**猪滑液支原体****PCR检测试剂盒**

**PCR Detection Kit for** ***Mycoplasma Hyosynoviae***

猪滑液支原体（*Mycoplasma Hyosynoviae*）在全世界的猪群中广泛分布，易于在感染的猪体内传播，通过呼吸、唾液和粪便排出体外，会在猪间迅速传播，有时不引起临床症状，有时会导致严重的疾病。猪滑液支原体存在于许多猪的扁桃体和上呼吸道，这些猪可能成为其终生携带者。猪滑液支原体可以在血液中循环，对关节组织有亲和力，感染关节和肌腱鞘，引起非化脓性关节炎，导致明显的跛行和疼痛。在年龄在8-30周龄的生长猪身上易引起疾病，在较老的母猪中非常罕见，因为猪体对其产生的免疫抵抗已经形成，这种免疫抵抗可通过初乳传给后代，并在数周内逐渐消失。

体外培养法和PCR法均可用于检测猪滑液支原体。体外培养法是经典的检测方法，但耗时较长，而使用PCR法则有更高的灵敏度，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果。

猪滑液支原体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验证为特异性靶向猪滑液支原体，与其他生物的基因组无交叉反应。使用本试剂盒检测了从270头猪中取得的724个样品，仅有猪滑液支原体产生特异性扩增条带。724个样品中检测出14个阳性样品，其中扁桃体的阳性率为4.14%，关节液的阳性率为1.60%，肺组织的阳性率为0。可见本试剂盒具有物种特异性，可用于猪滑液支原体的鉴定和检测。

**货号：M-hysy-20 规格：20个反应**

**货号：M-hysy-50 规格：50个反应**

**货号：M-hysy-100 规格：100个反应**

**试剂盒组份：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 　组份 | 成份 | 体积（微升） |
| M-hysy-20 | M-hysy-50 | M-hysy-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（666bp和/或400bp）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，60℃退火30秒，72℃延伸60秒，循环30次；循环结束后，在72℃延伸5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400-650bp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666bp处有一条带，阴性对照无条带，猪滑液支原体条带在400bp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。