

TwistAmp® Liquid exo/exo RT 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

- dNTP
- 扩增引物和 TwistAmp® exo 检测探针
- 分子级的水
- Rnase 抑制剂（如果扩增 RNA 模板）
- 具有荧光检测功能的微量恒温仪或其他恒温孵育箱
- 试剂快速离心用的微量离心机

方案

试剂盒组分储存注意事项

在合适的条件下， TwistAmp® Liquid 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）。解冻后，应在使用前混合所有组分。

TwistAmp® Liquid 20x Core Reaction Mix 和其他酶以 50% 甘油储备液的形式提供，因此应储存在 -20°C 或更低温度下（如果储存在 -20°C 下，则分装成较小的体积以避免反复冻融）。

10x Probe E-mix 应储存在低于 -20°C 的温度下。

TwistAmp® Liquid 2x Reaction Buffer 以各 3 mL 小份的形式提供。应将其储存在 -20°C 下以保持完全活性（为此可在到货后或在第一次解冻后进行分装）。

试剂盒内包含 TwistAmp® Liquid 阳性对照寡核苷酸混合物和对照 DNA (RT 试剂盒为 RNA) 到货后应将其储存在 -20°C/-80°C 下 (RNA), 必要时应再冷冻。

进行扩增: 反应微球再水合和 MgOAc 启动

TwistAmp® Liquid 反应体系的建立方法是, 将 20x Core Reaction Mix、50x Exo、dNTP、10x Probe E-mix、2x Reaction Buffer、扩增引物和模板混合(加水至每份样本总体积 47.5 µL)。加入 2.5 µL 体积的 MgOAc 溶液(随试剂盒提供)以启动反应, 这样每份样本的最终反应体积就是 50 µL。操作方法是使用移液管将 2.5 µL 的 MgOAc 溶液(随试剂盒提供)移到试管盖中, 小心地重新盖上试管, 注意确保 MgOAc 溶液保留在试管盖中, 然后离心试管以确保 MgOAc 溶液与样本混合。

使用这些液体试剂时, 调节体积非常简单, 因此用户可以运行更小或更大体积的反应。如果使用不同的体积, 应优化反应液制备过程中的试剂混合。

注: 可以根据所需的样本数量, 将所有这些样本所需的试剂盒组分混合成预混液。对于 TwistAmp® Liquid 反应, 这些组分的混合顺序至关重要。添加顺序取决于您是要尝试扩增多个模板, 还是要筛选多个引物组合。这是因为引物和探针应同时添加到 20x Core Reaction Mix 中, 以避免重组丝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, 用户有多种混匀方法可选。最简单的方法是在单个时间点翻转 8-10 次以手动混匀, 然后使用微型离心机短暂地快速离心。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® Liquid 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。建议进行混匀优化。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。

注：此 TwistAmp® Liquid 配方在 TwistAmp exo 及 TwistAmp exo RT 冻干反应微球中具有不同的核心 RPA 蛋白质比例。如果使用某一个试剂盒来开发分析方法，然后使用另一个试剂盒来执行这些分析，那么这些分析可能表现出与开发时不同的性能。

详细实验方案

为用户提供了以下实验的方案：

- 设置**引物筛选**以为分析开发确定合适/最佳的寡核苷酸
- 在**模板筛选**中测试不同的样本
- 测试试剂盒阳性对照

引物筛选准备（单重检测）¹

以下说明基于 50 μL 的反应体积；如果要使用不同的体积，应对用量进行相应调整。

1. 将浓度为 10 μM 的 2.1 μL 每种引物和 0.6 μL exo 探针加入到各个 0.2 mL PCR 试管中（如果使用磁力搅拌培养设备，则向每个试管中加入一个微珠）。
2. 制备预混液（每管反应）

2x Reaction Buffer	25 μL
dNTP ² + 水	8.2 μL （如果加入 RT ³ ，则为 7.2 μL ） ⁴
10x Probe E-mix	5 μL

 振荡并短暂离心。

注：应将 20x Core Reaction Mix 加热至室温，并使用移液管缓慢吹打混匀以确保所有蛋白质都溶解在溶液中并且分布均匀。

3. 将 2.5 μL 的 20x Core Reaction Mix（每管反应）加到预混液管盖上。将试管完全倒置 10 次进行混合并短暂离心。

4. 如果模板是 RNA，加入 1 μL 50x RT（每管反应）至试管盖上。将 1 μL 50x Exo（每管反应）加到试管盖上。将试管完全倒置 10 次进行混合并短暂离心。预混液现已制备完成⁵。使用前用移液管吹打混匀。
5. 将 41.7 μL ^{3,4} 预混液加入到制备于试管（第 1 步）内的引物和探针中，并用移液管吹打混匀。
6. 将 2.5 μL 的 280 mM MgOAc（已提供）和 1 μL 模板⁶ 加到试管盖上。^{3,4}在快速离心之前，试管盖上的 DNA/RNA 和 MgOAc 应保持分离，以减少三级结构的形成。离心使 MgOAc/模板落入试管，并充分混合（6 次倒置）以开始反应，短暂地快速离心。

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。

7. 将反应液放入荧光计中并开始运行：37-42°C，20 分钟。对于低拷贝数模板，在 4 分钟（RNA 为 5 分钟）后将样本从荧光计中取出（**不要停止程序**），完全倒转 6 次以混匀，快速离心并将样本放回荧光计，务必将试管放回其在孵育器模块中的最初位置。或者，也可使用微珠在孵育期间进行磁力搅拌。请参阅“监测 TwistAmp[®] Liquid exo/exo RT 扩增反应”。

¹ 有关多重分析的信息，请参阅 twistdx.co.uk 上的 TwistAmp[®] 分析设计手册。

² 建议 dNTP 最终浓度为 1.8 mM（总）。建议优化此参数。

³ 如果将加入更多/更少的模板和/或 MgOAc，则应调整体积。

⁴ 如果扩增 RNA，用户可能希望随模板加入 RNase 抑制剂，并相应地调整体积。

⁵ 请注意，预混液可能会出现浑浊，这是正常现象。

⁶ 当筛选核苷酸以寻找最敏感的组合时，我们建议使用 25-50 个拷贝的模板进行筛选。

模板筛选准备（单重分析）¹

以下说明基于 50 μL 的反应体积；如果要使用不同的体积，应对用量进行相应调整。

- 制备引物和探针的预混液（每管反应）

2x Reaction Buffer	25 μL
dNTP ² + 水至	8.2 μL （如果使用 RT ³ ，则为 7.2 μL ） ⁴
10x Probe E-mix	5 μL
Primer A (10 μM)	2.1 μL
Primer B (10 μM)	2.1 μL
Probe (10 μM)	0.6 μL

 振荡并短暂离心。

注：应将 20x Core Reaction Mix 加热至室温，并使用移液管缓慢吹打混匀以确保所有蛋白质都溶解在溶液中并且分布均匀。

- 将 2.5 μL 20x Core Reaction Mix（每管反应）加到试管盖上。将试管完全倒置 10 次进行混合并短暂离心。
- 如果模板是 RNA，加入 1 μL 50x RT（每管反应）至试管盖上。将 1 μL 50x Exo（每管反应）加到试管盖上。将试管完全倒置 10 次进行混合并短暂离心。预混液现已制备完成⁵。使用前用移液管吹打混匀。
- 将 46.5 μL ^{3,4} 预混液加入到 0.2 mL PCR 试管中（如果使用磁力搅拌培养设备，则向每个试管中加入一个微珠）。
- 将 2.5 μL 的 280 mM MgOAc（已提供）和 1 μL 模板加入到试管盖^{3,4}上。在快速离心之前，试管盖上的 DNA/RNA 和 MgOAc 应保持分离，以减少三级结构的形成。离心使 MgOAc/模板落入试管，并充分混合（6 次倒置）以开始反应。短暂地快速离心。

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。

6. 将反应液放入荧光计中并开始运行：**37-42°C，20 分钟**。对于低拷贝数模板，在 4 分钟（RNA 为 5 分钟）后将样本从荧光计中取出（**不要停止程序**），完全倒转 6 次进行混合，快速离心并将样本放回荧光计，务必将试管放回其在孵育器模块中的最初位置。或者，也可使用微珠在孵育期间进行磁力搅拌。请参阅“监测 TwistAmp® Liquid exo/exo RT 扩增反应”。

¹ 有关多重分析的信息，请参阅 twistdx.co.uk 上的 TwistAmp® 分析设计手册。

² 建议 dNTP 最终浓度为 1.8 mM（总）。建议优化此参数。

³ 如果扩增 RNA，用户可能希望随模板加入 RNase 抑制剂，并相应地调整体积。

⁴ 如果将加入更多/更少的模板和/或 MgOAc，则应调整体积。

⁵ 请注意，预混液可能会出现浑浊，这是正常现象。

执行阳性对照反应

TwistAmp® Liquid exo/exo RT 试剂盒包含阳性对照寡核苷酸混合物和模板，用户可利用这些寡核苷酸混合物和模板来测试试剂盒组分的活性。

以下说明基于 50 μL 的反应体积；如果要使用不同的体积，应对用量进行相应调整。

1. 解冻阳性对照寡核苷酸混合物。
2. 移取 8 μL 寡核苷酸混合物至洁净的 1.5 mL 微量离心试管中。
3. 向第 2 步的寡核苷酸混合物中加入 25 μL 2x Reaction Buffer。短暂振荡并快速离心。
4. 加入 5 μL 10x Probe E-mix。
5. 加入 dNTP¹ 和水至 3.5 μL （如果使用 RT²，则为 2.58 μL ）。振荡并短暂离心。

注：应将 20x Core Reaction Mix 加热至室温，并使用移液管缓慢吹打混匀以确保所有蛋白质都溶解在溶液中并且分布均匀。

6. 将 2.5 μL 的 20x Core Reaction Mix 加到预混液管盖上。将试管完全倒置 10 次进行混合并短暂离心。请注意：预混液可能会出现浑浊；这是正常现象。如果使用 RNA，将 1 μL 50x RT（每管反应）加到试管盖上。将 1 μL 50x Exo 加到试管盖上，完全倒置试管 10 次进行混合并短暂离心。转移到将用于扩增的容器中。
7. 将 4 μL 280 mM 的 MgOAc 和 1 μL 阳性对照 DNA（如果使用 exo RT 试剂盒，则为 RNA）加到试管盖上。在快速离心之前，试管盖上的 DNA/RNA 和 MgOAc 应保持分离。离心使 MgOAc/模板落入试管，并充分混合（6 次倒置）以开始反应。短暂离心。

- 将反应物放入荧光计中并开始运行：40°C，20 分钟。对于低拷贝数模板，在 4 分钟（RNA 为 5 分钟）后将样本从荧光计中取出（**不要停止程序**），完全倒转 6 次进行混合，快速离心并将样本放回荧光计，务必将试管放回其在孵育器模块中的最初位置。或者，也可使用微珠在孵育期间进行磁力搅拌。请参阅“监测 TwistAmp® Liquid exo/exo RT 扩增反应”。

exo 和 exo RT 试剂盒阳性对照均使用带有荧光素 (FAM) 荧光团标记的探针，最佳激发波长为 488 nM，最大发射波长为 520 nM。

监测 TwistAmp® exo/exo RT 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用于 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）。

¹ 建议 dNTP 最终浓度为 1.8 mM（总）。建议优化此参数。

² 如果扩增 RNA，您可能希望随模板加入 RNase 抑制剂，并相应地调整体积。

振荡反应液

为了使用 TwistAmp® 技术和探针实现最佳扩增和荧光信号生成，当需要超高灵敏度时，建议在孵育期间振荡混匀反应液（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）。除非 RPA 反应体积极小（小于 5 μL ）或模板的拷贝数极高，否则振荡混匀至关重要。振荡时间为反应开始后 3 至 6 分钟不等（标准时间为 4 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）。

对于通过在试管添加微珠并用磁力使磁珠自动运动来达到混匀目的的设备（例如 T8、T16），可以设置孵育期间的连续混匀间隔。应为开发的每一项分析优化混匀的时间点、规律性和强度。

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。许多荧光计设备要么从底部向上读取荧光，要么从侧面读取荧光，如果您的热循环仪是从试管上方读取荧光，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。这些热循环仪配有加热盖是为了防止 PCR 反应液蒸发并冷凝于管盖上，但 RPA 在如此低的温度下运行得非常快，不会存在该问题。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 RPA TwistAmp exo/exo RT 反应时，装置温度应设置为 39°C（此温度可稍后随振荡混匀方案一起优化）。应进行 20 分钟的反应孵育/监测，保存数据，并丢弃反应管。

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。