

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-26800  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

隐孢子虫荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)

*Cryptosporidium spp.* qPCR Kit (Dye based)

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>隐孢子虫(Cryptosporidium)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(C. parvum)，引起隐孢子虫病(cryptosporidiosis)，是一种以腹泻为主要临床表现的人畜共患性原虫病，因此对隐孢子虫进行快速灵敏的诊断具有重要的意义。本产品就是根据隐孢子虫 rRNA 编码基因的保守区设计引物而开发的高灵敏荧光定量 PCR 产品。本试剂盒具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 根据隐孢子虫 OWP (oocyst wall protein) 编码基因保守序列设计的专一性引物，与其他肠道疾病病原体（如 <i>B.hominis</i>、<i>E.coli</i>、<i>E.dispar</i>、<i>E.moshkovskii</i>、<i>V.cholerae</i> 等）无交叉反应。</li> <li>2. 灵敏度比常规 PCR 高 2-3 个数量级，可以达到几十拷贝/反应。</li> <li>3. 即开即用，用户只需要提供样品模板，操作简单，定量准确快速。</li> <li>4. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。</li> <li>5. 本试剂盒足够 100 次 20<math>\mu</math>L 反应体系的荧光定量 PCR。</li> <li>6. 本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。</li> </ol>																							
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装（去纸托）</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math>qPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>0.5 mL（装 A 袋）</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL（装 A 袋）</td> </tr> <tr> <td>隐孢子虫 PCR 引物 F</td> <td>14-26800f</td> <td>0.5 OD（装 B 袋）</td> </tr> <tr> <td>隐孢子虫 PCR 引物 R</td> <td>14-26800r</td> <td>0.5 OD（装 B 袋）</td> </tr> <tr> <td>隐孢子虫基因阳性对照 (1<math>\times</math>10E8 copy/<math>\mu</math>L)</td> <td>14-26800pc</td> <td>50 <math>\mu</math>L（装 C 袋）</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>11-3390sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装（去纸托）	2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	0.5 mL（装 A 袋）	超纯水	100935	1 mL（装 A 袋）	隐孢子虫 PCR 引物 F	14-26800f	0.5 OD（装 B 袋）	隐孢子虫 PCR 引物 R	14-26800r	0.5 OD（装 B 袋）	隐孢子虫基因阳性对照 (1 $\times$ 10E8 copy/ $\mu$ L)	14-26800pc	50 $\mu$ L（装 C 袋）	使用手册	11-3390sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装（去纸托）																						
2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	0.5 mL（装 A 袋）																						
超纯水	100935	1 mL（装 A 袋）																						
隐孢子虫 PCR 引物 F	14-26800f	0.5 OD（装 B 袋）																						
隐孢子虫 PCR 引物 R	14-26800r	0.5 OD（装 B 袋）																						
隐孢子虫基因阳性对照 (1 $\times$ 10E8 copy/ $\mu$ L)	14-26800pc	50 $\mu$ L（装 C 袋）																						
使用手册	11-3390sc	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输、-20<math>^{\circ}</math>C 保存(A 袋试剂放样品准备区、C 袋的阳性对照最好分开放置)，有效期一年。</p>																							
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>DNA 模板、10<math>\times</math>ROX（根据机型决定，具体见使用方法）。</p>																							
<p><b>使用方法</b></p>	<p><b>一、样品 DNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数原虫 DNA 提取试剂盒兼容。本公司的柱式粪便 DNA 提取试剂盒也可以用于隐孢子虫 DNA 提取。</li> </ol> <p><b>二、引物的制备（在样品制备室进行）</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. 按引物标签提示在装引物干粉的管中直接加入适量的超纯水（加入量见引物试管上的标签），使得两条引物的浓度均为 10<math>\mu</math>M（10pmol/<math>\mu</math>L），然后各取 110<math>\mu</math>L 混合在一起得 220<math>\mu</math>L，标注为引物混合物，放冰上待用。220<math>\mu</math>L 足够 100 次 qPCR 反应。</li> </ol>																							

**三、稀释阳性对照** (以 10E2-10E7 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,只提供可以直接使用的长为 150bp 的 DNA 片段作为阳性对照。

3. 标记 6 个离心管,分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
4. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  超纯水(最好用带芯枪头,下同)。
5. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照,充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头,在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头,从 6 号管中取 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照到 5 号管中,充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头,从 5 号管中取 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照到 4 号管中,得  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
9. 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。

**三、设置 qPCR 反应 (20  $\mu\text{L}$  体系,在样品制备室进行)**

10. 在 PCR 管中加入下列成分(待测样品需要做三次重复,下表只列出一。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	阴性对照	阳性对照(2-7 管)
2 $\times$ qPCR MagicMix	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
引物混合物	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
自备 10 $\times$ ROX (见注)	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
待测样品 DNA 模板	1-5 $\mu\text{L}$	不加	不加
阳性对照 (2-7 号)	不加	不加	各 5 $\mu\text{L}$ (2 号样到 2 号管,3 号样到 3 号管...)
补水到	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

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、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480) 不需要使用 ROX。

11. 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	95℃	3 分钟
		PCR 反应 (45 个循环)	95℃	30 秒
	55℃		30 秒	
	72℃		30 秒	
	<p>12. 数据采集</p> <p>具体操作按所用仪器推荐的流程进行。一般在复性步骤采集荧光数据。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。</p> <p><b>四、数据处理</b></p> <p>13. 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。</p>			
<p><b>关联产品</b></p>	<p>PCR 抑制物清除剂(CAT#:60804)，即用型荧光定量 PCR 试剂盒 (CAT#:90408-1)</p>			