**絮状支原体****PCR检测试剂盒**

**PCR Detection Kit for** ***Mycoplasma Flocculare***

絮状支原体（*Mycoplasma Flocculare*）和猪肺炎支原体（*Mycoplasma hyopneumoniae*）都是存在于猪呼吸道的传染性细菌，根据抗原组合物和基因组分析判断，这两种支原体亲缘关系较近。猪肺炎支原体是猪的地方性肺炎的病原体，而絮状支原体一般是非致病性的，可能在猪肺炎支原体侵袭机体时造成机会感染。这两种支原体有着与大多数支原体不同的特征，即很难培养和在固体培养基上的菌落外观不是典型的“煎蛋”样子。絮状支原体大小和形状不是固定不变的，特别是在生长后期。在生长稳定和趋向下降阶段，可发现细丝状细胞，这种细胞形状在猪肺炎支原体中不存在。

由于絮状支原体不引起疾病，虽然在猪群中分布广泛，但检测方法很少，主要还是体外培养法，耗时较长。使用PCR法可以对絮状支原体进行检测，灵敏度高，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果。

絮状支原体PCR检测试剂盒选取了16S rRNA基因的一段序列进行PCR鉴定，引物经BLAST验证为特异性靶向絮状支原体，与其他生物的基因组无交叉反应。使用本试剂盒检测了絮状支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体（*Mycoplasma Hyosynoviae*）和猪鼻支原体（*Mycoplasma Hyorhinis*）等共19个菌株和分离株，只有絮状支原体产生特异性扩增条带。可见本试剂盒具有物种特异性，可用于絮状支原体的鉴定和检测。

**货号：M-floc-20 规格：20个反应**

**货号：M-floc-50 规格：50个反应**

**货号：M-floc-100 规格：100个反应**

**试剂盒组份：**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组份 | 成份 | 体积（微升） | | |
| M-floc-20 | M-floc-50 | M-floc-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（1026bp和/或754bp）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30秒，54℃退火30秒，72℃延伸60秒，循环30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1%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700-1000bp区间有显示条带），120伏电泳约20分钟。在紫外线下观察电泳结果，阳性对照应在1026bp处有一条带，阴性对照无条带，絮状支原体条带在754bp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。