

TwistAmp® Basic 试剂盒

仅供体外使用。
仅供研发使用。
不得做诊断之用。

在开始之前： TwistAmp® 扩增过程需要使用合适的寡核苷酸引物才能进行有效扩增。为特定 PCR 分析而设计的引物虽然通常也适用，但该引物可能不是 TwistAmp® 反应的最佳选择。表现出快速扩增动力学的 TwistAmp® 引物通常比典型的 PCR 引物长，而且与 PCR 相比，寡核苷酸的解链温度对于其作为引物的性能而言或许并不是最关键的因素。用户应通过筛选流程为要执行的扩增确定合适的 TwistAmp® 引物（请参见 twistdx.co.uk 上的 TwistAmp® 分析设计手册）。

其他必需材料

- 扩增引物
- 分子级的水
- 微量恒温仪或其他恒温孵育箱
- DNA 片段纯化试剂/设备
- 琼脂糖凝胶电泳装置
- 微型离心机（用于快速离心试剂）

方案

试剂盒组分储存注意事项

在合适的条件下，TwistAmp® Basic 试剂盒组分可以进行长期储存（可达 6 个月，但储存更长时间也可能保持稳定）。

TwistAmp® Basic 反应微球的内包装为排管（每排 8 根反应管），外包装为可重复密封型储存袋。密封的产品长期储存在 -20°C 或更低的温度下，可保持微球的全部活性。储存袋开封后，储存反应微球时应将其放入该附带干燥剂的储存袋中并封口。**无引物再水合缓冲液**和**醋酸镁 (MgOAc)** 应储存在 -20°C 条件下以保持全部活性。

本试剂盒内含 **TwistAmp® Basic 阳性对照引物混合物**和**阳性对照 DNA 模板**。到货后，应将其储存在 $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$ (RNA) 下，到货后应储存在 -20°C 条件下以保持全部活性，必要时应再冷冻。

进行扩增：反应微球的再水合与醋酸镁激活

TwistAmp® Basic 反应的建立方法是用合适的再水合溶液将所提供的冻干反应微球复溶。再水合溶液包含无引物再水合缓冲液（随试剂盒提供）、扩增引物和模板（以及水，每份样本总体积为 $47.5\ \mu\text{L}$ ）。

加入 2.5 μL 醋酸镁溶液 (MgOAc) (随试剂盒提供) 后, 反应开始, 每份样本的最终反应体积为 50 μL 。

可以根据所需的样本数量, 将所有这些样本所需的再水合溶液组分混合成预混液。在某些情况下, 例如进行引物筛选时, 必须制备许多不同的再水合溶液 (具体根据待测试引物对数量而定)。在此情况下, 应将所有反应的共同组分 (例如模板、再水合缓冲液、水) 制备成预混液, 将预混液按相应体积分装到洁净的试管中, 再将不同引物对按所需体积加入到相应的试管中。随后根据试验方案照常使用这些不同的再水合溶液继续试验。

注: 应将引物和探针同时添加到微球中, 以避免重组复合物的形成出现任何偏差。

孵育混匀

对于低拷贝数模板的扩增 (例如模板拷贝数小于 100), 在孵育期间混匀反应液可促进产物形成 (因为在小反应体积中低拷贝数模板的快速扩增会引起局部底物耗尽)。

有多种混匀方法可供选择: 最简单的方法是在单个时间点大力翻转 8-10 次以手动混匀, 然后使用微型离心机短暂地快速离心, 或先振荡混匀再快速离心 (如以下方案中所述)。进行手动混匀的时间点应介于反应开始后 3 至 7 分钟之间。标准振荡混匀时间点为 4 分钟 (RT-RPA 为 5 分钟), 较长的或积累缓慢的扩增子可能特别适合采用稍微延后的振荡时间点。

一些装置通过向反应中加入微珠 (在用 MgOAc 激活之前), 可在整个孵育过程中进行磁力搅拌。TwistAmp[®] 反应的一个磁力搅拌方案示例为, 扫描持续时间 1,200 秒, 采样率 15 秒。振荡时间点和频率的变化也会影响产物的形成。建议进行混匀优化。如果 RPA 反应的体积很小 (小于 5 μL), 或模板的拷贝数很高, 则可能不需要混匀。

孵育

在孵育装置特定用于 TwistAmp[®] Basic 反应时, 温度应设置为 39°C。此温度可稍后在进行混匀时作适当调整 (最佳温度通常为 37-42°C)。反应孵育 20 分钟。

详细实验方案

- 按以下所述制备每份样本的再水合溶液：

正向引物 (10 μ M)	2.4 μ L
反向引物 (10 μ M)	2.4 μ L
无引物再水合缓冲液	29.5 μ L
模板和水	13.2 μ L
(总体积	47.5 μ L)

振荡并短暂离心。
- 对于每份样本，将 47.5 μ L 再水合溶液转移至反应微球中。吹打混匀直到整个微球重悬。
- 对于每份样本，加入 2.5 μ L 280 mM 醋酸镁 (MgOAc) 并充分混匀。如需同时如此处理多个样本，可将 MgOAc 加到反应管 (8 联排管) 的盖子中，小心盖紧管盖，并通过离心使 MgOAc 进入再水合材料中以激活反应。短暂振荡并再次快速离心。

注： TwistAmp® 反应是靠 MgOAc 来激活。即使在室温下，一旦加入 MgOAc，RPA 反应立即启动。建议在加入 MgOAc 后，迅速将样本置于选择的孵育温度下进行孵育。

- 将试管放入合适的恒温仪 (39°C) 中孵育 20 分钟。如果模板拷贝数低，在 4 分钟后取出试管，振荡并短暂离心，再放回恒温仪中。另外，孵育期间也可使用微珠进行磁力搅拌 (参见孵育混匀)。
- 孵育后，先纯化 RPA 产物扩增子，然后再在琼脂糖凝胶上跑胶。请参阅 *监测 TwistAmp® Basic 扩增反应*。

注： 请采取预防措施以尽量降低两次实验之间的核酸携带污染风险。请在分开的工作区域中使用分开的移液器执行扩增前和扩增后步骤。请使用外置活塞式移液器，或防气溶胶移液器吸头。将使用过的移液管吸头和反应容器收集到密封容器中。在纯化扩增子并在琼脂糖凝胶上对其进行分析时应格外小心。

执行阳性对照反应

TwistAmp® Basic 试剂盒包含阳性对照引物和模板，可用于检测试剂盒各组分的活性。阳性对照材料与 TwistAmp® Basic 反应微球及无引物再水合缓冲液配合使用。

1. 解冻阳性对照引物混合物，吸取 8 μL 加至洁净的 1.5 mL 微量离心管。
2. 向步骤 1 所得的阳性对照引物混合物中加入 29.5 μL 无引物再水合缓冲液。短暂振荡并快速离心。
3. 制备 10 μL 的 1/10 稀释阳性对照 DNA（使用分子级的水）。
4. 向步骤 2 所得的溶液中加入 10 μL 稀释阳性对照 DNA 模板。短暂振荡并快速离心。该混合物即为再水合溶液。
5. 将含有冻干 TwistAmp® Basic 反应微球的反应管摘掉管盖，将管盖倒置于反应管前。
6. 向反应管中加入 47.5 μL 含有引物和模板 DNA 的再水合溶液，使所有微球重悬于再水合溶液中。吹打混匀直到整个微球重悬。
7. 对于每份样本，加入 2.5 μL 280 mM 醋酸镁 (MgOAc) 并充分混匀。如需同时如此处理多个样本，可将 MgOAc 加到反应管（8 联排管）的盖子上，小心盖紧管盖，并通过离心使 MgOAc 进入再水合材料中以激活反应。短暂振荡并再次快速离心。

注： TwistAmp® 反应是靠 MgOAc 来激活。即使在室温下，一旦加入 MgOAc，RPA 反应立即启动。建议在加入 MgOAc 后，迅速将样本置于选择的孵育温度下进行孵育。

8. 将反应管放入孵育器模块 (39°C) 中，孵育 20 分钟。在 4 分钟后取出反应管、振荡并短暂快速离心，再将其放回孵育器模块。
9. 孵育后，先纯化 RPA 产物扩增子，然后在琼脂糖凝胶上跑胶。请参阅 *监测 TwistAmp® Basic 扩增反应*。

注：如果在扩增后打开试管，工作台面极易被扩增子污染。务必采取适当的措施加以避免。

阳性对照反应可生成由 143 个碱基对组成的扩增产物，凝胶电泳时将出现相应条带。

监测 TwistAmp[®] Basic 扩增反应

在 TwistAmp[®] Basic 反应完成后通常使用终点检测法分析反应结果，例如琼脂糖凝胶电泳法 (AGE)，该方法在本节中有述。然而，也可使用除 AGE 以外的其他方法。如果使用其他方法，下述方案需作出相应的修改。应首先纯化扩增产物以除去可能干扰下游应用的反应组分。

1. 按照市售 PCR 纯化试剂盒的说明纯化扩增产物。或者根据分子生物学规范，用水按 1/10 稀释反应溶液（含有扩增产物）后进行苯酚/氯仿萃取。
2. 现在可按照标准实验方案，取所需量的扩增产物在合适的琼脂糖凝胶上进行电泳以分离这些产物，然后相应地使之显现。这些操作与相当大小的 PCR 产物的 AGE 分析非常类似。
3. 数据分析：应检测到预期大小扩增产物所形成的条带。根据所使用的引物，或如果使用低靶标拷贝数，有可能形成非特异性产物，或每条链长短不一的双链扩增子，并在凝胶上显现（有关引物噪音的论述，请参见 twistdx.co.uk 上的 TwistAmp[®] 分析设计手册）。此类非特异性假象通常见于无模板对照中以及模板拷贝数极低时。必要时，可将主产物与非特异性产物相互分离，并纯化主产物以便作下游应用（例如亚克隆、测序）。