

探针法火鸡支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

火鸡支原体 (*Mycoplasma Meleagridis*) 是火鸡特异性的病原体, 可经蛋传递或由蜱虫传播, 分布于全球, 在集中饲养环境中容易出现感染, 通常影响 16 周龄以下的幼禽。在自然感染淘汰的幼禽中, 与火鸡支原体有关的气囊炎的发生率很高 (约 20-65%)。火鸡支原体可以从上呼吸道、气囊、阴茎、精液、泄殖腔和鼻窦分离出来, 引起的病变主要是后代火鸡的气囊炎, 其它还包括鼻窦炎、低孵化率、骨骼畸形、歪脖病和生长发育迟缓等。

火鸡支原体可以在含有精氨酸的支原体琼脂和肉汤培养基上培养, 菌落可能需要 7 天才能出现, 并最终形成一个典型的煎蛋外观。也可以使用包括生长抑制、代谢抑制和免疫荧光在内的血清学测试方法来鉴定火鸡支原体, 其中免疫荧光即使在混合培养物中也是有效的。由于火鸡支原体的菌株之间抗原变异较大, 因此血清学方法常常遇到困难。PCR 法具有检测时间短、灵敏度高和特异性强的特点, 成为目前使用较多的鸟类支原体检测方法, 只需数个小时即可获得结果, 无需漫长的培养过程。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。

探针法火鸡支原体定量 PCR 试剂盒选取 16-23S rRNA 基因区间序列作为靶点, 特异性靶向火鸡支原体, 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 17 种鸟类支原体, 均无交叉反应发生。检测十个不同的火鸡支原体菌株, 均为阳性。可见本试剂盒适用于火鸡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-mel-20 | Mqt-mel-50 | Mqt-mel-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°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, 特异性检测火鸡支原体, 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 10 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、60°C 30 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/BHQ1 标记, 在每个循环的结合阶段收集荧光信号。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 10 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。