

猪肺炎支原体 PCR 检测试剂盒

PCR Detection Kit for *Mycoplasma Hyopneumoniae*

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。猪肺炎支原体通过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，形成猪肺部的损伤病变，这种损害妨碍正常的纤毛清除，并且经常引发继发性感染，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。猪对猪肺炎支原体的免疫应答缓慢，常常来不及发挥作用。猪肺炎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。

货号：M-hypn-20

规格：20 个反应

货号：M-hypn-50

规格：50 个反应

货号：M-hypn-100

规格：100 个反应

试剂盒组份：

组份	成份	体积（微升）		
		M-hypn-20	M-hypn-50	M-hypn-100
组份 A（蓝色管）	Taq 酶，dNTPs，染料	250	625	1250
组份 B（绿色管）	上下游引物	50	125	250
组份 C（黄色管）	阳性对照样品	50	125	250
水（白色管）	无菌超纯水	200	500	1000

保存条件：保存于-20℃，避免反复冻融。没有反复冻融的情况下，保质期一年。

操作方法:**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（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（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℃ 预热 5 分钟； 94℃ 变性 60 秒，55℃ 退火 40 秒，72℃ 延伸 60 秒，循环 40 次；循环结束后，在 72℃ 延伸 7 分钟，最后保持在 4℃。

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 伏电泳约 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、本试剂盒仅供科研使用。