

RT-RPA核酸扩增试剂（基础型）说明书v1.12

产品信息

产品名称	Cat#	组份及状态	规格
RT-RPA 核酸扩增试剂(基础型)	K114B00	1) Mix 颗粒: 25 μ L \times 48 颗; 2) 醋酸镁 Buffer: 280mM, 1mL 或 醋酸镁冻干球 \times 48 颗;	48 Tests/瓶
	K114B01	1) Mix 颗粒: 25 μ L \times 96 颗; 2) 醋酸镁 Buffer: 280mM, 1mL; 或 醋酸镁冻干球 \times 96 颗;	96 Tests/瓶
	K114B02	1) Mix 颗粒: 25 μ L \times 384 颗; 2) 醋酸镁 Buffer:280mM, 4mL; 或 醋酸镁冻干球 \times 384 颗;	384 Tests/瓶

储存及有效期

本产品存储于 2~28 °C、干燥、避光条件下，有效期为 12 个月；
未用完试剂，请盖紧瓶盖置于常温保存，有效期 2 个月。

产品用途

本产品可应用于多重核酸（DNA 和/或 RNA）的快速扩增，根据需求选择产品及规格。

产品说明

- 1) 本产品是”Ready to Use”即用型 RT- RPA 冻干颗粒；含有除引物外所有的反应要素，冻干颗粒中包含成分如下：重组酶，聚合酶，单链结合蛋白，ATP，dUTP，dATP，dCTP，dGTP，poly A，TET 和 PEG 35000 等。
- 2) 反应需要 14mM 醋酸镁，请与 RPA 颗粒一起溶解,或根据客户需要添加醋酸镁缓冲液。
- 3) 扩增产品电泳分析，请务必提取核酸；产品直接电泳，大概率观察不到条带。
- 4) “基础型”适合电泳分析和后续 CRISPR 检测，“荧光型”含有外切酶或 NFO 适用荧光探针或试纸条，不适合后续 CRISPR 分析。
- 5) 若使用核酸释放剂(主要成份为 0.5% Triton X-100 或 CA-63，pH=8.0)，可直接溶解球使用；可任何比例与样本混溶，释放核酸推荐 2: 1 与未处理样本混合后再溶解 RPA 球。
- 6) RT-RPA 扩增试剂可用检测 DNA 或 RNA。
- 7) 引物建议用 Beacon Designer 软件设计引物，引物长度 28~35 碱基。
- 8) 试剂盒最低检测下限为 10-100 copies/测试（依据引物筛选优化程度和检测手段）。

技术原理

重组酶介导链置换核酸扩增（Recombinase Polymerase Amplification, RPA），是一种恒温核酸快速扩增技术。从细菌或真菌中获得的重组酶在常温下可与引物DNA紧密结合，形成重组酶/引物复合物，侵入DNA双链核酸模板，在侵入位点重组酶将双链打开，同时单链结合蛋白结合到被重组酶打开的单链上，维持双链模板处于开链状态。重组酶/引物复合物开始对双链进行扫描，当引物在模板上搜索到与之完全匹配的互补序列时，重组酶/引物复合物解体，DNA聚合酶结合到引物的3'端，开始合成新链。合成的新链又可以作为模板，最终扩增产物以指数级增长，

完成靶标基因的扩增。

本试剂盒具有快速、灵敏度高以及特异性强等优点，反应组分已混合并冷冻干燥成核酸扩增试剂，操作简便，易于保存。

引物设计

RT-RPA核酸扩增技术对引物设计的要求与常规PCR引物设计有一定的区别。由两条寡核苷酸组成一对引物，分别特异性识别一个核酸目标物的上下游核苷酸序列；引物长度在28-35 nt之间，序列中无回文序列、连续单碱基重复序列和内部二级结构区；引物Tm值不作为设计时主要考虑因素。建议在开展RPA扩增反应之前，先进行引物的筛选试验，以便得到较高的检测灵敏度。

适用仪器

恒温金属浴、恒温水浴锅、荧光PCR仪。

检测步骤

1. 核酸样本处理

1.1 核酸提取：请参考传统DNA/RNA提取方法或其他同效商品化试剂盒提取DNA样本。

1.2 核酸释放：*核酸释放剂，可溶解所有被膜病毒、绝大部分非被膜病毒和细菌(分支杆菌除外)；建议使用>2:1 比例与样本混匀，然后溶解RPA颗粒。

*核酸释放剂：主要成份为 0.5% Triton X-100 或 CA-63, pH=8.0；可直接溶解球使用；可任何比例与样本混溶，释放核酸推荐 2: 1 与未处理样本混合后再溶解 RPA 球。

2. 样本检测

2.1 反应体系： 单管反应体系（25 μ L）：

上游引物(10 μ M)	1.0 μ L
下游引物(10 μ M)	1.0 μ L
核酸样本和水	20.3 μ L
RT-RPA 颗粒	1个
醋酸镁Buffer/冻干球	1.25 μ L / 1颗
总体积	25.0 μ L

2.2 操作步骤

2.2.1 根据反应数量，按照反应体系配制含有水、上游引物(10 μ M)、下游引物(10 μ M)的 Mix，混合均匀后加入装有核酸扩增试剂的检测单元管中；

2.2.2 向检测单元管中加入经步骤2.2.1处理得到的待测核酸样本； 盖上管盖，上下颠倒 轻甩充分混匀 5-6次，使冻干球完全溶解后，低速离心10 sec（注：本步骤“是否充分混匀”将决定实验结果的重复性）。

2.2.4 将检测单元管放入37~40 $^{\circ}$ C 恒温金属浴、恒温水浴锅或PCR仪中，孵育20min。

【注意事项】

- 1) 开始检测前请仔细阅读本说明书全文，并严格按照要求进行操作。
- 2) 不同类型样品所提取的核酸含量和纯度有差异，可能导致扩增效率不同。
- 3) 当实验室环境、试剂、仪器或配件存在阳性物质（例如质粒、扩增产物等）污染，或样本间存在交叉污染的情况时，会影响检测结果准确性，出现假阳性结果。

- 4) 务必保证试剂保存、配制或运输得当，否则可能导致试剂检测性能下降，出现假阴性结果。
- 5) 阳性对照为质粒，适用于评价本试剂核酸扩增性能。
- 6) 请严格按照基因扩增实验室的管理规范进行操作。实验结束后，检测过程中所产生的废弃物应按照规定规范进行处理。

结果分析与判定

本产品可以根据琼脂糖电泳判定实验结果。