

天
净
沙
系
列

CAT#:16-81920
低温运输, -20℃保存

BINGENE

新型冠状病毒 N 基因荧光及可视化 RT-LAMP 试剂盒

SARS-CoV-2 N Gene Fluorescent & Colorimetric RT-LAMP Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

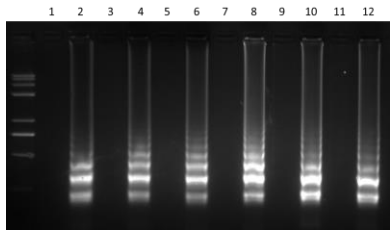
产品及特点	新型冠状病毒（SARS-Cov-2）是单股正链 RNA 病毒，发现于 2019 年。人感染了冠状病毒后常见体征有呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等。在较严重病例中，感染可导致肺炎、严重急性呼吸综合征、肾衰竭，甚至死亡。对于新型冠状病毒所致疾病没有特异治疗方法，因此新型冠状病毒的快速准确鉴定有重要意义。新型冠状病毒 N 基因编码的 N 蛋白是病毒粒子的核心成分，它与病毒基因组 RNA 结合，将 RNA 包装成核糖核蛋白（RNP）复合体。除了组装外，N 蛋白还在病毒 mRNA 转录和复制中发挥重要作用，并参与免疫调节。N 基因相对保守，故是早期快速诊断和疫苗研发的关键靶标。为此本公司根据独有的双染料 RT-LMAP 技术，开发了专门检测的新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 检测试剂盒，它具有下列特点： 1. 即开即用，用户只需要提供病毒 RNA 样品。 2. 恒温扩增，可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。 3. 含可见光和荧光染料，既可以用金属浴和水浴扩增用可见光肉眼判断结果，也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测。 4. 检测灵敏性一般比 RT-PCR 高 10 倍以上，分析灵敏度可以达到 100 拷贝/反应左右。 5. 特异性高，根据新型冠状病毒 N 基因 RNA 保守序列设计 6 条特异引物，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。 6. 荧光检测时，阳性样品一般 15 分钟开始起峰，阴性样本一般 60 分钟内不会起峰。 7. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。 8. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。 9. 上样量大，对 20 μL 的反应体系，最大样品加样量高达 13μL。 10. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。 11. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的染料法荧光及可视化 RT-LAMP 扩增。 12. 只可用于科研。																				
规格及成分	<table><tr><th>成 份</th><th>编号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>RT-LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)</td><td>211224a</td><td>250 μL（绿盖管）</td></tr><tr><td>逆转录酶-扩增酶混合液</td><td>211208b</td><td>100 μL（红盖管）</td></tr><tr><td>20×新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 引物混合液</td><td>yw16-81920</td><td>200 μL（白盖管）</td></tr><tr><td>新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 阳 性对照（1×10E4 拷贝/μL）</td><td>pc16-81920</td><td>250 μL（黄盖管）</td></tr><tr><td>PCR 级石蜡油</td><td>220101</td><td>1.5mL（本色盖）</td></tr></table>			成 份	编号	五孔盒包装	RT-LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)	211224a	250 μL（绿盖管）	逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 μL（红盖管）	20×新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 引物混合液	yw16-81920	200 μL（白盖管）	新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 阳 性对照（1×10E4 拷贝/μL）	pc16-81920	250 μL（黄盖管）	PCR 级石蜡油	220101	1.5mL（本色盖）
成 份	编号	五孔盒包装																			
RT-LAMP MagicMix (可视化染料-荧光染料，待加酶)	211224a	250 μL（绿盖管）																			
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 μL（红盖管）																			
20×新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 引物混合液	yw16-81920	200 μL（白盖管）																			
新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 阳 性对照（1×10E4 拷贝/μL）	pc16-81920	250 μL（黄盖管）																			
PCR 级石蜡油	220101	1.5mL（本色盖）																			

	使用手册	16-81920sc	1 份																								
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。																										
自备试剂	待测样品。																										
使用方法	一、样品 RNA 的制备 1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的包膜病毒核酸释放剂。 2. 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照(PC) 和一个样品制备阴性对照（NC）。PC 可以用 10μL 本试剂盒提供的阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）加一定量的水得到，其总体积必须跟核酸提取试剂盒所要求的起始样品相同，NC 用水替代。 二、RT-LAMP 反应（20μL 体系） 3. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，需要设置 N+4 个 RT-LAMP 扩增，增加的两个分别是 RT-LAMP 阴性对照和 RT-LAMP 阳性对照。第一次使用本产品时，需要将 100uL 逆转录酶-扩增酶混合液酶全部加入到 250uL RT-LAMP MagicMix（可视化染料-荧光染料，待加酶）中。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分： <table><tr><th>成分</th><th>N+2 个样品管</th><th>RT-LAMP 阴性对照</th><th>RT-LAMP 阳性对照</th></tr><tr><td>RT-LAMP MagicMix（可视化染料-荧光染料，已加酶）</td><td>各 6 μL</td><td>6 μL</td><td>6 μL</td></tr><tr><td>20×新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 引物混合液</td><td>各 1 μL</td><td>1 μL</td><td>1 μL</td></tr><tr><td>N+2 个样品 RNA</td><td>各 13 μL</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>-</td><td>13 μL</td><td>-</td></tr><tr><td>新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）</td><td>-</td><td>-</td><td>13 μL</td></tr></table> 4. 如果使用金属浴或水浴保温，没有热盖，建议在每个反应管中加入 30μL 本试剂盒提供的石蜡油，否则保温期间反应体系的水分会蒸发到管盖下方凝集，反应体积变化，会严重影响反应效率，增加假阳性率。最后置于 65℃保温 60 分钟进行扩增。 5. 如果使用常规 PCR 仪进行 RT-LAMP 反应，设置程序时必须打开热盖，设置成 65℃保温 60 分钟进行扩增。			成分	N+2 个样品管	RT-LAMP 阴性对照	RT-LAMP 阳性对照	RT-LAMP MagicMix（可视化染料-荧光染料，已加酶）	各 6 μL	6 μL	6 μL	20×新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL	N+2 个样品 RNA	各 13 μL	-	-	超纯水	-	13 μL	-	新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	-	-	13 μL
成分	N+2 个样品管	RT-LAMP 阴性对照	RT-LAMP 阳性对照																								
RT-LAMP MagicMix（可视化染料-荧光染料，已加酶）	各 6 μL	6 μL	6 μL																								
20×新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL																								
N+2 个样品 RNA	各 13 μL	-	-																								
超纯水	-	13 μL	-																								
新型冠状病毒 N 基因 RT-LAMP 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL）	-	-	13 μL																								

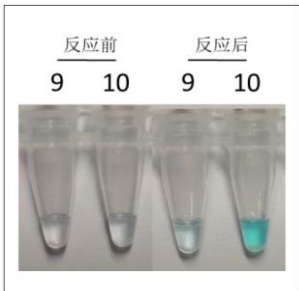
6. 如果使用荧光定量 PCR 仪，则设置 60 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

三、结果分析

7. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10μL RT-LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。RT-LAMP 阳性对照必须有正常 RT-LAMP 条带（200bp 左右的梯形扩增产物），RT-LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RT-LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



8. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的反应液将呈蓝色，样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的反应液将呈淡蓝色或无色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明样品为阳性，如果接近阴性对照则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见左图（9 为阴性，10 为阳性）。



9. 荧光分析（仅限于用 qPCR 仪进行反应的场景）：样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的荧光信号将有标准的 S 扩增曲线，样品制备阴性对照和 RT-LAMP 阴性对照的荧光信号呈平线，没有 S 曲线，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的荧光曲线为 S 型，则说明样品为阳性，如果为平线则说明待测样品为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性，右边为阴性。

