

TwistAmp® exo 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。 TwistAmp[®] 引物比典型的 PCR 引物更长更适用，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并不是关键的因素。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）。

使用荧光法对扩增进行实时检测需要使用与 TwistAmp[®] exo 生物化学相容的特定探针，即 TwistAmp[®] exo 探针。至于这些探针的设计，请参见 TwistAmp 分析设计手册。 PCR 和其他核酸扩增过程（例如 Taqman）用的探针在 TwistAmp[®] exo 反应中是无效的。

其他必需材料

- 扩增引物
- TwistAmp[®] exo 检测探针
- 分子级的水
- 孵育器/荧光计
- 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[®] exo 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[®] exo 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[®] exo 阳性对照引物混合物和阳性对照 DNA 模板。到货后应储存在 -20°C 条件下以保持全部活性，必要时再冷冻。

进行扩增：反应微球的再水合与醋酸镁激活

TwistAmp[®] exo 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、检测探针和模板（以及水，每份样本总体积为 47.5 μL ）。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），扩增子较长或积累速度较慢时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。

监测 TwistAmp[®] exo 扩增反应

可在现有的各种孵育荧光计（例如 Twista[®]、T8、T16 设备）上执行实时荧光检测，此外，任何能激发和检测所选荧光团并能将温度稳定于 37-42°C 的酶标仪或实时热循环仪也应适合于 exo 探针检测。如果设备与 0.2 mL 反应管不匹配，则将再水合样本转移至合适的反应容器（例如多孔板），并根据设备要求对样本进行孵育/监测。

此外，应根据实验方案来调整振荡混匀方案。反应的荧光读取频率可由用户确定（通常为每 20-30 秒）。

使用热循环仪

根据所选用的热循环仪，您可能需要更换提供的反应管管盖，即换掉圆顶管盖。许多荧光计从底部向上读取荧光或从侧面读取荧光。但是，如果您的热循环仪是从管上方读取荧光，则可能需要平盖。热循环仪通常有加热盖（通常已设定温度，且用户无法调节），某些型号上的加热盖可以关闭加热。设定的温度对于 RPA 来说通常过高，可能会影响酶的效率。加热盖用于防止 PCR 反应液蒸发并冷凝于盖子上，但 RPA 反应迅速并且是在低温下进行，因此不存在这种问题。我们建议尽可能关闭加热盖的加热功能。

孵育

在孵育装置特定用于 TwistAmp[®] exo 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 μM)	2.1 μL
反向引物 (10 μM)	2.1 μL
TwistAmp [®] exo 探针 (10 μM)	0.6 μL
无引物再水合缓冲液	29.5 μL
模板和水	13.2 μL
（总体积	47.5 μL）

 振荡并短暂离心。
- 对于每份样本，将 47.5 μL 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 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。

- 将反应管放入荧光计模块 (39°C) 中，启动荧光检测，持续检测 20 分钟。对于低拷贝数模板，在 4 分钟后取出反应管、振荡并短暂快速离心，然后将样本重新放回荧光计，确保将管放回其在荧光计模块中的最初位置。另外，孵育期间也可使用微珠进行磁力搅拌（参见孵育混匀）。
- 程序结束时保存数据并弃置样本管。

注： 扩增反应完成后请勿打开反应管，开管可能会使设备、工作面等被扩增产物污染。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。

执行阳性对照反应

TwistAmp[®] exo 试剂盒包含阳性对照引物/探针混合物和阳性对照 DNA 模板，可用于检测试剂盒各组分的活性并测试检测设备（最多进行 8 管反应）。阳性对照材料与 TwistAmp[®] exo 反应微球和无引物再水合缓冲液配合使用。阳性对照探针带有荧光素 (FAM) 荧光团标记，最佳激发波长为 488 nM，最大发射波长为 520 nM。

- 解冻阳性对照引物/探针混合物，吸取 8 μL 加至洁净的 1.5 mL 微量离心管。
- 向步骤 1 所得的阳性对照引物/探针混合物中加入 29.5 μL 无引物再水合缓冲液。短暂振荡并快速离心。
- 制备 10 μL 的 1/10 稀释阳性对照 DNA 模板（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 Twist Amp[®] exo 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/探针和模板 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： Twist Amp[®] 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. 将反应管放入荧光计模块 (40°C) 中，启动荧光检测，持续检测 20 分钟。在 4 分钟后取出反应管、振荡并短暂快速离心，再将样本重新放回荧光计，确保将管放回其在荧光计模块中的最初位置。
9. 程序结束时保存数据并弃置样本管。