

探针法絮状支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

絮状支原体 (*Mycoplasma Flocculare*) 是猪呼吸道粘膜的共生菌，在肺和鼻腔均可发现，根据抗原组合物和基因组分析判断，和猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 亲缘关系非常近，常对其检测造成干扰。猪肺炎支原体是猪的地方性肺炎的病原体，而絮状支原体一般是非致病性的，可能是粘附在纤毛上皮细胞上，但不破坏细胞，在猪肺炎支原体侵袭机体时有时造成机会感染。这两种支原体有着与大多数支原体不同的特征，即很难培养和在固体培养基上的菌落外观不是典型的“煎蛋”样子。絮状支原体大小和形状不是固定不变的，特别是在生长后期。在生长稳定和趋向下降阶段，可发现细丝状细胞，这种细胞形状在猪肺炎支原体中不存在。

由于絮状支原体不引起疾病，虽然在猪群中分布广泛，但检测方法很少，主要还是体外培养法，耗时较长。使用 PCR 法可以对絮状支原体进行检测，有速度快、特异性强、灵敏度高的优势，仅需几个小时即可获得结果。普通 PCR 实验操作较为繁琐，只能对目标 DNA 进行定性分析，相比之下，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，更少受环境污染的影响。

探针法絮状支原体定量 PCR 试剂盒选取果糖转运蛋白基因作为靶点，经 BLAST 验证，特异性靶向絮状支原体，与其他生物基因组无交叉反应。使用本试剂盒检测了亲缘关系或分布范围较近的 24 种支原体（包括猪肺炎支原体）和 10 种细菌，只有絮状支原体可以产生特异性信号，其余均无交叉反应发生。对 141 个样品进行检测，得到 25 个阳性，与普通 PCR 法检测结果完全一致。本试剂盒适用于絮状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-flo-20	Mqt-flo-50	Mqt-flo-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 μmol/L ROX	50	125	250
水（白色管）	无 DNA 酶超纯水	160	400	800

储存：-20℃，避光保存，有效期一年。避免反复冻融，频繁使用可置于 4℃ 保存。本产品可在 4℃ 保持稳定数周。

试剂盒特点：

- 1, 特异性检测絮状支原体，与其他生物基因组无交叉反应。
- 2, 灵敏度高，最低检测极限为反应液中 80 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°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, 探针采用 FAM/BHQ1 标记, 在每个循环的结合阶段采集荧光信号。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 80 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。