

**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。扩增体系含有正、反向扩增引物和探针。将一条引物/探针标记生物素（Biotin），另一条引物/探针标记异硫氰酸荧光素（FITC）或 6-羧基荧光素（6-FAM），探针经过 nfo 酶的切割和 RAA 后，形成了带有两种标记物的双链扩增产物，该产物可使用胶体金技术（三明治夹心法）进行检测。

在等温条件下（通常为 39℃），RAA 体系内的重组酶和引物形成蛋白/单链核苷酸的复合体 Rec/ssDNA，在辅助蛋白和单链结合蛋白 SSB 的帮助下，侵入双链 DNA 模板；在侵入位点形成 D-loop 区域，并开始对 DNA 双链进行扫描；待找到与引物互补的目的区域后，复合体 Rec/ssDNA 解体的同时，聚合酶也结合到引物的 3' 末端，以样品 DNA 为模板，12~20 min 即可实现对目的基因片段的高效扩增。

正、反向引物建议的设计长度为 30~35 nt 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，影响扩增速度和检测灵敏度；引物过长则有可能形成二级结构而影响扩增。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 150~300 bp，通常不超过 500 bp。注意，模板 DNA 片段过长或出现重复序列时，扩增的准确性会降低。

在正、反向引物中间，设计一段长度为 46~52 nt 与目的片段互补的探针序列。探针序列的 5' 末端修饰抗原标记（Biotin 或 FITC/6-FAM），5' 末端和 3' 末端的中部位置标记 1 个 dSpacer（四氢呋喃，THF），作为 nfo 的识别位点，3' 末端标记一个修饰基团，例如胺基、磷酸基团或 C3-Spacer 等。

**预期用途:**

本试剂盒仅供科研使用，适用于各种 DNA 模板的扩增，核酸扩增产物可使用进行检测。

**试剂盒组成:**

组分	JY0202 (48T)	数量
A buffer	1.6 mL	1
B buffer	150 μL	1
阳性对照模板	30 μL	1
阳性对照引物 Mix	60 μL	1
反应单元	48 管	48
使用说明书	1 份	1

**包装规格/货号:**

包装规格：48 次，货号 JY0202。

**储存条件及有效期:**

-20℃ 避光保存，有效期 14 个月，避免重压和反复冻融。反应单元开封后，须当天用完。

**操作步骤:**

1. 提前 30 min 将试剂盒所需组分取出，室温融化，震荡混匀。
2. 每个干粉反应管加入 29.4 μL A buffer（注意：A buffer 需完全融化混匀，否则会对实验效果产生影响）；
3. 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。  
每个反应管分别加入 2 μL 正向引物、2 μL 反向引物和 0.6 μL 探针（引物和探针浓度 10 μM，对于多个反应、步骤 1 和步骤 2 可以混合后再分装至反应管中）；向反应管中依次加入 12.1 μL ddH<sub>2</sub>O 和 2 μL 核酸模板（可根据核酸浓度调整加入的核酸模板体积，并相应调整加入的 ddH<sub>2</sub>O 体积，至模板与 ddH<sub>2</sub>O 总体积为 14.1 μL）。

组分	用量 (μL)
A buffer	29.4
正向引物 (10 μM)	2
探针 (10 μM)	0.6
反向引物 (10 μM)	2
核酸模板	2 ~ 13.5
以水补足体积至	47.5

注：阳性对照反应单元体系配制：阳性对照模板加入 2μL，加入 4 μL 阳性对照引物 Mix（包含上、下游引物）。其他组分参照体系配制。

- 最后向反应管中加入 2.5 μL B buffer 并充分混合（请务必上下颠倒甩动反应管 8~10 次进行混匀（可涡旋混匀）；对于多个反应，建议将 B buffer 加至反应管的盖子内侧上下颠倒后混匀）；
- 混匀后，将反应液甩（或快速离心）至管子底部，然后立即将反应管放入恒温设备中。
- 37~39 °C 孵育 10~16 min。
- 反应结束后，取 10 μL 加入含有 190 μL ddH<sub>2</sub>O 的离心管中，混合均匀后，将试纸条（JY0201, JY0209）结合垫端（箭头端）插入 PCR 反应管（图 1），液面不得超过结合垫最上端，待判读区全部浸润（约需 1~2 min，外界环境温度较低时，如冬季，会降低吸水速度，判读区浸润时间将会延长），待质控线（C 线）显色后，根据试纸条显色情况直接读取检测结果。

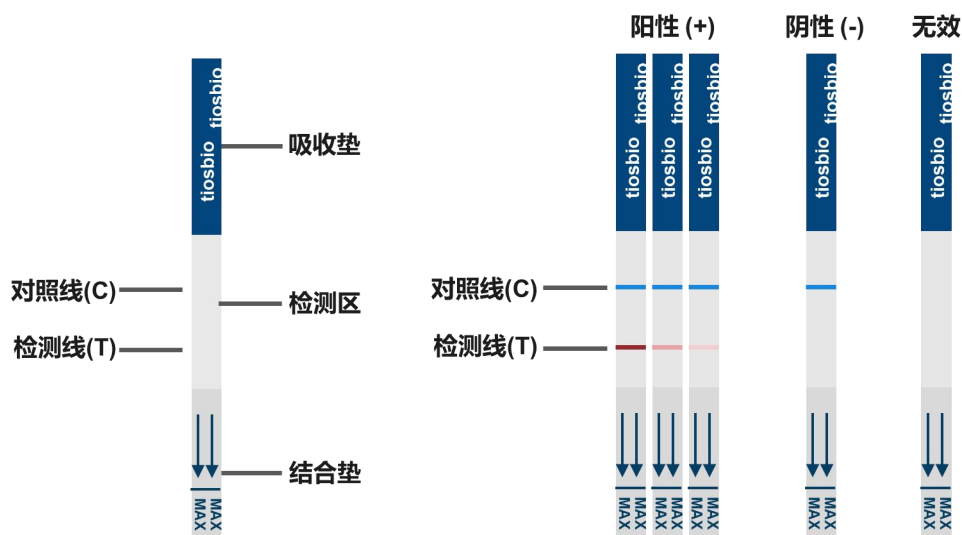


图 2 单靶标一次性核酸检测试纸条结构示意图和检测结果示意图

- 质控线（C 线）显色后 10 min 内观察结果，10 min 后判读无效。

#### 检测灵敏度:

本试剂盒检测极限约为  $1 \times 10^1$  拷贝/反应（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:

- 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。
- 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。
- 为避免交叉污染，试剂配制区及检测区应分隔开。
- 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。
- 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。
- 不能使用过有效期的产品。