

探针法鹦鹉热衣原体族实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Chlamydia psittaci* cluster

鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*)，或称鹦鹉热嗜衣原体/鹦鹉热亲衣原体 (*Chlamydophila psittaci*)、鹦鹉衣原体，是一种严格细胞内寄生的原核生物，属于衣原体科 (*Chlamydiaceae*)。鹦鹉热衣原体是最早发现的衣原体，宿主非常广泛，不仅有包括鹦鹉在内的多种鸟类，还有许多哺乳动物；在许多宿主中已形成独特的亚型，每种亚型都具有各自的宿主特异性。另外还有一部分亚型，根据 16S 和 23S rRNA 序列的差异，被划分为独立物种，如：流产衣原体 (*Chlamydia abortus*)、猫衣原体 (*Chlamydia felis*)、豚鼠衣原体 (*Chlamydia caviae*) 和兽类衣原体 (*Chlamydia pecorum*) 等。鹦鹉热衣原体的传播可通过直接接触、鸟粪、鼻分泌物和气溶胶，引起鸟类和哺乳动物的呼吸道疾病；由于可在环境中保持感染力达数月之久，因此可以造成公共安全威胁，包括在家禽养殖中大规模爆发，以及在人类中偶尔引发的鹦鹉病（或称鸟疫、鹦鹉热）。

鹦鹉热衣原体可使用培养法和血清学方法进行检测。由于耗时费力，且需要实验室安全等级较高，培养法很少使用。一些血清学方法常用于检测鹦鹉热衣原体，其缺点在于可能产生交叉反应，且灵敏度较低，不适用于早期感染，一般只能用作回顾性诊断。PCR 法是一种体外酶促合成特异性 DNA 片段的方法，更适合检测鹦鹉热衣原体，其灵敏度高，特异性强，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。

本试剂盒采用探针法定量 PCR，针对胞膜外蛋白基因的保守序列设计引物，特异性识别鹦鹉热衣原体，同时可以识别流产衣原体、猫衣原体、豚鼠衣原体、*Chlamydia buteonis* 和 *Chlamydia ibidis*；这几种衣原体均与鹦鹉热衣原体亲缘关系很近或曾归属于鹦鹉热衣原体。经 BLAST 验证，与其他生物基因组没有交叉反应。使用本试剂盒检测了不同的衣原体，以及亲缘关系较近或者较常见的 22 种细菌，均未发现非特异性信号，沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 和兽类衣原体均不能产生特异性信号；对 18 个临床样本（包括痰、喉拭子和支气管冲洗液）进行检测，获得 8 个阳性，灵敏度高于 ELISA 法（6 个阳性），与临床诊断结果一致；对源于鸽的 9 个鼻拭子样本进行检测，获得 3 个阳性。可见本试剂盒适用于鹦鹉热衣原体族的检测。

试剂盒成分：

组份	成分	货号/规格/体积（微升）		
		Cqt-psi-20	Cqt-psi-50	Cqt-psi-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, 特异性检测鹦鹉热衣原体族，包括：鹦鹉热衣原体、流产衣原体、猫衣原体、豚鼠衣原体、*Chlamydia buteonis* 和 *Chlamydia ibidis*；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 80 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°C 2 分钟, 95°C 2 分钟, 然后以 95°C 10 秒、62°C 5 秒、72°C 15 秒循环 49 次, 探针以 FAM/TAMRA 标记, 在每个循环的结合阶段采集荧光信号。
- 5, 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 80 个拷贝/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。