

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 |
| RT-荧光扩增试剂 (铝箔袋) | | 24T*1 | 16T*6 |
| 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°C、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 ^[1] | 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 ₂ 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^[2]中。振荡混匀^[3]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^[4]，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^[5]并再次快速离心。
- 将反应管放入恒温仪（40-42°C）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。

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. 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