	35.3 \pm 2.24
5	4.52 \pm 0.30	∞	4.33 \pm 0.36	4.29 \pm 0.29	31.1 \pm 3.06
6	4.39 \pm 0.20	3.32 \pm 0.66	4.76 \pm 0.38	4.54 \pm 0.43	32.9 \pm 4.51
7	4.38 \pm 0.30	∞	4.46 \pm 0.18	4.89 \pm 0.16	35.4 \pm 1.67
8	4.35 \pm 0.30	∞	4.26 \pm 0.08	4.27 \pm 0.16	31.0 \pm 1.70
9	4.32 \pm 0.20	∞	4.76 \pm 0.04	4.85 \pm 0.11	35.2 \pm 1.16
10	4.32 \pm 0.21	2.50 \pm 0.10	4.71 \pm 0.22	4.88 \pm 0.03	35.4 \pm 0.28
11	4.30 \pm 0.19	∞	4.16 \pm 0.10	4.37 \pm 0.10	31.7 \pm 1.42
12	4.29 \pm 0.19	∞	4.38 \pm 0.11	4.15 \pm 0.63	30.1 \pm 6.60
13	4.21 \pm 0.14	∞	4.35 \pm 0.08	4.72 \pm 0.09	34.3 \pm 0.97
14	4.19 \pm 0.40	∞	4.40 \pm 0.09	4.10 \pm 0.09	29.8 \pm 0.95

续表 1

编号 no.	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	相对面积/% relative area	相对 IOD/% relative IOD	物理长度/Mb physical length
15	4.19 ± 0.16	∞	4.28 ± 0.09	4.44 ± 0.11	32.2 ± 1.20
16	4.06 ± 0.26	∞	3.72 ± 0.10	3.74 ± 0.08	27.1 ± 0.82
17	4.06 ± 0.22	∞	4.08 ± 0.06	4.09 ± 0.19	29.7 ± 1.98
18	4.00 ± 0.19	∞	4.08 ± 0.26	3.71 ± 0.44	26.9 ± 4.64
19	3.98 ± 0.27	∞	3.63 ± 0.32	3.51 ± 0.40	25.4 ± 4.21
20	3.83 ± 0.24	∞	3.62 ± 0.10	3.69 ± 0.01	26.8 ± 0.12
21	3.80 ± 0.38	∞	3.35 ± 0.23	3.36 ± 0.59	24.4 ± 6.21
22	3.64 ± 0.17	∞	3.80 ± 0.11	3.65 ± 0.22	26.5 ± 2.29
23	3.51 ± 0.13	3.11 ± 0.35	3.58 ± 0.09	3.48 ± 0.01	25.2 ± 0.03
24	2.86 ± 0.17	∞	2.26 ± 0.08	1.80 ± 0.32	13.1 ± 3.37

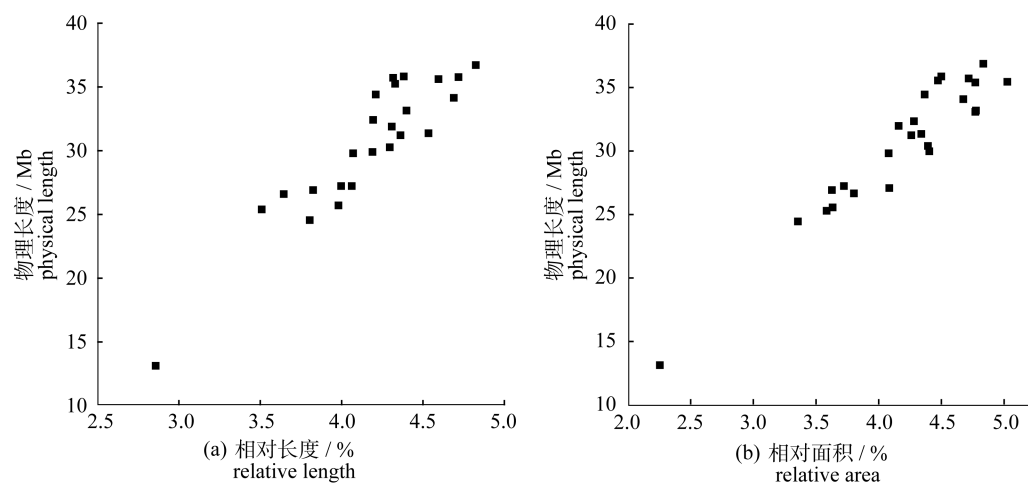


图 2 染色体估测物理长度 - 相对长度散点图 (a) 和染色体估测物理长度 - 相对面积散点图 (b)

Fig. 2 Scatter figure of the estimated physical length and relative length of chromosomes (a), and that of the estimated physical length and relative area of chromosomes (b)

染色体估测物理长度与相对长度的回归方程为 $y = -16.7 + 11.3x$ ($R^2 = 0.838$; $P < 0.001$); 染色体估测物理长度与相对面积的回归方程为 $y = -4.56 + 8.34x$ ($R^2 = 0.909$; $P < 0.001$)。估测物理长度 - 相对面积的相关系数高于估测物理长度 - 相对长度的相关系数。

3 讨论

现有的大黄鱼染色体核型研究报道仅涉及手工测量染色体相对长度和臂比两个常规参数^[8-11]。然而,和其他鱼类染色体一样,大黄鱼染色体存在规格小、形态相似和长度分布连续的特点,仅凭相对长度和臂比两个参数很难鉴别和配对。近年来,随着荧光原位杂交技术(FISH)和图像分析技术在染色体分析领域的应用与发展,

准确识别小型、长度连续染色体已经成为可能^[5,19]。本研究结合使用 Image-pro plus 6.0、Photoshop CS5 和基于 Image J 的 CHIAS IV 系统等图像分析软件工具分析了大黄鱼核型。除了常规的染色体相对长度、臂比外,本实验还测量染色体的相对面积和相对 IOD,使用于染色体核型分析的形态特征参数从二维增加至四维,提高了染色体识别和配对的准确性,也为开发染色体自动识别系统奠定了基础。

本研究采用流式细胞术,以鸡血细胞为参照,测定大黄鱼基因组约为 (725.25 ± 14.65) Mb, DNA 含量约为 (0.74 ± 0.01) pg。本实验还进一步利用图像分析技术首次估测了大黄鱼各对染色体的物理长度,为了解大黄鱼基因组特征、推进大黄鱼全基因组序列分析与组装工作提供了基础数

据。利用图像分析估计染色体大小的方法也见于人、鸡和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 等生物的染色体研究中^[20-22]。

研究结果还显示,大黄鱼染色体 PI 着色不完全均匀,主要表现在 3 个方面:非同源染色体间、部分同源染色体间、以及染色体不同位置存在荧光强度差异(图 1-c)。PI 是 DNA 定量分析中最常用的荧光染料,对 DNA 染色几乎没有区域选择性,可以使染色体比较均一地染色^[23]。造成大黄鱼染色体 PI 着色不均匀可能原因包括:(1)在有丝分裂过程中,非同源染色体间的浓缩程度存在差异是导致非同源染色体间平均荧光强度不等的主要原因;(2)染色体浓缩程度存在区域差异可能是导致染色体着丝粒部位荧光强度高、端部低的主要原因;(3)染色体圆杆状形态导致荧光强度呈中轴高周边低;(4)着色不完全均匀可能是导致部分同源染色体间 IOD 存在较大差异(图 1 中 12 号染色体)的原因。非同源染色体间平均荧光强度不等的现象提示,平均荧光强度或 IOD 可以作为染色体识别及配对的辅助标记,但与臂长和臂比这两个常规参数一样也要考虑到偶然误差的存在。

此外,大黄鱼染色体的估测物理长度与相对长度、相对面积均有线性相关。物理长度-相对面积的相关系数要高于物理长度-相对长度的相关系数。这表明同一基因组中的非同源染色体纵轴方向的浓缩程度并不均一;染色体的宽度或面积可以作为染色体识别的辅助标记。

大黄鱼是我国重要的海水养殖鱼类,其基因组和功能基因研究正快速发展,细胞遗传学领域的研究需要同步发展。本研究首次应用图像分析技术测定了大黄鱼染色体的面积和 IOD,并估测了染色体的物理长度,为大黄鱼染色体识别与配对提供了新的标记,也为大黄鱼全基因组序列的组装工作提供数据支持。

参考文献:

- [1] Krinski D, Fernandes A, Rocha M P. Cytogenetic analysis: A new era of procedures and precision[M] // Tirunilai P, eds. Recent trends in cytogenetic studies-methodologies and applications. Rijeka: InTech, 2012: 107-124.
- [2] Popescu M, Gader P, Keller J, et al. Automatic karyotyping of metaphase cells with overlapping chromosomes [J]. Computers in Biology and Medicine, 1999, 29(1): 61-82.
- [3] Speicher M R, Gwyn Ballard S, Ward D C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH[J]. Nature Genetics, 1996, 12(4): 368-375.
- [4] Fukui K. Recent development of image analysis methods in plant chromosome research [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2005, 109(1-3): 83-89.
- [5] Habermann F A, Cremer M, Walter J, et al. Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells [J]. Chromosome Research, 2001, 9(7): 569-584.
- [6] Zhang Q, Tiersch T R. Identification and analysis of weak linear banding patterns of fish chromosomes with a computer-based densitometric method [J]. Biotechniques, 1998, 24(6): 996-997.
- [7] Gallardo-Escárate C, Álvarez-Borrego J, Bueno M A, et al. Analysis of chromosomal DNA contents in Pacific red abalone *Haliotis rufescens* (Archaeogastropoda: Haliotidae) by fluorescence image analysis [J]. Journal of Shellfish Research, 2005, 24(4): 1161-1168.
- [8] Quan C G, Wang J, Ding S X, et al. The karyotypes of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2000, 39(1): 107-110. [全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼染色体核型研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39(1): 107-110.]
- [9] Wu J S, Lin Q, Zeng Z N. The chromosome study of *Pseudosciaena crocea* [J]. Journal of Fujian Fisheries, 2001, 12(4): 60-63. [吴建绍, 林琪, 曾志南. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的染色体研究. 福建水产, 2001, 12(4): 60-63.]
- [10] Zou S M, Li S F, Zhao J L, et al. Karyotype of *Pseudosciaena crocea* in Guanjiangyang of Fujian [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(2): 179-181. [邹曙明, 李思发, 赵金良, 等. 福建官井洋海区大黄鱼的染色体核型分析. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 179-181.]
- [11] Wang E X, Su Y Q, Wang S F, et al. The karyotypes and their polymorphisms of the *Pseudosciaena crocea* from different populations [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(6): 176-178. [王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 不同地理种群大黄鱼染色体核型的比较研究. 海洋学报, 2006, 28(6): 176-178.]

- [12] Cai M Y, Liu X D, Wu X W, *et al.* Induction and microsatellite analysis of allotriploid between *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34 (11): 1629 - 1635. [蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析. *水产学报*, 2010, 34 (11): 1629 - 1635.]
- [13] *Gallus gallus* [DB/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/111>. 2014 - 03 - 15.
- [14] Wong G K, Liu B, Wang J, *et al.* A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms [J]. *Nature*, 2004, 432 (9): 717 - 722.
- [15] Dolezel J, Bartoš J, Voglmayr H, *et al.* Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. *Cytometry*, 2003, 51 (2): 127 - 128.
- [16] Tong J G, Yu X M, Zhang J, *et al.* Comparison of genome size of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) with other model fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27 (2): 208 - 210. [童金苟, 俞小牧, 张菁, 等. 稀有鮡鲫与其他模式实验鱼类基因组大小的比较. *水生生物学报*, 2003, 27 (2): 208 - 210.]
- [17] Wang D X, Wang J, Guo F, *et al.* Study on the karyotype in *Nibea miichtheoides* [J]. *Marine Sciences*, 2002, 26 (11): 68 - 70. [王德祥, 王军, 郭丰, 等. 鲩状黄姑鱼染色体核型的研究. *海洋科学*, 2002, 26 (11): 68 - 70.]
- [18] Kato S, Ohmido N, Fukui K. CHIAS IV system [CP]. <http://www2.koku-u.ac.jp/~ohmido/index03.htm>. 2013 - 11 - 15.
- [19] Kato A, Lamb J C, Birchler J A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (37): 13554 - 13559.
- [20] Smith J, Burt D W. Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*) [J]. *Animal Genetics*, 1998, 29 (4): 290 - 294.
- [21] Mayall B H, Carrano A V, Moore D H, *et al.* The DNA-based human karyotype [J]. *Cytometry*, 1984, 5 (4): 376 - 385.
- [22] Fujiwara A, Fujiwara M, Nishida-Umehara C, *et al.* Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers [J]. *Genetica*, 2007, 131 (3): 267 - 274.
- [23] Krishan A. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining [J]. *Journal of Cell Biology*, 1975, 66 (1): 188 - 193.

Area and physical length of metaphase chromosomes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

CHEN Ziyang, WANG Zhiyong, LIU Xiande, JIANG Yonghua, CAI Mingyi*

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The sizes of genome and chromosomes were respectively estimated with flow cytometry and image analysis in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Genome size of large yellow croaker was estimated at 725.25 ± 14.65 Mb. The relative area of chromosome ranged from $2.26\% \pm 0.08\%$ to $4.83\% \pm 0.08\%$; the relative integrated optical density (IOD) ranged from $1.80\% \pm 0.32\%$ to $5.04\% \pm 0.15\%$. Based on the relative IOD, the shortest physical length was estimated at 13.1 ± 3.37 Mb for the 24th chromosome, while the physical length of the other chromosomes ranged from 24.4 ± 6.21 Mb to 36.6 ± 1.62 Mb. Linear correlation between the physical length and the relative area was observed, as well as linear correlation between the physical length and the relative length. The correlation coefficient for the physical length and the relative area was higher than that for the physical length and the relative length. The image of metaphase chromosome also showed that the optical density of chromosomes was not completely uniform with propidium iodide (PI) staining. The variation existed among non-homologous chromosomes, between sister chromatids, and among different regions of a chromosome. Above all, new parameters of chromosomes present in this paper will facilitate chromosome identification and pairing, as well as studies on genomics, in large yellow croaker.

Key words: *Larimichthys crocea*; chromosome; genome size; physical length of chromosome; image analysis

Corresponding author: CAI Mingyi. E-mail: myicai@jmu.edu.cn