

Broad-Spectrum Fungi qPCR
Detection Kit

广谱版真菌检测试剂盒（qPCR 法）

（Broad-Spectrum Fungi qPCR Detection Kit）

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



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®

广谱版真菌检测试剂盒（qPCR法）说明书

【试剂盒简介】

广谱版真菌检测试剂盒（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。

本试剂盒已验证可检测常见的5种念珠菌属真菌（白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌）、3种曲霉属真菌（黑曲霉、烟曲霉、巴西曲霉）、产黄青霉、新型隐球菌和限制性马拉色菌（*Malassezia restricta*），共11种真菌。经序列比对，可匹配约1950种真菌，与细菌、支原体和293细胞等无交叉反应，具备灵敏度高、特异性好等特点。

本试剂盒使用FAM和HEX荧光探针进行检测，FAM通道检测真菌特异性扩增，HEX通道检测内质控扩增。内质控可在PCR反应阶段加入，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。

与本公司核酸提取试剂盒（货号：MK0104-50）搭配使用，可简便快速提取样品中的真菌DNA，排除不同样本基质的干扰，提高检测的灵敏度。已验证黑曲霉和白色念珠菌的灵敏度低至10-100 CFU/mL，建议配套使用。

【试剂盒组成】

表1 试剂盒组分

试剂名称	货号	规格（50 T）
5×Fu 反应液	FuA2-50	250 μL×1 管
酶	FuB2-50	7.5 μL×1 管
Fu 阳性质控	FuC2-50	125 μL×1 管
Fu 内质控	FuD2-50	125 μL×1 管
PCR 稀释液	FuE2-50	1000 μL×2 管

* 5×Fu反应液保存和使用过程注意避光，所有试剂取用时应避免微生物和核酸污染。使用完毕尽快放回-20°保存。

【产品规格】

产品货号：FU0002-50

产品规格：50T/盒

【有效期】

试剂盒需在-20℃保存，12个月。

初次使用时，建议将组分分装到无菌无核酸残留的离心管中以减少反复冻融次数和降低污染风险。

经验证，试剂反复冻融10次不影响检测效果。

【适用机型】

含有FAM和HEX双通道的荧光定量PCR仪，推荐使用上海宏石SLAN-48P/SLAN-96S。

【实验所需但试剂盒中未含材料】

- * 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- * 八联管或 96孔qPCR 板
- * 1000 μ L、200 μ L、100 μ L、10 μ L 无菌低吸附带滤芯枪头
- * 75%酒精及核酸清除剂

【相关设备】

- * 超净台或生物安全柜
- * 高速离心机及掌式离心机
- * 漩涡振荡器
- * 荧光定量 PCR 仪
- * 不同规格微量移液器

【实验前准备】

1. 穿戴无菌、无核酸污染的工作服、一次性口罩、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作区及环境采取适当方式消毒，去除残留核酸。需要使用的设备和耗材转移到相应工作台内，工作台内紫外照射至少30 min，先后喷洒75%酒精和核酸清除剂全面擦拭消毒。
3. 将试剂盒从冰箱-20℃以下区域转移至冰上或2~8℃条件下融化，除组分FuB2-50外均需涡旋振荡混匀，所有组分瞬时离心转移到工作台内，实验全程应遵守无菌操作。
4. 实验严格分区操作（阴性区、待测样本区、阳性区和扩增区），相关实验应至少在各区域的超净工作台内操作。阴性区：试剂配制及无模板对照加样区；待测样本区：待测样本及阴性对照加样区（可与样本提取区共用）；阳性区：阳性质控加样区（可以与待测样本区共用，但使用阳性质控时一定要在待测样本加样完成后，阳性质控加样后做好操作区的核酸清除工作）；扩增区：qPCR反应体系的扩增。

【实验流程】

1. 样本准备

待测样本需要进行核酸提取，推荐使用本公司核酸提取试剂盒（货号：MK0104-50）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。提取时每份待测样本加入2.5 μ L内质控，添加内质控时间点参考本公司的核酸提取说明书。

阴性对照需与待测样本同步进行核酸提取，以评估是否存在样本交叉污染或环境污染情况，推荐使用确定无污染的与待测样本同类型的样本作为阴性对照。

注：本产品检测模板为真菌核酸。若待测样本中含有由真菌表达的重组蛋白，那检测结果可能会出现阳性（组分中的真菌核酸残留导致）。为确保检测结果的准确性，请在使用前仔细确认样本的组成。

2. qPCR检测

2.1 根据所要检测样本的数量，计算所需反应孔数，一般做 2 个重复孔。

配置反应孔数 $N = (1 \text{ 个阳性对照} + 1 \text{ 个阴性对照} + 1 \text{ 个无模板对照} + \text{待测样本个数}) \times \text{重复数} + 1$

注：实验中存在误差损失量，建议多配1孔。

2.2 反应体系配制（阴性区）

将试剂盒中各组分提前融化并充分混匀后使用。在混匀过程可能出现气泡，轻弹离心管可消除气泡，快速离心将液体收集到管底部。如果待测样本和阴性对照提取时加入内质控，按照表2配制体系；如果提取时没有添加内质控，按照表3配制反应体系。

根据需求按照表2或表3配制反应体系，充分混匀后按照单孔总体积（20 / 17.5 μL ）分装到 PCR 反应管中。

A. 待测样本与阴性对照在提取时加入内质控，体系配制参考下表：

表2 qPCR反应体系配置表A

组分	单孔用量	配制用量
5×Fu 反应液	5 μL	5 $\mu\text{L} \times N$
酶	0.15 μL	0.15 $\mu\text{L} \times N$
PCR 稀释液	14.85 μL	14.85 $\mu\text{L} \times N$
总体积	20 μL	20 $\mu\text{L} \times N$

B. 待测样本与阴性对照没有在提取加入内质控时，体系配制参照下表：

表3 qPCR反应体系配置表B

组分	单孔用量	配制用量
5×Fu 反应液	5 μL	5 $\mu\text{L} \times N$
酶	0.15 μL	0.15 $\mu\text{L} \times N$
PCR 稀释液	12.35 μL	12.35 $\mu\text{L} \times N$
总体积	17.5 μL	17.5 $\mu\text{L} \times N$

2.3 加样（待测样本区）

内质控在加样时加入，需要先稀释10倍，将10倍稀释液加入反应孔中。10 倍稀释液需要现用现配，避免反复冻融。加样后封盖，轻弹离心管去除可能出现的气泡，快速离心收集液体到底部。配置好后应尽快进行PCR反应。加样分以下两种情况（与反应液配置情况保持一致）：

A. 待测样本与阴性对照在提取时加入内质控时，加样参考下表：

表4 各反应孔加样示例A

阳性对照	20 μL 反应液 + 2.5 μL 阳性质控 + 2.5 μL 内质控（10 倍稀释）
无模板对照	20 μL 反应液 + 5 μL PCR 稀释液
待测样本	20 μL 反应液 + 5 μL 待测样本提取液
阴性对照	20 μL 反应液 + 5 μL 阴性对照提取液

B.待测样本与阴性对照没有在提取时加入内质控时，加样参考下表：

表5 各反应孔加样示例B

阳性对照	17.5 μL 反应液 +2.5 μL 阳性质控 +2.5 μL 内质控 10 倍稀释液 + 2.5 μL PCR 稀释液
无模板对照	17.5 μL 反应液 +7.5 μL PCR 稀释液
待测样本	17.5 μL 反应液 +5 μL 待测样本提取液 +2.5 μL 内质控 10 倍稀释液
阴性对照	17.5 μL 反应液 +5 μL 阴性对照提取液 +2.5 μL 内质控 10 倍稀释液

2.4设置程序扩增

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，反应程序如下表所示：

表6 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	45
退火 / 延伸（荧光信号收集）	58 °C	15 sec	

注1：该扩增程序已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。

3.结果分析**3.1 质控结果分析**

分析模式选用阈值线（Single Threshold mode），多数仪器默认阈值设置在基线荧光标准差的10倍处，一般情况下选择默认阈值即可。若有需要也可适当调整FAM通道的基线阈值在阳性对照FAM通道荧光值的1/10-1/20之间，HEX通道的基线阈值在阳性对照HEX通道荧光值的1/10处。结果判定前需先满足下表质控判定结果：

表7 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

3.2 样本结果判定

各对照符合质控分析后，按照下表进行样本结果判定：

表8 待测样本的结果判定

FAM 通道	HEX 通道	结果判定
Ct 值 ≤ 37	Ct 值 ≤ 45 或者 NoCt	真菌阳性
NoCt	Ct 值 ≤ 35	真菌阴性
NoCt	Ct 值 > 35 或者 NoCt	存在 PCR 抑制，需复测
边界值 $37 < Ct \leq 45$	Ct 值 ≤ 45 或者 NoCt	结果存疑，需复测

需要复测的情况说明：出现边界值（FAM通道 $37 < Ct \leq 45$ ，且复孔检测时多为单孔检出）的检测结果，原因多为检测体系中出现及其微量的真菌核酸污染，或者检测样本中存在小于检测限浓度的微量真菌。需要重新提取检测或者加大提取量重新提取检测。

PCR抑制若是人员操作误差引起，如未正确加入内质控，需要重新提取检测；部分复杂基质（例如某些含有细胞或血浆的样本）也可能引起PCR抑制，可以参考提取说明书进行适当处理消除抑制因子后再进行提取检测。

当检测复孔数 ≥ 2 个时，复孔间判定不一致可以先重复qPCR检测；若复测结果判定依旧不一致，再重新提取并检测。若遇到特殊样本或其他难以判定结果的情况，可联系我司咨询具体解决方案。

【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：2025 -V1.0.0

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

