

Fungi Detection Kit for qPCR

真菌检测试剂盒（qPCR 法）
(Fungi Detection Kit for qPCR)
/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —

YOCON 友康®

真菌检测试剂盒（qPCR法）

参照中国药典、美国药典、日本药典、《人源干细胞产品指导原则2023》等指南进行相关验证。

-20℃保存

FUNGI

本产品仅限科研用途

本产品仅限科研用途

YOCON

使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品（北京）有限公司

YOCON 友康®

真菌检测试剂盒（qPCR法）说明书

【试剂盒简介】

真菌检测试剂盒（qPCR法）基于荧光定量PCR技术，采用多重PCR的方法检测真菌DNA，用于定性检测如培养基、细胞培养物以及生物制品中的常见真菌污染。

本试剂盒参照中国药典、欧洲药典和美国药典，从专属性、检测限、重现性和耐用性等方面进行了验证。已验证可检测黑曲霉和白色念珠菌，且检测限不大于100 CFU/mL，经序列比对还可检测常见的子囊菌和接合菌亚门下近500种真菌，与细菌、支原体以及人等哺乳类动物基因组无交叉反应。

本试剂盒使用两种荧光探针，FAM和HEX，分别检测真菌目标序列和内参对照。FAM通道检测真菌特异性扩增，HEX通道检测内参的扩增。内参对照可在PCR反应阶段加入，可用于排除因样品中含有PCR抑制因素导致的假阴性结果；也可在样品提取阶段加入，用于评估提取效果，排除提取不当而导致的假阴性。

本试剂盒能够与本公司的核酸提取试剂盒搭配使用，提取样品中的真菌DNA，排除不同样本基质的干扰，提高检测的灵敏度。

【试剂盒组成】

表1 试剂盒组分

试剂名称	货号	规格（50T）
5×Fu 反应液	FUA-50	250 µL/ 管 ×1 管
酶	FUB-50	12.5 µL/ 管 ×1 管
Fu 阳性对照	FUC-50	200 µL/ 管 ×1 管
Fu 内参对照	FUD-50	100 µL/ 管 ×1 管
PCR 稀释液	FUE-50	1000 µL/ 管 ×2 管

【产品规格】

产品货号：FU0001-50

产品规格：50T/盒

【有效期】

※-20℃保存，12个月。

※5×反应液保存和使用过程注意避光。

※经验证，试剂反复冻融10次不影响检测效果。

※内参对照在不参与样本提取时，需要100倍稀释后使用，稀释的内参请勿反复冻融使用。

【实验前准备】

实验所需但试剂盒中未含材料

- * 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌无RNA酶低吸附离心管
- * 八联管或 96孔qPCR 板
- * 不同规格无菌无RNA酶低吸附带滤芯枪头

检测相关设备

- * 超净台或生物安全柜
- * 离心机
- * 漩涡振荡器
- * 荧光定量 PCR 仪
- * 不同规格移液枪

【检测步骤】

1. 样本处理

样本需要进行样品提取后进行检测。

推荐使用本公司核酸提取试剂盒（货号：MK0103-50）进行样本的核酸提取，提取产物作为待测样本加入检测体系进行检测。阴性对照的提取和待测样本同步操作，以评估是否存在样本交叉污染或环境污染情况，阴性对照可选择确定无污染的同类型检测样本或试剂盒中的PCR稀释液。每份待提取的样本和阴性对照中需要加入2μL的内参对照，内参对照加入时间为样本裂解后，异丙醇加入之前。（详见提取试剂说明书）

注1：当样本中细胞总量高于 1×10^6 cells时，建议先进行细胞基质清除，再进行样本提取操作。

注2：本产品检测的是真菌的核酸。如果待测样本中含有真菌表达的重组蛋白，那么检测结果可能会出现阳性（样本中的真菌核酸残留导致），此类样本在搭配本公司提取试剂时，推荐加入扩展包使用。（详见提取试剂说明书）

2. 检测方法

使用前阅读说明书并按流程进行操作。

① 确定配制体系数量

根据所需检测样本数计算所需反应孔数，推荐做2个重复孔。

配制体系数量 $N = (\text{待测样品数} + \text{阴性对照} 1\text{个} + \text{无模板对照} 1\text{个} + \text{阳性对照} 1\text{个}) \times \text{单孔重复数} + 1$

② qPCR反应体系配制（配制区操作）

样品准备：将试剂盒中的各组分，提前在冰上完全融化后混匀使用。

qPCR反应体系配制按下表进行：

表2 qPCR反应体系配置表

组分	单 T 用量	总用量
5×Fu 反应液	5 μL	5 μL × N
酶	0.25 μL	0.25 μL × N
PCR 稀释液	14.75 μL	14.75 μL × N
总体积	20 μL	20 μL × N

按照表格配制反应液，充分混匀后，按照 20 μL 每管分装到 PCR 反应管中。

注：反应液混匀过程可能会出现气泡，轻弹离心管可以消除气泡，快速离心可将管壁上液体收集到底部。

③加样（在样本处理区进行）

每个反应孔中加入5 μL模板，总反应体系为25 μL。

待测样本与各对照，具体参考下表进行加样：

表3 各反应孔加样示例

阳性对照	20 μL qPCR 反应液 +3 μL 阳性对照 +2 μL 内参对照（100 倍稀释）
无模板对照	20 μL qPCR 反应液 +5 μL PCR 稀释液
待测样本	20 μL qPCR 反应液 +5 μL 提取后的待测样本
阴性对照	20 μL qPCR 反应液 +5 μL 提取后的阴性对照

注1：当内参对照不参与提取直接加入检测体系时，需要用试剂盒中的PCR稀释液100倍稀释后使用。

注2：完成加样后，盖紧管盖，在微孔板离心机上短时低速离心，将管盖和管壁的残留液体收集至管底，操作时尽量避免产生气泡。如有气泡，轻弹管底消除气泡再离心。

注3：经核酸提取的样本如在提取过程加入了内参，配制体系过程就不需要再加入内参。

注4：为避免影响荧光信号读取，请注意不要在管盖上做标记或使用刮板反复摩擦。

④ qPCR扩增（在扩增区操作）

将PCR反应管放入扩增仪器样品槽，按照对应顺序设置待测样品与各对照。读取FAM通道和HEX通道，反应体积设置为25 μL，反应程序：

表4 qPCR反应程序

反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	95℃	1 min	1
变性	95℃	5 sec	40
退火 / 延伸（荧光信号收集）	60 °C	15 sec	

注1：该扩增程序已经在上海宏石医疗科技有限公司SLAN-96P/-48P全自动医用PCR分析系统、西安天隆科技有限公司Gentier 96R全自动医用PCR分析系统上进行验证，如在其它设备上使用，遇到问题可与我司技术人员联系。

注2：有些仪器的荧光信号采集时间大于15 sec，按照仪器最小时间设置荧光信号收集时间即可。

⑤结果分析

阳性对照和阴性对照的扩增结果应满足下表判定结果：

表5 质控结果分析

质控样本	FAM通道	HEX通道
无模板对照	NoCt	NoCt
阳性对照	Ct 值≤ 35	Ct 值≤ 35
阴性对照	NoCt	Ct 值≤ 35

※质控结果复孔均符合表5的判定结果后，才能对待测样本进行结果判定；如结果与表5不符，待测样本的判定结果可能不可靠，需要分析原因后重新检测判定。

按照下表进行待测样本的结果判定：

表6 待测样本的结果判定

FAM 通道	HEX 通道	结果判定
Ct 值≤ 40	Ct 值≤ 40 或者 NoCt	真菌阳性
NoCt	Ct 值 > 35 或者 NoCt	存在 PCR 抑制
NoCt	Ct 值≤ 35	真菌阴性

※若存在PCR抑制，需要重新提取再检测或者对样品进行合适处理消除抑制因子后再进行提取检测。

※当不存在PCR扩增抑制时，FAM通道复孔Ct≤40与不检出同时存在，充分混匀样本后重复检测不小于2反应孔，依旧有孔出现Ct≤40的结果，判为真菌阳性；重复检测所有孔都为NoCt时，判为真菌阴性。

⑥注意事项

- 1)本产品仅供科研使用。
- 2)实验过程，操作人员应佩戴手套与口罩进行操作，人可能携带真菌，避免污染待测样本和检测体系。
- 3)注意实验前后的杀菌清洁处理。提前对实验耗材、仪器和工作台等进行消杀，避免引入外源污染干扰实验结果。
- 4)使用本试剂前请仔细阅读说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样，严格按照说明书步骤操作。
- 5)实验室管理需尽量遵照PCR基因扩增实验室的管理规范，实验人员需进行专业培训，实验过程严格分区进行，各区各阶段不可交叉使用，避免阳性对照、阳性样本对检测体系的污染，所有消耗品仅作一次性使用。
- 6)体系配制和样本处理推荐使用生物安全柜，以防止交叉污染。
- 7)冻存的试剂需在使用前在冰上充分融化并混匀。
- 8)样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求。
- 9)反应管完成反应后，请勿打开反应管盖子。
- 10)请在有效期内使用试剂盒。
- 11)不同批号的试剂组分不可互换使用。

【参考文献】

- 1.中国药典2020版：1101 无菌检查法
- 2.中国药典2020版：9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则
- 3.《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》
- 4.《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》
- 5.美国药典 USP44<71>：Sterility Tests
- 6.日本药典 JP17<4.06>：Sterility Tests
- 7.聚合酶链反应（PCR）检验实验室检查要点指南（2016版）



文件版本号：2024 -V1.0.1

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网站：www.yocon.cn

