鸟类血孢子虫的系统分类鉴定和感染强度的定量检测

Molecular Identification and Quantitation of Avian Haemosporidian Parasites

王心怡[#], 高丽君[#], 杨国成[#], 董森, 黄希^{*}

生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 北京师范大学, 北京 100875

*通讯作者邮箱: xi.huang@bnu.edu.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 王心怡, 高丽君, 杨国成, 董森, 黄希. (2021). 鸟类血孢子虫的系统分类鉴定和感染强度的定量检测. *Bio-101* e1010653. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010653.

How to cite: Wang, X. Y., Gao, L. J., Yang, G. C., Dong, S., and Huang, X. (2021). Molecular Identification and Quantitation of Avian Haemosporidian Parasites. *Bio-101* e1010653. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010653. (in Chinese)

摘要: 鸟类血孢子虫是人疟原虫的近缘类群, 由于物种丰富、地理分布广泛、宿主组成多样而成为研究宿主和寄生虫协同演化的模式系统。对血孢子虫在鸟类宿主中感染率、多样性和感染强度的检测是展开相关研究的必要基础。传统的镜检法, 即在显微镜下观察血涂片的方法极为耗时, 且对观测者经验和血涂片质量要求较高。本文介绍了基于分子技术对鸟类血液样品中血孢子虫进行系统分类鉴定和感染强度定量的方法, 与传统的血涂片镜检方法相比, 这些方法操作简单, 同时灵敏度、精确性和可重复性更高。

关键词: 鸟类, 血孢子虫, 感染率, 系统发育, 感染强度, 分子方法

研究背景

鸟类血孢子虫 (avian haemosporidians) 是人疟原虫的近缘物种且为从共同祖先较早分化出的一支 (Galen *et al.*, 2018), 数十年来一直是研究疾病传播机制和种间协同演化的模式类群 (Rivero and Gandon, 2018)。鸟类血孢子虫主要包括疟原虫属 (*Plasmodium*)、血液变形虫属 (*Haemoproteus*) 和住白细胞原虫属 (*Leucocytozoon*) 等, 由蚊、蠓和蚋等双翅目 (Diptera) 吸血昆虫传播 (Valkiūnas, 2005), 是鸟类中最常见的血液寄生虫 (Rivero and Gandon, 2018; Dunn and Outlaw, 2019), 当前基于线粒体细胞色素 b 基因 (*cyt b*) 条形码序列定义的谱系支 (lineage) 已超过 4,000 个, 在全

球除南极洲以外的所有地区感染了约 2,000 种鸟类宿主 (Bensch *et al.*, 2009), 并对被感染鸟类的健康乃至生存造成严重威胁。这些血孢子虫谱系支所感染的宿主种类与地理分布范围不尽相同, 其中大部分感染病例 (infection cases) 为能感染多种鸟类宿主的泛性寄生虫 (或称为广宿主寄生虫, generalist parasite) 所引发。对泛性寄生虫如何适应不同的宿主这一问题的解答, 是揭示宿主和寄生虫协同演化关系的关键。

由于鸟类宿主行为和免疫功能的差异, 泛性血孢子虫对不同鸟类宿主的适应能力并不相同 (Fenton *et al.*, 2015), 通常表现在感染率 (prevalence) 和感染强度 (infection intensity) 两方面。感染率即鸟类种群中被感染个体的比例, 反映了寄生虫感染宿主的能力; 感染强度即血孢子虫在鸟类宿主体内的种群数量, 以被感染红细胞的比例衡量 (Pigeault *et al.*, 2015), 反映了寄生虫在宿主体内繁殖的能力。

传统的血孢子虫检测方法是在显微镜下观察鸟类血涂片, 根据血细胞中寄生虫配子母细胞或裂殖体 (仅疟原虫) 的大小、形状、位置、色素排列等一系列形态特征对其进行分类鉴定; 并通过对数百个视野中被感染细胞的直接计数获得血孢子虫的感染强度 (Valkiūnas, 2005)。血涂片镜检法对检测者经验和血涂片质量的要求较高, 且灵敏度有限, 而野生鸟类的感染强度通常较低, 因此常出现假阴性结果。此外, 镜检法很难区分形态特征极为相似的隐存种, 尤其对隐存种众多的疟原虫属, 镜检法往往低估了血孢子虫的多样性。

随着科学技术的发展, 基于 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术的分子方法逐渐普及, 大大提升了检测效率、灵敏度和精确性。本文将分为三个章节, 依次介绍基于巢式 PCR (nested PCR) 的鸟类血孢子虫系统分类鉴定、基于实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 的相对定量检测, 以及基于数字式微滴 PCR (digital droplet PCR, ddPCR) 的绝对定量检测方法的实验流程和数据分析方法。

一、基于巢式 PCR 对鸟类血孢子虫进行系统分类鉴定

A Nested PCR Assay for Taxonomic Identification of Avian Haemosporidians

王心怡, 黄希*

研究背景

鸟类血孢子虫物种多样, 能感染的宿主种类和数量也各不相同。因此, 对血孢子虫进行

准确的系统分类鉴定是研究其与宿主相互关系的基础。随着分子生物学的发展以及技术的不断完善, 2000 年, 基于聚合酶链式反应 (PCR) 技术的分子鉴定方法首次被用于鸟类血孢子虫的研究 (Bensch *et al.*, 2000), 该方法对血孢子虫线粒体基因组细胞色素 *b* 基因 (*cyt b*) 的 479 bp 的片段 (条形码片段) 进行扩增和测序分析, 在该片段出现一个碱基的差异便会被认定为不同谱系支 (lineages)。在此基础上改良的巢式 PCR 则进一步提高了扩增的可靠性和灵敏度 (Hellgren *et al.*, 2004)。巢式 PCR 使用两对引物依次进行 PCR 扩增 (图 1)。第一轮扩增的靶序列略长于条形码片段, 第二轮则以第一轮扩增的产物为模板, 用两对引物分别对目标片段进行再次扩增。其中一对引物 (HaemF-HaemR2) 适用于疟原虫属和血液变形虫属寄生虫的扩增和物种鉴定, 另一对 (HaemFL-HaemR2L) 则适用于住白细胞原虫属。如果第一轮扩增产生了错配, 第二轮扩增中错误片段与引物结合的概率极低。因此, 相比单一 PCR, 巢式 PCR 大大提高了扩增的特异性。同时由于两次富集使目标片段大量扩增, 巢式 PCR 的灵敏度也高于单一 PCR。研究表明, 即使将野外采集的鸟类血液样品稀释一百多倍, 巢式 PCR 仍然能够准确鉴定出阳性个体 (Waldenström *et al.*, 2004)。

图 1. 巢式 PCR 引物及其目标序列 (引自 Hellgren *et al.* (2004), 已授权)

本方法一经面世便得到广泛应用, 目前已发表的基于此方法鉴定的鸟类血孢子虫谱系支的条形码序列、感染的鸟类物种、地理分布等信息均收录于 MalAvi 数据库中 (Bensch *et al.*, 2009)。将血孢子虫条形码序列与数据库进行比对便可对其进行系统分类学鉴定。

本文介绍了利用巢式 PCR 鉴定鸟类血孢子虫和通过序列比对进行系统分类鉴定的

详细流程。

材料与试剂

1. 移液器吸头 (AxyGen, 加利福尼亚, 美国, 0.1-2.5 μ l, 1-10 μ l, 20-200 μ l, 100-1,000 μ l)
2. 1.5 ml 离心管 (Eppendorf, 德国)
3. PCR 管或 96 孔板 (Eppendorf)
4. 96 孔板封膜或硅胶盖 (Eppendorf)
5. 50 ml 试剂槽 (BBI, catalog number: F619711)
6. Premix TaqTM 酶 (Takara, 日本, catalog number: RR330A)
7. DNA 分子量标准 Marker (生工, 上海, DL2000, catalog number: B500350)
8. 50 $\times$ TAE 缓冲液 (生工, catalog number: B548101)
9. 琼脂糖 (生工, catalog number: A620014)
10. 引物 3 对 (由测序公司合成, 见表 1)

表 1. 巢式 PCR 引物信息

	引物名称	引物序列 (5'-3')
第一轮	HaemNFI	CATATATTAAGAGAATTATGGAG
	HaemNR3	ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC
第二轮	HaemFL	ATGGTGTTTTAGATACTTACATT
(住白细胞原虫)	HaemR2L	CATTATCTGGATGAGATAATGGHGC
第二轮	HaemF	ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG
(疟原虫/血液变形虫)	HaemR2	GCATTATCTGGATGTGATAATGGT

仪器设备

1. 移液器 (Eppendorf, 德国, 量程 0.1-2.5 μ l, 1-10 μ l, 20-200 μ l, 100-1,000 μ l)
2. 离心机 (Eppendorf Centrifuge 5810R)
3. PCR 仪 (Applied Biosystems, 加利福尼亚, 美国, catalog number: 435786)
4. 微波炉

5. 电泳仪 (Bio-Rad, 加利福尼亚, 美国)
6. 凝胶电泳成像仪 (基因有限公司, 香港)

分析软件

1. Genious (Biomatters, Ltd. <https://www.geneious.com/>)
2. R (R Core Team, <https://www.r-project.org/>)

实验步骤

1. 样品准备
 - 1) 在冰上融化引物和试剂。
 - 2) 在冰上配制第一轮 PCR 反应体系预混液。计算所需的试剂体积，将缓冲液、引物和酶在 1.5 ml 离心管中混合，振荡混匀，短暂离心收集管壁上液滴，完成无模板的预混液制备。使用 96 孔板时可以在条形试剂槽中混匀，用排枪上样。考虑到移液过程中的损失，预混液的总体积为 (单个反应体积) × (实际反应数 + 1)。第一轮 PCR 的产物体积仅需满足第二轮反应对模板用量的要求即可，因此通常采用较小的反应体系以减少不必要的试剂和引物消耗，通常采用 20 µl 反应体系，根据待检测样品的数量，建议配制方法如表 2 所示。

表 2. PCR 反应体系 (20 µl) 及其各成分配比

试剂	单个反应 (20 µl)	24 个样品 (25×)	96 板整版 (100×)
ddH ₂ O	7.2	180	720
正向引物	0.4	10	40
反向引物	0.4	10	40
Taq premix (2×)	10	250	1,000
DNA 模板	2	-	-
总计	20	450	

- 3) 在已灭菌的 PCR 反应管或 96 孔板中加入预混液。
- 4) 向有预混液的 PCR 管中加入 DNA 模板，每轮反应至少包含 1 个阴性对照和

- 1 个阳性对照，阳性对照通常选用感染强度较高的样品；阴性对照可采用确定无感染的样品，或以 ddH₂O 代替 DNA 模板。
2. 第一轮 PCR 反应，引物 HaemNF1-HaemNR3 (通用)
设置反应程序。[94 °C - 5 min] + [94 °C - 30 s, 50 °C - 30 s, 72 °C - 45 s] × 20 cycles + [72 °C - 5 min]
3. 第二轮 PCR 反应，引物 HaemF-HaemR2 (疟原虫/血液变形虫) ,HaemFL-HaemR2L (住白细胞原虫)
 - 1) 在冰上配制第二轮 PCR 反应体系预混液。配制方法同第 1 步。第二轮 PCR 反应需确保有足够产物用于后续的 Sanger 测序，通常采用 40 µl 体系，因此试剂用量为表 1 中的 2 倍。
 - 2) 向 PCR 反应管中加入预混液和 DNA 模板。模板为第 2 步获得的 PCR 产物。
 - 3) 设置反应程序。[94 °C - 5 min] + [94 °C - 30 s, 50 °C - 30 s, 72 °C - 45 s] × 35 cycles + [72 °C - 5 min]
4. 电泳检测
 - 1) 将 TAE 缓冲液稀释后与琼脂糖混合，微波加热溶解，制备 1%琼脂糖凝胶。
 - 2) 取 3 µl 第二轮反应产物与 3 µl 上样缓冲液混合后，加入凝胶上样孔，120 V 电泳 15 min，在凝胶电泳成像仪中以紫外光照射成像，根据 500 bp 位置有无条带判断样品是否被血孢子虫感染 (图 2)。

图 2. 第二轮 PCR 产物的电泳结果图。其中 092、093、095 为阳性样品。

数据分析

1. 测序分析

- 1) 将阳性样品送至测序公司进行 **Sanger** 测序。由于鸟类血孢子虫多样性极高，如果采样地点已有的相关研究较少，则检测到新谱系支的可能性很高，建议采用双向测序以确保准确性。若采样地点的血孢子虫多样性本底已较为熟悉，则疟原虫/血液变形虫仅用正向测序即可，住白细胞原虫仍建议双向测序。
- 2) 获得序列后检查测序峰图 (**abi** 文件)，删除首尾有重叠峰或峰图不清晰的部分，以确保结果的准确性。删去可能测到的引物序列，避免影响比对结果。可用 **Geneious** 软件的'Trim primer'功能去除序列两端的引物片段 (图 3)。

图 3. 用 **Geneious** 软件 (v.20.1) 去除测得序列中引物片段的操作界面，两端红色部分为去除的引物序列。该序列为两个血孢子虫的混合序列，在 75 和 160 碱基处分别为 A/T 和 A/G 重叠峰，可根据已知信息手动拆解。

- 3) 在野生鸟类中，混合感染（即同一只个体被两种甚至更多种血孢子虫谱系支感染）的现象较为普遍 (Valkiūnas *et al.*, 2006)。对于被不同属血孢子虫混合感染的个体，由于 **PCR** 的产物主要取决于前四次循环中引物所结合的模板序列，而混合感染中引物和血孢子虫的结合具有较大的随机性 (Ciloglu *et al.*, 2019)，绝大多数情况下一次实验中只会扩增其中一种。对于被同属不同血孢子虫，尤其是序列较为相似的谱系支感染的个体，则可能出现同时扩增的情况。此时测序

所得的峰图中会出现重叠峰，当重叠峰较少时，可以根据与数据库、同一地区以及同一批样品中的血孢子虫序列的比对结果手动拆解。以图 3 为例，序列中第 75 和第 160 个碱基位置存在重叠峰，则可认为该个体被两个谱系支同时感染，其序列相差两个碱基。如果同一批样品中检测到与之其他碱基均相同、该两处分别为 T 和 A 血孢子虫，则可认为该谱系支为其中之一；另一个谱系支这两处碱基则分别为 A 和 G。当重叠峰过多，或其中没有与已知序列相似度为 100% 的谱系支时，无法根据已有信息拆解，则需要进行重复实验。

2. 系统分类鉴定

- 1) 通过与 MalAvi 数据库中收录的序列进行比对，确定样品中鸟类血孢子虫的系统分类地位。常用的鸟类血孢子虫序列比对方法有三种。
 - a. 将所获序列复制粘贴至 MalAvi 数据库 BLAST 模块 (<http://130.235.244.92/Malavi/blast.html>) 直接比对，比对方法与 NCBI 的 BLAST 模块相同。
 - b. 用 Geneious 软件，将数据库中所有序列导入 Geneious 并设置为自定义数据库，再用 blast 功能进行比对，该方法可以同时比对多条序列 (图 4)。

图 4. 用 Geneious 软件 (v.20.1) 自定义数据库对血孢子虫进行比对的操作界面

- c. 在 R 软件中用 malaviR 软件包 (Ellis *et al.*, 2017) 下的 blast_malavi 功能进行序列比对，运行代码为：


```
#安装软件包
devtools::install_github("vincenzoaellis/malaviR",
build_vignettes = TRUE)
#载入软件包
library(malaviR)
#导入测得的序列
Seq <- "GCAACTGGTGCTTCATTTGTATTTATT
TTAACTTATTTACATATTTTAAGAGGATTAAATTATTC
ATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTAA
TAATATTTTAAATATCTATAGTAACAGCTTTTATGGGT
TACGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGC
TACCGTAATAACTAATTTATTATATTTTATACCTGGAC
TAGTTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAGTGAC
CCAACCTTAAAAAGATTCTTTGTACTACATTTTACATT
TCCTTTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATAT
TCTTTCTACATTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGG
TATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCT
TTTAAGTCTTGATATTAAAGGATTTAATAATGTATTAG
TATTATTTTATAGCACAAAGTTTATTTGGAATACT"
#和 MalAvi 数据库比对，获得相似度最高的 5 个 lineage 信息
hits <- blast_malavi(seq)
#检查比对结果
hits
```

	Lineage	Score	Identities	Gaps	Strand	Coverage	Perfect.Match
1	ACAGR1	885	479/479	0/479	Plus/Plus	479	Yes
2	SGS1	880	478/479	0/479	Plus/Plus	479	No
3	CXPIP20	876	476/477	0/477	Plus/Plus	477	No
4	YWT4	874	477/479	0/479	Plus/Plus	479	No
5	SERCAN01	874	477/479	0/479	Plus/Plus	479	No

- 2) 如果与最相近序列相似度为 100%，则可确定为相同谱系支；如果相似度低于 100%（即存在一个或更多碱基差异），则定义为新谱系支，可根据相似谱系支的种属信息推断其系统发育地位。新谱系支的命名方法为鸟类宿主拉丁名的属

名前三位、种名前三位加数字，如在银喉长尾山雀 (*Aegithalos caudatus*) 中首次发现的谱系支命名为 AEGCAU01。

致谢

实验方案摘自文章 [A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood](#)(Hellgren et al., 2004).

二、基于实时荧光定量 PCR 技术对鸟类血孢子虫进行相对定量检测

A Real-time Quantitative PCR Assay for Relative Quantification of Avian Haemosporidians

高丽君，黄希*

研究背景

寄生虫对特定宿主的感染强度，即在该宿主个体内的种群大小，反应了其在宿主体内繁殖的能力，是衡量寄生虫对宿主适应能力的重要指标 (Huang *et al.*, 2018)。由于急性感染经常导致宿主死亡或不活跃，在野外捕获的鸟类几乎都处于感染强度较低的慢性感染期 (Mukhin *et al.*, 2016)，因此制作的血涂片往往缺乏数量足够的、处于不同生活史阶段的血孢子虫，使其很难满足镜检的质量要求。实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 技术在常规 PCR 的基础上加入荧光染料，染料可以与 DNA 双链相结合，通过对扩增过程中荧光信号的实时监测完成对模板中目标片段拷贝数的相对定量 (Kubista *et al.*, 2006)。根据荧光信号的变化可将反应分为三个时期（图 5）：基线期，体系中目标片段较少，荧光信号主要来源于模板中的 DNA 双链；对数增长期，目标片段大量扩增，荧光信号随之上升；平台期，体系中的 dNTP 等原料已消耗殆尽，酶活也降低，因此目标片段扩增效率极低，荧光信号几乎不再变化。根据基线期的荧光信号强度可设定阈值，体系中荧光信号到达阈值时所处的 PCR 反应循环数即为 Ct 值 (cycle of threshold)，模板中目标片段越多，荧光信号到达阈值的时间越早，即 Ct 值越低。由于理想的 PCR 扩增效率为 100%，即每个循环结束时体系中目标基因拷贝数为上一循环结束时的 2 倍，通常认为 Ct 值增加 1 意味着模板中目标片段数量降低 1/2。

图 5. 实时荧光定量 PCR 反应过程中荧光信号变化

PCR 反应完成后的熔解反应则通过快速升温使体系中所有 DNA 双链解开，接着急剧降温再逐步升高温度，监测荧光信号的变化。由于不同长度、不同序列的 DNA 双链结合温度不一致，通过对熔解曲线的分析可以排除引物二聚体和非特异扩增导致的假阳性结果。qPCR 方法便于操作，灵敏快捷，对模板质量要求较低，与血涂片镜检、常规 PCR 相比灵敏度和可重复性均较高。目前 qPCR 相对定量操作方法在多个实验室中被广泛使用，包括能扩增绝大多数血孢子虫的通用方法 (Friedl and Groscurth, 2012; Bell *et al.*, 2015) 和多种扩增特定血孢子虫的特异性方法 (Marzal *et al.*, 2008; Asghar *et al.*, 2011; Schoener *et al.*, 2017)，为研究血孢子虫在不同宿主中适应性差异、与宿主相互关系的时空动态及其影响因素建立了基础。由于操作和分析方法均大同小异，本文仅介绍通用方法。

材料与试剂

1. 移液器吸头 (BBI, 上海, 0.1-2.5 μ l, 1-10 μ l, 20-200 μ l, 100-1,000 μ l)
2. 1.5 ml 离心管 (Eppendorf)
3. 50 ml 试剂槽 (BBI, catalog number: F619711)
4. 光敏 96 孔板 (Applied Biosystems, 加利福尼亚, 美国, catalog number: 4306737)
5. 光敏 96 孔板封膜 (Applied Biosystems, catalog number: 4360954)
6. TaKaRa TB Green™ Premix Ex Taq™ (Takara, catalog number: RR820A)
7. 引物 2 对 (由测序公司合成, 见表 3)

表 3. 实时荧光定量 PCR 引物信息

	引物名称	引物序列 (5'-3')
血孢子虫	RNA_343F	GCTCACGCATCGCTTCT
	RNA_496R	GACCGGTCATTTTCTTTG
鸟类宿主	SFSR/3Fb	ACTAGCCCTTTCAGCGTCATGT
	SFSR/3Rb	CATGCTCGGGAACCAAAGG

仪器设备

1. 移液器 (Eppendorf, 德国, 量程 0.1-2.5 μ l, 1-10 μ l, 20-200 μ l, 100-1,000 μ l)
2. 离心机 (Eppendorf)
3. 7500 快速实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 加利福尼亚, 美国)

分析软件

1. 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems)

实验步骤

1. 样品准备
 - 1) 将模板、引物和试剂置于冰上融化, TBGreen 和 ROX 可以短暂存放于 4 °C 冰箱。
 - 2) 在冰上配制反应体系预混液。计算反应所需的试剂体积, 将 TBGreen、ROX、ddH₂O 和引物在 1.5 ml 离心管中混合, 振荡混匀, 短暂离心收集管壁上液滴, 完成无模板的预混液制备。检测整板样品时可以在条形试剂槽中混匀, 用排枪上样。考虑到移液过程中的损失, 预混液的总体积为 (单个反应体积) $\times$ (实际反应数 + 1)。7500 仪器建议的 qPCR 反应体系为 20 μ l, 根据待检测样品的数量, 推荐配制方法如表 4 所示。

表 4. PCR 反应体系 (20 μ l) 及其各成分配比

试剂	单个反应 (20 μ l)	24 个样品 (25 $\times$)	96 板整版 (100 $\times$)
----	----------------------	--------------------------	---------------------------

ddH ₂ O	6	150	600
ROX	0.4	10	40
正向引物	0.8	20	80
反向引物	0.8	20	80
TB Green (2×)	10	250	1,000
DNA 模板	2	-	-
总计	20	450	

- 3) 在光敏 96 孔板中加入 18 µl 预混液。
- 4) 向有预混液的 PCR 管中加入 DNA 模板, 每轮反应中, 每个样品均重复 2-3 次, 并至少包含 2 个阴性对照和 2 个阳性对照, 阳性对照通常选用感染强度适中的样品 (Ct 值约 25-30); 阴性对照可采用确定未感染的样品, 或以 ddH₂O 代替 DNA 模板。
- 5) 将 96 孔板放入离心机, 配平后中速离心, 确保样品管中没有气泡、管壁没有沾上液滴。

注意: 不可以在 96 孔板或封膜上用马克笔做任何标记! 否则会影响荧光检测。

2. 血孢子虫定量检测

- 1) 设置反应程序。Instrument: 7500 (96Wells); Type of Experiment: Quantitation – Comparative Ct; Reagent: SYBR Green; Include Melt Curve。如果实验室有已知感染强度的样品, 则将其梯度稀释后作为标准品, Type of Experiment 项选择 Quantitation - Standard Curve。
- 2) 在 7500 软件中录入每一个反应管中的目标基因和样品信息。
- 3) 设置反应条件。
 - a. 血孢子虫定量: [95 °C - 1 min] + [95 °C - 5 s, 52 °C - 34 s, 72 °C - 30 s] × 40 cycles + [熔解曲线荧光信号采集 95 °C - 15s, 60 °C - 1min, 95 °C - 15 s]
 - b. 鸟类红细胞定量: [95 °C - 1 min] + [95 °C - 5 s, 57 °C - 34 s, 72 °C - 30 s] × 40 cycles + [熔解曲线荧光信号采集 95 °C - 15s, 60 °C - 1 min, 95 °C - 15 s]
- 4) 将 96 孔板放入仪器, 开始 PCR 反应。反应过程中可以实时监测荧光信息 (图

6)。

图 6. 实时荧光定量 PCR 反应界面, 包括反应程序、反应管中样品和目标基因、荧光信号信息

数据分析

1. 扩增曲线分析

- 1) 根据扩增曲线手动调整荧光强度阈值。阈值应略高于基线期的最高值以确保准确性。检查阴性对照样品, 如果出现较低 Ct 值则表明实验过程中可能有污染, 结果不可信。如果同一个样品的两个重复的 Ct 值相差较大, 则结果不可信, 需要重复实验; 如果较为一致, 则取其平均值以待分析。
- 2) 如果选择标准曲线反应程序, 检查标准曲线和扩增效率 (图 7)。理想的扩增效率应在 90%-110%间。

图 7. 实时荧光定量 PCR 反应的标准曲线

2. 熔解曲线分析

检查熔解曲线，根据最高峰的位置排除非特异扩增 (图 8)。确保结果可信后，导出数据至 Excel 文件。

图 8. 实时荧光定量 PCR 反应的熔解曲线 右侧为阳性样品，呈现目标片段的熔解峰，左侧为阴性对照，呈现引物二聚体的熔解峰。根据熔解峰出现温度的差异可排除非特异扩增。

3. 计算血孢子虫感染强度

如果采用标准曲线法，软件会自动计算目标 DNA 的量；如果采用相对定量法，则根据待检测样品 (X) 和阳性对照 (Positive control, P) 的 Ct 值差异，计算样品中目标 DNA 相对量， $QX = 2^{CtX - CtP}$ ，若阳性对照中血孢子虫的含量 (QP) 已知，则待检测样品中血孢子虫含量的绝对值为 $QX \times QP$ 。结合血孢子虫和宿主的定量检测结果，

感染强度为 $\frac{Q_{\text{寄生虫}}}{Q_{\text{宿主}}} \times 100\%$ 。

致谢

实验方案摘自文章 Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? (Asghar *et al.*, 2011)和 Generalist haemosporidian parasites are better adapted to a subset of host species in a multiple host community(Huang *et al.*,2018).

三、基于数字式荧光 PCR 技术对鸟类血孢子虫进行绝对定量检测

A Digital Droplet PCR Assay for Absolute Quantification of Avian Haemosporidians

杨国成, 董森, 黄希*

研究背景

实时荧光定量 PCR 实现了对鸟类血孢子虫的相对定量, 但其结果高度依赖于标准品的选择, 很难做到标准化的评估, 导致不同实验室、不同年度间获得的实验结果缺乏可比性 (Huang, 2021)。近年来兴起的数字式微滴 PCR (ddPCR) 由于极高的灵敏度和不依赖于标准品即可定量检测的优点, 已在多个领域得以应用。ddPCR 系统在传统的 PCR 扩增前将反应体系进行微滴化处理, 利用油包水技术将其"分割"为数万个纳米级的微滴, 每个微滴都是一个独立的 PCR 反应体系。PCR 扩增完成后, 利用微滴读取仪逐个对微滴进行检测, 有荧光信号的微滴判读为"1", 没有荧光信号的判读为"0", 根据泊松分布原理及阳性微滴的比例即可得出原始模板中目标片段的拷贝数, 从而实现绝对定量 (Hikosaka *et al.*, 2013)。

由于所有微滴中的 PCR 反应都是独立进行的, 相当于进行了几万次重复实验, 因此可以排除绝大多数随机因素对 PCR 结果产生的影响, 如酶的消耗、背景中大量的宿主 DNA、血红蛋白和醇类等 PCR 抑制剂的影响。因此, 与传统 PCR 相比, ddPCR 不同批次间检测结果的差异大大降低, 确保了实验的灵敏度和可重复性 (Koepfli *et al.*, 2016)。此外, 由于 ddPCR 采用泊松分析法而非根据荧光强度对模板进行定量, 其结果几乎不受扩增效率的影响, 对模板 DNA 浓度和质量的要求也较低。这种技术不仅能够检测含量极低的核酸序列 (目标基因在总 DNA 中占比低至 0.001%), 而且无需标准品即可对目标片段进行绝对定量, 灵敏度和精确性更高。

本文所介绍的方法为可检测三个属血孢子虫的通用方法 (图 9), 目标基因为血孢子虫线粒体基因组上的保守 rRNA 片段, 能对感染强度低至 10^{-5} (每 10^5 个宿主细胞中有 1 个被血孢子虫感染) 的样品进行精确定量 (Huang *et al.*, 2020), 使不同实验室的研究结果比较成为可能, 也为在大尺度上比较血孢子虫和宿主相互适应关系建立了基础。

图 9. 数字式微滴 PCR 实验操作和原理示意图

材料与试剂

1. 移液器吸头 (Rainin, 加利福尼亚, 美国, 0.1-2.5 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l)
2. 1.5 ml 离心管 (Eppendorf)
3. 50 ml 试剂槽 (BBI, catalog number: F619711)
4. 普通 96 孔板 (Eppendorf)
5. 半裙边 96 孔微生物学板 (Bio-Rad, 加利福尼亚, 美国, catalog number: 30129334)
6. 96 孔板热封膜 (Bio-Rad, catalog number: 1814040)
7. 微滴发生卡 (Bio-Rad, catalog number: 1864008)
8. 微滴生成密封垫 (Bio-Rad, catalog number: 1863009)
9. EvaGreen 微滴发生油 (Bio-Rad, catalog number: 1863005)
10. EvaGreen ddPCR mix (Bio-Rad, catalog number: 1863010)
11. 引物 1 对 (3524F: 5'-AGGCAAAGAAAATGACCGG-3', 3655R: 5'-ATGGCGAGAA GGGGAAGTGTG-3')

仪器设备

1. 单道移液器 (Rainin, 加利福尼亚, 美国, 量程 0.1-2.5 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l)

2. 8 道移液器 (Rainin, 量程 2-20 μ l, 20-200 μ l)
3. PX1 热封仪 (Bio-Rad)
4. 循环变温加热器 (Bio-Rad)
5. QX200 微滴生成仪 (Bio-Rad)
6. QX200 微滴读取仪 (Bio-Rad)

软件

1. Quantasoft (Bio-Rad)

实验步骤

1. 样品准备

- 1) 将模板、引物和试剂置于冰上融化。
- 2) 在冰上配制反应体系预混液。计算反应所需的试剂体积，将 EvaGreen、ddH₂O 和引物在 1.5 ml 离心管中混合，振荡混匀，短暂离心收集管壁上液滴，完成无模板的预混液制备。使用 96 孔板时可以在条形试剂槽中混匀，用排枪上样。考虑到移液过程中的损失，预混液的总体积为 (单个反应体积) $\times$ (实际反应数 + 1)。单个反应体系为 20 μ l，根据待检测样品的数量，建议配制方法如表 5 所示。

表 5. ddPCR 反应体系 (20 μ l) 及其各成分配比

试剂	单个反应 (20 μ l)	24 个样品 (25 $\times$)	96 板整版 (100 $\times$)
ddH ₂ O	7	175	700
正向引物	0.5	12.5	50
反向引物	0.5	12.5	50
EvaGreen (2 $\times$)	10	250	1,000
DNA 模板	2	-	-
总计	20	450	

- 3) 将移液器量程设置为 18.18 μ l，将无模板样品预混液分装至普通 96 孔板。(移液器排出溶液时只按至第 1 档，实际加样体积为 18 μ l)

- 4) 将移液器 (排枪) 量程设置为 2.02 μl , 向无模板样品预混液中加入模板溶液。
(移液器排出溶液时只按至第 1 档, 实际加样体积为 2 μl)。每轮反应中, 每个样品均重复 3 次, 建议每排为 7 个样品加一个阴性对照。阴性对照可采用确定未感染的样品, 或以 ddH₂O 代替 DNA 模板。

- 5) 将 96 孔板放入离心机, 配平后中速离心, 确保样品管中没有气泡、管壁没有沾上液滴。如果无法立刻继续实验, 可短暂存放于 4 °C 冰箱, 但建议不超过 24h。

注意: 有荧光染料, 注意避光; 合理使用移液器档位, 将量程设置为略高于所需用量以减少操作性损失, 加样时只按至第 1 档可减少气泡产生。

2. 生成微滴

- 1) 将移液器量程设置为 20 μl , 将反应溶液转移至微滴发生卡的中间孔。由于微滴发生卡为八联管形式, 每次可转移一排样品。(移液器排出溶液时只按至第 1 档)
- 2) 将移液器量程设置为 70 μl , 向微滴发生卡的下排孔中加入微滴生成油。(由于油滴不会产生气泡, 移液器排出溶液时按至第 2 档, 将液体全部加入孔中)
- 3) 检查并排除气泡后, 将微滴发生卡插入托架, 套上密封垫, 放入微滴生成仪, 生成微滴。
- 4) 取出微滴发生卡, 将 8 道移液器 (排枪) 量程设置为 42 μl (增加 2 μl 保证吸取全部微滴产物), 将微滴生成卡上排孔中的微滴产物缓慢匀速转移至半裙边 96 孔板中, 每个样品转移时间控制在 30s 至 1min, 尽量避免气泡的产生。96 孔板置于冰盒上, 并用普通封板膜 (光滑面在下) 盖住以避光。
- 5) 重复以上步骤, 完成所有微滴产物的制备和转移。

3. 96 孔板封膜

- 1) 点击 PX1 热封仪屏幕上的"向上箭头" (注意此时 96 孔板不要放在仪器前方), 将上述所得 96 孔板与专用金属板封板膜放入 PX1 热封仪中 (封板膜不能有折痕, 且有红线的一面向上), 在此点击屏幕上的"向上箭头", seal, 扣紧, 封板; 水平旋转 180°再封一次。
- 2) 点击 180 °C, Off, 待热封仪冷却至室温后再关机。生成微滴后尽快开始 PCR 反应, 建议当天完成。

4. PCR 扩增

- 1) 设置 PCR 程序, 94 °C 5 min → 35 cycles [94 °C 30 s → 57 °C 30 s → 72 °C

40 s] → 72 °C 10 min → 4 °C hold [注: 变温速率 (ramp rate) ≤ 2 °C /s; 热盖温度 105 °C; 反应体系 40 μl]。

2) 放入 96 孔板, 盖上热盖并拧紧旋钮直至听到"嗒嗒"声, 开始 PCR。

5. 读取数据

- 1) 打开微滴读取仪。(开机顺序: 电脑→微滴读取仪→QuantaSoft 软件) 在 PCR 运行过程中, 在 QuantaSoft 软件中设置微滴读取参数及样品信息。
- 2) 检查微滴读取仪的读取油和废油液面指示, 如报警则更换相应的油瓶。
- 3) 确定微滴读取仪可正常工作, 并做使用前维护。(如未使用时间超过一周, 则先做"Prime"; 每天实验前先做"Flush System")
- 4) 设置反应参数。Experiment: ABS; Supermix: QX200 ddPCR EvaGreen SuperMix; Target 1 Type: ch1 Unknow, Target 2: Unused; 将 Target 1 Name 改为引物名称 (3524F-3655R), 点击 Apply。
- 5) 设置每个孔的对应样品名称: Sample → Name。
- 6) PCR 结束后, 尽快开始读取微滴数据, 等待时间 ≤ 30min。

数据分析

1. 质量控制

检查微滴分布图和对应直方图, 根据阴性对照的微滴分布手动调整荧光强度阈值。非特异扩增产生的阳性微滴可能呈"雨滴"状分布于目标扩增产物下方, 因此阈值应高于阴性对照的最高值以排除非特异扩增 (图 10)。检查微滴数, 理想微滴数应在 15,000-20,000 间 (图 11), 读取微滴数低于一万的样品结果不可信。如果同一个样品的三个重复的微滴分布相差较大, 则去除不一致的结果。

图 10. 数字式微滴 PCR 反应的微滴分布图。A03、D03 为阳性样品，呈现阳性微滴和非特异扩增产生的“雨滴”；C10 为阴性对照，呈现阴性微滴。由于阴性微滴的荧光信号极低，不同样品中阴性微滴的位置可能存在一定差异，但一般位于 10,000 附近。阈值应高于阴性微滴和雨滴位置。微滴数目用不同颜色标明，蓝色为较少，红色为较多，黄色为极多。

图 11. 数字式微滴 PCR 反应的微滴直方图，显示可读取的微滴数量。每个反应孔中微滴的理论数量约为 20,000，如果可读取微滴数低于 10,000 则结果不可信，需重复实验。

2. 导出结果

- 1) 确定结果可信后，软件会自动计算每个样品中的目标片段拷贝数，将其导出至 Excel 文件，根据反应体系中加入的 DNA 模板体积 (2 μ l) 即可得到原始模板中血孢子虫的数量 (Q 寄生虫)。
- 2) 宿主红细胞个数 (Q 宿主) 可沿用第二章 qPCR 中的引物 SF5R/3Fb - SF5R/3Rb，用 ddPCR 方法检测，方法与血孢子虫检测方法相同。结合血孢子虫和宿主的定量检测结果，感染强度为 $\frac{Q_{\text{寄生虫}}}{Q_{\text{宿主}}} \times 100\%$ 。

竞争性利益声明

无经济或非经济性竞争性利益。

伦理学声明

采样和实验均获得北京师范大学生命科学院批准。

批准文号: No. CLS-EAW-2013-007

致谢

实验方案摘自文章 A new protocol for absolute quantification of haemosporidian parasites in raptors and comparison with current assays(Huang *et al.*, 2020).

参考文献

1. Asghar, M., Hasselquist, D. and Bensch, S. (2011). [Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds?](#) *J Avian Biol* 42(6): 530-537.
2. Bell, J., Weckstein, J., Fecchio, A., and Tkach, V. (2015). [A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians.](#) *Parasites Vectors* 8: 1-9.
3. Bensch, S., Hellgren, O. and Pérez-Tris, J. (2009). [MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages.](#) *Mol Ecol Resour* 9(5): 1353-1358.
4. Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Örjan, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H. and Pinheiro, R. T. (2000). [Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds.](#) *Proc Royal Soc B* 267(1452): 1583-1589.

5. Ciloglu, A., Ellis, V.A., Bernotienė, R., Valkiūnas, G., Bensch, S., (2019). [A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites](#). *Parasitol. Res.* 118(1): 191-201.
6. Dunn, J. C. and Outlaw, D. C. (2019). [Flying into the future: avian haemosporidians and the advancement of understanding host–parasite systems](#). *Parasitology* 146(12): 1487-1489.
7. Ellis, V., Bensch, S. and Canbäck, B. (2017). MalaviR: an R interface to MalAvi. R package version 0.1. 0. GitHub. Retrieved from <https://github.com/vincenzoaeellis/malaviR>.
8. Fenton, A., Streicker, D. G., Petchey, O. L. and Pedersen, A. B. (2015). [Are all hosts created equal? Partitioning host species contributions to parasite persistence in multihost communities](#). *Am Nat* 186: 610-622.
9. Friedl, T. W. P. and Groscurth, E. (2012). [A real-time PCR protocol for simple and fast quantification of blood parasite infections in evolutionary and ecological studies and some data on intensities of blood parasite infections in a subtropical weaverbird](#). *J Ornithol* 153: 239-247.
10. Galen, S. C., Borner, J., Martinsen, E. S., Schaer, J., Austin, C. C., West, C. J. and Perkins, S. L. (2018). [The polyphyly of *Plasmodium*: comprehensive phylogenetic analyses of the malaria parasites \(order Haemosporida\) reveal widespread taxonomic conflict](#). *Roy Soc Open Sci* 5(5): 171780.
11. Hellgren, O., Waldenström, J. and Bensch, S. (2004). [A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood](#). *J Parasitol* 90(4): 797-802.
12. Hikosaka, K., Kita, K. and Tanabe, K. (2013). [Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa](#). *Mol Biochem Parasitol* 188(1): 26-33.
13. Huang, X., (2021). [Assessment of Associations between Malaria Parasites and Avian Hosts—A Combination of Classic System and Modern Molecular Approach](#). *Biology* 10(7): 636.
14. Huang, X., Ellis, V. A., Jönsson, J. and Bensch, S. (2018). [Generalist haemosporidian parasites are better adapted to a subset of host species in a multiple host community](#). *Mol Ecol* 27(21): 4336-4346.
15. Huang, X., Huang, D., Liang, Y., Zhang, L., Yang, G., Liu, B., Peng, Y., Deng, W. and Dong, L. (2020). [A new protocol for absolute quantification of haemosporidian](#)

- [parasites in raptors and comparison with current assays](#). *Parasites Vectors* 13(1): 354.
16. Koepfli, C., Nguitragool, W., Hofmann, N. E., Robinson, L. J., Ome-Kaius, M., Sattabongkot, J., Felger, I. and Mueller, I. (2016). [Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR \(ddPCR\)](#). *Sci Rep* 6: 39183.
 17. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. and Zoric, N. (2006). [The real-time polymerase chain reaction](#). *Mol Aspects Med* 27: 95-125.
 18. Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J. and De Lope, F. (2008). [Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two](#). *J Evol Biol* 21(4): 979-987.
 19. Mukhin, A., Palinauskas, V., Platonova, E., Kobylkov, D., Vakoliuk, I. and Valkiūnas, G. (2016). [The strategy to survive primary malaria infection: an experimental study on behavioural changes in parasitized birds](#). *PLoS One* 11: e0159216.
 20. Pigeault, R., Vézilier, J., Cornet, S., Zélé, F., Nicot, A., Perret, P., Gandon, S. and Rivero, A. (2015). [Avian malaria: a new lease of life for an old experimental model to study the evolutionary ecology of *Plasmodium*](#). *Phil Trans R Soc B* 370(1675): 20140300.
 21. Rivero, A. and Gandon, S. (2018). [Evolutionary ecology of avian malaria: past to present](#). *Trends Parasitol* 34(8): 712-726.
 22. Schoener, E. R., Hunter, S. and Howe, L. (2017). [Development of a rapid HRM qPCR for the diagnosis of the four most prevalent *Plasmodium* lineages in New Zealand](#). *Parasitol Res* 116(7): 1831-1841.
 23. Valkiūnas, G. (2005). [Avian malaria parasites and other haemosporidia](#). CRC Press. Boca Raton.
 24. Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Hellgren, O., Bolshakov, C.V., (2006). [Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: Microscopy is still essential](#). *J. Parasitol.* 92(2): 418-422.
 25. Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. and Ostman, O. (2004). [A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood](#). *J Parasitol* 90(1): 191-194.