杜氏假丝酵母探针法 qPCR 试剂盒

Candida dubliniensis Probe qPCR Kit

目录号: [ml108179](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

杜氏假丝酵母 (*Candida dubliniensis*) 是一种厚垣孢子和芽管阳性酵母, 主要存在于获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 患者的口腔中。杜氏假丝酵母的衍生物对一些抗生素药物具有抗药性。杜氏假丝酵母的存在会影响抗生素的药物作用, 从而对治疗造成不良影响, 因此快速检测杜氏假丝酵母具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测杜氏假丝酵母的试剂盒, 它

具有下列特点:

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, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/ μ L。
3. 提供阳性对照和内参, 便于排除假阴性结果。
4. 特异性高, 引物是根据杜氏假丝酵母高度保守区设计, 不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。

5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 各数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
杜氏假丝酵母 PCR 引物-探针干粉 (含内参探针)	50 次	1.5mL 棕盖管
杜氏假丝酵母 PCR 阳性对照(1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄色管
杜氏假丝酵母 PCR 内参(1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5mL 白盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p>注意: 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 200μL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20°C保存。</p>		

使用方法

- 一、稀释含内参的标准曲线样品** (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E3 拷贝/ μ L 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)。
1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0。
 2. 在 0 号管中加入 280 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，35 μ L 本试剂盒提供的内参，震荡一分钟混匀。
 3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45 μ L/管加入到标记的 1-6 号管中，用带芯枪头 (下同)。
 4. 在 6 号管中加入 5 μ L 1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E6 拷贝/ μ L 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^4 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品, 每个样品中内参的浓度固定为 10^3 拷贝/ μL 。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

8. 如果有 N 个样品, 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 μL 上步所得 4 号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。在所有样本中加入 5 μL 本试剂盒提供的内参 (共 50000 拷贝)。
9. 用自选方法纯化样品的 DNA (含内参), 本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容, 也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 (20 μL 体系, 在样品制备室进行)

10. 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 (直接用第 6 步第 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。

11. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管(1-6 管)
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL

杜氏假丝酵母 PCR 引物-探针混合液 (含内参引物)	各 4 μ L	4 μ L	各 4 μ L
N+2 个待测 DNA (含内参)	各 6 μ L	不加	不加
超纯水	不加	6 μ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (含内参, 1-6 号)	不加	不加	各 6 μ L

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	3min
PCR 反应 (45 个循环)	95 $^{\circ}$ C	10sec
	60 $^{\circ}$ C	60sec
	72 $^{\circ}$ C	60 sec (采集 FAM 通道和 HEX 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 TAMRA)

四、数据处理

13. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系, 购买新的引物和探针。对任何阴性样品, 如果内参无 Ct, 则此样品的阴性结果无效, 此样品需要重复实验。

14. 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, 分别以阳性对照 (FAM 通道) 和内参 (HEX 通道) 的 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线, 阳性对照的标准曲线为斜线, r2 必须大于 0.95, 内参的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

15. 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 FAM 通道的 Ct 必须大于或等

	<p>于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 35。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。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的样品，如果其对应的内参 HEX 通道无 Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。</p>
自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。