

探针法猫血支原体实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Mycoplasma haemofelis*

目前已知寄生于猫血中的嗜血支原体有三种：猫血支原体（*Mycoplasma haemofelis*），*Candidatus Mycoplasma haemominutum* 和 *Candidatus Mycoplasma turicensis*。在 PCR 技术出现之前，这三种支原体被统称为猫血巴尔通氏体（*Haemobartonella felis*）；三种支原体常发生双重或三重感染，猫血支原体往往是检出拷贝数最少的，因此需要单独的检测方法排除另两种支原体的干扰。猫血支原体，或称为猫嗜血支原体、猫附红细胞体（*Eperythrozoon felis*），致病能力强于另两种支原体。猫血支原体寄生于猫红细胞表面，具多形性，可呈现为球状、环状或杆状，对红细胞有破坏作用，可引起传染性溶血性贫血，有时呈急性发作，可致命；有时呈慢性发作，出现嗜睡、厌食、粘膜惨白及黄疸、发烧、脾脏肿大等症状，并可能出现反复发作。其传播途径为血液传播，包括：吸血昆虫叮咬、咬伤、输血等。

寄生于犬血中的支原体有两种：犬血支原体（*Mycoplasma haemocanis*，旧称 *Haemobartonella canis*）和 *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*。犬血支原体与猫血支原体亲缘关系非常近，基因组序列几乎 100% 相同。在实验条件下，猫可以感染犬血支原体，而犬不能感染猫血支原体。犬血支原体可能引起的临床表现包括：无症状、脱水、轻度贫血、心跳过速、黄疸、死亡，但是很少引起明显的溶血，除非是做了脾切除手术或者发生了免疫抑制。犬血支原体是犬类中最常见的嗜血支原体，分布极为广泛。

嗜血支原体无法在体外培养，因此难以开发蛋白类检测方法。常用的检测方法包括显微镜镜检法和 PCR 法。镜检法灵敏度低，实验误差大，无法区分支原体种类，易受血液中其他物质以及人工涂片方法的干扰，且支原体易从红细胞表面脱落，造成漏检。而 PCR 法在灵敏度和特异性上则有明显的优势，可以区分支原体种类。定量 PCR 法与普通 PCR 法相比，不仅可以进行定量分析，而且操作更为方便，更少受环境污染的影响。

本试剂盒基于 16S rRNA 基因的保守区域，设计特异性引物和探针，可以准确识别猫血支原体和犬血支原体，经 BLAST 验证，仅与近亲 *Mycoplasma haemobos* 有微弱的交叉反应，与其他生物的基因组无交叉反应。*Mycoplasma haemobos* 寄生于牛血中，不会对本试剂盒的检测产生影响。对 1585 个猫血样品进行检测，获得 45 个阳性，其中有 25 个为与另两种猫嗜血支原体共感染。可见本试剂盒适用于猫血支原体和犬血支原体的检测。

试剂盒成分：

组份	成分	货号/规格/体积（微升）		
		Mqt-hfe-20	Mqt-hfe-50	Mqt-hfe-100
		20 次反应	50 次反应	100 次反应
组份 A（蓝色管）	热启动 Taq 酶，dNTPs，UDG 酶	200	500	1000
组份 B（棕色管）	上下游引物，探针	40	100	200
组份 C（黄色管）	阳性对照样品	40	100	200
ROX（棕色管）	5 µmol/L ROX	50	125	250
水（白色管）	无 DNA 酶超纯水	160	400	800

储存：-20℃，避光保存，有效期一年。避免反复冻融，频繁使用可置于 4℃ 保存。本产品可在 4℃ 保持稳定数周。

试剂盒特点：

- 1, 特异性检测猫血支原体和犬血支原体, 不受其他基因组干扰。
- 2, 灵敏度高, 最低可检出反应液中的 1-10 个拷贝。
- 3, 使用的 DNA 聚合酶具有抗抑制能力强和热稳定性好的特点; 采用热启动方式, 可抑制非特异性扩增, 降低背景荧光。
- 4, 带有阳性对照样品 (组份 C), 可用于检验试剂盒有效性, 以及帮助排除假阴性。
- 5, 带有 UDG 酶和 dUTP, 可降低残留 DNA 的污染。

操作步骤：

- 1, 准备好样品, 抽提 DNA 后进行 PCR。本试剂盒使用的 DNA 聚合酶抗干扰能力强, 对大多数使用 Tris 缓冲系统的样品可直接扩增, 可先直接用样品进行 PCR 预实验, 确认是否需要抽提 DNA。参考方法: 将样品和组份 C 在同一管内进行 PCR, 信号正常则说明样品中不含 PCR 抑制成分, 可省去提取 DNA 步骤。
- 2, 将本试剂盒各组份置于室温充分融解, 融解不完全可能导致实验结果异常, 融解过程注意避光; 手指轻弹管底以混匀, 然后瞬时离心使液体沉降至管底; 不可涡旋振荡。
- 3, 参考下表配制反应体系: 反应体积 20 微升。将适量组份 A、组份 B、ROX 和水混合好之后, 分装到 PCR 管中, 最后加入待测样品或组份 C, 阴性对照则加入与样品体积相同的水。注意避免剧烈操作, 防止气溶胶污染。ROX 须根据仪器型号选择恰当浓度, 必要时需先进行稀释再吸取适当体积 (参考 http://www.biothrive.cn/vip_doc/30703411.html)。

体积 (微升)	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管
组份 A	10	10	10
组份 B	2	2	2
组份 C	-	2	-
待测样品	-	-	2
ROX	x	x	x
水	8-x	6-x	6-x
总体积	20	20	20

- 4, 反应条件: 50℃2 分钟, 95℃2 分钟, 然后以 95℃15 秒、60℃30 秒循环 45 次。在每个循环的结合阶段读取荧光值。
- 5, 探针以 FAM/BHQ1 标记, 在每个循环的结合阶段读取荧光值。Ct 值小于 35 为阳性, 35-40 之间建议重复检测, 大于 40 可能是非特异性扩增。最低可检测出每反应 1-10 个拷贝。

注意事项：

- 1, 配制反应体系时, 尽量使用大体积移液。体积越大, 移液误差越小。
- 2, PCR 非常灵敏, 操作时产生的微量气溶胶即可造成样品之间的相互污染, 因此须小心谨慎, 避免剧烈操作。加液时枪头最好贴着管壁, 所有管子用完即盖, 对照和待测样品留在最后一步加入, 取过样品的枪头用完即弃, 尽量减少操作时污染的可能性。使用无污染的一次性枪头, 最好是用带滤芯的枪头, 在通风洁净区域操作。如长期使用本产品, 请使用带滤芯的枪头, 并注意避免环境 DNA 污染枪头。
- 3, 操作时须佩戴无粉尘手套。最好对工作区域进行划分, 将不同步骤, 如 DNA 提取和 PCR 反应液的配制, 分开在不同阶段不同区域进行。
- 4, 本产品仅限于科研使用, 不作诊断用途。