







TwistAmp® DNA 扩增试剂盒

综合说明手册

-  TwistAmp® Basic
-  TwistAmp® Basic RT
-  TwistAmp® exo
-  TwistAmp® exo RT
-  TwistAmp® fpg
-  TwistAmp® nfo

仅供 *体外* 使用。
仅供研发使用。
不得做诊断之用。

目录

内含材料、储存条件、购买者须知	5
简介	5
TwistAmp [®] 扩增技术概述	6
TwistAmp [®] 反应条件	6
TwistAmp [®] 应用系列	8
TwistAmp [®] 分析开发	9
TwistAmp[®] Basic 试剂盒	10
其他必需材料	11
方案	11
TwistAmp[®] Basic RT 试剂盒	16
其他必需材料	17
方案	17
TwistAmp[®] exo 试剂盒	22
其他必需材料	23
方案	23
TwistAmp[®] exo RT 试剂盒	28
其他必需材料	29
方案	30
TwistAmp[®] fpg 试剂盒	36
其他必需材料	37
方案	37
TwistAmp[®] nfo 试剂盒	42
其他必需材料	43
方案	44
参考文献、尾注、SDS 信息	50

标配材料

- 1 个可重复密封型储存袋，内含 96 管 TwistAmp[®] 反应冻干微球
- 1 管 4 ml 无引物再水合缓冲液
- 1 管 500 μ l 280 mM 醋酸镁 (MgOAc)

特定试剂盒的材料

- 1 管 100 μ l 阳性对照模板 (exo、Basic、nfo 和 fpg 试剂盒为 DNA，Basic RT/exo RT 试剂盒为 RNA)
- 1 管 75 μ l 阳性对照引物/探针混合物 (Basic/Basic RT 试剂盒中此寡核苷酸混合物包含引物，exo/exo RT、nfo、fpg 试剂盒中此寡核苷酸混合物包含引物和探针)

其他必需材料 (试剂盒中未提供)

- 分子级的水
- 特定分析用的寡核苷酸
- RNase 抑制剂 (与 RT 试剂盒结合使用)

储存条件

TwistAmp[®] 反应微球: 以可重复密封型储存袋为包装发货。到货后储存在 -20°C 条件下 (全活性可保持 6 个月)。产品可在室温下保存数天而不丧失活性。但如需长期储存，我们建议将试剂盒反应微球装入可重复密封型储存袋中并储存于 -20°C 条件下，且要保留储存袋中的干燥剂袋。储存袋开封后，反应微球的有效期仍适用。

无引物再水合缓冲液和醋酸镁 (MgOAc): 到货后储存在 -20°C 条件下 (全活性可保持 6 个月)。避免冻/融次数过多。

阳性对照引物/探针混合物和 DNA 模板: 到货后储存在 -20°C 条件下；最多可进行 5 次解冻-再冷冻循环 (全活性可保持 6 个月)。**阳性对照 RNA 模板:** 到货后应储存在 -80°C 条件下。

购买者须知

许可、使用限制和责任限制

定义。在本部分中，“试剂盒”是指本手册（以下简称“手册”）中所述的由 TwistDx 向购买者（以下简称“接收者”）提供的物品。“材料”是指作为本试剂盒的一部分提供的所有生物和化学材料。“信息”是指作为本试剂盒的一部分提供的所有书面信息、通过 TwistDx 网站提供的与试剂盒相关的信息，以及 TwistDx 的任何员工或代理提供的与本试剂盒或其使用有关的任何口头或书面信息。

材料和信息的使用及分发限制

接收者确认并同意，材料和信息是 TwistDx 的专有财产，可能受到 TwistDx 或其附属公司拥有的专利要求书或专利申请的保护，并须在以下限制下提供：材料和信息以非专有方式授权给接收者，仅用于非商业性内部研究目的，以及用于除在基因测序设备的单次测定中连续确定至少 200,000 个总核苷酸的同源性和相对顺序之外的应用。明确禁止将材料和信息用于任何体外诊断用途，或用于诊断或监测人体的任何病况。

无保证；责任限制

接收者了解并同意，材料属于实验性质，提供材料和信息时未就结果、适用性、特定用途适用性或任何专利或其他知识产权提供任何保证，也未提供任何其他明示或暗示的声明、保证或条件。TwistDx 对基于任何合同、疏失、严格责任或其他论据提出的，与材料、信息或违反本协议有关的以下损失、费用或损害赔偿概不负责：**(a)** 收入损失、利润损失，数据（包括检测结果）丢失或不准确，不管如何描述此类损害赔偿；**(b)** 替代商品、服务或技术的费用（包括采购费用），或 **(c)** 任何特殊、间接、附带或后果性损害赔偿。任何情况下，TwistDx 在本协议下的累积责任不超过一百美元 (US\$100)。接收者了解，其将材料和/或信息用于其活动中须自行承担全部风险。

简介

TwistAmp[®] DNA 扩增试剂盒提供所需试剂用于将核酸模板材料从痕量水平扩增到可检测水平（从单个模板分子扩增到约 10^{12} 个分子的扩增产物）。该技术的生物化学基础是聚合酶与 DNA 重组/修复蛋白（包括重组酶）的组合。两者组合得到的酶混合物在低温下（最佳约 37-42°C）具有活性，能够通过寡核苷酸引物特异性地识别模板靶位点的序列，随后发生 DNA 的链置换合成，从而使模板中的靶区域呈指数扩增。在多数情况下，使用 TwistAmp 试剂盒进行扩增时扩增速度非常快（最佳条件下），产物可在 10 分钟内达到可检测水平。

TwistAmp® 扩增技术概述

TwistAmp® 等温扩增技术的基础是 TwistDx 开发的重组酶聚合酶扩增 (RPA) 过程 (请参见第 61 页)。对 RPA 扩增产物可在终点进行检测, 也可进行实时检测, 检测方法多样, 其中包括凝胶电泳法、基于探针的荧光检测法或者简便的免仪器“夹心分析”法, 例如横向流动试纸条。RPA 过程采用了称为重组酶的酶, 其原型是*大肠杆菌* *recA*, 该重组酶可结合单链核酸骨架 (在本扩增技术中为标准寡核苷酸), 并刺激形成的蛋白质-DNA 复合物寻找双链 DNA 中的同源序列。找到同源序列后进行链置换反应, 寡核苷酸与其互补链配对, 以便聚合酶从 3' 末端启动合成过程。TwistAmp® 扩增过程使用两个方向相反的寡核苷酸引物来启动每起合成事件。以类似于 PCR 的方式为靶标设计的这些引物可实现指数级的扩增过程。

TwistAmp® 反应条件

和所有 DNA 扩增体系一样, 除了选择好的扩增引物和靶标外, 还有很多其他方法可以优化 RPA 反应条件。改变反应组分浓度可影响多个反应参数, 这些参数包括但不限于动力学、产物长度最大值以及最佳反应温度。但为了简化最终用户的操作, 目前 TwistAmp® 试剂盒经过专门配制而具备了以下整体性能特征:

- 扩增速度非常快 (在大多数情况下, 在 10-12 分钟内达到可检出水平)
- 扩增子长度小于 500bp
- 最佳温度为 37°C-42°C

通过改变条件, 扩增能够以更慢的动力学进行以便于定量, 能够生成更长的扩增产物 (最高 2 kb), 还能够在显著更低的温度下有效运行。相关方如需了解有关 TwistAmp® 反应条件优化的进一步论述, 请参阅 twistdx.co.uk 上的 TwistAmp® 分析设计手册。对于 TwistAmp® 分析设计手册中未论及的专业需求和应用, 请通过技术支持中心联系 TwistDx, 技术支持中心电子邮箱为 techsupport@twistdx.co.uk。

注: 所有 TwistAmp® 反应微球都含有*大肠杆菌* DNA 杂质。如果*大肠杆菌*中存在与菌株 K12 及 BI21 (用于生产我们的蛋白质) 同源的序列, 则不适合使用 RPA 反应来开发这些*大肠杆菌*的诊断检测。

1. 重组酶-寡核苷酸引物复合物形成并靶向识别同源 DNA。

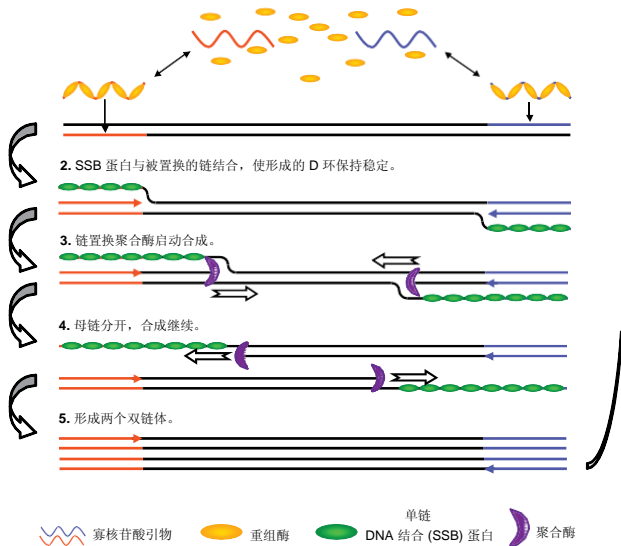


图 1 RPA 循环

TwistAmp® 应用系列

针对不同的应用和检测模式设计了许多不同的配方。

TwistAmp® Basic 含有 DNA 扩增所必需的酶和试剂，用户只需自行准备引物和模板。通常采用终点检测法（例如凝胶电泳）来评估是否扩增成功。还可以纯化扩增所得材料并用于下游应用（例如亚克隆）。

TwistAmp® Basic RT 专用于以 RNA 模板作为起始材料进行一步法扩增。它包含 TwistAmp® Basic 试剂盒的试剂组分（见上文）以及相容的逆转录酶，该酶用于将起始 RNA 模板转换为 cDNA，从而生成扩增底物。反应微球目前不含 Rnase 抑制剂。

TwistAmp® exo 将 RPA 扩增技术与 TwistDx 专有的 TwistAmp® exo 荧光探针相结合。除了基本的组分，该试剂盒还包含强大的核酸酶（核酸外切酶 III），该酶将在扩增反应期间处理 TwistAmp® exo 探针并产生实时读数。核酸外切酶 III 的存在会使终点时扩增子的最终总产量减少，导致不适合进行凝胶电泳检测，但它特别适用于在 RPA 体系中产生强荧光信号动力学。

TwistAmp® exo RT 专用于以 RNA 模板作为起始材料进行实时定量一步法扩增。它包含 TwistAmp® exo 试剂盒的试剂组分（见上文）以及相容的逆转录酶，该酶用于将起始 RNA 模板转换为 cDNA，从而生成扩增底物。反应微球目前不含 Rnase 抑制剂。

TwistAmp® fpg 将 RPA 扩增技术与另一种 TwistAmp® 报告探针体系 - TwistAmp® fpg 探针以均相形式相结合。相较于 TwistAmp® exo 探针，这些探针的设计限制更少，但荧光累积的动力学可能更慢。除了基本的组分，还包含强大的核酸酶（甲酰胺嘧啶 DNA 糖基化酶 [fpg]），该酶将在扩增反应期间处理 TwistAmp® fpg 探针并产生实时读数。相较于 TwistAmp® exo 试剂盒中所用的核酸外切酶 III，fpg 的存在不会减少扩增子的最终总产量，即允许进行终点凝胶电泳检测。

TwistAmp® nfo 允许采用终点夹心分析法（例如横向流动 (LF) 试纸条）来检验扩增反应是否成功。除了基本的扩增试剂，还包含核酸酶（核酸内切酶 IV [nfo]），该酶使用合适的 TwistAmp® nfo 探针生成新的聚合酶延伸底物，从而可以采用免仪器的检测方式来检测扩增子。TwistAmp® nfo 试剂盒配合 TwistAmp® exo 荧光探针使用时还适合进行荧光检测，可取代 TwistAmp® exo 试剂盒。nfo 将处理这些探针（通常以稍微较弱动力学进行），还支持在终点时使用凝胶分析产物。

TwistAmp® 分析开发

有关所有 TwistAmp 分析设计的完整说明，请参阅 twistdx.co.uk 上发布的单独 TwistAmp® 分析设计手册。

目前 RPA 尚没有适用的自动引物设计软件，因为我们仍在探索最佳设计。我们不建议在 RPA 分析中使用 PCR 引物设计软件，因为这类软件主要使用解链温度 (Tm) 来确定良好的引物对。由于 RPA 反应中不会发生热解链（一切由酶催化完成），我们不知道 Tm 与 RPA 引物性能有多大关系（如果有的话）。一些 RPA 用户通过在设计软件中将默认引物长度更改为 32-36 个碱基并忽略 Tm 参数，成功开发出了合适的引物。对于最敏感的引物，我们建议遵循 TwistAmp® 分析设计手册中的指南。

使用荧光团/淬灭团探针进行实时检测能够非常便利地监测 TwistAmp® 反应中的扩增事件。探针特别适用于快速生成不同引物对之间的速度及灵敏度对比数据，因此是用于筛选潜在候选引物的有用工具（请参见 TwistAmp 分析设计手册第 2 节）。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。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。有关这三种探针的专利性探针设计，请参见 TwistAmp® 分析设计手册，该手册中包括有关结构、功能、长度、位置的指南以及设计示例。

可使用 TwistDx™ TwistAmp® 寡核苷酸订购表（可在 twistdx.co.uk 上获取），从各寡核苷酸制造商处订购 TwistAmp® 探针连同分析引物。

TwistAmp[®] Basic 试剂盒

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）。

TwistAmp[®] Basic RT 试剂盒

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。表现出快速扩增大动力学的 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）。

注： TwistAmp[®] Basic RT 试剂盒不含有 Rnase 抑制剂。如您想要使用，您需要自行准备，使用时应遵循生产商的说明（使用量与 50 μ L PCR 反应中的用量相当）。

其他必需材料

- 扩增引物
- 分子级的水
- Rnase 抑制剂
- DNA 片段纯化试剂/设备
- 微量恒温仪或其他恒温孵育箱
- 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 RT 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 RT 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 -80°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、醋酸镁 (MgOAc) 和 TwistAmp[®] Basic RT 阳性对照引物混合物应储存在 -20°C 条件下以保持全部活性。TwistAmp[®] Basic RT 对照 RNA 模板在到货后应储存在 -80°C 条件下，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 RT 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 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。

孵育

在孵育装置特定用于 TwistAmp® Basic RT 反应时，温度应设置为 40°C。此温度可稍后随振荡混匀方案一起优化（最佳温度通常为 40-42°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 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、RNase 抑制剂和水 (总体积)	13.2 μ L 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 (40°C) 中孵育 20 分钟。如果模板拷贝数低，在 5 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 RT 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 RT 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 RT 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 阳性对照引物混合物加至洁净的 1.5 mL 微量离心管。
2. 向步骤 1 所得的引物溶液中加入 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 RNA（使用分子级的水和 Rnase 抑制剂）。
4. 向步骤 2 所得的溶液中加入 10 μL 稀释阳性对照 RNA 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 RT 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 RNA 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： 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 (40°C) 中，孵育 20 分钟。在 5 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，然后再在琼脂糖凝胶上跑胶。请参阅监测 TwistAmp® Basic RT 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。

阳性对照反应可生成由 141 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 RT 扩增反应

在 TwistAmp® Basic RT 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。但也可使用除 AGE 以外的其他方法，如果采用其他方法，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 纯化试剂盒的说明书纯化扩增产物。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）。

TwistAmp[®] exo 试剂盒

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。

TwistAmp[®] exo RT 试剂盒

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 RT 反应中是无效的。

注： TwistAmp[®] exo RT 试剂盒不含有 Rnase 抑制剂。如果您想要使用，您需要自行准备，使用时应遵循生产商的说明（使用量与 50 μ L PCR 反应中的用量相当）。

其他必需材料

- 扩增引物
- TwistAmp[®] exo 检测探针
- 分子级的水
- Rnase 抑制剂
- 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 RT 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 RT 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、醋酸镁 (MgOAc)** 和 **TwistAmp[®] exo RT 阳性对照引物混合物**应储存在 -20°C 条件下以保持全部活性。**TwistAmp[®] exo RT 对照 RNA 模板**到货后应储存在 -80°C 条件下，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 RT 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 μ L），或模板的拷贝数很高，则可能不需要混匀。

监测 TwistAmp[®] 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）。

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 RT 反应时，装置温度应设置为 40°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 40-42°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 μ M)	2.1 μ L
反向引物 (10 μ M)	2.1 μ L
TwistAmp [®] exo 探针 (10 μ M)	0.6 μ L
无引物再水合缓冲液	29.5 μ L
模板、RNase 抑制剂和水	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。对于低拷贝数模板，在 5 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 RT 试剂盒包含阳性对照引物/探针混合物和阳性对照 RNA 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 RT 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。

1. 解冻阳性对照引物/探针混合物，吸取 8 μL 加至新的 1.5 mL 微量离心管。
2. 向步骤 1 所得的引物/探针溶液加入 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 RNA 模板（使用分子级的水和 Rnase 抑制剂）。
4. 向步骤 2 所得的溶液中加入 10 μL 稀释阳性对照 RNA 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[®] exo RT 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： 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. 将反应管放入荧光计模块 (40°C) 中，启动荧光检测，持续检测 20 分钟。在 5 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。

TwistAmp[®] fpg 试剂盒

在开始之前：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® fpg 生物化学相容的特定探针，即 TwistAmp® fpg 探针。关于这些探针的设计，下文有更详细的说明。PCR 和其他核酸扩增过程（例如 Taqman）用的探针在 TwistAmp® fpg 反应中是无效的。

其他必需材料

- 扩增引物
- TwistAmp® fpg 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® fpg 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® fpg 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® fpg 阳性对照引物/探针混合物和阳性对照 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® fpg 反应的执行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（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。

监测 TwistAmp® fpg 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® fpg 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® fpg 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。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。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[®] fpg 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[®] fpg 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 加至新的 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。

3. 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 TwistAmp[®] fpg 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： 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. 将反应管放入荧光计模块 (39°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，确保将管放回其在孵育器模块中的最初位置。
9. 程序结束时保存数据并弃置样本管。

TwistAmp[®] nfo 试剂盒

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）。

使用夹心检测法（例如横向流动技术系统）对扩增进行终点检测时，需要使用与 TwistAmp® nfo 生物化学相容的特定探针，即 TwistAmp® nfo 探针。至于这些探针的设计，请参见 TwistAmp 分析设计手册。该探针为额外的寡核苷酸，通常与主要扩增引物之间的序列同源，因此可结合扩增产物。该探针 5' 末端上的抗原性标记（通常为 FAM）与对侧扩增引物 5' 末端上的抗原性标记（通常为生物素或 DIG）相互结合，这种联结可通过夹心检测法检出。

其他必需材料

- 扩增引物
- TwistAmp® fpg 检测探针
- 分子级的水
- 微量恒温仪或其他恒温孵育箱
- 微型离心机（用于快速离心试剂）

选配材料

- 横向流动试纸条（可从 TwistDx™ 购得）
- DNA 片段纯化试剂/设备
- 琼脂糖凝胶电泳装置

方案

试剂盒组分储存注意事项

在合适的条件下，TwistAmp[®] nfo 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[®] nfo 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[®] nfo 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[®] nfo 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（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。

孵育

在孵育装置特定用于 TwistAmp[®] nfo 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）。反应孵育时间应为 20 分钟，但也可对该时间进行优化。

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 [®] nfo 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。

4. 将试管放入合适的恒温仪 (40°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）。
5. 孵育结束时，开始监测 TwistAmp[®] nfo 扩增反应。

执行阳性对照反应

TwistAmp[®] nfo 试剂盒包含阳性对照引物/探针和模板，可用于检测试剂盒各组分的活性并测试检测设备。阳性对照材料与 TwistAmp[®] nfo 反应微球及无引物再水合缓冲液配合使用。如果使用横向流动试纸条检测作为读出系统，阳性对照反应的预期结果应为试纸条上有一条清晰的有色检测线（以及独立的对照线）。相反，阴性对照（无模板）在检测线处不产生任何信号。TwistAmp[®] nfo 试剂盒阳性对照反向引物带有 FAM 标记，而探针带有生物素标记。

1. 解冻阳性对照引物/探针混合物，吸取 8 μL 加至新的 1.5 mL 微量离心管。
2. 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。
3. 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 所得溶液加入 10 μL 的稀释阳性对照 DNA。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[®] nfo 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： 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，然后开始 *监测 TwistAmp[®] nfo 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。

监测 TwistAmp[®] nfo 扩增反应

反应完成后通常使用终点检测法来分析 TwistAmp[®] nfo 反应的结果。如果使用了探针 (例如 TwistAmp[®] nfo 探针)，我们建议使用简单的夹心检测技术来确定靶标是否存在以及扩增是否发生。一种办法是使用 Milenia 的 Genline Hybridetect-1 试纸条，该试纸条单独开发用于检测扩增核酸，包括 PCR 产物。

TwistAmp[®] 非常适合使用此类试纸条，因为 TwistAmp[®] nfo 试剂盒专为与 TwistAmp[®] nfo 探针系统结合使用而设计，该探针系统可以直接探测试纸条上的扩增子，无需二次杂交或反应纯化。也可以使用其他横向流动耗材，例如 twistdx.co.uk 上提供的耗材。

在使用含 0.1% Tween20 的 1 x 磷酸盐缓冲液 (PBST) 进行稀释后, 可在几分钟内检测到扩增子, 且信噪比极高。此外, 在使用该试剂盒时, 可采用其他检测方法, 例如琼脂糖凝胶电泳 (AGE), 该方法在本节中也有相关论述。TwistAmp[®] nfo 也可用 TwistAmp[®] exo 探针, 因为 nfo 核酸酶可替代核酸外切酶 III 来处理 TwistAmp[®] exo 探针。相较于核酸外切酶 III, 使用 nfo 核酸酶时信号产生更慢且切割更少, 但其优点是扩增产物不会被 nfo 破坏, 因此也支持在终点时于凝胶上分析反应。

使用 TwistAmp[®] nfo 探针系统和 Milenia Genline Hybridect-1 对扩增进行评估

1. 如上文所述使用 TwistAmp[®] nfo 试剂盒、扩增引物和 TwistAmp[®] nfo 探针进行 DNA 扩增。确保等待足够的时间足以使反应接近终点, 通常需要多于 10 分钟但少于 20-30 分钟。
2. 采取适当的污染控制措施, 吸取 2 μ L 反应产物, 并与 98 μ L PBST 电泳缓冲液 (随 Milenia Genline Hybridect-1 提供; 含有 0.1% 吐温的 PBS 同样适用) 混合。
3. 将 10 μ L 稀释样本转移至 Hybridect-1 试纸条的样本垫上。
4. 将试纸条末端的样本垫放入 200 μ L 电泳缓冲液中。将 PBST 分别加入到 96 孔板的各孔中并将试纸条竖立于孔中, 这通常是一种便捷的做法。
5. 2-5 分钟后出现一条有色检测线便表明存在扩增产物。试纸条上更远处应始终出现一条独立的对照线, 这表明试纸条是正常有效的。
6. 弃置吸头、试纸条和多余缓冲液时应小心谨慎, 以避免引起扩增子污染。我们建议在与 RPA 反应分开的区域内执行所有扩增后操作。

采用琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 对扩增进行评估

1. 按照市售 PCR 纯化试剂盒的说明书纯化扩增产物。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）。

参考文献

Piepenburg et al, PLoS Biol.2006 Jul;4(7):e204.z

尾注

TwistAmp[®]、Twista[®] 和 TwistAmp[®] probe 是 TwistDx[™] 的注册商标。RPA 过程和探针技术的使用受到多项专利保护，其中除了美国专利 7,270,981 B2、7,399,590 B2、7,435,561 B2、7,485,428 B2 和外国同类专利外，还有一些正在申请的专利。

SDS 信息

TwistDx[™] 产品的安全数据表 (SDS) 信息见于 TwistDx[™] 网站，网址：twistdx.co.uk。产品发货时不包含 SDS 文档。

订购信息和技术支持

TwistDx™ Limited
Abbott House, Vanwall Business Park, Vanwall Road,
Maidenhead SL6 4XE 英国

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。