

eLAMP (easy Loop-mediated isothermal amplification)由 HaiGene 测试建立, 为 HotStart Bst4.2 DNA/RNA Polymerase 系统推荐使用的方案。eLAMP 为 HaiGene 建立, 但并未做任何专利限制, 包括研究者和开发这均可畅通的去应用它。由于加入了温和的解旋因子 (Helicaser), 其可协助 FIP/BIP 形成核心“哑铃”结构。因此, 在标准 LAMP (下述简称 sLAMP) 扩增中的 F3/B3 引物可完全去除, 这将降低反应体系中的引物种类, 从而降低引物 Dimer 的形成。除此外, FIP/BIP 引物的使用浓度, 可降低到 sLAMP 的 50%, 进一步降低 Dimer 的风险。在实际测试中 eLAMP vs sLAMP 比较来看, 扩增速度、灵敏度几乎不受影响。由于 Helicaser 的最佳反应温度为 70°C, 因此必须搭配耐高温的 Bst4.2 进行反应, 推荐的反应温度为 70°C。在 60-65°C 反应时, 由于 Helicaser 的活性下降, 会导致反应速度急剧下降。

1. eLAMP 与标准 LAMP 的引物设计

eLAMP 和 sLAMP 引物, 除 F3/B3 有无区别之外, 几乎没有其它不同点。也就是 sLAMP 的引物可以平移到 eLAMP 中。仅有的一项差异需特别注意: 在 sLAMP 扩增中, 可以仅使用一条 Loop 引物 (扩增速度下降不明显), 但 eLAMP 中必须使用两条 Loop 引物, 否则扩增扩增速度会大幅下降。

引物的设计仍然可以应用现有的工具来进行分析, 包括: (1) NEB 的在线免费工具 (<https://lamp.neb.com>); (2) EIKEN 的在线免费工具 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>); (3) 付费的本地工具 (LAMP Designer)。这三种设计工具均有优点和缺点。具体的软件使用方法, 在此不做阐述, 均可参考其软件的 Manual。总得来说, NEB 和 EIKEN 设计出的引物, 通常性能良好, 但时常只能获得一条 Loop 引物, 此时需要经验上去添加另一条 Loop, 这项工作通常是需要经验的。LAMP Designer 设计的引物均包含 2 条 Loop 引物, 但此软件经常设计失败, 其设计失败的比例比较高。因此, 有时需要结合几个工具, 来组合分析设计。在设计失败时, 也可以将推荐的参数调整为放宽的参数, 此时会放宽引物的筛选条件, 从而获得引物。HaiGene 向客户提供免费的引物设计协助, 需要的可来信咨询 (info@haigene.cn)。

HaiGene 推荐的 LAMP 引物参数表(适用 eLAMP 和 sLAMP)

| | 推荐参数 | 放宽参数 |
|------------------------|-------------|-------------|
| 引物长度 | 17-20nt | 17-25nt |
| F1c/B1c/LF/LB | Tm=63°C ± 1 | Tm=65°C ± 4 |
| F3/B3/F2/B2 | Tm=58°C ± 1 | Tm=60°C ± 4 |
| F2 to B2 长度 | 120-180bp | 120-240bp |
| 环区长度 | 40-60nt | 40-75nt |
| 3'(F3/B3)到 5'(F2/B2)距离 | 0-20bp | 0-40bp |

注意: (1) 引物设计完毕后, 在 FIP/BIP 的引物中额外加入“TTTTT”碱基, 通常会增加引物的扩增效率 (不绝对), 形式为 FIP=(F1c-TTTTT-F2); BIP=(B1c-TTTTT-B2)。额外加入的碱基利于 F1/B1 的回折, 加速“哑铃”结构的形成。(2) 关于试纸条用的引物对, 目前文献给出的标记, 通常为 FIP+LB (或 BIP+LF) 组合, 但 HaiGene 推荐使用 LF+LB 组合, 其完全满足要求。标记引物的浓度可以灵活调整, 并不影响扩增速度和灵敏度。并且引物成本更低、特异性更好, 该策略可以参考使用。

2. 不同 LAMP 检测策略的比较

下述为比较流行的 LAMP 检测方案，且全部经 HaiGene 内部测试，在有限的引物组比较来看，总体结论如下，可供参考。%表示按照同指标最高水平作为 100%，该数值相对主观，经验上的比重较大，仅供排序对比参考。此外 LNA 修饰的 Molecular Beacon 探针用在 LAMP 的报道也较多，它的特异性理论上应该超过 DP-Probe，但信噪比会低于 DP-Probe，HaiGene 没有做系统测试，在此不罗列。

| | SYBR Green | DP-Probe | L-HNB | HNB | Red 变色 | OG 变色 | 试纸条 |
|-----------|------------|----------|-------|-----|--------|-------|-----|
| 检测方案 | 荧光法 | 荧光法 | 可视 | 可视 | 可视 | 可视 | 可视 |
| 速度 (%) | 100 | 95 | 90 | 80 | 90 | 100 | 100 |
| 灵敏度 (%) | 100 | 100 | 90 | 70 | 90 | 100 | 100 |
| 特异性 (%) | 80 | 100 | 90 | 90 | 90 | 80 | 90 |
| 稳定性 (%) | 100 | 100 | 90 | 80 | 90 | 100 | 100 |
| 通量 (%) | 100 | 100 | 90 | 90 | 90 | 70 | 60 |
| 家用性 (%) | - | - | 100 | 100 | 100 | 80 | 80 |
| 试剂廉价度 (%) | 100 | 95 | 90 | 90 | 90 | 70 | 50 |

3. 引物的粗筛选

无论是变色、试纸条、荧光法 LAMP 试剂的开发，前期的测试过程，HaiGene 推荐采用价格较低的液体 HotStart Bst4.2 SYBR Green 试剂（货号：A3831-02）进行粗筛选。通常筛选的引物为 3-5 组。以下以 eLAMP 为例说明。

3.1 配制 10xeLAMP Mix: FIP/BIP=8 μ M each; LF/LB=4 μ M each. 在荧光、OG 变色、试纸条的测试中，该引物浓度 95% 以上的情况下满足要求。在 L-HNB、HNB、Red 变色中可能需要增加 FIP/BIP 的浓度到 12-16 μ M each，具体以测试为准。

3.2 测试样品: 10e3、100、25、10Copies/管, NTC(16-32 重复)

2.5xBst4.2 SYBR Green Mix _____ 10 μ l

10x ePrimer Mix _____ 2.5 μ l

HotStart Bst 4.2 (8U/ μ l) _____ 1 μ l

模板 DNA/RNA _____ X μ l

ddH₂O 到总体积 _____ 25 μ l

置于 70° C 反应 45min, 1min 收集一次荧光信号。良好的引物组具有以下特性:

- (1) Ct 值: 10e3copies =5-10min; 25copies <15min; 10Copies<20min, NTC 均>40min.
- (2) 引物增加或减少 25%的情况下, Ct 值变化<2min, 表明引物容错率较高。
- (3) 酶量增加或减少 25%的情况下, Ct 值变化<2min, 表明引物容错率较高。
- (4) 检测宿主核酸 Ct>40min, 具体的核酸宿主量要根据具体情况判定。
- (5) 高度同源的近亲核酸样本、亚型核酸样本测试。在此说明一点, LAMP 对引物内的突变并不敏感, 所以亚型脱靶 (target-off) 的概率相对较小, 但这不是绝对的。在 LF/LB/F2/B2 的 3'端和 F1c/B1c 的 5'端突变, 对扩增造成的影响较大。此测试结果对于试剂的最终阈值选择至关重要。

以上实验需要反复确认, 以确保核心引物的工作效率, 否则重新筛选, 再进行后续的其他测试。

4. 关于成品试剂的冻干

为了满足用户制备冻干 LAMP 试剂的需求，HaiGene 提供了丰富的产品，不仅能满足专业的冻干人员全程自行制备冻干试剂，还提供了半成品液体试剂供自行冻干。除此外，HaiGene 还提供含引物全体系冻干品的订制服务，任何关于 LAMP 产品冻干的问题，HaiGene 承诺“Buckets Stop Here”！



HotStart Bst4.2 Polymerase(A3831-00)

该制品不含甘油，适合于专业人员，全程制备冻干品



HotStart Bst 4.2 Basic Mix (A3831-01)

HotStart Bst 4.2 SYBR Green Mix (A3831-02)

该制品含冻干赋形剂，在加入引物后可直接冻干



Oligo Lyophilized Solution (A3831-20) 为引物快速冻干赋形剂，可方便的进行引物冻干。冻干后的引物可加入HaiGene成品冻干球，制备成全体系冻干品。

HaiGene提供Basic、SYBR Green、L-HNB、Red、HNB等冻干球