



真菌核酸提取 试剂盒

—— 使用说明书 ——

Version 1.1



武汉珈创生物技术股份有限公司

地址：湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷国际生物医药企业加速器 3.1 期 4 栋 1 层、2 层、3 层

微信公众号

www.canvestbio.com

bd@canvestbio.com

400 - 027 0021

武汉珈创生物技术股份有限公司

CANVEST® 真菌核酸提取试剂盒

Cat #JCFU25E

【试剂盒简介】

CANVEST® 真菌核酸提取试剂盒用于提取细胞样本中微量真菌 DNA，与 CANVEST® 真菌 qPCR 检测试剂盒配套使用，其灵敏度可达到 5-100CFU/mL。

本试剂盒可从单管细胞 2×10^7 个细胞中有效提取存在的真菌 DNA (最低 5CFU/ml)，如单管细胞数目少于 1×10^6 个，可跳过细胞基质清除步骤直接进行样本 DNA 提取。

【试剂盒组分】

表 1 试剂盒组分 A

组份	装量	储存条件
真菌裂解物 1	0.5g	RT
真菌提取物 1	0.1g	RT
真菌提取液 3	30 μ l	RT

表 2 试剂盒组分 B

组份	装量	储存条件
真菌裂解液 2	30 μ l	-20°C 以下
真菌提取液 2	30 μ l	-20°C 以下

【规格】

25 Extractions

【运输储存方法】

- 组分 A 常温运输，组分 B 干冰运输，试剂盒开封前，规定储存条件下有效期 1 年。
- 初次使用时，建议将各组分分装，以减少反复冻融次数和降低污染风险。

【实验准备】

- 配置真菌裂解液 1，称量 0.1g 真菌裂解物 1，溶于 5 ml 的无菌水中，注意现配现用。
- 配制真菌提取液 1，向真菌提取物 1 管中加入 1ml 无菌水，重悬，使用前现配，未用完的分装置于 4°C。
- 在样品准备时需要注意以下几点：

阴性提取对照 (NEC)：每次实验都需要设置一个 NEC 作为对照样品 (无菌水)，和待测样品同步操作，以评估是否存在样品交叉污染或环境污染，避免造成假阳性结果。

待测样品 (TS)：在提取过程中加入内部控制对照 IC (真菌 qPCR 检测试剂盒提供)，可以作为整个实验过程的质控，也可以在 PCR 扩增反应阶段加入内部控制对照 IC，以判断 qPCR 反应中是否存在抑制。

【实验流程】

一、细胞基质清除 (若细胞基质数量少于 10^6 个细胞，可跳过)

- 将 1mL 待检样品转移至 1.5 mL 的离心管 (DNase/RNase free) 中；
- 4°C, 16500g, 离心 10min 后取出，小心弃上清，但不要吸走沉淀；
- 向管中加入 1mL 真菌裂解液 1，吹打或涡旋振荡混匀至无明显沉淀，混匀完可能会出现透明胶状物质；
- 向管内加入 1 μ L 真菌裂解液 2，颠倒摇匀，此时胶状物质消失；
- 4°C, 16500g, 离心 10min 后取出，小心弃上清，但不要吸走沉淀；
- 向管内加入 1mL 无菌水，吹打或涡旋振荡混匀，4°C, 16500g, 离心 10min 后取出，小心弃上清，但不要吸走沉淀；
- 重复操作 6
- 得到的沉淀部分直接进行样本提取操作 (3)，也可以在 -20°C 的条件下储存 (不超过 10 天)，再进行样本提取操作。

二、样本提取

- 将 1mL 样品转移至 1.5 mL 的离心管 (DNase/RNase free) 中。

(2) 16500g, 10min 高速离心后, 小心弃去上清, 但不要吸走沉淀;

(3) 在保留沉淀的离心管中加入 25 μ L 真菌提取液 1 (每次取用前均需混匀), 反复吹打直至混匀, 依次加入 1 μ L 真菌提取液 2, 1 μ L 内部控制对照 IC (选加), 简短离心, 涡旋振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h, 温浴期间需涡旋 3 次。

注意: 添加 1 μ L 内部控制对照 IC 可监控提取和 qPCR 过程, 配置 qPCR 反应体系的时候不用再额外添加 IC。

(4) 向离心管中添加 1 μ L 真菌提取液 3, 涡旋振荡混匀, 56 $^{\circ}$ C 温浴 10min, 温浴期间需涡旋 3 次, 沸水浴 10min;

(5) 立即冰浴 1min, 16500g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min;

(6) 小心吸取 22 μ L 上清液 (避免吸到底部沉淀), 将其转移至新的离心管 (DNase/RNase free) 中。

注意事项

1. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书, 实验应规范操作。
2. 请尽量在完成样品提取处理当天进行后续 qPCR 检测, 以保证检测结果的准确性。
3. 注意加强实验环境控制, 减少环境中气溶胶的污染; 注意规范人员实验操作, 规避实验过程中引入的污染; 注意分区操作, 降低样品之间交叉污染的风险。
4. 建议使用无菌低吸附带滤芯枪头 (DNase/RNase free)。



真菌qPCR检测 试剂盒(探针法)

—— 使用说明书 ——

Version 1.1



武汉珈创生物技术股份有限公司

地址：湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路388号光谷国际生物医药企业加速器3.1期4栋1层、2层、3层

微信公众号

www.canvestbio.com

bd@canvestbio.com

400-027-0021

武汉珈创生物技术股份有限公司

CANVEST® 真菌qPCR检测试剂盒

Cat # JCFU50D

【试剂盒简介】

CANVEST® 真菌 qPCR 检测试剂盒主要适用于效期短、批量小，无法保证在产品使用前完成放行检查的细胞类制品，也可用于检测主细胞库、工作细胞库、病毒种子批是否有常见病原性真菌的污染。

本试剂盒中的引物探针可以对多种致病性真菌进行特异性检测，与原核基因组、人等哺乳类动物基因组不存在交叉反应，其核酸检测限为 1-5genome copies/reaction,同时参照《中国药典》(ChP 9201)、《欧洲药典》(EP 5.1.6)和《美国药典》(UPS 1223)，从专属性、检测性、等效性、重现性和耐用性等 5 个方面进行了全面的验证。

试剂盒中加入了内部控制系统，内部控制对照 (IC) 可在 PCR 扩增反应阶段加入，以判断待检样本对扩增反应是否存在抑制；也可在样本提取阶段加入，作为实验整体对照，同时监测提取得率以及样本中可能存在的 PCR 抑制情况。经过验证，同时使用《CANVEST® 真菌核酸提取试剂盒》和《CANVEST® 真菌 qPCR 检测试剂盒》对样本进行提取和检测，其灵敏度可达到 5-100CFU/mL，建议配套使用。

【试剂盒组分】

表 1 试剂盒组分

组份	装量 (50 Tests)	储存条件
真菌 qPCR 反应液 1	600µl	-20°C及以下,避光
真菌 qPCR 反应液 2	60µl	-20°C及以下,避光
内部控制对照 (IC)	100µl	-20°C及以下
阳性对照 (PC)	250µl	-20°C及以下
RNase-free Water	1ml	-20°C及以下

【规格】

50 Reactions

【运输储存方法】

1. 干冰运输。试剂盒开封前，-20°C及以下保存，有效期八个月。
2. 初次使用时，建议将各组分分装，以减少反复冻融次数和降低污染风险。

【适用机型】

含有 FAM™和 HEX™双通道的荧光定量 PCR 仪，优选：Bio-rad CFX96、Bio-rad Connect。

【实验准备】

在提取过程中可直接添加内部控制对照，在 qPCR 阶段添加内部控制对照需使用无核酸酶水将其进行 10 倍稀释后使用。

【实验流程】

一、样本提取

1、待测样本 TS

取 1mL 待测样本进行核酸提取，详见《CANVEST® 真菌 DNA 提取试剂盒》说明书。

注意：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。

2、阴性提取对照 NEC

阴性提取对照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的情况。

二、样本 qPCR 检测

1、qPCR 反应液的准备

1.1 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。

反应孔数 = (1 个阳性对照 PC + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性提取对照 NEC + N 个待测

样本) × 2

注：阳性对照 (PC)：Positive control；无模板对照 (NTC)：No template control；阴性提取对照 (NEC)：Negative extraction control；待测样本 (TS)：Test sample

1.2 根据反应孔数计算所需的 Mix 总量：

推荐 Mix 总量 = (反应孔数 + 2) × 15μL (含有 2 孔的损失量)

1.3 单孔用量

表 2 qPCR Mix①配制表

组分	单孔用量
真菌 qPCR 反应液 1	11μl
真菌 qPCR 反应液 2	1.1μl
内部控制对照 (IC) 已稀释 10 倍	
RNase-free Water	2.9μl
总体积	15μl

* 此体系适用于提取过程中已添加 IC 的样本

表 3 qPCR Mix②配制表

组分	单孔用量
真菌 qPCR 反应液 1	11μl
真菌 qPCR 反应液 2	1.1μl
内部控制对照 (IC) 已稀释 10 倍	1μl
RNase-free Water	1.9μl
总体积	15μl

* 此体系适用于提取过程中未添加 IC 的样本

2. 加样

将所有溶液在冰上溶解，轻微振荡混匀后根据表 4 所示加样，封盖，快速离心，配置好反应液后应尽快进行 PCR 反应。

表 4 各反应孔加样示例

	提取过程中添加 IC	提取过程中不添加 IC
PC	15μl qPCR Mix② + 5μl PC	15μl qPCR Mix② + 5μl PC
NTC	15μl qPCR Mix② + 5μl RNase-free Water	15μl qPCR Mix② + 5μl RNase-free Water
NEC	15μl qPCR Mix① + 5μl NEC 提取液	15μl qPCR Mix② + 5μl NEC 提取液
TS	15μl qPCR Mix① + 5μl TS 提取液	15μl qPCR Mix② + 5μl TS 提取液

3. 程序

在荧光定量 PCR 仪上运行程序，勾选 FAM 和 HEX 作为荧光基团。

PCR 反应程序如下：

表 5 qPCR 反应程序

预变性	95°C for 10min <small>过程中不添加 IC</small>
42cycles	95°C for 15sec
	50°C for 30sec
	72°C for 20sec (Plate Read)

4. 结果判定

分析模式选用阈值线 (Single Threshold mode)，FAM 通道的基线阈值选择 PC (FAM 通道) 荧光值的 1/10，HEX 通道的基线阈值选择 NTC (HEX 通道) 荧光值的 1/10。读取 TS、NEC、PC、NTC 的 CT 值。NEC、PC、NTC 的检测结果应为表 5 所示，真菌样本结果判定遵循表 6 原则：

表 6 质控结果分析

质控样本	真菌 FAM 通道	内控 HEX 通道
PC	阳性 (Ct ≤ 30)	无联系
NEC	阴性 (无 Ct 值或 Ct > 40)	阳性 (Ct ≤ 40)
NTC	阴性 (无 Ct 值或 Ct > 40)	阳性 (Ct ≤ 40)

表 7 真菌样本检测结果判定

真菌 FAM 通道	内控 HEX 通道	结果判定
阳性 (Ct≤40)	无联系	真菌阳性
阴性 (无 Ct 值或 Ct>40)	阴性 (无 Ct 值或 Ct>40)	PCR 抑制
阴性 (无 Ct 值或 Ct>40)	阳性 (Ct≤40)	真菌阴性

样本基质可能引起 qPCR 反应抑制，如果两个重复真菌阴性样本的 HEX 通道只有一个扩增阴性，则重复 qPCR，如果两个重复真菌阴性样本的 HEX 通道均为阴性，需要重新进行样本核酸提取进行 qPCR。

注意事项

1. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本预处理、样本提取、样本 qPCR 检测。
2. 注意加强实验环境控制，减少环境中气溶胶的污染；注意规范人员实验操作，规避实验过程中引入的污染；注意分区操作，降低样本之间交叉污染的风险；加样时先加阴性对照，并及时封盖；样本在 qPCR 排版时，阳性对照与待测样本、阴性对照可适当分开。
3. 配液和加样步骤都尽量在冰上操作。
4. 每个组分在使用前都应震荡混匀，瞬时离心。
5. 建议使用无菌低吸附带滤芯枪头 (DNase/RNase free)。