

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) 技术对支原体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°C），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，30~40 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。

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，核酸扩增产物可采用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

试剂盒组成:

组分	JY2249 (48T)	数量
A buffer	1.6 mL	1
B buffer	150 μ L	1
阳性对照模板	30 μ L	1
支原体检测引物 Mix	60 μ L	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 JY0200。

储存条件及有效期:

-20°C 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 μ L 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。

组分	用量 (μ L)
A buffer	29.4
正向引物 (10 μ M)	2
反向引物 (10 μ M)	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 2 μ L，加入 4 μ L 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 μ L 正向引物和 2 μ L 反向引物(引物浓度 10 μ M, 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 μ L ddH₂O 和 2 μ L 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 μ L)。

4. 最后向反应管中加入 2.5 μ L 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恒温设备中。
6. 37~39 °C 孵育 30 min。
7. 反应结束后, 加入 50 μ L 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 μ L 上清进行琼脂糖凝胶电泳(胶浓度一般为 1.5%~2%)检测。

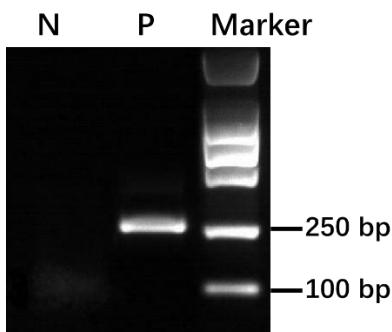


图 1 阴性对照 (N) 和阳性对照 (P) 的 RAA 扩增及电泳检测

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。