

# 基于适配体的金黄色葡萄球菌流式细胞术检测方法

董晓琳,李志萍,高玮村,樊洪超,王园园,吴永魁\*,夏志平\*

(军事医学科学院军事兽医研究所/吉林省人兽共患疾病预防与控制重点实验室,长春 130122)

**摘要:**本研究以金黄色葡萄球菌为对象,旨在建立一种基于荧光标记核酸适配体的流式细胞术检测方法。通过优化流式细胞仪检测参数、适配体用量及折叠方式,观察适配体针对不同方式处理细菌的识别效果建立检测方法,并对该方法的特异性和灵敏性进行了验证。结果显示:不经高温变性处理的适配体检测结果最佳,适配体最佳使用浓度为250 nmol/L,对活菌识别效果最强。本实验建立的基于适配体的流式细胞术检测方法特异性强、过程简单,40 min于混合细菌中特异性检测、鉴别靶细菌,为金黄色葡萄球菌的检测提供了一种有效方法。

**关键词:**适配体;流式细胞术;金黄色葡萄球菌

中图分类号:S851.3

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2016)03-0081-06

## Detection of *Staphylococcus aureus* with Flow Cytometry and Aptamer

DONG Xiaolin, LI Zhiping, GAO Weicun, FAN Hongchao, WANG Yuanyuan, WU Yongkui\*, XIA Zhiping\*

(Institute of Veterinary Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun 130122, China)

**Abstract:** The aim of this study is to establish a flow cytometry method based on fluorescent-labeled nucleic acid aptamer for detection of *Staphylococcus aureus*. By optimizing flow cytometry parameters, the amount and folding methods of the aptamer and bacterial treatment, specificity and sensitivity of this method was finally verified. The results showed that aptamer which was not folding by the high temperature denaturation process has a good identification and the strongest binding with viable bacteria, the optimal working concentrations of aptamer is 250 nmol/L. We determined *Staphylococcus aureus* after pre-incubation in a total analysis time of 40 min, even in the presence of *Escherichia coli* cells. The results proved that flow cytometry combined with fluorescently labeled aptamer offers advantages of speed and specificity for the detection of *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** Aptamer; Flow cytometry; *Staphylococcus aureus*

核酸适配体(aptamer)是通过 SELEX(指数富集进化系统)技术从单链随机寡核苷酸文库中筛选出的一类单链核酸小分子(DNA和RNA),以其特殊的三维结构能够高特异性地结合靶物质。适配体相比蛋白类抗体具有许多优点:制备简单、易于修饰、稳定性好,易于结合其他方法构建生物传感器<sup>[1-3]</sup>,实现对微生物的识别和检测。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为一种革兰氏阳性球菌,其流行病学呈季节分布,多见于春夏季。由该菌

污染的食品种类多,如奶、肉、蛋、鱼及其制品,上呼吸道感染患者鼻腔带菌率83%,人畜化脓性感染部位常成为污染源。临床上以骨髓炎、心内膜炎和菌血症为主要症状<sup>[4]</sup>。研究发现经过甲氧西林和万古霉素治疗后,会出现耐甲氧西林和耐万古霉素金黄色葡萄球菌<sup>[5]</sup>。因此,快速诊断和鉴定金黄色葡萄球菌尤为重要。传统的检测方法需要进行细菌分离培养和一系列繁琐的生化实验鉴定,较为费时费力。流式细胞仪以其快速针对单个细菌进行多参数定量和定性分析的特点,已广泛应用于细菌的常规工作和微生物学研究中<sup>[6]</sup>。本研究运用流式细胞术(flow cytometry, FCM),以荧光标记的核酸适配体为识别分子,初步构建了一种快速鉴别、检测金黄色葡萄球菌的新方法。

收稿日期:2016-02-21

基金项目:武汉东湖新技术开发区3551光谷人才计划-第七批

作者简介:董晓琳(1990-),女,在读硕士,主要从事基础兽医学研究。

通讯作者:吴永魁,男,副研究员,E-mail: wuyongkui@sohu.com

夏志平,男,研究员,E-mail: zpxia@126.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

大肠杆菌 O157:H7 (CICC 21530)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213) 由军事兽医研究所基础实验室保存, 大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体由军事兽医研究所细菌研究室馈赠。生物素标记试剂盒 (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit) 购买于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 链霉亲和素标记的藻红蛋白 (SA-PE, 100 μg/500 μL) 购买于 Biolegend 公司; FAM 标记的核酸适配体 FAM-SA17<sup>[7]</sup> 5'(FAM)-TCCCTACGGCGCTAACCTCCCAACCGCTC CACCCTGCCTCCGCCTCGCCACCGTGCTACAAC-3', 由上海生物工程有限公司合成; 结合缓冲液 (40 mmol/L Tris, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH8.6) 由本实验室配制。

### 1.2 主要仪器设备

流式细胞仪 (Becton Dickinson, FACSCalibur)、电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司, AB204-S)、台式高速离心机 (Thermo 公司, pico)、水平离心机 (北京雷勃尔离心机有限公司, LDZ5-2)、涡旋振荡器 (上海精科实业有限公司, XW-80A)、超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司, KQ-250DE)、恒温水平摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司, ZWYR-240)、离心层析柱 (美国 Bio-Rad 公司, Micro Bio-Spin™ P-6 Gel Columns)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 基于荧光标记适配体金黄色葡萄球菌的流式细胞检测方法建立

##### 1.3.1.1 利用流式细胞术观察细菌

调整不同 FSC/SSC 电压模式和电压、FL1 电压和阈值, 确定检测细菌的最佳参数。

##### 1.3.1.2 适配体折叠方式对细菌检测效果的影响

对适配体分别采用以下 4 种方式折叠, 比较适配体折叠方式对流式细胞术细菌识别率的影响。使用结合缓冲液稀释 FAM-SA17 至 500 nmol/L, 分别吸取 400 μL 于 4 个离心管中, 混匀后 4℃ 保存备用。4 种折叠方式如下: (A) 将水浴锅升温至 95℃, 将离心管插于浮漂上, 放入水中, 95℃ 5 min 后, 关掉水浴锅, 使其自然降温过夜, 取出放至 4℃ 保存备用; (B) 使用 PCR 仪, 设置 PCR 程序为 95℃ 2 min, 每 40 s 降 2℃, 降至 37℃, 从 PCR 仪中取出, 直接放于 -20℃ 备用, 使用前现融化; (C) 95℃ 金属浴中 5 min, 立即置于冰盒上 10 min; (D) 不进行任何处理, 直接从 4℃ 取出使用。

金黄色葡萄球菌培养至 OD<sub>600</sub>=1.0 (菌浓度约为 10<sup>9</sup> CFU/mL), 吸取 4 mL 菌液, 5 000 r/min, 离心 5 min, 4 mL 结合缓冲液洗涤, 离心吸弃上清, 加入上述 4 种不同方式折叠的适配体, 使用结合缓冲液补充孵育体系至 100 μL (适配体使用浓度为 250 nmol/L), 冰上 30 min 后, 洗涤重悬。稀释菌液浓度约 10<sup>6</sup> CFU/mL 后, 上机检测, 设置 Gate events=20 000 个, 测定阳性细胞百分比, FlowJo 7.60 软件分析数据, 以上试验重复 3 次。最后 SPASS Statistics 17.0 进行单因素方差分析, 满足方差齐性后, 使用 LSD 方法进行两两比较。

##### 1.3.1.3 适配体最佳使用浓度的确定

采用“2.1.2”方法处理细菌。使用最优折叠方式进行适配体的预处理, 取不同量的适配体分别与金黄色葡萄球菌 (1 mL 菌量) 孵育, 孵育体系为 100 μL, 适配体终浓度分别为 50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、250 nmol/L、300 nmol/L, 冰上孵育 30 min 后离心洗涤重悬, 使用细胞分析仪检测。

##### 1.3.1.4 适配体对 4% 甲醛处理细菌的识别效果

4% 甲醛固定细菌后与适配体孵育结合, 观察流式细胞术对不同状态的细菌的识别能力。使用结合缓冲液配制 4% 甲醛。吸取金黄色葡萄球菌悬液, 分别进行甲醛固定处理和不做任何处理。甲醛固定细菌: 使用 1 mL 结合缓冲液洗涤 2 次后, 1 mL 4% 甲醛溶液重悬菌沉淀, 37℃ 摇床 30~45 min, 结合缓冲液洗涤 2 次, 每次使用结合缓冲液重悬后, 静止 1 min 后, 再离心洗涤, 完成后放至 4℃ 保存备用。活菌: 直接吸取菌液后, 结合缓冲液洗涤两遍, 4℃ 备用。取上述不同方式处理后的 1 mL 金黄色葡萄球菌与 FAM-SA17 孵育结合, 100 μL 孵育体系 (FAM-SA17 终浓度为 250 nmol/L), 结合缓冲液洗涤 1 次后, 流式细胞仪观察分析, 并设置相应的空白对照。

### 1.3.2 方法的验证

#### 1.3.2.1 灵敏度验证

同“1.3.1.2”操作, 将金黄色葡萄球菌培养至 OD<sub>600</sub>=1.0。分别取 4 mL、3 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL 菌液与 FAM-SA17 孵育, FAM-SA17 终浓度参照“1.3.1.3”试验数据确定, 流式细胞分析计算阳性细菌百分比, 绘制曲线。

#### 1.3.2.2 特异性验证

培养金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 至 OD<sub>600</sub>=1.0, 分别取 500 μL 菌悬液, 结合缓冲液离心洗涤后, 与 FAM-SA17 溶液孵育, 体系为 100 μL, FAM-SA17 终浓度为 250 nmol/L, 结合缓冲液洗涤

后,流式细胞术分析阳性细胞百分比。

### 1.3.2.3 针对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 两重检测方法的探索

参照上述方法,培养金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 至 OD<sub>600</sub>=1.0。分别取 500μL 菌悬液,使用结合缓冲液离心洗涤后,分别加入生物素标记大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体(按照生物素标记试剂盒说明,对单克隆抗体进行标记)终浓度为 1:100,孵育 30 min 后洗涤,加入 SA-PE,SA-PE 终浓度为 10μg/mL,孵育 30 min 后,离心洗涤,上机分析阳性细胞百分比。其中孵育体系始终为 100μL,对照为细菌与 SA-PE 孵育洗涤后的重悬液。分别取 500μL 菌悬液,使用结合缓冲液离心

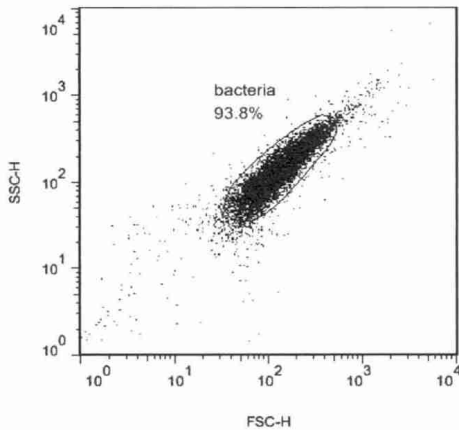


图1 流式细胞仪检测细菌散点图

洗涤混合,同上述方法加入荧光标记适配体和抗体,混合孵育后离心洗涤,上机检测,调整仪器荧光补偿,观察检测结果。

## 2 结果

### 2.1 基于荧光标记适配体金黄色葡萄球菌的流式细胞识别方法建立

#### 2.1.1 流式细胞仪细菌观察结果

通过设置流式细胞仪相关参数,使得 FSC/SSC 散点图中呈现较为明显的菌群(图 1),方便进行设门以及后续数据分析,优化 FSC/SSC 电压模式和电压、阈值、FL1 电压参数结果如图 2。

Cytometer Type: FACSCalibur

| Detectors/Amps: |          |         |         |      |
|-----------------|----------|---------|---------|------|
| Param           | Detector | Voltage | AmpGain | Mode |
| P1              | FSC      | E01     | 5.41    | Log  |
| P2              | SSC      | 505     | 1.00    | Log  |
| P3              | FL1      | 582     | 1.00    | Log  |
| P4              | FL2      | 320     | 1.00    | Log  |
| P5              | FL3      | 705     | 1.00    | Log  |
| P6              | FL1-A    |         | 1.00    | Lin  |
| P7              | FL4      | 835     |         | Log  |

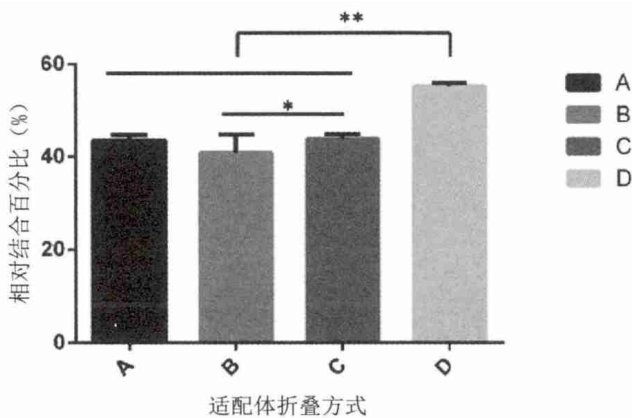
Threshold:  
 Primary Parameter: FSC  
 Value: 52

Secondary Parameter: SSC  
 Value: 52

图2 流式细胞仪细菌检测参数

#### 2.1.2 不同折叠方式的适配体检测结果

将 4 种不同折叠方式的适配体与同等量细菌结合。单因素方差分析,具有方差齐次性,适配体折叠方式对适配体的检测效果有显著性差异 ( $F=52.908, P=0.000$ )。D 折叠方式与其余 3 种折



- A: 95℃水浴 5 min,自然降温过夜;
- B: PCR 程序降温,95℃ 2 min,每 40 s 降 2℃,降至 37℃;
- C: 直接从 4℃取出使用;D: 95℃金属浴 5 min,冰上 10 min

图3 适配体的不同折叠方式对流式细胞识别率的影响

叠方式的检测效果相比差异性极显著,C 折叠方式与 B 折叠方式的适配体检测效果相比差异性显著(图 3)。为节省时间、方便操作,最后采用未经高温变性处理适配体的折叠方式(D 折叠方式)进行后续试验( $0.01 < P < 0.05$  差异性显著; $P < 0.01$  差异性极显著)。

#### 2.1.3 适配体的最佳工作浓度

采用上述最优折叠方式处理适配体,将不同浓度 FAM-SA17 与金黄色葡萄球菌孵育后,流式细胞仪分析显示,适配体浓度为 200 nmol/L 时,与金黄色葡萄球菌的结合开始趋于平稳(图 4),为最小饱和使用浓度。为保证试验结果的稳定性,本研究使用浓度为 250 nmol/L。

#### 2.1.4 适配体对 4% 甲醛处理细菌的识别结果

如图 5 所示,适配体活菌识别能力较强 ( $51.50\% \pm 11.5\%$ ),对 4% 甲醛固定的细菌具有一定的识别能力(结合率为  $15.45\% \pm 0.05\%$ )。

#### 2.1.5 灵敏度验证

取不同量的金黄色葡萄球菌与 250 nmol/L

FAM-SA17 孵育、结合、洗涤后,流式细胞术测定阳性结合百分比。结果显示,随着菌浓度的降低,结合率逐渐降低,图6所示,细菌总数数量级为  $10^8$  CFU~ $10^9$  CFU 时,流式细胞术检测结果可靠

(允许阴性对照非特异性荧光信号(假阳性率)一般小于 1%~5%<sup>[8]</sup>,流式细胞术阳性率大于 5% 结果可信)。

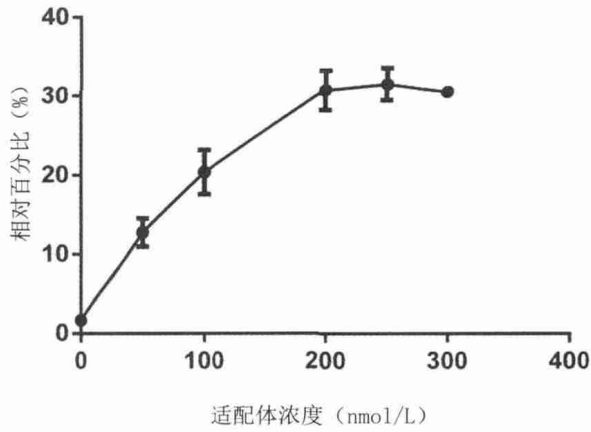


图4 适配体 FAM-SA17 饱和结合曲线图

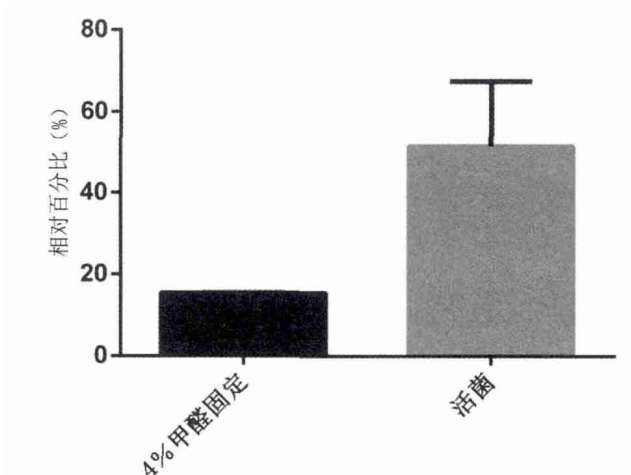


图5 适配体对不同方式处理金黄色葡萄球菌的识别效果

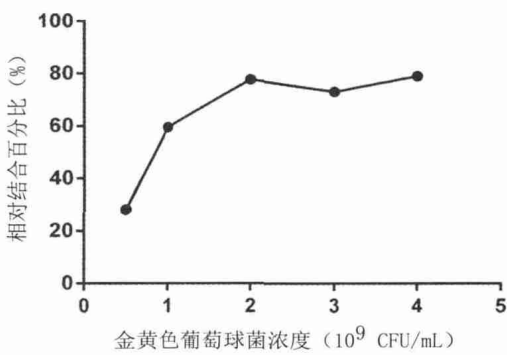


图6 金黄色葡萄球菌浓度对流式细胞术细菌检测率的影响

2.1.6 特异性验证

如图7所示,金黄色葡萄球菌适配体 FAM-SA17 能够特异性结合金黄色葡萄球菌,而与大肠杆菌 O157:H7 无结合。

2.1.7 两重检测方法的探索性结果

由图8观察,大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体与金黄色葡萄球菌有着一定的非特异性结合。使用两种适配体同时检测两种细菌时,适配体仍然可特异性识别金黄色葡萄球菌(图9 D 中 Q2 14.7% 与图9 B 中 Q3 25.9%)。

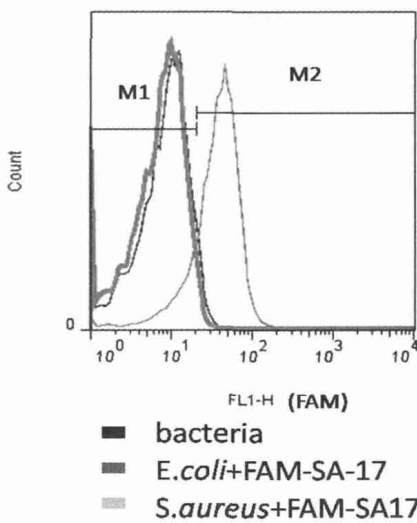


图7 适配体 SA17 特异性流式分析图

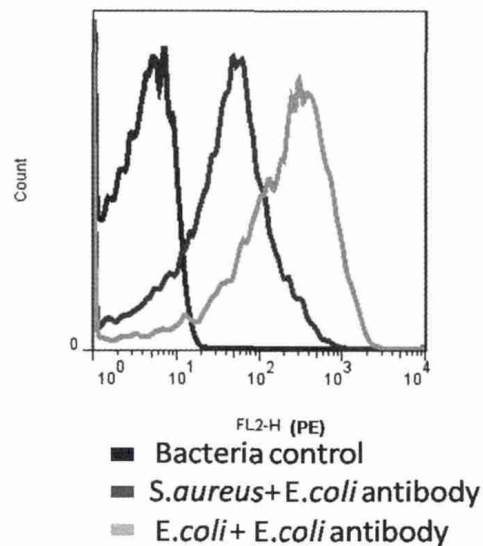


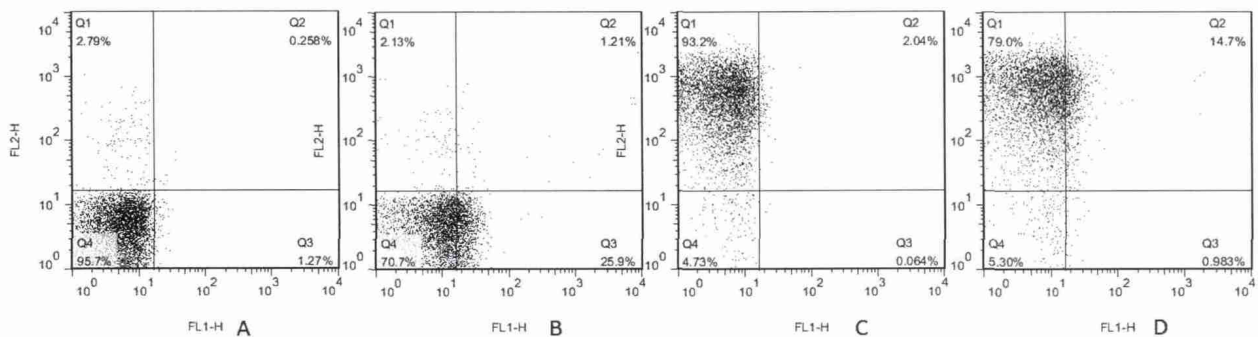
图8 大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体特异性流式分析图

3 讨论

适配体自 1990 年以来,以其高特异性、高亲和力等特点,备受广大学者青睐。针对不同靶物

质(蛋白、细菌、化学小分子等)的核酸适配体筛选和应用(细菌检测、疾病治疗、药物传送等)研究层出不穷。核酸适配体制备过程简单,不易受环境影响(pH、温度、化学试剂)、能经受构象的改变再次使用、易于保存和修饰,从而便于结合其他电化学方法检测细菌。Duan等<sup>[1]</sup>运用SELEX技术筛选获得鼠伤寒沙门氏菌适配体和副溶血弧菌适配体,将其分别固定于发射波长为535 nm和585 nm的量子点,通过FCM检测绿色荧光通道和

橙色荧光通道的阳性区域的细菌数百分比,实现副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌的同时检测,方法特异性强且结果稳定。本研究使用荧光素FAM修饰的金黄色葡萄球菌适配体SA17,运用FCM分析绿色通道的阳性细菌百分比(FAM发射波长为535 nm),实现检测的目的。目前,有许多研究使用转换荧光纳米材料、纳米银或其他信号分子修饰的适配体为分子探针识别靶细菌,然后使用相关仪器测定信号分子进而建立检测方法。



A: 阴性对照; B: 金黄色葡萄球菌与 FAM-aptamer 结合的流式细胞分析结果;  
C: 大肠杆菌 O157:H7 与其单克隆抗体(间接 PE 标记)结合的流式细胞分析结果;  
D: 两种细菌与两种适配体混合结合的流式细胞分析结果  
Q4: FAM<sup>-</sup> PE<sup>-</sup>; Q3: FAM<sup>-</sup> PE<sup>+</sup>; Q2: FAM<sup>+</sup> PE<sup>+</sup>; Q1: FAM<sup>+</sup> PE<sup>-</sup>

图9 流式细胞术检测细菌分析结果图

核酸适配体的折叠过程主要是高温变性使核酸变成直链,低温复性,依靠链内碱基的互补配对及氢键或疏水力等作用折叠形成稳定而复杂的三维构象。适配体凭借其独特的空间构象识别靶分子,但 Abbaspour 等<sup>[2]</sup>将合成的核酸适配体序列溶解于结合缓冲后直接使用,进行细菌检测,结果可靠且快速便捷。本研究针对适配体 SA17,运用流式细胞术首次比较了 4 种适配体折叠方式对检测结果的影响,最终使用不经高温变性处理的适配体,检测过程更加省时、便捷。

FCM 是利用流式细胞仪,对单个细胞或者微生物进行逐个、精准检测,分析多种参数,多用于微生物检测<sup>[9-10]</sup>、细胞凋亡分析<sup>[11]</sup>、免疫表型分析等方面。使用荧光染料染色细菌能够快速、准确分析样本中微生物生存状态及活菌与死菌数量,谢小军等<sup>[12]</sup>使用碘化丙啶(propidium iodide, PI)荧光染料,用流式细胞术分析计数了由链球菌 $\alpha$ -34 抑制而死亡的化脓性链球菌 32309-2,但这种方法不能实现鉴别样本中微生物的目的。通过选择特异性的微生物适配体,结合 FCM 可实现分析鉴别样品特定病原菌的目的<sup>[13-14]</sup>。王宁<sup>[15]</sup>利用荧光抗体 ab30522 对大肠杆菌进行特异性染色,进而

实现鉴别和计数大肠杆菌的目的。本试验结果显示大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体能非特异性结合金黄色葡萄球菌,这可能是金黄色葡萄球菌的表面 SPA 蛋白与抗体的 Fc 片段的结合导致,本研究以金黄色葡萄球菌特异性适配体 SA17 为分子探针指示靶细菌。适配体 SA17 由 Chang 等<sup>[7]</sup>利用 SELEX 技术经过 8 轮筛选获得,特异性高,间接免疫荧光实验显示与 13 种食源性致病菌无交叉反应。该适配体与固定(灭活)细菌有一定的结合力,根据荧光染料染色细菌可定性分析细菌的活性这一特点,未来可将特异性适配体和荧光染料共同使用,进一步分析鉴别具有活力的靶细菌。

传统微生物学检测方法需对疑似样本进行增菌,然后接种于平板进行分离培养,最后通过复杂的生化试验进行微生物鉴定,总需时 3~7 d,过程漫长且繁琐费力。本研究以 FAM 标记的适配体 SA17 为识别探针,运用流式细胞术建立了一种鉴别金黄色葡萄球菌的检测方法,方法快速、便捷。细菌预扩增后,40 min 完成整个检测过程,并可于混合细菌中鉴别靶细菌。但结果显示检测限较高,分析是与适配体的亲和力有关,筛选高亲和力和高特异性的适配体,是未来适配体应用于

检测技术的关键。食品样本并非单一微生物污染,多种适配体同时使用,实现食源性致病菌的高通量鉴别检测是未来研究趋势。本试验初步探索了同时使用两种配体检测金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 的混合菌悬液。由于大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体对金黄色葡萄球菌有非特异性结合,当两种适配体同时检测时,金黄色葡萄球菌在两个荧光通道均显示阳性。因此,未来构建相关多重检测方法时,选择高特异性适配体是该技术的关键。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Duan N, Wu S, Yu Y, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels[J]. *Analytica chimica acta*, 2013, 804(804c): 151-158.
- [ 2 ] Abbaspour A, Norouz-Sarvestani F, Noori A, et al. Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015(68): 149-155.
- [ 3 ] Wang J, Wu X, Wang C, et al. Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of *Staphylococcus aureus* Based on Aptamer Recognition[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2015, 7(37): 20919-20929.
- [ 4 ] Elaine S, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens.[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(1):1339-1340.
- [ 5 ] Laarman A J, Mijnheer G, Mootz J M, et al. *Staphylococcus aureus* Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis[J]. *The EMBO journal*, 2012, 31(17): 3607-3619.
- [ 6 ] 刘新星,霍转转,云慧,等.流式细胞术在细菌快速检测中的应用[J].*微生物学通报*,2014,41(1):161-168.
- [ 7 ] Chang Y C, Yang C Y, Sun R L, et al. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(5):1863.
- [ 8 ] 梁智辉.流式细胞术基本原理与实用技术[M].武汉:华中科技大学出版社,2008:23-25.
- [ 9 ] Hwang M G, Oh J W, Cho J K, et al. Application of multiparametric flow cytometry (FCM) to enumerate the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*[J]. *Environmental Engineering Research*, 2012, 17(1): 35-39.
- [ 10 ] Liu T, Kong W, Chen N, et al. Bacterial characterization of Beijing drinking water by flow cytometry and MiSeq sequencing of the 16SrRNA gene[J]. *Ecology & Evolution*, 2016, 6(4):923-934.
- [ 11 ] 娜仁图娜拉,闫雷,赵瑞杰,等.流式细胞术及其在细胞凋亡检测中的应用[J].*中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(27):5353-5355.
- [ 12 ] 谢小军,王冲,何亮,等.流式细胞术计数细菌的研究[J].*中国微生物学杂志*,2009,21(6):509-511.
- [ 13 ] Fuchsli H P, Kötzsch S, Keserue H A, et al. Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2010, 77(3): 264-274.
- [ 14 ] 李萍,温平威,许恒毅,等.流式细胞术在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J].*食品工业科技*,2013,34(14):375-379.
- [ 15 ] 王宁.流式细胞术检测牛乳中大肠杆菌数及细菌总数的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.

(责任编辑:王昱)