



RNA 恒温快速扩增试剂盒（荧光型）使用说明书

【产品名称】

通用名称：RNA 恒温快速扩增试剂盒（荧光型）

【包装规格】

货号：EDN-RY01

规格：48 份/盒

【原理概述】

本试剂盒基于一种常温恒温核酸快速扩增技术：在常温恒温下（一般为 39°C~42°C），反转录酶利用特异性引物 DNA 和模板 RNA 合成 cDNA 链，在辅助蛋白和单链结合蛋白 SSB 的帮助下，重组酶和引物形成蛋白/单链核苷酸的复合物 Rec/ssDNA，进行同源搜索并结合目的同源域，在同源位置形成 D-loop 区域并开始进行链交换；伴随着重组酶从复合物上解离，聚合酶也结合到引物的 3' 末端，开始链的延伸。同时依赖核酸外切酶的作用，加入根据模板设计的特异的分子探针，使用荧光监测设备能实现对目标片段扩增过程的实时监控。

【产品特点】

本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、反应时间短（仅需 20 min）等优点，反应组分为干粉状态，操作简便，易于保存。

可适用于各种品牌的荧光定量 PCR 仪，恒温荧光扩增仪器等荧光检测设备。

【引物设计】

建议使用长度在 30-35 bp 的引物，引物过短会影响扩增速度和检测灵敏度；引物设计避免形成二级结构而影响扩增；扩增子长度建

议在 150-500 bp。

【荧光探针设计】

探针序列不与特异性引物识别位点重叠，长度为 46-52 nt，序列避免回文序列、内部二级结构和连续的重复碱基。探针共有四个修饰位点：距离 5' 端的约 30~35 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' 末端约 15 nt，并且 3' 末端标记一个修饰基团，例如胺基、磷酸基团或 C3-Spacer。

【试剂盒组成】

组成	含量
A buffer	1.6 mL×1 管
B buffer	150 μL×1 管
试剂	48 份
使用说明书	1 份

注：考虑到核酸降解问题，RNA 系列产品不提供正对照模板和引物探针。

【试剂盒储存】

1. 运输温度：≤ 20 °C 的恒温环境；
2. 储存条件：储存温度 ≤ -20 °C (± 5 °C) 恒温环境，避光保存，避免重压、反复冻融；
3. 产品有效期：14 个月；
4. 生产日期见外包装。



【操作步骤】

提前 30 分钟将试剂盒所需组分取出，室温融化，震荡混匀。

- (1) 每个干粉反应管加入 29.4 μL A buffer (注意: A buffer 需完全融化混匀, 否则会对实验效果产生影响);
- (2) 每个反应管分别加入 2 μL 上游引物、2 μL 下游引物和 0.6 μL 探针 (引物和探针浓度为 10 μM , 对于多个反应、步骤 1 和步骤 2 可以混合后再分装至反应管中);
- (3) 向反应管中依次加入 5 μL 核酸模板和 8.5 μL ddH₂O (可根据实际需求调整加入模板的体积, 并相应调整加入的 ddH₂O 体积, 至模板与 ddH₂O 总体积为 13.5 μL);
- (4) 最后向反应管中加入 2.5 μL B buffer 并充分混合 (注意: a. B buffer 是启动反应的缓冲液, 一旦进入体系意味着酶被激活; b. 请务必上下颠倒甩动反应管 8-10 次进行混匀, 涡旋、弹管子等方式可能无法有效混匀; c. 对于多个反应, 建议提前将 B buffer 加至反应管的盖子内侧, 盖上盖后上下颠倒后混匀, 可保证反应同时启动);

- (5) 混匀后, 将反应液甩 (或快速离心) 至管子底部, 然后立即将反应管放入荧光检测设备中。荧光检测程序设置为: 恒温 42 $^{\circ}\text{C}$; 每 30 s 采集一次 FAM 通道 (信号采集通道的选择与荧光探针设计一致) 荧光值; 反应时间 20 min。

注: 如使用 ABI 系列 PCR 仪, 请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择 “none”。

体系配制

组分	体积 (μL)
A buffer	29.4
上游引物(10 μM)	2
下游引物(10 μM)	2
探针(10 μM)	0.6
ddH ₂ O 和 RNA 模板	13.5
B buffer	2.5
总体积	50

【注意事项】

1. 由于试剂盒灵敏度非常高, 在进行反应时请注意避免核酸污染, 并设置空白对照;
2. 使用时请取出实验所需的冻干试剂的数量, 剩余部分请置于存储条件下。
3. 使用有效期内试剂, 且组分不得与其他批号的相应试剂混用。

