

新生隐球菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用,不得用于临床诊断

咨询QQ: 2881498726

订购热线: 021-54720761

咨询电话: 13166274223(微信同号)

产品及特点:

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)是深部感染真菌中隐球菌属的主要菌种之一,种类较多,广泛分布于自然界,例如受动物污染的土壤,检出率较高。由于肿瘤及化疗药物的使用、艾滋病的流行、移植术后免疫抑制药物的使用等原因,新生隐球菌的发病率越来越高,在国外已成为艾滋病患者常见的并发症之一,也是导致患者死亡的重要原因,在我国新生隐球菌的发病率也呈逐年增加的趋势,因此快速检测新生隐球菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测新生隐球菌的试剂盒。

1. 即开即用,用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化,灵敏性高。
3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。
4. 特异性高,引物是根据新生隐球菌高度保守区设计,不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2 × Probe qPCR MagicMix	500μL (本色盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)
试剂二	新生隐球菌探针法 qPCR 引物混合液	100μL (白盖)
试剂四	新生隐球菌探针法 qPCR 探针	50μL (棕色管)
试剂五	新生隐球菌探针法 qPCR 阳性对照(1× 10E8/μL)	50μL (红盖)
	使用手册	1份

运输及保存:

低温运输， -20℃保存， 保存期限为 12 个月。

自备试剂:

样品 DNA。

使用方法:

一、 稀释标准曲线样品 (以 10E2-10E7 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例) :

由于标准品浓度非常高， 因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行， 千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原， 本产品不提供活体样品做阳性对照， 只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管， 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液， 最好用带芯枪头， 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)， 充分震荡 1 分钟， 得 1×10E7 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头， 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)， 充分震荡 1 分钟， 得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头， 在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)， 充分震荡 1 分钟， 得 1×10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。

6. 放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备：

7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μ L 阳性对照的 10000 倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。

8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应 (20 μ L 体系，在样品制备室进行)：

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析，并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（用第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

成份	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
2 \times Probe qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
新生隐球菌探针法 qPCR 探针	1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
新生隐球菌探针法 qPCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 μ L	--	--
超纯水	--	7 μ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 7 μ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管)

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min
PCR 反应 40 个循环	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)

四、数据处理：

12. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。