



RPA RAA DNA恒温扩增试剂盒 (试纸型) (防污染)

RPA RAA DNA Isothermal Amplification
Kit (Strip-Type) (Anti-Contamination)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: NF-LYO-FW-48
NF-LYO-FW-96

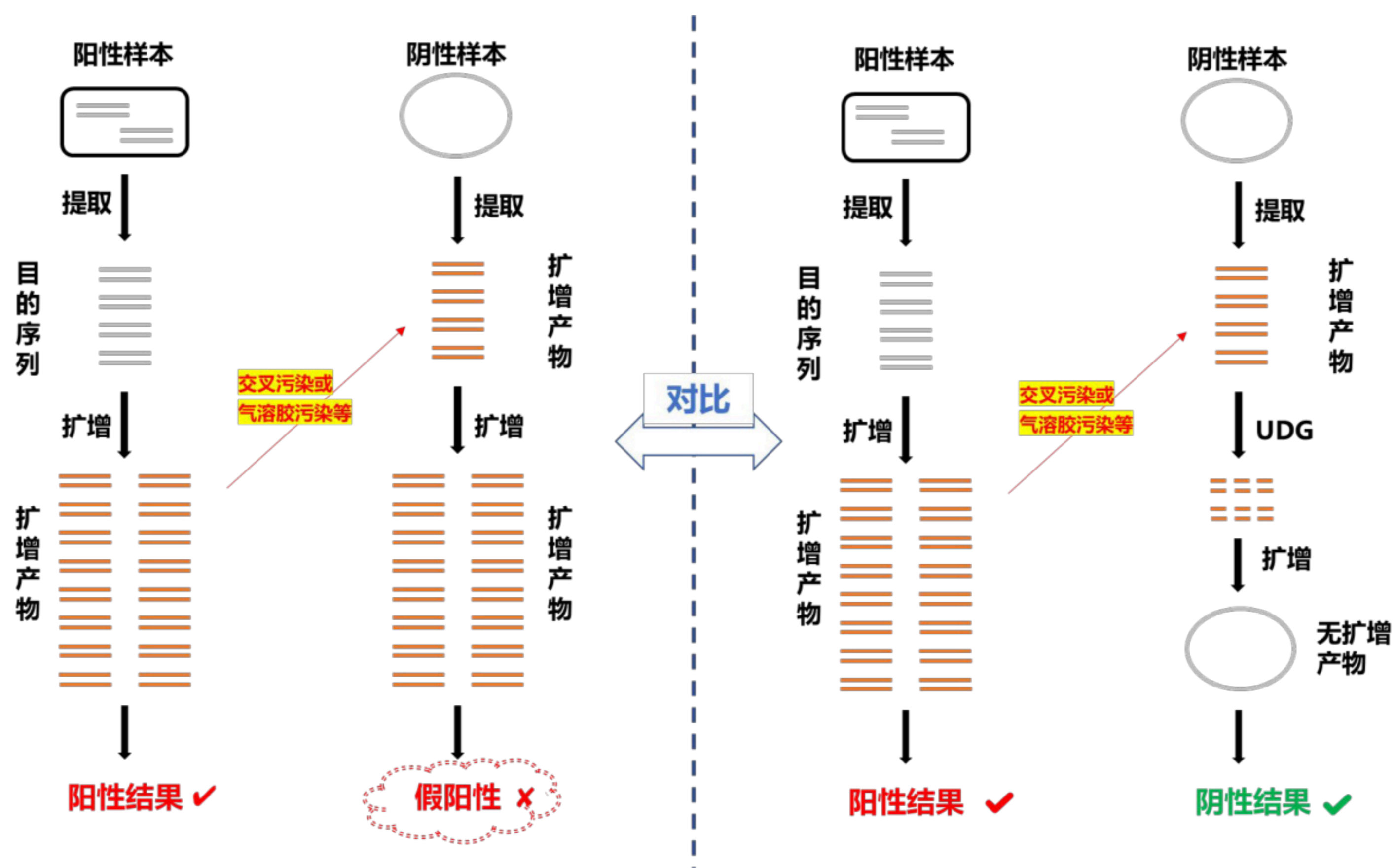
目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
需要但未提供的材料	2
储存	2
检测样品	2
操作步骤	3
注意事项	4
如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒	4
恒温扩增-Nfo试剂盒工作原理图	5
Nfo探针设计原则	6

产品简介

Brief introduction

本试剂盒提供核酸恒温扩增所需的试剂，具有灵敏度高、特异性强、反应时间短等优点。反应在恒温（37°C~42°C）下进行，扩增通常在30分钟内完成，操作简便，可以利用试纸条观察结果。为了降低污染风险，本产品提供了UDG酶，可以迅速、高效且特异地降解扩增产物，从而预防因扩增产物导致的交叉污染或气溶胶污染等。



试剂盒组成

Materials supplied

Item	BA-LYO-FW-48	BA-LYO-FW-96
Rehydration Buffer (2X)	500μL	500μL*2
Positive Control* (10X)	10μL	10μL*2
Starter (10X)	100μL	100μL*2
Reaction Tubes	48T	96T
Diluent Buffer	4000μL	4000μL*2
UDG (10X) (冻干粉) **	1管	2管
UDG Diluent Buffer	1000μL	1000μL*2

* Positive control包含引物，探针和DNA模板。

**根据标签上的标识，向UDG冻干粉中加入相应体积的UDG Diluent Buffer，混匀。

需要但未提供的材料

Materials needed but not provided

1. 移液器，枪头，离心机
2. dd H₂O
3. 恒温扩增特异性引物和探针
(EZassay恒温扩增引物与探针在线设计：<https://ezassay.com/primer>)
4. 核酸试纸条。推荐EZassay™ 核酸检测试纸条，货号：PS-FMBO-96。

储存

Assay procedure

-20°C

检测样品

Sample Testing

DNA 模板 (RNA需要反转录为cDNA)。

操作步骤

Operating steps

1. 样本处理。
从样本中提取核酸或将样本中的核酸释放出来，作为扩增反应的模板。
加UDG消化模板中可能存在的污染：吸取9μL待测模板，加入1μL UDG (10X)，室温或25~37°C孵育2~5分钟。
2. 以20μL反应体系为例，每孔Reaction Tubes中加入（注意：冰上操作）。

组份	体积
Rehydration Buffer (2X)	10 μ L
正向引物(20 μ M)	0.42 μ L
反向引物(20 μ M)	0.42 μ L
探针(4 μ M)	0.6 μ L
DNA模板或阳性对照*	x μ L
Starter (10X) **	2 μ L
ddH2O	补齐至19 μ L

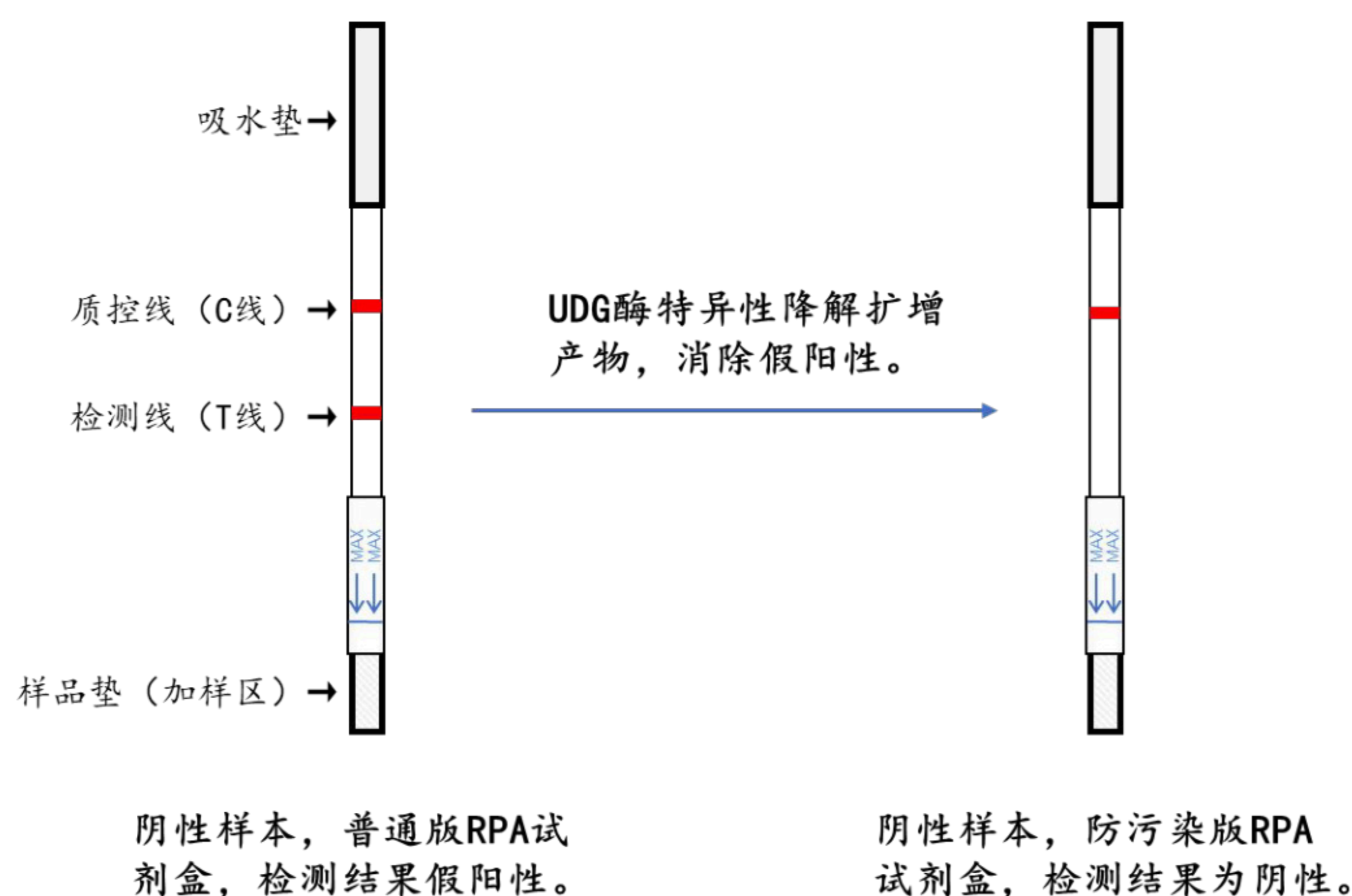
*阳性对照组加入2 μ L Positive Control. (已包含引物、探针和模板)

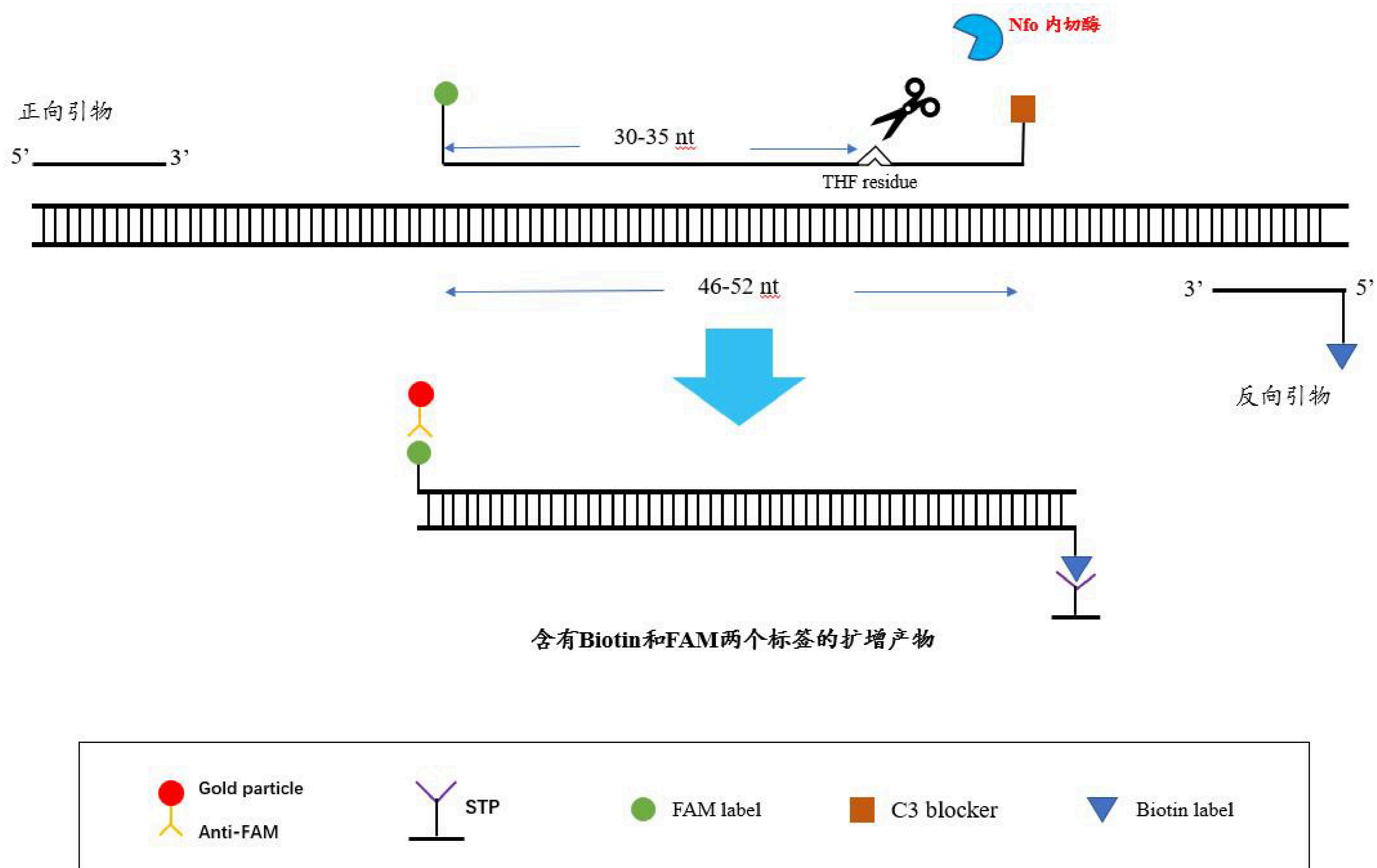
如模板浓度高推荐模板DNA 加样量为1 μ L, $x \leq 5\mu$ L

**最后加入Starter.

3. 使用UDG Diluent Buffer稀释UDG (10X), 在管盖上加1 μ L稀释后的UDG (1X).
4. 弹数次混匀或者上下倒置混匀, 瞬时离心, 重复3次。(需确保混匀, 避免剧烈震荡涡旋)
5. 39 $^{\circ}$ C或40 $^{\circ}$ C孵育20~40分钟。
6. 取10 μ L扩增产物, 加入80 μ L Diluent Buffer, 混匀, 取70 μ L滴加到试纸条上。
(注意避免扩增产物污染; 稀释倍数可根据实际情况优化, 一般1: 9至1: 500之间)

遇到问题: 扩增产物交叉污染/气溶胶污染, 导致假阳性。

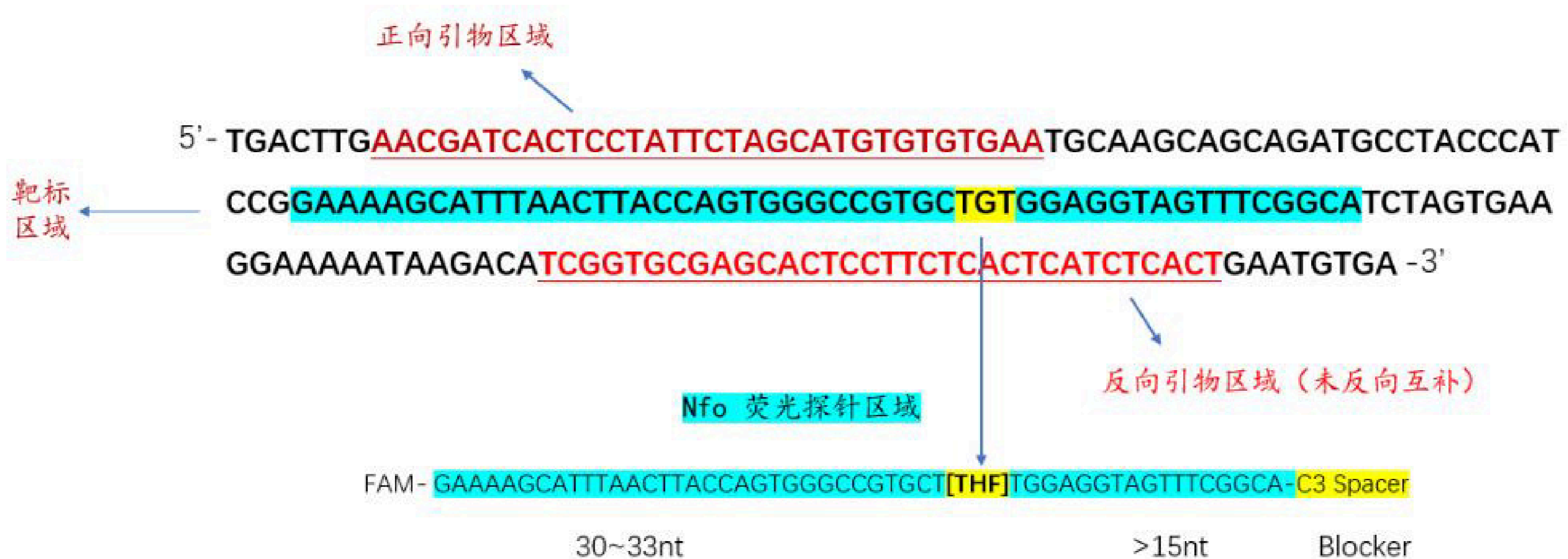




Nfo探针设计原则

Design Principles of NFO Probe

1、恒温扩增-Nfo探针结构：恒温扩增-Nfo探针通常含有核苷酸类似物THF(四氢呋喃)、5'端荧光基团 (FAM、FITC等)、3'端Block (合适的3'-修饰基团(例如C3-spacer, a phosphate, a Biotin-TEG or an amine) 组成。THF(四氢呋喃)替代了目标序列中的碱基，而不是附加插入序列中。Nfo探针示例图：



注意事项

Notes

- 建议扩增前，扩增后，分区操作。避免扩增产物污染。(Avoid carry-over contamination)
- 温度37~42°C范围内，温控设备可以用金属浴，水浴锅或PCR仪。PCR仪确保关闭热盖，可以提前关闭热盖后运行控制热盖温度，具体如何控制热盖温度请根据型号咨询厂家。一般PCR仪或qPCR仪打开电源后热盖会马上升温直到105°C，因此需要确保热盖温度降到合适的温度，起码在50°C以下才可以把反应管放进去反应，否则过热的热盖温度传导到底部，会把酶部分失活或全部失活。
- 所有的组分都应当完全溶解并混匀。
- DNA 和 Starter 应该分开加到反应管的不同区域, 然后离心到管底。
- 正向引物，反向引物和探针应该同时加入。
- 对于低模板浓度的样品可以在反应第4分钟时轻弹几次，离心混匀。（避免剧烈震荡）

如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒

How to choose the right RPA/RAA isothermal amplification kit

产品名称	分类	待测模板	货号	简介
RPA RAA 恒温扩增试剂盒 (防污染)	基础型	DNA	BA-LYO-FW-96	类似PCR，只是完成DNA扩增，用DNA胶观察结果或与CRISPR技术结合使用。
		RNA	BA-RT-LYO-FW-96	
	荧光型	DNA	EX-LYO-FW-96	在基础型的基础上，引入荧光探针 (Exo probe)，增强特异性，类似荧光探针PCR。用荧光仪读荧光值。
		RNA	EX-RT-LYO-FW-96	
	试纸型	DNA	NF-LYO-FW-96	在基础型的基础上，引入试纸探针 (Nfo probe)，增强特异性，用层析试纸条观察结果。
		RNA	NF-RT-LYO-FW-96	

恒温扩增-Nfo试剂盒工作原理图

Working Principle Diagram of Isothermal Amplification-Nfo Kit

利用“双抗体夹心”的原理，可将恒温扩增-Nfo反应产物直接在胶体金试纸条上检测是否有反应产物。

- 2、恒温扩增-Nfo反向引物结构：5' 端需要进行生物素修饰；
- 3、探针长度：46-52nt左右；
- 4、探针的5' 端距离THF介于 30-33nt；
- 5、探针的3' 端距离THF \geq 15nt；
- 6、请注意Nfo探针的3' -block不能用生物素进行block！
- 7、避免探针和引物形成二聚体。
- 8、同一方向的引物可以与探针重叠，重叠部分小于20nt。
- 9、探针的浓度可在50nM-150nM之间进行优化；
- 10、探针设计可以在上述引物筛选之后确定好扩增区域后再进行设计和筛选，探针设计在上下游引物之间即可；
- 11、恒温扩增试剂盒（试纸型）须用相应的试纸条进行结果检测。注意增加阴性对照，避免假阳性；
- 12、请注意试纸条型试剂盒的扩增产物会被Nfo酶切割，不适合跑胶观察。