

RNA 恒温快速扩增试剂盒（基础型）使用说明书

【产品名称】

通用名称：RNA 恒温快速扩增试剂盒（基础型）

【包装规格】

货号：EDN-RJ01

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 39~42 °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/单链核苷酸的复合体 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体上解离，聚合酶也结合到引物的 3'末端，开始链的延伸。适用于实验室级别的 RNA 扩增以及其他检测用途的 RNA 扩增使用。

【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 30 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。

【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。

【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 上游引物和 2 μL 下游引物（引物浓度 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 9.1 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 14.1 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恒温设备中 39~42 °C 孵育 30 min；
- (6) 反应结束后，选择以下其中一种方式处理反应产物使蛋白变性，然后进行琼脂糖凝胶电泳（琼脂糖凝胶浓度建议为 1.5%-2%）：

6.1 抽提法（推荐）：反应产物加入 50 μ L Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇（25: 24: 1）DNA 抽提液，混匀后 12000 rpm 离心 5 min，取 5 μ L 上清与 1 μ L 6 $\times$ Loading buffer 混匀点样进行琼脂糖凝胶电泳 检测；

6.2 热变性法：向反应产物加入 8 μ L 6 $\times$ Loading buffer 混匀，在金属浴 56°C 孵育 5min，取 5 μ L 混合液进行琼脂糖凝胶电泳检测。

注意：不推荐使用 PCR 产物纯化试剂盒的方法处理产物，经测试市面部分产物纯化试剂盒不适用，可能造成假阴性结果。

体系配制

组分	体积 (μ L)
A buffer	29.4
上游引物(10 μ M)	2
下游引物(10 μ M)	2
ddH ₂ O 和 RNA 模板	14.1
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。

