

描述: 本试剂盒采用恒温环扩技术配合可视化技术, 进行 2019-nCoV 的 RNA 病毒检测。试剂盒灵敏度 10 copies。肺泡灌洗液、拭子浸泡液可直接检测 (不需要核酸提取), 唾液、痰液、血清、血浆、含高盐病毒保存液样本需要核酸提取。该试剂盒的灵敏度为 10copies (检出率 100%, 单 copy 检出率 30-50%), 假阳性比例 <1%。

该试剂盒的靶标基因为 N 基因, 靶标序列如下:

```
ATTCCCTCGAGGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCA
GTCCAGATGACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGA
CGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCC
AAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAGCTG
GACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTG
CAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAAAGATCACATTGGC
ACCCGCAATCCTGCTAACAAATGCTGCAATCGTGCTACAACCT
CCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCT
```

组分

| 名称 | 96T |
|-----------------------|------|
| 2019-CoV N Assay(冻干品) | 2 支 |
| 2xIsoAmp BufferD | 1 ml |
| CoV N Positive(冻干品) | 1 支 |
| ddH ₂ O | 1 ml |
| OG 染料变色反应管盖 | 96 支 |

储存及运输: 该制品可于室温运输, 其在室温条件下稳定 15 日。长期保存于 -20°C, 1 年有效。

关于样本的使用说明:

(1) 唾液、痰液、血清、血浆、高盐病毒保存液制作的样本, 必须核酸提取后再使用。核酸纯化样品, 使用量为 5 μ l。

(2) 关于粗制样品的使用说明: 由于恒温扩增反应温度为 65°C, 且反应 Buffer 中含有去污剂, 因此, 理论上咽拭子、肛拭子, 浸泡于 0.5ml ddH₂O 后, 可以直接作为扩增模板。在加热的过程中病毒分子在高温和去污剂的作用下, 裂解并释放 RNA 分子作为扩增模板。但该试剂盒未做活毒测试, 无法提供相应数据支持。

使用方法:

1. OG 染料已经预先加入在 EP 管盖上, 为干粉形式, 其牢固的结合在管盖上, 仅有反应完毕后, 将 EP 管倒置后才能将其溶解, 溶解后其将立即终止反应, 并与反应产物形成鲜亮的绿色可见光。在配制反应液和反应过程中务必不能将 EP 管盖上的染料混入反应液中, 否则会导致反应终止。

2. 每一支 2019-CoV N Assay 冻干品可用于 50 人份的检测反应, 首次使用前用 250 μ l 的 ddH₂O 溶解该制品。未使用完的该制品, 可短期保存于 4°C (1 周内使用)。CoV N Positive 用 200 μ l 的 ddH₂O 溶解。

3. 配制反应体系

在本试剂盒提供的 0.2 ml EP 反应管中加入下述试剂

| | |
|---------------------------|------------|
| 溶解后的 2019-CoV N Assay 冻干品 | 5 μ l |
| 2xIsoAmp BufferD | 10 μ l |
| 检测样品 | 5 μ l |

全部试剂加入完毕后, 轻弹 EP 管底部后, 再盖上含 OG 染料的 EP 管盖 (盖上管盖后务必不能再剧烈混合与倒置, 以防止将管盖上的 OG 染料溶解, OG 染料一旦混入反应液中将会终止反应)。

4. 反应体系配好后, 静置于 65°C 反应 20min。

5. 观察结果

反应结束后, 将所有反应管从水浴锅取出, 室温冷却 2 分钟, 并用纸再次压紧管盖, 以防止溶液从反应管泄露。反应管外侧多余的水, 可用纸巾擦拭干净。将反应管倒置过来, 轻甩一次, 将反应液甩至管盖上, 覆盖 OG 染料, 倒置 30 秒 (可倒置在纸巾上)。管盖上的 OG 染料溶解后, 再将反应管正置过来, 轻甩一次, 将溶液甩至管底部。肉眼观察反应液颜色变化进行结果判读 (可拍照留存数据)。

6. 结果判读

| | 阴性对照 | 阳性对照 | 检测样品 | 判读结果 |
|---|------|------|------|---------------|
| A | 橙黄色 | | 绿色 | 阳性 (+) |
| B | | 绿色 | 橙黄色 | 阴性 (-) |
| C | 绿色 | | 绿色 | 不能判断为阳性, 需重检测 |
| D | | 橙黄色 | 橙黄色 | 不能判断为阴性, 需重检测 |

特殊说明:

(1) 该方法灵敏度实际测试达到 10 copies 灵敏度。但该方法存在一定比例的假阳性 (<1%), 因此阳性样品, 建议进行复检, 复检仍然为阳性, 可判读为阳性, 否则判读为阴性。

(2) 阳性对照在单独检测管中加入 5 μ l 本试剂盒提供的阳性标准品。

(3) 阴性对照可采用 ddH₂O, 用量同样为 5 μ l。