

BioSunLAMP: 一个用于环介导等温扩增的引物设计软件

查磊¹, 蔡欣¹, 应晓敏¹, 徐东刚¹, 曹源^{2*}, 李伍举¹

[摘要] **目的** 环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型等温核酸扩增方法。由于其具有简便、高效、特异性高和成本低等优点,在甲型H1N1流感和肺结核等流行病检测中得到了广泛应用。在LAMP技术中,关键的起始步骤是设计合适的引物序列。为了让引物设计更加方便与高效,我们开发了LAMP引物设计软件BioSunLAMP。**方法** 采用Delphi程序设计语言开发了界面友好、便于使用的软件系统。**结果** 经甲型H1N1流感、结核分枝杆菌实验验证,BioSunLAMP软件设计的引物达到了预期效果。此外,与同类软件相比,BioSunLAMP还具有如下特点:①集引物设计与引物特异性分析于一体,可以通过本地数据库或远程调用NCBI的相关数据库来检查引物特异性;②支持针对多序列的通用引物与特异引物设计。**结论** BioSunLAMP软件的开发,为LAMP技术的普及提供了很好的生物信息学支持。

[关键词] BioSunLAMP; LAMP; 引物设计

[中图分类号] TP31 **[文献标志码]** A

[文章编号] 1674-9960(2012)03-0230-04

BioSunLAMP: A software system for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer design

CHA Lei¹, CAI Xin¹, YING Xiao-min¹, XU Dong-gang¹, CAO Yuan^{2*}, LI Wu-ju^{1*}

(1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the 90th Hospital, Jinan 250031, China)

* Co-corresponding authors, LI Wu-ju, Tel: 010-66931324, E-mail: liwj@nic.bmi.ac.cn; CAO Yuan, Tel: 0531-51666415, E-mail: labs.net@gmail.com

[Abstract] **Objective** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel approach to nucleic acid amplification. Due to its user-friendliness, high specificity, efficiency and low cost, LAMP method is widely used for detecting infectious diseases such as H1N1 flu and tuberculosis. The key initial step for LAMP method is to design a set of proper primers. In order to make primer design easier, we developed a software system, BioSunLAMP, for primer selection. **Methods** Delphi was employed to develop the user-friendly and easy-to-use software. **Results** BioSunLAMP was successfully applied to design the primers for the H1N1 flu and tuberculosis. Moreover, compared to other similar tools, BioSunLAMP had the following features. First, primer design and specificity checking were integrated into one system. In addition, the local nucleotide database or remote NCBI nucleotide database could be called for primer specificity check. Second, it could be used to design common and specific primers for a set of closely-related multiple sequences. **Conclusion** BioSunLAMP provides better bioinformatics support for the wide application of LAMP method.

[Key words] BioSunLAMP; LAMP; primer design

环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由Notomi等^[1]于2000年发明的一种新型等温核酸扩增方法,与目前常用的PCR技术相比,具有灵敏度高、结果肉眼可辨、扩增

速度快和不需要昂贵的循环仪等优点。因此,自发明以来,LAMP已被广泛应用于多种病原体检测^[2-4]。然而,与常规PCR技术相同,LAMP技术的成功应用需要设计合适的引物序列。

目前,主要有2个软件用于LAMP引物设计,分别为Eiken Chemical公司开发的PrimerExplorer^[5]和Torres等^[6]开发的LAVA,其中PrimerExplorer比较常用。然而,这2个软件还存在如下缺陷:(1)缺少引物特异性检测步骤,尽管LAMP引物是由多条序列组成,特异性相对于PCR引物来说比较高,但仍

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31071157)

[作者简介] 查磊,男,博士研究生,研究方向:生物信息学

[作者单位] 1. 军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850;
2. 济南军区总医院实验诊断科,济南 250031

[通讯作者] 李伍举, Tel: 010-66931324, E-mail: liwj@nic.bmi.ac.cn; 曹源, Tel: 0531-51666415, E-mail: labs.net@gmail.com

有可能产生误判。在 PrimerExplorer 和 LAVA 中,若需要对某条序列的引物设计结果进行特异性检测,需要用另外的软件完成;(2)在检测野生型与突变型序列时,需额外进行多序列比对,根据设计目的不同,选取共同片段或者突变片段作为靶基因来设计引物。尽管 PrimerExplorer 在第 4 版中提供了导入多序列比对结果的功能,但直接融合多序列比对功能并自动进行相应的引物设计将会更加方便实验室人员的使用。为了克服上述软件的不足,我们开发了 LAMP 引物设计软件 BioSunLAMP,增加了引物特异性检测以及针对多序列的通用引物与特异引物设计功能,在一个软件中实现了 LAMP 引物设计所需的全部功能,方便了实验室人员的使用。

1 引物设计规则

LAMP 引物的设计原理如图 1 所示。主要针对靶基因及其互补片段的 6 个不同位点设计如下 4 条引物:由靶基因互补序列的 F1c 区域以及靶基因的 F2 区域组成的上游内部引物(forward inner primer, FIP 引物)、由靶基因的 B1c 区域和靶基因互补序列的 B2 区域组成的下游内部引物(backward inner primer, BIP 引物)、上游外部引物(forward outer primer, F3 引物)、下游外部引物(backward outer primer, B3 引物)。此外,为加快实验反应速度,根据需要,还可以增加 LF(loop primer forward)、LB(loop primer backward)两条环状引物。



图 1 LAMP 引物相对位置展示

参照 PrimerExplorer 以及 Tomita 等^[7]的设计原则,并根据我们实际实验中总结的一些经验,引物设计规则如下所述。

1.1 序列 GC 含量

根据序列 GC 含量的不同,将序列分为三类,分别进行设计。GC 含量在 40% ~ 65% 的序列定义为普通序列,GC 含量大于 65% 的定义为 GC 富集序列,GC 含量小于 40% 的定义为 AT 富集序列。GC 含量的不同影响到解链温度(T_m 值)以及引物长度。

1.2 引物长度

根据序列 GC 含量的不同,设置了不同的引物长度,如表 1 所示。

1.3 解链温度

根据序列 GC 含量的不同,设置了不同的引物

解链温度(T_m 值),如表 2 所示。

表 1 不同类型序列的引物长度

序列类型	引物	引物长度(nt)
普通序列	F1c、B1c	20 ~ 24
	F2、B2	18 ~ 22
	F3、B3	18 ~ 25
AT 富集序列	F1c、B1c	20 ~ 28
	F2、B2	18 ~ 25
	F3、B3	20 ~ 28
GC 富集序列	F1c、B1c	15 ~ 22
	F2、B2	15 ~ 20
	F3、B3	15 ~ 20

表 2 不同类型序列的引物解链温度

序列类型	引物	解链温度(T_m 值)
普通序列	F1c、B1c	64 ~ 66℃
	F2、B2、F3、B3	59 ~ 61℃
	F1c、B1c	60 ~ 63℃
AT 富集序列	F2、B2、F3、B3	55 ~ 58℃
	F1c、B1c	64 ~ 68℃
GC 富集序列	F2、B2、F3、B3	59 ~ 63℃

1.4 引物间距

引物间距是指某一引物的 3' 端最后一个碱基与其下游另一引物(若另一引物位于互补序列上,则取互补序列的对应位置)的 5' 端第一个碱基之间所间隔的碱基数目。F2 与 B2 引物间距为 120 ~ 180 nt, F3 与 F2 引物间距为 0 ~ 20 nt, F1c 与 B1c 引物间距为 0 ~ 100 nt。

1.5 引物末端稳定性

引物末端稳定性采用引物末端 6 个碱基与靶标序列结合前后的自由能差值(ΔG)来衡量。自由能差值采用 SantaLucia 方法^[8]进行计算。F2、B2、F3、B3、LF、LB 引物的 3' 端自由能差值应该 ≤ -4 kcal/mol, F1c、B1c 引物的 5' 端自由能差值应该 ≤ -3 kcal/mol。

基于上述设计原则,我们开发了 LAMP 引物设计软件 BioSunLAMP。

2 设计流程

2.1 输入待设计序列

BioSunLAMP 支持三类序列输入方法:(1)通过选择物种、基因、正负链以及起始终止位点来得到序列;(2)在文本框中输入或黏贴待设计序列,可以输入单条或多条 FastA 格式序列;(3)可以选择打开一个包含单条或多条序列的 FastA 格式文件。如果输入了多条序列,可以勾选多序列比对选项以设计通用或特异引物。序列输入界面如图 2 所示。



图2 BioSunLAMP 序列输入界面

2.2 参数设定

在参数设定界面,可以从序列性质、引物长度、解链温度、引物间距等6个方面对1.1~1.5中的各项默认参数进行微调,以便更符合实验的需要。参数设置界面如图3A所示。

2.3 引物特异性检测

对于设计好的引物,我们采用Blast程序对其进行特异性检验。在此步骤中,需要设置如下参数:(1)用于特异性检验的比对数据库。BioSunLAMP软件支持本地数据库以及NCBI远程数据库。如果

使用本地数据库,勾选Local Blast选项,并输入本地数据库的路径。如果使用远程数据库,勾选Remote Blast选项,并在下拉框中选择相应的NCBI数据库。(2)设置每组引物所包含的引物条数,以及这些引物中,允许与数据库中非靶标序列匹配的最多引物条数。一般来说,在每组6条引物中,最多容许4条引物序列与数据库中非靶标序列匹配。参数设置界面如图3B所示。

在上述设置完成后,点击Run按钮程序即开始自动设计。

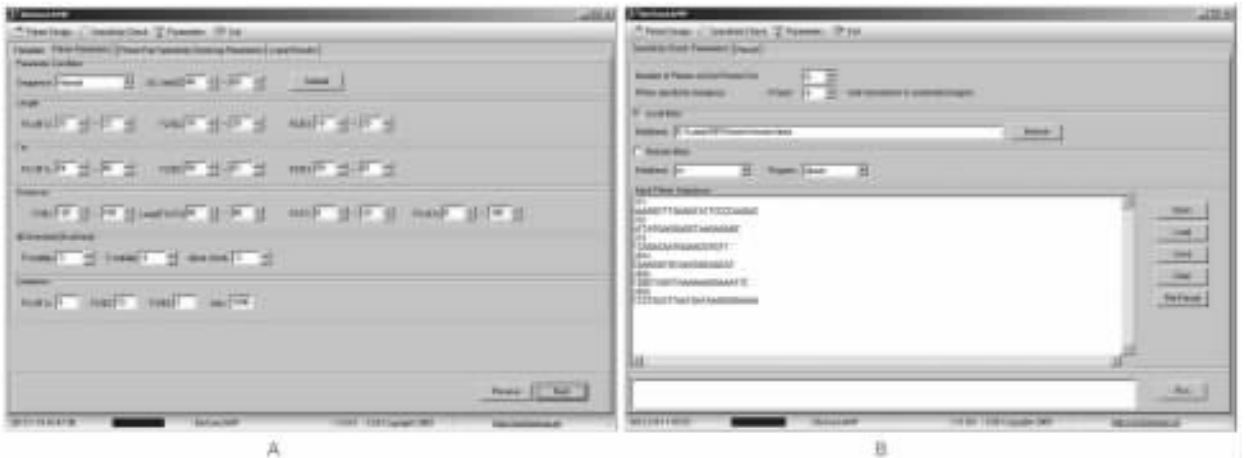


图3 BioSunLAMP 参数设置界面(A)和引物特异性检测界面(B)

3 设计实例:甲型流感的LAMP引物设计

甲型流感是3种流感病毒中较易发生变异的一种流感病毒,对人类健康有着重要的影响。特别是2009年甲型H1N1流感在国际及国内的流行,更是对公众健康造成了严重威胁。我们针对报道的首例

甲型H1N1病毒核酸序列,采用BioSunLAMP软件设计了特异性的引物。

3.1 序列来源

选取首例甲型H1N1流感序列作为设计靶基因 { influenza A virus [(A/California/04/2009(H1N1)], FJ966082 },选取下列流感序列作为比对序列:甲型

H3N2 流感序列} influenza A virus [(A/Swine/Minnesota/593/99 (H3N2)], AF251427 }、乙型流感序列 [influenza B virus (B/New York/12/2007), EU515996]以及 H5N1 禽流感序列} influenza A virus [A/chicken/Vietnam/200/2005(H5N1)], EU930876 }序列。以上序列均来自 NCBI 数据库。将上述序列存为 FASTA 文件,用 BioSunLAMP 软件打开,勾选 Multi Sequence 选项,并勾选 Specific 以设计特异性引物。在设计特异性引物时,BioSunLAMP 默认以第一条序列作为靶基因进行设计。

3.2 比对数据库

从 NCBI 中下载了全部病毒序列,存为 Virus 数据库,作为比对数据库。

3.3 参数设置

序列 GC 含量为 40.68%,为普通序列,因此,保持默认参数。

3.4 特异性检测

为节省比对时间,在特异性检测页面,选择进行本地 Blast,并选择事先下载的 Virus 数据库作为比对数据库。在进行特异性比对时,参数设置一般为 6 条 LAMP 引物序列中,有 2 条或以上引物序列与比对数据库中的序列有差别即可保证所设计引物具有较好的特异性。

在上述步骤完成后,点击 Run 按钮,BioSunLAMP 软件即自行设计适合的引物,并检测其特异性。设计结果如表 3 所示。经过实验验证^[9],该引物能够特异性地识别甲型 H1N1 样本。

表 3 利用 BioSunLAMP 软件分析 H1N1 设计的 LAMP 引物

引物类别	引物序列(5'-3')	引物长度
FIP	GTCCTGGGCAATATCTCAAACCTTTTTATTATGAGG- AGCTAAGAGAGC	50
BIP	CAAAGGTGTAACGGCAITTTTGAATTCCTTTTTTAA- CTAGCCA	44
F3	TCAGACAATGGAACCTGTT	19
B3	CTTCCCTTTATCATTAATGTAGGA	25

从上述设计实例可以看出,BioSunLAMP 软件在设计 LAMP 引物时,仅需要输入待设计序列,程序将自动完成多序列比对、特异性检测等步骤,这将使得引物设计更加简便与高效,也使得实验室人员能

够在没有相关生物信息学知识的情况下,设计出可靠的引物。

总之,为了克服目前 LAMP 引物设计软件的不足,我们开发了 BioSunLAMP 引物设计软件,与目前软件相比,BioSunLAMP 具有如下特点:(1)集引物设计与引物特异性分析于一体;(2)支持针对多序列的通用引物与特异引物设计。目前,该软件已应用于甲型 H1N1 流感、结核分枝杆菌^[10]等实验中,所设计引物的可靠性与特异性得到了实验验证。

【参考文献】

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acid Res*, 2000, 28 (12):63.
- [2] Hong TCT, Mai QL, Cuong DV, *et al.* Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronaviruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5):1956 - 1961.
- [3] Poon LLM, Leung CSW, Chan KH, *et al.* Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1):427 - 430.
- [4] Torinawa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Microbiol Immunol*, 2006, 50(5):379 - 387.
- [5] <http://primerexplorer.jp/e,2009-01>.
- [6] Torres C, Vitalis EA, Baker BR, *et al.* LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12 (240):1471 - 2105.
- [7] Tomita N, Mori Y, Kanda H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protocols*, 2008, 3(5):877 - 882.
- [8] SantaLucia J. A unified view of polymer, Dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-Neighbor thermodynamics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 2(95):1460 - 1465.
- [9] 付文亮,蔡欣,查磊,等. RT-LAMP 检测甲型 H1N1 病毒核酸几种结果判定方法[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(5): 68 - 70.
- [10] Hong M, Zha L, Fu WL, *et al.* A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 28(2):523 - 531.

(孙承媛 编辑 2012-02-16 收稿)