



RNA 恒温快速扩增试剂盒（胶体金试纸条型）-II

使用说明书

【产品名称】

通用名称：RNA 恒温快速扩增试剂盒（胶体金试纸条型）

【包装规格】

货号：EDN-RT01

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和模板 RNA 合成 cDNA 链，在辅助蛋白和单链结合蛋白的帮助下，重组酶和引物形成复合物；进行同源搜索并结合目的同源域，此时在该同源位置形成 D-loop 区并开始进行链交换；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。依赖 nfo 酶的作用，加入根据模板设计的特异的分子探针，使用胶体金技术（三明治夹心法）可以对最终结果进行检测。

【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 15 min）等优点，反应组分为干粉状态，操作简便，易于保存。

本试剂对设备要求低，金属浴、水浴锅等即可进行反应操作，无需购买 PCR 扩增仪等价格高昂的专属设备。

【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；下游引物的 5'端标记一个修饰基团（常用生物素）。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】

在上下游引物中间，设计一段长度为 46-52nt 与目的片段互补的序列；5'端修饰一个抗原标记（典型 FAM）；在 5'端和 3'末端的中部位置标记一个 dSpacer（四氢呋喃，THF），作为 nfo 的识别位点；3'末端标记一个修饰基团，例如胺基、磷酸基团或 C3-Spacer 等。

【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（也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. 请务必以上下颠倒甩动反应管 8-10 次的方式进行混匀，涡旋、弹管子等方式可能无法有效混匀； c. 对于多个反应，建议将 B buffer 加至反应管的盖子内侧，盖好后上下颠倒后混匀，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，然后将反应管放入恒温设备中 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 8-12 min；
- (6) 反应结束后，用 ddH₂O 将扩增产物稀释 10~20 倍，混合均匀后，进行试纸

条显色，5 min 内观察质控线与检测线 判读结果。

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 和核酸模板	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 MIRA 反应单元的数量，剩余部分请置于存储条件下。

