ME Instruments Inc.
铭 毅 智 造

病原靶向测序检测试剂盒
(可逆末端终止测序法)

货号：MG0192

使用说明书

版本号：T200 V4.1.202311

声　明：请完整仔细阅读实验操作说明书后开始实验

本试剂盒仅限科研使用，不用于临床诊断

目 录

一、产品概述.....2
二、包装规格.....2
三、检测原理.....2
四、检测病原列表.....3
五、试剂盒组成.....6
五、产品运输与保存.....6
六、其它材料（需要但未包含的物料）.....7
客户自备：.....7
七、适用仪器.....7
八、样本要求.....7
九、操作流程.....8
十、注意事项.....13
十一 参考文献.....14
十二、历史版本.....14

一、产品概述

本试剂盒可用于疑似感染样本中的病原微生物检测，包括细菌、真菌、病毒等病原体引起的感染。

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。

二、包装规格

48 人份/盒

三、检测原理

本方法采用可逆末端终止测序法，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详见图 1。

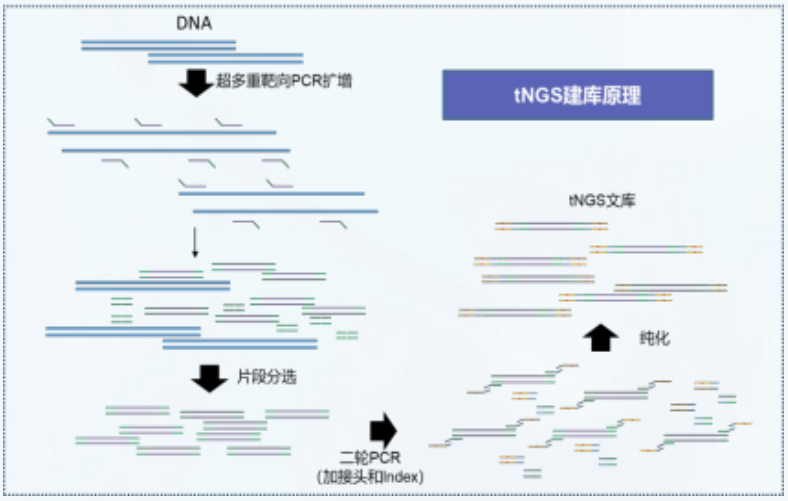


图 1 试剂盒建库原理图

四、检测病原列表

革兰氏阳性菌	肺炎链球菌、猪链球菌、中间链球菌、婴儿链球菌、咽峡炎链球菌、厌氧消化链球菌、无乳链球菌、唾液链球菌、停乳链球菌、缓症链球菌、化脓链球菌、变形链球菌、马肠链球菌、表皮葡萄球菌、头状葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌、路邓葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、屎肠球菌、鸟肠球菌、粪肠球菌、鹑鸡肠球菌、星形诺卡菌、豚鼠耳炎诺卡菌、巴西诺卡菌、皮疽诺卡菌、圣乔治诺卡菌、脓肿诺卡菌、偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌、结核分枝杆菌、龟分枝杆菌、蟾分枝杆菌、胞内分枝杆菌、破伤风梭菌、艰难梭菌、第三梭菌、产气荚膜梭菌、败毒梭菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、炭疽芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌、星座链球菌、沃氏葡萄球菌
革兰氏阴性菌	铜绿假单胞菌、肠道沙门菌、肺炎克雷伯菌、解鸟氨酸拉乌尔菌、产酸克雷伯菌、产气克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、大肠弯曲杆菌、阴沟肠杆菌、粘质沙雷菌、大肠杆菌、鼠疫耶尔森菌、具核梭杆菌、坏死梭杆菌、死亡梭杆菌、新洋葱伯克霍尔德菌、多食伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、鼻疽伯克霍尔德菌、嗜麦芽窄食假单胞菌、嗜水气单胞菌、产碱假单胞菌、牙龈卟啉单胞菌、百日咳鲍特菌、支气管鲍特菌、霍氏鲍特菌、脆弱拟杆菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、卡他莫拉菌、流产布鲁菌、马耳他布鲁菌、猪布鲁菌、嗜肺军团菌、脑膜脓毒伊丽莎白菌、和平空间

	站伊丽莎白菌、创伤弧菌、霍乱弧菌、问号状钩端螺旋体、梅毒螺旋体、伯氏疏螺旋体、汉氏巴尔通体、摩氏摩根菌、克氏柠檬酸杆菌、弗劳地柠檬酸杆菌、产吲哚金黄杆菌、按蚊伊丽莎白金菌、唐菖蒲伯克氏菌、副百日咳博德特菌、欣策博德特菌
真菌	白色念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、库德里阿兹氏毕赤酵母、解脂耶罗威亚酵母菌、葡萄牙棒孢酵母、热带念珠菌、黄曲霉、 烟曲霉、 黑曲霉、土曲霉、马尔尼菲篮状菌、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌、新型隐球菌、格特隐球菌、耶氏肺孢子菌、微小根毛霉、小孢根霉、荚膜组织胞浆菌、尖端赛多孢霉、伞枝横梗霉、皮炎外瓶霉
DNA 病毒	BK 多瘤病毒(BKPyV)、JC 多瘤病毒(JCPyV)、KI 多瘤病毒(KIPyV) 、WU 多瘤病毒(WuPyV)、梅克尔细胞多瘤病毒(MCPyV)、人类疱疹病毒 1 型(HHV-1)、人类疱疹病毒 2 型(HHV-2)、人类疱疹病毒 3 型(VZV)、人类疱疹病毒 5 型(CMV)、人类疱疹病毒 4 型(EBV)、人类疱疹病毒 6A 型(HHV-6A)、人类疱疹病毒 6B 型(HHV-6B)、人疱疹病毒 7 型(HHV-7)、人类疱疹病毒 8 型(HHV-8)、人类博卡病毒(HBoV)、人类腺病毒 A(HAdV-A)、人类腺病毒 B(HAdV-B)、人类腺病毒 C(HAdV-C)、人类腺病毒 D(HAdV-D)、人腺病毒 F (HAdV-F) 、人类细小病毒 B19 型(B19V)、猴痘病毒(MPXV)、猪疱疹病毒 1 型(PRV)、乙型肝炎病毒(HBV)

RNA 病毒	鼻病毒 A(HRV-A)、鼻病毒 B(HRV-B)、鼻病毒 C(HRV-C)、人类偏肺病毒(HMPV)、日本脑炎病毒、新型布尼亚病毒、基孔肯雅病毒、人冠状病毒 229E(HCoV-229E)、人冠状病毒 HKU1(HCoV-OC43)、人冠状病毒 NL63(HCoV-HKU1)、人冠状病毒 OC43(HCoV-NL63)、SARS 冠状病毒(SARS-CoV)、新型冠状病毒(SARS-CoV2)、呼吸道合胞病毒(HRSV)、狂犬病毒(RABV)、登革热病毒(DENV)、甲型流感病毒 、乙型流感病毒、人类副流感病毒 1 型(HPIV-1)、人类副流感病毒 2 型(HPIV-2)、人类副流感病毒 3 型(HPIV-3)、人类副流感病毒 4 型(HPIV-4)、人轮状病毒、寨卡病毒、丙型流感病毒、诺如病毒、麻疹病毒、肠道病毒 A 型、肠道病毒 B 型、肠道病毒 C 型、人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)、人类免疫缺陷病毒 2 型(HIV-2)
非典型病原	恙虫病东方体、猫立克次体、普氏立克次氏体、惠普尔养障体、肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体、人型支原体、微小脲原体、解脲脲原体、生殖支原体、贝纳特柯克斯体
寄生虫	刚地弓形虫、利什曼原虫、广州管圆线虫、恶性疟原虫、华支睾吸虫、牛血吸虫、埃及血吸虫、日本血吸虫、曼氏血吸虫、溶组织内阿米巴、卵形疟原虫、三日疟原虫、间日疟原虫、隐孢子虫
耐药基因	KPC-2、OXA-23、VIM-2、CTX-M-14、pbp1a、marR、TEM-1、ermB、mecA、VanA、penA、gyrA、parC、RPOB、katG、rrs、23S

五、试剂盒组成

包装盒	组分	规格	数量	储存条件
Box 1	扩增试剂 1	280 μL/管	1 管	-20℃
	扩增试剂 2	800 μL/管	1 管	-20℃
	引物 Mix-1	60 μL/管	1 管	-20℃
	引物 Mix-2	280 μL/管	1 管	-20℃
	扩增试剂 3	1100 μL/管	1 管	-20℃
	NC	1.9 mL，3rxns	1 管	-20℃
	无核酸酶水	1 mL	1 管	-20℃
Box 2	引物 Mix-3（包含 48 个不同的 Index1-48，PE1.0）	4.2 μL/孔×48	48 孔	-20℃
Box 3	纯化磁珠	6.5mL	1 瓶	4℃

注：不同批号试剂盒中各组分不可互换。

六、产品运输与保存

1. 试剂盒子 1 和试剂盒 2，应于-20℃±5℃保存，反复冻融次数不超过 5 次，不应与有污染物品的样本混存。

2. 试剂盒 3 保存于 4℃： 有效期为 12 个月。

3. 生产日期及失效日期见试剂标签。

七、其它材料（需要但未包含的物料）

客户自备：

用途	试剂盒名称	生产企业	注册/备案证号
其他试剂	Qubit™ dsDNA 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	/

八、适用仪器

基因测序仪(UniSeq 2000)

九、样本要求

1. 适用的样本类型：血液、肺泡灌洗液、脑脊液、痰液、拭子保存液、脓液等。

2. 样本采集：参照临床检验样本采集指南采集，无菌操作，采集后的样本置于无菌管中,怀疑 RNA 病原存在时，使用专用的保存液保存样本，或采集后立即于-20℃以下保存。

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，常温放置时 2 小时内进行提取；如果不能及时检测，则置于- 18℃~-25℃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，避免反复冻融。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℃ 下保存 12 小时内进行文库制备，或置于- 18℃~-25℃以下保存，5 天内完成文库制备；文库制备完成后立即进行测序，如果不能及时检测，则置于- 18℃~-25℃以下保存，30 天内完成检测。

十、操作流程

1 试剂准备

将包装盒 1 和 2 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。包装盒 3 中的磁珠在使用前应置于室温平衡 30min，加入前充分混匀。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 文库构建

2.1 RNA病原逆转录与第一轮扩增

2.1.1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(每次提取需要有1个阴性对照--NC)按照公式 N=待测样本量*110%，计算本次反应液总体积的配制，按照表 1 配置逆转录与第一轮扩增的反应混合液。配制操作需在冰盒上，整个过程体系配置需在试剂准备间进行；

表 1 RNA 病原逆转录反应混合液

试剂	一个反应标准量
扩增试剂 1	5 μL
引物 Mix-1	1 μL
无核酸酶水	10 μL

2.1.2将上述体系配制好之后转移至核酸提取间的生物安全柜中，向体系中添加 9 μl 样本提取的核酸。

2.1.3充分混匀，将 3.1.2 逆转录反应液转移至 PCR 扩增室 1 的PCR 仪上运行表 2 的PCR反应程序

表 2. RNA 病原逆转录与第一轮 PCR 反应程序

温度	时间	循环数	备注
55℃	15 min	1	热 盖：105℃ 反应体积：25 μL
95℃	3 min	1	
95℃	30 sec	30	
60℃	1 min		
72℃	30 sec		
72℃	3 min	1	
4℃	∞	1	

2.1.4反应结束后瞬时离心，转移至扩增室2，备用。

2.2 DNA病原的第一轮 PCR 扩增

2.2.1 根据待测样本数量(待测样本、1个阴性对照-NC)按照公式 N=待测样本数量*110%，计算本次反应液总体积的配制，进行第一轮 PCR 扩增，按照表 3 的比例在新离心管中配制检测所需量的第一轮 PCR 反应混合液。配制体系需在冰盒上，需在试剂准备间完成体系配制；

表3 DNA 第一轮 PCR 反应混合液

试剂	一个反应标准量
扩增试剂 2	15 μL
引物 Mix-2	5 μL
水	1 μL

2.2.2将上述体系配制好之后转移至 PCR 扩增室 1 的生物安全柜中，向体系中添加9 μL样本提取核酸。

2.2.3充分混匀，将 3.2.2 扩增反应液转移至 PCR 扩增室 1 的 PCR 仪上运行表 4 的 PCR 反应程序；

表 4 DNA 第一轮 PCR 反应程序:

温度	时间	循环数	备注
95℃	3 min	1	热 盖：105℃ 反应体积：30 μL
95℃	30 sec	30	
60℃	1 min		
72℃	30 sec		
72℃	3 min	1	
4℃	∞	1	

2.2.4反应结束后瞬时离心，并将扩增产物转移至扩增室 2 ，准备进行产物纯化。首先向3.2.3 步骤扩增产物中加入前述4.1.3的扩增产物约25 μL，然后加入33 μL纯化磁珠 (0.6X磁珠)，充分混匀，室温静置5min ，置于磁力架 2min 至溶液澄清，转移上清至新的无核酸酶1.5mL 离心管；

2.2.5向上清中加入39 μL纯化磁珠（1.3X磁珠），涡旋混匀后，室温孵育5min；

2.2.6将离心管瞬离并置于磁力架上，待溶液澄清后（约2min），小心移除上清。保持离心管始终处于磁力架中，加入 200 μL 80%乙醇 (需现配现用) ，室温孵育30 sec，小心移除上清；

2.2.7重复步骤3.2.6。

2.2.8保持离心管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠（约5 min），待磁珠表面不反光即可。（此步结束需要立马加入第二轮PCR混合液。）

▲磁珠表面不可过于龟裂，磁珠干燥过度将影响核酸回收效率；

2.3 第二轮 PCR 扩增

2.3.1在试剂准备间根据表 5 的比例在新离心管中配制检测所需量的第二轮 PCR 反应混合液，每个样本加入2 μL不重复的引物 Mix-3 (**包含 48 个不同的 Index，若单次上机文库少于10个，建议每次上机必须使用45-48号index**)，将扩增反应液转移至扩增室 2，并在生物安全柜里，在3.2.8 步骤的磁珠中加入40 μL PCR 反应混合液；

表 5 第二轮 PCR 反应混合液

试剂与成分	体积
扩增试剂 3	20 μL
引物 Mix-3 (48 个不同的 Index)	2 μL (每个样本使用 1 个 index)
无核酸酶水	18 μL

2.3.2充分混匀，在扩增2室的PCR仪上运行表6的PCR反应程序；

表 6 PCR 反应程序

温度	时间	循环数	备注
98℃	45 sec	1	热盖：105℃ 反应体积：40 μL
95℃	20 s	13	
60℃	30 s		
72℃	30 s		
72℃	5 min	1	
10℃	Holding	1	

2.3.3反应结束后，瞬时离心，加入36 μL (0.9X) 磁珠，室温孵育5 min，转移至磁力架上孵育约2 min 至磁珠完全吸附，弃上清；

2.3.4加入200 μL 80%乙醇(需现配现用)，在磁力架上静置30 s，弃上清液；

2.3.5重复 3.3.4 一次，将离心管瞬时离心后置于磁力架上，用 10 μL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)；

2.3.6加入33 μL无核酸酶水，充分混匀，室温静置5 min，置于磁力架3 min至溶液澄清，取30 μL上清液于新1.5 ml 离心管中，标记好文库编号、接头号和日期。

3 文库质控

浓度质控：文库建议使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 及配套仪器测定 DNA 文库浓度。若文库核酸浓度≥1 ng/μL，总量≥30 ng，质控合格。若文库核酸浓度＜1 ng/μL，总量＜30 ng，需要重复文库制备实验，并质检，若文库质量再次不合格，检测终止。

其中，文库浓度换算公式：

文库浓度[nM] = 文库质量浓度（ng/μL）*1000000/660/文库平均片段长度

◢*平均文库片段长度约在 350 bp 左右。*

十一、注意事项

1 本品仅用于体外诊断，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 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。

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，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。

4 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》。

5 所有的试剂在使用前，均需在充分融化、混匀后使用。

6 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。

7 请在失效日期前使用本试剂盒。

8 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。

十二 参考文献

Gaston, D. C., H. B. Miller, J. A. Fissel, E. Jacobs, E. Gough, J. Wu, E. Y. Klein, K. C. Carroll and P. J. Simnera (2022). Evaluation of Metagenomic and Targeted Next-Generation Sequencing Workflows for Detection of Respiratory Pathogens from Bronchoalveolar Lavage Fluid Specimens. Journal of Clinical Microbiology 60(7): 1-15.

十三、历史版本

（列出历次版本号及修改内容和日期）

版本号	内容描述	日期
V3	升级 DNA 引物池	2023.06.29

V4	升级引物池	2023.10.12
V4.1	升级引物池	2023.11.27