

众测®RT-RAA 核酸扩增试剂（基础型）使用说明书

【产品名称】 RT-RAA 核酸扩增试剂（基础型）

【包装规格】 48 T/盒

【产品用途】 本产品可应用于核酸 RNA 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 42℃ 恒温条件下特异识别并扩增目标样本的 RNA 片段，用琼脂糖凝胶电泳检测判断。

【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。RT-RAA 先利用逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA，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 RNA-cDNA 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。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】 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 30-35nt 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。

建议：在开展 RT-RAA （基础型）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
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】 恒温金属浴、恒温水浴锅或恒温培养箱等。

【检测步骤】

1. RNA 样本提取：请参考传统 Trizol 方法或其他同效商品化试剂盒提取 RNA 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
RNA 样本和水	18.5μL
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
水	13.5 μL
RNA 样本	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)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 RNA 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，上下颠倒充分混匀 5-6 次，低速离心 10sec；

（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 42℃ 恒温金属浴（或恒温水浴锅、恒温培养箱等）中，孵育 30min。

2.2.5 反应结束后，在检测单元管中加入 50μL 酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）抽提液，充分混匀后 12000rpm/min 离心 5min，取上清进行电泳检测。（此步骤除去反应体系中对电泳结果有影响的蛋白类成分）

【结果分析与判定】

使用凝胶成像仪进行图像采集和分析，对比扩增条带是否与目的片段大小一致。

【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. 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；
5. 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