

RT-基础型冻干微球（ERA法）使用说明书**（货号：KS303）****试剂盒标配材料**

组分	24T	96T
激活剂 MC（绿盖）	250μl	250μl
6* Loading Buffer（紫盖）	1mL	1mL
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）

- 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
模板RNA	2 ≤ x ≤ 10
ddH ₂ O	43.8-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^[4]并再次快速离心。
- 将反应管放入恒温仪（40-45℃）中孵育20分钟，推荐45℃。
- 孵育结束后^[5]，应立即使用产品自带6*Loading Buffer，按所需量（每10μl样品加1.5μl Loading Buffer）添加后，56℃孵育5分钟，然后在琼脂糖凝胶上跑胶，或纯化ERA扩增产物^[6]进行其他下游应用。

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3-5s，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3s左右**，时间过长会导致检出时间延后。

- [5] 孵育结束后必须**立即终止反应**【纯化或者使用**蛋白酶 K** (5 μ g/100 μ l) 消化处理】，否则反应会继续进行，产生大量非特异性扩增，影响实验结果。
- [6] ERA是一类多酶反应体系（即酶促重组等温扩增技术），若不做纯化直接跑核酸电泳，会堵塞胶孔，核酸无法跑出。

注意事项

1. 本试剂盒仅用于非医用检测；应存储于2-8 $^{\circ}$ C、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2 μ l~10 μ l。如果待检样本浓度较高，则仅需添加2 μ l，反之，则加大样本添加量，最大体积不超过10 μ l。
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。
8. 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