

真菌 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1504631

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/1

仅供研究用

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, 检测限为不大于 35 CFU/反应。

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; 通过多种真菌、非真菌和常见工程细胞物种 DNA 检测, 广谱性好, 特异性强。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
Fun qPCR Reaction Buffer	NNB017	220 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
Fun Primer&Probe MIX	NNC086	40 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
Fun 内部质控 (IC)	NNA038	600 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
Fun 阳性质控 (PC)	NNA042	500 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL \times 2 管	-18 $^{\circ}$ 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, 使用前需用户验证检测灵敏度)

- SHENTEK-96S
- 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, 200 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，联系本公司订购

■ 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 μL ，200 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

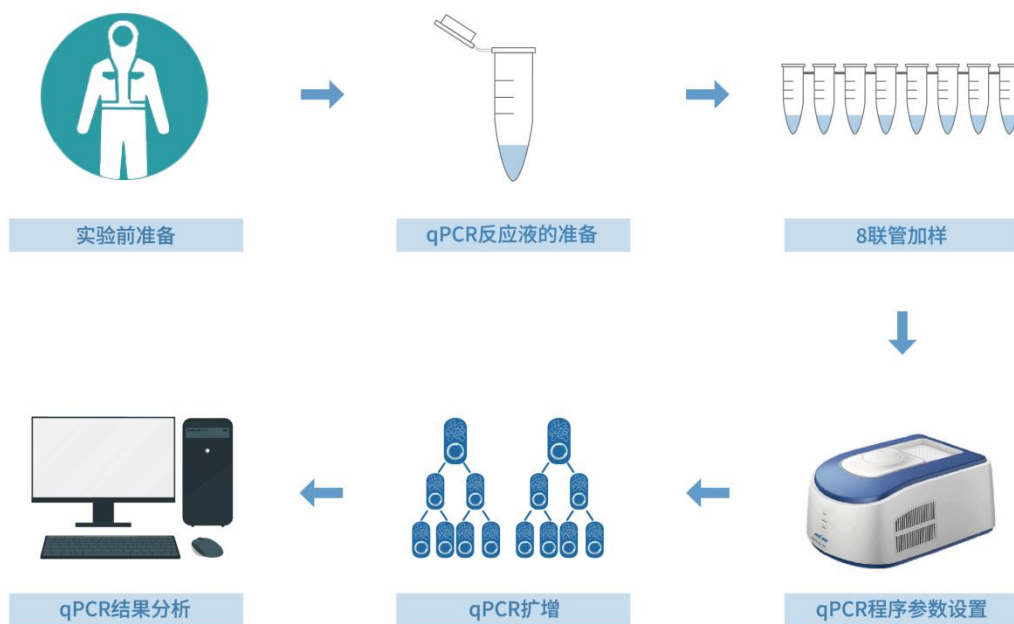


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

（一）实验前准备：

1. 穿戴适当的工作及防护服，至少穿戴无 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. 工作区及环境采取适当地消毒，去除残留核酸。至少工作台面、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 °C 以下区域转移至 2-8 °C 区域融化，涡旋振荡混匀并瞬时离心。
4. 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：待测样品加样区域；

阳性区：PCS、PC 阳性质控加样区域。

（二）qPCR 反应液准备：

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 qPCR MIX 总量：
qPCR MIX 总量 = (反应孔数+2) × 10 μL (含有 2 孔的损失量)
3. 各试剂根据表 2 所示准备 qPCR MIX：

表 2. qPCR MIX 配制表*

组分	单孔用量
Fun qPCR Reaction Buffer	8 μL
Fun Primer&Probe MIX	1.5 μL
Fun 内部质控 (IC) **	0.5 μL
总体积	10 μL
UNG 酶	0.1 U

* qPCR MIX 配制应在阴性区无菌超净工作台中操作。

**若样品提取时已加入 IC，则配制 MIX 时应根据表 2 使用等体积的 DNA 稀释液代替 IC。

二、操作步骤

(一) 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

各样品	加样量
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

*若用户样品经过完整的提取和检测过程，只需随带 NCS、PCS 阴阳性对照样品即可。

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。

***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。

（二）程序参数设置

将八联管用管盖封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪，接着进行 qPCR 程序设置：

- 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&Bac**”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

- 其他荧光定量 qPCR 系统推荐程序设置如下：

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；创建 VIC 探针，选择报告荧光基团为 VIC。
3. 设置三步法反应程序：

25 °C UNG 酶作用 10 分钟；

95 °C 预变性 10 分钟；


95 °C 15 秒，55 °C 30 秒，72 °C 1 分钟（读取荧光），45 个循环；

反应体积 30 μ L。

三、结果计算与判断

（一）结果计算

- 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、PCS 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、阴性对照样品 NCS、阳性对照样品 PCS、阳性质控 PC、待测样品的检测值。

- 以 Roche LightCycler 480 II、软件版本 1.5 为例。

1. 在 Subset Editor 的左下方点击“+”选项，然后选择相对应上样孔，确定后点击右下方的“Apply”选项保存。
2. 在 Sample Editor 的 Sample Name 一栏中命名相对应上样孔的名称

NTC、NCS、S、PCS、PC。

3. 在 Analysis 中选择 Abs Quant/Fit Points 分析类型, 点击“√”选项进入界面, 在 Noise Band 界面下方选择 Noiseband(Fluoresc), 通过手动改变 Noise Band 使阴阳性样品区分 (此时 Threshold 将与 Noise Band 保持一致), 然后点击左下方“Calculate”选项, 进行 Ct 值读取。

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。

(二) 结果判定

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 39.00 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35.00 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔 Ct \geq 39.00 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35.00 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct $<$ 35.00 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35.00 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct $<$ 39.00 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35.00 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 $<$ 39.00 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 40.00 且有效的“S”型扩增	检出
	2 复孔 Ct \geq 40.00 或扩增曲线无明显起峰	存在抑制, 结果无效
2 复孔 Ct \geq 39.00 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 40.00 且有效的“S”型扩增	未检出
	2 复孔 Ct \geq 40.00 或扩增曲线无明显起峰	无法判断, 存在抑制

*若阴性质控 Ct 值 $<$ 39.00 但 Ct 值大于 50-100 CFU 菌株 2 个循环及以上, 则可判定阴性质控符合要求。

*阴阳性质控符合要求时, 若待测样品 Ct 值 $<$ 39.00 但 Ct 值大于 50-100 CFU 菌株 2 个循环及以上, 也可判定为未检出。

*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。

生效日期：2024 年 02 月 25 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：400-878-2189