

探针法鸟衣原体实时定量 PCR 试剂盒

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

鸟衣原体 (*Chlamydia avium*) 最初是在德国和意大利从鸽子和鹦鹉中分离出来, 直到 2014 年才确定为新物种, 目前仅在鸽子和鹦鹉中发现有分布。家禽感染后通常没有症状, 有时会引起体重下降、羽毛蓬松、厌食、呼吸困难、肝脾肿大, 甚至死亡。根据一项对野生鸽粪便的研究, 鸟衣原体的检测感染率在大约 20-36% 的水平, 高于鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*) 2.4-7.5% 的水平。目前尚不清楚鸟衣原体对人类的危害程度。

对鸟衣原体的检测一般采用 PCR 法。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, 不仅可以精确定量, 而且操作更为方便, 更少受环境污染的影响。

本试剂盒针对鸟衣原体烯醇化酶的基因序列设计引物和探针, 可以特异性识别鸟衣原体, 与其他生物基因组没有交叉反应。本试剂盒检测了 6 种其他衣原体、19 种细菌和 3 种真菌, 未发现非特异性信号; 对衣原体阳性的 125 个鸽泄殖腔拭子样本进行检测, 获得 10 个阳性。可见本试剂盒适用于鸟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-avi-20	Cqt-avi-50	Cqt-avi-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)	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, 特异性检测鸟衣原体, 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 3 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。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/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 3 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。