

DOI:10.13350/j.cjpb.250702

• 论著 •

狂犬病病毒 VHH 抗体库的构建、表达及鉴定^{*}赵韩^{1,2}, 莫若^{2,3}, 王琮^{2,3}, 王申², 闫飞虎², 冯娜², 王铁成², 赵永坤^{2**}, 夏咸柱^{1,2,3***}

(1. 东北农业大学动物医学院, 黑龙江哈尔滨 150036; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 吉林农业大学)

【摘要】 **目的** 筛选抗狂犬病病毒特异性纳米抗体, 为其作为免疫治疗制剂提供基础。 **方法** 采集免疫羊驼后的外周血, 分离单个核细胞, 利用巢式 PCR 扩增 VHH 基因。通过噬菌体展示技术构建狂犬病病毒纳米抗体展示文库, 通过 phage ELISA 特异性筛选具有高亲和力和特异性的抗 RABV 纳米抗体序列。将获得的抗体序列插入真核表达载体 pcDNA3.1(+), 构建真核重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-VHH, 以脂质体作为转染试剂, 瞬时转染高密度的 HEK293T 细胞中进行表达。表达的抗体经镍柱纯化后分别通过 Western blot 和病毒中和实验验证其活性。 **结果** 成功构建了库容量为 3.3×10^6 cfu/mL 的狂犬病病毒纳米抗体文库, 文库多样性良好。筛选获得了 4 株具有高亲和力和特异性的抗 RABV 纳米抗体序列。表达纯化的 2 株重组纳米抗体均显示对 RABV 的中和活性, 中和效价分别为 0.817 IU/mL 和 1.14 IU/mL。 **结论** 本研究成功构建了针对 RABV 的纳米抗体文库, 并在细胞中成功表达了特异性的纳米抗体。

【关键词】 狂犬病病毒; 纳米抗体; 噬菌体文库; 蛋白表达

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2025)07-0836-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Jul. ;20(07):836-840.]

Construction, expression and characterisation of VHH antibody library antibodies against rabies virus

ZHAO Han^{1,2}, MO Ruo^{2,3}, WANG Qiong^{2,3}, WANG Shen², YAN Feihu², FENG Na², WANG Tiecheng², ZHAO Yongkun², XIA Xianzhu^{1,2,3} (1. *School of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150036, China*; 2. *Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences*; 3. *Jilin Agricultural University*)

【Abstract】 **Objective** To screen for anti-rabies virus-specific nano-antibodies to provide a basis for their use as immunotherapeutic agents. **Methods** Peripheral blood was collected from immunized alpacas, single nucleated cells were isolated, and the VHH gene was amplified using nested PCR. Rabies virus nanoantibody display libraries were constructed by phage display technology, and anti-RABV nanoantibody sequences with high affinity and specificity were specifically screened by phage ELISA. The obtained antibody sequences were inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+), and the eukaryotic recombinant expression plasmid pcDNA3.1(+)-VHH was constructed, which was transiently transfected into high-density HEK293T cells for expression, using liposomes as transfection reagents. The expressed antibody was purified by nickel column and its activity was verified by Western blot and viral neutralization assay, respectively. **Results** A rabies virus nanoantibody library with a library capacity of 3.3×10^6 cfu/mL was successfully constructed with good library diversity. The two recombinant nanobodies expressed and purified showed neutralizing activity against RABV, with neutralizing potencies of 0.817 IU/mL and 1.14 IU/mL, respectively.

Conclusion In this study, we successfully constructed nanobody libraries against RABV and expressed specific nanobodies in cells.

【Keywords】 rabies virus; nanobodies; phage libraries; protein expression

^{***} 狂犬病是由狂犬病病毒(Rabies virus, RABV)引起的人兽共患病, 病毒主要通过被感染的动物咬伤进行传播, 侵入宿主的中枢神经系统后造成不可逆损伤^[1]。狂犬病一旦发生, 致死率可达 100%。狂犬病病毒是一种不分节段的单股负链 RNA 病毒, 基因组长度约为 12 kb, 编码 5 种结构蛋白, 核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和聚合酶(L 其中 G 蛋白作为病毒包膜上的唯一糖蛋白, 可以诱导产生中和抗体和提供免疫保护作用, 同时也是疫苗设计、抗体筛选和药物研究的重要靶蛋白^[2-3]。RABV G 蛋白以

三聚体形式出现在病毒颗粒表面, 呈现纤突状, 外膜区通过对受体的识别和黏附介导病毒的出芽, 并导致宿主产生中和抗体的宿主细胞受体^[4]。

^{*} **【基金项目】** 吉林省科技发展计划项目 (No. 20210202052NC)。

^{**} **【通信作者】** 赵永坤, E-mail: zhaoyongkun1976@126.com
夏咸柱, E-mail: xiazh@cae.cn

【作者简介】 赵韩(2000-), 女, 吉林松原人, 硕士, 主要研究方向: 分子病毒学。E-mail: 2710740973@qq.com

目前狂犬病的治疗方法主要是针对暴露者进行暴露后处置^[5]。尚无行之有效的标准治疗方法。现使用的人用狂犬疫苗均为病毒培养灭活疫苗,虽然安全性好、保护率高,但产生免疫应答的速度较慢,而且需要连续接种4~5次、10~14 d后才能达到免疫保护^[6]。对伤口接近中枢神经系统、潜伏期短的伤者难以起到紧急预防救治作用。现在临床批准使用的免疫血清或免疫球蛋白,多为疫苗接种后的人的免疫血清或其纯化的免疫球蛋白,在2022和2024年批准使用的人用狂犬病单克隆抗体和鸡尾酒抗体,为人源化抗体或全人源IgG抗体,难以透过血脑屏障^[7]。

纳米抗体(nanobodies, Nbs)又称为重链单域抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH),其分子质量大小为15 ku,是目前已知识别和结合抗原能力的最小抗体。它来源于骆驼,天然缺失轻链和CH1,可与抗原发生特异性结合^[8]。纳米抗体与传统的抗体与传统抗体相比,具有分子质量小、渗透性强、水溶性好、稳定性好、抗原识别能力强、易于表达等优点^[9],能够通过噬菌体展示技术获得完整的VHH序列。因此,纳米抗体有望透过血脑屏障,成为狂犬病的有效治疗抗体。为此,本研究利用噬菌体展示技术构建并筛选RABV的纳米抗体,经病毒中和试验进一步鉴定并表达为具有中和能力,为抗体研究提供了物质基础和技术支持。

材料与方法

1 材料

1.1 实验细胞及实验动物 HEK293T细胞、BHK细胞、抗狂犬病病毒羊驼外周血由中国农业科学院长春兽医研究所动物病毒学与特种经济动物疫病学实验室保存。

1.2 主要试剂 外周血淋巴细胞分离液购自天津、样本稀释液、清洗液购自天津市灏洋生物科技责任有限公司; Trizol裂解液、DreamTaqPCR预混液(2×)、SacI限制性内切酶、BcuI限制性内切酶、T4 DNA Ligase均购自美国Thermo公司; D/RNase-free wqter购自北京天根生化科技有限公司; 三氯甲烷购自成都市科隆化学品有限公司; 异丙醇购自天津市天力化学试剂有限公司; PCR聚合酶PremeSTAR Max DNA Polymerase购自日本Takara公司; Pcomb3XSS、XL1-BLue、VCSM13均购自北京宝科维食安生物技术有限公司; PEG8000购自上海碧云天生物有限公司。

2 方法

2.1 纳米抗体文库的构建 使用梯度密度离心法提取分离实验室保存的抗狂犬病病毒,用Trizol法提取

RNA,反转录成cDNA,根据李江凡^[10]设计的引物进行两轮PCR扩增,引物序列见表1。PCR产物经2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。用限制性内切酶BcuI和SpeI对PCR产物和Pcomb3XSS载体进行双酶切,回收片段。用T4 DNA连接酶连接16℃连接过夜。连接产物经DNA回收试剂盒纯化后电转入制备的新鲜的TG1感受态细胞。取10 μL用培养基做梯度稀释,涂板计数计算库容,加入15%的甘油, -80℃备用。随机挑取单克隆做菌液PCR鉴定测定转化效率,送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序,用DNAMAN和MEGA软件分析测序结果并绘制系统进化树,分析抗体库的多样性。AlpH-LD、CH2-R为PCR第一轮引物,VHH-F、VHH-R为PCR第二轮引物,划线部分分别为SacI和BcuI的酶切位点。

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primers

引物	引物序列(5'-3')
AlpH-LD	CTTGGTGGTCCTGGCTGC
CH2-R	GGTACGTGCTGTTGAAGTGTTC
VHH-F	<u>CGAGCTCG</u> AGTCTGGAGGRRGCTTGGTGCA
VHH-R	<u>CGGACTAGT</u> TGAGGAGACGRTGACSTSGGTC

2.2 噬菌体文库的鉴定与筛选 将冻存纳米抗体文库接种于含100 μg/mL Amp和20%葡萄糖的2×YT培养基(初始A₆₀₀=0.1),37℃培养至A₆₀₀=0.5~0.55后,按MOI=20:1加入辅助噬菌体VCSM13,经吸附、离心后重悬于2×YT(含Amp、Kana、Tet)培养基中过夜培养。将培养液经4℃, 4 000 r/min离心20 min,收集上清,加入冷的1/4的PEG/NaCl,混合均匀,冰上孵育,同上离心,用PBS重悬沉淀,为RABV特异性重组噬菌体库。将10 μg RABV G蛋白包被ELISA板,5%脱脂乳封闭,加入噬菌体上清,用三乙胺洗脱15 min,中和洗脱,加入20 mL的XL1-Blue宿主菌(A₆₀₀=0.5),37℃振荡培养1 h,取10 μL进行梯度稀释涂板计算淘筛量,经过3轮淘筛获得的菌液加入15%甘油, -80℃保存。菌液梯度稀释涂板,随机挑取96个单克隆制备噬菌体,ELISA检测其结合活性(以HRP-抗M13抗体为二抗,TMB显色,A₄₅₀≥2倍阴性对照判为阳性)。选取高阳性克隆进行PCR扩增及测序分析。

2.3 VHH的真核表达纯化与鉴定 根据淘筛出的4株噬菌体序列为模板设计引物(表2)进行PCR扩增纳米抗体片段。将目的片段和载体pcDNA3.1(+)用限制性内切酶EcoRI和KpnI分别进行酶切处理,用T4DNA连接酶连接。将构建正确的重组质粒转入大肠埃希菌感受态细胞DH5α中,取100 μL涂布在LB平板上,挑取单克隆进行菌液PCR和双酶切鉴定。对

鉴定正确的菌株提取质粒 DNA,命名为 VHH-11、VHH-21、VHH-23、VHH-30。

表 2 PCR 引物
Table 2 PCR primers

引物	引物序列(5'-3')
VHH-F	CGGGGTACCGCCACCATGCAGGCGGCCGAGCTCGAGTCT
VHH-R	CCGGAATTCTTAGTGGTGGTGGTATGGTATGATGATGATG

将上述构建成功的质粒转染至 293T 细胞,48 h 后收取含表达抗体的上清进行 Western blot 检测目的蛋白的表达情况。目的蛋白大量表达并通过镍亲和柱纯化后进行 Western blot 鉴定。纯化后的纳米抗体进行中和能力验证,加入 50 μ L 的细胞稀释液;37 $^{\circ}$ C,培养 48 h 后应该是进行荧光检测,计算效价。

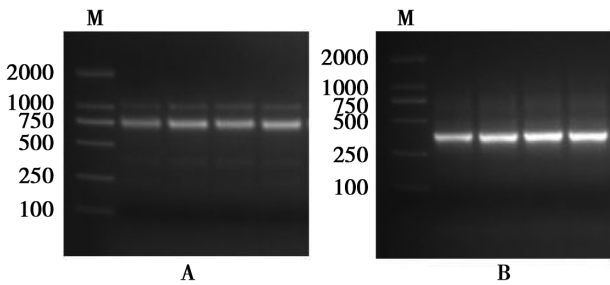
结 果

1 纳米抗体文库的构建

结果显示成功扩建出普通抗体基因,大小约为 900 bp 和重链抗体编码基因,在大小约为 700 bp 特异性条带,回收 700 bp 附近的条带,进行二轮 PCR,结果显示特异性条带在 450 bp 左右,符合预计的 VHH 基因大小。

随机挑取 34 个细菌文库的单菌落并计算库容为 3.3×10^6 cfu/ml,对随机挑取的 34 个菌落进行菌液 PCR,鉴定抗体库的阳性率,PCR 结果如图 2 所示,在 450 bp 附近有条带符合预期,显示阳性率为 100%。

随机挑取的单菌落测序测序成功见图 3,对所测序列进行进化树分析,可见该抗体库的多样性良好。



A PCR 重链抗体结果 B VHH 基因扩增结果
图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results

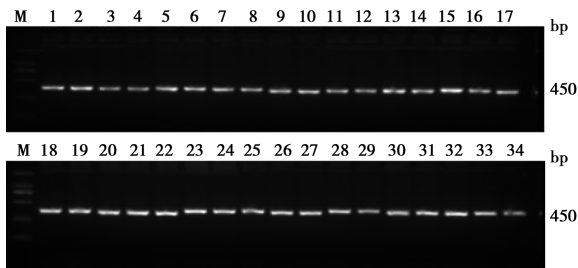


图 2 菌液 PCR 结果

Fig. 2 PCR results of bacterial liquid

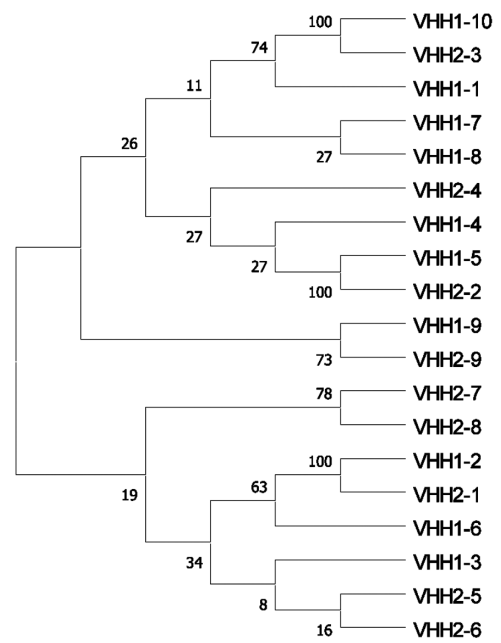


图 3 序列的进化树分析

Fig. 3 Evolutionary tree analysis of sequences

通过用 DNAMAN 进行序列比对分析,结果见图 4,显示序列同源性差异较大,进一步表明初始文库中重链可变区基因的多样性较好。

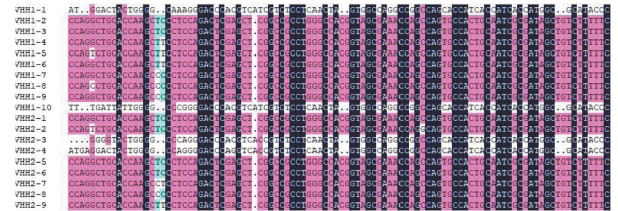


图 4 纳米抗体的序列分析

Fig. 4 Sequence analysis of nanobodies

2 噬菌体文库的鉴定与筛选

噬菌体抗体库三轮筛选结果见表 3,具有结合活性的噬菌体在三轮筛选中输出稳定,回收率趋于稳定。

表 3 噬菌体抗体库三轮筛选结果

Table 3 Results of three rounds of screening of phage antibody library

筛选轮数	噬菌体投入量 (pfu/ml)	噬菌体输出量 (pfu/ml)	回收率
1	4×10^{10} pfu/ml	1.3×10^5	3.25×10^{-6}
2	4×10^{10} pfu/ml	2.3×10^6	5.75×10^{-4}
3	4×10^{10} pfu/ml	1.6×10^6	4×10^{-4}

随机挑取 96 个三轮淘筛后的噬菌体文库的单克隆菌落进行 phage ELISA 检测,结果如图 5,选定 VHH-11、VHH-21、VHH-23 和 VHH-30 共 4 株进行表达和鉴定。

3 VHH 的表达纯化与鉴定

成功构建真核重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-VHH(图 6)。将转染后的细胞上清进行离心用镍柱

进行纯化后,经 Western blot 检测可在 15 ku 附近可见目的蛋白条带,表明 VHH 抗体成功表达,结果见图 7。通过中和实验对狂犬病纳米抗体的中和活性进行测定,鉴定结果如图 8,两株纳米抗体 VHH-11 和 VHH-23 具有中和活力,效价分别为 0. 817 IU 和 1. 14 IU。

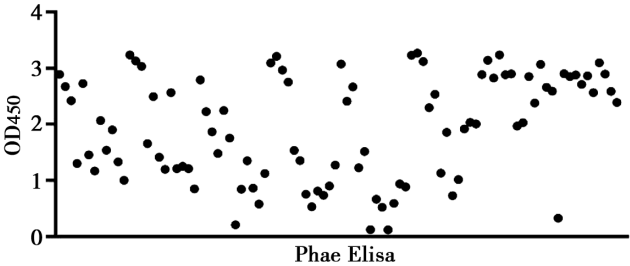


图 5 phage ELISA 鉴定阳性克隆结果
Fig. 5 phage ELISA identifies positive clone results

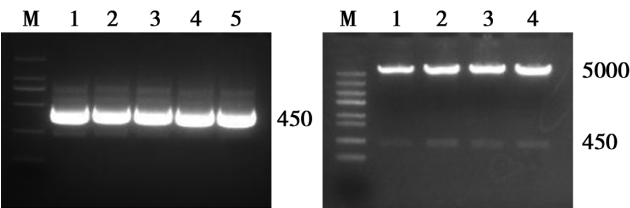


图 6 纳米抗体重组真核表达质粒的鉴定
Fig. 6 Identification of recombinant eukaryotic expression plasmids for nanobodies

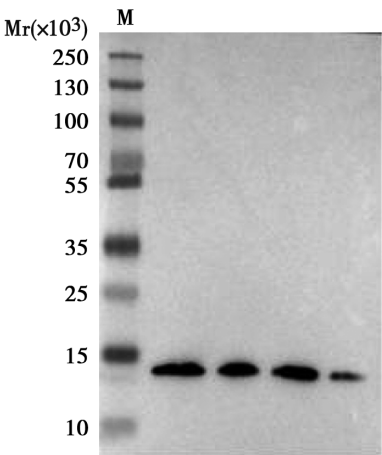


图 7 纳米抗体表达与纯化鉴定
Fig. 7 Nanobodies expression and purification identification

讨 论

狂犬病是一种古老的动物源性人兽共患病,可造成感染动物与人的急性不可逆性致死性脑炎。通常认为狂犬病可防不可治,一旦发病,死亡率接近 100%^[11]。2015 年世界卫生组织提出,将在 2030 年前消除人间狂犬病的发生作为一个全球目标。根据近几年调查数据显示,我国各地的狂犬病发病率均呈现下降趋势,但是距离消除狂犬病还有一段距离^[12]。人狂

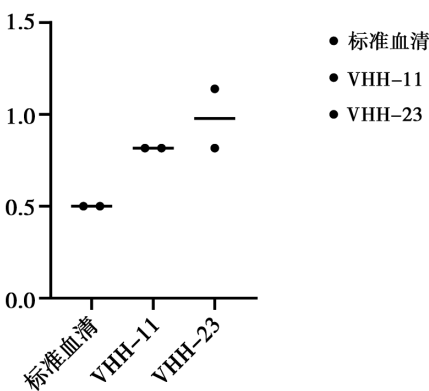


图 8 中和检测结果
Fig. 8 Neutralisation test results

犬病的防控,关键在于对暴露后人群的分级分类处理,一级和二级暴露的人群需要进行伤口冲洗并接种疫苗,三级暴露人群在此之外还需使用免疫球蛋白进行紧急救治。对于伤口接近神经中枢的患者,免疫球蛋白的及时与正确使用至关重要。

目前使用的狂犬病免疫球蛋白主要是疫苗接种人群的血清制品与马抗血清制品,受到安全隐患与过敏反应、来源有限等限制。为此兴盟生物研发了一款人源化狂犬病免疫球蛋白^[7]。此外,华北制药研发了全人源狂犬病抗体奥木替韦单抗注射液(商品名“迅可”),能特异地中和狂犬病病毒糖蛋白保守抗原位点中的线性中和抗原表位,从而阻止狂犬病毒侵染组织细胞,发挥预防狂犬病的作用^[13]。房世娣等^[14]基于人源抗狂犬病病毒 ScFv 噬菌体抗体库,成功分离出 20 株人类来源抗狂犬病病毒单克隆抗体。这些基因工程抗体的研究与应用填补了我国狂犬病病毒单抗的空白,弥补了我国狂犬病被动免疫制剂供应不足的现状,具有较为广阔的市场前景广阔。

纳米抗体的分子质量较小以及独特的结构优势,已被证明能够通过自然手段和物理和化学方法等人工手段穿过血脑屏障^[9]。纳米抗体的分子结构简单,能在不同的表达系统中表达^[15]。现今纳米抗体的筛选技术主要包括噬菌体展示技术、酵母表面展示技术与核糖体展示技术等。本研究采用的噬菌体展示技术与其他两种技术相比,具有技术成熟度高,文库构建效率较高,展示的蛋白稳定性高、多样性好,特异性筛选能力强、易于实现高通量筛选成本和成本相对较低等优点^[16]。噬菌体展示技术通过将目的蛋白或者肽段插入编码噬菌体外壳蛋白的基因中,使其在噬菌体表面随着噬菌体外壳蛋白的表达而表达,并且保持噬菌体自身的生物活性和结构功能不发生改变^[17]。本研究中的 M13 噬菌体主要是近年来被广泛使用,在后续实验淘筛过程中可简化噬菌体纯化的步骤,可节省淘筛

时间^[18]。

本研究采集免疫羊驼外周血,经密度梯度离心等操作提取 PBMC,再依次进行 RNA 提取、反转录获得 cDNA,以此为模板扩增重链抗体基因及 VHH 基因,过程涉及特定引物设计与 PCR 反应条件优化,如重链抗体基因扩增引物为 AlprH-LD 和 CH2-R, VHH 基因扩增分两步且引物为 VHH-F、VHH-R,并通过凝胶电泳切回收目的基因片段。上述结果表明 VHH 基因扩增成功,对单克隆菌株序列用 MEGA 绘制进化树,结果表明各序列同源性差异显著,文库具有较高的多样性,为后续高效筛选高亲和力抗体提供了保障。

【参考文献】

- [1] 王宇洋. 狂犬病分子流行病学及狂犬病毒感染小鼠代谢组学研究[D]. 北京:军事科学院,2019.
- [2] Nadin-Davis SA. Special issue "advances in rabies research"[J]. Viruses, 2023, 15(7):1557.
- [3] Ng WM, Fedosyuk S, English S, et al. Structure of trimeric pre-fusion rabies virus glycoprotein in complex with two protective antibodies[J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(9):1219-1230.
- [4] Wang W, Long C, Wang L, Wang Y. Pseudotyped viruses for lyssavirus[J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1407:191-208.
- [5] Wilde H, Lumlertdacha B, Meslin FX, et al. Worldwide rabies deaths prevention—A focus on the current inadequacies in postexposure prophylaxis of animal bite victims[J]. Vaccine, 2016, 34(2):187-189.
- [6] Kumar A, Bhatt S, Kumar A, Rana T. Canine rabies: An epidemiological significance, pathogenesis, diagnosis, prevention,

and public health issues[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2023, 97:101992.

- [7] 吴梦,张浩,刘雪芹,等. 狂犬病暴露后预防性单克隆抗体药物研究进展[J]. 生物学杂志, 2024, 41(5):100-106.
- [8] 唐秀兰,邓安琦,陈文聪,等. 纳米抗体筛选技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2):350-366.
- [9] Jin BK, Odongo S, Radwanska M, et al. NANOBODIES?: A Review of diagnostic and therapeutic applications[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6):5994.
- [10] 李江凡. 高致病冠状病毒纳米抗体的构建与中和机制研究[D]. 北京:军事科学院,2021.
- [11] 刘佳佳. 2006-2018 年中国狂犬病流行特征及影响因素研究[D]. 昆明:昆明医科大学,2020.
- [12] 王相超. 2002-2021 年我国狂犬病发病趋势的 Joinpoint 回归分析[J]. 预防医学论坛, 2024, 30(3):204-206, 212.
- [13] 赵欣悦,杨晓梅,孙树阳,等. 纳米抗体的特性及其在免疫检测中的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(4):472-478.
- [14] 房世娣,赵晓瑞,陈继军,等. 人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的构建及验证[J]. 微生物学免疫学进展, 2019, 47(4):7-13.
- [15] Wang J, Mukhtar H, Ma L, et al. VHH Antibodies: Reagents for mycotoxin detection in food products[J]. Sensors (Basel), 2018, 18(2):485.
- [16] 邓湘赢,曾焱华. 噬菌体展示技术及其在病原微生物研究中的应用进展[J]. 中南医学科学杂志, 2017, 45(3):315-317.
- [17] Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, et al. Basics of antibody phage display technology[J]. Toxins (Basel), 2018, 10(6):236.
- [18] 颜爱. 噬菌体展示技术筛选 PCV2 Cap 蛋白的抗原表位[D]. 长沙:湖南农业大学,2012.

【收稿日期】 2024-12-26 【修回日期】 2025-03-03

(上接 835 页)

- [17] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 61(2):315-320.
- [18] 王飞,田茵,杨静,等. 纳米磁分离法结合实时荧光定量 PCR 检测恶性疟原虫的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2014, 26(5):522-525.
- [19] 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.
- [20] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [21] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14):1754-1760.
- [22] Abdel HM, Abdelraheem MH, Acheampong DO, et al. Pf7: an open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in 20000 worldwide samples[J]. Wellcome Open Res, 2023, 8:22.
- [23] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/Map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16):2078-2079.
- [24] 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.

- [25] Joste V, Colard-Itte E, Guillochon E, et al. Genetic profiling of *Plasmodium ovale* wallikeri relapses with microsatellite markers and whole-genome sequencing[J]. J Infect Dis, 2023, 228(8):1089-1098.
- [26] Carey-Ewend K, Popkin-Hall ZR, Simkin A, et al. Population genomics of *Plasmodium ovale* species in sub-Saharan Africa[J]. Nat Commun. 2024, 15(1):10297.
- [27] Ibrahim A, Manko E, Dombrowski JG, et al. Population-based genomic study of *Plasmodium vivax* malaria in seven Brazilian states and across South America[J]. Lancet Reg Health Am, 2023, 18:100420.
- [28] Ibrahim A, Diez BE, Nolder D, et al. Selective whole genome amplification of *Plasmodium malariae* DNA from clinical samples reveals insights into population structure[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):10832.
- [29] de Bourcy CF, De Vlaminck I, Kanbar JN, et al. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods[J]. Plos One, 2014, 9(8):e105585.
- [30] 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.

【收稿日期】 2024-12-25 【修回日期】 2025-03-13