天净沙系列

CAT#:240747

低温运输，-20℃避光保存

天净沙

通用探针法 RT-RPA 试剂盒

Probe RT-RPA Kit

使用手册 V1.01

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

重组酶介导链置换核酸扩增（Recombinase Polymerase Amplification，RPA/RAA），是一种恒温核酸快速扩增技术。本产品将反转录和扩增过程同步进行，在等温条件下（一般为 39℃），反应 10～30 分钟，以样本 RNA 为模板即可实现对目的基因片段的扩增。本产品具有下列特点：

1. 本试剂盒可用于一步法实现 RNA 扩增，并通过荧光探针法对扩增的 RNA 进行检测。
2. 要求引物设计长度 30～35 bp，扩增片段 80～500 bp，探针长度 46～52 bp，并在中部 THF 位点两侧标记荧光基团及淬灭基团，探针 5’端到 THF 位点至少要 30 个碱基；THF 位点到 3’端至少要 15 个碱基，3’端修饰阻断基团，以保证扩增反应的快速灵敏有效。
3. 本试剂盒在 39℃条件下，10 拷贝/测试的质粒可以得到稳定扩增；具体的灵敏度与该项目的引物探针设计有关。
4. 本试剂盒中由阳性质控品以及配套的阳性对照正向引物、阳性对照反向引物和阳性对照探针组成的扩增体系主要用来评估试剂盒中的试剂是否有效。
5. 试剂盒采用泡沫箱加蓄冷剂的方式运输 7 天，温度不高于 20℃不会影响产品性能。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
探针法 RT-RPA 缓冲液	240747a	1.5 mL×2	1.5 mL 本色管
乙酸镁溶液	240747b	600 μL	1.5 mL 黄盖管
RT 荧光基础反应单元	240747c	96 T	热封袋
阳性对照正向引物	yw240747F	25 μL	0.5 mL 绿盖管
阳性对照反向引物	yw240747R	25 μL	0.5 mL 白盖管
阳性对照探针	pb240747	10 μL	0.5 mL 棕色管
阳性质控品	pc240747	25 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1.5 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	240747sc	1 份	无

运输及保存

-20±5℃下避光保存，有效期 12 个月，开封后反应单元可保存 1 个月，尽量避免反复冻融；2-8℃下避光保存，有效期 1 个月。

自备物品

样品 RNA，核酸提取试剂，恒温水浴锅。

使用方法

一、样本要求

1. 样本的采集：各类型样本按照常规方法采集；

2. 样本的运输：采用冰盒或泡沫箱加冰密封进行运输。

二、核酸提取

3. 待检样本核酸提取可采用核酸提取试剂盒或全自动核酸提取仪，具体提取方法请按相应的产品说明书执行。

三、恒温核酸扩增检测仪操作步骤

4. 检测开始前 30 分钟启动样品前处理系统和恒温核酸扩增检测仪进行预热；

5. 将铝箔包装的反应管从试剂盒中取出，撕开包装，取出当次实验需要的反应管，放到96孔板上，并取出探针法RT-RPA缓冲液备用。拆封后剩余的反应管立即用铝箔自封袋密封于-20±5℃保存；

6. 反应体系的准备：按下表准备反应体系：

单管反应体系	
成分	加入量
探针法 RT-RPA 缓冲液	25 μL
阳性对照正向引物（10 μM）	2.1 μL
阳性对照反向引物（10 μM）	2.1 μL
阳性对照探针（10 μM）	0.6 μL
纯化水	15.2 μL-n
总体积	45 μL-n

注：n 为模板 RNA 加样量，如模板浓度高，推荐模板 RNA 加样量为 1 μL；阴性质控品可以使用纯化水；若待检模板 RNA 数量为 X，建议配制 X+2 管混合液后分装（包含阴性对照及阳性对照）。

7. 将上述混合液手弹混匀短暂离心，加入（45 μL-n）μL 混合液至 RT 荧光基础反应单元中，轻柔手弹使冻干粉充分重溶（注意：该步骤不能用涡旋振荡仪剧烈振荡混匀），短暂离心将液体收集至管底。

8. 加样：打开反应单元，向每个反应单元的管盖内侧加入 5 μL 乙酸镁溶液，然后向各反应单元中加入 n μL 质控品或待检样品 RNA，加完一个样品，盖紧管盖，再加下一个样品，加样的顺序为阴性质控品、待检样品 RNA、阳性质控品。

9. 扩增检测：将加好样品的反应管放置于提前预热好的样品前处理系统，长按预处理键（出现 7 min 倒计时即可）进行预扩增，仪器蜂鸣提示后取出反应管；

10. 将混匀的反应管放入恒温核酸扩增检测仪中，仪器设置反应温度为 39℃，时间 30 分钟，并实时观察结果；

11. 反应结束后，将反应管（闭管）取出放入塑封袋，按污染源处理。

四、可检测 FAM 荧光的 PCR 检测仪操作步骤

12. 实验前准备：实验开始前将水浴锅打开并设置温度为 39℃；

13. 试剂准备：将铝箔包装的反应管从试剂盒中取出，撕开包装，取出当次实验需要的反应管，放到 96 孔板上，并准备好与 PCR 仪适配的 PCR 管。拆封后剩余的反应管立即用铝箔自封袋密封于-20±5℃保存；

14. 反应体系的准备：按下表准备反应体系。

单管反应体系	
成分	加入量
探针法 RT-RPA 缓冲液	25 μL
阳性对照正向引物（10 μM）	2.1 μL
阳性对照反向引物（10 μM）	2.1 μL
阳性对照探针（10 μM）	0.6 μL
纯化水	15.2 μL-n
总体积	45 μL-n

注：n 为模板 RNA 加样量，如模板浓度高，推荐模板 RNA 加样量为 1 μL；阴性质控品可以使用纯化水；若待检模板 RNA 数量为 X，建议配制 X+2 管混合液后分装（包含阴性对照及阳性对照）。

15. 将上述混合液手弹混匀短暂离心，加入（45 μL-n）μL 混合液至 RT 荧光基础反应单元中，轻柔手弹使冻干粉充分重溶（注意：该步骤不能用涡旋振荡仪剧烈振荡混匀），短暂离心将液体收集至管底。

16. 将步骤 15 中的溶液依次转移至相应的 PCR 仪适配的 PCR 管中；

17. 加样：打开 PCR 管管盖，向管盖上加入 5 μL 乙酸镁溶液，然后向各反应管中加入 n μL 质控品或待检样品 RNA，加样的顺序为阴性质控品、待检样品 RNA、阳性质控品；

18. 将 PCR 管置于掌上离心机中短暂离心，将乙酸镁溶液离心至管中；

19. 稍用力手弹 PCR 管，将试剂与样本充分混匀后置于掌上离心机中短暂离心（备注：如果反应管中产生较多泡沫或气泡需用离心机去除，避免影响 PCR 仪检测结果）

20. 将 PCR 管置于 39℃恒温水浴锅中静置 7 分钟；

21. 水浴时间结束后重复步骤 19。

22. 将 PCR 管放入相应的 PCR 检测仪中，按下表设置反应程序并运行

步骤	参数	循环数

预变性	39℃ 30 秒	1 个
延伸	39℃ 30 秒（采集荧光）	50 个

23. 反应结束后，将反应管（闭管）取出放入塑封袋，按污染源处理。

五、结果分析：

恒温核酸扩增检测仪结果分析：

24. 反应结束后，设置斜率为 20，仪器将自动进行数据分析，自动呈现判定结果；或设定阈值为 300，反应结束后，仪器将自动进行数据分析，自动呈现判定结果；
25. 仪器的通道一（FAM 通道）为检测通道。通道一显示阳性、结果即为阳性；通道一显示阴性，结果为阴性。

可检测 FAM 荧光的 PCR 检测仪结果分析：

26. 根据 PCR 检测仪的判定结果进行判定：阴性无扩增，阳性有明显扩增。
27. 阳性质控品为阳性；阴性质控品为阴性；
28. 如检测结果不符合步骤27的要求，该实验视为无效，应检查仪器、试剂等的偏差，确认无误后重新检测。

六、检测方法的局限性

29. 不合理的样本采集、储存及处理过程均有可能导致扩增后的检测出现错误的结果。
30. 未经验证的干扰物质或 RAA 抑制因子等可能会导致假阴性结果。
31. 实验室环境污染、试剂污染或样品交叉污染均会导致 RNA 扩增后出现假阳性结果。
32. 试剂运输、保存不当、试剂配制不准确或试剂未充分混匀均会引起试剂检测效能下降，出现假阴性或检测不准确的结果。

七、注意事项：

33. 为避免交叉污染，试剂配制区、加样区及检测区应分隔开。
34. 实验需设置不加模板的空白对照，以确认是否有待扩增核酸的污染。
35. 建议加样在专门的加样区或生物安全柜中进行，避免阳性 RNA 污染试剂。
36. 所有检测样本及试剂均按照传染性物质对待，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并做好合理更换，以做好工作人员的防护并避免交叉污染。
37. 不能使用过有效期的产品。

关联产品	通用电泳法 RT-RPA 试剂盒