

## RT-荧光型核酸扩增试剂盒（ERA法）使用说明书

（产品货号：KS104）

### 试剂盒标配材料

组分	24T	96T
溶解剂 DA（白盖）	1.2mL	1.2mL*2
激活剂 MC（绿盖）	250μl	250μl
阳性引物 PM（蓝盖）	180μl	180μl
阳性探针 PB	15μl	15μl
阳性标准品（红盖）	80μl	80μl
RT-荧光扩增试剂（铝箔袋）	24T*1	24T*4
使用说明书	1份	1份

### 检测下限

本试剂盒最低检测下限为10-100copies/测试（依据引物筛选优化程度和检测手段）

### 存储条件及有效期

存储在-20±5℃、干燥、避光的环境，有效期1年。

### 详细实验方案（反应体系为 50μl）

- 按照以下所述制备每份样本的预混液：

组分	每管加样量/μl
溶解剂 <sup>[1]</sup>	20
正向引物 (10μM)	2.1
反向引物 (10μM)	2.1
荧光探针 (10μM)	0.6
模板RNA	2≤x≤10
ddH <sub>2</sub> O	23.2-x
体积	48

充分振荡混匀并短暂离心。

- 对于每份样本，将48μl预混液转移至每管RT-荧光扩增试剂<sup>[2]</sup>中。振荡混匀<sup>[3]</sup>直到扩增试剂重悬，并短暂离心。
- 对于每份样本，在反应管盖上加上2μl激活剂<sup>[4]</sup>，小心盖紧管盖，通过短暂离心使激活剂进入预混液中。短暂振荡混匀<sup>[5]</sup>并再次快速离心。
- 将反应管放入恒温仪（40-42℃）中，启动检测，持续20分钟，每30秒采集一次FAM通道荧光值。
- 反应结束后，保存数据并弃置样本管。

**操作注意要点：**

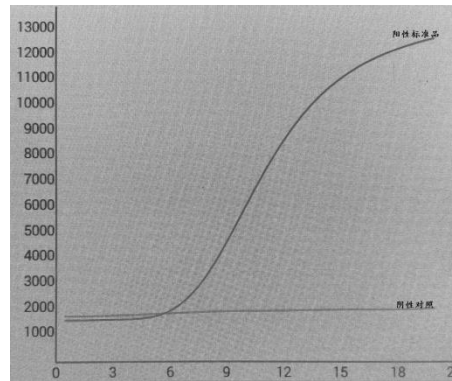
- [1] 溶解剂需**完全融化混匀**，否则会对实验产生影响。
- [2] RT-荧光扩增试剂在使用前放置室温平衡10min，剩余未用尽的试剂应注意**防潮密封保存**。
- [3] 此处振荡混匀旨在将扩增试剂重悬，使体系分散均匀，混匀时间应在**3-5s, 3000rpm**。
- [4] ERA反应是靠激活剂来启动，一旦加入激活剂，务必**立即上机孵育**。
- [5] 此处**振荡混匀时间应在3s左右**，时间过长会导致检出时间延后。

## 阳性对照反应

RT-荧光型核酸扩增试剂盒包括阳性引物、探针和阳性标准品（**浓度：10<sup>5</sup>cp/μl**），可用于检测试剂盒各组分的活性。检测方法与上述实验方案相同（阳性引物Primer mix添加量为4.2μl，荧光探针添加量0.6μl），**反应温度推荐使用40℃**。阳性对照探针带有荧光素（FAM）标记物，最佳激发波长为492nm，最大发射波长为520nm。

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

组分	每管加样量/μl
溶解剂	20
阳性引物 PM	4.2
阳性探针 PB	0.6
ddH <sub>2</sub> O	21.2
阳性标准品	2
激活剂	2
体积	50



\*阳性标准品、阴性对照实时荧光曲线如上右图，所用仪器为先达 GS8 荧光恒温扩增仪。

## 注意事项

1. 本试剂盒仅用于非医用检测；应存储于-20±5℃、干燥、避光的环境。
2. ERA扩增产物的气溶胶易造成假阳性，为避免交叉污染，试剂配制区与扩增分析区应分隔开。
3. 实验时应设置不加模板的空白对照，以确认是否有待扩增核酸的污染。
4. 在不同的核酸提取方法下，所提取的样本RNA含量和纯度会有差异，可能会导致出现扩增效率不一的现象（详情请查阅PCR抑制剂：乙醇、苯酚、血红素等等）。
5. 阳性标准品建议添加2μl，待检样本添加量范围为2μl~10μl。如果待检样本浓度较高，则仅需添加2μl，反之，则加大样本添加量，最大体积不超过10μl。
6. 单独添加模板RNA至反应管盖时，应与激活剂分开，防止与激活剂混合后稳固RNA的三级结构，从而导致逆转录酶受到抑制。
7. 如果模板RNA拷贝数低，请在反应5分钟后取出反应管，振荡混匀并短暂离心，再放回恒温仪中。
8. 任何能激发和检测所选荧光团，并能将温度稳定于40-42℃的荧光检测仪都适用于荧光探针检测（GS8荧光恒温扩增仪，ABI 7500，LightCycler480，CFX 96等荧光定量PCR仪）。
9. 扫码关注公众号，输入“问题解答”获取操作视频及常见问题解决方案。



欢迎扫码关注