

猪肺炎支原体 PCR 检测试剂盒

货号：PC3470

规格：20T/50T

保存：-20℃保存，有效期 1 年，避免反复冻融。

产品组成：

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

产品介绍：

猪肺炎支原体（*Mycoplasma Hyopneumoniae*）是地方性猪肺炎（也称猪支原体性肺炎、猪气喘病）的主要病原体。猪肺炎是一种慢性呼吸系统疾病，以高发病率和低死亡率为特征，在世界各地均可发生。猪肺炎支原体会造成猪发育迟缓，食物转化不良，对其他生物感染的易感性增加。猪肺炎支原体附着于猪肺上皮细胞的纤毛上，导致纤毛停滞、结块和丢失，最终导致上皮细胞死亡，这是猪肺部损伤病变的原因。这种损害妨碍正常的纤毛清除，并且经常引发继发性感染。猪对猪肺炎支原体的免疫应答缓慢且无效。这种支原体不产生任何特别有害的毒素，但是可观察到一些毒性很小的代谢副产品。

对猪肺炎支原体的检测，常采用体外培养法和血清学检测方法。由于猪肺炎支原体对培养条件非常挑剔，生长缓慢，培养法有时需要一个月才能完成。其他支原体，尤其是猪鼻支原体（*Mycoplasma Hyorhinis*），常对猪肺炎支原体的培养造成污染，因此培养法很少使用。由于猪免疫系统对猪肺炎支原体应答缓慢，血清学检测方法往往无效，而且会与猪鼻支原体和絮状支原体（*Mycoplasma flocculare*）产生交叉反应。而使用 PCR 法检测，具有更高的灵敏度和特异性，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果。

猪肺炎支原体 PCR 检测试剂盒选取了一个有乳酸脱氢酶活性的胞质蛋白基因序列进行 PCR 鉴定，该基因高度保守，且具有物种特异性。引物经 BLAST 验证为特异性靶向猪肺炎支原体，与其他生物的基因组无交叉反应。使用本试剂盒检测了 16 种猪呼吸道常见的支原体和革兰氏阴性、阳性细菌，仅有猪肺炎支原体产生特异性扩增条带，其他均无交叉反应。可见本试剂盒具有物种特异性，可用于猪肺炎支原体的鉴定和检测。

操作步骤：（仅供参考）

1、样品准备

对于采集的拭子样品或其他组织样品，推荐使用 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。按下表所示，在已灭菌的 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





中应注意无菌，戴口罩，并注意避免操作产生的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 (μL)	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 (541bp 和/或 369bp) 出现则说明没有 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 94°C 预热 5 分钟；94°C 变性 60 秒，55°C 退火 40 秒，72°C 延伸 60 秒，循环 40 次；循环结束后，在 72°C 延伸 7 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 350-550bp 区间有显示条带)，120 V 电泳约 25 分钟。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在 541bp 处有一条带，阴性对照无条带，猪肺炎支原体条带在 369bp 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. 某些 PCR 抑制物通过抽提基因组 DNA 不能去除，此时可以通过加入高浓度 (如 2%) 的 BSA (牛血清白蛋白) 中和其抑制活性。
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，对照样品和检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。
4. 本产品仅限于科研使用，不作诊断用途。

