**肺炎支原体****PCR检测试剂盒**

**PCR Detection Kit for** ***Mycoplasma*** ***Pneumoniae***

肺炎支原体（*Mycoplasma Pneumoniae*）属于最小的自我复制型生物之一，是导致支原体肺炎（一种与冷凝集素病有关的非典型细菌性肺炎）的人类病原体。肺炎支原体细胞呈细长形状，长约0.1-0.2μm，宽约1-2μm，光学显微镜下无法检测；其菌落的长度通常小于100μm，需要立体显微镜来观察。肺炎支原体寄生于人类的呼吸道上皮，通过附着细胞器粘附于呼吸上皮细胞，然后与宿主细胞融合并进入细胞内，逃避宿主免疫系统的检测，并调节细胞膜的组成以模拟宿主细胞膜。因此肺炎支原体易于产生慢性或潜伏性感染，而且因其细胞膜组成与人细胞相似，可能导致几种器官和组织中的自身免疫反应（如：类风湿性关节炎）。

体外培养法很少用于检测肺炎支原体，可能的检测方法包括：免疫印迹，免疫荧光染色，血细胞吸附试验，四唑还原，代谢抑制试验，血清学试验和聚合酶链式反应（PCR）等。由于成本低，测试时间相对较短，EIA血清学分析是用于诊断的最常用的肺炎支原体检测方法，其缺点在于需要使用活组织，这种取样方式可能会加大感染的严重程度。PCR是确定肺炎支原体存在的最快速和最有效的方法，有更高的灵敏度，检测特异性强，且检测时间短，仅需几个小时即可获得结果。

肺炎支原体PCR检测试剂盒选取了肺炎支原体细胞粘附素蛋白基因的一段序列进行PCR鉴定，引物经BLAST验证为特异性靶向肺炎支原体，与其他生物的基因组无交叉反应。使用本试剂盒检测了分布范围较近的8种支原体和7种细菌，以及131份关节炎患者的关节液样本，仅有肺炎支原体产生特异性条带，有30份样本鉴定为肺炎支原体阳性。可见本试剂盒具有物种特异性，可用于肺炎支原体的鉴定和检测。

**货号：M-pneu-20 规格：20个反应**

**货号：M-pneu-50 规格：50个反应**

**货号：M-pneu-100 规格：100个反应**

**试剂盒组份：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 　组份 | 成份 | 体积（微升） |
| M-pneu-20 | M-pneu-50 | M-pneu-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（688bp和/或450bp）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95℃预热5分钟； 95℃变性35秒，58℃退火40秒，72℃延伸45秒，循环40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400-700bp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688bp处有一条带，阴性对照无条带，肺炎支原体条带在450bp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。