

## 探针法鸡毒支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

鸡毒支原体 (*Mycoplasma Gallisepticum*)，又称为鸡败血支原体、鸡毒霉形体、鸡败血霉形体，是一种重要的家禽致病性支原体，常造成重大经济损失，有时能导致整群家禽被淘汰。它是慢性呼吸系统疾病的病原体，可导致上呼吸道感染，表现出啰音、咳嗽、流鼻涕、结膜炎、鼻窦炎、产蛋量减少、胚胎死亡率上升等不同的症状，严重时可引起气囊炎，还有报道其能使肉鸡体重增加缓慢和肉品下降，以及经蛋引起感染性不育。尽管鸡毒支原体感染可能没有临床症状，但它们可以使禽类更容易继发感染大肠杆菌等细菌，以及新城疫、传染性支气管炎和传染性喉气管炎等疾病。鸡毒支原体可以通过气溶胶、食物、水和环境中的各种物品进行传播，很多时候无法查明传播源头。鸡毒支原体也是火鸡、鸭、鹅、野鸟、鸽子和孔雀等鸟类各年龄段的传染性鼻窦炎的病原体。

鸡毒支原体可进行体外培养，但生长缓慢，对营养要求比较高，常需要一到数个星期才能完成生长和血清学鉴定工作。由于时间较长，其生长有时会被其它生长较快的上呼吸道腐生支原体所掩盖。血清学方法常用于鸡毒支原体的检测，但其有个重要的缺点就是检测滞后于感染，在感染后至少一周才能进行平板快速凝集实验，而红血球凝聚抑制实验则必须在感染后三周以内进行；另一个缺点是血清学方法特异性不足，常与其他支原体发生交叉反应，对不同菌株也可能有灵敏度差异。PCR 法具有检测时间短、灵敏度高、特异性强的特点，成为目前使用较多的鸟类支原体检测方法，只需数个小时即可获得结果，无需漫长的培养过程。普通 PCR 实验操作较为繁琐，只能对目标 DNA 进行定性分析；相比之下，实时定量 PCR 不仅可以对目标 DNA 进行定量分析，实验步骤也较为简单，且灵敏度更高，更少受环境污染的影响。

探针法鸡毒支原体定量 PCR 试剂盒选取细胞粘附素蛋白基因作为靶点，特异性靶向鸡毒支原体，经 BLAST 验证，与其他生物基因组无交叉反应。使用本试剂盒检测了 17 种鸟类支原体，均无交叉反应发生。检测十个不同的鸡毒支原体菌株，均为阳性。可见本试剂盒适用于鸡毒支原体的检测和鉴定。

## 试剂盒成分：

| 组份        | 成分                    | 体积（微升）     |            |             |
|-----------|-----------------------|------------|------------|-------------|
|           |                       | Mqt-gal-20 | Mqt-gal-50 | Mqt-gal-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 $\mu$ mol/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，特异性检测鸡毒支原体，与其他生物基因组无交叉反应。
- 2，灵敏度极高，最低检测极限为反应液中 1 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](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℃10 秒、60℃30 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/BHQ1 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。最低检测极限为每反应 1 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。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。