

# LAMP 技術簡介

波仕特生物科技股份有限公司

2011/7/4

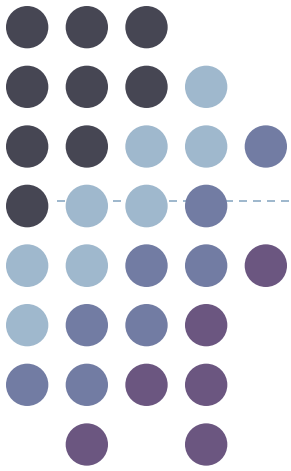


**Eiken GENOME SITE**



波仕特生物科技股份有限公司  
Protech Technology Enterprise Co., Ltd.

講者：梁成芝



# Outline

---

- ▶ LAMP 簡介
- ▶ LAMP 基本原理
- ▶ LAMP 操作流程
- ▶ Eiken 公司的相關產品

# LAMP 的完整名稱

---

Loop-mediated Isothermal  
Amplification

(環型恆溫核酸增幅法)

→ LAMP

# LAMP 的演進

---

- ▶ 1998 年：日本榮研公司研發出 LAMP 技術

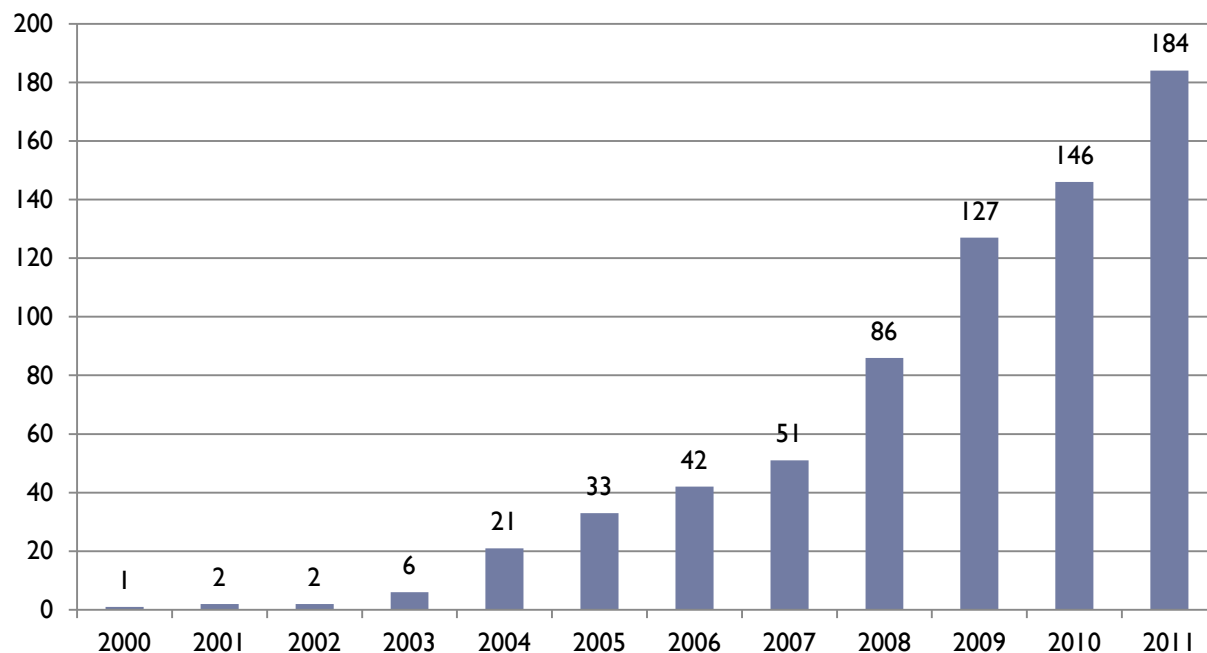


- ▶ 2000 年：首篇 paper 發表 (Notomi *et al.*, 2000)
- ▶ 2000 年：在台申請專利成功，專利號碼 I221855，專利期 20 年。
- ▶ ~ 2002 年：榮研公司的 LAMP kit 上市。

# LAMP 相關發表數量

- ▶ Pubmed 搜尋超過 500 篇 paper

LAMP 相關 paper 各年度發表篇數



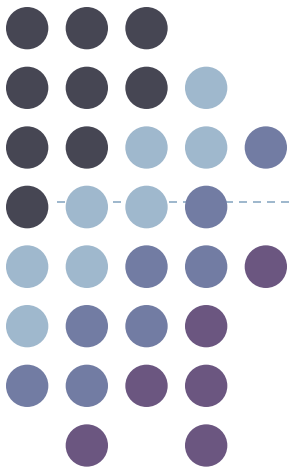
(2011 年數量為預估篇數，到 6 月止實際篇數為 92 篇)

# 台灣相關發表列表 (2011 年新增)

篇名	期刊名稱	年份	檢測 target	單位
Koi herpesvirus epizootic in cultured carp and koi, <i>Cyprinus carpio</i> L., in Taiwan.	J Fish Dis.	2011	Koi herpesvirus (錦鯉泡疹病毒)	屏東科技大學
Species and sex identification of Formosa landlocked salmon using loop-mediated isothermal amplification.	Mol Ecol Resour.	2011	sex identification of Formosa landlocked salmon (臺灣鮭魚性別鑑定)	海洋大學
A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification	Lab Chip.	2011	MRSA (抗藥性金黃色葡萄球菌)	成功大學
Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes.	J Virol Methods.	2011	white spot syndrome virus (蝦白點症病毒)	瑞基公司
One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of <i>Cymbidium mosaic virus</i> .	J Virol Methods.	2011	<i>Cymbidium mosaic virus</i> (蕙蘭嵌紋病毒)	中國醫藥大學
M-specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus.	J Virol Methods.	2011	Swine flu (豬流感)	家畜衛生試驗所
An integrated microfluidic loop-mediated-isothermal-amplification system for rapid sample pre-treatment and detection of viruses.	Biosens Bioelectron.	2011	-	成功大學

# 台灣相關發表列表

篇名	期刊名稱	年份	檢測 target	單位
One-tube loop-mediated isothermal amplification combined with restriction endonuclease digestion and ELISA for colorimetric detection of resistance to isoniazid, ethambutol and streptomycin in Mycobacterium tuberculosis isolates.	J Microbiol Methods.	2010	Mycobacterium tuberculosis (TB)	高醫、奇美醫學中心
Rapid detection of squash leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification.	J Virol Methods.	2010	squash leaf curl virus (葫蘆捲葉病毒)	台中農試所
Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anaemia virus.	J Appl Microbiol..	2009	chicken anaemia virus (雞貧血病毒)	中興大學
Rapid identification of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by loop-mediated isothermal amplification.	J Econ Entomol..	2009	Mediterranean fruit fly (地中海果蠅)	台大昆蟲
In situ reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (in situ RT-LAMP) for detection of Japanese encephalitis viral RNA in host cells.	J Clin Virol.	2009	Japanese encephalitis virus (日本腦炎)	長庚大學
Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and sensitive detection of nervous necrosis virus in groupers.	J Virol Methods.	2009	nervous necrosis virus (神經壞死病毒)	動植物防疫檢疫局
Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Entamoeba histolytica.	J Clin Microbiol..	2009	Entamoeba histolytica (腸道阿米巴原蟲)	陽明大學
Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of orf virus.	J Virol Methods..	2009	orf virus	中興大學
Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of Mycobacterium tuberculosis.	J Microbiol Methods.	2009	Mycobacterium tuberculosis (TB)	高醫
Specific detection of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification amplicons for Taura syndrome virus by colorimetric dot-blot hybridization.	J Virol Methods.	2007	Taura syndrome virus	銳基



# Outline

---

- ▶ LAMP 簡介
- ▶ LAMP 基本原理
- ▶ LAMP 操作流程
- ▶ Eiken 公司的相關產品



# LAMP & PCR 比較

	LAMP	PCR
溫度	恆溫，僅需水浴槽或乾浴槽	需要溫度循環儀
時間	約15 ~ 60 min	2 ~ 3 hr
產物量	約 $10^{10}$ 倍 (100億倍)	約 $10^7$ 倍 (1千萬倍)
專一性	4條 primer 針對 6 個區域	2 條 primer 針對2個區域
檢出方法	可用肉眼觀測有無擴增反應發生	需要以其他方式進行檢測
RNA 檢測	步驟和時間與 DNA 檢測相同	需進行 RT 步驟，增加 30-60 min

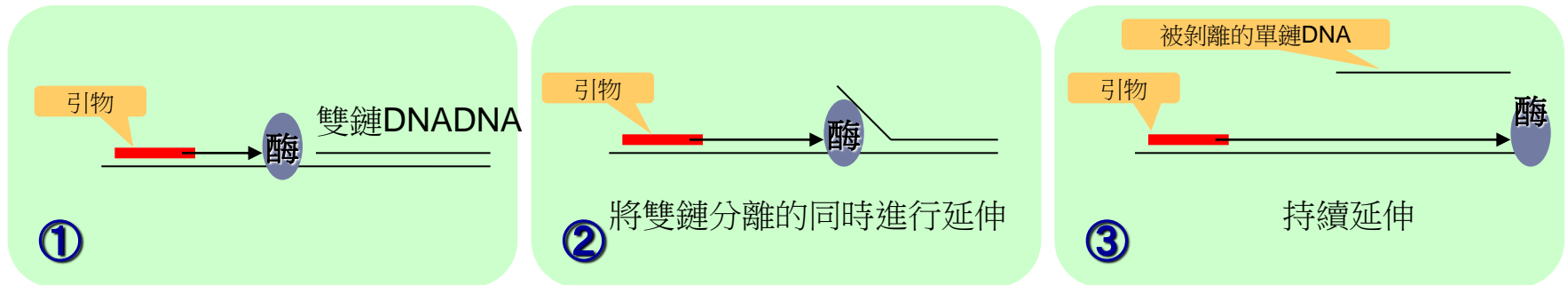
# LAMP 的特點

---

- ▶ 特殊的酵素 → 可恆溫增幅
- ▶ 特殊的 primer 設計 → 高專一性，形成 loop 構造
- ▶ 特殊的檢測方式 → 可用肉眼判斷 DNA 是否增幅

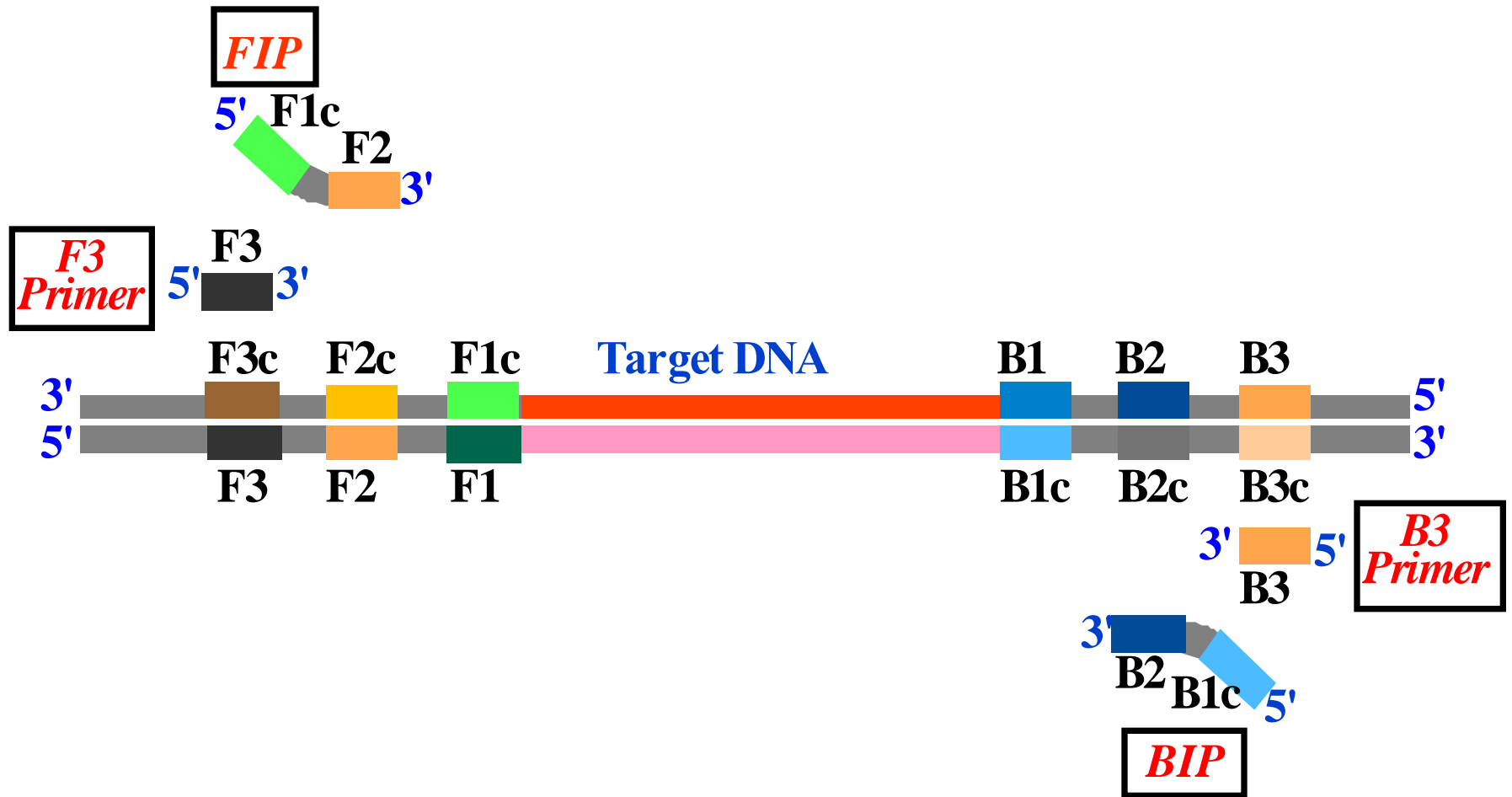
# DNA 鏈置換型反應聚合酶 (*Bst*)

- ▶ 與 DNA 模板結合的 primer 會從 3' 末端開始進行 DNA 鹼基配對延伸。
- ▶ 延伸的前方如果有雙鏈的話，前方的雙鏈會被強制剝離以便繼續延伸。
- ▶ 最適合 LAMP 法的反應聚合酶的溫度是 65°C。



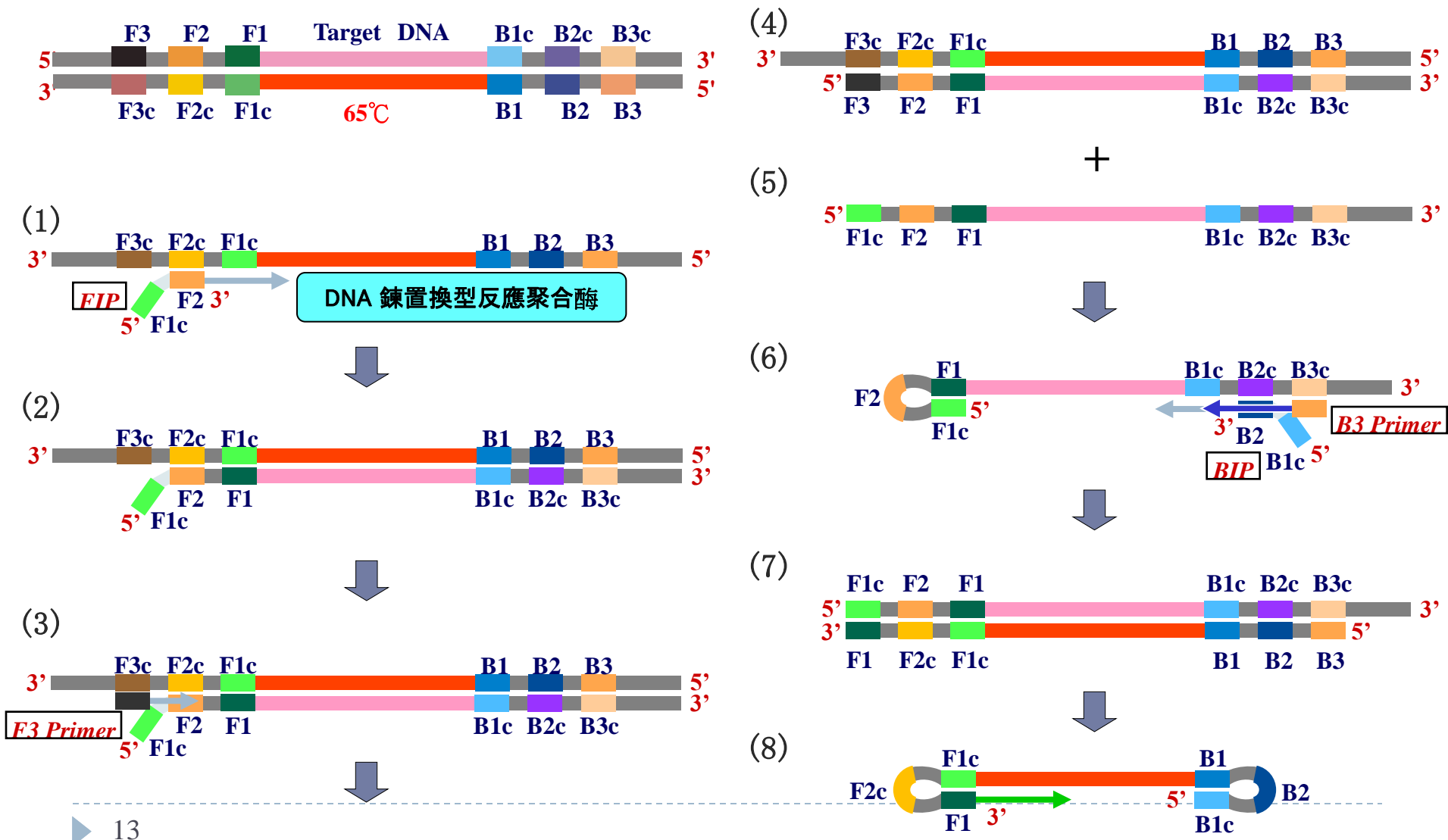
# LAMP 的基本原理

- Primer 設計原理 -



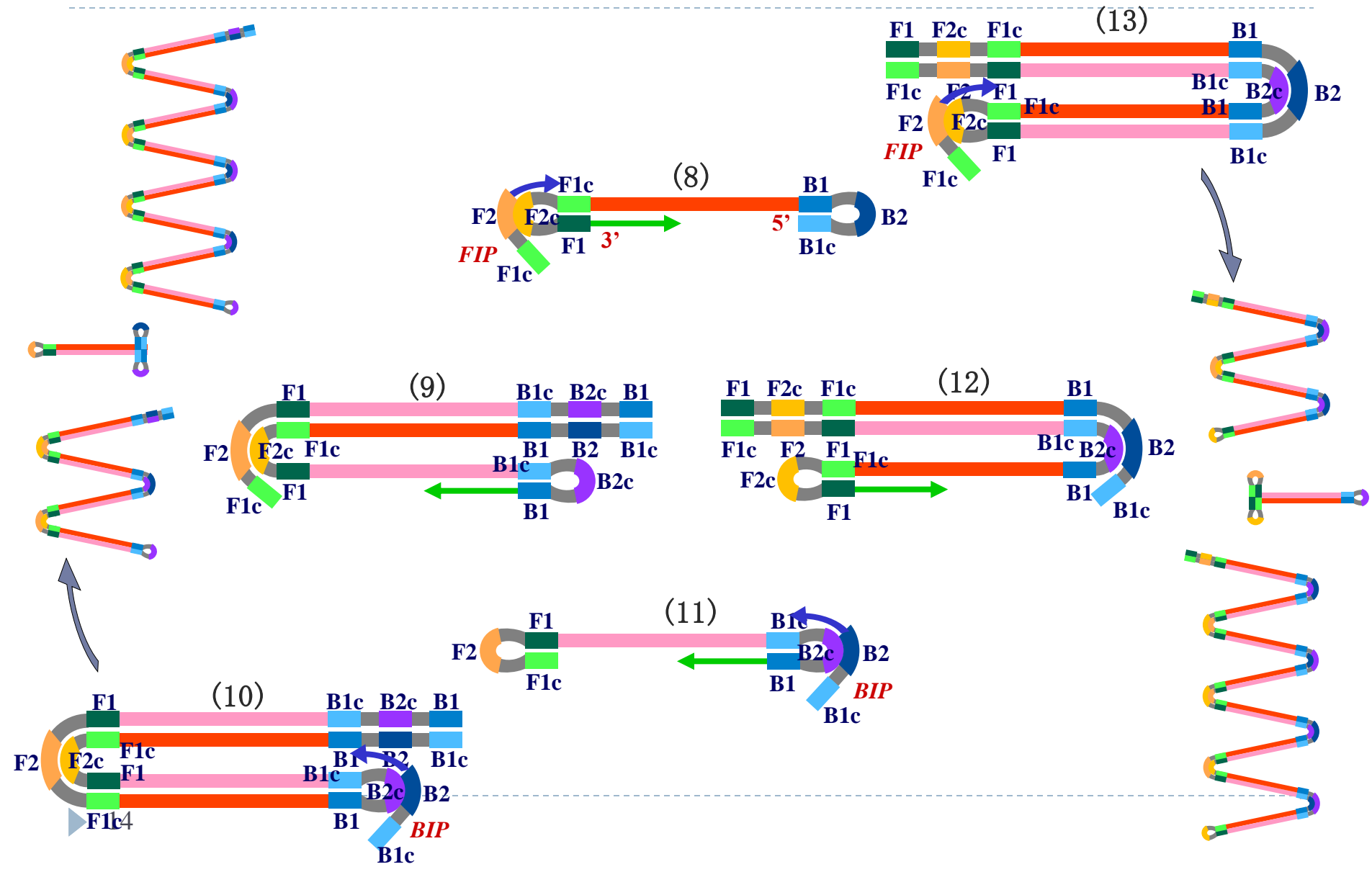
# LAMP 的基本原理

## - LAMP 的起始結構 -



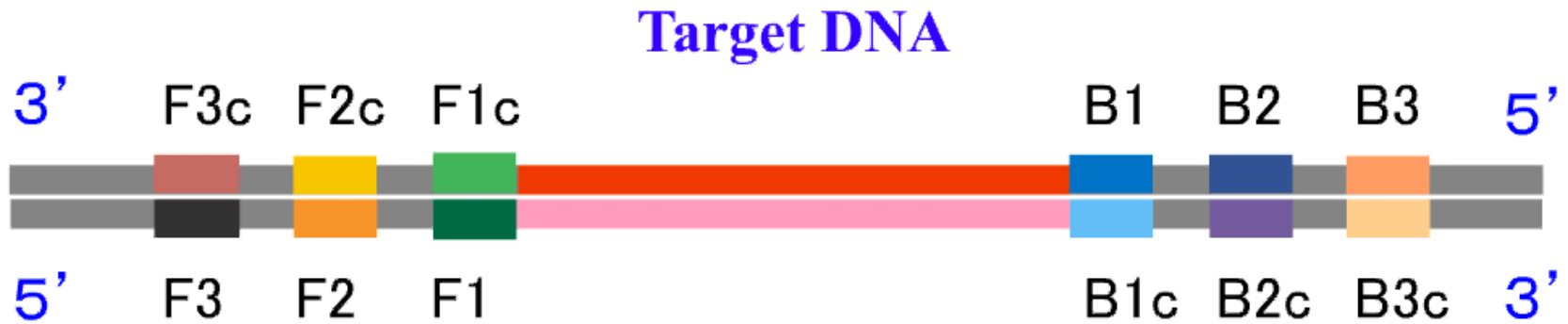
# LAMP 的基本原理

## - 循環擴增 -



# LAMP 的基本原理

## Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

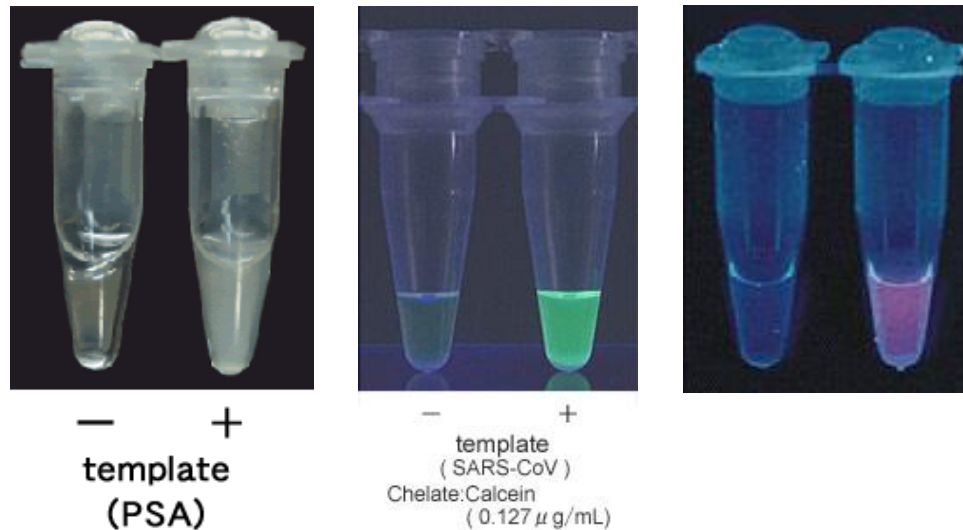


請上原廠網頁觀看動畫

<http://www.loopamp.eiken.co.jp/lamp/anim.html>

# LAMP 結果判定

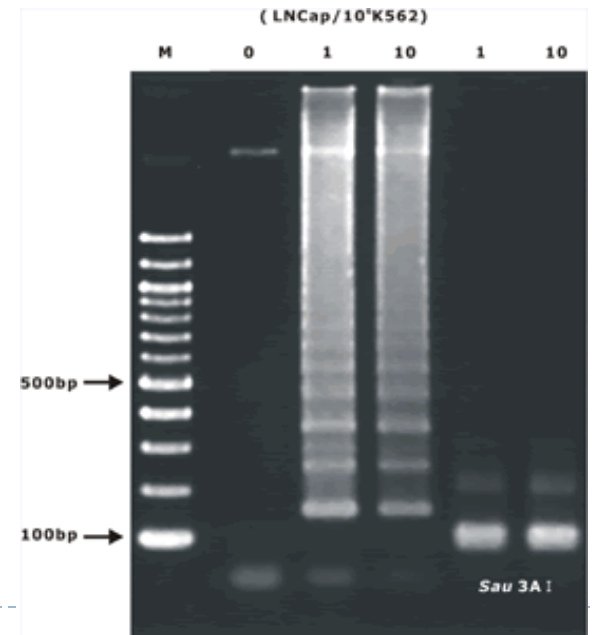
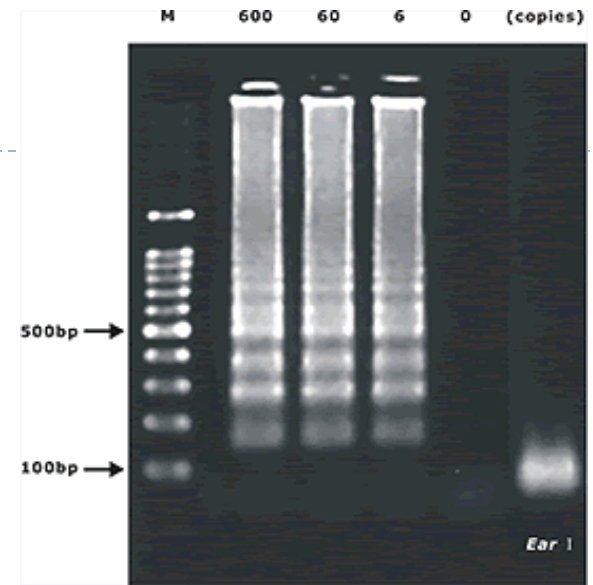
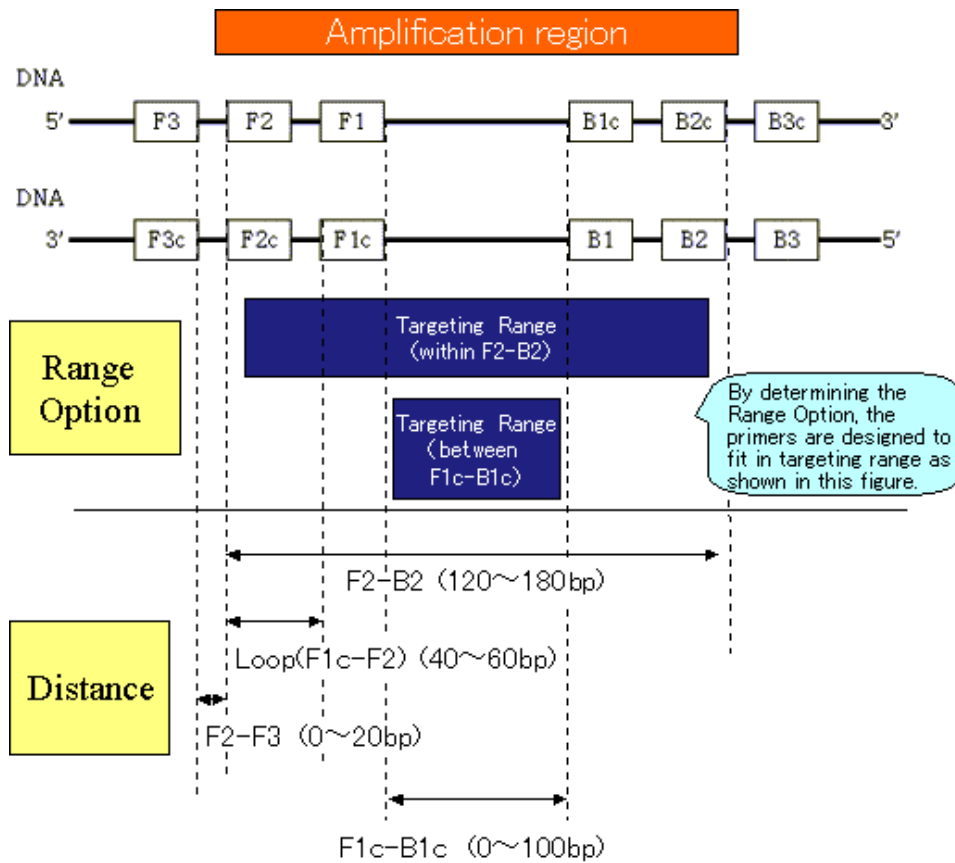
- ▶ LAMP 結果可直接用肉眼觀察
  - ▶ 肉眼直接觀察
  - ▶ 加入原廠螢光試劑
  - ▶ 加入 EtBr 及甲基藍





# LAMP 結果判定

## ▶ 限制酶切及電泳輔助檢測



# LAMP 的特點

---

## ▶ 簡易

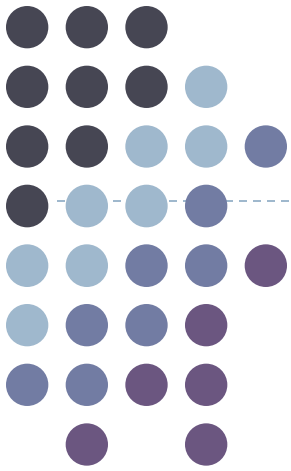
- ▶ 採用恆溫擴增反應。不需要先經過變性過程。
- ▶ 操作及對儀器的要求簡單。

## ▶ 快速靈敏

- ▶ 擴增反應可在 15 – 60 分鐘內完成。
- ▶ RNA 檢測也可一步完成。
- ▶ 檢測可藉由判定有無擴增產物來決定。
- ▶ 可放大  $10^{10}$  倍。(DNA 濃度 > 500 ug/mL)

## ▶ 高特異性

- ▶ 針對六個特定的區域設計四個不同的引物、LAMP法能準確的對目標基因進行擴增反應。



# Outline

---

- ▶ LAMP 簡介
- ▶ LAMP 基本原理
- ▶ LAMP 操作流程
- ▶ Eiken 公司的相關產品

# LAMP 操作流程

---

- ▶ Kit 內容物
- ▶ 相關產品準備
- ▶ Primer 設計及合成
- ▶ 反應溶液配製
- ▶ 反應步驟

## 各包裝 Kit 內容物 (DNA amplification kit)

---

名稱	容量	48 rxn	96 rxn	192 rxn
2 x Reaction Mix (RM)	0.6 mL	1管	2管	4管
<i>Bst</i> DNA Polymerase (EM)	60 uL	1管	2管	4管
Distilled Water (DW)	1.0 mL	1管	2管	2管
Primer Mix DNA (PM DNA)*	25 uL	1管	0管	0管
Positive Control DNA (PC DNA)*	0.1 mL	1管	0管	0管

\* 48 rxn DNA amplification kit 才有附，其他包裝沒有附。

# 相關產品

---

產品名稱	廠牌及產品編號
Sterilized tubes for master mix preparation	Axygen MCT-150-C
Pipettes	Axygen Axyjet 系列: AP-10, AP-100, AP-1000
Tips with filter	Axygen TF 系列: TF-200-L-R-S, TF-300-L-R-S
Loopamp reaction tube	Axygen PCR-02-C
Ice and ice box	
Centrifuge for micro-tubes	Labnet C1301
Vortex mixture	Labnet S0200

# Primer 設計及合成

---

## ▶ Primer 設計

- ▶ 請使用原廠設計網頁
- ▶ <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>
- ▶ 使用方式請參考後續介紹內容

## ▶ Primer 合成

- ▶ 請合成 HPLC 純化等級 primer
- ▶ 若為測試用 primer，純化等級建議至少為 OPC 以上

# 反應溶液配製 (Reaction Master Mix)

---

## Control

Reagent	Amount
RM (Reaction Mix)	12.5 uL
PM DNA (Primer Mix DNA)	2.5 uL
EM (Enzyme Mix)	1.0 uL
DW (Distilled Water)	7 uL
Total	23 uL

## Sample

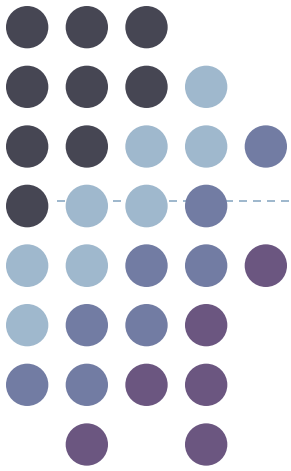
Reagent		Amount
RM (Reaction Mix)		12.5 uL
Primer	FIP	40 pmol
	BIP	40 pmol
	F3	5 pmol
	B3	5 pmol
EM (Enzyme Mix)		1.0 uL
DW (Distilled Water)		23-x uL
Total		23 uL



# 反應步驟

---

- ▶ 分裝 Master Mix 23 uL/tube
- ▶ 每管加入 DNA template 2 uL 使反應總體積為 25 uL
- ▶ 將 tube 放入 LA-320C 測定儀中反應
  - ▶ 60~65 度 30~60 分鐘
  - ▶ 80 度 5 分鐘
- ▶ 讀取儀器判定結果



# Outline

---

- ▶ LAMP 簡介
- ▶ LAMP 基本原理
- ▶ LAMP 操作流程
- ▶ **Eiken 公司的相關產品**

# Eiken 公司產品分類

---

- ▶ 增幅試劑
- ▶ 檢測試劑
  - ▶ 病原檢測試劑
  - ▶ 性別判定試劑
  - ▶ SNP 檢測試劑
- ▶ Primer Set
- ▶ 檢測儀器
- ▶ 其他



# Eiken 公司產品列表

---

## ▶ 增幅試劑

- ▶ Loopamp<sup>®</sup> DNA Amplification Reagent Kit
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> RNA Amplification Reagent Kit(RT-LAMP)

# Eiken 公司產品列表

## ▶ 病原檢測試劑

- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Mycoplasma pneumoniae* detection kit (肺炎黴漿菌)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Legionella* detection kit (退伍軍人桿菌)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> H1 pdm 2009 Influenza virus detection kit (豬流感)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> H5 subtype Influenza virus detection kit (禽流感)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> SARS detection kit (冠狀病毒)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Norovirus GI/GII Detection Kit (諾羅病毒)



# Eiken 公司產品列表

---

## ▶ 病原檢測試劑

- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Legionella* detection kit (退伍軍人桿菌)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Cryptosporidium* detection kit (隱孢子蟲)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Giardia lamblia* detection kit (鞭毛蟲)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Salmonella* detection kit (沙門氏桿菌)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Verotoxin-producing *Escherichia coli* Detection Kit
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Verotoxin (VT) Typing kit
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *Escherichia coli* O157 Detection Kit
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> *L.monocytogenes* Detection Kit
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Campylobacter Detection Kit



## ▶ 性別判定試劑

- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Bovine Embryo Sexing Kit (胎牛性別鑑定)

# Eiken 公司產品列表

---

## ▶ Primer set

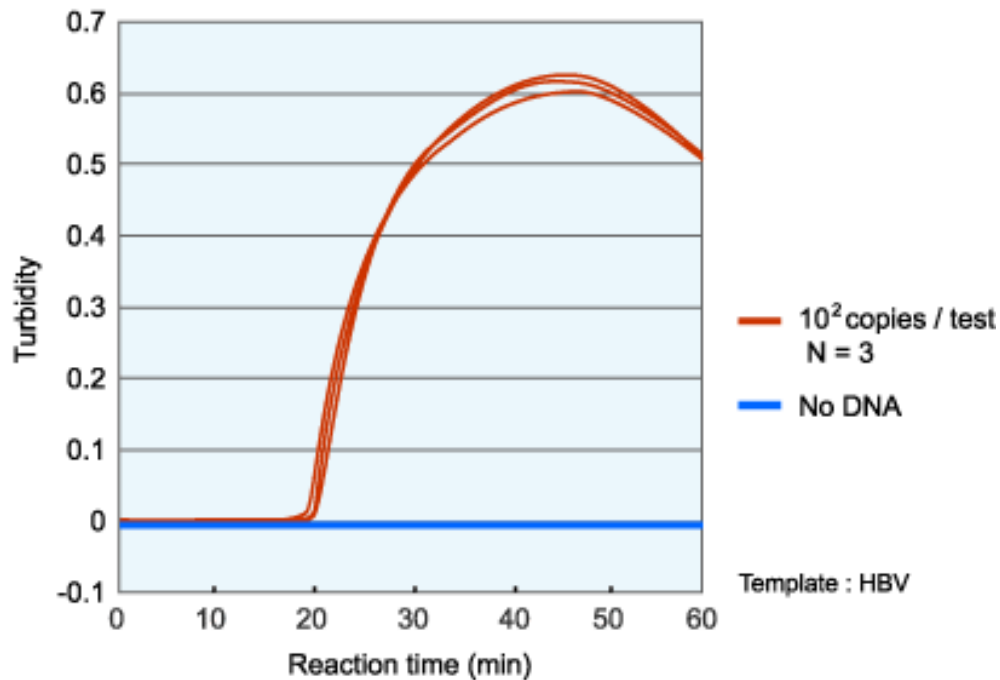
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for WNV (西尼羅河病毒)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for Avian Flu H5 (禽流感)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for Avian Flu H7 (禽流感)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for KHV (錦鯉疱疹病毒)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for *A.acidoterrestris* (嗜酸耐熱菌)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for *Flavobacterium psychrophilum* (冷水病)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Primer Set for Flu A (A型流感)



# Eiken 公司產品列表

## ▶ 測定裝置 (即時偵測)

### ▶ LA-500

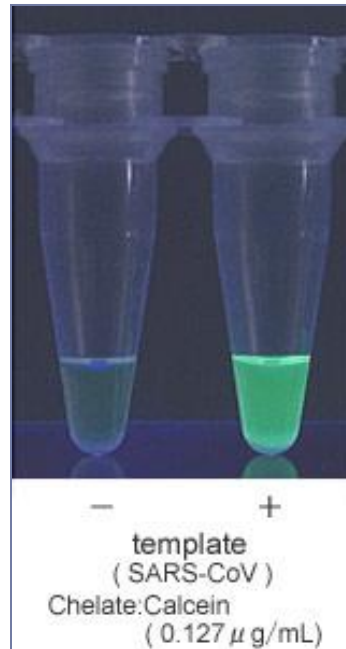




# Eiken 公司產品列表

## ▶ 其他

- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Florescent Visual Detection Kit (螢光試劑)
- ▶ Loopamp<sup>®</sup> Reaction Tube



## 如需檢測其他基因

---

- ▶ 可針對自己需要檢測的基因設計 primer，並搭配下列產品使用
  - ▶ Loopamp<sup>®</sup> DNA Amplification Reagent Kit
  - ▶ Loopamp<sup>®</sup> RNA Amplification Reagent Kit (RT-LAMP)
- ▶ Primer 設計請上 LAMP 原廠網頁
  - ▶ <http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/>
- ▶ 其他問題請來信或來電洽詢
  - ▶ [tech@bio-protech.com.tw](mailto:tech@bio-protech.com.tw)
  - ▶ 0800-231-530 #48 梁s

---

Thanks for your attention

