



025-85653525

[www.atgbiotechnology.com](http://www.atgbiotechnology.com)

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

# ATGScript<sup>®</sup> one Step RT-LAMP SYBR Green kit

M202



产品说明书  
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司  
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

## 目录 Product Manual

1. 产品简介 .....	1
2. 产品组成 .....	1
3. 储存条件 .....	1
4. 质量控制 .....	1
5. 实验流程 .....	2
6. 常见问题与解决方案 .....	3
7. 注意事项 .....	4

## 产品简介

本产品是 ATG<sup>®</sup> Bst DNA Polymerase 和 ATG<sup>®</sup> M-MLV (H<sup>-</sup>) Reverse Transcriptase (耐热型)为核心酶的 RT-LAMP 等温扩增 RNA 模板一步法检测试剂盒，可用于 SYBR<sup>®</sup> Green I 嵌合荧光法荧光定量 LAMP，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点。配合针对 SYBR<sup>®</sup> Green I 嵌合荧光法而优化的最适 Buffer，可以抑制非特异性扩增，从而显著提高扩增效率，适用于进行高灵敏度染料法 LAMP 检测反应。本产品以便捷的 Mix 提供，可在宽广的区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

## 产品组成

组 分	M202 (500 rxn)	M202 (2500 rxn)
	20 µl / reaction	
RNase free ddH <sub>2</sub> O	1.25 ml × 4	
2 × RT LAMP SYBR Reaction Mix <sup>a</sup>	1.25 ml × 4	M202 (500 rxn) × 5
RT LAMP Enzyme Mix <sup>b</sup>	125 µl × 4	

- 包含 dNTP，Mg<sup>2+</sup>和 SYBR<sup>®</sup> Green I 等。使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 仪等，需要进行孔间荧光信号校正时，ROX 添加量为终浓度 1 ×。
- 包含本公司相关产品 ATG<sup>®</sup> Bst DNA Polymerase, Large Fragment (ATG#M102)，ATG<sup>®</sup> M-MLV (H<sup>-</sup>) Reverse Transcriptase (ATG # R101)，ATG<sup>®</sup> RNasin (ATG # RR101)等。

## 储存条件

-20°C保存，于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

## 质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以国家标准 SARS-CoV-2 RNA 稀释液为模板，扩增 3 个基因，扩增曲线在批次间的产品中相近。

## 实验流程

### 1. PCR 管中配制引物混合液 primer Mix

Primer FIP (100 $\mu$ M)	16 $\mu$ l
Primer BIP (100 $\mu$ M)	16 $\mu$ l
Primer F3 (100 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Primer B3 (100 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Primer LOOP F (100 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
Primer LOOP R (100 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
RNase free ddH <sub>2</sub> O	Up to 100 $\mu$ l

### 2. qPCR 管中配置如下混合液

2 $\times$ RT LAMP SYBR Reaction Mix	10 $\mu$ l
RT LAMP Enzyme Mix	1 $\mu$ l
primer Mix <sup>a</sup>	1 $\mu$ l
Template RNA <sup>b</sup>	X $\mu$ l
RNase free ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu$ l

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- 一般来说该反应体系中各引物终浓度为 0.8  $\mu$ M FIP/BIP primers, 0.2  $\mu$ M LF/LB primers, 0.1  $\mu$ M F3/B3 primers。注：以上浓度为建议参考值，实际添加量按实验优化结果为准。
- qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。如模板类型为未稀释 RNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

### 3. 按照以下条件进行 RT-LAMP 反应

Stage	RT-LAMP	60-65 $^{\circ}$ C <sup>a</sup>	20-30 min <sup>b</sup>
a.	由于 RT LAMP Enzyme Mix 中使用的 ATG <sup>®</sup> M-MLV (H <sup>-</sup> ) Reverse Transcriptase (耐热型) 能够耐受 65 $^{\circ}$ C 反应温度，故可设置反应温度为 63 $^{\circ}$ C 一步反应。该程序不适用其他厂家普通型逆转录酶；		
b.	设置荧光定量 PCR 仪每 30 s 读取一次荧光信号。		

## 常见问题与解决方案

### 扩增曲线形状异常

扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生。提高模板浓度重复性实验；ROX 类型使用错误，确认所用 ROX 与机型是否匹配。

扩增曲线断裂或者下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 CT。减小基线终点（C 值-4），重新分析数据。

个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

### 反应结束无扩增曲线出现

反应时间不够：一般设置 30 min 左右，但需要注意的是扩增时间过长会增过多的背景信号，降低数据可信度。

确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能。

模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

### CT 值出现太晚

扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。

模板浓度太低：减少稀释度重读实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

RT-LAMP 产物太长：推荐 RT-LAMP 产物长度为 80-250 bp。

体系中存在 PCR 抑制剂：一般为模板带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

### 阴性对照出现明显扩增

反应体系污染：更换新的 mix、水、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配置，减少气溶胶污染。

### 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。

标准品降解：重新制备标准品，重复实验。

模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

#### 实验重复性差

加样体积失准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。

定量 PCR 仪不同的位置温度控制不一致：定期校准仪器。

模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。

## 注意事项

本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。

使用前请上下颠倒以混匀 Mix，请勿 vortex 以免产生过多气泡引起反应体系体积失准，进而影响定量结果。Mix 经混匀轻微离心后即可使用。使用过程中吹打要轻，如果操作不慎 Mix 起泡，需再次离心方可使用。

由于本品中含有荧光染料 SYBR<sup>®</sup> Green I，因此无论保存 Mix 还是配制反应体系时都应该尽量避免强光照射，建议用锡箔纸包好。

由于本品检测灵敏度极高，即使空气中微量的 RNA 气溶胶都可以引起污染，进而导致实验失败。因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液枪，避免污染。推荐使用带滤芯的枪头。