

探针法肺炎支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

肺炎支原体 (*Mycoplasma Pneumoniae*) 属于最小的自我复制型生物之一, 是导致支原体肺炎的人类病原体。其细胞呈细长形状, 长约 1-2 μm , 宽约 0.1-0.2 μm , 光学显微镜下无法检测; 其菌落的长度通常小于 100 μm , 需要立体显微镜来观察。肺炎支原体寄生于人类的呼吸道上皮, 通过附着细胞器粘附于呼吸上皮细胞, 然后与宿主细胞融合并进入细胞内, 逃避宿主免疫系统的检测, 并调节细胞膜的组成以模拟宿主细胞膜。因此肺炎支原体易于产生慢性或潜伏性感染, 而且因其细胞膜组成与人细胞相似, 可能导致几种器官和组织中的自身免疫反应。

肺炎支原体分布遍及全球, 经常在患呼吸道疾病的病人中被发现, 可引起多种症状, 包括: 肺炎、支气管炎、上呼吸道疾病, 有时并不表现出症状, 通常与其他细菌或病毒难以区分。肺炎支原体是肺炎的重要致病因子, 并且与多发性关节炎、中风、传染性神经元炎、冠状动脉疾病等有关。

肺炎支原体体外培养时生长缓慢, 有时需数周的时间, 因此很少使用体外培养法检测。其他可能的检测方法包括: 免疫印迹, 免疫荧光染色, 血细胞吸附试验, 四唑还原, 代谢抑制试验, 血清学试验和聚合酶链式反应 (PCR) 等。由于成本低, 测试时间相对较短, EIA 血清学分析是最常用的肺炎支原体检测方法, 其缺点在于需要使用活组织, 这种取样方式可能会加大感染的严重程度。血清学方法通常特异性和灵敏度都比较低, 且只能做回顾性检测。PCR 是确定肺炎支原体存在的最快速和最有效的方法, 有更高的灵敏度和更强的特异性, 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。

本试剂盒选择细胞黏附素基因作为靶点, 特异性识别肺炎支原体, 经 BLAST 验证, 与其他生物基因组没有交叉反应。本试剂盒检测了分布范围类似的 28 种细菌和 6 种病毒, 未发现非特异信号; 对 49 个组织样品 DNA 进行检测, 发现 38 个阳性, 与常规 PCR 方法检测结果一致。可见本试剂盒适用于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-pne-20	Mqt-pne-50	Mqt-pne-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°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, 特异性检测肺炎支原体, 与其他生物基因组没有交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限低于每反应 10 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 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℃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/TAMRA标记,在每个循环的结合阶段读取荧光值。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。最低检测极限约每反应10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。