

DOI:10.13350/j.cjpb.250701

• 论著 •

4种试剂盒对恶性疟原虫选择性全基因组扩增性能的比较研究^{*}

王银龙¹, 李飞¹, 张嘉尧², 徐岁², 朱国鼎^{1,2}, 刘耀宝^{1,2**}, 曹俊^{1,2}

(1. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏南京 211166; 2. 国家卫生健康委员会寄生虫病预防和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, 江苏省医学重点实验室, 江苏省血吸虫病防治研究所)

【摘要】 目的 比较4种全基因组扩增试剂盒对滤纸血样本中恶性疟原虫选择性全基因组扩增的性能, 为恶性疟原虫全基因组研究提供参考。 **方法** 对恶性疟患者全血样本进行梯度稀释, 制备高、中、低原虫密度的滤纸血样本并提取DNA, 采用 Transgen、Vazyme、QIAGEN 和 NEB 4种全基因组扩增试剂盒进行选择全基因组扩增(sWGA)。扩增产物经酶切法构建测序文库, 使用 Illumina NovaSeq 6000 S4 平台进行150 bp 双端测序。测序数据经 fastp 进行质控, 并以恶性疟原虫 Pf3D7 参考基因组进行比对, 分析 Mapping 率、覆盖度和测序深度, 同时评估 *Kelch13* 基因区域的扩增效果, 使用 R 软件对数据分析并可视化。 **结果** 4种全基因组扩增试剂盒均能满足测序文库构建需求, 平均产生 35.14M (30.21M~44.35M) 有效测序 reads, 测序数据 Q30 比例均>85%。不同试剂盒的扩增产物在测序数据质量、Mapping 率、覆盖度及测序深度方面存在显著差异, 且受原虫密度影响。在低原虫密度样本中, Transgen 试剂盒表现最佳, 其 Mapping 率、覆盖度及测序深度均显著高于其他试剂盒 ($P<0.05$)。在中等原虫密度样本中, Transgen 和 Vazyme 试剂盒的覆盖度较高(>98%), NEB 试剂盒的覆盖度波动较大(69.51(28.30)%。在高原虫密度样本中, 4种试剂盒的测序数据质量差异较小, Mapping 率和覆盖度均接近 100%。*Kelch13* 基因区域的测序分析显示, Transgen 试剂盒在低密度样本中的测序覆盖度最高(98.39(3.23)%), NEB 和 QIAGEN 试剂盒的覆盖度较低, 且不同试剂盒在不同原虫密度下的平均测序深度差异显著。 **结论** 不同试剂盒对恶性疟原虫选择性全基因组扩增性能的差异较大, Transgen 和 Vazyme 对低原虫密度的样本扩增效果均较好。

【关键词】 疟疾; 恶性疟原虫; 滤纸血; 试剂盒; 选择性全基因组扩增

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)07-0831-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Jul. ;20(07):831—835, 840.]

Comparative study of the genome amplification performance of four kits for *Plasmodium falciparum*

WANG Yinlong¹, LI Fei¹, ZHANG Jiayao², XU Sui², ZHU Guoding^{1,2}, LIU Yaobao^{1,2}, CAO Jun^{1,2}

(1. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; 2. National Health Commission Key Laboratory of Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Provincial Medical Key Laboratory, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases) ^{***}

【Abstract】 Objective This study evaluates four WGA kits for selective whole-genome amplification of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots, providing a reference for *P. falciparum* whole-genome research. **Methods** Whole blood samples from *Plasmodium falciparum*-infected patients were serially diluted to prepare dried blood spot (DBS) samples with high, medium, and low parasite densities. Genomic DNA was extracted and subjected to selective whole-genome amplification (sWGA) using four different WGA kits: Transgen, Vazyme, QIAGEN, and NEB. Amplified products were used to construct sequencing libraries via enzymatic fragmentation, followed by 150 bp paired-end sequencing on the Illumina NovaSeq 6000 S4 platform. Sequencing reads were quality-controlled using fastp and aligned to the Pf3D7 reference genome. Mapping rate, genome coverage, and sequencing depth were analyzed, and the amplification performance of the *Kelch13* gene region was specifically evaluated. Data analysis and visualization were performed using R. **Results** All four WGA kits successfully met the requirements for sequencing library construction, producing an average of 35.14 million (30.21M-44.35M) high-quality reads with Q30 scores above 85%. Significant differences were observed among kits in sequencing quality, mapping rate, genome coverage, and depth, particularly under varying parasite densities. In low-density samples, the Transgen kit performed best, with significantly higher mapping rate, coverage, and

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(82372275, 82320108014); 江苏省“科教能力提升工程”专项经费(ZDXYS202207)。

^{**} **【通信作者】** 刘耀宝, E-mail: yaobao0721@163.com

【作者简介】 王银龙(1997-), 男, 山东德州人, 硕士研究生。主要研究方向: 寄生虫病分子流行病学。E-mail: wangyinlong1997@163.com

depth ($P < 0.05$). For medium-density samples, Transgen and Vazyme achieved $>98\%$ coverage, while NEB showed large variability (69.51% (28.30%). In high-density samples, all kits yielded comparable performance with near-complete coverage. The Transgen kit also showed the highest coverage of the *Kelch13* gene region in low-density samples (98.39% (3.23%)), while NEB and QIAGEN performed less consistently. **Conclusion** The selective whole-genome amplification performance of different kits varied considerably, with Transgen and Vazyme showing better amplification efficiency in low-density *Plasmodium falciparum* samples.

【Keywords】 malaria; *Plasmodium falciparum*; dried blood spots (DBS); kit; selective whole genome amplification (sWGA)

疟疾 (Malaria) 是由按蚊叮咬传播的一种虫媒传染病, 是全球最严重的公共卫生问题之一, 特别是撒哈拉以南非洲和东南亚地区^[1], 根据世界卫生组织报告, 2022 年全球约有 2.49 亿疟疾病例, 死亡病例超过 60 万^[2]。寄生于人体的疟原虫有 5 种, 分别为恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*) 和诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*), 其中, 恶性疟原虫引起的恶性疟最为严重^[3]。

疟疾分子流行病学监测在疟疾控制中发挥重要作用, 通过开展分子标记或基因组监测可追溯疟疾传播动态, 鉴定不同来源疟原虫虫株, 表征疟原虫种群遗传结构和基因流, 并为抗疟药耐药性监测和疫苗抗原靶标多样性研究提供见解^[4]。近年来, 随着测序技术的技术的进步和测序成本的降低, 使疟疾现场样本全基因组测序 (Whole genome sequencing, WGS) 数据在疟疾生物学、流行病学以及耐药性监测等方面得到广泛应用^[5-7]。为获取高质量的疟原虫基因组数据, 现场采样静脉血时需要进行白细胞过滤以去除宿主 DNA 的干扰^[8-9], 但这些操作依赖实验支持, 在资源有限的地区往往难以实现。滤纸血样本具有采集方便、利于保存和运输等优点, 但由于滤纸血样本中的血量有限, 特别是在低原虫密度感染的情况下, 获取高质量疟原虫基因组测序数据十分困难。为应对这些挑战, 选择性全基因组扩增 (Selective Whole Genome Amplification, sWGA) 技术常被用于疟原虫 DNA 的扩增富集^[10-12], 并有效提升了疟原虫全基因组重测序效果。sWGA 技术的核心原理是采用疟原虫特异性的随机引物, 在噬菌体 Phi29 DNA 聚合酶的催化下进行多重置换扩增 (Multiple Displacement amplification, MDA), 不断复制和扩增单链产物, 生成大量长链 DNA, 从而增加疟原虫 DNA 含量。sWGA 技术涉及多个实验步骤, 其扩增效果与引物特异性、酶的适配性、反应条件等多种因素有关^[13]。目前国外多数研究均使用 NEB 的试剂盒进行扩增^[14-16], 且市面上存在多种不同品牌的全基因组扩增试剂盒, 但这些

试剂盒对疟原虫选择性全基因组扩增的性能如何尚缺乏数据支持。因此, 本研究以滤纸血样本为研究对象, 对目前常用的 4 种全基因组扩增试剂盒在恶性疟原虫选择性全基因组扩增的性能进行综合评估, 为恶性疟原虫全基因组研究提供参考。

材料与方法

1 材料

1.1 恶性疟原虫 样本选用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生物样本库 1 例境外输入性恶性疟原虫感染血液样本, 经巢式 PCR 鉴定为恶性疟原虫单一感染^[17], 采用荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)^[18] 对样本的原虫密度进行定量, 计算原始血液样本的原虫密度为 25 286 p/μL。

本研究已获得江苏省寄生虫病防治研究所伦理委员会的批准 (伦理编号: JIPD-2024-017)。

1.2 主要试剂 四种全基因组扩增试剂分别为: Phi29 DNA Polymerase 购于中国全式金生物有限公司; Phi29 MAX DNA Polymerase 购于南京诺唯赞生物科技有限公司; REPLI-g Single Cell Kit 购于德国 QIAGEN 公司; Phi29 DNA Polymerase 购于美国 NEB 公司; 文库构建试剂盒 VAHTS Universal Pro DNA Library Prep Kit for Illumina, qPCR 试剂 AceQ qPCR Probe Master Mix、纯化磁珠 VAHTS DNA Clean Beads 均购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 核酸提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit 购于德国 QIAGEN 公司; DNA 定量试剂盒 Qubit 1 × dsDNA HS Assay Kit 购于美国 ThermoFisher 公司; Whatman 903 滤纸购于英国 Whatman 公司。

1.3 主要仪器 Qubit™ 4 Fluorometer 购于美国 ThermoFisher 公司; Mastercycler® X50-PCR 热循环仪购于德国 Eppendorf 公司; LightCycler® 480 Instrument II 购于瑞士 Roche 公司; NovaSeq 6000 S4 高通量测序平台购于美国 Illumina 公司; KUBOTA 3300 台式离心机购于日本 KUBOTA 公司; Elix/Rios 纯水系统购于美国 Millipore 公司。

2 方法

2.1 滤纸血样本准备 将恶性疟患者血液样本用健康人血倍比稀释至不同原虫密度(5000 p/μL、200 p/μL、40 p/μL),取 150 μL 稀释血样滴加于滤纸上,室温干燥后按试剂盒说明提取核酸,并测定 DNA 浓度。

2.2 选择性全基因组扩增 按照 4 种全基因组扩增试剂盒说明书进行扩增,采用 MalariaGEN(<https://www.malariagen.net/>)推荐的引物和扩增反应条件^[18]。每个样本进行 5 次技术重复,DNA 投入量 6 μL(约 10 ng)。3 种原虫密度样本共进行 60 次 sWGA 扩增,产物经磁珠纯化后测定 DNA 浓度。

2.3 文库构建和测序 采用酶切法构建测序文库,酶切条件为 37 ℃,10 min。使用 Illumina NovaSeq 6000 S4 测序平台进行 150 bp 双端测序,每个样本测序数据量不低于 30 M reads(百万读长数,Million reads)。

2.4 数据分析 使用 fastp 软件(版本 0.23.4)对下机数据质控,包括去除接头序列、低质量碱基和过短的测序片段^[20]。采用 BWA 软件(版本 0.7.18)进行基因组比对^[21],参考基因组选用恶性疟原虫 Pf3D7 虫株基因组序列^[22],比对生成的 bam 文件使用 SAMtools 软件(版本 1.20)进行质控^[23],使用 R 软件(版本 4.3.2)进行统计分析。采用 R 软件的 ggplot2(版本 3.5.1)、ggridges 包(版本 0.5.6)和 GraphPad Prism 软件(版本 9.5.1)可视化。采用 *t* 检验和单因素方差分析评估组间差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 4 种试剂盒基本性能比较

4 种试剂盒对恶性疟原虫进行选择全基因组扩增后的产物浓度差别较大(表 1),QIAGEN 组与其他组相比差异有统计学意义($t=4.682\sim5.547$,均 $P<0.05$)。所有扩增产物测序后产生的数据量范围为 30.21 M~44.35 M reads,测序数据的 Q20 及 Q30 比例均>85%(图 1)。

2 不同试剂盒 sWGA 产物测序数据比较

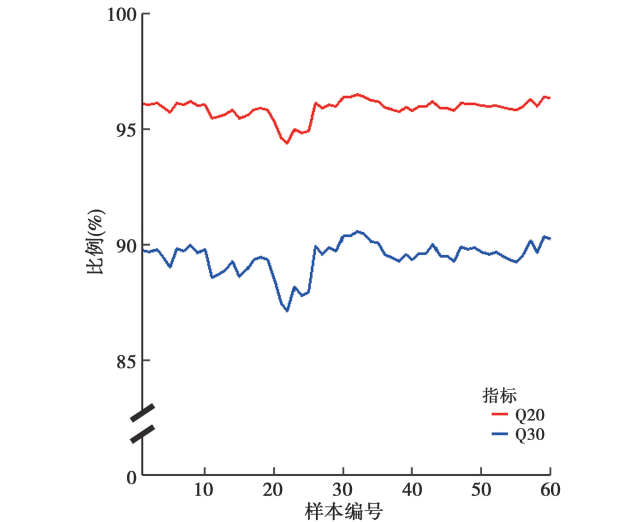
4 种试剂盒在不同原虫密度的下机数据基本统计结果见图 2。在较低原虫密度(1:625 稀释)样本中,Mapping 率方面 Transgen 组与其他组比较差异有统计学意义($t=5.70\sim20.19$,均 $P<0.05$),覆盖度方面,Transgen 组与其他三组比较差异有统计学意义($t=8.995\sim28.52$,均 $P<0.05$),测序深度>5×数据比例方面 Transgen 组表现优异,与其他组相比差异有统计学意义($t=12.46\sim24.09$,均 $P<0.05$);中等原虫密度(1:125 稀释)样本中,Mapping 率及测序深度>5×数据比例与低密度样本具有相同趋势,覆盖度方面 Transgen 组除与 NEB 组相比无统计学意义外,与其他组相比差异均有统计学意义($t=6.398\sim30.97$,均

$P<0.05$);高原虫密度(1:5 稀释)样本中,Mapping 率方面,Transgen 组与其他三组比较差异有统计学意义($t=5.01\sim26.67$,均 $P<0.05$),且与中、低原虫密度样本的趋势一致。在覆盖度和>5×测序深度比例方面,部分试剂盒之间的两两比较显示统计学差异较小,仅在>5×测序深度比例方面 QIAGEN 与其他三组相比差异均有统计学意义($t=2.76\sim7.39$,均 $P<0.05$)。

表 1 4 种试剂盒选择性全基因组扩增基本情况比较
Table 1 Basic comparison of four kits for selective whole genome amplification

稀释比例	试剂盒	扩增 体积 (μL)	测序数据量 (M, $\bar{x} \pm s$)	扩增产物浓度 (ng/μL, $\bar{x} \pm s$)	F	P
1:5 (5000 p/μL)	Transgen	20	34.48 ±1.95	13.2 ±3.02	26.9	<0.01
	Vazyme	13	36.49 ±1.84	16.3 ±2.85		
	NEB	20	35.74 ±2.38	26.9 ±5.22		
	QIAGEN	50	37.85 ±2.35	104.4 ±36.64		
1:125 (200 p/μL)	Transgen	20	36.77 ±3.20	16.8 ±2.98	115.8	<0.01
	Vazyme	13	38.37 ±3.37	21.2 ±10.66		
	NEB	20	34.68 ±2.60	39.8 ±6.92		
	QIAGEN	50	39.97 ±2.49	105.6 ±14.29		
1:625 (40 p/μL)	Transgen	20	35.16 ±3.03	11.1 ±5.09	207.7	<0.01
	Vazyme	13	35.41 ±1.96	21.2 ±10.66		
	NEB	20	34.06 ±3.72	38.6 ±7.42		
	QIAGEN	50	37.63 ±1.85	131.2 ±12.83		

注:表中 F 值和 P 值均针对产物浓度统计,不同原虫密度组内试剂盒两两单独比较, $P<0.05$ 。



注:Q20 为碱基正确率大于 99% 的比例,Q30 为碱基正确率大于 99.9% 的比例。
图 1 测序数据质控后 Q20 及 Q30 比例
Fig. 1 Q20 and Q30 Proportion in cleandata of sequencing samples

3 不同试剂盒对 Kelch13 基因测序效果分析

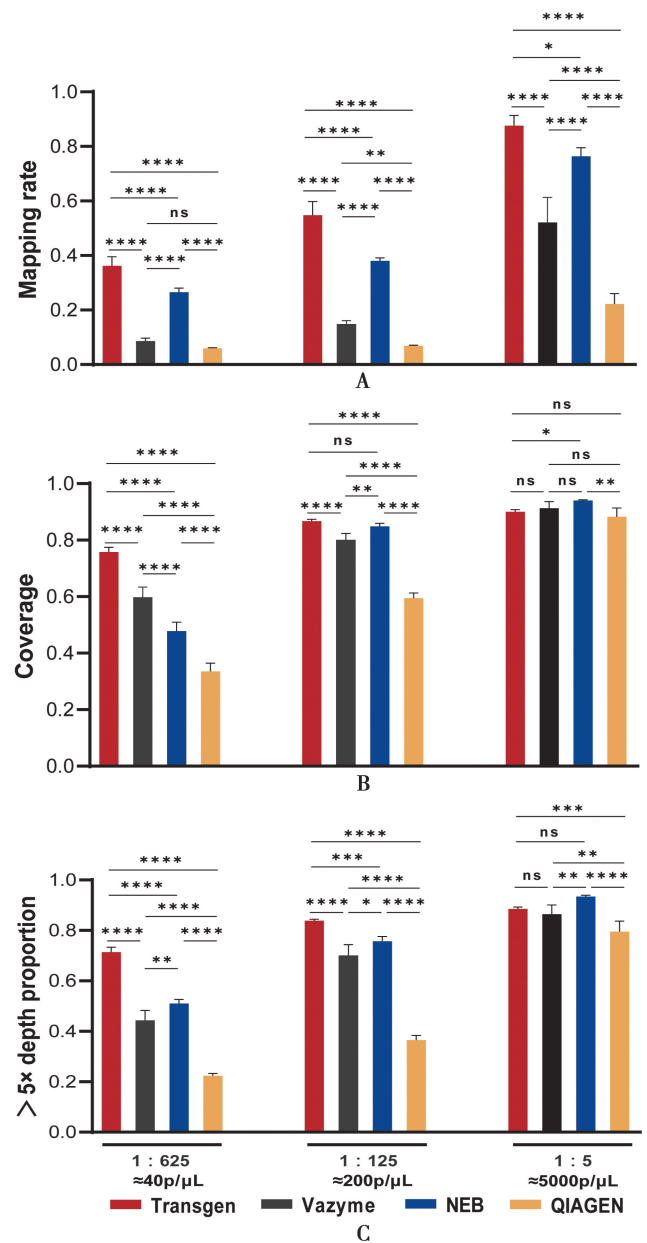
随着原虫密度的降低,4 种试剂盒对耐药基因 Kelch13 区域测序的覆盖度和深度均逐渐下降(图 3)。高原虫密度组(1:5 稀释),Transgen 和 NEB 的覆盖度均为 100%,QIAGEN 和 Vazyme 的覆盖度分

别为 $99.76\% \pm 0.48\%$ 和 $94.75\% \pm 10.49\%$, 平均测序深度分别为 $372.33 \pm 358.52 \times$ (Transgen)、 $35.85 \pm 13.50 \times$ (NEB)、 $41.95 \pm 3.43 \times$ (QIAGEN) 和 $70.00 \pm 33.54 \times$ (Vazyme), 两指标各组之间比较差异无统计学意义; 中等原虫密度组 (1 : 125 稀释), Transgen ($99.03\% \pm 1.94\%$) 和 Vazyme ($98.34\% \pm 1.53\%$) 覆盖度较高, QIAGEN ($79.64\% \pm 7.88\%$) 和 NEB ($69.51\% \pm 28.30\%$) 覆盖度较低, Transgen 组与 QIAGEN 组、NEB 组相比差异均有统计学意义 ($t = 2.082 \sim 4.774$, 均 $P < 0.05$), 平均测序深度方面, 各组分别为 $50.68 \pm 26.04 \times$ (Transgen)、 $6.55 \pm 4.78 \times$ (NEB)、 $4.15 \pm 0.82 \times$ (QIAGEN) 和 $17.10 \pm 6.26 \times$ (Vazyme), Transgen 组与其他组相比较差异均有统计学意义 ($t = 2.51 \sim 3.57$, 均 $P < 0.05$), 其他组之间比较差异无统计学意义; 低原虫密度组 (1 : 625 稀释), Transgen 的覆盖度最高 ($98.39\% \pm 3.23\%$), QIAGEN 的覆盖度最低 ($23.81\% \pm 7.44\%$), Vazyme 和 NEB 的覆盖度分别为 $65.32\% \pm 11.04\%$ 和 $56.60\% \pm 28.28\%$, 除 Vazyme 组与 NEB 组比较差异无统计学意义之外, 其他组之间比较差异均有统计学意义 ($t = 2.51 \sim 20.56$, 均 $P < 0.05$), 平均测序深度方面, 各组分别为 $63.78 \pm 71.74 \times$ (Transgen)、 $3.10 \pm 0.82 \times$ (NEB)、 $4.30 \pm 0.99 \times$ (QIAGEN) 和 $4.87 \pm 2.39 \times$ (Vazyme), 各组之间无差异。

讨论

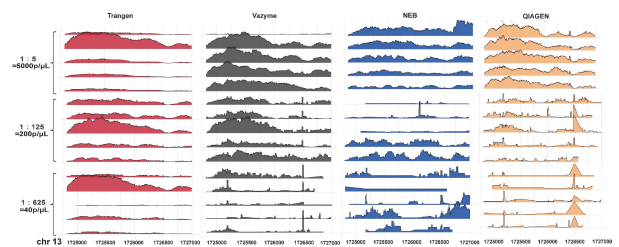
在疟原虫基因组学研究中, 选择性全基因组扩增技术 (sWGA) 能有效减少宿主 DNA 的干扰, 逐渐成为广泛使用的工具, 特别是在低原虫密度感染样本中, 能显著提高基因组测序数据质量^[24]。sWGA 技术已在多项疟原虫种群遗传学相关研究中得到应用, 证明其可靠性和广泛适用性^[25-27]。然而, 现有研究主要依赖于传统测序策略, 在低原虫密度感染样本 (尤其是滤纸血) 中损耗较大, 大量样本因建库失败无法进行大规模基因组分析。本研究系统评估了 4 种不同全基因组扩增试剂盒对恶性疟原虫滤纸血样本的扩增效果, 为国内疟疾分子流行病学研究提供技术参考。

所有试剂盒均能有效扩增滤纸血样本中疟原虫 DNA, 且产出足够的数据量进行测序, 但不同试剂盒在测序深度、覆盖度和特定基因区域的表现上均存在显著差异, 试剂盒的扩增效果与样本的原虫密度密切相关, 随着原虫密度的降低, 所有试剂盒的扩增效果均有所减弱, 低密度样本的全基因组比对率均在 40% 以下, 最高覆盖度仅为 77%, 表明模板浓度和非特异性扩增对结果产生了较大影响^[28]。



A Mapping 率比较 B 覆盖度比较 C $>5 \times$ 测序深度比例比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 2 不同试剂盒在不同原虫密度下覆盖率、映射率和 $>5 \times$ 深度比例比较
Fig. 2 Comparison of coverage, mapping rate and $>5 \times$ depth proportion of different kits at various infection densities



注: 横轴为基因组位置, 纵轴为测序深度; 每列为不同试剂盒, 每行表示相同原虫密度下的不同重复样本。

图 3 不同试剂盒在不同原虫密度下测序数据在 *Kelch13* 基因区域的覆盖情况
Fig. 3 Coverage of the *Kelch13* gene region by different kits at varying infection densities

QIAGEN 试剂盒对滤纸血样本的扩增能力最强,相同 DNA 模板投入量,其扩增产物浓度是其他试剂盒的 2~9 倍,然而其 Mapping 率和覆盖度在 4 种试剂盒中表现最差,可能与该试剂盒在扩增时产生了大量恶性疟原虫非特异性序列有关。在低原虫密度样本(1:625 稀释)中,Transgen 试剂盒在全基因组测序深度 $>5 \times$ 比例(67%~73%)和覆盖度(73%~77%)方面表现最佳,并且其对 *Kelch13* 基因区域的覆盖度(98.39% $\pm$ 3.23%)和测序深度(63.78 $\pm$ 71.74 $\times$)较高,因此在疟原虫青蒿素抗药性分子监测中具有优势。QIAGEN 试剂盒在高原虫密度样本中全基因组测序深度 $>5 \times$ 比例均超过 87%,但在低原虫密度样本中,其整体基因组缺失率较高(29%~37%),且平均测序深度极低,这一结果与 Ibrahim 等^[28]的研究一致,后者对原虫密度 <400 p/ μ L 的样本进行 sWGA 时,覆盖度 $>5 \times$ 的比例仅为 40%~60%。选择合适的扩增方法和试剂盒对获得可靠的基因组数据至关重要,尤其是在处理低密度样本时^[29]。

国产试剂盒的成功应用能够有效降低研究成本,提高样本利用率。本研究 Transgen 与 Vazyme 两种试剂盒均为国产试剂,在不同原虫密度中表现较好,尤其是在低原虫密度时,Transgen 试剂盒在全基因组层面表现出优先于其他试剂盒的 Mapping 率及覆盖率,显著高于其他试剂盒,与 Oyola 等^[30]对 NEB 试剂在低原虫密度条件下的研究结果一致,进一步表明 NEB 试剂盒在处理低浓度样本时存在局限性。此外,Transgen 与 Vazyme 试剂盒在 *Kelch13* 基因区域上的表现优于目前国外常用的 NEB 试剂,随着原虫密度的下降,NEB 试剂盒的性能下降幅度明显大于 Transgen 与 Vazyme,在低原虫密度样本中,Transgen 试剂盒对 *Kelch13* 区域的平均覆盖度(测序深度)为 98.39%(63.78 $\times$),Vazyme 为 65.32%(4.87 $\times$),而 NEB 仅为 56.60%(3.10 $\times$),且不同重复实验之间的波动性较大,表明 NEB 试剂盒对低原虫密度样本扩增不稳定,可能影响其在现场应用中的可靠性。由于滤纸血样本是现场研究中最常用的保存方式,如何优化扩增策略以提高数据质量,是影响疟疾基因组学研究效率的关键因素之一。本研究通过实验室模拟样本系统评估了不同 sWGA 试剂盒的性能,但其在大规模分子流行病学研究中的适用性尚需验证,扩增策略和试剂盒的选择范围仍有待扩大,且 Transgen 和 Vazyme 试剂盒在不同疟原虫种群及遗传背景下的适用性仍需进一步研究。

综上所述,本研究通过比较 4 种不同试剂盒对滤纸血样本中恶性疟原虫全基因组选择性扩增的性能,明确了其在不同原虫密度下的效果差异,为后续相关

研究提供参考。未来研究可进一步优化扩增引物及反应条件,以提升 sWGA 技术在低密度样本中的扩增效率,并结合现场样本进行大规模验证,从而推动该技术在疟疾分子流行病学研究中的更广泛应用。

【参考文献】

- [1] Ashley EA, Pyae PA, Woodrow CJ. Malaria[J]. Lancet, 2018, 391(10130):1608-1621.
- [2] WHO. World malaria report 2023[R]. Geneva:WHO, 2023.
- [3] WHO. Malaria[EB/OL]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
- [4] Ruybal-Pesantez S, McCann K, Vibin J, et al. Molecular markers for malaria genetic epidemiology: Progress and pitfalls[J]. Trends Parasitol, 2024, 40(2):147-163.
- [5] Manske M, Miotto O, Campino S, et al. Analysis of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing[J]. Nature, 2012, 487(7407):375-379.
- [6] Da S C, Boene S, Datta D, et al. Targeted and whole-genome sequencing reveal a north-south divide in *P. falciparum* drug resistance markers and genetic structure in Mozambique[J]. Commun Biol, 2023, 6(1):619.
- [7] Shi SM, Shi TQ, Chen SB, et al. Genome-wide scans for ghanaiian *Plasmodium falciparum* genes under selection from local and chinese host populations[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:630797.
- [8] Auburn S, Campino S, Clark TG, et al. An effective method to purify *Plasmodium falciparum* DNA directly from clinical blood samples for whole genome high-throughput sequencing[J]. Plos One, 2011, 6(7):e22213.
- [9] Venkatesan M, Amaratunga C, Campino S, et al. Using CF11 cellulose columns to inexpensively and effectively remove human DNA from *Plasmodium falciparum*-infected whole blood samples[J]. Malar J, 2012, 11:41.
- [10] Cowell AN, Loy DE, Sundararaman SA, et al. Selective whole-genome amplification is a robust method that enables scalable whole-genome sequencing of *Plasmodium vivax* from Unprocessed Clinical Samples[J]. Mbio, 2017, 8(1):e02257-16.
- [11] Oyola SO, Ariani CV, Hamilton WL, et al. Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification[J]. Malar J, 2016, 15(1):597.
- [12] Joste V, Guillochon E, Clain J, et al. Development and optimization of a selective whole-genome amplification to study *Plasmodium ovale* Spp[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(5):e0072622.
- [13] Huang M, Yang F, Fu J, et al. Reaction parameter comparison and optimization of multiple displacement amplification[J]. Anal Methods-Uk, 2020, 12(1):46-53.
- [14] de Cesare M, Mwenda M, Jeffreys AE, et al. Flexible and cost-effective genomic surveillance of *P. falciparum* malaria with targeted nanopore sequencing[J]. Nat Commun, 2024, 15(1):1413.
- [15] Oyola SO, Ariani CV, Hamilton WL, et al. Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification[J]. Malar J, 2016, 15(1):597.
- [16] Coonahan E, Gage H, Chen D, et al. Whole-genome surveillance identifies markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance and novel genomic regions under selection in Mozambique[J]. Mbio, 2023, 14(5):e0176823.

(下转 840 页)