

探针法人型支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

人型支原体 (*Mycoplasma Hominis*) 是一种多形性革兰氏阴性菌, 可呈球形、丝状和不规则形状, 最小直径约 80 至 100 纳米, 最大直径约 0.5 至 1 微米, 平均直径约 0.2 至 0.3 微米, 是一种人类常见的条件性支原体, 可发现于人类和灵长类动物。人型支原体可作为共生菌生活在泌尿生殖道, 在呼吸道也可发现其存在。它在宿主中营寄生和腐生生活, 能引起多种感染, 如: 盆腔炎, 流产后发热, 产后发热, 免疫抑制人群的外生殖器感染, 以及新生儿的脑膜炎、肺炎和脓肿等。人型支原体有三种能量产生途径, 包括糖酵解、精氨酸水解和核黄素代谢。

体外培养法是传统的人型支原体检测方法, 但这个方法相对较慢, 需 2-5 天时间, 灵敏度较低, 容易受到其他微生物的污染, 有时需要繁琐的显微观察。这些缺点往往造成严重的时间浪费。而 PCR 法用于检测人型支原体, 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。

本试剂盒选择高度保守的膜蛋白移位酶基因作为靶点, 可以特异性识别人型支原体, 经 BLAST 验证, 与其他生物基因组没有交叉反应。靶点区域经数十个菌株的测序证实不包含突变, 相比之下, 以 gap 基因和 16S rRNA 基因为靶点的 PCR 方法, 由于这两个基因在靶点区域有一些小的突变, 因而导致一些菌株不能识别或灵敏度降低。用本试剂盒检测 13 种支原体和 31 种细菌, 无特异性反应; 检测 153 个泌尿生殖道样品, 获得 108 个阳性, 灵敏度高于培养法。可见本试剂盒适用于人型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-hom-20	Mqt-hom-50	Mqt-hom-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, 特异性检测人型支原体, 与其他生物基因组没有交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限为每反应 7 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℃ 2 分钟, 95℃ 2 分钟, 然后以 95℃ 10 秒、60℃ 60 秒循环 45 次。

5, 探针以 FAM/BHQ1 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。最低检测极限约为每反应 7 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。