



RPA RAA RNA恒温扩增试剂盒 (基础型) (防污染)

RPA RAA RNA Isothermal Amplification
Kit (Basic 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: BA-RT-LYO-FW-48
BA-RT-LYO-FW-96

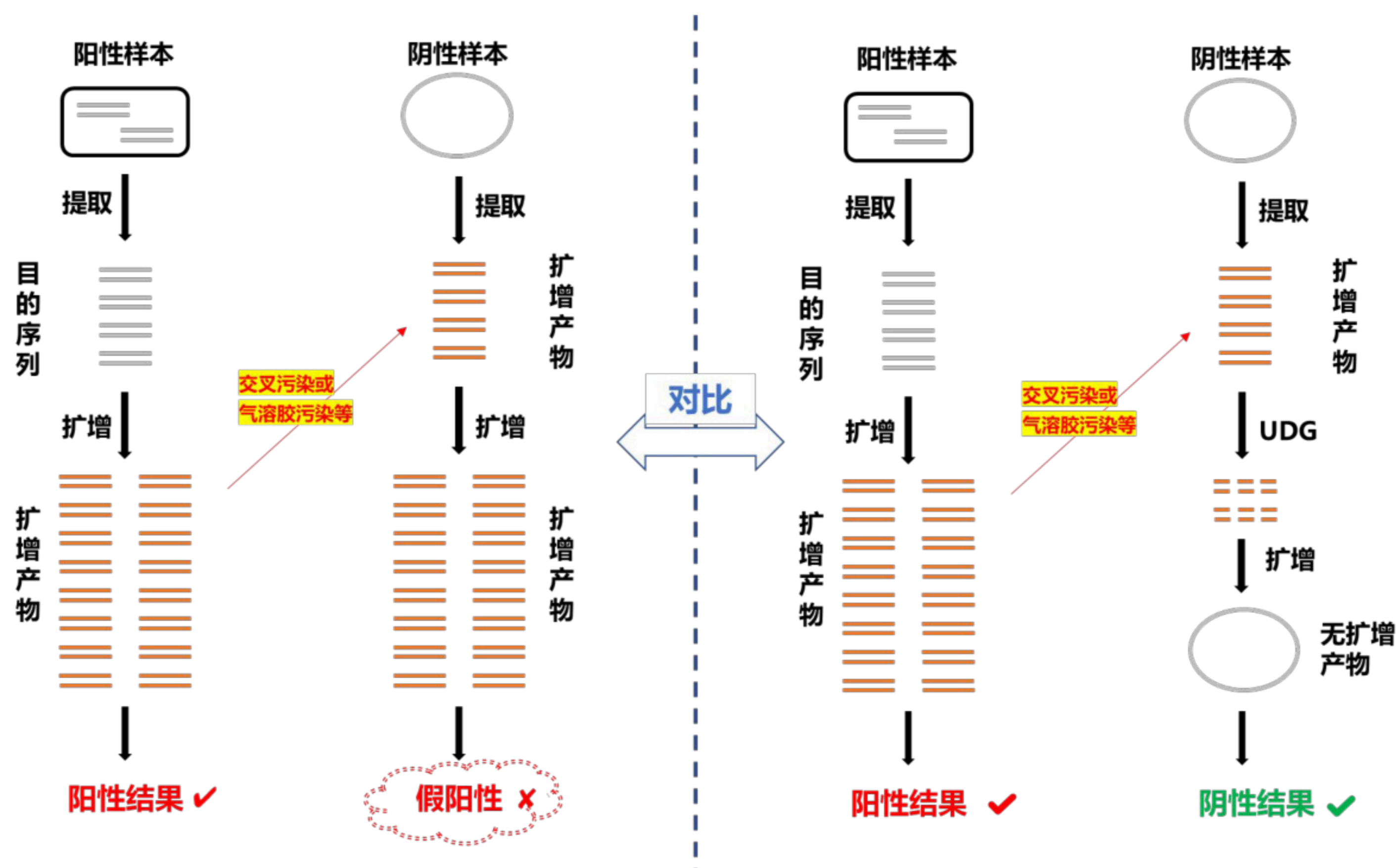
目录 CONTENTS

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
检测样本	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
恒温扩增基础引物设计原则	5

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（37~42℃）下进行，扩增通常在30分钟内完成，操作简便，易于保存。金属浴、水浴锅等即可进行反应操作，无需购买PCR仪等价格高昂的专属设备。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-RT-LYO-FW-48	BA-RT-LYO-FW-96
Rehydration Buffer (2X)	500μL	500μL*2
Positive Control* (10X)	10μL	10μL*2
Starter (10X)	100μL	100μL*2
Reaction Tubes	48T	96T
UDG (10X) (冻干粉) **	1管	2管
UDG Diluent Buffer	1000μL	1000μL*2

* Positive control包含RNA模板和引物。

**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
(EZassay恒温扩增引物与探针在线设计: <https://ezassay.com/primer>)
4. 加热设备 (37 ~ 42°C)

储存

Assay procedure

-20°C

检测样品

Sample Testing

RNA 模板。兼容DNA模板。

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)	0.5 μ L
反向引物(20 μ M)	0.5 μ L
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. (已包含引物和模板)

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

**最后加入Starter.

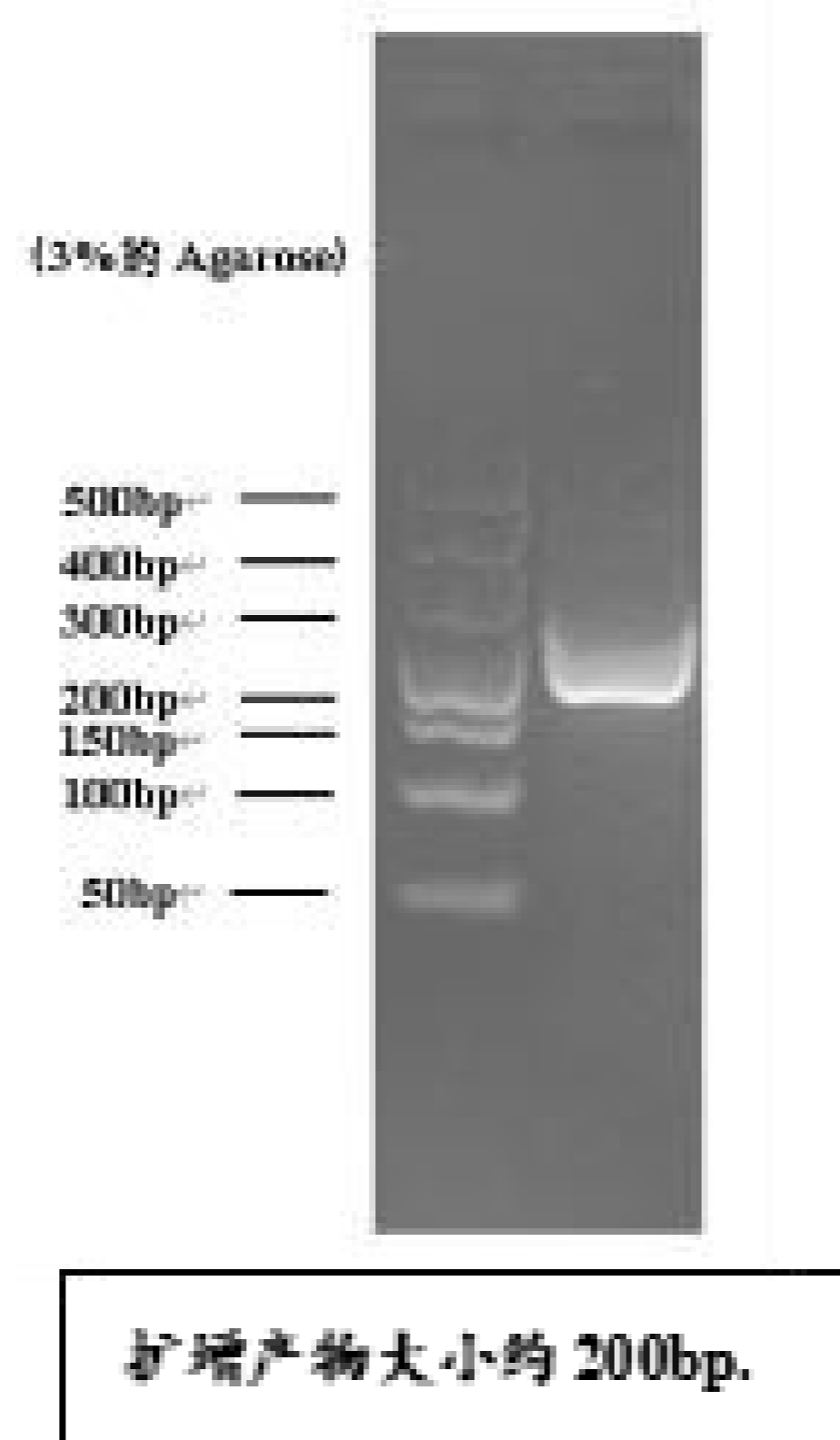
3. 使用UDG Diluent Buffer稀释UDG (10X), 在管盖上加入1 μ L稀释后的UDG (1X).

4. 弹数次混匀或者上下倒置甩混匀,

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. 纯化扩增产物后跑胶。(或65 $^{\circ}$ C加热10分钟后直接跑胶)



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。
- 建议使用3%的胶跑电泳
- DNA模板和 Starter应该分开加到反应管的不同区域，然后离心到管底。
- 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），再放回原来的孔位继续反应。

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	

恒温扩增基础引物设计原则

Design principles of basic primers for isothermal amplification

- 1、长度：30-35nt左右；
- 2、引物的5'端前3-5个核苷酸避免连续的G碱基，但是如果是C碱基或是T碱基则对扩增有好处，引物这会有利于重组酶跟引物形成filament结构；
- 3、引物的3'末端的最后三个碱基，有G碱基和C碱基是有利于扩增的，可能是因为有利于聚合酶的锚定作用使得酶和引物结合得更加稳定；
- 4、GC含量应大于30%和小于70%；
- 5、还有就是引物的一般设计原则：
 - 1) 应避免连续出现4个以上的单一碱基；
 - 2) 不能含有自身互补序列，否则会形成发夹样二级结构；

3) 两个引物之间不应有多于4个的互补或同源碱基，不然会形成引物二聚体，尤应避免3'端的互补重叠；

4) 3'末端：如果可能的话，每个引物的3'末端碱基应为G或C，但不应在其3'端出现超过3个的连续G或C，否则会使引物在GC富集序列区错误引发。

6、扩增子的长度不应超过500bp，最好是150-250bp左右。

7、引物筛选过程举例：

1) 进行第一轮引物筛选，先选定正向F3引物去筛选所有的反向引物，得到最优的结果为F3+R4，确定R4为最优的反向引物；

	R1	R2	R3	R4	R5
F1					
F2					
F3	--	+	+	+++	++
F4					
F5					

2) 进行第二轮引物筛选，将R4作为最优的反向引物去对所有的正向引物进行筛选，得到最优的结果为：F4+R4。

	R1	R2	R3	R4	R5
F1				--	
F2				++	
F3	--	+	+	+++	++
F4				++++	
F5				++	

8、引物筛选的时候应该以比较“困难的反应条件”去筛选，比如模板浓度低和反应时间短。

9、引物的浓度可在150nM-600nM之间进行优化。

10、引物筛选可直接使用琼脂糖凝胶观察是否能扩增出目的片段。