

基于核酸侵入反应的生物分子检测技术的研究进展 *

马寅姣¹ 邹秉杰¹ 王建平¹ 周国华^{1,2△}

(1 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009 2 华东医学生物技术研究所 江苏 南京 210002)

摘要 核酸侵入反应是由 5' 核酸内切酶或 flap 内切酶催化的,能够识别切割核酸片段形成的特异性结构的一类反应。近年来发展了很多基于该反应的生物大分子检测技术,能够对 DNA、RNA、miRNA 及蛋白质进行高灵敏、高特异性的测定。这些技术大都无需扩增待测靶标,极大地降低了扩增产物交叉污染的风险,在临床检测中具有很大的应用前景。本文对这些检测技术的原理及应用作简要综述。

关键词 核酸侵入反应 5' 核酸内切酶 Flap 内切酶 信号扩增

中图分类号 R392 R446 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)12-2384-05

Advances in Bio-molecular Diagnostic Assays Based on Invasive Reaction*

MA Yin-jiao¹, ZOU Bing-jie¹, WANG Jian-ping¹, ZHOU Guo-hua^{1,2△}

(1 School of life science and technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT: The invasive reaction is catalyzed by 5' endonuclease or flap endonuclease, which can recognize and cleavase a specific structure formed by oligonucleotides. Recently, numerous newly techniques based on invasive reaction have been developed to detect biological molecules, such as DNA, RNA, miRNA and protein, with a high sensitivity and specificity. These techniques do not depend on target amplification, so the risk of cross-contamination decreased significantly, and it show great potential in clinical diagnostics. This article gives a review on the principles and applications of these developed assays.

Key words: Invasive reaction; 5' Endonuclease; Flap endonuclease; Signal amplification

Chinese Library Classification (CLC): R392 R446 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2384-05

前言

1993 年 Lyamichev V 等人描述了 DNA 聚合酶在 DNA 复制过程中,可切割除去滞后链的 RNA 引物,在 DNA 的修复过程中,可切割除去含有不正确碱基的 DNA 单链,并且这种切割并不依赖于 RNA 或 DNA 的序列,而是一种结构特异性的行为^[1]。这种特殊结构是一种二叉结构,由双链 DNA 和单链 DNA 形成,DNA 聚合酶可识别这一结构,并切割除去单链 DNA。在后续研究中还发现,古细菌中的一类核酸内切酶,称之为 flap 核酸内切酶(Flap Endonucleases, FEN)也有和 DNA 聚合酶相同的识别特异性结构,从而对单链 DNA 进行切割的活性,并将这种切割反应定义为核酸侵入反应(invasive reaction)^[2]。

核酸侵入反应主要依赖于能够识别核酸片段形成的特殊结构,并切割结构内单链 DNA 的核酸内切酶,该类酶主要包括 flap 内切酶 I(Flap Endonuclease I, FEN I)家族中的一些成员,以及经人工突变使丧失聚合活性的 DNA 聚合酶^[3],它们能特异性识别一种特殊的二叉结构 -- 侵入重叠结构,如图 1 所示,并切割结构中的单链部分,切割所产生的短片段被称为 flap 或 arm 片段,能够作为模板特异性的信号分子被检测^[3,4]。

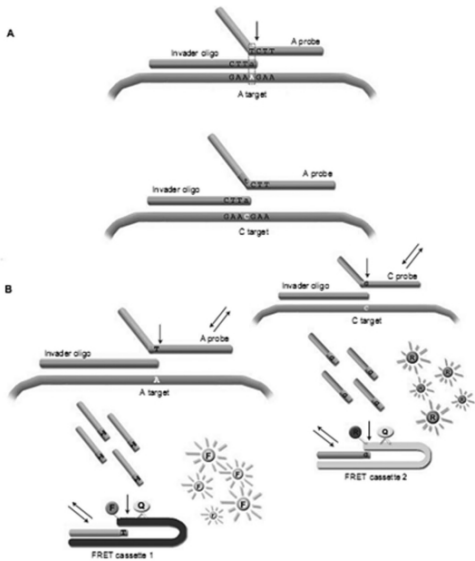


图 1 级联侵入信号放大技术基本原理^[5]

Fig.1 The principle of Invader assay

核酸侵入反应具有很高的特异性,当反应体系中的核酸片段,没有形成特异的侵入重叠结构时,切割反应几乎不发生,不

* 基金项目 江苏省自然科学基金(No. BK2010111); 国家自然科学基金项目(No. 21005088)

作者简介:马寅姣(1988-) 女,硕士研究生,主要研究方向:分子诊断,电话:13921426559, E-mail: Dooly0829@163.com

△通讯作者:周国华 E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

(收稿日期:2011-02-21 接受日期:2011-03-15)

产生特异的信号分子。高的特异性使该反应可以准确的检测 DNA 和 RNA 分子中单碱基突变、插入或缺失,也适用于靶序列的定量研究^[6]。近年来,许多基于核酸侵入反应的生物大分子检测方法被建立,并用来检测 DNA、RNA、miRNA 及蛋白质等生物分子。由于核酸侵入反应不依赖核酸序列,而只依赖于核酸形成的特异性结构,使得该反应具有广泛的适用性,并且由于该反应并非扩增待测模板本身,极大地降低了模板交叉污染的风险,使基于该反应建立的生物测定方法具有很大的优势,在临床分子诊断中得到了广泛应用。本文对基于核酸侵入反应的各种生物大分子检测方法作简要介绍。

1 级联侵入信号放大技术(Invader assay)

Hall JG 等人的研究,通过将两步核酸侵入反应偶联,建立了级联侵入信号放大技术(Invader assay)。该技术的基本原理如图 1 所示,首先根据待测靶核酸设计两条寡核苷酸探针,可与目标单链 DNA 形成一种单碱基重叠侵入结构^[7]。其中一条寡核苷酸探针被称为侵入探针或上游探针,该探针 5' 端与靶序列的 3' 端完全互补,其 3' 端最后一个碱基与靶序列错配。第二条寡核苷酸探针被称为下游探针,下游探针含有两个区域,3' 端一段序列与靶序列完全互补,称为靶序列特异区域,5' 端一段序列与靶序列不相关,并不会影响到 flap 核酸内切酶切效率,但在体系中作为报告分子的前体,这段不相关序列被称为 flap 片段^[3,4]。一旦这两个寡核苷酸探针与靶序列退火,并形成了单碱基重叠侵入结构,即会被反应体系中的 flap 核酸内切酶识别,并切断下游探针与靶序列互补的第一个和第二个碱基之间的化学键,产生 flap 片段。产生的 flap 片段作为第二步侵入切割反应的侵入探针,与一个具有发夹型结构,5' 端分别修饰有荧光基团和淬灭基团的荧光共振能量转移探针(Fluorescence Resonance Energy Transfer Cassette,简称 FRET 探针)退火杂交,再次形成 flap 核酸内切酶识别的侵入结构,在酶的作用下,FRET 探针上标记的荧光基团和淬灭基团被切割分离,从而释放出荧光报告分子产生荧光信号。由于 flap 片段和 FRET 探针的序列与靶序列完全不相关,FRET 探针可做为检测核酸的通用探针。

在设计与靶核酸杂交的下游探针时,与靶核酸杂交部分的 T_m 值及切割产生的 flap 片段 T_m 值与反应温度接近^[8]。这样,在合适的反应温度下,被切割的下游探针及 flap 片段会处于一种动态的杂交与解离状态,完整的下游探针或 FRET 探针会不断与模板或 flap 片段退火,形成新一轮的切割,使信号逐渐放大。通常,一个靶核酸分子能够产生 10^6 ~ 10^7 个信号分子,检测灵敏度能够达到 1000 个拷贝^[7]。

目前, Invader assay 已应用于微生物分型^[9, 10]、病毒检测^[11, 12]及基因多态性(SNP)检测^[13, 14]等领域。在进行 SNP 检测时, 只需将侵入位点设计在 SNP 位点处, 利用两种不同标记的 FRET 探针, 及其配套的 flap 片段, 可在同一反应体系中检测两种不同的 SNP 类型。该方法可直接检测基因组 DNA 或未纯化的 PCR 产物, 其检测 SNP 的准确率与常规的基于 PCR 的方法相比达到 99.2 %^[15-17], 与其他两个检测 SNP 较常用的技术焦测序、SNaPshot 相比, 也具有准确、操作简便且成本低等优点^[18]。

2 偶联 PCR 侵入信号放大技术(Invader Plus)

Invader Plus 技术实现了在单个反应体系内将 PCR 和 Invader assay 结合,对靶序列既通过 PCR 进行扩增,又通过 Invader assay 进行信号放大并检测对扩增的靶序列进行 SNP 分析或基因分型^[19]。这一检测放法相对于独立的 PCR 反应或 Invader 反应,提高了检测灵敏度和特异性,降低了交叉污染的概率,操作简便,更适宜于高通量的核酸检测。

Invader Plus 技术中用到的酶包括 Taq 聚合酶和 flap 内切酶,其基本原理见图 2,PCR 反应中的引物(图中白色序列)T_m 值设计为 72 °C,并作为上游侵入探针,下游探针 T_m 值设计为 63 °C。在进行 PCR 扩增时,首先进行高温退火循环,反应温度一直高于 63 °C,体系中的下游探针在该温度下不能与靶序列杂交,因此不会影响 PCR 扩增。待 PCR 反应结束后,体系升温至 99 °C,孵育 10 分钟灭活 Taq 聚合酶,这一步骤不会影响切割酶活性。反应温度再降至 63 °C,孵育 15 到 30 分钟,这时反应体系中的下游探针与靶序列杂交,并与 PCR 反应中的一条引物形成单碱基重叠侵入结构(图 2,C),进行 Invader 反应,并产生可检测到的荧光信号。

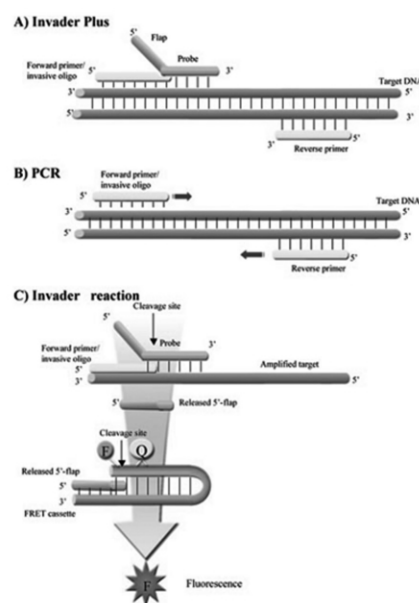
图 2 偶联 PCR 侵入信号放大技术基本原理^[19]

Fig. 2 The principle of Invader Plus

Allawi HT 等人将该方法应用于脑脊液中单纯疱疹病毒的检查及分型^[19], Tang YW 等人也将该方法应用于水痘 - 带状疱疹病毒的检测与分型^[20]。Tadokoro K 等人在 Invader plus 基础上做了进一步的改进, 通过将 PCR 反应延伸温度与 Invader 反应设计为同一温度, 并使用两步 PCR, 使得 PCR 反应的延伸阶段同时进行 Invader 反应, 并在延伸阶段结束后检测荧光值, 从而实现了反应的实时检测, 并节省了检测时间、简化了引物及探针设计^[21]。

3 RNA 侵入信号放大技术(Invader RNA assay)

Invader RNA assay 利用侵入反应原理对 RNA 进行检测, 其原理与 Invader assay 基本相同^[22], 但是检测 DNA 时所用到的

的 flap 内切割酶不能有效的识别 RNA 序列,为了解决这一问题,研究人员从真细菌提取出不同的切割酶,经过基因工程的改造,使得这些切割酶可应用于 RNA 的检测^[23]。RNA 检测的第一步反应与检测 DNA 的第一步相同,其原理如图 3,A 所示。在第二步反应中,用到了检测探针并非发夹状的 FRET 探针,而是分开的两条探针。这一不同是由于 RNA 检测中所用到的切割酶的特殊性质决定的。为了降低寡核苷酸之间的非特异性杂交, RNA 检测的第一步反应中还使用了一个叠加探针,如图 3 C 所示。叠加探针紧挨着下游探针与待测 RNA 序列杂交,使得下游探针的 T_m 值升高,通过在待测 RNA 上创造出一个合适的杂交区域,叠加探针可以进一步改善 Invader RNA 反应检测 RNA 的特异性。同时,为了减少未切割的下游探针的干扰,还设计了下游探针的捕获探针,使完整的下游探针不会对第二步反应造成严重干扰(图 3 B)。

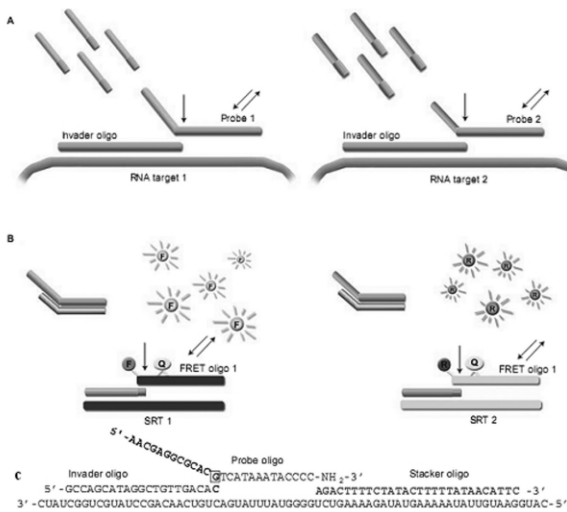


图 3 RNA 侵入信号放大技术基本原理^[5]

Fig.3 The principle of Invader RNA assay

Wagner EJ 等人利用 Invader RNA assay,检测了成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor Receptor-2, FGFR2)转录物的两种类型,结果显示,该方法可检测到 0.01amol 的 FGFR2 RNA,并可很好的区分转录物的两种类型^[24]。Allawi HT 等人进一步改进 Invader RNA assay,将其应用于小 RNA(micro RNA, miRNA)的检测,称为 miRNA 侵入信号放大技术(Invader miRNA assay)^[25]。该方法中的侵入探针和下游探针各有一半的序列与 miRNA 互补,其余碱基可形成颈环结构,如图 4 所示。这样就可以固定住序列较短的 miRNA,提高检测效率。这一方法灵敏度较高,只需要用到 50-100 ng 的总细胞 RNA,或 1000 个裂解细胞,并无需对细胞裂解产物进行分级处理,该方法也具有较高的特异性,可区分只有一个碱基差异的 miRNA,并可区分 miRNA 前体和成熟 miRNA。通过利用微量滴定板检测反应产生的荧光信号,可达到 miRNA 的高通量筛分分析。

4 表面侵入信号放大技术(Surface Invader)

表面侵入信号放大技术,不同于常规的液相侵入信号放大反应,通过将带有荧光基团与淬灭基团的 SNP 位点特异性下游探针固定于 DNA 芯片表面,使得该技术可用于基因组水平

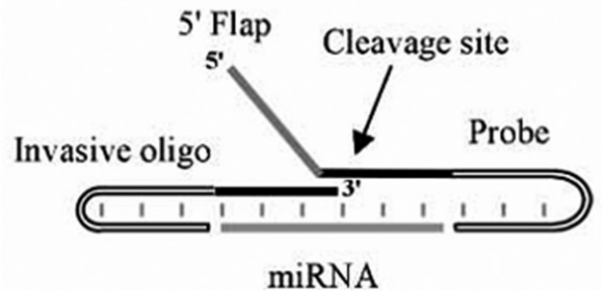


图 4 miRNA 侵入信号放大技术第一步反应原理^[25]

Fig.4 The principle of the first step of Invader miRNA assay

的 SNPs 平行分析^[26]。基因组 DNA 样本可直接加于修饰有 SNP 特异性下游探针阵列的芯片表面,这样在芯片表面每一个对应于 SNP 等位基因的位点,就会形成单碱基重叠侵入结构。反应所需的上游探针以两种形式加入,方案 1:加入液相反应体系中,见图 5 (1);方案 2:与下游探针一起固定于芯片表面,见图 5 (2)。反应发生后,微阵列上该位点会产生荧光信号,显示相应的 SNP 等位基因存在于靶 DNA 上。方案 2 与方案 1 相比,不需要在反应液中加入上游探针,可减少反应液中的非特异性杂交,提高反应效率并可简化操作步骤。在芯片表面进行 Invader 反应,使得多个反应平行发生,可平行检测基因组 DNA 上多个 SNP 位点。这样的含有 100 万个位点的 DNA 阵列,一步即可检测 50 万个 bi-allelic SNPs。侵入信号放大技术与表面 DNA 阵列技术的结合,为人们提供了一种新的高通量 SNP 检测技术。

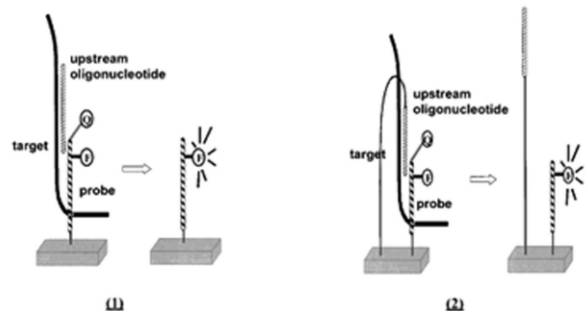


图 5 表面侵入信号放大技术基本原理^[26]

Fig.5 The principle of Surface Invader

5 偶联滚环扩增侵入信号放大技术(Invader RCA assay)

Nie B 等人将表面侵入信号放大技术与滚环扩增技术结合,利用滚环扩增(Rolling Circle Amplification, RCA)检测 Invader 反应的切割产物,可直接分析非扩增的人类基因组 DNA 上的 SNPs,其原理见图 6^[27]。该方法利用滚环扩增,针对 Surface Invader 切割产物,并通过一种具有双 3'-OH 的特殊探针,将切割产物的 5' 端转变为 3' 端,作为滚环引物,扩增出一段长的单链 DNA,并利用 SYBR Green I 染料可嵌入滚环产物的性质,用荧光显微镜检测表面荧光。滚环扩增针对单个切割产物所产生的长达几千个碱基的单链 DNA,使得该方法可以检测到 Surface Invader 反应的单个产物,可达到无需扩增检测基因组 DNA 上 SNP 位点,并且反应表面的荧光强度与表面的靶 DNA 浓度有一定相关性,具有一定定量性能^[28]。

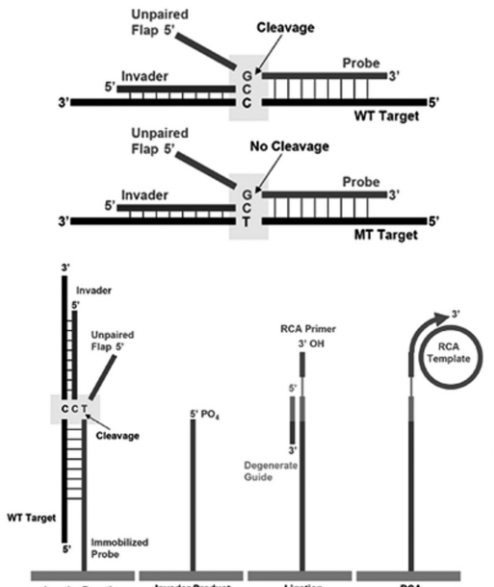


图 6 偶联滚环扩增侵入信号放大技术基本原理^[27]

Fig.6 The principle of RCA combined with Invader assay

6 免疫侵入信号放大技术(Immuno-Invader assay)

Xie MJ 等人将三明治免疫测定技术与侵入信号放大技术结合,从而提高免疫测定法的灵敏度,这一新技术被称为免疫侵入信号放大技术(Immuno-Invader assay)^[29]。该方法包括三个主要步骤,如图 7 所示:(1)目标抗原被抗体捕获,并与生物素修饰的检测抗体形成三明治结构;(2)向体系内加入链酶亲和素和生物素标记的寡核苷酸探针,与检测抗体形成另一个三明治结构;(3)利用 Invader 反应,检测三明治结构中的寡核苷酸探针。该方法已经应用于人类肿瘤坏死因子- α (hTNF- α)的检测,其检测限能达到 0.1 pg/ml,比现有的单纯免疫检测方法的灵敏度提高了近 35 倍。免疫信号放大技术可作为一种新的、高灵敏度的免疫测定技术,以代替常规检测方法。

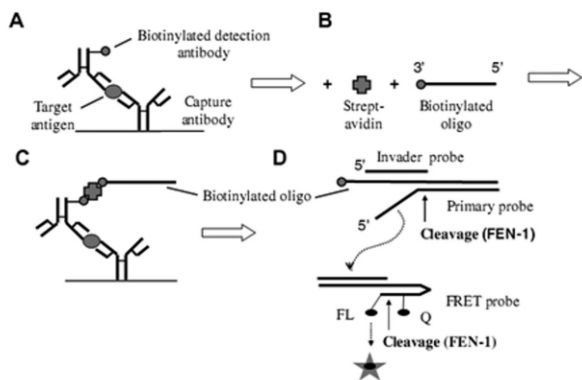


图 7 免疫侵入信号放大技术基本原理^[29]

Fig.7 The principle of Immuno-Invader assay

7 偶联切刻内切酶侵入信号放大技术(Cascade Enzymatic Signal Amplification, CESA)

Zou B^[30]等人通过分子信标连接反应将核酸侵入反应与切刻内切酶信号放大反应(Nicking Endonuclease Signal Amplification, NES)相偶联^[31],将侵入反应产生的 flap 片段与分子信标上一段寡核苷酸片段相连,使信标打开并形成切刻内切酶识

别位点,然后利用切刻内切酶识别双链之切割其中一条单链的特性,将信标链切断,进而使得连接产生的核苷酸片段能够与未切割的完整的信标继续退火,形成切刻内切酶信号扩增^[32],使 flap 片段产生的信号进一步被放大,最终检测灵敏度能够达到 1 fM。通过将侵入信号放大技术与切刻内切酶信号放大反应结合,克服了切刻内切酶信号放大反应需要待测模板含有切刻内切酶位点的缺点,使任何模板都能被检测。

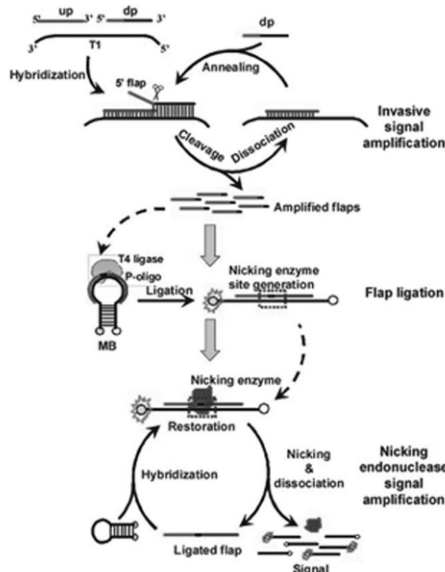


图 8 偶联切刻内切酶侵入信号放大技术基本原理^[30]

Fig.8 The principle of Cascade Enzymatic Signal Amplification

8 结论

侵入信号放大技术与常规的模板扩增技术相比,具有不易交叉污染、恒温反应无须特殊仪器等优点,已经成功应用于微生物分型、病毒检测、基因多态性(SNP)检测及基因表达量分析等领域,是一种非常具有潜力的核酸检测技术。基于核酸侵入反应的生物分子检测技术,进一步扩展了该技术的应用,为研究人员提供了更多的操作简单、成本较低的新的检测方法。在未来,该技术将应用于更多的临床疾病监测、生物学及农学研究。

参考文献(References)

- [1] Lyamichev V, Brow M A and Dahlberg J E. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases[J].Science,1993,260(5109):778-783
- [2] Lyamichev V, Mast A L, Hall J G, et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes[J].Nat Biotechnol,1999,17(3):292-296
- [3] Kaiser M W, Lyamicheva N, Ma W, et al. A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'-exonucleases [J].J Biol Chem, 1999,274(30):21387-21394
- [4] Lyamichev V, Brow M A, Varvel V E, et al. Comparison of the 5' nuclease activities of taq DNA polymerase and its isolated nuclease domain[J].Proc Natl Acad Sci U S A,1999,96(11):6143-6148
- [5] de Arruda M, Lyamichev V I, Eis P S, et al. Invader technology for DNA and RNA analysis: principles and applications [J].Expert Rev

- Mol Diagn,2002,2(5):487-496
- [6] Kwiatkowski R W, Lyamichev V, de Arruda M, et al. Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay[J].Mol Diagn, 1999,4(4):353-364
- [7] Hall J G, Eis P S, Law S M, et al. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2000,97(15):8272-8277
- [8] Lyamichev V I, Kaiser M W, Lyamicheva N E, et al. Experimental and theoretical analysis of the invasive signal amplification reaction[J]. Biochemistry,2000,39(31):9523-9532
- [9] Germer J J, Majewski D W, Yung B, et al. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus[J].J Clin Microbiol,2006,44(2): 318-323
- [10] Ichimura S, Nagano M, Ito N, et al. Evaluation of the invader assay with the BACTEC MGIT 960 system for prompt isolation and identification of mycobacterial species from clinical specimens[J].J Clin Microbiol,2007,45(10):3316-3322
- [11] Hjertner B, Meehan B, McKillen J, et al. Adaptation of an Invader assay for the detection of African swine fever virus DNA [J].J Virol Methods,2005,124(1-2):1-10
- [12] Schutzbank T E, Jarvis C, Kahmann N, et al. Detection of high-risk papillomavirus DNA with commercial invader-technology-based analyte-specific reagents following automated extraction of DNA from cervical brushings in ThinPrep media [J].J Clin Microbiol, 2007,45(12):4067-4069
- [13] Patnaik M, Dlott J S, Fontaine R N, et al. Detection of genomic polymorphisms associated with venous thrombosis using the invader biplex assay[J].J Mol Diagn,2004,6(2):137-144
- [14] Hasegawa Y, Sarashina T, Ando M, et al. Rapid detection of UGT1A1 gene polymorphisms by newly developed Invader assay[J]. Clin Chem,2004,50(8):1479-1480
- [15] Hessner M J, Budish M A and Friedman K D. Genotyping of factor V G1691A (Leiden) without the use of PCR by invasive cleavage of oligonucleotide probes[J].Clin Chem,2000,46(8 Pt 1):1051-1056
- [16] Mein C A, Barratt B J, Dunn M G, et al. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation[J].Genome Res,2000,10(3):330-343
- [17] Nagano M, Yamashita S, Hirano K, et al. Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by Invader assay [J].J Lipid Res, 2002,43(7):1011-1018
- [18] Pati N, Schowinsky V, Kokanovic O, et al. A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput [J].J Biochem Biophys Methods,2004,60(1):1-12
- [19] Allawi H T, Li H, Sander T, et al. Invader plus method detects herpes simplex virus in cerebrospinal fluid and simultaneously differentiates types 1 and 2[J].J Clin Microbiol,2006,44(9):3443-3447
- [20] Tang Y W, Allawi H T, DeLeon-Carnes M, et al. Detection and differentiation of wild-type and vaccine mutant varicella-zoster viruses using an Invader Plus method [J].J Clin Virol,2007,40 (2): 129-134
- [21] Tadokoro K, Yamaguchi T, Kawamura K, et al. Rapid quantification of periodontitis-related bacteria using a novel modification of Invader PLUS technologies[J].Microbiol Res,2010,165(1):43-49
- [22] Eis P S, Olson M C, Takova T, et al. An invasive cleavage assay for direct quantitation of specific RNAs [J].Nat Biotechnol,2001,19(7): 673-676
- [23] Ma W P, Kaiser M W, Lyamicheva N, et al. RNA template-dependent 5' nuclease activity of Thermus aquaticus and Thermus thermophilus DNA polymerases[J].J Biol Chem,2000,275(32):24693-24700
- [24] Wagner E J, Curtis M L, Robson N D, et al. Quantification of alternatively spliced FGFR2 RNAs using the RNA invasive cleavage assay[J].RNA,2003,9(12):1552-1561
- [25] Allawi H T, Dahlberg J E, Olson S, et al. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay[J].RNA,2004,10(7):1153-1161
- [26] Lu M, Shortreed M R, Hall J G, et al. A surface invasive cleavage assay for highly parallel SNP analysis [J].Hum Mutat,2002,19 (4): 416-422
- [27] Nie B, Shortreed M R and Smith L M. Scoring single-nucleotide polymorphisms at the single-molecule level by counting individual DNA cleavage events on surfaces [J].Anal Chem,2005,77 (20): 6594-6600
- [28] Nallur G, Luo C, Fang L, et al. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays[J].Nucleic Acids Res,2001,29(23): E118
- [29] Xie M J, Fukui K, Horie M, et al. A novel sensitive immunoassay method based on the Invader technique [J].Anal Biochem,2008,374 (2):278-284
- [30] Zou B, Ma Y, Wu H, et al. Ultrasensitive DNA Detection by Cascade Enzymatic Signal Amplification Based on Afl Flap Endonuclease Coupled with Nicking Endonuclease [J].Angew Chem Int Ed Engl, 2010
- [31] Tang Z, Wang K, Tan W, et al. Real-time monitoring of nucleic acid ligation in homogenous solutions using molecular beacons[J].Nucleic Acids Res,2003,31(23):e148
- [32] Kiesling T, Cox K, Davidson E A, et al. Sequence specific detection of DNA using nicking endonuclease signal amplification (NESA)[J]. Nucleic Acids Res,2007,35(18):e117

(上接第 2383 页)

- [27] 边长玲,龚正达,张丽云,等.中国西南横断山区小型兽类嗜吞噬细胞无形体基因的检测及序列测定[J].中华流行病学杂志,2009,30 (12):1277-1280
- Bian Chang-ling,Gong Zheng-da,Zhang Li-yun ,et al.Identification of Anaplasma phagocytophilum in small mammals from Hengduan Mountains of Southwest China[J].Chinese Journal of Epidemiology , 2009,30(12):1277-1280
- [28] 周艳,揭盛华.人粒细胞无形体病的研究进展[J].中华传染病杂志, 2009,27(9):566-569
- Zhou Yan,Jie Sheng-hua.Human granulocyte Anaplasma Disease Research Progress [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases2009,27 (9):566-569