

探针法无乳支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

无乳支原体 (*Mycoplasma Agalactiae*) 是支原体属的一种细菌，是继丝状支原体之后第二个被人类所知的支原体，在 1925 年首次被分离出来，在全球广泛分布，是造成 90% 山羊和接近 100% 绵羊传染性无乳症综合症爆发的病原体，雌雄均可感染，除了无乳症之外，还可以引发乳腺炎、关节炎和角膜结膜炎。无乳支原体没有细胞壁，因此不受许多常见的抗生素如青霉素或靶向细胞壁合成的其他 β -内酰胺类抗生素的影响。无乳支原体生物化学特征如下：缺乏葡萄糖和甘露糖代谢以及对精氨酸和明胶的水解能力，有磷酸酶活性，在厌氧和有氧条件下可还原四唑，有血球吸附能力。

对无乳支原体的检测，可以通过体外培养法、血清学方法（如免疫荧光法和免疫印迹法）或遗传学方法（如 PCR 扩增或寡核苷酸互补配对）进行检测。体外培养法耗时较长，且生长状态较难掌握。牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) 和无乳支原体在表型和遗传基因上都有很高的相似性，且拥有非常多的共同抗原和表位，因此血清学方法区别二者较为困难；二者在一些代谢通路上也很相似，因此也限制了生化诊断方法的应用。血清学方法也易受到疫苗的干扰。针对特异性序列的 PCR 法，检测时间短，不易受干扰，在灵敏度和特异性上有明显的优势，因此得到了广泛应用。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 DNA 聚合酶基因进行 PCR 鉴定，特异性靶向无乳支原体，经 BLAST 验证，与其他生物的基因组不产生特异性信号。使用本试剂盒进行的特异性检测包括：34 个无乳支原体菌株、24 种其他支原体（包括牛支原体和丝状支原体族）、寄生于小型反刍类动物的病原体（包括病毒（13 种）、细菌（27 种）和 6 种真核类寄生生物）、以及健康反刍类动物组织，未发现假阴性或假阳性结果。可见本试剂盒适用于无乳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-aga-20	Mqt-aga-50	Mqt-aga-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 μ mol/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, 特异性检测无乳支原体，与其他生物基因组无特异性反应。
- 2, 灵敏度高，检测极限为每反应 6 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 10 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 60 秒循环 45 次。
- 5, 探针以 FAM/MGB 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。

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。