

## 探针法生殖支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

生殖支原体 (*Mycoplasma Genitalium*) 是一种性传播的致病菌，专性细胞内寄生，生活在人类尿道和生殖道的纤毛上皮细胞上，在呼吸道、直肠和滑液样本中也可发现其存在。生殖支原体最早于 1981 年从人类的泌尿生殖道中分离出来，于 1983 年被确定为新的支原体物种，完整的基因组序列发表于 1995 年，大小为 0.58 Mb，只有 482 个蛋白编码基因，是最小的可自我复制的原核细胞，也是继流感嗜血杆菌之后第二个完整测序的细菌基因组。它在男性和女性中都会导致尿道炎，发病率高于其他常见的性传播感染，也是艾滋病毒传播的一个公认的危险因素，同性恋男性和之前接受过阿奇霉素抗生素治疗的男性患病率较高。根据一份由文献报道综合的数据，在男性中，生殖支原体存在于 21% 的非淋球菌尿道炎患者，无症状者中有 6% 为携带者；在女性中，生殖支原体与宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎症和输卵管不孕有关，在人群中大约 2-7.3% 为携带者。

生殖支原体对培养基要求极高且生长缓慢，培养较难，尤其是从临床标本中培养更不容易成功，这使得检测临床标本中的病原体 and 随后的分离培养都非常困难。生殖支原体与肺炎支原体 (*Mycoplasma Pneumoniae*) 有共同的抗原，在大多数的血清学实验中形成交叉反应。由于没有特异性的血清学检测方法，核酸扩增实验是检测生殖支原体唯一可行的选择。PCR 法具有灵敏度高和特异性强的优点，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果，被广泛用于生殖支原体的检测。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。

本试剂盒选择一个脱氢酶基因作为靶点，特异性识别生殖支原体，经 BLAST 验证，与其他生物基因组没有交叉反应。使用本试剂盒检测了其他 13 种支原体，未发现非特异信号；对 1600 个宫颈拭子 DNA 进行检测，发现 119 个阳性，与国外某品牌 qPCR 试剂盒检测结果一致，且灵敏度更高。可见本试剂盒适用于生殖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-gen-20	Mqt-gen-50	Mqt-gen-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:  $-20^{\circ}\text{C}$ , 避光保存, 有效期一年。避免反复冻融, 频繁使用可置于  $4^{\circ}\text{C}$  保存。本产品可在  $4^{\circ}\text{C}$  保持稳定数周。

#### 试剂盒特点：

- 1, 特异性检测生殖支原体, 与其他生物基因组没有交叉反应。

- 2, 灵敏度高, 可百分百检出每反应 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 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](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 15 秒、60°C 60 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/BHQ1 标记, 在每个循环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。最低检测极限低于每反应 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。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。