



耶氏肺孢子虫探针法荧光定量 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

监督电话: 021-54845833

产品及特点:

肺孢子虫(Pneumocystis)是一种重要的机会致病性病原体，寄生于人和多种哺乳动物肺组织内，引起肺孢子虫肺炎(Pneumocystis pneumonia,PCP)或称肺孢子虫病(Pneumocystosis)。目前将寄生于鼠类的称为耶氏肺孢子虫(Pneumocystis carinii)，寄生人体者称为耶氏肺孢子虫(Pneumocystisjiroveci)。该虫可在免疫功能低下的人群中诱发致命性的肺孢子虫肺炎(PCP)。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耶氏肺孢子虫的试剂盒。

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，引物是根据耶氏肺孢子虫高度保守区设计，不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μ 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 μ L(本色盖)
试剂二	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL(黄盖)
试剂三	耶氏肺孢子虫 qPCR 引物混合液	100 μ L(白盖)
试剂四	耶氏肺孢子虫 qPCR 探针	50 μ L(棕色管)
试剂五	耶氏肺孢子虫探针法 qPCR 阳性对照($1 \times 10^8/\mu$ L)	50 μ 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/μL 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 μL 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 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1×10E7 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 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。
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 10μL 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 (20μL 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×Probe qPCR MagicMix	10μL	10μL	各 10μL
耶氏肺孢子虫 qPCR 探针	1μL	1μL	各 1μL
耶氏肺孢子虫探针法 qPCR 引物混合液	2μL	2μL	各 2μL
N+2 个待测 DNA 模板	7μL	--	--
超纯水	--	7μL	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)	--	--	各 7μL (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！