



# RPA RAA RNA恒温扩增试剂盒 (荧光型) (防污染)

RPA/RAA RNA Isothermal Amplification  
Kit (Fluorescent) (Anti-contamination)

✉ [info@ezassay.com](mailto:info@ezassay.com)

🌐 [www.ezassay.com](http://www.ezassay.com)

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: EX-RT-LYO-FW-48  
EX-RT-LYO-FW-96

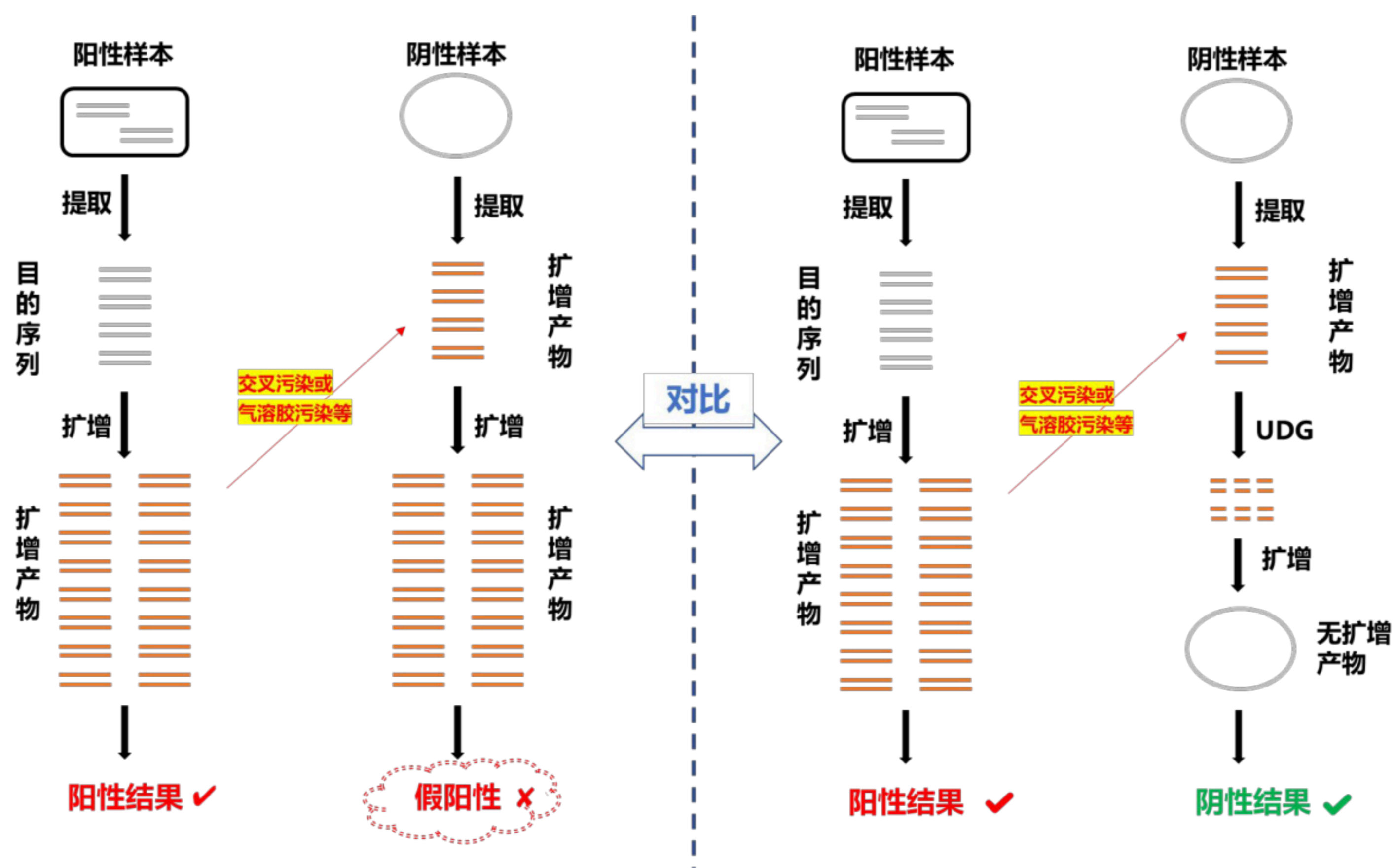
# 目录 CONTENTS

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-Exo试剂盒工作原理示意图	5
Exo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 ~ 42°C）下进行，扩增通常在30分钟内完成，操作简便，反应结束后无需开盖，降低污染风险。为了进一步降低污染风险，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	EX-RT-LYO-FW-48	EX-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包含引物，探针和RNA 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 H<sub>2</sub>O
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. 荧光仪 (例如qPCR仪)

## 储存

### Assay procedure

-20°C

## 检测样品

### Sample Testing

RNA 模板。兼容DNA模板。  
本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)。

## 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. 将荧光仪的温度设置为39°C (关闭热盖功能或者将盖子温度设置为42°C。)  
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 $\mu$ L
正向引物(20 $\mu$ M)	0.42 $\mu$ L
反向引物(20 $\mu$ M)	0.42 $\mu$ L
探针(4 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L
RNA 模板或阳性对照*	x $\mu$ L
Starter (10X) **	2 $\mu$ L
ddH2O	补齐至19 $\mu$ L

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

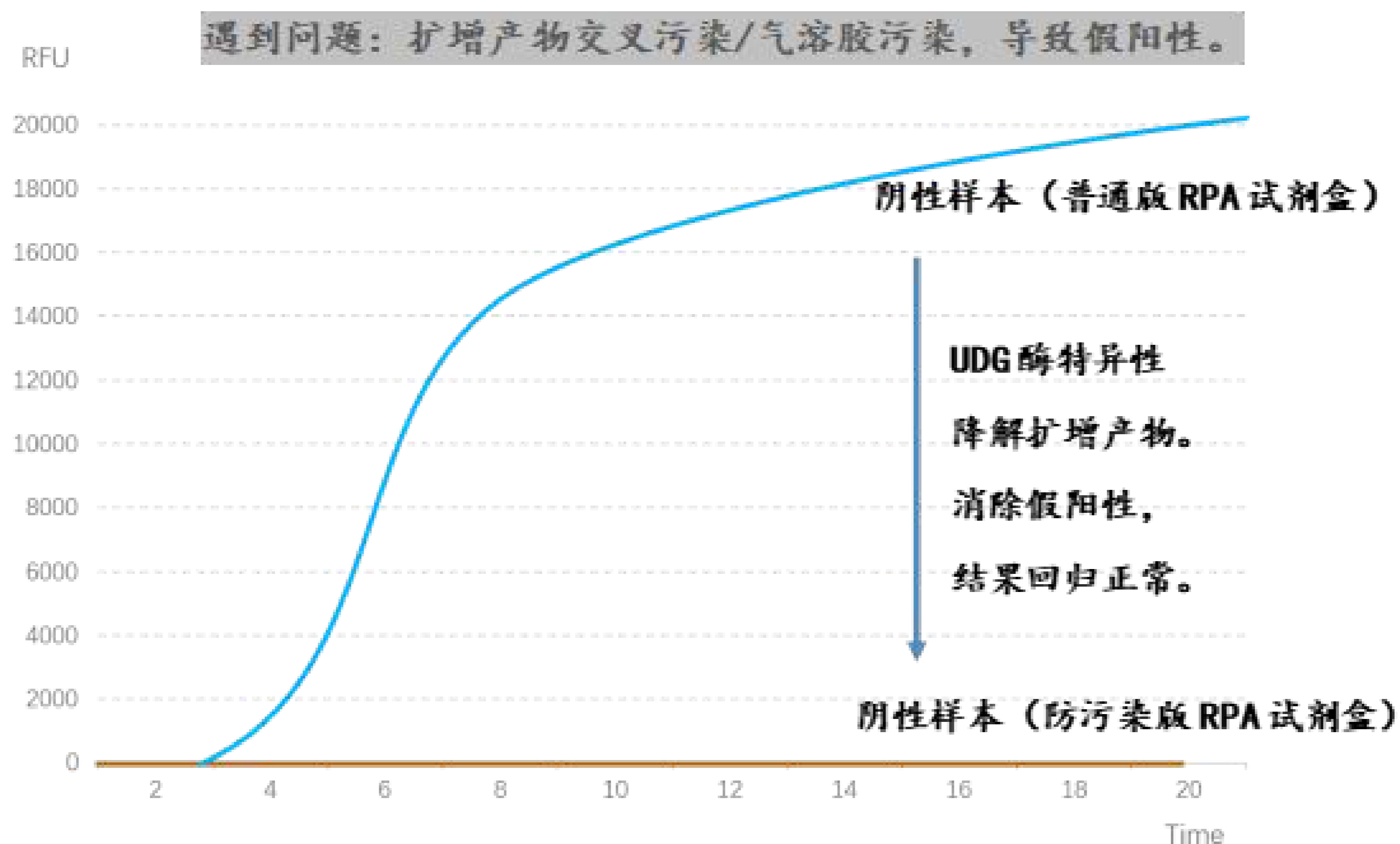
如模板浓度高推荐模板RNA 加样量为1 $\mu$ L,  $x \leq 5 \mu$ L

\*\*最后加入Starter.

3. 使用UDG Diluent Buffer稀释UDG (10X), 在管盖上加入1 $\mu$ 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. 将Reaction Tubes放入荧光仪中开始读数。反应时间20~40分钟。



## 注意事项

### Notes

- 所有的组分都应当完全溶解并混匀。
- 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。
- 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), 再放回原来的孔位继续反应。
- 如果使用ABI 荧光仪, 将 “Passive reference” & “Quencher” 设置为 “None”。
- 如果使用的荧光仪是从管盖读取荧光值, 建议增大反应体积。例如将20 $\mu$ L反应体系增加到40 $\mu$ L。如果使用的荧光仪是从管壁读取荧光值, 则无影响。
- 注意避免交叉污染。
- qPCR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qPCR仪打开电源后热盖会马上升温直到105 $^{\circ}$ C, 因此需要确保热盖温度降到合适的温度, 起码在50 $^{\circ}$ 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。

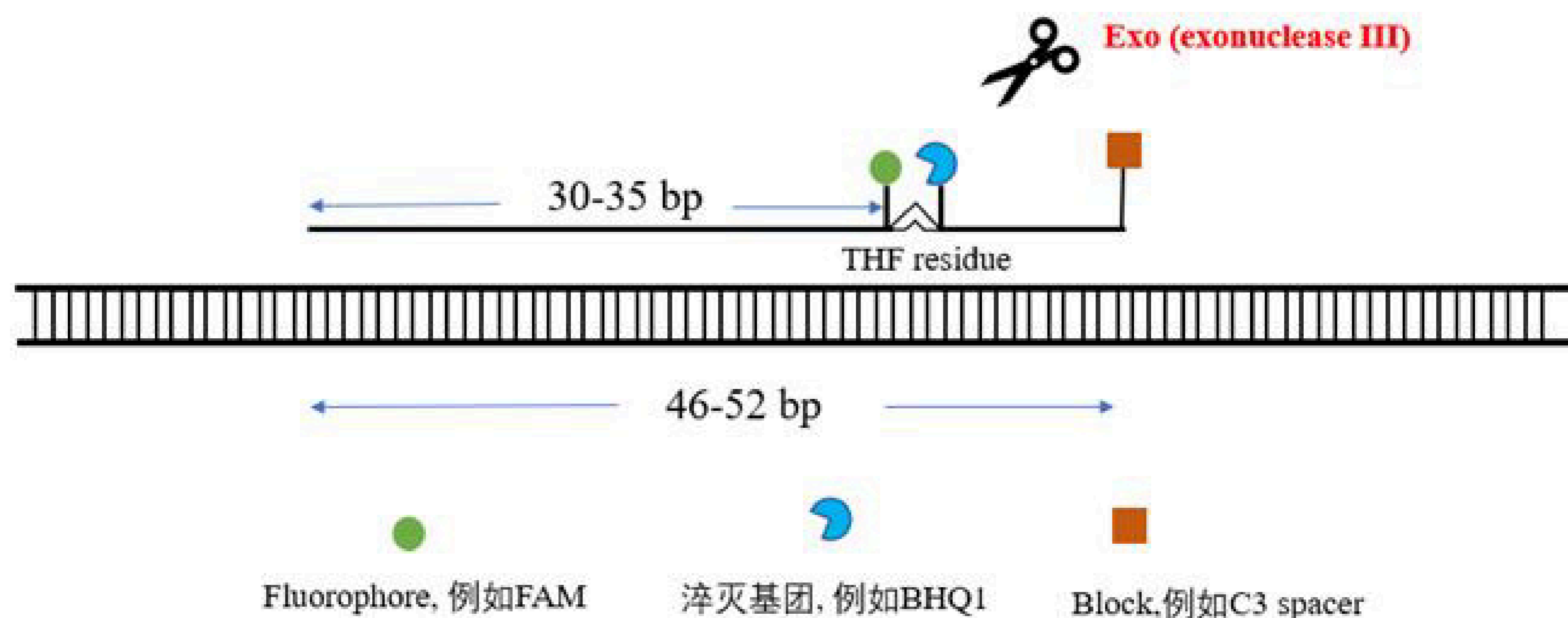
## 如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒

### 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-Exo试剂盒工作原理示意图

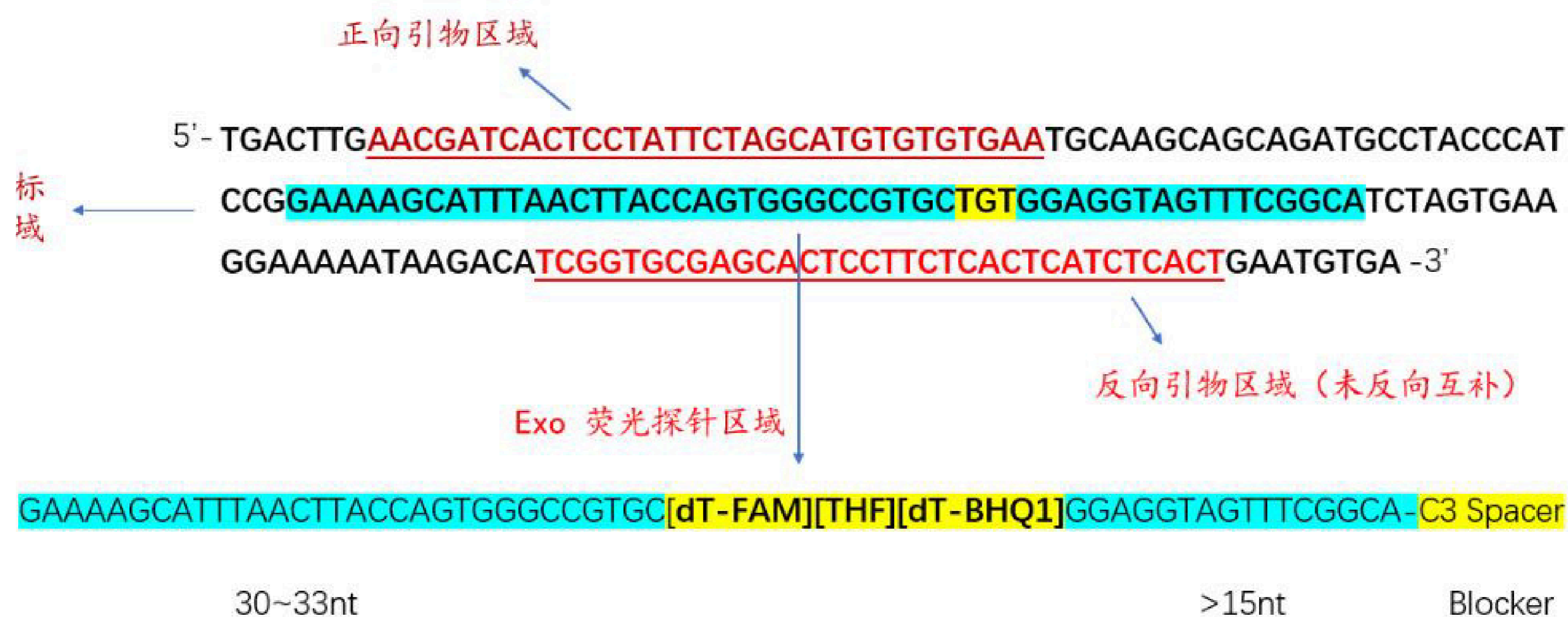
### Schematic Diagram of the Working Principle of the Isothermal Amplification-Exo Kit



## Exo探针设计原则

### Design Principles of Exo Probes

1、Exo探针结构：Exo探针通常含有核苷酸类似物THF(四氢呋喃)、荧光基团（FAM/TAMRA等）、淬灭基团BHQ、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。其中序列中的相关T残基被dT荧光团残基或dT淬灭剂残基取代。Exo探针示例图：



- 2、探针长度：46-52nt左右；
- 3、探针的5' 端距离THF $\geq$  30-33nt；
- 4、探针的3' 端距离THF $\geq$ 15nt；
- 5、荧光基团和淬灭基团的距离应该 $\leq$ 5nt；
- 6、荧光标记基团和淬灭基团距离THF应在0~2nt之间，最多不能超过2nt，否则会导致Exo酶的切割效果不好；
- 7、探针标记当使用FAM作为荧光基团，建议使用BHQ1作为淬灭基团，当使用TAMRA作为荧光基团时，建议使用BHQ2作为淬灭基团；
- 8、探针的浓度可在50nM-150nM之间进行优化；
- 9、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；
- 10、结果判读需要用具有荧光信号采集的仪器，如带有荧光收集的恒温扩增仪或者是ABI-7500、罗氏480等基础qPCR仪；
- 11、请注意Exo试剂盒的扩增产物一般会被Exo酶切割。若进行跑胶，一般不能看到清晰的目的条带。