**牛支原体****PCR检测试剂盒**

**PCR Detection Kit for** ***Mycoplasma Bovis***

支原体是一类缺乏细胞壁的原核生物，大小一般在0.3～0.5um之间，呈高度多形性，有球形、杆形、丝状，分枝状等多种态。它不同于细菌，也不同于病毒，种类繁多，分布广泛，造成的危害相当大，涉及人、动物、植物及昆虫等多个领域。牛支原体（*Mycoplasma Bovis*）是最重要的致病性牛寄生支原体，呈全球流行趋势，可引起牛肺炎、关节炎、乳腺炎、生殖紊乱和流产等多种疾病，发病率达到60%-100%，但病死率不高。牛支原体并不总是引起牛的疾病，在健康或患病的牛身上均可发现其存在。由于牛支原体的疾病表现和对治疗和疫苗的反应常发生变化，对它的诊断和控制较为困难。

对牛支原体的检测，可以通过血清学方法（如免疫荧光法和免疫印迹法），或遗传学方法（如基于RRS基因的PCR法或寡核苷酸互补配对）， 进行检测。后来的研究发现牛支原体的实验室菌株和野外分离获得的菌株存在抗原和遗传学上的变异，对上述检测方法形成了干扰，因此PCR法是更好的选择。

基于稳定的管家基因的PCR可以排除上述变异的干扰。因此，牛支原体PCR检测试剂盒选取了一个种内变异很小的与DNA修复有关的基因进行PCR鉴定，引物经BLAST验证为特异性靶向牛支原体，与其他生物的基因组不产生交叉反应。使用本试剂盒检测了22种不同的牛或羊寄生性支原体，仅有牛支原体产生特异性扩增条带。而对13个实验室或野外分离的牛支原体菌株，本试剂盒均可产生特异性扩增条带。可见本试剂盒具有物种特异性，可用于牛支原体的鉴定和检测。

**货号：M-bovi-20 规格：20个反应**

**货号：M-bovi-50 规格：50个反应**

**货号：M-bovi-100 规格：100个反应**

**试剂盒组份：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 　组份 | 成份 | 体积（微升） |
| M-bovi-20 | M-bovi-50 | M-bovi-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。如怀疑有PCR抑制物存在，可以把组分C加入测试反应管与样品共同反应。有条带（1849bp和/或1626bp）出现则说明没有PCR抑制物，条带不出现则有PCR抑制物。*

**3、PCR反应**

在94℃预热5分钟； 94℃变性30秒，52℃退火30秒，72℃延伸110秒，循环35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0.7%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1626-1849bp区间有显示条带），110伏电泳约2小时。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在1849bp处有一条带，阴性对照无条带，牛支原体条带在1626bp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、如何判断有无PCR抑制物：在测试反应管中同时加入测试样品和阳性对照样品，观察是否出现扩增条带（1849和/或1626 bp）。如果测试反应管的对照条带和检测条带都没有出现，则可判断为PCR反应受到了抑制，存在PCR抑制物，可能出现假阴性结果。

4、本试剂盒仅供科研使用。