

双重探针法人类脲原体实时定量 PCR 试剂盒

Duplex Probe Real-time PCR Kit for *Ureaplasma parvum* & *urealyticum*

脲原体 (*Ureaplasma*) 是一类具有尿素分解能力的支原体，呈球状或球杆状，革兰氏阳性，克隆呈煎蛋状，细胞直径在 0.1 到 1.0 μm 之间，于 1954 年首次从人类泌尿生殖道分离出来，1974 年首先被命名为解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*)，人类中已知有 14 种血清型。经过多年的争论，在 2002 年，根据基因组大小、16S rRNA 基因序列、16S-23S rRNA 基因间隔区序列、酶的多态性、DNA-DNA 杂交、对锰的分化反应、多带抗原基因等，将其区分为两种生物：解脲脲原体和微小脲原体 (*Ureaplasma parvum*)。区分后的解脲脲原体包含的血清型有十种：2、4、5、7、8、9、10、11、12 和 13，微小脲原体包含的血清型有四种：1、3、6 和 14。不同血清型对人体疾病的影响目前尚没有一致结论。这两种脲原体是健康人常见的泌尿生殖道共生菌，可以单独或共同存在，有时也会与一些疾病相关联。目前尚不清楚这些脲原体会在什么情况下引起疾病，体液免疫系统健全的人一般不会受其影响。

脲原体的体外培养非常困难，耗时较长，灵敏度较低。对脲原体的分型是依靠针对全细胞或纯化抗原的单克隆或多克隆抗体，实验方法包括：生长抑制实验、代谢抑制实验、免疫荧光、免疫过氧化物酶、ELISA、免疫印迹等，这些方法都比较耗时费力，结果常常难以重复，有很多交叉反应，在含有多个血清型的样本上常难以区分。而 PCR 法用于检测脲原体，则有更高的灵敏度和更好的特异性，不受其他微生物污染的影响，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果。定量 PCR 法与常规 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。

本试剂盒选择脲原体特征性的尿素酶基因作为靶点，将脲原体 14 种血清型的序列进行比对，设计引物和探针，特异性识别人类脲原体所有血清型，并区分解脲脲原体和微小脲原体，经 BLAST 验证，与其他生物基因组没有交叉反应。对 42 个分离培养样本进行检测，得到 37 个微小脲原体阳性，4 个解脲脲原体阳性，以及一个双重阳性，与测序结果完全一致。对 31 个临床拭子样本进行检测，获得 11 个微小脲原体阳性，6 个解脲脲原体阳性，与常规 PCR 法检测结果一致，阳性率高于体外培养法，显示本试剂盒灵敏度高于体外培养法。可见本试剂盒适用于解脲脲原体和微小脲原体的检测。

试剂盒成分：

组份	成分	货号/规格/体积 (微升)		
		Mqt-upr-20	Mqt-upr-50	Mqt-upr-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 $^{\circ}\text{C}$ ，避光保存，有效期一年。避免反复冻融，频繁使用可置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。本产品可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持稳定数周。

试剂盒特点：

- 1, 特异性检测并区分微小脲原体和解脲脲原体，可识别人类脲原体的全部十四种血清型，与其他生物基因组没有交叉反应。

- 2, 灵敏度高于培养法, 与普通 PCR 法相当。
- 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)。

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 40 次。
- 5, 微小脲原体探针 5'-端以 FAM 修饰, 解脲脲原体探针 5'-端以 HEX 修饰, 3'-端都以 TAMRA 修饰, 在每个循环的结合阶段收集荧光信号。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。

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。