



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园 D 6 幢 710 室

ATGScript[®] one Step RT-LAMP

Basic kit

M502



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

产品简介

本产品是 ATG® Bst DNA Polymerase 和 ATG® M-MLV (H⁻) 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 RT-LAMP, 具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点。配合针对 RT-LAMP 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, 对靶基因进行准确检测, 重复性好, 可信度高, 可用于核酸胶验证。

产品组成

组 分	M502 (500 rxn)	M502 (2500 rxn)
	20 µl / reaction	
RNase free ddH ₂ O	1.25 ml × 4	
2 × RT LAMP Basic Reaction Mix ^a	1.25 ml × 4	M502 (500 rxn) × 5
RT LAMP Enzyme Mix ^b	125 µl × 4	

a. 包含 dNTP, Mg²⁺等。添加荧光染料, 如 SYBR Green I 可用 Real Time PCR 仪等进行检测。

b. 包含本公司相关产品 ATG® Bst DNA Polymerase, Large Fragment (ATG#M102), ATG® M-MLV (H⁻) Reverse Transcriptase (ATG#R101), ATG® 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, 跑胶验证。

实验流程

1. PCR 管中配制引物混合液 primer Mix

Primer FIP (100 μ M)	16 μ l
Primer BIP (100 μ M)	16 μ l
Primer F3 (100 μ M)	2 μ l
Primer B3 (100 μ M)	2 μ l
Primer LOOP F (100 μ M)	4 μ l
Primer LOOP R (100 μ M)	4 μ l
RNase free ddH ₂ O	Up to 100 μ l

2. qPCR 管中配置如下混合液

2 \times RT LAMP Basic Reaction Mix	10 μ l
RT LAMP Enzyme Mix	1 μ l
primer Mix ^a	1 μ l
Template RNA ^b	X μ l
RNase free ddH ₂ O	Up to 20 μ 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 μ M FIP/BIP primers, 0.2 μ M LF/LB primers, 0.1 μ 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。
- 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 ^a	20-30 min ^b
a.	由于 RT LAMP Enzyme Mix 中使用的 ATG [®] M-MLV (H ⁻) 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.	30min 反应结束后，进行核酸电泳验证。		

常见问题与解决方案

反应结束无扩增条带出现

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加过多的背景信号，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。

扩增产量低

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。

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。