

MicroSHENTEK[®]

真菌 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1504631

版本：测试版

仅供研究用，不可用于临床诊断

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

MicroSHENTEK® 真菌 DNA 检测试剂盒（PCR- 荧光探针法）与 MicroSHENTEK® 真菌细菌 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）配套使用，定性检测细胞、细胞制品、疫苗等产品中是否有真菌污染。试剂盒参照中国药典 qPCR 方法检测相关要求进行了验证，检测限为 100CFU。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术，可定性检测样品中是否存在真菌 DNA，可覆盖约 92% 的已知真菌物种，匹配近 5 千种（或亚种）真菌 DNA 序列；经过多种真菌、非真菌和常见工程细胞物种 DNA 检测，广谱性好，特异性强。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	规格	储存条件
Fun qPCR Reaction Buffer	NNB013	220 μL×2 管	-18°C及以下，避光
Fun Primer&Probe MIX	NNC037	40 μL×2 管	-18°C及以下，避光
Fun 内部质控（IC）	NNA038	600 μL×1 管	-18°C及以下
Fun 阳性质控（PC）	NNA042	500 μL×1 管	-18°C及以下
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL×2 管	-18°C及以下

■ 规格

50 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于以下机型，使用前需验证检测灵敏度）

- SHENTEK-96S
- 7500 Real-Time PCR System
- Roche LightCycler 480 II

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 八联管及管盖
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 无菌低吸附带滤芯枪头
- 75%酒精
- UNG 酶 (确定使用前建议验证酶效果)
- 医疗用一次性利器盒
- 核酸清除剂

■ 相关设备

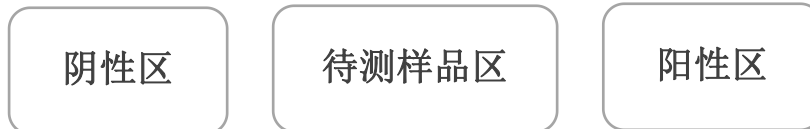
- 单人桌面无菌超净工作台 (SSD-1)
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 移液枪

操作过程

参考《MicroSHENTEK®真菌细菌 DNA 提取纯化试剂盒(磁珠法)说明书》

要求进行分区: 分为阴性区、待测样品区、阳性区。

分别在各区域单人桌面无菌超净工作台(SSD-1)中操作。



阴性区: 试剂配制区域&NCS、NTC 阴性质控加样区域;

待测样品区: 未知样品加样区域;

阳性区: PCS、PC 阳性质控加样区域。

❖ 实验前的准备

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性反穿衣、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子和医用口罩。
2. 工作台面、移液枪、枪头、八联管及管盖、离心管及离心管架紫外照射时长不少于 1 小时, 使用核酸清除剂、75%酒精全面擦拭消毒。
3. 将试剂盒从冰箱-18℃以下区域转移至 2~8℃区域融化, 涡旋振荡混匀并瞬时离心。

❖ qPCR 反应液的准备

1. 根据所要检测样品的数量, 计算所需反应孔数, 一般做 2 个重复孔。
反应孔数=(1 个阳性质控 PC + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性对照样品 NCS + 1 个阳性对照样品 PCS + N 个待测样品) × 2
2. 根据反应孔数计算所需的 MIX 总量:
 $MIX = (反应孔数 + 2) \times 10 \mu L$ (含有 2 孔的损失量)
3. 将各试剂根据表 2 所示准备 qPCR MIX:

表 2. qPCR MIX 配制表

组份	单孔用量
Fun qPCR Reaction Buffer	8 μ L
Fun Primer&Probe MIX	1.5 μ L
IC	0.5 μ L
总体积	10 μ L
UNG 酶	0.1 U

* qPCR MIX 配制应在阴性区无菌超净工作台中操作。

❖ 加样

1. 将所有溶液振荡混匀后根据表 3 所示加样，排版方式可参考表 4:

表 3. 各反应孔加样示例

反应孔	加样示例
阳性质控 PC	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L 阳性质控
无模板对照 NTC	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L DNA 稀释液
阴性对照样品 NCS	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L NCS 纯化液
阳性对照样品 PCS	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L PCS 纯化液
待测样品	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L 待测样品纯化液

* 按照样品类型在不同无菌超净工作台中进行加样，并注意加样顺序。

* 加样完成后体积为 30 μ L /孔。

表 4. 检测孔排版示例

NTC	NCS				S1	S1				PCS	PC	A
NTC	NCS				S2	S2				PCS	PC	B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
					S6	S6						F
					S7	S7						G
					S8	S8						H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

*该示例表示的是检测 1 个阳性质控 PC、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性对照样品 NCS、1 个阳性对照样品 PCS、8 个待测样品。每个检测做 2 个重复孔。

*实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版加样。

2. 将八联管加管盖封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

***严格注意操作顺序：**应当依次在阴性区完成 NTC 和 NCS 加样及封闭，待测样品区完成待测样品加样及封闭，阳性区完成 PC 和 PCS 加样及封闭。

*待 NTC、NCS、待测样品、PCS 样品加样封闭后，再将 PC 在阳性区进行加样封闭。

❖ qPCR 程序参数设置

◇ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1：选择反应孔。
3. 选择步骤 2：选择项目中的“**Micro-Fun**”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

◇ **其他定量 PCR 系统程序设置如下：**


1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针，命名为“**真菌检测**”，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none，创建 VIC 探针，选择报告荧光基团为 VIC，猝灭荧光基团为 none，检测参比荧光为 ROX（可选）。

3. 设置三步法反应程序：**25°C UNG 酶作用 10 min；95°C 预变性 10 min；95°C 15 s，60°C 30 s，72°C 1 min 30 s，45 个循环；**反应体积 30 μ L。

❖ qPCR 结果分析


◇ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3：定义反应孔，将 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照，PC 孔设置为阳性对照，NCS 孔设置为阴性对照，待测样品孔设置为待测样品。


2. 在“实验分析”页面点击 ，在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。

✧ 以 **7500 Real-Time PCR System**、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2. 在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、PCS 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、PCS，之后点击 。

3. 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品、PCS 的检测值。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

❖ 判定标准

1. PC、NTC、NCS、PCS 检测结果应为：

表 5. 质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
NTC	2 复孔 Ct \geq 39 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔 Ct \geq 39 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct $<$ 39 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增

*质控标准应基于实验室验证数据，可从满足检测限要求考虑。

2. 待测样品检测结果判定:

表 6. 待测样品检测结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 Ct<39 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	阳性, 有抑制
2 复孔 Ct≥39 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断, 有抑制

*若阴性质控 Ct_{NCS} < 39 但与 100 CFU 验证菌株 Ct 值相差 2 个循环及以上, 也可进行有效判断。

*如遇特殊样品或其他异常现象, 结果难以判定, 可联系湖州申科, 咨询具体解决方案。

修订日期: 2023 年 05 月 20 日

生效日期: 2023 年 05 月 23 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910