مجله ایمنی زیستی
دوره۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹٦

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه: یک روش نوین برای تکثیر DNA و RNA

محمد امین الماسی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

aminalmasi66@gmail.com

چکیده

تشخیص بیماری یک امر حیاتی در تصمیم‌گیری‌های درمانی مناسب است. درگذشته، تشخیص براساس جداسازی و شناسایی عامل بیماری‌زا بود که توسعه آزمون‌های سرولوژیکی را در طول زمان درپی داشت. امروزه، آزمون‌های مولکولی با حساسیت بالا مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و انواع آن، جایگزین روش‌های تشخیصی قدیمی‌تر شده‌اند. مانع اصلی در استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR نیاز به ترموسایکلر است که سیستم تکثیر هم‌دمایی مانند آزمون تکثیر هم‌دمای به واسطه حلقه (LAMP) یک جایگزین خوب برای آن است. LAMP، به واسطه منحصربه فرد بودنش، تبدیل به یک ابزار تشخیص مولکولی قدرتمند در دنیا شده است. این روش جدید تکثیر ژن، اسیدنوکلئیک را با سرعت، حساسیت، اختصاصیت و کارایی بالا تکثیر می‌کند. از ویژگی‌های مهم LAMP، سادگی دستورالعمل و هزینه پایین انجام آن است. از برجسته‌ترین ویژگی‌های این روش، فعالیت آنزیم‌های *BST* و *BSM* پلیمراز با خاصیت جایگزینی رشته است، که تکثیر ژن در نمونه‌های فرآوری نشده را فراهم می‌سازد. هزینه پایین و کاربردوستی در میان دیگر مزیت‌های LAMP، آن را به یک ابزار تشخیصی ایده‌آل برای حل مشکلات روش PCR و امثال آن تبدیل کرده است و امتیازات برجسته آن در پژوهش‌های مختلف، منجر به تغییراتی در این روش شده است. تا امروز، انواعی از آزمون‌های LAMP برای تشخیص تعداد زیادی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های باکتریایی، قارچی، ویروسی و انگلی توسعه یافته‌اند.

واژه‌های کلیدی: تشخیص، تکثیر هم‌دما، LAMP، RT-LAMP

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقدمه

تکثیر اسیدنوکلئیک یکی از بزرگترین دستاوردهای قرن ۲۱ است. تشخیص دقیق بیماری‌ها کلید درمان موثر، پیشگیری و دستیابی به پیش‌آگاهی است. در طول چند دهه گذشته، روش‌های تشخیصی بر پایه اسیدنوکلئیک برخی از چالش‌های پیش روی تشخیص بیماری‌ها را محدود نموده‌اند. برخی از این چالش‌ها در مواجه با تشخیص بیماری‌های عفونی ناشی از ویروس‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا، زمان‌بر بودن کشت میکروب و همچنین خطر ابتلا به طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها در روش‌های ایمونوسرولوژیکی است (۲ ،۱). روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) که در دهه‌های گذشته بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است، روشی سریع و حساس است که می‌تواند تعداد نسخه‌های اندکی از DNA را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص است، تکثیر کند. به علت کارایی بالا و قدرت زیاد PCR، این روش در سال‌های گذشته به طور گسترده‌ای در تشخیص سریع عوامل بیماری‌زا به کار گرفته شده است (٤ ،۳).

گرچه این روش دارای مزیت‌های بسیاری است اما دارای محدودیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به استفاده از چرخه‌های حرارتی زیاد جهت تکثیر (زمان‌بر است)، نیاز به دستگاه ترموسایکلر (گران‌قیمت است) و نیاز به روش‌های آشکارسازی و تشخیص محصول تکثیریافته (از مواد خطرناکی مانند اتیدوم بروماید استفاده می‌شود) اشاره نمود (۵-۷). اخیراً استفاده از روش Real-time PCR پژوهشگران را قادر ساخته تا با سرعت، حساسیت و اختصاصیت بالا عوامل بیماری‌زا را شناسایی کنند. متاسفانه در این روش، کارایی تکثیر از نمونه‌ای به نمونه دیگر متفاوت است. بازدارنده‌های تکثیر، حساسیت به آلودگی و خطای آزمایشی راه استفاده از این روش قدرتمند را دشوار می‌سازند. همچنین این روش نیاز به دستگاه و مواد گران‌قیمت با آشکارسازهای فلورسنت دارد و تنها افراد متخصص قادر به استفاده از این روش هستند (۱۰-۸). در طی ۱۰ سال گذشته، روش تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (Loop-Mediated Isothermal Amplification) که به اختصار به آن LAMP می‌گویند به علت سادگی، سرعت، کارآیی بالا و اختصاصیت منحصربه‌فرد، به طور گسترده‌ای در آنالیز اسیدنوکلئیک به کار گرفته شده است. در این روش از آنزیم‌های *BST* یا *BSM* پلیمراز و مجموعه‌ای از آغازگرهای اختصاصی، استفاده می‌شود. تجهیزات گران‌قیمت برای دستیابی به دقت بالا، مورد نیاز نیست و مراحل آن در مقایسه با PCR معمولی و Real-time PCR کمتر است (۱۲ ،۱۱).

۲- روش LAMP

روش LAMP تکیه بر چرخه‌های خودکاری دارد که در آنها رشته DNA سنتز شده، به وسیله *BST* یا *BSM* پلیمراز با فعالیت جایگزینی رشته به طور مداوم جایگزین و رشته جدید به طور پیوسته سنتز می‌شود. LAMP روشی ساده، سریع، اختصاصی و

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقرون به صرفه برای تکثیر اسیدنوکلئیک است که امتیاز آن در اختیار شرکت Eiken کشور ژاپن است (۹). متدولوژی این روش بر پایه استفاده از چهار آغازگر مختلف است که به طور اختصاصی شش ناحیه از ژن هدف را شناسایی می‌کنند و پیشروی فرآیند واکنش در یک دمای ثابت و پیوسته با استفاده از واکنش جایگزینی رشته صورت می‌گیرد (۲). تکثیر و شناسایی ژن می‌تواند تنها در یک مرحله به وسیله گرم‌خانه‌گذاری مخلوط نمونه‌ها، آغازگرها، آنزیم و اجزای مورد عمل، در یک دمای ثابت ٦٠ تا ٦٥ درجه سانتی‌گراد کامل شود (٥). روش LAMP می‌تواند cDNA را از روی RNA الگو سنتز کند و RNA با این روش تکثیر و تشخیص داده شود که به این روش RT-LAMP می‌گویند. این روش، مشابه تکثیر DNA است با این تفاوت که آنزیم نسخه‌برداری معکوس به مخلوط واکنش نیز اضافه می‌شود. واکنش RT-LAMP، شامل دو واکنش نسخه‌برداری معکوس و واکنش LAMP است (١١). با استفاده از مزیت پایداری آنزیم نسخه‌برداری معکوس *Avian myeloblastosis virus*(AMV) در دماهای بالا و بدون کاهش فعالیت آن، واکنش می‌تواند در دمای ٦٠-٦٥ درجه سانتی‌گراد صورت گیرد (١٣). آنزیم نسخه‌برداری معکوس *Moloney murine leukemia virus*(M-MLV) نیز می‌تواند در روش RT-LAMP استفاده شود اما باید توجه داشت که فعالیت این آنزیم بر خلاف آنزیم قبلی، در دمای بالاتر از ٤٥ درجه سانتیگراد از بین می‌رود (١٤).

٣ - مبانی علمی واکنش LAMP

وقتی که ژن هدف و مواد واکنشگر در یک دمای ثابت گرم‌خانه‌گذاری می‌شوند، ادامه واکنش طی مراحلی پیش می‌رود که شامل دو فاز است. فاز اول، فاز مقدماتی بوده و در دومین فاز، واکنش اصلی LAMP انجام می‌شود. در این روش از دو آغازگر داخلی یکی Forward Inner Primer (FIP) و دیگری Backward Inner Primer (BIP) و نیز دو آغازگر خارجی یکی Forward Outer Primer (F3) و دیگری Backward Outer Primer (B3) برای انجام واکنش استفاده می‌شود. در مرحله نخست واکنش، هر چهار آغازگر استفاده می‌شوند اما بعد در طی چرخه اصلی واکنش، تنها آغازگرهای داخلی برای سنتز DNA مورد استفاده قرار می‌گیرند. به همین دلیل در واکنش LAMPغلظت آغازگرهای داخلی همیشه بیشتر از آغازگرهای خارجی درنظر گرفته می‌شود. آغازگرهای داخلی هر یک شامل دو توالی مجزای متناظر با توالی‌های سنس و آنتی‌سنس در توالی DNAهدف هستند که یکی برای پرایمینگ (Priming) در مرحله نخست و دیگری برای سلف‌پرایمینگ (Self-priming) در مراحل بعدی عمل می‌کنند (٩، ٦، ٢). DNA سنتز شده اولیه، ساختاری ساقه-حلقه (stem-loop) را ایجاد می‌کند و واکنش چرخه‌ای با تجمع $١٠^{٩}$ کپی از قطعه هدف در کمتر از یک ساعت همراه است. محصولات نهایی، DNAهای ساقه-حلقه با چندین تکرار معکوس از توالی هدف و ساختارهای کلم-گل مانند با حلقه‌های چندگانه هستند (١٣، ١١).

٤- طراحی آغازگرهای LAMP

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

طراحی آغازگرهای LAMP بر اساس شش ناحیه درون توالی هدف و با استفاده از نرم‌افزار آنلاین PrimerExplorerV4 صورت می‌گیرد. دمای ذوب (Tm)، پایداری انتهای هر آغازگر، میزان نوکلئوتیدهای گوانین و سیتوزین (GC) و ساختار ثانویه، چهار فاکتور کلیدی در طراحی آغازگرها هستند. دمای ذوب با استفاده از روش Nearest-Neighbor تخمین زده می‌شود. این روش مشخص شده یک روش تخمینی است که مقداری نزدیکتر به مقدار واقعی را نمایش می‌دهد. Tm محاسبه شده تحت تأثیر شرایط آزمایشی مانند غلظت نمک و غلظت اولیگو است، به گونه‌ای که ترجیح داده می‌شود تحت شرایط آزمایشی ثابت (غلظت اولیگو ۰/۱ میکرولیتر، غلظت یون سدیم ۵۰ میلی‌مولار، غلظت یون منیزیم ٤ میلی‌مولار) محاسبه شود. انتهای آغازگرها به عنوان نقطه آغاز سنتز DNA به کار گرفته می‌شود و دارای میزان معینی از پایداری است. تغییرات انرژی آزاد (ΔG) بین انرژی آزاد محصولات و انرژی آزاد واکنش‌گر متفاوت است. پیشرفت واکنش به سمت تغییر انرژی آزاد (ΔG) منفی است. اتصال بین آغازگر و ژن هدف یک واکنش متعادل است و واکنش اتصال با یک ΔG کوچکتر پیشرفت می‌کند. میزان GC درحدود بین ٤۰ تا ٦٥ درصد درنظر گرفته می‌شود. آغازگرهای با میزان GC بین ۵۰ تا ٦۰ درصد مطلوب‌تر هستند. برای آغازگر داخلی مهم است که آغازگرها به گونه‌ای طراحی شوند که تشکیل ساختارهای ثانویه ندهند. همچنین برای جلوگیری از تشکیل دایمر، اطمینان از مکمل نبودن انتهاهای ′۳ مهم است (۹،٦).۵ روش‌های آشکارسازی محصولات تکثیریافته در LAMP تشخیص مشاهده‌ای (Visual detection) که مبتنی بر تشخیص به وسیله مشاهده است، روشی سریع و کارا و از خصوصیات منحصربه‌فرد روش LAMP است. در تشخیص مشاهده‌ای بوسیله کدورت‌سنجی (Turbidity)، کدورت ناشی از تشکیل رسوب در خلال واکنش است. آنالیزهای شیمیایی و اسپکتروفوتومتری نشان داده‌اند که رسوب ایجاد شده، پیروفسفات منیزیم است. در واقع هدف استفاده از رسوب ایجاد شده برای بنا نهادن یک روش تشخیصی جدید در واکنش LAMP بر اساس کدورت‌سنجی است. وجود یا عدم وجود DNA الگو در نمونه معیاری برای سنجش تکثیر و اندازه‌گیری کدورت در مخلوط واکنش است. زمانی که DNA تکثیر یابد، رسوبات در ته تیوب تجمع می‌یابند که به آسانی با چشم قابل مشاهده است و تأییدی بر وجود تکثیر DNA هدف است. مزایای این نوع از تشخیص مشاهده‌ای عبارت است از: ۱- روشی بسیار ساده است، زیرا فقط نیاز به یک مشاهده دارد. ۲- روشی سریع است، زیرا همزمان با انجام واکنش قابل انجام است و به هیچ زمانی جهت تشخیص نیاز ندارد. ۳- از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است، زیرا نیاز به ماده شیمیایی تشخیصی و یا دستگاهی جهت آشکارسازی ندارد. ٤- روشی ایمن است، زیرا از مواد شیمیایی مثل رنگ‌های فلورسانت و یا اتیدیوم بروماید که سمی و برای محیط‌زیست مضرند جهت آشکارسازی استفاده نمی‌شود. الماسی و همکارانش موفق شدند با

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

استفاده از تغییر رسوب به وجود آمده و استفاده از کربنات کلسیم و تشکیل رسوب پیروفسفات کلسیم به ماندگاری و پایداری کدورت حاصل از واکنش اضافه کنند (١٦ ،١٥). علاوه براین، استفاده از رنگ‌هایی مانند هیدروکسی نفتول بلو (HNB)، GenFinder و فنول‌رد (phenol red) نیز به تازگی رواج یافته‌اند. تکثیر مثبت به وسیله تغییر رنگ نمایان می‌شود. آزمون بر پایه این رنگ‌ها، یک مزیت عالی در مقایسه با آزمون‌های دیگر دارد و آن این است که رنگ قبل از شروع واکنش با نمونه مخلوط می‌شود و نیاز به باز کردن تیوب‌ها برای اضافه کردن رنگ نیست و در نتیجه خطر آلودگی کاهش می‌یابد (١٧-٢٢). یکی از راه‌های تشخیص مشاهده‌ای استفاده از مواد فلورسنات است. ماده فلورسانت کالسئین (calcein) وقتی به مخلوط واکنش اضافه شود، با یون‌های منیزیم ترکیب شده و مانع از اثر فلورسانت آن می‌شود. با انجام واکنش و آزاد شدن یون‌های پیروفسفات، این یون‌ها با منیزیم وارد واکنش شده و باعث جدا شدن منیزیم از کالسئین و تولید پیروفسفات منیزیم می‌شوند. در نتیجه کالسئین آزاد، قادر به تشعشع خواهد بود (٢). روش دیگر استفاده از پلیمر کاتیونی پلی‌اتیلن-ایمین (PEI) است. در پایان واکنش LAMP مقدار بهینه‌ای از PEI با وزن مولکولی کم اضافه می‌شود که سبب رسوب کمپلکس نامحلول LAMP-amplicon-PEI می‌شود. کاوشگرهای DNA برچسب‌دار شده با محصول LAMP هیبرید و در درون رسوب با هم ترکیب می‌شوند و این رسوب، فلورسانسی متناظر با الگوهای اسیدنوکلئیک تکثیرشده را منتشر می‌کند. انتشار فلورسانس می‌تواند به آسانی بوسیله چشم غیرمسلح زیر دستگاه UV مشاهده شود (٢٣). اضافه کردن مواد فلورسانتی مانند اتیدیوم‌بروماید (EtBr)، ژل‌رد (gel red) و سایبرگرینII (SYBRGreen II) به تیوب‌ها در پایان واکنش، روشی دیگر برای تأیید انجام واکنش است. در این روش مقدار بهینه‌ای از ماده فلورسانت به تیوب اضافه شده و در زیر نور UV مشاهده می‌شود. به علت خطرناک بودن این مواد، این روش زمانی استفاده می‌شود که کدورت حاصل از رسوب پیروفسفات منیزیم دیده نشود (٢٥ ،٢٤). در LAMP می‌توان برای مشاهده نتایج، محصولات را الکتروفورز نمود که در این صورت باندهای روی ژل تک باند نبوده و الگوی نردبانی شکلی را تولید می‌کند؛ زیرا محصولات تولید شده دارای اندازه‌های مختلفی بوده و شامل توالی‌های متناوب معکوس و تکراری از توالی موردنظر هستند (٩ ،٢).

٦- کاربردهای LAMP

کاربردهای این روش نوین روز به روز در حال افزایش است و هر روز گزارشات جدیدی از استفاده از این روش در زمینه‌های مختلف منتشر می‌شود. روش LAMP اولین بار برای تشخیص ژن $stxA_2$ در سلول‌های اشریشاکلی استفاده شد و ثابت شد که روش in situ LAMP سبب آسیب سلولی کمتر و تصاویر واضح‌تر در مقایسه با in situ PCR می‌شود (٢٦). روش LAMP به طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا (٢٨ ،٢٧ ،٢٥ ،٣ ،١)، ویروس‌های بیماری‌زا (٣١-

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

۲۹)، قارچ‌های بیماری‌زا (۳۳، ۳۲)، پروتوزوآ (۳۶-۳٤)، مایکوپلاسما (۳۷)، فیتوپلاسما (۳۸)، ویروئید (۱۳) و مخمر (۳۹) به کار گرفته شده است. علاوه براین، از این روش در تشخیصات دیگری غیر از عوامل بیماری‌زا مانند تشخیص جهش (٤۰)، ترکیبات تراریخته (GMOs) (۲٦، ٤)، تعیین جنسیت جنین (٤۱)، تشخیص تومور (٤۲) و مقاومت به دارو و آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری (٤۳) در سال‌های گذشته استفاده شده است.

۷ - پیشرفت‌های روش LAMP

در طی چند سال گذشته، LAMP به عنوان یک ابزار جدید تکثیر ژن، در میان پژوهشگران محبوبیت و علاقه زیادی پیدا کرده است که منجر به تلاش مستمر در جهت بهبود کارآیی و برخی تحولات قابل ملاحضه شده است. ناگامین و همکارانش (Nagamine et al.) توانستند با استفاده از دو آغازگر دیگر (آغازگرهای حلقوی) علاوه بر چهار آغازگر به کار رفته در واکنش، نقاط شروع جهت سنتز DNA را افزایش دهند و از این طریق زمان شناسایی ژن هدف را کاهش دهند (٦).

روش Real-time LAMP، ترکیبی از دو روش LAMP و Real-time برای پایش مقدار کمی DNA در هر لحظه از واکنش به صورت مانیتورینگ است. آنالیز کمی یا بوسیله اندازه‌گیری فلورسانس به دست آمده از رنگ استفاده شده در چرخه دمایی و یا به وسیله اندازه‌گیری کدورت با استفاده از Real-time turbidimeter انجام می-پذیرد. روش اندازه‌گیری کدورت روشی مؤثر و ارزان در مقایسه با روش اندازه‌گیری فلورسانس است که نیاز به تجهیزات و مواد گران قیمت ندارد (٤٤، ۱۵، ۱۰، ۹).

آزمون Lateral Flow Dipstick (LFD) که با نام آزمون ایمونوکروماتوگرافی (ICS) نیز شناخته شده است، ابزاری ساده برای تشخیص حضور یا عدم حضور جزء موردنظر در نمونه است. به طور معمول این آزمون‌ها برای تشخیص پزشکی، آزمایشات خانگی یا کاربردهای آزمایشگاهی استفاده می‌شوند. این آزمون شکلی از ایمنی‌سنجی است که نمونه مورد آزمایش در امتداد یک سوبسترای جامد از طریق عمل مویینگی جریان می‌یابد. بعد از آن نمونه با یک معرف رنگی مواجه می‌شود که با آن مخلوط شده و سپس از نواحی یا خطوط برخوردی در سوبسترا عبور می‌کند که با یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن از قبل تیمار شده است (٤٦، ٤۵). بسته به حضور جز موردنظر در نمونه، مواد رنگی می‌توانند در این نواحی یا خطوط متصل شوند. تمام آزمون‌ها شامل یک خط کنترل متناسب با نمونه هستند که برای اعتبار نتایج آزمون استفاده می‌شود. ظهور دو خط، نشانه نتیجه مثبت است، در حالی که نتیجه منفی تنها خط کنترل را ایجاد می‌کند. اگر هیچ خطی ظاهر نشود، آزمون باید دوباره تکرار شود (٤۸، ٤۷).

Micro-LAMP شکل جدیدی از LAMP است که از تراشه میکروسیال برای تشخیص آسان و کمیت-سنجی مقدار اسیدنوکلئیک بهره می‌گیرد. این روش تحت شرایط هم‌دما انجام شده و می‌توان مقدار کمی ژن‌های تکثیر شده را در هر لحظه از زمان مشاهده نمود (٤۹).

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

Lyophilized LAMP، روش دیگری است که هدف آن ساده نمودن و سرعت بخشیدن به کار تشخیص از طریق ترکیب نمودن همه اجزای واکنش با هم و تبدیل آن به یک کیت به نام کیت لیوفیلیزه LAMP است و تنها DNA الگو یا نمونه به این مخلوط اضافه می‌شود. این کیت‌ها به صورت تجاری برای تشخیص سریع برخی از بیماری‌ها در دسترس هستند (۵۱، ۵۰).

Electric LAMP (eLAMP)، یک دستگاه طراحی شده برای بهبود کارایی آغازگرهای قرارگرفته بر روی ژن هدف در واکنش است که به پژوهشگران کمک می‌کند تا امکان استفاده از پرایمر موجود را برای تکثیر توالی‌های مختلف مورد ارزیابی قرار دهند (۵۲).

۸- نتیجه‌گیری

در LAMP کل واکنش تکثیر تحت شرایط هم‌دما (۶۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد) به شکل پیوسته انجام شده که یک حمام آبگرم یا بلوک حرارتی، می‌تواند دمای مورد نیاز را فراهم سازد. در اینجا برخلاف PCR، هیچ زمانی جهت تغییر دما از دست نمی‌رود و واکنش در دمای بهینه فعالیت آنزیم به شکل پیوسته انجام می‌گیرد (۲). LAMP قادر است DNA را با کارایی بالا در شرایط هم‌دما بدون اثر معنی‌داری بر روی وجود DNA غیرهدف تکثیر کند. این شناسایی با تعداد کپی اندکی قابل انجام است که از این نظر نسبت به PCR معمولی بسیار برتری دارد. در این روش به واسرشت‌سازی اسیدنوکلئیک دو رشته‌ای به تک رشته‌ای جهت شروع واکنش پلیمریزاسیون نیاز نیست. حتی بدون واسرشت‌سازی اولیه، واکنش به راحتی انجام می‌پذیرد که به سبب فعالیت آنزیم‌های *BST* و *BSM* پلیمراز با خاصیت جایگزینی رشته است (۹، ۶). استفاده از چهار آغازگر اختصاصی شناسایی کننده شش ناحیه معین بر روی الگو سبب اختصاصیت بسیار بالا می‌شود و با افزودن دو آغازگر حلقه‌ای سرعت واکنش افزایش می‌یابد (۱۱). در اینجا نیاز به استفاده از مواد شیمیایی خطرناکی مانند اتیدیوم بروماید نیست و کدورت حاصل از رسوب منیزیم پیروفسفات یا کلسیم پیروفسفات برای مشاهده انجام واکنش کافی است (۳۰). محصول تکثیر شده دارای ساختار مرکبی از توالی‌های متناوب معکوس و تکراری از توالی هدف است (۳۳). RNA نیز می‌تواند به عنوان الگو، با استفاده از این روش تنها با اضافه نمودن آنزیم نسخه‌برداری معکوس تکثیر شود (۲۶، ۱۱).

روش LAMP به علت ویژگی‌هایی که دارد در سطح مزرعه‌ای و آزمایشات صحرایی قابل استفاده است. این روش کمتر تحت تأثیر مواد مهارکننده موجود در نمونه قرار می‌گیرد، به گونه‌ای که می توان مرحله استخراج DNA را در این روش حذف نموده و مراحل انجام واکنش را کمتر کرد (۴۴، ۱۸، ۱۶، ۱۰، ۴).

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

References

منابع مورد استفاده

1. Hosseini SF, Almasi MA, Kardi MT, Moghim S, Karbasizade V. 2014. Molecular Detection of Clostridium Difficile in Patients with Diarrhea via LAMP Technique. Journal of Mazandaran University Medical Science 24, 36-42. (In Farsi with English abstract).
2. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28:e63.
3. Moradi A, Nasiri J, Abdollahi H, Almasi M. 2012. Development and evaluation of a loopmediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. European Journal of Plant Pathology 133:609-620.
4. Almasi MA, Aghapour-ojaghkandi M, Bagheri K, Ghazvini M, Hosseyni-dehabadi SM. 2015. Comparison and evaluation of two diagnostic methods for detection of npt II and GUS genes in Nicotiana tabacum. Applied Biochemistry and Biotechnology 175:3599-3616.
5. Almasi MA. 2015. Establishment and Application of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Grapevine Fanleaf Virus. Molecular Biology 4:5.
6. Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes 16:223-229.
7. Ahmadi S, Almasi MA, Fatehi F, Struik PC, Moradi A. 2012. Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with hydroxynaphthol blue dye. Journal of phytopathology 161:120-124.
8. Almasi MA, Erfanmanesh M, Jafary H, Hosseinidehabadi SM. 2013. Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with the Genefinder^{TM} dye. Journal of Virological Methods 192:51-54.
9. Haghnazari A, Almasi MA, Hoseini SM. 2011. LAMP and guide of primer design by PrimerExplorerV4 software. Azarkelk press, Zanjan, Iran. (In Farsi with English abstract).
10. Moradi A, Almasi MA, Jafary H, Mercado-Blanco J. 2014. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assy for the specific detection of *Verticillium dahliae*. Journal of Applied Microbiology 116:942-954.
11. Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. 2003. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. Archives of Virology 148:1713-1720.
12. Almasi MA, Moradi A, Nasiri J, Karami S, Nasiri M. 2012. Assessment of performance ability of three diagnostic methods for detection of *Potato leafroll virus* (PLRV) using different visualizing systems. Applied Biochemistry and Biotechnology 168:770-784.
13. Boubourakasa IN, Fukuta S, Kyriakopoulou PE. 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods 160:63-68.
14. Nie X. 2006. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. Plant Disease 89:605-610.
15. Almasi MA, Jafary H, Moradi A, Zand N, Ojaghkandi MA, Aghaei S. 2013. Detection of coat protein gene of the *Potato leafroll virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Plant Pathology and Microbiology 4:156.
16. Almasi MA, Moradi A, Ojaghkandi MA, Aghaei S. 2013. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Plant Pathology and Microbiology 4:177.

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

17. Almasi MA, Aghapour-Ojaghkandi M, Aghaei S. 2013. Visual detection of *Curly top virus* by the colorimetric loop-mediated isothermal amplification. Plant Pathology and Microbiology 4:198.

18. Almasi MA, Dehabadi SH, Eftekhari Z. 2013. Immunocapture loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) without DNA extraction. Plant Pathology and Microbiology 4:185.

19. Almasi MA, Dehabadi SH. 2013. Colorimetric immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Potato virus y*. Plant Pathology and Microbiology 4:188.

20. Almasi MA, Ojaghkandi MA, Hemmatabadi A, Hamidi F, Aghaei S. 2013. Development of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Tomato yellow leaf curl virus*. Plant Pathology and Microbiology 4:153.

21. Cardoso TC, Ferrari HF, Bregano LC, Silva-Frade C, Rosa AC, Andrade AL. 2010. Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. Molecular and Cellular Probes 24:415-417.

22. Ma XJ, Shu YL, Nie K, Qin M, Wang DY, Gao RB, Wang M, Wen LY, Han F, Zhou SM, Zhao X, Cheng YH, Li DX, Dong XP. 2010. Visual detection of pandemic influenza A H1N1 Virus 2009 by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. Journal of Virological Methods 167:214-217.

23. Mori Y, Hirano T, Notomi T. 2006. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnology 6:1-10.

24. Tsai SM, Chan KW, Hsu WL, Chang TJ, Wong ML, Wang CY. 2009. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of orf virus. Journal of Virological Methods 157:200-204.

25. Kouguchi Y, Fujiwara T, Teramoto M, Kuramoto M. 2010. Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic Escherichia coli isolates. Molecular and Cellular Probes 24:190-195.

26. Fukuta S, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Hasegawa M, Hayashi I, Hashimoto M, Kanbe M. 2004. Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms. Eur Food Res Technol. 218:496-500.

27. Qiao YM, Guo YC, Zhang XE, Zhou YF, Zhang ZP, Wei HP, Yang RF, Wang DB. 2007. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Bacillus anthracis spores. Biotechnology Letters 29:1939-1946.

28. Zhang J, Zhang GH, Yang L, Huang R, Zhang Y, Jia K, Yuan W, Li SJ. 2011. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of Mycobacterium bovis. The Veterinary Journal 187:393–396.

29. Xu HD, Feng J, Guo ZX, Ou YJ, Wang JY. 2010. Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods 163:123-128.

30. Almasi MA, Haghnazari A, Moradi A, Saberfar E. 2012. Different methods of RT-LAMP for detection of potato leaf roll virus (PLRV). Genetic Engineering and Biosafety Journal 1, 1-8. (In Farsi with English abstract).

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

31. Almasi MA, Hosseyni-Dehabadi SM, Aghapour-Ojaghkandi M. 2014. Comparison and evalution of three diagnostic methods for detection of *Beet curly top virus* in sugar beet using different visualizing systems. Applied Biochemistry and Biotechnology 173:1836-1848.

32. Sun J, Najafzadeh MJ, Vicente V, Xi L, Hoog GS. 2010. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by Fonsecaea agents of chromoblastomycosis. Journal of Microbiological Methods 80:19-24.

33. Niessen L, Vogel RF. 2010. Detection of Fusarium graminearum DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. International Journal of Food Microbiology 140:183-191.

34. Njiru ZK, Mikosza ASJ, Matovu E, Enyaru JCK, Ouma JO, Kibona SN, Thompson RCA, Ndungu JM . 2008. African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. International Journal for Parasitology 38:589-599.

35. Njiru ZK, Ouma JO, Enyaru JC, Dargantes AP. 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of Trypanosoma evansi strain B. Experimental Parasitology 125:196-201.

36. Lin X, Chen Y, Lu Y, Yan J, Yan J. 2009. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic Leptospira. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 63:237-242.

37. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. 2005. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Mycoplasma pneumonia. Journal of Medical Microbiology 54:1037-1041.

38. Obura E, Masiga D, Wachira F, Gurja B, Khan ZR. 2011. Detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). Journal of Microbiological Methods 84:312-316.

39. Hayashi N, Arai R, Tada S, Taguchi H, Ogawa Y. 2007. Detection and identification of Brettanomyces Dekkera sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. Food Microbiology 24:778-785.

40. Inacio J, Flores O, Spencer-Martins I. 2008. Efficient identification of clinically relevant Candida yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with hybridization to species-specific oligonucleotide probes. Journal of Clinical Microbiology 46:713-720.

41. Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Watanabe K, Kojiya S, Notomi T, Minamihashi A. 2006. Rapid sexing of water buffalo (Bubalus bubalis) embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology 66:1249-1256.

42. Horibe D, Ochiai T, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F, Gun M, Tanizawa T, Hayashi H. 2006. Rapid detection of metastasis of gastric cancer using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Internatinal Journal of Cancer 120:1063-1069.

43. Lee MF, Chen YH, Hsu HJ, Peng CF. 2010. 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. Journal of Microbiological Methods 83:53-58.

44. Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Inagaki S, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Kojima S, Asano S. 2006. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. Journal of Virological Methods 132:216-221.

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018

45. Soliman H, El-Matbouli M. 2010. Loop-mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of cyprinid herpes virus-3. Molecular and Cellular Probes 24:38-43.

46. Arunrut N, Prombun P, Saksmerprome V, Flegel TW, Kiatpathomchai W. 2011. Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Journal of Virological Methods 171:21-25.

47. Lu Y, Liu J. 2009. Catalyst-functionalized nanomaterials. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 1:35–46.

48. Njiru, ZK. 2011. Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 69:205-209.

49. Fang X, Liu Y, Kong J, Jiang X. 2010. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens. Anal Chemistry 82:3002-3006.

50. La Barre P, Hawkins KR, Gerlach J, Wilmoth J, Beddoe A, Singleton J, Boyle D, Weigl B. 2011. A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity–toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings. PLoS One 6:e19738.

51. Selvam MM, Sajitharan D, Paul MW. 2013. Associated technologies ensures complete Loop-mediated isothermal amplification: Platform for pathogen diagnosis. African Journals of Biotechnology 12:6049-6054.

52. Salinas NR, Little DP. 2012. Electric LAMP: Virtual loop-mediated isothermal Amplification. ISRN Bioinformatics. DOI: 10.5402/2012/696758.

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 18:28 +0430 on Thursday June 21st 2018