

RT-RPA核酸扩增试剂（荧光型）说明书v1.41

产品信息

产品名称	Cat#	组份及状态	规格
RT-RPA 核酸扩增试剂(荧光型)	K114A00	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
	K114A01	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
	K114A02	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 $^{\circ}$ 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。

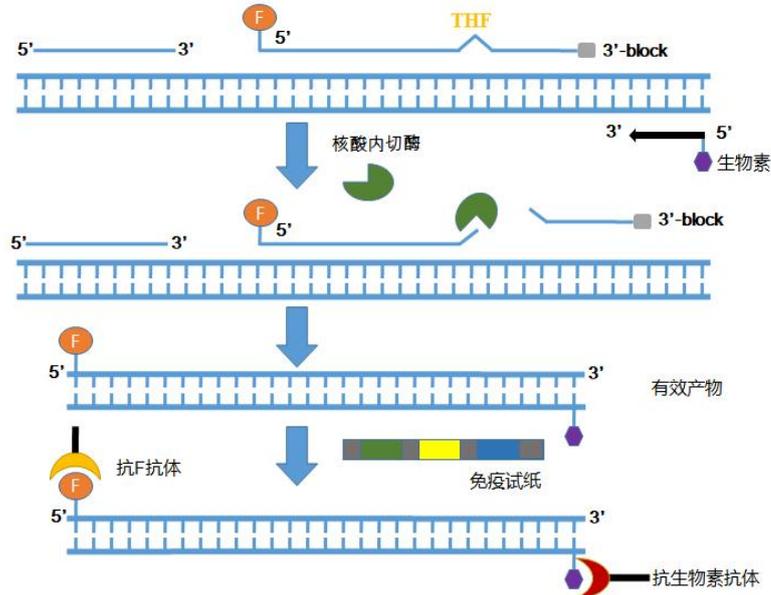
产品说明

- 1) 本产品是”Ready to Use”即用型 RT-RPA 冻干颗粒；含有除引物和探针外所有的反应要素，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) RT-RPA 扩增试剂可用检测 DNA 或 RNA。
- 6) 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。
- 7) 引物建议用 Beacon Designer 软件设计引物和探针；引物长度 28~35 碱基，探针优选 45 个碱基。
- 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。经过荧光标记的探针与扩增产物结合，当探针被核酸内切酶切后，与生物素标记的引物共同扩增形成两端有荧光标记及生物素标记的片段，可用电泳法或荧光法进行判断。如下图所示：



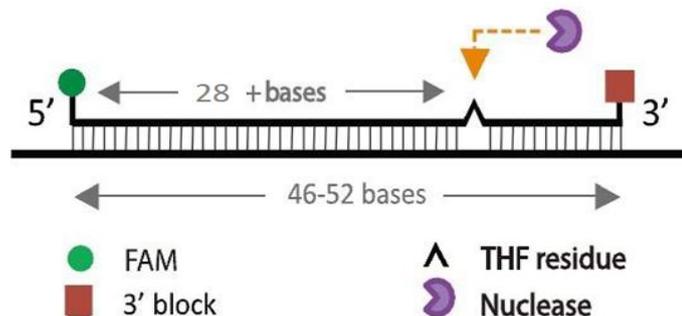
本试剂盒具有快速、灵敏度高以及特异性强等优点，反应组分已混合并冷冻干燥成核酸扩增试剂，操作简便，易于保存。

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。

1) 探针设计建议方法：探针长度在 46-52 nt 之间，序列避免回文序列、内部二级结构和连续的重复碱基；探针的 5'端用一种抗原标记物标记，通常为 FAM 基团或羧基荧光素；内部含有碱基核苷酸类似物替换核苷酸（例如四氢咪唑残基 THF-有时称为'd Spacer'）；3'末端有聚合酶延伸阻断基团（例如 C3-spacer，磷酸基或双脱氧核苷酸）。如下图所示：

注意：在开始实验前检查探针 5'端标记的基团与下游引物 5'端标记的基团是否与所用的试纸条相



匹配；建议在开展 RPA 试纸条型扩增反应之前，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提取方法或其他等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颗粒和镁颗粒。

*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 球和镁球。

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
探针(10 μ M)	0.3 μ L
核酸样本和水	22.7 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)和/或探针的 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; 荧光法则每隔30秒, 采集一次荧光信号。

【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国家相关规范进行处理。

结果分析与判定

本产品可以根据试纸条或者荧光法判定实验结果。