

探针法丝状支原体丝状亚种实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

丝状支原体族 (*Mycoplasma Mycoides* cluster) 是一组具有传染性的支原体, 包括六个成员: Mmc (*Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri.*, 丝状支原体山羊亚种), MmmLC (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony, 丝状支原体丝状亚种大克隆, 现已被重新归类至 Mmc), MmmSC (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony, 丝状支原体丝状亚种小克隆), *Mycoplasma leachii* (旧称: *Mycoplasma* sp. bovine group 7, Mbg7), Mcc (*Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum*, 丝状支原体山羊亚种) 和 Mccp (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*)。由于 MmmLC 已被重新归类至 Mcc, 因此, 丝状支原体丝状亚种 (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, 简称 Mmm) 的成员仅剩 MmmSC。

MmmSC 于 1898 年首次发现, 是牛传染性胸膜肺炎 (CBPP, 一种严重的呼吸道传染病) 的致病菌。CBPP 症状表现为发热、厌食、咳嗽、呼吸困难, 病理检查有血清纤维蛋白化、间质性肺炎和肺部骨坏死等, 是养牛业的主要威胁, 在流行区域可造成很大的经济损失。有时牛感染后并不表现出症状, 此时患牛易成为传染源。受限于缺乏小型动物的疾病模型, MmmSC 致病机制仍不清楚, 其细胞表面的多糖抗原可能是致病因素。

检测丝状支原体时血清学方法常出现交叉反应, 且灵敏度较低, 而体外培养法又较为耗时。PCR 是一种高灵敏度和高特异性的检测方法, 仅需几个小时即可获得结果, 可以有效弥补上述两种方法的不足。定量 PCR 法与普通 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。

本试剂盒通过将几种丝状支原体族成员的基因组进行比较, 选取一个跨膜蛋白基因作为靶点, 特异性识别丝状支原体丝状亚种, 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 27 个 MmmSC 菌株, 以及分属丝状支原体族其他各成员的 33 个菌株, 14 种寄生于牛的其他种类支原体, 仅有 MmmSC 产生特异性信号。可见本试剂盒适用于丝状支原体丝状亚种的检测和鉴定。

试剂盒成分:

组份	成分	货号/规格/体积 (微升)		
		Mqt-msc-20	Mqt-msc-50	Mqt-msc-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, 特异性检测丝状支原体丝状亚种, 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每反应 8 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°C2分钟,95°C2分钟,然后以95°C20秒、57°C45秒、68°C45秒循环45次。
- 5, 探针以FAM/MGB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8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。