

文章编号 1006-8147(2021)03-0285-06

论 著

多重荧光定量 PCR 快速检测 6 种常见下呼吸道感染病原菌

王然^{1,2}, 刘雨³, 于津伟⁴, 王冬梅², 赵鹏², 孙续国¹

(1.天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2.中国人民解放军第九八三医院检验科, 天津 300142; 3.河北工程大学临床医学院, 邯郸 056000; 4.天津市疾病预防控制中心, 天津 300011)

摘要 目的:探讨多重实时荧光定量 PCR(MRT-PCR)检测 6 种常见呼吸道病原菌的检测方法。方法:采用 BeaconDesigner7.9 设计引物和探针建立 MRT-PCR 法,通过构建质粒标准品分析该方法的最低检出限。对 176 例临床标本中大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌进行回顾性检测,并用一代基因测序验证。结果:MRT-PCR 法检测病原菌的最低检出限达 10^3 copies/mL,大肠埃希菌 19 例,金黄色葡萄球菌 30 例,铜绿假单胞菌 37 例,肺炎克雷伯菌 53 例,阴沟肠杆菌 15 例,鲍曼不动杆菌 22 例,与传统鉴定方法报告病原菌一致,特异性达 100%。通过一代基因测序结果完全符合。结论:使用多荧光通道 PCR 仪,采用多重 PCR 技术检测痰液标本中 6 种常见病原菌的基因检测方法,敏感性和特异性高,提高了检测效率。

关键词 多重实时荧光定量 PCR; 呼吸道病原菌; 基因测序

中图分类号 R446.9

文献标志码 A

Rapid detection of six common pathogens of lower respiratory tract infection by multiplex fluorescent quantitative PCR

WANG Ran^{1,2}, LIU Yu³, YU Jin-wei⁴, WANG Dong-mei², ZHAO Juan², SUN Xu-guo¹

(1.College of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2.Department of Laboratory Medicine, 983th Hospital of PLA, Tianjin 300142, China; 3. Clinical Medical College of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China; 4.Tianjin Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China)

Abstract **Objective:** To explore a multiplex real-time fluorescent quantitative PCR (MRT-PCR) method for the detection of six common respiratory pathogens. **Methods:** The primers and probes were designed with beacon designer 7.9 establish MRT-PCR. The lowest detectable limit and specificity of MRT-PCR were analyzed by plasmid standard constructing. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* in 176 clinical specimens were retrospectively detected by the established method, and the results were verified by gene sequencing of first generation. **Results:** The lowest detectable limit of MRT-PCR for six pathogens was 10^3 copies/mL. There were 19 cases of *Escherichia coli*, 30 cases of *Staphylococcus aureus*, 37 cases of *Pseudomonas aeruginosa*, 53 cases of *Klebsiella pneumoniae*, 15 cases of *Enterobacter cloacae*, 22 cases of *Acinetobacter baumannii*, which were consistent with the traditional identification methods, and the specificity was 100%. The results of gene sequencing of the first generation were completely consistent. **Conclusion:** The gene detection of six common pathogens in sputum samples by multiplex PCR technology with multi fluorescent channel PCR instrument has high sensitivity and specificity, which improves the detection efficiency.

Key words multiplex real-time quantitative PCR; respiratory pathogens; gene sequencing

全国细菌耐药监测报告显示,2018 年革兰阳性菌分离率第一为金黄色葡萄球菌(32.5%),革兰阴性菌分离率由高到低分别为大肠埃希(28.9%)、肺炎克雷伯菌(20.4%)、铜绿假单胞菌(12.4%)、鲍曼不动杆菌(9.9%)和阴沟肠杆菌(4.0%),依据标本来源数量,其中痰标本占 41.5%、尿标本占 18.8%、血标本占 9.2%^[1]。感染性疾病需要及时准确地明确病原

菌种类,并针对性应用敏感抗菌药物^[2-3]。

相比于传统检验方法,定量 PCR 在病原菌感染检测方面具有明显优势^[4-5]。目前该技术已广泛应用于肝炎病毒、呼吸道病毒、乳头瘤病毒、幽门螺旋杆菌、结核杆菌及支原体、衣原体等多种病原微生物的检测研究^[6-7]。鉴于未知病原的呼吸道感染,临床需要一次快速鉴定多种类型病原菌的可能性,多重实时荧光定量 PCR 方法检测痰液病原性细菌具有临床应用潜能。本文拟通过建立多重实时荧光定量 PCR(MRT-PCR)法,对呼吸道感染性疾病常见的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克

基金项目 国家十三五重大专项(2018ZX10713003-001-015)

作者简介 王然(1990-),男,主管技师,硕士在读,研究方向:微生物、免疫及分子生物学临床检验;通信作者:孙续国, E-mail:sunxuguo@tjmu.edu.cn。

雷伯菌、阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌等 6 种病原菌进行检测,为呼吸道病原菌的早期筛查提供一种快速、准确的检测方法。

1 材料和方法

1.1 样本采集 收集本医院重症监护室(ICU)、呼吸科、老年病科呼吸道感染患者 176 例,其中男 119 例,女 57 例,年龄 52~93 岁。所有人员咳痰前先用温开水反复漱口,然后用力咳出呼吸道深部的痰,痰液直接吐入痰盒中,标本量应>1 mL。痰量少或无痰者可采用雾化吸入加温至 45℃ 的 10%NaCl 水溶液,使痰液易于咯出,直接收集到一次性无菌杯盒,及时规范送检进行细菌培养和药敏试验,同时采集到的标本用一代测序法确证病原菌种类。测序样本可立即用于检测,如不能立即检测,样本在 4℃ 保存不超过 24 h;-20℃ 保存不超过 3 个月,反复冻融不超过 3 次,标本运送应使用 0℃冷藏转运箱。

1.2 仪器与试剂 全自动荧光定量 PCR 检测系统(上海宏石 SLAN96p),全自动核酸提取仪(西安天隆 NP968-C),PCR 试剂(PremixExTaqTaKaRa 货号:RR390B),核酸提取及纯化试剂[西安天隆 Ex-DNA 细菌基因组(预封装)],全自动基因测序仪

(ABI 3500xL);全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司 VITEK-2 compact)及药敏分析系统。

1.3 核酸提取 吸取 0.5~1 mL 痰液样本,加入 1 mL 1 mol/L NaOH,充分混匀使痰液液化,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;向离心管中加入 1 mL PBS 轻微混匀后 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清。向富集产物中加入 180 μL 溶菌酶和 20 μL 蛋白酶 K 溶液,充分涡旋混匀后 50℃ 水浴 30 min 以上,水浴结束后瞬时离心,向离心管中加入 200 μL 菌体消化液,充分混匀后按照核酸提取或纯化试剂盒说明书提取 DNA,样本提取后置-80℃ 备用。

1.4 引物和探针设计 采用 BeaconDesigner7.9 设计下列病原菌检测基因引物和杂交探针,大肠埃希菌选择 uidA 基因,金黄色葡萄球菌选择 nuc 基因,铜绿假单胞选择 OprI 基因,铜绿假单胞选择 OprI 基因,肺炎克雷伯菌选择 SHV 基因,阴沟肠杆菌选择 ampC 基因,鲍曼不动杆菌选择 RecA 基因。为避免后续扩增结果的假阳性或假阴性,需进行 BLAST 序列比对验证引物和探针是否能与目标片段 100% 特异性结合,引物与探针设计均委托通用生物系统(安徽)有限公司。引物探针序列见表 1。

表 1 目的基因引物探针信息

Tab 1 Primer probe information of target gene

菌株	目的基因	引物及探针	引物及探针序列(5'→3')	片段长度
大肠埃希菌	uidA	F	TCACGCCGTATGTTATTG	101 bp
		R	GTCGGTAATCACCATTCC	
		P	FAM-TGCCAGTTCAGTTCGTTGTTTAC-BHQ1	
金黄色葡萄球菌	nuc	F	GGTTCTGAAGATCCAACA	133 bp
		R	GTCTGAATGTCATTGGTTG	
		P	VIC-AACCGTATCACCATCAATCGCTT-BHQ1	
铜绿假单胞菌	OprI	F	CGTTCTGAAATTTCTCTGC	76 bp
		R	TTCCGTTTCTTTGGAGTG	
		P	ROX-CAGAACAGCAGCCAGAGCCA-BHQ2	
肺炎克雷伯菌	SHV	F	CCATGATGAGCACCTTTA	96 bp
		R	GGCGATAGTGATCTTTC	
		P	ROX-CTGTTCTGTCACCGCATCCA-BHQ2	
阴沟肠杆菌	ampC	F	CAGGGTATTCGTATGCTG	113 bp
		R	TGCCAGTTTTGATAAAAGC	
		P	FAM-ATCTCGCCACCTACACCGCT-BHQ1	
鲍曼不动杆菌	RecA	F	CTTGGTGTAGATATTGATAACC	76 bp
		R	GCATGTCAGCAATTTCAA	
		P	VIC-TGCTTGCTCACCATTGTCGG-BHQ1	

1.5 病原菌标准品的制备 各种病原菌均提取 DNA 检测,标准品制备方法相同,具体制备方式以大肠埃希菌为例:质粒合成委托通用生物系统(安徽)有限公司,选择 pUC19 载体与含有目标序列的片段质粒合成;合成的 DNA 质粒为 5 μg/支,在离心管中加入 10 μL 1×TE 缓冲液,稀释后的浓度

为 0.5 g/L,通过公式计算质粒原始拷贝数,拷贝数(copies/μL)=(6.02×10²³)×质粒浓度(ng/μL)/(碱基数×660),再用 1×TE 缓冲液(pH8.0)连续 10 倍稀释至浓度 9.0×10⁷ 拷贝数/mL,取 2 μL 作为模板。建立每种病原菌的标准曲线并获得每套引物探针的最低检出限。

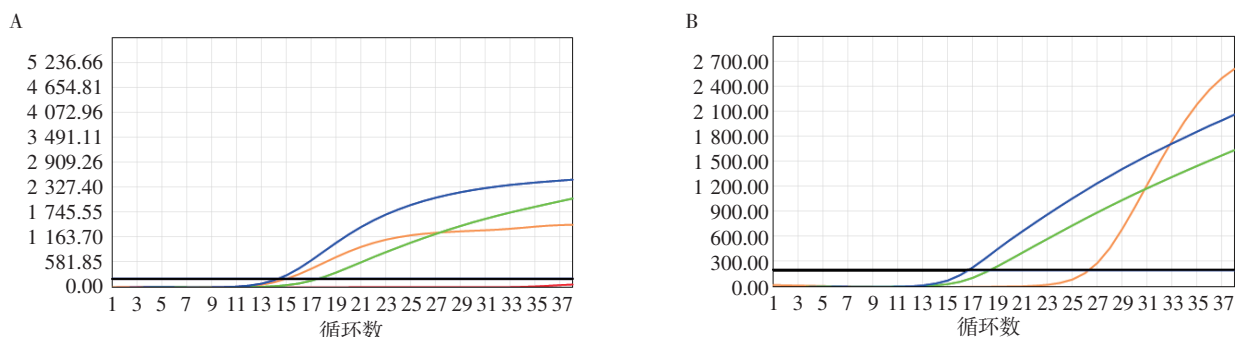
1.6 多重PCR检测 每个临床样本提取DNA,核酸样本进行两组反应,每组反应在一个反应管中进行。第1组检测的3个病原菌为:大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。第2组检测的3个病原菌为:肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌。每组中均含有需检测病原菌的引物对和探针,采用宏石荧光定量96pPCR检测系统进行荧光定量PCR。每组混合物配比:Premix Ex Taq 10 μ L,上下游引物终浓度各2 μ mol,探针终浓度1 μ mol,模板2 μ L,用无菌水补足体系为20 μ L。在宏石荧光定量96p运行PCR程序如下:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,共38个循环。

1.7 Sanger 核酸测序 分别选取培养鉴定后的6种病原菌培养菌落,用细菌稀释液配制成约0.1%~0.5%的菌体混悬液取20 μ L加入无菌EP离心管,加入50 μ L DNA提取液,金属浴100 $^{\circ}$ C 10 min后12 000 r/min离心5 min,取上清液用各自引物在95 $^{\circ}$ C 10 min,

95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 60 s条件下,共38个循环进行单个目的基因PCR扩增,取5 μ L扩增引物进行琼脂糖凝胶电泳,观察与目的产物片段大小一致的单一条带,纯化回收PCR产物,最后在ABI 3500 xL Genetic Analyzer上进行测序PCR,然后用Sequencing Analysis软件进行数据分析(基因测序由诺道中科医学检验实验室有限公司完成)。

2 结果

2.1 验证多重荧光定量PCR引物和探针 扩增程序运行完毕,仪器自动给出Ct值,试验结果与一代测序检测结果比对,当Ct值>36时,判断为阴性;Ct值 \leq 36时,判断为阳性。阳性和阴性对照模板扩增试验结果表明,无假阳性和假阴性现象,各引物及探针的检测特异性为100%。按照多重PCR检测分组情况对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌进行扩增,两组检测结果见图1。



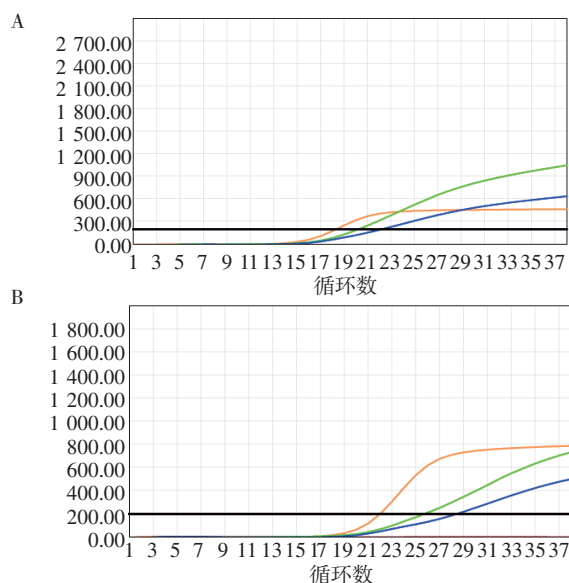
注:A:大肠埃希菌(蓝)、金黄色葡萄球菌(绿)、铜绿假单胞菌(桔);B:肺炎克雷伯菌(桔)、阴沟肠杆菌(蓝)、鲍曼不动杆菌(绿)

图1 6种病原菌的多重PCR扩增曲线

Fig 1 Multiplex PCR amplification curves of 6 pathogens

2.2 分析临床标本检测效果 用多重实时荧光定量PCR对176例临床标本检测,并用一代基因测序验证。MRT-PCR方法检出大肠埃希菌19例,金黄色葡萄球菌30例,铜绿假单胞菌37例,肺炎克雷伯菌53例,阴沟肠杆菌15例,鲍曼不动杆菌22例,该结果与一代测序检测结果符合度达100%(图2、3)。

2.3 MRT-PCR最低检测限 病原菌以大肠埃希菌阳性标准品制备,采用本方法检测,结果显示标准曲线相关系数 $R^2>0.99$,扩增效率E在90%~110%,标准品拷贝数($\text{copies}/\mu\text{L}$)= $(6.02 \times 10^{23}) \times \text{质粒浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})/(\text{碱基数} \times 660)$,标准品扩增曲线(图4)。每个浓度重复3次,共稀释5个梯度,其中最低检出限为稀释至第5个浓度时,检测Ct值范围在36~38,MRT-PCR法检测病原菌的最低检出限达 10^3 copies/mL。

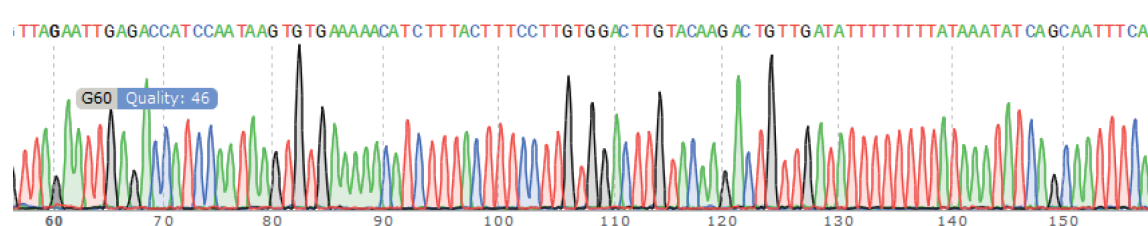


注:A:大肠埃希菌(蓝)、金黄色葡萄球菌(绿)、铜绿假单胞菌(桔);B:肺炎克雷伯菌(桔)、阴沟肠杆菌(蓝)、鲍曼不动杆菌(绿)

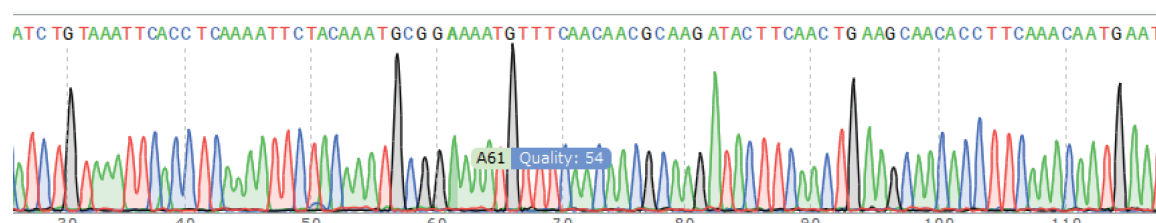
图2 6种病原菌样本PCR扩增曲线

Fig 2 PCR amplification curve of 6 pathogenic bacteria samples

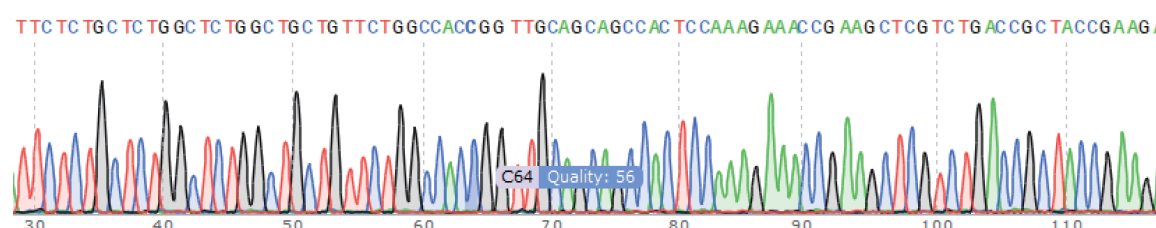
大肠埃希菌 uidA 基因



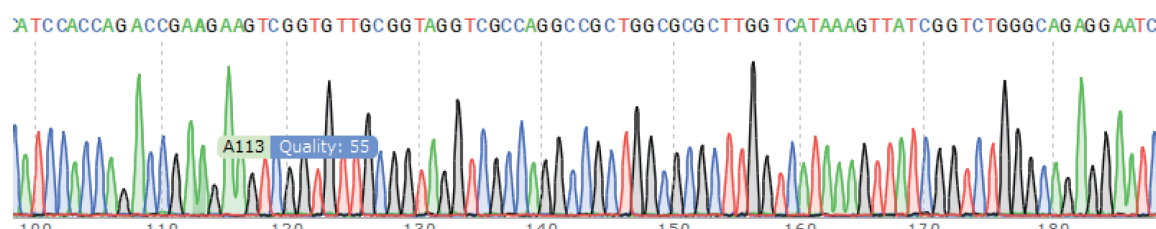
金黄色葡萄球菌 nuc 基因



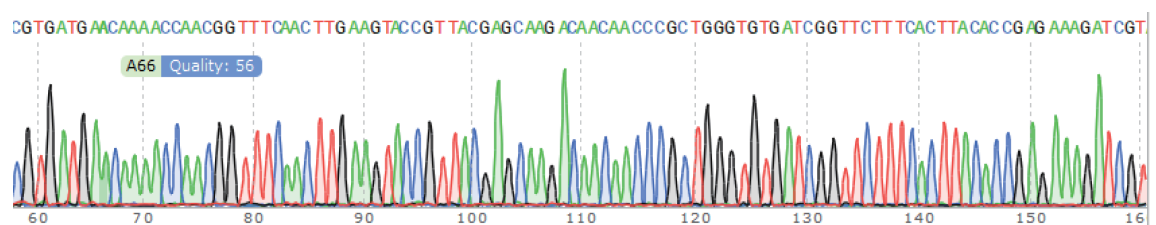
铜绿假单胞菌 OprI 基因



肺炎克雷伯菌 SHV 基因



阴沟肠杆菌 ampC 基因

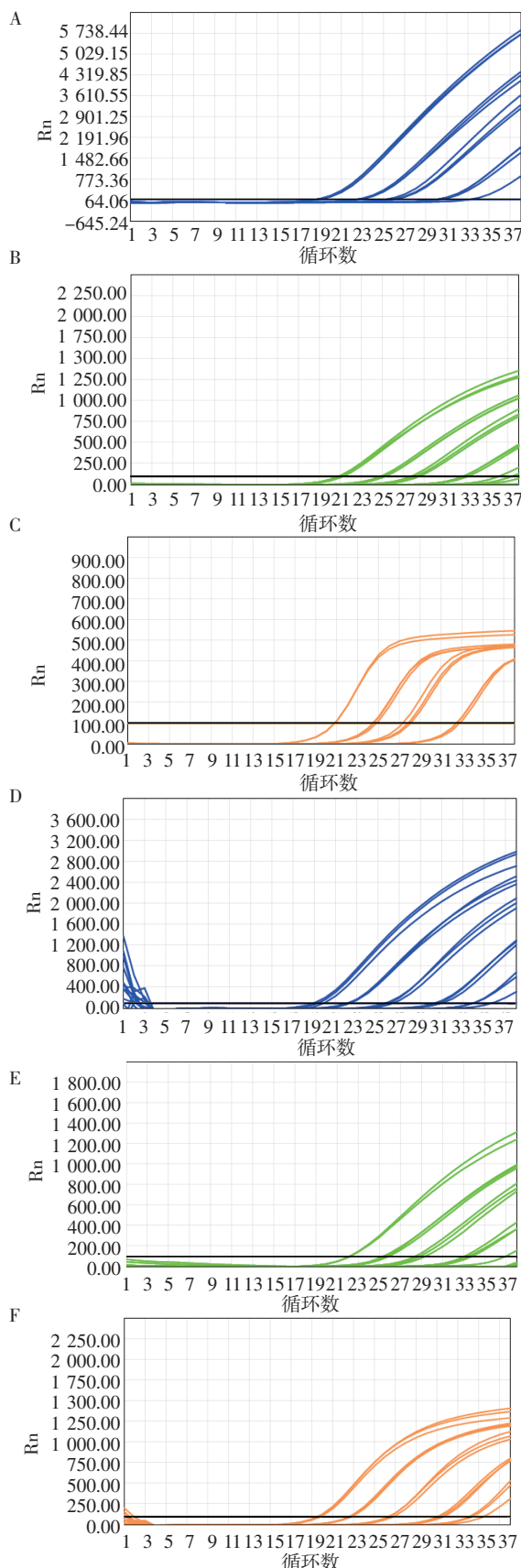


鲍曼不动杆菌 RecA 基因



图 3 6 种病原菌 Sanger 基因测序法一代测序图

Fig 3 Sanger gene sequencing generation sequencing map of 6 pathogens



注:A: 大肠埃希菌质粒标准品;B: 金黄色葡萄球菌质粒标准品;C: 铜绿假单胞菌质粒标准品;D: 阴沟肠杆菌质粒标准品;E: 鲍曼不动杆菌质粒标准品;F: 肺炎克雷伯菌质粒标准品

图4 6种病原菌质粒标准品扩增曲线

Fig 4 Amplification curve of plasmid standard of 6 pathogens

3 讨论

下呼吸道感染是临床上常见疾病,特别对老年人和免疫力差的患者具有一定的危害性,明确病原菌及时选用敏感药物是治疗的关键^[8],而病原菌在不同地区、不同时期存在一定的差异^[9]。目前临床诊断呼吸道感染的方法有多种,细菌感染主要是分离培养鉴定和血清学检测,培养法通常被认为是诊断的“金标准”,但是培养法耗时长,而且未做药物敏感试验的抗生素滥用,导致送检样本阳性检出率降低,菌体变异和耐药性增加使常规生化鉴定产生不确定情况,难与典型菌种完全对应;血清学检测虽操作简便,但灵敏性或特异性不高,容易出现假阳性和假阴性,并且存在窗口期漏检,使得感染早期难以确诊。随着分子生物技术的发展,实时荧光定量PCR技术凭借其精准定量、简易高效的特点,在医学检测和诊断方面得到了大力推广。多重荧光定量PCR方法可在一个管中进行多种病原菌检测,保持较高的灵敏性和特异性,不易造成交叉污染^[10]。本文采用的多重荧光定量PCR检测方法可以将6种病原菌置于同一反应体系、同一反应条件下进行,大大提高了检测人员的工作效率,快速帮助临床确定感染病原菌。176例患者的样本均用一代测序与本文中设计的6种病原菌的临床样本验证,10³ copies/mL的检测下线和100%符合率说明该方法的灵敏度高、特异性好。

近年随着疾病治疗手段的增多,广谱抗生素的滥用,免疫抑制剂的广泛运用,常见的病原菌耐药情况日益严峻,一些条件致病菌有机会成为感染的主要病原菌,这些致病菌的耐药严重,是重症肺炎治疗困难、死亡率高的主要原因之一。更多感染患者分布以ICU、老年病科、呼吸科为主,大部分患有慢性阻塞性肺疾病、脑卒中、晚期肿瘤、多器官衰竭、侵入后手术后及重度呼吸系统原发疾病。另外,医护人员手卫生消毒和无菌操作不规范,病室未按感控要求分类隔离也会造成院内交叉感染的发生,使临床感染控制难度增加^[11-12]。在6种下呼吸道感染致病菌中,大肠埃希菌是肠道内常见的革兰阴性杆菌,在全身衰竭或免疫功能低下的重症患者中感染率很高,是医院内获得性肺炎中较为常见的一种。金黄色葡萄球菌是最主要的革兰阳性致病菌,对于青霉素耐药性超过93%;铜绿假单胞菌可通过多种机制产生耐药,包括与酶的修饰作用、外膜孔蛋白丢失、靶位改变以及反泵作用、生物被膜形成等^[13]。肺炎克雷伯菌兼性厌氧,在自然界广泛分布,引起的医院感染率近期逐年增高,肺炎克雷伯菌耐

药机制主要包括产生 β -内酰胺酶、生物被膜的形成、外膜孔蛋白的缺失、抗菌药物主动外排等,抗菌药物耐药基因播散是临床多重耐药菌株增多的重要原因^[4]。阴沟肠杆菌广泛存在于自然界中,是肠道正常菌种之一,但可作为条件致病菌。随着头孢菌素的广泛使用,阴沟肠杆菌已成为医院感染的主要病原菌,尤以免疫功能低下的慢性阻塞性肺病及支气管肺癌患者多见。鲍曼不动杆菌是一种严格需氧、非乳糖发酵的条件致病菌,不具鞭毛,移动性差,但适应力极强,已经成为重症监护病房医院感染的主要来源。

本论文报道采用多重 PCR 方法检测痰液标本中 6 种常见病原菌的基因检测方法,及时准确的作出病原学诊断,大幅度缩短了致病菌的鉴定时间,提高了检测效率,特别在多重细菌感染的检测更具优势。同时应加强与临床医生的沟通,提高抗生素治疗前的细菌培养标本送检率,帮助临床选择敏感的抗感染药物,缩短住院治疗时间,延缓和控制耐药菌株的产生。

参考文献:

- [1] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 2018 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(1): 1
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S22. Wayne PA: CLSI, 2012
- [3] 陈倩倩, 宋缘缘, 唐洪影, 等. 2015-2018 血流感染病原菌菌群分布及耐药性分析[J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(3): 271
- [4] 刘又宁, 施毅. 铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(1): 9
- [5] 邢楣, 符琳琳. 一种 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株新方法的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3): 283
- [6] 彭亚柏, 朱秀云, 刘赛云. 不同基因型 HCV 感染患者重叠 HBV 或 HIV 感染的病毒学特征[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 861
- [7] 向蕾, 陈仕菊, 王昕, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 快速检测四种呼吸道病毒的研究[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(4): 461
- [8] 胡继红, 胡云建. 正确应用药敏标准提供准确药敏结果[J]. 中华医学检验杂志, 2012, 35(8): 685
- [9] 糜琛蓉, 倪语星, 唐毅, 等. 2010-2014 年医院金黄色葡萄球菌感染的流行病学研究与耐消毒剂分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(11): 2444
- [10] Welti M, Jatón K, Altwegg M, et al. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract secretions[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 45(2): 85
- [11] 将开龙, 代作林, 秦冬梅, 等. 医院临床感染性疾病常见病原菌分布及耐药情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2708
- [12] 张鹏. 医院多重耐药菌的检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(16): 2389
- [13] 伍勇, 陈丽华. 重视细菌生物被膜导致的细菌耐药及其解决方案[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(10): 725
- [14] 刘平, 张坚磊, 刘晔华, 等. 碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌的基因分型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(9): 701

(2020-11-09 收稿)

(上接第 284 页)

药物、辅料相互作用与辅料也有一定关系,由于辅料多为聚合物,分子大小不一,单一结构单元的结构特征无法准确表征,从辅料的角度值得进一步研究。该研究仅从药物的角度已经能够发现比较明确的规律,可以在一定程度上从药物的结构层面预测药物与辅料的相互作用的程度,对实验研究具有较好的参考价值。该研究涉及的药物和辅料种类相对较少,要得到系统而准确的辅料和药物相互作用的规律,还需要更多的深入研究。

参考文献:

- [1] 何秉踊. 我国药用辅料行业期待更高质量发展[N]. 中国医药报, 2019-05-27(4)
- [2] 陈思雨, 陈露露, 王欣桐, 等. 药用辅料对 CYP3A 活性的影响及其对仿制药质量和疗效一致性评价的指导作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(4): 460
- [3] 杨锐, 孙会敏, 于丽娜, 等. 药用辅料对药品安全性的影响[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1309
- [4] 靳贵英. 药用辅料 β -环糊精中 7 种重金属元素的分析[J]. 今日药学, 2017, 27(4): 228
- [5] Garcia-Arieta A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence[J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 65: 89
- [6] 薛晶, 许鸣镛, 南楠, 等. 原辅料及制剂处方工艺对口服固体制剂溶出行为的影响[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(12): 1370
- [7] 李均艳, 孟策, 张卫敏, 等. 羟丙甲基纤维素对托拉塞米渗透的影响[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(4): 390
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
- [9] 黎少志, 黄紫玉, 任晓文, 等. 基于药物与羟丙甲基纤维素凝胶相互作用的缓释特征参数研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(9): 1059
- [10] 王博, 张来华, 李苑新, 等. 亲水凝胶骨架缓释片释药机制评价方法的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(10): 782
- [11] Shekhawat P B, Pokharkar V B. Understanding peroral absorption: regulatory aspects and contemporary approaches to tackling solubility and permeability hurdles[J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(3): 260
- [12] 陈娇婷, 詹怡飞. 药用辅料的研发与应用[J]. 山东化工, 2015, 44(18): 21

(2020-10-27 收稿)