

众测® RT-RAA-nfo 核酸扩增试剂（试纸条型）使用说明书

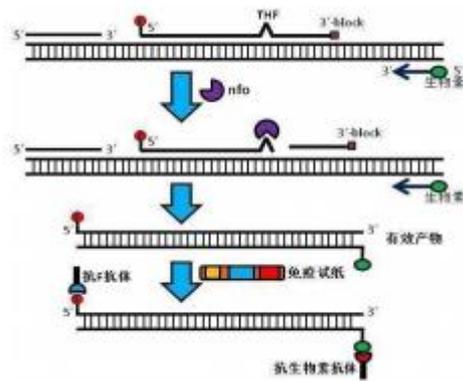
【产品名称】 RT-RAA-nfo 核酸扩增试剂（试纸条型）

【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，采用通用型核酸检测试纸条进行检测。

【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，用通用型核酸检测试纸条检测判断。

【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。经过荧光标记的探针与扩增产物结合，当探针被核酸内切酶酶切后，与生物素标记的引物共同扩增形成两端有荧光标记及生物素标记的片段，可用通用型核酸检测试纸条进行判读。如下图所示：

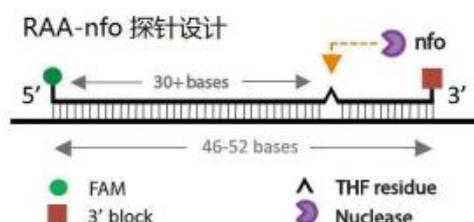


本试剂盒具有快速、灵敏度高以及特异性强等优点，反应组分已混合并冷冻干燥成反应干粉，操作简便，易于保存。

【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。同时 RAA-nfo 的下游引物 5' 端用一种抗原标记物标记，通常为生物素。

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；探针的 5' 端用一种抗原标记物标记，通常为 FAM 基团或羧基荧光素；内部含有碱基核苷酸类似物替换核苷酸（例如四氢呋喃残基 THF-有时称为'dSpacer'）；3' 末端有聚合酶延伸阻断基团（例如 C3-spacer，磷酸基或双脱氧核苷酸）。如下图所示：



建议： 在开展 RT-RAA-nfo（试纸条型）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 μ L/管×1 管
使用说明书	1 份

【储存条件及有效期】 本产品存储于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、干燥、避光条件下；有效期为 12 个月。

【检测步骤】

1. RNA 样本提取：请参考传统 Trizol 方法或其他等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(2 μ M)	2.0 μ L
下游引物(2 μ M)	2.0 μ L
探针(2 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(2 μ M)	2.0 μ L
下游引物(2 μ M)	2.0 μ L
探针(2 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(2 μ M)、下游引物(2 μ M)、探针(2 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入 2.5 μ L 的 B Buffer，盖上管盖，上下颠倒轻甩混匀 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 42°C 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，将 50 μ L 反应体系液用无菌水或者 PBS 稀释（50 μ L 反应体系液:300 μ L 稀释剂），利用通用型核酸检测试纸条进行检测。推荐使用免开盖的装置进行试纸条检测，避免气溶胶污染。

【结果分析与判定】 利用通用型核酸检测试纸条进行结果判定。

【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