

探针法滑液支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

滑液支原体 (*Mycoplasma Synoviae*)，也称为滑液囊支原体，呈多形态的球形体(直径约 0.2~0.4 微米)，比鸡毒支原体稍小，革兰氏染色阴性，只有一个血清型，不同菌株的致病力有差异，引起的症状也因病原的趋向性而不同。滑液支原体主要感染鸡、火鸡以及珍珠鸡，且以幼雏为主，鸭、鹅、鸽、日本鹌鹑、红腿鹌鹑等也可感染。感染后可引起急性或慢性的全身性疾病，并导致关节的滑液囊膜及腱鞘等发生传染性渗出性滑膜炎、腱鞘滑膜炎及黏液囊炎。常出现亚临床性上呼吸道症状，如与新城疫或细菌感染相结合，可导致气囊炎。

检测滑液支原体的传统方法是体外培养，由于生长缓慢，有时需长达三周的时间，因此培养物常被其他支原体或细菌、真菌污染。血清学方法广泛用于对滑液支原体的检测，其缺点是不能检测早期感染，血清中抗体的产生滞后于感染，至少一周后才能进行血清平皿凝集实验，三周内才可以进行血凝抑制实验，因此不适用于血清转化监测。而 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。

探针法滑液支原体定量 PCR 试剂盒选取 16-23S rRNA 基因区间序列作为靶点，特异性靶向滑液支原体，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。检测十个不同的滑液支原体菌株，均为阳性。可见本试剂盒适用于滑液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-syn-20	Mqt-syn-50	Mqt-syn-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 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, 特异性检测滑液支原体，与其他生物基因组无交叉反应。
- 2, 灵敏度高，最低检测极限为反应液中 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 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 10 秒、60°C 30 秒循环 40 次。
- 5, 探针采用 FAM/BHQ1 标记, 在每个循环的结合阶段收集 FAM 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。最低检测极限为反应液中 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。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。