

染料法嗜血支原体通用实时定量 PCR 试剂盒

Dye-quantitative Real-time PCR Kit for Universal Hemoplasma

嗜血支原体 (*Hemotropic mycoplasma*, 或 *hemoplasma*) 寄生于多种哺乳动物血液中, 附着于红细胞表面, 无细胞壁, 具多形性, 可通过血液传播。嗜血支原体曾被命名为血巴尔通体 (*Haemobartonella*) 和附红细胞体 (*Eperythrozoon*), 分类为立克次氏体属, 现已重新归类为支原体属。临床上嗜血支原体可引发溶血性贫血症, 其他症状还包括: 厌食症、昏睡症、脱水、体重减轻、突然死亡等, 有时表现为急性发作, 也有很多动物感染后症状轻微或无症状。目前已在猫、狗、猪、牛、羊、驼、鼠等动物中发现嗜血支原体, 不同种动物感染的嗜血支原体有遗传相似性, 很多动物的血液支原体感染仍然未知。

嗜血支原体的体外培养非常困难, 难以常规应用, 一般采用 PCR 法在血液或组织样本中检测。常规 PCR 方法较为繁琐, 耗时较长, 较易产生产物污染; 探针法实时定量 PCR 具有更强的特异性, 较少受到残留 DNA 的污染, 较难识别未知物种; SYBR 法实时定量 PCR 可兼具二者的优点, 通过熔解曲线来区分不同的 PCR 产物, 提高检测的特异性, 相较探针法, 又可在一定程度上识别未知物种。

本试剂盒采用 SYBR 染料法, 根据嗜血支原体的 16S rRNA 基因序列, 设计通用引物, 可识别寄生于常见哺乳动物 (如: 猫、犬、猪、牛、羊、鼠等) 的所有已知嗜血支原体。通过 BLAST 验证, 本试剂盒与非嗜血支原体的其他物种无交叉反应。使用本试剂盒对 320 个猫血样进行检测, 获得 139 个阳性, 其中包括猫的全部三种嗜血支原体。对扩增产物进行测序, 证实为嗜血支原体特异性扩增。可见本试剂盒适用于嗜血支原体的通用检测。

下表列出已知的可识别嗜血支原体种类:

支原体	宿主	支原体	宿主
<i>Candidatus Mycoplasma haemohominis</i>	人	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	牛
<i>Mycoplasma coccoides</i>	鼠	<i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i>	牛
<i>Candidatus Mycoplasma haemomuris</i>	鼠	<i>Mycoplasma ovis</i>	羊
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	猫	<i>Candidatus Mycoplasma haemovis</i>	羊
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	猫	<i>Candidatus Mycoplasma erythrocervae</i>	鹿
<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>	猫	<i>Candidatus Mycoplasma haemocervae</i>	鹿
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	犬	<i>Candidatus Mycoplasma kahanei</i>	猴
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	犬	<i>Candidatus Mycoplasma haemomacae</i>	猴
<i>Mycoplasma suis</i>	猪	<i>Mycoplasma erythrodidelphis</i>	负鼠
<i>Mycoplasma parvum</i>	猪	<i>Mycoplasma haemozalophi</i>	海狮
<i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i>	羊驼	<i>Candidatus Mycoplasma haemomeles</i>	獾

试剂盒成分:

组份	成份	货号/规格/体积 (微升)		
		Mqs-hae-20	Mqs-hae-50	Mqs-hae-100
		20 次反应	50 次反应	100 次反应
组份 A (棕色管)	热启动 Taq 酶, dNTPs, ROX, SYBR Green I 染料, UDG 酶	200	500	1000
组份 B (绿色管)	引物混合物	40	100	200
组份 C (黄色管)	阳性对照样品	40	100	200
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。

试剂盒特点:

- 1, 作为嗜血支原体通用试剂盒使用, 可检测绝大部分目前已知的嗜血支原体。
- 2, 使用热启动的 Taq 酶, 可抑制非特异性扩增, 降低背景荧光。
- 3, 带有阳性对照样品, 可用于检验试剂盒有效性。
- 4, 带有 ROX 参比染料, 帮助校正加样误差和管间差异。
- 5, 带有 UDG 酶和 dUTP, 可降低残留 DNA 的污染。

操作步骤:

- 1, 准备 EDTA 处理过的血液, 使用 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 用于 PCR 反应。
- 2, 将试剂盒各组份置于室温溶解, 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。将组分 A 和 B 混合好之后, 分装到 PCR 管中, 然后加入水, 最后向 PCR 管中加入 DNA 样本或阳性对照。注意避免剧烈操作, 防止气溶胶污染。如需排除假阴性, 可将组份 C 与待测样品在同一管中共同反应, 出现信号说明没有 PCR 抑制物, 没有信号则说明有 PCR 抑制物。

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	—
水	8	6	6
测试样品	—	—	2
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℃60 秒循环 40 次。在每个循环的结合阶段和延伸阶段都收集荧光信号。计算熔解温度时, 在 60-95℃之间, 每隔 0.25℃记录一次荧光值。
- 5, Ct 值小于 35 为检测阳性。扩增产物熔解温度在 75.1±0.4℃, 明显偏离此温度范围的为非特异扩增。

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。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。