

基于重组酶介导等温扩增技术的广州管圆线虫核酸检测方法的建立

张强¹, 丁昕¹, 刘燕红², 刘剑峰¹, 徐祥珍¹, 应清界², 戴洋^{1*}, 曹俊^{1,3}

[摘要] **目的** 建立一种基于重组酶介导等温扩增技术(RAA)的广州管圆线虫核酸检测方法。**方法** 选择广州管圆线虫内转录间隔区1(*ITS1*)基因序列作为靶基因序列,设计、合成并筛选出特异性最强的引物和探针,构建用于广州管圆线虫核酸检测的基础及荧光RAA检测方法。分别以含检测靶基因片段序列的不同拷贝数重组质粒以及不同浓度广州管圆线虫基因组DNA为模板进行荧光RAA扩增,评价其检测敏感性;分别以广州管圆线虫、曼氏血吸虫、似蚓蛔线虫、华支睾吸虫、细粒棘球绦虫、十二指肠钩口线虫及小管福寿螺和藁杆双脐螺螺体基因组DNA为模板进行荧光RAA扩增,评价其检测特异性。**结果** 成功建立了用于广州管圆线虫核酸检测的荧光RAA法,该方法可在37℃ 20 min内对广州管圆线虫特异性DNA片段实现实时扩增。以含靶基因片段序列的不同拷贝数重组质粒和不同浓度广州管圆线虫基因组DNA为模板时,该法最低检出限分别为10拷贝/μL重组质粒和100 pg/μL基因组DNA;以曼氏血吸虫、似蚓蛔线虫、华支睾吸虫、细粒棘球绦虫、十二指肠钩口线虫及小管福寿螺和藁杆双脐螺螺体基因组DNA为模板,检测结果均为阴性。**结论** 成功建立了一种可用于广州管圆线虫核酸检测的荧光RAA法,其检测简便快速,具备较好的敏感性和特异性。

[关键词] 广州管圆线虫;等温扩增;重组酶;核酸检测;检测效能

[中图分类号] R383.19 **[文献标识码]** A

Establishment of a recombinase-aided isothermal amplification technique (RAA) for nucleic acid detection of *Angiostrongylus cantonensis*

ZHANG Qiang¹, DING Xin¹, LIU Yan-Hong², LIU Jian-Feng¹, XU Xiang-Zhen¹, YING Qing-Jie², DAI Yang^{1*}, CAO Jun^{1,3}

1 National Health Commission Key Laboratory of Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; 2 Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ltd., China; 3 Public Health Research Center, Jiangnan University, China

* Corresponding author

[Abstract] **Objective** To establish a recombinase-aided isothermal amplification technique (RAA) for the nucleic acid detection of *Angiostrongylus cantonensis*. **Methods** The internal transcribed spacer-1 (*ITS1*) gene sequence of *A. cantonensis* was used as the detection target sequence, and the specific primers and probes were designed and synthesized, followed by screening of the primers and probes with the highest specificity, to establish the basic and fluorescent RAA assay for nucleic acid detection of *A. cantonensis*. The sensitivity of the fluorescent RAA assay was evaluated by using the target gene fragment sequence-contained recombinant plasmids at various copy numbers and the genomic DNA from *A. cantonensis* as the template DNA samples, and the specificity of the fluorescent RAA assay was evaluated by using the genomic DNA from *A. cantonensis*, *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Clonorchis sinensis*, *Echinococcus granulosus* and *Ancylostoma duodenale*, as well as *Pomacea canaliculata* and *Biomphalaria straminea* snail tissues as the template DNA samples. **Results** A fluorescent RAA assay was successfully established for nucleic acid detection of *A. cantonensis*, which achieved real-time amplification of the specific DNA fragment of *A. cantonensis* within 20 min at 37℃. By using the target gene fragment sequence-contained recombinant plasmids at various copy numbers and the genomic DNA from *A. cantonensis* as the DNA templates, the lowest detection limits of the fluorescent

[基金项目] 江苏省“科教强卫工程”项目(ZDXKA2016016);省属公益类科研院所自主科研项目(BM2018020);江苏省青年医学人才项目(QN-RC2016622)

[作者单位] 1 国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室、江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室、江苏省血吸虫病防治研究所(无锡 214064);2 江苏省奇天生物科技有限公司;3 江南大学公共卫生研究中心

[作者简介] 张强,男,硕士,医师。研究方向:寄生虫病防治

* 通信作者 E-mail:15951581011@163.com;ORCID:0000-0003-1489-9080

[数字出版日期] 2020-07-03 10:03

[数字出版网址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20200701.1629.002.html>

RAA assay were 10 copies/ μ L of recombinant plasmids and 100 pg/ μ L of genomic DNA, respectively. The fluorescent RAA assay was negative for detection of the genomic DNA from *A. cantonensis*, *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *C. sinensis*, *E. granulosus*, *A. duodenale*, and *P. canaliculata* and *B. straminea* snail tissues. **Conclusion** A simple, rapid fluorescent RAA assay has been successfully established, which has a high sensitivity and specificity for the nucleic acid detection of *A. cantonensis*.

[Key words] *Angiostrongylus cantonensis*; Isothermal amplification; Recombinase; Nucleic acid detection; Detection efficiency

广州管圆线虫病是一种由广州管圆线虫幼虫感染人体引起的一种食源性寄生虫病,人体主要因食入含Ⅲ期感染性幼虫的中间宿主或转续宿主而感染^[1],人体感染广州管圆线虫后主要表现为以嗜酸性粒细胞浸润为主的中枢神经系统炎症反应,重度感染时可致患者死亡^[2]。自2000年以来,广州管圆线虫病已经在我国多地相继发现并造成暴发流行,严重威胁人体健康,受到社会各界广泛关注^[3-6]。

传统病原学检测是目前广州管圆线虫病诊断的金标准,在患者脑脊液或者眼底中发现虫体即能确诊该病,但是由于虫体数量少、分布密度低以及虫体可在人体内移行等原因,使得虫体检出率不高^[7]。酶联免疫吸附试验(ELISA)等免疫学诊断技术是目前用于广州管圆线虫病检测的最常用方法,具有良好的特异性和敏感性;但免疫学方法存在不能良好鉴别现症和既往感染且经常出现假阳性、假阴性甚至交叉反应等不足^[8]。采用螺肺检法、人工消化法检测中间宿主螺体内幼虫操作简便、成本低廉,但对于幼虫鉴定人员要求较高,且操作花费时间较长,不适用于现场快速检测^[9]。PCR技术是一种快速扩增特定基因或DNA序列的分子生物学技术,已广泛应用于广州管圆线虫检测^[10],但由于PCR技术检测成本较高、操作繁琐以及检测时间较长等限制了其在现场大规模应用^[11]。因此,研发方便、快捷、敏感、特异且性价比比较高的广州管圆线虫检测方法是目前研究的重点。

重组酶介导的等温扩增技术(Recombinase-aided isothermal amplification, RAA)是一种可在恒温条件下(一般37~42℃)对核酸快速扩增及检测(一般5~20 min)的新型等温核酸扩增方法^[12]。该方法操作方便快捷、引物设计简单且具有高性价比,已成功应用于多种寄生虫核酸检测^[13-15]。本研究针对广州管圆线虫特异性核酸序列建立基于RAA的核酸检测技术,旨在为广州管圆线虫检测提供一种新方法。

材料与方法

1 材料

1.1 样本来源 含有广州管圆线虫Ⅲ期幼虫的藁杆双脐螺和无寄生虫感染阴性藁杆双脐螺由中山大学吴忠道教授馈赠。Ⅲ期幼虫分离采用人工消化法^[9],

分离幼虫后-80℃保存备用。曼氏血吸虫成虫、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫成虫、十二指肠钩口线虫钩蚴和细粒棘球绦虫幼虫均由江苏省寄生虫病防治研究所保存。小管福寿螺采自江苏省靖江市。

1.2 主要仪器 PCR仪和离心机为Eppendorf公司产品;NanoDrop 2000核酸蛋白浓度测定仪购自Thermo Scientific公司;QT-RAA-F1620便携式恒温核酸检测仪和QT-RAA-B6100恒温震动混匀仪购自江苏奇天基因生物科技有限公司;-80℃超低温冰箱为海尔公司产品;CryoMill全自动冷冻研磨仪由Verder Retsch公司提供。

1.3 主要试剂 RAA核酸扩增反应单元为江苏奇天基因生物公司产品;QIAamp PowerFecal粪便微生物DNA提取试剂盒与DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒购自凯杰企业管理有限公司;质粒抽提试剂盒为Promega公司产品;琼脂糖由北京索莱宝科技有限公司提供;100 bp DNA Ladder由MBI公司提供。

2 方法

2.1 核酸提取 采用QIAamp PowerFecal粪便微生物DNA提取试剂盒提取似蚓蛔线虫虫卵DNA,采用DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒提取华支睾吸虫成虫、曼氏血吸虫成虫、十二指肠钩口线虫钩蚴、细粒棘球绦虫幼虫DNA,操作按试剂盒说明书进行。吸取广州管圆线虫Ⅲ期幼虫,置全自动研磨仪中进行液氮冷冻研磨,所得产物采用DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒提取DNA;藁杆双脐螺和小管福寿螺压碎后取螺体组织,PBS清洗3遍后剪碎,采用DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒提取螺体组织DNA。所有提取的DNA样本测定浓度后置-80℃冰箱保存备用。

2.2 RAA方法的建立

2.2.1 靶基因特异性序列筛选及引物和探针设计 选择广州管圆线虫内转录间隔区1(*ITS1*)基因作为检测靶基因,在GenBank数据库中检索*ITS1*全基因序列(GenBank登录号:GU733321)。应用DNAMAN 7.0软件进行同源性分析,筛选出广州管圆线虫高度保守序列作为本研究RAA检测靶标,该保守序列长度为174 bp。根据RAA引物探针设计原理,应用Amplifx软件设计合成,并筛选获得最优上(5'-TACGATC-

GATGATGTAGTGGTGGGTGGGTGGTTG-3')、下游引物(5'-TAGCGACATAGCCGCCAAATTATCATCAC-CATC-3')及探针序列(5'-TGTGATCAACAACGAGA-AACCACCAACACATATACACGTTTCACCTAGT-3',第31位碱基修饰荧光报告基团,第33位碱基修饰淬灭基团,第32位碱基修饰四氢呋喃残基)。上述RAA引物及荧光探针均由上海生工生物工程有限公司合成。

2.2.2 RAA基础反应体系的建立 按RAA反应原理设计、构建基础反应体系,总反应体系为50 μ L。其中反应缓冲液25 μ L、ddH₂O 17.5 μ L、正向引物(0.1 mmol/L)2 μ L、反向引物(0.1 mmol/L)2 μ L,将上述溶液混匀后加到RAA反应单元冻干粉中复溶,手指轻轻弹匀,然后在盖子中加入2.5 μ L乙酸镁溶液(280 mmol/L),最后在混合溶液中加入1 μ L广州管圆线虫基因组DNA(9 ng/ μ L)。置恒温震动混匀仪中,37 $^{\circ}$ C条件下反应30 min,反应结束后向扩增产物中加入50 μ L 1:1 酚/氯仿,振荡混匀,12 000 $\times g$ 离心(离心半径15 cm)1 min,取10 μ L上层溶液进行1%琼脂糖凝胶电泳(100 V,60 min),于紫外灯下观察扩增结果。

2.2.3 荧光RAA反应体系的建立 按RAA荧光检测原理,构建荧光RAA反应体系,总反应体系为50 μ L,其中25 μ L反应缓冲液、15.7 μ L ddH₂O、2.1 μ L正向引物(420 nmol/L)、2.1 μ L反向引物(420 nmol/L)、0.6 μ L荧光探针(120 nmol/L),混匀后加到RAA反应单元冻干粉中复溶,手指轻轻弹匀,瞬时离心后,在盖子中加入2.5 μ L醋酸镁溶液(280 mmol/L),最后加入2 μ L广州管圆线虫基因组DNA。置于震荡混匀仪中充分混匀后,置于恒温核酸检测仪中37 $^{\circ}$ C反应20 min,每20 s采集1次荧光值。反应结束后,根据荧光信号斜率值(K值)判定反应结果,其中K值 ≥ 20 判定为阳性,K值 < 20 判定为阴性。

2.3 荧光RAA法敏感性评价

2.3.1 以含广州管圆线虫特异性基因序列的不同拷贝数重组质粒为模板 以上述靶基因序列TA克隆入质粒载体(pGEM-T),转化入大肠埃希菌DH5 α 培养后提取质粒,采用核酸蛋白浓度测定仪进行浓度测定并进行拷贝数计算,并梯度稀释至10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10 拷贝/ μ L的检测样品,分别以此为模板进行荧光RAA扩增,评价其检测灵敏度。

2.3.2 以不同浓度广州管圆线虫基因组DNA为模板

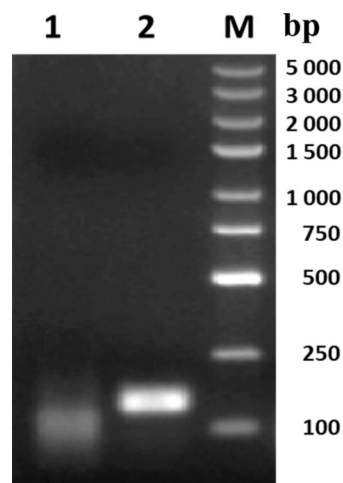
提取广州管圆线虫基因组DNA,浓度为9 ng/ μ L,分别对其进行9、90、900倍梯度稀释后获得不同浓度DNA模板样本,以此为模板进行荧光RAA扩增,评价其检测敏感性。

2.4 荧光RAA法特异性评价 分别以广州管圆线虫III期幼虫、曼氏血吸虫成虫、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫成虫、细粒棘球绦虫幼虫、十二指肠钩口线虫钩蚴以及藁杆双脐螺、小管福寿螺螺体组织基因组DNA为模板,进行荧光RAA扩增,评价其检测特异性。

结 果

1 以广州管圆线虫基因组DNA为模板的基础RAA扩增结果

以广州管圆线虫基因组DNA为模板进行基础RAA扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后置紫外灯下观察,可见一大小约140 bp的清晰特异性条带(图1)。



注:1 阴性对照;2 广州管圆线虫基因组DNA;M DNA分子质量标志物

Note: 1 Negative control; 2 *A. cantonensis* genomic DNA; M DNA molecular marker

图1 广州管圆线虫基因组DNA的RAA扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RAA amplification products of *A. cantonensis* genomic DNA

2 以广州管圆线虫基因组DNA为模板的荧光RAA扩增结果

以广州管圆线虫基因组DNA为模板进行荧光RAA扩增,进行了重复2次实验,结果均显示在5 min内即开始出现阳性扩增(图2),而阴性对照无扩增。

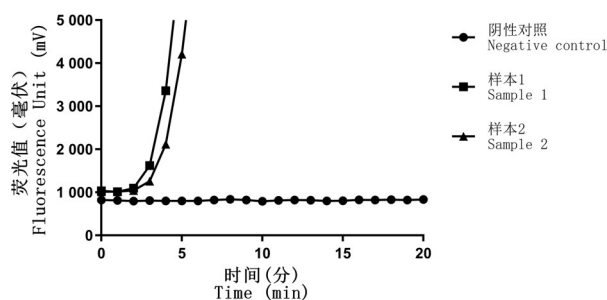
3 荧光RAA法检测敏感性

3.1 以含广州管圆线虫特异性基因序列的不同拷贝数重组质粒为模板 重组质粒拷贝数越低,荧光RAA信号起峰时间逐渐延长,10 拷贝/ μ L重组质粒依然可以检测到荧光信号(图3)。结果表明,荧光RAA法的最低检出限为10 拷贝/ μ L重组质粒,且在5 min

内即可出现阳性扩增。

3.2 以不同浓度广州管圆线虫基因组 DNA 为模板

随着基因组 DNA 浓度的降低,荧光 RAA 信号起峰时间逐渐延长;当广州管圆线虫基因组 DNA 浓度稀释至 100 pg/ μ L 时,10 min 内仍可出现阳性扩增(图 4),表明检测灵敏度可达 100 pg/ μ L。



注:样本 1、2 均为广州管圆线虫基因组 DNA

Note: Samples 1 and 2 are both *A. cantonensis* genomic DNA

图 2 以广州管圆线虫基因组 DNA 为模板的荧光 RAA 扩增结果

Fig. 2 Fluorescent RAA amplification using *A. cantonensis* genomic DNA as templates

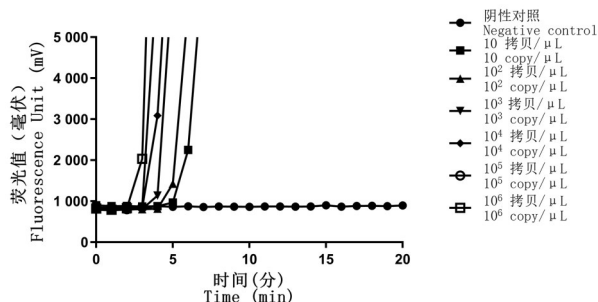


图 3 以不同拷贝数重组质粒为模板的荧光 RAA 法检测结果

Fig. 3 Fluorescent RAA assay using different copy numbers of recombinant plasmids as templates

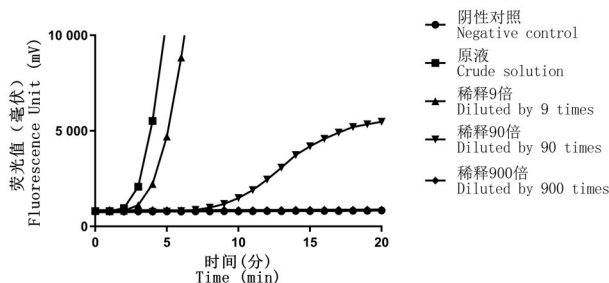


图 4 以不同浓度基因组 DNA 为模板的荧光 RAA 法检测结果

Fig. 4 Fluorescent RAA assay using different concentrations of genomic DNA as templates

4 荧光 RAA 法检测特异性

广州管圆线虫 III 期幼虫基因组 DNA 在 5 min 内即可出现明显阳性扩增,而曼氏血吸虫成虫、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫成虫、细粒棘球绦虫幼虫、十二指肠钩口线虫钩蚴以及藁杆双脐螺、小管福寿螺螺体组织基因组 DNA 均无荧光值出现(图 5),表明荧光 RAA 法检测广州管圆线虫具有良好特异性。

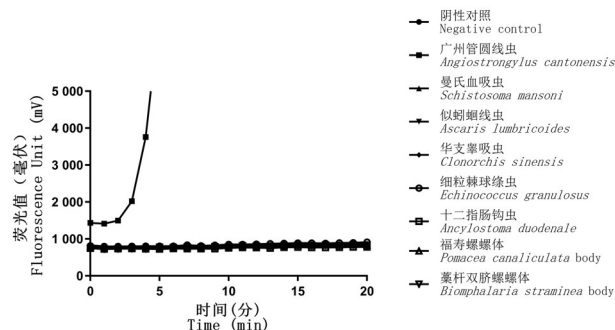


图 5 荧光 RAA 法检测特异性

Fig. 5 Specificity of fluorescent RAA assay

讨 论

病原学技术依然是用于中间宿主和转续宿主体内广州管圆线虫幼虫检测的“金标准”,常用方法包括螺肺检法、人工消化法、匀浆法等^[9]。螺肺检法和人工消化法对现场检测设备及环境条件要求低,但前者检出率较低,同时取螺肺过程也有一定操作难度;而后者操作过程多、检测耗时较长,故容易发生漏诊^[9]。近年来,建立的环介导等温核酸扩增法(LAMP)克服了传统 PCR 技术反应时间长、结果读取繁琐、仪器设备昂贵的缺陷,具有操作简便、检测快速等优点,已用于广州管圆线虫检测,但该技术需设计多对引物同时假阳性问题也比较严重^[16]。本研究建立的荧光 RAA 检测技术具有完全自主知识产权,可以在 37℃ 恒温条件下实现核酸快速扩增,具备操作简单、价格实惠、反应快速以及实时观察获取结果等优势。但该方法能否用于人体广州管圆线虫感染检测有待进一步研究。

既往研究显示,ITS 序列可作为分子遗传标记物用于鉴定广州管圆线虫^[17]。柯艳坤等^[18]针对广州管圆线虫 ITS 基因序列设计引物,应用实时荧光 PCR 和高分辨率溶解曲线法成功检出广州管圆线虫 III 期幼虫。刘春艳等^[16]以广州管圆线虫 ITS1 基因序列设计引物,成功建立了检测玛瑙螺中广州管圆线虫的 LAMP 法。本研究选取广州管圆线虫 ITS1 基因筛选出高度保守片段并成功设计特异性引物和探针,建立

了广州管圆线虫实时荧光 RAA 反应体系,分别以含广州管圆线虫特异性基因序列的不同拷贝数重组质粒和不同浓度广州管圆线虫基因组 DNA 为模板对该方法进行敏感性评价,发现荧光 RAA 法检测灵敏度可分别达到 10 拷贝/ μL 重组质粒和 100 pg/ μL 基因组 DNA。危芙蓉等^[19]建立的多重 PCR 法可检测出广州管圆线虫 III 期幼虫 DNA 的最低浓度为 120 pg/ μL ,魏纪玲等^[10]建立的 PCR 法检测广州管圆线虫 III 期幼虫 DNA 的灵敏度为 1 ng/ μL 。本研究建立的广州管圆线虫荧光 RAA 检测方法灵敏度略高于既往报道的 PCR 检测技术^[10,19];以曼氏血吸虫成虫、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫成虫、细粒棘球绦虫幼虫、十二指肠钩口线虫钩蚴以及藁杆双脐螺、小管福寿螺螺体组织基因组 DNA 为模板,扩增结果均为阴性,提示该方法具有较高特异性。后续将提取含有广州管圆线虫幼虫螺体 DNA 或实验室模拟 DNA 样本进行荧光 RAA 检测,进一步评价及检测效能,从而来提升其实际应用价值。受样本所限,本研究未对荧光 RAA 法检测福寿螺和藁杆双脐螺体内其他寄生虫的特异性进行评价,这有待于进一步研究。

综上所述,本研究成功建立了一种可应用于广州管圆线虫 III 期幼虫检测的荧光 RAA 法,该方法能够在 37 ℃ 恒温条件下短时间内完成检测,具有简便、快速、灵敏、特异以及引物探针设计方便等优点,为广州管圆线虫感染监测提供了一种新的技术手段。后续将开展福寿螺等中间宿主样本中广州管圆线虫检测的评价研究,为该方法的现场应用提供基础数据。

【参考文献】

- [1] Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, et al. Human angiostrongyliasis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(10): 621-630.
- [2] 廖瑶,孙希,吴忠道. 广州管圆线虫感染致病机制的研究进展 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(1): 98-102.
- [3] 薛大燕,阮云洲,林宝楚,等. 温州市一起广州管圆线虫病暴发流行的调查 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2000, 18(3): 176-178.
- [4] 林金祥,李友松,朱凯,等. 长乐市广州管圆线虫集体感染的流行病学研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2002, 21(2): 110-112.
- [5] 杨发柱,张璧珍,屠昭平,等. 一起疑为食用螺肉引起的广州管圆线虫病暴发调查 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2004, 10(1): 44-45.
- [6] 陈凤,陈绍荣,李科荣,等. 大理市 1 起食用螺肉引起的广州管圆线虫病暴发调查 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2012, 23(6): 687-690.
- [7] 诸欣平,苏川. 人体寄生虫学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 186-188.
- [8] 王涵,申丽洁,李伟. 广州管圆线虫病免疫诊断研究进展 [J]. *国际医学寄生虫病杂志*, 2011, 38(2): 113-118.
- [9] 刘和香,张仪,吕山,等. 三种方法检测福寿螺肺囊内广州管圆线虫效果的比较研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(1): 53-56.
- [10] 魏纪玲,周卫川,邵碧英,等. PCR 检测螺类感染广州管圆线虫方法的建立与应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(12): 1136-1140.
- [11] Saucier C, da Silva AJ, Eamsobhana P. The current status of laboratory diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infections in humans using serologic and molecular methods [J]. *Hawaii J Med Public Health*, 2013, 72(6 Suppl 2): 55-57.
- [12] 李婷,杨坤. 等温扩增技术在寄生虫及其他病原体检测中的应用 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2018, 30(2): 232-236.
- [13] 李婷,刘燕红,赵松,等. 重组酶介导的核酸等温扩增荧光法快速检测日本血吸虫感染性钉螺 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(2): 109-114, 120.
- [14] 倪碧娴,吴小珉,刘燕红,等. 重组酶介导的隐孢子虫属特异性等温核酸扩增方法的建立及评价 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(4): 388-392.
- [15] 张强,丁昕,吴小珉,等. 重组酶介导的华支睾吸虫特异性核酸等温扩增方法的建立及初步评价 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(5): 468-473.
- [16] 刘春艳. 广州管圆线虫线粒体和核糖体 DNA 变异的研究及 LAMP 检测方法的建立 [D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [17] Lv S, Zhang Y, Steinmann P, et al. The genetic variation of *Angiostrongylus cantonensis* in the People's Republic of China [J]. *Infect Dis Poverty*, 2017, 6(1): 125.
- [18] 柯艳坤,黄裕,葛秀清,等. 高分辨率熔解曲线法检测广州管圆线虫幼虫的初步研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2014, 32(6): 452-454.
- [19] 危芙蓉,刘和香,吕山,等. 用多重 PCR 技术检测小管福寿螺体内广州管圆线虫幼虫 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2010, 28(5): 355-358.

【收稿日期】 2020-03-23 【编辑】 汪伟