EZassay

RPA DNA恒温扩增试剂盒（基础型）（UDG酶防污染）

RPA Basic Kit (UDG Enzyme Based Contamination Control)

info@ezassay.com

www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: BA-LYO-FW-48
BA-LYO-FW-96

目录 CONTENTS

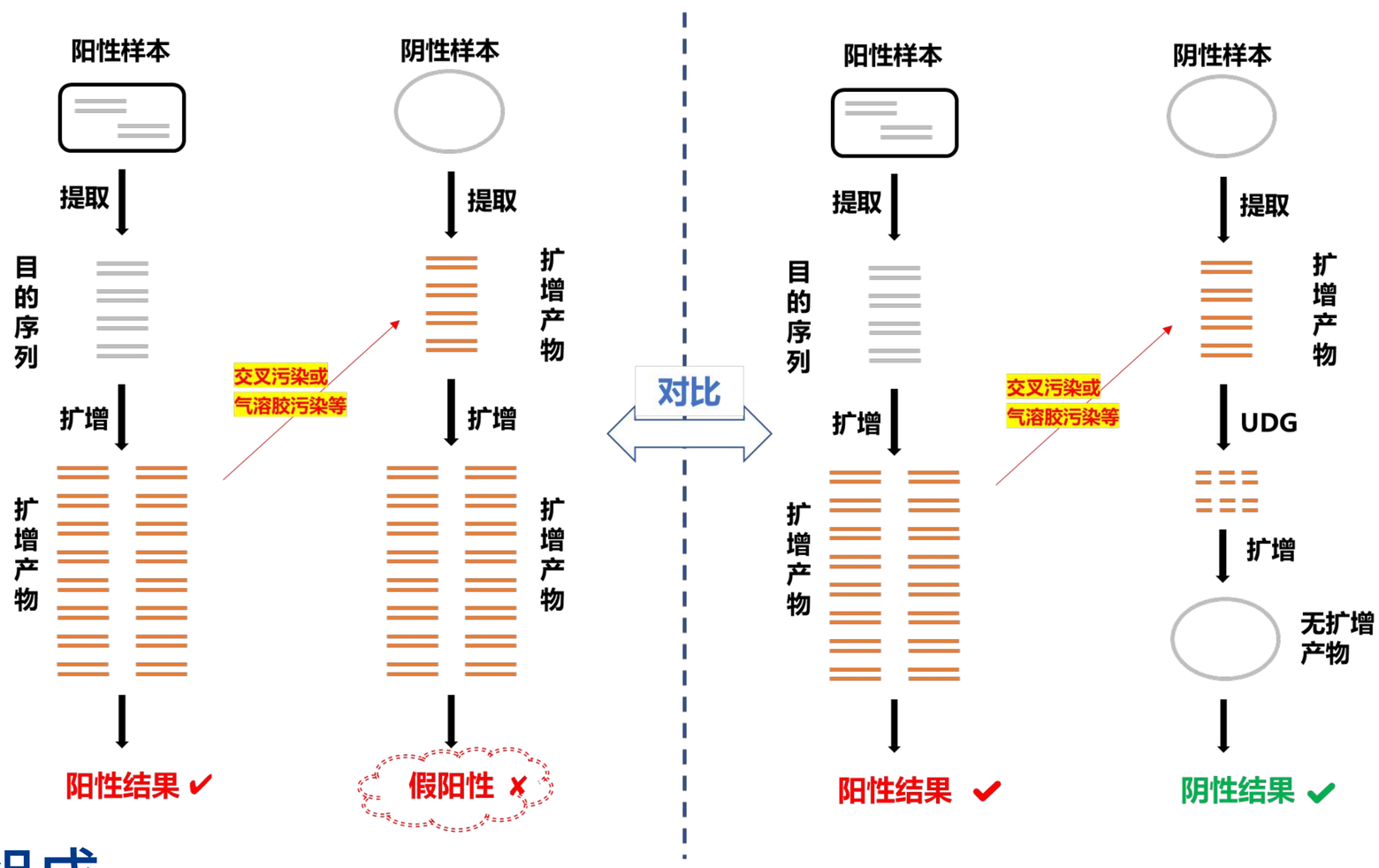
内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
需要但未提供的材料	2
储存	2
检测样本	2
操作步骤	2
注意事项	4
恒温扩增基础引物设计原则	5
如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒	6

产品简介
Brief introduction

本试剂盒提供进行核酸恒温扩增（RPA）反应所需的核心组分，具有高灵敏度、高特异性和反应快速等特点。反应可在 37–42°C 恒温条件下进行，通常可在 30 分钟内完成扩增。

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。

该试剂盒操作简便，对设备要求低，仅需金属浴或水浴等恒温设备即可完成反应，适用于快速核酸检测及现场检测应用。



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
RPA Reaction Tube**	48T	96T
UDG (10X)（冻干粉）***	1管	2管
UDG Diluent Buffer	1000µL	1000µL*2

* Positive control包含DNA 模板和引物。
**内含 RPA 冻干粉，使用前建议短暂离心，将冻干粉收集于管底。
***根据管身标签标示的体积，向UDG冻干粉中加入相应体积的UDG Diluent Buffer，充分混匀。

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

(推荐RPA引物与探针在线设计：https://www.ezassay.com/primerDesign)

4. 加热设备（37 ~ 42°C）,例如PCR仪，金属浴，水浴锅等。

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. 设置仪器温度至39°C。
若使用PCR仪，请确保关闭**热盖或调至42°C。**

2. 处理DNA模板。
从样本中提取核酸或通过裂解释放核酸，作为扩增反应模板。
为降低污染风险，使用UDG对模板中可能存在的扩增产物进行处理：取9 µL待测模板，加入1 µL UDG (10x)，于室温或25–37°C孵育2–5分钟。

3. 向每个RPA Reaction Tube加入以下组份：
建议在冰上操作。

序号	组份	实验组	阳性对照组	阴性对照组
1	Rehydration Buffer (2x)	10µL	10µL	10µL
2	正向引物(20µM)* 反向引物(20µM)	0.5µL 0.5µL	- -	0.5µL 0.5µL

3	DNA 模板	x μL	-	-
4	Positive Control **	-	2μL	-
5	ddH2O		补齐至18μL	

*根据反应数，建议配置引物预混液(primer mix)。
** Positive Control管内包含引物和DNA模板。

4. 向每个RPA Reaction Tube加入2μL Starter。
建议将Starter加在管盖或管壁上。

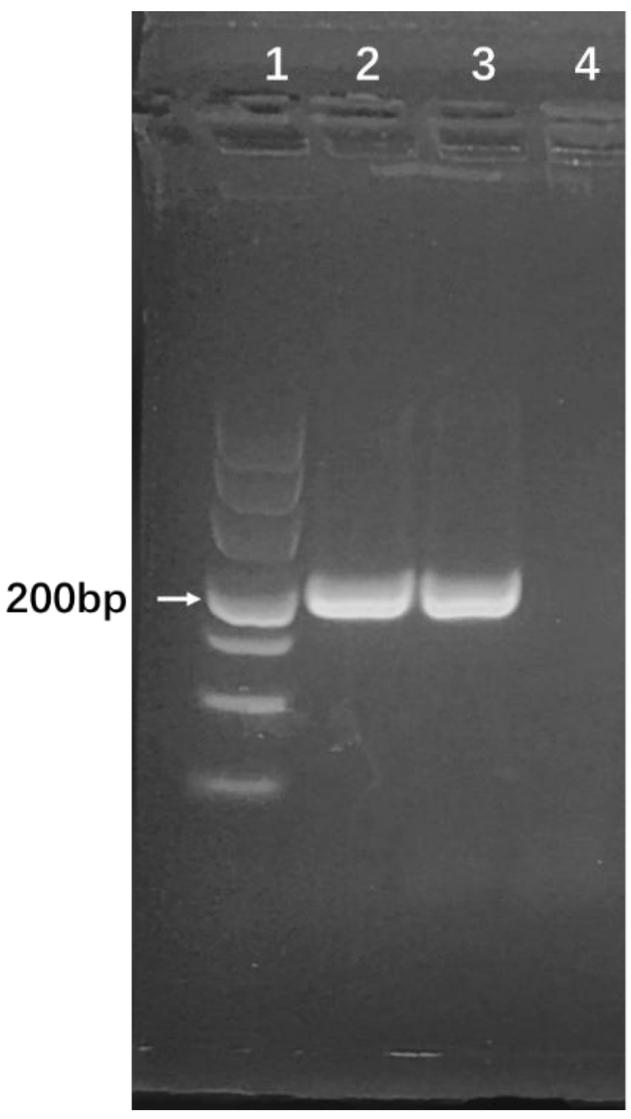
5. 使用UDG Diluent Buffer稀释UDG (10x)，在管盖上加入1μL稀释后的UDG (1x)。

6. 上下颠倒甩动反应管，瞬时离心，重复3次，确保混匀。RPA Reaction Tube中冻干粉应当完全溶解并混匀。
请注意避免剧烈涡旋震荡。

7. 将RPA Reaction Tube放置仪器中，39°C孵育20~40分钟进行RPA反应，得到扩增产物。请注意设置温度与实际温度可能存在有差异。建议首次使用时进行温度梯度测试，例如配置3个反应，分别在 **37°C、39°C 和 42 °C**下进行对比以确定最佳反应温度。

8. 65°C 加热 10 分钟终止反应。随后取 1–10 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，推荐使用 2%–3% 琼脂糖凝胶。

需要注意的是，高温变性不能完全去除反应体系中的蛋白成分，可能会对后续产物分析产生一定影响。为获得更清晰、可靠的电泳结果，建议先对扩增产物进行 DNA 纯化，再进行琼脂糖凝胶电泳。



RPA扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析示例图： 采用3%琼脂糖凝胶，在120 V条件下电泳30分钟。扩增产物经65°C加热10分钟后，取10 μL与2 μL 6× DNA Loading Buffer混匀后上样。泳道1为DNA marker, 泳道2为实验组，泳道3为阳性对照组（目标条带大小约200 bp），泳道4为阴性对照组。

注意事项
Notes

- 建议在扩增前和扩增后实施分区操作，并在样本制备、反应体系配制及扩增等步骤中使用相互独立的区域、设备和耗材，以避免扩增产物污染。
进行终点检测时，应确保阴性对照（NTC）优先于阳性样本处理，并在打开阳性样本时保持阴性对照反应管处于密闭状态。
如怀疑存在扩增产物污染，应弃用已使用的试剂，并更换为新的试剂组分。
- RPA防污染版的扩增产物（含dU)与crRNA可以正常匹配。dU可以与rA配对，形成类似A=U的氢键。
- UDG酶只降解含有dUTP的扩增产物，对于之前的污染源（dNTP)无效。对于已经有的污染，建议清除污染源，再进行实验。
- 在 RPA 反应孵育过程中进行 300 rpm 振荡（如使用恒温振荡器）可能有助于提高检测灵敏度。
- 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。
- 模板使用建议

a)　　人基因组 DNA（Human genomic DNA）：
推荐加入量为 1–500 ng / 20 µL 反应体系。在优化条件下，检测灵敏度最低可达 0.1 ng。
b)　　细菌基因组 DNA（Bacterial genomic DNA）：
推荐加入量为 0.01–10 ng / 20 µL 反应体系。在优化条件下，检测灵敏度最低可达 0.1 pg。
c)　　病毒 DNA/RNA（Viral DNA/RNA）：
推荐加入量为 ≥100 copies / 20 µL 反应体系。在优化条件下，检测灵敏度最低可达 1–5 copies。

- 引物浓度

对于单重（RT-）RPA 反应，建议每条引物的终浓度为 0.3~0.6µM。
对于多重（RT-）RPA 反应，建议将每条引物浓度降低至 0.1 µM。如有需要，可在 0.1–0.3 µM 范围内对引物浓度进行优化。

恒温扩增基础引物设计原则
Design principles of basic primers for isothermal amplification

1. 推荐RPA引物与探针在线设计：https://www.ezassay.com/primerDesign
2. 一般RPA引物长度30-35nt，扩增产物长度150-250bp。
3. RPA引物筛选过程举例：

a) 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					

b) 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				++	

4. 引物的浓度可在0.1 μM -0.6 μM之间进行优化。
5. 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。

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 恒温扩增试剂盒	基础型	DNA	BA-LYO-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-96	
	荧光型	DNA	EX-LYO-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-96	
	试纸型	DNA	NF-LYO-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-96	

核酸与蛋白产品专业提供商
Professional supplier of point-of-care test products

EZassay 深圳易致生物科技有限公司

www.ezassay.com
info@ezassay.com