

双重探针法人类脲原体实时定量 PCR 试剂盒

Duplex Probe Real-time PCR Kit for *Ureaplasma parvum* & *Ureaplasma urealyticum*

脲原体 (*Ureaplasma*) 是一类具有尿素分解能力的支原体, 呈球状或球杆状, 革兰氏阳性, 克隆呈煎蛋状, 细胞直径在 0.1 到 1.0 μm 之间, 于 1954 年首次从人类泌尿生殖道分离出来, 1974 年首先被命名为解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*), 人类中已知有 14 种血清型。经过多年的争论, 在 2002 年, 根据基因组大小、16S rRNA 基因序列、16S-23S rRNA 基因间隔区序列、酶的多态性、DNA-DNA 杂交、对锰的分化反应、多带抗原基因等, 将其区分为两种生物: 解脲脲原体和微小脲原体 (*Ureaplasma parvum*)。区分后的解脲脲原体包含的血清型有十种: 2、4、5、7、8、9、10、11、12 和 13, 微小脲原体包含的血清型有四种: 1、3、6 和 14。不同血清型对人体疾病的影响目前尚没有一致结论。这两种脲原体是健康人常见的泌尿生殖道共生菌, 可以单独或共同存在, 有时也会与一些疾病相关联, 如: 尿道炎、产后子宫内膜炎、绒毛膜羊膜炎、自然流产、早产、低出生体重、肺炎、菌血症、脑脊膜炎和早产儿慢性肺病等。目前尚不清楚这些脲原体会在什么情况下引起疾病, 体液免疫系统健全的人一般不会受其影响。

脲原体的体外培养非常困难, 耗时较长, 灵敏度较低。对脲原体的分型是依靠针对全细胞或纯化抗原的单克隆或多克隆抗体, 实验方法包括: 生长抑制实验、代谢抑制实验、免疫荧光、免疫过氧化物酶、ELISA、免疫印迹等, 这些方法都比较耗时费力, 结果常常难以重复, 有很多交叉反应, 在含有多个血清型的样本上常难以区分。而 PCR 法用于检测脲原体, 则有更高的灵敏度和更好的特异性, 不受其他微生物污染的影响, 且检测时间短, 仅需几个小时即可获得结果。定量 PCR 法与常规 PCR 法相比, 不仅可以精确定量, 而且操作更为方便, 更少受环境污染的影响。

本试剂盒选择脲原体特征性的尿素酶基因作为靶点, 将脲原体 14 种血清型的序列进行比对, 设计引物和探针, 特异性识别并区分解脲脲原体和微小脲原体。使用本试剂盒可以准确区分脲原体 14 种血清型的生物分类, 经 BLAST 验证, 与其他生物基因组没有交叉反应。对 42 个分离培养样本进行检测, 得到 37 个微小脲原体阳性, 4 个解脲脲原体阳性, 以及一个双重阳性, 与测序结果完全一致。对 31 个临床拭子样本进行检测, 获得 11 个微小脲原体阳性, 6 个解脲脲原体阳性, 与常规 PCR 法检测结果一致, 阳性率高于体外培养法, 显示本试剂盒灵敏度高于体外培养法。

本试剂盒包含热启动 DNA 聚合酶、dNTP (以 dUTP 代替 dTTP)、引物、两个探针 (分别标记 FAM 和 HEX)、阳性对照品, 和用以防止残余 DNA 污染的 UDG (Uracil-DNA Glycosylase, 尿嘧啶-DNA-糖基酶), 用户只需准备好 DNA 样品即可使用。本试剂盒采用的 DNA 聚合酶源自极端嗜热菌 (*Thermus thermophilus*), 经改造后较普通的 Taq 酶具有更强的抗抑制能力和热稳定性。

试剂盒成分:

组份	成份	体积 (微升)		
		Mqt-upr-20	Mqt-upr-50	Mqt-upr-100
组份 A (蓝色管)	热启动 Taq 酶, dNTPs, UDG 酶	200	500	1000
组份 B (棕色管)	引物, 探针	40	100	200
组份 C (黄色管)	阳性对照样品	40	100	200
水 (白色管)	无核酸酶纯水	160	400	800

储存: -20 度, 避光保存, 有效期一年。避免反复冻融。

试剂盒特点:

- 1, 特异性检测并区分微小脲原体和解脲脲原体, 可识别人类脲原体的全部十四种血清型, 与其他生物基因组没有交叉反应。
- 2, 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。
- 3, 带有阳性对照样品 (组分 C), 可用于检验试剂盒有效性。
- 4, 带有 dUTP 和 UDG 酶, 可降低残留 DNA 的污染。

操作步骤:

- 1, 用 DNA 提取试剂盒抽提菌落、拭子或组织的 DNA, 检测浓度和纯度, 用于 PCR 实验。
- 2, 将本试剂盒各组分置于室温溶解, 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, 将除 DNA 样本及组份 C 之外的所有成分混合好之后, 分装到 PCR 管中, 最后向 PCR 管中加入 DNA 样本或组份 C, 注意防止气溶胶污染。

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	-
水	8	6	3
测试样品	-	-	5
总体积	20	20	20

- 4, 反应条件: 50 度 2 分钟, 95 度 2 分钟, 然后以 95 度 15 秒、60 度 30 秒循环 40 次。
- 5, 两条探针, 第一条 5'-端以 FAM 修饰, 用于检测微小脲原体, 第二条 5'-端以 HEX 修饰, 用于检测解脲脲原体, 3'-端都以 TAMRA 修饰。Ct 值小于 35 为阳性。

注意事项:

- 1, 本产品仅限于科研使用, 不作诊断用途。
- 2, 配制反应体系时, 尽量使用大体积移液。可将组分预混后分装到反应管中。体积越大, 移液误差越小。
- 3, 操作过程中应注意防范样品之间的串联污染。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。最好在通风区域操作, 操作时须佩戴无粉尘手套。使用无污染的一次性枪头, 最好是带滤芯的枪头。

相关产品:

解脲脲原体 PCR 检测试剂盒, 货号: M-uure-20, M-uure-50, M-uure-100。

微小脲原体 PCR 检测试剂盒, 货号: M-upar-20, M-upar-50, M-upar-100。

人类脲原体 PCR 检测试剂盒, 货号: M-upuu-20, M-upuu-50, M-upuu-100。