

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.004

单管可视化环介导等温扩增技术快速检测恶性疟原虫*

江再茂¹ 马雪萍^{2,3} 殷竹君⁴ 陆妍^{2,3} 曹晓梅³ 武海萍^{2,4}

(1 中国人民解放军第 171 医院 江西 九江 332000; 2 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002;

3 南京军区南京总医院药理科 江苏 南京 210002; 4 江苏省出入境检验检疫局 江苏 南京 210001)

摘要 目的:建立一种基于环介导等温核酸扩增技术(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)的恶性疟原虫高灵敏可视化闭管检测方法。**方法:**针对恶性疟原虫核糖体 DNA 的序列保守区设计 LAMP 引物,通过优化 LAMP 体系中的 Mg^{2+} 、甜菜碱浓度和反应温度等因素,建立环介导等温扩增法;并结合蜡封反应管对产物进行检测,检测结果可直接通过肉眼观察 SYBR Green I 荧光显色进行判定。**结果:**本方法可检测到 70 个拷贝/管的恶性疟原虫核酸片段,并具有高特异性,可区分检测常见的血液病毒。该法具有如下优点:1、整个反应恒温进行,无需热循环仪;2、闭管检测,极大降低了扩增产物交叉污染的风险;3、检测速度快,整个检测过程只需 30 min。**结论:**该法的建立为恶性疟原虫的现场快速筛检提供了一种简便、高灵敏、高特异的工具。

关键词:恶性疟原虫;环介导等温扩增;闭管反应

中图分类号:R-446;R446.11 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)26-5014-05

A Closed-tube Isothermal Amplification Method for Highly Sensitive and Visualized Detection of *Plasmodium Falciparum**

JIANG Zai-mao¹, MA Xue-ping^{2,3}, YIN Zhu-jun⁴, LU Yan^{2,3}, CAO Xiao-mei³, WU Hai-ping^{2,4}

(1 Department of pharmacy, The 171st Hospital of PLA, Jiujiang, Jiangsu, 332000, China; 2 Military Medical Institute of Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu, 210002, China; 3 Department of Pharmacology, Jinling Hospital, School of Medicine Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210002, China; 4 Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing, Jiangsu, 210001, China)

ABSTRACT Objective: To develop a visualized closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay with a high sensitivity for the detection of *Plasmodium falciparum*. **Methods:** LAMP primers were designed based on the conserved region of the ribosomal DNA of *Plasmodium falciparum*. LAMP reaction conditions were optimized in light of the concentration of Mg^{2+} and betaine, as well as the reaction temperature. The read-out was carried out by using naked eyes to observe the color changes of fluorescent intercalator SYBR Green I, which was sealed by wax at the bottom of the detection tube before LAMP reaction. **Results:** The sensitivity of the proposed method is high and can test as low as 70 copies of genomic DNA of *Plasmodium falciparum*. The method is highly specific, and can easily distinguish *Plasmodium falciparum* from common blood pathogens. This method has the following advantages: 1. LAMP assay is an isothermal amplification, so no thermal cycler is needed; 2. The closed-tube LAMP reaction greatly decrease the risk of cross-contamination from amplicons; 3. The assay is very fast, and only 30 minutes is needed for the whole amplification process. **Conclusions:** The proposed method is a simple, highly sensitive and highly specific tool for rapid screening of *Plasmodium falciparum*.

Key words: *Plasmodium falciparum*; Loop-mediated isothermal amplification; Closed-tube reaction

Chinese Library Classification: R-446; R446.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5014-05

前言

疟疾(Malaria)是经按蚊叮咬感染疟原虫所引起的虫媒传染病。世界范围内每年有 3-5 亿疟疾临床病例,其中有 150-270 万死亡^[1],大部分严重病例是恶性疟原虫感染引起的恶性疟疾^[2]。由于现代交通工具的使用,相当数量的非流行区人口能够进入疟疾流行区,若感染疟疾并带回非流行区,将造成严重后果^[3]。因此,需建立一种高灵敏、快速、简便的恶性疟原虫检测方法应用于口岸检疫。

传统检测恶性疟疾的方法是厚、薄血膜涂片法^[4-6]。薄血膜中疟原虫密度低时,容易漏检;厚血膜在染色过程中红细胞溶解,原虫形态有所改变,虫种鉴别较困难^[7-9]。因此,传统血膜染色法虽具有简便、成本低等优点,但费时、费力且容易漏诊、误诊。

环介导等温核酸扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[10-12]依赖于能够识别靶序列上 6 个特异区域的引物和一种具有链置换特性的 DNA 聚合酶,在等温条件下可高效、快速、特异地扩增靶序列^[13]。反应结果可以检测扩增副

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373485);江苏省科技支撑计划 - 社会发展项目(BE2011607)

作者简介:江再茂(1964-),男,药理学学士,主要研究方向:医院药学,电话:0792-7166073, E-mail: jiangzaim@sina.com

△通讯作者:武海萍, E-mail: fenger19800512@126.com

(收稿日期:2014-03-19 接受日期:2014-04-15)

产物焦磷酸镁沉淀形成的浊度。然而,浊度仪价格昂贵,增加了检测成本,并且传统 LAMP 法检测对象是扩增副产物焦磷酸镁沉淀,易造成非特异性检测结果。而采用开管盖加荧光染料的方法虽可进行肉眼判断^[4],但却易产生气溶胶污染,造成假阳性结果^[5]。Leo L.M. Poon 等^[6]虽然已用 LAMP 法对恶性疟原虫进行检测,然而其采用的是日本荣研化学公司的浊度仪和 LAMP 恒温试剂盒,每管反应成本较高,不适合大批样本的筛查。基于此,本课题组建立了一种基于微晶蜡的闭管 LAMP 技术^[7],用微晶蜡将 SYBR Green I 染料密封于管底,在 LAMP 扩增时微晶蜡呈固态,染料与扩增体系分离互不干扰,待扩增结束后将温度升高,微晶蜡融化,染料与扩增产物接触,即可对扩增产物进行检测。该技术具备灵敏度高、特异性好、操作简便的优点,并解决了传统 LAMP 易污染的问题。本文成功将这种闭管 LAMP 技术用于恶性疟原虫的检测,在恒定温度下可对恶性疟原虫进行无污染闭管 LAMP 扩增,最低可检测到 70 个恶性疟原虫的 DNA 分子。本方法不仅灵敏度高,而且特异性好,能明显分辨常见的血液病毒,如 HBV、HCV 和 HIV,为恶性疟原虫的检验检疫提供了一种有力工具。

1 材料与方法

1.1 材料

EDC-810 型基因扩增仪(东胜创新生物科技有限公司),

DNA Engine Opticon 2 实时荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), PolyScience 9105 低温水浴箱(美国 PolyScience 公司),Syngene GeneGenius 全自动凝胶成像系统(美国 Syngene 公司)。

Tris-base(瑞士 Roche 公司),蛋白酶 K(上海晨易生物科技有限公司),牛血清白蛋白(英国 Biotech Grade 公司),脱氧核糖核苷三磷酸(10 mmol/L,南京百斯凯生物技术有限公司),SYBR Green I(美国 Promega 公司),EVA Green(美国 Biotium 公司),Bst DNA 聚合酶大片段(美国 New England Biolabs 公司),BioSpin PCR 产物纯化试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),全血基因组 DNA 提取试剂盒(大连 TaKaRa 公司)。

含恶性疟原虫、HBV、HCV 和 HIV 特异基因片段的质粒均由英潍捷基(上海)公司合成;恶性疟疾感染血液样本由江苏省出入境检验检疫局提供。

1.2 血液 DNA 的提取

依照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书对血液 DNA(包括人基因组 DNA 和疟原虫 DNA)进行提取。

1.3 LAMP 扩增引物设计

GenBank 进行同源性分析后利用 Primer Explorer V3 软件设计扩增 P. f CSP 基因(GenBank 登陆号:M19173.1)。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 恶性疟原虫的扩增引物序列

Table 1 Sequences of primers used for *P. falciparum*

Primers	Primer sequences(5'→3')	Nucleotide position	Length(bp)
FIP	5'-AGCTGGAATTACCGCGGCTG	573-592 (F1c)	41
	GGTTCCTAGAGAAACAATTGG-3'	533-553 (F2)	
BIP	5'-TGTTGCAGTTAAAACGTTCTAG	613-635 (B1c)	45
	CCCAAACCAAGTTTAAATGAAAC-3'	656-678 (B2)	
F3	5'-TGTAATTGGAATGATAGGAATTTA-3'	506-529	24
B3	5'-GAAAACCTTATTTGAACAAAGC-3'	703-725	23
LF	5'-GCACCAGACTTGCCCT-3'	554-569	16
LB	5'-TTGAATATTAAAGAA-3'	636-650	15

1.4 恶性疟原虫 LAMP 扩增体系

LAMP 25 μ L 反应体系包括 8 U Bst DNA 聚合酶、1 mmol/L dNTPs、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、10 mmol/L KCl、8 mmol/L $MgSO_4$ 、10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$ 、0.1 % (V/V) Tween-20 和 0.01 % BSA, FIP 和 BIP 引物各 1.6 μ mol/L 以及 LF 和 LB 引物各 0.8 μ mol/L、F3 和 B3 引物各 0.2 μ mol/L、DNA 样本加 2 μ L。反应混合物于 62 $^{\circ}C$ 恒温 30 min, 后加热至 80 $^{\circ}C$ 终止反应,每次实验均用不加模板的空白体系进行对照。

1.5 恶性疟原虫 LAMP 反应条件优化

本实验对影响 LAMP 扩增的三个主要因素 Mg^{2+} 浓度、甜菜碱浓度和反应温度,采用 SPSS Statistics 设计了三因素四水平的 $L_{16}(4^3)$ 正交优化试验(见表 2)。每个反应中 Mg^{2+} 浓度、甜菜碱浓度和反应温度分别采用表 2 所示条件,体系中其它成分均不变。琼脂糖凝胶电泳法对扩增产物进行检测,以去离子水

代替模板作为空白对照。

1.6 LAMP 产物的蜡封管检测法

本实验采用文献报道的蜡封反应管对恶性疟原虫进行可视化闭管检测^[7]。首先在 PCR 管中加入 2 μ L 400 μ mol/L SYBR Green I 溶液,称取 5 mg 微晶蜡固体(熔点 78 $^{\circ}C$ 左右)置于管底,加热至 80 $^{\circ}C$ 使蜡熔化,取出于室温冷却至蜡凝固,此时 SYBR Green I 染料被固体微晶蜡封存于管底。在固体蜡上层加入 LAMP 反应液,进行恒温反应,待反应结束后于 80 $^{\circ}C$ 加热 10 min 使酶失活;由于微晶蜡熔点在 78 $^{\circ}C$ 左右,所以此时微晶蜡也随即融化,振荡 PCR 管,使下层的 SYBR Green I 染料与上层的反应液混合并显色;日光灯下阳性呈绿色,阴性为橙色,紫外灯下阳性发出绿色荧光,阴性无荧光。

2 结果

表 2 LAMP 反应条件 L16(4³)正交优化实验Table 2 Orthogonal test of L16 (4³) of LAMP reaction conditions

No. of the test	The concn. of Mg ²⁺ (mmol/L)	The concn. of betaine (mmol/L)	The temp. (°C)
1	10	8	62
2	6	8	60
3	10	800	60
4	4	80	62
5	8	80	60
6	10	0	65
7	4	0	60
8	6	0	67
9	8	80	67
10	8	0	62
11	6	800	62
12	8	800	67
13	4	8	67
14	6	80	65
15	4	800	65
16	8	8	65

2.1 恶性疟原虫 LAMP 反应条件的优化

Mg²⁺ 浓度、甜菜碱浓度和反应温度是影响 LAMP 反应的 3 个主要因素, 本实验采用 SPSS Statistics 设计了三因素四水平的 L₁₆(4³) 正交优化试验。采用琼脂糖凝胶电泳对 LAMP 扩增产物进行检测。结果如图 1 所示, 2、5、7、10、11、14 和 16 号泳道有条带, 且 10 号泳道条带最亮, 表明 10 号的产物量最多。因此, 恶性疟原虫 LAMP 反应的最佳条件为 Mg²⁺ 浓度 8 mmol/L、甜菜碱浓度 0 mmol/L、温度 62 °C。

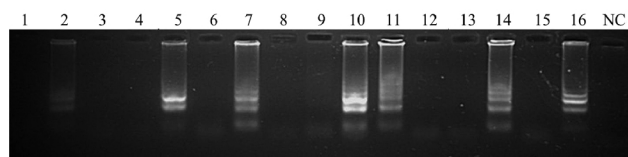


图 1 恶性疟原虫 LAMP 反应条件正交优化试验结果

Fig. 1 Orthogonal optimization of LAMP reaction conditions for detecting *P. falciparum*

2.2 LAMP 闭管检测恶性疟原虫方法的灵敏度

为了测定本方法的灵敏度, 采用闭管 LAMP 检测法对不同浓度的合成质粒分子进行检测。首先, 将合成的质粒梯度稀释成 7000、700、70 和 7 个拷贝 / 管, 各取 1 μL 加入含有 LAMP 反应液的蜡封反应管中 62 °C 恒温反应 30 min, 然后加热到 80 °C 10 min 终止反应, 微晶蜡融化。震荡离心冷却后, 在日光或紫外灯下观察结果, 如图 2 所示。表明, 70 个拷贝及以上的合成质粒 DNA 分子的闭管 LAMP 产物在日光灯下呈绿色(图 2b 中左侧 3 管), 在紫外灯下发绿色荧光(图 2c 中左侧 3 管); 7 个拷贝及以下的合成质粒 DNA 分子的闭管 LAMP 产

物及阴性对照在日光灯下为橙色(图 2b 中右侧 2 管), 在紫外灯下无荧光(图 2c 中右侧 2 管)。以琼脂糖凝胶电泳法对图 2 中 b 和 c 的反应结果进行验证, 结果如图 2a 所示, 表明 70 个拷贝及以上合成质粒 DNA 分子的闭管 LAMP 产物经电泳后呈阶梯状条带(图 2a 中左侧 3 个泳道), 7 个拷贝及以下的合成质粒 DNA 分子的闭管 LAMP 产物及阴性对照经电泳无条带(图 2a 中右侧 2 个泳道)。因此, 采用闭管 LAMP 法能检测低至 70 个拷贝的合成质粒 DNA 分子, 并能实现无需开管肉眼直接观察检测结果。

2.3 LAMP 闭管检测恶性疟原虫方法的特异性

在采用本文建立的方法检测恶性疟原虫检测时, 必须避免错检出血液中其它病原体^[18-21]。因此, 本文采用所建立的 LAMP 法对恶性疟疾血液样本, 以及 HBV、HCV 和 HIV 合成的质粒 DNA 进行检测。首先, 将血液样本进行核酸提取, 取 1 μL 核酸模板加入含有 LAMP 反应液的蜡封反应管中 62 °C 恒温反应 30 min, 然后加热到 80 °C 10 min 终止反应, 微晶蜡融化。震荡离心冷却后, 在日光或紫外灯下观察结果, 如图 3 所示。恶性疟疾血液样本的闭管 LAMP 产物在日光灯下呈绿色(图 3b 中左侧 1 管), 在紫外灯下发绿色荧光(图 3c 中左侧 1 管), 为阳性结果; HBV、HCV、HIV 血液样本和阴性对照的闭管 LAMP 产物在日光灯下为橙色(图 3b 中右侧 4 管), 在紫外灯下不发荧光(图 3c 中右侧 4 管), 为阴性结果。采用琼脂糖凝胶电泳法对结果进行验证, 如图 3(a) 所示, 恶性疟疾血液样本的闭管 LAMP 产物经电泳后呈阶梯状条带, HBV、HCV、HIV 血液样本和阴性对照的闭管 LAMP 产物均无条带。因此, 本文建立的闭管 LAMP 检测法特异性高, 能够区分检测常见的血液病原体。

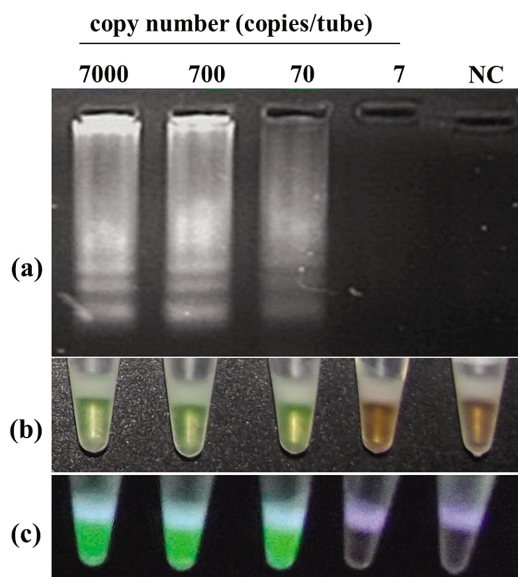


图2 不同拷贝数(7-7000)恶性疟原虫合成质粒的 LAMP 检测结果
(a) 闭管 LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果; (b) 蜡封管中 LAMP 产物在日光灯下的结果; (c) 蜡封管中 LAMP 产物在紫外灯下的结果
Fig. 2 LAMP detection images of different copies (from 7 to 7000) of *P. falciparum* plasmid DNA

(a) the electrophorogram of LAMP amplicons, (b) the LAMP amplicons with SYBR I in wax-sealed tube irradiated by daylight, (c) the LAMP amplicons with SYBR I in wax-sealed tube irradiated by UV light

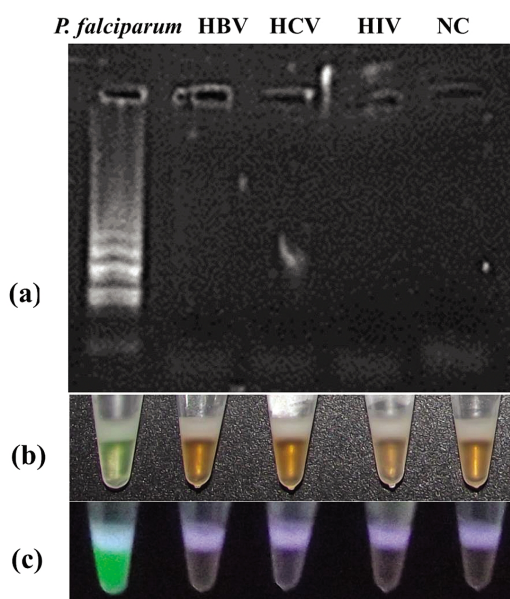


图3 LAMP 闭管检测 *P. falciparum*、HBV、HCV 和 HIV 结果
(a) 闭管 LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果; (b) 蜡封管中 LAMP 产物在日光灯下的结果; (c) 蜡封管中 LAMP 产物在紫外灯下的结果
Fig. 3 The closed-tube LAMP detection results of *P. falciparum*, HBV, HCV and HIV

(a) the electrophorogram of LAMP amplicons, (b) the LAMP amplicons with SYBR I in wax-sealed tube irradiated by daylight, (c) the LAMP amplicons with SYBR I in wax-sealed tube irradiated by UV light

2.4 实际样本的检测

采用本文建立的 LAMP 闭管检测恶性疟原虫的方法,对

经过厚、薄血膜染色镜检过的 13 例血液样本进行 DNA 提取物和 LAMP 闭管检测。结果如图 4 所示,1、4 和 6 号样本 LAMP 闭管检测产物在日光灯下呈绿色,为阳性;2、3、5、7、8、9、10、11、12、13 和阴性对照的 LAMP 闭管检测产物在日光灯下显橙色,为阴性。该结果与镜检结果完全一致,表明本文建立的方法准确性高,能够用于实际样本的检测。

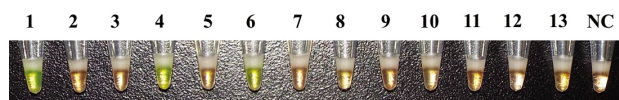


图4 13 例血液样本 DNA 提取物的 LAMP 闭管可视化检测结果
Fig. 4 The closed-tube LAMP visualized detection results of 16 blood specimens

3 讨论

本文建立了一种 LAMP 闭管检测恶性疟原虫的方法。该方法灵敏度高,可检测低至 70 个拷贝的 DNA 分子;特异性好,可区分检测常见的血液病原体;检测时间短,可在 30 min 内实现对恶性疟原虫的检测。与传统的厚、薄血膜检测法检测法相比,本方法检测恶性疟原虫无需对虫体进行分离,直接采用待检病人血液进行 DNA 提取便可检测,操作简便、快速。与基于 PCR 的方法相比,优点表现在:(1)本方法检测过程恒温进行,无需热循环装置;(2)采用温度敏感的微晶蜡将显色用荧光染料 SYBR Green I 密封于反应管底部,扩增反应结束后通过升温的方式使扩增产物发生显色反应,无需开管进行检测,因此避免了污染;(3)在日光灯或紫外灯下,通过肉眼观测颜色变化就能分辨阳性和阴性,实现了可视化检测,无需昂贵的检测仪器,极大降低了检测成本。因此,本文建立的 LAMP 闭管检测恶性疟原虫的方法,非常适合于恶性疟疾的现场快速筛检。

参考文献(References)

- [1] James S, Takken W, Collins F H, et al. Needs for monitoring mosquito transmission of malaria in a pre-elimination world[J]. Am J Trop Med Hyg, 2014, 90(1): 6-10
- [2] Salmani M P, Preeti B M, Peerapur B V. Comparative study of peripheral blood smear and quantitative buffy coat in malaria diagnosis[J]. J Commun Dis, 2011, 43(1): 57-59
- [3] Mishra S, Mohanty S, Mohanty A, et al. Management of severe and complicated malaria [J]. Journal of postgraduate medicine, 2006, 52 (4): 281-287
- [4] Norgan A P, Arguello H E, Sloan L M, et al. A method for reducing the sloughing of thick blood films for malaria diagnosis [J]. Malar J, 2013, 12(1): 231
- [5] Bejon P, Andrews L, Hunt-Cooke A, et al. Thick blood film examination for Plasmodium falciparum malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density[J]. Malar J, 2006, 5(1): 104
- [6] Fernando S D, Ihalamulla R L, Wickremasinghe R, et al. Effects of modifying the World Health Organization standard operating procedures for malaria microscopy to improve surveillance in resource poor settings[J]. Malar J, 2014, 13(1): 98
- [7] Nkrumah B, Agyekum A, Acquah S E, et al. Comparison of the novel

- Partec rapid malaria test to the conventional Giemsa stain and the gold standard real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(8): 2925-2928
- [8] Sato K, Shinomiya N. Identification of four species of human malaria parasites by fast PCR[J]. *Rinsho Byori*, 2008, 56(8): 657-661
- [9] Krishna B V, Deshpande A R. Comparison between conventional and QBC methods for diagnosis of malaria [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2003, 46(3): 517-520
- [10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63
- [11] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 877-882
- [12] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. *Journal of infection and chemotherapy*, 2009, 15(2): 62-69
- [13] Liang C, Chu Y, Cheng S, et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification detection by sequence-based barcodes coupled with nicking endonuclease-mediated pyrosequencing[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(8): 3758-3763
- [14] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2003, 41(6): 2616-2622
- [15] Cheng S-J, Chen Z-Y, Chu Y-N, et al. Sensitive detection of influenza A (H1N1) virus by isothermal amplification in a single tube [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39(3): 335-340
- [16] Poon L L, Wong B W, Ma E H, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(2): 303-306
- [17] Liang C, Cheng S, Chu Y, et al. A Closed-Tube Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Products Using a Wax-Sealed Fluorescent Intercalator [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2013, 13(6): 3999-4005
- [18] Iroezindu M O, Agaba E I, Okeke E N, et al. Prevalence of malaria parasitaemia in adult HIV-infected patients in Jos, North-central Nigeria[J]. *Niger J Med*, 2012, 21(2): 209-213
- [19] Kurup R, George C. Detection of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients with and without HIV infection in a rural setting[J]. *West Indian Med J*, 2013, 62(2): 122-126
- [20] Tena-Tomas C, de Messias-Reason I, Song le H, et al. A globally occurring indel polymorphism in the promoter of the IFNA2 gene is not associated with severity of malaria but with the positivity rate of HCV[J]. *BMC Genet*, 2008, 9(1): 80
- [21] John C C. Complex interactions of HIV infection, malaria, and iron deficiency[J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(11): 1635-1637

(上接第 5004 页)

- [3] I. I. Borodin, A. Y. Letiagin. Reaction of circadian rhythms of the lymphoid system to deep screening from geomagnetic fields of the earth[J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1990, 109(2): 191-193
- [4] L.M. Nepomniashchikh, E.L. Lushnikova, M.G. Klinnikova, et al. Tissue and intracellular reorganization of the mouse myocardium induced by the hypogeomagnetic field[J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1997, 124(10): 455-459
- [5] A.V. Trofimov, E.V. Sevostyanova. Dynamics of blood values in experimental geomagnetic deprivation (in vitro) reflects biotropic effects of natural physical factors during early human ontogeny[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2003, 146(1): 100-103
- [6] V.I. Babych. The characteristics of tissue lipid peroxidation of the internal organs in anaphylaxis under the action of a hypo- or hypermagnetic field[J]. *Fiziol Zh*, 1996, 42(5-6): 66-71
- [7] D. Ciorba, V. V. Morariu. Life in zero magnetic field. III. Activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase during in vitro aging of human blood [J]. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2001, 20(3): 313-321
- [8] L. I. Ciortea, V.V. Morariu, A. Todoran, et al. Life in zero magnetic field. III. Effect on zinc and copper in human blood serum during in vitro aging [J]. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2001, 20(2): 127-139
- [9] B. Tombarkiewicz. Effect of long-term geomagnetic field deprivation on the concentration of some elements in the hair of laboratory rats[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2008, 26(1): 75-79
- [10] 贾斌, 张卫菊, 谢丽, 等. 亚磁场环境对小鼠血液系统的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2011, 05: 318-322
- Jia Bin, Zhang Wei-ju, Xie Li, et al. Effects of hypomagnetic field environment on hematopoietic system in mice [J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2011, 24(5): 318-322
- [11] A.Klaus, H. Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. *Annu. Rev. Plant Biol*, 2004, 55: 373-399
- [12] A.E. Szulman. Chemistry, distribution, and function of blood group substances[J]. *Annu Rev Med*, 1966, 17: 307-322
- [13] N. Hamasaki, M. Yamamoto. Red blood cell function and blood storage[J]. *Vox Sang*, 2000, 79(4): 191-197
- [14] M. Dorofteiu, V.V. Morariu, C. Marina, et al. The effects of near null magnetic field upon the leucocyte response in rats[J]. *Cytobios*, 1995, 84(1-2): 179-189
- [15] O. Soehnlein. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151(1): 139-145
- [16] A. Ramel, K.H. Wagner, I. Elmadfa. Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men [J]. *Br J Sports Med*, 2004, 38(5): E22
- [17] S.S. Arash, A. Heather, S.G. Abdelilah. The Molecular Mechanisms of Glucocorticoids-Mediated Neutrophil Survival [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(4): 556-562
- [18] I.V. Shustand I.M. Kostinik. Reaction of the animal adrenal cortex to the action of a strong, constant magnetic field and to a hypomagnetic environment[J]. *Probl Endokrinol (Mosk)*, 1976, 22(2): 86-92
- [19] V.I. Babych. Serotonin metabolism under the action of a low geomagnetic field [J]. *Fiziol Zh*, 1996, 42(1-2): 79-82
- [20] X. Zhang, J.F. Li, Q.J. Wu, et al. Effects of hypomagnetic field on noradrenergic activities in the brainstem of golden hamster [J]. *Bioelectromagnetics*, 2007, 28(2): 155-158