

货号	名称	规格	存储
B8201C1	DNA 恒温快速扩增试剂盒 (RAA 基础型)	48T	-20℃

【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, 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。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/引物复合物, 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/引物复合物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/引物复合物解体, 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 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
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】 恒温金属浴、恒温水浴锅或恒温培养箱等。

【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 (50 μ L) :		推荐反应体系 (模板用量为 5 μ L) :		阳性对照反应体系:	
反应干粉	1 管	反应干粉	1 管	反应干粉	1 管
A Buffer	25 μ L	A Buffer	25 μ L	A Buffer	25 μ L
上游引物(10 μ M)	2.0 μ L	上游引物(10 μ M)	2.0 μ L	C Buffer	4.0 μ L
下游引物(10 μ M)	2.0 μ L	下游引物(10 μ M)	2.0 μ L	水	13.5 μ L
DNA 样本和水	18.5 μ L	水	13.5 μ L	阳性对照	5 μ L
B Buffer	2.5 μ L	DNA 样本	5 μ L	B Buffer	2.5 μ L
		B Buffer	2.5 μ L		
总体积	50.0 μ L	总体积	50.0 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)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入 2.5 μ L 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 39 $^{\circ}$ C 恒温金属浴（或恒温水浴锅）中，孵育 30min。

2.2.5 反应结束后，在检测单元管中加入 50 μ L 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）

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 25 μ L A Buffer、4.0 μ L C Buffer 和 13.5 μ L 水；

3.2 向检测单元管中加入 5.0 μ L 阳性对照；

3.3 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 39 $^{\circ}$ C 恒温金属浴（或恒温水浴锅）中，孵育 30min。

3.5 反应结束后，在检测单元管中加入 50 μ L 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. 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。

相关产品：

货号	产品	规格
B8201C1	DNA 恒温快速扩增试剂盒（RAA 基础型）	48T
B8202C3	DNA 恒温快速扩增试剂盒（RAA 荧光型）	48T
B8203C5	DNA 恒温快速扩增试剂盒（RAA 试纸条型）	48T
B8204C7	RNA 恒温快速扩增试剂盒（RT-RAA 基础型）	48T
B8205C9	RNA 恒温快速扩增试剂盒（RT-RAA 荧光型）	48T
B8206C0	RNA 恒温快速扩增试剂盒（RT-RAA 试纸条型）	48T
JY0209	双靶标 HybriDetect 侧向层析试纸条（彩虹型）	50T
JY0201	单靶标 HybriDetect 侧向层析试纸条（彩虹型）	50T
JY0307	Tiosbio® CRISPR 单酶切及扩增产物检测试纸条	50T
JY0301	CRISPR Cas12/13 HybriDetect 试纸条	50T
JY0308	Tiosbio® CRISPR 双酶切检测试纸条（变色龙）	50T