



TwistAmp® Liquid DNA 扩增试剂盒

综合说明书

-  TwistAmp® Liquid Basic/Basic RT
-  TwistAmp® Liquid exo/exo RT

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	4
购买者须知	5
简介	6
TwistAmp [®] 扩增技术概述	6
TwistAmp [®] 反应条件	6
TwistAmp [®] Liquid 应用系列	9
TwistAmp [®] 分析开发	10
TwistAmp[®] Liquid Basic/Basic RT 试剂盒	11
方案	12
详细实验方案	14
TwistAmp[®] Liquid exo/exo RT 试剂盒	22
其他必需材料	23
详细实验方案	25
参考文献、尾注、SDS 信息	32

标配材料

- 250 μ L 20x Core Reaction Mix
- 3 mL 2x Reaction Buffer
- 500 μ L 280 mM 醋酸镁 (MgOAc)
- 550 μ L 10x E-mix (“Basic” 或 “Probe”，取决于试剂盒)

特定试剂盒的材料

- 100 μ L 50x 核酸外切酶 III (TwistAmp[®] Liquid *exo/exo* RT 试剂盒)
- 100 μ L 50x 逆转录酶 (RT) (TwistAmp[®] Liquid Basic RT/*exo* RT 试剂盒)
- 100 μ L 阳性对照模板 (随 TwistAmp[®] Liquid *exo*/Basic 试剂盒提供的 DNA, 随 TwistAmp[®] Liquid Basic RT/*exo* RT 试剂盒提供的 RNA)
- 45 μ L 阳性对照寡核苷酸混合物 (Basic/Basic RT 试剂盒中的该寡核苷酸混合物由引物组成, *exo/exo* RT 试剂盒中的该寡核苷酸混合物由引物和带荧光标记的 *exo* 探针组成)

其他必需材料 (试剂盒中未提供)

- 分子级的水
- dNTP
- 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[®] Liquid 试剂盒组分: 到货后储存于 -20°C 下 (全活性可保持 6 个月)。

2x Reaction Buffer: 到货后分装并储存在 -20°C 下 (全活性可保持 6 个月)。避免冻/融次数过多。通过在到货后或在第一次解冻后进行分装便可避免。

阳性对照寡核苷酸混合物和 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 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 或其附属机构拥有的专利要求书或专利申请的保护，其供应有以下限制：材料和信息以非排他性方式授权给接收者，仅用于非商业性内部研究目的，以及在测序设备上鉴别序列和测定其相对顺序时，单次运行中的总靶标核苷酸数量不得达到 200,000。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、适销性、特定用途适用性或不侵犯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。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 38 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[®] 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：20x Core Reaction Mix 含有大肠杆菌 DNA 杂质。如果大肠杆菌中存在与菌株 K12 及 B121（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。

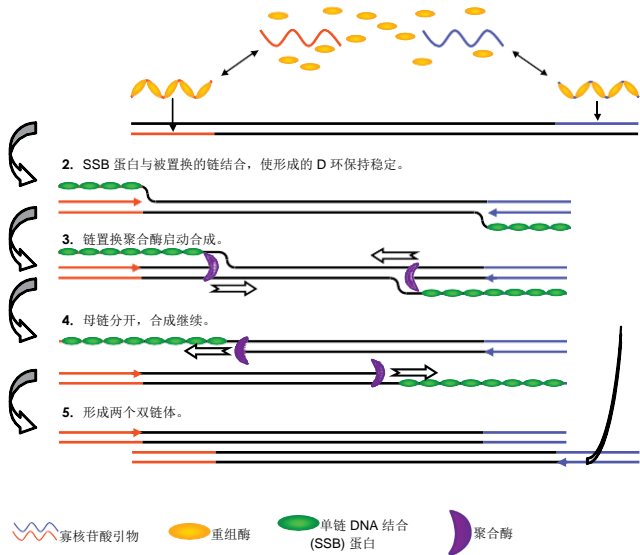


图 1 RPA 循环

TwistAmp® Liquid 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® Liquid Basic

含有 DNA 扩增所需的所有酶和试剂，用户只需自行准备引物、模板和 dNTP。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® Liquid 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® Liquid 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 DNA，从而生成扩增底物。

TwistAmp® Liquid exo

将 TwistDx™ 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® Liquid 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® Liquid 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 DNA，从而生成扩增底物。

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）。TwistAmp[®] exo 寡核苷酸探针与 TwistAmp[®] exo 试剂盒相容。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。关于此专利性探针设计，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[®] Liquid Basic/Basic RT
试剂盒

在开始之前：The 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

- dNTP
- 扩增引物
- 分子级的水
- Rnase 抑制剂（如果扩增 RNA 模板）
- 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
- 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（如果储存在低于 -20°C 的温度下，则分装成较小的体积以避免反复冻融）。10x Basic 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）模板。到货后，应将其储存在 $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$ (RNA) 下，必要时应再冷冻。

进行扩增：反应混合液制备和 MgOAc 启动

TwistAmp[®] Liquid 反应体系的建立方法是，将 20x Core Reaction Mix、dNTP、10x Basic E-mix、2x Reaction Buffer、扩增引物和模板混合（加水至每份样本总体积 $47.5\ \mu\text{L}$ ）。加入 $2.5\ \mu\text{L}$ 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 $50\ \mu\text{L}$ 。操作方法是使用移液管将 $2.5\ \mu\text{L}$ 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，而且调整确切的样本振荡时间点有时可改善产物形成。有多种混匀方法可供选择：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。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 反应体积极小（小于 5 μL ）或模板的拷贝数非常高，则可能不需要混匀。

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。

1. 将浓度为 10 μM 的每种引物各 2.4 μL 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	9.2 μL （如果使用 RT ³ 则为 8.2 μL ） ⁴
10x Basic 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。如果模板是 RNA，加入 1 μL 50x RT（每管反应）至试管盖上。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。
4. 将 41.7 μL ^{3,4} 预混液加入到制备于试管（第 1 步）内的引物中并用移液管吹打混匀。
5. 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。

6. 在 37-42°C 的温度下孵育 20-40 分钟。对于低拷贝数模板，在 4 分钟（RNA 为 5 分钟）后取出联排反应管，完全倒转 6 次进行混匀并短暂离心，然后放回加热设备中。或者，也可使用微珠在孵育期间进行磁力搅拌。
7. 在孵育期（第 6 步）之后，先纯化扩增子，然后再在琼脂糖凝胶上跑胶。请参见“监测 TwistAmp[®] Liquid Basic/Basic RT 扩增反应”。

警告：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。

- 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。
- 6 当筛选寡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。

1. 制备引物预混液（每管反应）

2x Reaction Buffer	25 μL
dNTP ² + 水	9.2 μL ³ （如果使用 RT ³ 则为 8.2 μL ） ⁴
10x Basic E-mix	5 μL
引物 A (10 μM)	2.4 μL
引物 B (10 μM)	2.4 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。

5. 在 37-42°C 的温度下孵育 20-40 分钟。对于低拷贝数模板，在 4 分钟（RNA 为 5 分钟）后取出联排反应管，完全倒转 6 次进行混匀并短暂离心，然后放回加热设备中。或者，也可使用微珠在孵育期间进行磁力搅拌。调整样本振荡时间点有时可以改善产物形成。
6. 在孵育期（第 5 步）之后，先纯化扩增子，然后再在琼脂糖凝胶上跑胶。请参见“监测 TwistAmp® Liquid Basic/Basic RT 扩增反应”。

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

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。

执行阳性对照反应

TwistAmp® Liquid Basic/Basic RT 试剂盒可能包含阳性对照引物和模板，用户可利用这些引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 7 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 Basic E-mix。
5. 加入 dNTP¹ 和水至 5.5 μL （如果使用 RT²，则为 4.5 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。

6. 将 2.5 μL 20x Core Reaction Mix 加到试管盖上。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。将试管完全倒置 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 Basic 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。
8. 在 40°C 下孵育 20-40 分钟。对于低拷贝数模板，在 4 分钟（RNA 为 5 分钟）后取出联排反应管，完全倒转 6 次进行混匀并短暂离心，然后放回加热设备中。或者，也可使用微珠在孵育期间进行磁力搅拌。调整样本振荡时间点有时可以改善产物形成。

9. 在孵育期（第 5 步）之后，先纯化扩增子，然后再在琼脂糖凝胶上跑胶。请参见“监测 TwistAmp[®] Liquid Basic/Basic RT 扩增反应”。

阳性对照反应将生成 289 个碱基对 (Basic) 或 141 个碱基对 (Basic RT) 的扩增产物，这些产物将在凝胶电泳中形成相应的条带。

监测 TwistAmp[®] Liquid Basic/Basic RT 扩增反应

在 TwistAmp[®] Liquid Basic/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 纯化试剂盒的说明纯化扩增产物。或者根据标准分子生物学规范，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，如果使用低靶标拷贝数，则在反应期间可能形成一些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）。这样的一些非特异性假象通常见于人和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）。

注：请注意，在执行反应溶液的扩增后处理时，设备、工作面等很容易受到扩增产物的污染！有关降低污染风险的措施，请参阅“防止模板交叉污染”一节。

防止模板交叉污染

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。在纯化扩增子并在琼脂糖凝胶上对其进行分析时须格外小心。

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。

TwistAmp[®] Liquid exo/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。

1. 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。

2. 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。
3. 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。
4. 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）。
5. 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。

参考文献

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

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：twistdx.co.uk/en/support/safety-data-sheets。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。