

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	应用
RPA/RAA 3.0 (荧光型)	DNA	901112032	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】

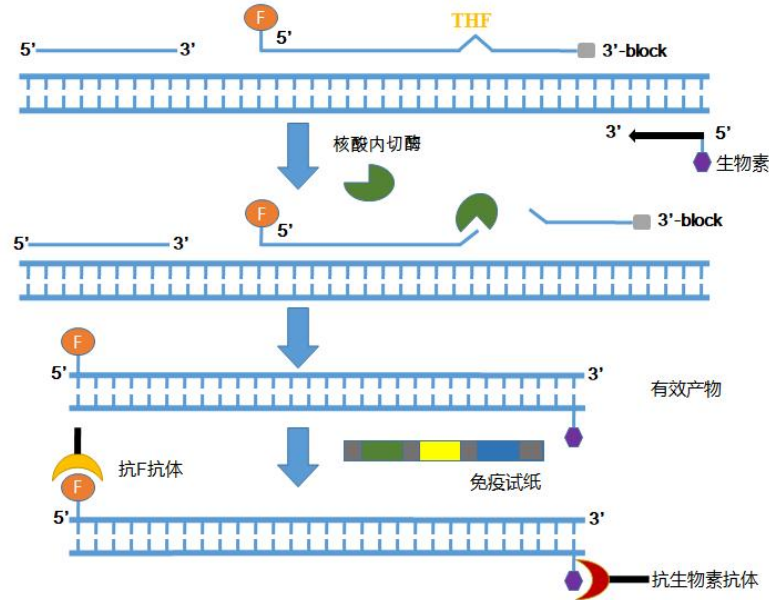
本产品可应用于核酸DNA的快速扩增, 根据需求选择产品及规格。

【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, 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) 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。
- 8) 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:



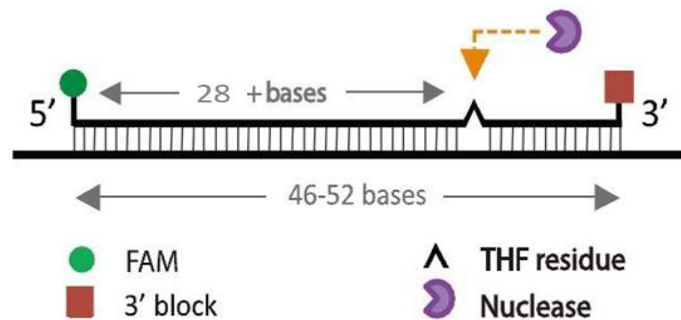
UDG酶 (Uracil-DNA Glycosylase) 也称为UNG酶, 能够选择性水解断裂含有dU的双链或单链DNA中的尿嘧啶糖苷键, 形成有缺失碱基的DNA链, 该缺失碱基的DNA链在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂成为单链核苷酸。本产品使用热敏型UDG酶, 在40℃左右, 保留10~15%活性; 55℃2分钟才能完全灭活。由于RPA反应温度较低, 热敏UDG失活温度远远高于该温度, 因此, 本产品使用dUTP-UDG额外引入了尿嘧啶-DNA糖基化酶抑制剂 (UGI)。将UDG与Mg²⁺冻成颗粒, 溶解过程中, 优先处理提取的DNA或RNA样本中的气溶胶污染; 处理之后的样本直接与RPA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

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】

可以根据荧光PCR仪或试纸条判定实验结果。

【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