

探针法山羊肺炎支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

subsp. *capripneumoniae*

山羊支原体亚种山羊肺炎支原体 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae* , 简称 Mccp) 属于丝状支原体族 (*Mycoplasma mycoides* cluster) , 宿主包括山羊和绵羊。Mccp 可引起传染性山羊胸膜肺炎, 症状包括急性呼吸窘迫、咳嗽、流鼻涕和严重的纤维性胸膜肺炎; 还可以引起山羊乳腺炎, 导致乳腺萎缩, 丧失泌乳能力。

山羊肺炎支原体的体外培养难度较高, 因其培养条件要求较为苛刻, 在液体培养基中生长缓慢, 在固体培养基上也仅能形成非常微小的克隆, 常被其他支原体的生长所掩盖。而血清学检测方法则容易与其他丝状支原体族成员产生交叉反应。相比之下, PCR 法具有速度快、特异性强、灵敏度高的优势。普通 PCR 实验操作较为繁琐, 无法对目标 DNA 进行定量, 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。

探针法山羊肺炎支原体实时定量 PCR 试剂盒选取解旋酶基因作为靶点, 特异性靶向山羊肺炎支原体, 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山羊肺炎支原体 7 个菌株, 全部产生特异性信号, 而分布范围相似的其他 17 种支原体, 包括丝状支原体族其他成员, 以及 3 种常见呼吸道病毒, 均未发现非特异信号。可见本试剂盒适用于山羊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-mcp-20	Mqt -mcp-50	Mqt -mcp-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, 特异性检测山羊肺炎支原体, 与其他生物基因组没有交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限为反应液中 23 个基因拷贝。
- 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°C 2 分钟, 95°C 2 分钟, 然后以 95°C 10 秒、56°C 20 秒、72°C 20 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。最低检测极限为每反应 23 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。