

# LAMP

## – szybka i specyficzna detekcja patogenów

**STRESZCZENIE** | W obecnych czasach istnieje potrzeba opracowywania szybkich, tanich i skutecznych metod diagnostycznych w celu wykrywania patogenów bakteryjnych, mogących stanowić mikrobiologiczne zanieczyszczenie np. produktów żywnościowych. Technika LAMP (ang. *Loop-mediated Isothermal Amplification*) stwarza taką możliwość także poprzez specyficzną detekcję bakterii z rodzaju *Salmonella* w materiale pochodzenia organicznego.

**SŁOWA KLUCZOWE** | *Loop-mediated Isothermal AMPlification* (LAMP), szybka metoda, wykrywanie *Salmonella*

**SUMMARY** | Currently, there is a need for rapid, low-cost and effective diagnostic methods for the detection of bacterial pathogens, which may present a microbiological contamination of food products. LAMP technique (Loop-mediated Isothermal Amplification) creates such possibility also by specific detection of *Salmonella* spp. in the material of organic origin.

**KEYWORDS** | Loop-mediated Isothermal AMPlification (LAMP), rapid method, *Salmonella* detection

dr Bożena Futoma-Kołoch<sup>1</sup>,  
dr Iwona Migdał<sup>2</sup>,  
Adam Burzyński<sup>3</sup>,  
mgr inż. Marta Jankowska<sup>4</sup>,  
dr Grzegorz Woźniakowski<sup>5</sup>,

<sup>1</sup> ZAKŁAD MIKROBIOLOGII, INSTYTUT GENETYKI I MIKROBIOLOGII, UNIWERSYTET WROCŁAWSKI

<sup>2</sup> ZAKŁAD GENETYKI I FIZJOLOGII KOMÓRKI, UNIWERSYTET WROCŁAWSKI

<sup>3</sup> NOVAZYM, POLSKA S.C., POZNAŃSKI PARK NAUKOWO-TECHNOLOGICZNY

<sup>4</sup> KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI, UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU

<sup>5</sup> PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY, PUŁAWY

Celem w nowoczesnej diagnostyce laboratoryjnej jest zarówno obniżenie kosztów prowadzenia prac laboratoryjnych, jak i zastosowanie skutecznych technik molekularnych, dzięki którym uzyskuje się pewny wynik w krótkim czasie. W przypadku badań w kierunku *Salmonella spp.* czas oczekiwania na wynik z laboratorium jest jednocześnie czasem, w którym produkty nie mogą wejść do wolnego obrotu, co jest bardzo niekorzystne z punktu widzenia producentów. Tradycyjne metody hodowlane stosowane w identyfikacji *Salmonella* pozwalają na uzyskanie wyniku po około pięciu dniach od momentu pobrania próbki. Obecnie dąży się do udoskonalenia procedur laboratoryjnych pozwalających na redukcję czasu analizy patogenów z kilku dni do kilku godzin. Metodą analizy genetycznej, tzw. *rapid methods*, o wysokim potencjale aplikacyjnym jest LAMP – *Loop-mediated Isothermal AMPLification* (1, 2). Niniejsza praca ma na celu charakterystykę metody LAMP, ze wskazaniem na poszczególne etapy pracy laboratoryjnej. Opisy



Genie® II i Genie III® – urządzenia do prowadzenia reakcji LAMP i detekcji produktu w czasie rzeczywistym

wzbogacone są o wiele uwag praktycznych i głównie dotyczą wykorzystania w diagnostyce mikrobiologicznej testu Ampli-LAMP *Salmonella spp.*

### ❖ METODA AMPLIFIKACJI KWAŚÓW NUKLEINOWYCH – LAMP

LAMP jest metodą amplifikacji kwasów nukleinowych, która pozwala na szybką identyfikację patogenów bakteryjnych, wirusowych i grzybowych w warunkach izotermicznych – stałotemperaturowych.

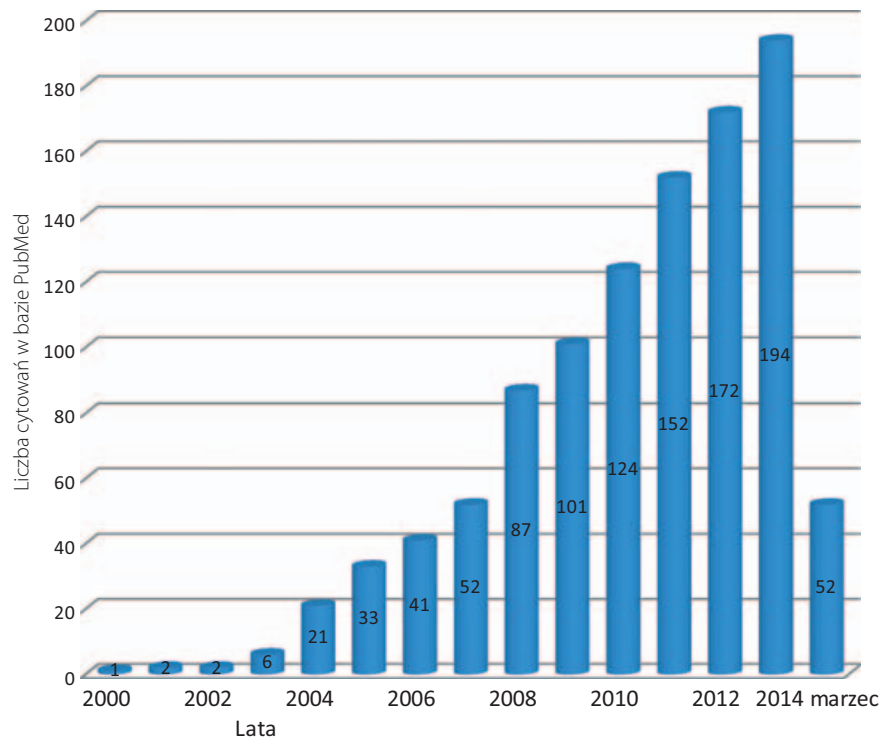
Technika została opracowana przez japońską firmę EIKEN CHEMICAL co., Ltd. w 1998 r., natomiast pierwszy komercyjny zestaw odczynników pojawił się na rynku światowym w 2002 r. Wzrost zainteresowania techniką LAMP w Europie obserwuje się od czasu pojawienia się na rynku nowej polimerazy DNA o nazwie handlowej GspSSD® (OptiGene Limited), która pozwala na szybszą oraz wydajniejszą amplifikację kwasów nukleinowych w stosunku do Bst I Polimerazy DNA, enzymu rutynowo sto- ▶



▷ sowanego do LAMP. Wzrastająca liczba publikacji naukowych poruszających tę tematykę w chwili obecnej świadczy o popularności metody, która ze względu na swoją wysoką czułość i specyficzność może śmiało konkurować z PCR i qPCR (rys. 1). Polimerazy stosowane w reakcji LAMP posiadają aktywność wymiany nici DNA (ang. *strand displacement activity*), natomiast nie posiadają aktywności egzonukleazowej. Uzyskany produkt charakteryzuje bardzo wysoka specyficzność do matrycy, jednak nie jest widoczny w obrazie rozdzielu elektroforetycznego jako zwarty prążek, ale stanowi mieszaninę produktów o powtarzającej się sekwencji. Z tego względu najlepszym sposobem detekcji produktu LAMP jest zastosowanie dedykowanego sprzętu, takiego jak np. aparaty Genie II i Genie III, które pozwalają na odczyt w czasie rzeczywistym na kanale FAM i dodatkowo pracują na zasilaniu akumulatorowym. Ponadto do detekcji reakcji LAMP można wykorzystać każdy aparat do Real-Time PCR z kanałem odczytu dla barwników FAM/SYBR. W chwili obecnej dostępnych jest siedem polimeraz DNA (GspM, GspM 2.0, GspM 3.0, GspSSD, GspSSD 2.0, GspF, Tin) i dwa gotowe mastermiksi zawierające barwnik fluorescencyjny i polimerazę GspSSD lub GspSSD 2.0. Dwa ostatnie enzymy charakteryzuje bardzo wysoka aktywność wymiany nici, co skutkuje skróceniem czasu reakcji już do kilku minut. Dodatkowo oba posiadają aktywność odwrotnej transkryptazy, która jednak nie jest na tyle wysoka, aby była skuteczna w rutynowej diagnostyce. W reakcji RT-LAMP (ang. *Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification*) jej niewysoką aktywność uzupełnia się odwrotną transkryptazą dedykowaną tego typu reakcji.

Technika LAMP umożliwia identyfikację patogenów w bardzo krótkim czasie, w ciągu kilku, kilkunastu do kilkudziesięciu minut, w zależności od zidentyfikowanego drobnoustroju i typu zastosowanej polimerazy. Dzięki wykorzystaniu LAMP możliwa jest efektywna identyfikacja:

- pierwotniaków, np. *Babesia canis* (test Ampli-LAMP), *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella*, *Toxoplasma gondii* (test Ampli-LAMP), *Plasmodium falciparum*,



Rys. 1. Liczba publikacji naukowych o technice LAMP opublikowanych w latach 2000-2014. Liczbę cytowań w bazie PubMed oszacowano na podstawie słów kluczowych „loop-mediated isothermal amplification”. 2000 rok – pierwsza publikacja o LAMP (Notomi i wsp.: *Nucleic Acid Res.* 28, E63, Japonia)

SKŁADNIK	2 PARY STARTERÓW	3 PARY STARTERÓW
	OBJĘTOŚĆ (μl)	
MasterMix	7,5	7,5
F3 (10 μM)	0,25	0,25
B3 (10 μM)	0,25	0,25
FIB (10 μM)	1,0	1,0
BIP (10 μM)	1,0	1,0
LF (10 μM)	brak	0,5
LB (10 μM)	brak	0,5
DNA (1 ng/μl)	1,0	1,0
miliQ	1,5	0,5
Razem	12,5	12,5

Tab. 1. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia LAMP w dwóch wariantach: z użyciem 2 par starterów oraz 3 par starterów (Ampli-LAMP *Salmonella* species, Novazym, Polska)

- bakterii, m.in. *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp. (test Ampli-LAMP *Salmonella* species), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (test Ampli-LAMP *Lm*),
- wirusów, np. parwowirus gęsi (test Ampli-LAMP GPV), cirkowirus gęsi (test Ampli-LAMP GCV), wirus Mareka (test Ampli-LAMP MDV), wirus opryszczki, wirus Ebola, wirus brodawczaka ludzkiego, wirus retikuloendoteliozy REV (test Ampli-LAMP REV),
- grzybów, m.in. *Candida* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis pneumonia*,
- nicieni, np. *Wuchereria bancrofti* (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

#### !!! ZASADA DZIAŁANIA REAKCJI

Kolejne cykle wydłużania i zastępowania nici prowadzone są przy użyciu odpowiedniej polimerazy i dwóch lub trzech par starterów rozpoznających odpowiednio sześć lub osiem miejsc matrycy. Startery wewnętrzne to FIP (ang. *Forward Inner Primer*) oraz BIP (ang. *Backward Inner Primer*). Ich sekwencje są komplementarne

do dwóch różnych miejsc w sekwencji matrycy (nici sensownej i antysensownej). Startery zewnętrzne to F3 (ang. *Forward*) i B3 (ang. *Backward*), komplementarne są do zewnętrznych końców matrycy. Dodatkowo w celu uzyskania większej ilości produktów oraz wyższej specyficzności reakcji stosuje się parę starterów: LoopF (LF) i LoopB (LB) (tab. 1). Zastosowana polimeraza DNA w reakcji LAMP posiada aktywność wymiany nici DNA oraz nie posiada aktywności egzonukleazowej, co pozwala na ominięcie etapu denaturacji matrycy. Kluczową cechą LAMP jest utworzenie w pierwszym etapie reakcji sztucznej matrycy (ssDNA) o strukturze typu łydga - pętla, przez tzw. *self-priming* końców matrycy. Matryca w następnych etapach jest amplifikowana, co prowadzi do powstania mieszaniny dwuniciowego DNA o strukturze podobnej do kalafiora. Cały proces można podzielić na etapy: tworzenie materiału starterowego LAMP, cykliczna amplifikacja, elongacja i re-cyklizacja. Animacja reakcji LAMP dostępna jest pod adresem internetowym: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html> (3).

Izotermiczna mieszanina do amplifikacji (Master mix) do prowadzenia reakcji LAMP pozwala na fluorescencyjną detekcję produktu, np. na platformie Genie II oraz innych urządzeniach fluorymetrycznych ustawionych na wzbudzenie przy długości fali 488 nm i emisję przy 520 nm. Może być także wykorzystywana na urządzeniach dla reakcji ilościowego PCR (qPCR, Real-time PCR) ustawionych na kanał FAM. Krzywa annealingu (krzywa topnienia) jest generowana w celu potwierdzenia obecności produktu, co eliminuje konieczność rozdzielania elektroforetycznego produktów oraz pozwala na prowadzenie reakcji w systemie zamkniętym, takim jak aparaty do qPCR.

Opisywana metoda może być użyta do identyfikacji szczepów na podstawie polimorfizmu (zmienności) pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Wysoka specyficzność reakcji LAMP, co do sekwencji, powoduje, że tylko docelowa sekwencja zawierająca SNP zostanie zamplifikowana spośród sekwencji homologicznych. Badanie SNP możliwe jest dzięki odpowiedniemu zaprojektowaniu starterów do reakcji. Startery FIP i BIP do reakcji SNP-LAMP projektowane są w taki sposób, aby ich końce 5' różnicowały polimorfizm. Kiedy

matrycą w reakcji jest tzw. allel WT (ang. *Wild Type allele*), wówczas w trakcie reakcji powstaje struktura starterowa i reakcja jest kontynuowana. W przypadku gdy matrycą jest zmutowana sekwencja genu, nie otrzymuje się produktu w reakcji. Animacja reakcji SNP-LAMP znajduje się pod adresem internetowym: [http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps\\_anim.html](http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps_anim.html).

### ! LAMP W IDENTYFIKACJI BAKTERII *SALMONELLA*

Opisywany test zapewnia bardzo szybką oraz wysoce specyficzną identyfikację materiału genetycznego bakterii z rodzaju *Salmonella* (17, 18, 19, 20, 21). W tab. 1 podano ilości reagentów niezbędnych do przygotowania mieszaniny reakcyjnej „na stole” do reakcji LAMP. Czas niezbędny do amplifikacji specyficznego produktu w izotermicznej reakcji LAMP jest 2-3 razy krótszy, kiedy do reakcji zostanie podana trzecia para starterów, tzw. startery zapętłające LF i LB. Wykazano, że w wyniku amplifikacji 1 ng DNA *Salmonella* z dwoma parami starterów identyfikacja następuje w ciągu 25 minut (50 cykli x 30 sek.), natomiast z trzema parami starterów - w ciągu 10 minut (20 cykli x 30 sek.).

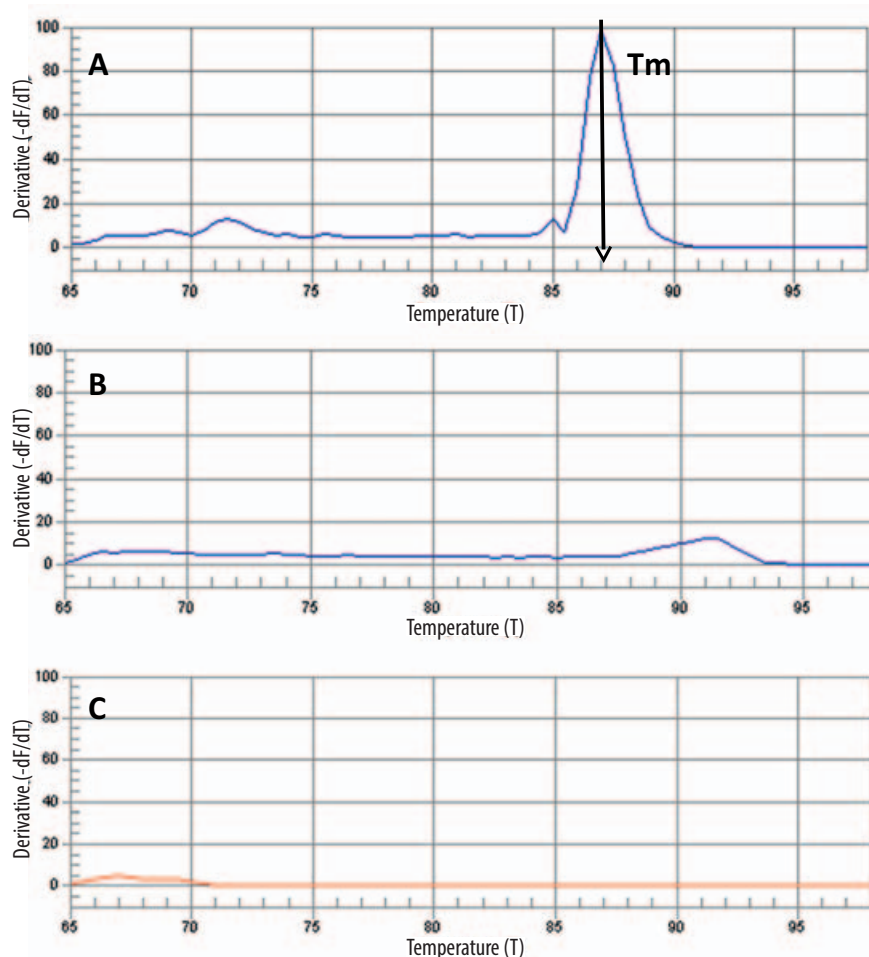
W tab. 2 zawarto informacje o parametrach temperaturowo-czasowych wymaganych do przeprowadzenia reakcji z zastosowaniem PCR lub Real-time PCR. Minimalny czas do zakończenia reakcji LAMP przy użyciu standardowego PCR to 31 minut (plus ewentualnie czas na rozdziel elektroforetyczny), natomiast w przypadku użycia aparatów Genie lub qPCR czas ten ulega znacznemu skróceniu do 5-15 minut, z pełną analizą.

LAMP opracowany dla *Salmonella spp.* opiera się na specyficznej amplifikacji konserwatywnego regionu DNA - genu *invA*, kodującego białko wchodzące w skład III systemu sekrecji, ważnego w procesach wirulencji *Salmonella*, m.in. wnikania do komórek epitelialnych jelita. Wymagany czas do przeprowadzenia reakcji to około 30 minut w przypadku wykorzystania standardowego termocyklera oraz około 5-15 minut w przypadku termocyklera do Real-time PCR. W zależności od urządzenia wykorzystanego do przeprowadzenia testu różny jest sposób analizy wyników testu.

Jeśli posiada się na wyposażeniu laboratorium termocyklerek do PCR lub termoblok, można analizować produkt

▷ reakcji LAMP na podstawie różnicy intensywności fluorescencji w próbce, w świetle ultrafioletowym. Metoda ta wymaga dodania barwnika fluorescencyjnego, takiego jak Sybr Green, po zakończeniu reakcji (fot. 1). Innym sposobem detekcji produktu LAMP jest analiza turbidymetryczna (zmętnienie roztworu na skutek powstawania pirofosforanu magnezu), jednak wymaga to zastosowania mastermiksi, który nie zawiera enzymu pirofosfatazy. Produkty LAMP można analizować po rozdzielach elektroforetycznych na żelu agarozowym (fot. 2), jednak ze względu na spore ryzyko kontaminacji laboratorium produktem LAMP nie poleca się tego sposobu pracy w jakimkolwiek układzie otwartym. Z tego też względu do analizy produktów LAMP dosyć często używa się barwnika fluorescencyjnego – kalceiny, którą dodaje się do przygotowanej wcześniej mieszaniny przed reakcją. Kalceina nie wpływa negatywnie na przebieg reakcji, a jej intensywna fluorescencja pozwala na rozróżnienie prób negatywnych od pozytywnych po jej zakończeniu.

Jeżeli to możliwe, zaleca się prowadzenie reakcji LAMP na termocyklerach do Real-time PCR lub amplifikatorach typu Genie. W ten sposób można dokonać analizy przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym na podstawie pomiaru fluorescencji (odczyt przez kanał FAM) i analizować profil topnienia produktu po reakcji (rys. 2). Krzywą topnienia (ang. *melting curve*) uzyskuje się poprzez powolne (0,1-0,2°C co 5 sek.) ogrzewanie mieszaniny poreakcyjnej od minimalnej temperatury przyłączenia starterów do temperatury denaturacji (95°C). Obecność pojedynczego pik na wykresie świadczy o istnieniu jednego produktu reakcji, czyli w tym przypadku



Rys. 2. Krzywa topnienia produktu amplifikacji (0,5°C co 5 sek.) jest dodatkową analizą produktów otrzymanych w PCR. Potwierdzenie, że amplikon ma charakterystyczną wartość temperatury topnienia ( $T_m$ ). A. *Salmonella* Mokola, B. *Citrobacter* sp., C. Kontrola negatywna bez matrycy DNA

pik uzyskany przy wartości temperatury 87-88°C potwierdza obecność bakterii *Salmonella* w analizowanych próbkach. W amplifikatorach typu Genie ze względu na oszczędność energetyczną procesu zamiast analizy profilu topnienia stosuje się analizę procesu asocjacji po wcześniejszym zdenaturowaniu produktu w temperaturze 95°C. Pozwala to osiągnąć zawrotną zdolność pracy urządzenia – do 20 godzin na jednokrotnym ładowaniu akumulatora.

### Obligatoryjne kontrole testu Ampli-LAMP *Salmonella* species

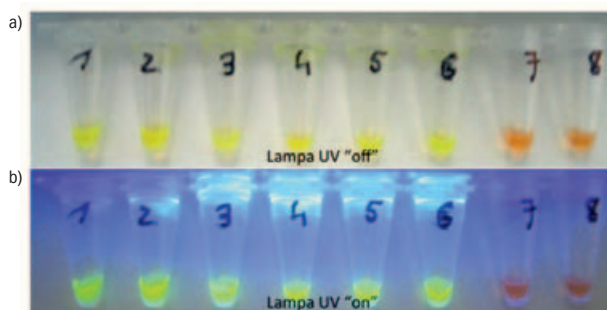
W celu prawidłowej interpretacji wyników testu należy, obok próbek badanych, zastosować minimum trzy kontrole reakcji:

- kontrolę pozytywną reakcji, która pozwala ocenić poprawność przebiegu amplifikacji docelowego produktu – matrycę stanowi próbka zawierająca amplifikowaną sekwencję DNA,
- kontrolę negatywną reakcji, która daje możliwość oceny poprawności prze-

STANDARDOWY PCR			
ETAP	TEMPERATURA	CZAS	LICZBA CYKLI
Amplifikacja	66°C	30 min	1
Chłodzenie	4°C	1 min	
REAL-TIME PCR			
Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Amplifikacja	66°C	30 s	70
Topnienie produktu	66°C-98°C	0,5°C/5 s	Pomiar fluorescencyjny ilości produktu amplifikacji po każdym cyklu reakcji, w czasie rzeczywistym
Chłodzenie	40°C	30 s	Pomiar fluorescencji po każdorazowej zmianie temperatury o 0,5°C

Tab. 2. Warunki do przeprowadzenia reakcji testu LAMP z zastosowaniem PCR lub Real-time PCR





Fot. 1. Wyniki uzyskane metodą LAMP. Metoda jakościowa. A. obserwacja prowadzona w świetle widzialnym – zmiana koloru probówek zawierających DNA *Salmonella* spp. z pomarańczowego na zielony. B. obserwacja prowadzona w świetle ultrafioletowym – zielona fluorescencja w probówkach zawierających DNA *Salmonella* spp. Wynik pozytywny: 1 – *S. Enteritidis*, 2 – *S. Typhimurium*, 3 – *S. diarizonae*, 4 – *S. arizonae*, 5 – *S. salamae*, 6 – *S. indica*. Kontrole negatywne: 7 – *Citrobacter freundii*, 8 – *Escherichia coli*

biegu amplifikacji – matrycę stanowi izolat DNA ze zdrowej tkanki zwierzęcej lub produktu pochodzenia roślinnego,

- kontrolę negatywną reakcji bez matrycy DNA, która pozwala ocenić czystość odczynników używanych do reakcji amplifikacji LAMP – matryca zastąpiona wodą miliQ.

### Fakultatywne kontrole testu

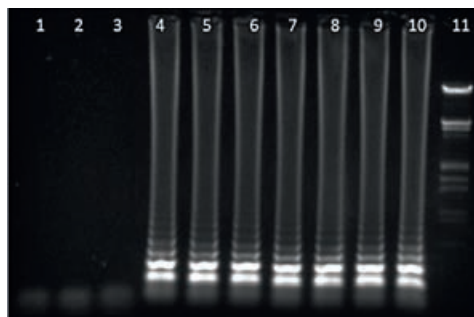
#### Ampli-LAMP *Salmonella* species

Okresowo zaleca się przeprowadzać:

- kontrolę negatywną izolacji DNA – pozwala ona ocenić czystość odczynników do izolacji. Należy wykonać jedną taką kontrolę w każdej serii izolacji lub okresowo w krótkich odstępach czasu, izolując z wody (zamiast z zainfekowanej tkanki),
- kontrolę pozytywną izolacji – pozwala ona potwierdzić skuteczność procesu izolacji. Należy stosować ją okresowo, np. dla nowej partii odczynników do izolacji DNA (do izolacji należy podać tkankę naturalnie lub sztucznie zainfekowaną bakterią).

### PODSUMOWANIE

LAMP jest innowacyjną i rozwijającą się techniką amplifikacji kwasów nukleinowych. Doskonale nadaje się w sytuacjach, gdy mamy do czynienia z ograniczonymi zasobami sprzętowymi, a prowadzone analizy wymagają uzyskania wyników w krótkim czasie. Do zalet testu LAMP można bez wątplenia zaliczyć: krótki czas reakcji, specyficzność, a także możliwość prowadzenia reakcji w stałej temperaturze, a produkt reakcji można zaobserwować nawet „gołym okiem”. Problematyczne w tej technice może być projektowanie starterów do reakcji w porównaniu do metody PCR. Warto podkreślić, że technika LAMP ma zastosowanie w detekcji patogenów, których sekwencje DNA lub RNA są znane. Reakcję LAMP charakteryzuje także bardzo wysoka wydajność – powstaje nawet do 30 µg DNA, zawierającego bardzo dużą liczbę kopii amplikonu, dlatego zaleca się, aby nie otwierać probówek z produktami amplifikacji w tym samym pomieszczeniu, gdzie jest wykonywany proces izolacji DNA z materiału przeznaczonego do badań i w pomieszczeniach przeznaczonych do analityki i dokonywać obserwacji fluorescencji produktów amplifikacji w probówce w świetle UV oraz stosować aparat do Real-time PCR. Ponadto reakcja LAMP jest mniej wrażliwa na obecność inhibitorów niż PCR i nie zawsze wymaga izolacji DNA, a amplifikacja RNA jest możliwa bez dodawania odwrotnej



Fot. 2. Wynik jakościowy amplifikacji sekwencji genu *invA* w izotermicznej reakcji LAMP, z wykorzystaniem trzech par starterów (Ampli-LAMP *Salmonella* spp., Novazym). Warunki amplifikacji: 66°C, 35 min; 4°C, 5 min. Produkty reakcji w objętości 12,5 µl rozdzielono w 2-proc. żelu agarozowym i wybarwiono bromkiem etydyny. Wizualizacja w świetle UV. Produkt reakcji ma postać tzw. drabinki (ang. ladder-pattern structure), ponieważ w wyniku reakcji LAMP powstają różnej długości konkatamery złożone z powtórzeń sekwencji matrycowej. 1 – *Escherichia coli*, 2 – *Klebsiella pneumoniae*, 3 – reakcja kontrolna bez matrycy DNA, 4 – *Salmonella* Zanzibar, 5 – *S. Saintpaul*, 6 – *S. Istanbul*, 7 – *S. Hadar*, 8 – *S. California*, 9 – *S. Branderup*, 10 – *S. Thompson*, 11 – marker masy DNA, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker

transkryptazy. Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że najnowszą tendencją w stosowaniu LAMP jest stworzenie mobilnej platformy, którą będzie można zastosować „w terenie”, bez konieczności transportowania próbek do laboratorium.

Przedstawiony artykuł powstał na bazie własnych doświadczeń autorów i przede wszystkim wskazuje na zastosowanie nowoczesnych technik molekularnych w diagnostyce laboratoryjnej.

**Piśmiennictwo dostępne w redakcji**



reklama