

## 衣原体科通用 PCR 检测试剂盒

PCR Detection 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。衣原体最早发现于 1935 年, 现在已发现的有约 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。感染后有时并不表现出症状, 在多数动物中会引起结膜炎和鼻粘膜炎症, 或者侵袭生殖系统导致流产和不育。

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。血清学方法同样灵敏度较低, 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。

本试剂盒针对 16S-23S rRNA 基因区间序列设计引物, 可以特异性识别各种衣原体/嗜衣原体, 经 BLAST 验证, 与衣原体科以外的其他生物基因组没有交叉反应。本试剂盒检测了 9 种衣原体, 和易于产生相似临床症状的 20 种细菌及 4 种病毒, 只有衣原体产生特异性信号, 与其他细菌和病毒没有交叉反应。对 833 个鸟类组织样本用三种方法进行平行检测, 荧光标记单克隆抗体法获得 54 个阳性, 改良 Ziehl-Neelsen 染色法获得 40 个阳性, 而本试剂盒获得 103 个阳性, 完全包括了前两种方法获得的阳性样本, 可见本试剂盒具有更高的灵敏度。

货号: C-ceae-20                      规格: 20 个反应  
 货号: C-ceae-50                      规格: 50 个反应  
 货号: C-ceae-100                      规格: 100 个反应

## 试剂盒成分:

组份	成份	体积 (微升)		
		C-ceae-20	C-ceae-50	C-ceae-100
组份 A (蓝色管)	Taq 酶, dNTPs, 染料	250	625	1250
组份 B (绿色管)	上下游引物	50	125	250
组份 C (黄色管)	阳性对照样品	50	125	250
水 (白色管)	纯水	200	500	1000

储存: -20℃ 保存, 有效期一年。避免反复冻融。

## 操作步骤:

- 1, 用 DNA 提取试剂盒抽提菌落、拭子或组织的 DNA, 检测浓度和纯度, 用于 PCR 实验。
- 2, 将本试剂盒各组份置于室温溶解, 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, 反应体积 25 微升, 配制方法参考下表, 每次实验需加一个阴性和一个阳性对照, 测试反应管可以有多个。将组份 A 和 B 混合好之后, 分装到 PCR 管中, 然后加入水, 最后向 PCR 管中加入 DNA 样本或阳性对照。配制过程中应注意戴口罩, 避免剧烈操作, 以免产生的气溶胶造成样品间的交叉污染, 推荐在有风压的设备如超净台或生物安全柜中进行操作。配制完毕后瞬时离心以使液体沉至管底。

体积 (微升)	阴性对照管	阳性对照管	测试反应管*
组份 A	12.5	12.5	12.5
组份 B	2.5	2.5	2.5
组份 C	-	2.5	2.5 / - *
水	10	7.5	5.5 / 8 *
测试样品	-	-	2
总体积	25	25	25

\*测试反应管中加入组份 C 可以判别测试样品中是否含 PCR 抑制物。把组分 C 加入测试反应管与样品共同反应, 有条带 (356bp 和/或 657bp) 出现则说明没有 PCR 抑制物, 无条带出现则说明有 PCR 抑制物, 此时应注意假阴性的可能性。

- 4, 反应条件: 95°C 4 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒循环 45 次。
- 5, 琼脂糖凝胶电泳: 按常规方法准备好 2% 琼脂糖凝胶, 加入 EB 或 Gold-View 等用于显色。每份反应液取 8 微升, 无须加入上样缓冲液, 直接加入凝胶加样孔中, 另留一孔加入 DNA marker (最好在 350-650 bp 区间有显示条带), 120 伏电泳约 20 分钟, 在紫外线下观察电泳结果, 阳性对照应在 657 bp 处有一条带, 阴性对照无条带, 衣原体条带在 356 bp 处。

## 注意事项:

- 1, 组份 A 中含有染料, 染料的加入不影响 PCR 反应, 反应产物可直接电泳, 节省时间。
- 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。