

探针法猪衣原体实时定量 PCR 试剂盒

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

常见的感染猪的衣原体有四种：猪衣原体 (*Chlamydia suis*)、鸚鵡热衣原体 (*Chlamydophila psittaci*)、流产衣原体 (*Chlamydophila abortus*) 和兽类衣原体 (*Chlamydophila pecorum*)，其中阳性率最高的是猪衣原体。猪衣原体起初被认为是沙眼衣原体在猪当中的一个变种，于 1999 年被正式命名为独立物种。一般认为猪是其唯一宿主，但是近年在牛和青蛙中也有发现；在人类的临床样本中也发现其遗传物质，尚无致病报道。由于猪衣原体和沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 在亲缘关系上较近，因此不能排除感染人类的可能性。猪衣原体感染家猪或野猪后有时不引起症状，可能引起的症状包括：呼吸困难、肺炎、结膜炎、关节炎、心包炎、多浆膜炎、小肠炎、腹泻和生殖功能紊乱；实验性感染可引起猪的结膜炎、呼吸系统和胃肠道损伤。猪衣原体可通过基因水平转移从其他细菌获得抗生素抗性，所依赖的抗性基因岛 (TetR) 是第一个被鉴别出来的获得性抗性因子。

猪衣原体在鸡胚或体外细胞中培养较为困难；血清学方法常用于检测，如：补体结合试验 (CFT)、间接血凝试验 (IHA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等，这些方法往往灵敏度较低，特异性较差，且不能检测感染早期。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，可以弥补上述方法的缺点。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。

本试剂盒针对猪衣原体的胞膜外蛋白基因序列设计引物和探针，可以特异性识别猪衣原体，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 6 种其他衣原体，未发现非特异性信号；对 225 个猪组织样本进行检测，获得 42 个阳性，高于普通 PCR 法检出的 36 个，显示出更高的灵敏度。可见本试剂盒适用于猪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-sui-20	Cqt-sui-50	Cqt-sui-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, 特异性检测猪衣原体，与其他生物基因组无交叉反应。
- 2, 灵敏度高于普通 PCR 法，最低检测极限约为 170 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。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、60°C 35 秒循环 40 次。
- 5, 探针以 FAM/MGB 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 170 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。