

TwistAmp® Liquid Basic/Basic 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：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。表现出快速扩增速度的 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。