



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111763768 A

(43) 申请公布日 2020.10.13

(21) 申请号 202010619218.0

(22) 申请日 2020.06.30

(71) 申请人 安徽微分基因科技有限公司

地址 238000 安徽省巢湖市巢湖经济开发区龙泉路6号未名生物医药产业园一期南区C楼2层

(72) 发明人 聂志超 张慧 李西清 张鸿

(74) 专利代理机构 安徽申策知识产权代理事务所(普通合伙) 34178

代理人 程艳梅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12R 1/93 (2006.01)

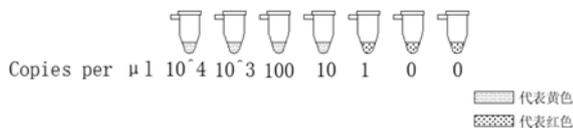
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及分子生物技术领域,且公开了一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:S1、将试剂解冻,分别将检测显色指示剂、检测反应液和LAMP引物组按照一定的比例配置混合均匀,S2、分别将待检测核酸样品,阳性对照品和阴性对照品按照一定比例加入S1配置好的的混合溶液中,混匀离心,S3、将反应置于65℃孵育30分钟,S4、反应结束后在自然光充足的环境中进行观察,可肉眼直接判读结果;指示试剂盒基于LAMP扩增技术快速检测COVID-19病毒N基因,在恒温条件下进行高效的特异性链置换反应,克服了传统PCR反应温控精密度要求高,过程复杂耗时的特点,同时,该指示试剂盒操作简便,对实验操作人员的要求低。



1. 一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述指示试剂盒包含检测显色指示剂、检测反应液、阳性对照品、阴性对照品和LAMP引物组。

2. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述检测显色指示剂包含0.5~2.3mM dNTPs、2~12mM MgSO₄、10~25mM Tris-HCl、5~15mM KCl、8~16mM (NH₄)₂SO₄、0.1~0.3% Triton X-100、0.5~1.5M甜菜碱和酸碱指示剂。

3. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述检测反应液包含6~10U Bst DNA聚合酶、16~25U ThermoStable V反转录酶、DNA Polymerase、20U AMV反转录酶、6~10U RNase抑制剂、18~26%海藻糖。

4. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述阳性对照品为COVID-19特异性基因N对应的人工合成质粒。

5. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述阴性对照品为非COVID-19特异性基因N对应的人工合成质粒。

6. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述LAMP引物组包含COVID-19病毒的特异性基因N对应LAMP引物组,0.1~0.3μM引物组F3/B3、0.8~3.2μM引物组FIP/BIP、0.2~0.6μM引物组LoopF/LoopR。

7. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述LAMP引物组由外引物组F3/B3、内引物组FIP/BIP以及环引物组LoopF/LoopR组成,

F3序列为:5'-GCTGCTGAGGCTTCTAAG-3' ;

B3序列为:5'-GCGTCAATATGCTTATTCAGC-3' ;

FIP序列为:5'-GCGGCCAATGTTTGTAAATCAGTAGACGTGGTCCAGAACAA-3' ;

BIP序列为:5'-TCAGCGTTCCTCGGAATGTCGCTGTGTAGGTCAACCACG-3' ;

LoopF序列为:5'-CCTTGTCTGATTAGTTCCTGGT-3' ;

LoopR序列为:5'-CAGCGCTTCAGCGTTCCTCG-3' 。

8. 根据权利要求1所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:

S1、将试剂解冻,分别将检测显色指示剂、检测反应液和LAMP引物组按照一定的比例配置混合均匀。

S2、分别将待检测核酸样品,阳性对照品和阴性对照品按照一定比例加入S1配置好的混合溶液中,混匀离心。

S3、将反应置于65℃孵育30分钟。

S4、反应结束后在自然光充足的环境中进行观察,可肉眼直接判读结果。

9. 根据权利要求8所述的一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,其特征在于:所述步骤S3中,孵育过程用到的温控设备,65℃的恒温孵育仪、热循环仪、水浴锅等均可以。

一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物技术领域,具体为一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒。

背景技术

[0002] 基于核酸扩增的分子诊断是通过引物介导特异性扩增目的基因以检测内源性(遗传或变异)或外源性(病原体)目的基因的存在与否,进而对疾病的诊断和治疗提供信息和决策依据。其主要的应用场景有传染病的诊断,血筛,肿瘤早期辅助诊断,肿瘤的分子分型,遗传病的诊断,产前诊断,组织分型等。其中在传染病的诊断和血筛方面,基于核酸扩增的分子诊断能缩短诊断的“窗口期”,并且可以定量对病原体进行检测。相比于传统的免疫诊断方式而言,有不可替代的优势。

[0003] 其中,在众多检测手段中,环介导等温扩增技术(Loop-mediated Isothermal Amplification,LAMP)是Notomi等在1998年报道的一种等温核酸扩增技术。该法依赖于识别保守序列DNA的6个特异性片段的4条引物(2条外引物和2条内引物)和一种链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)。LAMP检测体系中基因的扩增和产物的检测可一步完成,扩增效率高,可在30~60min扩增 $10^9\sim 10^{10}$ 倍,特异性较高。LAMP技术的主要原理是DNA在65℃左右可以处于动态平衡状态,DNA在此温度下利用4条特异性引物依靠一种链置换DNA聚合酶,使链置换DNA的合成不停地自我循环。扩增的最后产物是具有不同个数茎环结构、不同长度DNA的混合物,且产物DNA为扩增靶向序列的交替反向重复序列。

[0004] LAMP扩增系统结合酸碱指示剂,反应过后的阳性产物与阴性产物显色差异明显,可以直接通过观察判别结果,具有结果易判读、操作简便、灵敏度高等优势,整个反应过程只需要65℃30min,检测速度快、反应时间短且不需要复杂的温控设备,适合现场即时筛查COVID-19疫情的快速检测。

发明内容

[0005] (一)解决的技术问题

[0006] 针对现有技术中的问题,本发明能够解决现有新冠病毒分子核酸检测技术检测下限低、操作流程复杂耗时、需要复杂实验室仪器设备和气溶胶污染严重的问题,在不需要复杂温控设备仪器的同时,简化检测流程,通过反应后产物颜色的变化直接判读结果,并且做到样本只进不出,有效防止污染。适用于任何场景的病毒分子诊断和筛查。

[0007] (二)技术方案

[0008] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,所述指示试剂盒包含检测显色指示剂、检测反应液、阳性对照品、阴性对照品和LAMP引物组。

[0009] 优选的,所述检测显色指示剂包含0.5~2.3mM dNTPs、2~12mM MgSO₄、10~25mM Tris-HCl、5~15mM KCl、8~16mM (NH₄)₂SO₄、0.1~0.3% Triton X-100、0.5~1.5M甜菜碱和酸碱指示剂。

[0010] 优选的,所述检测反应液包含6~10U Bst DNA聚合酶、16~25U ThermoStable V 反转录酶、DNA Polymerase、20U AMV反转录酶、6~10U RNase抑制剂、18~26%海藻糖。

[0011] 优选的,所述阳性对照品为COVID-19特异性基因N对应的人工合成质粒。

[0012] 优选的,所述阴性对照品为非COVID-19特异性基因N对应的人工合成质粒。

[0013] 优选的,所述LAMP引物组包含COVID-19病毒的特异性基因N对应LAMP引物组,0.1~0.3 μ M引物组F3/B3、0.8~3.2 μ M引物组FIP/BIP、0.2~0.6 μ M引物组LoopF/LoopR。

[0014] 优选的,所述LAMP引物组由外引物组F3/B3、内引物组FIP/BIP以及环引物组LoopF/LoopR组成,

[0015] F3序列为:5' -GCTGCTGAGGCTTCTAAG-3' ;

[0016] B3序列为:5' -GCGTCAATATGCTTATTCAGC-3' ;

[0017] FIP序列为:5' -GCGGCAATGTTTGTAAATCAGTAGACGTGGTCCAGAACAA-3' ;

[0018] BIP序列为:5' -TCAGCGTTCTTCGGAATGTCGCTGTGTAGGTCAACCACG-3' ;

[0019] LoopF序列为:5' -CCTTGTCTGATTAGTTCCTGGT-3' ;

[0020] LoopR序列为:5' -CAGCGCTTCAGCGTTCTTCG-3' 。

[0021] 优选的,所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:

[0022] S1、将试剂解冻,分别将检测显色指示剂、检测反应液和LAMP引物组按照一定的比例配置混合均匀。

[0023] S2、分别将待检测核酸样品,阳性对照品和阴性对照品按照一定比例加入S1配置好的混合溶液中,混匀离心。

[0024] S3、将反应置于65 $^{\circ}$ C孵育30分钟。

[0025] S4、反应结束后在自然光充足的环境中进行观察,可肉眼直接判读结果。

[0026] 优选的,所述步骤S3中,孵育过程用到的温控设备,65 $^{\circ}$ C的恒温孵育仪、热循环仪、水浴锅等均可以。

[0027] (三)有益效果

[0028] 本发明提供了一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,具备以下有益效果:

[0029] 本发明中,指示试剂盒基于LAMP扩增技术快速检测COVID-19病毒N基因,在恒温条件下进行高效的特异性链置换反应,克服了传统PCR反应温控精密度要求高,过程复杂耗时的特点,同时,该指示试剂盒操作简便,对实验操作人员的要求低,单个反应成本低,可以在任务场景对样本进行快速筛查,整个过程只需要30分钟,检测流程短,速度快、效率高,检测结果颜色差异明显,可通过肉眼直接判读,观察方便,且不需要再次开盖检测,避免了反应后开盖检测扩增产物造成气溶胶污染,减少检测过程中污染的风险。

附图说明

[0030] 图1是本发明不同浓度COVID-19RNA分子的对比图。

具体实施方式

[0031] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他

实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 如图1所示,本发明提供一种技术方案:一种COVID-19快速检测显色指示试剂盒,指示试剂盒包含检测显色指示剂、检测反应液、阳性对照品、阴性对照品和LAMP引物组。

[0033] 优选的,检测显色指示剂包含0.5~2.3mM dNTPs、2~12mM MgSO₄、10~25mM Tris-HCl、5~15mM KCl、8~16mM (NH₄)₂SO₄、0.1~0.3% Triton X-100、0.5~1.5M甜菜碱和酸碱指示剂。

[0034] 优选的,检测反应液包含6~10U Bst DNA聚合酶、16~25U ThermoStable V反转录酶、DNA Polymerase、20U AMV反转录酶、6~10U RNase抑制剂、18~26%海藻糖。

[0035] 优选的,阳性对照品为COVID-19特异性基因N对应的人工合成质粒。

[0036] 优选的,阴性对照品为非COVID-19特异性基因N对应的人工合成质粒。

[0037] 优选的,LAMP引物组包含COVID-19病毒的特异性基因N对应LAMP引物组,0.1~0.3 μM引物组F3/B3、0.8~3.2 μM引物组FIP/BIP、0.2~0.6 μM引物组LoopF/LoopR。

[0038] 优选的,LAMP引物组由外引物组F3/B3、内引物组FIP/BIP以及环引物组LoopF/LoopR组成,

[0039] F3序列为:5' -GCTGCTGAGGCTTCTAAG-3' ;

[0040] B3序列为:5' -GCGTCAATATGCTTATTCAGC-3' ;

[0041] FIP序列为:5' -GCGCCAATGTTTGTAATCAGTAGACGTGGTCCAGAACAA-3' ;

[0042] BIP序列为:5' -TCAGCGTTCTTCGGAATGTCGCTGTGTAGGTCAACCACG-3' ;

[0043] LoopF序列为:5' -CCTTGTCTGATTAGTTCCTGGT-3' ;

[0044] LoopR序列为:5' -CAGCGCTTCAGCGTTCTTCG-3' 。

[0045] 优选的,试剂盒的使用方法包括如下步骤:

[0046] S1、将试剂解冻,分别将检测显色指示剂、检测反应液和LAMP引物组按照一定的比例配置混合均匀。

[0047] S2、分别将待检测核酸样品,阳性对照品和阴性对照品按照一定比例加入S1配置好的混合溶液中,混匀离心。

[0048] S3、将反应置于65℃孵育30分钟。

[0049] S4、反应结束后在自然光充足的环境中进行观察,可肉眼直接判读结果。

[0050] 优选的,步骤S3中,孵育过程用到的温控设备,65℃的恒温孵育仪、热循环仪、水浴锅等均可以。

[0051] 本实施例中,检测COVID-19样品RNA分子包括以下步骤:

[0052] 将试剂解冻,分别将检测显色指示剂、检测反应液和LAMP引物组按照一定的比例配置混合均匀,取5.5 μl不同浓度COVID-19病毒RNA分子的样品和阴性对照品分别加入检测体系中,混匀,将反应管置于65℃反应30分钟,反应结束后直接判读结果,其中,检测体系为:

[0053]

试剂	用量
检测显色试剂	10 μL
检测反应液	2.5 μL
特异性引物对	2 μL
待检测模板	5.5 μL

[0054] 反应结束后在自然光充足的环境中进行观察,可肉眼直接判读结果,观察各个反应管中溶液颜色,无颜色变化的红色为阴性,呈黄色的为阳性。

[0055] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0056] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

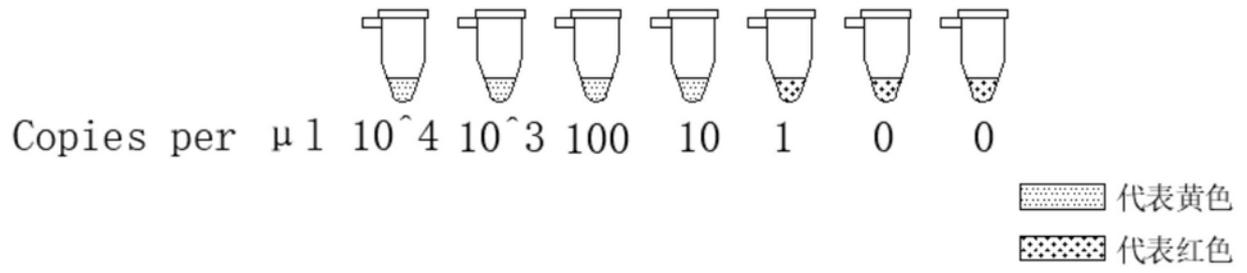


图1