

探针法肺炎衣原体实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Chlamydia pneumoniae*

肺炎衣原体（*Chlamydia pneumoniae*）是属于衣原体科（*Chlamydiaceae*）的专性细胞内寄生原核生物，在 1965 年首次分离出来，1989 年被正式命名。肺炎衣原体感染呼吸道，包括咽喉、气管和肺，引起约 5-10%的社区获得性肺炎，其感染易转为慢性，与许多慢性疾病有关，如慢性阻塞性肺病、支气管哮喘、肺癌、神经功能紊乱、多发性硬化症、精神分裂症、冠心病、动脉粥样硬化、结节病及反应性关节炎等。肺炎衣原体侵入人体后，主要引起单核-巨噬细胞反应，肺泡巨噬细胞作为病原体贮存和传播的载体，造成其在宿主体内的持续感染，其发病机制尚不明确。可从肺部及脾脏中分离出肺炎衣原体。肺炎衣原体通过呼吸道飞沫进行传播，无症状感染者也可进行传播，没有动物和人之间传播的报道，一般认为人类是肺炎衣原体唯一的宿主；但在考拉、马，以及其他有袋类动物、两栖动物、爬行动物中也有发现肺炎衣原体。根据遗传学分析，人类的肺炎衣原体是源于动物，但已不依赖于动物进行传播。

对肺炎衣原体的检测可以采用培养法和血清学方法。肺炎衣原体只能使用组织培养，不能使用无细胞培养体系，对鸡胚不敏感，一般是在呼吸道来源的细胞内进行，培养较其他衣原体更为困难。最常用的血清学方法是补体结合反应。哺乳动物一般于感染后 7 天出现补体结合抗体。微量免疫荧光抗体检测（MIF）技术对肺炎衣原体的诊断是特异的且敏感性高，被誉为肺炎衣原体感染诊断的“金标准”，但该方法的抗原片制作过程复杂，实验室要求条件高。PCR 是一种体外酶促合成特异性 DNA 片段的方法，灵敏度高于其他方法，特异性强，可以确定感染的细菌种类，检测速度快，只需两三个小时即可完成。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。

本试剂盒针对胞膜外蛋白 OMP1 基因的序列设计引物和探针，可以特异性识别肺炎衣原体，经 BLAST 验证，与其他生物基因组没有交叉反应。本试剂盒检测了 14 种细菌和 19 种病毒，未发现非特异性信号；对 186 个呼吸道临床样本进行检测，获得 51 个阳性。可见本试剂盒适用于肺炎衣原体的检测和鉴定。

试剂盒成分：

组份	成分	货号/规格/体积（微升）		
		Cqt-pne-20	Cqt-pne-50	Cqt-pne-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 μmol/L ROX	50	125	250
水（白色管）	超纯水	160	400	800

储存：-20℃，避光保存，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， 特异性检测肺炎衣原体，与其他生物基因组无交叉反应。
- 2， 灵敏度高，最低检测极限约为 0.13 IFU/反应。
- 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 40 次。
- 5, 探针以 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。最低检测极限约为 0.13 IFU/反应。

注意事项:

- 1, 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。
- 2, 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。
- 3, 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。
- 4, 本产品仅限于科研使用, 不作诊断用途。