

分枝杆菌及结核耐药基因靶向检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法） 说明书

版本号：23A09

【产品名称】

分枝杆菌及结核耐药基因靶向检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

【包装规格】

48 人份/盒

【货号】

ATQ02-05

【预期用途】

本试剂盒适用于对人肺泡灌洗液、痰液、血液（临床明确诊断为血流感染患者）、脑脊液及其他病灶部位样本的疑似结核、非结核分枝杆菌的检测及耐药基因检测。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，用于定性检测样本中的结核、非结核分枝杆菌，及结核分枝杆菌临床常见耐药基因位点检测。

本试剂检测结果主要用于对疑似分枝杆菌引起的感染的辅助诊断，以及对结核分枝杆菌耐药检测。以便于临床医生结合患者其它临床诊断信息进行更加准确的疾病诊断。分枝杆菌检测结果不能单独作为确诊或排除病例的依据，耐药检测结果不作为药敏检测结果。

【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。

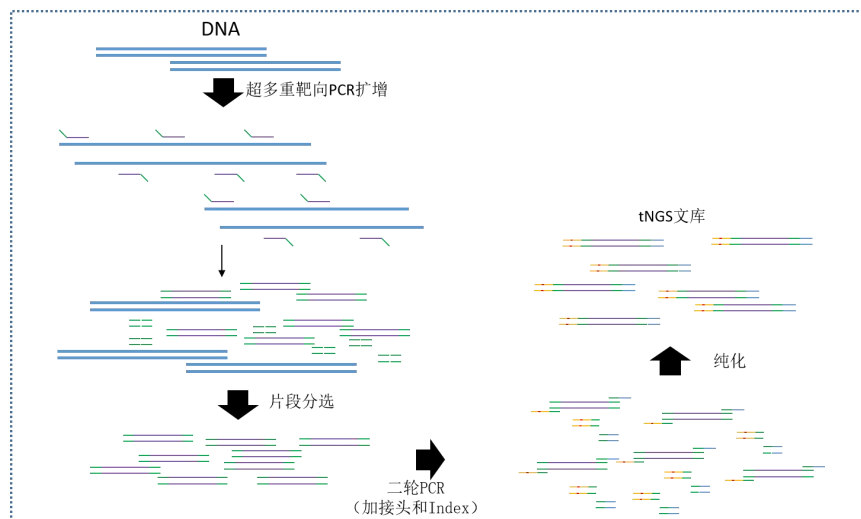


图 1 试剂盒建库原理图

【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 μL/管	1 管
	逆转录酶	55 μL/管	1 管
	1st-PCR Mix	420 μL/管	1 管
	1st-PCR 扩增酶 2	55 μL/管	1 管
	引物 NTM	270 μL/管	1 管
	内标	55 μL/管	1 管
	2nd-PCR 缓冲液	1400 μL/管	1 管
	2nd-PCR 扩增酶	55 μL/管	1 管
	引物 2	220 μL/管	1 管
试剂盒 2	引物 3-N (含 48 个不同的 Index)	8 μL/管	48×1 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℃ 保存，试剂盒 3 于 2~8℃ 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：人肺泡灌洗液样本、痰液、血液（仅适用于临床明确诊断为血流感染患者）、脑脊液等。
2. 样本采集过程：参照临床检验样本采集指南采集肺泡灌洗液、痰液、血液、脑脊液等，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 Mix	8 μL
1st-PCR 扩增酶 2	1 μL
引物 NTM	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 $^{\circ}\text{C}$	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°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°C 孵育 30 min。反

应产物可进入下一步反应或置于-20℃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，采用阿吉安（福州）基因医学检验实验室有限公司开发的“病原微生物靶向测序数据分析软件”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：分枝杆菌检测限为 100 copies/mL~1000 copies/mL，耐药基因突变检测限为 1%VAF。

【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	GTCAGTGCGA	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	ACGGTTCGCGT
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