

探针法牛生殖支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

牛生殖支原体(*Mycoplasma bovis*), 也有称为牛生殖道支原体, 最早发现于1960年, 被认为与牛生殖系统疾病有关, 可引起牛乳腺炎、生殖道炎、子宫内膜炎、难产、附睾炎和不育症等, 可从牛生殖道分离出来, 从患肺炎、结膜炎和关节炎的病牛中也可分离出牛生殖支原体。通过直接接种, 或者身体其他部位的接触, 如呼吸道和泌尿生殖道粘膜、受感染的关节, 牛生殖支原体可经由人工方式引发乳腺炎。

微生物培养法和免疫学技术通常用于支原体的检测和鉴定。培养法用时较长, 一般需要7-10天时间, 培养条件较为苛刻, 操作较为繁琐, 并且需要特定的方法来进行鉴定, 由于支原体生长缓慢, 所以容易受到其他细菌的干扰。免疫学方法在某些情况下不够灵敏。牛生殖支原体与牛支原体(*Mycoplasma bovis*)在生化特征和培养方法上高度类似。虽然它们可以通过一些血清学技术加以区分, 但也存在交叉反应。高灵敏度和高特异性的PCR法可以有效克服这些缺点, 其检测时间短, 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。

本试剂盒选择16S-23S rRNA基因间隔区序列作为靶点, 特异性识别牛生殖支原体, 经BLAST验证, 与其他生物基因组不产生交叉反应。检测分布范围相似的16种支原体和20种常见细菌, 未见非特异性信号。对281个牛源样本进行检测, 获得5个阳性样本, 与16S rRNA基因测序结果完全一致, 可见本试剂盒具有非常好的特异性, 适用于牛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-bge-20	Mqt-bge-50	Mqt-bge-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, 特异性检测牛生殖支原体, 与其他生物基因组没有交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限相当于反应液中约含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)。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 5 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 60 秒循环 45 次。
- 5, 探针以 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。检测极限相当于每反应约 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。