



# 新生隐球菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

官方 Q Q: 2881498548

官方网址: [www.tw-reagent.com](http://www.tw-reagent.com)

监督电话: 021-54845833

## 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 $\mu$ 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 $\times$ Probe qPCR MagicMix	500 $\mu$ L (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	100 $\mu$ L (白盖)
试剂四	新生隐球菌探针法 qPCR 探针	50 $\mu$ L (棕色管)
试剂五	新生隐球菌探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^8/\mu$ L)	50 $\mu$ L (红盖)
	使用手册	1 份

## 运输及保存:

低温运输，-20 $^{\circ}$ C保存，保存期限为 12 个月。



## 自备试剂:

样品 RNA。

## 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 10μL 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 (20μL 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×Probe qPCR MagicMix	10μL	10μL	各 10μL
新生隐球菌探针法 qPCR 探针	1μL	1μL	各 1μL
新生隐球菌探针法 qPCR 引物混合液	2μL	2μL	各 2μL
N+2 个待测 DNA 模板	7μL	--	--
超纯水	--	7μL	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)	--	--	各 7μL (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°C	3 min
PCR 反应 40 个循环	95°C	15 sec
	60°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。

**五、特别提示:**

**本公司的所有产品, 仅可用于科研实验, 严禁用于临床医疗及其他非科研用途!**