

探针法猪肺炎支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

猪肺炎支原体 (*Mycoplasma Hyopneumoniae*) 是猪支原体性肺炎 (又称地方性猪肺炎) 的主要病原体。猪支原体性肺炎是一种慢性呼吸系统疾病, 以高发病率和低死亡率为特征, 在世界各地均可发生。猪肺炎支原体会造成猪发育迟缓, 食物转化不良, 干咳, 对其他生物感染的易感性增加; 其附着于猪肺上皮细胞的纤毛上, 导致纤毛停滞、结块和丢失, 最终导致上皮细胞死亡, 这是猪肺部损伤病变的原因。这种损害妨碍正常的纤毛清除, 并且经常引发继发性感染。猪对猪肺炎支原体的免疫应答缓慢且无效。这种支原体不产生任何特别有害的毒素, 但是可观察到一些毒性很小的代谢副产品。

对猪肺炎支原体的检测, 可采用体外培养法或血清学方法。由于猪肺炎支原体对培养条件非常挑剔, 生长缓慢, 培养法有时需要一个月才能完成。其他支原体, 尤其是猪鼻支原体 (*Mycoplasma Hyorhinis*), 常对猪肺炎支原体的培养造成污染, 因此培养法很少使用。由于猪免疫系统对猪肺炎支原体应答缓慢, 血清学检测方法往往无效, 而且会与猪鼻支原体和絮状支原体 (*Mycoplasma flocculare*) 产生交叉反应。使用 PCR 法检测, 可以克服上述两种方法的缺点, 具有更高的灵敏度和特异性, 且检测时间短, 仅需几个小时即可获得结果。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。

探针法猪肺炎支原体定量 PCR 试剂盒选取粘附蛋白基因作为靶点, 特异性靶向猪肺炎支原体, 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亲缘关系或分布范围较近的 11 种支原体 (包括絮状支原体和猪鼻支原体) 和 10 种细菌, 只有猪肺炎支原体可以产生特异性信号, 其余均无交叉反应发生。对接种猪肺炎支原体的 52 个呼吸道拭子和灌洗液样品进行检测, 得到 51 个阳性。可见本试剂盒适用于猪肺炎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-hpn-20	Mqt-hpn-50	Mqt-hpn-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 μ mol/L ROX	50	125	250
水 (白色管)	无 DNA 酶超纯水	160	400	800

储存: -20°C , 避光保存, 有效期一年。避免反复冻融, 频繁使用可置于 4°C 保存。本产品可在 4°C 保持稳定数周。

试剂盒特点:

- 1, 特异性检测猪肺炎支原体, 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 5 个基因组。

- 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℃2 分钟, 95℃2 分钟, 然后以 95℃15 秒、60℃60 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/BHQ1 标记, 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。最低检测极限约为每反应 5 个基因组。

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。