

柯萨奇病毒 B 组 2 型 SYBR Green I RT-PCR 检测方法的建立^{*}

杨亚平, 段素琴, 杨凤梅, 李艳艳, 刘权, 刘雨, 赵远, 马绍辉, 和占龙^{**}
(中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

[摘要] 目的: 建立一种简单快速、灵敏、特异检测柯萨奇病毒 B 组 2 型(CVB2)的 SYBR Green I 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法。方法: 根据 CVB2 病毒衣壳蛋白 1(VP1)的基因保守序列设计带有 T7 启动子的特异性引物, 构建 CVB2-T 载体的重组质粒, 以体外转录获得的 RNA 为标准品, 绘制标准曲线; 建立检测 CVB2 的 SYBR Green I RT-PCR 方法, 对该方法特异性、灵敏性及重复性进行评价。结果: 该方法在 $10^2 \sim 10^9$ 拷贝/ μL 范围内具有良好的线性关系, 最低检测限度为 10^2 拷贝/ μL , 标准曲线中 R^2 为 0.996, 扩增效率为 102.2%; 且该方法对肠道病毒 71 型(EVA71)、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CVA16)、柯萨奇病毒 A 组 10 型(CVA10)和柯萨奇病毒 A 组 6 型(CVA6)均无交叉反应; 组间和组内重复性实验中变异系数(CV)均小于 1%。结论: 本研究建立的检测 CVB2 的 SYBR Green I RT-PCR 方法具有良好的灵敏性、特异性和重复性, 可用于 CVB2 病毒的快速检测和定量分析。

[关键词] 手足口病; 逆转录聚合酶链反应; 柯萨奇病毒感染; 染料稀释技术

[中图分类号] R373.2⁺ [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2020)03-0315-06
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.03.013

Development of a SYBR Green I RT-PCR Method to Detect Coxsackievirus B2

YANG Yaping, DUAN Suqin, YANG Fengmei, LI Yanyan, LIU Quan, LIU Yu, ZHAO Yuan, MA Shaohui, HE Zhanlong
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple, fast, sensitive and specific one-step SYBR Green I reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for rapid and accurate detection of Coxsackievirus B2 (CVB2). **Methods:** Specific primers with T7 promoter were designed in accordance with the conserved sequence of CVB2 capsid protein 1 (VP1) gene, and the recombinant plasmid of CVB2-T vector was constructed. The ribonucleic acid (RNA) obtained from in vitro transcription was used as the standard to draw a standard curve, and SYBR Green I RT-PCR method was established to detect CVB2. The sensitivity, specificity and repeatability of this method were evaluated. **Results:** The established method showed a good amplification curve in the range of $10^2 \sim 10^9$ copies/ μL template. The lowest detection limit was about 10^2 copies/ μL , the R^2 coefficient in the standard curve was 0.996, and the amplification efficiency was 102.2%. No cross-reaction was found with enterovirus A71 (EVA71), coxsackievirus A16 (CVA16), coxsackievirus A10 (CVA10) and

^{*}[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016 - I2M - 2 - 001, 2018 - I2M - 3 - 002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(2016ZX310179 - 4); 云南省重大科技专项(2017ZF020); 云南省科技创新人才计划(2015HC027); 昆明市科技创新和服务能力提升计划重点项目(2016 - 2 - R - 07674)

^{**}通信作者 E-mail:554929259@qq.com

coxsackievirus A6 (CVA6) in the method. The variation coefficients value of the method was less than 1% in the repeated intergroup and within-group experiments. **Conclusion:** The SYBR Green I RT-PCR method established to detect CVB2 in the experiment possesses good sensitivity, specificity and repeatability, and can be used for rapid detection and quantitative analysis of CVB2.

[**Key words**] hand, foot and mouth disease (HFMD); reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); coxsackievirus infections; dye dilution technique

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是一类由人肠道病毒(human enterovirus, HEV)感染引起的流行性传染病,多发生于5岁以下婴幼儿,可引起严重的中枢神经系统损伤和心肺衰竭等症状^[1-2],2008年5月HFMD被纳入我国法定报告的丙类传染病^[3]。近年来,HFMD引起的病例呈高发态势,严重危害婴幼儿健康和生命安全,给家庭带来沉重的疾病和经济负担^[4]。目前,我国对HFMD的监测主要集中在肠道病毒71型(enterovirus A71, EVA71)、柯萨奇病毒A组16型(coxsackievirus A16, CVA16)、柯萨奇病毒A组10型(coxsackievirus A10, CVA10)和柯萨奇病毒A组6型(coxsackievirus A6, CVA6),对其他肠道病毒的分型鉴定尚不多,但近年来其他肠道病毒比例有所升高^[5];此外,引起HFMD的病原谱构成呈多样化和复杂化^[6]。柯萨奇病毒B组2型(coxsackievirus B2, CVB2)属于小RNA病毒科肠道病毒属B组^[7]。流行病学调查显示, CVB2是引起儿童HFMD的病原体之一^[8], CVB2还会引起心肌炎和无菌性脑膜炎^[9-10],严重者可导致多器官感染^[11],尤其是病毒性心肌炎常见的原因^[12-13]。目前,对于病毒性心肌炎的临床诊断,主要依据临床症状、生化检查和心电图^[14-15],但由于病毒性心肌炎发病初期症状不典型,出现临床症状时往往已经累及心肌,引起心肌不可逆转的损伤,严重危害健康^[16]。由于目前有关CVB2检测方法的报道甚少,为了加强对CVB2引起的HFMD的监测及预防,因此本研究拟建立检测CVB2的SYBR Green I 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法,为CVB2的快速诊断和流行病学调查提供快捷、有效的分子检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 CVB2 (RW41-2/YN/CHN/2012)、

316

CVA6 及 CVA10 病毒由中国医学科学院医学生物学研究所遗传室马绍辉课题组惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 JM109 感受态细胞、pMDTM19-T Vector Cloning、PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver. 2、AxyPrep DNA Gel Recovery Kit、in vitro Transcription T7 Kit、One Step TB Green® PrimeScriptTM PLUS RT-PCR Kit 及 DNA A-Tailing Kit 均购自大连宝生物工程有限公司, TIANpure Midi Plasmid Kit 购自天根生物有限公司, C1000 型 PCR 仪、C1000 TouchTM Thermal Cycler 实时荧光定量 PCR 仪及凝胶成像自动分析仪均购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 利用 GenBank 中 CVB2 毒株(RW41-2/YN/CHN/2012)的病毒衣壳蛋白1(virus protein 1, VP1)基因序列,通过 MEGA7.0 软件对本毒株和 GenBank 中其他 CVB2 基因序列比对,之后利用 Primer5.0 软件设计引物(表1),由上海生工生物工程(股份)公司合成。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

基因名称	序列	产物大小/bp
VP1-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGT CCAGTGAAGAGTCATTGAG-3'	875
VP1-R	5'-AAAAGCACCCGTTGTCGT-3'	
q-RT-PCR-F	5'-AGAACTTCCTTGCACGCTCAGC--3'	112
q-RT-PCR-R	5'-GCAGCCTGTCTAACACTCACCTTC-3'	

1.2.2 制备标准品 用 Trizol 法提取病毒 RNA, 采用 RT-PCR 扩增的方法,用 PCR 引物 VP1-F 和 VP1-R 特异性扩增 875 bp 的 CVB2 DNA 片段;用 AxyPrep DNA Gel Recovery Kit 纯化 PCR 产物,利用 DNA A-Tailing 试剂盒和 pMDTM19-T Vector Cloning 试剂盒对纯化后的 PCR 产物进行末端加 A 与载体连接,形成 T-A 连接产物;将连接产物转化至 JM109 感受态细胞,用蓝白斑试验筛选重组质粒,挑取白色菌落转接至含有氨苄的 LB 培养液中,

37 ℃、200 r/min。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,切下含有目的片段的 3 572 bp 琼脂糖凝胶,用 AxyPrep DNA Gel Recovery Kit 纯化后进行体外转录,体外转录用 In vitro Transcription T7 Kit 体外转录获得模板 RNA。于室温下采用 20 μL 体系:10 × 缓冲液 2 μL,腺嘌呤核糖核苷三磷酸(adenine ribonucleoside triphosphate,ATP)、鸟嘌呤核糖核苷三磷酸(guanine ribonucleoside triphosphate,GTP)、胞嘧啶核糖核苷三磷酸(cytosine ribonucleoside triphosphate,CTP)及尿嘧啶核糖核苷三磷酸(uracil ribonucleoside triphosphate,UTP)各 2 μL,T7 RNA Polymerase 0.5 μL,核酸酶抑制剂 2 μL,线性化质粒 50 ng,去离子水补足至 20 μL,37 ℃、3 h,转录产物加 RNase free DNase I(1 U/L)0.2 L,37 ℃、30 min,用苯酚/氯仿抽提、异丙醇沉淀转录 RNA,采用紫外分光光度计测定 RNA 浓度,计算标准品的拷贝数^[17]。

1.2.3 RT-PCR 反应体系优化及检测方法评价

(1)优化反应体系,在相同模板量与反应体系中,采用矩阵法优化引物浓度,即以无引物二聚体产生、背景噪音小、荧光信号强等为判断标准,确定引物的最佳浓度;(2)建立标准曲线,以 10 倍梯度稀释 CVB2 病毒 VP1 重组质粒的体外转录标准品,取浓度 10² ~ 10⁹ 拷贝/μL 标准品稀释液 8 个梯度,进行 SYBR Green I RT-PCR 反应,同时设立阴性对照,制作标准曲线;(3)特异性检测,利用优化的

SYBR Green I RT-PCR 检测体系对 CVB2、CVA6、CVA10、CVA16 及 EV71 的病毒核酸进行检测,评价方法的特异性;(4)灵敏性检测,将 CVB2 的标准品按 10 倍梯度稀释(10⁰ ~ 10⁹ 拷贝/μL),使用建立的 SYBR Green I RT-PCR 方法进行检测,评价其对病毒核酸检测的灵敏性;(5)重复性检测,分别制备不同浓度梯度的标准品(10³、10⁶ 及 10⁹ 拷贝/μL),同时进行 SYBR Green I RT-PCR,每个标准品做 3 个重复,观察组内重复性;对上述不同浓度的标准品分别做独立的 SYBR Green I RT-PCR 检测,同样做 3 个重复,观察组间重复性。

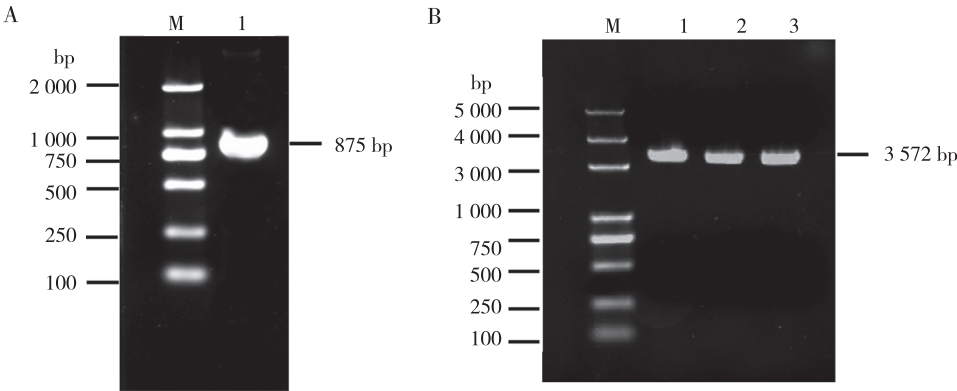
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件计算出组间和组内的 *Ct* 平均值(\bar{x}),标准差(*s*)以及变异系数(coefficient variation,CV)。

2 结果

2.1 CVB2 特异性片段 VP1 的扩增

CVB2 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,700 ~ 1 000 bp 见一条特异性条带,大小与预期一致,见图 1A;重组质粒 pMD19-T-CVB2 经 XbaI 酶切后,3 572 bp 出现一条清晰的条带,与预期相符,见图 1B;用测定的重组质粒序列与 GeneBank 数据库中的 CVB2 株(RW41-2/YN/CHN/2012)的基因序列进行序列比对,同源性为 99.77%。



注:A 为 CVB2 的 VP1 片段,B 为酶切后的重组质粒;M 表示 DNA marker,1 ~ 3 表示 3 个重组质粒。

图 1 RT-PCR 产物电泳及重组质粒的酶切产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of RT-PCR products and recombinant plasmids after enzyme

2.2 反应体系优化

经矩阵法优化后最佳引物终浓度为 300 μmol/L,SYBR Green I RT-PCR 反应体系及各试剂使用量为:2 × One Step TB Green RT-PCR Buffer 10 μL、

TaKaRa Ex Taq HS Mix 1.2 μL、PrimeScript PLUS RTase Mix 0.4 μL、RNase free dH₂O 5.2 μL、q-RT-PCR-F/R(10 μmol/L)各 0.6 μL、模板 2 μL。反应条件为 42 ℃、5 min,95 ℃、10 s,95 ℃、5 s,60 ℃、

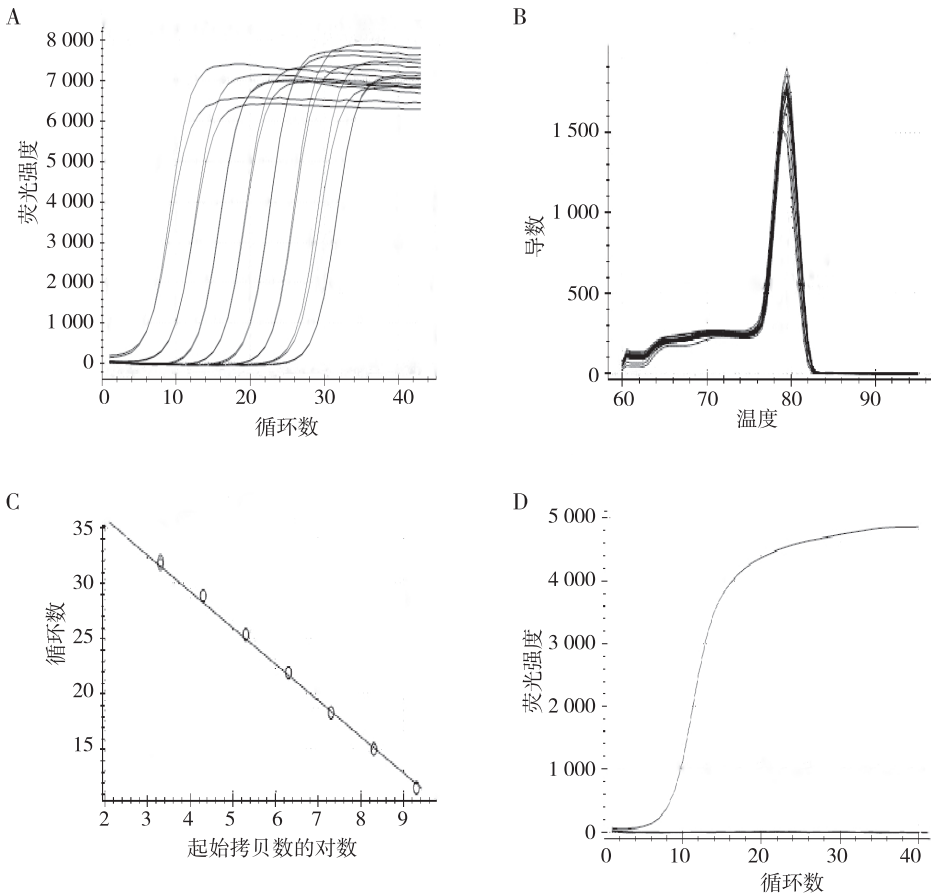
30 s,共 40 次循环。

2.3 检测方法的评价

2.3.1 标准曲线的建立 将线性化的重组质粒用于体外转录,转录所得 RNA 经核酸检测仪测定,测得浓度为 190 mg/L;以 1 ng 为初始量开始计算拷贝数为 2×10^9 拷贝/ μL ,将体外转录产物按 10 倍梯度依次稀释为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 及 10^0 拷贝/ μL 的标准品用作标准曲线的建立。利用优化的 SYBR Green I RT-PCR 方法对 10

个稀释度进行扩增,得到扩增曲线、熔解曲线和标准曲线(图 2A、B、C),扩增曲线稀释度依次为 2×10^9 、 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 及 2×10^2 拷贝/ μL ,CVB2 不同梯度标准间线性关系(R^2)为 0.996,斜率为 -3.271 ,扩增效率 102.2%,标准曲线方程式 $\hat{Y} = -3.271x + 42.351$ 。

2.3.2 特异性评价 该方法检测 CVB2 为阳性,CVA6、CVA10、CVA16 及 EV71 无荧光扩增曲线,提示该方法特异性较强,见图 2D。



注:A 为扩增曲线,B 为熔解曲线,C 为标准曲线,D 为特异性检测。

图 2 SYBR Green I RT-PCR 标准曲线的建立和特异性检测

Fig. 2 Establishment and specific detection of SYBR Green I RT-PCR standard curve

2.3.3 灵敏性评价 该方法检测标准品在 $10^2 \sim 10^9$ 拷贝/ μL 时,可出现较好的扩增曲线,建立的 SYBR Green I RT-PCR 方法的最低检测限为 10^2 拷贝/ μL 。

2.3.4 重复性评价 对不同浓度梯度的标准品 (10^3 、 10^6 及 10^9 拷贝/ μL) 各进行 3 次组间和组内重复性实验,结果显示组内及组间 CV 均 $< 1\%$,见表 1。

表 1 SYBR Green I RT-PCR 重复试验

Tab. 1 Repeated test results of SYBR Green I RT-PCR

拷贝数/ (拷贝/ μL)	Ct 值/Hu		CV/%	
	组内	组间	组内	组间
10^9	12.890 ± 0.035	12.902 ± 0.025	0.272	0.194
10^6	22.701 ± 0.041	22.710 ± 0.039	0.181	0.172
10^3	33.499 ± 0.062	33.512 ± 0.073	0.185	0.218

3 讨论

近年来 CVB2 病毒感染引起手足口病的报道逐渐增多,建立一种简单快速、特异性强及灵敏性高的检测方法对于手足口病病原的检测和分型有重要意义^[18]。HFMD 相关病原体的检测方法有病毒分离和血清学诊断,前者是诊断病毒性疾病的金标准,但检测周期较长,敏感性较低;后者虽快速,但操作繁琐,费时费力且易出现假阳性、假阴性的问题^[19]。目前,HFMD 病原体常用检测技术有 RT-PCR、实时荧光 PCR 探针法、环介导等温扩增技术和基于毛细管电泳芯片的激光诱导荧光检测系统^[20-23]。但这些方法需用昂贵的荧光探针或需要引物和复杂的设备,而 SYBR Green I 染料法不需要荧光探针,并且设备简单^[24]。SYBR Green I 染料法中的染料与双链 DNA 结合后使荧光增强 1 000 倍左右,并能对 PCR 扩增产物进行连续的检测,通过溶解曲线判断引物是否有特异性,通过熔解温度有效区分特异性产物、非特异性产物及引物二聚体^[25]。同时,该方法检测样品简便快捷,无需凝胶电泳且可实时观察结果,大大节省了时间^[26]。吕莉琨等^[27]应用该方法对柯萨奇病毒 A 组的 3 个基因型进行了分型鉴定。当然 SYBR Green I RT-PCR 检测方法自身也有不足之处:如无法检测扩增产物的大小,因各实验室所用的标准曲线的标准品不一致,可能会使结果缺乏可比性等,随着对检测方法的进一步优化,这些问题都将能得到改进^[28]。

本研究以 CVB2 的保守基因片段作为 RNA 标准品制备的模板,以保证实验检测的准确性。在扩增合成 VP1 标准品 RNA 的 DNA 模板时,在用以扩增 VP1 的上游引物的 5'端加了 T7 启动子,之后在体外对重组质粒的 VP1 片段进行转录。该方法从技术上避免了用载体合成 RNA 的缺点,同时利用试剂盒体外转录的 RNA,可以避免交叉污染,减少生物安全风险。本研究构建的含有 T7 启动子的 CVB2 的重组质粒,经体外转录、精制获得的 RNA 用做标准品,将标准品梯度稀释后经优化后的反应体系获得的熔解曲线单一,曲线平稳且无非特异性溶解峰,可对 CVB2 实现特异性扩增。同时,利用标准品建立的标准曲线在 $10^2 \sim 10^9$ 拷贝/ μL 范围内具有良好的线性关系,最低检测限度 10^2 拷贝/ μL , R^2 为 0.996,扩增效率 102.2%;对 EVA7、

CVA16、CVA10 和 CVA6 均无交叉反应,组间和组内的 CV 均小于 1%。

综上所述,本实验建立的检测 CVB2 的 SYBR Green I RT-PCR 方法具有良好的灵敏性、特异性和重复性,可用于 CVB2 毒的快速检测和定量分析。

4 参考文献

- [1] BENDIG J A, O'BRIEN P S, MUIR P. Serotype-specific detection of coxsackievirus A16 in clinical specimens by Reverse Transcription-Nested PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(10): 3690-3692.
- [2] WU K X, NG M L, CHU J J H. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71[J]. *Drug Discovery Today*, 2010, 15(24): 1041-1051.
- [3] 胡跃华,肖革新,郭莹,等. 2008-2011 年中国大陆手足口病流行特征分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2014, 18(8): 693-697.
- [4] WANG S M, LIU C C. Update of enterovirus 71 infection: epidemiology, pathogenesis and vaccine[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2014, 12(4): 447-456.
- [5] 赵奇,朱俊萍. 中国手足口病的流行状况及病原谱变化分析[J]. *病毒学报*, 2015(5): 554-559.
- [6] 吕莉琨,李力,杨东靖,等. 天津市 2013 年手足口病病原检测及基因特征[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(1): 33-36.
- [7] 苏婷,朱艳菊,闫姗姗,等. 一株柯萨奇病毒 B2 分离株的 VP1 基因序列特征分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 28(1): 49-53.
- [8] ZHANG J, ZHANG H H, ZHAO Y L, et al. Molecular characterization of a new human coxsackievirus B2 associated with severe hand-foot-mouth disease in Yunnan province of China in 2012[J]. *Archives of Virology*, 2016, 162(1): 1-5.
- [9] MOOR M, KAPLAN M H, MCPHEE J, et al. Epidemiologic, clinical, and laboratory features of coxsackie B1-B5 infections in the United States, 1970-79[J]. *Public Health Reports*, 1984, 99(5): 515-522.
- [10] PENG T Q, LI Y W, YANG Y Z, et al. Characterization of enterovirus isolates from patients with heart muscle disease in a selenium-deficient area of China[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(10): 3538-3543.
- [11] HOPKINS K A, ABDOL M H, HADI M A, et al. Coxsackie B2 virus infection causing multiorgan failure and cardiogenic shock in a 42-year-old man[J]. *Texas Heart Institute Journal*, 2019, 46(1): 32-35.

- [12] HONG J ,KANG B ,YEO S, et al. Pathogenesis of coxsackievirus B2 in mice: characterization of clinical isolates of the coxsackievirus B2 from patients with myocarditis and aseptic meningitis in Korea [J]. Journal of Veterinary Science, 2017,18(4):457-464.
- [13] SAIKIA U N ,MISHRA B ,SHARMA M ,et al. Disseminated coxsackievirus B fulminant myocarditis in an immunocompetent adult: a case report [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 78(1):98-100.
- [14] 龚玲. 轮状病毒性肠炎并发病毒性心肌炎 28 例临床分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016(5):117-119.
- [15] 朱通球, 刘勇, 张晓桂,等. 动态心电图在小儿病毒性心肌炎中的诊断价值[J]. 实用预防医学, 2012,19(1):102-103.
- [16] 倪荣,李丽丽. 病毒性心肌炎的发病机制和治疗进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2016,19(6):936-938.
- [17] 张文宁,王芑,周建光,等. 人 4 型腺病毒拷贝数 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2017,28(4):528-533.
- [18] 丛超,郭义山,王东. 病毒性心肌炎发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2017,23(15):2948-2953.
- [19] 刘艳红,李咏梅. 手足口病的实验室诊断[J]. 山东医药, 2012,52(35):100-106.
- [20] JAIANAND K, SARAVANAN N, GUNASEKARAN P, et al. Development of a new method for diagnosis of group B coxsackie genome by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2011,29(2):110-117.
- [21] JIA R, CHENG J S, HENG C, et al. Microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence combined with one-step duplex reverse-transcription polymerase chain reaction for the rapid detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in throat swab specimens [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(14):2538-2544.
- [22] 代海丽,高铁磊,朱琳,等. 柯萨奇病毒 B3 的 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(1):8-10.
- [23] 段晶晶,刘国华,黄学勇,等. 柯萨奇病毒 B5 巢式 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 郑州大学学报(医学版), 2013(3):58-61.
- [24] 李杰,卢昕,徐嘉良,等. 应用 SYBR Green I 荧光 PCR 方法快速检测溶藻弧菌[J]. 中国预防医学杂志, 2014(3):195-198.
- [25] 丛喆,李兆忠,魏强,等. SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒 RNA 拷贝数方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2006(4):271-275.
- [26] 李杰,卢昕,徐嘉良,等. 应用 SYBR Green I 荧光 PCR 方法快速检测溶藻弧菌[J]. 中国预防医学杂志, 2014(3):195-198.
- [27] 吕莉琨,杨东靖,李力,等. 手足口病柯萨奇病毒 A2、A4 和 A5 型 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2017(1):21-25.
- [28] 周晓丽,朱国坡,李雪华,等. 实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2010,37(2):87-89.

(2020-01-10 收稿,2020-02-18 修回)

中文编辑: 严 征; 英文编辑: 丁廷森

(上接第 314 页)

- [26] 陶瑜,劳景莉,于旭东,等. 不同激素对五指毛桃离体再生的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2019,53(4):528-533.
- [27] 王丰青,田云鹤,周勋,等. 地黄高效叶片离体再生系统的建立[J]. 中国现代中药, 2013(2):122-126.
- [28] 王毕,邓婕红,王彩霞,等. 长寿花组培快繁技术[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2019,41(5):494-496,560.

(2020-01-07 收稿,2020-02-26 修回)

中文编辑: 严 征; 英文编辑: 张启芳