

工作原理:

本试剂盒采用逆转录重组酶介导等温核酸扩增（Reverse Transcription Recombinase Aided Amplification, RT 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。

RT RAA 是一种等温核酸扩增技术，在等温条件下（通常为 42℃），特殊修饰的反转录酶利用特异性引物 DNA 和模板 RNA 合成 cDNA 链，反应体系中的重组酶、单链结合蛋白 SSB 和 DNA 聚合酶以新合成的 cDNA 链为模板进行快速核酸扩增反应。适用于实验室级别的 RNA 扩增以及其他检测用途的 RNA 扩增，及 DNA 模板的扩增使用，具有灵敏度高、特异性强、反应时间短（仅需 30 min）等优点，反应组分为干粉状态，操作简便，易于保存。

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。

预期用途:

本试剂盒仅供科研使用，适用于各种 RNA 及 DNA 模板的扩增，核酸扩增产物可采用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

试剂盒组成:

组分	JY0203 (48T)	数量
A buffer	1.6 mL	1
B buffer	150 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 JY0203。

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，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)
A buffer	29.4
正向引物 (10 μM)	2
反向引物 (10 μM)	2
核酸模板	2~14.1
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 4μL 阳性对照引物 Mix（包含上、下游引物）。其他组分参照体系配制。每个反应管分别加入 2 μL 正向引物和 2 μL 反向引物（引物浓度 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 ddH₂O 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 ddH₂O 体积，至模板与 ddH₂O 总体积为 14.1 μL）。

4. 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）；
5. 混匀后，将反应液甩（或快速离心）至管子底部，然后将反应管放入恒温设备中。
6. 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
7. 反应结束后，加入 50 μL 酚/氯仿（1:1），充分振荡均匀，注意，该步骤可使用涡旋振荡器剧烈振荡混匀。12000 rpm 离心 5 min，取 5 μL 上清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:

本试剂盒检测极限约为 1×10^2 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:

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。