

探针法 *Waddlia chondrophila* 实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Waddlia chondrophila*

Waddlia chondrophila 属于衣原体目 (*Chlamydiales* order) 的华诊体科 (*Waddliaceae*, 或称石德菌科), 为专性细胞内寄生菌, 最初是在 1990 年从流产胎牛中分离出来, 被认为是引起反刍动物流产的致病菌。在人类当中, *Waddlia chondrophila* 血清抗体阳性与流产有强关联性, 因此也被认为是一个可能的致病因素, 另外在毛细支气管炎或肺炎患者的呼吸道样本中也可检测到它的存在。有研究显示, *Waddlia chondrophila* 可在人巨噬细胞中快速增殖, 导致细胞产生病变, 引起巨噬细胞裂解, 进而损害免疫系统。

Waddlia chondrophila 不能采用传统的培养法进行检测, 因此只能采用 PCR 法。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 rRNA 基因设计引物和探针, 可以特异性识别 *Waddlia chondrophila*, 与其他生物基因组没有交叉反应。本试剂盒检测了亲缘或分布较为接近的 20 种细菌, 无交叉反应出现。对 32 个非病毒性毛细支气管炎患者的鼻咽吸出物进行检测, 得到 3 个阳性样本。可见本试剂盒适用于 *Waddlia chondrophila* 的检测和鉴定。

试剂盒成分:

组份	成分	货号/规格/体积 (微升)		
		Cqt-cho-20	Cqt-cho-50	Cqt-cho-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℃, 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 *Waddlia chondrophila*, 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 10 个拷贝/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于管底; 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。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)。注意避免剧烈操作, 防止气溶胶污染。

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, 探针以 FAM/BHQ 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 10 个拷贝。

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。