

探针法猫衣原体实时定量 PCR 试剂盒

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

猫衣原体 (*Chlamydia felis*)，或称猫嗜衣原体/猫亲衣原体 (*Chlamydophila felis*)，是一种专性细胞内寄生原核生物，革兰氏阴性，属衣原体科 (*Chlamydiaceae*)，曾被归属为鹦鹉热嗜衣原体 (*Chlamydophila psittaci*) 在猫中的亚型，1999 年正式确立为独立物种。一般认为猫衣原体的宿主仅限于猫，但在犬中也有发现，在人类也可能引起角膜结膜炎。猫衣原体离开宿主后不能存活，因此必须通过近距离接触（通常是借助眼分泌物）才能传播，年轻猫更易受到感染。猫衣原体属于常见感染，是猫结膜炎的主要病因，眼部症状表现为先单边后两边的结膜炎、瞬膜充血、眼睑痉挛、眼分泌物增多、结膜水肿，除此之外还可以引起发烧、昏睡、跛行、体重下降，以及一些上呼吸道症状。

猫衣原体可以在鸡胚或细胞系中进行培养。对猫衣原体的检测，培养法较为困难，因为结膜拭子中只含有很少量的菌体，并且在慢性感染时眼泪中的抗体也会造成影响；而且培养法较为耗时，操作也比较复杂。PCR 法是一种体外酶促合成特异性 DNA 片段的方法，更适合检测猫衣原体，其灵敏度高于培养法，且特异性强，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。

本试剂盒针对胞膜外蛋白基因序列设计引物和探针，可以特异性识别猫衣原体，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 5 种其他衣原体和 14 种细菌，未发现非特异性信号；对源自 9 种家养动物的 272 个样本进行检测，获得 139 个阳性，其中 135 个来自猫，4 个来自患结膜炎的狗。可见本试剂盒适用于猫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-fel-20	Cqt-fel-50	Cqt-fel-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 $\mu\text{mol/L}$ 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, 特异性检测猫衣原体，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 80 个基因组/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, 及帮助排除假阴性。
- 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°C 2 分钟, 95°C 2 分钟, 然后以 95°C 15 秒、60°C 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 80 个基因组/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。