

分子诊断技术在防控新型冠状病毒肺炎中的应用

王振飞, 武颖彩, 牟永平, 梁俊青 综述, 贾永峰[△] 审校

(内蒙古自治区肿瘤医院肿瘤分子诊断实验室, 呼和浩特 010010)

[摘要] 当前, 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)正严重威胁着人们的健康和生命安全。早发现、早诊断、早治疗、早隔离是防控该病的关键所在。本文介绍了分子诊断技术在抗击 COVID-19 中的应用, 旨在为控制新型冠状病毒流行及尽快战胜疫情提供参考。

[关键词] 新型冠状病毒肺炎; 高通量核苷酸序列分析; 实时荧光定量 PCR; 免疫学检测

[中图分类号] R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)14-0-0

Application of molecular diagnostic technology in prevention and control of the corona virus disease 2019

WANG Zhenfei, WU Yingcai, MOU Yongping, LIANG Junqing, JIA Yongfeng[△]

(Tumor Molecular Diagnosis Laboratory, Inner Mongolia Tumor Hospital, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region 010010, China)

[Abstract] Currently, the corona virus disease 2019 (COVID-19) is seriously threatening people's health and life safety. Early detection, early diagnosis, early treatment and early isolation are the keys to preventing and controlling the disease. This article introduced the application of molecular diagnostic technology in combating the COVID-19, aiming at providing references for controlling the prevalence of SARS-CoV-2 and overcoming the epidemic as soon as possible.

[Key words] corona virus disease 2019; high-throughput nucleotide sequencing; real-time fluorescence quantitative PCR; immunological detection

进入 21 世纪以来, 冠状病毒引起的传染性疾病不断出现。如 2003 年严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome-coronavirus, SARS-CoV)引起的非典型性肺炎和 2012 年中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome-coronavirus, MERS-CoV)引起的中东呼吸综合征, 分别造成约 10% 和 36% 的病死率^[1-2]。2019 年 12 月底以来, 湖北省武汉市及全国其他地区陆续出现了新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的肺炎—新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19), 严重威胁着人们的健康和生命安全。

目前, 对新型冠状病毒肺炎尚无有效的治疗药物, 防控的关键在于对患者的早诊断、早治疗、早隔离。但是, 该病初期的症状以发热、干咳、乏力为主, 与普通流感不易区分; 且部分患者仅为中低热甚至无明显发热症状, 缺乏明显的特异性临床表现, 增加了临床的诊断难度和病毒传播速度; 加之 SARS-CoV-2 感染人体后存在潜伏期(中位时间 3.0 d, 最长可超过 3 周), 在潜伏期内也具有较强传染性^[3-7]。因此, 快速、准确地诊断出 SARS-CoV-2 感染者对于及时切断

病毒的传播是至关重要的。分子诊断技术在这方面大有可为。

1 SARS-CoV-2 的病原学特点

冠状病毒家族属于病毒目、冠状病毒科^[8]。该家族可进一步细分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属。SARS-CoV-2 属于 β 属, 其基因组序列与 SARS-CoV 有 79.5% 的相似性, 与 MERS-CoV 有 40% 的相似性, 与蝙蝠 SARS 样冠状病毒(bat-SL-CoVZC45)有超过 85% 的相似性^[9-10]。在进化上, 形成了与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 不同的另外一个分枝^[9,11]。

SARS-CoV-2 病毒颗粒的直径在 50~200 nm。它的遗传物质为连续线型单链 RNA, 基因组全长 29 891 个核苷酸, 编码 9 860 个氨基酸(aa), GC 含量为 38%^[11]。基因组的 5' 和 3' 端各有一个不翻译区, 3' 端有 Poly A "尾", 内部包含 10 个基因: 开放阅读框 1ab (ORF1ab) 基因(编码 7 096 aa 的多聚蛋白)、棘突蛋白基因(编码 1 273 aa 的棘突蛋白)、ORF3a 基因、包膜蛋白基因(编码 75 aa 的包膜蛋白)、膜糖蛋白基因(编码 222 aa 的膜糖蛋白)、ORF6 基因、ORF7a 基因、ORF8 基因、核衣壳蛋白基因(编码 419 aa 的核衣壳

蛋白)及 ORF10 基因^[11-12]。

棘突蛋白由 S1 和 S2 亚基组成。S1 亚基含有信号肽、N 末端结构域和受体结合结构域(RBD),负责介导病毒与宿主细胞膜结合;S2 亚基包含融合肽、胞质结构域和跨膜结构域,负责病毒与宿主细胞膜融合^[12]。SARS-CoV-2 棘突蛋白与 SARS-CoV 棘突蛋白的氨基酸序列相似度为 76.47%,且二者 RBD 的 3D 结构相同,因此,SARS-CoV-2 棘突蛋白与人 II 型肺泡细胞表面的血管紧张素转换酶 2 分子也具有强烈的亲和性,二者的结合很可能是介导 SARS-CoV-2 进入人体细胞的关键所在^[12]。包膜蛋白和膜糖蛋白均参与病毒的装配。核衣壳蛋白包裹并保护病毒的遗传物质。

2 分子诊断技术在防控 SARS-CoV-2 感染中的应用

2.1 高通量测序

高通量测序准确性高、周期性短,可同时对多个样品进行检测,还能够从未经纯化培养的复杂样品中捕获疑似病原体的核酸序列,并且可以详细解析其基因组的完整信息^[13]。因此,它在 MERS-CoV、托高土病毒(Thogotovirus)、人禽流感病毒等病原体引起的疫情的病因调查中,均发挥了重要作用^[14]。

COVID-19 发生以后,我国科学家迅速收集患者临床标本,提取病毒 RNA,进行了高通量测序。2020 年 1 月 10 日,复旦大学张永振教授领导的团队率先完成第 1 个 SARS-CoV-2 基因组的测序工作,并在第一时间将所得的序列信息上传至 virological.org 网站和 GenBank(下载地址: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>,目前版本为 1 月 23 日的升级版本 MN908947.3)。近日,该工作的正式论文已发表于 Nature 杂志,文中对 SARS-CoV-2 的 5' 和 3' 不翻译区及各 ORF 进行了详细的分析,与 SARS-CoV Tor2、bat-SL-CoVZC45 等冠状病毒的基因组序列进行了比对,并根据各 ORF 的同源性追溯了 SARS-CoV-2 的进化位置^[15]。随后,中国疾病预防控制中心和山东第一医科大学等机构的研究人员利用我国华大基因自主研发的纳米孔测序平台 DNB-SEQ-T7,对 9 例住院患者的支气管肺泡灌洗液标本和培养分离株进行测序,获得了 8 个完整的和 2 个部分的 SARS-CoV-2 基因组序列,并将这些序列与 SARS、MERS 及来源于舟山的 bat-SL-CoVZC45 和 bat-SL-CoVZXC21 病毒株的基因组序列进行了详细的比对,开展了系统进化分析^[16]。香港大学的 YUEN 团队使用纳米孔测序技术对来自同一家庭的感染者的痰液标本进行了高通量测序,并将所得序列与其他 SARS 相关冠状病毒的基因组序列进行了比对。结果发现,SARS-CoV-2 的棘突蛋白 RBD 与其他 SARS 相关冠状病毒仅有 40% 的相似性,而它的 orf3b 则很可能编码一个全新的短蛋白^[11,17]。

目前,通过高通量测序,全球已获得了超过 13 例

SARS-CoV-2 基因组序列。这些基因组数据为追溯 SARS-CoV-2 的演化来源、分析其致病机理、开发特异性诊断试剂盒奠定了坚实基础。更为重要的是,相比于 DNA 病毒, RNA 病毒具有较强的突变能力,如果突变位点恰在荧光定量 PCR 引物和探针覆盖的序列内,将造成一些现有诊断试剂的失效。随着疫情的蔓延,下一步需要密切监控 SARS-CoV-2 基因组的变异。在这项工作中,高通量测序技术无疑将会发挥重要作用。

国家卫生健康委已将"呼吸道或血液标本病毒基因组测序中得到与已知的 SARS-CoV-2 高度同源"的结果,作为 COVID-19 临床病例确诊的病原学证据之一^[18]。当然,由于高通量测序的成本还相对较高,其在临床诊断上的应用暂时还不如基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测那样广泛。

2.2 基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测

基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测具有灵敏度高、特异性强、成本低的优点。SARS-CoV-2 的基因组序列公布后,一些研究小组和商业化公司争相研发可以有效检测 SARS-CoV-2 基因组的荧光定量 PCR 体系。此体系的核心是灵敏度好、特异性强的 PCR 引物和荧光探针。理想的引物和荧光探针既能高效地扩增出 SARS-CoV-2 基因组的片段,又能有效区分 SARS-CoV-2 基因组和其他常见冠状病毒及流感病毒的基因组。

德国柏林大学的 CORMAN 研究小组针对 SARS-CoV-2 的 RNA 聚合酶基因(位于 ORF1ab 中)、包膜蛋白基因及核衣壳蛋白基因设计了 3 对引物和荧光探针^[19]。3 对引物同时扩增,可以保证对 SARS-CoV-2 的检出;其中针对 RNA 聚合酶基因的引物配备了两套不同的荧光探针,其中一套探针在不同冠状病毒间无特异性,对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的 RNA 聚合酶基因均可进行扩增,而另一套探针则只特异性扩增 SARS-CoV-2 的 RNA 聚合酶基因,二者配合,保证了检测体系的高灵敏度与强特异性。

国内,香港大学与北京疾病预防控制中心等单位合作,建立了 SARS-CoV-2 的实时荧光定量 PCR 检测体系^[20]。该体系中的两套引物和荧光探针分别针对 SARS-CoV-2 的 ORF1ab 基因和核衣壳蛋白基因所设计。该体系具有很高的检测灵敏度,对低至 10 个拷贝的分子仍可检出。使用该体系对 1 例 SARS-CoV-2 感染者的痰液标本和 1 例 SARS-CoV-2 感染者的咽拭子标本进行检测,均呈现阳性结果;而对来自于其他冠状病毒(OC43、NL63、HKU1、229E)、乙型流感病毒及腺病毒等感染的呼吸道标本的 RNA 进行检测时,均呈现阴性结果,显示了良好的特异性。

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所则在其官网公布了自己设计的 SARS-CoV-2 核酸检测引

物和荧光探针的序列(http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html),其两套引物和探针分别针对 ORF1ab 及核衣壳蛋白基因设计。

目前,已有多家生物医学诊断公司研制出基于实时荧光定量 PCR 的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒,他们的引物和探针大多针对 ORF1ab 基因、包膜蛋白基因及核衣壳蛋白基因中的 2 种或 3 种所设计,检测下限基本可达 20 个拷贝,同时对其他常见冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒等的检测结果为阴性。其中达安基因、华大生物、上海之江等公司的试剂盒已通过国家药监局的审批,在临床检验中大量使用,为 SARS-CoV-2 的防控做出了积极贡献。国家卫生健康委已将“呼吸道或血液标本实时荧光定量 PCR 检测 SARS-CoV-2 核酸阳性”作为 COVID-19 临床病例确诊的病原学证据之一^[18]。

基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测试剂盒虽原理大体相同,但在实际应用中,其性能还是有一定的差异。重庆市人民医院廖璞团队进行了一项非常及时的研究工作,采用 1 例弱阳性感染者的咽拭子标本,对 6 家不同公司生产的核酸检测试剂盒进行了比较^[21]。结果发现:只有 2 种试剂盒能够同时扩增出 ORF1ab 基因和 N 基因,另外 4 种试剂盒则只能扩增出两个基因中的一个;不同试剂盒批内检测的重复性不尽相同,变异系数最小为 0.23,最大可达 5.84;随感染者病情的进展,只有 3 种试剂盒能检测出病毒基因拷贝数的相应增加。这提示各家的检测试剂盒在灵敏度、稳定性、内标设置、参数设定等方面还有进一步提高的余地,各检测单位也应根据具体的检测目的选择适宜的试剂盒。

当前,随着疑似患者数量的增多,以及实时荧光定量 PCR 检测向基层单位的延伸,部分地区也出现了气溶胶污染导致 PCR 假阳性、标本质量不佳导致 PCR 假阴性、疾病病程导致病毒核酸水平低于 PCR 检测限等问题。解决这些问题需要从 3 个方面入手:(1)尽量挑选熟练的专业操作人员在标准 PCR 室中进行检测,优化采样部位、采样手法及标本运输条件,具体分析患者病程阶段;(2)研发灵敏度更高的、一步法闭管操作的荧光定量 PCR 检测试剂盒或数字 PCR 检测试剂盒;(3)与免疫学检测技术协同配合。

2.3 免疫学检测 相比于核酸检测,病毒的免疫学检测具有下述优点:(1)不需配备专业实验室、专用仪器和专门的技术人员,可在社区卫生服务中心、基层医院广泛开展;(2)可以实现高危人群的早期筛查;(3)有助于区分病毒感染的潜伏期、急性期、病程初期和恢复期。常用的病毒免疫学检测方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫胶体金、荧光素酶免疫吸附及蛋白质芯片等^[22]。SARS-CoV-2 的棘突蛋白与核衣壳蛋白均是理想的免疫学检测靶标。考虑到棘突蛋白 RBD 与其他 SARS 相关冠状病毒该结构域同源

性较低,以及 orf3b 很可能编码新型短蛋白^[11],棘突蛋白 RBD 和 orf3b 编码的新型短蛋白有望成为 SARS-CoV-2 的特异性检测靶标。一方面,可以针对这些蛋白设计合成多肽、免疫动物、纯化出相应抗体,制备成抗原检测试剂,用于检测咽拭子、下呼吸道标本中的 SARS-CoV-2 抗原。另一方面,可以克隆这些蛋白的基因并构建原核或真核表达载体,纯化出相应蛋白,制备抗体检测试剂,用于检测全血、血清或血浆标本中针对 SARS-CoV-2 的 IgM/IgG 抗体。其中 IgM 抗体的检测对 SARS-CoV-2 感染者的筛查具有重要意义。部分 SARS-CoV-2 感染者并无明显临床症状,但他们是病毒的危险传播者^[23]。如果对高危人群进行大面积的血液 IgM 检测,筛查出并无发热等症状的 IgM 阳性个体,再结合核酸检测,就可尽早排查、确诊,有力控制病毒的传播^[24]。

冠状病毒感染人体后,会激发机体免疫系统的广泛反应,引起血液中多种细胞因子和趋化因子水平的变化^[25-26]。SARS-CoV-2 感染者血浆中白细胞介素(IL)-2、IL-7、IL-10、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干扰素诱导蛋白-10(IP10)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP1)、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP1A)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等因子的水平显著高于健康人,并且这种升高在重症监护感染者中更为明显^[23]。针对这些细胞因子和趋化因子的免疫学检测,可作为核酸检测的有效补充手段,在对患者的病程监测和疗效判断等方面发挥重要作用。

在 SARS-CoV-2 免疫学检测试剂的研发中,有两个需要特别注意的问题:(1)快速制备出有效的抗体;(2)保证抗体的特异性。目前,获得单克隆抗体的方法主要有杂交瘤细胞技术和噬菌体展示文库^[27]。前者包括用适宜的抗原免疫动物,制备可持续增殖的杂交瘤细胞,筛选出能活跃分泌高亲和力抗体的杂交瘤细胞等环节;后者包括用适宜的抗原免疫动物,提取脾淋巴结细胞的 RNA 并反转录,获取 cDNA 中全套的抗体可变区基因并克隆到噬菌体载体,表达融合蛋白,筛选目标抗体等环节。这些都需要很大的工作量,消耗较长的时间才能完成^[27]。这使得基于特异性抗体的检测试剂的研发慢于核酸检测试剂,目前还没能在 SARS-CoV-2 感染者的临床诊断中发挥重要作用。未来可以考虑用单细胞转录组测序从单个 B 淋巴细胞的 cDNA 文库中调取免疫球蛋白基因信息,而后 PCR 扩增免疫球蛋白基因并克隆至真核表达载体,从而快速获得单克隆抗体^[28]。

SARS-CoV-2 的基因组序列和基因组结构与 SARS-CoV、bat-SL-CoV 等其他冠状病毒具有一定的相似性,反映到蛋白水平,其氨基酸序列、特定区域抗原表位也具有一定的相似性^[11-12]。因此,最好选择 SARS-CoV-2 与其他冠状病毒氨基酸序列差异较大的肽段,以及 orf3b 编码的新型短蛋白这样的特有抗

原,去制备和筛选 SARS-CoV-2 的检测抗体,以保证较好的特异性,减少假阳性结果。

3 小结与展望

分子诊断技术已在 SARS-CoV-2 基因组序列结构的解析、感染者的早期诊断、病程进展的监控等方面发挥了重要作用。随着与疫情战斗的深入,各种分子诊断技术将在指导精准用药、监测病毒变异、阐明病毒致病机制等方面进一步做出贡献。当然,每种分子诊断技术都有其长处与短处,在实际应用中,需要不同技术的协同配合、互为补充。随着对 SARS-CoV-2 认识的深入,新的诊断技术与诊断产品也将陆续出现,为疫情的防控做出更大贡献。

参考文献

- [1] PEIRIS J, GUAN Y, YUEN K Y, et al. Severe acute respiratory syndrome[J]. *Nature*, 2004, 410 (12 Suppl): S88-97.
- [2] ZUMLA A, HUI D S. Infection control and MERS-CoV in health-care workers[J]. *Lancet*, 2014, 383(9932): 1869-1871.
- [3] ROTHE C, SCHUNK M, SOTHMANN P, et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany[J/OL]. *New Engl J Med*. (2020-01-30) [2020-02-21]. <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM2001468>.
- [4] WANG D, HU B, HU C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China[J]. *JAMA*. (2020-02-07) [2020-02-21]. <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2761044>.
- [5] CHEN N, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J]. *Lancet*, 2020, 395 (10223): 15-21.
- [6] SONG F, SHI N, SHAN F, et al. Emerging coronavirus 2019-nCoV pneumonia [J/OL]. *Radiology*. (2020-02-06) [2020-02-21]. <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2020200274>.
- [7] LI Q, GUAN X, WU P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J/OL]. *New Engl J Med*. (2020-01-29) [2020-02-21]. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2001316>.
- [8] 闻玉梅. 冠状病毒的致病性及防控[J]. *微生物与感染*, 2020, 15(1): 5-12.
- [9] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J/OL]. *Nature*. (2020-02-03) [2020-02-26]. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-7>.
- [10] XU X, CHEN P, WANG J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457-460.
- [11] CHAN J F W, KOK K H, ZHENG Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan[J]. *Emerg Microbes Infec*, 2020, 9(1): 221-236.
- [12] DONG N, YANG X, YE L, et al. Genomic and protein structure modelling analysis depicts the origin and infectivity of 2019-nCoV, a new coronavirus which caused a pneumonia outbreak in Wuhan, China[J/OL]. *Biorxiv*. (2020-01-22) [2020-02-21]. <https://doi.org/10.1101/2020.01.20.913368>.
- [13] VILSKER M, MOOSA Y, NOOIJ S, et al. Genome detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(5): 871-873.
- [14] BUERMANS H P, DEN DUNNEN J T. Next generation sequencing technology: advances and applications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(10): 1932-1941.
- [15] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J/OL]. *Nature*. (2020-02-03) [2020-02-21]. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>.
- [16] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [17] CHAN J F W, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 514-523.
- [18] 靳英辉, 蔡林, 程真顺, 等. 新型冠状病毒(2019-

- nCoV)感染的肺炎诊疗快速建议指南(标准版)[J/OL]. 解放军医学杂志: 1-20 (2020-02-02) [2020-02-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.r.20200201.1338.003.html>.
- [19] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveill, 2020, 25(3): pii2000045.
- [20] CHU D K W, PAN Y, CHENG S M S, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia[J/OL]. Clin Chem. (2020-01-31) [2020-02-21]. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029>.
- [21] 郭元元, 王昆, 张宇, 等. 6种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J]. 重庆医学: 1-10 (2020-02-12) [2020-02-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.
- [22] 王江, 徐轶, 陈俊峰, 等. 流感病毒实验室检测方法研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(2): 308-312.
- [23] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 497-506.
- [24] BISWAS B, AMIN S, AZAD M A K, et al. A study on the dangerous outbreak of chikungunya in Chittagong, including a limited survey around that city of Bangladesh[J]. Int J Community Med Public Health, 2019, 6(11): 4677-4681.
- [25] MAHALLAWI W H, KHABOUR O F, ZHANG Q, et al. MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile[J]. Cytokine, 2018, 104: 8-13.
- [26] WONG C K, LAM C W K, WU A K L, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(1): 95-103.
- [27] TSUMOTO K, ISOZAKI Y, YAGAMI H, et al. Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies[J]. J Immunother, 2019, 11(2): 119-127.
- [28] VON BOEHMER L, LIU C, ACKERMAN S, et al. Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells[J]. Nat Protoc, 2016, 11(10): 1908-1923.

(收稿日期: 2019-12-18 修回日期: 2020-02-02)