

探针法衣原体目通用实时定量 PCR 试剂盒

Probe-quantitative Real-time PCR Kit for *Chlamydiales* order

衣原体目 (*Chlamydiales* order) 为专性细胞内寄生菌, 包括 7 个主要的家族或家族性谱系: 衣原体科 (*Chlamydiaceae*), 副衣原体科 (*Parachlamydiaceae*), 西门坎氏菌科 (*Simkaniaceae*), 华诊体科 (*Waddliaceae*, 或称石德菌科), *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, 和 *Criblamydiaceae*。除了衣原体科, 其他细菌笼统称为类衣原体。衣原体科微生物在人或动物中都属于致病菌。类衣原体也属于专性细胞内寄生, 目前的研究较少, 其中一些成员也与人或动物的疾病有关联, 如: *Parachlamydia acanthamoebae* 与人类肺炎有关, 还可能在牛引起流产; *Simkania negevensis* 可引起呼吸道感染, 尤其是在儿童当中; *Waddlia chondrophila* 引起牛的流产, 并且很可能在人也同样如此。一些能抵抗阿米巴原虫的类衣原体也同样对人的巨噬细胞有抗性。因此, 检测这些衣原体和类衣原体对人类和动物疾病的预防和治疗有重要的意义。

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, 且灵敏度低。血清学方法的灵敏度较低, 且容易产生交叉反应。类衣原体不能采用传统的培养法进行检测。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。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 16S rRNA 基因设计特异性引物和探针, 可以特异性识别衣原体目的各种微生物, 包括前述 7 种家族、谱系, 经 BLAST 验证, 与衣原体目以外的其他生物基因组没有交叉反应。本试剂盒检测了 6 种衣原体, 9 种类衣原体, 9 种细菌, 以及 4 种阿米巴原虫, 只有衣原体和类衣原体产生特异性信号, 与其他细菌和阿米巴原虫没有交叉反应。对 422 个鼻咽拭子进行检测, 获得 48 个阳性, 与测序结果一致。可见本试剂盒适用于对衣原体目微生物的检测。

试剂盒成分:

组份	成分	货号/规格/体积 (微升)		
		Cqt-ord-20	Cqt-ord-50	Cqt-ord-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°C , 避光保存, 有效期一年。避免反复冻融, 频繁使用可置于 4°C 保存。本产品可在 4°C 保持稳定数周。

试剂盒特点:

- 1, 特异性检测衣原体目微生物, 与衣原体目以外的其他生物基因组无交叉反应。
- 2, 灵敏度高, 最低检测极限约每反应 20 个基因组。
- 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 15 秒、67°C 15 秒、72°C 15 秒循环 50 次。
- 5, 探针采用 FAM/BHQ1 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。最低检测极限约每反应 20 个基因组。

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。