EZassay

RPA DNA恒温扩增试剂盒（荧光型）（UDG酶防污染）

RPA Exo Kit (UDG Enzyme Based Contamination Control)

info@ezassay.com
www.ezassay.com
深圳易致生物科技有限公司

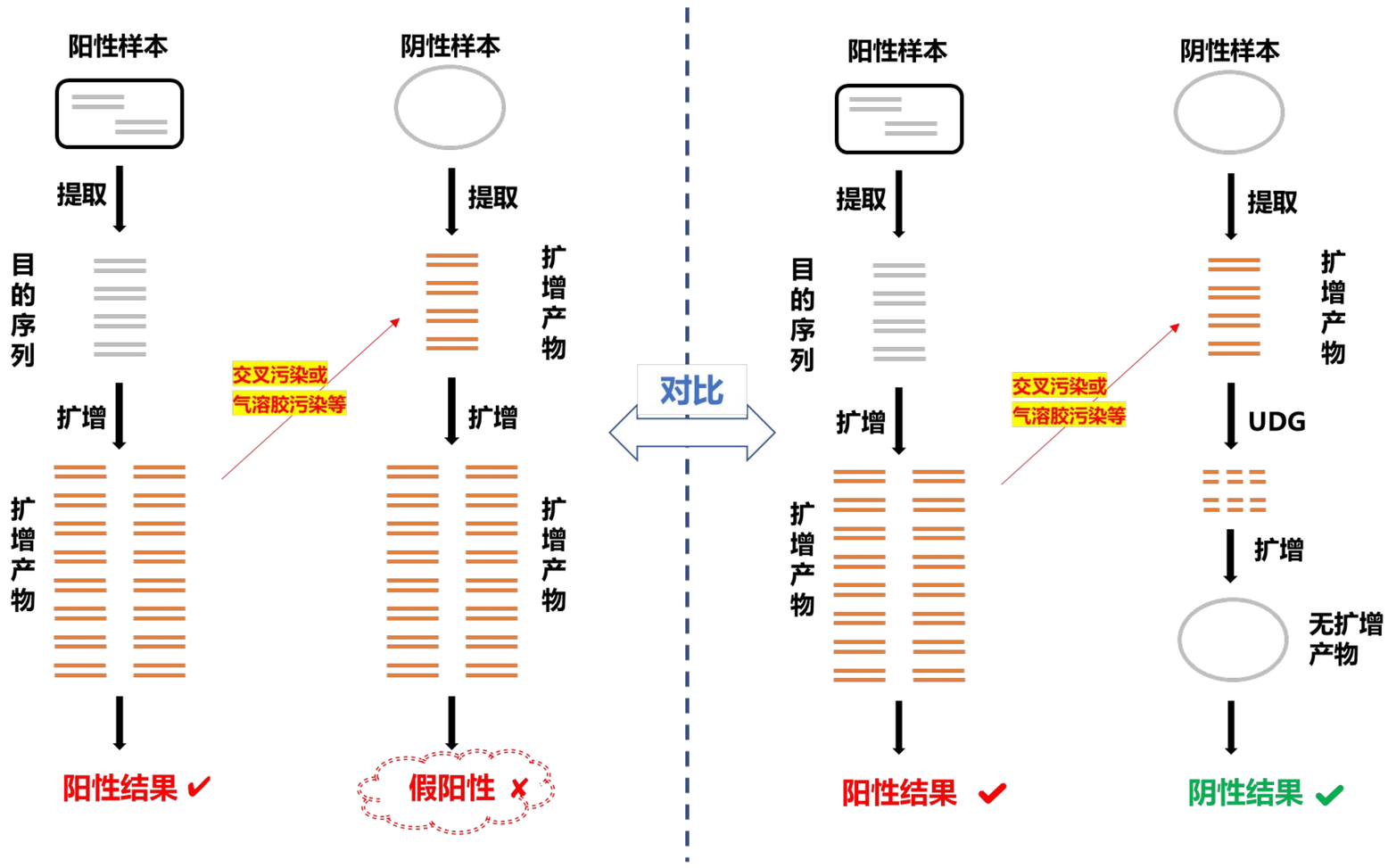
目录编码: EX-LYO-FW-48
EX-LYO-FW-96

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	2
注意事项	4
如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒	5
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

RPA荧光型试剂盒是在基础型RPA试剂盒的基础上引入特异性荧光探针，进一步提升检测的特异性与灵敏度。为降低污染风险，本产品采用 UDG 酶，可快速、高效、特异性地降解残留扩增产物，有效防止扩增产物造成的交叉污染和气溶胶污染。
本试剂盒提供RPA反应所需的核心组分，具有高灵敏度、高特异性及反应快速等特点。反应可在37–42°C恒温条件下进行。扩增过程可通过qPCR仪或便携式荧光检测设备进行实时监测。
该产品操作简便，对仪器设备要求低，且反应后无需开盖，有效降低气溶胶污染风险，适用于快速核酸检测及现场即时检测（POCT）等应用场景。



试剂盒组成
Materials supplied

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

* Positive control包含DNA 模板，引物和探针。
**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和探针
(推荐RPA引物与探针在线设计：https://www.ezassay.com/primerDesign)
4. 荧光仪，例如qPCR仪，掌上恒温荧光仪。

储存
Assay procedure

-20°C

检测样品
Sample Testing

DNA 模板 (RNA需要反转录为cDNA)

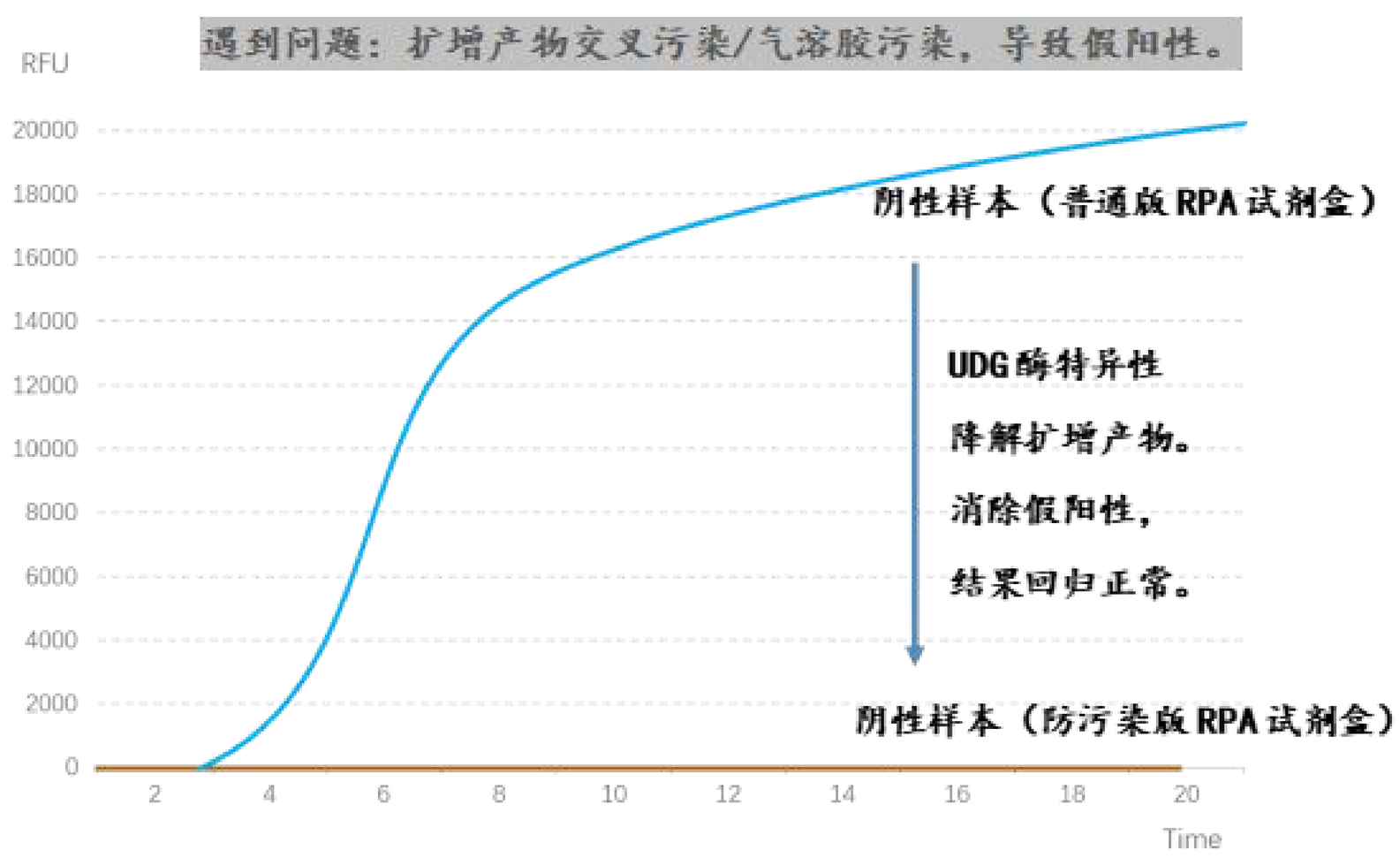
操作步骤
Operating steps

1. 将荧光仪的温度设置为39°C
若使用qPCR仪，请确保**关闭热盖或调至42°C。**
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。
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) Exo探针(4μM)	0.42μL 0.42μL 0.6μL	- - 	0.42μL 0.42μL 0.6μL
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，探针预混液(primer&probe mix)。
** Positive Control已包含引物,探针和模板。 探针为FAM-BHQ1修饰。

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置于荧光检测仪中进行实时检测，反应时间一般为20–40分钟。



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。

- 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。

- 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20µL反应体系增加到40µL。如果使用的荧光仪是从管壁读取荧光值，则无影响。

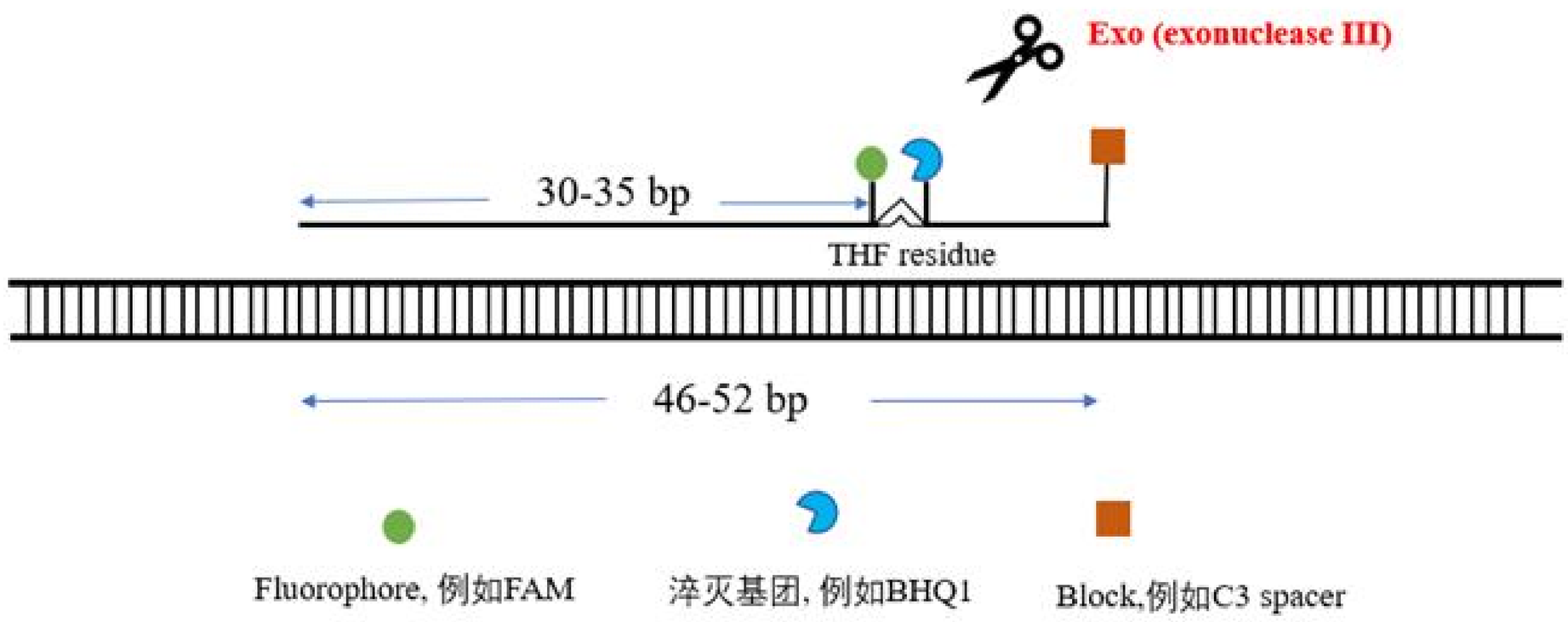
如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒

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	

恒温扩增-Exo试剂盒工作原理示意图

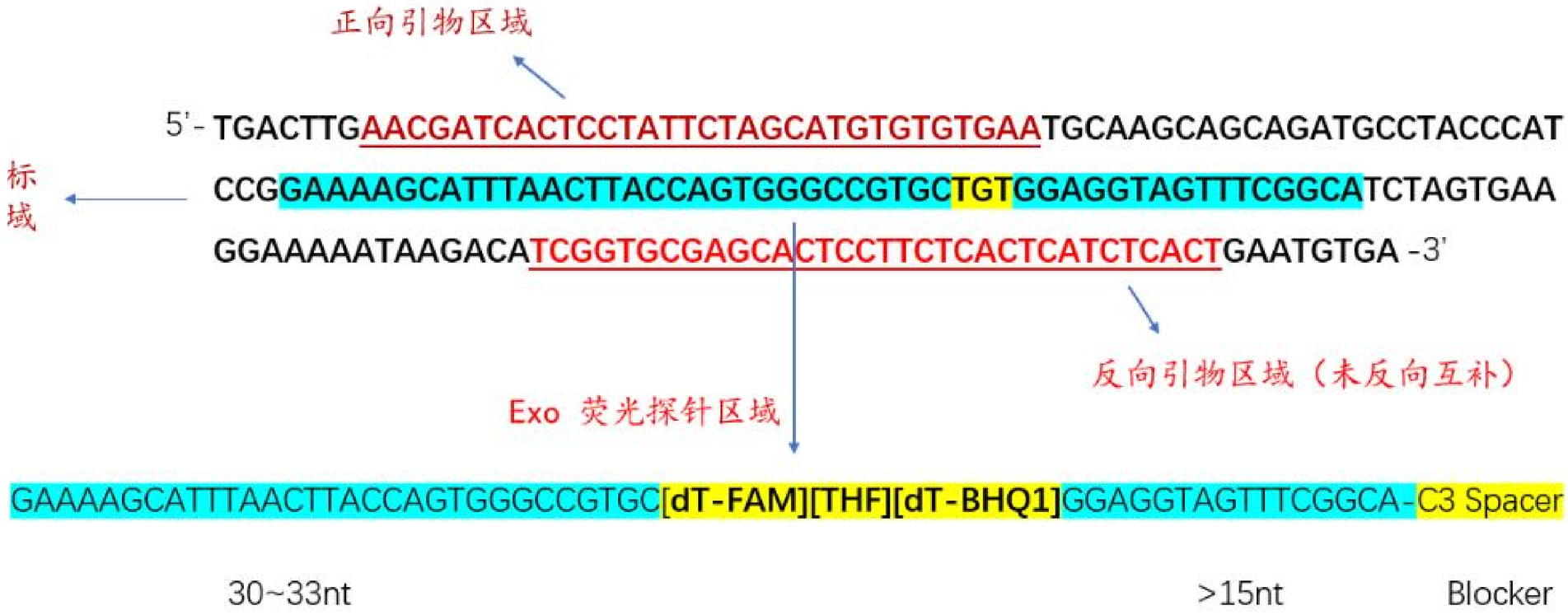
Schematic Diagram of the Working Principle of the Isothermal Amplification-Exo Kit



反应体系中引入 Exo 探针（30–35 bp）：5’端标记荧光基团（如 FAM），中部为 THF residue，随后为淬灭基团（如 BHQ1），3’端以 C3 spacer（Block）封闭，完整状态下因荧光基团与淬灭基团空间邻近而淬灭，探针本身也无法被延伸。扩增开始后，Exo 探针与模板退火配对，Exonuclease III 识别 THF 位点并在该处切割探针，使荧光基团与淬灭基团分离-游离的荧光基团不再被淬灭而恢复发光，同时去除含 C3 blocker 的 3’片段，暴露 3’-OH 供链置换聚合酶继续延伸，扩增产物的产生与荧光信号的积累同步进行（46-52 bp 扩增区间）。通过荧光定量仪或便携式荧光读取装置实时监测信号变化，即可实现扩增产物的定量或定性判读。

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 residue (四氢呋喃残基) 作为脱碱基（AP）位点类似物，模拟无嘌呤/无嘧啶位点、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≥ 30-33nt；
4、 探针的3’端距离THF≥15nt；
5、 荧光基团和淬灭基团的距离应该≤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作为淬火基团；
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、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。

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