

探针法衣原体科通用实时定量 PCR 检测试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Chlamydiaceae*

衣原体科 (*Chlamydiaceae*) 属于衣原体门 (*Chlamydiae* phylum) 衣原体目 (*Chlamydiales* order), 于 1966 年首次确立。1999 年根据仅有的 4 个成员的 RNA 基因序列, 将其分为两个种属: 衣原体属 (*Chlamydia*) 和嗜衣原体属 (*Chlamydophila*)。随着更多衣原体种类地发现, 两个种属之间的区别不再明显, 因此 2010 年正式将二者重新合并为一个种属, 仍称为衣原体属 (*Chlamydia*), 所有的衣原体都归类于衣原体属。

衣原体最早发现于 1935 年, 现在已发现的约有 15 种, 全部是专性细胞内寄生, 在人和动物中可引起疾病。目前已在人、哺乳动物、鸟类和爬行类动物中发现衣原体。很多衣原体可感染多种宿主, 有些则具有宿主特异性, 只感染一种或一类宿主。衣原体主要侵袭呼吸道、胃肠道或生殖系统的粘膜, 感染位点和严重程度与衣原体种类和宿主都有关系。感染后在多数动物中会引起结膜炎和鼻粘膜炎, 或者侵袭生殖系统导致流产和不育, 但有时也并不表现出症状。

衣原体可以通过培养法和血清学方法进行检测。由于衣原体是专性细胞内寄生, 因此必须在活组织或细胞内进行培养, 操作复杂, 耗时, 灵敏度低。血清学方法灵敏度较低, 且只能在已感染一段时间之后才能检测。PCR 法具有灵敏度高、特异性强的优点, 检测速度快, 只需两三个小时即可完成, 可以有效弥补上述两种方法的不足。定量 PCR 法与普通 PCR 法相比, 不仅可以进行定量分析, 而且操作更为方便, 更少受环境污染的影响。

本试剂盒针对 16S-23S rRNA 基因区间序列设计特异性引物和探针, 可以特异性识别衣原体科的各种衣原体/嗜衣原体, 经 BLAST 验证, 仅与衣原体目 (*Chlamydiales* order) 细菌的少数几种 (*Estrella lausannensis*, *Waddlia chondrophila*, *Simkania negevensis*) 有微弱交叉反应, 与其他生物基因组没有交叉反应。在高浓度的情况下, 这几种衣原体目细菌有可能产生特异性信号。本试剂盒检测了 145 个生物样品, 包括结膜拭子、鼻腔拭子、奶、新鲜组织、体液和粪便等各种类型, 获得 125 个阳性, 测序结果证实其中包含 6 种衣原体, 包括一种未报道过的新衣原体物种。可见本试剂盒适用于衣原体科微生物的检测。

试剂盒成分:

组份	成分	货号/规格/体积 (微升)		
		Cqt-cea-20	Cqt-cea-50	Cqt-cea-100
		20 次反应	50 次反应	100 次反应
组份 A (蓝色管)	热启动 Taq 酶, dNTPs, UDG 酶	200	500	1000
组份 B (棕色管)	上下游引物, 探针	40	100	200
组份 C (黄色管)	阳性对照样品	40	100	200
ROX (棕色管)	5 μ mol/L ROX	50	125	250
水 (白色管)	超纯水	160	400	800

储存: -20℃ 保存, 有效期一年。避免反复冻融, 频繁使用可置于 4℃ 保存。本产品可在 4℃ 保持稳定数周。

试剂盒特点:

- 1, 特异性检测衣原体/嗜衣原体属, 仅与衣原体目少数细菌有微弱交叉反应, 与衣原体目以外的其他生物基因组无交叉反应。

- 2, 灵敏度高, 最低检测极限约每反应 56 个基因组。
- 3, DNA 聚合酶采用热启动方式, 可抑制非特异性扩增, 降低背景荧光。
- 4, 带有阳性对照样品, 可用于检验试剂盒有效性。
- 5, 带有 UDG 酶和 dUTP, 可降低残留 DNA 的污染。

操作步骤:

- 1, 准备好样品, 抽提 DNA 后进行 PCR。本试剂盒使用的 DNA 聚合酶抗干扰能力强, 对大多数使用 Tris 缓冲系统的样品可直接扩增, 可先直接用样品进行 PCR 预实验, 确认是否需要抽提 DNA。参考方法: 将样品和组份 C 在同一管内进行 PCR, 信号正常则说明样品中不含 PCR 抑制成分, 可省去提取 DNA 步骤。
- 2, 将本试剂盒各组份置于室温充分融解, 融解不完全可能导致实验结果异常, 融解过程注意避光; 手指轻弹管底以混匀, 然后瞬时离心使液体沉降至管底; 不可涡旋振荡。
- 3, 参考下表配制反应体系: 反应体积 20 微升。将适量组份 A、组份 B、ROX 和水混合好之后, 分装到 PCR 管中, 最后加入待测样品或组份 C, 阴性对照则加入与样品体积相同的水。注意避免剧烈操作, 防止气溶胶污染。ROX 须根据仪器型号选择恰当浓度, 必要时需先进行稀释再吸取适当体积 (参考 http://www.biothrive.cn/vip_doc/30703411.html)。

体积 (微升)	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管
组份 A	10	10	10
组份 B	2	2	2
组份 C	-	2	-
待测样品	-	-	2
ROX	x	x	x
水	8-x	6-x	6-x
总体积	20	20	20

- 4, 反应条件: 50℃2 分钟, 95℃2 分钟, 然后以 95℃15 秒、60℃60 秒循环 45 次。
- 5, 探针采用 FAM/TAMRA 标记, 在每个循环的结合阶段采集荧光信号。Ct 值小于 35 为阳性, 35-40 之间建议重复检测, 大于 40 可能是非特异性扩增。最低检测极限约每反应 56 个基因组。

注意事项:

- 1, 试剂盒采用的 DNA 聚合酶抗干扰能力强, 对大多数使用 Tris 缓冲系统的样品可直接扩增, 对 PBS 缓冲液兼容性略差, 反应液中血清浓度低于 5% 时完全不受影响。
- 2, 配制反应体系时, 尽量使用大体积移液。体积越大, 移液误差越小。
- 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, 对照和待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。使用无污染的一次性枪头, 最好是用带滤芯的枪头, 在通风洁净区域操作。如长期使用本产品, 请使用带滤芯的枪头, 并注意避免环境 DNA 污染枪头。操作时须佩戴无粉尘手套。
- 4, 最好对工作区域进行划分, 将不同步骤, 如 DNA 提取和 PCR 反应液的配制, 分开在不同阶段不同区域进行。
- 5, 本产品仅限于科研使用, 不作诊断用途。