

肺炎衣原体 PCR 检测试剂盒

PCR Detection Kit for *Chlamydia pneumoniae*

肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)，或称肺炎嗜衣原体/肺炎亲衣原体 (*Chlamydophila pneumoniae*)，是属于衣原体科 (*Chlamydiaceae*) 的专性细胞内寄生原核生物，在 1965 年首次分离出来，1989 年被正式命名。肺炎衣原体感染呼吸道，包括咽喉、气管和肺，引起约 5-10% 的社区获得性肺炎；感染后 70% 的人没有或只有轻度症状，30% 的人会有较严重的呼吸道症状，包括社区获得性肺炎、支气管炎和上呼吸道感染。其感染易转为慢性，与许多慢性疾病有关。肺炎衣原体侵入人体后，主要引起单核-巨噬细胞反应，肺泡巨噬细胞作为病原体贮存和传播的载体，造成其在宿主体内的持续感染。其发病机制尚不明确，可从肺部及脾脏中分离出肺炎衣原体。肺炎衣原体通过呼吸道飞沫进行传播，无症状感染者也可进行传播，没有动物和人之间传播的报道，一般认为人类是肺炎衣原体唯一的宿主；但在考拉、马，以及其他有袋类动物、两栖动物、爬行动物中也有发现肺炎衣原体。

对肺炎衣原体的检测可以采用培养法和血清学方法。肺炎衣原体只能使用组织培养，不能使用无细胞培养体系，对鸡胚不敏感，一般是在呼吸道来源的细胞内进行，培养较其他衣原体更为困难。最常用的血清学方法是补体结合反应。哺乳动物一般于感染后 7 天出现补体结合抗体。微量免疫荧光抗体检测 (MIF) 技术对肺炎衣原体的诊断是特异的且敏感性高，因此被国内外学者誉为 Cpn 感染诊断的“金标准”，但该方法的抗原片制作过程复杂，实验室要求条件高。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。定量 PCR 法与普通 PCR 法相比，不仅可以精确定量，而且操作更为方便，更少受环境污染的影响。

本试剂盒针对肺炎衣原体 OMP1 基因的序列设计引物，可以特异性识别肺炎衣原体，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 11 种细菌、4 种真菌和 16 种病毒，未发现非特异性信号；对 208 个肺炎临床样本进行检测，获得 15 个阳性，与血清学检测结果一致。可见本试剂盒可用于肺炎衣原体的检测和鉴定。

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

试剂盒成分：

组份	成份	体积 (微升)		
		C-pneu-20	C-pneu-50	C-pneu-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 提取试剂盒抽提拭子或组织等样本的 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, 参考下表配制反应体系。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, 最后加入 DNA 样本或组份 C。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(236bp 和/或 435bp)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℃5 分钟, 然后以 95℃15 秒、60℃30 秒、72℃60 秒循环 40 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 250-450 bp 区间有显示条带), 120 伏电泳约 15 分钟, 在紫外线下观察电泳结果, 阳性对照应在 435 bp 处有一条带, 阴性对照无条带, 衣原体条带在 236 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。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。