



RPA DNA 恒温扩增试剂盒 (基础型)

RPA Basic Kit

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: BA-LYO-48
BA-LYO-96

目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
检测所需物品	1
储存	1
样本准备	2
检测步骤	2
注意事项	3
恒温扩增基础引物设计原则	4
如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒	5

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℃ 恒温条件下进行，通常可在 30 分钟内完成扩增。

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-48	BA-LYO-96
Rehydration Buffer (2X)	500μL	500μL*2
Positive control(10X)	10μL	10μL*2
Starter (10X)	100μL	100μL*2
RPA Reaction Tube*	48T	96T

* 内含 RPA 冻干粉，使用前建议短暂离心，将冻干粉收集于管底。

检测所需物品

Required materials but not supplied

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://ezassay.com/primer>)
4. 加热设备（37 ~ 42℃）,例如PCR仪，金属浴，水浴锅等。

储存

Storage

-20℃

样本准备

Sample for detection

DNA 模板 (RNA需要反转录为cDNA)。

检测步骤

Assay procedure

1.

设置仪器温度至39℃。
若使用PCR仪，请确保**关闭热盖或调至42℃**。
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℃、39℃ 和 42 °C**下进行对比以确定最佳反应温度。
2.

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)*	0.5μL	-	0.5μL
	反向引物(20μM)	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，探针预混液(primer&probe mix)。

** Positive Control管内包含引物和模板。

3.

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

4.

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。

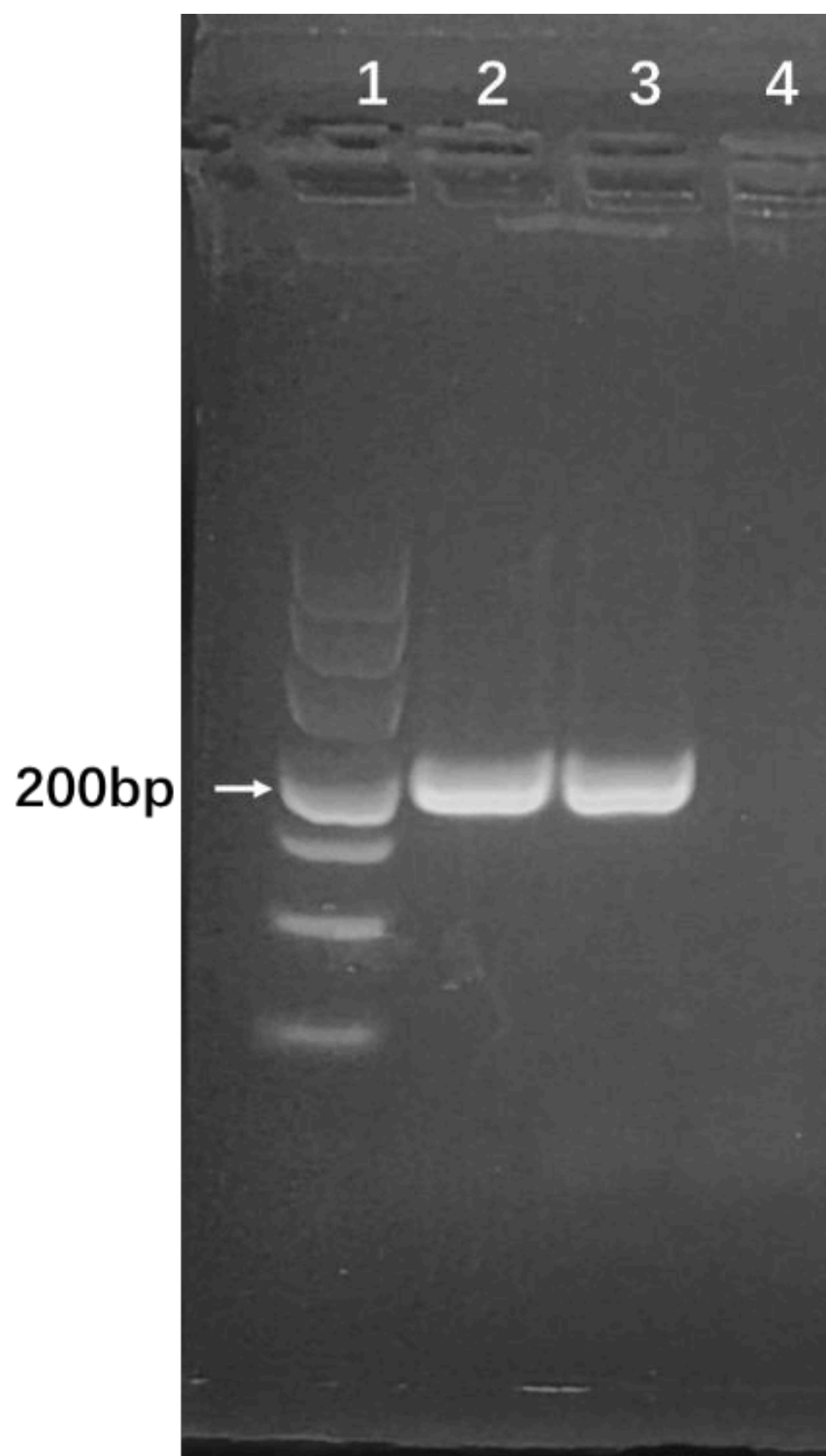
5.

将RPA Reaction Tube放置仪器中，39℃孵育20~40分钟进行RPA反应，得到扩增产物。

6.

95℃ 加热 5 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。推荐使用本公司的 DNA 提取与纯化试剂盒（磁珠法）（货号：MB-WG-050）进行纯化。请注意，市场上部分扩增产物纯化试剂盒可能不适用于 RPA 扩增产物，可能导致 DNA 回收效率降低，从而出现假阴性结果。



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 μ L 与 2 μ L 6 $\times$ 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。
- 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 0.3~0.6 μ M。
对于多重 (RT-) RPA 反应，建议将每条引物浓度降低至 0.1 μ M。如有需要，可在 0.1–0.3 μ M 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、 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、 还有就是一般引物的设计原则：
 - 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0.1 μM -0.6 μM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。

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	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），类似荧光探针PCR。可以用荧光仪读荧光值。
		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），可以用层析试纸条观察结果。
		RNA	NF-RT-LYO-96	