



## 隐孢子虫通用探针法荧光定量 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:

隐孢子虫 (Cryptosporidium spp.) 为体积微小的球虫类寄生虫,广泛存在多种脊椎动物体内,寄生于人和大多数哺乳动物的主要为微小隐孢子虫,由微小隐孢子虫引起的疾病称隐孢子虫病,是一种以腹泻为主要临床表现的人畜共患性原虫病,会给人体健康带来严重损害,因此快速检测隐孢子虫具有重要意义。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隐孢子虫的试剂盒。

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,引物是根据隐孢子虫通用高度保守区设计,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  | 隐孢子虫通用探针法 qPCR 引物混合液                          | 100 $\mu$ L (白盖)  |
| 试剂四  | 隐孢子虫通用探针法 qPCR 探针                             | 50 $\mu$ L (棕色管)  |
| 试剂五  | 隐孢子虫通用探针法 qPCR 阳性对照(1 $\times$ 10E8/ $\mu$ 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/ $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L  $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu$ L 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L | 10 $\mu$ L | 各 10 $\mu$ L                         |
| 隐孢子虫通用探针法 qPCR 探针              | 1 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L  | 各 1 $\mu$ L                          |
| 隐孢子虫通用探针法 qPCR 引物混合液           | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L                          |
| N+2 个待测 DNA 模板                 | 7 $\mu$ L  | --         | --                                   |
| 超纯水                            | --         | 7 $\mu$ L  | --                                   |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)        | --         | --         | 各 7 $\mu$ 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°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！**