



تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه: روش تشخیص سریع و کم هزینه عوامل عفونی

اعظم عسکری^۱، محمد کارگر*^۲، صادق قربانی دالینی^۳، عباس دوستی^۴

^۱کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی،
^۲کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان، ^۳استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

روش تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه (LAMP) مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک در دمای ثابت $62-65^{\circ}\text{C}$ است. در این روش بدون نیاز به مرحله واسرشت شدن حرارتی، به کمک آنزیم DNA پلی مرز *Bst* به صورت هم‌زمان امکان جداسازی دو رشته DNA و تکثیر وجود دارد. بنابراین بر خلاف سایر روش‌های متداول تکثیری، بدون نیاز به چرخه‌های دمایی و دستگاه ترموسایکلر و با استفاده از تجهیزات ارزان قیمتی مانند حمام آب گرم و یا بلوک حرارتی قابل انجام است. برای طراحی واکنش LAMP نیاز به ۶ عدد پرایمر وجود دارد که توانایی اتصال کاملاً اختصاصی به ۸ ناحیه مجزا از توالی هدف را داشته باشند. در نتیجه واکنش LAMP مقدار بسیار زیادی محصول ایجاد می‌شود که بدون نیاز به روش پر زحمت الکتروفورز در ژل، به کمک روش‌های ساده‌تری مانند مشاهده کدورت و یا تغییر رنگ ناشی از رنگ‌های فلورسنس در مخلوط واکنش به سادگی قابل تشخیص می‌باشد. بدین ترتیب روش LAMP با توجه به مزایایی مانند حساسیت و ویژگی مناسب، کارایی بالا، عدم نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی گران قیمت و سادگی تشخیص، می‌تواند به عنوان ابزاری ارزشمند برای تشخیص سریع بیماری‌های عفونی در آزمایشگاه‌های کلینیکی و بیمارستانی به ویژه در کشورهای در حال توسعه به کار برده شود. این مقاله با هدف معرفی مبانی و کاربردهای روش LAMP در تشخیص عوامل عفونی تدوین گردیده است.

واژگان کلیدی: LAMP، طراحی پرایمر، بهینه سازی

دریافت مقاله: فروردین ۱۳۹۱ پذیرش برای چاپ: خرداد ۱۳۹۱

مقدمه

بیوشیمیایی و سرولوژی جایگزین شدند. در حال حاضر، روش‌های سرولوژی متداول‌ترین و ساده‌ترین راه تشخیص بیماری‌های عفونی می‌باشند. اما با وجود استفاده گسترده، حساسیت بالایی ندارند و واکنش مثبت کاذب در آن‌ها بارها گزارش شده است. علاوه بر این، با توجه به این‌که تولید آنتی‌بادی (Ab) ضد عامل عفونت‌زا در اغلب موارد چندین هفته به طول می‌انجامد، بنابراین تست‌های سرولوژی در مراحل اولیه بیماری مثبت نخواهند شد (۱). یک سیستم ایده آل برای

یکی از مهم‌ترین موفقیت‌های علمی بشر در قرن گذشته، توانایی جداسازی و تشخیص میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، با استفاده از محیط کشت‌های مصنوعی و کشت سلولی بوده است که به دلیل نیاز به مراحل طولانی برای جداسازی و مشکلات مربوط به تفسیر نتایج، به تدریج توسط روش‌های

*آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳، پست الکترونیک: makrgar@jia.ac.ir

به پرسنل ماهر دارد. اخیراً نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی در این روش، بین ۴ تا ۳۱٪ گزارش شده است (۱۲). روش real-time PCR از لحاظ کاهش احتمال آلودگی، سرعت، ویژگی، اندازه‌گیری کمی و استاندارد سازی آسان، نسبت به PCR معمولی برتری دارد. اما به دلیل این که برای تکثیر توالی هدف نیازمند کیت و تجهیزات گران قیمت از قبیل نور سنج‌هایی برای ساطع کردن و جمع‌آوری نور، کامپیوتر و نرم‌افزار برای آنالیز داده‌ها است، به عنوان یک ابزار تشخیصی متداول در آزمایشگاه‌های خصوصی و کلینیکی از آن استفاده نمی‌شود (۱۱ و ۱۳). به طور کلی، با وجود سرعت، ویژگی و حساسیت بالای روش‌های PCR، به دلیل نیاز به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر برای تکثیر و الکتروفورز در ژل برای تشخیص محصولات، در بسیاری از مراکز تشخیصی قابل استفاده نخواهند بود. بنابراین برای تکمیل سیستم‌های مبتنی بر PCR توسعه روش‌های ساده، ارزان و حساس‌تر ضروری به نظر می‌رسد. در سال ۲۰۰۰ نوتومی (Notomi) و همکاران یک روش مبتنی بر تشخیص اسید نوکلئیک، به نام روش تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه (Loop-mediated isothermal Amplification) یا LAMP را گزارش کردند. در این روش اسید نوکلئیک هدف توسط آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst* و ۶ عدد پرایمر اختصاصی که ۸ ناحیه مجزا در توالی هدف را تشخیص می‌دهند، تکثیر می‌شود. آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst* علاوه بر تکثیر، قادر است دو رشته DNA را از یکدیگر جدا کند. به عبارتی دیگر در این روش، DNA بدون نیاز به چرخه‌های دمایی به صورت خود چرخه‌ای (self-cycling) تکثیر می‌شود (۱۴). بنابراین روش LAMP نیاز به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر ندارد و به راحتی توسط حمام آب یا بلوک حرارتی منظم فراهم کننده دمای یکنواخت ۶۵-۶۲°C (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst*) انجام می‌گیرد. در واقع مهم‌ترین مزیت روش LAMP از دیدگاه کشورهای در حال توسعه با منابع مالی محدود، کم‌تر بودن هزینه ابزارهای لازم برای تکثیر است. ساختار ویژه پرایمرهای LAMP و زیاد بودن تعداد آن‌ها علاوه بر افزایش ویژگی واکنش، نقاط آغازین (

تشخیص بیماری‌های عفونی باید بتواند طیف وسیعی از عوامل میکروبی را در تمام مراحل بیماری با سرعت، حساسیت و ویژگی بالا تشخیص دهد و در اکثر مراکز تشخیصی به سادگی قابل انجام باشد. امروزه روش‌های مولکولی مانند هیبریدسازی در محل (*in situ Hybridization*) و روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک برای تشخیص عوامل عفونت‌زا نیز توسعه بسیاری پیدا کرده‌اند. روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک مانند PCR (۲) و NASBA (۳) (nucleic acid sequence based amplification)، 3SR (self-sustained sequence replication) (۴) و SDA (۵) (strand displacement amplification) (۶) با ارزش‌ترین روش‌ها در تمام زمینه‌های علمی از قبیل پزشکی کلینیکی و آزمایشات تشخیصی و ژنتیکی می‌باشند (۷). روش‌های NASBA و 3SR حساسیت بسیار بالایی دارند و قادرند کم‌تر از ۱۰ نسخه در میلی‌لیتر اسید نوکلئیک هدف را در کم‌تر از یک ساعت تکثیر کنند (۸). اما به دلیل کم بودن ویژگی‌شان در انتخاب توالی هدف، نیازمند ابزار دقیق برای تکثیر و روش‌های پیچیده برای تشخیص محصولات می‌باشند. روش SDA با استفاده از ۴ پرایمر و شرایط هم‌دمایی، ویژگی بیشتری دارد. اما به دلیل هضم DNA غیرهدف و نیاز به استفاده از نوکلئوتیدهای تغییر یافته گران قیمت، کاربرد تشخیصی ندارد (۹ و ۱۰). در بین روش‌های تشخیصی مولکولی، انواع روش‌های مختلف PCR مانند رونوشت برداری معکوس (RT-PCR)، آشیانه‌ای (nested-PCR)، چندگانه (Multiplex PCR) و زمان واقعی (real-time PCR) بیشترین موارد استفاده را دارند. حد تشخیص روش‌های PCR معمولی، کم‌تر از ۵۰ تا ۱۰۰ نسخه در هر میلی‌لیتر نمونه است (۱۱). برای افزایش حساسیت PCR معمولی، روش nested-PCR نیز توسعه پیدا کرده است. روش یاد شده به دلیل استفاده از پرایمرهای بیشتر، ویژگی بسیار بالایی برای تکثیر ژن فراهم می‌کند، اما به دلیل انجام این روش در دو مرحله، احتمال آلودگی محصولات در هنگام انتقال از مرحله اول PCR به مرحله دوم، پاسخ مثبت کاذب را به دنبال دارد. از این‌رو برای جلوگیری از ایجاد هر گونه آلودگی احتمالی نیاز

مروری، چگونگی طراحی پرایمرها، روش انجام، بهینه سازی، حساسیت و ویژگی و کاربردهای روش LAMP برای تشخیص عوامل عفونی مورد بحث قرار گرفته است.

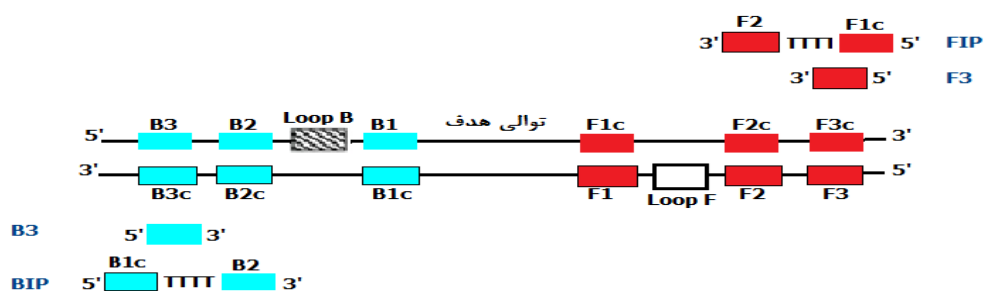
طراحی پرایمرهای LAMP

موفقیت واکنش LAMP در درجه اول بستگی به اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده دارد. به دلیل این که طراحی ۶ پرایمر نیاز به ۸ توالی مجزا کاملاً حفاظت شده در DNA هدف دارد، بنابراین کاری بسیار پیچیده و حساس می‌باشد. اما در صورت طراحی دقیق پرایمرها، توالی هدف با ویژگی بسیار بالا تکثیر خواهد شد. ناحیه هدف برای طراحی پرایمرهای LAMP را

می‌توان با کمک نرم افزار برخط primer explorer (<http://primerexplorer.Venus.netlaboratory.com>, Japan, Net laboratory) (۱۵) و یا با استفاده از نرم افزارهایی مانند MEGA4 به صورت دستی طراحی کرد. واکنش LAMP در اصل توسط ۴ عدد پرایمر انجام می‌گیرد که به دلیل داشتن ساختار ویژه قادرند ۶ ناحیه مجزا در توالی هدف را تشخیص دهند. این پرایمرها شامل دو پرایمر داخلی به نام FIP (Forward Inner Primer) و BIP (Backward inner primer) و دو پرایمر خارجی به نام F3 (Forward) و B3 (Backward) می‌باشند. ساختارهای ساقه -

حلقه DNA، بخش‌های اصلی مراحل چرخه‌ای واکنش LAMP می‌باشند و نقش اصلی در تشکیل این حلقه‌ها بر عهده پرایمرهای داخلی است. بدین ترتیب هر کدام از آنها باید دارای دو ناحیه مجزا باشند. پرایمر FIP از سه بخش، توالی مکمل F1 (F1c)، رابط T-T-T-T و F2 تشکیل شده است. پرایمر BIP نیز متشکل از توالی B1، رابط T-T-T-T و توالی مکمل B2 (B2c) می‌باشد. رابط T-T-T-T به صورت یک لولا عمل کرده و در تشکیل حلقه و پدیده خود-پرایمری (self-priming) دخالت دارد. پرایمرهای F3 و B3 به ترتیب خارج از نواحی F2 و B2 طراحی می‌شوند و در مراحل اولیه واکنش به آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst* در خارج سازی رشته کمک می‌کنند (۱۴، ۱۵ و ۲۵). ناگامین (Nagamin) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که با اضافه کردن دو پرایمر دیگر به نام پرایمرهای

(priming) بیشتری را برای DNA پلی‌مراز فراهم می‌کند و منجر به افزایش راندمان و سرعت تکثیر می‌شود. به این ترتیب DNA هدف در مدت ۹۰-۱۵ دقیقه 10^9-10^{10} برابر ازدیاد می‌یابد و مقدار بسیار زیادی محصول تولید می‌شود (۱۶-۱۴). به منظور تشخیص محصولات LAMP می‌توان همانند PCR از روش الکتروفورز در ژل استفاده کرد. اما به دلیل تولید مقدار زیادتری محصول واکنش LAMP نسبت به PCR، می‌توان با استفاده از رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA و یا از طریق انباشته شدن محصولات جانبی، نتایج تکثیر را به ترتیب به صورت تغییر رنگ یا ایجاد کدورت در میکروتیوب حاوی محصولات به راحتی مشاهده کرد (۱۷ و ۱۸). بنابراین برای بررسی نتایج واکنش LAMP نیاز به روش پر زحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطان‌زای اتیدیوم بروماید وجود ندارد. علاوه بر این، با اندازه‌گیری تغییر در کدورت توسط کدورت سنج و رسم منحنی استاندارد می‌توان میزان محصولات و تعداد نسخه‌های ژن را به صورت کمی با روش *real-time* اندازه‌گیری کرد (۱۹). یکی دیگر از مزایای مهم واکنش LAMP این است که کم‌تر از واکنش PCR تحت تاثیر مهار کننده‌های موجود در نمونه‌های کلینیکی قرار می‌گیرد. بنابراین برخلاف PCR لزوماً نیازی به استخراج اسید نوکلئیک هدف وجود ندارد و مستقیماً بر روی نمونه‌های کلینیکی (با حساسیت کم‌تر) قابل انجام است (۲۰-۲۲). از دیگر ویژگی‌های مهم این روش، ادغام آن با روش رونوشت برداری معکوس (Reverse Transcription-LAMP) است. بدین ترتیب، در صورتی که اسید نوکلئیک هدف RNA باشد، با افزودن آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) به مخلوط واکنش، RNA به عنوان الگو تکثیر شده و با حذف مرحله اضافی *cDNA* سازی باعث صرفه جویی در هزینه و زمان می‌شود (۲۳ و ۲۴). روش LAMP تا کنون برای تشخیص انواع مختلفی از عفونت‌های میکروبی توسعه پیدا کرده است. به طور کلی، روش LAMP با در نظر گرفتن مزایایی مانند سادگی، سرعت تکثیر زیاد و تشخیص آسان، کاربردهای بالقوه‌ای را برای تشخیص کلینیکی و پایش بیماری‌های عفونی در کشورهای در حال توسعه می‌تواند داشته باشد. در این مقاله

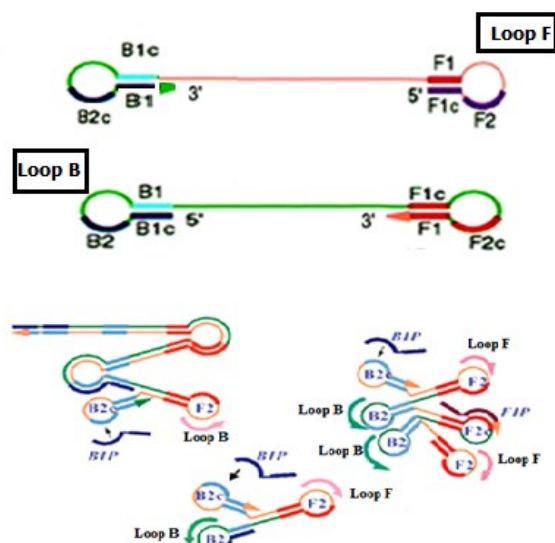


شکل ۱: موقعیت و ترتیب قرارگیری پرایمرهای LAMP بر روی توالی هدف.

نقطه آغازین) مورد هدف پرایمرها (FIP و BIP) قرار می‌گیرد. به عبارت دیگر، سنتز از دو نقطه آغاز می‌گردد. اما در واکنش LAMP سریع، هر ۶ حلقه تک رشته‌ای توسط پرایمرهای داخلی و پرایمرهای حلقه مورد هدف قرار می‌گیرند. از این رو زمان مورد نیاز برای واکنش LAMP سریع، یک سوم تا یک دوم زمان مورد نیاز برای واکنش LAMP عادی است (۲۶).

در طراحی پرایمرهای LAMP چهار عامل اساسی، دمای ذوب یا T_m (Melting temperature)، درصد GC، پایداری انتهای پرایمرها و ساختار ثانویه بایستی مورد توجه قرار گیرند. حرارت T_m برای نواحی F1c و B1c باید حدود 65°C (بین $61-69$) باشد. به عبارتی دیگر، برای اطمینان از ایجاد ساختارهای ساقه-حلقه، مقادیر T_m برای F1c و B1c باید کمی بالاتر از F2 و B2 باشد. علاوه بر این، برای اطمینان از این‌که پرایمرهای داخلی زودتر از پرایمرهای خارجی به توالی هدف متصل شوند، مقادیر T_m پرایمرهای خارجی باید کم‌تر از پرایمرهای داخلی باشد. محتوای GC پرایمرهای LAMP باید بین ۴۰ تا ۶۵ درصد باشد. به ویژه پرایمرهای داخلی باید طوری طراحی شوند که توالی پایانه ۳' آنها نباید غنی از AT و یا مکمل پرایمرهای دیگر باشد. طراحی پایانه ۳' پرایمرهای F3/B3، F2/B2، F1c/B1c و پایانه ۵' پرایمرهای F1c/B1c باید به شکلی باشد که انرژی آزاد (dG) آنها کوچک‌تر یا مساوی با ۴- کیلو کالری بر مول باشد (۹). فاصله بین انتهای ۵' نواحی F2 و B2 (ناحیه‌ای که به وسیله روش LAMP تکثیر می‌شود) بایستی بین ۱۸۰-۱۲۰ جفت باز در نظر گرفته شود. همچنین فاصله بین

حلقه (Loop)، توالی هدف سریع‌تر و با ویژگی بسیار بالاتری تکثیر خواهد شد. این پرایمرها به حلقه‌های تک رشته‌ای موجود در ساختارهای ساقه-حلقه ایجاد شده در مراحل مختلف واکنش LAMP تشکیل می‌شوند متصل شده و با ایجاد مناطق آغازین بیشتر برای DNA پلی‌مراز، سرعت تکثیر توالی هدف را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهند. پرایمرهای حلقه برای اتصال به نواحی بین F1 و F2 و B1 و B2 طراحی می‌گردد و به ترتیب Loop B و Loop F نامیده می‌شوند (شکل ۱). بنابراین بر اساس استفاده از پرایمرهای حلقه دو نوع واکنش LAMP می‌تواند وجود داشته باشد. در واکنش LAMP اصلی، تنها از ۴ پرایمر و در LAMP سریع علاوه بر پرایمرهای اصلی از پرایمرهای حلقه نیز استفاده می‌شود. به عنوان مثال با توجه به شکل ۲ در واکنش LAMP اصلی تنها دو عدد از حلقه‌ها (دو



شکل ۲: محل اتصال پرایمرهای حلقه و تأثیر آن بر روی مکان‌های آغازین.

می‌شود (ساختار ۱). سپس پرایمر F3 به توالی هدف متصل می‌شود و آنزیم *Bst*، هم‌چنان که از انتهای ۳' پرایمر F3 سنتز را آغاز می‌کند از طرف دیگر رشته تازه سنتز شده متصل به FIP را از رشته الگو جدا می‌کند (ساختار ۲). در نتیجه، رشته تازه سنتز شده متصل به F3 و رشته الگو یک DNA دو رشته‌ای را تشکیل می‌دهند (ساختار ۳) و رشته تازه سنتز شده متصل به FIP به صورت تک رشته رها می‌شود. به دلیل مکمل بودن نواحی F1 و F1c در پایانه ۵'، یک حلقه تک رشته‌ای تشکیل می‌شود (ساختار ۴). سپس این ساختار ساقه-حلقه به عنوان الگویی برای آغاز سنتز توسط پرایمرهای داخلی و خارجی بعدی عمل می‌کند. با اتصال پرایمر BIP به ساختار ساقه-حلقه، ساخت رشته مکمل از پایانه ۳' آغاز می‌شود و با حرکت رو به جلوی آنزیم، حلقه پایانه ۵' را باز می‌کند. سپس پرایمر B3 به توالی هدف می‌چسبد و مانند مرحله یاد شده با رشته الگو تشکیل یک DNA دو رشته‌ای را می‌دهد (ساختار ۵). از طرف دیگر رشته مکمل متصل به BIP به صورت تک رشته‌ای جدا می‌شود. در نهایت به دلیل وجود نواحی مکمل در پایانه‌های ۳' و ۵'، ساختار دمبلی شکلی تشکیل می‌شود (ساختار ۶). این ساختار آغازکننده مرحله چرخه‌ای تکثیر LAMP می‌باشد (شکل ۳-الف).

ب) مرحله چرخه‌ای: در این مرحله پرایمرهای خارجی دخالتی ندارند و تنها از پرایمرهای داخلی و در صورت نیاز از پرایمرهای حلقه استفاده می‌شود. پایانه آزاد ۳' در ساختار دمبلی شکل (فلش نشان داده شده در ساختار ۶) به عنوان پرایمر عمل کرده و سنتز DNA جدید را خود به خود آغاز می‌کند (خود آغازگری یا Self-priming). بدین ترتیب ساختار دمبلی شکل تبدیل به ساختار ساقه-حلقه می‌شود (ساختار ۷). سپس با اتصال پرایمر FIP به حلقه تک رشته‌ای و گسترش رشته از پایانه ۳'، رشته ساخته شده در مرحله خود-آغازگری از رشته الگو جدا می‌شود. اما پایانه ۵' آن به ناحیه F1c پرایمر FIP می‌چسبد و به صورت یک دنباله متصل به DNA الگو باقی می‌ماند. در نتیجه ساختار ساقه-حلقه متشکل از یک ساقه-حلقه دو رشته‌ای و یک ساقه-حلقه تک رشته‌ای تشکیل می‌گردد.

محل اتصال پرایمرها نیز اهمیت ویژه‌ای دارد. فاصله‌های بین F2 و F3 و همچنین B2 و B3 باید بین ۲۰-۰ جفت باز باشد. از طرفی فاصله پایانه ۵' ناحیه F2 تا ۳' ناحیه F1 و همچنین پایانه ۵' ناحیه B2 تا ۳' ناحیه B1 (ناحیه تشکیل حلقه) بایستی بین ۶۰-۴۰ جفت باز در نظر گرفته شود. از طرف دیگر، غلظت پرایمرهای داخلی باید بیشتر از پرایمرهای خارجی باشد. در مطالعات مختلف غلظت پرایمرهای داخلی ۸ برابر پرایمرهای خارجی و ۴ برابر پرایمرهای حلقه (۴ : ۸ : ۱) در نظر گرفته شده است (۱۴ و ۱۵).

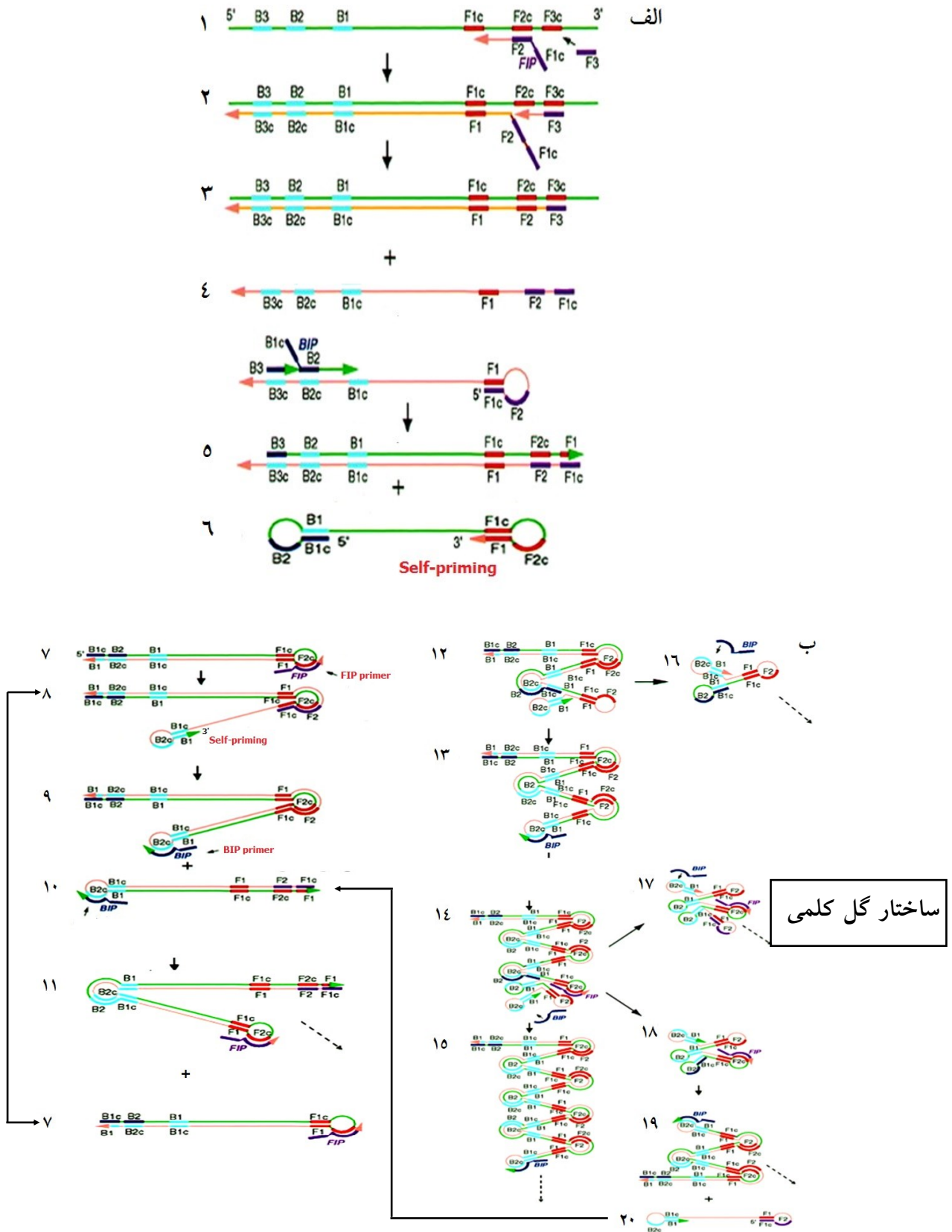
ویژگی‌های آنزیم *Bst* پلی‌مراز DNA

آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst* محصول ژن تغییر یافته آنزیم DNA پلی‌مراز باکتری *Basilus pasteurii* است (فاقد دومین ۵' به ۳' اگزونوکلئازی) با وزن مولکولی ۶۷ کیلو دالتون می‌باشد. این آنزیم دارای فعالیت پلی‌مرازی ۵' به ۳' و اگزونوکلئازی ۳' به ۵' است. همچنین هم‌زمان با پلی‌مریزاسیون، توانایی جداسازی دو رشته DNA و سنتز خود-چرخه‌ای DNA را دارد (۲۷). فعالیت بهینه آنزیم در دمای ثابت ۶۵-۶۰°C به ویژه ۶۳°C است. اما با توجه به غیرفعال شدن آن در دمای بالاتر از ۷۰°C، از آن نمی‌توان به منظور PCR و توالی‌یابی با چرخه‌های دمایی استفاده کرد. اما برای تکثیر هم‌دمایی DNA به ویژه تکثیر نواحی دشوار مانند توالی‌های تکرار شونده، نواحی غنی از GC و ساختارهای ثانویه مناسب است (۲۸ و ۲۹).

مکانسیم واکنش LAMP

واکنش LAMP شامل دو مرحله غیرچرخه‌ای، تشکیل ساختار دو حلقه‌ای (دمبلی شکل) شروع کننده چرخه تکثیر LAMP و مرحله چرخه‌ای، تکثیر توالی هدف می‌باشد.

الف) مرحله غیرچرخه‌ای: زمانی که DNA دو رشته‌ای در دمای حدود ۶۵-۶۲°C قرار می‌گیرد یکی از پرایمرهای داخلی (مثلاً پرایمر FIP) واکنش را آغاز می‌کند. بدین ترتیب که ابتدا قسمت F2 پرایمر FIP به توالی هدف متصل شده و از انتهای ۳' آن، ساخت رشته مکمل توسط آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst* آغاز



شکل ۳: مراحل مختلف واکنش LAMP. الف) مرحله غیر چرخه‌ای (۱ تا ۶). ب) مرحله چرخه‌ای (۶ تا ۲۰).

بهبود سازی واکنش LAMP

یکی از عوامل محدود کننده سرعت واکنش LAMP اندازه DNA هدف است. با توجه به همگام شدن سنتز DNA با خارج سازی رشته، اندازه DNA هدف تأثیر بسیار مهمی بر بازده تکثیر دارد. بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده که DNA حاوی ۲۰۰-۱۳۰ جفت باز بهترین نتیجه را در واکنش LAMP به دنبال دارد.

نقش اصلی در مراحل چرخه‌ای LAMP بر عهده ساختارهای ساقه حلقه می‌باشد. نوتومی و همکاران اثر اندازه‌های مختلف حلقه‌های تشکیل شده بین F2c (B2c) و F1c (B1c) را بر روی راندمان تکثیر بررسی کردند و دریافتند که حلقه حاوی ۴۰ باز یا بیشتر بهترین نتیجه را نشان می‌دهد (۱۴ و ۱۵).

مواد شیمیایی ناپایدار کننده ماریپیچ DNA مانند بتائین (N,N,N) تری متیل گلیسین) یا L پرولین موجب کاهش انباشتگی بازها و جلوگیری از تکثیر توالی‌های نامربوط می‌شوند. به این ترتیب توالی هدف بهتر انتخاب می‌شود و در نواحی غنی از GC ساختارهای ثانویه کم‌تری به وجود می‌آید. غلظت‌های بالاتر بتائین نیاز به واسرشت شدن حرارتی را بر طرف می‌سازد و به طور چشمگیری سرعت و راندمان تکثیر را افزایش می‌دهد (۳۲-۳۰).

ارزیابی محصولات LAMP

برای تأیید محصولات واکنش LAMP نیز می‌توان همانند PCR معمولی از روش الکتروفورز در ژل آگارز، استفاده کرد. اما با توجه به تولید میزان بسیار زیاد DNA در واکنش LAMP، بنابراین، می‌توان بدون نیاز به ابزار خاصی به راحتی نتایج حاصل را در مخلوط واکنش مشاهده کرد. به طور کلی از روش‌های زیر می‌توان برای ارزیابی محصولات LAMP استفاده نمود.

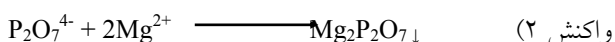
الف) الکتروفورز در ژل آگارز: یکی از متداول‌ترین روش‌های تأیید محصولات واکنش LAMP الکتروفورز در ژل آگارز (۲-۳٪) رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و مشاهده در زیر نور UV (Ultra Violet) می‌باشد. به دلیل اندازه‌های مختلف محصولات واکنش LAMP، در نتیجه یک الگوی نردبانی همانند سایز مارکر (DNA size maker) بر روی ژل ایجاد می‌گردد. در نتیجه

ساقه تک رشته‌ای در واقع یک نسخه معکوس از توالی هدف است (ساختار ۸). به طور کلی در هر کدام از مراحل چرخه‌ای واکنش LAMP با اتصال پرایمرهای داخلی به حلقه‌های تک رشته‌ای و همچنین ادامه پدیده خود-آغازگری، در اواسط هر مرحله توالی هدف ۳ برابر تکثیر می‌یابد. اما در مخلوط واکنش، گذشته از پرایمرهای اصلی از پرایمرهای حلقه نیز استفاده می‌شود. این پرایمرها به نواحی مکمل خود بر روی حلقه‌های تک رشته‌ای متصل و در نتیجه سرعت تکثیر چند برابر می‌گردد. در ادامه با پیشرفت واکنش LAMP محصولات بزرگتر با ساقه-حلقه‌های بیشتری تشکیل می‌شود. به طوری که توالی هدف و معکوس آن به طور متناوب در طول این ساختارها تکرار می‌شوند. محصولات نهایی شامل مخلوطی از DNA های ساقه-حلقه با ساقه‌هایی در اندازه‌های متفاوت و ساختارهای گل کلمی (حاوی حلقه‌های متعدد) می‌باشد (شکل ۳-ب) (۱۴ و ۱۵).

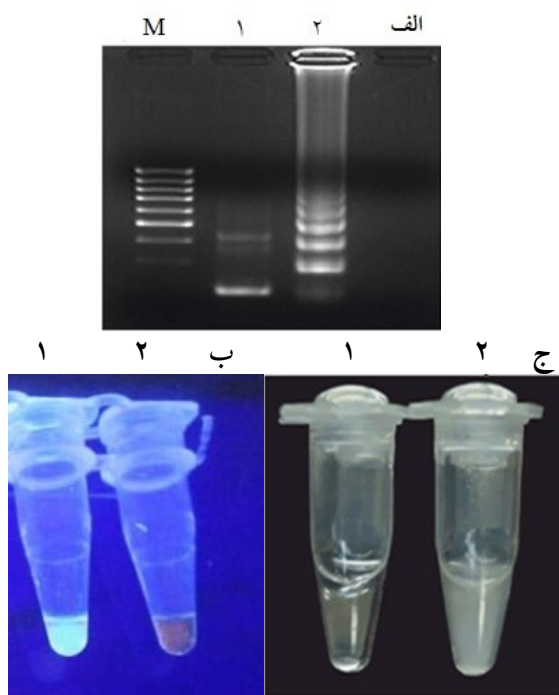
روش انجام واکنش LAMP

معمولاً مخلوط واکنش LAMP در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر Thermopol (حاوی مقادیر مشخصی از KCl ، $MgSO_4$ ، $(NH_4)_2SO_4$ و Tris-HCl با pH ۸/۸)، بتائین، مخلوطی از نوکلئوتیدها (dNTPs)، پرایمرهای داخلی، خارجی و پرایمرهای حلقه به نسبت ۴:۱:۸، DNA الگو و آب مقطر استریل انجام می‌گیرد. ابتدا مخلوط یاد شده در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه به منظور جدا شدن دو رشته DNA حرارت داده می‌شود. پس از خنک کردن توسط کیسه یخ، آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst*، به آن اضافه می‌گردد. سپس به منظور تکثیر مخلوط واکنش به مدت ۶۰-۱۵ دقیقه در دمای $65-62^{\circ}C$ در بلوک حرارتی یا حمام آب قرار داده می‌شود. در نهایت به منظور خاتمه واکنش و غیرفعال کردن آنزیم DNA پلی‌مراز *Bst*، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $80^{\circ}C$ نگهداری می‌گردد (۱۶-۱۴). در صورتی که ژنوم مورد بررسی RNA باشد، با افزودن آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) به مخلوط واکنش و تبدیل RNA الگو به cDNA، مراحل واکنش LAMP انجام می‌گیرد (۱۵، ۲۳ و ۲۴).

ژن هدف (نتیجه مثبت) است. کلسئین در صورت ترکیب با یون‌های منیزیم فلورسنس شدیدتری ساطع می‌کند. کلسئین بر خلاف سایبر گرین قبل از شروع تکثیر به مخلوط اضافه می‌شود. از این‌رو، امکان آلودگی محصولات واکنش پس از تکثیر وجود نخواهد داشت (۱۲، ۱۵، ۴۱ و ۴۲).



ج) تشخیص مشاهده‌ای به کمک کدورت: مورای (Mori) در سال ۲۰۰۱ نشان داد که به موازات تولید محصولات اصلی (DNA) در واکنش LAMP، مقدار بسیار زیادی از محصولات جانبی مانند پیروفسفات نیز ایجاد می‌شود که همراه با یون منیزیم موجود در مخلوط، رسوب سفید رنگ پیروفسفات منیزیم را به وجود می‌آورد (واکنش ۱ و ۲). از این‌رو در پایان مخلوط واکنش کدر می‌شود (شکل ۴-ج). هر چه میزان



شکل ۴: ارزیابی محصولات واکنش LAMP (الف) الکتروفورز محصولات LAMP: M: سایز مارکر، ۱: محصول PCR و ۲: الگوی نردبانی واکنش LAMP (ب) تشخیص با استفاده از سایبر گرین در زیر نور UV. ۱: نمونه مثبت و ۲: نمونه منفی. (ج) تشخیص به کمک کدورت ناشی از انباشتگی رسوب سفید رنگ پیروفسفات منیزیم. ۱: نمونه منفی و ۲: نمونه مثبت.

باندها از کوتاه‌ترین طول DNA تا نزدیک به چاهک کشیده می‌شوند (شکل ۴-الف) (۱۶-۱۴).

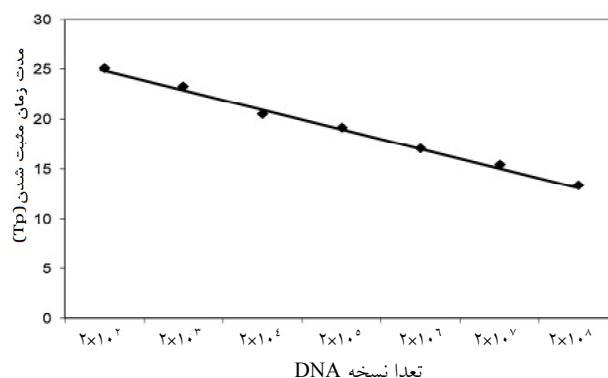
ب) تشخیص مشاهده‌ای به کمک فلورسنس: حضور محصولات تکثیر LAMP را می‌توان با اضافه کردن رنگ‌های فلورسنسی مانند سایبر گرین (SYBR Green)، کلسئین (Calcein)، پیکوگرین (Picogreen) و غیره مستقیماً در لوله حاوی مخلوط واکنش مشاهده کرد. سایبر گرین میل ترکیبی بسیار زیادی به DNA دو رشته‌ای دارد و پس از برانگیخته شدن رنگ فلورسنس، نور سبز ساطع می‌کند (۳۳ و ۳۴). پس از خاتمه تکثیر، با افزودن محلول رقیق شده سایبر گرین به مخلوط واکنش LAMP می‌توان نتایج را بر اساس تغییر رنگ مورد بررسی قرار داد. در صورت وجود داشتن ژن هدف، به دلیل انباشتگی محصولات فراوان و اتصال سایبر گرین رنگ سبز (نتیجه مثبت) ایجاد می‌شود. شدت فلورسنس با استفاده از نور UV افزایش می‌یابد. از این‌رو می‌توان نمونه‌های مثبت را به صورت فلورسنس سبز درخشان مشاهده کرد (شکل ۵). اما تغییر نکردن رنگ، بیانگر وجود نداشتن ژن هدف و محصولات تکثیری (نتیجه منفی) می‌باشد (شکل ۴-ب) (۴۰-۳۵). با استفاده از این روش، محصولات واکنش LAMP بدون نیاز به روش پر زحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطان‌زای اتیدیوم بروماید، با هزینه کم‌تر به راحتی قابل تشخیص خواهند بود. سایبر گرین میل ترکیبی زیادی به DNA دارد و تغییر رنگ در روش LAMP شدید بوده و به راحتی قابل تشخیص است. اما در PCR این گونه نیست. زیرا در واکنش LAMP مقدار تولید محصولات نسبت به PCR بیشتر (بیشتر از ۱۰ μg در واکنش LAMP در مقایسه با ۰/۲ μg در PCR) است.

روش دیگر اضافه کردن کلسئین به مخلوط واکنش LAMP قبل از شروع تکثیر می‌باشد. کلسئین یک نوع رنگ فلورسنس است که تا قبل از شروع تکثیر به دلیل ترکیب شدن با یون‌های منگنز خاموش است. پس از تکثیر، محصولات جانبی مانند پیروفسفات تشکیل می‌شود. پیروفسفات یون‌های منگنز را از کلسئین جدا کرده و به دلیل رها شدن کلسئین، نور فلورسنس ساطع می‌گردد. بنابراین، ایجاد فلورسنس نشان دهنده حضور

واکنش LAMP اضافه کرد. بدین ترتیب به راحتی نسخه‌های ازدیاد یافته بدون استفاده از منبع گران قیمت نور یا آشکارگر قابل مشاهده خواهد بود. زیرا PEI به دلیل داشتن وزن مولکولی بسیار پایین، نمی‌تواند با پلی‌مرهای آنیونی تک رشته‌ای دارای وزن مولکولی کم (مانند شناساگرهای DNA)، کمپلکس نامحلول تشکیل دهد. اما قادر است با مولکول‌های DNA دارای وزن مولکولی زیاد مانند محصولات LAMP، کمپلکس نامحلول ایجاد و تشکیل رسوب دهد. با توجه به تشکیل مقدار بسیار زیاد محصول واکنش LAMP و نشان‌دار بودن شناساگرهای DNA، در زمان افزودن PEI به مخلوط واکنش LAMP رسوب رنگی بسیار زیادی تشکیل می‌شود که به راحتی به وسیله چشم غیر مسلح قابل مشاهده است (شکل ۶). یکی از محدودیت‌های این روش این است که PEI به طور قابل توجهی واکنش LAMP را مهار می‌کند. از این رو بایستی پس از خاتمه تکثیر به مخلوط واکنش اضافه گردد. به همین دلیل امکان آلودگی محصول تکثیر شده وجود دارد (۴۹).

حساسیت و ویژگی روش LAMP

با استفاده از روش LAMP می‌توان تعداد نسخه‌های بسیار کم (کم‌تر از ۱۰ نسخه در میلی-لیتر) DNA یا RNA را در نمونه تشخیص داد. در اغلب پژوهش‌های انجام شده حساسیت روش LAMP شدت 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 و 10^7 تا 10^8 ، 10^9 ، 10^{10} معمولی-گزارش شده است. (۱۲، ۲۱، ۴۲، ۵۳، ۵۴ و ۵۵). به طور کلی در روش‌های تکثیر مولکولی هدف هر چه تعداد پرایمرهای مورد استفاده بیشتر باشد، توالی هدف نیز با ویژگی بیشتری تشخیص داده می‌شود. با توجه به این که پرایمرهای LAMP قادر به شناسایی ۸ تا ۱۰ جفت باز توالی-هدف هستند، بنابراین در صورت طراحی صحیح، امکان واکنش متقاطع با توالی‌های مشابهی با وجود قابلیت سبیل زید وجود نخواهد داشت. همچنین در تمام پژوهش‌های انجام شده ویژگی روش LAMP 10^3 تا 10^8 گزارش شده است. (۵۵-۵۰)



شکل ۵: منحنی استاندارد تعداد نسخه ژن بر اساس زمان مثبت شدن.

محصولات DNA بیشتر باشد به مراتب محصولات جانبی بیشتری تولید می‌گردد و در نتیجه کدورت نیز افزایش می‌یابد. بین مقدار DNA تولید شده و کدورت یک رابطه خطی وجود دارد. به عبارت دیگر، زمانی که میزان DNA بیش از ۴ میکروگرم باشد، مقدار پیروفسفات بیشتر از ۰/۵ ppm و در حد قابل مشاهده خواهد بود. با این که در واکنش PCR نیز مقدار بسیار جزیی پیروفسفات منبزم تشکیل می‌شود، اما به دلیل دمای بالای مرحله واسرشت (۹۴°C)، هیدرولیز شده و قابل تشخیص نخواهد بود (۱۸). با توجه به این که افزایش کدورت با میزان DNA سنتز شده رابطه مستقیم دارد، می‌توان با استفاده از کدورت سنجی و سنجش نور، مقدار محصولات را به صورت کمی با مدل سنجش لحظه‌ای (real-time) اندازه‌گیری نمود. با استفاده از این روش معمولاً یک نمودار خطی بین غلظت‌های مختلف و زمان مثبت شدن به دست می‌آید. تعداد نسخه‌های ژن در روش real-time PCR براساس میزان C_t و در روش LAMP براساس مدت زمان مثبت شدن (T_p) بیان می‌شود (شکل ۵).

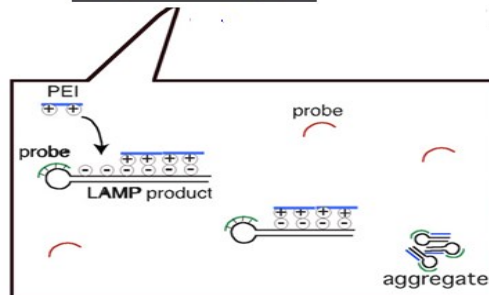
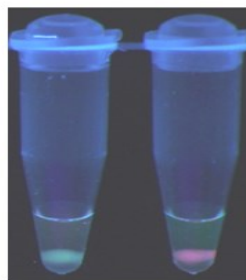
بدیهی است که دستگاه کدورت سنج نسبت به real-time PCR خیلی ارزان‌تر است (۱۹). افزایش در کدورت ویژگی منحصر به فرد واکنش LAMP محسوب می‌شود و در واقع آسان‌ترین راه تشخیص ژن تکثیر شده توسط این روش است (۴۳-۴۸).

د) تشخیص مشاهده‌ای اختصاصی توالی: به منظور تشخیص یک توالی خاص در محصولات LAMP، می‌توان مقدار بسیار جزیی پلی اتیلن ایمین (PEI) با وزن مولکولی پایین به مخلوط

ویروس سندرم حاد تنفسی شدید (SARS) (۵۴)، و ویروس نقص ایمنی انسان (۶۹) و ویروس‌های هپاتیت A (۷۰) و E (۵۵) راه اندازی شده است. همچنین ما برای اولین بار این تکنیک را برای شناسایی ویروس هپاتیت C طراحی نمودیم (۳۹ و ۵۲). در حال حاضر برای تشخیص کمی برخی از عوامل عفونی کیت‌های تجاری LAMP در دسترس است. علاوه بر این، روش LAMP برای تشخیص انگل‌های مهمی از قبیل پلاسمودیوم فالسیپاروم (۷۱) نیز راه اندازی شده است. روش LAMP در ایران نیز برای تشخیص ویروس‌های هپاتیت B (۴۰)، C (۲۵) و فارچ کریپتوکوکوس نئوفورمانس (۷۲) مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین تکنیک LAMP یک روش دقیق، سریع و ساده برای تعیین نوع SNP است. با توجه به ویژگی بسیار زیاد روش LAMP، حتی در صورت وجود توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه در مخلوط واکنش از آن می‌توان به منظور تعیین دقیق نوع SNP (SNP-typing) استفاده نمود (۷۳ و ۷۴). در برخی از پژوهش‌ها از روش LAMP برای بررسی شیوع سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو مانند شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، سودوموناس آئروجینیوزا مقاوم به چند دارو و متالو بتالاکتامازهای دهلی نو ۱ (NDM-۱) در آسیتوباکتر بومانی را نام برد (۷۵-۷۷). با توجه به این که باکتری‌های یاد شده از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت بیمارستانی می‌باشند و با در نظر گرفتن هزینه بسیار پایین روش LAMP، امکان استفاده از آن به منظور شناسایی سریع و کاهش زمان بستری شدن در بیمارستان و کاهش هزینه‌های درمانی وجود دارد.

نتیجه گیری

هرچند طراحی پرایمرهای روش LAMP کمی مشکل‌تر از پرایمرهای PCR است اما پس از طراحی آن با توجه به حساسیت و ویژگی بالای آن و نیز عدم نیاز به پرسنل ماهر و تجهیزات گران قیمت، از آن می‌توان به منظور شناسایی دقیق و سریع عوامل عفونی استفاده نمود. همچنین امکان استفاده از این روش برای پایش و همه‌گیر شناسی بیماری‌های شایع عفونی در



شکل ۶: تشخیص مشاهده‌ای اختصاصی توالی با استفاده از PEI.

کاربردهای روش LAMP

روش LAMP علاوه بر تشخیص کلینیکی بیماری‌های عفونی، در زمینه‌های مختلف مانند اندازه‌گیری میزان اسید نوکلئیک هدف، تعیین چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (single nucleotide polymorphisms = SNPs) و ژن‌های خاص (مانند ژن‌های مقاومت به دارو) نیز کاربرد دارد. روش LAMP اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط نوتومی و همکاران برای تشخیص DNA ویروس هپاتیت B توسعه پیدا کرد، سپس به طور گسترده توسط محققین، برای تشخیص کلینیکی انواع مختلفی از بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی مورد استفاده قرار گرفت. از مهم‌ترین باکتری‌های عفونت‌زایی که توسط این روش شناسایی شده‌اند عبارتند از مایکوباکتریوم توبریکولوزیس (۵۶)، استافیلوکوکوس اورئوس (۵۷)، بروسلای (۵۸)، کمپیلوباکتر (۵۹)، لژیونلا (۶۰)، سالمونلا (۶۱) و سویه‌های مختلف اشریشیا کلسی (۳۵، ۶۲، ۶۳ و ۶۴). علاوه بر این، روش LAMP به طور موفقیت آمیزی برای تشخیص سریع انواع ویروس‌های DNA دار و RNA دار مانند هرپس سیمپلکس و ویروس‌های تیپ ۱ و ۲ (۲۱ و ۶۵)، واریسل‌زوستر (۲۱)، هرپس انسانی تیپ ۶ (۱۲ و ۶۶) و سیتومگالو ویروس (۶۷)، و ویروس‌های پاپیلومای انسانی (۴۶)، انفلوانزا A (۴۱ و ۶۸)، اورپون (۵۰)، سرخچه (۵۱)،

مناطق محروم از امکانات متداول آزمایشگاهی وجود دارد. از این رو طراحی این روش به منظور شناسایی سایر عوامل عفونی، تشخیص مولکولی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین ارزیابی ارتباط چند شکلی‌های ژنتیکی با بیماری‌های خودایمنی با اتیولوژی ناشناخته پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی نویسندگان این مقاله از تمام پژوهشگرانی که در سرتاسر جهان و کشور عزیزمان در گسترش استفاده از این تکنیک نقش داشته‌اند و به دلیل محدودیت‌های مقاله امکان استناد به آن‌ها وجود نداشته است کمال امتنان را دارند.

References

1. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
2. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230: 1350-1354.
3. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487-491.
4. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991; 350: 91-92.
5. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *PNAS.* 1990; 87: 1874-1878.
6. Walker GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD. Strand displacement amplification an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 1691-1696.
7. Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. *J Mol Diagn.* 2008; 10:185-197.
8. Vrana KE. Advancing technologies in gene amplification. *Trends in biotechnol.* 1996; 14(11): 413-415.
9. Chan AB, Fox JD. NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Rev Med Microbiol.* 1999; 10: 185-196.
10. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic acids.* 2008; 27 (3): 224-243.
11. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol.* 2007; 9: 87-102.
12. Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Fujita A, Sugata K, Suga S, Ohashi M, Nishimura N, Ozaki T, Asano Y, Yoshikawa T. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol* 2007; 39(1): 22-26.
13. Espy MJ, Uhl JR, Sloan L, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 165-256.
14. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): e63.
15. Eiken GENOME SITE. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/>
16. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008; 18(6): 407-421.
17. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protocols.* 2008; 3: 877-882.
18. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289:150-154.

19. Mori Y, Kiato M, Tomitam N, Notomi T. Real-Time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*. 2004; 59: 145-157.
20. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification reaction using a non denaturated template. *Clin Chem*. 2001; 47: 1742-1743.
21. Kaneko H, Iida T, Aoki K. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(7): 3290-3296.
22. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 499-501.
23. Whiting, SH, Champoux JJ. Properties of strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mechanistic implications. *J Mol Biol*. 1998; 278: 559-577.
24. Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290: 1250-4 to 1195-8.
25. Kargar M, Askari A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Comparison of efficiency of ELISA, LAMP and nested-PCR assays for detection of Hepatitis C Virus. *Journal of Isfahan Medical School*. 2013; [In Press].
26. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 2002; 16: 223-229.
27. New England Biolabs Company. *Bst* DNA Polymerase Lg Frag from New England Biolabs. <http://www.neb.com>.
28. Aviel Ronen S, Qi Zhu C. Large fragment *Bst* DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics*. 2006; 7: 312.
29. Hafner GJ, Yang IC, Wolter LC, Stafford MR, Giffard PM. Isothermal amplification and multimerization of DNA by *Bst* DNA polymerase. *Biotechniques*. 2001; 30: 852-867.
30. Rees WA, Rees WA, Yager TD, Korte J, von Hippel PH. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry*. 1993; 32: 137-144.
31. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr DA, Loening S. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3957-3958.
32. Rajendrakumar CS, Suryanarayana T, Reddy AR. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Letters*. 1997; 410: 201-205.
33. Karleson F, Steen H, Nesland J. SYBR green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction. *J Virol methods*. 1995; 55: 153-156.
34. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids Res*. 2004; 32 (12): e103.
35. Hill J, Beriwal S, Chandra I, Paul VK, Kapil A, Singh T, Wadowsky RM, Singh V, Goyal A, Jahnukainen T, Johnson JR, Tarr PI, Vats A. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2800-2804.
36. Bista B, Ishwad CM, Wadowsky R. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of BK Virus. *J Clin Microbiol*. 2007; 1581-1587.
37. Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, Onuma M. Loop mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4): 1646-1650.
38. Parida M, Horioka K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, Islam MA, Inoue S, Hosaka N, Morita K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 2895-2903.
39. Kargar M, Askari A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Hepatitis C virus. *Indian J Virol*. 2012; 23(1): 18-23.

40. Shahhosseiny MH, Esmailii Z, Moslemi E, Yaghmaii P. Loop mediated isothermal amplification of hepatitis B virus in hemodialysis patients. *Journal of Microbial World*. 2009; 2(3): 183-192. [In Persian]
41. Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ischzaki T, Van Tu P, Tien NT, Tashiro M, Odagiri T. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods*. 2007; 141: 173-180.
42. Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Aoyama I, Tsukamoto T. Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses. *J Med Virol*. 2007; 79: 326-334.
43. Parida M, Santhosh SR, Dash PK. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(11): 4172-4178.
44. Parida M, Guillermo P, Shingo I, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(1): 257-263.
45. Toriwa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol*. 2006; 50: 379-387.
46. Hagiwara M, Sasaki H, Matsuo K, Honda M, Kawase M, Nakagawa H. Loop mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. *J Med Virol*. 2007; 79(5): 605-615.
47. Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, Shimazu Y, Miyazaki K. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(4): 1376-1381.
48. Parida M. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *J Biosci*. 2008; 33(4): 617-628.
49. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol*. 2006; 6(3): 1-10.
50. Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4): 1625-1631.
51. Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9): 3268-3273.
52. Askari A, Kargar M, Doosti A. 2011. Comparative evaluation of LAMP, Nested PCR and EIA methods for diagnosis of Hepatitis C Virus. 1st International and 12th Iranian Congress of Microbiology, Kermanshah, Iran. No.1427
53. Alhassan A, Govind Y, Thanh Tam N. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitol Res*. 2007; 100: 1165-1168.
54. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5): 1956-1961.
55. Lan X, Yang B, Li BY, Yin XP, Li XR, Liu JX. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(7): 2304-2306.
56. Iwamoto Y, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2616-22.

57. Goto M, Hayashidani H, Takatori K, Kudo, YH. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. *Lett Appl Microbiol.* 2007; 45: 100-107.
58. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008; 104: 1815-1823.
59. Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, Inoue K. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 444-451.
60. Annaka T. Rapid and simple detection of *Lgionella* species by LAMP, a new DNA amplification method. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi.* 2003; 14: 5660-5662.
61. Ohatsuka K, Yanagawa K, Takatori K, Hara-Kudo Y. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 6730-5.
62. Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, ayoko Ohtsuka K, Segawa Y, Takatori K, Kojima T, Ikedo M. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 398-406.
63. Zhao X, Li Y, Wang L, You L, Xu Z, Li L, He X, Liu Y, Wang J, Yang L. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Mol Biol Rep.* 2010; 37(5): 2183-2188
64. Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (8): 5023-5028.
65. Enomoto Y, Tetsushi Y, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Suga S, Suzuki K, Kawana T, Nishiyama Y, Asano Y. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2): 951-955.
66. Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, Akimoto S, Ohashi M, Suga S, Nishimura N, Ozaki T, Nishiyama Y, Notomi T, Ohta Y, Asano Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA Amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1): 140-145.
67. Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Inagaki S, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Kojima S, Asano Y. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. *J Virol Methods.* 2006; 132(1-2): 216-221.
68. Jayavardena S, Cheung CY, Barr I, Chan KH, Chen H, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (6): 899-901.
69. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods.* 2008; 151: 264-270.
70. Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, Totsuka A, Wakita T. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods.* 2007; 145(2): 162-168.
71. Paris HD, Imwong MM, Faiz A. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(5): 972-976.
72. Shahhosseiny MH, Rezaei Amirabadi A, Yousefi J, Ghahri M, Azadmanesh K, Moslemi E. LAMP detection of *Cryptococcus neoformans* in AIDS patients. *Journal of Microbial World.* 2010; 2(4): 235-242. [In Persian].
73. Iwasaki M, Yonekawa T, Otuska K, Suzuki W, Nagamin K, Hase K, Horigome T, Notomi T, Kanda H. Validation of the loop-mediated isothermal amplification method for single nucleotide polymorphism genotyping with whole blood. *Genome Lett.* 2003; 2: 119-126.
74. Nakamura N, Ito K, Takahashi M, Hashimoto K, Kawamoto M, Yamanaka M, Taniguchi A,

- Kamatani N, Gemma N. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal Chem.* 2007; 79(24): 9484-9493.
75. Misawa Y, Yoshida A, Saito R, Yoshida H, Okuzumi K, Ito N, Okada M, Moriya K, Koike K. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures. *J Infect Chemother.* 2007; 13(3): 134-140.
76. Sekiguchi J, Asagi T, Akiyama TM, Kasai A, Mizuguchi Y, Araake M, Fujino T, Kikuchi H, Sasaki S, Watari H, Kojima T, Miki H, Kanemitsu K, Kunishima H, Kikuchi Y, Kaku M, Yoshikura H, Kuratsuji T, Kirikae T. Outbreaks of multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 979-989.
77. Liu W, Zou D, Li Y, Wang X, He X, Wei X, Shao C, Li X, Shang W, Yu K, Liu D, Li Y, Guo J, Yin Z, Yuan J. Sensitive and rapid detection of the new Delhi metallo-beta-lactamase gene by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1580-5. doi: 10.1128/JCM.06647-11.



Loop mediated isothermal amplification assay: Rapid and cost effective method for detection of pathogens

Ahzam Askari¹, Mohammad Kargar², Sadegh Ghorbani-Dalini³, Abbas Doosti⁴

¹M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²Associate Professors, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

³M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's club Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

⁴Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is nucleic acid amplification method that amplifies target isothermally at 62-65°C. In this approach, without thermal denaturation step, double stranded DNA is simultaneously denatured and synthesized by using the *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA polymerase with high strand displacement activity. Thus the reaction can be conducted with a cost-effective equipment such as water bath or heating block, and the thermal-cycling needs of a PCR are avoided. The LAMP reaction uses six primers that specifically recognize eight distinct regions on the target sequence. Moreover, the LAMP reaction produces a large amount of amplified products, resulting in easier detection, such as visual judgment based on the turbidity or colour change result from fluorescent dsDNA intercalating dye in the reaction mixture, so gel electrophoresis is not required. Therefore, the LAMP assay has the advantages of high specificity, sensitivity, amplification efficiency and simple detection, that without the need for expensive equipment could be applicable as valuable tool for rapid diagnosis of infectious diseases in both clinical and hospital laboratories of developing countries. The aim of this article is to introduce the principles and applications of LAMP method for detection of infectious agents.

Keywords: LAMP, Primer Design, Optimization

Correspondance to: Mohammad Kargar

Tel: +989173149203

E-mail: mkargar@jia.ac.ir

Journal of Microbial World 2012, 5(1&2): 7-22.