

嗜血支原体通用 PCR 检测试剂盒

PCR Detection Kit for Hemotropic mycoplasma

嗜血支原体 (*Hemotropic mycoplasma*, 或 *hemoplasma*) 是一类寄生于多种哺乳动物血液中的原核生物, 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附红细胞体 (*Eperythrozoon*) 和血巴尔通体 (或血巴通氏体) (*Haemobartonella*), 被归类为立克次氏体, 根据 16S rRNA 基因序列分析, 现已重新归类为支原体。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, 很多动物的血液支原体感染仍为未知状态。一般认为吸血性节肢动物是其传播途径。

嗜血支原体的体外培养非常困难, 难以常规应用, 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, 容易受到制片方法和血液里其他成分的干扰。而使用 PCR 法检测则更为方便, 且灵敏度更高, 检测时间短, 仅需几个小时即可获得结果。

本试剂盒针对 16S rRNA 基因进行 PCR 鉴定, 引物特异性靶向嗜血支原体, 可识别寄生于常见哺乳动物 (如: 猫、犬、猪、牛、羊、驼、鼠等) 的所有已知嗜血支原体, 如下表所示; 经 BLAST 验证, 与真核细胞基因组无交叉反应, 仅与 *Mycoplasma fastidiosum* 族非嗜血支原体有交叉反应, 包括: 狮子鱼支原体 (*Candidatus Mycoplasma liparidae*) (发现于深渊狮子鱼肠道)、*Mycoplasma fastidiosum* (发现于马鼻咽部)、*Mycoplasma cavipharyngis* (发现于豚鼠鼻咽部)、*Mycoplasma insons* (发现于绿鬣蜥上呼吸道)。对于猪支原体 (*Mycoplasma suis*) 的野猪(wild boar)型菌株, 本试剂盒敏感性较低。对 100 个猫血 DNA 样本进行检测, 得到 22 个阳性样本, 用物种特异性 PCR 复检, 可鉴定出感染的是三种猫嗜血支原体的一种或几种, 无假阳性现象。本试剂盒适合用于样本中嗜血支原体的初步检测筛选。

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

货号: M-hemo-20

规格: 20 个反应

货号: M-hemo-50

规格: 50 个反应

货号: M-hemo-100

规格: 100 个反应

试剂盒组份:

组份	成份	体积（微升）		
		M-hemo-20	M-hemo-50	M-hemo-100
组份 A（蓝色管）	Taq 酶, dNTPs, 染料	250	625	1250
组份 B（绿色管）	上下游引物	50	125	250
组份 C（黄色管）	阳性对照样品	50	125	250
水（白色管）	无菌超纯水	200	500	1000

保存条件：保存于-20℃，避免反复冻融。没有反复冻融的情况下，保质期一年。

操作方法：

1、样品准备

准备 EDTA 处理过的血液，使用 DNA 抽提试剂盒提取样品 DNA，用于 PCR 反应。

2、PCR 反应的准备

待试剂盒各组份融化后先瞬时离心，然后轻弹混匀。参考下表，在 PCR 管中配制反应体系，每次实验需加一个阴性和一个阳性对照，测试反应管可以有多个。配制过程中应注意气溶胶污染，避免剧烈操作。配制完毕后瞬时离心以使液体沉至管底。尽量使用大体积移液，体积越大，移液误差越小。

体积（微升）	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管*
组份 A	12.5	12.5	12.5
组份 B	2.5	2.5	2.5
组份 C	—	2.5	2.5 / — *
水	10	7.5	5.5 / 8 *
测试样品	—	—	2
总体积	25	25	25

*测试反应管中加入组份 C 可以判别测试样品中是否含 PCR 抑制物。把组分 C 加入测试反应管与样品共同反应，有条带（1108bp 和/或 595-622bp）出现则说明无 PCR 抑制物，无条带则说明有 PCR 抑制物，此时应注意假阴性的可能性。

3、PCR 反应

在 94℃ 预热 5 分钟； 94℃ 变性 20 秒，60℃ 退火 30 秒，72℃ 延伸 70 秒，循环 30 次；循环结束后，在 72℃ 延伸 7 分钟，最后保持在 4℃。

4、琼脂糖凝胶电泳

按常规方法准备好 1.5% 琼脂糖凝胶，加入 EB 或 Gold-View 等用于显色。每份反应液取 8 微升，无须加入上样缓冲液，直接加入凝胶加样孔中，另留一孔加入 DNA marker（最好在 600-1100bp 区间有显示条带），120 伏电泳约 30 分钟。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在 1108bp 处有一条带，阴性对照无条带，嗜血支原体条带在 595-622bp 区间。

注意事项：

- 1, 组份 A 中含有染料，染料的加入不影响 PCR 反应，反应产物可直接电泳，节省时间。
- 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。操作时须佩戴无粉尘手套。
- 3, 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。