

**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 RNA 序列进行扩增, 产物可通过琼脂糖凝胶电泳或 Tiosbio® 一次性核酸检测试纸条 (彩虹型) (JY0201) 进行检测。

RT-RAA 是一种将反转录过程和扩增过程同步进行的等温核酸扩增技术, 在等温条件下 (通常为 39℃), 20~40min, 以样品 RNA 为模板, 即可实现对目的基因片段的扩增。

本试剂盒可用于科研, 要求引物设计长度 30~35bp 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。

**试剂盒组成:**

名称	含量
无核酸酶的双蒸水	1500 μL
基础缓冲液	1500 μL
乙酸镁	150 μL
基础反应单元	48 管
U 模板正向引物	25 μL
U 模板反向引物	25 μL
基础阳性质控品	25 μL
说明书	1 份

**包装规格/货号:**

包装规格: 48 次, 货号 JY0203。

**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, 须于 24 小时内使用完毕。

**操作步骤:****1. 样本处理**

1) 样本采集: 各类型样本按照常规方法采集;

- 2) 存放：样本在 2~8℃ 条件下保存应不超过 72h，-70℃ 以下可长期保存，但应避免反复冻融（最多冻融 3 次）；
  - 3) 运输：使用冰盒、泡沫箱加冰密封后，运输。
  - 4) 核酸提取：采用核酸提取试剂盒或全自动核酸提取仪，具体提取方法依照试剂盒说明书进行。
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。

组分	用量 (μL)
基础缓冲液	25
引物 F (10μM)	2
引物 R (10μM)	2
模板 RNA*+无核酸酶的双蒸水	18.5
补足体积至	47.5

\*如模板浓度较高，推荐模板 RNA 加样量为 1μL；阴性质控样本推荐使用无核酸酶的双蒸水。

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. 可以用 Tiosbio® 一次性核酸检测试纸条（彩虹型）（JY0201）直接进行检测。
8. 产物纯化后，可进行产物的琼脂糖凝胶电泳检测。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。**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  $1 \times 10^5$  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。