

## 探针法鸡毒支原体实时定量 PCR 试剂盒

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

鸡毒支原体 (*Mycoplasma Gallisepticum*)，又称为鸡败血支原体、鸡毒霉形体、鸡败血霉形体，是一种重要的家禽致病性支原体，常造成重大经济损失，有时能导致整群家禽被淘汰。它是慢性呼吸系统疾病的病原体，可导致上呼吸道感染，表现出啰音、咳嗽、流鼻涕、结膜炎、鼻窦炎、产蛋量减少、胚胎死亡率上升等不同的症状，严重时可引起气囊炎，还有报道其能使肉鸡体重增加缓慢和肉品下降，以及经蛋引起感染性不育。尽管鸡毒支原体感染可能没有临床症状，但它们可以使禽类更容易继发感染大肠杆菌等细菌，以及新城疫、传染性支气管炎和传染性喉气管炎等疾病。鸡毒支原体可以通过气溶胶、食物、水和环境中的各种物品进行传播，很多时候无法查明传播源头。鸡毒支原体也是火鸡、鸭、鹅、野鸟、鸽子和孔雀等鸟类各年龄段的传染性鼻窦炎的病原体。

鸡毒支原体可进行体外培养，但生长缓慢，对营养要求比较高，常需要一到数个星期才能完成生长和血清学鉴定工作。由于时间较长，其生长有时会被其它生长较快的上呼吸道腐生支原体所掩盖。血清学方法常用于鸡毒支原体的检测，但其有个重要的缺点就是检测滞后于感染，在感染后至少一周才能进行平板快速凝集实验，而红血球凝聚抑制实验则必须在感染后三周以内进行；另一个缺点是血清学方法特异性不足，常与其他支原体发生交叉反应，对不同菌株也可能有灵敏度差异。PCR 法具有检测时间短、灵敏度高、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。

探针法鸡毒支原体定量 PCR 试剂盒选取细胞粘附素蛋白基因作为靶点，特异性靶向鸡毒支原体，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。检测十个不同的鸡毒支原体菌株，均为阳性。可见本试剂盒适用于鸡毒支原体的检测和鉴定。

#### 试剂盒组分：

组分	成分	体积 (微升)		
		Mqt-gal-20	Mqt-gal-50	Mqt-gal-100
		20 次反应	50 次反应	100 次反应
组分 A (蓝色管)	热启动 Taq 酶, dNTPs, UDG 酶	200	500	1000
组分 B (棕色管)	上下游引物, 探针	40	100	200
组分 C (黄色管)	阳性对照样品	40	100	200
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。

**试剂盒特点:**

- 1, 特异性检测鸡毒支原体, 与其他生物基因组无交叉反应。
- 2, 灵敏度极高, 最低检测极限为反应液中 1 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 dUTP 和 UDG 酶, 可降低残留 DNA 的污染。

**操作步骤:**

- 1, 准备待测样品。试剂盒采用的 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; 如出现 PCR 抑制现象, 可用 DNA 提取试剂盒抽提样本 DNA。
- 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于管底, 不可涡旋振荡。
- 3, 参考下表配制反应体系, 于薄壁 PCR 管中进行反应, 反应体积 20 微升。将组份 A 和 B 混合好之后, 分装到 PCR 管中, 然后加入水, 最后加入待测样本或组份 C。注意避免剧烈操作, 防止气溶胶污染。如需排除假阴性, 可将组份 C 与待测样品在同一管中共同反应, 出现信号说明没有 PCR 抑制物, 没有信号则说明有 PCR 抑制物。

体积 (微升)	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管
组分 A	10	10	10
组分 B	2	2	2
组分 C	-	2	-
水	8	6	6
测试样品	-	-	2
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。在每个循环的结合阶段收集荧光信号。
- 5, 探针以 FAM/BHQ1。最低检测极限为每反应 1 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。