

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-45600  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

新生隐球菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒

*Cryptococcus neoformans* SYBR qPCR Kit

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)

## 产品及特点

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)是深部感染真菌中隐球菌属的主要菌种之一,种类较多,广泛分布于自然界,例如受动物污染的土壤,检出率较高。由于肿瘤及化疗药物的使用、艾滋病的流行、移植术后免疫抑制药物的使用等原因,新生隐球菌的发病率越来越高,在国外已成为艾滋病患者常见的并发症之一,也是导致患者死亡的重要原因,在我国新生隐球菌的发病率也呈逐年增加的趋势,因此快速检测新生隐球菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术,本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测新生隐球菌的试剂盒,它具有下列特点:

1. 即开即用,用户只需要提供 DNA 模板。
2. 特异性高,引物是根据新生隐球菌高度保守区设计,不会扩增其他微生物。
3. 引物和扩增体系经过优化,灵敏性比常规 PCR 高 100 倍。
4. 提供无传染性的 PCR 阳性对照,便于区分假阴性样品。
5. 一管式操作,荧光 PCR 检测,不容易产生环境污染。
6. 本产品只能用于科研,本试剂盒足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的荧光定量 PCR。

## 规格及成分

成分	编号	十孔盒包装
2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (棕色)
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)
新生隐球菌 PCR 引物混合液	14-45600yw	100 $\mu$ L (白盖)
新生隐球菌 PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-45600pc	50 $\mu$ L (红盖)
天净沙 DNA 释放剂试用装	61202	20 次 (1mL, 绿盖)
使用手册	14-45600sc	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 DNA。

## 使用方法

一、制备标准曲线样品 (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 阳性对照 (其浓度为 1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L, 试剂盒提

供),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头,在 6 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  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/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 5 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 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. 用自选方法纯化样品的 DNA,本产品跟市场上绝大多数核酸纯化产品兼容。
8. 如果有 N 个样品,则需要进行 N+2 个样品提取,多出的一个用作样品制备阳性对照管、另一个用作样品制备阴性对照管。如果需要使用本试剂盒自带的免 DNA 提取天净沙核酸释放剂试用装,则到公司网站 [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com) 输入产品名称天净沙核酸释放剂或产品编号 61202 下载使用手册并按手册操作。

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

9. 如果做定量检测,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 个用于标准曲线样品。如果做定性检测,则 6 个标准曲线样品只做其中 1 个(比如选择第 4 号),样品数为 N+4。
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):

成分	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
2 $\times$ qPCR MagicMix (棕色管)	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
新生隐球菌 PCR 引物混合液 (白盖)	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	6 $\mu\text{L}$	不加	不加
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 6 $\mu\text{L}$ (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、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480)不需要使用 ROX,则用水替代。

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）。

#### 四、荧光定量 PCR 反应参数

过程	温度	时间
预变性	94℃	10 min
PCR 反应 (40 个循环)	94℃	15 sec
	58℃	60 sec (采集 SYBR 通道的荧光信号)
最后延伸	72℃	10 min

#### 五、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 DNA 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。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。

### 关联产品

新生隐球菌可视化 LAMP 检测试剂盒