

DOI:10.13350/j.cjpb.221210

• 论著 •

# 山羊无形体可视化等温扩增法的建立与应用\*

任晴<sup>1</sup>, 薛晶<sup>1</sup>, 杜雯英<sup>1</sup>, 王蒋丽<sup>2</sup>, 郭文平<sup>1</sup>, 谢广成<sup>1\*\*</sup>

(1. 承德医学院病原生物学教研室, 河北承德 067000; 2. 承德市疾病预防控制中心)

**【摘要】** 目的 山羊无形体(*Anaplasma capra*)是无形体属中近年来新发现的一种人兽共患无形体,可引起无形体病,严重威胁人类的健康。建立一种适用于现场快速检测山羊无形体的可视化环介导等温扩增(LAMP)方法,对无形体病的诊断与防控有重要意义。方法 用聚合酶链式反应(PCR)扩增山羊无形体的 *mosp2* 基因,构建重组质粒。利用在线引物设计软件设计 LAMP 引物,优化其反应条件和反应体系;加入一定浓度的钙黄绿素,建立可视化 LAMP 方法,评价其敏感性和特异性,并与 PCR 方法比较。结果 建立的可视化 LAMP 反应可准确检测山羊无形体的重组质粒和样品中的山羊无形体基因,且与其他无形体发生交叉反应,最低检测限为 1 copy/ $\mu$ L,比 PCR 方法的灵敏度高 100 倍。用该方法检测已知山羊无形体阳性蜱的总 DNA,结果均为阳性;检测承德市野外采集的蜱标本,山羊无形体阳性率为 16.1%,PCR 方法的阳性率为 12.5%。结论 建立的可视化 LAMP 方法敏感性、特异,操作简单、快捷,可用于人感染山羊无形体的早期检测与蜱携带无形体的监测。

**【关键词】** 山羊无形体;环介导等温扩增;可视化

**【中图分类号】** R37

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)12-1415-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Dec;17(12):1415-1419.]

## Establishment and application of visual loop-mediated isothermal amplification of *Anaplasma capra*

REN Qing<sup>1</sup>, XUE Jing<sup>1</sup>, DU Luan-ying<sup>1</sup>, WANG Jiang-li<sup>2</sup>, GUO Wen-ping<sup>1</sup>, XIE Guang-cheng<sup>1</sup> (1. Department of Pathogenic Biology, Chengde Medical University, Chengde 06700, Hebei, China; 2. Chengde Center for Diseases Control and Prevention) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** *Anaplasma capra* is a newly discovered zoonotic *Anaplasma* species in recent years, which can cause human anaplasmosis, and seriously threaten human health. Hence, it's important to develop a visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the rapid and on-site detection of *A. capra*, which is very significant for the diagnosis, prevention and control of anaplasmosis. **Methods** The *mosp2* gene of *A. capra* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) to construct the recombinant plasmid. LAMP primers were designed by primer explorer software 5.0. The LAMP reaction conditions and reaction system were optimized, and calcein was added to establish the visual LAMP method. All available *mosp2* gene sequences of *A. capra* were downloaded from the GenBank database. All the LAMP primer sequences were aligned with the *mosp2* gene sequences to ensure that the primers were located at the conserved region. The sensitivity was evaluated using a 10-fold ratio dilution plasmid as a template, and the specificity was evaluated by detecting *A. capra* in collected ticks. **Results** The established visual LAMP reaction can accurately detect the recombinant plasmid containing the *mosp2* gene. The detection limit of the LAMP assay established in this study can reach up to 1 copy/ $\mu$ L, which is 100 times more sensitive than the PCR method. The established visual LAMP can accurately detect the positive tick sample of *A. capra* without cross-reaction with other members in the genus. The total DNA of forty known *A. capra*-positive ticks was detected by this LAMP method, and the results showed that all the samples tested positive for *A. capra*. This method was used to detect the *A. capra* infection in ticks collected in Chengde, the results showed that the positive rate was 16.1% (31/192), higher than the positive rate of 12.5% (24/192) detected by the PCR method. **Conclusion** Totally, the established visual LAMP method can detect *A. capra* sensitively and specifically, which is simple and rapid to use for early detection of human infection with *A. capra* and surveillance of its infection in ticks.

**【Key words】** *Anaplasma capra*; loop-mediated isothermal amplification; visualization

\* **【基金项目】** 河北省高等学校青年拔尖人才计划项目(No. BJ2020024);承德医学院高层次人才科研启动基金项目(No. 202001);2021年度医学科学研究课题计划项目(No. 20210234)。

\*\* **【通讯作者】** 谢广成, E-mail: xieguangcheng123@126.com; 郭文平, E-mail: guowenping1984@sina.com

**【作者简介】** 任晴(1998-),女,河南商丘人,在读研究生。研究方向:蜱携带病原体。E-mail:1612195785@qq.com

无形体(*Anaplasma*)属于立克次体目(Rickettsiales)无形体科(Anaplasmataceae),严格细胞内寄生,革兰染色阴性,传播媒介为蜱,可引起人兽共患无形体病。现已发现对人致病的无形体包括嗜吞噬细胞无形体(*A. phagocytophilum*)、绵羊无形体(*A. ovis*)、和山羊无形体(*A. capra*)<sup>[1]</sup>。山羊无形体是近年来新发现的一种人兽共患无形体,2015年曹务春等<sup>[2]</sup>首次报道了我国黑龙江省人感染山羊无形体的病例,临床表现为高烧、头痛、不适、头晕和肌肉疼痛等症状,很难依据临床特征与其他急性发热性疾病区分。迄今为止,我国已经在黑龙江省、山东省、四川省、广西省和甘肃省甘南藏族自治州等地的蜱中发现了山羊无形体,携带山羊无形体的蜱种包括全沟血蜱、长角血蜱和青海血蜱<sup>[3-4]</sup>。由于长角血蜱在我国分布广泛<sup>[5]</sup>,推测以该蜱作为主要传播媒介的山羊无形体在我国的分布也十分广泛,因此对山羊无形体的研究倍受关注<sup>[6]</sup>。

随着分子生物学的发展,目前已有聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)、巢氏 PCR、荧光定量 PCR、实时荧光定量 PCR 等运用到传染病病原体的诊断中<sup>[7]</sup>。这些检测方法虽具有灵敏度高、特异性强等优点,但大多需要昂贵的专业仪器设备,不适合现场检验。因此,建立一种经济、高效、灵敏、直观的诊断方法对无形体病的防控很有必要。2000年,Notomi等<sup>[8]</sup>研发出了一种新的分子检测技术,称为环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。与传统的检测方法比较, LAMP 具有高特异性、高灵敏度、快速直观等优点,适合基层医疗机构与现场检验。近年来 LAMP 技术凭借其优势在医疗卫生与环境现场检测等方面得到广泛应用<sup>[9-10]</sup>。本研究主要针对山羊无形体的保守基因 *msp2* 设计一对具有特异性的 LAMP 引物,优化 LAMP 的反应条件与体系,并检验该方法的特异性和灵敏度,以期建立一种特异、灵敏和可视化的用于检测山羊无形体感染的 LAMP 方法。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 蜱标本来源** 从承德市野外采集蜱 192 只,收集到离心管中,记录采集点、采集日期等信息。绵羊无形体、中央无形体、边缘无形体、牛无形体、山羊无形体的阳性蜱 DNA 样品均为本实验室测序验证并留存。

**1.2 主要试剂** Bst 3.0 DNA Polymerase, 10 × ThermoPol Buffer 和 MgSO<sub>4</sub> 购自美国 New England Biolabs(NEB)公司;钙黄绿素和甜菜碱购自美国 Sigma 公司;dNTP 购自北京天根生化科技有限公司;Taq PCR Mix 购自北京聚合美生物科技有限公司;

Plasmid Mini Kit I D6943 和 Tissue DNA Kit D3396 购自美国 OMEGA 生物技术公司。

### 2 方法

**2.1 LAMP 及 PCR 引物的设计与合成** 在 GenBank 数据库中检索山羊无形体 *msp2* 基因序列(GenBank:LC432266),通过 Clustal 软件比对分析,选取特异的保守片段。通过在线 Primer Explorer V5(<http://primerexplorer.jp/e/>)设计多套 LAMP 引物,包括两条外引物(F3, B3)和两条内引物(FIP, BIP)。同时对该区域设计 1 对普通 PCR 扩增引物,预期扩增目的片段长度为 857 bp,用于重组质粒的构建。引物由上海生物工程有限公司合成。

**2.2 重组质粒的构建与扩增** 用自行设计的 *msp2* F (5'-ATGCCGTTGGTAGGATAGAC-3') 和 *msp2* R (5'-GCACTCTATGGTAGAAAGCT-3') 为引物,以提取的已知山羊无形体阳性蜱的 DNA 为模板,PCR 扩增 *msp2* 基因片段。将目的片段与 pGEM-T 载体连接,构建重组质粒,并通过测序验证重组质粒的准确性。将重组质粒转化 DH5α 感受态细胞,在 LB 液体培养基中进行培养。提取菌液质粒,测定其浓度和纯度,并计算拷贝数;*msp2* 基因拷贝数(copies/μL) =  $(6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA length} \times 660)$ 。

**2.3 蜱总 DNA 的提取** 采用 OMEGA Tissue DNA Kit D3396 (DNA 提取试剂盒)提取 192 只蜱标本 DNA,存放于 -20 °C 冰箱备用。

**2.4 LAMP 反应体系的建立与优化** 以山羊无形体重组质粒为模板,用引物 F3、B3 及 FIP、BIP 使用 25 μL 反应体系进行 LAMP 扩增。分别对 LAMP 反应温度(59、60、61、62、63、64 °C)、反应时间(30、40、50、60 min)和反应体系(Mg<sup>2+</sup> 浓度 2、4、6、8、10、12 mmol/L, dNTP 浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L, 甜菜碱浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)进行优化,确定最佳反应条件。

**2.5 LAMP 可视化试验** 在反应前向体系中加入 1 μL 钙黄绿素和 MnCl<sub>2</sub> 混合液(终浓度分别为 0.05 和 0.60 mmol/L)。反应结束后,体系呈绿色为阳性,橙色为阴性。

**2.6 LAMP 交叉反应性检测** 分别以山羊无形体、绵羊无形体、中央无形体、边缘无形体、牛无形体阳性标本作为模板,并设置阴性对照,采用优化的反应条件及体系进行 LAMP 检测方法的交叉反应性检测。

**2.7 LAMP 敏感性检测** 取山羊无形体重组质粒作 10 倍梯度倍比稀释,分别作为模板进行 LAMP 扩增,同时设置阴性对照,反应结束后观察各管颜色变化,同时对扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,检测 LAMP 方法的敏感性。同时用上述相同浓度梯度的重

组质粒为模板进行 PCR 以作比较。PCR 反应体系: Taq PCR Mix 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物(LAMP 最佳引物 F3、B3)各 0.8  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至终体积为 20  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。取 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 确定普通 PCR 检测的敏感性。

**2.8 蝉标本检测** 分别用建立并优化的 LAMP 方法和 PCR 法对从承德市野外采集的 192 只蝉检测, 比较两种方法的山羊无形体阳性率, 并用 LAMP 方法对 40 份已知山羊无形体阳性蝉总 DNA 进行检测。

## 结 果

### 1 引物的设计与筛选

对设计的 LAMP 引物进行筛选验证并进行试验, 以制备的山羊无形体 *msp2* 基因的重组质粒为模板, 同时设立阴性对照组, 将设计的多套 LAMP 引物分别用 LAMP 法进行扩增, 反应体系为 LAMP 通用 25  $\mu$ L 体系, 反应温度为 60~65  $^{\circ}$ C, 设置时间为 1 h 左右, 然后在 85  $^{\circ}$ C 左右使 Bst DNA Polymerase 热失活, 5 min 后使反应终止。最终筛选的引物序列信息如表 1。

表 1 LAMP 引物  
Table 1 Primer sequence of LAMP assays

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences
F3	GGATACAGTCTTGGAGGAG
B3	ACGATCTACCTGACCTCTA
FIP	GCTTCTTACCAGACTTCTTTGCTGTAGAA GTTGAAGTAGGATACGA
BIP	TTAAGGGAGCAAAGAAGTCTGGTTGTGCT AGTTCTTTACCTAGT

### 2 LAMP 反应体系的优化

以拷贝数为 10<sup>4</sup> 的质粒为模板, 对 LAMP 反应条件与体系进行优化。确定该方法最佳反应温度为 63  $^{\circ}$ C, 最佳反应时间为 50 min。最佳反应体系: F3/B3(5  $\mu$ mol/L) 均为 1  $\mu$ L, FIP/BIP(20  $\mu$ mol/L) 均为 2  $\mu$ L, Bst DNA 聚合酶(8 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub>(100 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L) 4.0  $\mu$ L, 甜菜碱(5 mol/L) 3  $\mu$ L, 10 $\times$  ThermoPol Buffer 2.5  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。经以上最佳反应条件及体系进行 LAMP 的扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳出现最佳梯状条带。

### 3 试验的交叉反应性

分别以山羊无形体、绵羊无形体、中央无形体、边缘无形体、牛无形体 DNA 为模板, 用优化的反应条件和体系进行 LAMP 扩增, 结果如图 2A。山羊无形体

扩增出特异梯状条带(图 2A)。山羊无形体扩增产物经钙黄绿素染色后变色, 为绿色荧光; 其他扩增产物未变色, 为橙色(图 2B)。

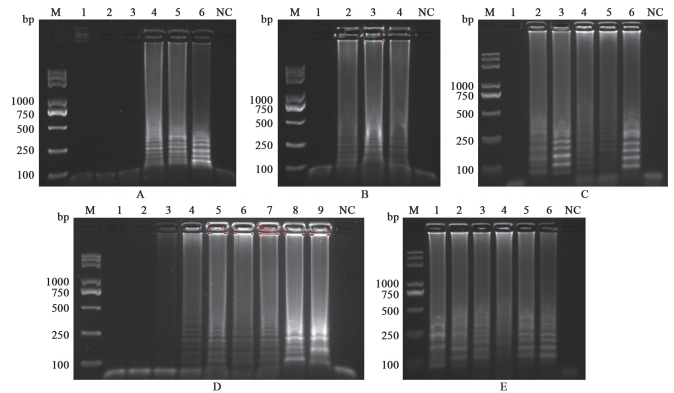


图 1 LAMP 反应体系及条件优化  
A 温度优化 M DL 2000 plus DNA Marker 1~6 温度分别为 59、60、61、62、63、64  $^{\circ}$ C NC 阴性对照 B 时间优化 M DL 2000 plus DNA Marker 1~4 时间分别为 30、40、50、60 min NC 阴性对照 C Mg<sup>2+</sup> 浓度浓度优化 M DL 2000 plus DNA Marker 1~6 浓度分别为 2、4、6、8、10、12 mmol/L NC 阴性对照 D dNTP 浓度浓度优化 M DL 2000 plus DNA Marker 1~9 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L NC 阴性对照 E 甜菜碱浓度优化 M DL 2000 plus DNA Marker 1~6 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mol/L NC 阴性对照。

图 1 LAMP 反应体系及条件优化  
A Temperature optimization M DL 2000 plus DNA Marker 1-6 59, 60, 61, 62, 63, 64  $^{\circ}$ C NC Negative control B Time optimization M DL 2000 plus DNA Marker 1-4 30, 40, 50, 60 min NC Negative control C Concentration optimization of Mg<sup>2+</sup> M DL 2000 plus DNA Marker 1-6 2, 4, 6, 8, 10, 12 mmol/L NC Negative control D Concentration optimization of dNTP M DL 2000 plus DNA Marker 1-9 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mmol/L NC Negative control E Concentration optimization of betaine M DL 2000 plus DNA Marker 1-6 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mol/L NC Negative control

Fig. 1 LAMP optimization of reaction system and conditions

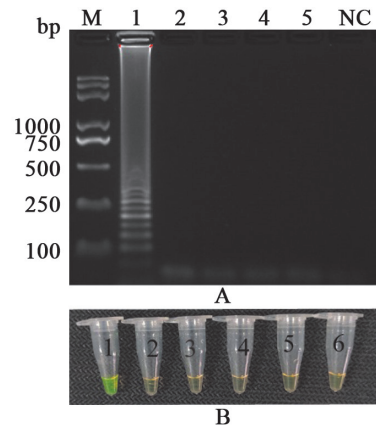


图 2 LAMP 交叉反应性检测  
A LAMP 电泳结果图 B LAMP 可视化结果图 M DL 2000 plus DNA Marker 1~5 分别为山羊无形体、绵羊无形体、中央无形体、边缘无形体、牛无形体 LAMP 产物 NC、6 阴性对照

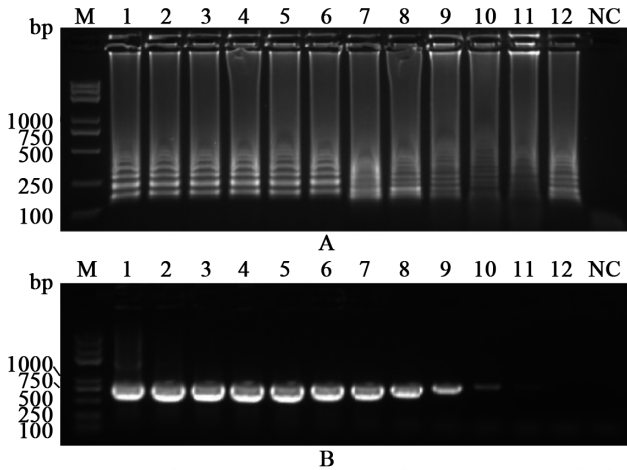
图 2 LAMP 交叉反应性检测  
A LAMP electrophoresis result B Visual LAMP result M DL 2000 plus DNA Marker 1-5 A. *capra*, A. *ovis*, A. *centrale*, A. *marginale* and A. *bovis* NC, 6 Negative control.

Fig. 2 Cross-reactivity of LAMP assays



#### 4 试验的灵敏性

使用 10 倍比稀释的山羊无形体质粒作为模板, 浓度从  $10^{11}$  copies/ $\mu\text{L}$  到  $1$  copy/ $\mu\text{L}$ , 该 LAMP 方法的最低检测限为  $1$  copy/ $\mu\text{L}$ (图 3A), 比普通 PCR 方法的最低检出限  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ (图 3B) 高 2 个数量级。在反应体系中加入钙黄绿素进行可视化检测(图 4), 与 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果一致。



A LAMP 电泳图 B PCR 电泳图 M DL 2000 plus DNA Marker 1~12 模板拷贝数分别为  $10^{11} \sim 10^0$  copy/ $\mu\text{L}$  NC 阴性对照。

图 3 LAMP 和 PCR 检测山羊无形体质粒的敏感性比较

A LAMP electrophoresis result B PCR electrophoresis result M DL 2000 plus DNA Marker 1-12 Template copy numbers are  $10^{11} \sim 10^0$  copy/ $\mu\text{L}$  respectively NC Negative control

Fig. 3 Comparison analysis of LAMP and PCR sensitivity



1~12 模板拷贝数分别为  $10^{11} \sim 10^0$  copy/ $\mu\text{L}$  13 阴性对照

图 4 LAMP 可视化结果

1-12 Template copy numbers are  $10^{11} \sim 10^0$  copy/ $\mu\text{L}$  respectively 13 Negative control

Fig. 4 Visual LAMP result

#### 5 蜱样品检测

取 40 份已知山羊无形体阳性的蜱虫总 DNA 进行 LAMP 检测, 结果均为阳性。对野外采集的 192 只蜱进行 LAMP 检测, 其中 31 份阳性, 阳性率为 16.1%。PCR 法检测的阳性率为 12.5% (24/192)。PCR 检测阳性的 24 份样品用 LAMP 检测均为阳性。

#### 讨论

山羊无形体是近年发现的新发蜱传人兽共患病原体, 宿主范围非常广泛, 可感染牛、羊和一些野生动物,

人感染可引起无形体病, 是一种严重影响人类健康的人兽共患病<sup>[11-12]</sup>。由于无形体病临床表现缺乏特异性, 加之缺少有效的实验室诊断技术, 所以临床上存在误诊、漏诊现象。无形体引起的无形体病是自然疫源性疾病, 通过检测其在蜱以及动物中的感染情况可有效预防该疾病的发生。目前国内对动物无形体感染的检测手段有病原学检测, 使用光学显微镜观察血液涂片, 但在感染早期较难观察到病原体, 不利于早期诊断<sup>[13]</sup>。血清学检测方法包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、补体结合试验 (CFT)、卡片凝集试验 (CAT) 等。ELISA 以无形体蛋白 MSP5 作为抗原进行检测, 但 MSP5 蛋白具有高度保守性, 无法区分各种无形体。CFT 容易出现假阳性或假阴性结果。CAT 存在非特异性反应, 且结果判断具有很强的主观性<sup>[13]</sup>。基于 PCR 的分子技术灵敏度、特异性均较强, 但需要的设备要求高, 反应时间较长, 不适合在基层及现场进行快速检验<sup>[14]</sup>。因此, 急需开发一种适用于基层的山羊无形体检测方法。

LAMP 是新型分子技术的一大研究热点, 最大的特点是在恒温条件下能使核酸连续扩增, 与传统 PCR 相比更加便捷, 只需要一个稳定水浴锅, 符合在资源匮乏的基层单位开展病原检测的要求。自 LAMP 推出后经过不断优化与改进已较为成熟, 具有广阔的应用前景, 多项研究将 LAMP 技术应用于蜱媒传播病原体检测<sup>[15-17]</sup>。Wang 等<sup>[18]</sup>建立了基于 16S rRNA 基因的 LAMP 法快速检测嗜吞噬细胞无形体, 检测限为 1 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。Pan 等<sup>[19]</sup>建立了基于斑点热群立克次体 *ompB* 基因的 LAMP 检测方法, 检测限为 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

本研究对山羊无形体的保守序列 *mSP2* 基因进行序列对比, 确保选择最保守的片段来设计特异性 LAMP 引物。为达到理想的扩增效果, 需要对 LAMP 反应条件与体系进行优化。Mg<sup>2+</sup> 作为 Bst 酶的活力因子, 其浓度变化对反应的影响较为明显, 浓度过低时反应效率不高, 过高时有一定的抑制作用。本研究建立的 LAMP 方法反应时间只需 50 min, 比 PCR 反应时间缩短了 50%, 灵敏性是传统 PCR 的 100 倍, 可达 1 个拷贝/ $\mu\text{L}$ 。此外, 本研究选用常见的其他无形体物种作为阴性对照进行 LAMP, 结果均未有特异性条带, 表明建立的 LAMP 方法具有良好的特异性。由于 LAMP 具有高敏感性, 开盖容易产生气溶胶污染, 因此在实验过程中一定要严格将配制体系区域和加样区域区分开。本研究在 LAMP 体系中加入钙黄绿素染料, 在不开盖的情况下就可观测到结果, 减少了污染的发生。用该方法检测 40 份已知山羊无形体阳性的蜱虫总 DNA 和野外采集的 192 只蜱虫总 DNA, 并与普通 PCR 法相比较。结果表明, LAMP 方法比普通

PCR法具有更高的敏感性,可用于人感染山羊无形体的早期检测与蜱携带该病原体的监测。

【参考文献】

[1] 吴东兴,李淑艳,包黎明,等. 蜱传人兽共患无形体科属病原体研究[J]. 畜禽业,2021,32(11):8-10.  
[2] Li H,Zheng YC, Ma L, et al. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China; a surveillance study[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(6):663-670.  
[3] Liu Z, Ma M, Wang Z, et al. Molecular survey and genetic identification of *Anaplasma* species in goats from central and southern China[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(2):464-470.  
[4] Sun XF, Zhao L, Wen HL, et al. *Anaplasma* species in China[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(11):1263-1264.  
[5] Zhao L, Li J, Cui X, et al. Distribution of *Haemaphysalis longicornis* and associated pathogens: analysis of pooled data from a China field survey and global published data[J]. Lancet Planet Health, 2020, 4(8):e320-9.  
[6] Chvosta M, pitalska E, Vaclav R, et al. Seasonal patterns in the prevalence and diversity of tick-borne *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, *Anaplasma phagocytophilum* and Rickettsia spp. in an Urban Temperate Forest in South Western Slovakia[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 15(5):994.  
[7] 刘梦莹,许士奇. 蜱传疾病实验检测方法研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(1):83-87.  
[8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):E63.  
[9] 刘旺,靳晶豪,陈孝仁. 环介导等温扩增技术的应用进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(2):128-135.  
[10] Moore KJM, Cahill J, Aidelberg G, et al. Loop-mediated isothermal amplification detection of SARS-CoV-2 and myriad other applications[J]. J Biomol Tech, 2021, 32(3):228-275.

[11] Yang J, Liu Z, Niu Q, et al. A novel genotype of "*Anaplasma capra*" in wildlife and its phylogenetic relationship with the human genotypes[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1):210.  
[12] Yang J, Han R, Niu Q, et al. Occurrence of four *Anaplasma* species with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China[J]. Ticks Tick Borne Dis, 2018, 9(1):82-85.  
[13] 牛泽,张勇,尉超,任殿玉,刘丽霞,梁薇. 牛羊无形体病检测技术的研究进展[J]. 兽医导刊, 2019(21):78-79.  
[14] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? [J]. Cells, 2021, 10(8):1931.  
[15] Giglioti R, Bassetto CC, Okino CH, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Anaplasma marginale*[J]. Exp Appl Acarol, 2019, 77(1):65-72.  
[16] Pan L, Zhang L, Wang G, et al. Rapid, simple, and sensitive detection of *Anaplasma phagocytophilum* by loop-mediated isothermal amplification of the *msp2* gene[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12):4117-4120.  
[17] Wang J, Zhang Y, Cui Y, et al. A rapid, simple and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect *Anaplasma bovis* in sheep and goats samples[J]. Parasitol Int, 2018, 67(1):70-73.  
[18] Wang J, Zhang Y, Wang X, et al. A loop-mediated isothermal amplification assay targeting 16S rRNA gene for rapid detection of *Anaplasma phagocytophilum* infection in sheep and goats [J]. J Parasitol, 2017, 103(2):187-192.  
[19] Pan L, Zhang L, Wang G, et al. Rapid, simple, and sensitive detection of the *ompB* gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification [J]. BMC Infect Dis, 2012(12):254.

【收稿日期】 2022-08-12 【修回日期】 2022-11-05

(上接 1414 页)

[23] 常红敏,赵蕾,王小杰,等. 旋毛虫排泄分泌蛋白对小细胞肺癌 NCI-H446 细胞凋亡的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(4):299-303.  
[24] 吴合亮,安子熙,邵薪诺,等. 热疗联合旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白对小细胞肺癌 H446 凋亡及 S 期阻滞的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(11):1250-1254, 1260.  
[25] Luo J, Yu L, Xie G, et al. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs[J]. Parasitology. 2017,

144(6):793-800.

[26] 于莉,苏萌,谢广成,等. 旋毛虫肌幼虫虫体蛋白对小细胞肺癌 H446 细胞凋亡的影响[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(2):124-128.  
[27] Wu H, Li M, Shao X, et al. *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory/secretory products trigger apoptosis and S-phase arrest of the non-small-cell lung cancer line A549[J]. Exp Parasitol, 2020(218):107983.

【收稿日期】 2022-07-12 【修回日期】 2022-10-07