

## 探针法牛支原体实时定量 PCR 试剂盒

### Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Mycoplasma Bovis*

牛支原体 (*Mycoplasma Bovis*) 是最重要的致病性牛寄生支原体, 呈全球流行趋势, 可引起肺炎、关节炎、乳腺炎、中耳炎、结膜炎、生殖紊乱和流产等多种疾病, 发病率达到 60%-100%, 病死率不高, 但有时会造成很大的经济损失。在健康或患病的牛身上均可发现牛支原体, 其疾病表现和对治疗和疫苗的反应常发生变化, 诊断和控制较为困难, 因此其流行程度常被低估。

牛支原体的检测方法包括: 体外培养法, 血清学方法, 和遗传学方法。牛支原体的体外培养条件较为苛刻, 用时较长, 有时甚至要两周时间, 并且需要特定的方法来进行鉴定, 容易受到其他呼吸道病原体的干扰。血清学方法则必须在感染一段时间之后才能检测, 存在检测时间的延迟, 此外, 实验室菌株和野外分离获得的菌株存在抗原和遗传学上的变异, 对检测形成了干扰。因此, 高灵敏度和高特异性的 PCR 法是更好的选择, 其检测时间短, 仅需几个小时即可获得结果。

由于受到无乳支原体及其他一些近亲支原体的干扰, 基于 16S rRNA 基因的 PCR 方法往往无法准确鉴别牛支原体。基于 DNA 复制修复基因 *uvrC* 的 PCR 方法可以对这些支原体进行特异性区分, 而且该基因十分稳定, 很少发生变异, 因此本试剂盒选择 *uvrC* 基因作为靶点对牛支原体进行 PCR 鉴定, 经 BLAST 验证, 具有非常好的特异性, 与其他生物的基因组无交叉反应。通过检测 10 种近亲支原体和 21 种常见细菌, 以及 19 个健康牛肺组织, 未见假阳性结果, 可见本试剂盒对牛支原体具有特异性。对 372 个牛源样品 (包括肺、奶、关节液和鼻拭子) 进行检测, 获得 321 个阳性, 与培养法检测结果一致。可见本试剂盒适用于牛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-bov-20	Mqt-bov-50	Mqt-bov-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°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, 特异性检测牛支原体, 与其他生物基因组无交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限相当于 240 CFU/ml。

- 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](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 10 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 60 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/MGB 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。

#### 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。