

TwistDx™

探索 DNA 的无限可能

TwistAmp® DNA 扩增试剂盒

分析设计手册

目录

1. 分析注意事项	3
1.1 反应温度	3
1.2 定量与扩增开始	3
1.3 防止模板交叉污染	3
1.4 分析优化	4
1.5 更慢的扩增速率和更长的扩增子	5
1.6 逆转录酶使用	5
2. 引物设计注意事项	6
2.1 引物长度	6
2.2 引物序列	6
2.3 扩增产物长度	7
2.4 引物选择	8
2.5 困难扩增子	12
2.6 引物噪音	12
2.7 简并引物和错配	12
3. 探针设计注意事项	13
3.1.1 TwistAmp [®] exo 探针结构和功能	14
3.1.2 TwistAmp [®] exo 探针长度、位置和示例	15
3.2.1 TwistAmp [®] nfo 探针结构和功能	18
3.2.2 TwistAmp [®] nfo 探针长度、位置和示例	20
3.3.1 TwistAmp [®] fpg 探针结构和功能	21
3.3.2 TwistAmp [®] fpg 探针长度、位置和示例	22
4. 多重分析	24
4.1 引物相容性和浓度比	24
4.2 抑制性引物	24
4.3 总引物浓度	24
4.4 不同的扩增速率	24
5. 样本相容性	25
5.1 裂解方法示例	25
5.2 缓冲液相容性	25
5.3 扩增终止	25
6. 其他 RPA 方法	25

分析注意事项

1.1 反应温度

标准的 TwistAmp[®] 试剂盒最适合在 37°C-42°C 的温度范围内操作。过高的温度会对反应体系产生不利的影响，因为酶会逐渐地失去活性。在低于最佳范围的温度下，重组酶聚合酶扩增 (RPA) 反应虽然速率降低，但仍可顺利进行。然而，目前 TwistAmp[®] 试剂盒的试剂组成和方案是为实现极高速扩增而设，而非专门为低温（低于建议的最佳范围）分析方案而设。随着温度的降低，扩增子倍增时间比能量耗尽时间延长得更快，这可能导致燃料在扩增子积累完成之前“烧尽”。据观察，TwistAmp[®] exo 实时荧光试剂盒对温度的敏感性最强。其他试剂盒某种程度上更耐低温，TwistAmp[®] Basic 和 TwistAmp[®] nfo 试剂盒已被证实可在典型环境温度下成功生成并检出扩增子。

1.2 定量与扩增开始

特定分析的扩增子达到可检出水平的的时间取决于起始模板材料量：模板的拷贝越多，达到可检出水平的的时间越短。然而，这种“基于时间”的定量（与基于循环数的 qPCR 方法完全不同）需要仔细的实验设置。首先，确保同时开始对照反应至关重要，例如供试品需要与标准品连续稀释液同时开始反应。这可通过说明手册中描述的“醋酸镁启动”来实现。或者，可以通过将反应液放置在冰上以暂时减缓（或停止）反应，然后同时转移到最佳反应温度下开始反应。通过改变反应组成和/或温度，还可以减慢/改变动力学速率以改善分析的时间分辨率。但是，如上所述，目前的 TwistAmp[®] 试剂盒尚未为实现最佳的慢动力学和低温分析而经过优化，我们不建议将 TwistAmp[®] exo 系统的运行温度设定在推荐温度以下，否则扩增可能很少达到或全部达不到可检出水平。

1.3 防止模板交叉污染

必须采取预防措施来最大限度地减少实验之间的核酸材料（特别是扩增产物）携带污染风险。应使用分开的工作区域和移液管来执行扩增前和扩增后步骤，而且应使用外置活塞式移液器或使用防气溶胶移液器吸头，这些均是很好的预防措施，有条件时最好还使用 PCR 通风橱。使用过的移液器吸头和反应管应收集到密闭容器中，或收集到可破坏潜在污染物 DNA 的条件下（例如酸性条件、漂白剂）下。如果反应的任何类型的扩增后处理需要打

开装有扩增子的试管，例如在进行纯化、凝胶电泳或横向流动检测时，必须格外小心。

1.4 分析优化

目前的 TwistAmp® 试剂盒配方和方案（说明书中有介绍）提供的标准反应条件对于大多数分析而言可实现快速和灵敏的扩增/检测。然而，有些分析仍可以通过优化反应条件得到进一步提高性能。用户可以轻松改变的参数是反应温度、醋酸镁 (MgOAc) 浓度、振荡混匀方案以及引物/探针（探针适用时）浓度和比例：

- 温度可在推荐的范围内调整（参见第 1.1 节）。
- 反应中推荐的 MgOAc 浓度范围在 12 mM 和 30mM 之间（说明手册的标准建议是 14m M — 反应速率可随 MgOAc 浓度增加而增加）。
- 振荡混匀时间点可在反应开始后 3 至 7 分钟的范围内调整（标准时间点为 4 分钟 — 在进行 RT 分析时如果扩增子较长或积累较缓慢，可能适合采用稍微延后的振荡混匀时间点）。
- 每种引物浓度可在约 150 nM 至 600 nM 的范围内调整，探针浓度可在 50 nM 至 150 nM 的范围内调整。另外，引物 1:引物 2:探针的比例可以调整，但是，反应中的总寡核苷酸浓度应该保持在 750-2000 nM 的范围内。使用低浓度的引物可能会降低扩增速度，但有利于生成更长的扩增子并可提高实时分辨率；而高浓度则可加快动力学。

注： TwistDx 发现来自商业供应商的探针制剂质量存在批间差异，这会影响 RPA 性能。对于一致性要求比较严格的应用，我们建议在建立的分析中使用经纯化的寡核苷酸。还应通过适当方式对反复订单中的引物储备液浓度进行确认，因为供应商浓度通常失实。

1.5 更慢的扩增速率和更长的扩增子

目前的 TwistAmp[®] 试剂盒配方设计是专门为了对模板 DNA 内相对较短的靶序列 (80-500bp) 进行快速灵敏的扩增。在某些情况下, 可能需要调整参数。例如, 当 TwistAmp[®] 过程用于模板定量时, 可能需要较慢的扩增速率 (参见第 1.2 节)。有许多方法可以降低 RPA 反应动力学 — 例如, 选择一些扩增速率比其他引物更慢的引物。或者降低反应温度或 MgOAc 浓度。然而, RPA 反应的时间有限制, 因为能量再生组分会耗尽, 而且当前试剂盒包含相对较高的重组酶水平 (为了加快反应动力学), 而重组酶非常耗 ATP, 这导致在可接受的参数范围内无论如何调整反应条件, 燃料通常都会在约 25-30 分钟内耗尽 (取决于所用的引物浓度 — DNA 和重组酶的复合物决定燃料消耗速率)。由于只适合在一定的范围内调整引物与重组酶的比例, 因此目前的 TwistAmp[®] 试剂盒不一定能达到理想的实时高分辨率。这是因为非常低的扩增速率 (例如由低温扩增引起) 可能导致 ATP 或 dNTP 在信号产生之前耗尽 (特别是 TwistAmp[®] exo 试剂盒, 因为外切核酸酶 III 与聚合酶在产物生成方面存在竞争)。

TwistAmp[®] 试剂盒也可用于生成更长的扩增产物, 但目前的 TwistAmp[®] 试剂盒配方并非专门为此目的而设计。尽管如此, 使用前面介绍的优化措施 (参见第 1.4 节, 例如在可接受范围内降低寡核苷酸浓度、改变 MgOAc 和温度) 仍可以在一定程度上改善较长产物的扩增, 或者刻意减慢扩增速率以便实时分析。我们期望在不久的将来推出一些专门为较长扩增子而设计的试剂盒。

1.6 逆转录酶使用

目前的 TwistAmp[®] Rt 试剂盒含有逆转录酶, 可以先将 RNA 转化为 cDNA 再进行扩增, 而且一步完成。该过程不需要额外的引物。只需在构建反应体系时添加合适的逆转录酶 (RT), 就可以使用 TwistAmp[®] 试剂盒来分析 RNA 模板。如果将适合在 37-42°C 下工作的 RT 添加到 RPA 化学过程中, 则可以一步完成 RNA 的逆转录以及 cDNA 的产生和扩增。互补的 DNA 序列便是添加的 RNA 的序列。根据您所选制造商的说明, 我们建议使用与相同体积的 PCR 反应相似的 RT 量。我们还建议您在 40°C 下运行反应, 并将反应液振荡时间点延迟一分钟以让 RT 充分起效, 而在其他方面您只需按照正常的 TwistAmp[®] 反应来运行本反应 (这是一步过程)。在任何以 RNA 为靶标材料的反应中最好加入 RNase 抑制剂。

引物设计注意事项

开发灵敏、快速的 TwistAmp[®] 分析方法依赖于选择合适的扩增引物。由于还不可能纯粹根据序列来预测特定寡核苷酸的扩增性能，因此建议进行简单的分析开发过程，其中包括设计和筛选一系列候选引物并从中选择出较好的引物对。

注：若要开发高灵敏度的分析，最好遵循以下引物设计指南。对于检测要求不高的分析（每份供试品多于 1000 个拷贝），在大多数情况下仅需要筛选少量引物，并且使用 PCR 引物可能就足够了。

2.1 引物长度

为特定 PCR 分析而设计的引物虽然通常也适用于 RPA，但该引物可能不是 TwistAmp[®] 反应的最佳选择。TwistAmp[®] 引物比典型的 PCR 引物更长更适合（30 至 35 个核苷酸），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。重组酶蛋白刺激并完成重组/启动的能力随寡核苷酸的大小而降低。相反，虽然许多 TwistAmp[®] 引物也可以用于 PCR 扩增，但其不是为此目的而被选择或优化，它们在 PCR 中的性能可能与它们作为 TwistAmp[®] 引物时的质量没有直接关系。

短于 30 个核苷酸的寡核苷酸仍然有效，不过在该条件下，与使用各由 30 个或更多个残基构成的两个正反向扩增引物相比，扩增动力学通常较慢。

目前已成功将最多由 45 个核苷酸构成的寡核苷酸作为引物应用到 TwistAmp[®] 过程中，原则上引物甚至可以更长。然而，延长引物并不一定能提高扩增性能，而且会导致引物容易形成二级结构，这可造成引物噪音（参见第 2.6 节）。因此，建议不要设计过长的引物。

2.2 引物序列

不同序列的寡核苷酸在 TwistAmp[®] 反应中有不同的表现，但没有固定的规则可根据核苷酸的顺序和组成来预测特定扩增引物的性能。不过还是根据经验观察而制定了一些指南（但用户不应被这些指南束缚，应广泛尝试各种序列）。

如有可能，最好避免引物中存在不寻常的序列，例如一段长序列全由一种特定的核苷酸组成，或存在许多重复的短序列。GC 含量过高 (> 70%) 或过低 (< 30%) 都不利。由于引物内和引物之间的碱基配对相互作用可能有助于生成假象（引物二聚体等），因此，如果寡核苷酸内含有有利于二级结构和引物间相互作用或发夹结构形成的序列，则应舍弃该寡核苷酸。

2.3 扩增产物长度

根据反应条件，RPA 可扩增的最大 DNA 产物长度至少为 1.5kb [<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>]。然而，目前的 TwistAmp[®] 试剂盒配方是为了实现快速扩增，而不是为了最大化扩增产物的长度。因此，使用目前的 TwistAmp[®] 配方不能很好地扩增超过约 500bp 的靶标。对于超快速的 TwistAmp[®] 分析，我们建议扩增子长度不超过 500bp，理想长度为 100-200bp。这是因为较短的产物在较短的时间内生成，因此具有较好的产物/噪音比。这最终使得总体扩增性能得到改善（尽管扩增速度的主要因素是所选引物对的特性）。

注：RPA 中的扩增子大小直接影响扩增灵敏度和速度：由于引物噪音的影响（假象；参见第 2.6 节）。较长的扩增子需要较长的扩增时间，但引物噪音往往不受靶标大小影响。因此，扩增子越长，引物噪音越可能超过靶标扩增。所以短扩增子更适合作超灵敏分析。

如果要使用探针进行检测，在设计扩增引物时必须注意为设计寡核苷酸探针留出足够的序列空间（参见第 3 节）。RPA 产物大小的下限主要取决于 RPA 引物的大小。一般要求扩增子长度超过大约 70-80bp。

2.4 引物选择

引物选择过程通常包括以下步骤：

步骤 1. 选择靶区

建议在模板上选择核苷酸序列成分相对“均衡”的一个区域：

- GC 含量在 40% 到 60% 之间
- 重复序列
- 很少正向/反向重复、回文等

应避免特定基因组内的重复序列，以保持靶标的唯一性。就这一点而言，首选序列的确定方法与 PCR 中的方法大致相同。

步骤 2. 候选引物

在选择合适的靶区域后，选择两组相向交错的寡核苷酸（即具有正向和反向）作为候选引物（参见图 2）。同方向的引物可以（但不必）重叠。正向组的每种引物随后可以与反向组的每种引物配对。为了筛选出能够以单分子灵敏度检测模板 DNA 并可实现“倍增时间”（产物数量发生倍增的 RPA 指数期反应时长）不超过 20 秒的引物，一次中等规模的筛选通常包含每个方向 8 至 10 个引物（即产生 64 至 100 种可能的引物组合）。当时间紧迫时以及无需最佳的引物设计时（例如样本中分析靶标的浓度相对较高时），建议在 PCR 软件（例如 Primer 3、Primer-BLAST）中输入以下值：

- 引物大小最小 30，最大 36
- 引物 GC% 最小 20%，最大 70%
- 引物 Tm 最小 50，最大 100
- 最大允许的单核苷酸重复长度（例如“CCCCC”）设定为 5。

步骤 3. 筛选候选引物

确定候选引物对后，必须评估和比较其相对性能。

每个引物对的质量取决于所用分析方法的环境，且筛选程序的读取方法也因此相应地有所不同：

- 对于 TwistAmp[®] Basic，应按方案所述使用每种引物对，应纯化（例如标准 PCR 产物纯化方法）各种扩增产物，然后通过琼脂糖凝胶电泳分离。然后可以根据灵敏度、产物产量、产物/噪音比和扩增时间（如果采用时间进程）对各种引物对进行分类。
- 对于 TwistAmp[®] exo 和 TwistAmp[®] fpg，根据标准方案使用相关荧光检测探针测试引物对，以便实时读数并比较荧光数据。关键性能参数为灵敏度、扩增起始时间和总荧光信号强度。
- 对于 TwistAmp[®] nfo，使用 TwistAmp[®] nfo。

探针和相应的横向流动试纸条分析作为读数系统来评估引物对质量。适用的性能指标是总信号强度以及横向流动试纸条上有无背景信号，还有灵敏度和扩增时间（如果采用时间进程）。应该注意的是，在实际中，最实用的引物筛选分析方法可能是实时荧光读出法，该方法可快速生成灵敏度和动力学数据。然后可以针对合适的读出方法（即 nfo 探针、Basic）调整引物对和探针。可以进行再验证以确认选择。不一定需要测试每种候选的引物组合。例如，先配合某一个正向引物来筛查所有反向引物，挑选最佳反向引物，然后使用它筛查所有正向引物，如此便可以在 16 至 20 次反应中找到良好的引物对（参见图 1a 和 1b）。

	R1	R2	R3	R4	R5
F1					
F2					
F3	--	+	+	+++	++
F4					
F5					

图 1a. 5X5 候选引物矩阵示例和首轮筛选实验的结果。配合正向引物 3 (F3) 来筛查所有反向引物（表示为 R1 至 R5）并对所有反向引物的扩增性

能进行评分（“-”为失败扩增，“+++”为最佳扩增等）。图中，反向引物 4 (R4) 得出的结果最佳。

	R1	R2	R3	R4	R5
F1				--	
F2				++	
F3	--	+	+	+++	++
F4				++++	
F5				++	

图 1b. 本示例是在图 1a 所示结果的基础上进行的第二轮筛选实验。将 R4 与所有正向引物配对进行筛选。F4 得出的结果最佳。F4/R4 组合是性能最佳的引物对。可以执行进一步的筛选实验以确认该结果，例如，配合 F4 筛查所有反向引物。

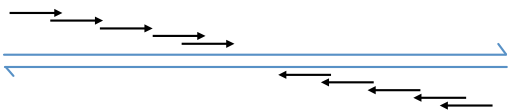
候选引物筛选试验的条件（模板的拷贝数、模板纯度）应该足够苛刻，以便能够区分出性能最佳的引物。另一方面，初始条件不应该太过苛刻，以免在此分析开发阶段，所有受检引物对均不成功：即使目标是检测一个分子，请找出可检测 25 个分子的有限引物集，以将范围缩小到那些通常表现良好并且可能有改善空间的引物（参见步骤 4）。

在许多情况下，筛选策略的步骤 3 已可找到足够好的引物对用于预期的分析。如果这样，则可以通过在不同的起始模板浓度下重复试验来进一步分析几个最佳引物对（通常是最好的 3 对）的扩增速度和灵敏度。如果需要多重分析，建议在此阶段确定多对最合适的引物（而不是仅仅一对）（参见第 4 节）。如果在此分析开发阶段没有一个受检引物对的表现令人满意，则必须返回第 2 步并设计新的引物。

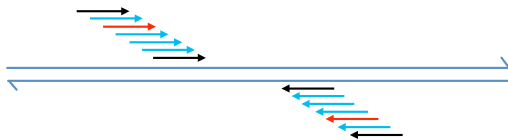
注：引物筛选的成功还取决于探针的质量；有关检测探针设计的论述，请参见第 3 节。

步骤 4. 第二次和第三次候选引物筛选（用于高灵敏度分析）即使寡核苷酸序列的微小变化有时也会导致引物活性出现显著变化（可能是因为引物二

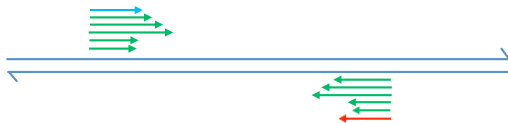
聚体或其他假象形成的倾向有变化)。因此,改善特定分析的性能的策略是,通过修整第 3 步中确定的最佳引物来生成第二代引物,并重新筛选这些引物以提高扩增性能。最好首先将初次筛选中选出的引物的周围间隙填补。保持所选引物的长度不变,以 1 个碱基的速度向前及向后移动其在模板上的位置,直至达到之前被否决的引物,然后筛查其中哪个位置上的引物最好。之后可以通过从所选引物的 3' 末端添加和去掉碱基来作进一步改进(有时 32-mer 比 35-mer 更好,有时 38-mer 表现最佳)。引物选择程序的步骤 4 应得出适用于预期分析的良好引物对。如果没有得出良好引物对,即在开发过程中受检的所有引物对均没有令人满意,则必须返回第 2 步并设计新的引物。



第一次筛选: 以不同的组合测试靶标序列的侧翼引物



第二次筛选: 将第一次筛选所得的最佳引物向前和向后以 1 个碱基的速度移动其在模板上的位置而得到一系列引物,然后以不同的组合测试这些引物



第三次筛选: 将第二次筛选所得的最佳引物从 3' 末端逐一增减碱基而得到一系列引物,然后以不同组合测试这些引物

图 2. 典型的严格引物筛选。如果不需要单分子灵敏度，第一次筛选通常就已足够。

2.5 困难扩增子

在极少数情况下，扩增子内有些序列（即引物之间的序列）不利于快速扩增，而用于对含有这种序列模体的扩增子进行扩增的所有引物对都将表现不佳。如果为设计出适合特定靶区的引物对而经过多番尝试，但始终得到超出预期或期望行为正常范围的结果，应在模板上的其他部位寻找另一个非重叠的靶标区域。经过第一次筛选后，通常应能够检测低至 25-50 个拷贝，并可在到达最佳反应温度后 15 分钟内达到实时检测阈值（使用最标准的荧光监测系统）。

2.6 引物噪音

除了促进真正的扩增事件之外，TwistAmp[®] 反应环境下还可能发生不利的引物相互作用（类似的现象也常发生于其他核酸扩增技术，例如 PCR）。这种相互作用可以是分子内（发夹结构等）相互作用，也可以是相同或不同寡核苷酸之间的引物二聚体形成。这些结构可成为 DNA 聚合酶催化延伸的底物，如此产生的一些假象将作为进一步重组/延伸的模板，继而进入指数扩增阶段。此类过程将产生可检出水平的较低分子量的 DNA，其由引物衍生序列组成（“引物噪音”）。噪音反应与真正的扩增过程发生竞争（竞争引物、核苷酸、聚合酶结合和能量），并最终抑制后者。产生噪音的倾向会影响特定引物对的灵敏度。因此，引物选择很重要，所选引物应能够最大程度减少竞争性地生成引物假象。在实际中，这需要从候选引物中筛选出具有最高灵敏度的引物。引物噪音在序列上与 TwistAmp[®] exo、TwistAmp[®] fpg 及 TwistAmp[®] nfo 试剂盒使用的检测探针不相关。因此，使用这些试剂盒时此类假象不会产生错误信号。

2.7 简并引物和错配

关于在 RPA 中使用简并碱基，无具体的限制建议，尽量减少使用不一定就好。RPA 通常具有高度的抗错配性能。研究表明，当引物和探针携带 5-9 个错配碱基对时，RPA 分析的性能不受影响 (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071642>; <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00135-13>)。

探针设计注意事项

RPA 使用专有的探针系统来进行高特异性和灵敏的扩增子检测。这些探针经设计通常与扩增子上位于主扩增引物之间的区域具有同源性。与 TwistAmp[®] 技术兼容的寡核苷酸探针有三种不同的类型：TwistAmp[®] exo、TwistAmp[®] fpg 和 TwistAmp[®] nfo 探针。每种类型分别与 TwistAmp[®] exo、TwistAmp[®] fpg 试剂盒和 TwistAmp[®] nfo 试剂盒配合使用。

探针订购

可使用 TwistDx™ TwistAmp[®] 探针订购表（可在 twistdx.co.uk 上获取），从各寡核苷酸制造商处订购 TwistAmp[®] 探针。

荧光团选择

有一系列不同波长的荧光团适合使用。既往使用过的荧光团标记包括 FAM、SIMA/HEX、ROX、TAMRA、Texas Red 和 CalFluor610。当使用 FAM 荧光团时，建议使用 6FAM，因为研究显示 6-羧基荧光素寡核苷酸的发射带比 5-羧基荧光素类似物的发射带明显更尖锐 (<https://doi.org/10.1021/bc7001874>)。当使用生物样本时，建议不要使用 FAM，因为这类样本可能出现高水平的背景荧光。

推荐的合适荧光淬灭团如下：

荧光团	淬灭团
FAM	BHQ1
SIMA/HEX	BHQ1
ROX	BHQ2
TAMRA	BHQ2
TexasRed/CalFluor610	BHQ2

全部三种类型的 TwistAmp[®] 探针的结构将在下文分开论述。

候选探针

虽然探针对序列变异的敏感性低于引物，但不同序列的探针仍有不同的性能。如果需要最佳性能，建议在一个靶标内测试多个潜在探针。不过即使没有优化，根据所述原理设计的大多数探针已具有足够好的性能，并可充分区分不同引物对的性能。如果使用探针来筛选引物，则最好将探针设计

在最小的候选扩增子（是指候选引物正向组中最内层的引物与反向组中最内层的引物之间的扩增子，参见第 2 节）内。然后便可以使用该探针来测试周围所有引物的性能。值得注意的是，可以在任一条链上设计探针，这使得能够为特定靶标设计出更多的候选探针。

3.1.1 TwistAmp[®] exo 探针结构和功能

与 TwistAmp[®] exo 试剂盒相容的寡核苷酸探针类型是 TwistAmp[®] exo 探针。TwistAmp[®] exo 探针由寡核苷酸骨架组成，骨架中包含：

- 一个脱碱基核苷酸类似物（四氢呋喃 [THF] 残基，有时称为“dSpacer”）。
- 一个侧翼 dT-荧光团（通常是荧光素，但也可以使用任何作为 dT 偶联试剂用于寡核苷酸合成的荧光团）。
- 在 THF 基团另一侧有一个相应的 dT-淬灭团（通常是合适的黑洞淬灭团 [BHQ]）。
- 一个合适的 3'-修饰基团（例如 C3-间臂、磷酸盐、生物素-TEG 或胺）以阻断探针的聚合酶延伸。

由荧光团产生的任何荧光信号通常都会被位于 3'端方向上与荧光团相差 2-5 个碱基的淬灭团淬灭。在双链情况下，THF 残基作为 TwistAmp[®] exo 试剂盒中的 DNA 修复酶核酸外切酶 III 的底物，该酶将在 THF 位点裂解探针，从而分离荧光团和淬灭团并产生荧光信号。仅当探针经退火而与扩增产物内的靶序列杂交时，该核酸酶才发挥活性。因此，探针的切割表明存在特定的靶标扩增事件，可用于监测特定的扩增子累积。

由于 TwistAmp[®] exo 探针中使用的内部标记目前全是预连接于胸腺嘧啶，因此通常只有当序列中存在两个相隔约 5 个核苷酸（更大的间隔会降低淬灭效率，且目前没有其他碱基的核苷酸类似物可用）的胸腺嘧啶时，才有理想的探针位置。然而，在大多数情况下，鉴于可以使用靶标的任一条链，通常存在合适的设计位置。此外，还有两种方法可增加在 TwistAmp[®] exo 探针设计时可选的标记位置。(1) TwistAmp[®] exo 探针可以与其中一个扩增引物相同，但具有额外的 3'端延伸序列，该延伸序列包含 THF 残基和连接于 THF 残基 3'端的另外 15 个同源残基。THF 残基必须位于相关主扩增引物序列的 3'端之后，以避免探针检测到可能由该引物产生的“引物噪

音”事件。(2) 还可以容许探针中存在错配，这样如果无法找到两个间距适宜的胸腺嘧啶，则直接让探针中一个胸腺嘧啶与靶标序列错配。探针的效率可能会降低，降低程度无法预测；不过这种配置在过去一直是有效的。图 3 为典型 TwistAmp[®] exo 探针的示意图。

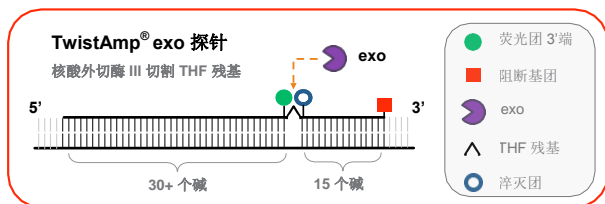


图 3 退火的 TwistAmp[®] exo 探针的结构示意图。仅当探针与其靶标结合时，脱碱基的 THF 残基才能被核酸外切酶 III 裂解。该切割步骤将荧光团和淬灭团分离并产生荧光信号。

3.1.2 TwistAmp[®] exo 探针长度、位置和示例

TwistAmp[®] exo 探针长度应为 46-52 个核苷酸，其中至少 30 个位于 THF 位点的 5'端，另外至少 15 个位于其 3'端。

注：THF 残基、dT-荧光团和 dT-淬灭团取代靶标扩增子序列内的碱基，而不是额外插入。

没有固定的规则来判定特定探针相对于其相应扩增引物的最佳位置。必须注意消除探针检测到引物假象的可能性，如果探针与扩增引物重叠则可能发生此现象。与探针方向相反的引物与探针之间不应有重叠，以避免形成引物-探针二聚体。但与探针方向相同的引物可与探针 5'端部分重叠（参见第 3.1.1 节），重叠区不得包括探针的脱碱基位点及其 3'端后部分（即与引物之间的重叠区应限于探针 5'端最多 27-30 个核苷酸）。这样可防止意外

为探针内灵敏的裂解序列生成假杂交靶标。还应避免可能导致探针自身回折的二级结构。

TwistAmp[®] exo 探针设计示例

给一个合适的靶标序列设计探针时，最重要的因素是找到互相极为接近的一对 T 残基（仅相隔 1-5 个核苷酸）。例如，下图显示了一个靶标序列以及两个可用于检测该靶标序列的推荐探针：

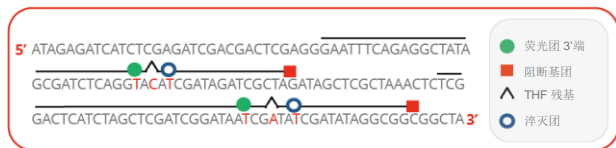


图 4 示例 — 一个序列及适用于检测此序列的 TwistAmp[®] exo 探针。适用探针的位置用粗线表示，探针连接物和结构也被相应标出。待替换的相应碱基用红色表示。

在该示例中，设计的一个探针将具有以下序列，该序列中的相关 T 残基被 dT-荧光团残基或 dT-淬灭团残基取代，一个碱基（该示例中为 C）被 THF 残基取代：

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGG [FAM-dT] A [THF] A [BHQ1-dT]
CGATAGATCGCTA [3'端阻断基团]

dT-荧光团或 dT-淬灭团与 THF 之间的核苷酸数量可以是 0、1 或 2，这些中间核苷酸没有已知的序列要求，被 THF 替换的碱基也没有序列要求。基于这些原则，另一个适用的探针序列为：

TCGACTCATCTAGCTCGATCGGATAA [FAM-dT] CG [THF] TA [BHQ1-dT]
CGATATAGCGG [3'端阻断基团]

我们通常使用 C3-间臂、生物素-TEG 或磷酸盐等基团阻断探针的 3'末端。在大多数情况下，扩增引物被设计在探针序列的前后，但是如上所述，探针的 5'端部分和扩增引物之间可以存在一些重叠。

常见 TwistAmp[®] exo 探针设计错误:

探针的靶标序列:

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGTCAATCGATAGATCGCTA

F = FAM-dT

H = 四氢呋喃

Q = BHQ1-dT

良好的探针设计:

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGG**FAHA**QCGATAGATCGCTA
[3'端阻断基团]

THF 5'端有 ≥ 30 个碱基

THF 3'端有 ≥ 15 个碱基

荧光团和淬灭团之间有 ≤ 5 个碱基，荧光团和淬灭团之间只有一个 THF。

不良的探针设计:

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGG**FHHH**QCGATAGATCGCTA
[3'端阻断基团]

每个探针仅需要一个 THF。

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGTACATCGA**FAHA**QCGCTA
[3'端阻断基团]

如果核酸外切酶要进行有效的切割，则 THF 的 3'端应有 ≥ 15 个碱基。

GAATTCAGAGGCTATAGCGATC**FCAH**GQACATCGATAGATCGCTA
[3'端阻断基团]

THF 的 5'端应该有 30-38 个碱基，以便在切割后探针可以起到引物的作用。

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGG**FAH**ATCGA**Q**AGATCGCTA
[3'端阻断基团]

荧光团和淬灭团之间的距离太大 — 淬灭效果可能很差。

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGFACHAQCAGATAGATCGCTA
[3'端阻断基团]

THF 作为额外碱基插入，而不是替换现有的碱基。

3.2.1 TwistAmp[®] nfo 探针结构和功能

TwistAmp[®] nfo 探针与 TwistAmp[®] nfo 试剂盒配合使用，适用于在横向流动试纸条上进行所谓的夹心法检测。探针由寡核苷酸骨架组成，其中包含：

- 一个 5'端抗原性标记。
- 一个作为核苷酸替代物的内部脱碱基核苷酸类似物（四氢呋喃 [THF] 残基，有时称为“dSpacer”）。
- 一个位于 3'末端的聚合酶延伸阻断基团（例如磷酸盐、C3-间臂基或双脱氧核苷酸，但不是生物素-TEG）。

TwistAmp[®] nfo 探针要在以下配置中使用，即反方向的扩增引物在其 5'末端带另一种抗原性标记（与探针的不同）。反应中的第三种寡核苷酸（与探针同向）是常规引物。图 5 为典型 TwistAmp[®] nfo 探针的示意图。在实际中，这两个标记对调（即无论哪个标记在探针上，哪个标记物在引物上）不会产生影响。但为了便于试验的进一步开发，可能将抗体偶联物用的标记（PCRD 用生物素）连接在探针上比较好。如此一来，对于要使用具有两条检测线的试纸条进行多重分析的用户来说，可以通过订购新的标记引物而非新探针来变换他们在试纸条上使用的检测线。

注： THF 残基取代靶序列中存在的碱基，而不是额外插入。

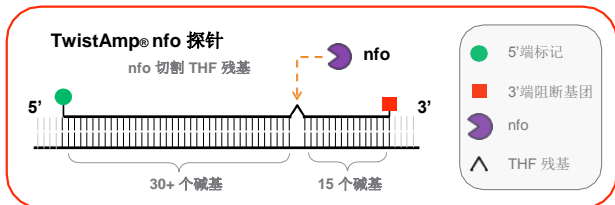


图 5. 退火 TwistAmp[®] nfo 探针的结构示意图。仅当探针结合时，脱碱基的 THF 残基才能被 nfo 裂解。在该过程中产生的 3'端 OH 基团是聚合酶延伸的靶标，并使 5'端标记能够整合到扩增产物中。

由两种引物寡核苷酸促发的 TwistAmp[®] 扩增反应将生成 TwistAmp[®] nfo 探针退火杂交的靶标。在所得到的双链环境中，THF 残基成为 TwistAmp[®] nfo 试剂盒中的酶 nfo（也称为核酸内切酶 IV）的底物。nfo 将在 THF 位点裂解探针，从而产生新的 3'-羟基（可有效解封探针），其可以作为聚合酶延伸的启动位点，从而将探针转化为引物。

由经加工的探针和带 5'端标记的反方向扩增引物产生的扩增子有效地将两个抗原性残基共同连接至一个 DNA 分子中（参见图 6）。然后可以使用如下所列的耗材，通过夹心法（通常在扩增后，即终点检测）检测该双链体：

耗材	用于检测带有以下标记的扩增子
Milenia Hybridetect-1	生物素 + FITC/FAM
U-Star装置	生物素 + FITC/FAM
PCR D	DIG + 生物素和/或 FITC/FAM + 生物素

有关上述耗材的更多信息，请访问 twistdx.co.uk。

核酸检测用的横向流动试纸条（包括 Milenia Hybridetect-1）通常利用产物（例如 PCR 产物和带抗原性标记的探针）作为底物，因此需要大量的样本处理程序。相比之下，TwistAmp[®] nfo 反应机制在进行扩增反应的同时产生带双标记的报告分子，仅需要很少的扩增后处理。

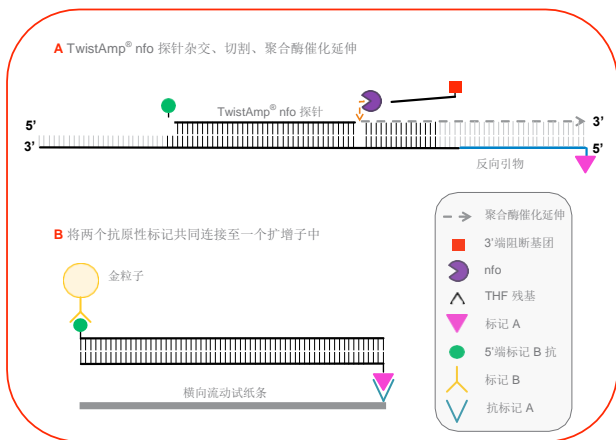


图 6. 扩增引物和 TwistAmp[®] nfo 探针的编排示意图。(A) 经处理的探针和反方向的引物将生成双链扩增产物，其共同连接两个抗原性标记。(B) 该产物随后可通过其中一个标记被捕获（例如在横向流动试纸条使用抗生物素检测线），并通过另一个标记显现（例如通过与带金标记的抗体相互作用）。

发生 nfo 核酸酶反应并由此生成双标记扩增子的前提是，探针可以退火至与位于原始扩增产物内的靶序列杂交。因此，探针的切割直接表明发生扩增事件，并可用于监测 TwistAmp[®] 反应是否成功。

3.2.2 TwistAmp[®] nfo 探针长度、位置和示例

TwistAmp[®] nfo 探针长度通常为 46-52 个核苷酸，其中至少 30 个位于 THF（四氢呋喃）位点的 5'端，另外至少 15 个位于 THF 的 3'端。THF 残基取代可正常与互补序列进行碱基配对的核苷酸。

没有固定的规则来判定特定探针相对于其相应扩增引物的最佳位置。必须注意消除探针检测到引物假象的可能性。虽然与探针方向相同的引物可以与探针 5'端部分重叠，但重叠区不得延伸至探针的脱碱基位点（即引物重叠区最多只能覆盖探针 5'端大约 30 个核苷酸）。这样可防止引物假象意外

生成杂交靶标而与探针内的敏感序列发生杂交。与探针方向相反的引物与探针之间不应有重叠，以避免形成引物-探针二聚体。反方向的扩增引物必须带有抗原基团标记，通常是生物素。

TwistAmp[®] nfo 探针设计示例

例如，下图显示一个靶标序列以及其适用的推荐探针：

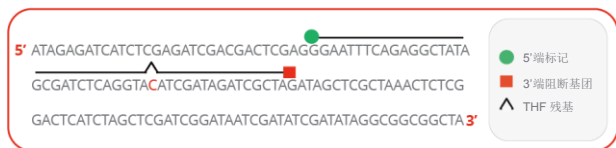


图 7. 示例 — 一个序列及此序列适用的 TwistAmp[®] nfo 探针。适用探针的位置用粗线表示，探针连接物和结构也被相应标出。待替换的相应碱基用红色表示。

探针被阻断（通常使用双脱氧-C、G、A 或 T，或使用 C3-间臂或磷酸盐，**但不使用生物素**）。因此，此探针的序列为：

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGTA[THF]ATCGATAGATCGCT
A [3'端阻断基团]

扩增引物通常位于探针任一侧，如图 6 所示。

3.3.1 TwistAmp[®] fpg 探针结构和功能

TwistAmp[®] fpg 探针与 TwistAmp[®] fpg 试剂盒配合使用，用于荧光检测分析。这些探针通常是与靶扩增子同源的寡核苷酸，其含有：

- 一个荧光团标记，在探针 3'末端上游约 15 个核苷酸处用 dR-荧光团（通常为 FAM 或 ROX）替换 A 或 G 核苷酸。荧光团通过 C-O-C 连接基团（所谓的 dR-基团）与脱碱基位点的脱氧核糖连接。

- 一个 dT-淬灭团（对所选荧光团类型具有特异性）接着被放置在荧光团的上游或下游 1-3 个核苷酸处。
- 此外，TwistAmp[®] fpg 探针通过适当的 3'端修饰（例如 C3-间臂、磷酸盐、生物素-TEG 或胺）被阻断以防聚合酶催化延伸。

荧光团（呈 dR-衍生物形式的任何荧光团，例如羧基荧光素）产生的荧光信号通常会被淬灭团（通常是黑洞淬灭团 [BHQ]）淬灭。在双链情况下，dR-荧光团残基（探针中的“缺口”）成为 TwistAmp[®] fpg 试剂盒中的酶 fpg 的底物。fpg 将在 dR 位置裂解探针，从而分离荧光团和淬灭团并产生荧光信号。该核酸酶步骤的发生前提是，探针可退火至与扩增产物内的靶序列杂交。因此，探针的切割直接表明发生扩增事件，并可用于监测 TwistAmp[®] 反应进程。图 8 为典型 TwistAmp[®] fpg 探针的示意图。

注：dT-荧光团和 dT-淬灭团取代位于靶标扩增子序列内的碱基，而不是额外插入。

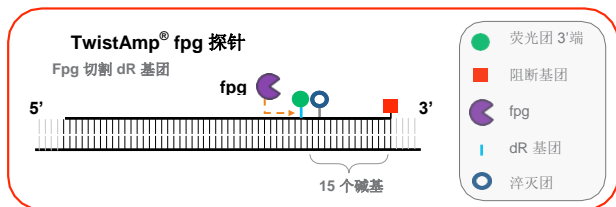


图 8. 退火的 TwistAmp[®] fpg 探针的结构示意图。仅当探针与其靶标结合时，脱碱基的 dR 残基才能被 fpg 裂解。该切割步骤从探针释放荧光团而使之远离淬灭团并产生荧光信号。

3.3.2 TwistAmp[®] fpg 探针长度、位置和示例

TwistAmp[®] fpg 探针长度通常为 46-52 个核苷酸，不过较短的探针也可能成功。没有固定的规则来判定特定 TwistAmp[®] fpg 探针淬灭团相对于所

用扩增引物的最佳位置。不过必须注意消除探针检测到引物假象的可能性，因此应避免引物和探针之间发生任何重叠。

TwistAmp® fpg 探针设计示例

例如，下图显示一个靶标序列以及其适用的两种推荐探针：

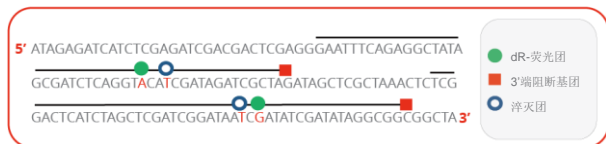


图 9. 示例 — 一个序列及此序列适用的 TwistAmp® fpg 探针。探针的位置用粗线表示，探针连接物也被相应标出。待替换的相应碱基用红色表示。

在该示例中，设计的一个探针将具有以下序列，在该序列中通过 dR-基团连接的荧光团标记位于探针 3'末端 15 个碱基处，dT-淬灭团位于荧光团下游 2 个核苷酸处，并且 3'端被 C3-间臂阻断：

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGT [dR-FAM] CA [BHQ1-dT]
CGATAGATCGCT [3'端阻断基团]

基于这些原则，还有另一个适用的探针，其中 dR-荧光团位于探针 3'末端 16 个碱基处，dT-淬灭团位于荧光团上游 1 个核苷酸处，并且 3'端被 C3-间臂阻断：

TCGACTCATCTAGCTCGATCGGATAA [BHQ1-dT] C [dR-FAM]
ATATCGATATAGGCGG [3'端阻断基团]

内部 dT-淬灭团和 dR-荧光团之间的确切碱基数最好不要超过 3 个，以保证淬灭效率。

多重分析

多重分析 TwistAmp® 反应就是在单个反应中同时扩增多个靶标。对多重分析中每种靶标的扩增引物，都必须进行相容性测试并尽可能进行优化。并非所有在单重分析反应中表现出足够活性的引物对都在多重分析反应中表现良好。

4.1 引物相容性和浓度比

为多重反应确定良好引物的一个好策略是，首先单独为每个靶标确认多个良好的候选引物对。随后，按最终多重分析的模式将每种靶标的候选引物对连续地与其他靶标的候选引物对组合。确定最佳组合后，可以通过改变反应中使用的引物量比例来调节不同靶标的引物对相对性能差异（例如，在假设的双重反应中，靶标 A 的扩增引物量可占反应中总引物量的 65%，靶标 B 的扩增引物的比例将仅为 35%）。

4.2 抑制性引物

在一些多重分析中，即使调节引物的比例，也难以将某些引物对有效地配对使用。通常这是因为体系中的一种引物对体系中的其他引物和扩增子具有支配性和/或抑制性活性。在这种情况下，建议仅将一对引物中的一个引物添加到有效的体系中以确定分析中哪个单引物具有这种不良活性。一旦确定了引物，可以采取措​​施将其从以后的多重分析中排除。

4.3 总引物浓度

注意，反应中寡核苷酸的总量（即加入反应混合液中的所有引物的总和）不应超过推荐量。因此，与单重分析反应相比，多重分析将导致不同靶标的各个扩增子的产量降低。

4.4 不同的扩增速率

可以在 RPA 中以不同的速率来扩增不同的扩增子。如果靶扩增子必须被共扩增，并且样本中的预期靶标数相近，那么两个靶标的扩增速率最好相同。不过在其他情况下，一种靶标可能总是明显多于另一种靶标，而检测方法必须对含量较低的靶标保持灵敏。与 PCR 不同，RPA 在这种情况下具有优势，因为它允许我们调整引物选择并开发出一种能够使低含量靶标

扩增速率高于高含量靶标的多重分析体系。当需要在含丰富靶标（要用作内部对照）的背景中检测罕见事件时，这种灵活性非常有用。

样本相容性

已通过基本裂解方法（如弱碱或热处理）从各种来源（包括血液、鼻拭子、植物材料和培养基）制备出 RPA 相容的模板。在裂解后通常不需要进一步对核酸材料进行分离和纯化。与 PCR 相比，RPA 具有更高的抗样本抑制剂性能。必须专门为每种类型的应用（和分析）确定最佳的裂解方法，且最佳方法取决于病原体滴度、抑制剂的存在与否和裂解要求等因素。

5.1 裂解方法示例

可以使用简单的方法，例如使用非离子型洗涤剂（例如 1% Triton-X 100）或加热。用 0.2 M NaOH 或 KOH 稀释样本也可以很好地进行裂解。

5.2 缓冲液相容性

PCR 常用的非稀释缓冲液也可能与 RPA 相容。所有破坏 PCR 的明显可以因素（即 EDTA/EGTA、强洗涤剂、高盐、酸/碱等）也可能影响 RPA。

5.3 扩增终止

在扩增过程中，RPA 反应最终会耗尽燃料和试剂；然而，在某些应用中可能需要刻意终止扩增。在这些情况下，可以采用如下策略：

- 加热反应（高于或等于 85°C）使蛋白质变性。
- 加入 EDTA 或类似物以螯合存在的 MgOAc。
- 用水稀释反应，使拥挤剂无效（稀释度至少 1/4）。由于存在的核酸酶会逐渐降解扩增子，因此不建议将此方法用于 TwistAmp® exo 或 fpg 产品。

其他 RPA 方法

尽管说明手册中没有直接支持，但许多 RPA 用户已将该技术以其他模式用于其特定应用；这些应用包括数字、巢式、微流体、固相、模板生成、电化学、比色或 SNP 检测。有关这些方法如何与 RPA 联合使用的更多信息，请参见 twistdx.co.uk 上列出的出版物。



探索 DNA 的无限可能

订购信息和技术支持

TwistDx™ Limited

Abbott House, Vanwall Business Park, Vanwall Road
Maidenhead SL6 4XE

orders@twistdx.co.uk

techsupport@twistdx.co.uk

twistdx.co.uk

© 2018 TwistDx™.保留所有权利。TWISTA、TWIRLA、TWISTFLOW、TWISTGLOW 和 TWISTAMP 是 TwistDx Limited 的商标。