EZassay

RPA RNA 恒温扩增试剂盒 (试纸型)

RT-RPA Nfo kit

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

目录编码: NF-RT-LYO-48
NF-RT-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	2
样本准备	2
检测步骤	2
注意事项	3
如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒	4
恒温扩增-Nfo试剂盒工作原理图	5
Nfo探针设计原则	5

产品简介
Brief introduction

RPA试纸型试剂盒是在基础型RPA试剂盒的基础上引入特异性探针，进一步提升检测的特异性与灵敏度。
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。
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即时检测（POCT）等应用场景。

试剂盒组成
Materials supplied

Item	NF-RT-LYO-48	NF-RT-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. 加热设备（ 37 ~ 45°C）,例如PCR仪，金属浴，水浴锅等。
2. 移液器，枪头，离心机
3. dd H2O
4. 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)
5. 核酸试纸条。推荐EZassayTM核酸检测试纸条，货号：PS-FMBO-96。

储存
Storage

-20°C

样本准备
Sample for detection

RNA 模板

检测步骤
Assay procedure

1. 设置仪器温度至42°C。
若使用PCR仪，请确保**关闭热盖或调至45°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 **39°C、42°C 和 45 °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)* 反向引物(20μM) Nfo探针(4μM)	0.42μL 0.42μL 0.6μL	- -	0.42μL 0.42μL 0.6μL
3	RNA 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，探针和RNA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°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 39°C、42°C 和 45 °C下进行对比以确定最佳反应温度。

6.　　取10μl扩增产物，加入80 μl Diluent Buffer（稀释液）（需使用核酸检测试纸配套的稀释液），混匀，取70 μl 滴加到试纸条上。滴加后 5分钟内判读。

稀释倍数可根据实际情况优化，一般1：9至1：500之间。

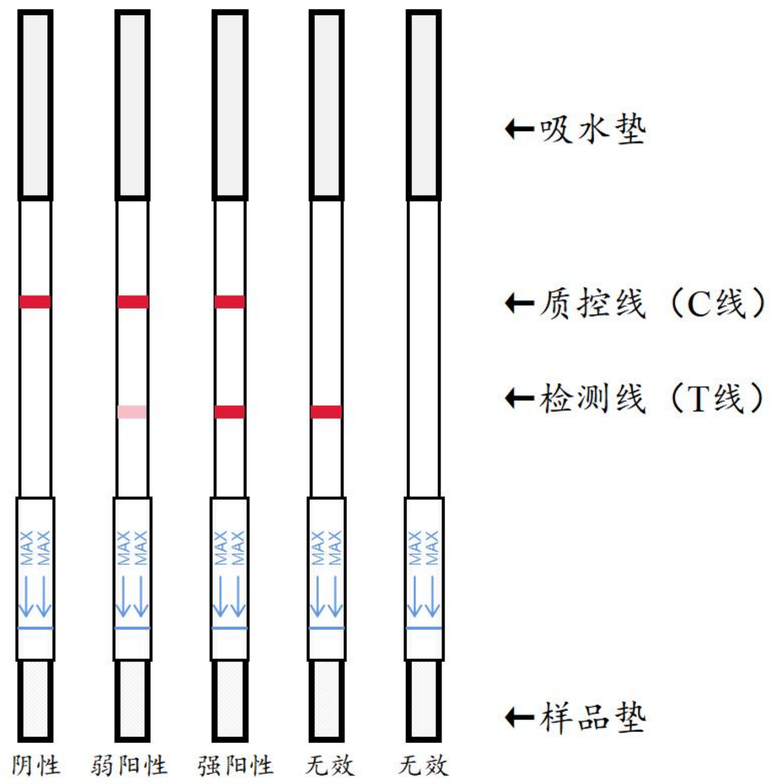


图1. 核酸检测试纸条（货号：PS-FMBO-96）结果判读

注意事项
Notes

- 本试剂盒不提供Diluent buffer (稀释液)，该试剂需使用核酸检测试纸条产品中配套提供的稀释液。
- 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。

- 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。

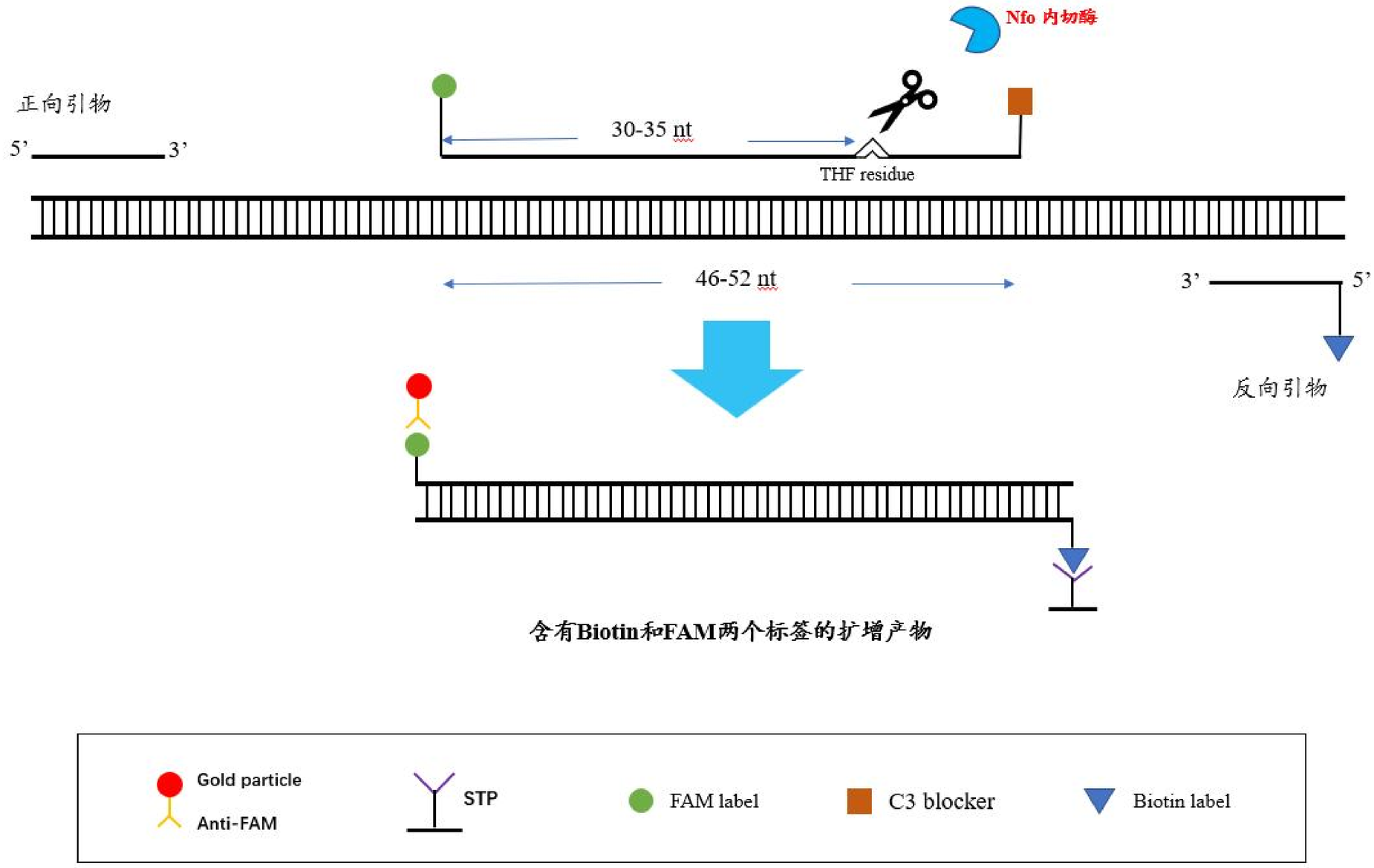
- 如果使用的荧光仪是从管盖读取荧光值，建议增大反应体积。例如将20μL反应体系增加到40μL。如果使用的荧光仪是从管壁读取荧光值，则无影响。

如何选择合适的RPA/RAA恒温扩增试剂盒
Choose the right product

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	

恒温扩增-Nfo试剂盒工作原理图：

Schematic diagram of working principle of Nfo kit：



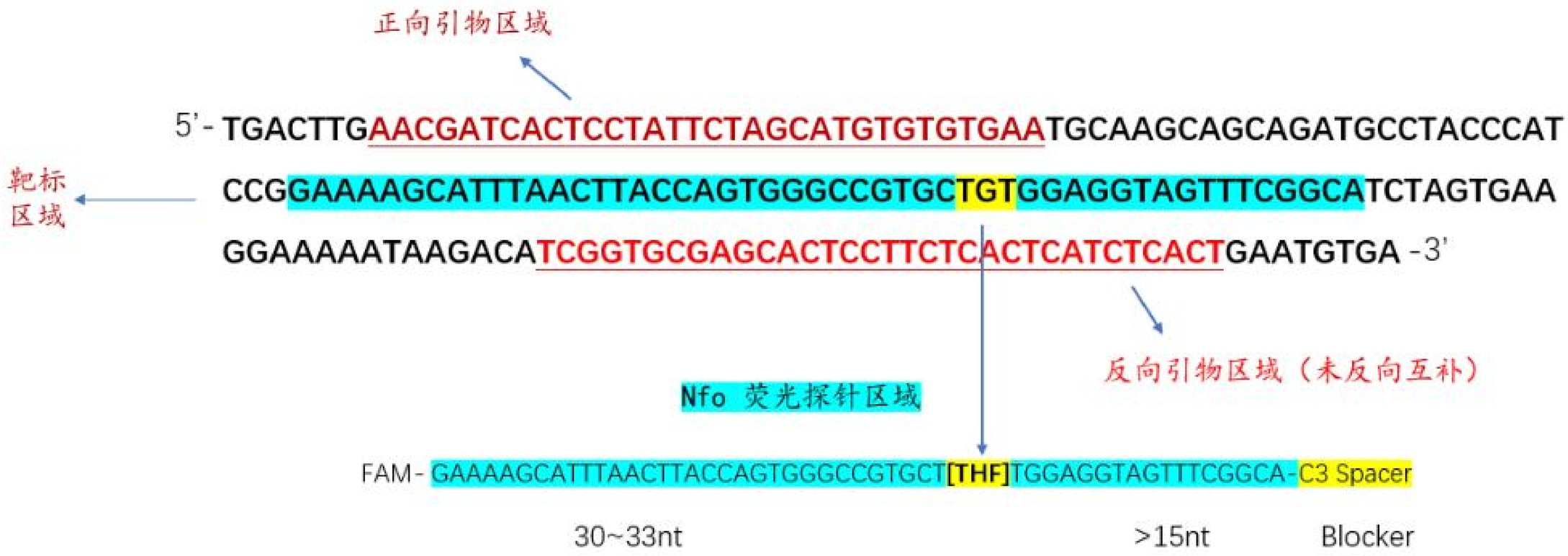
反应体系中，正向引物（5′→3′）、反向引物（5′端标记 Biotin）与 Nfo 探针（30–35 nt）共同介导扩增：Nfo 探针的 5′端标记 FAM，探针中部的 THF residue（四氢呋喃残基）模拟无嘌呤/无嘧啶位点，3′端以 C3 spacer 封闭以阻止非特异性延伸。当探针与模板同源配对后，Nfo 内切酶识别 THF 位点并在该处切割，去除含 C3 blocker 的 3′片段，暴露出游离 3′-OH，链置换 DNA 聚合酶随即以此延伸，最终在恒温（37–42 °C）条件下产生同时携带 FAM（探针 5′端）与 Biotin（反向引物 5′端）双标记的扩增产物（46–52 nt 扩增区间）。检测时，利用“双抗体夹心”原理：胶体金颗粒偶联的抗-FAM 抗体（Gold particle–Anti-FAM）结合产物上的 FAM，产物经层析至检测线时，其 Biotin 端被固定于检测线的链霉亲和素（STP）捕获而滞留显色；未结合产物的金标抗体继续迁移至质控线。

Nfo探针设计原则：

Design principles of probe for Nfo kit:

1、 恒温扩增-Nfo探针结构：

恒温扩增-Nfo探针通常含有核苷酸类似物THF(四氢呋喃)、5’端荧光基团（FAM、FITC等）、3’端Block（合适的3’-修饰基团(例如C3-spacer,aphosphate, a Biotin-TEG or an amine）组成。THF(四氢呋喃)替代了目标序列中的碱基，而不是附加插入序列中。Nfo探针示例图：



2、 恒温扩增-Nfo反向引物结构：5’端需要进行生物素修饰；
3、 探针长度：46-52nt左右；
4、 探针的5’端距离THF介于 30-33nt；
5、 探针的3’端距离THF≥15nt；
6、 请注意Nfo探针的3’-block不能用生物素进行block！
7、 避免探针和引物形成二聚体。
8、 同一方向的引物可以与探针重叠，重叠部分小于20nt。
9、 探针的浓度可在50nM-150nM之间进行优化；
10、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；
11、恒温扩增试剂盒（试纸型）须用相应的试纸条进行结果检测。注意增加阴性对照，避免假阳性；
12、请注意试纸条型试剂盒的扩增产物会被Nfo酶切割，不适合跑胶观察。

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