

RT- RPA 3.0（荧光型）

说明书

【规格及货号】

产品名称	应用	货号	组份及状态	规格	备注
RT-RPA/RAA 3.0(荧光型)	RNA DNA	901212032	1) Mix 颗粒: 25 μ L \times 96颗; 2) 醋酸镁颗粒: 14mM, >96颗; 3) 核酸释放剂: 1mL。	96Test/瓶	荧光探针或 试纸条

【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】

本产品可应用于核酸DNA或RNA的快速扩增，根据需求选择产品及规格。

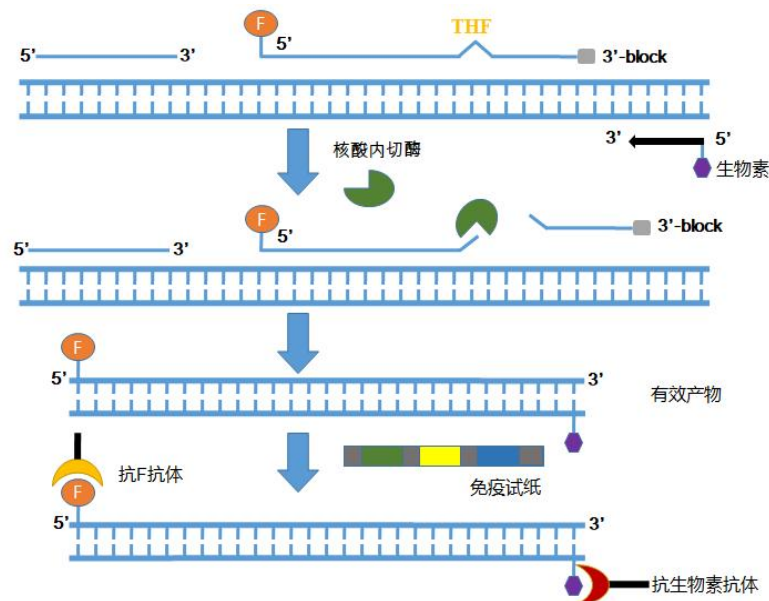
【产品说明及使用注意事项】

- 1) 本产品是"Ready to Use"即用型 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，逆转录酶，单链结合蛋白，ATP，dUTP，dATP，dCTP，dGTP，UGI，缓冲液，poly A，TET和PEG 35000等。
- 2) 本产品为防污染的RPA试剂：利用UGI可逆抑制UDG活性原理；扩增结束后UGI抑制效果减弱，UDG活性释放可快速消化DNA。若稀释后试纸条或CRISPR检测，请在稀释液中加入UGI，推荐终浓度1mM。
- 3) 醋酸镁颗粒：含有14mM 醋酸镁 \times 25 μ L和20nM UDG **（备注：熟悉RPA操作前，请勿与RPA颗粒一起溶解）。**
- 4) 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。
- 5) **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。**
- 6) **“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。**
- 7) RT-RPA/RAA可用检测DNA或RNA。
- 8) RPA引物建议使用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。
- 9) 试剂盒最低检测下限为 10-100copies/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/引物复合体，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/引物复合体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/引物复合体解体，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：



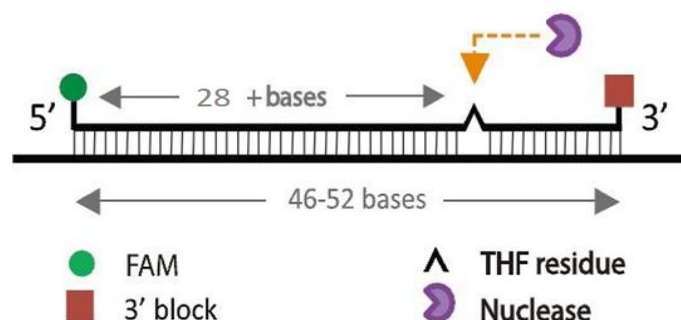
UDG酶 (Uracil-DNA Glycosylase) 也称为UNG酶，能够选择性水解断裂含有dU的双链或单链DNA中的尿嘧啶糖苷键，形成有缺失碱基的DNA链，该缺失碱基的DNA链在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂成为单链核苷酸。本产品使用热敏型UDG酶，在40℃左右，保留10~15%活性；55℃2分钟才能完全灭活。由于RPA反应温度较低，热敏UDG失活温度远远高于该温度，因此，本产品在dUTP-UDG外额外引入了尿嘧啶-DNA糖基化酶抑制剂 (UGI)。将UDG与Mg²⁺冻成颗粒，溶解过程中，优先处理提取的DNA或RNA样本中的气溶胶污染；处理之后的样本直接与RPA反应试剂混匀，试剂中的UGI有效地抑制了UDG的活性，保证了后续扩增出来的模板不被UDG降解，从而达到防污染效果。

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】

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T_m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。

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（例如四氢呋喃残基THF-有时称为'dSpacer'）；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/RNA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。

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
RPA颗粒	1个
Mg ²⁺ 颗粒（14mM/RXN）	1个

处理后的核酸样本、释放剂和水 Up to 25.0 μ L

（备注：Mg²⁺最后溶解，请勿在未加入引物和模板的情况下直接用水与RPA球一起溶解）。

2.2 推荐操作步骤*

- 1) RPA球溶解：将RPA球分装于八排管中，推荐使用20 μ L核酸直接溶解RPA球；
- 2) 镁离子球溶解：镁离子球分装于八排管盖子上，用引物探针Mix点样溶解或固定。
- 3) 盖紧管盖，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）。
- 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。

2.3 备注：

- 1) 切勿RPA球与镁离子球直接溶解：Mg²⁺是反应激动剂，加入后直接反应消耗Mix中ATP和磷酸肌酸，会导致后续检测失败。
- 2) 若不需要醋酸镁颗粒，可配制280mM 醋酸镁母液使用，推荐RPA反应终浓度14mM/Test。
- 3) Mg²⁺应最后加入，或与引物模板一起加入。

【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相关规范进行处理。

【结果分析与判定】

可以根据琼脂糖电泳或荧光法判定实验结果。

【生产企业】

名称：苏州可尔生命科技有限公司

地址：苏州市虎丘区科技城锦峰8号17-202.

电话：13401346531

邮箱：info@keerlife.com

【版本号】 1.2版