

海藻糖对冷冻干燥的 LAMP 反应体系的保护效果

李美霞^{1,2} 张庆利² 刘利平¹ 黄 捷^{2*} 谢国驹²

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 环介导等温扩增(LAMP)技术近年来被广泛应用于病原生物的检测。为了解决 LAMP 反应试剂混合物在室温条件下的储运问题,本研究对添加 5%、10% 和 15% 海藻糖(质量/体积, g/ml) 的 LAMP 反应试剂混合物进行冷冻干燥处理,研究了其在 4℃、25℃ 和 37℃ 储藏条件下活性维持的情况。研究表明,添加 15% 海藻糖能最大程度地保护 LAMP 反应试剂混合物的活性。相对于未经处理的普通 LAMP 体系混合物而言,添加 15% 海藻糖并经冷冻干燥的试剂混合物在 4℃、25℃ 和 37℃ 储藏条件下的活性半衰期分别为 112.3、36.2 和 6.2 d,分别为对照组的 6.5、8.7 和 2.1 倍。在 LAMP 反应试剂混合物中添加海藻糖并进行冷冻干燥处理成本不高、方法简单,将有助于推动 LAMP 方法在各领域的大规模推广应用。

关键词 真空冷冻干燥 环介导等温扩增 LAMP 试剂保存 海藻糖

中图分类号 Q539 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)05-0095-07

The protective effects of trehalose on freeze-drying and LAMP reagents storage

LI Mei-xia^{1,2} ZHANG Qing-li² LIU Li-ping¹ HUANG Jie^{2*} XIE Guo-si²

(¹College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, 201306)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT With the unique advantages of high sensitivity, equipment independence, and rapid procedure, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has been extensively developed to detecting various pathogens. The substances of enzyme, dNTP, and other complex organic molecules in LAMP mixture are subjected to a variety of chemical changes under room temperature, many of which are quite unacceptable in terms of storage and transportation. In order to solve this problem, we tried to develop a lyophilization technology for the protection of the LAMP mixture with the addition of trehalose as a stabilizer. The predictive effects of freeze-drying and different concentrations of trehalose (5%, 10% and 15%) in LAMP mixture during storage under temperature of 4℃, 25℃ and 37℃ on amplification activity of LAMP were analyzed systematically. The non-freeze-dried reagents without trehalose were also stored at the

公益性行业(农业)科研专项经费(201103034)和现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-46)共同资助

* 通讯作者. huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期:2012-02-23;接收日期:2012-05-10

作者简介:李美霞(1986-),女,硕士研究生,主要从事养殖病原检测研究。E-mail: limeixia119@yahoo.com.cn, Tel:13205329862

same temperature as controls. Our results showed that the lyophilizing LAMP reagents with 15% trehalose exhibited the greatest performance. Furthermore, at 4 °C, the half-life of freeze-dried mixtures with 15% trehalose (w/v) was 112.3d, which was 6.5-fold of the control. At the temperature of 25 °C, the half-life of treated reagents was 36.2d, which was 8.7-fold higher than control. Even under the temperature of 37 °C, the half-life was 6.2d, which was 2-fold of the control. We report here the cost effective, simple developing procedure of a freeze-drying LAMP reagent which will promote the widespread use of LAMP in the field.

KEY WORDS Vacuum freeze-drying LAMP Trehalose Reagents storage

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由 Notomi 等(2000)发明的一种全新的等温扩增技术。LAMP 技术具有特异性高、操作简单、无需复杂仪器设备等优点,近年来被广泛用于生物致病病原的检测。但在实际应用中,LAMP 反应所需的寡聚核苷酸引物、三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)、反应缓冲液和 DNA 聚合酶等均需在低温条件下贮存,并且反复冻融会使上述成分失活;同时,在大规模生产商品化检测试剂盒时,为了保证检测过程的简便性及检测结果的可靠性、准确性和稳定性,也要求将 LAMP 的各种试剂进行一次性地添加和分装,并使试剂盒具备尽可能长的保质期限(Zhang *et al.* 2009)。因此开发一种方便有效保存 LAMP 反应试剂混合物的新方法具有重要的价值。

在保护剂存在条件下对生物活性物质进行冷冻干燥处理常被用来提高生物活性物质的贮存期限和效能。20 世纪 90 年代以来的研究表明,海藻糖对生物大分子具有独特的非特异性保护作用(Crowe *et al.* 1983; Sampedro *et al.* 2001);生物大分子周围包裹着一层维持其结构和功能必不可少的水分子,在干燥、冷冻等条件下,海藻糖能替代此类水分子,构成一种“玻璃态”,使生物大分子运动和变性非常微弱,其空间结构得到维持;海藻糖还能与蛋白质表面残余水分子结合,使分子结构更紧密,构象更稳定,有利于抵御冷冻干燥对蛋白质的损害(Carpenter *et al.* 1992; Franks 1992)。Klatser 等(1998)和 Chua 等(2011)研究发现,添加海藻糖并进行冷冻干燥处理能延长多聚酶链反应试剂在常温条件下的保存期限。

本实验室在前期研究中建立了多种水生动物病原的 LAMP 快速检测技术(Zhang *et al.* 2009),并研发了相应的试剂盒。为解决试剂盒运输和现场应用中的保存问题,基于上述前人的研究结果,本研究尝试采用冷冻干燥方法延长 LAMP 反应体系混合物保存期限,并添加海藻糖作为保护剂以增强该效果。

1 材料与方法

1.1 模板的制备

将迟缓爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 菌种(本实验室保存)接种于 LB 培养基中,37 °C 摇床培养 16 h,用细菌基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司)制备爱德华氏菌基因组 DNA,保存于-20 °C,作为 LAMP 反应模板。

1.2 引物

针对迟缓爱德华氏菌 EdwR 基因设计 3 对 LAMP 引物(表 1),送交上海生工生物工程有限公司合成,所合成的引物干粉分别用 ddH₂O 溶解,配制成浓度为 100 mmol/L 的引物母液,保存于-20 °C 待用。

1.3 LAMP 反应体系及其冷冻干燥

按 25 μl LAMP 反应体系配制不含模板和外补水的 LAMP 预混物,其中含 20 mmol/L Tris-HCl、10mmol/L KCl、2 mmol/L MgSO₄、10 mmol/L (NH₄)₂ SO₄、0.1% Triton X-100、1.4 mmol/L dNTP、1.2 mol/L Betaine、1.6 μmol/L FIP/BIP (each)、0.02 μmol/L B3/F3 (each)、0.8 μmol/L LF/LB (each)、

6 mmol/L MgCl₂、8 U Bst DNA Polymerase (Large fragment), 一次性配制预混物, 分装成每份 14 μl 体积, 用于后续实验。在 LAMP 反应前, 加入约 20 ng 经 95 °C 变性 5 min 的模板, 并补足反应体积至 25 μl。反应过程为: 63 °C 反应 60 min, 85 °C 灭活 5 min。冷冻干燥时, 将 24 μl 不含模板的 LAMP 预混物分装于 0.2 ml 的 PCR 管中, 在真空离心冷冻干燥机 (HetoDrywinne, 丹麦) 中进行离心冻干。

表 1 针对爱德华氏菌 EdwR 基因的 LAMP 引物

Table 1 The sequences of LAMP primers for the EdwR gene of *E. tarda*

引物 Primer	序列 Sequence
F3	5'-AAAGCGCTCATGGGCATC -3'
B3	5'-GGGATGAGAAGATCACCGTC -3'
FIP	5'-ATGGTGCAGCATCGCGACTTTTTTCAGCAGCATTTGTAGGACG -3'
BIP	5'-ATGCAGCACAAAGGTGTAGCCTTTTTCTCGAAGCTGAACCTCTCG -3'
LF	5'-GAGATTGAGCGCAGCAGAG -3'
LB	5'-CGGCTCACCTGGTATTTCTTG -3'

1.4 不同海藻糖浓度对 LAMP 反应体系活性的影响

向含模板的 LAMP 预混物中添加用去离子水配制 70% (g/ml) 的海藻糖 (上海生工) 母液, 再用 ddH₂O 补齐反应总体积至 25 μl, 使海藻糖在最终反应混合物中的浓度分别为 0%、5%、10%、15%、20% 和 25%, 进行 LAMP 反应, 用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测反应产物, 考察添加不同浓度的海藻糖对反应体系的影响。

1.5 不同干燥时间对 LAMP 反应体系活性的影响

将加有不同浓度海藻糖 (终浓度分别为 0%、5%、10% 和 15%) 的 LAMP 预混物, 分别冷冻干燥 1、2、3、4 h 后取出, 然后添加 ddH₂O 和 1 μl 已变性好的模板至 25 μl, 进行 LAMP 反应。以不含海藻糖, 冰上分别保存 1、2、3、4 h 的体系作为对照组。根据 1.3 和 1.5 的实验结果确定长期保存体系所需冷冻干燥时间和海藻糖量。

在冻干过程中, 另设置 15 支添加有 150 mmol/L CoCl₂ 的 LAMP 反应体系作为冻干程度的指示管。每组 3 个指示管, 其海藻糖添加量分别为 5%、10%、15%。每隔 0.5 h 从冷冻干燥机中取出一组指示管观察其颜色变化, 至干燥 2.5 h。指示管中的颜色为粉红色时表示尚未脱水; 颜色成为紫红色时, CoCl₂ 为含两分子结晶水状态 (其结晶水占结晶分子量的 26.7%); 颜色为蓝色时, CoCl₂ 为无结晶水状态 (含水率为 0%)。

1.6 储藏温度对 LAMP 预混物的影响

将添加有 5%、10%、15% 海藻糖的 3 组冷冻干燥后的 LAMP 预混物分别储藏于 4 °C、25 °C 和 37 °C, 每 3 d 或 5 d 取出 1 组, 每组 3 个重复, 添加适量双蒸水和 1 μl 已变性的模板使反应体系恢复至 25 μl, 进行 LAMP 反应。以相同温度下不添加海藻糖的普通 LAMP 反应体系混合物作为对照, 每 3 d 取出 1 组 (3 个重复), 按实验组的操作方法进行。

1.7 LAMP 反应产物电泳条带强度的定量分析

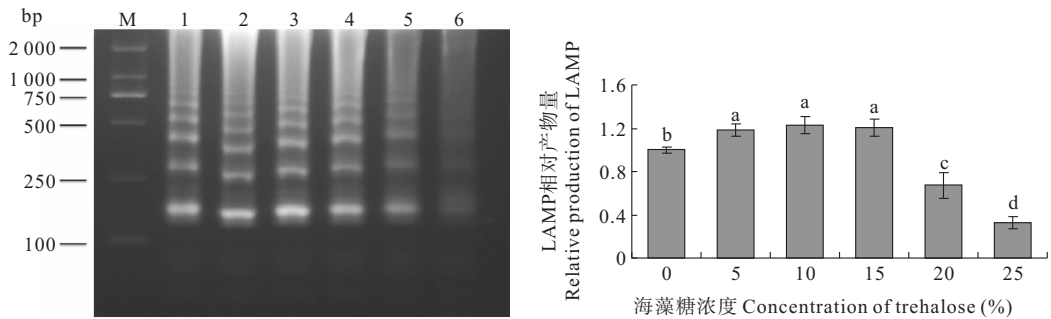
上述 LAMP 反应均采用等量的 DNA 添加适量双蒸水和 1 μl 已变性的模板使反应体系恢复至 25 μl, 进行 LAMP 反应, 用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测反应产物。取反应产物电泳结果的数码照片, 用 Gel-pro 软件分析其各泳道扩增产物的 IOD (总荧光强度), 泳道 N 的 LAMP 相对产物量 = IOD_N/IOD_M, 其中, IOD_N 表示泳道 N 的 IOD, IOD_M 表示标准分子量泳道 M (Marker) 的 IOD。

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。通过 LSD 法进行单因素方差多重比较, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同海藻糖浓度对 LAMP 反应体系活性的影响

LAMP 反应体系中海藻糖添加量在 5%~15% 时, LAMP 反应扩增产物电泳条带变得更加清晰, 且反应产物的总量显著增加 ($P < 0.05$), 以不添加海藻糖的 LAMP 反应体系为对照, 添加 10%~15% 海藻糖时 LAMP 反应体系的活性比对照组增加了 20.5%~22.5%。而添加量为 20% 及其以上时, LAMP 反应产物的电泳条带模糊, 而且产物总量显著下降 ($P < 0.05$), 减少到对照组的 32.8% 以下 (图 1)。从反应结果说明, 10%~15% 海藻糖的添加量对 LAMP 反应有最佳的促进效应。



左: LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳照片。其中, M: Marker DL2000; 1~6 泳道海藻糖浓度分别为 0%、5%、10%、15%、20% 和 25%; 右: LAMP 产物经 Gel-pro 定量分析结果

Left: results analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis. M: Marker DL2000; 1~6: concentration of trehalose was 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, and 25%. Right: results analyzed by Gel-pro software

图 1 不同海藻糖浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 1 Effect of different trehalose concentration on LAMP

2.2 冷冻干燥时间对 LAMP 反应体系活性的影响

未添加海藻糖的 LAMP 反应体系分别经冷冻干燥 1、2、3、4 h 后, LAMP 反应活性分别只有未经干燥、在 4 °C 放置 1 h 的 LAMP 体系的 49.1%、40.6%、25.6% 和 15.2% (图 2), 且随着干燥时间的延长, 体系活性呈降低趋势, 说明冷冻干燥对 LAMP 反应体系存在冻干损伤。因此, 应该在保证体系低含水率的条件下, 采用尽可能短的冷冻干燥时间。

观察含 Co^{2+} 混合物监控冷冻干燥进程的指示管的颜色变化发现, 干燥后 2 h 添加 5%、10% 海藻糖组体系呈蓝色, 15% 海藻糖组呈蓝紫色; 继续干燥至 2.5 h, 15% 海藻糖组仍显蓝紫色。基于该结果, 确定后续试验中的冷冻干燥时间为 2 h。

在 LAMP 反应混合物中添加不同浓度的海藻糖, 经冷冻干燥, 反应混合物的 LAMP 活性得到较好保护 (图 2), 处理 2 h 后, 添加 10% 和 15% 海藻糖组的产物量是不添加海藻糖组的 2.02~2.06 倍; 仍保留新鲜配制的普通 LAMP 体系活性的 82.2%~83.5%。

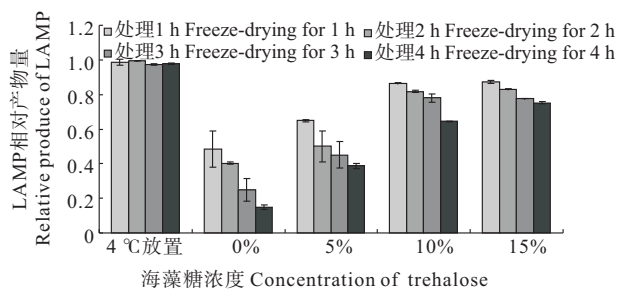


图 2 不同海藻糖浓度和干燥时间对干燥过程中反应体系活性的影响

Fig. 2 Effect of different trehalose concentration and freeze-drying time on the activity of LAMP mixture

2.3 不同海藻糖浓度对冷冻干燥的 LAMP 反应体系经长期保存的影响

添加不同海藻糖浓度的 LAMP 反应混合物经冷冻干燥 2 h 后,分别在 4 °C 和 25 °C 条件下储藏 90d,比较不同海藻糖添加量保留体系活性效果的差异(图 3)。结果表明,添加 5%海藻糖组经 4 °C 下 90 d 储存,保留其初始活性(添加同量海藻糖,冷冻干燥后储存第 0 天,下同)的 27.1%,10%组的活性是其初始活性的 37.9%,15%保留了 47.2%的活性。25 °C 下储藏 90d 后,添加 5%海藻糖组丧失其所有活性,10%海藻糖组的活性是初始活性的 0.7%,15%保留了初始活性的 15.4%。由此可见,在海藻糖添加量为 5%~15% 的范围内,LAMP 反应试剂混合物中海藻糖添加浓度越高,对反应扩增活性的保护效果越好。根据这一结果,在后续研究中最终选取 15%作为海藻糖的添加浓度。

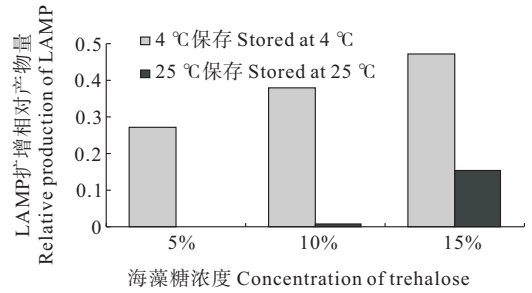


图 3 经处理的 LAMP 反应混合物储藏 90d 后的活性保留情况

Fig. 3 Amplification of freeze-dried LAMP reagents after 90d of storage

2.4 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在不同储藏温度下的活性衰减特征

为了对冷冻干燥的 LAMP 反应体系的储藏特性有精确了解,以相同储存温度下、未作任何处理的 LAMP 反应体系作为对照,将添加 15%海藻糖的冷冻干燥 LAMP 反应体系混合物在不同温度下储藏,定时监测各实验组的 LAMP 反应相对产物量。

2.4.1 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在 4 °C 下的活性衰减特征

由图 4 看出,储藏 9 d 时对照体系保持其初始活性的 84%,之后活性大幅度减弱,30 d 后条带完全消失。经 SigmaPlot 将荧光强度对储藏天数进行非线性回归,得到 4 °C 储藏条件下对照体系半衰期为 17.2 ± 2.2 d;而添加 15%海藻糖体系的半衰期为 112.3 ± 12.8 d,其储存时间是对照体系的 6.5 倍。说明冷冻干燥和添加海藻糖处理能够保持 LAMP 反应试剂混合物的活性。

2.4.2 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在 25 °C 储藏下的活性衰减特征

图 5 结果显示,随着储藏时间增长,对照组扩增产物量逐渐减少;到 12 d 时,已无法观测到扩增。经 SigmaPlot 软件拟合,得到 25 °C 储藏条件下对照组半衰期为 4.16 ± 0.51 d。而含 15%海藻糖的 LAMP 反应混合物半衰期为 36.2 ± 8.3 d,其储存时间是对照体系的 9.7 倍。说明冷冻干燥处理能够显著保持 LAMP 反应试剂混合物的活性。此外,与 4 °C 储藏组相比(图 4),25 °C 储藏的反应混合物扩增减弱更快,因此冷冻干燥体系仍应该尽量保存于低温条件。

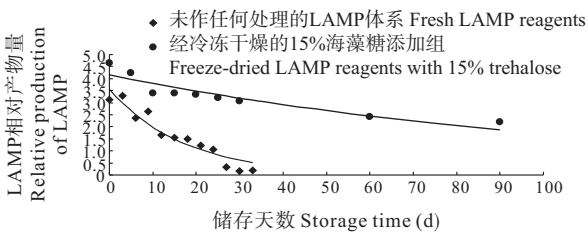


图 4 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在 4 °C 储藏下的活性衰减特征

Fig. 4 Decay curve of freeze-dried LAMP reagents with 15% trehalose stored at 4 °C

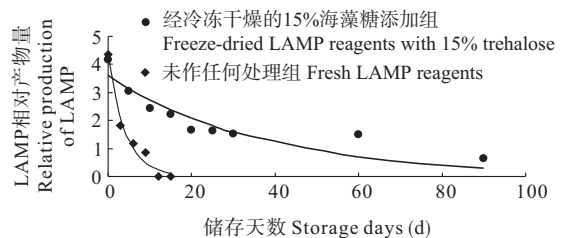


图 5 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在 25 °C 储藏下的活性衰减特征

Fig. 5 Decay curve of freeze-dried LAMP reagents with 15% trehalose stored at 25 °C

2.4.3 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在 37 °C 储藏下的活性衰减特征

考虑到一些运输条件较为严酷,我们还测试了 37 °C 下 LAMP 体系的储存特性。对照体系储藏 9 d 后基本已无扩增活性;而添加 15% 海藻糖的体系混合物直到 15 d 后其扩增活性才完全丧失(图 6)。经 SigmaPlot 软件拟合,添加 15% 海藻糖体系混合物的半衰期为 6.2 ± 0.4 d,是对照组的 2.1 倍,该结果表明,在 37 °C 条件下,添加海藻糖和冷冻干燥处理仍能在一定程度下保护 LAMP 反应混合物活性。但与 2.4.1、2.4.2 结果相比,该储藏温度下的处理体系半衰期最短,保护效果也最不明显,因此冷冻干燥和添加海藻糖处理只能用于应对短期运输的严酷条件。

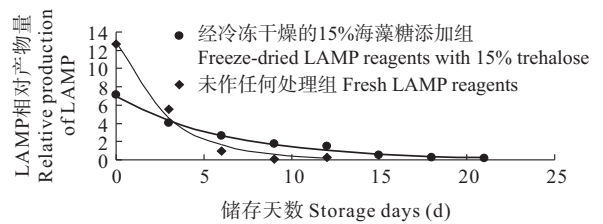


图 6 经冷冻干燥的 LAMP 反应体系在 37 °C 储藏下的活性衰减特征

Fig. 6 Decay curve of freeze-dried LAMP reagents stored at 37 °C

3 讨论

在大规模应用 LAMP 技术进行病原检测时,如何一次性得到大量灵敏性高、特异性强、在生产现场及野外等较为易变的环境条件下亦能保持良好稳定性的反应体系是一个值得深入研究的问题。

前人的多项研究表明,在保护剂存在条件下对生物活性物质进行冷冻干燥处理能大大提高生物活性物质的贮存期限和效能:Klatser 等(1998)冷冻干燥添加有海藻糖的 PCR 体系,结果显示,冻干品在 4 °C 能存放 1 年,37 °C 下能存放 90d;而对照组在 4 °C 能仅存放 7d,37 °C 下 1 d。陈黎忠等(2001)揭示海藻糖在 6 种酶的冷冻干燥-再水化过程中体现出良好的保护作用。在冷冻干燥的 Real-time PCR 体系中添加终浓度为 5% 的海藻糖,室温放置 150d 后体系的扩增效果与 -20 °C 储存的普通体系的相近(Tomlinson *et al.* 2005)。本研究发现,添加 15% 海藻糖的 LAMP 反应体系混合物经过冷冻干燥后,在 4 °C 储藏条件下的半衰期为 112.3 d,是其对照组的 6.5 倍。在 25 °C 储藏条件下的半衰期为 36.2 d,是其对照组的 8.7 倍。即使在 37 °C 储藏条件下其半衰期也是对照组的 2.1 倍,达到 6.2 d。上述研究结果证明,海藻糖无论在 LAMP 反应试剂混合物体系的冷冻干燥过程当中,还是在不同温度的保存试验中都表现出了对体系良好的保护效果。

此前有研究指出,冷冻干燥过程中的压力、干燥、低温等因素都会对反应体系成分产生干燥损伤(Allison *et al.* 1998; Anchordoquy *et al.* 1996; Zhao *et al.* 2005),本研究也出现了类似情况:冷冻干燥 1 h 后,添加 0 和 15% 海藻糖的冷冻干燥的体系组的活性分别只有 4 °C 放置的普通体系的 49.1% 和 88.3%。该现象提示我们在实际应用中应尽量选择冷冻干燥效率高、时间短的方法进行干燥,以减少冷冻干燥对 LAMP 反应体系的不良影响。

基于其优良的特性,冷冻干燥被广泛应用于制备药品,菌种等生物制品保存等(张敬如等 2006; 马小来等 2006)领域;但将冷冻干燥应用于核酸等温扩增反应试剂混合物的处理,以获得稳定性强、能够长期保存的体系混合物的相关研究在国内外尚属首次。此外,本研究舍弃直接使用肉眼观察电泳图片的方法来评价各处理的保护效果(Klatser *et al.* 1998; Aziah *et al.* 2007; Chua *et al.* 2011),使用图像分析软件结合统计软件,在更深层次上挖掘图像中隐含的大量数据信息,得出了量化的试验数据,使本研究的结论取得了质的跨越。作者认为本研究所采用的试验结果分析方法值得推广。

在 LAMP 反应体系混合物中添加海藻糖并进行冷冻干燥处理能大大提高反应试剂混合物在常温(25 °C)甚至 37 °C 条件下的保存时间,并且处理成本低、方法简单,为 LAMP 的应用提供了更便利的条件,将有力推动 LAMP 方法在各领域的大规模推广应用。

参 考 文 献

- 马小来,姚君斐,袁勤生. 2006. 肝素黄杆菌菌种保存方法的研究. 食品与药品, 4: 39~42
- 陈光明. 2003. 蛋白质药品冷冻干燥技术研究进展. 制冷空调与电力机械, 2: 1~7
- 陈黎忠,季曦光,边广珠,刘 群. 2001. 海藻糖对含酶冻干品的保护作用. 上海医学检验杂志, 16(3): 166~167
- 张敬如,黄复生,王 昆. 2006. 蛋白质药品的真空冷冻干燥技术及研究进展. 中国药业, 15(13): 25~27
- Allison, S. D., Randolph, T. W., Manning, M. C., Middleton, K., Davis, A., and Carpenter, J. F. 1998. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. Archives of Biochemistry and Biophysics, 358:171~181
- Anchordoquy, T. J., and Carpenter, J. F. 1996. Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state. Archives of Biochemistry and Biophysics, 332:231~238
- Aziah, I., Ravichandran, M., and Ismail, A. 2007. Amplification of ST50 gene using dry-reagent based polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella typhi*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 59:373~377
- Carpenter, J. F., Arakawa, T., and Crowe, J. H. 1992. Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. Dev Biol Stand. 74:225~38
- Chua, A. L., Elina, H. T., Lim, B. H., Yean, C. Y., Ravichandran, M., and Lalitha, P. 2011. Development of a dry reagent-based triplex PCR for the detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae*. Journal of Medical Microbiology, 60:481~485
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., and Mouradian, R. 1983. Stabilization of biological membranes at low water activities. Cryobiology, 20:346~356
- Franks, F. 1992. Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions. Dev Biol Stand. 74:9~18
- Klatser, P. R., Kuijper, S., Van Ingen, C. W., and Kolk, A. H. J. 1998. Stabilized, freeze-dried PCR mix for detection of Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology, 36:1 798~1 800
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12): e63
- Sampedro, J. G., Cortés, Muñoz-Clares R. A., Fernández, A., and Uribe, S. 2001. Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. protection by trehalose. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1544:64~73
- Sampedro, J. G., and Uribe, S. 2004. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. Molecular and Cellular Biochemistry, 256/257:319~327
- Tomlinson, J. A., Boonham, N., Hughes, K. J. D., Griffin, R. L., and Barker, I. 2005. On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Applied and Environmental Microbiology, 71:6 702~6 710
- Zhang, Q., Shi, C., Huang, J., Jia, K., Chen, X., and Liu, H. 2009. Rapid diagnosis of turbot reddish body iridovirus in turbot by loop-mediated isothermal amplification method (LAMP). J. Virol. Meth. 158(1-2):18~23
- Zhao, G., and Zhang, G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. Journal of Applied Microbiology, 99:333~338