|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-60250****低温运输，-20℃保存** |  |
| **耳念珠菌染料法PCR 试剂盒*****Candida auris* SYBR PCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：**[**www.bingene.com**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：****order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 耳念珠菌( *Candida auris* )是一种可引起侵袭性感染的多重耐药酵母菌，2009年首次被发现，因其传播快、耐药广、鉴定难、病死率高正逐渐成为一个新的全球性威胁。因此对其进行快速诊断具有重要的意义。本产品是根据染料法荧光定量 PCR 原理开发的检测耳念珠菌的试剂盒，它具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA模板。
2. 引物经过优化，灵敏性高，可以达到1000拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据耳念珠菌高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20μL体系的染料法荧光定量PCR反应。
6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少5个数量级。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 |
| 2×SYBR qPCR MagicMix | 90408 | 0.5 mL（本色盖） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL（绿盖管） |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL（蓝盖管） |
| 耳念珠菌染料法PCR引物混合液 | yw14-60250 | 100 μL（白盖管） |
| 耳念珠菌染料法PCR阳性对照 (1×10E7拷贝/μL) | pd14-60250 | 50 μL（黄盖管） |
| 使用手册 | 14-60250sc | 1份 |

 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。 |
| **自备试剂** | 样品DNA。 |
| **使用方法** | **一、稀释标准曲线样品**（以10E1-10E6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6，5，4，3，2，1。
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。
4. 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。
5. 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。
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**1. 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第6步所得的第4号稀释液（1×10E4拷贝/μL）再加上一定量的水使总体积跟每次核酸纯化所要求的样品起始体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品DNA提取试剂盒兼容，也可使用本公司的免提取核酸释放剂。

**三、染料法qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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。
2. 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** | **标准曲线****样品管（1-6管）** |
| 2×SYBR qPCR MagicMix | 10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 耳念珠菌染料法PCR引物混合液 | 2 μL | 2 μL | 各2 μL |
|  N+2个待测DNA模板 | 8 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 8 μL | 不加 |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（1-6号） | 不加 | 不加 | 各8μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |

1. 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℃ | 5 分 |
| PCR反应（30个循环） | 95℃ | 10秒 |
| 60℃ | 40秒（采集SYBR通道的荧光信号） |
| 根据所用仪器的使用手册进行溶解曲线分析 |

注意：循环次数不要超过30个循环。**五、数据处理**1. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有Ct值，但Tm值跟阳性对照Tm不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm跟阳性对照Tm一致的，为有效Ct。
2. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得Tm值跟阳性对照的Tm值一样，说明环境或试剂可能有过去的PCR扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
3. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和PCR阴性对照）扩增产品的Tm跟阳性样品的Tm不同，则判为假阳性，这种情况下，实验有效，可以继续分析其它样品有效数据。
4. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的log值为横轴，以有效Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效Ct值从标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再换算出待测样品的DNA浓度。
5. 对定性检测，具有有效Ct值的样品为阳性，没有有效Ct值的样品为阴性。
 |
| **关联产品** | 耳念珠菌荧光及可视化LAMP检测试剂盒 |

20220328wmx