**猪鼻支原体****PCR检测试剂盒**

**PCR Detection Kit for** ***Mycoplasma Hyorhinis***

猪鼻支原体（*Mycoplasma hyorhinis*）通常在猪的呼吸道中以共生的形式存在，而在人类的皮肤中则很少发现。 猪鼻支原体会促进和加剧一些疾病的发展，如猪传染性肺炎和猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）。 在没有其他细菌的参与时，猪鼻支原体少数情况下也可能引起幼猪的支原体性关节炎、支原体性多发性浆膜炎或支原体性败血症。在小于10周龄的仔猪中可见多种临床体征，跛行、多浆膜炎和关节肿胀是最常见的症状，继发于中耳炎，可能会出现恶臭，较不明显的症状包括被毛质量差、发热、心血管、胃肠道、神经和呼吸道症状等。猪鼻支原体可经由胎牛血清对细胞培养造成污染。

体外培养、免疫荧光抗体检测、补体结合试验和血凝试验等均可用于检测猪鼻支原体。而使用PCR法检测，则可以得到更高的灵敏度，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果。

猪鼻支原体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鼻支原体，仅与极地杆菌属石决明（*Polaribacter haliotis*）RA4-7产生交叉反应。极地杆菌属石决明RA4-7是从海生动物鲍鱼的肠道中分离得到的，所有极地杆菌属细菌都是从海水或海生动物中分离获得，与猪鼻支原体的生活环境存在极大差异，因此不会影响本试剂盒的使用。使用本试剂盒检测了从270头猪中取得的724个样品，得到79个阳性样品，仅有猪鼻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，可用于猪鼻支原体的鉴定和检测。

**货号：M-hyrh-20 规格：20个反应**

**货号：M-hyrh-50 规格：50个反应**

**货号：M-hyrh-100 规格：100个反应**

**试剂盒组份：**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组份 | 成份 | 体积（微升） | | |
| M-hyrh-20 | M-hyrh-50 | M-hyrh-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（897bp和/或676bp）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1.5%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700-900bp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897bp处有一条带，阴性对照无条带，猪鼻支原体条带在676bp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。