

泌尿生殖感染病原体靶向检测（联合探针锚定聚合测序法）说明书

版本号：23D26

【产品名称】

泌尿生殖感染病原体靶向检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

【包装规格】

48 人份/盒

【货号】

ATS02-05

【预期用途】

本试剂盒适用于男性尿液、尿道分泌物、前列腺液及精液，女性尿道分泌物、阴道分泌物、宫颈分泌物、宫腔分泌物等样本中的病原微生物检测，与配套的核酸提取试剂、测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）联合使用，用于定性检测疑似泌尿生殖系统感染患者样本中的病原体。

本试剂检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本方法采用多重 PCR 和高通量测序（NGS）技术，首先对样本中的核酸（DNA 和 RNA）进行提取，经过两轮 PCR 反应，完成测序文库制备。对文库定量和质检合格后，采用高通量测序仪对文库进行测序获得序列信息，然后通过配套软件与病原数据库进行比对，判读样本中是否存在靶标病原体，可用于辅助诊断病原体感染。本试剂盒的建库原理如图 1。

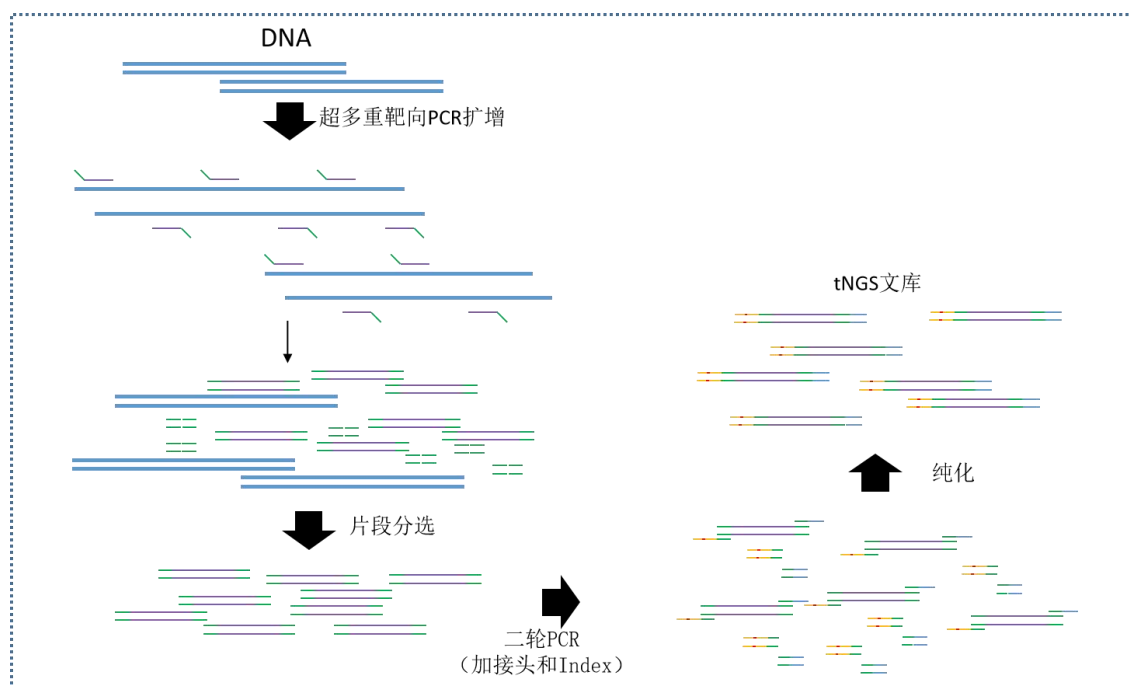


图 1 试剂盒建库原理图

【主要组成成分】

试剂盒	组分名称	规格	数量
试剂盒 1	逆转录缓冲液	110 μ L/管	1 管
	逆转录酶	55 μ L/管	1 管
	1st-PCR 缓冲液	270 μ L/管	1 管
	1st-PCR 扩增酶 1	160 μ L/管	1 管
	1st-PCR 扩增酶 2	55 μ L/管	1 管
	引物 1	280 μ L/管	1 管
	内标	55 μ L/管	1 管
	2nd-PCR 缓冲液	1400 μ L/管	1 管
	2nd-PCR 扩增酶	55 μ L/管	1 管
	引物 2	220 μ L/管	1 管
试剂盒 2	引物 3-N (含 48 个不同的 Index)	8 μ L/管	48 \times 1 管
试剂盒 3	无核酸酶水	2.5 mL/管	2 管
	纯化磁珠	3 mL/管	2 管

注：1) 不同批号试剂盒中各组分不可互换。

2) 引物 3-N 使用说明见附录。

3) 客户自备试剂（推荐）：

用途	试剂盒名称	生产企业
核酸提取	病原微生物核酸提取试剂	福州奥吉芯生物科技有限公司
测序	DNA 环化反应试剂盒	福州奥吉芯生物科技有限公司
	MGIEasy 环化试剂盒	深圳华大智造科技有限公司
	测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）	深圳华大智造科技有限公司
其他试剂	全能核酸清除剂	福州新创元生物科技有限公司
	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	赛默飞世尔科技公司
	Qubit™ RNA HS Assay Kit	赛默飞世尔科技公司
	无核酸酶水	赛默飞世尔科技公司
	无水乙醇（分析纯）	不限

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒 1 和试剂盒 2 于 -25 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存，试剂盒 3 于 2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂应避免反复冻融，反复冻融次数不超过 6 次，不应与有污染物品的样本混存。

3. 试剂盒 1 和 2 采用干冰运输，试剂盒 3 采用冰袋运输，运输时间≤5 天。
4. 生产日期及失效日期见试剂标签。

【适用仪器】

基因测序仪（MGISEQ-200、MGISEQ-2000）

【样本要求】

1. 适用的样本类型：男性尿液、尿道分泌物、前列腺液及精液，女性尿道分泌物、阴道分泌物、宫颈分泌物、宫腔分泌物等。
2. 样本采集过程：参照临床检验样本采集指南采集指南要求男性尿液、尿道分泌物、前列腺液及精液，女性尿道分泌物、阴道分泌物、宫颈分泌物、宫腔分泌物等临床样本，无菌操作，采集后的样本置于无菌管中。
3. 样本采集注意事项：样本在采集、保存和转移时避免污染。
4. 样本保存与运输：样本采集后，建议 12 小时内进行检测；如果不能及时检测，则置于-18℃及以下保存，在 1 个月内完成检测；样本长期保存则置于-70℃以下，1 年内有效。样本采用干冰运输。冻融次数应不超过 3 次。冷冻样本检测前应将样本置于室温融化，并充分混匀后使用。
5. 样本安全性：所有样本均视为有潜在的感染性，操作时按国家相关标准执行。
6. 核酸的保存：提取的核酸，应立即进行文库制备，如果不能及时检测，则置于 2℃~8℃保存，12 小时内进行文库制备，或置于-18℃及以下温度保存；文库制备完成后应立即进行测序，如果不能及时测序，则置于-18℃及以下温度保存，30 天内完成检测。

【检验方法】

1 试剂准备

- (1) 将试剂盒1中试剂从试剂盒中取出，酶类试剂需短暂离心，置于冰上备用；其他试剂置于冰上融化，振荡混匀，短暂离心备用。
- (2) 磁珠在使用前应置于室温平衡30 min，加入前充分混匀。
- (3) 采用无水乙醇和分子级水配制80%乙醇，根据用量现配现用。

2 核酸提取

推荐使用福州奥吉芯生物科技有限公司生产的“病原微生物核酸提取试剂”，严格按照说明书操作步骤进行样本核酸的提取。

每批次临床样本提取时，带一个无核酸酶水作为阴性质控品样本进行提取。

3 核酸样本定量及准备

推荐使用 Qubit 荧光定量仪或同等功能的仪器对提取的核酸（DNA & RNA）进行浓度测定，严格按照说明书操作。核酸浓度应大于等于 0.1ng/ μL，否则视为提取不合格，需重新提取。

4 文库构建

4.1 逆转录（PCR 扩增室 1）

4.1.1 对提取后的总核酸振荡混匀，随即进行逆转录操作。根据待测样本数量（每次检测带一个阴性质控品）计算本次反应液配制所需总体积，按照表 1 配置逆转录反应混合液。配制操作需在冰盒上。

表 1 逆转录反应混合液

试剂	一个反应标准量
逆转录缓冲液	2 μL
逆转录酶	1 μL
总体积	3 μL

4.1.2 将配制好的逆转录反应混合液按 3 μL /管分装于 PCR 管或八连管中，向每个 PCR 管中加 7 μL 样本提取核酸产物；

4.1.3 充分混匀并离心，将 4.1.2 逆转录反应液置于 PCR 仪上运行表 2 的 PCR 反应程序；

表 2 逆转录 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
25 $^{\circ}\text{C}$	5min	1
37 $^{\circ}\text{C}$	15min	1
85 $^{\circ}\text{C}$	5s	1
4 $^{\circ}\text{C}$	保存	1

4.1.4 反应结束后将 4.1.3 逆转录反应产物离心。

4.2 第一轮 PCR 扩增（PCR 扩增室 1）

4.2.1 取 1.5ml 离心管，按照表 3 在冰盒上配制第一轮 PCR 反应混合液。

表 3 第一轮 PCR 反应混合液

试剂	一个反应标准量
1st-PCR 缓冲液	5 μL
1st-PCR 扩增酶 1	3 μL
1st-PCR 扩增酶 2	1 μL
引物 1	5 μL
内标	1 μL
总体积	15 μL

4.2.2 将上述体系配制好，涡旋混匀并离心，避免产生气泡。再将一轮 PCR 反应混合液分装移至 4.1.4 中的逆转录产物中；

4.2.3 充分混匀，置于 PCR 仪上运行表 4 的 PCR 反应程序；

表 4 第一轮 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
37°C	10min	1
95°C	3min	1
95°C	30s	25
60°C	3min	
72°C	1min	
72°C	1min	1
4°C	保存	1

4.2.4 反应结束后瞬时离心，每个反应管中补加无核酸酶水 25 μ L 至总体积 50 μ L，再加入 30 μ L 磁珠，充分混匀，室温静置 5min，置于磁力架静置 3min 至溶液澄清，转移上清至新孔；

4.2.5 加入 30 μ L 磁珠至上一步上清，室温孵育 5min，转移至磁力架上静置约 3min 至磁珠完全吸附，弃上清；

4.2.6 加入 200 μ L 80%乙醇（需现配现用），在磁力架上静置 30s，或用移液器吹吸 3~5 次，即可弃上清液；

4.2.7 重复 4.2.6 一次，将离心管瞬时离心后置于磁力架上，用 10 μ L 移液器吸尽管中残留液体，室温晾干至磁珠表面哑光（晾干时间最长不超过 5min）；

4.2.8 加入 15 μ L 无核酸酶水，充分混匀，室温静置 5min，置于磁力架 3min 至溶液澄清。

4.3 第二轮 PCR 扩增（PCR 扩增室 2）

4.3.1 根据表 5 的方法在 1.5mL 离心管中配制检测所需量的第二轮 PCR 反应混合液，在冰上操作。

表 5 第二轮 PCR 反应混合液

试剂	一个反应标准量
2nd-PCR 缓冲液	25 μ L
2nd-PCR 扩增酶	1 μ L
引物 2	4 μ L
无核酸酶水	6 μ L
总体积	36 μ L

4.3.2 将配好的反应液分装至新的 PCR 管或八连管中，分别加入 4.2.8 步骤的纯化产物 10 μ L，再按照每个孔中加入 4 μ L 不重复的引物 3-N，并做好记录；

4.3.3 充分混匀，在 PCR 仪上运行表 6 的 PCR 反应程序；

（注：为了防止污染，第二轮 PCR 的反应及纯化，建议与第一轮 PCR 分开，步骤 4.3.2 以后程序在 PCR 扩增室 2 进行。）

表 6 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
95°C	2min30s	1
95°C	30s	17
62°C	35s	
72°C	35s	
72°C	5min	1
4°C	保存	1

4.3.4 反应结束后，瞬时离心，向扩增产物中加入 50 μ L 磁珠，涡旋混匀，室温孵育 5min，瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上静置约 3min，磁珠完全吸附，弃废液；

4.3.5 加入 200 μ L 80%乙醇（需现配现用），在磁力架上静置 30s，或用移液器吹吸 3~5 次即可弃上清液；

4.3.6 重复步骤 4.3.5 一次，将离心管瞬时离心后置于磁力架上，用 10 μ L 移液器吸尽管中残留液体，室温晾干磁珠至表面哑光（不超过 5min）；

4.3.7 加入 25 μ L 无核酸酶水，充分涡旋混匀，室温静置 5min，置于磁力架 3min 至溶液澄清，取 23 μ L 上清液于新 1.5ml 离心管中，标明样本编号、接头号和日期。

（注：建议 PCR 实验室使用完，使用全能核酸清除剂对实验台、PCR 仪、移液器等进行核酸清除，以消除文库构建过程 DNA 产物对检测结果的影响。）

5 文库质控

用 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 试剂检测文库的浓度，当检测文库的浓度低于 0.5ng/ μ L 时，建议重新构建文库。

6 上机测序

6.1 环化反应

建议采用深圳华大智造科技有限公司生产的“MGIEasy 环化试剂盒（货号：100005259）”或福州奥吉芯生物科技有限公司生产的“DNA 环化反应试剂盒（货号：ALT03-03）”；如使用其它供应商生产的环化试剂盒需自己评估适配性；

如果使用福州奥吉芯生物科技有限公司生产的“DNA 环化反应试剂盒（货号：ALT03-03）”，可按如下步骤进行文库环化。

6.1.1 环化反应试剂的准备

取出环化反应缓冲液和连接酶，置于冰盒上，待融化后用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒后，短暂离心置于冰盒上备用。

注意： 不要将连接酶室温解冻，不要用手长时间触碰管壁。

6.1.2 根据 DNA 文库定量结果，于新的 PCR 管中将待测文库根据标签接头编号等量混合，取 200 ng DNA 混合文库，用 TE 缓冲液将体积补充至 46 μ L（若混合文库体积大于 46 μ L，请重新制备文库），充分混匀后短暂离心 5s，置于 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 孵育 3 min，孵育完毕即刻取出 PCR 管放置于冰上冷却 2 min。

6.1.3 向上述反应体系中加入 13 μ L 环化反应缓冲液、1.5 μ L 连接酶，充分混匀，短暂离心，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。反应产物可进入下一步反应或置于 -20 $^{\circ}$ C 以下冻存。

6.3 测序

建议采用深圳华大智造科技有限公司生产的 MGISEQ-200 平台或 MGISEQ-2000 平台对应的测序通用试剂盒进行文库 DNB 制备和上机测序。

也可采用国内外其它厂商提供 MGISEQ-200 平台或 MGISEQ-2000 平台对应的测序通用试剂盒进行文库 DNB 制备和上机测序，但需要自行进行适配性测试。

7 信息分析

将测序获得的原始数据传输至本地服务器，采用福州奥吉芯生物科技有限公司开发的“tNGS 通用型分析系统”对原始数据进行质检和生信分析。

【检验结果的质量控制】

1. 阴性质控品的检测结果应为试剂盒检测病原菌阴性，若检出试剂盒检测范围内病原体一种或多种阳性，说明环境中可能存在污染源；本次实验结果不可靠，需重新检测。
2. 每个样本中均有 3 种内标序列检出，否则本次实验结果不可靠，需重新检测。
3. 待检测样本数据量应 \geq 0.1M Reads。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅供科研使用。
2. 当待测样本中含有的病原体浓度核酸低于试剂的检测限，可能会发生假阴性结果。
3. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
4. 本试剂盒只能检测说明书中涵盖的病原体类型。因此当本试剂盒检测结果为阴性时，并不能排除被检测样本携带本试剂盒检测范围外的其他病原体。
5. 不合理的样本采集、转运、储存及提取核酸过程均有可能导致错误的检测结果。
6. 仅限于说明书规定的样本类型及适用机型。
7. 本试剂盒的检测结果应结合患者的症状/体征、病史、其他实验室诊断结果等情况进行综合分析以及解释，不得作为患者临床诊治或管理的唯一依据。
8. 导致假阴性结果的可能性分析：
 - 8.1 不合理的样本采集、处理、运输及保存条件；

- 8.2 基因序列的变异或其他原因导致的序列改变;
- 8.3 患者采样前采取了抗生素治疗会降低病原体的浓度, 低于试剂的检测限;
- 8.4 样本中目标物滴度过低, 低于试剂的检测限;
- 8.5 未经验证的其他干扰, 如内源性或外源引入样本的物质。
- 9. 导致假阳性结果的可能性分析:
 - 9.1 样本间的交叉污染;
 - 9.2 未经验证的其他交叉反应物质。

【产品性能指标】

检测限: 本试剂盒检测限为 100 copies/mL~1000 copies/mL。

【注意事项】

- 1. 本品仅用于科研使用, 使用前请仔细阅读本说明书, 所有操作须严格按说明书进行。
- 2. 病人使用抗微生物药物治疗后取样检测, 药物可能影响检测结果。
- 3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室与高通量测序实验室的管理规范, 实验人员必须进行专业培训。
- 4. 建议每次实验完, 使用全能核酸清除剂对实验室进行核酸清除。
- 5. 为防止污染, 实验过程严格分区进行, 所用耗材应灭菌后一次性使用, 实验中的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段用品不能交叉使用, 实验完毕后按标准 PCR 操作间的规范处理工作台和移液器。
- 6. 所有检测样品应视为具有传染性物质, 实验过程中穿工作服, 戴一次性手套并经常替换手套以避免样品间的交叉污染; 样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求: 卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 7. 为防止污染, 使用本试剂盒时建议用一次性耗材和带滤芯吸头。实验完毕用 10%次氯酸钠溶液、75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器。

【基本信息】

生产企业名称: 福州奥吉芯生物科技有限公司

住所: 福建省福州市闽侯县南屿镇尧溪路 3 号福建省电子信息集团科学工业园二号厂房 4 层西侧 401

电话: 0591-85666335

邮编: 350100

附录

病原靶向捕获试剂盒中接头引物说明

1. 试剂盒中接头引物包含 2 种：引物 2 和引物 3 -N，用于对捕获的病原产物的两端加上测序接头序列，构建完整文库，进行后续测序。

(1) 引物 2 结构：

5Phos/-GAACGACATGGCTACGATCCGACT

(2) 引物 3-N 结构：

TGTGAGCCAAGGAGTTGXXXXXXXXXXTTGTCTTCCTAAGACCGCTTGG

*注：X 为 Index 序列。

2. 引物编号与试剂盒引物名称，及试剂标签的对应关系如下表所示：

试剂盒名称	试剂标签	Index 序列	试剂盒名称	试剂标签	Index 序列
引物 3-1	T-1	GTGCATAGCA	引物 3-25	T-25	CCTGTGTGTG
引物 3-2	T-2	CTCTATGCAC	引物 3-26	T-26	GACAGCACTA
引物 3-3	T-3	AGTACGCATT	引物 3-27	T-27	ATATCAGTGT
引物 3-4	T-4	TAGGTCCTGG	引物 3-28	T-28	AGGCATTACC
引物 3-5	T-5	TCATGAGCTT	引物 3-29	T-29	TCTGTGCTAT
引物 3-6	T-6	CAACTCTAGG	引物 3-30	T-30	CGATGTCAGG
引物 3-7	T-7	ACCGGATGCA	引物 3-31	T-31	GTCACAGCAA
引物 3-8	T-8	GGTACGATAC	引物 3-32	T-32	TAGCACAGCC
引物 3-9	T-9	AATTCGATAC	引物 3-33	T-33	GGCAGTGCCT
引物 3-10	T-10	ACGTAGTACG	引物 3-34	T-34	GTTAACGACG
引物 3-11	T-11	CGAGTACGTT	引物 3-35	T-35	ACATTACTTC
引物 3-12	T-12	GTCAGTGC GA	引物 3-36	T-36	TAGCACTGGA
引物 3-13	T-13	TCACACAGTT	引物 3-37	T-37	CTTGCGATAT
引物 3-14	T-14	TGTGCATCGG	引物 3-38	T-38	CAACTGCGTG
引物 3-15	T-15	CTGCGTCACA	引物 3-39	T-39	TCCGGATCAA
引物 3-16	T-16	GACATCGTAC	引物 3-40	T-40	AGGTCTAAGC
引物 3-17	T-17	CCGGAACGAG	引物 3-41	T-41	CCAATCTGTC
引物 3-18	T-18	TCCTGGCACG	引物 3-42	T-42	CGGCCAATTC
引物 3-19	T-19	GATATCGCTT	引物 3-43	T-43	ATTGATGCGT
引物 3-20	T-20	AGACAGTTGC	引物 3-44	T-44	GACTGTCACG
引物 3-21	T-21	CTGACCATTA	引物 3-45	T-45	TTCAAGTTAA
引物 3-22	T-22	GGTCCTAGGT	引物 3-46	T-46	ACGGTCGCGT
引物 3-23	T-23	TAATGTGCAA	引物 3-47	T-47	TGATGACACA
引物 3-24	T-24	ATCGTATACC	引物 3-48	T-48	GATCCGAGAG

3. 引物接头 Index 碱基平衡关系如下：每一列 8 个 Index 之间碱基平衡。

	1	2	3	4	5	6
A	T-1	T-9	T-17	T-25	T-33	T-41
B	T-2	T-10	T-18	T-26	T-34	T-42
C	T-3	T-11	T-19	T-27	T-35	T-43
D	T-4	T-12	T-20	T-28	T-36	T-44
E	T-5	T-13	T-21	T-29	T-37	T-45
F	T-6	T-14	T-22	T-30	T-38	T-46
G	T-7	T-15	T-23	T-31	T-39	T-47
H	T-8	T-16	T-24	T-32	T-40	T-48