

## 工作原理:

本试剂盒采用重组酶介导等温核酸扩增 (Recombinase Aided Amplification, RAA) 技术对检测目标序列进行扩增, 产物可通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。

RAA 是一种等温核酸扩增技术, 在等温条件下 (通常为 39℃), 20~40min, 以样品 DNA 为模板, 即可实现对目的基因片段的扩增。

引物的设计长度为 18~35bp 之间, 长度通常长于 PCR 引物。引物过短可能会降低反应重组率, 引物过长则有可能形成二级结构。引物浓度应根据模板的浓度进行筛选, 以确定最佳浓度, 提升扩增效率。扩增片段的长度推荐为 80~500bp, 模板 DNA 片段过长或出现重复序列时, 扩增的准确性会降低。

## 预期用途:

本试剂盒仅供科研使用, 适用于各种 DNA 扩增, 核酸扩增产物可采用琼脂糖凝胶电泳进行扩增结果检测。

## 包装规格/货号:

包装规格: 48 次, 货号 JY0200。

## 储存条件及有效期:

RAA 核酸扩增试剂盒的储存条件: -20℃ 避光保存, 有效期 6 个月, 避免反复冻融。4℃ 避光保存, 有效期 1 个月。反应单元开封后, 须当天用完。

## 操作步骤:

### 1. 样本处理

#### 1) 动物样本处理

肌肉或内脏样品: 首选脾脏, 其次为扁桃体、淋巴结、肾脏、骨髓等。每份组织用手术剪取 0.05g 或 3mm 见方的组织块于离心管内, 加入 180μL 动物组织裂解液 (BT0311) 组分 1, 漩涡混合均匀后, 可分别采用以下方式处理, ①95℃ 加热 5min 后, 再加入 20μL 动物组织裂解液 (BT0311) 组分 2, 漩涡混合均匀。12000rpm 离心 2min, 吸取上清液至一干净的离心管内, 待检。②95℃ 加热 2min 后, 再加入 20μL 动物组织裂解液 (BT0311) 组分 2, 漩涡混合均匀。12000rpm 瞬时离心, 吸取上清液至一干净的离心管内, 待检。处理方式①后期扩增效果优于②, 处理方式②操作更为简便, 快捷。

#### 2) 植物样本处理

剪取 2~3mm 见方的叶片, 或长度约 3m 的根、茎、芽于离心管内, 加入 180μL 植物组织裂解液 (BT0312), 漩涡混合均匀后, 可分别采用以下方式处理, ①95℃ 加热 5min 后, 12000rpm 离心 2min, 吸取上清液至一干净的离心管内, 待检。②样品经简单研磨后, 漩涡混合均匀, 12000rpm 瞬时离心, 吸取上清液至一干净的离心管内, 待检。处理方式①后期扩增效果优于②, 处理方式②操作更为简便, 快捷。

### 2. 反应体系的配制 (单个样品/反应):

建议加样顺序为阴性质控样本、待检样本和阳性对照, 每个样本添加完毕后均需立即扣好管盖, 避免污染。

#### 1) 用于病原物或一般样品扩增的反应体系

| 组分          | 用量 (μL) |
|-------------|---------|
| 基础缓冲液       | 25      |
| 引物 F (10μM) | 2.1     |
| 引物 R (10μM) | 2.1     |
| 样品裂解液       | 2~4     |
| 以水补足体积至     | 47.5    |

2) 用于 SNP 检测的反应体系

| 组分          | 用量 (μL) |
|-------------|---------|
| 基础缓冲液       | 25      |
| 引物 F (10μM) | 2.1     |
| 引物 R (10μM) | 2.1     |
| 探针 P (10μM) | 0.6~0.8 |
| 样品裂解液       | 2~4     |
| 以水补足体积至     | 47.5    |

- 3. 将上述反应体系混匀，加入基础反应单元。使冻干粉充分溶解，**注意，该步骤不能使用涡旋振荡器剧烈振荡混匀。**
- 4. 打开反应单元，加入 2.5μL 乙酸镁，充分混匀并离心收集；**注意，该步骤不能用涡旋振荡器剧烈振荡混匀。**
- 5. 将反应管放置在 39℃ 条件下反应 20~40min。
- 6. 反应结束后，将反应管取出。
- 7. 每个反应管中加入 50μL 酚/氯仿 (1:1)，充分振荡均匀，12000rpm 离心 1min。**注意，该步骤可使用涡旋振荡器剧烈振荡混匀。**
- 8. 吸取 10μL 上清液进行琼脂糖凝胶电泳（胶浓度一般为 1.5%~2%）检测。

检测灵敏度:

本试剂盒检测下限 1×10<sup>2</sup> 拷贝/测试（试剂盒的检测灵敏度与目的序列的 GC 含量及引物的扩增效率有关）。

注意事项及安全提示:

- 1. 本产品仅供科研使用。使用前请仔细阅读说明书，严格按照说明书操作。违反或者未按说明书进行操作可能导致错误结果。
- 2. 产品应依照说明书要求，储存于合适的环境和温度下，并在有效期内使用。储存不当或产品过期可能导致错误结果。
- 3. 为避免交叉污染，试剂配制区及检测区应分隔开。
- 4. 实验需设置不加模板的空白对照，以确认是否有待扩增核酸的污染。
- 5. 如用于病毒等病理样品检测，所有检测样本及试剂均按照传染性物质对待，实验过程中穿工作服，戴一次性手套，并经常更换手套，以做好工作人员的防护并避免交叉污染。
- 6. 不能使用过有效期的产品。