

## 探针法结膜支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

结膜支原体 (*Mycoplasma Conjunctivae*) 是绵羊、山羊、羚羊等反刍动物的传染性角膜结膜炎 (IKC) 的主要病原体, 在全球广泛分布于家养的反刍类动物中。IKC 是一种常见的传染性眼病, 称为小反刍动物的红眼病, 可在家养和野生动物之间传播, 其特点是结膜和角膜的炎症。在晚期阶段, 角膜变得不透明甚至穿孔, 致盲的野生动物可能从悬崖坠落或死于饥饿。一项研究表明, 成年绵羊中结膜支原体抗体的阳性率为 53%。支原体性 IKC 可以在不同物种之间传播, 传播途径可能是物理接触或苍蝇等媒介昆虫。目前在大多数国家尚不清楚结膜支原体的流行程度, 这可能是由于缺乏检测结膜支原体的技术。

结膜支原体感染的经典诊断方法是体外培养和后续对支原体菌落的免疫学鉴定。但是这个方法非常繁琐, 需要较长的时间, 且需要专业化的技术。而使用 PCR 法检测则具有高灵敏度和高特异性的特点, 且检测时间短, 仅需几个小时即可获得结果。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。

本试剂盒选取了结膜支原体基因组内的一个膜蛋白基因进行 PCR 鉴定, 引物特异性靶向结膜支原体, 经 BLAST 验证, 与其他生物的基因组无交叉反应。检测亲缘关系较近的支原体和寄生于羊的其他常见微生物, 未见特异性扩增信号。对来自 182 只山羊、绵羊或羚羊的拭子样本进行检测, 获得 159 个阳性, 检测灵敏度明显优于平行检测的巢式 PCR 法 (131 个阳性)。可见本试剂盒适用于结膜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-con-20	Mqt-con-50	Mqt-con-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 $\mu\text{mol/L}$ 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, 特异性检测结膜支原体, 与其他生物无交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限为反应液中 5 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 (组分 C), 可用于检验试剂盒有效性, 以及帮助排除假阴性。
- 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。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))。注意避免剧烈操作, 防止气溶胶污染。

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 10 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 60 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/TAMRA 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。最低可检测出每反应约 5 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。