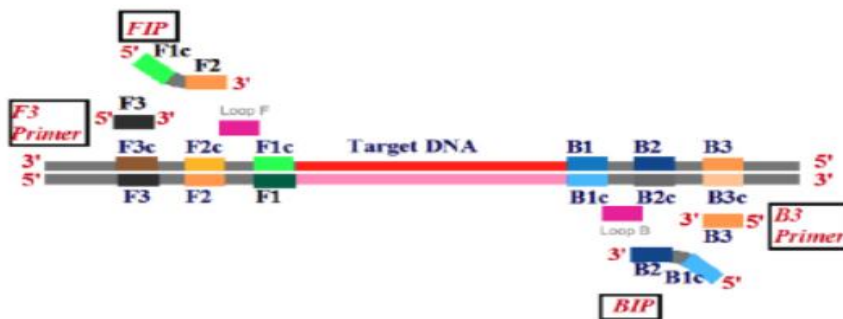


一、历史背景

2000年日本学者 Notomi 在 *Nucleic Acids Res* 杂志上公开了一种新的适用于基因诊断的恒温核酸扩增技术，即环介导等温扩增技术（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）。该法依赖于识别保守序列 DNA 的 6 个特异性片段的 4 条引物（2 条外引物和 2 条内引物）和一种链置换 DNA 聚合酶（Bst DNA polymerase）。反应体系一般包括 4 条引物、Bst DNA 聚合酶缓冲液、具有链置换特性的 Bst DNA 聚合酶、dNTP、模板 DNA、甜菜碱、Mg₂SO₄ 等。LAMP 检测体系中基因的扩增和产物的检测可一步完成，扩增效率高，可在 30~60min 扩增 10⁹~10¹⁰ 倍，特异性较高，同时反应过程中，从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg²⁺ 结合，产生副产物焦磷酸镁--乳白色沉淀。LAMP 技术的主要原理是 DNA 在 65℃ 左右可以处于动态平衡状态，DNA 在此温度下利用 4 条特异性引物依靠一种链置换 DNA 聚合酶，使链置换 DNA 的合成不停地自我循环[1]。

2002 年 Nagamine 通过增加 LoopF 和 LoopB 两条引物使得，等温扩增的速度明显加快（可在 10~15min 内完成检测），并大大提高了检测效率（高出 7 个数量级）[2]。

因此，目前 LAMP 扩增实验中以 6 条引物组合为主，分别是 F3、B3、FIP(F1c+F2)、BIP(B1c+B2)、LoopF、LoopB，灵敏度要求不高的仍然可采用无 LoopF/B 的四引物组合。



二、引物设计原则

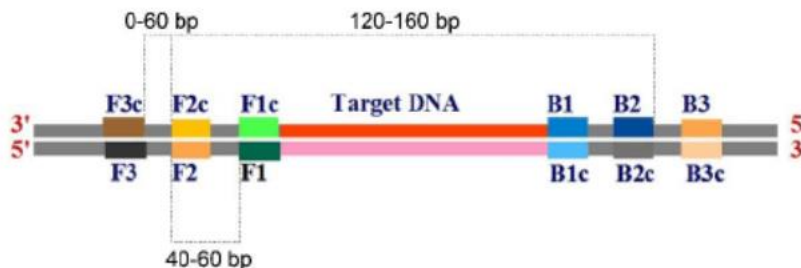
（1）TM 值要求

F1c/B1c=64~65℃； F2/B2=59~61℃； F3/B3=59~61℃； LoopF/LoopB=64~65℃。

（2）GC 含量

尽可能保证引物的 GC 含量在 40~65%。

（3）引物间距



F2 的 5' 末端到 B2 的 5' 末端约为 120~160bp； F2 的 5' 末端到 F1c 的 5' 末端约为 40~60bp； F3 的 3' 末端到 F2 的 5' 末端约为 0~60bp； LoopF 位于 F2c 的 3' 末端和 F1c 的 5' 末端之间； LoopB 位于 B1 的 3' 末端和 B2 的 5' 末端之间；

（4）引物设计软件

在线免费版本（只能设计 4 引物组合，不能设计 6 引物组合）

PrimerExplorer: <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>

本地设计软件 (可设计 6 引物组合): LAMP Designer, 我们可以免费提供 LAMP Designer 设计的引物, 如需要设计发送邮件至: order@haigene.cn, 提供的设计引物如下:

Name	Primer (5' -3')
F3	ACAGAAATGGCCTGTGAAA
B3	CATATCCAGGCTGTGTCG
FIP	TATACGTGAATGTGGCCTGTGCAGCCGAGGAAGAACTATGA
BIP	ACCAACAGTAACCAACCTCAGTGGGTGAGGAATGGGTTCCAC
LoopF	GCAATACCTTCCATGTTGCAGAC
LoopB	CTATGACCTGCTGGTGCTGATT

三、DNA 的 LAMP 扩增实验

所需材料如下, 使用四种方案中的任意一种组合都可以:

货号	名称
A3801	Bst 2.0 DNA 聚合酶
A3901	Bst 3.0 DNA/RNA 聚合酶
A3805	Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶
A3802	LAMP-HNB 变色扩增试剂盒
A3803	LAMP-浊度扩增试剂盒
A0302	dNTP Mixture (10 mM each)

典型的 LAMP 反应, 以 Bst 2.0 DNA 聚合酶为例说明

(1) 按以下组分配制 PCR 反应液

Bst 2.0 DNA Polymerase (10 U/μl)	0.25~1 μl
10×Bst Buffer	2.5 μl
100 mM MgSO ₄	1.5 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	3.5 μl
模板 DNA	10ng~1 μg
*10X Primers	2.5μl
ddH ₂ O	Up to 25 ul

*10X Primers: 16 μM FIP/BIP, 2 μM F3/B3, 4 μM LoopF/B each。

(2) 65°C 30~60min; 85°C 5min 失活。

四、RNA 的 RT-LAMP 扩增实验

所需材料如下, 使用两种方案中的任意一种组合都可以:

注意: Bst 3.0 和 Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶可直接用于 RT-LAMP 实验, 但 Bst 2.0 DNA 聚合酶或其它形式的 Bst DNA 聚合酶不能直接用于 RT-LAMP 实验。

货号	名称
A3901	Bst 3.0 DNA/RNA 聚合酶
A3805	Bst 4.0 DNA/RNA 聚合酶
A0302	dNTP Mixture (10 mM each)

典型的 RT-LAMP 反应，以 Bst 3.0 DNA/RNA 聚合酶为例说明

(1) 按以下组分配制 PCR 反应液

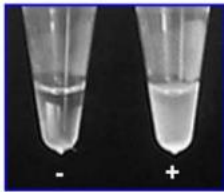
Bst 3.0 DNA/RNA Polymerase (8 U/μl)	0.25~1 μl
10×Bst Buffer	2.5 μl
100 mM MgSO ₄	1.5 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	3.5 μl
模板 RNA	1ng~1 μg
*10X Primers	2.5μl
ddH ₂ O	Up to 25 ul

*10X Primers: 16 μM FIP/BIP, 2 μM F3/B3, 4 μM LoopF/B each。

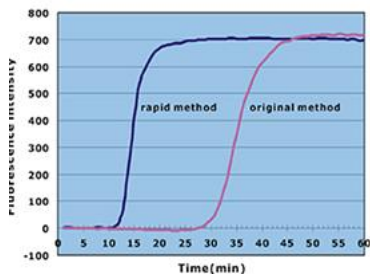
(2) 70°C 30~60min; 98°C 15min 失活。

五、检测和显色反应

(1) 肉眼观察焦磷酸镁白色沉淀法

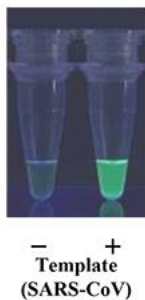


(2) SYBR Green I 荧光检测法：可配合荧光检测设备来实时检测。



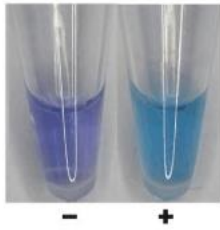
(3) 钙黄绿素法：

荧光目视检测的结果

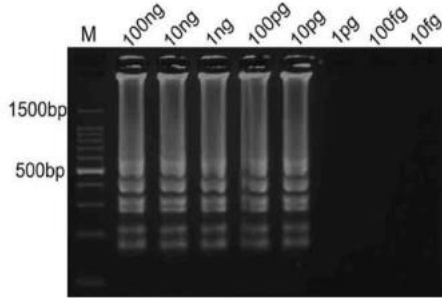


Template (SARS-CoV)

(4) 羟基萘酚蓝（HNB）法：



(5) 琼脂糖电泳检测：



参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63-e63.
- [2] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [3] Gao H, Lei Z, Jia J, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of Yersinia enterocolitica in pork meat[J]. Journal of microbiological methods, 2009, 77(2): 198-201.