

RT-探针型冻干微球（ERA法）使用说明书**（货号：KS304）****试剂盒标配材料**

组分	24T	96T
激活剂 MC（绿盖）	250μl	250μl
冻干微球（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2-8℃、干燥、避光的环境，有效期1年

详细实验方案（反应体系为 50μl）**一. 荧光法**

- 按照以下所述制备每份样本的预混液：

组分	每管加样量/μl
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	43.2-x
体积	48

充分振荡混匀并短暂离心。

- 对于每份样本，将48μl预混液转移至每管冻干微球^[1]中。振荡混匀^[2]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^[3]，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（40-45℃）中，推荐45℃，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]** 冻干微球在使用前放置室温平衡10分钟，剩余未用尽的试剂应注意**防潮密封保存**。
- [2]** 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5-8s，3000rpm**。
- [3]** 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**。
- [4]** 此处**振荡混匀时间应在5s左右**，未完全混匀会导致检出时间延后灵敏度受到影响。

二. 试纸法

- 按照以下所述制备每份样本的预混液:

组分	每管加样量/ μl
正向引物 (10 μM)	2.1
反向引物 (10 μM)	2.1
试纸探针 (10 μM)	0.6
模板RNA	$2 \leq x \leq 10$
ddH ₂ O	43.2-x
体积	48

充分振荡混匀并短暂离心。

- 对于每份样本，将48 μl 预混液转移至每管冻干微球^[1]中。振荡混匀^[2]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2 μl 激活剂^[3]，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^[4]并再次快速离心。
- 将反应管放入合适的恒温荧光检测仪（40-45 $^{\circ}\text{C}$ ）中孵育10-15分钟，推荐45 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育10分钟。
- 反应结束后，试纸条（卡）详细操作见试纸条（卡）附带说明书。

操作注意要点:

- [1] 冻干微球在使用前放置室温平衡10分钟，剩余未用尽的试剂应注意**防潮密封保存**。
- [2] 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5-8s，3000rpm**。
- [3] 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**。
- [4] 此处**振荡混匀时间应在5s左右**，未完全混匀会导致检出时间延后灵敏度受到影响。

注意事项

- 本试剂盒仅用于非医用检测；应存储于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 、干燥、避光的环境。
- 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。
- 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。
- 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）。
- 待检样本添加量范围为2 μl ~10 μl 。如果待检样本浓度较高，则仅需添加2 μl ，反之，则加大样本添加量，最大体积不超过10 μl 。
- 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。
- 如果模板RNA拷贝数低，请在反应4分钟后取出反应管，振荡混匀并短暂离心，再放回恒温仪中。
- 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