

众测®RT-RAA 核酸扩增试剂（荧光型）使用说明书

【产品名称】RT-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 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，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。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。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 30-35nt 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。

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 46-52 nt 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≥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，下游标记一个淬灭基团，两个基团的间距为 2-4 nt，THF 距离 3'末端≥15nt；在 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 RT-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
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-Rad CFX96 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. 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 (50 μ L):

反应干粉	1 管
A Buffer	25 μ L
上游引物(10 μ M)	2.0 μ L
下游引物(10 μ M)	2.0 μ L
探针(10 μ M)	0.6 μ L
RNA样本和水	17.9 μ L
B Buffer	2.5 μ L
总体积	50.0 μ L

推荐反应体系 (模板用量为5 μ L):

反应干粉	1 管
A Buffer	25 μ L
上游引物(10 μ M)	2.0 μ L
下游引物(10 μ M)	2.0 μ L
探针(10 μ M)	0.6 μ L
水	12.9 μ L
RNA样本	5 μ L
B Buffer	2.5 μ L
总体积	50.0 μ L

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 μ M)、下游引物(10 μ M)、探针 (10 μ M) 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 μ L 的 B Buffer, 盖上管盖, 上下颠倒充分混匀 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 荧光检测仪中, 开始检测 (或其他荧光定量 PCR 仪)。

3. RAA 程序设定

3.1 Genchek 系列荧光检测仪:

3.1.1 开机自检后, 点击“扩增”;

3.1.2 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”;

3.1.3 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。

3.2 其他荧光定量 PCR 仪: 反应体系为 50 μ L 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	42 $^{\circ}$ C	40 s	1	否
扩增	42 $^{\circ}$ C	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 $\leq$ 15min (Ct 值 $\leq$ 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 $\geq$ 20min (Ct 值 $\geq$ 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 $\leq$ 18min (Ct 值 $\leq$ 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. 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国家规范进行处理。

【版本号】 1.0 版