

新型恆溫式圈環形核酸增幅法簡介與應用 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

前 言

核酸增幅技術已成為生物學領域最重要的工具之一，在臨床醫學應用領域上，舉凡感染病原、遺傳疾病...等的檢測，皆扮演著舉足輕重的角色。除了一般人較熟知常用的 PCR 相關技術外，其他核酸增幅技術如依賴核酸序列擴增法 (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、自主序列複製系統 (self-sustained sequence replication, 3SR)、鏈替代擴增法 (strand displacement amplification, SDA) 亦陸續被發展出來。這些核酸增幅技術，固然均具有快速且專一地增幅少量核酸片段之優點，但缺點則是：除 SDA 是在恆溫反應外，其餘均需要特殊且高精確度的快速溫度循環儀或檢測機器，易有偽陽性，核酸的濃度及純度要求高，且增幅效率不好。

2000 年日本 Notomi 等人研發出 LAMP 核酸增幅技術[1]，由於操作十分簡單，儀器僅需溫度可達 60-65°C 恆溫的水浴槽或乾熱板 (heat block)，因此適合田間篩檢、現場 (point-of-care) 或床邊 (bed-side) 測試、初級照護機構、小規模臨床實驗室、偏遠物資缺乏地區，田野分子流行病學調查或大規模檢疫工作用。

原 理

「LAMP」[1]全名為loop-mediated isothermal amplification，以名稱來看即一種恆溫、具loop形式的DNA擴增法。LAMP反應最大的特點在於：(1) 使用作用溫度 60-65°C 和具高DNA strand置換能力的DNA聚合酶 (DNA polymerase)：換個角度來說，就是缺乏 5'→3'的DNA分解能力，在DNA聚合的過程中，只能將模版DNA上既有的互補DNA鏈整條“鏟”起，就像是靠聚合酶進行dsDNA→ssDNA的步驟。(2) 使用inner primers (FIP, BIP) 和

outer primers (F3, B3) (圖一)，或再加上loop primers (Loop F, Loop B) [2]：inner primers與outer primers為反應所必須，在增幅的過程中分別扮演了啓始引發與後續「self-priming」的角色，而loop primers則是互補於DNA序列F1、F2中間的片段，這個位置在LAMP的DNA product上，為stem-loop結構的loop位置，有助於提升整個反應的效率；這三對引子在設計之時， T_m 值要控制在 60-65°C，以利DNA聚合時可達最佳效能，也因此提升了在溫度調控上的便利性及專一性。除了以上的優點，目前的研究皆肯定LAMP的靈敏度可達 10 copies以下[1]，再加上作用時間短且可以肉眼直視結果[3]，實為一極佳的核酸檢驗技術。

LAMP的反應原理，簡單來講，就如同一般的PCR，但是其denature的步驟則由一特定的DNA polymerase取代，primers的 T_m 值也全部控制在 60-65°C，而省去annealing的步驟，再加上其設計會使被擴增的DNA產物呈現stem-loop的結構，促使self-prime的發生而DNA片段長度持續以對數延長，過程中也不斷釋出啓始或中間反應的DNA片段，造成target DNA的質量與數量快速的放大，此結果有助於檢驗；整個反應過程，除了一開始需要一次heat denature和即時冰上冷卻的動作外，之後只要視需要設定 60-65°C之間的反應溫度，作用 35-60 分鐘，終止反應後，可以magnesium pyrophosphate產生沈澱的方式[4]，或利用SYBR Green I 螢光顯色[3]來判斷檢體的陰、陽性。(詳細反應過程請詳閱 [1, 2])

材料與方法

一、DNA polymerase

依據原理所敘述的功能，文獻[1]指出可選用下列三種 DNA polymerase 之一：*Bst* DNA polymerase, *BcaBEST* DNA polymerase, *Z-Taq* DNA polymerase。其中 *Z-Taq* DNA polymerase 的效果較差，但如果 DNA polymerase 必須在 heat denaturation 之前加入，*Z-Taq* DNA polymerase 則是很好的選擇。

二、Primers

在前面「原理」的地方有提到以下三組 primers：Outer primers、Inner primers 和 Loop primers。

在 DNA 片段上 primers 序列的位置，5'→3'分別是 B3-B2-Loop B-B1 和 F3-F2-Loop F-F1（圖一）。在 LAMP 進行的時候，因為 outer primers（F 3, B 3）在 inner primers 的 5'端，所以會將下游 inner primers 所合成的 DNA 鏈鏟起。inner primers 則包括 forward inner primer (FIP) 和 backward inner primer (BIP)。FIP, BIP 的設計則較特殊，從 5'→3'的序列組成爲 F1c-F2、B1c-B2 或 F1c-[Spacer]-F2、B1c-[Spacer]-B2，[Spacer]爲 3~6bp 的 T（thymidine）或不互補的序列。當 outer primers 啓始的 DNA 合成，使 inner primers 啓始的 DNA 鏈成爲單股時，inner primers 上的 F1c、B1c 會與其下游的 F1、B1 形成 looped out 的結構，最後由兩端 loop 的啞鈴形 DNA 衍生爲主要增幅步驟的 stem-loop 模版 DNA，loop 端的單股 DNA 序列 5'→3'爲 [Spacer]-F2-Loop F、[Spacer]-B2-Loop B 或 F2-Loop F、B2-Loop B（圖二）。

Loop primers（Loop F、Loop B）的功能則是在 stem-loop 模版 DNA 增幅過程中，當 loop 端的序列 5'→3'爲 [Spacer]c-F2c-Loop Fc、[Spacer]c-B2c-Loop Bc 或 F2c-Loop Fc、B2c-Loop Bc 時，加強增幅效率[2]。

三、Reaction mixture for LAMP

根據原創文獻[1]與之後的引用文獻記載，總 LAMP reaction mixture 爲 25 μ l，除了 dNTP（0.4-1.6mM each dNTP），primers, template DNA 與 $MgSO_4$ 外，以下爲較固定成分：1 M betaine（Sigma），20 mM Tris-HCl（pH 8.8），10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton X-100。

$MgSO_4$ 濃度的調整，是由於結果的分析是以 magnesium pyrophosphate formation 產生沈澱的方式，而有所不同[4]。

LAMP reaction mixture 加入了 outer primers（濃度要低於 inner primers），Inner primers, 或 Loop primers[2] 與 template DNA 加入後，加熱

至 95°C 5 分鐘再置冰上冷卻，加入 8 U *Bst* polymerase，置於 65°C 反應 35 分鐘至 1 小時，80°C 10 分鐘結束反應後，就可進行結果的判讀[1, 2]。反應過程中的 heat denaturation 及 DNA polymerase heat termination，有文獻[5]指出可省略而不影響最後結果，雖然反應的啓始較慢，但對檢驗器材的精簡有很大的幫助。

四、Analysis

就較直接結果判讀來說，magnesium pyrophosphate 沈澱[4]所造成的渾濁度可以肉眼或濁度計 405nm 檢測[6]，也可以快速離心，以得到更確切的結果。再者，在反應結束後加入高濃度的 SYBR Green I 螢光顯色直接以肉眼判斷[3]。

檢驗應用

LAMP自推出以來有關應用可行性的報告不斷在擴增中。在病原菌檢測上用於直接檢測病患痰液中的 *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium* 及 *M. intracellulare*[3] 及牛隻的 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*。亦有學者發展 Real-time LAMP 可即時追蹤濁度變化以偵測西尼羅河病毒 (West-Nile Virus) [7]，並展望此技術未來除檢測病人檢體外亦可應用於田野監測野鳥及病媒蚊帶病毒情形。LAMP 可應用於偵測人類血漿中的皰疹病毒-6 [8]。亦有學者描述 LAMP 技術應用於原位 (*in situ*) 偵測 *Escherichia coli* O157:H7 的 *stx*₂ 基因[5]。使用簡便的 LAMP 技術偵測非洲昏睡病的錐體蟲 (trypanosomes)，可有利於在開發中國家推廣[9]。在植物檢疫上，在日本 LAMP 被應用來篩檢日本蕃薯苗圃感染嵌紋病毒[6] 及蕃茄植株和白蠅病媒體內的黃葉捲曲病毒[10]。在漁業養殖方面，LAMP 可檢測蝦子白斑病病毒 [11] 及魚的 *Edwardsiella tarda* 感染[12]。LAMP 的產物為標的 DNA 反轉重複 (inverted repeats) 的啞鈴形 DNAs 形成帶有複環形狀的花椰菜狀構造。此產物可用 *TspRI* 等限制酵素切後再以引子延長反應，取得大量的單股 DNA 產

物，作為後續定序確認或DNA微陣列的材料[13]。最近則有香港地區報告SARS檢驗之使用[14]。

優點

- 一、操作簡便，步驟簡單，所有反應在單一試管內完成，增幅 DNA 在 60-65°C 恆溫下進行即可，DNA 可以不變性為單股，不需經繁複的核酸萃取可直接從檢體檢測，不需要溫度循環器、跑膠或雜合偵測等複雜的設備，就可以完成。
- 二、特異性相當高，因為需兩對引子先後辨認六段序列，反應才能持續進行。
- 三、高效率，每次循環可增幅三倍，且不需PCR的階段性循環升降溫，故所需時間較PCR短（一般約 35 分-1 小時），只要數個copy的標的基因即會快速增幅至 10^9 個copy（500 μ g/ml DNA），所需樣本量微，敏感度與 nested- 或real-time PCR相當，且檢測容易。
- 四、分析簡便，DNA 大量增幅過程中，會有大量副產物 pyrophosphate 產生，藉由 magnesium pyrophosphate 白色沈澱物的生成，可肉眼辨識混濁度或以簡單濁度計量測，且沈澱物量與 DNA 產物成正比。若加入 SYBR Green I 螢光染劑，目測之靈敏度可與電泳凝膠法相當。
- 五、也可檢測 RNA(RT-LAMP)，只要在同一反應管中多加反轉錄酶(reverse transcriptase)，先行反轉錄的過程，再進行 LAMP 即可。
- 六、可偵測 SNP，因為每次循環只要有單一核苷酸變異即會被偵測出來。

缺點

- 一、primer 設計複雜且限制多，目前網站上已有專用的設計程式，惟尚未對外開放。
- 二、標準化不易。
- 三、迄今發表之應用尚少，關於其侷限性仍有待釐清。

撰稿者：林于勤, 李淑英, 陳豪勇, 林鼎翔

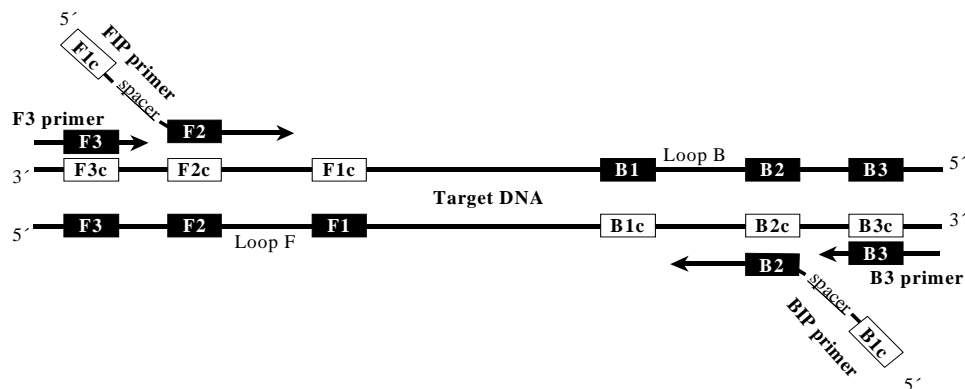
衛生署疾病管制局研究檢驗組

參考文獻

- 1、Notomi T, Okayama H, Masubuchi H et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:E63.
- 2、Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell Probes* 2002;16:223-229.
- 3、Iwamoto T, 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;41:2616-2622.
- 4、Mori Y, Nagamine K, Tomita N et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;289:150-154.
- 5、Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N et al. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69:5023-5028.
- 6、Fukuta S, Iida T, Mizukami Y et al. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol.* 2003;148:1713-1720.
- 7、Parida M, Posadas G, Inoue S et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:257-263.
- 8、Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y et al. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:140-145.
- 9、Kuboki N, Inoue N, Sakurai T et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:5517-5524.
- 10、Fukuta S, Kato S, Yoshida K et al. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods* 2003;112:35-40.
- 11、Kono T, Savan R, Sakai M et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 2004;115:59-65.

- 12、Savan R, Igarashi A, Matsuoka S et al. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:621-624.
- 13、Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;290:1195-1198.
- 14、Poon LL, Leung CS, Tashiro M et al. Rapid Detection of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Clin. Chem.* 2004.

圖一、LAMP 的 primer 與標的 DNA 關係圖 (改編自[11]Fig.1A)

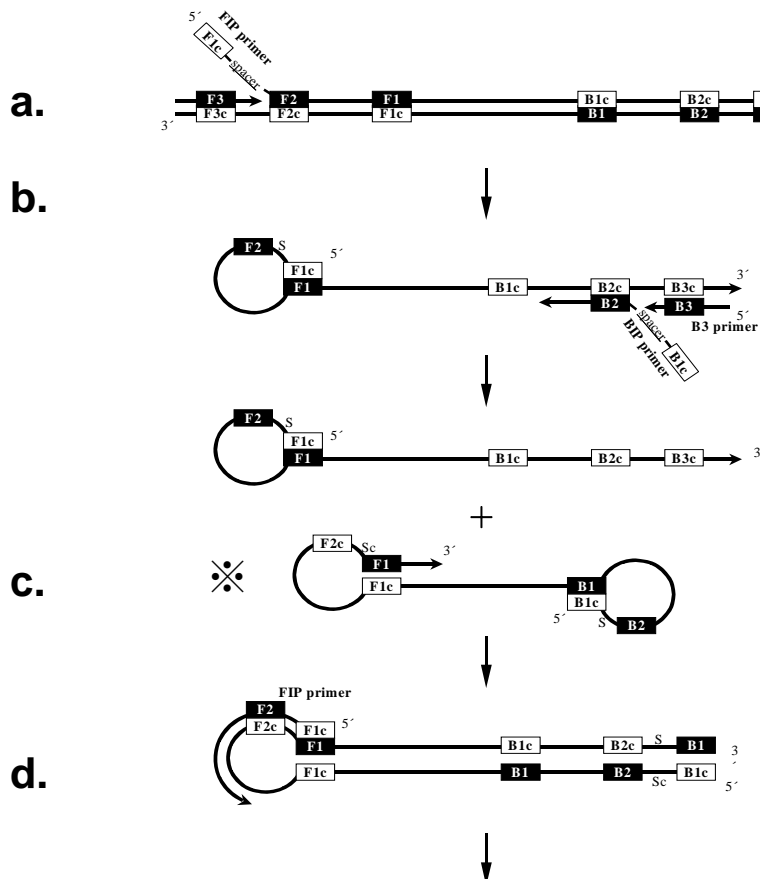


FIP & BIP : inner primer

F3 & B3 : outer primer

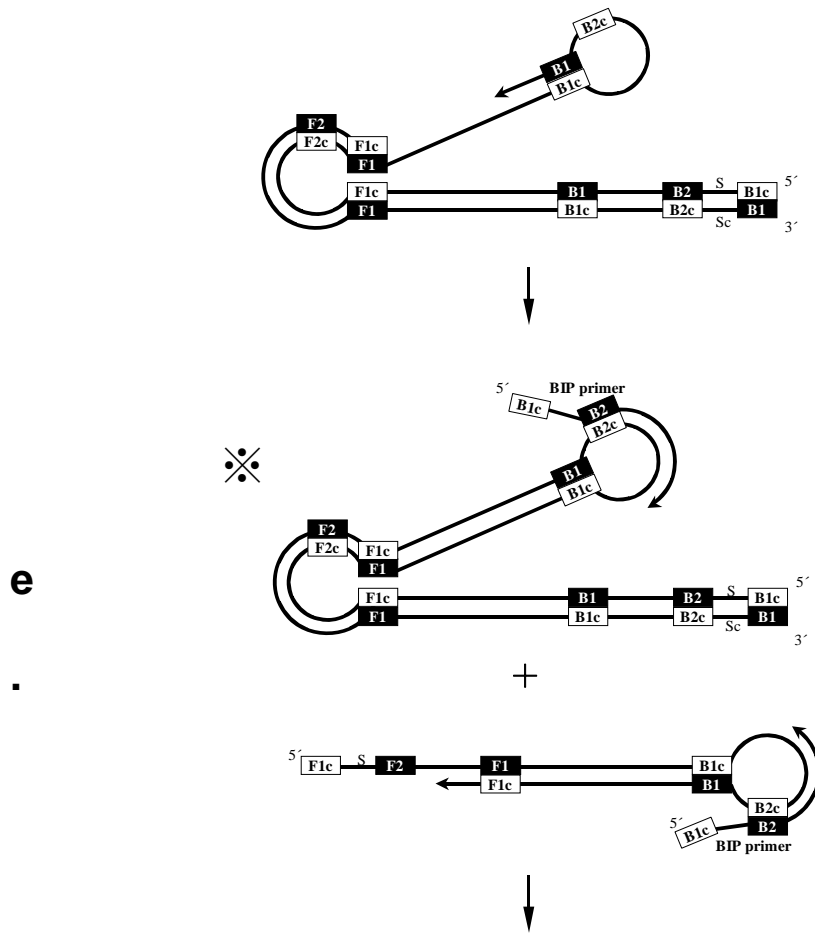
Inner primer 相對於 outer primer 在 DNA 片段上的結合位置，是在其下游。由於 LAMP 所選用特定 DNA 聚合酶的功能，致使在 outer primer 下游的 inner primer 啓始合成的 DNA 鏈，在 outer primer 進行 DNA 聚合的過程中被鑷起。而 inner primer 上 F1c & B1c 的序列，在 LAMP 的反應過程中，將形成主要的 LAMP 啞鈴形模版 DNA (見圖二 c)。

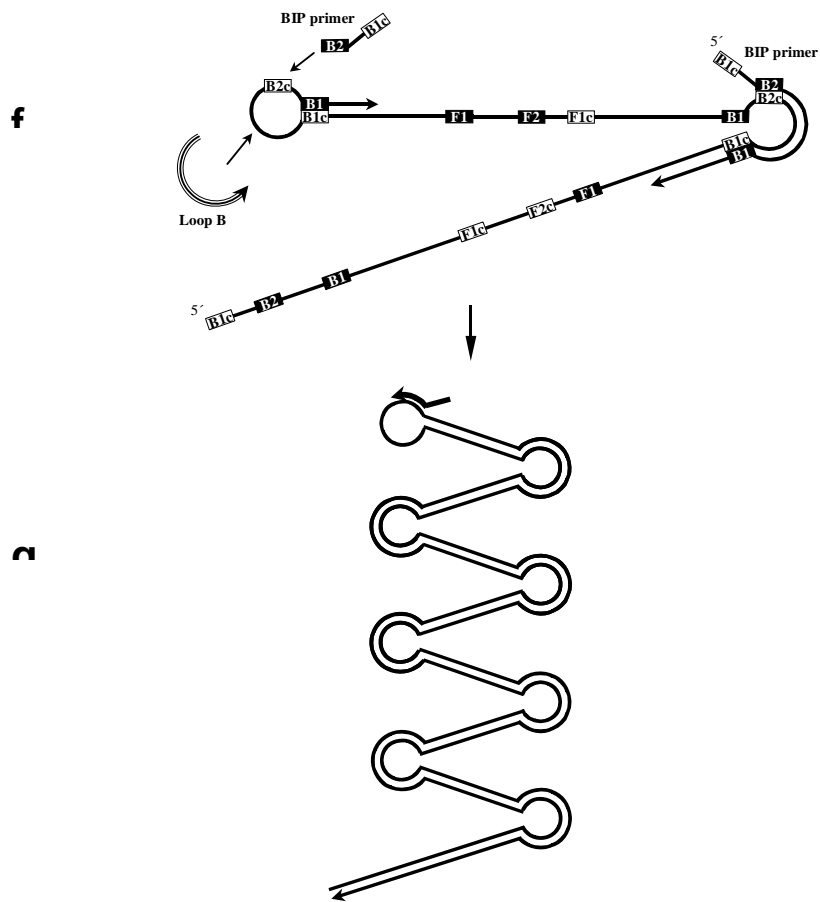
圖二、LAMP 簡略流程圖 (改編自[1]Fig.1)



a.~ c.

以 FIP 啓始的 DNA 合成爲例 (a)，因上游自 F3 合成 DNA 的同時，特定 DNA 聚合酶作用使 FIP 啓始合成的 DNA 鏈脫離原始模版 DNA；同理另一端 B3 與 BIP 的 DNA 合成後 (b)，產生一特殊 DNA 片段，因兩端具有與較中間特定區域 (F1、B1) 互補的序列 (F1c、B1c)，而形成「啞鈴形」(兩端圈環)的結構 (c※)。圈環 (loop) 的形成則造就 self-primed 的功能。



**d.~ g.**

構成 stem-loop 的 DNA，在圈環的部分可再與 inner primer 接合，繼續 DNA 的合成 (d)，再加以 self-primed 致使 stem-loop DNA 會自行延伸 (e-f)，且過程中製造出的多重產物，部分再繼續回復循環於整個 LAMP 過程中，如此持續循環作用，加速標的 DNA 的產能不斷增殖，而利於檢測應用。