工作原理:

本试剂盒利用特殊修饰的反转录酶以特异性引物作为转录引物，将体系内的 RNA 逆转录为 cDNA，并以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。在等温条件下（通常为 42℃），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 cDNA 模板或双链 DNA 产物内；在侵入位点形成 D-loop 区域，并开始对 DNA 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。扩增体系含有正、反向扩增引物和特异性的分子探针。在 42 ºC 下，特殊修饰的探针经过 exo 酶的切割后，可使用荧光监测设备对目标片段扩增过程进行实时监控。适用于各种品牌的荧光定量 PCR 仪、恒温荧光扩增仪器等荧光检测设备。

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，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。探针序列避免回文序列、内部二级结构和连续的重复碱基。探针序列共有四个修饰位点：距离 5’端的≥35 nt 的中部位置标记一个 dSpacer（四氢呋喃，THF），作为核酸外切酶的识别位点；THF 位点的上游标记一个荧光基团，下游标记一个粹灭基团，两个基团的间距为 2～4 nt；THF 距离 3’末端≥15 nt，并且 3’末端标记一个修饰基团，例如胺基、磷酸基团或 C3-Spacer。

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	JY0206（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 JY0206。

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 分钟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 11.5 µL ddH$_2$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$_2$O 体积，至模板与 ddH$_2$O 总体积为 13.5 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**

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，然后立即将反应管放入荧光检测设备中。荧光检测程序设置为：恒温 **42 ºC**；每 **30 s** 采集一次 **FAM** 通道（信号采集通道的选择与荧光探针设计一致）荧光值；反应时间 **20 mins**。如使用 **ABI** 系列 **PCR** 仪， **passive reference** 和 **quencher** 务必选择**“none”**。
6. **42 ºC** 孵育 **20 min**。根据扩增曲线判断检测结果。

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。