

# 支原体快速实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

## 【用途】

用于犬、猫等动物结膜、鼻、咽口等拭子中支原体 (*Mycoplasma*) 的核酸检测, 此方法可以检测犬、猫、肺炎支原体等, 为通用型方法。

## 【检测原理】

利用离心柱内玻璃纤维滤膜提取样品病原 RNA 和 DNA, 以 DNA 为模板, 引物为起点, 合成与 DNA 模板互补的链, 在热启动 Taq 酶的作用下, 经高温变性、中温退火及延伸的循环 37 次后, 使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。经荧光素标记的探针与扩增的 DNA 杂交, 利用 Taq 聚合酶的 5'→3'外切活性, 使荧光探针的报告基团与淬灭基团分离, 发出特异性荧光信号, 利用荧光 PCR 仪检测特异性荧光信号, 根据样品 Ct 值的大小及扩增曲线的形成情况判定结果。

## 【试剂盒组成】

名称	成分	数量	贮藏条件
单份核酸提取试剂耗材 (10 套)	一次性棉拭子	1 支	室温
	无菌生理盐水	1 支	
	RD 吸附柱和收集管	1 套	
	RD 消化液	1 支	
	1.5 mL 离心管	1 支	
核酸提取液	RD 结合液	3.6mL	室温
	RD 洗涤液	12 mL	
	RD 洗脱液	1mL	
-20 °C 试剂	反应管	10 支	-20 °C
	RD 蛋白酶 K	1 支	

## 【需要自备的物品】

1. 仪器: 水浴锅、涡旋震荡器、离心机、荧光 PCR 扩增仪、-20 °C 冰箱、可调移液器。
2. 耗材: 板架、吸头。

## 【操作步骤】

### 1. 样品采集与制备

1.1 将拭子用无菌生理盐水沾湿, 在结膜囊内或鼻粘膜处或咽部翻转涂擦, 采集样本, 再将拭子插入无菌生理盐水 (多余部分掰断, 盖好盖子), 涡旋震荡混匀, 取上清液 200 $\mu$ L 于 RD 消化液管中, 再加入 20 $\mu$ L RD 蛋白酶 K (-20 $^{\circ}$ C), 混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴 9min, 每 3min 涡旋震荡一次。

### 2. 病毒核酸 (RNA 和 DNA) 的提取

2.1 向消化过的液体中加入 300 $\mu$ L RD 结合液, 颠倒混匀, 将管中液体吸入吸附柱中 (吸附柱要套上收集管, 吸入液体时尽量不要吸进悬浮杂质, 以免离心时堵塞吸附柱), 10000 rpm 离心 30 s。

2.2 弃去收集管中液体, 吸取 RD 洗涤液 500  $\mu$ L 加入吸附柱, 10000 rpm 离心 30 s。

2.3 弃去收集管中液体吸取 RD 洗涤液 500  $\mu$ L 加入吸附柱, 10000 rpm 离心 2min (拿出时请注意避免吸附柱碰

到下面的液体)。

2.4 将吸附柱移入 1.5 mL 离心管中, 吸取 RD 洗脱液, 向吸附柱中央加入 50 $\mu$ L, 10000 rpm 离心 30 s, 离心管中液体即为模板 (RNA 和 DNA)。

### 3. 操作方法

取反应管置室温融化, 用移液器吸取模板 2 $\mu$ L 加入反应管中, 使用离心机离心 30s, 放入机器中, 使用程序 CHL 进行扩增检测。

## 【结果判定】

根据分析, Ct 值  $\leq 36$  并出现特异性扩增曲线为 MYCO 阳性, 余下情况为阴性; 对于某些未呈现特异性扩增曲线但本底较高的样品, 应为阴性。

## 【注意事项】

1. 本品仅供体外诊断用。
2. 为确保检测结果准确, 请严格按照说明书操作。
3. 试剂盒中提取耗材和反应管只能使用一次, 请勿重复使用。
4. 若无涡旋震荡器, 可用手使劲弹底部, 使液体充分混匀。
5. 所有用于检测的废弃物品均应放入含消毒液的废物缸内, 浸泡消毒; 实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精消毒工作台。
6. 蛋白酶 K 用之前, 10000 rpm 离心 30 s, 使液体全部沉于管底, 放于冰盒中, 吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取, 使用后应立即放回 -20  $^{\circ}$ C。
7. 实验过程中, 尽量避免手和手套接触吸附柱管口和离心管口, 进行步骤 2.1 时, 若离心管开盖时粘在手上或溅出, 应立即更换手套; 所有接触病料的物品均应合理处理。
8. 进行步骤 2.3 时, 为避免取出吸附柱时碰到下面液体, 建议加入洗涤液后先 10000rpm 离心 30s, 倒掉废液后再套上收集管 10000rpm 空管离心 2min。
9. 反应管用前, 于室温融化, 打开时请左右摇动掰至 45 $^{\circ}$ , 再用劲打开, 避免用力过大将其掰断。
10. 反应管加入模板后, 一定要离心, 使液体全部置于管底。
11. 反应管使用完后, 从机器用取样器取出时, 插入最后一道棱, 不要将反应管打开, 避免污染。

## 【规格】10 头份/盒

【保存及有效期】本品反应管于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存, 有效期为 12 个月。其它物品于室温保存。

## 【生产企业】北京世纪元亨动物防疫技术有限公司

地址: 北京海淀区北清路 68 号院中区 13 号楼