

Step-by-step guide to Rapid SARS-CoV-2 Detection in Clinical Samples using a Colorimetric RT-LAMP reaction.

Language: Russian

Translator: Dr. Pavel Morozov

Пошаговая инструкция по быстрому выявлению SARS-CoV-2 в клинических образцах используя RT-LAMP колориметрическую реакцию.

Обзор метода: Данный протокол предназначен для выявления SARS-CoV-2 непосредственно в клинических образцах (соскоб из носоглотки помещённый в транспортную среду для вирусов, VTM) за 30 минут. Единственным необходимым лабораторным оборудованием является сухая баня (мини-инкубатор). Метод не требует выделения и очистки РНК. Метод использует обратную транскрипцию, изотермическую петлевую амплификацию (LAMP) с использованием шести специально разработанных праймеров (3 набора по два праймера) для амплификации вирусной РНК и колориметрический индикатор для визуального отображения результата.

Для проведения теста создается основная смесь, состоящая из шести праймеров, буфера для лизиса, реагентов для амплификации и раствора цветового индикатора. Основная смесь помещается в микроцентрифужную пробирку. Клинический образец (например, VTM) помещается в пробирку с основной смесью, перемешивается, и, затем, $\frac{1}{2}$ получившейся смеси переливается в другую микроцентрифужную пробирку. Обе пробирки помещаются в сухую баню при 63.0°C на 30 минут. После 30 минут образец извлекается и помещается в лёд на одну минуту и анализируется визуально. Красный цвет соответствует негативному результату, жёлтый цвет соответствует позитивному результату.

Ниже приведено пошаговое руководство, состоящее из трёх частей. Первая часть состоит из списка необходимых реагентов и оборудования. Вторая часть состоит из инструкций для приготовления реакционного буфера. Третья часть является протоколом проведения анализа.

Реагенты и оборудование:

1. LAMP праймеры (CUFC-FIP, CUFC-BIP, CUFC-LF, CUFC-LB, CUFC-F3, CUFC-B3)
2. Безнуклеазная вода (вода, свободная от нуклеаз, Ambion, AM9937).
3. 100mM dUTP,
4. 0.5µL UDG, и
5. 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854)
6. 1250µL WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800L).
7. TE буфер pH 8.0
8. Tween-20
9. 1% Термолабильная протеиназа K (NEB, P8111S),
10. 2% ezDNase (Invitrogen, 11766051),

11. 0.3ng/ μ L человеческая геномная ДНК
12. 1.5mL LoBind пробирки для микроцентрифуги (Eppendorf, 022431021)
13. Лёд и контейнер для него.
14. Стерильные одноразовые пипетки (Fisherbrand, 13-711-20)
15. 63.0°C сухая баня (мини-инкубатор) (Fisherbrand, 14-955-219)

Приготовление:

1. 25-кратная смесь LAMP праймеров (CUFC-FIP, CUFC-BIP, CUFC-LF, CUFC-LB, CUFC-F3, CUFC-B3) приготовлена заранее и содержит 40 μ M CUFC-FIP и CUFC-BIP, 10 μ M CUFC-LF и CUFC-LB, и 5 μ M CUFC-F3 и CUFC-B3 праймеров в безнуклеазной воде (Ambion, AM9937).
2. 2X колориметрический RT-LAMP раствор готовится добавлением 3.5 μ L 100mM dUTP, 0.5 μ L UDG, и 0.25 μ L 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854) в 1250 μ L WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800L).
3. Реакционная смесь готовится смешением 125 μ L 2X колориметрического RT-LAMP раствора, 10 μ L 25-кратной смеси LAMP праймеров, и 95 μ L безнуклеазной воды на одну 250 μ L реакцию, и масштабируется в соответствии с количеством планируемых тестов.
4. Буфер для лизиса состоит из 0.1-кратного TE буфера с pH 8.0 с 0.1% Tween-20, 1% термолабильной протеиназы K (NEB, P8111S), 2% ezDNase (Invitrogen, 11766051), и 0.3ng/ μ L человеческой геномной ДНК здорового мужчины. Для одного анализа 460 μ L реакционной смеси и 20 μ L буфера для лизиса помещаются в 1.5mL LoBind пробирку (Eppendorf, 022431021) которая помещается в лёд до начала анализа.

Проведение анализа:

1. Добавить 20 μ L клинического образца непосредственно в 1.5mL LoBind пробирку для микроцентрифуги (Eppendorf, 022431021) содержащую реакционную смесь (460 μ L) и буфер для лизиса (20 μ L).

1b: Альтернативный способ: добавить 10 μ L клинического образца непосредственно в 1.5mL LoBind пробирку для микроцентрифуги (Eppendorf, 022431021) содержащую реакционную смесь (230 μ L) и буфер для лизиса (10 μ L). Повторить процедуру со второй пробиркой. Перейти на шаг 4.

2. Перемешать используя стерильную одноразовую пипетку (Fisherbrand, 13-711-20).
3. Отобрать 250 μ L из 500 μ L раствора и поместить в новую чистую 1.5mL LoBind пробирку для микроцентрифуги.
4. Поместить обе пробирки содержащие ~250 μ L раствора каждая в 63.0°C сухую баню (Fisherbrand, 14-955-219)
5. Инкубировать пробирки в течении 30 минут при 63.0°C в сухой бане.
6. Поместить обе пробирки в лёд на 1 минуту для остановки реакции.
7. Зарегистрировать колориметрические результаты:

- ❖ Красный=Негативный результат,
- ❖ Жёлтый=Позитивный результат.

Таблица 1. Последовательности LAMP праймеров для определения SARS-Cov-2

Праймер	
Название	Последовательность
CUFC1-F3	TGGATACAAGCTAGCTACAGAGAAG
CUFC1-B3	AGCCAAAGACCGTTAAGTGTA
CUFC1-FIP	GTGGTGGTTGGTAAAGAACATCAGACTTGTTGTCATCTCGCAAAGG
CUFC1-BIP	CCTCTATCACCTCAGCTGTTTTGCTGTACCATAACAACCTCAACTT
CUFC1-LF	ACCTGAGTTACTGAAGTCATTGAGA
CUFC1-LB	TGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCC