



# 杜氏假丝酵母探针法 qPCR 试剂盒

Candida dubliniensis Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

| 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，<br><b>它具有下列特点：</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |       |           |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|----|------------------------|-------|-----------|----------------|-----|-----------|---------------------------|------|-----------|-------------------------------|------|-----------|-----------------------------|-------|-----------|------|-----|---|------------|--|--|-------------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|
|                                                                         | 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/μL。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |       |           |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|                                                                         | 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 20μL 体系的探针法 PCR 反应。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |       |           |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|                                                                         | 7. 本产品只能用于科研。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |       |           |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
| 规格及成分                                                                   | <table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>0.5mL</td><td>0.5mL 本色管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>杜氏假丝酵母 PCR 引物-探针干粉（含内参探针）</td><td>50 次</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>杜氏假丝酵母 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>杜氏假丝酵母 PCR 内参(1×10E4 拷贝/μL)</td><td>250μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr><tr><td colspan="3">本产品采用五孔盒包装</td></tr><tr><td colspan="3"><b>注 意：</b>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℃保存。</td></tr></table> | 成分    | 规格        | 包装 | 2×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 | 0.5mL 棕色管 | 杜氏假丝酵母 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | 杜氏假丝酵母 PCR 内参(1×10E4 拷贝/μL) | 250μL | 0.5mL 白盖管 | 使用手册 | 1 份 | 无 | 本产品采用五孔盒包装 |  |  | <b>注 意：</b> 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℃保存。 |  |  |  |  |
|                                                                         | 成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 规格    | 包装        |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|                                                                         | 2×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  | 0.5mL 棕色管 |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|                                                                         | 杜氏假丝酵母 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 50μL  | 0.5mL 黄盖管 |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|                                                                         | 杜氏假丝酵母 PCR 内参(1×10E4 拷贝/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 250μL | 0.5mL 白盖管 |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
|                                                                         | 使用手册                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1 份   | 无         |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
| 本产品采用五孔盒包装                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |       |           |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
| <b>注 意：</b> 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℃保存。 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |       |           |    |                        |       |           |                |     |           |                           |      |           |                               |      |           |                             |       |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |  |  |
| 使用方法                                                                    | <b>一、稀释含内参的标准曲线样品</b> （以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E3 拷贝/μL 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 280μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，35μL 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 45μL/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 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供),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。放冰上待用。
- 6. 换枪头,在 4 号管中加入 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10E4 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 10E3 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 10μL 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 5uL 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 (20μL 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<br>N+2 个 | PCR<br>阴性对照 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管) |
|----------------------------|--------------|-------------|--------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix     | 各 10μL       | 10μL        | 各 10μL             |
| 杜氏假丝酵母 PCR 引物-探针混合液(含内参引物) | 各 4μL        | 4μL         | 各 4μL              |
| N+2 个待测 DNA (含内参)          | 各 6μL        | 不加          | 不加                 |
| 超纯水                        | 不加           | 6μL         | 不加                 |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)   | 不加           | 不加          | 各 6μL              |

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℃ | 3min                                         |
| PCR 反应<br>(45 个循环) | 95℃ | 10sec                                        |
|                    | 60℃ | 60sec                                        |
|                    | 72℃ | 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

12. 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。

13. 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。

14. 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

|        |                                                                                                                                                                                                                        |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | 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。 |
| PCR 编号 | TW-E10269                                                                                                                                                                                                              |
| 说明书    | 1 份                                                                                                                                                                                                                    |
| 自备试剂   | 样品 DNA                                                                                                                                                                                                                 |
| 运输及保存  | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年                                                                                                                                                                                                    |

**生产企业：上海通蔚实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54845833**

**技术支持：15800441009**