

**技术原理:**

本试剂盒采用多重 LAMP (MultiPlex LAMP) 环扩增技术, 配合特异性的双标荧光探针进行新型冠状病毒 (SARS CoV-2) 检测。试剂盒采用单管三重设计, 靶标基因为 ORF1ab、N 基因和人内参 beta-actin 基因。

**技术指标:**

1. 在单管中进行三重 LAMP 扩增, 分别靶向 ORF1ab (FAM) 和 N 基因 (FAM), 防止突变造成的检测脱靶。内参 beta-actin (VIC) 用于扩增和采样质控(内参引物不能扩增人基因组 DNA)。
2. 在直接使用拭子浸泡液的情况下 (不进行核酸提取), 有效灵敏度: 200 个病毒/拭子; 极限灵敏度: 50 个病毒/拭子。在体外转录的 RNA 测试中, 无论 ORF1ab 或 N 基因, 灵敏度均为单 copy。人 Total RNA 可检测到 0.1ng。
3. 无需核酸纯化步骤, 可以直接使用病毒灭活后的拭子浸泡液。在 25  $\mu$ l 的 LAMP 反应体系中, 可采用 10  $\mu$ l 的拭子浸泡液, 上样量大, 增加检出率, 降低假阴性率。
4. 反应速度快, 恒温 65 $^{\circ}$ C 条件下, 30min 内完成检测。在每个检测管中含有 100 个病毒以上的样本, 10min 内完成检测。
5. 采用特异性的双标 TaqMan 探针, 准确性 100%, 无假阳性。
6. 核心试剂成分为冻干品形态, 方便运输与保存。
7. 试剂盒的靶标区域

N 基因靶标序列如下:

```
CAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGCGCGCAGTCAAGCCTCT
TCTCGTTCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATCAACTCCAGGCAGCAGTA
GGGGAACCTCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCCTTTC
TGCTGCTTGACAGATTGAACCGCTTGAGAGCAAAATGTCTGGTAAAGGCCAACCAAC
AACAAGGCCAAACTGTCTACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGC
```

ORF1ab 基因靶标序列如下:

```
ATGTGTCGCCCTTTCATCAAACGTTCCGGATGCTCGAACTGCACCTCATGGTCATGTTA
TGTTGAGCTGGTAGCAGAACTCGAAGGCATTACGTACGGTCGTAGTGGTGAGACAC
TTGGTGTCTTGTCCCTCATGTGGGCGAAATACCAGTGGCTTACCAGCAAGGTTCTTC
TTCGTAAGAACGGTAATAAAGGAGCTGGTGGCCATAGTTACGGCGCCGATCTAAAGTC
ATTTGACTTAGGCGACGAGCTTGGCACTGATCCTTATGAAGATTTTCAAGAAAAGCTGG
```

**组分:**

名称	25 次
CoV-2 Triplex LAMP Assay(25T)	1 瓶
2.5xLAMP Buffer	0.25 ml
ddH <sub>2</sub> O	1 ml
N-O 阳性标准品	20 $\mu$ l
快速病毒裂解液	10 ml

**保存条件:**

1. 试剂盒整体保存于 -20 $^{\circ}$ C, 3 年内有效。4-8 $^{\circ}$ C 条件下可保存 6 个月, 常温 25 $^{\circ}$ C 条件下可保存 2 个月。
2. CoV-2 Triplex LAMP Assay 为干粉形式 (每瓶用于 25 人份检测), 包含 Bst 5.1 DNA 聚合酶、引物、探针等, 在未溶解前, 该制品可 -20 $^{\circ}$ C 长期保存, 并可室温运输, 性能无下降。使用前每瓶用 0.125 ml 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解后, 可立即使用, 剩余试剂可在 -20 $^{\circ}$ C 保存 15 天, 在 -60 $^{\circ}$ C 以下长期保存。
3. N-O 阳性标准品为 DNA 形式, 浓度为 100 copy/ $\mu$ l。每次阳性对照使用 10  $\mu$ l。
4. 不同批次的试剂组分, 不要混用。

**检测样本的使用说明:**

- (1) 咽拭子、鼻腔拭子采集完毕后, 将拭子棉签部分放入到含有 0.3 ml 本试剂盒提供的快速病毒裂解液中, 可在 1.5 ml EP 管或 2 ml 病毒保存管中操作。
- (2) 在裂解液覆盖棉签的情况下, 漩涡混合 10-20s, 使棉签上的病毒和人体细胞从棉签上脱落。
- (3) 上述裂解产物可以直接作为模板进行检测, 或在 56 $^{\circ}$ C 条件下进行病毒灭活后进行检测。未使用完毕的病毒液可 -80 $^{\circ}$ C 长期保存病毒核酸, 也可以用于病毒的核酸纯化。

**使用方法:**

**1. 仪器和程序设置**

LAMP 的检测可以使用标准定量 PCR 仪（也可使用恒温荧光设备），荧光通道选择 FAM 和 VIC 双通道。

步骤 1: 65°C 10s

步骤 2: 65°C 50s 收集信号，循环 30 次，即总反应时间为 30min。

注意：本试剂盒无需热盖加热，在使用定量 PCR 进行检测时，可关掉 PCR 仪的热盖功能，以缩短检测时间。

**2. 配置反应体系**

2.1 向每瓶 CoV-2 Triplex LAMP Assay 冻干品中，加入 0.125 ml 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解。

2.2 向检测反应管中加入 5 μl 溶解后的 LAMP Assay、10 μl 的 2.5xLAMP Buffer。

2.3 向检测反应管中加入 10 μl 灭活后的待检测病毒液[或 N-O 基因阳性标准品(阳性对照)，或快速病毒裂解液(阴性对照)]。

2.4 反应体系配好后，混匀 2-5s。并短暂离心，置于荧光定量 PCR 仪上进行反应即可。

**3. 结果判读**

**3.1 结果判读的成立条件:**

	FAM 通道 (SARS-CoV-2)	VIC 通道 (beta-actin 内参)	结果
N-O 基因阳性标准品	起峰，成典型扩增曲线	不参考	可靠
阴性对照	无信号	无信号	
N-O 基因阳性标准品	无信号	不参考	试剂失效，重新检测
阴性对照	起峰，成典型扩增曲线	不参考	发生污染，重新检测

**3.2 检测样本结果判读:**

FAM 通道 (SARS-CoV-2)	VIC 通道 (beta-actin 内参)	判读结果
起峰，成典型扩增曲线	不参考	阳性
无信号	起峰	阴性
无信号	无信号	采样不佳或样本保存不当，重新采样并进行检测。

**3.3 典型的检测结果**

