热带念珠菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒

产品及特点：

热带念珠菌（Candida tropicalis）是一种腐物寄生菌，广泛存在于自然界，可从水果、蔬菜、乳制品、土壤中分离出。也可存在于健康人体的皮肤、阴道、口腔和消化道等部位。约10%的健康妇女和 30%的孕妇可无任何临床症状而阴道内带有念珠菌。当机体抵抗力降低或阴道局部环境发生改变时，热带念珠菌就大量繁殖，产生病变。所以，热带念珠菌是一种条件致病菌。本公司开发热带念珠菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒样品。

2. 根据热带念珠菌保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。

3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。

4. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。

5. 本试剂盒足够 50 次 20μL 反应体系的荧光定量 PCR。

规格及成分：

编号	成分	规格
试剂一	2×qPCR MagicMix	500 μL（棕色管）
试剂二	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL（黄盖）
试剂三	热带念珠菌染料法 PCR 引物混合液	100 μL（白盖）
试剂四	热带念珠菌染料法 PCR 阳性对照(1×10E8 /μL)	50 μL（红盖）
试剂五	DNA 病毒裂解液（试用装）	15 次（9 mL）
	使用手册	1 份

运输及保存：

低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备试剂：

DNA 模板、10×ROX（根据机型决定，具体见使用方法）。

使用方法：

一、稀释 PCR 阳性对照（以 10E2-10E7 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）：

1. 注意：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，只提供可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。

2. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。

3. 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）。

4. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

5. 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 的阳性对照。放冰上待用。

6. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备：

8. 如果有 N 个样品，必须设置 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 上步制备的 PCR 阳性对照的第 4 号（浓度为 1×10E4 拷贝/μL，10μL 相当于 1 万拷贝）或第 5 号（浓度为 1×10E5 拷贝/μL，10μL 相当于 10 万拷贝）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。如果每次制备需要 200μL 样品，则 PC 和 NC 的体积也必须是 200μL。

9. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次一管式病毒 DNAout。

三、设置 qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）：

10. 如果只做 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，6 个用于 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。

11. 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）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	PCR阳性对照管(2-7 管)
2×qPCR MagicMix (棕色管)	10μL	10 μL	各 10 μL
热带念珠菌 PCR 引物混合液（白盖）	2 μL	2 μL	各 2 μL
自备 10×ROX (见注)	2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 待测样品 DNA 模板	6 μL	不加	不加
第 7 步所得 PCR 阳性对照稀释液（2-7 号）	不加	不加	各 6μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）

注：仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照，其他荧光 PCR 仪器（如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480）不需要使用 ROX，则用水替代。

12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR（具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化）。

过程	温度	时间
预变性	92℃	5 分钟
PCR 反应 30 个循环	94℃	60 秒

	50℃	60 秒
	72℃	60 秒

13. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光谱在 530 nm。信号采集可以设置在复性或延伸步骤。

四、数据处理：

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，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 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 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。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。

上海纪宁实业有限公司(www.shjning.com)所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。