

猪支原体 PCR 检测试剂盒

货号：PC3120

规格：20T/50T

保存：-20℃保存，避免反复冻融，没有反复冻融的情况下，保质期一年。

产品组成：

组分	成分	20T	50T
组分 A (蓝色管)	Taq 酶, dNTPs, 染料	250 μL	625 μL
组分 B (绿色管)	上下游引物, 探针	50 μL	125 μL
组分 C (黄色管)	阳性对照样品	50 μL	125 μL
水 (白色管)	无核酸酶超纯水	200 μL	500 μL

产品介绍：

嗜血支原体 (Hemotropic Mycoplasma, 或hemoplasma) 是一类寄生于红细胞表面的细菌, 无细胞壁, 曾被命名为血巴通氏体 (Hemobartonella) 和附红细胞体 (Eperythrozoon), 根据 16S rRNA 基因序列分析, 被重新归类为支原体。在猪体内已发现的嗜血支原体有三种: 猪支原体 (Mycoplasma suis)、小支原体 (Mycoplasma parvum) 和 Candidatus Mycoplasma haemosuis。

猪支原体旧称 Eperythrozoon suis, 最早报道于 1932 年, 呈杆状, 具多形性, 是猪附红细胞体病的病原体。猪感染后症状表现多样, 急性发作时, 母猪表现出贫血、黄疸和厌食等症状 1-3 天, 同时可能伴随发烧和产奶量下降, 以及母性行为异常; 仔猪则表现为严重贫血和发烧。急性发作后进入慢性感染阶段, 此时表现为生长缓慢、易患病、繁殖能力下降。有实验表明, 猪支原体和母猪的生殖问题直接相关。

猪支原体尚无合适的体外培养方法, 检测方法一般采用吉姆萨染色的血涂片法。血涂片法的检测灵敏度和特异性均比较差, 容易受到制片方法和血液里其他成分的干扰。在急性发作期, 此时菌体尚不明显, 需病程进一步发展才能检测。血清学方法由于难以获得足够的抗原, 所以很少得到应用。而使用 PCR 法检测则更为方便, 且灵敏度更高, 检测时间短, 仅需几个小时即可获得结果。

本试剂盒针对 16S rRNA 基因进行 PCR 鉴定, 引物经 BLAST 验证为特异性靶向猪支原体, 与犬的 Candidatus Mycoplasma haematoparvum 有交叉反应, 与另一些动物的嗜血支原体有弱交叉反应, 但是和小支原体无交叉反应。由于嗜血支原体具有严格的宿主特异性, 在进行血液取样时严格操作即可避免这些交叉反应的干扰。使用 6 只猪的血液 DNA 样本检测表明, 本试剂盒不会受到小支原体和其他微生物的干扰。

本试剂盒可用于猪支原体的鉴定和检测, 使用时需注意不要污染其他动物的血制品。

操作步骤：

1. 样品准备

准备 200 微升 EDTA 处理过的猪血液, 使用 DNA 抽提试剂盒提取样品 DNA, 用于 PCR 反应。

2. PCR 反应的准备

待试剂盒各组份融化后先瞬时离心, 然后轻弹混匀, 不可涡旋振荡。按下表所示, 在 PCR 管中配制反应体系, 每次实验需加一个阴性和一个阳性对照, 测试反应管可以有多个。配制过程中应注意避免剧烈操作, 以免产生气溶胶造成样品间的交叉污染, 推荐在有风压的设备





如超净台或生物安全柜中进行操作。配制完毕后瞬时离心以使液体沉至管底。

体积（微升）	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管*
组份 A	12.5	12.5	12.5
组份 B	2.5	2.5	2.5
组份 C	-	2.5	2.5 / - *
水	10	7.5	5.5 / 8 *
测试样品	-	-	2
总体积	25	25	25

*测试反应管中加入组份C可以判别测试样品中是否含PCR抑制物。把组分C加入测试反应管与样品共同反应，有条带（684bp和/或484bp）出现则说明无PCR抑制物，无条带出现则说明有PCR抑制物，此时应注意假阴性的可能性。

3. PCR反应

在95°C预热5分钟；95°C变性20秒，50°C退火30秒，72°C延伸40秒，循环30次；循环结束后，在72°C延伸5分钟，最后保持在4°C。

4. 琼脂糖凝胶电泳

按常规方法准备好2%琼脂糖凝胶，加入EB或Gold-View等用于显色。每份反应液取8微升，无须加入上样缓冲液，直接加入凝胶加样孔中，另留一孔加入DNA marker（最好在500-600bp区间有显示条带），120伏电泳约30分钟。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在684bp处有一条带，阴性对照无条带，猪支原体条带在484bp处。

注意事项：

- 1、组份A中含有染料，染料的加入不影响PCR反应，反应产物可直接电泳，节省时间。
- 2、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。
- 3、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。
- 4、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。
- 5、本产品仅限于科研使用，不作诊断用途。

