

众测®RAA 核酸扩增试剂（荧光型）使用说明书

【产品名称】RAA 核酸扩增试剂（荧光型）

【包装规格】48 T/盒

【产品用途】本产品可应用于核酸 DNA 的快速扩增。

【检测原理】本产品是基于重组酶介导链置换核酸扩增（Recombinase-aid Amplification, RAA）技术开发的恒温核酸扩增检测试剂，在 39℃ 恒温条件下特异识别并扩增目标样本的 DNA 片段，可用 **Genchek 荧光检测仪** 实时监控扩增过程，5-20 min 即可完成扩增检测。

【技术原理】重组酶介导链置换核酸扩增（Recombinase-aid Amplification, RAA），是一种恒温核酸快速扩增技术。从细菌或真菌中获得的重组酶在常温下可与引物 DNA 紧密结合，形成重组酶/引物复合体，侵入 DNA 双链核酸模板，在侵入位点重组酶将双链打开，同时单链结合蛋白结合到被重组酶打开的单链上，维持双链模板处于开链状态。重组酶/引物复合体开始对双链进行扫描，当引物在模板上搜索到与之完全匹配的互补序列时，重组酶/引物复合体解体，DNA 聚合酶结合到引物的 3' 端，开始合成新链。合成的新链又可以作为模板，最终扩增产物以指数级增长，完成靶标基因的扩增。经过荧光标记的探针与扩增产物结合，当探针被核酸外切酶酶切后发出荧光信号，可对扩增过程进行实时监控。本试剂盒具有快速、灵敏度高以及特异性强等优点，反应组分已混合并冷冻干燥成反应干粉，操作简便，易于保存。

【引物设计与探针设计】

引物设计建议方法：RAA 核酸扩增技术对引物设计的要求与常规 PCR 引物设计有一定的区别。由两条寡核苷酸组成一对引物，分别特异性识别一个核酸目标物的上下游核苷酸序列；引物长度在 30-35 nt 之间，序列中无回文序列、连续单碱基重复序列和内部二级结构区；引物 Tm 值不作为设计时主要考虑因素；最佳引物对需通过试验优化筛选得到，要求其扩增产物为单一条带，无非特异性扩增和明显的引物二聚体。

探针设计建议方法：探针序列不与引物识别位点重叠，长度在 46-52nt 之间，序列避免回文序列、内部二级结构和连续的重复碱基；共有四个修饰位点，距离 5' 端的 ≥28nt 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，下游标记一个淬灭基团，两个基团的间距为 2-4 nt，THF 距离 3' 末端 ≥15nt；3' 末端标记一个修饰基团，例如胺基、磷酸基团、生物素、生物素-TEG 或 C3-spacer。

建议：在开展 RAA（荧光型）扩增反应之前，先进行引物的筛选试验，以便得到较高的检测灵敏度。

【产品组成】

产品组成	包装规格
反应干粉	8T/条×6 条
A Buffer	1.5 mL/管×1 管
B Buffer	200 μL/管×1 管
C Buffer	70 μL/管×1 管
阴性对照	100 μL/管×1 管
阳性对照	100 μL/管×1 管
使用说明书	1 份

【储存条件及有效期】本产品存储于 -20±5℃、干燥、避光条件下；有效期为 12 个月。

【适用仪器】Genchek 系列荧光检测仪、其他荧光定量 PCR 仪（如：ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪（软件要求 2.0 以上）、Bio-RadCFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪或耶拿 qTOWER 实时荧光定量 PCR 仪等）。

【检测步骤】

1. DNA 样本提取：请参考传统 DNA 提取方法或其他同效商品化试剂盒提取 DNA 样本。

2. 样本检测

2.1 单管反应体系（50μL）：

反应干粉	1 管
A Buffer	25 μL
上游引物(10 μM)	2.0 μL
下游引物(10 μM)	2.0 μL
探针(10 μM)	0.6 μL
DNA样本和水	17.9μL
B Buffer	2.5μL
总体积	50.0μL

推荐反应体系（模板用量为5μL）：

反应干粉	1 管
A Buffer	25 μL
上游引物(10 μM)	2.0 μL
下游引物(10 μM)	2.0 μL
探针(10 μM)	0.6 μL
水	12.9 μL
DNA样本	5 μL
B Buffer	2.5 μL
总体积	50.0 μL

阳性对照反应体系：

反应干粉	1 管
A Buffer	25 μL
C Buffer	4.6 μL
水	12.9 μL
阳性对照	5 μL
B Buffer	2.5 μL
总体积	50.0 μL

2.2 操作步骤

- 2.2.1 根据反应数量，按照反应体系配制含有水、A Buffer、上游引物(10 μM)、下游引物(10 μM)、探针（10μM）的 Mix，混合均匀后加入装有反应干粉的检测单元管中；
- 2.2.2 向检测单元管中加入经步骤 1 处理得到的待测 DNA 样本；
- 2.2.3 再向检测单元管盖上加 2.5 μL 的 B Buffer，盖上管盖，上下颠倒轻甩充分混匀 5-6 次，低速离心 10 sec；
（注：本步骤“是否充分混匀”将决定实验结果的重复性）
- 2.2.4 将检测单元管放入 Genchek 荧光检测仪（或其他荧光定量 PCR 仪）中，开始检测。

3. 阳性对照反应

- 3.1 向装有反应干粉的检测单元管中加入 25μL A Buffer、4.6 μL C Buffer 和 12.9 μL 水；
- 3.2 向检测单元管中加入 5.0 μL 阳性对照；
- 3.3 再向检测单元管盖上加 2.5 μL 的 B Buffer，盖上管盖，上下颠倒轻甩充分混匀 5-6 次，低速离心 10 sec；
（注：本步骤“是否充分混匀”将决定实验结果的重复性）
- 3.4 将检测单元管放入 Genchek 荧光检测仪（或其他荧光定量 PCR 仪）中，开始检测。

4. RAA 程序设定

4.1 Genchek 系列荧光检测仪：

- 4.1.1 开机自检后，点击“扩增”；
- 4.1.2 放入反应管后点击“新建”，编辑实验名称，然后选择荧光通道“FAM”并选择相应反应孔。点击“启动”；
- 4.1.3 对反应孔对应的样本信息进行编辑，完成后点击“确定”启动反应。

4.2 其他荧光定量 PCR 仪：反应体系为 50μL 体系，荧光通道选择 FAM 通道。

步骤	温度	时间/循环	循环数	荧光信号采集
预热	39℃	60 s	1	否
扩增	39℃	30 s	40	是

【结果分析与判定】

1. 结果分析

- 1.1 Genchek 系列荧光检测仪：无需自行设定基线和阈值。
- 1.2 其他荧光定量 PCR 仪：参照具体荧光定量 PCR 仪使用说明书进行基线设定和阈值设定。

2. 结果判定

- 2.1 Genchek 荧光检测仪：可自动判读检测结果。
- 2.2 其他荧光定量 PCR 仪（注：不同荧光定量 PCR 仪的判定标准有所差别，可依据实际情况进行调整，以下判定内容仅供参考）：
- 2.2.1 阳性对照：有典型的扩增曲线出现，出峰时间≤15min（Ct 值≤30），为有效结果；
- 2.2.2 阴性对照：无扩增曲线出现，或出峰时间≥20min（Ct 值≥40），为有效结果；
- 2.2.3 检测样本：有典型的扩增曲线出现，出峰时间≤18min（Ct 值≤36）时为阳性；出峰时间>18min（Ct 值>36）时为阴性。

【注意事项】

1. 在同一核酸提取方法下，不同样品类型所提取的核酸含量和纯度会有明显差异，导致扩增效率不同；
2. 当实验室环境、试剂、仪器或配件存在阳性物质（例如质粒、扩增产物等）污染，或样本间存在交叉污染的情况，则会影响检测结果准确性，出现假阳性结果；
3. 务必保证试剂保存、配制或运输得当，否则可能导致试剂检测性能下降，出现假阴性结果；
4. 阳性对照核酸应尽快使用，避免反复冻融；
5. 请严格按照本说明书和基因扩增实验室的管理规范进行试验操作；
6. 实验结束后，检测过程中所产生的废弃物应按照相关规范进行处理。

【版本号】 1.0 版