

应用比色法 RT-LAMP（逆转录-环状介导等温扩增）快速检测临床样品 SARS-CoV-2 的分步指南

语言： 中文

翻译： 韦珊

方法概要：这个操作方法可以在 30 分钟内从临床样品（鼻拭子置于病毒运输液中）中直接检测 SARS-CoV-2 病毒。唯一需要的设备是热浴，不需要提取纯化 RNA。这个方法应用了 6 个（3 对）特异引物利用逆转录和环状介导等温扩增（LAMP）方法扩增病毒 RNA，并用比色法指示剂提供可视的检测结果。

要进行这个检测，需要预先配制包含 6 个特异引物，裂解液，扩增试剂和酸碱指示剂的反应混合液，并分装于干净离心管中备用。在装有反应混合液的离心管中加入临床样品（譬如，保存在病毒运输液内），混合，并取出 1/2 最终反应液置于一个新的干净离心管中。两个离心管都被置于 63°C 干浴 30 分钟。30 分钟后，取出离心管置于冰上 1 分钟暂停反应，观察测试结果。反应液红色是阴性，黄色是阳性。

下面是分步详细指南，共分成三个部分。第一部分是试剂和耗材清单，第二部分是制备反应液的方法，第三部分是进行这个检测的操作方法。

试剂和耗材：

1. LAMP 引物（FIP, BIP, LF, LB, F3, B3）
2. 无核酸酶超纯水 (Ambion, AM9937)
3. 100mM dUTP (Thermo Scientific, R0133)
4. Antarctic Thermolabile UDG (NEB, M0372S)
5. 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854)
6. 1250µL WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800S/L).
7. TE buffer pH 8.0
8. Tween-20
9. Thermolabile Proteinase K (NEB, P8111S),
10. ezDNase (Invitrogen, 11766051),
11. 0.3ng/µL 人基因组 DNA
12. 1.5mL LoBind 离心管 (Eppendorf, 022431021)
13. 冰和容器.
14. Sterile disposal transfer pipette (Fisherbrand, 13-711-20)
15. 63.0°C 干浴 (Fisherbrand, 14-955-219)

准备：

1. 准备 25 倍浓度的 LAMP 引物混合液（CUFC-FIP, CUFC-BIP, CUFC-LF, CUFC-LB, CUFC-F3, CUFC-B3），在无核酸酶水中加入 40µM CUFC-FIP 和 CUFC-BIP，10µM CUFC-LF 和 CUFC-LB，5µM CUFC-F3 和 CUFC-B3 引物。

2. 准备 2 倍浓度的 RT-LAMP 混合液，在 1250 μ L WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800L)（一管）中加入 3.5 μ L 100mM dUTP (Thermo Scientific, R0133), 0.5 μ L UDG (NEB, M0372S)和 0.25 μ L 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854)。混合均匀。
3. 准备一个 250 μ L 检测的反应混合物，需要混合 125 μ L 2 倍 浓度的 RT-LAMP 混合液，10 μ L 25 倍浓度的 LAMP 引物混合物，95 μ L 无核酸酶水。可以根据具体检测的样本数量成倍数扩大。
4. 裂解液包含 0.1X TE buffer pH 8.0, 0.1% tween-20, 1% 体积的 Thermolabile Proteinase K (NEB, P8111S), 2% 体积的 ezDNase (Invitrogen, 11766051), 0.3ng/ μ L 正常男性基因组 DNA。在每一个检测中，460 μ L 反应混合液和 20 μ L 裂解液预先分装在一个干净的 1.5mL LoBind 离心管 (Eppendorf, 022431021)，保存在冰上备用。

进行检测：

1. 取 20 μ L 临床样品直接加入含有反应液（460 μ L）和裂解液（20 μ L）的 1.5mL LoBind 离心管中(Eppendorf, 022431021)。
2. 用无菌的一次性移液器 (Fisherbrand, 13-711-20) 混合均匀。
3. 并取 250 μ L 反应液置于一个新的干净 LoBind 离心管中。
4. 合上离心管，把两个装有~250 μ L 反应液的离心管放入 63°C 干浴 (Fisherbrand, 14-955-219)。
5. 63°C 干浴温育 30 分钟。
6. 把离心管放在冰上一分钟暂停反应。
7. 记录比色结果
 - ❖ 红色=阴性
 - ❖ 黄色=阳性

表 1. 用于 SARS-CoV-2 检测的 LAMP 引物序列

Primer	Sequence
Name	
CUFC1-F3	TGGATACAAGCTAGCTACAGAGAAG
CUFC1-B3	AGCCAAAGACCGTTAAGTGTA
CUFC1-FIP	GTGGTGGTTGGTAAAGAACATCAGACTTGTTGTCATCTCGCAAAGG
CUFC1-BIP	CCTCTATCACCTCAGCTGTTTTGCTGTACCATAACAACCTCAACTT
CUFC1-LF	ACCTGAGTTACTGAAGTCATTGAGA
CUFC1-LB	TGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCC

