天净沙系列

CAT#:240744

低温运输，-20℃保存

天净沙

通用染料法 RPA 试剂盒

SYBR RPA Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于荧光染料检测的即用型 RPA 试剂盒，可以对靶片段进行实时定量 RPA 分析。用户只需加入模板和引物即可进行实时定量 RPA 反应，具有广泛的用途。本产品具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 快捷，即用型的预配液使加样操作步骤简化，避免了交叉污染，降低实验误差。
4. 各成分的浓度和比例都经过精心优化，反应的灵敏度高，特异性强。
5. 本产品规格足够 100 次 20 μL 体系的染料法荧光定量 RPA。
6. 本产品只供科研使用。

规格及成分

本产品采用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
染料法 RPA 反应缓冲液	240744a	1 mL	1 mL 本色管
染料法 RPA 酶混合液	240744b	100 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	240744sc	1 份	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

DNA 模板、引物、超纯水。

使用方法

1. 如果有 N 个样品（最好含一个样本制备阳性对照和一个样本制备阴性对照）并且做定量分析，最好设置 N+7 个反应，多出的 7 个中，6 个用于 6 点标准曲线，一个是扩增阴性对照（NC）。在 N+7 个 PCR 管中，加入下列成分。如果是做定性分析，则 6 个做标准曲线的样品缩减成一个扩增阳性对照（PC），用户自己需要根据下表进行适当修改（把 6 个标曲反应改成 1 个阳性对照反应）。

成分	N 个样品管	6 个标准曲线管	NC 管
染料法 RPA 酶混合液	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
染料法 RPA 反应缓冲液	各 9 μL	各 9 μL	各 9 μL
自备引物 1（10 μM）	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备引物 2（10 μM）	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备模板 DNA			
基因组 DNA	10-100 ng	不加	不加
或 cDNA	1-10 ng	不加	不加
自备阳性对照模板（6 各梯度）	不加	各 1 μL	不加

阴性对照模板(一般用水)	不加	不加	1μL
自备 50×自备 ROX I 或 ROX II 染料(见附)	各 0.4 μL	各 0.4 μL	0.4 μL
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

2. 放入荧光 RPA 仪中进行扩增，下表的扩增参数仅供参考。

循环步骤	反应参数	备注
预热	39℃ 1 分钟	
RPA（40 次循环）	39℃ 30 秒	靶分子长度最好在 80-200 bp
	39℃ 30 秒	（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析	按 PCR 仪器手册执行	

3. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟扩增阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟扩增阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
4. 如果两种阴性对照（样本制备阴性对照和扩增阴性对照）的溶解曲线所得 Tm 值跟扩增阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 RPA 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
5. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 RPA 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
6. 对定量检测，以 6 个标准曲线样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。
7. 对定性检测，则得到有效 Ct 值的样本为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

附：

下列信息仅供参考，具体以 PCR 仪器的使用手册为准。

1．不需要 ROX 的机型：Agilent MX3000 和 MX4000、iCycler IQ、LightCycler 480、Smart Cycler System、Thermal Cycler Dice Real Time System 等型号的荧光 PCR 仪器不需要加 ROX 染料，但加入的话也不会影响整个 RPA 分析。

2．需要使用 ROX I 的机型：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。

3．需要使用 ROX II 的机型：ABI Prism7500、7500 Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、Corbett RotorGene 3000。

关联产品	通用探针法 RPA 试剂盒(重组酶聚合酶扩增)