



隐孢子虫通用染料法荧光定量 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

监督电话：021-54845833

产品及特点：

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。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒样品。
2. 根据隐孢子虫通用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 20 μ L 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 \times qPCR MagicMix | 500 μ L (棕色管) |
| 试剂二 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1 mL (黄盖) |
| 试剂三 | 隐孢子虫通用染料法 PCR 引物混合液 | 100 μ L (白盖) |
| 试剂四 | 隐孢子虫通用染料法 PCR 阳性对照(1 \times 10E8 / μ L) | 50 μ L (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 $^{\circ}$ C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 |
| 隐孢子虫通用 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 6 μ 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、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 $^{\circ}$ C | 5 分钟 |
| PCR 反应 30 个循环 | 94 $^{\circ}$ C | 60 秒 |
| | 50 $^{\circ}$ C | 60 秒 |
| | 72 $^{\circ}$ C | 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。

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!