



衣原体 DNA 检测试剂盒 (双重 qPCR-荧光探针法) 说明书

货 号:

TRS0302-050(50T)

TRS0302-025S(25T)



一、试剂盒简介

衣原体 (Chlamydia) 目前包括 11 种：流产衣原体 (*C. abortus*)、鸟衣原体 (*C. avium*)、豚鼠衣原体 (*C. caviae*)、猫衣原体 (*C. felis*)、禽衣原体 (*C. gallinacea*)、小鼠衣原体 (*C. muridarum*)、家畜衣原体 (*C. pecorum*)、肺炎衣原体 (*C. pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体 (*C. psittaci*)、猪衣原体 (*C. suis*) 和沙眼衣原体 (*C. trachomatis*)。qPCR 法与普通 PCR 法相比，不仅可以进行定性分析，而且操作更为方便，更少受环境污染的影响。

本试剂盒采用了双重 qPCR 荧光探针技术，定量检测样品中所有衣原体 (Chlamydia) DNA。检测快速、灵敏度高、检测具有 100% 特异性，最低检测限可以达到 fg 水平。本试剂盒包含有外源性靶标的引物、探针和模板，通过外源性靶标检测结果来监测样本提取及试剂配制过程，避免假阴性结果。本试剂盒使用了 dUTP/UDG 防污染系统，可防止假阳性结果出现，保证结果准确性。

本试剂盒可搭配本公司核酸释放剂、支原体样品前处理试剂盒（磁珠法）试剂配套使用。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5℃储存。
3. 产品批号，生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

组分名称	TRS0302-050(50T)	TRS0302-025S(25T)	保存
2×qPCR Reaction Buffer	1 ML	500μL	-20±5℃
Chla Pri/Pro Mix	300μL	150μL	-20±5℃，避光
阳性质控 (Chla PC)	100μL	50μL	-20±5℃
内部质控 (Chla IC)	100μL	50μL	-20±5℃
DNA 稀释液	1.5mL×2	1.5mL	-20±5℃

四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System、SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

检测方法

实验流程 A（标准模式）

1. 待测样本的 DNA 准备

- 1.1 建议配套使用本公司“支原体样品前处理试剂盒（磁珠法）”，提取样本 DNA。
- 1.2 将试剂盒放置 2~8℃冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

2. qPCR 反应体系的准备

- 2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

反应孔数=(1 个阳性质控 PC+1 个无模板对照 NTC+1 个提取阳性对照 PCS+1 个提取阴性对照 NCS+N 个待测样品) ×2

- 2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要反应混合液的总量。

反应混合液总量=(反应孔数+2) ×20 (2 为损失孔数)

按以下方案配置反应混合液。

表 1 反应混合液配置

组分	单孔用量/μL
2×qPCR Reaction Buffer	15
ChlaPri/Pro Mix	4
IC*	1
总体积	20

*若提取时未加入 IC，则按表 1 配置反应混合液；若提取时加入 IC，则在反应混合液中用 DNA 稀释液替代 IC。

3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20μL 反应混合液及 10μL 待测核酸样品，如表 2 所示。

表 2 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20μL 反应混合液+10μL 阳性质控	30μL
无模板对照 NTC	20μL 反应混合液+10μL DNA 稀释液	30μL
提取阳性对照 PCS	20μL 反应混合液+10μL PCS 纯化液	30μL
提取阴性对照 NCS	20μL 反应混合液+10μL NCS 纯化液	30μL
待测样品	20μL 反应混合液+10μL 待测样品纯化液	30μL

注：①PCS 纯化液可使用 10 μ L PC+190 μ L 样品空白 buffer（或者 1 $\times$ PBS）作为样品进行前处理获得，或根据实验室情况调整；

②NCS 纯化液可使用 DNA 稀释液作为样品进行前处理获得。

4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve，TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 选择报告荧光基团，衣原体通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；

4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法：

表 3 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min	1
循环	95 $^{\circ}$ C	5s	45
	60 $^{\circ}$ C	30s	

反应体积选择 30 μ L，开始运行。

各实验室可根据所用**机型**进行设置反应程序。

实验流程 B（快速模式）

1. 待测样本的 DNA 准备

（A、建议配套使用本公司“核酸释放剂”，获得样本 DNA；B、以细胞样本为例，在实验前几天，细胞需在 24 孔培养板上，用无抗生素的培养基进行培养，待细胞生长至 80%以上开始试验。）

1.1 样品为细胞（优选方案）

- 1.1.1 弃去培养皿内的细胞培养基。
- 1.1.2 用 1×PBS 或者生理盐水洗 2 次细胞。
- 1.1.3 加入适量的核酸释放剂（以 24 孔板为例，每孔 100μL）裂解细胞，室温放置 5 分钟。
- 1.1.4 收集细胞裂解液，放入离心管中。
- 1.1.5 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一支新离心管。
- 1.1.6 取 2μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

1.2 样品为培养上清（代替方案）

- 1.2.1 取 1~1.5mL 细胞培养上清（含有细胞或细胞碎片），放入离心管中。
- 1.2.2 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟。
- 1.2.3 弃上清，用 1×PBS 或者生理盐水洗沉淀一次。
- 1.2.4 加入 100 μL 裂解液裂解样品，上下颠倒混匀后，室温放置 5 分钟。
- 1.2.5 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一支新离心管。
- 1.2.6 取 2 μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

2. qPCR 反应体系的准备

- 2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

$$\text{反应孔数} = (1 \text{ 个阳性质控 PC} + 1 \text{ 个无模板对照 NTC} + N \text{ 个待测样品}) \times 2$$

- 2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要的反应混合液的总量。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \text{ (2 为损失孔数)}$$

按以下方案配置反应混合液。

表 4 反应混合液配置

组分	单孔用量/ μL
2 $\times$ qPCR Reaction Buffer	15
ChlaPri/Pro Mix	4
IC	1
总体积	20

3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 μL 反应混合液及 10 μL 待测核酸样品，如表 5 所示。

表 5 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20 μL 反应混合液+10 μL 阳性质控	30 μL
无模板对照 NTC	20 μL 反应混合液+10 μL DNA 稀释液	30 μL
待测样品	20 μL 反应混合液+2 μL 待测样品+8 μL DNA 稀释液	30 μL

注：由“核酸释放剂”获得样本 DNA 样品，体积大于 2 μL 可能会产生 PCR 扩增抑制。

4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 选择报告荧光基团，衣原体通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；

4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法，如下表 6 所示。

表 6 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5min	1
循环	95 $^{\circ}\text{C}$	5s	45
	60 $^{\circ}\text{C}$	30s	

反应体积选择 30 μL ，开始运行。各实验室可根据所用**机型**进行设置反应程序。

六、结果分析

以 ABI7500, 软件版本 2.4 为例:

1. 分析设定

1.1 推荐阈值 (Threshold=0.2), 亦可采用自动阈值。如需手动调整, 阈值线要高于阴性对照或者基线噪音, 通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期, 不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。

1.2 基线通常采用自动基线。如需手动调整, 基线起始循环数选择在指数增长期之前, 起点需避开起始荧光采集的波动区, 终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

2. 结果判定

2.1 PC、NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 7。

表 7 质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
PC	Ct<35, 且有明显的扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
NTC	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
PCS	Ct<35, 且有明显的扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
NCS	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线

注: ①快速模式实验流程无需检测 PCS、NCS, 即该模式下无需进行 PCS、NCS 分析。

②质控结果判定标准, 可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

2.2 待测样品检测结果判断, 参考表 8。

表 8 待测样品结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判定
Ct<40 且有明显扩增曲线	Ct<40, 且有明显的扩增曲线	阳性
	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	阳性, 有抑制
Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<40, 且有明显的扩增曲线	阴性
	Ct≥40, 或无明显的扩增曲线	无法判断, 有抑制

注: 若出现有抑制的情况, 需重新测试或对样品进行合适处理消除抑制因子。



七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需严格按照说明书操作步骤使用，以保证最佳的检测结果。
3. 提取阳性对照 PCS，可以加入 10 μ L PC+190 μ L 样品空白 buffer（或者 1 $\times$ PBS）作为样本提取，或根据实验室情况调整。
4. 若在提取时加入 IC，可以在待测样品中加入 10 μ L IC，50 μ L 洗脱，10 μ L 上样。
5. IC 通道荧光可以根据实验室情况选择是否收集及后期数据处理。
6. 由“核酸释放剂”获得样本 DNA 样品，PCR 扩增体积应小于 2 μ L。
7. 试剂盒组分建议在低温下融化使用。
8. 建议使用带滤芯吸头。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。

