

## 山东栒子基因组 DNA 的提取和 SRAP 分子标记引物筛选

步俊彦, 臧德奎\* (山东农业大学林学院, 山东泰安 271000)

**摘要** 根据山东栒子叶片多糖多酚多毛的理化性质, 研究适合山东栒子便捷高效的基因组 DNA 提取方法。结果获得了纯度高、质量符合后续分子标记和遗传多样性分析要求的基因组 DNA。采用 6 个不同种群的样品, 利用 150 对 SRAP 引物组合进行筛选, 确定了最佳反应体系为 2×EsTaqMasterMix (含染料) 12.5 μL, 40 ng/μL DNA 模板 1 μL, 10 pmol/μL 引物 0.5 μL, dd H<sub>2</sub>O 10.5 μL, 共筛选出 11 对多态性相对良好、条带较为清晰的引物组合。该研究为以后 SRAP 分子标记在栒子属植物遗传多样性方面的研究奠定了基础。

**关键词** DNA 提取; 山东栒子; SRAP; 引物筛选

**中图分类号** S 188+.1 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2019)10-0097-04

**doi:** 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.10.029

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Extraction of Genomic DNA from *Cotoneaster schantungensis* and Screening of SRAP Molecular Marker Primers

BU Jun-yan, ZANG De-kui (College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000)

**Abstract** According to the physicochemical properties of polysaccharide polyphenols and hypertrichiasis from *Cotoneaster schantungensis*, a convenient and efficient genomic DNA extraction method suitable for *C. schantungensis* was studied. The obtained genomic DNA was of high purity and the quality was sufficient to satisfy the requirements of subsequent molecular marker experiments. For 6 plant samples from different populations, 150 pairs of SRAP primer combinations were used to screen, and 2×EsTaqMasterMix (containing dye) 12.5 μL, 40 ng/μL DNA template 1 μL, 10 pmol/μL primer 0.5 μL, dd H<sub>2</sub>O 10.5 μL of good system and 11 pairs of well-characterized bands with clear primer combinations were determined. This series of experiments laid the foundation for the experimental study of genetic diversity of SRAP molecular markers for the *C. schantungensis* and *Cotoneaster* genus species.

**Key words** DNA extraction; *Cotoneaster schantungensis*; SRAP; Primer screening

山东栒子(*Cotoneaster schantungensis*)隶属蔷薇科栒子属, 是山东特有树种<sup>[1]</sup>, 已列入山东珍稀濒危保护树种名录。过去仅生长于济南南部山区, 种群数量少, 屈素青<sup>[2]</sup>对 16 份野生种质进行遗传多样性分析, 但样品数过少。近年来在泰山、徂徕山、鲁山等地发现了与山东栒子表型极为相似的栒子属种群, 需要通过分子标记技术进一步鉴定其分类归属。分子标记技术因其方法相对简便、多态性高、成本低且满足多种遗传分析等优点, 成为目前种质资源鉴定的高效技术手段之一<sup>[3-5]</sup>。迄今为止, 遗传基因检测中常用的 DNA 分子标记技术主要包括 RFLP、RAPD、AFLP、CDDP、SSR 等, 各种分子标记技术的复杂程度、稳定性及产生遗传信息的能力不同, 各自具有优点和缺点。而 SRAP 作为功能序列扩增的分子标记技术<sup>[6]</sup>, 因其操作简便、结果稳定、中等产率和相对较易得到选择条带序列的特点而被广泛应用于棉花<sup>[7]</sup>、西瓜<sup>[8]</sup>、黄瓜<sup>[9]</sup>、菊花<sup>[10]</sup>等植物的遗传多样性研究。

笔者利用 SRAP 分子标记对 39 份山东栒子样品以及 50 个表型相似的疑似山东栒子样品进行分析, 在分子水平上验证新发现栒子种群的归属, 更进一步深入分析山东栒子的遗传多样性, 从而推动濒危植物山东栒子的保护与利用。由于栒子类植物叶片中含有多种次生代谢物质, 如酚类、多糖等, 且还有表面多毛、细胞壁较厚等特点, 胞内物质很难被裂解出来, 多蛋白多杂质, DNA 易降解而 RNA 难去除等, 经过反复试验证明, 无法利用最常用的改良 CTAB 法提取 DNA。因此, 选择适

合山东栒子的方法以去除这些因素对 DNA 质量的影响极其重要<sup>[11-12]</sup>。该试验旨在找出最便捷高效的山东栒子基因组 DNA 提取方法, 筛选出高质量的 SRAP 引物, 为验证新发现栒子属植物归属及山东栒子的遗传多样性研究奠定基础。

#### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 试验材料为采自山东泰山、徂徕山、佛峪、红叶谷、鲁山等地的 89 份样品, 采集幼叶后, 立即加入硅胶干燥, 密闭储存于干燥黑暗环境以备备用。

**1.2 试验仪器** 研磨仪, 低温高速离心机, 电泳仪, 水浴锅, 紫外分光光度计, 凝胶成像分析系统。

**1.3 试剂** CTAB 缓冲液(配方见表 1), 氯仿-异戊醇(V:V=24:1), 无水乙醇, 70%乙醇, 1×TE, 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O), NaAc。

表 1 CTAB 提取缓冲液配方

Table 1 The formulation of CTAB buffer solution

序号 No.	试剂 Reagent	用量 Dosage//mL
1	10%PEG 8 000	10
2	1 mol/L Tris-HCl pH 7	10
3	5 mol/L NaCl	28
4	10%CTAB	20
5	500 mmol/L EDTA	4
6	10%SLS(月桂酰肌氨酸钠)	25

注: 用 ddH<sub>2</sub>O 定容, 最终体积为 100 mL

Note: Using dd H<sub>2</sub>O to contant volume, the final volume was 100 mL

#### 1.4 试验方法

**1.4.1 准备工作。**①准备高压蒸汽灭菌离心管、移液器枪头、提取介质、直径 2 mL 的小钢珠等; ②将离心管(2.0、1.5 mL)标好对应标号; ③打开水浴锅预热, 将 CTAB 缓冲液放于水浴锅中水浴预热备用。

**基金项目** 山东省科技创新项目(LYCX01-2018-03); 国家自然科学基金基金项目(31870688)。

**作者简介** 步俊彦(1994—), 女, 山东聊城人, 硕士研究生, 研究方向: 风景园林植物资源与利用。\* 通信作者, 教授, 从事植物分类及植物种质资源研究。

**收稿日期** 2019-01-05; **修回日期** 2019-01-10

**1.4.2 山东栒子 DNA 的提取。**①称取样品 0.2 g 干燥叶片加入到 2 mL 离心管中,再加入 3~5 个 2 mm 直径的小钢珠,盖紧离心管盖子。放入液氮桶中进行预冷。②将研磨机 12 孔圆盘用镊子夹住浸入液氮桶预冷,注意不要没过圆盘上端塑料片。③将预冷后的离心管用镊子加入研磨盘中,以 50 Hz 的频率研磨 5 min,镊子取出磨样盘浸入液氮桶预冷 30 s,继续以 50 Hz 的频率研磨 5 min。④加入预先在 65 °C 水浴锅中预热好的 1 mL CTAB 缓冲液,用振荡器摇匀后水浴 15 min,每 5 min 左右轻轻上下摇匀。⑤取出离心管待冷却至室温后,放入离心机中,并以 12 000 r/min 的转速在常温下离心 15 min。⑥准备新的 2 mL 离心管,写好编号。离心结束后,将离心管取出,抽取上清液共 800  $\mu$ L(少量多次抽取,每次取上清液 200  $\mu$ L,800  $\mu$ L 为上限)于新的 2 mL 离心管内,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),轻轻摇动离心管,直至管内液体上下不分层,即反应液混合均匀。⑦将离心管再次放入离心机中,在低温模式 4 °C 下以 12 000 r/min 的转速离心 10 min,离心结束后观察离心管中间白色蛋白层,如果中间蛋白质较多,需再次利用氯仿-异戊醇再次抽提剩余蛋白质杂质,直至中间白色蛋白层基本消失。⑧准备一支新的 1.5 mL 离心管,编号。将 400  $\mu$ L 上清液用有黄色平底枪头(每次 100  $\mu$ L)转移到 1.5 mL 离心管中。先加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 试剂于上清液中,然后再加入 2 倍体积的 -20 °C 无水乙醇,放入冰箱 -20 °C 保存 1 h 以上待 DNA 凝结析出,再以 12 000 r/min 的转速在低温离心机 4 °C 下离心 3~5 min。舍弃上清液,用约 1 000  $\mu$ L 的 70% 乙醇充分洗涤管底沉淀,轻弹管底使 DNA 与管底脱离以便充分洗涤,但注意不要将 DNA 弹散,轻轻摇动 2~3 次后,静置 5 min,小心倒出乙醇后再重复此步骤 2~3 次,用移液器轻轻将剩余乙醇吸除

后,将离心管开盖在避自然光室温下放置约 3~4 h,或放置于 37 °C 烘箱至烘干。⑩将沉淀于 50  $\mu$ L 的 1 $\times$ TE 内溶解,并储存在 4 °C 冰箱中(如若长期储存需放置在 -20 °C)。

**1.4.3 山东栒子 DNA 质量检测。**针对山东栒子 RNA 难去除的特点,增加 RNAase 用量,延长水浴时间。将 5  $\mu$ L RNAase 加入至提取的 DNA 样品中,轻轻摇匀,将混合好的 DNA 溶液置于 37 °C 水浴锅中水浴 1.5 h,目的在于完全去除 DNA 溶液中的 RNA。

琼脂糖凝胶电泳检测:配制 1% 琼脂糖凝胶,利用 gelred 核酸染料进行染色,凝结为固态胶后将胶置于电泳槽内,将 5  $\mu$ L 除去 RNA 的 DNA 溶液和 1  $\mu$ L Loading Buffer 的混合溶液依次点入琼脂糖凝胶孔中,然后在 120V 电压下电泳 30 min,最后凝胶成像系统中观察、拍照。通过分光光度计检测 DNA 纯度和质量:当  $A_{260/280} < 1.8$ ,表明其可能受到蛋白(芳香族)或酚类等物质的污染,需要进一步纯化样品,当  $A_{260/280} > 2.0$ ,表明其原因可能是最终提取 DNA 产物中 RNA 未去除充分。

**1.4.4 山东栒子 SRAP 分子标记引物筛选。**从佛峪、红叶谷、泰山、徂徕山、鲁山、抱犊崮 6 个地区的栒子基因组 DNA 中各挑选一个质量较高的 DNA 样品,利用引物对其进行扩增。SRAP 引物参照 Li 等<sup>[4]</sup>的方法,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 2)。将上游和下游引物组合搭配共形成 150 对(山东栒子)引物组合,从中筛选出扩增条带较为清晰、丰富、稳定的引物组合,以用于后期试验的正式扩增。在经过多次反应体系试验调试后,确定了稳定性相对较好的 PCR 扩增体系:2 $\times$ EsTaqMasterMix(含染料) 12.5  $\mu$ L, 40 ng/ $\mu$ L DNA 模板 1  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L 引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L。

表 2 用于山东栒子 SRAP 分析的引物序列

Table 2 Primer sequences used in SRAP analyses of *Cotoneaster schantungensis* Klotz.

正向引物 Forward primer	碱基序列 Sequences	反向引物 Reverse primer	碱基序列 Sequences
ME1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	EM3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
ME2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	EM4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
ME3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	EM5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
ME4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	EM6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
ME5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	EM7	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
ME6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	EM8	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3'
ME7	5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	EM9	5'-GACTGCGTACGAATTCCA-3'
ME8	5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	EM10	5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
ME9	5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	EM11	5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3'
ME10	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	EM12	5'-GACTGCGTACGAATTGCC-3'
反向引物 Reverse primer	碱基序列 Sequences	EM13	5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'
EM1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'	EM14	5'-GACTGCGTACGAATTTCAA-3'
EM2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'	EM15	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'

采用 25  $\mu$ L PCR 反应体系,SRAP-PCR 扩增在 Bio-Rad PCR 仪(My Cyclor)上完成。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,进行 5 个循环;94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸

1 min,进行 30 个循环;72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。

SRAP-PCR 扩增结果检测:将 6  $\mu$ L 扩增产物点于被 gelred 核酸染料染色的 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,在 5V/cm 的电压下进行电泳,1.5~2.0 h,电泳完成后,在凝胶成

像分析仪上进行观察并采集图像。

## 2 结果与分析

**2.1 山东栒子基因组 DNA 的提取** 在改良 DNA CTAB 提取法的基础上, 配制了新的综合 CTAB 提取缓冲液, 在提取方法上也做了进一步的改良, 且在一定程度上缩短了 DNA 提取时间, 大大提高了提取效率。琼脂糖凝胶电泳结果(图 1) 显示, DNA 条带清晰, 拖尾轻, 无明显降解, 完整性良好, 表

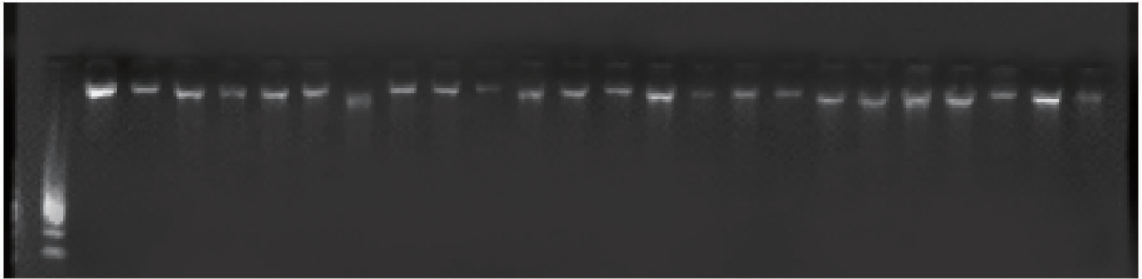


图 1 部分 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 Test results of partial DNA sample agarose gel electrophoresis

**2.2 山东栒子 SRAP 引物筛选** 通过利用 150 对引物对选择出来的 6 份 DNA 材料进行扩增, 并根据二元性状编码法统计扩增出的引物位点。舍弃未扩增出来条带, 或扩增出条带相对较少且多态性条带较少, 或者扩增出条带较多但多态性条带较少的引物, 最终得出 11 对(表 3) 多态性相对较好、条带较为清晰的引物组合, 用于后续的 SRAP 分子标记试验(图 2)。其中扩增出多态性条带数最多的引物组合为 EM4-EM11, 多态性条带共有 14 条, 最少的为 ME8-EM9, 多态性条带仅 6 条; 引物组合 ME4-EM11 多态性最好, 达 93.33%, 多态性最差的为 ME6-EM12, 仅为 43.75%。

表 3 11 对 SRAP 引物序列及其扩增结果

Table 3 Sequences of 11 pairs of SRAP primers and amplification results

引物组合 Primer combination	总条带数 No. of total bands	平均条 带数 No. of average bands	多态性 条带数 No. of polymorphic bands	多态性 比率 Polymorphism rate//%
ME8-EM5	65	10.8	9	64.29
ME8-EM9	44	7.3	6	54.55
ME5-EM15	44	7.3	8	88.89
ME6-EM6	58	9.6	8	61.54
ME6-EM8	56	9.3	9	69.23
ME6-EM12	87	14.5	7	43.75
ME6-EM9	37	6.2	10	76.92
ME4-EM11	66	11.0	14	93.33
ME4-EM12	63	10.5	7	53.85
ME4-EM9	77	12.8	7	46.67
ME4-EM7	73	12.1	9	52.94

## 3 结论与讨论

植物基因组 DNA 的提取质量已成为分子标记试验是否成功的重要因素。由于植物的理化性质不同, 因此需要选择适宜且更加高效便捷的 DNA 提取方法尤为重要<sup>[13]</sup>。由于山东栒子多糖多酚的特点, 其细胞壁较厚难以裂解, DNA 易

明新一代改良 CTAB 法能够更有效、更快速、更便捷地提取濒危植物山东栒子的 DNA。

经检测, 所提取的山东栒子基因组 DNA 的  $A_{260/280}$  在 1.66~1.84, DNA 浓度在 800~2 700 ng/ $\mu$ L, 说明该试验所提取的 DNA 质量和产率均较高, 足够满足 SRAP-PCR 对 DNA 的质量要求。这表明新一代改良 CTAB 提取 DNA 法能够有效地提取质量相对较高的栒子属基因组 DNA。

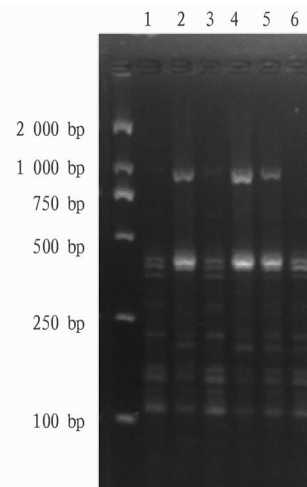


图 2 引物组合 ME6-EM6 对 6 个样品进行 SRAP 引物筛选扩增结果

Fig.2 Primer combination ME6-EM6 for SRAP primer screening amplification results for 6 samples

降解而 RNA 难去除的特点, 难以获得适用于分子标记试验的高纯度、高质量的基因组 DNA, 经过反复试验不断探索后, 在进一步改善了传统使用的改良 CTAB 提取 DNA 方法。选择利用研磨机以高频率充分研磨样品叶片, 加速细胞的裂解, 与普通加液氮利用研钵磨样相比, 研磨机研磨 2 次并增加沁入液氮预冷次数, 使整个研磨过程均能在低温环境下进行, 降低操作和环境的影响, 以保证研磨充分的同时也可以避免 DNA 降解; 提取缓冲液中加入 10% PEG 8000 改变了细胞结构, 增加细胞通透性以加快细胞膜的破裂; 提高 CTAB 浓度以增加 DNA 提取效率; 加入 CTAB 后, 延长水浴时间, 可以重分裂解细胞膜, 使膜内物质完全释放; 增加氯仿-异戊醇抽提的次数, 可以相对减少蛋白质杂质对 DNA 纯度的影响; 用乙醇洗涤沉淀前加入 3 mol/ $\mu$ L 的 NaAc 溶液以去除多糖; 增加 RNAase 用量, 适当延长水浴时间以充分去除

DNA 中的 RNA 杂质。简化了试验操作过程,缩短试验时间,减少了试验过程中 DNA 降解的可能性也在一定程度上提高了试验效率。SRAP 作为一种针对功能序列扩增的分子标记技术,具有简便、稳定、中等产率、易于获得选择条带序列的特点。每个采样种群中均选择一个基因组 DNA 质量较高的样品 DNA,并利用 150 个引物进行筛选,最终确定:2×EsTaq-MasterMix(含染料) 12.5 μL,40 ng/μLDNA 模板 1 μL,10 pmol/μL引物各 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL 的反应体系,筛选出 11 对多态性较好的引物组合,其中多态性最好的为 ME4~EM11,多态性高达 93.33%,多态性最差的为 ME6~EM12,多态性仅为 43.75%。

该研究表明,新一代改良的 CTAB 提取方法在针对多糖多酚多杂质的植物基因组 DNA 的提取上具有良好可行性;SRAP 分子标记引物筛选试验研究结果表明,SRAP 分子标记在柃木属植物遗传多样性分析研究中效果较好,为山东柃木甚至柃木属的分子学研究奠定良好基础。

#### 参考文献

[1] 杨海平,张锋,姚树建,等.山东柃木光合特性的研究[J].山东林业科技,2017,47(4):44-46,54.

- [2] 屈素青.珍稀树种山东柃木和野生玫瑰种质资源调查与评价[D].泰安:山东农业大学,2013.
- [3] 林榕燕,钟淮钦,黄敏玲,等.文心兰 EST-SSR 标记的开发及其在遗传多样性分析中的应用[J].分子植物育种,2016,14(11):3113-3119.
- [4] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical and applied genetics, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [5] AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. Plant cell reports, 2008, 27(4): 617-631.
- [6] 杨迎花,李先信,曾柏全,等.新型分子标记 SRAP 的原理及其研究进展[J].湖南农业科学,2009(5):15-17,20.
- [7] 林忠旭,张献龙,聂以春,等.棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J].科学通报,2003,48(15):1676-1679.
- [8] 李严,张春庆.西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析[J].园艺学报,2005,32(4):643-647.
- [9] 李丽,郑晓鹰,柳李旺.用 SRAP 标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种[J].分子植物育种,2006,4(5):702-708.
- [10] 李仁伟,王晨,戴思兰,等.菊花品种表型性状与 SRAP 分子标记的关联分析[J].中国农业科学,2012,45(7):1355-1364.
- [11] 闫玖英,马长青,常博,等.改良 CTAB 法用于苹果果实基因组 DNA 的提取[J].分子植物育种,2017,15(9):3610-3615.
- [12] 许超,曲勤凤,顾文佳,等.几种提取转基因木瓜 DNA 方法的比较[J].食品安全质量检测学报,2016,7(4):1531-1534.
- [13] 魏明钰,王博,侯殿雅,等.四种不同提取方法提取大豆基因组的比较[J].农业开发与装备,2018(4):97,164.

(上接第 88 页)

中 IFN- $\gamma$  含量无明显影响。这提示芒柄花黄素可以增强机体体液免疫应答能力,而这种调节作用可能是通过上调 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌,从而增加脾细胞 IgG 类抗体的合成而实现的,而芒柄花黄素对实验小鼠细胞免疫无影响。

综上所述,芒柄花黄素可以提高实验小鼠巨噬细胞的吞噬功能,促进溶菌酶的合成与分泌,增强小鼠的固有免疫功能。同时,芒柄花黄素还可以通过抑制脾细胞凋亡、增强脾细胞转化增殖能力,提高 Th1 型细胞因子 IL-4 的分泌水平,从而促进 B 细胞 IgG 类抗体的合成,提高机体的体液免疫功能。然而,芒柄花黄素对机体细胞免疫功能无明显影响。

#### 参考文献

- [1] 姜慈静,吴秋慧,任倩瑶,等.芒柄花黄素对大鼠局部脑缺血再灌注损伤保护作用的初步研究[J].中国医药导报,2017,14(32):8-10,14.
- [2] PARK S, BAZER F W, LIM W, et al. The O-methylated isoflavone, formononetin, inhibits human ovarian cancer cell proliferation by sub G0/G1 cell phase arrest through PI3K/AKT and ERK1/2 inactivation [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(9):7377-7387.
- [3] 张幸,梁梅花,黄文君,等.芒柄花黄素诱导膀胱癌细胞凋亡作用[J].中国公共卫生,2015,31(3):314-317.
- [4] 董陈斌,钟漓,张广钰,等.芒柄花黄素对人胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠

- 模型的抑制作用及机制研究[J].重庆医学,2016,45(32):4482-4483,4486.
- [5] 梁馨元,韦珊珊,李礼顺,等.芒柄花黄素对小鼠体内 SOD、MDA、GSH-Px 和 BUN 的影响[J].湖北科技学院学报(医学版),2017,31(3):188-190.
- [6] 王昌明,刘婷,李鹤,等.铁箍散乳膏对大鼠皮肤疮疡的药效学研究[J].中南药学,2015,13(2):136-140.
- [7] 田强,冯香芝,杨雨敏,等.鹅脾混合多肽对小鼠非特异性免疫功能的影响[J].医药导报,2015,34(2):158-161.
- [8] 杨朝晖,秦红兵,成海龙,等.麋鹿角醇提液对衰老小鼠行为及免疫功能的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(2):221-225.
- [13] 华慧,张波,李向阳,等.华支睾吸虫脂肪酸结合蛋白 CsFABP 对巨噬细胞免疫功能的影响[J].中国病原生物学杂志,2017,12(11):1058-1061,1065.
- [14] 吴婷,周武雄.肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(2):265-267,271.
- [15] 沈芄.溶菌酶抗菌作用及其在防控医院感染中的应用[J].中国消毒学杂志,2014,31(10):1089-1091.
- [16] 沙爱龙,孟庆艳,郝海燕.小雁塔花水提物对小鼠镇静催眠及免疫功能的影响[J].现代食品科技,2016,32(5):22-26,39.
- [17] 张振宇,黄衍松,李伟冰,等.慢性乙型肝炎中医证型与患者细胞免疫功能关系研究[J].中西医结合肝病杂志,2018,28(1):8-10.
- [18] 蔡琨,王晓敏,张波,等.仙茅多糖对环磷酰胺所致免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(12):5030-5034.
- [19] 阿孜古丽·阿布都热合曼,韩玉明.肝癌患者血清 Th1/Th2 相关因子与免疫功能的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(6):737-741.