

探针法维容氏支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

嗜血支原体 (*Hemotropic Mycoplasma*, 或 *hemoplasma*) 是一类寄生于红细胞表面的细菌, 无细胞壁, 可以感染很多哺乳动物, 包括猫、犬、猪、牛、羊等, 也包括人类。在牛体内已发现的嗜血支原体有两种: 维容氏支原体 (*Mycoplasma wenyonii*) 和 *Candidatus Mycoplasma haemobos*。维容氏支原体, 旧称维容氏附红细胞体 (*Eperythrozoon wenyonii*), 也有称为温氏支原体、文氏支原体、温氏附红细胞体、维氏附红细胞体、牛附红细胞体、温氏血虫体、文氏附红血球体, 首次发现于 1934 年, 目前为止仅在牛体内发现。血涂片检测结果显示, 其游离于血浆或附着在红细胞表面, 在全世界广发分布, 可与无形体 (*Anaplasma*)、巴贝虫 (*Babesia*) 和泰勒虫 (*Theileria*) 形成共感染。多数情况下牛在感染后无临床表现, 有时会出现贫血、发热、后肢水肿、乳头肿胀、产奶量突降和体重减轻等症状。感染后很难完全清除, 可能终身带菌。一般认为吸血性节肢动物是其传播途径。

维容氏支原体尚无合适的体外培养方法, 因此难以开发蛋白类检测方法。检测方法一般采用吉姆萨染色的血涂片法。血涂片法的检测灵敏度和特异性均比较差, 容易受到人工制片方法和血液里其他成分 (如: Howell - Jolly 体) 的干扰, 且支原体易从红细胞表面脱落, 造成漏检。而 PCR 法在灵敏度上则有明显的优势, 且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 基因设计特异性引物和探针, 准确识别维容氏支原体, 经 BLAST 验证, 与羊支原体 (*Mycoplasma ovis*)、猪支原体 (*Mycoplasma suis*)、以及寄生于梅花鹿的 *Candidatus Mycoplasma haemocervae* 和 *Candidatus Mycoplasma erythroceruae* 有交叉反应, 而与 *Candidatus Mycoplasma haemobos* 及其他生物的基因组无交叉反应。由于嗜血支原体有严格的宿主特异性, 检测时只需注意严格操作, 不污染其他动物的血源, 就不会对检测造成干扰。检测 4 种非嗜血支原体和源于猫、犬、羊驼的 5 种嗜血支原体, 均无交叉反应。对不同健康状况的牛群进行检测, 在 159 只患致命贫血牛中获得 133 个阳性, 在 57 只患不相关疾病牛中获得 33 个阳性, 在 61 只健康牛中获得 38 个阳性, 而在 47 只健康牛犊中只获得 2 个阳性。可见本试剂盒适用于维容氏支原体的检测和鉴定。

试剂盒成分:

组份	成分	货号/规格/体积 (微升)		
		Mqt-wen-20	Mqt-wen-50	Mqt-wen-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 $\mu\text{mol/L}$ ROX	50	125	250
水 (白色管)	无核酸酶超纯水	160	400	800

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

试剂盒特点:

- 1, 特异性检测维容氏支原体, 准备样品时注意不要污染其他动物血制品。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限低于每反应 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。
- 5, 带有 dUTP 和 UDG 酶, 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于管底; 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°C 2 分钟, 95°C 2 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 60 秒循环 45 次。
- 5, 探针以 FAM/TAMRA 标记, 在每个循环的结合阶段采集荧光信号。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。最低检测极限低于每反应 10 个拷贝, 反应液中仅 1 个基因组时检出率为 58%。

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。