



## ПЕТЛЕВАЯ LAMP АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. I. ДВА ДЕСЯТИЛЕТИЯ РАЗВИТИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

<sup>1</sup>Гарафутдинов Р.Р., <sup>2</sup>Чемерис Д.А., <sup>3</sup>Мавзютов А.Р., <sup>4,5</sup>Ахметзянова Л.У.,  
<sup>5</sup>Давлеткулов Т.М., <sup>4,5</sup>Губайдуллин И.М., <sup>1</sup>Чемерис А.В.\*

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71, \*Email: chemeris@anrb.ru

<sup>2</sup>ООО «Максим Медикал», Россия, 123423, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1

<sup>3</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

<sup>4</sup>Институт нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450075, Уфа, пр. Октября, 141

<sup>5</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет, Россия, 450062, Уфа, ул. Космонавтов 1

### Резюме

За два десятилетия, прошедших после появления петлевой амплификации (Loop AMPLification, LAMP), проводящейся в изотермических условиях для обнаружения специфичных фрагментов нуклеиновых кислот, она претерпела довольно много усовершенствований. В настоящем обзоре приведены данные, отражающие методические основы около сотни вариаций метода LAMP, сгруппированных по способам детекции как целевых ДНК-продуктов – лампликонов, так и побочных, представленных пирофосфатом и протонами, с учетом специфичности процессов; по предназначению тех или иных вариантов LAMP; по способам ее проведения, включая микрофлюидуку. Определенное внимание уделено количественной LAMP-амплификации и ее перспективному варианту – цифровой LAMP. Представлены перспективы развития метода.

**Ключевые слова:** LAMP, изотермическая петлевая амплификация, обратнo-транскрипционная петлевая амплификация, лампликон, ДНК, РНК, диагностика

**Цитирование:** Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Мавзютов А.Р., Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. I. Два десятилетия развития и совершенствования // *Biomics*. 2021. Т.13(2). С. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14

© Авторы

## LAMP AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS. I. TWO DECADES OF DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT

<sup>1</sup>Garafutdinov R.R., <sup>2</sup>Chemeris D.A., <sup>3</sup>Mavzyutov A.R., <sup>4,5</sup>Akhmetzyanova L.U.,  
<sup>5</sup>Davletkulov T.M., <sup>4,5</sup>Gubaidullin I.M., <sup>1</sup>Chemeris A.V.\*

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, 71 Pr. Oktyabrya, \*Email: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

<sup>2</sup>Maxim Medical LLC, 34-1 Narodnogo Opolcheniya str., Moscow, 123423, Russia

<sup>3</sup>Bashkir State Medical University, 3 Lenina Str., 450008, Ufa, Russia

<sup>4</sup>Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450075, 141 Pr. Oktyabrya

<sup>5</sup>Ufa State Petroleum Technological University, Russia, Ufa, 450062, 1 Kosmonavtov str.

### Resume

Over the two decades that have passed since the development of loop amplification (Loop AMPLification, LAMP), that carry out to detect specific nucleic acid under isothermal conditions, it has undergone quite a lot of improvements. This review presents data represented methodological bases of about a hundred variations of the

LAMP, classified according to the methods of detecting both target DNA products (lamplicons) and by-products (pyrophosphate and protons), considering the specificity of the processes, and according to the purpose of certain LAMP options and implementation, including microfluidics. Particular attention is paid to quantitative LAMP amplification and promising digital LAMP. The prospects for the development of the method are presented.

**Keywords:** LAMP, isothermal loop amplification, reverse-transcriptional loop amplification, RT-LAMP, lamplicon, DNA, RNA, diagnostics

**Citation:** Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Mavzyutov A.R., Akhmetzyanova L.U., Davletkulov T.M., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. LAMP amplification of nucleic acids. I. Two decades of development and improvement. *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14

© **The Authors**

<b>Содержание</b>	<b>Стр.</b>
Введение	178
Петлевая LAMP амплификация – самое начало и не только	178
Праймерные системы	181
Способы детекции лампликонов	182
Неспецифические методы детекции лампликонов	183
<i>Детекция пирофосфата</i>	183
Прочие колориметрические методы детекции лампликонов	184
Специфические методы детекции лампликонов	187
LAMP и микрофлюидика	191
Электрохимическая детекция лампликонов	192
Детекция лампликонов физическими методами	193
Количественная LAMP амплификация	193
<i>Количественная LAMP амплификация в реальном времени</i>	194
<i>Цифровая LAMP амплификация</i>	194
Некоторые применения LAMP амплификации	196
<i>Обнаружение микроРНК</i>	196
<i>Выявление мутаций / однонуклеотидного полиморфизма</i>	197
<i>Выявление половой принадлежности для исследуемых образцов</i>	199
<i>Дифференциация жизненного статуса микроорганизмов</i>	199
Неспецифичная LAMP амплификация либо полное отсутствие оной	200
Дизайн праймеров для петлевой LAMP амплификации	201
Заключение	202
Литература	203
References	215

<b>Content</b>	<b>Pages</b>
Introduction	178
LAMP amplification – the very beginning and not only	178
Primer systems	181
Methods of lamplicon detection	182
Non-specific methods of detection of lamplicons	183
<i>Pyrophosphate detection</i>	183
Other colorimetric methods for detection of lamplicons	184
Specific methods of detection of lamplicons	187
LAMP and microfluidics	191
Electrochemical detection of lamplicons	192
Detection of lamplicons by physical methods	193
Quantitative LAMP amplification	193
<i>Quantitative LAMP amplification in real time</i>	194
<i>Digital LAMP amplification</i>	194
Some applications of LAMP amplification	196
<i>microRNA detection</i>	196
<i>Detection of mutations / single-nucleotide polymorphism</i>	197
<i>Identification of gender identity for the studied samples</i>	199
<i>Differentiation of the life status of microorganisms</i>	199

Non-specific LAMP amplification or the complete absence of it	200
Design of primers for LAMP amplification	201
Conclusion	202
References (in Russian)	203
References	215

### Введение

После разработки в середине 1980-х гг. полимеразной цепной реакции (ПЦР) она довольно быстро стала диагностическим методом №1 и до сих пор не сдала свои позиции, несмотря на то что вслед за ней появились другие реакции амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот. При этом большинство этих реакций протекают в изотермических условиях, что дает им определенные преимущества. Так, при их проведении можно обходиться без ДНК-термоциклеров, хотя нужно заметить, что в некоторых вариациях изотермических амплификаций с применением флуоресценции эти приборы все же используются, но без термоциклирования. Однако главное в том, что изотермические реакции амплификации идут при одной температуре и всегда с максимально возможной в конкретный момент скоростью, определяемой кинетикой фермента и наличием в должном количестве в реакционной смеси других необходимых ингредиентов. То есть при проведении таких реакций не происходит искусственного сдерживания работы фермента, что весьма важно для ускорения всего процесса амплификации. Тогда как реакции амплификации нуклеиновых кислот, регулируемые сменой температур (та же ПЦР и некоторые другие), больше «стоят» нежели «идут», поскольку для них чтобы начался тот или иной этап требуется достижение определенных температур реакционной смеси, варьирующих в довольно широких пределах. Так, при ПЦР при 95°C происходит денатурация цепей ДНК (исходных молекул или появляющихся ампликонов) для того, чтобы на них, становящихся под действием высокой температуры одноцепочечными, могли отжечься праймеры (обычно при 50 - 60°C) и произошла их элонгация (обычно при 72°C). При этом смены температур в реакционном блоке ДНК-термоциклера происходят не мгновенно, и это ведет к искусственному сдерживанию процесса амплификации. Появление новых одноцепочечных матриц в изотермических реакциях происходит иначе и по-разному, но преимущественно за счет действий ДНК полимераз, обладающих цепь-вытесняющей активностью.

Возможность обходиться без сложного оборудования при использовании изотермических методов амплификации способствует также развитию перспективных подходов к диагностике в виде так называемых исследований по месту лечения или у

постели больного – ПОСТ (Point-of-Care-Testing) либо употребляемого в некоторых публикациях более сокращенного варианта – ПОС. При этом нужно признать, что изотермические реакции амплификации нуклеиновых кислот имеют свои недостатки, среди которых меньшая чувствительность по сравнению с ПЦР (для большинства из них), определенные трудности количественной оценки исходного числа матриц (мишеней).

### Петлевая LAMP амплификация - самое начало и не только

Одной из таких изотермических реакций детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот с сопоставимым с ПЦР экспоненциальным накоплением продуктов, которой и посвящен данный обзор, не претендующий, впрочем, на исчерпывающую полноту<sup>1</sup>, является метод петлевой амплификации LAMP (Loop AMPlification), разработанный два десятилетия назад японскими авторами [Notomi et al., 2000] и характеризующийся довольно сложной системой праймеров. В оригинальной статье 2000 г. было предложено использовать два внешних F3 (Forward) и B3 (Backward), а также два внутренних праймера FIP (Forward Inner Primer) и BIP (Backward Inner Primer), причем последние несли каждый по паре мест отжига F1c<sup>2</sup> / F2 и B1c / B2 соответственно, что можно видеть из рис. 1. Праймеры F1c и B1c в составе FIP и BIP можно считать праймерами второго уровня, поскольку они отжигаются позже на вновь образуемых цепях ДНК.

<sup>1</sup> За пределами рассмотрения окажутся варианты LAMP, совмещенные с прочими методами амплификации нуклеиновых кислот (RPA, CRISPR и др.), поскольку им будет посвящена готовящаяся нами отдельная статья. Также внимание не будет уделено различным применениям LAMP, включая диагностику новой коронавирусной инфекции ввиду того, что вопросам детекции SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP готовится другая статья. Что касается процитированных в данном обзоре статей, то это большей частью пионерные публикации методологического характера, но при этом за редким исключением мы не будем упоминать какие объекты исследовались (амплифицировались) в той или иной работе, поскольку важнее сами принципы и подходы.  
<sup>2</sup> «с» – указывает на комплементарную цепь ДНК

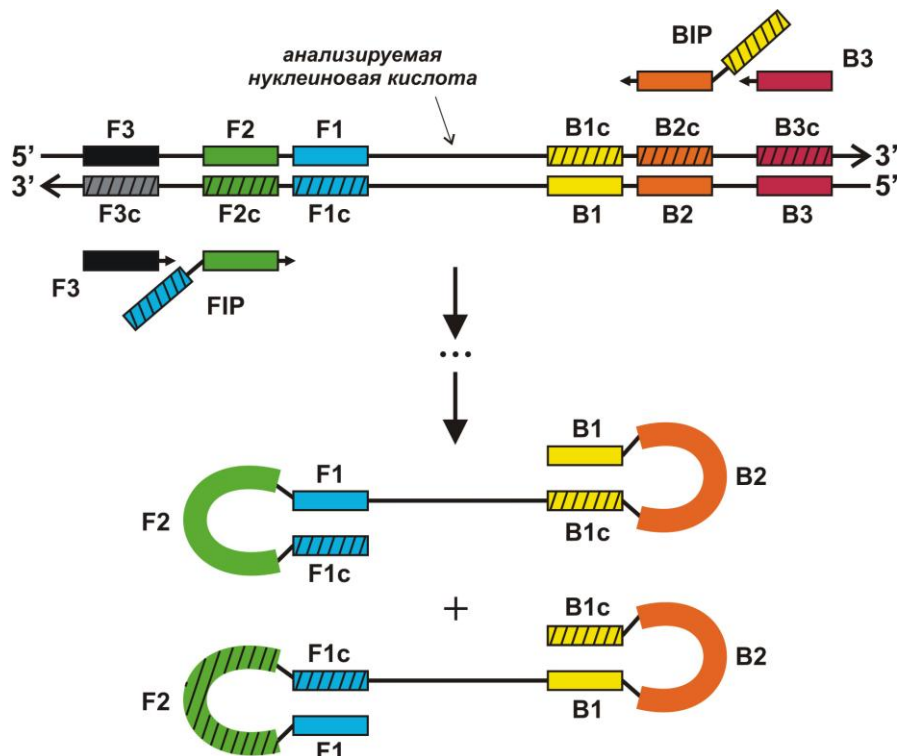


Рис. 1. Схема расположения мест отжига праймеров на участке ДНК, служащим мишенью для LAMP-амплификации, и один из типов продуктов амплификации.

Прямой и обратный праймеры F3 и B3 необходимы лишь для образования одноцепочечной амплифицируемой ДНК и требуются только на начальном этапе и потому берущееся в реакцию их количество заметно меньше, чем других прямых и обратных праймеров FIP и BIP.

Помимо особого устройства системы LAMP праймеров, крайне важным компонентом этой реакции служит фермент *Bst* полимеразы, обладающая активностью, вытесняющей встречающуюся ей цепь ДНК, за счет чего образуются одноцепочечные ДНК-матрицы, пригодные для отжига на них очередных порций внутренних праймеров FIP и BIP. В ряде статей описывается применение и других подобных ДНК полимераз, выделенных из родственных бацилл, а также модифицированные ферменты в виде *Bst* 2.0 WarmStart фирмы New England Biolabs, Inc., обеспечивающей блокирование работы фермента благодаря комплексу со специальным аптамером или в виде *Bst* полимеразы версии 3.0 той же фирмы, за счет добавленного домена обладающей улучшенными характеристиками, в том числе ревертазной активностью.

Скрининг вирусного метагенома из горячих источников Йеллоустона позволил выявить и охарактеризовать термостабильную ДНК полимеразу PyroPhage 3173, нашедшую применение в LAMP

реакции. Эта полимеразы, имеющая повышенную термостабильность с температурным оптимумом около 70°C и обладающая ревертазной активностью, под торговой маркой OmniAmp поставилась фирмой Lucigen Corporation [Chander et al., 2014]. В настоящее время Lucigen Corporation предлагает широкую линейку продуктов для проведения петлевой амплификации под торговой маркой LavaLAMP. Еще одной полимеразой, нашедшей применение в LAMP реакциях, является фермент SD, представляющий собой измененную *Taq* полимеразу, которой генно-инженерным путем придана сильная цепь-вытесняющая активность [Ignatov et al., 2014].

Если в ПЦР участок ДНК, ограниченный подобранными праймерами, служит мишенью и обычно совпадает (по размеру) с нарабатываемым ходом амплификации ампликоном, то в LAMP ситуация иная. Так, мишенью в целом выступает фрагмент ДНК, ограниченный праймерами F3 и B3, а ординарным размером ампликонов можно считать участок ДНК между 5'-концами праймеров FIP и BIP. При этом в ходе LAMP амплификации происходит постоянное увеличение размеров нарабатываемых фрагментов ДНК.

С учетом серьезных отличий между ампликонами, образуемыми в ПЦР, и продуктами, генерируемыми в ходе LAMP реакции (рис. 2), последние могут быть

названы «лампликонами», что было уже предложено ранее разными группами авторов [Yang et al., 2012; 2013; Ahsan et al., 2017; Bektaş, 2017]. Причем в последней статье использован такой вариант их обозначения – LAMPlicons [Bektaş, 2017]. Однако в обиход это слово все же пока не вошло, возможно, напрасно. Видимо следует принять и применять этот пока непривычный термин. Здесь можно еще заметить, что в одной обзорной статье 2019 г. в разделе, посвященном LAMP реакции, при цитировании статьи Yang et al. [2013] упоминаются лампликоны. Может, стоит также ввести в оборот и

совсем новое слово – «ламплификация» для обозначения процесса, в ходе которого нарабатываются специфичные фрагменты ДНК, увеличивающегося размера в виде лесенки полос, и тогда будет ясно, что это LAMP реакция. Хотя лесенки из полос ДНК в виде ампликонов увеличивающегося размера нарабатываются и в некоторых других методах амплификации нуклеиновых кислот, но они заметно уступают по популярности LAMP реакции.

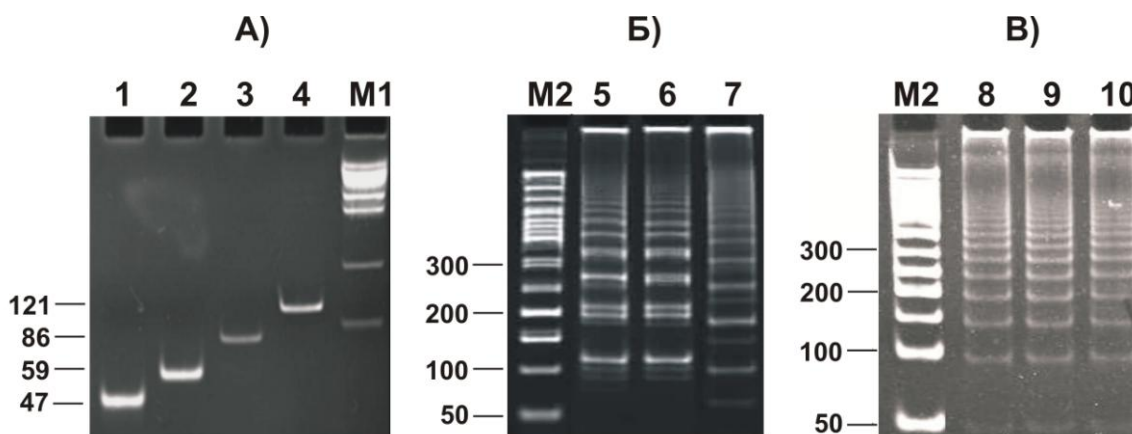


Рис. 2. Ампликоны в ПЦР (А, под номерами 1-4 приведены ПЦР-ампликоны разной длины, полученные на одной и той же ДНК мишени с помощью сближенных праймеров [Garafutdinov et al., 2017]), лампликоны в LAMP (Б, под номерами 5 и 6 приведены лампликоны, полученные в результате LAMP-амплификации РНК, выделенной из назофарингеальных соскобов пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, а под номером 7 - ложноположительный контроль [Sakhabutdinova et al., 2021]) и конкатемеры в RCA (В, под номерами 8-10 приведены продукты амплификации "катящимся кольцом" (RCA) [Garafutdinov et al., 2020], полученные на синтетической кольцевой ДНК-матрице при разных температурных режимах). M1 и M2 – стандартные маркерные лестницы

Fig. 2. Amplicons in PCR (A, numbers 1-4 show PCR amplicons of different lengths obtained on the same DNA target using nearby primers [Garafutdinov et al., 2017]), amplicons in LAMP (B, numbers 5 and 6 show lamplicons obtained as a result of LAMP amplification of RNA isolated from nasopharyngeal swabs of patients infected with SARS-CoV-2, and number 7 is a false positive control [Sakhabutdinova et al., 2021]), and concatamers in RCA (B, numbers 8-10 show the products of rolling circle amplification (RCA) [Garafutdinov et al., 2020], obtained on a synthetic circular DNA template at different temperatures). M1 and M2 - standard marker ladders.

Происходящие процессы при LAMP амплификации приводят к формированию на одном из этапов гантелеподобных (dumbbell) структур, которые можно считать неким ядром данной реакции и обеспечивающих дальнейшее самопраймирование и эффективное размножение ДНК, в результате чего возникают гетерогенные продукты разной (увеличивающейся) длины, что нагляднее всего представлено в анимации фирмы Eiken Chemical Co (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html>) и в видеоролике фирмы New England Biolabs ([https://international.neb.com/products/ml1800-warmstart-](https://international.neb.com/products/ml1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna#Product%20Information)

[colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna#Product%20Information](https://international.neb.com/products/ml1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna#Product%20Information)). Помимо указанных сайтов с анимацией и видео, протекание данной реакции и особенности детекции целевых продуктов довольно подробно рассмотрены в ряде обзоров [Parida et al., 2008; Zhang et al., 2014; Notomi et al., 2015; Zhang et al., 2019; et al., 2020; Gill, Amree, 2020], в том числе подготовленных отечественными авторами [Макарова и др. (Makarova et al.), 2018; Хафизов и др. (Khafizov et al.), 2021].

Возвращаясь к первой статье по LAMP [Notomi et al., 2000], следует заметить, что в ней,

помимо модельного эксперимента по амплификации ДНК фага M13 и детекции вируса гепатита В, приведших к увеличению исходного числа копий мишеней в  $10^9$  раз, была осуществлена также обратнотранскрипционная LAMP амплификация (RT-LAMP), когда мишенью послужила мРНК специфичного антигена простаты для чего потребовалось использование дополнительного фермента – обратной транскриптазы. Год спустя этой группой авторов была опубликована краткая заметка, в которой сообщалось, что в присутствии высокой концентрации бетаина, матрицей для LAMP может служить и неденатурированная ДНК, признав, что механизм процесса им неизвестен [Nagamine et al., 2001]. Что касается детекции молекул РНК, то после оригинальной статьи 2000 г. прошло несколько лет, прежде чем с помощью LAMP было предложено детектировать РНК-содержащие вирусы. Так, в 2003 г. было сообщено об обнаружении с помощью RT-LAMP потивируса мозаики японского ямса [Fukuta et al., 2003]. Причем в этом исследовании использовалась еще четырехпраймерная система, а детекция целевых продуктов реакции велась по конечной точке с помощью обычного спектрофотометра, контролируя мутность раствора. Чуть позже с помощью RT-LAMP была продемонстрирована детекция в режиме реального времени РНК вируса лихорадки Западного Нила, относящегося к флавивирусам [Parida et al., 2004]. В этой работе контроль за наработкой продуктов реакции осуществлялся также по меняющейся (увеличивающейся) мутности раствора, но в специальном приборе – турбидиметре модели LA-200. При этом было показано, что чувствительность RT-LAMP амплификации превышала таковую в ОТ-ПЦР на порядок.

Вообще о чувствительности LAMP нужно сказать отдельно. Любая реакция амплификации нуклеиновых кислот характеризуется пределами своей чувствительности в виде детекции того или иного количества минимального числа копий исходных мишеней. Причем, разброс по этому показателю весьма велик и зависит от множества причин, рассмотрение которых выходит за рамки данного обзора. При этом во многих работах отмечается, что LAMP чувствительнее ПЦР. Так, сообщается, что LAMP оказалась чувствительнее ПЦР в 10 раз [Chen et al., 2011]. Другими авторами обнаружено, что LAMP чувствительнее ПЦР в 100 раз [Zhao et al., 2017; Nkere et al., 2018] и даже в 1000 раз [Wang et al., 2012]. Однако при описании различных вариантов LAMP амплификации мы за редким исключением не будем акцентировать внимание на том какое количество мишеней удалось детектировать в той или иной работе и какое время на это было потрачено,

поскольку сопоставление результатов разных авторов часто не представляется возможным ввиду того, что в экспериментальных статьях приводятся или сведения о детектируемом числе геномных копий некоего образца в пересчете на микролитр или весовые (например, фемтограммовые) количества ДНК или РНК, в том числе «на пробирку», либо вообще говорится о детекции энного количества (микро)организмов. К тому же подобранные разные праймерные системы могут работать в конкретной LAMP амплификации с различной эффективностью, что зависит также и от чистоты используемых препаратов нуклеиновых кислот, хотя следует заметить, что во многих работах подчеркивается, что для LAMP амплификации можно и не выделять ДНК или РНК вообще или, по крайней мере, не очищать [Kaneko et al., 2006]. Также за единичными исключениями не будет приводиться информация типа концентраций используемых реагентов или времени проведения реакции, про которое в целом можно сказать, что оно короче, чем затрачиваемое на подобные эксперименты в обычной ПЦР. Поэтому тем, кому важна информация по чувствительности LAMP реакции и прочим техническим моментам, можно порекомендовать обращаться к оригинальным публикациям, поскольку данный обзор посвящен больше принципам и особенностям LAMP амплификации, а также способам детекции целевых продуктов.

### Праймерные системы

Чтобы ускорить процесс наработки нужных лампликонов разработчиками LAMP амплификации спустя некоторое время в реакционную смесь было добавлено еще два праймера, отжигающихся на участках ДНК между праймерами F1c и F2, а также между праймерами B1c и B2 (см. рис. 1) на неких образующихся петлях, и потому получивших название петлевых (Loop primers – FLP и BLP или LoopF и LoopB) [Nagamine et al., 2002]. После введения этого новшества старый вариант LAMP с четырьмя праймерами в большинстве случаев перестал использоваться, хотя в ряде работ сообщается об использовании только одного из Loop праймеров. Таким образом, для проведения LAMP уже требовался подбор 8 мест отжига праймеров, что в том числе приводило к еще большему удлинению целевых ДНК-мишеней. В вариантах LAMP с пятью праймерами участок одного из Loop праймеров используется как место для отжига гибрида зондов, о которых будет говориться ниже.

Впоследствии другими авторами вместо Loop-праймеров также с целью ускорить процесс амплификации было предложено использовать дополнительные Stem-праймеры - StemF и StemB, отжигающиеся внутри мишени (внутри лампликонов)

на участке между прямым и обратным праймерами FIP и VIP [Gandelman et al., 2011]. Иное усовершенствование праймерной системы LAMP заключалось в использовании вместо Loop праймеров так называемых Swarm праймеров, отжигающихся фактически на тех же местах, что и праймеры F1 и B1 [Martineau et al., 2017]. Авторы предположили некий гипотетический механизм такого праймирования, сообщив при этом, что использование предлагаемых ими этих дополнительных праймеров повышает скорость LAMP амплификации и увеличивает наработку целевых продуктов.

Озаботившись тем, что температура протекания LAMP амплификации (около 65°C) все же довольно высока для ПОСТ-анализов, другие авторы предложили модификацию определенных LAMP праймеров из стандартного набора в виде использования их фосфотиоатных производных, что позволило снизить температуру до 40°C с сохранением эффективности и специфичности данной реакции [Cai et al., 2018]. Так, части F1c у FIP- и B1c у VIP-праймеров в их экспериментах полностью состояли из нуклеотидов с фосфотиоатными связями вместо фосфодиэфирных. Дополнительные особенности предложенной ими модификации PS-LAMP заключались в добавлении в реакционную смесь мочевины и SSB-белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК.

#### Способы детекции лампликонов

Фактически первичным методом детекции продуктов LAMP амплификации и одновременно контролем за произошедшей реакцией на стадиях отработки диагностических тест-систем (одним из этапов определения специфичности процесса) является разделение образуемых лампликонов с помощью гель-электрофореза. Свидетельством успешного протекания LAMP является наличие в геле некой «лестницы» из полос ДНК, окрашенных бромидом этидия или другим интеркалирующим красителем и видимых в ультрафиолетовом свете. Несмотря на то, что подобное разделение в геле продуктов LAMP амплификации позволяет прийти к заключению, что подобранная система праймеров успешно сработала все же однозначного решения о присутствии искомым мишеней в исследуемом образце принять нельзя. Для этого требуется дополнительное подтверждение правильности отжига подобранных праймеров, что обычно осуществляется с помощью гибридационных зондов, причем они должны быть комплементарны участкам мишени, не привносимым в реакционную смесь вместе с комплектом праймеров. При этом самым точным подтверждением правильности произошедшей амплификации является секвенирование лампликонов, которое может проводиться разными методами, но

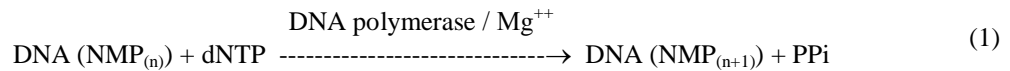
наиболее точным сейчас является нанопоровое секвенирование, что уже показано в ряде статей. В частности, при мультиплексной LAMP амплификации шести видов и подвидов паразитических плазмодий с последующим секвенированием с помощью MinION нанопорового секвенатора с использованием соответствующих баркодов со 100% точностью подтверждено их присутствие в специально составленном модельном образце [Imai et al., 2017]. Однако это дополнительная довольно дорогостоящая процедура и поэтому широкого распространения она пока не получила. К тому же она не быстрая, что не приемлемо для диагностических анализов.

В оригинальной статье 2000 г. Notomi и соавт. [2000] для детекции LAMP продуктов использовали как раз гель-электрофорез, но для подтверждения правильности амплификации именно нужного участка ДНК ими был применен метод блот-гибридизации по Саузерну, в котором в качестве гибридационной пробы служили меченные дигоксигенином олигонуклеотиды, комплементарные зоне между праймерами FIP и VIP. Другим дополнительным контролем специфичности реакции было расщепление лампликонов несколькими рестрикционными эндонуклеазами, поскольку выбранный ими для модельного эксперимента участок фага M13 приходился на так называемый полилинкер, несущий множество сайтов узнавания рестрикционных эндонуклеаз. И тот и другой проверочные подходы занимают довольно длительное время и не могут быть рекомендованы при массовой диагностике с помощью LAMP, так как одним из важных преимуществ использования LAMP амплификации является быстрота этой реакции, включая ускоренную детекцию целевых продуктов. При этом они могут считаться все же высокоспецифичными за счет большого числа используемых праймеров и еще большего числа мест их отжига, поскольку допустить, что еще в каких-то других местах геномов прочих организмов может образоваться такая же комбинация гомологичных всем праймерам участков практически невероятно. При этом конечно нужно исключать образование так называемых гомо- и гетеродимеров праймеров, ведущих к появлению ложноположительных результатов, чему ранее мы уделили довольно большое внимание [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019]. Среди них некоторая доля ложноположительных результатов приходится на контаминацию реакционных смесей продуктами предыдущих амплификаций тех же мишеней. При этом большее количество ДНК, образующееся в LAMP реакциях, ведет в повышенному риску подобных загрязнений. В этой связи особенно при диагностических исследованиях крайне важным становятся подходы, позволяющие получать

результаты, не открывая пробирок или иных емкостей, где шла амплификация, что решается разными способами как при специфических, так и неспецифических методах детекции. Причем они могут осуществляться как по конечной точке, так и в режиме реального времени – главное не открывать реакционные сосуды, поскольку в этом случае в составе воздушно-капельной смеси в воздух могут подняться миллиарды лампликонов и загрязнить все вокруг.

**Неспецифические методы детекции лампликонов**  
*Детекция пирофосфата*

Известно, что в процессе ферментативного синтеза ДНК, крайне упрощенно описываемого уравнением (1), при присоединении очередного нуклеотида от дНТФ отщепляется пирофосфат (PPi), который как побочный продукт реакции полимеризации ДНК относительно легко может быть детектирован.



Поскольку при LAMP амплификации образуется весьма большое количество вновь синтезированных молекул ДНК, то, следовательно, из использовавшихся для их построения дНТФ в пропорциональном количестве высвобождается

пирофосфат, который с присутствующими в реакционной смеси ионами магния образует нерастворимый осадок, что можно описать уравнением (2).



Таким образом, в ходе полимеризации цепей ДНК при LAMP амплификации будет меняться мутность раствора, что и было предложено контролировать [Mori et al., 2001]. Для полной уверенности в том, что образующийся осадок представляет собой именно пирофосфат магния в той работе было проведено сравнение ИК-спектров продажного реактива  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , и образующегося в ходе LAMP амплификации осадка, показавшее практически полное их совпадение за исключением того, что в последнем были указания на присутствие органического материала, что было вполне ожидаемо и могло принадлежать ДНК и прочим биологическим молекулам. В той же статье было оценено образующееся количество амплифицируемой ДНК специфичного антигена простаты при ПЦР и при LAMP, свидетельствующее, что в течение одного часа при одинаковом стартовом числе мишеней в LAMP нарабаталось ДНК в 50 раз больше и эти различия оказываются критичными, не позволяющими в ПЦР использовать тот же принцип детекции пирофосфата магния ввиду образующегося относительно незначительного его количества. Другие авторы сообщили об использовании разработанного ими 8-ми канального портативного турбидиметра [Sappat et al., 2011], введя также аббревиатуру RT-LAMP-AGE, где под последними тремя буквами подразумевался – Agarose Gel Electrophoresis, изредка встречающуюся и в других статьях по LAMP амплификации.

числе основанных на появлении в реакционной смеси большого количества пирофосфата магния. В частности, чтобы достоверно увидеть осадок пирофосфата магния реакционную смесь после завершения LAMP амплификации предлагалось коротко центрифугировать [Le Roux et al., 2009].

Также показана возможность контроля за наработкой продуктов амплификации в LAMP путем добавления в реакционную смесь флуоресцентного металлоиндикатора кальцеина вкупе с ионами марганца, высвобождающимися при появлении большого количества пирофосфата за счет формирования с ним нерастворимого комплекса и частичного замещения ионов марганца ионами магния в кальцеине, вызывая тем самым свечение последнего [Tomita et al., 2008]. Однако кальцеин ингибирует работу ДНК полимеразы и поэтому в качестве альтернативы ему предложено использовать другой металлоиндикатор – гидрооксинафтоловый синий, не ухудшающий протекание LAMP амплификации, что позволяет его добавлять в исходную реакционную смесь, которая при появлении большого количества лампликонов (читай пирофосфата, связывающего магний), меняет цвет с фиолетового на небесно-голубой [Goto et al., 2009]. Еще один металлоиндикатор – Eriochrome Black T был с успехом использован для той же цели, причем для него характерен аналогичный переход окрашивания раствора – с фиолетового на небесно-голубой [Oh et al., 2016].

Не меньший интерес представляет визуальная детекция результатов LAMP-амплификации невооруженным глазом, что весьма важно для РОСТ-анализов и этому посвящено немало работ, в том

Другим красителем, который нашел применение для детекции продуктов LAMP амплификации, оказался малахитовый зеленый,



приобретающий голубую окраску при положительных результатах и остающийся бесцветным в отсутствии амплификации [Nzelu et al., 2014]. В цитируемой статье подчеркивается, что это первый случай применения малахитового зеленого в LAMP. Позже такой подход с использованием малахитового зеленого (MG – malacchite green) получил название – MG-LAMP [Lucchi et al., 2016]. Справедливости ради следует заметить, что ранее были попытки использования этого красителя для детекции образующегося пирофосфата в ПЦР, однако для усиления сигнала требовались еще дополнительные реактивы, но чувствительность все равно была низкой [Gibson et al., 1997].

Регистрация выделяющегося при LAMP амплификации пирофосфата в реальном времени была осуществлена также с помощью биолюминесцентного подхода BART (Bioluminescent Assay in Real Time) [Gandelman et al., 2010]. В этом случае запускался каскад ферментативных реакций, когда выделяющийся пирофосфат под действием АТФ-сульфуриказы превращал находящийся в реакционной смеси аденозинфосфосульфат в АТФ, который в свою очередь способствовал окислению люциферина люциферазой с выделением регистрируемых квантов света.

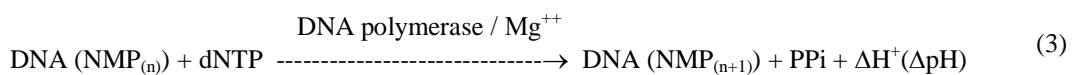
Еще один способ детекции LAMP также основан на высвобождении пирофосфата, связывающегося с ионами магния, концентрация которых снижалась, что вело к деагрегации находящихся в растворе частиц коллоидного золота и изменения его цвета [Wong et al., 2014]. В этом случае коллоидное золото было модифицировано меркаптоундекановой кислотой, связывающейся с магнием, служившим неким «мостиком» между

соседними коллоидными частицами, что вызывало их агрегацию с характерным лиловым цветом реакционной смеси до начала процесса, а по мере успешного протекания LAMP амплификации и образования пирофосфата магния цвет раствора менялся на красноватый.

Относительно недавно предложен довольно экзотический способ визуальной детекции пирофосфата после LAMP амплификации, основанный на так называемом «эффекте кофейного кольца» для чего готовилась пленка из коллоидных наночастиц двуокиси кремния на подходящей подложке, на которые наносилось 0,5 мкл реакционной смеси после завершения LAMP реакции и по диаметру образующегося за 5 минут пятна судили о количестве исходных мишеней в анализируемом образце с подсчитанным пределом детекции в виде 20 копий [Zhang et al., 2019].

#### Прочие колориметрические методы детекции лампликонов

Нужно сказать, что уравнение (1), описывающее процесс полимеризации ДНК, излишне простое и требует некоторого уточнения, поскольку присоединение очередного нуклеотида к растущей цепи ДНК приводит к выделению не только пирофосфата. Появляется еще и протон, изменяющий рН раствора. В уравнении (3)  $\Delta\text{H}^+$  ( $\Delta\text{pH}$ ) обозначает изменение концентрации протонов в реакционной смеси, приводящее к сдвигу (снижению) рН раствора. При присоединении очередного дНМФ к цепи ДНК происходят и некоторые другие изменения, но в этом контексте они нас интересовать не будут.



Основываясь на этом изменении рН реакционной смеси при LAMP амплификации, довольно простой подход к детекции протекания LAMP был реализован другими авторами [Tanner et al., 2015]. Так, ими была использована реакционная смесь с минимальным забуфериванием, позволяющая контролировать изменение рН раствора с помощью некоторых рН-чувствительных красителей. В этой работе было исследовано восемь различных рН-индикаторов, среди которых наилучшие результаты показали феноловый красный, крезоловый красный (меняющие цвет раствора с красного на желтый), а также нейтральный красный, окраска которого переходила с бледно-оранжевого на розовый. Позже другими авторами был предложен бесприборный вариант детекции NINA-LAMP (Non-Instrumented

Nucleic Acids), рассчитанный на использование рН-чувствительных красителей нейтрального красного и фенолового красного [Poole et al., 2017]. С использованием еще одного рН-чувствительного красителя ксиленолового оранжевого было осуществлено детектирование ДНК *E.coli* и ряда патогенных микроорганизмов путем LAMP амплификации, подтверждением успешного протекания которой служил AGE [Jagoenram et al., 2019]. Накопление протонов также предложено регистрировать с помощью полупроводниковой CMOS технологии с использованием рН чувствительного сенсора на основе пятиокиси тантала [Veigas et al., 2014].

Еще один метод колориметрической детекции результатов LAMP-амплификации основан на

применении лейкоформы красителя кристаллического фиолетового, образующейся при его взаимодействии с сульфитом натрия и приобретающего свою обычную окраску, связываясь с двухцепочечной ДНК [Miyamoto et al., 2015]. Причем авторы в этой работе провели специальное исследование по влиянию на изменение окраски данного красителя выделяющегося пирофосфата, который они разрушали пирофосфатазой. В итоге ими был предположен механизм восстановления цвета у лейкоформы кристаллического фиолетового при его взаимодействии с ДНК без участия в этом пирофосфата. Несмотря на то, что в данном обзоре имеется специальный раздел, посвященный микрофлюидным вариантам LAMP амплификации, логично именно здесь упомянуть работу, в которой описывается изготовление и использование чипа на бумаге с границами в виде парафинового кольца, в центре которого помещался краситель кристаллический фиолетовый в виде его лейкоформы, который приобретал фиолетовую окраску после накопления продуктов LAMP амплификации [Roу et al., 2017].

Имеются все основания, чтобы еще один вариант микрофлюидики с использованием специальной конструкции в виде бумажной оригами с довольно сложной геометрией упомянуть тоже здесь, поскольку в нем проводилась колориметрическая детекция результатов LAMP реакции, в основе которой лежит краситель метиленовый синий и его лейкоформа [Trieu, Lee, 2019]. Положительно заряженный метиленовый синий связывается с ДНК за счет электростатических и стэкинг-взаимодействий, и при этом его хромофорная группа имеет большее сродство к ДНК, нежели к тому же сульфиту натрия, который делает данный краситель бесцветным. Поскольку при LAMP амплификации образуется большое количество ДНК, то связывающийся с ней метиленовый синий придает изначально бесцветному раствору соответствующую окраску, что и фиксировалось в определенных местах данной оригами конструкции.

Описано применение интеркалирующего красителя SYBR Green I для детекции продуктов LAMP амплификации невооруженным глазом [Iwamoto et al., 2003]. В присутствии большого количества лампликонов исходный раствор оранжевого цвета становился зеленым. Поскольку считается, что SYBR Green I до некоторой степени ингибирует работу ДНК полимеразы, то было предложено его изолировать на некоем конусе из тонкой фольги в верхней части пробирки, а по завершению реакции путем быстрого центрифугирования этот краситель объединялся с основным раствором [Hong et al., 2012]. Другой

способ изоляции SYBR Green I от реакционной смеси достигался созданием барьера из смеси парафинов, выдерживающей 65°C, но плавящейся при 80°C [Liang et al., 2013]. Для этого капля интеркалирующего красителя помещалась на дно пробирки, над которой формировался барьер из данной смеси парафинов, и уже затем наливалась реакционная смесь. По завершению амплификации производился нагрев до соответствующей температуры, сопровождаемый вибрацией для лучшего перемешивания двух разделенных растворов, после чего можно было регистрировать достигнутые результаты амплификации. Еще один способ временного устранения SYBR Green I из реакционной смеси заключался в изготовлении специальных капсул из агара, содержащих этот краситель, помещаемых в пробирку и расплавляемых по завершению процесса LAMP амплификации [Karthik et al., 2014]. Чуть позже были проанализированы две группы интеркалирующих в ДНК красителей, возбуждаемых в зеленой и оранжевой областях спектра, из которых наиболее подходящими для детекции продуктов LAMP амплификации были признаны SYTO-82, SYTO-84 и SYTOX Orange [Seyrig et al., 2015]. Отечественными авторами также исследована целая группа аналогичных соединений и было показано, что наилучшие результаты детекции продуктов LAMP-амплификации обеспечивают красители SYTO-9 и SYTO-82 [Oscorbin et al., 2016]. Причем в обеих этих работах испытывался также SYBR Green I, уступивший по чувствительности другим красителям, и была продемонстрирована возможность контроля за LAMP амплификацией в реальном времени, но для этого уже потребовались подходящие (дорогостоящие) ДНК-термоциклеры с оптическим модулем. Еще большее число связывающихся с ДНК флуоресцентных красителей (двадцать три) было опробовано в другой работе, в том числе с учетом ингибирования ДНК полимеразы и в руках этих авторов лучшие результаты LAMP амплификации были отмечены с SYTO-9, SYTO-82, SYTO-16 и SYTO-13, а также с Miami Yellow [Quyen et al., 2019]. Ранее вместо SYBR Green I для детекции продуктов LAMP амплификации было предложено использовать другой интеркалирующий флуоресцентный краситель – берберин [Fischbach et al., 2015]. В качестве преимуществ этого красителя указывался его природный характер и меньшая стоимость при схожей чувствительности, однако для регистрации его свечения требовался ультрафиолетовый источник света, поскольку при обычном освещении изменения реакционной смеси были не видны.

Поскольку известно, что полиэтиленимин осаждает ДНК и если ее много (а в LAMP ДНК образуется много), то это будет заметно глазом, и

поэтому появление другого типа осадка было предложено контролировать в еще одной экспериментальной статье разработчиков данной реакции [Mori et al., 2006], хотя это соединение способно несколько ингибировать процесс петлевой амплификации.

В приведенных выше уравнениях (1) и (3) отражены единичные события полимеризации цепи ДНК, тогда как разных молекул в реакционной смеси присутствуют огромные количества. В частности, используемые при построении новых цепей ДНК дНТФ, превращаясь в составе ДНК в дМНФ, заметно уменьшаются в количестве, поскольку при LAMP амплификации молекул ДНК синтезируется довольно много. Считается даже, что происходит истощение пула дНТФ, что позволило использовать это обстоятельство для регистрации прохождения LAMP реакции. Так, было показано, что добавление к 25 мкл раствора после завершения LAMP реакции 1 мкл 0,1 mM CuSO<sub>4</sub> ведет в течение 15 сек к образованию некоего осадка в виде кольца в средней части пробирки, в той, где не произошла амплификация, что авторы связали с присутствием большего количества неизрасходованных дНТФ, взаимодействующих с сульфатом меди [Zhang et al., 2009]. Другими авторами было продолжено исследование эффекта взаимодействия CuSO<sub>4</sub> в разных довольно высоких концентрациях (от 0,5 до 5 M) с компонентами LAMP реакции и показано, что формирующийся белый осадок представляет собой Cu(OH)<sub>2</sub> и его количество зависит от присутствующего в растворе дНТФ [Zoheir, Allam, 2010].

Еще одним неспецифическим способом детекции продуктов LAMP реакции следует считать использование флуоресцентного красителя и его гасителя, расположенных на 5'-экстрапоследовательности внутренних FIP- и VIP-праймеров, которые авторы назвали EFIP и EVIP соответственно [Wang et al., 2015]. Важным моментом этого подхода MERT-LAMP (Multiple Endonuclease Restriction real-Time) являлось наличие в этой экстрапоследовательности сайта узнавания нуклеотидной последовательности Nb.BstDI с оптимумом действия 65°C, узнающей гексануклеотидный участок, что приводило к тому, что в ходе LAMP амплификации возникали двухцепочечные участки ДНК, одну цепь которых (несущую флуорохром и гаситель) этот фермент разрезал, высвобождая в раствор короткую последовательность с флуорохромом, который начинал светиться. Помимо этого, возникали и другие сайты данной нуклеотидной последовательности в составе гантелеподобных структур, обеспечивая дополнительные места начала построения цепей ДНК. Ранее для мультиплексного анализа результатов LAMP амплификации, сопряженного с пироквенированием,

экстрапоследовательность в виде сайта узнавания нуклеотидов в качестве баркодов была добавлена в FIP-праймер между F1c и F2 зонами [Liang et al., 2012]. При этом в разные FIP-праймеры, нацеленные на выявление разных вирусных и бактериальных патогенов, добавлялись различные баркоды, позволяющие их затем дифференцировать. По завершению LAMP реакции производилось удаление мешающих пироквенированию компонентов (пирофосфат и др.) после чего проводилось ограниченное секвенирование и по выявлению тех или иных баркодов судили о наличии в исходном образце соответствующих патогенов. Помимо неспецифической детекции результатов LAMP, поскольку от димеров праймеров или неспецифического отжига эти подходы не защищают, требуется отсутствие сайтов данных нуклеотидов в мишенях для амплификации, чему дополнительно нужно уделять внимание, а действующие программы подбора праймеров, о которых будет говориться ниже такой опцией не обладают.

Схожий метод детекции в реальном времени продуктов LAMP амплификации получил название TEC-LAMP (*Tth* Endonuclease Cleavage), поскольку основан на использовании термостабильной *Tth* эндонуклеазы IV, расщепляющей цепь ДНК в месте, где отсутствует азотистое основание, находящееся между флуорохромом и его гасителем, а именно вблизи 5'-конца одного из внутренних составных праймеров, синтезированного с такой модификацией [Higgins et al., 2018]. В этом случае после того как построенная цепь ДНК с внутреннего праймера смещалась новой цепью ДНК, построенной с внешнего праймера, возникала шпильчатая структура и 5'-конец внутреннего лампликона с отсутствием одного азотистого основания формировал двухцепочечную ДНК, которую расщепляла находящаяся в реакционной смеси *Tth* эндонуклеаза IV, тем самым выводя флуорофор с небольшим участком ДНК в раствор и заставляя его светиться.

Модификация внутренних праймеров FIP и VIP путем внедрения в них между их частями предшественника дезоксирибозы с обогащенной цитозинами последовательностью с целью формирования в ходе амплификации функциональных дезоксирибозимов в виде G-квадруплексов, в комплексе с гемом имитирующих пероксидазную активность, позволяет с помощью соответствующего субстрата и прочих необходимых ингредиентов вести колориметрическую детекцию результатов LAMP амплификации [Zhu et al., 2017], но специфичной подобную детекцию считать также нельзя ввиду того, что последовательность, превращающаяся в

функциональный дезоксирибозим, привносится в реакционную смесь вместе с праймерами.

В основе ряда несколько отличающихся способов детекции результатов LAMP амплификации лежит использование предложенной ранее для другой изотермической реакции праймерной конструкции Molecular zipper, состоящей из одно- и двухцепочного участка ДНК, где первый выступал непосредственно праймером, а второй выполнял роль носителя флуорохрома, расположенного на 5'-конце данного олигонуклеотида, свечение которого временно блокировалось его гасителем, размещенном на 3'-конце комплементарному ему олигонуклеотида [Yi et al., 2006]. По хронологии первым из этой группы оказался способ, получивший название DARQ (Detection of Amplification by Release of Quenching), и заключающийся в том, что один из его внутренних праймеров нес такую молекулярную застезку-молнию, тушащую до поры до времени его флуоресценцию [Tanner et al., 2012]. В этой работе флуорохром располагался на смещаемом в ходе амплификации коротком олигонуклеотиде-блокираторе, который оказываясь вытесненным из исходной структуры с более длинным олигонуклеотидом-праймером, придавал свечение раствору, поскольку на его месте оказывалась новая цепь ДНК, и он уже не мог составить ей конкуренцию. Позже другие авторы, применив этот принцип к подобным праймерным структурам, несущим разные флуорохромы, показали возможность мульти(три)плексной LAMP амплификации [Nanayakkara, White, 2019].

Использование флуоресцентно меченного праймера (одного из внутренних или петлевых) и относительно короткого комплементарного ему олигонуклеотида, несущего гаситель, позволило реализовать несколько иной принцип детекции мультиплексной LAMP амплификации, названный QUASR (Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters), характеризующийся при этом фиксацией результатов только по конечной точке [Ball et al., 2015]. Его особенностью было то, что температура плавления тушащего олигонуклеотида ниже на 10°C, чем рабочая температура реакции, что обеспечивало его нахождение в растворе, никак не мешая амплификации, но по завершению процесса и снижения температуры данный тушащий олигонуклеотид, присутствующий в большом избытке, связывался со всем невступившими в построение новых цепей ДНК мечеными праймерами, обеспечивая тушение их флуорохромов, тогда как праймеры послужившие затравками при синтезе ДНК ввели свои флуорохромы в образовавшиеся лампиконы, которые и светились.

Хотя и в статье [Kouguchi et al., 2010] описывается как с помощью двух комплектов LAMP праймеров велась детекция конкретных генов Shiga 1 и Shiga 2 у токсигенных изолятов *Escherichia coli*, абсолютно специфичным этот подход считать нельзя, поскольку происходящие изменения флуоресценции зависят фактически от одного внутреннего VIP праймера, меченного флуоресцентным красителем FAM, выступающим в качестве донора для осуществления FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer<sup>3</sup>) эффекта, тогда как акцептором служит краситель бромистый этидий, неспецифично интеркалирующий в любую двухцепочечную ДНК. Принцип данного эксперимента заключался в следующем. В случае присутствия в реакционной смеси того гена, который мог амплифицироваться с меченым праймером VIP, возникали соответствующие меченные флуоресцеином лампиконы, которые, будучи двухцепочечными, связывались с присутствующим в растворе красителем бромистым этидием и при возбуждении соответствующей длиной волны красителя FAM тот передавал резонансную энергию на находящийся с ним в тесном контакте в составе одной молекулы бромистый этидий, тем самым снижая собственную флуоресценцию. Но если в образце присутствовал другой ген, амплифицируемый с помощью немеченного праймера, то VIP праймер, меченный FAM, оставался в растворе и не мог передавать резонансную энергию бромистому этидию, светясь сам.

#### Специфические методы детекции лампиконов

Как уже упоминалось выше, в оригинальной статье 2000 г. [Notomi et al., 2000] для подтверждения амплификации целевого участка среди прочих способов был применен довольно трудоемкий и длительный метод блот-гибридизации по Саузерну, в котором в качестве зонда использовался меченный дигоксигенином олигонуклеотид. Однако в той статье не описано как проводилось выявление такой метки, но поскольку упоминается набор для мечения DIG Oligonucleotide Tailing Kit фирмы Roche Diagnostics, то вполне логично допустить, что затем был использован другой набор этой фирмы, содержащий антитела к дигоксигенину, конъюгированные со щелочной фосфатазой. Пишем здесь об этом только потому, что спустя несколько лет такой подход с выявлением продуктов LAMP амплификации с помощью процесса молекулярной гибридизации с зондом, комплементарным или участку между внутренними праймерами или зоне Loop праймеров, и

<sup>3</sup> о FRET-эффекте ниже будет говориться более подробно

с применением соответствующих антител нашел довольно широкое применение.

Весьма распространенным вариантом подобной детекции целевых продуктов LAMP амплификации стал иммунохроматографический анализ на специальных тест-полосках, называемых также Lateral Flow Dipstick или Device (LFD), что даже привело к использованию аббревиатуры LAMP-LFD [Kiatpathoomchai et al., 2008; Jaroenram et al., 2009] с тем отличием, что в этих работах гибридизационная проба была мечена FITC и использовались соответствующие антитела к этой метке. Популярность такого подхода, помимо подтверждения достоверности амплификации, объясняется его быстротой, поскольку по завершению основной реакции требуется около 5 минут на такое иммуноферментное взаимодействие и хроматографическое разделение, с высокой чувствительностью свидетельствующее о наличии или об отсутствии (благодаря специальному контролю) искомым нуклеотидных последовательностей. Для таких LAMP-LFD анализов необходимо дополнительно метить один из внутренних праймеров биотином, что не составляет большой проблемы и практически не удорожает данную реакцию. Недавно этими же авторами [Jaroenram et al., 2020] сообщено о новом варианте такой детекции, названной ими как SH-LAMP-LFD (Simultaneous DNA Hybridization), характеризующейся в 100 раз увеличенной чувствительностью по сравнению с предыдущим способом. В этом случае по завершению LAMP амплификации в реакционную пробирку добавляли LFD-буфер и окунали в него тест-полоску, с которой через 2 минуты считывали результат. Ранее для подобной LAMP-LFD детекции другим коллективом авторов было разработано специальное устройство с заменяемыми картриджами [Roskos et al., 2013]. Детекция целевых LAMP продуктов осуществлялась также с помощью иммунохроматографии, но была еще сопряжена с особой пробой со смещением цепи ДНК и получила название SD-LAMP-LFIAs (SD – Strand Displacement; LFIA – Lateral Flow Immunoassay strip) [Phillips et al., 2018]. Использование чуть более сложного устройства для иммунохроматографического разделения продуктов амплификации позволило авторам назвать свой подход LAMP-LFB (Lateral Flow Biosensor) [Gong et al., 2021]. В одной из работ было предложено проводить мультиплексную LAMP-LFD детекцию благодаря использованию разных гибридизационных зондов, меченных, в частности, дигоксигенином и техасским красным с соответствующими антителами к ним [Jung et al., 2015]. В другой подобной работе сообщается о триплексной LAMP, в ходе которой, благодаря разным меткам проводилось обнаружение

патогенной *Entamoeba histolytica* и идентичных ей, но непатогенных *E. dispar* и *E. moshkovskii* [Foo et al., 2017]. Завершая рассмотрение LAMP, сопряженной с использованием антител, стоит упомянуть еще такой вариант этой реакции как LAMP-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [Lee et al., 2009], который, впрочем, не нашел широкого применения ввиду его длительности и сильной конкуренции со стороны LAMP-LFD.

Еще один колориметрический метод детекции целевых продуктов LAMP амплификации основан на агрегации коллоидного золота, присоединенного к модифицированному тиоловой SH-группой олигонуклеотиду, комплементарному петлевому участку лампликона [Seetang-Nun et al., 2013]. В этой работе показано, что при положительном результате LAMP и произошедшей гибридизации с олигонуклеотидом, функционализированным коллоидным золотом при добавлении соли ( $MgSO_4$ ) имеет место стабилизация, сохраняющая красную окраску раствора, тогда как в отсутствии целевых продуктов происходит агрегация этих гибридизационных проб с золотом и цвет становится лиловым, что видно невооруженным глазом. Позже этот подход был усовершенствован [Manajit et al., 2018] и превращен в UDG-LAMP-AuNP (Uracil-DNA-Glycosylase; Aurum NanoParticle), позволяющий к тому же исключить возможную контаминацию от предыдущих реакций, о чем будет идти речь в разделе про неспецифичную LAMP амплификацию.

Известно, что гуанин для многих флуорохромов выступает в качестве гасителя флуоресценции, и это его свойство было использовано и в LAMP амплификации при детекции результатов в реальном времени, получившей название ABC-LAMP (Alternately Binding Quenching probe) [Tani et al., 2007]. Для этого был синтезирован гибридизационный зонд, отжигающийся на месте одного из петлевых праймеров, и его особенностью было наличие на 3'-конце фосфатной группы, не позволяющей ему удлиняться ДНК полимеразой, а на 5'-конце у цитозинового остатка находился подходящий флуорохром (BODIPY FL), тушение которого происходило при спаривании данной пробы с мишенью, у которой в ожидаемом месте располагался комплементарный цитозину гуанин. Относительно недавно тот же принцип тушения флуоресценции гуанином того же красителя BODIPY FL был использован при исследовании большого числа мишеней с помощью LAMP реакции в режиме реального времени [Takayama et al., 2019]. Главным отличием было то, что применялся не гибридизационный зонд, а несущий флуоресцентную метку один из петлевых праймеров, что, впрочем, уже не является специфичной детекцией продуктов LAMP,

поскольку привносится в реакцию вместе с праймерами.

В качестве гибридационных зондов в LAMP реакции могут использоваться так называемые молекулярные маяки или биконы (Molecular Beacon) [Tyagi, Kramer, 1996], представляющие собой олигонуклеотидные шпильчатые структуры со сближенным в их обычном состоянии расположением на 5'- и 3'-концах флуорохрома и его тушителя. Однако прошло довольно много времени, прежде чем появились первые публикации с их использованием в данной реакции, что вполне объяснимо, поскольку LAMP преимущественно позиционировалась как реакция, обходящаяся без дорогостоящего оборудования, но при использовании молекулярных биконов уже требуется (как правило) применение ДНК-термоциклера с оптическим модулем. Так, только в 2017 г. впервые был применен молекулярный бикон для детекции протекания LAMP в режиме реального времени, и реакция была названа MB-LAMP [Liu et al., 2017]. В этой работе много внимания было уделено оптимизации размеров бикона, его концентрации в реакционной смеси, температурным условиям. Однако справедливости ради следует сказать, что ранее был описан способ мультиплексной детекции разных LAMP-продуктов в одной реакции за счет применения гибридационных зондов, несущих различные флуорохромы и гасители к ним [Nyuan, Swinson, 2015]. В этой работе приведены последовательности данных зондов, отжигающихся на месте одного из петлевых праймеров, но классическими молекулярными биконами они не являлись, поскольку не имели структуру шпильки со стебельком. Но еще раньше в статье [Kubota et al., 2011], посвященной использованию в LAMP так называемых ассимилирующих проб, приводятся последовательности настоящих молекулярных биконов, также пригодных для гибридизации с участками петлевых праймеров, но ни в методической части, ни в обсуждении результатов про них ничего более не говорится.

Применение в молекулярных биконах LNA нуклеотидов уменьшило фоновую флуоресценцию [Bakthavathsalam et al., 2018]. Использование расщепляемого бикона дало название методу CHB-LAMP (Cleave Hairpin Beacon) [Ding et al., 2019; 2020]. Важной особенностью устройства такого бикона было наличие ряда рибонуклеотидов, которые при формировании гетеродуплексной структуры на месте, где обычно отжигается Loop праймер разрушались РНКазой H, а оставшаяся часть служила праймером, усиливая амплификацию и обеспечивая детекцию в реальном времени. Но еще раньше о нахождении в петле бикона рибонуклеотида, расщепляемого РНКазой H, и также служившего затем праймером

было сообщено в статье, в которой к тому же использовалась третья пара азотистых оснований – Z и P, относящихся к системе AEGIS (Artificially Expanded Genetic Information Systems), располагавшихся в стебельке такого бикона, что приводило к снижению фоновой флуоресценции [Yaren et al., 2016]. В своей другой статье эти же авторы разместили в биконах с третьей AEGIS парой нуклеотидов сайт никазы Nt.BsmAI с той же целью улучшить детекцию продуктов LAMP амплификации [Yaren et al., 2016a].

Недавно сообщено о новом типе молекулярных биконов, обеспечивающих колориметрическую детекцию результатов LAMP амплификации благодаря тому, что их бикон содержал не флуорохром с гасителем, а дополнительный участок ДНК, служащий дезоксирибозимом, имитирующим действие пероксидазы хрена и вкупе с необходимыми ингредиентами обеспечивал развитие окраски реакционной смеси [Lee et al. 2020]. Причем авторы подчеркнули, что их подход не требует применения дорогостоящего оборудования.

В методе FRET LAMP (Fluorescence (или Förster) Resonance Energy Transfer) [Chou et al., 2011] детекция целевых продуктов петлевой амплификации основана на предложенном способе переноса резонансной энергии от флуорохрома-донора к флуорохрому-акцептору при их нахождении в разных олигонуклеотидх, когда те гибридизуясь с некой матричной нуклеотидной последовательностью, оказываются сближены настолько, что такой перенос может иметь место [Cardullo et al., 1988]. В свою очередь это базируется на открытом в середине 1940-х гг. эффекте переноса энергии в виде резонансных диполь-дипольных взаимодействий, необходимым условием чего являются перекрывающиеся спектры испускания и возбуждения донорного и акцепторного флуорохромов соответственно [Förster, 1948]. Важным моментом для осуществления такого переноса энергии является расстояние между донорным и акцепторным красителями, поскольку эффективность переноса сильно зависит от расстояния (обратно пропорциональна ему в шестой степени) и в упрощенном виде описывается следующей формулой –  $E_0 = 1/(1+[R/R_0]^6)$ . Возвращаясь к методу FRET LAMP, нужно отметить, что место для отжига проб с соответствующими флуорофорами располагалось в средней части гантелеподобной структуры между FIP и VIP праймерами, причем один из олигонуклеотидов нес на 3'-конце флуоресцеин (и поэтому не мог служить праймером), а соседний с ним (через два нуклеотида) олигонуклеотид нес краситель LC640 на 5'-конце и на 3'-конце фосфатную группу, что также не позволяло ему удлиняться ДНК полимеразой, При

этом в данном исследовании изменение флуоресценции велось в режиме реального времени в ДНК-термоциклере, обладающим возможностью регистрировать FRET эффект [Chou et al., 2011], однако нужно признать, что далеко не все подобные приборы характеризуются таким функционалом.

Предложен вариант детекции свечения флуорохрома только по завершению LAMP реакции, для чего требовалось открывать пробирку, что не есть хорошо, но используемый нанотехнологичный подход заслуживает внимания [Waiwijit et al., 2015]. В этом случае меченный флуорохромом одноцепочечный олигонуклеотид, служащий гибридационной пробой, находился в одной пробирке с оксидом графена, связывающим его за счет  $\pi$ - $\pi$  стэкинг взаимодействий, приводя к гашению флуоресценции. Проводимая отдельно LAMP амплификация, если протекала успешно, то приводила к образованию большого количества молекул ДНК, в том числе содержащих последовательности, комплементарные гибридационному зонду. При объединении двух этих растворов, гибридационный зонд формировал с лампликонами двухцепочечную структуру, которая десорбировалась с оксида графена, в результате чего флуорохром приобретал способность к свечению. В случае если в LAMP реакции не накапливалась нужная ДНК, то флуоресценция продолжала отсутствовать.

Похожие друг на друга методы проведения LAMP реакции с детекцией меняющейся флуоресценции в режиме реального времени, принципы которой происходят из начала 2000-х гг., описываются в статьях двух групп авторов [Howard et al., 2015; Gadkar et al., 2018]. Так, в первой статье [Howard et al., 2015] использовалась проба HyBeacon (Hybridization Beacon), флуорохром в средней части которой, как было показано ранее, увеличивал свою флуоресценцию после формирования двухцепочечной структуры [French et al., 2001]. Местом отжига HyBeacon в LAMP реакции был участок между внутренними праймерами FIP и VIP. Во второй статье метод детекции продуктов LAMP реакции в режиме реального времени, также основывающийся на эффекте усиления свечения флуорохрома в двухцепочечной ДНК [Nazarenko et al., 2002], получил название FLOS-LAMP (Fluorescence of Loop primer Upon Self dequenching) [Gadkar et al., 2018]. В нем при подборе петлевого праймера учитывалось наличие около его 3'-конца остатка тимина, к которому и производилось присоединение флуорохрома, а также присутствие одного или нескольких гуанинов. В ходе LAMP амплификации этот участок мишени становился двухцепочечным, и происходило увеличение флуоресценции.

Что касается упомянутых выше ассимилирующих проб, основанных на принципе молекулярной застежки-молнии, то они были названы так потому, что отжигаясь на участке петлевых праймеров, выполняли их функцию и после удаления тушащего комплементарного их части олигонуклеотида, передавали свою флуоресценцию образующимся в LAMP ампликонам [Kubota et al., 2011]. Этой же группой авторов создано портативное устройство, позволяющее количественно регистрировать в реальном времени меняющуюся флуоресценцию при использовании таких проб в LAMP реакции [Jenkins et al., 2011].

Еще один тип одно/двухцепочечных гибридационных проб, происходящий из начала 2000-х гг. [Li et al., 2002], напоминающий молекулярные застежки-молнии, получивший обозначение как OSD (One-step Strand Displacement), нашел применение и в LAMP амплификации [Jiang et al., 2015; 2017]. Главными отличиями этих проб было то, что смещение более короткой цепи для застежек-молний происходит под действием ДНК полимеразы, обладающей цепь-вытесняющей активностью, тогда как в случае OSD проб происходит безферментативная за счет энергии водородных связей замена цепей ДНК, начинающаяся со служащего затравкой одноцепочечного участка, который обычно составляет 10-11 нуклеотидов. И так как OSD проба подобно застежкам-молниям сближено несет на разных цепях флуорохром и его гаситель, то при замене тушащей цепи на последовательность лампликона происходит регистрируемый подъем флуоресценции. Этой же группой авторов опубликована серия статей, посвященная использованию в LAMP реакциях вместе со специфической гибридационной пробой к петлевому участку, несущей экстрапоследовательности, запускающие процесс самосборки других каталитически активных шпилечных структур, также несущих флуорохром и гаситель, что обеспечивает дополнительное увеличение сигнала в 50 - 100 раз [Li et al., 2012; Zhu et al., 2016].

Применение некоей смещаемой медиаторной нуклеотидной последовательности позволило создать универсальную репортерную пробу в виде напоминающего молекулярный бикон, но с выступающим 3'-концом шпилечного олигонуклеотида, несущего гаситель с флуорохромом, которые в ходе такой MD-LAMP (Mediator Displacement) реакции пространственно отдалялись, приводя к свечению последнего [Becherer et al., 2018]. Для осуществления всей этой процедуры петлевой праймер представлял собой одно/двухцепочечную структуру по типу упоминавшейся ранее

молекулярной застежки-молнии, не неся при этом никаких меток, но его короткий олигонуклеотид при построении комплементарной цепи смещался *Bst* полимеразой и сам становился праймером для универсальной пробы.

Для детекции результатов LAMP предложено использовать персональные глюкометры, для чего после завершения LAMP амплификации необходимо провести ряд этапов [Du et al., 2015; Guo et al., 2020]. Сначала производилась молекулярная гибридизация ампликонов с зондом, комплементарным участку мишени между первой и второй частями внутренних FIP и VIP праймеров (где обычно размещаются Loop праймеры), при этом данный зонд представлял собой фиксированную на магнитных частицах гибридизационную пробу со смещением цепи и нес комплементарную ей нуклеотидную последовательность, конъюгированную с ферментом инвертазой, в силу меньшего числа водородных связей (спаренных нуклеотидов) не выдерживающую «конкуренцию» и выходящую в раствор. После удаления излишних, не вступивших в реакцию гибридизации проб с помощью магнита, а также удаления гибридизационных комплексов в виде этой пробы с лампликонами, в реакционной смеси оставался олигонуклеотид с инвертазой, на дополнительной стадии превращающей добавленную сахарозу в глюкозу, которая и регистрировалась [Du et al., 2015]. В своей следующей работе эти авторы, не изменив общий принцип детекции результатов LAMP с помощью глюкометра, несколько усложнили организацию гибридизационной пробы, сделав ее более составной [Guo et al., 2020].

Было показано, что с помощью довольно заметных (на градусы) различий в температуре плавления лампликонов можно детектировать в одной LAMP реакции разные мишени [Mahony et al., 2013]. С применением технологии HRM возможно даже дискриминировать лампликоны, различающиеся на 0,2°C [Dong et al., 2018]. С целью улучшить разрешающую способность данного метода было предложено добавлять в реакционную смесь пирофосфатазу, разрушающую образующийся пирофосфат, связывающийся с ионами магния, которые, как известно, влияют на температуру плавления молекул ДНК [Tone et al., 2017].

#### LAMP и микрофлюидика

Довольно большое число работ методологического плана посвящено использованию микрофлюидики для проведения LAMP реакций, что неудивительно, поскольку сразу решается несколько вопросов по миниатюризации процесса и повышению его чувствительности, а также по большей пригодности для РОСТ анализов. Прежде чем перейти

к краткому описанию этих подходов необходимо уточнить, что здесь под микрофлюидикой мы будем понимать очень широкий круг устройств, включая разнообразные ДНК-чипы и микроемкости.

Вскоре после появления метода LAMP амплификации его разработчики опубликовали статью, в которой сообщили о создании интегрированного микрочипа, позволяющего вести изотермическую амплификацию, регистрируя ее протекание с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green I или на том же чипе разделять продукты гель-электрофорезом [Hataoka et al., 2004]. Изготовление 8-ми канального микрочипа с регистрацией результатов LAMP амплификации путем контроля за мутностью раствора позволило другим авторам назвать свой подход как  $\mu$ LAMP [Fang et al., 2010]. Была также сконструирована система детекции флуоресценции LAMP амплификации, пригодная для РОСТ анализов, проводившихся в одноразовом полидиметилсилоксановом чипе, несущем 9 реакционных колодцев емкостью 1 мкл каждый [Abe et al., 2011].

Сообщено об изготовлении интегрированного чипового устройства, с помощью которого можно было провести экстракцию нуклеиновых кислот и последующую LAMP амплификацию [Wu et al., 2011]. В дальнейшем целый ряд подобных устройств, использующих вращение путем их центрифугирования, предложен для проведения и регистрации результатов LAMP амплификации [Oh et al., 2016; Santiago-Felipe et al., 2016; Park et al., 2017; Nguyen et al., 2019; Li et al., 2020].

С помощью специально чипа dPAD (distance-based Paper Analytical Device), изготовленного на фильтровальной бумаге Whatman No. 113, предложен способ визуальной полуколичественной оценки произошедшей LAMP амплификации [Hongwarittorn et al., 2017]. Его суть заключалась в следующем – с помощью твердочернильного принтера Xerox ColorCube 8570, печатающего восками, на данной фильтровальной бумаге были очерчены кольцевая зона для нанесения образца, промывочная область и гидрофильный канал с цифровой разметкой и подлежащим слоем положительно заряженного полиэтиленimina, что обеспечивало продвижение жидкости (реакционной смеси после LAMP амплификации), содержащей отрицательно заряженный гидрооксинафтоловый синий, задерживаемый полиэтиленимином. Поскольку в ходе положительной LAMP реакции концентрация ионов магния снижется, то это приводит к увеличению количества свободного красителя и по длине окрашенного синим (цвет гидрооксинафтолового синего без магния) пути в гидрофильном канале



можно приблизительно судить о стартовом количестве копий искомой мишени, чему как раз способствует цифровая разметка.

Еще одним типом микроемкостей для проведения LAMP амплификации явились «капли» полиакриламидного геля, толщиной около 1,5 микрон и диаметром около 17,5 микрон, закрепленные на стекле [Lam et al., 2008]. За счет ячеистой структуры геля в нем происходила амплификация целевых продуктов, регистрируемая по свечению интеркалирующих красителей SYBR Green, EvaGreen и др. Фактически в геле образовывались так называемые молекулярные колонии.

Некоторым особняком стоит публикация индийских авторов, отнести которую к микрофлюидике можно с большой натяжкой, разве что потому как реакционная смесь для проведения LAMP, названной ими как  $\mu$ LAMP, попадала в реакционный сосуд, которым служили стеклянные капилляры (1 мм x 75 мм), под действием капиллярных сил, после чего их концы для предотвращения испарения герметизировались или минеральным маслом или парафином [Ali et al., 2021]. Регистрация результатов такой LAMP амплификации велась при помощи красителя гидрооксинафтолового синего, причем контролировалось изменение окраски в капилляре каждые 5 минут.

Электрохимическая детекция накопления продуктов LAMP амплификации в большинстве случаев связана с микрофлюидикой, но с учетом специфических особенностей этих процессов, ее следует рассмотреть отдельно. Микрофлюидика легла также в основу цифровой LAMP амплификации, к рассмотрению которой ниже перейдем.

#### Электрохимическая детекция лампиконов

Считается, что электрохимические методы детекции продуктов амплификации нуклеиновых кислот имеют ряд преимуществ перед оптическими, не имея в виду самые простые визуальные методы оценки. При этом многие из предложенных способов детекции лампиконов представляют собой микрофлюидные устройства, включая более просто организованные чипы. Грубо их все можно подразделить на проводящие измерения в растворе или на твердой фазе.

Важной составляющей электрохимической детекции лампиконов являются электроактивные соединения, среди которых, пожалуй, наибольшее распространение получил краситель метиленовый синий, несущий положительный заряд и интеркалирующий в двухцепочечную ДНК, позволяя вести измерения изменений электрохимических показателей в растворе. Так, в одной из работ был задействован портативный USB потенциостат, с

помощью вольтамперометрии квадратной волны измеряющий ток, меняющийся при накоплении лампиконов, связывающих находящийся в растворе метиленовый синий и, выводя его таким образом из электроактивного состояния [Nagatani et al., 2011]. Другими авторами был изготовлен специальный чип, электроактивным компонентом реакционной смеси в электрохимической измерительной ячейке этой LAMP амплификации также служил метиленовый синий [Hsieh et al., 2012]. При измерении редокс-потенциалов через 0 мин, 30 мин и 60 мин протекания LAMP явно видно снижение тока ввиду исключения все большего количества метиленового синего из раствора за счет его интеркаляции в накапливающуюся ДНК. В другой схожей работе [Liu et al., 2014] оценивалось изменение электроактивного состояния метиленового синего в ходе LAMP амплификации с помощью циклической вольтамперометрии. В еще одной статье для детекции электрохимическим методом микотоксина – охратоксина А – также использовался метиленовый синий, но особенностью этой работы было применение аптамера, являющегося триггером данной LAMP реакции, поскольку он выполнял роль одного из внешних праймеров [Xie et al., 2014]. Детекция накопления лампиконов проводилась в этом случае при помощи дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Был изготовлен специальный композитный чип из оксида индия-олова с полидиметилсилоксаном с восемью микрореакторами, в которых проводилась электрохимическая LAMP амплификация в присутствии метиленового синего, позволившая осуществить мультиплексный подход, получивший название  $\mu$ ME-LAMP (micro Multiplex Electrochemical) [Luo et al., 2014].

Другим довольно часто используемым интелекалятором для электрохимической LAMP реакции служил редокс активный краситель Hoechst 33258, изменение потенциала которого при его связывании с лампиконом измерялось путем вольтамперометрии линейной развертки [Ahmed et al., 2009]. Однако недостатком этого красителя является ингибирование ДНК полимеразы. Относительно недавно разработан электрохимический геносенсор на основе графена и в качестве редокс пробы применялся тот же Hoechst 33258 для чего был изготовлен специальный электрод и минипотенциостат, позволяющий осуществлять циклическую вольтамперометрию для регистрации изменения тока при LAMP-EC (Electrochemical) [Jaroenram et al., 2020].

Интеркалирующее в цепочки ДНК редокс-соединение в виде гексамина рутения использовалось при электрохимической детекции наработки продуктов LAMP-амплификации в реальном времени

[Ahmed et al., 2013; Hashimoto et al., 2017]. Для подобных целей в LAMP амплификации использовались и редокс активные комплексы осмия [Safavieh et al., 2014]. Высокочувствительный вариант LAMP-ECL (ElectroChemiluminescence), основанный на использовании люминофора в виде соли рубидия  $[Ru(bpy)_3]Cl_2$  и триггера трипропиламина, потребовал уже наличия специальных электродов [Roy et al., 2016]. С помощью электродов сравнения и сопротивления в специальной измерительной ячейке в режиме реального времени велся контроль за протеканием LAMP реакции в присутствии кристаллического фиолетового, связывающегося с лампликонами, тогда как также отрицательно заряженный пирофосфат связывался с ионами магния, что приводило к снижению проводимости раствора [Liu et al., 2013]. В одной из работ в ходе LAMP амплификации использовался меченный диоксигенином дУТФ, что позволило в дальнейшем через антитела к данному соединению конъюгировать лампликоны с пероксидазой, которые в свою очередь оказались связаны через гибридизационный зонд, сорбированный благодаря биотин-стрептавидиновой системе на поверхности специального чипа, на котором с помощью хроноамперометрии велась регистрация превращения под действием этого фермента гидроксинаона в бензохинон, сопровождаемая выделением электронов [Bartosik et al., 2018].

И это далеко не полный перечень вариаций LAMP амплификации, в которой целевые или побочные продукты регистрировались с помощью электрохимических реакций.

#### **Детекция лампликонов физическими методами**

Безусловно, все происходящее в химических и тем более электрохимических процессах так или иначе основано на физических взаимодействиях атомов, протонов и электронов, однако все же существует группа методов, являющихся более физическими (пьезоэлектрические, магнитные, оптические и др.), чем остальные. И часть из них также нашла применение в детекции результатов LAMP реакции, хотя в большинстве своем это единичные работы, поскольку массовая диагностика с помощью петлевой амплификации нацелена на максимально простые и дешевые ее варианты. Тем не менее, соблюдая хронологический порядок, все же стоит привести здесь некоторые оригинальные исследования, позволяющие качественно судить о произошедшей LAMP амплификации. При этом в зависимости от используемого метода детекции результатов LAMP реакции велся контроль как побочных (пирофосфат, протон), так и целевых продуктов в виде лампликонов. Также нужно

заметить, что во многих подобных публикациях подчеркивается более высокая чувствительность физических методов детекции лампликонов по сравнению с другими, в том числе классическими. Но кроме как здесь больше не будем заострять на этом внимание.

Поскольку в процессе LAMP амплификации происходит изменение рефрактивного индекса раствора, вызванное накоплением в нем молекул ДНК и пирофосфата магния, то имеется возможность измерять рефрактивный индекс с помощью поверхностного плазмонного резонанса, для чего был разработан специальный картридж из полиметилметакрилата с поликарбонатной призмой, а метод получил название SPR LAMP (Surface Plasmon Resonance) [Chuang et al., 2012]. В качестве преимуществ перед измерением мутности раствора авторы указали на высокую чувствительность и требуемый меньший объем раствора. В другой работе с детекцией протекания LAMP реакции с помощью поверхностного плазмонного резонанса был изготовлен специальный чип с поверхностью из тонкого золота, на котором через биотин-стрептавидиновую систему происходило накопление лампликонов и шла регистрация увеличивающегося количества молекул ДНК [Yang et al., 2012].

С целью повышения чувствительности LAMP метода он был объединен с детекцией также увеличивающегося количества ДНК методом пьезоэлектрического микровзвешивания, что дало название такому подходу как LAMP-QCM (Quartz Crystal Microbalance) [Prakrankamanant et al., 2013]. Специально изготовленный микрофлюидный биосенсор GMR (Giant Magnetoresistive) позволил детектировать увеличивающееся количество лампликонов в вертикальном магнитном поле [Zhi et al., 2014]. Оптомагнитная детекция продуктов LAMP амплификации описана в другой статье [Minero et al., 2017]. Недавно сообщено о непрямом методе поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (Surface Enhanced Raman Scattering - SERS), измеряющей в микрокаплях агрегацию коллоидных наночастиц золота, вызванную накоплением пирофосфата в ходе LAMP реакции [Teixeira et al., 2020].

#### **Количественная LAMP амплификация**

Если при оценке результатов амплификации по конечной точке фактически производится качественный анализ в виде выявления специфичной нуклеотидной последовательности, например возбудителя какой-либо инфекции, то в режиме реального времени можно оценить присутствие такого возбудителя количественно, что в ряде случаев бывает крайне важно. Поскольку ПЦР уже давно подразделилась на ПЦР по конечной точке, на ПЦР в

реальном времени и на цифровую ПЦР, то вполне логично это было ожидать и от LAMP амплификации повторения такой ситуации, тем более что протекание LAMP вскоре после ее разработки стало также контролироваться в режиме реального времени.

#### **Количественная LAMP амплификация в реальном времени**

Уже в одной из первых статей [Mori et al., 2001] после разработки петлевой амплификации говорилось, что с учетом того, что в LAMP реакциях происходит изменение мутности реакционной смеси, которую можно контролировать, то в дополнение к количественной ПЦР следует ожидать появления нового метода количественной оценки числа исходных мишеней. Позже этой же группой авторов было сообщено о детекции изменения мутности реакционной смеси при LAMP амплификации в режиме реального времени с помощью специально сконструированного прибора, рассчитанного на 8 пробирок [Mori et al., 2004], ставшего затем коммерчески доступным от японской фирмы Eiken Chemical Co, которой в настоящее время поставляется новый такой прибор – Turbidimeter LA-500, пришедший на смену устаревшим моделям. В этой статье приводится сравнение результатов количественной оценки LAMP амплификации по детекции увеличивающейся мутности раствора с аналогичными данными в ПЦР, показавшее их совпадение. Авторы ввели новое понятие *Tt* (Time to turbidity), обозначающее время, необходимое для увеличения мутности растворов выше 0,1. При этом была продемонстрирована хорошая воспроизводимость этих показателей для исходного числа матриц копийностью от  $2 \times 10^3$  до  $2 \times 10^9$ .

Следующей работой [Aoi et al., 2006], заслуживающей внимания в связи с количественной LAMP амплификацией, является статья, в которой проведено сравнение количества исходных мишеней, оцениваемых при проведении LAMP реакций в режимах реального времени, с детекцией мутности раствора и меняющейся флуоресценции в турбидиметре LA-200 и термоциклере с оптическим модулем iCycler iQ соответственно. Первая реакция получила название TRt-LAMP (Turbidimetry Real-time), а вторая – FRt-LAMP (Fluorescent Real-time). Причем для измерения флуоресценции использовался краситель YO-PRO-1, про который сказано, что в количественной LAMP он зарекомендовал себя лучше, чем SYBR Green I. Динамический диапазон определяемых концентраций составил 7 порядков, что вполне сопоставимо с количественной ПЦР в реальном времени. *Tt* в данной статье стал означать Threshold time (пороговое время), что до некоторой степени соответствует пороговому циклу в ПЦР - *Ct*.

В одной из статей, посвященной эмпирическому подходу к количественной LAMP амплификации в модельной системе, предложен иной вариант – *Tr* (Time to positive) [Subramanian, Gomez, 2014], который, можно сказать, не прижился.

Завершая краткое рассмотрение количественной LAMP амплификации в реальном времени, необходимо заметить, что с ее помощью можно определять лишь приблизительное количество исходных мишеней относительно некой референсной нуклеотидной последовательности с известным числом копий, берущейся в качестве контроля путем построения калибровочных кривых. Что касается цифровой амплификации, то в этом случае в анализируемом образце производится определение абсолютного количества копий мишени, для чего нужно придерживаться определенных требований к подготовке исследуемого материала. В частности, детектируемое количество мишеней должно быть относительно невелико для исключения попадания множественных копий в конкретный микрореактор любого типа, которые могут генерироваться весьма разными способами.

#### **Цифровая LAMP амплификация**

Прежде чем перейти к рассмотрению вариантов цифровой LAMP амплификации стоит обратить внимание на фразу в самой первой статье по цифровой LAMP, где авторы отметили, что для LAMP реакции предложено немало вариантов ее проведения на чипах, но ни один из них не был реализован в цифровом формате [Gansen et al., 2012], но бесконечно так продолжаться не могло. При этом многие описанные выше подходы проведения LAMP в микрофлюидных устройствах были преобразованы в цифровую LAMP.

Так, первые сообщения о цифровой LAMP появились в 2012 г. когда две группы исследователей из США и Китая предложили, по сути, новый метод dLAMP (digital) [Gansen et al., 2012; Zhu et al., 2012]. Обе группы авторов пошли по пути изготовления специального чипа с прямоугольными ячейками числом несколько тысяч, в которые помещалась реакционная смесь для LAMP амплификации, содержащая все необходимое, включая небольшое число ДНК-мишеней и интеркалирующий краситель для детекции накопления ДНК. Было также показано, что при серийных разведениях пропорционально меняется количество светящихся ячеек, что свидетельствовало о хорошей воспроизводимости результатов [Zhu et al., 2012]. Позже американские авторы улучшили свою конструкцию и изготовили несколько вариантов таких чипов с максимальным количеством лунок, равным 10240, объемом около 50 пиколитров каждая [Kreutz et al., 2019]. Особенностью

генерации микрореакторов с помощью таких чипов было заполнение их легким минеральным маслом, после чего оно заменялось реакционной LAMP смесью, растворителем в которой служила вода и ее капли «проваливались» в имеющиеся лунки. Детекция результатов амплификации велась путем регистрации свечения кальцеина.

В дальнейшем разнообразие реакционных сосудов для dLAMP росло и их можно подразделить на несколько типов. Так, основой для некоторых стали чипы SlipChip, использующие скольжение друг относительно друга верхней и нижней пластин с вытравленными лунками для одновременного смешивания многочисленных образцов с требующимися реагентами, что было показано в модельном эксперименте с разными красителями [Du et al., 2009]. Позже разработчиками SlipChip технологии были выполнены dLAMP эксперименты, в ходе которых оценены преимущества и недостатки этого способа смешивания образцов с реагентами и проведена его оптимизация [Sun et al., 2013; Korosheva et al., 2015].

В довольно большом числе статей, посвященных dLAMP, описываются микрореакторы в виде капель в водно-масляной эмульсии, способы получения которой весьма разные. При этом можно иногда встретить аббревиатуру ddLAMP (droplet digital), показывающую, что в ней происходила LAMP амплификация в отдельных каплях. Впервые капельная LAMP амплификация в цифровом режиме была описана в 2015 г. [Rane et al., 2015]. В этой работе генерировалась водно-масляная эмульсия с помощью специального микрофлюидного устройства, имеющего зону для амплификации в виде серпантинных каналов. Скорость генерации такой эмульсии по подсчетам авторов составляла около одного миллиона капель за 110 минут. Водная фаза содержала все необходимые ингредиенты для LAMP реакции, включая исследуемый образец, результаты которой детектировались за счет свечения кальцеина или интеркалирующего красителя EvaGreen, регистрируемого в отдельных каплях при их прохождении через проточную ячейку, комбинированную с флуоресцентным микроскопом.

С помощью специального микрофлюидного чипа производилось смешивание с масляной фазой водной реакционной смеси LAMP, включающей исследуемый образец с минеральным маслом, формируя капли диаметром около 75 микрон с небольшим разбросом по размерам, не превышающим 3% и объемом около 220 пиколитров каждая [Ma et al., 2018]. Особенностью этого устройства было также то, что в нем имелось 8 зон, в каждой из которых были изготовлены ловушки для 30 капель, притом, что остальные генерируемые в эксперименте капли воды

проходили сквозь чип. В результате производимой LAMP амплификации происходило детектирование с помощью флуоресцентного микроскопа свечения кальцеина, свидетельствующего об единичных молекулах ДНК, изначально попавших в те или иные капли, застрявшие в ловушках. Авторы сообщили, что их устройство позволяет вести точный подсчет числа исходных молекул ДНК в динамическом диапазоне от 50 до  $2,5 \times 10^3$  копий на микролитр. Если в предыдущем способе регистрация свечения микрокапель в составе эмульсии велась в потоке, то в этом случае регистрация проводилась в стационарном состоянии.

Еще одна платформа для проведения цифровой LAMP амплификации получила название BEAMing LAMP [Chen et al., 2018]. Ее особенностью следует считать объединение эмульсионных микрореакторов с магнитными частицами, несущими единичные молекулы ДНК, заключаемые в микрокапли. Регистрация флуоресценции продуктов LAMP реакции с интеркалированным в них красителем SYBR Green I осуществлялась с помощью проточного цитофлуориметра. В одной из работ генерация эмульсии для ddLAMP осуществлялась за счет центробежных сил, возникающих при вращении специального чипа, содержащего емкость с водным раствором с компонентами LAMP реакции, включая исследуемый образец, и емкость с минеральным маслом [Peng et al., 2020].

Описано портативное микрофлюидное устройство LampPort, позволяющее проводить цифровую LAMP амплификацию и оценивать результаты невооруженным глазом, благодаря использованию красителя SYBR Green I в высокой концентрации [Wan et al., 2019]. Ранее этими авторами оценка результатов dLAMP производилась с помощью молекулярных маяков [Wan et al., 2017]. Упомянутая выше BART детекция результатов LAMP амплификации также нашла свое применение и в цифровом формате [Hardinge et al., 2020]. Точно также широко используемую в обычной LAMP амплификации детекцию увеличивающегося количества пирофосфата, приводящего к формированию его осадка с магнием, предложено использовать и в варианте ddLAMP, названном как Fractal-LAMP [Munoz et al., 2020]. В этом случае эмульсию микрокапель при относительно небольшом увеличении просматривали с помощью светлопольной микроскопии. Оригинальный способ нагрева чипа с 20 тысячами микрокапель в масляной эмульсии при проведении ddLAMP заключался в изготовлении полидиметилсилоксановой пленки с микрополостями для микрокапель, импрегнированной частицами коллоидного золота, которое нагревалось с помощью инфракрасного излучения [Zhang et al., 2020]. Иной

способ нагрева микрофлюидного устройства для проведения LAMP реакции с использованием ультразвуковых поверхностных акустических волн был предложен в другой работе [Xu et al., 2015].

Недавно сообщено о разработке MD-ddLAMP со смещаемой медиаторной пробой в виде микрофлюидного многофункционального устройства однократного применения LabDisk, выполняющего экстракцию нуклеиновых кислот, несущего необходимые реагенты, производящего микрореакторы в виде водно-масляной эмульсии, в котором проводится затем цифровая амплификация с фиксацией по конечной точке итоговой флуоресценции [Becherer et al., 2021].

В качестве микрореакторов для dLAMP предложено использовать вытравленные каналы в поликарбонатной мембране, доступной из коммерческих источников, в которую «втиралась» реакционная смесь, содержащая необходимые компоненты для LAMP амплификации и сами мишени в виде бактериальной ДНК или РНК вируса MS2 из сточных вод [Lin et al., 2019]. Около  $1,4 \times 10^4$  микрокапель умещались на такой мембране диаметром 13 мм, а объем реакционной смеси в каждой микроячейке составлял около 13 пиколитров. Регистрация амплификации бактериальной ДНК велась с помощью кальцеина, а вирусной РНК – с использованием гибридационной пробы с тушением флуоресценции. Продемонстрировано, что выявление абсолютно точного количества мишеней происходит в динамическом диапазоне от 11 до  $1,1 \times 10^5$  копий на микролитр.

Еще одним типом микрореакторов для dLAMP можно считать некое пространство в слое гидрогеля, представляющего собой акрилат полиэтиленгликоля, содержащий готовую реакционную смесь и исследуемый образец, размещенных на стеклянной пластине, имеющей специальный микрососуд площадью  $9 \times 9$  мм [Yi et al. 2021]. Причем поиск бактерий мог вестись непосредственно в цельной крови и в этом случае в гель должен быть добавлен лизоцим. Флуоресценцию гидрогеля, вызванную интеркаляцией EvaGreen в наработанную ДНК, наблюдали визуально в микроскопе и было показано, что в модельном эксперименте видны светящиеся точки для 1, 7, 14, 70, 280 и 560 копий ДНК-мишеней, изначально добавленных в соответствующие реакционные смеси. Важным преимуществом такого гидрогеля для цифровой LAMP амплификации является то, что различные ингибиторы оказываются пространственно разобщены с нуклеиновыми кислотами, подвергающимися размножению.

Кратко рассмотрев некоторые способы проведения цифровой LAMP, следует заметить, что

потенциал у этого подхода весьма велик и уже есть результаты его применения на практике, в том числе при детекции новой коронавирусной инфекции.

### **Некоторые применения LAMP ампликации**

Хотя выше мы упоминали, что в данном обзоре не будет рассматриваться применение LAMP ампликации на практике, тем не менее считаем необходимым некоторых все же коснуться. Отчасти причиной такого интереса к ним является то, что в этих случаях предлагались принципиально новые или несколько отличающиеся варианты LAMP амплификации, заслуживающие внимания, либо сферы применения оказались весьма далеки от классического предназначения LAMP ампликации для выявления патогенов различной природы.

#### **Обнаружение микроРНК**

Для обнаружения с помощью LAMP молекул микроРНК применяются несколько отличающиеся от классического варианта системы праймеров и готовых матриц. В самом простом варианте микроРНК использовалась в качестве внешнего праймера, например вместо F3, обеспечивающего образование одноцепочечной ДНК и возникновение из нее гантелеподобной структуры, пригодной для дальнейшего самопраймирования и отжига на ней новых порций праймеров [Li et al., 2010]. При этом было необходимо синтезировать любую подходящую матрицу, содержащую места для отжига работающих (подобранных ранее отдельно) праймеров FIP и VIP, главным условием для которой (матрицы) является отсутствие гомологии с геномной ДНК исследуемого организма и микроРНК, кроме участка мишени, на котором и должна отжигаться эта самая микроРНК. Схожую работу выполнили другие авторы, назвавшие свой метод детекции микроРНК TT-LAMP (Target-triggered) [Sun et al., 2017].

Иной подход для детекции микроРНК с помощью LAMP ампликации основан на лигировании синтезированных двух «полугантелей» (которые можно условно назвать - FIP и VIP) на поддерживающей матрице, приготовленной на основе микроРНК путем ее удлинения с помощью poly(A) РНК полимеразы, отжиг на достроенном участке олиго(dT) праймера и синтез кДНК, что приводило к образованию пригодной к самопраймированию полноценной гантелеподобной структуры [Du et al., 2016]. Данный подход напоминает лигирование так называемых С-проб на поддерживающих матрицах при проведении Rolling Circle Amplification (RCA), что нами недавно довольно детально рассмотрено [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021b]. В еще одной работе для детекции микроРНК также применялся этап обратной транскрипции с использованием специальной пробы SL (Stem-Loop),

после чего «в дело вступала» PS-H проба (Phosphorothioate Hairpin) и возникла гантелеподобная структура для отжига на ней FIP и VIP праймеров, регистрация результатов LAMP амплификации велась с помощью OSD пробы с временным гашением флуоресценции. Особенностью данного подхода, названного RT-THSP-LAMP (Terminal Hairpin formation and Self-Priming), было использование ДНК структур с фосфотиоатными связями, облегчающими отжиг и способствующими самопраймированию [Abdulla Al-Maskri et al., 2020].

#### **Выявление мутаций / однонуклеотидного полиморфизма**

Генотипирование, включая выявление мутантных форм или однонуклеотидного полиморфизма, по сравнению с ПЦР проводится с помощью LAMP реакции довольно ограниченно, хотя в последние годы наблюдается рост интереса к этому применению петлевой амплификации, хотя он был всегда. В качестве подтверждения того, что уже давно предлагались способы выявления однонуклеотидного полиморфизма с помощью LAMP амплификации можно привести публикацию самих разработчиков этой реакции [Kazuhara et al., 2005], где в модельном эксперименте был применен фермент *Bst* полимеразы вместе с другой термостабильной *Pwo* ДНК полимеразой с редактирующей активностью, удаляющей неспаренный нуклеотид на 3'-конце. Поскольку он нес флуорохром, то целевые продукты LAMP без мутантного нуклеотида становились флуоресцентно мечеными (и наоборот), что и позволяло определяться с переменным нуклеотидом, измеряя поляризацию флуоресценции, не прибегая к очистке реакционной смеси, так как флуорохром в ней в любом случае, помимо полимерной ДНК, оставался в составе неиспользованного дискриминирующего праймера и отщепленного меченого дНМФ. Такой подход был назван PR-LAMP (Proofreading). Есть и более ранние публикации этой же группы авторов, в которых описывалась детекция однонуклеотидного полиморфизма ДНК с помощью AS-LAMP (Allele Specific) [Iwasaki et al., 2003].

В случае использования для выявления полиморфизма ДНК с дискриминирующими праймерами AS-LAMP существует три подхода – располагать дискриминирующие нуклеотиды на 3'-или 5'-концах используемых праймеров либо размещать их в гибридных зондах. Для первого варианта в одной из работ предложено помещать дискриминирующие нуклеотиды на 3'-конце праймера F3, обозначая их как F3wt и F3mut соответственно [Carlos et al., 2017]. В другой статье описывается использование дискриминирующих нуклеотидов на 3'-конце праймера FIP [Khammanee et

al., 2021]. Описано и использование AS-LAMP с дискриминирующими нуклеотидами на 5'-конце праймеров, что неприменимо в ПЦР, но поскольку в петлевой амплификации 5'-концы FIP и VIP праймеров становятся через этап 3'-концами гантелеподобных структур, обеспечивающих самопраймирование, то в случае LAMP 5'-концы праймеров тоже могут служить для выявления переменных нуклеотидов в исследуемой мишени [Yamanaka et al., 2018], хотя такой вариант все же не оптимален. Еще один вариант аллель-специфичной LAMP амплификации производился с использованием дополнительных Loop праймеров, один из которых нес на 3'-конце замену нуклеотида и был неспособен выступать в качестве затравки при построении цепи ДНК [Ding et al., 2019]. Однако и без Loop праймера(ов), как известно, LAMP амплификация вполне может происходить, и поэтому авторы определяли тот или иной нуклеотид в интересующих их местах на мишени по скорости подъема кривых флуоресценции, поскольку при использовании только праймеров F3, B3, FIP и VIP подъем начинается позже.

В уже цитированной статье [Yamanaka et al., 2018] описана также ASO-LAMP амплификация (Allele Specific Oligonucleotide), где гибридная проба отжигалась на месте одного из Loop праймеров. При этом данные пробы с дискриминирующими нуклеотидами были фиксированы на ДНК-чипе, а выявление сигналов происходило с помощью пероксидазы хрена, конъюгированной с антителами к дигоксигенину, который присутствовал во время амплификации в составе ДУТФ. Ранее был проведен схожий эксперимент [Inacio et al., 2008], когда перед авторами стояла задача определить видовую принадлежность грибов рода *Candida*, вызывающих микозы. Для этой цели были подобраны LAMP-праймеры к консервативным участкам гена 26S рРНК, тогда как для пришедшихся на зону между FIP и VIP праймерами гибридных зондов, фиксированных на нейлоновой мембране, был использован переменный участок этого гена. При проведении амплификации в реакционную смесь был также добавлен меченный дигоксигенином ДУТФ, что позволило по завершению LAMP амплификации с помощью обратной дот-гибридации с фиксированными на нейлоновой мембране специфичными олигонуклеотидами (фактически ДНК-чипе), благодаря использованию антител к дигоксигенину с пришитой к ним щелочной фосфатазой, получить соответствующие цветные сигналы, свидетельствующие о присутствии определенных видов дрожжей в исследуемых образцах.

Как альтернатива хорошо известному методу выявления полиморфизма ДНК в виде ПЦР-ПДРФ (Полиморфизм Длины Рестрикционных Фрагментов) предложен метод mLAMP-RFLP (m – multiplex; RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) в мультиплексном варианте, с помощью которого в искусственно загрязненном молоке выявлены бактерии родов *Shigella* и *Salmonella* [Shao et al., 2011]. Процедура оказалась весьма длительной, отчасти из-за использования рестрикционной эндонуклеазы *HpaII*<sup>4</sup> и последующего геле-электрофореза. Метод, безусловно, имеет право на существование, однако в цитируемой работе несколько неожиданными оказались резко различающиеся размеры рестрикционных фрагментов, имеющими, судя по маркерной ДНК около 50 п.н. для *Salmonella typhimurium*<sup>5</sup> и 250 п.н. для *Shigella flexneri*, при том, что после амплификации на геле были видны стандартные лестницы полос ДНК для всех амплифицированных образцов. В схожей работе других авторов [Liu et al., 2014] в праймеры FIP и VIP между их частями F1c/F2 и B1c/B2 были добавлены сайты рестрикционной эндонуклеазы *EcoRI*, что по завершению амплификации и рестриктазного расщепления позволило выявить четкие различия между вирусами хризантем, поскольку после геле-электрофореза были видны специфичные фрагменты, присущие *Chrysanthemum Virus B* и *Chrysanthemum stunt viroid*, размерами около 140 и 170 п.н. соответственно, что вполне ожидаемо.

Еще один способ выявления мутаций с помощью петлевой амплификации был назван PNA-LNA mediated LAMP (PNA – Peptide Nucleic Acids; LNA – Locked Nucleic Acid) так как в нем использовалась PNA проба, неблокирующая или блокирующая в зависимости от конкретного нуклеотида в ней отжиг LNA-праймера на гантелеподобной структуре в зоне Loop праймера, что приводило соответственно к наработке или

<sup>4</sup> про сайты *HpaII* говорится, что они включены в mLAMP продукты и действительно, как можно видеть из приведенных в этой статье последовательностей используемых олигонуклеотидов, по одному сайту этого фермента есть в FIP и VIP праймерах

<sup>5</sup> 50 п.н. значительно меньше размера ординарного ампликона и допустить, что некий ампликон, например размером около 150 п.н. расщепился данным ферментом на три равные части представляется маловероятным. Или если допустить, что ординарный размер ампликонов для обоих родов около 250 п.н., то для одного из них он был должен расщепиться на 5 равных фрагментов, что еще менее вероятно. По крайней мере, конкретно этому вопросу в статье должно было быть уделено внимание.

отсутствию целевых продуктов [Itonaga et al., 2016]. Такой же подход с PNA/LNA пробами и праймерами был применен для детекции мутаций с помощью LAMP амплификации в микрофлюидном чипе [Cao et al., 2018]. В одной из ранних работ был изготовлен специальный ДНК-чип, с помощью которого электрохимическим методом с использованием красителя Hoechst 33258 исследовался полиморфизм б-однонуклеотидных замен одновременно [Nakamura et al., 2007].

При выявлении однонуклеотидного полиморфизма после LAMP амплификации (1 этап) проводилось инвазивное расщепление (2 этап) особым образом структурированных олигонуклеотидов с помощью определенного типа эндонуклеаз, получивших название Flap, способных узнавать несколько необычно спаренные азотистые основания и расщеплять в таких местах фосфодиэфирную связь [Lu et al., 2017]. Особенностью этого подхода была детекция на третьем этапе агрегации коллоидных частиц золота за счет нерасщепления шпильчатой пробы.

Уже упоминавшаяся выше OSD проба находит применение и при выявлении однонуклеотидного полиморфизма и в этом случае ее одноцепочечный участок несет дискриминирующий нуклеотид [Jiang et al., 2015]. Также предложено использовать для выявления мутаций так называемую универсальную UQProbe-G пробу, принцип действия которой заключается в тушении свечения флуорохрома находящимся вблизи от него в мишени гуанина [Ayukawa et al., 2017]. В этой работе подбирали мишень таким образом, что между праймерами FIP и VIP имелись мутации, которые предполагалось детектировать, для чего синтезировались подходящие на эти участки дополнительные олигонуклеотиды Joint DNA 1 и Joint DNA 2, которые содержали на своих 3'-концах экстрапоследовательности, комплементарные UQProbe-G (последовательность которой не приведена и говорится, что она защищена патентами). Сама UQProbe-G несла на 3'-конце флуорохром, который при гибридизации оказывался вблизи от гуанинов мишени, с которой спаривалась Joint ДНК, приводя к тушению его флуоресценции, что регистрировалось во время плавления образующихся в LAMP реакции лампликонов с данными пробами и по форме кривой определялись мутантные нуклеотиды.

Довольно простой и быстрый метод выявления мутаций (в том числе одновременно нескольких) в LAMP, основанный на определении температуры плавления лампликонов, получил обозначение LAMP-MC (Melting Curve), включающий в том числе использование режима HRM (High

Resolution Melting) [Abildgaard et al., 2018]. Однонуклеотидный полиморфизм детектировали также с помощью молекулярных биконов, связывающихся с мишенью в месте одного из Loop праймеров, регистрируя рост флуоресценции в режиме реального времени [Varona, Anderson, 2019].

**Выявление половой принадлежности для исследуемых образцов**

Расширение сфер применения петлевой LAMP амплификации привело к тому, что, в том числе, с ее помощью стали определять половую принадлежность различных объектов, включая человека, что бывает крайне важно, например, при поиске преступников и идентификации останков жертв массовых катастроф, которые невозможно определить визуально. Недавно нами подробно рассмотрены вопросы определения пола в ДНК-криминалистике, которые проводятся главным образом с помощью ПЦР на основе разных локусов, специфичных для Y-хромосомы [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021]. Однако и LAMP амплификация используется для этих целей, особенно в последние годы. Так, с помощью LAMP была определена половая принадлежность всех взятых в анализ образцов ДНК, выделенных из пульпы зубов 32 неродственных индивидов и хранившихся от одного года до 25 лет [Nogami et al., 2008]. Мишенями служили фрагменты амелогениновых локусов размерами 214 нуклеотидов для X-хромосомы и 203 нуклеотида для Y-хромосомы, а детекция велась по отдельности по изменяющейся мутности раствора с помощью турбидиметра модели LA-200. Спустя десятилетие эта работа была до некоторой степени повторена с теми отличиями, что образцами служила сперма 33 мужчин и детекция продуктов LAMP реакции велась колориметрически с использованием металлоиндикатора гидрооксинафтолового синего и pH индикатора фенолового красного [Scott et al., 2019].

Проведенное сравнение чувствительности ПЦР и LAMP при анализе следов крови и слюны, принадлежащих разным мужчинам, показало, что уже при 100-кратном разведении, только последний метод обеспечивал положительный результат, когда мишенью служила повторяющаяся альфоидная ДНК Y-хромосомы и для LAMP ее размер составил 194 п.н. [Kitamura et al., 2018]. Детекция велась как в режиме реального времени с интеркалирующим красителем EvaGreen, так и визуально. Особенностью этих экспериментов было еще и то, что реакционная смесь содержала пирофосфатазу, удаляющую образующийся пирофосфат, что не позволяло контролировать мутность раствора. Недавно с использованием того же маркерного локуса альфоидной ДНК из Y-хромосомы был проведен анализ большого числа биологических

образцов (слюны, волос, ногтей, ушной серы), полученных как от женщин, так и от мужчин, у которых еще были взяты образцы спермы, показавший применимость LAMP реакции для криминалистики, при этом женская ДНК как и положено не приводила к подъему кривых флуоресценции при детекции амплификации в режиме реального времени с красителем SYBR Green I [Nguyen, Seo, 2021].

Описан также модельный эксперимент, ставивший целью сравнить эффективность ПЦР и LAMP при выявлении SRV локуса (размер мишени для LAMP составил 210 п.н.) в пятнах крови 7 мужчин и 7 женщин на разных поверхностях (одежда, древесина, глина, керамическая плитка), хранившихся при комнатной температуре от одного до 60 дней [Kanchanaphum, 2018]. Показано, что, во-первых, в норме специфичный только для мужчин SRV локус в образцах женской крови не обнаруживается, а во-вторых, после двухмесячного хранения ПЦР уже была неспособна выявить присутствие искомого фрагмента, тогда как LAMP реакция с этой задачей успешно справилась, не говоря уже про более короткие сроки хранения при том, что уже через 30 дней для ПЦР с образцами с разных поверхностей наблюдались неоднозначные результаты.

Но, пожалуй, впервые половая принадлежность с помощью LAMP амплификации с участием разработчиков этой реакции была определена в экспериментах по имплантации зародышей у крупного рогатого скота с регистрацией результатов по меняющейся мутности раствора [Hirayama et al., 2004]. Определяли пол с помощью LAMP амплификации и у других объектов, в частности у хищных птиц [Centeno-Cuadros et al., 2017] и даже двудомных растений [Fujita et al., 2017].

**Дифференциация жизненного статуса микроорганизмов**

Основное предназначение LAMP амплификации это все же быстрая высокочувствительная детекция возбудителей различных инфекций, в том числе в РОСТ анализах, но на самом деле очень важным является установление жизненного статуса этих этиологических агентов, среди которых для бактерий, помимо спор, признается, по крайней мере, три: живые бактерии, мертвые бактерии и промежуточная между ними – покоящиеся бактерии, которые принято обозначать как VBNC (Viable But Non-Culturable). Их дифференциация может быть установлена с помощью некоторых соединений, проникающих в мертвые бактериальные клетки и взаимодействующих с ДНК, приводя этот биополимер в состояние, непригодное для амплификации. Наиболее часто такими реагентами служат фенантридиновые красители -



моноазид этидия (EMA – Ethidium monoazide) или моноазид пропидия (PMA – Propidium monoazide), а используемым методом амплификации фрагментов ДНК, свидетельствующим о жизненном статусе микроорганизмов – ПЦР, впервые предложенная с EMA в 2003 г., а с PMA – в 2006 г. Что касается использования для этих целей петлевой амплификации, то EMA-LAMP появилась в 2009 г., а PMA-LAMP – в 2011 г. В нашем недавнем обзоре [Баймиев и др. (Baumiev et al.), 2020] этому вопросу уделено довольно большое внимание, однако за это время появилась новая информация по дифференциации живых и мертвых бактерий, осуществляемая с помощью LAMP амплификации.

Так, в упоминавшейся выше работе [Trieu, Lee, 2019], в которой сообщалось об использовании микрофлюидной оригами конструкции и метиленового синего для колориметрической детекции целевых продуктов LAMP амплификации, речь шла еще и об определении жизненного статуса патогенных бактерий *Escherichia coli* O157:H7 и *Salmonella* spp., выявляемом с помощью PMA-LAMP. Для определения времени повреждения мембран микроорганизмов *Vibrio parahaemolyticus* в морском окуне при хранении рыб при низких положительных и отрицательных температурах были использованы PMA-LAMP, а также PMA-ПЦР, показавшие схожие результаты при дифференциации живых и мертвых бактерий [Telli, Doguer, 2019]. Проведенное сравнение различных подходов для определения жизненного статуса сальмонеллы *S. enterica* с помощью ПЦР, ОТ-ПЦР, LAMP, RT-LAMP в комбинации с PMA и без, а также с культуральным методом [Techathuvanan, D'Souza, 2020] показало в целом, что молекулярно-биологические методы сопоставимы по чувствительности с культуральным, но имеют преимущество в скорости. При этом отмечено, что PMA-LAMP потенциально может широко использоваться в пищевой промышленности, в частности на птицефабриках, благодаря короткому времени анализа, не требующего к тому же дорогостоящего оборудования.

Дифференциация живых и мертвых бактерий *S. typhimurium* с помощью PMA-LAMP в модельном эксперименте с мясом курицы из супермаркета, искусственно загрязненном разными количествами патогена, проводилась в микрофлюидном устройстве, регистрируя в реальном времени изменение мутности раствора смартфоном [Wang et al., 2020]. В другой работе исследовался VBNC статус бактерии *Campylobacter jejuni* при ее нахождении в различных пищевых продуктах с помощью PMA-LAMP амплификации (размер мишени составил 205 нуклеотидов) и был сделан вывод о пригодности такого подхода в пищевой промышленности для

снижения риска загрязнения конечных продуктов [Petersen et al., 2021]. Также недавно сообщено о дифференциации живых и мертвых бактерий *Lactobacillus salivarius* в сухих кормах для животных для чего был применен биолюминесцентный метод PMA-LAMP-BART с неким аналогом пропидия моноазидом PMAxx<sup>TM</sup>, показавший свою пригодность [Fei et al., 2021].

### **Неспецифичная LAMP амплификация либо полное отсутствие оной**

Как уже говорилось выше, LAMP является высокоспецифичной реакцией амплификации нуклеотидных последовательностей в силу большого числа праймеров и еще большего числа мест их отжига на мишени. Но это одновременно является и определенной проблемой данной реакции, поскольку известно, что чем больше праймеров участвует в реакции – тем труднее подобрать их так, чтобы между ними не образовывались разнообразные димеры. К тому же в случае LAMP амплификации длина некоторых праймеров, по сути, двойная, что повышает вероятность возникновения вторичных структур, которые могут до некоторой степени мешать протеканию реакции. Или, что гораздо хуже, они могут удлиняться ДНК полимеразой, приводя к появлению в реакционной смеси неожиданных нуклеотидных последовательностей и как следствие к неверным результатам.

Причинами ложноотрицательных результатов могут быть необученный персонал, просроченные реактивы и ошибки пипетирования, но если в расчет их не принимать, то при диагностике мутирующих с довольно высокой скоростью этиологических агентов могут оказаться непредсказуемые замены нуклеотидов, приходящиеся, в том числе на критичные места в виде 3'-концов праймеров. А в LAMP амплификации замены еще и на 5'-концах внутренних FIP и VIP праймеров также могут снизить эффективность настолько, что малое стартовое количество копий мишеней не позволит их детектировать. В ряде работ специально уделялось внимание неспаренным нуклеотидам между мишенями и праймерами в LAMP [Peurefritte et al., 2008; Wang, 2016], допуская наличие от одного до трех в средней части праймеров. Причем могут быть случаи, когда подобные неспаривания неизбежны. Так, в цитируемой работе [Peurefritte et al., 2008] мишенью для LAMP амплификации служил относительно консервативный участок генома вируса лихорадки Рифт-Валли, распространенной в ряде стран африканского континента, однако авторам не удалось найти двухсотнуклеотидный участок, не имеющий замен у изолятов вируса из разных стран и им пришлось довольствоваться не полностью

спаривающимися праймерами, несущими одну-две замены, но при этом амплификация все же происходила.

Ложноположительные результаты могут иметь место из-за загрязнения рабочих помещений, приборов и оборудования, реактивов. Значительно снижет риск контаминации применение вариантов детекции LAMP амплификации без открывания пробирок. Тем не менее, для тех случаев, когда это невозможно исключить, предложен способ разрушения лампиконов с помощью урацил-ДНК-гликозилазы, осуществляемый в одной пробирке [Hsieh et al., 2014]. Для этого при проведении LAMP амплификации в реакционную смесь изначально добавляется дУТФ, что практически никак не сказывается на детекции целевых продуктов тем или иным способом, но дает возможность начинать новую амплификацию с выщепления в течение 5 мин при комнатной температуре урацил-ДНК-гликозилазой остатков урацилов в возможных загрязнениях, приводя к формированию безазотистых мест в таких матрицах, становящихся неспособными к копированию *Bst* полимеразой, которая также сразу добавляется в реакцию и «ждет» повышения температуры до 60-65°C. Предложен и другой способ исключения контаминации из предыдущих реакций в виде внедрения в композитные праймеры FIP и VIP в зону между праймерами первого и второго уровня сайта рестрикционной эндонуклеазы *GsuI*<sup>6</sup>, позволяющий расщеплять потенциальные лампиконы, могущие попасть в новую реакцию [Ma et al., 2017]. Авторы назвали этот свой метод PE-LAMP (Primer Enzymatic). Собственно многие подходы, используемые для этой цели в ПЦР по исключению ложноположительных результатов и рассмотренные нами ранее, пригодны и для LAMP [Чемерис и др. (Chemieris et al.), 2012].

При отсутствии контаминации ложноположительные результаты также могут быть исключены, если использовать подходящие гибридационные зонды, комплементарные участкам мишени, не входящим в состав праймерных последовательностей. Хотя и с ними обнаружены некоторые проблемы (см. ниже). Тем не менее, гибридационные зонды служат контролем правильности амплификации, и в случае неспецифической реакции наработанная нецелевая ДНК будет для них «невидима». Конечно, одним из преимуществ LAMP амплификации считается ее быстрота и относительная простота, в случае,

например детекции любой ДНК, либо побочных продуктов полимеризации ДНК в виде пирофосфата и протона. И такие диагностические реакции имеют право на применение, только на стадии их отработки нужно все тщательно выверить. Поэтому неудивительно, что в ряде экспериментальных и обзорных статей поднимаются вопросы специфичности LAMP амплификации и при этом прогнозируются всевозможные шпилечные структуры, в том числе готовые к самопраймрованию [Зырина, Антипова (Zyryna, Antipova), 2021; Meagher et al., 2018; Rolando et al., 2020]. Построена математическая модель ожиданий правильности протекания LAMP реакций, способствующая снижению ложноотрицательных результатов [Schneider et al., 2019].

Казалось бы, что неспецифичная LAMP амплификация связана с детекцией исключительно побочных продуктов реакции полимеризации ДНК или выявлением по сути любой ДНК интеркалирующими красителями, но в одной из работ было сообщено, что используемые молекулярные биконы, рассчитанные, в частности на детекцию 35S промотора и NOS терминатора в генно-модифицированных растениях, и отжигающиеся не на участке Loop праймеров как обычно, а на Stem-участке между внутренними праймерами (то есть на участке не привносимым с праймерными последовательностями в реакцию) приводили к неспецифическому появлению флуоресцентных сигналов, хотя гомология между данными гибридационными зондами полностью отсутствовала [Hardinge, Murray, 2019]. Эти авторы выполнили многочисленные эксперименты, варьируя, в том числе шпилечную часть их биконов, но какой-либо убедительной причины такой неспецифики не нашли.

В то же время имеются публикации, в которых сообщается, что с помощью дополнительных ингредиентов удается снизить неспецифику LAMP реакции. К таковым причислили диметилсульфоксид [Wang et al., 2015] и пуллулан [Gao et al., 2019]. Показано, что применение гидрофобной ионной магнитной жидкости в LAMP амплификации привело к уменьшению димеров праймеров и повысило специфичность этой реакции [Ding et al., 2019]. Но в любом случае главная ответственность за правильность протекания LAMP амплификации «лежит» на правильности подбора праймеров.

#### Дизайн праймеров для петлевой LAMP амплификации

Вопроса дизайна праймеров для проведения LAMP необходимо коснуться отдельно. Если для ПЦР вполне возможен подбор праймеров в ручном режиме,

<sup>6</sup> *GsuI* узнает прерванную палиндромную последовательность, что довольно важно для исключения протяженных палиндромных участков в праймерах.

то для LAMP амплификации он крайне затруднителен и чреват ошибками. В какой-то степени подбор праймеров для LAMP можно сравнить с вложенной ПЦР, в которую добавлена еще пара праймеров (или даже две пары) с тем отличием, что части праймеров FIP и VIP на их 5'-конце представляют собой комплементарные последовательности, которые должны отжигаться на следующей стадии (после того как отожгутся и удлинятся их части на 3'-конце), обеспечивая самопраймрование и способствуя построению цепей ДНК в противоположном направлении, нежели их первые части (см. рис. 1). В этой связи настоятельно рекомендуется использовать специальные программы дизайна LAMP праймеров. Однако, если для проведения ПЦР подобных программ, в том числе для разных вариаций этого метода некоторое время назад уже имелось свыше полутора сотен, большая часть которых находится в открытом доступе [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2016], то для LAMP таковых существенно меньше. Имеются коммерческие программы **LAMP Designer** американской фирмы Premier Biosoft и **FastPCR** финской фирмы PrimerDigital [Kalendar et al., 2017], позволяющие проводить дизайн праймеров для LAMP. Хотя обычно праймеры, в том числе для LAMP реакции, подбираются для конкретных генов или отдельных участков генома, иногда имеет смысл подобрать праймеры к любому месту относительного небольшого генома (бактерий, архей, вирусов, геномов органелл). Для этой цели была создана программа **GLAPD** (**G**enome based **L**AMP **P**rimers **D**esigner), рассчитанная на дизайн LAMP праймеров для амплификации целых геномов с учетом выравнивания множественных последовательностей [Jia et al., 2019]. Она доступна для скачивания и установки на персональный компьютер (<https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/>) или для работы on-line (<https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/online/>). К сожалению, других опций кроме как подтвердить выбор петлевых праймеров или отказаться от него у данной программы нет.

Был также создан программный продукт **LAVA** [Torres et al., 2011], в котором дизайн LAMP праймеров основан на программе для подбора праймеров для ПЦР Primer3. В одной из статей описана Electric LAMP амплификация (**eLAMP**), представляющая собой электронную симуляцию протекания LAMP [Salinas, Little, 2012]. Такое электронное тестирование подобранных праймеров позволяет проверить насколько они будут хорошо работать с известными вариантами каких-либо нуклеотидных последовательностей. Недавно созданная программа **lamprim** (<https://github.com/Maximato/lamprim>) к сожалению, не имеет удобного интерфейса. Поэтому в подавляющем большинстве статей указывается, что подбор праймеров для LAMP амплификации осуществлялся с помощью программы **PrimerExplorer**, находящейся в свободном

доступе (<http://primerexplorer.jp/e/>) и работающей on-line, имеющей в настоящее время две версии 4 и 5, для которых для пользователей подготовлены подробные руководства. В последние годы появился еще один онлайн ресурс для дизайна праймеров для петлевой амплификации **NEB LAMP Primer Design Tool** (<https://lamp.neb.com/#/>).

К сожалению, для большинства новшеств LAMP амплификации, в том числе рассмотренных в данном обзоре, дизайн праймеров этими версиями не предусмотрен. Не предусмотрен этими программами и дизайн LAMP праймеров для возможных новых вариаций этого метода, о которых мы рассуждаем в Заключении.

### Заключение

За прошедшие два десятилетия, как можно видеть из изложенного выше материала, LAMP амплификация заметно развилась и усовершенствовалась. Появились модификации этой реакции, как еще более упрощающие в чем-то оригинал, так и весьма сильно усложняющие его, включая довольно неожиданные способы детекции результатов амплификации и используемое для этого оборудование. За эти годы LAMP амплификация нашла широкое применение для выявления различных патогенных агентов, среди которых немало различных вирусов и целым рядом фирм производятся готовые наборы для их детекции, в том числе в режиме реального времени, основанные при этом на разных принципах. В качестве дополнительного подтверждения повсеместного распространения LAMP амплификации можно указать на работу, в которой сообщалось об успешном проведении данной реакции даже в космосе - на МКС (Международной космической станции) [Rubinfien et al., 2019].

Однако предела совершенству, как известно, нет, и не все проблемы с LAMP амплификацией еще решены. Поскольку минимальный размер ДНК-мишени для LAMP заметно больше того, который может быть детектирован при ПЦР, то нужно признать, что это является одним из недостатков данной реакции, так как в образцах с сильно деградированной ДНК может просто не оказаться фрагментов такого относительно крупного размера<sup>7</sup>.

Так одним из недостатков LAMP можно считать довольно большой размер мишеней, которые требуется детектировать. Отчасти его можно уменьшить, сократив длину одной части составных праймеров, а именно праймеров второго уровня F1c и V1c, например до 12 нуклеотидов. Почему при этом нельзя сильно сокращать длину F2 и V2 частей FIP и VIP праймеров? Они первыми отжигаются на мишени

<sup>7</sup> не менее 120 и даже 160 п.н. для LAMP против 40 – 70 п.н. для ПЦР

и если будут слишком коротки, то могут расходоваться на иные неспецифичные случайные места в ДНК или РНК исследуемых образцов. Что касается праймеров второго уровня, вступающих в реакцию позже, то им гораздо проще отжечься на близлежащей последовательности, формируя шпильчатую гантелеподобную структуру, и поэтому их длина не столь важна, но чтобы они при довольно высокой температуре (60 – 65°C) могли образовывать водородные связи с комплементарными им последовательностями возможно следует использовать в них LNA нуклеотиды, заметно повышающие температуру отжига/плавления.

Для еще большего укорочения мишени можно отказаться от петлевых праймеров, но чтобы не снижать эффективность размножения молекул ДНК (расходования дНТФ, увеличения количества пирофосфата, снижения рН и изменения прочих атрибутов петлевой амплификации) последовательности таких праймеров (не имеющие отношения к мишени) можно ввести в композитные праймеры F1P и B1P (несколько увеличив их длину, конечно) в виде такого расположения F1c/F1p/F2 и B1c/B1p/B2, где строчные буквы 1р символизируют отсутствие их связи с мишенью. При этом эффективность размножения будет аналогична той, что имеет место с обычными петлевыми праймерами при сохранении в целом высокой специфичности процесса. Таким образом, длина детектируемой мишени может составить по минимуму около 100 нуклеотидов против обычных сейчас 160 - 250. При этом нужно признать, что чрезмерное насильственное сближение отжигаемых праймеров наложит определенные ограничения на свободу выбора мишени.

Что касается ферментов, используемых в LAMP, то их испробовано уже немало, в том числе созданных генно-инженерным путем, однако и здесь еще есть некоторый скрытый резерв. Скрытый, потому что такие ферменты еще нужно найти, но, то, что подобные в Природе существуют можно не сомневаться. Нашли же новую фаговую ДНК полимеразу в метагеноме из Йеллоустонских гейзеров [Chander et al., 2014]. Одной из важнейших характеристик ДНК полимеразы для проведения LAMP реакции является ее мощная цепь-вытесняющая активность. ДНК полимеразой с такими свойствами является полимеразы phi29, широко используемая, в том числе при амплификации всего генома даже высших организмов, но температурный оптимум этого фермента (30°C), найденного у одного из фагов мезофильных бактерий рода *Bacillus*, довольно низок, что может сказываться на специфичности отжига праймеров и соответственно всей LAMP реакции. Однако нельзя исключать, что родственные ему бактериофаги могут инфицировать

термостабильные бациллы из нынешнего рода *Geobacillus*. При этом они аналогично ферменту phi29 могут иметь и мощную цепь ДНК-вытесняющую активность и прочие важные характеристики, которые могли бы быть применены в новой LAMP амплификации. Для этого даже не нужно секвенировать метагеном подходящего сообщества микроорганизмов (точнее их фагов), а нужно просто поискать такие бактериофаги в хлороформном экстракте почвы, высеивая газон *Geobacillus* на чашки Петри и ища в нем фаговые бляшки. Причем ДНК полимеразу с такими свойствами, если удастся найти, то она будет использоваться и во многих других реакциях амплификации нуклеиновых кислот, в том числе для диагностических целей. Вообще многие фаговые ферменты, находящие применение в молекулярной биологии в чем-то лучше (мощнее) своих бактериальных собратьев, что, впрочем, неудивительно, учитывая биологию вирусов и жизненную необходимость размножаться с максимальной возможной для них скоростью.

В отношении недавней обзорной статье разработчиков LAMP амплификации [Mori, Notomi, 2020], рассуждая о будущем этой реакции, они указывают на важность применения мультиплексного формата в автоматическом режиме. Безусловно, такой способ проведения LAMP амплификации будет набирать «силу», тем более что их разработано уже немало. Подспорьем в этом служат изотермические условия проведения LAMP. Значительное внимание будет уделяться цифровой LAMP в ее разнообразных вариациях и здесь также изотермические условия процесса амплификации будут способствовать появлению новых вариантов ее проведения и детекции результатов.

И это далеко не все возможности усовершенствования и дальнейшего развития LAMP амплификации, о которых мы знаем и можем на них в этом обзоре указать.

Работа выполнена частично в рамках госзадания ИБГ УФИЦ РАН № АААА-А21-121011990119-1, а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-37-90091).

#### Литература

1. Abe T., Segawa Y., Watanabe H., Yotoriyama T., Kai S., Yasuda A., Shimizu N., Tojo N. Point-of-care testing system enabling 30 min detection of influenza genes // Lab. Chip. 2011. V. 11(6):1166-7. doi: 10.1039/c0lc00519c.
2. Abildgaard A., Tovbjerg S.K., Giltay A., Detemmerman L., Nissen P.H. Lactase persistence genotyping on whole blood by loop-mediated isothermal amplification and melting curve analysis // Clin. Chim. Acta. 2018. V. 482:50-56. doi: 10.1016/j.cca.2018.03.029.

3. Ahmed M.U., Nahar S., Safavieh M., Zourob M. Real-time electrochemical detection of pathogen DNA using electrostatic interaction of a redox probe // *Analyst*. 2013. V. 138(3):907-15. doi: 10.1039/c2an36153a.
4. Ahmed M.U., Saito M., Hossain M.M., Rao S.R., Furui S., Hino A., Takamura Y., Takagi M., Tamiya E. Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification // *Analyst*. 2009. V. 134(5):966-72. doi: 10.1039/b812569d.
5. Ahsan A., Usman M., Ullah I., Zahur A.B., Malik A.R. Molecular diagnostic assays for the detection of peste des petits ruminants virus: a concise review // *Vet. Sci.: Res. Rev.* 2017. V. 3(3):53-57. doi: 10.17582/journal.vsr/2017.3.3.53.57.
6. Ali S.A., Bobby N., Preena P., Singh S.V., Kaur G., Ghosh S.K., Nandi S., Chaudhuri P. Microcapillary LAMP for rapid and sensitive detection of pathogen in bovine semen // *Anim. Biotechnol.* 2021. V. 10:1-10. doi: 10.1080/10495398.2020.1863225.
7. Al-Maskri A.A., Ye J., Talap J., Hu H., Sun L., Yu L., Cai S., Zeng S. Reverse transcription-based loop-mediated isothermal amplification strategy for real-time miRNA detection with phosphorothioated probes // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1126:1-6. doi: 10.1016/j.aca.2020.06.007.
8. Aoi Y., Hosogai M., Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria // *J. Biotechnol.* 2006. V. 125(4):484-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.04.007.
9. Ayukawa Y., Hanyuda S., Fujita N., Komatsu K., Arie T. Novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay with a universal QProbe can detect SNPs determining races in plant pathogenic fungi // *Sci Rep.* 2017. V. 7(1):4253. doi: 10.1038/s41598-017-04084-y.
10. Bakthavathsalam P., Longatte G., Jensen S.O., Manefield M., Gooding J. J. Locked nucleic acid molecular beacon for multiplex detection of loop mediated isothermal amplification // *Sens. Act. B: Chem.* 2018. V. 268:255-263. doi: 10.1016/j.snb.2018.04.081.
11. Ball C.S., Light Y.K., Koh C.Y., Wheeler S.S., Coffey L.L., Meagher R.J. Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses // *Anal. Chem.* 2016. V. 88(7):3562-8. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04054.
12. Bartosik M., Jirakova L., Anton M., Vojtesek B., Hrstka R. Genomagnetic LAMP-based electrochemical test for determination of high-risk HPV16 and HPV18 in clinical samples // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1042:37-43. doi: 10.1016/j.aca.2018.08.020.
13. Becherer L., Bakheit M., Frischmann S., Stinco S., Borst N., Zengerle R., von Stetten F. Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters // *Anal. Chem.* 2018. V. 90(7):4741-4748. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05371.
14. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection // *Anal. Methods.* 2020. V. 12. doi: 10.1039/C9AY02246E.
15. Becherer L., Hess J.F., Frischmann S., Bakheit M., Nitschko H., Stinco S., Zitz F., Hofer H., Porro G., Hausladen F., Stock K., Drossart D., Wurm H., Kuhn H., Huber D., Hutzenlaub T., Paust N., Keller M., Strohmeier O., Wadle S., Borst N., Zengerle R., von Stetten F. Point-of-Care System for HTLV-1 Proviral Load Quantification by Digital Mediator Displacement LAMP // *Micromachines (Basel).* 2021. V. 12(2):159. doi: 10.3390/mi12020159.
16. Bektaş A., Chapela I. Loop-mediated isothermal amplification of single pollen grains // *J. Integr. Plant Biol.* 2014. V. 56(8):741-8. doi: 10.1111/jipb.12191.
17. Berard C., Cazalis M.A., Leissner P., Mougins B. DNA nucleic acid sequence-based amplification-based genotyping for polymorphism analysis // *Biotechniques.* 2004. V. 37(4). P.680-682, 684, 686. doi: 10.2144/04374DD04.
18. Cai S., Jung C., Bhadra S., Ellington A.D. Phosphorothioated Primers Lead to Loop-Mediated Isothermal Amplification at Low Temperatures // *Anal. Chem.* 2018. V.90(14). P.8290-8294. doi: 10.1021/acs.analchem.8b02062.
19. Cao G., Kong J., Xing Z., Tang Y., Zhang X., Xu X., Kang Z., Fang X., Guan M. Rapid detection of CALR type 1 and type 2 mutations using PNA-LNA clamping loop-mediated isothermal amplification on a CD-like microfluidic chip // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1024:123-135. doi: 10.1016/j.aca.2018.04.022.
20. Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1988. V. 85(23):8790-4. doi: 10.1073/pnas.85.23.8790.
21. Carlos F.F., Veigas B., Matias A.S., Doria G., Flores O., Baptista P.V. Allele specific LAMP- gold nanoparticle for characterization of single nucleotide polymorphisms // *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2017. V. 16:21-25. doi: 10.1016/j.btre.2017.10.003.
22. Carter C., Akrami K., Hall D., Smith D., Aronoff-Spencer E. Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA // *J. Virol. Methods.* 2017. V. 244:32-38. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.013.
23. Centeno-Cuadros A., Abbasi I., Nathan R. Sex determination in the wild: a field application of loop-mediated isothermal amplification successfully determines

- sex across three raptor species // *Mol. Ecol. Resour.* 2017. V. 17(2):153-160. doi: 10.1111/1755-0998.12540.
24. Chander Y., Koelbl J., Puckett J., Moser M.J., Klingele A.J., Liles M.R., Carrias A., Mead D.A., Schoenfeld T.W. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5:395. doi: 10.3389/fmicb.2014.00395.
25. Chang T.J., Yang D.M., Wang M.L., Liang K.H., Tsai P.H., Chiou S.H., Lin T.H., Wang C.T. Genomic Analysis and Comparative Multiple Sequence of SARS-CoV2 // *J. Chin. Med. Assoc.* 2020. V. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000335.
26. Chen G., Chen R., Ding S., Li M., Wang J., Zou J., Du F., Dong J., Cui X., Huang X., Deng Y., Tang Z. Recombinase assisted loop-mediated isothermal DNA amplification // *Analyst.* 2020. V. 145(2):440-444. doi: 10.1039/c9an01701a.
27. Chen J., Xu X., Huang Z., Luo Y., Tang L., Jiang J.H. BEAMing LAMP: single-molecule capture and on-bead isothermal amplification for digital detection of hepatitis C virus in plasma // *Chem. Commun. (Camb).* 2018. V. 54(3):291-294. doi: 10.1039/c7cc08403j.
28. Chen L., Fan X.Z., Wang Q., Xu L., Zhao Q.Z., Zhou Y.C., Liu J., Tang B., Zou X.Q. A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus // *Viol. Sin.* 2010. V. 25(1):59-64. doi: 10.1007/s12250-010-3043-2.
29. Chou P.H., Lin Y.C., Teng P.H., Chen C.L., Lee P.Y. 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. V. 173(1):67-74. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.01.009.
30. Chuang T.L., Wei S.C., Lee S.Y., Lin C.W. A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 32(1):89-95. doi: 10.1016/j.bios.2011.11.037.
31. Diagne C.T., Faye M., Lopez-Jimena B., Abd El Wahed A., Loucoubar C., Fall C., Mencatelli G., Faye O., Faye O., Weidmann M., Sall A.A. Comparative Analysis of Zika Virus Detection by RT-qPCR, RT-LAMP, and RT-RPA // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2142:165-179. doi: 10.1007/978-1-0716-0581-3\_14.
32. Ding S., Chen R., Chen G., Li M., Wang J., Zou J., Du F., Dong J., Cui X., Huang X., Deng Y., Tang Z. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP) // *Theranostics.* 2019. V. 9(13):3723-3731. doi: 10.7150/thno.33980.
33. Ding X., Clark K.D., Varona M., Emaus M.N., Anderson J.L. Magnetic ionic liquid-enhanced isothermal nucleic acid amplification and its application to rapid visual DNA analysis // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1045:132-140. doi: 10.1016/j.aca.2018.09.014.
34. Ding X., Yin K., Chen J., Wang K., Liu C. A ribonuclease-dependent cleavable beacon primer triggering DNA amplification for single nucleotide mutation detection with ultrahigh sensitivity and selectivity // *Chem. Commun. (Camb).* 2019. V. 55(84):12623-12626. doi: 10.1039/c9cc06296c.
35. Ding X., Yin K., Li Z., Pandian V., Smyth J.A., Helal Z., Liu C. Cleavable hairpin beacon-enhanced fluorescence detection of nucleic acid isothermal amplification and smartphone-based readout // *Sci. Rep.* 2020. V. 10(1):18819. doi: 10.1038/s41598-020-75795-y.
36. Dong J., Xu Q., Li C.C., Zhang C.Y. Single-color multiplexing by the integration of high-resolution melting pattern recognition with loop-mediated isothermal amplification // *Chem. Commun. (Camb).* 2019. V. 55(17):2457-2460. doi: 10.1039/c8cc09741k.
37. Du W., Li L., Nichols K.P., Ismagilov R.F. SlipChip // *Lab Chip.* 2009. V. 9(16):2286-92. doi: 10.1039/b908978k.
38. Du W., Lv M., Li J., Yu R., Jiang J. A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection // *Chem. Commun. (Camb).* 2016. V. 52(86):12721-12724. doi: 10.1039/c6cc06160e.
39. Du Y., Hughes R.A., Bhadra S., Jiang Y.S., Ellington A.D., Li B. A Sweet Spot for Molecular Diagnostics: Coupling Isothermal Amplification and Strand Exchange Circuits to Glucometers // *Sci. Rep.* 2015. V. 5:11039. doi: 10.1038/srep11039.
40. Fang X., Liu Y., Kong J., Jiang X. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens // *Anal. Chem.* 2010. V. 82(7):3002-6. doi: 10.1021/ac1000652.
41. Fei Z., Wei R., Zhou D., Li N., Xiao P. A novel bioluminescent approach to the loop-mediated isothermal amplification-based detection of *Lactobacillus salivarius* in feed samples // *J. Microbiol. Methods.* 2021. V. 187:106209. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106209.
42. Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glökler J.F. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine // *Biotechniques.* 2015. V. 58(4). P.189-194. doi: 10.2144/000114275.
43. Foo P.C., Chan Y.Y., Mohamed M., Wong W.K., Nurul Najian A.B., Lim B.H. Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp. // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 966:71-80. doi: 10.1016/j.aca.2017.02.019.

44. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // *Annalen Phys. (Leipzig)*. 1948. V.2. P.55–75.
45. French D.J., Archard C.L., Brown T., McDowell D.G. HyBeacon probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination // *Mol. Cell. Probes*. 2001. V. 15(6):363-74. doi: 10.1006/mcpr.2001.0384.
46. Fujita N., Ayukawa Y., Fuke M., Teraoka T., Watanabe K., Arie T., Komatsu K. Rapid sex identification method of spinach (*Spinacia oleracea* L.) in the vegetative stage using loop-mediated isothermal amplification // *Planta*. 2017. V. 245(1):221-226. doi: 10.1007/s00425-016-2618-z.
47. Fukuta S., Iida T., Mizukami Y., Ishida A., Ueda J., Kanbe M., Ishimoto Y. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP // *Arch. Virol*. 2003. V. 148(9):1713-20. doi: 10.1007/s00705-003-0134-5.
48. Gadkar V.J., Goldfarb D.M., Gantt S., Tilley P.A.G. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes // *Sci. Rep*. 2018. V. 8(1):5548. doi: 10.1038/s41598-018-23930-1.
49. Gandelman O., Jackson R., Kiddle G., Tisi L. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers // *Int. J. Mol. Sci*. 2011. V. 12(12):9108-24. doi: 10.3390/ijms12129108.
50. Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., Parmar S., Jalal H., Tisi L.C., Murray J.A. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time // *PLoS One*. 2010. V. 5(11):e14155. doi: 10.1371/journal.pone.0014155.
51. Gansen A., Herrick A.M., Dimov I.K., Lee L.P., Chiu D.T. Digital LAMP in a sample self-digitization (SD) chip // *Lab Chip*. 2012. V. 12(12):2247-54. doi: 10.1039/c2lc21247a.
52. Gao X., Sun B., Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Anal. Bioanal. Chem*. 2019. V. 411(6):1211-1218. doi: 10.1007/s00216-018-1552-2.
53. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Anal. Biochem*. 2017. V. 518:126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.
54. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase // *Biochimie*. 2020. V. 168:259-267. doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
55. Gibson N.J., Newton C.R., Little S. A colorimetric assay for phosphate to measure amplicon accumulation in polymerase chain reaction // *Anal. Biochem*. 1997. V. 254(1):18-22. doi: 10.1006/abio.1997.2324.
56. Gill A.A.S., Singh S., Thapliyal N., Karpoomath R. Nanomaterial-based optical and electrochemical techniques for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review // *Mikrochim. Acta*. 2019. V. 186(2):114. doi: 10.1007/s00604-018-3186-7.
57. Gill P., Hadian Amree A. AS-LAMP: A New and Alternative Method for Genotyping // *Avicenna J. Med. Biotechnol*. 2020. V. 12(1):2-8.
58. Gong L., Tang F., Liu E., Liu X., Xu H., Wang Y., Song Y., Liang J. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid detection of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* // *PLoS One*. 2021. V. 16(4):e0249582. doi: 10.1371/journal.pone.0249582.
59. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue // *Biotechniques*. 2009. V. 46(3):167-72. doi: 10.2144/000113072.
60. Guo L., Lu B., Dong Q., Tang Y., Du Y., Li B. One-tube smart genetic testing via coupling isothermal amplification and three-way nucleic acid circuit to glucometers // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1106:191-198. doi: 10.1016/j.aca.2020.01.068.
61. Hardinge P., Baxani D.K., McCloy T., Murray J.A.H., Castell O.K. Bioluminescent detection of isothermal DNA amplification in microfluidic generated droplets and artificial cells // *Sci. Rep*. 2020. V. 10(1):21886. doi: 10.1038/s41598-020-78996-7 (Erratum in: *Sci. Rep*. 2021. V. 11(1):10748).
62. Hardinge P., Murray J.A.H. Lack of specificity associated with using molecular beacons in loop mediated amplification assays // *BMC Biotechnol*. 2019. V. 19(1):55. doi: 10.1186/s12896-019-0549-z.
63. Hashimoto K., Inada M., Ito K. A novel voltammetric approach for real-time electrochemical detection of targeted nucleic acid sequences using LAMP // *Anal. Biochem*. 2017. V. 539:113-117. doi: 10.1016/j.ab.2017.10.019.
64. Hashimoto K., Inada M., Ito K. Multiplex Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Using an Electrochemical DNA Chip Consisting of a Single Liquid-Flow Channel // *Anal Chem*. 2019. V. 91(5):3227-3232. doi: 10.1021/acs.analchem.8b05284.
65. Hataoka Y., Zhang L., Mori Y., Tomita N., Notomi T., Baba Y. Analysis of specific gene by integration of isothermal amplification and electrophoresis on poly(methyl methacrylate) microchips // *Anal. Chem*. 2004. V. 76(13):3689-93. doi: 10.1021/ac035032u.
66. Higgins O., Clancy E., Cormican M., Boo T.W., Cunney R., Smith T.J. Evaluation of an Internally Controlled Multiplex Tth Endonuclease Cleavage Loop-Mediated Isothermal Amplification (TEC-LAMP) Assay for the Detection of Bacterial Meningitis Pathogens // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. V. 19(2):524. doi: 10.3390/ijms19020524.

67. Hirayama H., Kageyama S., Moriyasu S., Sawai K., Onoe S., Takahashi Y., Katagiri S., Toen K., Watanabe K., Notomi T., Yamashina H., Matsuzaki S., Minamihashi A. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification // *Theriogenology*. 2004. V. 62(5). P.887-896. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.007.
68. Hong M., Zha L., Fu W., Zou M., Li W., Xu D. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 28(2):523-31. doi: 10.1007/s11274-011-0843-y.
69. Hongwarittorn I., Chaichanawongsaroj N., Laiwattanapaisal W. Semi-quantitative visual detection of loop mediated isothermal amplification (LAMP)-generated DNA by distance-based measurement on a paper device // *Talanta*. 2017. V. 175:135-142. doi: 10.1016/j.talanta.2017.07.019.
70. Howard R.L., French D.J., Richardson J.A., O'Neill C.E., Andreou M.P., Brown T., Clark D., Clarke I.N., Holloway J.W., Marsh P., Debenham P.G. Rapid detection of diagnostic targets using isothermal amplification and HyBeacon probes--a homogenous system for sequence-specific detection // *Mol. Cell. Probes*. 2015. V. 29(2). P. 92-98. doi: 10.1016/j.mcp.2014.12.001.
71. Hsieh K., Mage P.L., Csordas A.T., Eisenstein M., Soh H.T. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP) // *Chem. Commun (Camb)*. 2014. V. 50(28):3747-9. doi: 10.1039/c4cc00540f.
72. Hsieh K., Patterson A.S., Ferguson B.S., Plaxco K.W., Soh H.T. Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. V. 51(20):4896-900. doi: 10.1002/anie.201109115.
73. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskikh K.A., Kramarova T.V., Kramarov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification // *Biotechniques*. 2014. V. 57(2):81-7. doi: 10.2144/000114198.
74. Imai K., Tarumoto N., Misawa K., Runtuwene L.R., Sakai J., Hayashida K., Eshita Y., Maeda R., Tuda J., Murakami T., Maesaki S., Suzuki Y., Yamagishi J., Maeda T. A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION nanopore sequencer // *BMC Infect. Dis.* 2017. V. 17(1):621. doi: 10.1186/s12879-017-2718-9.
75. Inácio J., Flores O., Spencer-Martins I. 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 // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46(2):713-20. doi: 10.1128/JCM.00514-07.
76. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K., Tamura T., Shimizu Y., Fujimoto M., Kojima F., Ichinose M., Murata S. Novel Methodology for Rapid Detection of KRAS Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification // *PLoS One*. 2016. V. 11(3):e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654.
77. 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. V. 41(6):2616-22. doi: 10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003.
78. Jaroenram W., Cecere P., Pompa P.P. Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli* // *J. Microbiol. Methods*. 2019. V. 156:9-14. doi: 10.1016/j.mimet.2018.11.020.
79. Jaroenram W., Kampeera J., Arunrut N., Karuwan C., Sappat A., Khumwan P., Jaitrong S., Boonnak K., Prammananan T., Chairprasert A., Tuantranont A., Kiatpathomchai W. Graphene-based electrochemical genosensor incorporated loop-mediated isothermal amplification for rapid on-site detection of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. V. 186:113333. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113333.
80. Jaroenram W., Kampeera J., Arunrut N., Sirithammajak S., Jaitrong S., Boonnak K., Khumwan P., Prammananan T., Chairprasert A., Kiatpathomchai W. Ultrasensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a rapid and specific probe-triggered one-step, simultaneous DNA hybridization and isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // *Sci. Rep.* 2020. V. 10(1):16976. doi: 10.1038/s41598-020-73981-6.
81. Jaroenram W., Kiatpathomchai W., Flegel T.W. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // *Mol. Cell. Probes*. 2009. V. 23(2):65-70. doi: 10.1016/j.mcp.2008.12.003.
82. Jenkins D.M., Kubota R., Dong J., Li Y., Higashiguchi D. Handheld device for real-time, quantitative, LAMP-based detection of *Salmonella enterica* using assimilating probes // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 30(1):255-60. doi: 10.1016/j.bios.2011.09.020.
83. Jia B., Li X., Liu W., Lu C., Lu X., Ma L., Li Y.-Y., Wei C. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes // *Front. Microbiol.* 2019. V.10:2860. doi: 10.3389/fmicb.2019.02860.
84. Jiang Y.S., Bhadra S., Li B., Wu Y.R., Milligan J.N., Ellington A.D. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid



- amplicons // *Anal. Chem.* 2015. V. 87(6):3314-20. doi: 10.1021/ac504387c.
85. Jiang Y.S., Stacy A., Whiteley M., Ellington A.D., Bhadra S. Amplicon Competition Enables End-Point Quantitation of Nucleic Acids Following Isothermal Amplification // *Chembiochem.* 2017. V. 18(17):1692-1695. doi: 10.1002/cbic.201700317.
86. Jung J.H., Oh S.J., Kim Y.T., Kim S.Y., Kim W.J., Jung J., Seo T.S. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 853:541-547. doi: 10.1016/j.aca.2014.10.020.
87. Kalendar R., Tselykh T.V., Khassenov B., Ramanculov E.M. Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1620:33-64. doi: 10.1007/978-1-4939-7060-5\_2.
88. Kanchanaphum P. Time Course of Detection of Human Male DNA from Stained Blood Sample on Various Surfaces by Loop Mediated Isothermal Amplification and Polymerase Chain Reaction // *Biomed. Res. Int.* 2018. V. 2018:2981862. doi: 10.1155/2018/2981862.
89. Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007. V. 70(3):499-501. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008.
90. Karthik K., Rathore R., Thomas P., Arun T.R., Viswas K.N., Dhama K., Agarwal R.K. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination // *MethodsX.* 2014. V. 1:137-43. doi: 10.1016/j.mex.2014.08.009.
91. Khammanee T., Sawangjaroen N., Buncherd H., Tun A.W., Thanapongpichat S. A LAMP-SNP Assay Detecting C580Y Mutation in Pfkfclh13 Gene from Clinically Dried Blood Spot Samples // *Korean J. Parasitol.* 2021. V. 59(1):15-22. doi: 10.3347/kjp.2021.59.1.15.
92. Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A., Ismagilov R.F. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44(2):e10. doi: 10.1093/nar/gkv877.
93. Kiatpathomchai W., Jaroenram W., Arunrut N., Jitrapakdee S., Flegel T.W. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // *J. Virol. Methods.* 2008. V. 153(2):214-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.06.025.
94. Kim H.E., Schuck A., Lee S.H., Lee Y., Kang M., Kim Y.-S. Sensitive electrochemical biosensor combined with isothermal amplification for point-of-care COVID-19 tests // *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 182:113168. doi: 10.1016/j.bios.2021.113168.
95. Kitamura M., Kubo S., Tanaka J., Adachi T. Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay // *Int. J. Legal. Med.* 2018. V. 132(4):975-981. doi: 10.1007/s00414-017-1661-z.
96. Koo B., Jin C.E., Lee T.Y., Lee J.H., Park M.K., Sung H., Park S.Y., Lee H.J., Kim S.M., Kim J.Y., Kim S.H., Shin Y. An isothermal, label-free, and rapid one-step RNA amplification/detection assay for diagnosis of respiratory viral infections // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 90:187-194. doi: 10.1016/j.bios.2016.11.051.
97. Kouguchi Y., Fujiwara T., Teramoto M., Kuramoto M. 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 // *Mol. Cell. Probes.* 2010. V. 24(4):190-5. doi: 10.1016/j.mcp.2010.03.001.
98. Kreutz J.E., Wang J., Sheen A.M., Thompson A.M., Staheli J.P., Dyen M.R., Feng Q., Chiu D.T. Self-digitization chip for quantitative detection of human papillomavirus gene using digital LAMP // *Lab. Chip.* 2019. V. 19(6):1035-1040. doi: 10.1039/c8lc01223g.
99. Kubota R., Alvarez A., Su W.W., Jenkins D. FRET-Based Assimilating Probe for Sequence-Specific Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) // *Biol. Engin. Trans.* 2011. V. 4:81-100. doi: 10.13031/2013.38509.
100. Kuzuhara Y., Yonekawa T., Iwasaki M., Kadota T., Kanda H., Horigome T., Notomi T. Homogeneous assays for single-nucleotide polymorphism genotyping: Exo-proofreading assay based on loop-mediated isothermal amplification // *Yokohama Med. J.* 2005. V. 56(1). P.9-16.
101. Lam L., Sakakihara S., Ishizuka K., Takeuchi S., Arata H.F., Fujita H., Noji H. Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber // *Biomed. Microdevices.* 2008. V. 10(4):539-46. doi: 10.1007/s10544-008-9163-x.
102. Le Roux C.A., Kubo T., Grobbelaar A.A., van Vuren P.J., Weyer J., Nel L.H., Swanepoel R., Morita K., Paweska J.T. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2009. V. 47(3):645-51. doi: 10.1128/JCM.01412-08.
103. Lee J.E., Mun H., Kim S.R., Kim M.G., Chang J.Y., Shim W.B. A colorimetric Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio*

- parahaemolyticus // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 151:111968. doi: 10.1016/j.bios.2019.111968.
- 104.Lee M.F., Chen Y.H., Peng C.F. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Microbiol. Methods.* 2009. V. 76(2):174-80. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.005.
- 105.Li B., Chen X., Ellington A.D. Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions // *Anal. Chem.* 2012. V. 84(19):8371-7. doi: 10.1021/ac301944v.
- 106.Li C., Li Z., Jia H., Yan J. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Chem. Commun (Camb).* 2011. V. 47(9):2595-7. doi: 10.1039/c0cc03957h.
- 107.Li Q., Luan G., Guo Q., Liang J. A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30(2):E5. doi: 10.1093/nar/30.2.e5.
- 108.Li R., Chen J., Zhang X., Cui J., Tao S., Yang L. Mini-Disk Capillary Array Coupling with LAMP for Visual Detection of Multiple Nucleic Acids using Genetically Modified Organism Analysis as an Example // *J. Agric. Food. Chem.* 2020. V. 68(3):899-906. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06979.
- 109.Li Y., Zhou X., Ye D. Molecular Beacons: An Optimal Multifunctional Biological Probe // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V.373(4). P.457-461. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.038.
- 110.Liang C., Cheng S., Chu Y., Wu H., Zou B., Huang H., Xi T., Zhou G. A closed-tube detection of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) products using a wax-sealed fluorescent intercalator // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013. V. 13(6):3999-4005. doi: 10.1166/jnn.2013.6497.
- 111.Liang C., Chu Y., Cheng S., Wu H., Kajiyama T., Kambara H., Zhou G. Multiplex loop-mediated isothermal amplification detection by sequence-based barcodes coupled with nicking endonuclease-mediated pyrosequencing // *Anal. Chem.* 2012. V. 84(8):3758-63. doi: 10.1021/ac3003825.
- 112.Lin X., Huang X., Urmann K., Xie X., Hoffmann M.R. Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification on a Commercial Membrane // *ACS Sens.* 2019. V. 4(1):242-249. doi: 10.1021/acssensors.8b01419.
- 113.Liu C., Jiang D.N., Xiang G.M., Luo F.K., Liu L.L., Yu J.C., Pu X.Y. DNA detection of *Clostridium difficile* infection based on real-time resistance measurement // *Genet. Mol. Res.* 2013. V. 12(3):3296-304. doi: 10.4238/2013.
- 114.Liu L.L., Jiang D.N., Xiang G.M., Liu C., Yu J.C., Pu X.Y. Development of a cyclic voltammetry method for the detection of *Clostridium novyi* in black disease // *Genet. Mol. Res.* 2014. V. 13(1):1724-34. doi: 10.4238/2014.
- 115.Liu W., Huang S., Liu N., Dong D., Yang Z., Tang Y., Ma W., He X., Ao D., Xu Y., Zou D., Huang L. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay // *Sci. Rep.* 2017. V. 7:40125. doi: 10.1038/srep40125.
- 116.Liu X.L., Zhao X.T., Muhammad I., Ge B.B., Hong B. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the simultaneous detection of CVB and CSVd in chrysanthemum // *J. Virol. Methods.* 2014. V. 210:26-31. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.09.008.
- 117.Lu Y., Ma X., Wang J., Sheng N., Dong T., Song Q., Rui J., Zou B., Zhou G. Visualized detection of single-base difference in multiplexed loop-mediated isothermal amplification amplicons by invasive reaction coupled with oligonucleotide probe-modified gold nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 90:388-393. doi: 10.1016/j.bios.2016.12.015.
- 118.Lucchi N.W., Ljolje D., Silva-Flannery L., Udhayakumar V. Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Plasmodium* spp. Parasites // *PLoS One.* 2016. V. 11(3):e0151437. doi: 10.1371/journal.pone.0151437.
- 119.Luo J., Fang X., Ye D., Li H., Chen H., Zhang S., Kong J. A real-time microfluidic multiplex electrochemical loop-mediated isothermal amplification chip for differentiating bacteria // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 60:84-91. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.073.
- 120.Ma C., Wang F., Wang X., Han L., Jing H., Zhang H., Shi C. A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification // *Chem. Comm. (Camb).* 2017. V. 53(77):10696-10699. doi: 10.1039/c7cc06469a.
- 121.Ma Y.D., Luo K., Chang W.H., Lee G.B. A microfluidic chip capable of generating and trapping emulsion droplets for digital loop-mediated isothermal amplification analysis // *Lab. Chip.* 2018. V. 18(2):296-303. doi: 10.1039/c7lc01004d.
- 122.Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity // *J. Clin. Virol.* 2013. V. 58(1):127-31. doi: 10.1016/j.jcv.2013.06.006.
- 123.Manajit O., Longyant S., Sithigorngul P., Chaivisuthangkura P. Development of uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification coupled with nanogold probe (UDG-LAMP-AuNP) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa* // *Mol. Med. Rep.* 2018. V. 17(4):5734-5743. doi: 10.3892/mmr.2018.8557.
- 124.Martineau R.L., Murray S.A., Ci S., Gao W., Chao S.H., Meldrum D.R. Improved Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays via Swarm

- Priming // *Anal. Chem.* 2017. V. 89(1):625-632. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02578.
125. Masaomi I., Toshihiro Y., Kimihiko O., Wataru S., Kentaro N., Tetsu H., Ke-Ita T., Tsuneyoshi H., Tsugunori N., Hidetoshi K. Validation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping with Whole Blood // *Genome Lett.* 2003. V. 2(3):119-126(8). doi: 10.1166/gl.2003.028
126. Meagher R.J., Priye A., Light Y.K., Huang C., Wang E. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA // *Analyst.* 2018. V. 143(8):1924-1933. doi: 10.1039/c7an01897e.
127. Minero G.A.S., Nogueira C., Rizzi G., Tian B., Fock J., Donolato M., Strömberg M., Hansen M.F. Sequence-specific validation of LAMP amplicons in real-time optomagnetic detection of Dengue serotype 2 synthetic DNA // *Analyst.* 2017. V. 142(18):3441-3450. doi: 10.1039/c7an01023k.
128. Mitani Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T., Oguchi-Katayama A., Kogo Y., Itoh M., Miyagi T., Takakura H., Hoshi K., Kato C., Arakawa T., Shibata K., Fukui K., Masui R., Kuramitsu S., Kiyotani K., Chalk A., Tsunekawa K., Murakami M., Kamataki T., Oka T., Shimada H., Cizdziel P.E., Hayashizaki Y. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology // *Nat. Methods.* 2007. V. 4(3):257-262. doi: 10.1038/nmeth1007.
129. Miyamoto S., Sano S., Takahashi K., Jikihara T. Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes // *Anal. Biochem.* 2015. V. 473:28-33. doi: 10.1016/j.ab.2014.12.016.
130. Mori Y., Hirano T., Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers // *BMC Biotechnol.* 2006. V.6:3. doi: 10.1186/1472-6750-6-3.
131. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2004. V. 59(2):145-57. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005.
132. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 289(1):150-4. doi: 10.1006/bbrc.2001.5921.
133. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage // *J. Infect. Chemother.* 2020. V. 26(1):13-17. doi: 10.1016/j.jiac.2019.07.020.
134. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases // *J. Infect. Chemother.* 2009. V. 15(2):62-9. doi: 10.1007/s10156-009-0669-9.
135. Mugasa C.M., Katiti D., Boobo A., Lubega G.W., Schallig H.D., Matovu E. Comparison of nucleic acid sequence-based amplification and loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human African trypanosomiasis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. V. 78(2):144-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.025.
136. Muñoz H.E., Riche C.T., Kong J.E., van Zee M., Garner O.B., Ozcan A., Di Carlo D. Fractal LAMP: Label-Free Analysis of Fractal Precipitate for Digital Loop-Mediated Isothermal Nucleic Acid Amplification // *ACS Sens.* 2020. V. 5(2):385-394. doi: 10.1021/acssensors.9b01974.
137. Na W., Nam D., Lee H., Shin S. Rapid molecular diagnosis of infectious viruses in microfluidics using DNA hydrogel formation // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 108:9-13. doi: 10.1016/j.bios.2018.02.040.
138. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers // *Mol. Cell. Probes.* 2002. V. 16(3):223-229. doi: 10.1006/mcpr.2002.0415.
139. Nagatani N., Yamanaka K., Saito M., Koketsu R., Sasaki T., Ikuta K., Miyahara T., Tamiya E. Semi-real time electrochemical monitoring for influenza virus RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification using a USB powered portable potentiostat // *Analyst.* 2011. V. 136(24):5143-50. doi: 10.1039/c1an15638a.
140. Nakamura N., Ito K., Takahashi M., Hashimoto K., Kawamoto M., Yamanaka M., Taniguchi A., Kamatani N., Gemma N. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip // *Anal. Chem.* 2007. V. 79(24):9484-93. doi: 10.1021/ac0715468.
141. Nanayakkara I.A., White I.M. Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA // *Analyst.* 2019. V. 144(12):3878-3885. doi: 10.1039/c9an00671k.
142. Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikononi P., Schuster D., Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30(9):e37. doi: 10.1093/nar/30.9.e37.
143. Nguyen H.V., Nguyen V.D., Lee E.Y., Seo T.S. Point-of-care genetic analysis for multiplex pathogenic bacteria on a fully integrated centrifugal microdevice with a large-volume sample // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 136:132-139. doi: 10.1016/j.bios.2019.04.035.
144. Nguyen H.V., Seo T.S. High-throughput human DNA purification on a centrifugal microfluidic device for rapid

- forensic sex-typing // *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 181:113161. doi: 10.1016/j.bios.2021.113161.
145. Nogami H., Tsutsumi H., Komuro T., Mukoyama R. Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V. 2(4):349-53. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.05.001.
146. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects // *J. Microbiol.* 2015. V. 53(1):1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
147. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28(12). E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
148. Nyan D.C., Swinson K.L. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses // *Sci. Rep.* 2015. V. 5:17925. doi: 10.1038/srep17925.
149. Nzelu C.O., Gomez E.A., Cáceres A.G., Sakurai T., Martini-Robles L., Uezato H., Mimori T., Katakura K., Hashiguchi Y., Kato H. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection // *Acta Trop.* 2014. V. 132:1-6. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.12.016.
150. Oh S.J., Park B.H., Jung J.H., Choi G., Lee D.C., Kim D.H., Seo T.S. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 75:293-300. doi: 10.1016/j.bios.2015.08.052.
151. Ostorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) // *Biotechniques.* 2016. V. 61(1):20-5. doi: 10.2144/000114432.
152. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42(1):257-63. doi: 10.1128/JCM.42.1.257-263.2004.
153. Parida M., Sannarangaiyah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases // *Rev. Med. Virol.* 2008. V. 18(6):407-21. doi: 10.1002/rmv.593.
154. Park B.H., Oh S.J., Jung J.H., Choi G., Seo J.H., Kim D.H., Lee E.Y., Seo T.S. An integrated rotary microfluidic system with DNA extraction, loop-mediated isothermal amplification, and lateral flow strip based detection for point-of-care pathogen diagnostics // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 91:334-340. doi: 10.1016/j.bios.2016.11.063.
155. Peng H., Zhu M., Gao Z., Liao C., Jia C., Wang H., Zhou H., Zhao J. A centrifugal microfluidic emulsifier integrated with oil storage structures for robust digital LAMP // *Biomed. Microdevices.* 2020. V. 22(1):18. doi: 10.1007/s10544-020-0475-9.
156. Petersen M., Ma L., Lu X. Rapid determination of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* in food products by loop-mediated isothermal amplification coupling propidium monoazide treatment // *Int. J. Food Microbiol.* 2021. V. 351:109263. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109263.
157. Peyrefitte C.N., Boubis L., Coudrier D., Bouloy M., Grandadam M., Tolou H.J., Plumet S. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley Fever virus // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46(11):3653-9. doi: 10.1128/JCM.01188-08.
158. Phillips E.A., Moehling T.J., Bhadra S., Ellington A.D., Linnes J.C. Strand Displacement Probes Combined with Isothermal Nucleic Acid Amplification for Instrument-Free Detection from Complex Samples // *Anal. Chem.* 2018. V. 90(11):6580-6586. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00269.
159. Poole C.B., Li Z., Alhassan A., Guelig D., Diesburg S., Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr., LaBarre P., Wanji S., Burton R.A., Carlow C.K. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) // *PLoS One.* 2017. V. 12(2):e0169011. doi: 10.1371/journal.pone.0169011.
160. Prakrankamanant P., Leelayuwat C., Promptmas C., Limpaboon T., Wanram S., Prasongdee P., Pientong C., Daduang J., Jearanaikoon P. The development of DNA-based quartz crystal microbalance integrated with isothermal DNA amplification system for human papillomavirus type 58 detection // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 40(1):252-7. doi: 10.1016/j.bios.2012.07.033.
161. Quyen T.L., Ngo T.A., Bang D.D., Madsen M., Wolff A. Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10:2234. doi: 10.3389/fmicb.2019.02234.
162. Rane T.D., Chen L., Zec H.C., Wang T.H. Microfluidic continuous flow digital loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Lab. Chip.* 2015. V. 15(3):776-82. doi: 10.1039/c4lc01158a.
163. Rolando J.C., Jue E., Barlow J.T., Ismagilov R.F. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48(7): e42. doi: 10.1093/nar/gkaa099.
164. Roskos K., Hickerson A.I., Lu H.W., Ferguson T.M., Shinde D.N., Klaue Y., Niemz A. Simple system for isothermal DNA amplification coupled to lateral flow

- detection // *PLoS One*. 2013. V. 8(7):e69355. doi: 10.1371/journal.pone.0069355.
165. Roy S., Mohd-Naim N.F., Safavieh M., Ahmed M.U. Colorimetric Nucleic Acid Detection on Paper Microchip Using Loop Mediated Isothermal Amplification and Crystal Violet Dye // *ACS Sens*. 2017. V. 2(11):1713-1720. doi: 10.1021/acssensors.7b00671.
166. Roy S., Wei S.X., Ying J.L.Z., Safavieh M., Ahmed M.U. A novel, sensitive and label-free loop-mediated isothermal amplification detection method for nucleic acids using luminophore dyes // *Biosens Bioelectron*. 2016. V. 86:346-352. doi: 10.1016/j.bios.2016.06.065.
167. Rubinien J., Atabay K.D., Nichols N.M., Tanner N.A., Pezza J.A., Gray M.M., Wagner BM, Poppin J.N., Aken J.T., Gleason E.J., Foley K.D., Copeland D.S., Kraves S., Alvarez Saavedra E. Nucleic acid detection aboard the International Space Station by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *FASEB Bioadv*. 2020. V. 2(3):160-165. doi: 10.1096/fba.2019-00088.
168. Safavieh M., Ahmed M.U., Ng A., Zourob M. High-throughput real-time electrochemical monitoring of LAMP for pathogenic bacteria detection // *Biosens. Bioelectron*. 2014. V. 58:101-6. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.002.
169. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. Inhibition of nonspecific polymerase activity using Poly(Aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte // *Anal. Biochem*. 2021. V. 628:114267. doi: 10.1016/j.ab.2021.114267.
170. Salinas N.R., Little D.P. Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal AMPLification // *ISRN Bioinform*. 2012. V. 2012:696758. doi: 10.5402/2012/696758.
171. Santiago-Felipe S., Tortajada-Genaro L.A., Carrascosa J., Puchades R., Maquieira Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors // *Biosens. Bioelectron*. 2016. V. 79:300-6. doi: 10.1016/j.bios.2015.12.045.
172. Sappat A., Jaroenram W., Puthawibool T., Lomas T., Tuantranont A., Kiatpathomchai W. Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter // *J. Virol. Methods*. 2011. V. 175(2):141-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.05.013.
173. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis // *Electrophoresis*. 2019. V. 40(20):2706-2717. doi: 10.1002/elps.201900167.
174. Scott A., Jackson K., Carter M., Comeau R., Layne T., Landers J. Rapid sperm lysis and novel screening approach for human male DNA via colorimetric loop-mediated isothermal amplification // *Forensic Sci. Int. Genet*. 2019. V. 43:102139. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.102139.
175. Seetang-Nun Y., Jaroenram W., Sriurairatana S., Suebsing R., Kiatpathomchai W. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification // *Mol. Cell. Probes*. 2013. V. 27(2):71-9. doi: 10.1016/j.mcp.2012.11.005.
176. Seyrig G., Stedtfeld R.D., Tourlousse D.M., Ahmad F., Towery K., Cupples A.M., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics // *J. Microbiol. Methods*. 2015. V. 119:223-7. doi: 10.1016/j.mimet.2015.11.004.
177. Shao Y., Zhu S., Jin C., Chen F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk // *Int. J. Food Microbiol*. 2011. V. 148(2):75-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.004.
178. Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification // *Microbiol. Immunol*. 2019. V. 63(10):407-412. doi: 10.1111/1348-0421.12734.
179. Subramanian S., Gomez R.D. An empirical approach for quantifying loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using *Escherichia coli* as a model system // *PLoS One*. 2014. V. 9(6):e100596. doi: 10.1371/journal.pone.0100596.
180. Sun B., Shen F., McCalla S.E., Kreutz J.E., Karymov M.A., Ismagilov R.F. Mechanistic evaluation of the pros and cons of digital RT-LAMP for HIV-1 viral load quantification on a microfluidic device and improved efficiency via a two-step digital protocol // *Anal. Chem*. 2013. V. 85(3):1540-6. doi: 10.1021/ac3037206.
181. Sun Y., Tian H., Liu C., Sun Y., Li Z. One-step detection of microRNA with high sensitivity and specificity via target-triggered loop-mediated isothermal amplification (TT-LAMP) // *Chem. Commun. (Camb)*. 2017. V. 53(80):11040-11043. doi: 10.1039/c7cc06140d.
182. Takayama I., Nakauchi M., Takahashi H., Oba K., Semba S., Kaida A., Kubo H., Saito S., Nagata S., Odagiri T., Kageyama T. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus // *J. Virol. Methods*. 2019. V. 267:53-58. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.02.010.
183. Tani H., Teramura T., Adachi K., Tsuneda S., Kurata S., Nakamura K., Kanagawa T., Noda N. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification // *Anal. Chem*. 2007. V. 79(15):5608-13. DOI: 10.1021/ac070041e.
184. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification // *Biotechniques*. 2012. V. 53(2):81-9. doi: 10.2144/0000113902.

185. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes // *Biotechniques*. 2015. V. 58(2):59-68. doi: 10.2144/000114253.
186. Techathuvanan C., D'Souza D.H. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays // *J. Food Sci.* 2020. V. 85(10):3509-3516. doi: 10.1111/1750-3841.15459.
187. Teixeira A., Paris J.L., Roumani F., Diéguez L., Prado M., Espiña B., Abalde-Cela S., Garrido-Maestu A., Rodriguez-Lorenzo L. Multifunctional Gold Nanoparticles for the SERS Detection of Pathogens Combined with a LAMP-in-Microdroplets Approach // *Materials (Basel)*. 2020. V. 13(8):1934. doi: 10.3390/ma13081934.
188. Telli A.E., Doğruer Y. Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using Propidium Monoazide - Quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR // *Microb. Pathog.* 2019. V. 132:109-116. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.029.
189. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3(5):877-82. doi: 10.1038/nprot.2008.57.
190. Tone K., Fujisaki R., Yamazaki T., Makimura K. Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values // *J. Microbiol. Methods*. 2017. V. 132:41-45. doi: 10.1016/j.mimet.2016.10.020.
191. Torres C., Vitalis E.A., Baker B.R., Gardner S.N., Torres M.W., Dzenitis J.M. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures // *BMC Bioinformatics*. 2011. V. 12:240. doi: 10.1186/1471-2105-12-240.
192. Trieu P.T., Lee N.Y. Paper-Based All-in-One Origami Microdevice for Nucleic Acid Amplification Testing for Rapid Colorimetric Identification of Live Cells for Point-of-Care Testing // *Anal. Chem.* 2019. V. 91(17):11013-11022. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01263.
193. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // *Nat. Biotechnol.* 1996. V. 14(3):303-8. doi: 10.1038/nbt0396-303.
194. Varona M., Anderson J.L. Visual Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms Using Molecular Beacon Loop-Mediated Isothermal Amplification with Centrifuge-Free DNA Extraction // *Anal. Chem.* 2019. V. 91(11):6991-6995. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01762.
195. Varona M., Eitzmann D.R., Pagariya D., Anand R.K., Anderson J.L. Solid-Phase Microextraction Enables Isolation of BRAF V600E Circulating Tumor DNA from Human Plasma for Detection with a Molecular Beacon Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay // *Anal. Chem.* 2020. V. 92(4):3346-3353. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05323.
196. Veigas B., Branquinho R., Pinto J.V., Wojcik P.J., Martins R., Fortunato E., Baptista P.V. Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitoring of isothermal DNA amplification // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 52:50-5. doi: 10.1016/j.bios.2013.08.029.
197. Waiwijit U., Phokaratkul D., Kampeera J., Lomas T., Wisitorsaat A., Kiatpathomchai W., Tuantranont A. Graphene oxide based fluorescence resonance energy transfer and loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus detection // *J. Biotechnol.* 2015. V. 212:44-9. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.003.
198. Wan L., Chen T., Gao J., Dong C., Wong A.H., Jia Y., Mak P.I., Deng C.X., Martins R.P. A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection // *Sci. Rep.* 2017V. 7(1):14586. doi: 10.1038/s41598-017-14698-x.
199. Wan L., Gao J., Chen T., Dong C., Li H., Wen Y.Z., Lun Z.R., Jia Y., Mak P.I., Martins R.P. LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Biomed. Microdevices*. 2019. V. 21(1):9. doi: 10.1007/s10544-018-0354-9.
200. Wang C.H., Lien K.Y., Wang T.Y., Chen T.Y., Lee G.B. An integrated microfluidic loop-mediated-isothermal-amplification system for rapid sample pre-treatment and detection of viruses // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 26(5):2045-52. doi: 10.1016/j.bios.2010.08.083.
201. Wang D.G., Brewster J.D., Paul M., Tomasula P.M. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification // *Molecules*. 2015. V. 20(4):6048-59. doi: 10.3390/molecules20046048.
202. Wang S., Liu N., Zheng L., Cai G., Lin J. A lab-on-chip device for the sample-in-result-out detection of viable *Salmonella* using loop-mediated isothermal amplification and real-time turbidity monitoring // *Lab. Chip*. 2020. V. 20(13):2296-2305. doi: 10.1039/d0lc00290a.
203. Wang Y., Wang Y., Lan R., Xu H., Ma A., Li D., Dai H., Yuan X., Xu J., Ye C. Multiple Endonuclease Restriction Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification: A Novel Analytically Rapid, Sensitive, Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection Technique // *J. Mol. Diagn.* 2015. V. 17(4):392-401. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.03.002.
204. Wang D. Effect of internal primer-template mismatches on loop-mediated isothermal amplification // *Biotechnol. Biotechnol. Equipment*. 2016. V. 2:314-318, doi: 10.1080/13102818.2015.1125765
205. Wong J.K., Yip S.P., Lee T.M. Ultrasensitive and closed-tube colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay using carboxyl-modified gold

- nanoparticles // *Small*. 2014. V. 10(8):1495-9. doi: 10.1002/sml.201302348.
206. Wu Q., Jin W., Zhou C., Han S., Yang W., Zhu Q., Jin Q., Mu Y. Integrated glass microdevice for nucleic acid purification, loop-mediated isothermal amplification, and online detection // *Anal. Chem.* 2011. V. 83(9):3336-42. doi: 10.1021/ac103129e.
207. Xie S., Chai Y., Yuan Y., Bai L., Yuan R. Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 55:324-9. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.009.
208. Xu G., Gunson R.N., Cooper J.M., Reboud J. Rapid ultrasonic isothermal amplification of DNA with multiplexed melting analysis – applications in the clinical diagnosis of sexually transmitted diseases // *Chem. Commun. (Camb)*. 2015. V. 51(13):2589-92. doi: 10.1039/c4cc08389j.
209. Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Pastor N., Maquieira Á. Polymorphism genotyping based on loop-mediated isothermal amplification and smartphone detection // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 109:177-183. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.008.
210. Yang A.K., Lu H., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Yu S., Cheung A.K., Kong S.K. Detection of Pantone-Valentine Leukocidin DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by resistive pulse sensing and loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 782:46-53. doi: 10.1016/j.aca.2013.04.004.
211. Yang K.L.A., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Kong S.K. Using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) and Spectral Surface Plasmon Resonance (SPR) to Detect Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA) // *Proc. Int. Conf. Biomed. Engin. Biotechnol. iCBEB*. 2012. 647-650. doi: 10.1109/iCBEB.2012.462.
212. Yaren O., Bradley K.M., Moussatche P., Hoshika S., Yang Z., Zhu S., Karst S.M., Benner S.A. A norovirus detection architecture based on isothermal amplification and expanded genetic systems // *J. Virol. Methods*. 2016. V. 237:64-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.08.012.
213. Yaren O., Glushakova L.G., Bradley K.M., Hoshika S., Benner S.A. Standard and AEGIS nicking molecular beacons detect amplicons from the Middle East respiratory syndrome coronavirus // *J. Virol. Methods*. 2016. V. 236:54-61. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.07.008.
214. Yi C., Luo Z., Lu Y., Belwal T., Pan X., Lin X. Nanoporous hydrogel for direct digital nucleic acid amplification in untreated complex matrices for single bacteria counting // *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 184:113199. doi: 10.1016/j.bios.2021.113199.
215. Yi J., Zhang W., Zhang D.Y. Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34(11):e81. doi: 10.1093/nar/gkl261.
216. Zhang D., Gao B., Zhao C., Liu H. Visualized Quantitation of Trace Nucleic Acids Based on the Coffee-Ring Effect on Colloid-Crystal Substrates // *Langmuir*. 2019. V. 35(1). P.248-253. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b03609.
217. Zhang H., Xu Y., Fohlerova Z., Chang H., Iliescu C., Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification // *Trends Analyt. Chem.* 2019. V. 113:44-53. doi: 10.1016/j.trac.2019.01.015.
218. Zhang X., Lowe S.B., Gooding J.J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 61:491-9. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.039.
219. Zhang Z., Zhao S., Hu F., Yang G., Li J., Tian H., Peng N. An LED-Driven AuNPs-PDMS Microfluidic Chip and Integrated Device for the Detection of Digital Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification // *Micromachines (Basel)*. 2020. V. 11(2):177. doi: 10.3390/mi11020177.
220. Zhang Z.P., Zhang Y., Liu J.P., Zhang J.T., An Z.X., Quan F.S., Zhang L., Cai X., Pu S.W. Codeposition of dNTPs detection for rapid LAMP-based sexing of bovine embryos // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44(1):116-21. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01006.x.
221. Zhao B., Yang D., Zhang Y., Xu Y., Zhao X., Liang J., Fan X., Du Y., Zhu Z., Shi B., Zhang Q., Zhang X. Rapid visual detection of lily mottle virus using a loop-mediated isothermal amplification method // *Arch. Virol.* 2018. V. 163(2):545-548. doi: 10.1007/s00705-017-3618-4.
222. Zhi X., Deng M., Yang H., Gao G., Wang K., Fu H., Zhang Y., Chen D., Cui D. A novel HBV genotypes detecting system combined with microfluidic chip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 54:372-7. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.025.
223. Zhu L., Xu Y., Cheng N., Xie P., Shao X., Huang K., Luo Y., Xu W. A facile cascade signal amplification strategy using DNAzyme loop-mediated isothermal amplification for the ultrasensitive colorimetric detection of *Salmonella* // *Sens. Act. B: Chem.* 2017. V. 242:880-888.
224. Zhu Q., Gao Y., Yu B., Ren H., Qiu L., Han S., Jin W., Jin Q., Mu Y. Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care // *Lab. Chip*. 2012. V. 12(22):4755-63. doi: 10.1039/c2lc40774d.
225. Zhu Z., Tang Y., Jiang Y.S., Bhadra S., Du Y., Ellington A.D., Li B. Strand-Exchange Nucleic Acid Circuitry with Enhanced Thermo- and Structure- Buffering Abilities Turns Gene Diagnostics Ultra-Reliable and Environmental Compatible // *Sci. Rep.* 2016. V. 6:36605. doi: 10.1038/srep36605.

226. Zoheir K.M., Allam A.A. A rapid method for sexing the bovine embryo // *Anim. Reprod. Sci.* 2010. V. 119(1-2):92-6. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.12.013.
227. Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Кулуев Б.Р., Швец К.Ю., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Чемерис Д.А., Зубов В.В., Алексеев Я.И., Мавзютов А.Р., Иваненков Я.А., Чемерис А.В. Современные подходы к дифференциации живых и мертвых бактерий с помощью избирательной амплификации нуклеиновых кислот // *Микробиология.* 2020. Т. 89, № 1. С. 17–33. doi: 10.31857/S0026365620010036.
228. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора // *Биомика.* 2019. Т.11(1). С. 23-70. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04.
229. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Алексеев Я.И., Чемерис А.В. Гендерные локусы в ДНК-криминалистике и женском спорте // *Биомика.* 2021. Т.13(1). С.54-74. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-6.
230. Зырина Н.В., В.Н. Антипова, Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации // *Биохимия.* 2021. Т. 86(7). С. 10661077. doi: 10.31857/S0320972521070101.
231. Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А., Алексеев Б.Я., Шкурников М.Ю. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии // *Онкоурология.* 2018. Т. 14(2). С. 88-99. doi: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99.
232. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации // *Вопросы вирусол.* 2021. Т. 66(1). С. 17-28. doi: 10.36233/0507-4088-42.
233. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // *Вестник биотехнол. физ.-хим. биол.* 2012. Т. 8. С. 34-45.
3. Ahmed M.U., Nahar S., Safavieh M., Zourob M. Real-time electrochemical detection of pathogen DNA using electrostatic interaction of a redox probe. *Analyst.* 2013. V. 138(3):907-15. doi: 10.1039/c2an36153a.
4. Ahmed M.U., Saito M., Hossain M.M., Rao S.R., Furui S., Hino A., Takamura Y., Takagi M., Tamiya E. Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification. *Analyst.* 2009. V. 134(5):966-72. doi: 10.1039/b812569d.
5. Ahsan A., Usman M., Ullah I., Zahur A.B., Malik A.R. Molecular diagnostic assays for the detection of peste des petits ruminants virus: a concise review. *Vet. Sci.: Res. Rev.* 2017. V. 3(3):53-57. doi: 10.17582/journal.vsr/2017.3.3.53.57.
6. Ali S.A., Boby N., Preena P., Singh S.V., Kaur G., Ghosh S.K., Nandi S., Chaudhuri P. Microcapillary LAMP for rapid and sensitive detection of pathogen in bovine semen. *Anim. Biotechnol.* 2021. V. 10:1-10. doi: 10.1080/10495398.2020.1863225.
7. Al-Maskri A.A., Ye J., Talap J., Hu H., Sun L., Yu L., Cai S., Zeng S. Reverse transcription-based loop-mediated isothermal amplification strategy for real-time miRNA detection with phosphorothioated probes. *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1126:1-6. doi: 10.1016/j.aca.2020.06.007.
8. Aoi Y., Hosogai M., Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J. Biotechnol.* 2006. V. 125(4):484-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.04.007.
9. Ayukawa Y., Hanyuda S., Fujita N., Komatsu K., Arie T. Novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay with a universal QProbe can detect SNPs determining races in plant pathogenic fungi. *Sci. Rep.* 2017. V. 7(1):4253. doi: 10.1038/s41598-017-04084-y.
10. Bakhavathsalam P., Longatte G., Jensen S.O., Manefield M., Gooding J. J. Locked nucleic acid molecular beacon for multiplex detection of loop mediated isothermal amplification. *Sens. Act. B: Chem.* 2018. V. 268:255-263. doi: 10.1016/j.snb.2018.04.081.
11. Ball C.S., Light Y.K., Koh C.Y., Wheeler S.S., Coffey L.L., Meagher R.J. Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses. *Anal. Chem.* 2016. V. 88(7):3562-8. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04054.
12. Bartosik M., Jirakova L., Anton M., Vojtesek B., Hrstka R. Genomagnetic LAMP-based electrochemical test for determination of high-risk HPV16 and HPV18 in clinical samples. *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1042:37-43. doi: 10.1016/j.aca.2018.08.020.
13. Baymiev A.K., Kuluev B.R., Shvets K.Y., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Chemeris D.A., Ivanenkov Y.A., Chemeris A.V., Zubov V.V., Alekseev

## References

1. Abe T., Segawa Y., Watanabe H., Yotoriyama T., Kai S., Yasuda A., Shimizu N., Tojo N. Point-of-care testing system enabling 30 min detection of influenza genes. *Lab. Chip.* 2011. V. 11(6):1166-7. doi: 10.1039/c0lc00519c.
2. Abildgaard A., Tovbjerg S.K., Giltay A., Detemmerman L., Nissen P.H. Lactase persistence genotyping on whole blood by loop-mediated isothermal amplification and melting curve analysis. *Clin. Chim. Acta.* 2018. V. 482:50-56. doi: 10.1016/j.cca.2018.03.029.



- Y.I., Mavzyutov A.R. Modern approaches to differentiation of live and dead bacteria using selective amplification of nucleic acids. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2020. V. 89. P. 13-27. DOI: 10.1134/S0026261720010038.
14. Becherer L., Bakheit M., Frischmann S., Stinco S., Borst N., Zengerle R., von Stetten F. Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters. *Anal. Chem.* 2018. V. 90(7):4741-4748. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05371.
15. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods*. 2020. V. 12. doi: 10.1039/C9AY02246E.
16. Becherer L., Hess J.F., Frischmann S., Bakheit M., Nitschko H., Stinco S., Zitz F., Hofer H., Porro G., Hausladen F., Stock K., Drossart D., Wurm H., Kuhn H., Huber D., Hutzenlaub T., Paust N., Keller M., Strohmeier O., Wadle S., Borst N., Zengerle R., von Stetten F. Point-of-Care System for HTLV-1 Proviral Load Quantification by Digital Mediator Displacement LAMP. *Micromachines (Basel)*. 2021. V. 12(2):159. doi: 10.3390/mi12020159.
17. Bektaş A., Chapela I. Loop-mediated isothermal amplification of single pollen grains. *J. Integr. Plant Biol.* 2014. V. 56(8):741-8. doi: 10.1111/jipb.12191.
18. Berard C., Cazalis M.A., Leissner P., Mouglin B. DNA nucleic acid sequence-based amplification-based genotyping for polymorphism analysis. *Biotechniques*. 2004. V. 37(4):680-2, 684, 686. doi: 10.2144/04374DD04.
19. Cai S., Jung C., Bhadra S., Ellington A.D. Phosphorothioated Primers Lead to Loop-Mediated Isothermal Amplification at Low Temperatures. *Anal. Chem.* 2018. V.90(14). P.8290-8294. doi: 10.1021/acs.analchem.8b02062.
20. Cao G., Kong J., Xing Z., Tang Y., Zhang X., Xu X., Kang Z., Fang X., Guan M. Rapid detection of CALR type 1 and type 2 mutations using PNA-LNA clamping loop-mediated isothermal amplification on a CD-like microfluidic chip. *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1024:123-135. doi: 10.1016/j.aca.2018.04.022.
21. Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1988. V. 85(23):8790-4. doi: 10.1073/pnas.85.23.8790.
22. Carlos F.F., Veigas B., Matias A.S., Doria G., Flores O., Baptista P.V. Allele specific LAMP- gold nanoparticle for characterization of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnol. Rep. (Amst)*. 2017. V. 16:21-25. doi: 10.1016/j.btre.2017.10.003.
23. Carter C., Akrami K., Hall D., Smith D., Aronoff-Spencer E. Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA. *J. Virol. Methods*. 2017. V. 244:32-38. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.013.
24. Centeno-Cuadros A., Abbasi I., Nathan R. Sex determination in the wild: a field application of loop-mediated isothermal amplification successfully determines sex across three raptor species. *Mol. Ecol. Resour.* 2017. V. 17(2):153-160. doi: 10.1111/1755-0998.12540.
25. Chander Y., Koelbl J., Puckett J., Moser M.J., Klingele A.J., Liles M.R., Carrias A., Mead D.A., Schoenfeld T.W. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol.* 2014. V. 5:395. doi: 10.3389/fmicb.2014.00395.
26. Chang T.J., Yang D.M., Wang M.L., Liang K.H., Tsai P.H., Chiou S.H., Lin T.H., Wang C.T. Genomic Analysis and Comparative Multiple Sequence of SARS-CoV2. *J. Chin. Med. Assoc.* 2020. V. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000335.
27. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to avoid the appearance of false-positive results in a polymerase chain reaction? *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2012. V. 8(3). P. 34-45.
28. Chen G., Chen R., Ding S., Li M., Wang J., Zou J., Du F., Dong J., Cui X., Huang X., Deng Y., Tang Z. Recombinase assisted loop-mediated isothermal DNA amplification. *Analyst*. 2020. V. 145(2):440-444. doi: 10.1039/c9an01701a.
29. Chen J., Xu X., Huang Z., Luo Y., Tang L., Jiang J.H. BEAMing LAMP: single-molecule capture and on-bead isothermal amplification for digital detection of hepatitis C virus in plasma. *Chem. Commun (Camb)*. 2018. V. 54(3):291-294. doi: 10.1039/c7cc08403j.
30. Chen L., Fan X.Z., Wang Q., Xu L., Zhao Q.Z., Zhou Y.C., Liu J., Tang B., Zou X.Q. A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus. *Virol. Sin.* 2010. V. 25(1):59-64. doi: 10.1007/s12250-010-3043-2.
31. Chou P.H., Lin Y.C., Teng P.H., Chen C.L., Lee P.Y. 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. V. 173(1):67-74. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.01.009.
32. Chuang T.L., Wei S.C., Lee S.Y., Lin C.W. A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification. *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 32(1):89-95. doi: 10.1016/j.bios.2011.11.037.
33. Diagne C.T., Faye M., Lopez-Jimena B., Abd El Wahed A., Loucoubar C., Fall C., Mencatelli G., Faye O., Weidmann M., Sall A.A. Comparative Analysis of Zika Virus Detection by RT-qPCR, RT-LAMP, and

- RT-RPA. *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2142:165-179. doi: 10.1007/978-1-0716-0581-3\_14.
34. Ding S., Chen R., Chen G., Li M., Wang J., Zou J., Du F., Dong J., Cui X., Huang X., Deng Y., Tang Z. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP). *Theranostics*. 2019. V. 9(13):3723-3731. doi: 10.7150/thno.33980.
35. Ding X., Clark K.D., Varona M., Emaus M.N., Anderson J.L. Magnetic ionic liquid-enhanced isothermal nucleic acid amplification and its application to rapid visual DNA analysis. *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1045:132-140. doi: 10.1016/j.aca.2018.09.014.
36. Ding X., Yin K., Chen J., Wang K., Liu C. A ribonuclease-dependent cleavable beacon primer triggering DNA amplification for single nucleotide mutation detection with ultrahigh sensitivity and selectivity. *Chem. Commun. (Camb)*. 2019. V. 55(84):12623-12626. doi: 10.1039/c9cc06296c.
37. Ding X., Yin K., Li Z., Pandian V., Smyth J.A., Helal Z., Liu C. Cleavable hairpin beacon-enhanced fluorescence detection of nucleic acid isothermal amplification and smartphone-based readout. *Sci. Rep.* 2020. V. 10(1):18819. doi: 10.1038/s41598-020-75795-y.
38. Dong J., Xu Q., Li C.C., Zhang C.Y. Single-color multiplexing by the integration of high-resolution melting pattern recognition with loop-mediated isothermal amplification. *Chem. Commun. (Camb)*. 2019. V. 55(17):2457-2460. doi: 10.1039/c8cc09741k.
39. Du W., Li L., Nichols K.P., Ismagilov R.F. SlipChip. *Lab Chip*. 2009. V. 9(16):2286-92. doi: 10.1039/b908978k.
40. Du W., Lv M., Li J., Yu R., Jiang J. A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection. *Chem. Commun. (Camb)*. 2016. V. 52(86):12721-12724. doi: 10.1039/c6cc06160e.
41. Du Y., Hughes R.A., Bhadra S., Jiang Y.S., Ellington A.D., Li B. A Sweet Spot for Molecular Diagnostics: Coupling Isothermal Amplification and Strand Exchange Circuits to Glucometers. *Sci. Rep.* 2015. V. 5:11039. doi: 10.1038/srep11039.
42. Fang X., Liu Y., Kong J., Jiang X. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens. *Anal. Chem.* 2010. V. 82(7):3002-6. doi: 10.1021/ac1000652.
43. Fei Z., Wei R., Zhou D., Li N., Xiao P. A novel bioluminescent approach to the loop-mediated isothermal amplification-based detection of *Lactobacillus salivarius* in feed samples. *J. Microbiol. Methods*. 2021. V. 187:106209. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106209.
44. Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glökler J.F. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015. V. 58(4):189-94. doi: 10.2144/000114275.
45. Foo P.C., Chan Y.Y., Mohamed M., Wong W.K., Nurul Najian A.B., Lim B.H. Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp. *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 966:71-80. doi: 10.1016/j.aca.2017.02.019.
46. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen Phys. (Leipzig)*. 1948. V.2. P.55-75.
47. French D.J., Archard C.L., Brown T., McDowell D.G. HyBeacon probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Mol. Cell. Probes*. 2001. V. 15(6):363-74. doi: 10.1006/mcpr.2001.0384.
48. Fujita N., Ayukawa Y., Fuke M., Teraoka T., Watanabe K., Arie T., Komatsu K. Rapid sex identification method of spinach (*Spinacia oleracea* L.) in the vegetative stage using loop-mediated isothermal amplification. *Planta*. 2017. V. 245(1):221-226. doi: 10.1007/s00425-016-2618-z.
49. Fukuta S., Iida T., Mizukami Y., Ishida A., Ueda J., Kanbe M., Ishimoto Y. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol.* 2003. V. 148(9):1713-20. doi: 10.1007/s00705-003-0134-5.
50. Gadkar V.J., Goldfarb D.M., Gantt S., Tilley P.A.G. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci. Rep.* 2018. V. 8(1):5548. doi: 10.1038/s41598-018-23930-1.
51. Gandelman O., Jackson R., Kiddle G., Tisi L. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12(12):9108-24. doi: 10.3390/ijms12129108.
52. Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., Parmar S., Jalal H., Tisi L.C., Murray J.A. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS One*. 2010. V. 5(11):e14155. doi: 10.1371/journal.pone.0014155.
53. Gansen A., Herrick A.M., Dimov I.K., Lee L.P., Chiu D.T. Digital LAMP in a sample self-digitization (SD) chip. *Lab. Chip*. 2012. V. 12(12):2247-54. doi: 10.1039/c2lc21247a.
54. Gao X., Sun B., Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411(6):1211-1218. doi: 10.1007/s00216-018-1552-2.
55. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., Alexeyev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova J.Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R.T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019. V.11(1):23-70. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04.

56. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers. *Anal. Biochem.* 2017. V. 518:126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.
57. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Alekseev Ya.I., Chemeris A.V. Gender loci in DNA forensics and women's sports. *Biomics.* 2021. V.13(1):54-74. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-6.
58. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase. *Biochimie.* 2020. V. 168:259-267. doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
59. Gibson N.J., Newton C.R., Little S. A colorimetric assay for phosphate to measure amplicon accumulation in polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1997. V. 254(1):18-22. doi: 10.1006/abio.1997.2324.
60. Gill A.A.S., Singh S., Thapliyal N., Karpoormath R. Nanomaterial-based optical and electrochemical techniques for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review // *Mikrochim. Acta.* 2019. V. 186(2):114. doi: 10.1007/s00604-018-3186-7.
61. Gill P., Hadian Amree A. AS-LAMP: A New and Alternative Method for Genotyping. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2020. V. 12(1):2-8.
62. Gong L., Tang F., Liu E., Liu X., Xu H., Wang Y., Song Y., Liang J. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid detection of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1*. *PLoS One.* 2021. V. 16(4):e0249582. doi: 10.1371/journal.pone.0249582.
63. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques.* 2009. V. 46(3):167-72. doi: 10.2144/000113072.
64. Guo L., Lu B., Dong Q., Tang Y., Du Y., Li B. One-tube smart genetic testing via coupling isothermal amplification and three-way nucleic acid circuit to glucometers. *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1106:191-198. doi: 10.1016/j.aca.2020.01.068.
65. Hardinge P., Baxani D.K., McCloy T., Murray J.A.H., Castell O.K. Bioluminescent detection of isothermal DNA amplification in microfluidic generated droplets and artificial cells. *Sci. Rep.* 2020. V. 10(1):21886. doi: 10.1038/s41598-020-78996-7 (Erratum in: *Sci. Rep.* 2021. V. 11(1):10748).
66. Hardinge P., Murray J.A.H. Lack of specificity associated with using molecular beacons in loop mediated amplification assays. *BMC Biotechnol.* 2019. V. 19(1):55. doi: 10.1186/s12896-019-0549-z.
67. Hashimoto K., Inada M., Ito K. A novel voltammetric approach for real-time electrochemical detection of targeted nucleic acid sequences using LAMP. *Anal. Biochem.* 2017. V. 539:113-117. doi: 10.1016/j.ab.2017.10.019.
68. Hashimoto K., Inada M., Ito K. Multiplex Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Using an Electrochemical DNA Chip Consisting of a Single Liquid-Flow Channel. *Anal. Chem.* 2019. V. 91(5):3227-3232. doi: 10.1021/acs.analchem.8b05284.
69. Hataoka Y., Zhang L., Mori Y., Tomita N., Notomi T., Baba Y. Analysis of specific gene by integration of isothermal amplification and electrophoresis on poly(methyl methacrylate) microchips. *Anal. Chem.* 2004. V. 76(13):3689-93. doi: 10.1021/ac035032u.
70. Higgins O., Clancy E., Cormican M., Boo T.W., Cunney R., Smith T.J. Evaluation of an Internally Controlled Multiplex Tth Endonuclease Cleavage Loop-Mediated Isothermal Amplification (TEC-LAMP) Assay for the Detection of Bacterial Meningitis Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19(2):524. doi: 10.3390/ijms19020524.
71. Hirayama H., Kageyama S., Moriyasu S., Sawai K., Onoe S., Takahashi Y., Katagiri S., Toen K., Watanabe K., Notomi T., Yamashina H., Matsuzaki S., Minamihashi A. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology.* 2004. V. 62(5):887-96. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.007.
72. Hong M., Zha L., Fu W., Zou M., Li W., Xu D. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 28(2):523-31. doi: 10.1007/s11274-011-0843-y.
73. Hongwarittorn I., Chaichanawongsaroj N., Laiwattanapaisal W. Semi-quantitative visual detection of loop mediated isothermal amplification (LAMP)-generated DNA by distance-based measurement on a paper device. *Talanta.* 2017. V. 175:135-142. doi: 10.1016/j.talanta.2017.07.019.
74. Howard R.L., French D.J., Richardson J.A., O'Neill C.E., Andreou M.P., Brown T., Clark D., Clarke I.N., Holloway J.W., Marsh P., Debenham P.G. Rapid detection of diagnostic targets using isothermal amplification and HyBeacon probes--a homogenous system for sequence-specific detection. *Mol. Cell. Probes.* 2015. V. 29(2):92-8. doi: 10.1016/j.mcp.2014.12.001.
75. Hsieh K., Mage P.L., Csordas A.T., Eisenstein M., Soh H.T. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem. Commun (Camb).* 2014. V. 50(28):3747-9. doi: 10.1039/c4cc00540f.
76. Hsieh K., Patterson A.S., Ferguson B.S., Plaxco K.W., Soh H.T. Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated

- isothermal amplification. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. V. 51(20):4896-900. doi: 10.1002/anie.201109115.
77. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskikh K.A., Kramarova T.V., Kramarov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *Biotechniques*. 2014. V. 57(2):81-7. doi: 10.2144/000114198.
78. Imai K., Tatumoto N., Misawa K., Runtuwene L.R., Sakai J., Hayashida K., Eshita Y., Maeda R., Tuda J., Murakami T., Maesaki S., Suzuki Y., Yamagishi J., Maeda T. A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION nanopore sequencer. *BMC Infect. Dis.* 2017. V. 17(1):621. doi: 10.1186/s12879-017-2718-9.
79. Inácio J., Flores O., Spencer-Martins I. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46(2):713-20. doi: 10.1128/JCM.00514-07.
80. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K., Tamura T., Shimizu Y., Fujimoto M., Kojima F., Ichinose M., Murata S. Novel Methodology for Rapid Detection of KRAS Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One*. 2016. V. 11(3):e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654.
81. 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. V. 41(6):2616-22. doi: 10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003.
82. Jaroenram W., Cecere P., Pompa P.P. Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods*. 2019. V. 156:9-14. doi: 10.1016/j.mimet.2018.11.020.
83. Jaroenram W., Kampeera J., Arunrut N., Karuwan C., Sappat A., Khumwan P., Jaitrong S., Boonnak K., Prammananan T., Chairprasert A., Tuantranont A., Kiatpathomchai W. Graphene-based electrochemical genosensor incorporated loop-mediated isothermal amplification for rapid on-site detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. V. 186:113333. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113333.
84. Jaroenram W., Kampeera J., Arunrut N., Sirithammajak S., Jaitrong S., Boonnak K., Khumwan P., Prammananan T., Chairprasert A., Kiatpathomchai W. Ultrasensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a rapid and specific probe-triggered one-step, simultaneous DNA hybridization and isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Sci. Rep.* 2020. V. 10(1):16976. doi: 10.1038/s41598-020-73981-6.
85. Jaroenram W., Kiatpathomchai W., Flegel T.W. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Mol. Cell. Probes*. 2009. V. 23(2):65-70. doi: 10.1016/j.mcp.2008.12.003.
86. Jenkins D.M., Kubota R., Dong J., Li Y., Higashiguchi D. Handheld device for real-time, quantitative, LAMP-based detection of *Salmonella enterica* using assimilating probes. *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 30(1):255-60. doi: 10.1016/j.bios.2011.09.020.
87. Jia B., Li X., Liu W., Lu C., Lu X., Ma L., Li Y.-Y., Wei C. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes. *Front. Microbiol.* 2019. V.10:2860. doi: 10.3389/fmicb.2019.02860.
88. Jiang Y.S., Bhadra S., Li B., Wu Y.R., Milligan J.N., Ellington A.D. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons. *Anal. Chem.* 2015. V. 87(6):3314-20. doi: 10.1021/ac504387c.
89. Jiang Y.S., Stacy A., Whiteley M., Ellington A.D., Bhadra S. Amplicon Competition Enables End-Point Quantitation of Nucleic Acids Following Isothermal Amplification. *Chembiochem*. 2017. V. 18(17):1692-1695. doi: 10.1002/cbic.201700317.
90. Jung J.H., Oh S.J., Kim Y.T., Kim S.Y., Kim W.J., Jung J., Seo T.S. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus. *Anal. Chim. Acta*. 2015. V. 853:541-547. doi: 10.1016/j.aca.2014.10.020.
91. Kalendar R., Tselykh T.V., Khassenov B., Ramanculov E.M. Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis. *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1620:33-64. doi: 10.1007/978-1-4939-7060-5\_2.
92. Kanchanaphum P. Time Course of Detection of Human Male DNA from Stained Blood Sample on Various Surfaces by Loop Mediated Isothermal Amplification and Polymerase Chain Reaction. *Biomed. Res. Int.* 2018. V. 2018:2981862. doi: 10.1155/2018/2981862.
93. Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007. V. 70(3):499-501. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008.
94. Karthik K., Rathore R., Thomas P., Arun T.R., Viswas K.N., Dhama K., Agarwal R.K. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*. 2014. V. 1:137-43. doi: 10.1016/j.mex.2014.08.009.

95. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnosis of a new coronavirus infection using the isothermal loop amplification reaction. *Voprosy virol.* 2021. T. 66(1):17-28. doi: 10.36233/0507-4088-42.
96. Khammanee T., Sawangjaroen N., Buncherd H., Tun A.W., Thanapongpichat S. A LAMP-SNP Assay Detecting C580Y Mutation in Pfkfch13 Gene from Clinically Dried Blood Spot Samples. *Korean J. Parasitol.* 2021. V. 59(1):15-22. doi: 10.3347/kjp.2021.59.1.15.
97. Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A., Ismagilov R.F. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP. *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44(2):e10. doi: 10.1093/nar/gkv877.
98. Kiatpathomchai W., Jaroenram W., Arunrut N., Jitrapakdee S., Flegel T.W. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods.* 2008. V. 153(2):214-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.06.025.
99. Kim H.E., Schuck A., Lee S.H., Lee Y., Kang M., Kim Y.-S. Sensitive electrochemical biosensor combined with isothermal amplification for point-of-care COVID-19 tests. *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 182:113168. doi: 10.1016/j.bios.2021.113168.
100. Kitamura M., Kubo S., Tanaka J., Adachi T. Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay. *Int. J. Legal. Med.* 2018. V. 132(4):975-981. doi: 10.1007/s00414-017-1661-z.
101. Koo B., Jin C.E., Lee T.Y., Lee J.H., Park M.K., Sung H., Park S.Y., Lee H.J., Kim S.M., Kim J.Y., Kim S.H., Shin Y. An isothermal, label-free, and rapid one-step RNA amplification/detection assay for diagnosis of respiratory viral infections. *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 90:187-194. doi: 10.1016/j.bios.2016.11.051.
102. Kouguchi Y., Fujiwara T., Teramoto M., Kuramoto M. 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 toxicogenic *Escherichia coli* isolates. *Mol. Cell. Probes.* 2010. V. 24(4):190-5. doi: 10.1016/j.mcp.2010.03.001.
103. Kreutz J.E., Wang J., Sheen A.M., Thompson A.M., Staheli J.P., Dyen M.R., Feng Q., Chiu D.T. Self-digitization chip for quantitative detection of human papillomavirus gene using digital LAMP. *Lab. Chip.* 2019. V. 19(6):1035-1040. doi: 10.1039/c8lc01223g.
104. Kubota R., Alvarez A., Su W.W., Jenkins D. FRET-Based Assimilating Probe for Sequence-Specific Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Biol. Engin. Trans.* 2011. V. 4:81-100. 10.13031/2013.38509.
105. Kuzuhara Y., Yonekawa T., Iwasaki M., Kadota T., Kanda H., Horigome T., Notomi T. Homogeneous assays for single-nucleotide polymorphism genotyping: Exo-proofreading assay based on loop-mediated isothermal amplification. *Yokohama Med. J.* 2005. V. 56(1). P.9-16.
106. Lam L., Sakakihara S., Ishizuka K., Takeuchi S., Arata H.F., Fujita H., Noji H. Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber. *Biomed. Microdevices.* 2008. V. 10(4):539-46. doi: 10.1007/s10544-008-9163-x.
107. Le Roux C.A., Kubo T., Grobelaar A.A., van Vuren P.J., Weyer J., Nel L.H., Swanepoel R., Morita K., Paweska J.T. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009. V. 47(3):645-51. doi: 10.1128/JCM.01412-08.
108. Lee J.E., Mun H., Kim S.R., Kim M.G., Chang J.Y., Shim W.B. A colorimetric Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 151:111968. doi: 10.1016/j.bios.2019.111968.
109. Lee M.F., Chen Y.H., Peng C.F. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microbiol. Methods.* 2009. V. 76(2):174-80. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.005.
110. Li B., Chen X., Ellington A.D. Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions. *Anal. Chem.* 2012. V. 84(19):8371-7. doi: 10.1021/ac301944v.
111. Li C., Li Z., Jia H., Yan J. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Chem. Commun (Camb).* 2011. V. 47(9):2595-7. doi: 10.1039/c0cc03957h.
112. Li Q., Luan G., Guo Q., Liang J. A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30(2):E5. doi: 10.1093/nar/30.2.e5.
113. Li R., Chen J., Zhang X., Cui J., Tao S., Yang L. Mini-Disk Capillary Array Coupling with LAMP for Visual Detection of Multiple Nucleic Acids using Genetically Modified Organism Analysis as an Example. *J. Agric. Food. Chem.* 2020. V. 68(3):899-906. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06979.
114. Li Y., Zhou X., Ye D. Molecular Beacons: An Optimal Multifunctional Biological Probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 373(4). P.457-461. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.038.

- 115.Liang C., Cheng S., Chu Y., Wu H., Zou B., Huang H., Xi T., Zhou G. A closed-tube detection of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) products using a wax-sealed fluorescent intercalator. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013. V. 13(6):3999-4005. doi: 10.1166/jnn.2013.6497.
- 116.Liang C., Chu Y., Cheng S., Wu H., Kajiyama T., Kambara H., Zhou G. Multiplex loop-mediated isothermal amplification detection by sequence-based barcodes coupled with nicking endonuclease-mediated pyrosequencing. *Anal. Chem.* 2012. V. 84(8):3758-63. doi: 10.1021/ac3003825.
- 117.Lin X., Huang X., Urmann K., Xie X., Hoffmann M.R. Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification on a Commercial Membrane. *ACS Sens.* 2019. V. 4(1):242-249. doi: 10.1021/acssensors.8b01419.
- 118.Liu C., Jiang D.N., Xiang G.M., Luo F.K., Liu L.L., Yu J.C., Pu X.Y. DNA detection of *Clostridium difficile* infection based on real-time resistance measurement. *Genet. Mol. Res.* 2013. V. 12(3):3296-304. doi: 10.4238/2013.
- 119.Liu L.L., Jiang D.N., Xiang G.M., Liu C., Yu J.C., Pu X.Y. Development of a cyclic voltammetry method for the detection of *Clostridium novyi* in black disease. *Genet. Mol. Res.* 2014. V. 13(1):1724-34. doi: 10.4238/2014.
- 120.Liu W., Huang S., Liu N., Dong D., Yang Z., Tang Y., Ma W., He X., Ao D., Xu Y., Zou D., Huang L. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci. Rep.* 2017. V. 7:40125. doi: 10.1038/srep40125.
- 121.Liu X.L., Zhao X.T., Muhammad I., Ge B.B., Hong B. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the simultaneous detection of CVB and CSVd in chrysanthemum. *J. Virol. Methods.* 2014. V. 210:26-31. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.09.008.
- 122.Lu Y., Ma X., Wang J., Sheng N., Dong T., Song Q., Rui J., Zou B., Zhou G. Visualized detection of single-base difference in multiplexed loop-mediated isothermal amplification amplicons by invasive reaction coupled with oligonucleotide probe-modified gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 90:388-393. doi: 10.1016/j.bios.2016.12.015.
- 123.Lucchi N.W., Ljolje D., Silva-Flannery L., Udhayakumar V. Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Plasmodium* spp. Parasites. *PLoS One.* 2016. V. 11(3):e0151437. doi: 10.1371/journal.pone.0151437.
- 124.Luo J., Fang X., Ye D., Li H., Chen H., Zhang S., Kong J. A real-time microfluidic multiplex electrochemical loop-mediated isothermal amplification chip for differentiating bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 60:84-91. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.073.
- 125.Ma C., Wang F., Wang X., Han L., Jing H., Zhang H., Shi C. A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification. *Chem. Comm. (Camb).* 2017. V. 53(77):10696-10699. doi: 10.1039/c7cc06469a.
- 126.Ma Y.D., Luo K., Chang W.H., Lee G.B. A microfluidic chip capable of generating and trapping emulsion droplets for digital loop-mediated isothermal amplification analysis. *Lab. Chip.* 2018. V. 18(2):296-303. doi: 10.1039/c7lc01004d.
- 127.Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *J. Clin. Virol.* 2013. V. 58(1):127-31. doi: 10.1016/j.jcv.2013.06.006.
- 128.Makarova Yu.A., Zotikov A.A., Belyakova G.A., Alekseev B.Ya., Shkurnikov M.Yu. Isothermal loop amplification: an effective method of express diagnostics in oncology. *Oncology.* 2018. V. 14(2):88-99. doi: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99.
- 129.Manajit O., Longyant S., Sithigorngul P., Chaivisuthangkura P. Development of uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification coupled with nanogold probe (UDG-LAMP-AuNP) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Med. Rep.* 2018. V. 17(4):5734-5743. doi: 10.3892/mmr.2018.8557.
- 130.Martineau R.L., Murray S.A., Ci S., Gao W., Chao S.H., Meldrum D.R. Improved Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays via Swarm Priming. *Anal. Chem.* 2017. V. 89(1):625-632. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02578.
- 131.Masaomi I., Toshihiro Y., Kimihiko O., Wataru S., Kentaro N., Tetsu H., Ke-Ita T., Tsuneyoshi H., Tsugunori N., Hidetoshi K. Validation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping with Whole Blood. *Genome Lett.* 2003. V. 2(3):119-126(8). doi: 10.1166/gl.2003.028
- 132.Meagher R.J., Priye A., Light Y.K., Huang C., Wang E. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. *Analyst.* 2018. V. 143(8):1924-1933. doi: 10.1039/c7an01897e.
- 133.Minero G.A.S., Nogueira C., Rizzi G., Tian B., Fock J., Donolato M., Strömberg M., Hansen M.F. Sequence-specific validation of LAMP amplicons in real-time optomagnetic detection of Dengue serotype 2 synthetic DNA. *Analyst.* 2017. V. 142(18):3441-3450. doi: 10.1039/c7an01023k.
- 134.Mitani Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T., Oguchi-Katayama A., Kogo Y., Itoh M., Miyagi T., Takakura H., Hoshi K., Kato C., Arakawa T., Shibata K., Fukui K., Masui R., Kuramitsu S., Kiyotani K., Chalk A., Tsunekawa K., Murakami M., Kamataki T., Oka T.,

- Shimada H., Cizdziel P.E., Hayashizaki Y. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat. Methods*. 2007. V. 4(3):257-262. doi: 10.1038/nmeth1007.
135. Miyamoto S., Sano S., Takahashi K., Jikihara T. Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes. *Anal. Biochem.* 2015. V. 473:28-33. doi: 10.1016/j.ab.2014.12.016.
136. Mori Y., Hirano T., Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol.* 2006. V.6:3. doi: 10.1186/1472-6750-6-3.
137. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004. V. 59(2):145-57. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005.
138. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 289(1):150-4. doi: 10.1006/bbrc.2001.5921.
139. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J. Infect. Chemother.* 2020. V. 26(1):13-17. doi: 10.1016/j.jiac.2019.07.020.
140. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 2009. V. 15(2):62-9. doi: 10.1007/s10156-009-0669-9.
141. Mugasa C.M., Katiti D., Boobo A., Lubega G.W., Schallig H.D., Matovu E. Comparison of nucleic acid sequence-based amplification and loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human African trypanosomiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. V. 78(2):144-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.025.
142. Muñoz H.E., Riche C.T., Kong J.E., van Zee M., Garner O.B., Ozcan A., Di Carlo D. Fractal LAMP: Label-Free Analysis of Fractal Precipitate for Digital Loop-Mediated Isothermal Nucleic Acid Amplification. *ACS Sens.* 2020. V. 5(2):385-394. doi: 10.1021/acssensors.9b01974.
143. Na W., Nam D., Lee H., Shin S. Rapid molecular diagnosis of infectious viruses in microfluidics using DNA hydrogel formation. *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 108:9-13. doi: 10.1016/j.bios.2018.02.040.
144. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.* 2002. V. 16(3):223-229. doi: 10.1006/mcpr.2002.0415.
145. Nagatani N., Yamanaka K., Saito M., Koketsu R., Sasaki T., Ikuta K., Miyahara T., Tamiya E. Semi-real time electrochemical monitoring for influenza virus RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification using a USB powered portable potentiostat. *Analyst.* 2011. V. 136(24):5143-50. doi: 10.1039/c1an15638a.
146. Nakamura N., Ito K., Takahashi M., Hashimoto K., Kawamoto M., Yamanaka M., Taniguchi A., Kamatani N., Gemma N. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal. Chem.* 2007. V. 79(24):9484-93. doi: 10.1021/ac0715468.
147. Nanayakkara I.A., White I.M. Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA. *Analyst.* 2019. V. 144(12):3878-3885. doi: 10.1039/c9an00671k.
148. Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikononi P., Schuster D., Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30(9):e37. doi: 10.1093/nar/30.9.e37.
149. Nguyen H.V., Nguyen V.D., Lee E.Y., Seo T.S. Point-of-care genetic analysis for multiplex pathogenic bacteria on a fully integrated centrifugal microdevice with a large-volume sample. *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 136:132-139. doi: 10.1016/j.bios.2019.04.035.
150. Nguyen H.V., Seo T.S. High-throughput human DNA purification on a centrifugal microfluidic device for rapid forensic sex-typing. *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 181:113161. doi: 10.1016/j.bios.2021.113161.
151. Nogami H., Tsutsumi H., Komuro T., Mukoyama R. Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V. 2(4):349-53. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.05.001.
152. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* 2015. V. 53(1):1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
153. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28(12). E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
154. Nyan D.C., Swinson K.L. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses. *Sci. Rep.* 2015. V. 5:17925. doi: 10.1038/srep17925.
155. Nzelu C.O., Gomez E.A., Cáceres A.G., Sakurai T., Martini-Robles L., Uezato H., Mimori T., Katakura K., Hashiguchi Y., Kato H. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for Leishmania infection. *Acta Trop.* 2014. V. 132:1-6. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.12.016.

156. Oh S.J., Park B.H., Jung J.H., Choi G., Lee D.C., Kim D.H., Seo T.S. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 75:293-300. doi: 10.1016/j.bios.2015.08.052.
157. Ostorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques.* 2016. V. 61(1):20-5. doi: 10.2144/000114432.
158. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42(1):257-63. doi: 10.1128/JCM.42.1.257-263.2004.
159. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 2008. V. 18(6):407-21. doi: 10.1002/rmv.593.
160. Park B.H., Oh S.J., Jung J.H., Choi G., Seo J.H., Kim D.H., Lee E.Y., Seo T.S. An integrated rotary microfluidic system with DNA extraction, loop-mediated isothermal amplification, and lateral flow strip based detection for point-of-care pathogen diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 91:334-340. doi: 10.1016/j.bios.2016.11.063.
161. Peng H., Zhu M., Gao Z., Liao C., Jia C., Wang H., Zhou H., Zhao J. A centrifugal microfluidic emulsifier integrated with oil storage structures for robust digital LAMP. *Biomed. Microdevices.* 2020. V. 22(1):18. doi: 10.1007/s10544-020-0475-9.
162. Petersen M., Ma L., Lu X. Rapid determination of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* in food products by loop-mediated isothermal amplification coupling propidium monoazide treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 2021. V. 351:109263. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109263.
163. Peyrefitte C.N., Boubis L., Coudrier D., Bouloy M., Grandadam M., Tolou H.J., Plumet S. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley Fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46(11):3653-9. doi: 10.1128/JCM.01188-08.
164. Phillips E.A., Moehling T.J., Bhadra S., Ellington A.D., Linnes J.C. Strand Displacement Probes Combined with Isothermal Nucleic Acid Amplification for Instrument-Free Detection from Complex Samples. *Anal. Chem.* 2018. V. 90(11):6580-6586. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00269.
165. Poole C.B., Li Z., Alhassan A., Guelig D., Diesburg S., Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr., LaBarre P., Wanji S., Burton R.A., Carlow C.K. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). *PLoS One.* 2017. V. 12(2):e0169011. doi: 10.1371/journal.pone.0169011.
166. Prakrankamanant P., Leelayuwat C., Promptmas C., Limpaboon T., Wanram S., Prasongdee P., Pientong C., Daduang J., Jearanaikoon P. The development of DNA-based quartz crystal microbalance integrated with isothermal DNA amplification system for human papillomavirus type 58 detection. *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 40(1):252-7. doi: 10.1016/j.bios.2012.07.033.
167. Quyen T.L., Ngo T.A., Bang D.D., Madsen M., Wolff A. Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting. *Front. Microbiol.* 2019. V. 10:2234. doi: 10.3389/fmicb.2019.02234.
168. Rane T.D., Chen L., Zec H.C., Wang T.H. Microfluidic continuous flow digital loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Lab. Chip.* 2015. V. 15(3):776-82. doi: 10.1039/c4lc01158a.
169. Rolando J.C., Jue E., Barlow J.T., Ismagilov R.F. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48(7): e42. doi: 10.1093/nar/gkaa099.
170. Roskos K., Hickerson A.I., Lu H.W., Ferguson T.M., Shinde D.N., Klaue Y., Niemz A. Simple system for isothermal DNA amplification coupled to lateral flow detection. *PLoS One.* 2013. V. 8(7):e69355. doi: 10.1371/journal.pone.0069355.
171. Roy S., Mohd-Naim N.F., Safavieh M., Ahmed M.U. Colorimetric Nucleic Acid Detection on Paper Microchip Using Loop Mediated Isothermal Amplification and Crystal Violet Dye. *ACS Sens.* 2017. V. 2(11):1713-1720. doi: 10.1021/acssensors.7b00671.
172. Roy S., Wei S.X., Ying J.L.Z., Safavieh M., Ahmed M.U. A novel, sensitive and label-free loop-mediated isothermal amplification detection method for nucleic acids using luminophore dyes. *Biosens Bioelectron.* 2016. V. 86:346-352. doi: 10.1016/j.bios.2016.06.065.
173. Rubinien J., Atabay K.D., Nichols N.M., Tanner N.A., Pezza J.A., Gray M.M., Wagner BM, Poppin J.N., Aken J.T., Gleason E.J., Foley K.D., Copeland D.S., Kraves S., Alvarez Saavedra E. Nucleic acid detection aboard the International Space Station by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *FASEB Bioadv.* 2020. V. 2(3):160-165. doi: 10.1096/fba.2019-00088.
174. Safavieh M., Ahmed M.U., Ng A., Zourob M. High-throughput real-time electrochemical monitoring of LAMP for pathogenic bacteria detection. *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 58:101-6. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.002.



175. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. Inhibition of nonspecific polymerase activity using Poly(Aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte. *Anal. Biochem.* 2021. V. 628:114267. doi: 10.1016/j.ab.2021.114267.
176. Salinas N.R., Little D.P. Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal AMPLification. *ISRN Bioinform.* 2012. V. 2012:696758. doi: 10.5402/2012/696758.
177. Santiago-Felipe S., Tortajada-Genaro L.A., Carrascosa J., Puchades R., Maquieira Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 79:300-6. doi: 10.1016/j.bios.2015.12.045.
178. Sappat A., Jaroenram W., Puthawibool T., Lomas T., Tuantranont A., Kiatpathomchai W. Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter. *J. Virol. Methods.* 2011. V. 175(2):141-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.05.013.
179. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis. *Electrophoresis.* 2019. V. 40(20):2706-2717. doi: 10.1002/elps.201900167.
180. Scott A., Jackson K., Carter M., Comeau R., Layne T., Landers J. Rapid sperm lysis and novel screening approach for human male DNA via colorimetric loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2019. V. 43:102139. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.102139.
181. Seetang-Nun Y., Jaroenram W., Sriurairatana S., Suebsing R., Kiatpathomchai W. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Mol. Cell. Probes.* 2013. V. 27(2):71-9. doi: 10.1016/j.mcp.2012.11.005.
182. Seyrig G., Stedtfeld R.D., Tourlousse D.M., Ahmad F., Towery K., Cupples A.M., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J. Microbiol. Methods.* 2015. V. 119:223-7. doi: 10.1016/j.mimet.2015.11.004.
183. Shao Y., Zhu S., Jin C., Chen F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 148(2):75-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.004.
184. Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* 2019. V. 63(10):407-412. doi: 10.1111/1348-0421.12734.
185. Subramanian S., Gomez R.D. An empirical approach for quantifying loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using *Escherichia coli* as a model system. *PLoS One.* 2014. V. 9(6):e100596. doi: 10.1371/journal.pone.0100596.
186. Sun B., Shen F., McCalla S.E., Kreutz J.E., Karymov M.A., Ismagilov R.F. Mechanistic evaluation of the pros and cons of digital RT-LAMP for HIV-1 viral load quantification on a microfluidic device and improved efficiency via a two-step digital protocol. *Anal. Chem.* 2013. V. 85(3):1540-6. doi: 10.1021/ac3037206.
187. Sun Y., Tian H., Liu C., Sun Y., Li Z. One-step detection of microRNA with high sensitivity and specificity via target-triggered loop-mediated isothermal amplification (TT-LAMP). *Chem. Commun. (Camb).* 2017. V. 53(80):11040-11043. doi: 10.1039/c7cc06140d.
188. Takayama I., Nakauchi M., Takahashi H., Oba K., Semba S., Kaida A., Kubo H., Saito S., Nagata S., Odagiri T., Kageyama T. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods.* 2019. V. 267:53-58. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.02.010.
189. Tani H., Teramura T., Adachi K., Tsuneda S., Kurata S., Nakamura K., Kanagawa T., Noda N. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* 2007. V. 79(15):5608-13. DOI: 10.1021/ac070041e.
190. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques.* 2012. V. 53(2):81-9. doi: 10.2144/0000113902.
191. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques.* 2015. V. 58(2):59-68. doi: 10.2144/000114253.
192. Techathuvanan C., D'Souza D.H. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays. *J. Food Sci.* 2020. V. 85(10):3509-3516. doi: 10.1111/1750-3841.15459.
193. Teixeira A., Paris J.L., Roumani F., Diéguez L., Prado M., Espiña B., Abalde-Cela S., Garrido-Maestu A., Rodriguez-Lorenzo L. Multifunctional Gold Nanoparticles for the SERS Detection of Pathogens Combined with a LAMP-in-Microdroplets Approach. *Materials (Basel).* 2020. V. 13(8):1934. doi: 10.3390/ma13081934.
194. Telli A.E., Doğruer Y. Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using Propidium Monoazide - Quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. *Microb. Pathog.* 2019. V. 132:109-116. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.029.
195. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008. V. 3(5):877-82. doi: 10.1038/nprot.2008.57.

196. Tone K., Fujisaki R., Yamazaki T., Makimura K. Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values. *J. Microbiol. Methods*. 2017. V. 132:41-45. doi: 10.1016/j.mimet.2016.10.020.
197. Torres C., Vitalis E.A., Baker B.R., Gardner S.N., Torres M.W., Dzenitis J.M. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinformatics*. 2011. V. 12:240. doi: 10.1186/1471-2105-12-240.
198. Trieu P.T., Lee N.Y. Paper-Based All-in-One Origami Microdevice for Nucleic Acid Amplification Testing for Rapid Colorimetric Identification of Live Cells for Point-of-Care Testing. *Anal. Chem*. 2019. V. 91(17):11013-11022. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01263.
199. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol*. 1996. V. 14(3):303-8. doi: 10.1038/nbt0396-303.
200. Varona M., Anderson J.L. Visual Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms Using Molecular Beacon Loop-Mediated Isothermal Amplification with Centrifuge-Free DNA Extraction. *Anal. Chem*. 2019. V. 91(11):6991-6995. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01762.
201. Varona M., Eitzmann D.R., Pagariya D., Anand R.K., Anderson J.L. Solid-Phase Microextraction Enables Isolation of BRAF V600E Circulating Tumor DNA from Human Plasma for Detection with a Molecular Beacon Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Anal. Chem*. 2020. V. 92(4):3346-3353. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05323.
202. Veigas B., Branquinho R., Pinto J.V., Wojcik P.J., Martins R., Fortunato E., Baptista P.V. Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitorization of isothermal DNA amplification. *Biosens. Bioelectron*. 2014. V. 52:50-5. doi: 10.1016/j.bios.2013.08.029.
203. Waiwijit U., Phokaratkul D., Kampeera J., Lomas T., Wisitsoraat A., Kiatpathomchai W., Tuantranont A. Graphene oxide based fluorescence resonance energy transfer and loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus detection. *J. Biotechnol*. 2015. V. 212:44-9. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.003.
204. Wan L., Chen T., Gao J., Dong C., Wong A.H., Jia Y., Mak P.I., Deng C.X., Martins R.P. A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection. *Sci. Rep*. 2017. V. 7(1):14586. doi: 10.1038/s41598-017-14698-x.
205. Wan L., Gao J., Chen T., Dong C., Li H., Wen Y.Z., Lun Z.R., Jia Y., Mak P.I., Martins R.P. LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biomed. Microdevices*. 2019. V. 21(1):9. doi: 10.1007/s10544-018-0354-9.
206. Wang C.H., Lien K.Y., Wang T.Y., Chen T.Y., Lee G.B. An integrated microfluidic loop-mediated-isothermal-amplification system for rapid sample pretreatment and detection of viruses. *Biosens. Bioelectron*. 2011. V. 26(5):2045-52. doi: 10.1016/j.bios.2010.08.083.
207. Wang D.G., Brewster J.D., Paul M., Tomasula P.M. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*. 2015. V. 20(4):6048-59. doi: 10.3390/molecules20046048.
208. Wang S., Liu N., Zheng L., Cai G., Lin J. A lab-on-chip device for the sample-in-result-out detection of viable Salmonella using loop-mediated isothermal amplification and real-time turbidity monitoring. *Lab. Chip*. 2020. V. 20(13):2296-2305. doi: 10.1039/d0lc00290a.
209. Wang Y., Wang Y., Lan R., Xu H., Ma A., Li D., Dai H., Yuan X., Xu J., Ye C. Multiple Endonuclease Restriction Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification: A Novel Analytically Rapid, Sensitive, Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection Technique. *J. Mol. Diagn*. 2015. V. 17(4):392-401. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.03.002.
210. Wang D. Effect of internal primer-template mismatches on loop-mediated isothermal amplification. *Biotechnol. Biotechnol. Equipment*. 2016. V. 2:314-318, doi: 10.1080/13102818.2015.1125765
211. Wong J.K., Yip S.P., Lee T.M. Ultrasensitive and closed-tube colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay using carboxyl-modified gold nanoparticles. *Small*. 2014. V. 10(8):1495-9. doi: 10.1002/sml.201302348.
212. Wu Q., Jin W., Zhou C., Han S., Yang W., Zhu Q., Jin Q., Mu Y. Integrated glass microdevice for nucleic acid purification, loop-mediated isothermal amplification, and online detection. *Anal. Chem*. 2011. V. 83(9):3336-42. doi: 10.1021/ac103129e.
213. Xie S., Chai Y., Yuan Y., Bai L., Yuan R. Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification. *Biosens. Bioelectron*. 2014. V. 55:324-9. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.009.
214. Xu G., Gunson R.N., Cooper J.M., Reboud J. Rapid ultrasonic isothermal amplification of DNA with multiplexed melting analysis – applications in the clinical diagnosis of sexually transmitted diseases. *Chem. Commun. (Camb)*. 2015. V. 51(13):2589-92. doi: 10.1039/c4cc08389j.
215. Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Pastor N., Maquieira Á. Polymorphism genotyping based on loop-mediated isothermal amplification and smartphone detection. *Biosens. Bioelectron*. 2018. V. 109:177-183. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.008.
216. Yang A.K., Lu H., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Yu S., Cheung A.K., Kong S.K. Detection of Pantone-Valentine Leukocidin DNA from methicillin-resistant Staphylococcus aureus by resistive pulse sensing and

- loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 782:46-53. doi: 10.1016/j.aca.2013.04.004.
217. Yang K.L.A., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Kong S.K. Using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) and Spectral Surface Plasmon Resonance (SPR) to Detect Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA). *Proc. Int. Conf. Biomed. Engin. Biotechnol. iCBEB.* 2012. 647-650. doi: 10.1109/iCBEB.2012.462.
218. Yaren O., Bradley K.M., Moussatche P., Hoshika S., Yang Z., Zhu S., Karst S.M., Benner S.A. A norovirus detection architecture based on isothermal amplification and expanded genetic systems. *J. Virol. Methods.* 2016. V. 237:64-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.08.012.
219. Yaren O., Glushakova L.G., Bradley K.M., Hoshika S., Benner S.A. Standard and AEGIS nicking molecular beacons detect amplicons from the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol. Methods.* 2016. V. 236:54-61. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.07.008.
220. Yi C., Luo Z., Lu Y., Belwal T., Pan X., Lin X. Nanoporous hydrogel for direct digital nucleic acid amplification in untreated complex matrices for single bacteria counting. *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 184:113199. doi: 10.1016/j.bios.2021.113199.
221. Yi J., Zhang W., Zhang D.Y. Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34(11):e81. doi: 10.1093/nar/gkl261.
222. Zhang D., Gao B., Zhao C., Liu H. Visualized Quantitation of Trace Nucleic Acids Based on the Coffee-Ring Effect on Colloid-Crystal Substrates. *Langmuir.* 2019. V. 35(1):248-253. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b03609.
223. Zhang H., Xu Y., Fohlerova Z., Chang H., Iliescu C., Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends Analyt. Chem.* 2019. V. 113:44-53. doi: 10.1016/j.trac.2019.01.015.
224. Zhang X., Lowe S.B., Gooding J.J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 61:491-9. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.039.
225. Zhang Z., Zhao S., Hu F., Yang G., Li J., Tian H., Peng N. An LED-Driven AuNPs-PDMS Microfluidic Chip and Integrated Device for the Detection of Digital Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. *Micromachines (Basel).* 2020. V. 11(2):177. doi: 10.3390/mi11020177.
226. Zhang Z.P., Zhang Y., Liu J.P., Zhang J.T., An Z.X., Quan F.S., Zhang L., Cai X., Pu S.W. Codeposition of dNTPs detection for rapid LAMP-based sexing of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44(1):116-21. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01006.x.
227. Zhao B., Yang D., Zhang Y., Xu Y., Zhao X., Liang J., Fan X., Du Y., Zhu Z., Shi B., Zhang Q., Zhang X. Rapid visual detection of lily mottle virus using a loop-mediated isothermal amplification method. *Arch. Virol.* 2018. V. 163(2):545-548. doi: 10.1007/s00705-017-3618-4.
228. Zhi X., Deng M., Yang H., Gao G., Wang K., Fu H., Zhang Y., Chen D., Cui D. A novel HBV genotypes detecting system combined with microfluidic chip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors. *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 54:372-7. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.025.
229. Zhu L., Xu Y., Cheng N., Xie P., Shao X., Huang K., Luo Y., Xu W. A facile cascade signal amplification strategy using DNzyme loop-mediated isothermal amplification for the ultrasensitive colorimetric detection of Salmonella. *Sens. Act. B: Chem.* 2017. V. 242:880-888.
230. Zhu Q., Gao Y., Yu B., Ren H., Qiu L., Han S., Jin W., Jin Q., Mu Y. Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care. *Lab. Chip.* 2012. V. 12(22):4755-63. doi: 10.1039/c2lc40774d.
231. Zhu Z., Tang Y., Jiang Y.S., Bhadra S., Du Y., Ellington A.D., Li B. Strand-Exchange Nucleic Acid Circuitry with Enhanced Thermo- and Structure- Buffering Abilities Turns Gene Diagnostics Ultra-Reliable and Environmental Compatible. *Sci. Rep.* 2016. V. 6:36605. doi: 10.1038/srep36605.
232. Zoheir K.M., Allam A.A. A rapid method for sexing the bovine embryo. *Anim. Reprod. Sci.* 2010. V. 119(1-2):92-6. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.12.013.
233. Zyrina N.V., V.N. Antipova, Nonspecific synthesis of nucleic acids in isothermal amplification reactions. *Biochemistry.* 2021. V. 86(7):1066-1077. doi: 10.31857/S0320972521070101.