

(三重)新冠恒温荧光探针法核酸检测试剂盒

Cat. No.: A380819 Size: 50T Storage: -20°C



技术原理:

本试剂盒采用多重恒温探针法环扩增技术,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 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 (ROX) 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。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 μ l 的 LAMP 反应体系中,可采用 5 μ l 的拭子浸泡液。
4. 反应速度快,恒温 65°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. 采用特异性的双标荧光探针,准确性 100%,无假阳性。
6. 试剂盒的靶标区域

N 基因靶标序列如下:

```
CAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGCGGCAGTCAAGCCTCT  
TCTCGTTCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATTAAGTCCAGGCAGCAGTA  
GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGC  
TGCTGCTTGACAGATTGAACAGCTTGAGAGCAAAATGTCTGGTAAAGCCAACAAC  
AACAAGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGC
```

ORF1ab 基因靶标序列如下:

```
TCATCAAACGTTCCGATGCTCGAACTGCACCTCATGGTCATGTTATGGTTGAGCTGGT  
AGCAGAACTCGAAGGCATTACAGTACGGTCGTAGTGGTGAGACTTGGTGTCTTGT  
CCCTCATGTGGGCGAAATACCAGTGGCTTACCGCAAGGTTCTTCTCGTAAGAACGG  
TAATAAAGGAGCTGGTGGCCATAGTTACGGCGCCGATCTAAAGTCATTTGACTTAGGC  
GACGAGCTTGGCACTGATCCTTATGAAGATTTCAAGAAAAGTGG
```

组分:

名称	50 次
nCoV-2 3IsoAmp Solution A	0.5 ml
nCoV-2 3IsoAmp Solution B	0.5 ml
N-O 阳性标准品	20 μ l
IsoAmp 快速核酸释放剂	20 ml

储存:

1. 试剂盒整体保存于 -20°C, 1 年内有效
2. N-O 阳性标准品为 DNA 形式,浓度为 100 copy/ μ l。每次阳性对照使用 5 μ l。
3. 不同批次的试剂组分,不要混用。

检测样本的使用说明:

1. 拭子样品

- (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 0.3ml 本试剂盒提供的 IsoAmp 快速核酸释放剂中(可在 1.5ml EP 管,或 2ml 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°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°C 长期保存病毒核酸,也可以用于病毒的核酸纯化。

2. 该试剂盒可同样适用于纯化的核酸样本,取 5 μ l 核酸样品即可用于检测。

使用方法

1. 仪器和程序设置

恒温扩增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 ROX 双通道。

步骤 1: 65°C 10s

步骤 2: 65°C 50s 收集信号，循环 18-25 次，即总反应时间为 18-25min（初次实验设置 25min，不同的机型所需时间可能会有所区别，在 ABI 的 Q1 和 V7 机型中 18min 可完成单 copy 的检出）。

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 向检测反应管中加入 10 µl 的 nCoV-2 IsoAmp Solution A、10 µl 的 nCoV-2 IsoAmp Solution B。

2.2 向检测反应管中加入 5 µl 的待检测病毒液[或 N-O 基因阳性标准品(阳性对照)，或 IsoAmp 快速核酸释放剂(阴性对照)]。

2.3 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)	ROX 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		可靠
阴性对照	无信号	无信号	
N-O 基因阳性标准品	无信号		试剂失效，重新检测
阴性对照	起峰，成典型扩增曲线		发生污染，重新检测

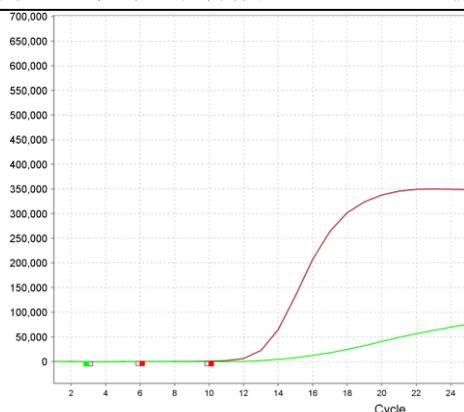
3.2 检测样本结果判读:

FAM 通道 (SARS-CoV-2)	ROX 通道 (beta-actin 内参)	判读结果
起峰，成典型扩增曲线		阳性
无信号	起峰	阴性
无信号	无信号	采样不佳或样本保存失效，重新采样和检测。

3.3 典型的检测结果

阳性样本(10 copies)

红色线为 FAM 信号，表明存在 SARS CoV-2 核酸分子



阴性样本 (5 µl 咽拭子浸泡液)

FAM 无信号，ROX 有信号，表明不含有 nCoV 核酸分子

