



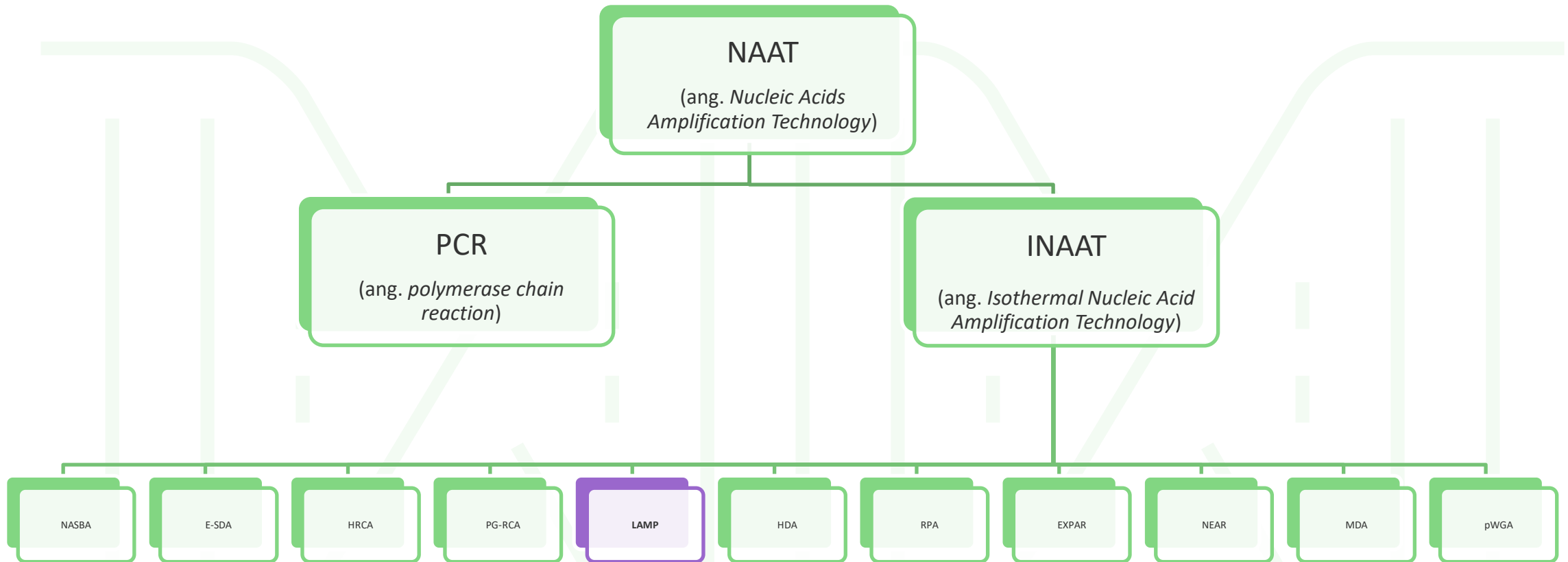
GENOMTEC



Właściwa diagnoza,
we właściwym czasie,
i właściwej cenie.

dr n. med. Małgorzata Małodobra-Mazur
Dyrektor ds. badawczo-rozwojowych

Miron Tokarski
Prezes Zarządu, Dyrektor Naukowy



Techniki izotermalnej amplifikacji kwasów nukleinowych

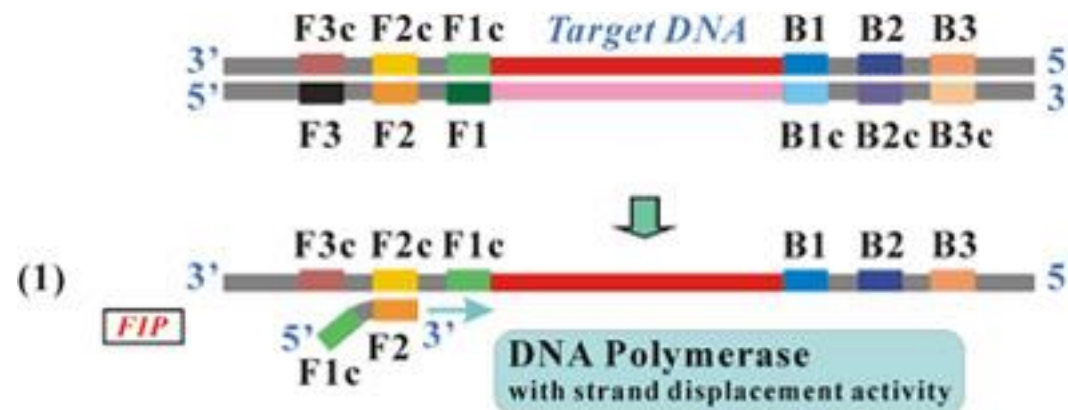
Metoda	Wymagane enzymy	Startery	Temperatura reakcji [°C]	Czas reakcji [godz.]	Cel	Amplikon	Wydajność
NASBA	2 lub 3: odwrotna transkryptaza oraz RNA polimeraza RNA (RNase H)	2	ok. 41	1,5-2	RNA (DNA)	RNA, DNA	10 ⁶ -10 ⁹
E-SDA	2: Polimeraza DNA oraz NEnaza	2 lub 4	37	2	DNA	dsDNA	10 ⁷
HRCA	2: ligaza oraz polimeraza DNA	2	60	1,5	DNA (RNA)	DNA	10 ⁹
PG-RCA	2: Polimeraza DNA oraz NEnaza	0	60	1-3	DNA (RNA)	DNA	ok. 60 kopii genomowego DNA
LAMP	1: Polimeraza DNA (oraz ewentualnie odwrotna transkryptaza w reakcji RT-LAMP)	4 lub 6	60-70	< 0,5	DNA (RNA w reakcji RT-LAMP)	DNA	10 ⁹ -10 ¹⁰
HDA	2: Polimeraza DNA oraz helikaza	2	37-65	0,5-2	DNA	DNA	10 ⁷
RPA	2: Polimeraza DNA oraz rekombinaza	2	37-42	0,5-1,5	DNA	DNA	10 kopii genomowego DNA
EXPAR	2: Polimeraza DNA oraz NEnaza	0	ok. 60	< 0,5	Krótkie DNA (RNA)	DNA	10 ⁶ -10 ⁸
MDA	1: Polimeraza DNA	Random primers	30-37	> 8	DNA	DNA	10 ⁶
pWGA	2: Primaza T7 gp4 oraz polimeraza DNA	0	37	0,5>2	DNA	DNA	10 ³ -10 ⁸

- Technologia LAMP została opracowana w Japonii pod koniec XX wieku przez zespół pod kierownictwem Tsugunori Natomi.
- LAMP wykorzystuje 4-6 starterów rozpoznających 6-8 odrębnych regionów docelowego DNA dla wysoce specyficznej reakcji amplifikacji.
- Polimeraza DNA o właściwości przemieszczania nici inicjuje syntezę amplikonu, a 2 specjalnie zaprojektowane startery tworzą struktury „pętlowe”, aby ułatwić kolejne rundy amplifikacji poprzez wydłużanie pętli i dodatkowe łączenie starterów.
- Produkty DNA są bardzo długie (> 20 kb) i utworzone z licznych powtórzeń krótkiej (80–250 pz) sekwencji docelowej, połączonych z jednoniciowymi regionami pętlowymi w długich konkatamerach.
- Możliwe jest wykorzystanie różnych technik detekcji jak: rejestracja fluorescencji w czasie rzeczywistym przy użyciu barwników interkalujących lub sond, metoda lateral flow czy rozdział amplikonów w żelu agarozowym.
- Przeprowadzenie reakcji możliwe jest na standardowym termocyklerze, termocyklerze Real-Time czy bloku grzejnym.

-
- Oprócz bardziej tradycyjnych lub złożonych metod detekcji, technologia LAMP jest tak wydajna, że produkty i produkty uboczne tych reakcji można również wizualizować wzrokiem.
 - Wskazane jest wykorzystanie dodatkowych starterów typu loop.
 - Reakcja LAMP jest wysoce wydajna i tolerancyjna na inhibitory, co pozwala na wykorzystanie surowej próbki lub minimalnie oczyszczonego kwasu nukleinowego.
 - Wykorzystanie nowej generacji enzymów mających właściwości odwrotnej transkryptazy pozwala na rezygnację z wykorzystania osobnego enzymu do przeprowadzenia diagnostyki w technice RT-LAMP.

Ponieważ dwuniciowy DNA jest w stanie dynamicznej równowagi w temperaturze około 65 ° C, jeden ze starterów LAMP może łączyć się z komplementarną sekwencją dwuniciowego docelowego DNA, a następnie inicjując syntezę DNA przy użyciu polimerazy DNA o aktywności przemieszczania nici, wypierając i uwalniając jednoniciowy DNA. W przypadku metody LAMP, w przeciwieństwie do PCR, nie ma potrzeby denaturacji termicznej dwuniciowego DNA.

Etapy 1 do 8 stanowią proces zmierzający do wytwarzania początkowej struktury dla cyklicznego etapu reakcji LAMP.



Dzięki aktywności polimerazy DNA o aktywności przemieszczania nici syntetyzowana jest nić DNA komplementarna do matrycowego DNA, zaczynając od końca 3' regionu F2 FIP.



Primer F3 łączy się z regionem F3c, poza FIP, na docelowym DNA i inicjuje syntezę DNA z wyparciem nici, uwalniając komplementarną nić połączoną z FIP.



Dwuniciowe DNA składa się z nici DNA syntetyzowanej począwszy od startera F3 i nici matrycowego DNA.



Komplementarna nić sprzężona z FIP jest uwalniana jako pojedyncza nić z uwagi na jej wyparcie przez nić DNA syntetyzowaną od startera F3. Następnie ta uwolniona pojedyncza nić tworzy strukturę łodyga-pętla na końcu 5' ze względu na komplementarne regiony F1c i F1.



Jednoniciowy DNA powstały w etapie 5 służy jako matryca do syntezy DNA zainicjowanej przez starter BIP i późniejszej syntezy DNA z przemieszczeniem nici inicjowanej przez starter B3.

BIP łączy się z nicią DNA wytworzoną w etapie 5. Synteza komplementarnego DNA rozpoczyna się od końca 3' startera BIP. Dzięki temu procesowi DNA powraca ze struktury pętli do struktury liniowej.

Następnie starter B3 łączy się z zewnętrzną częścią BIP, po czym, dzięki aktywności polimerazy DNA i rozpoczynając od końca 3', DNA syntetyzowany począwszy od startera BIP jest wypierany i uwalniany jako pojedyncza nić przed syntezą DNA ze startera B3.

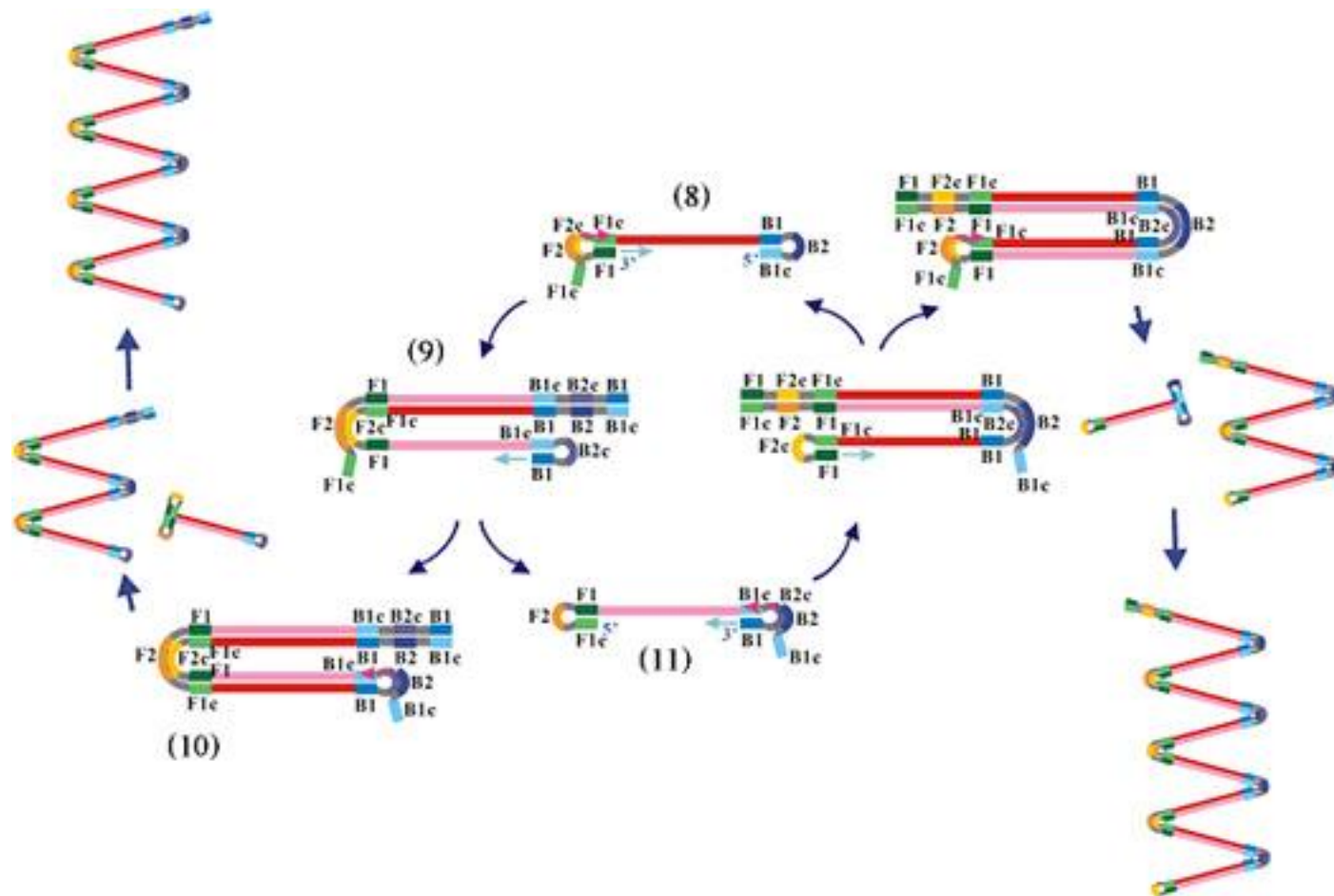


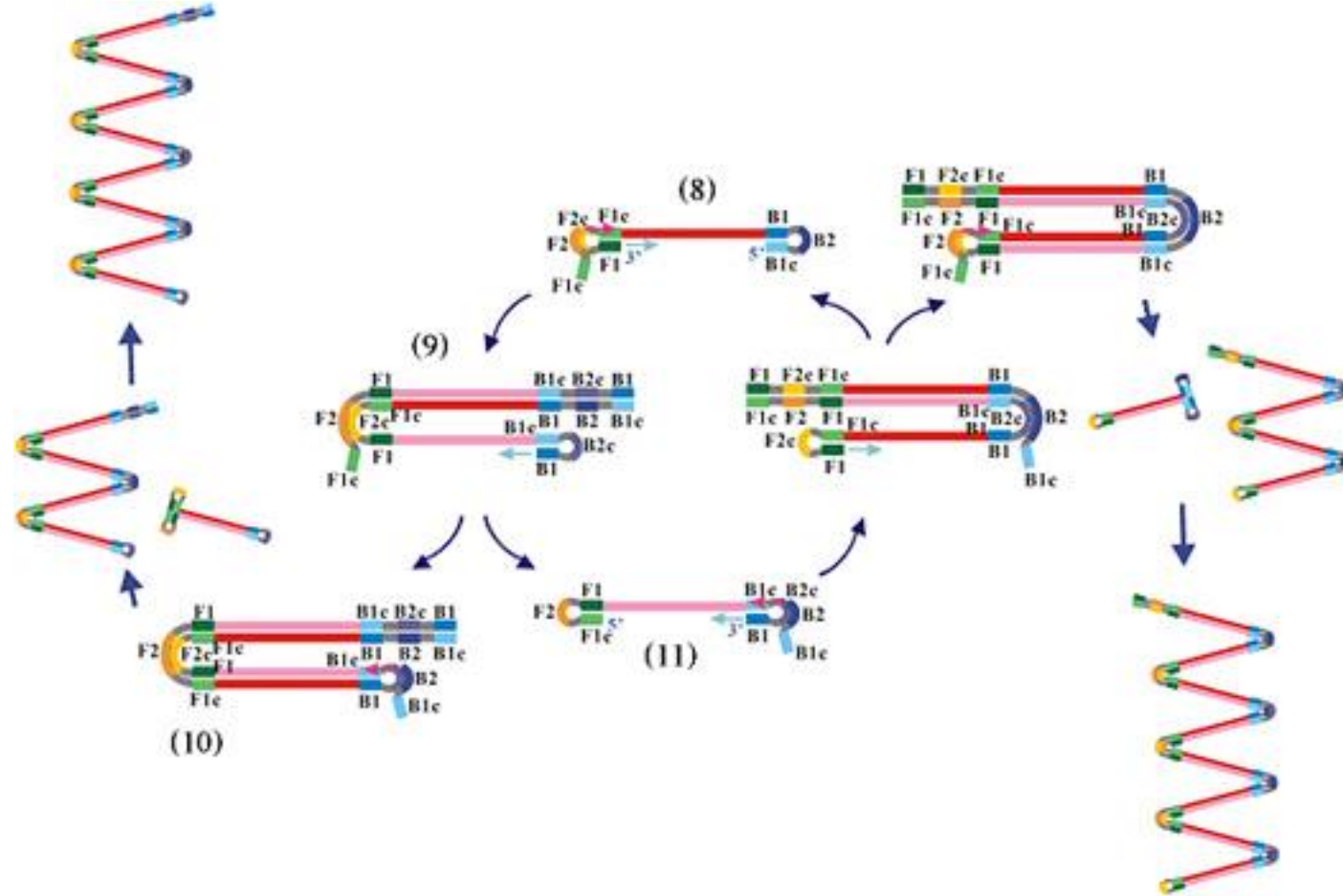
Dwuniciowy DNA jest wytwarzany w procesach opisanych w etapie 6.



Komplementarna nić pasmo połączona z BIP przemieszona w kroku 6 tworzy strukturę z pętelkami na każdym końcu, która wygląda jak hantle. Służy ona jako struktura początkowa dla cyklu amplifikacji w metodzie LAMP (cykliczny etap LAMP).



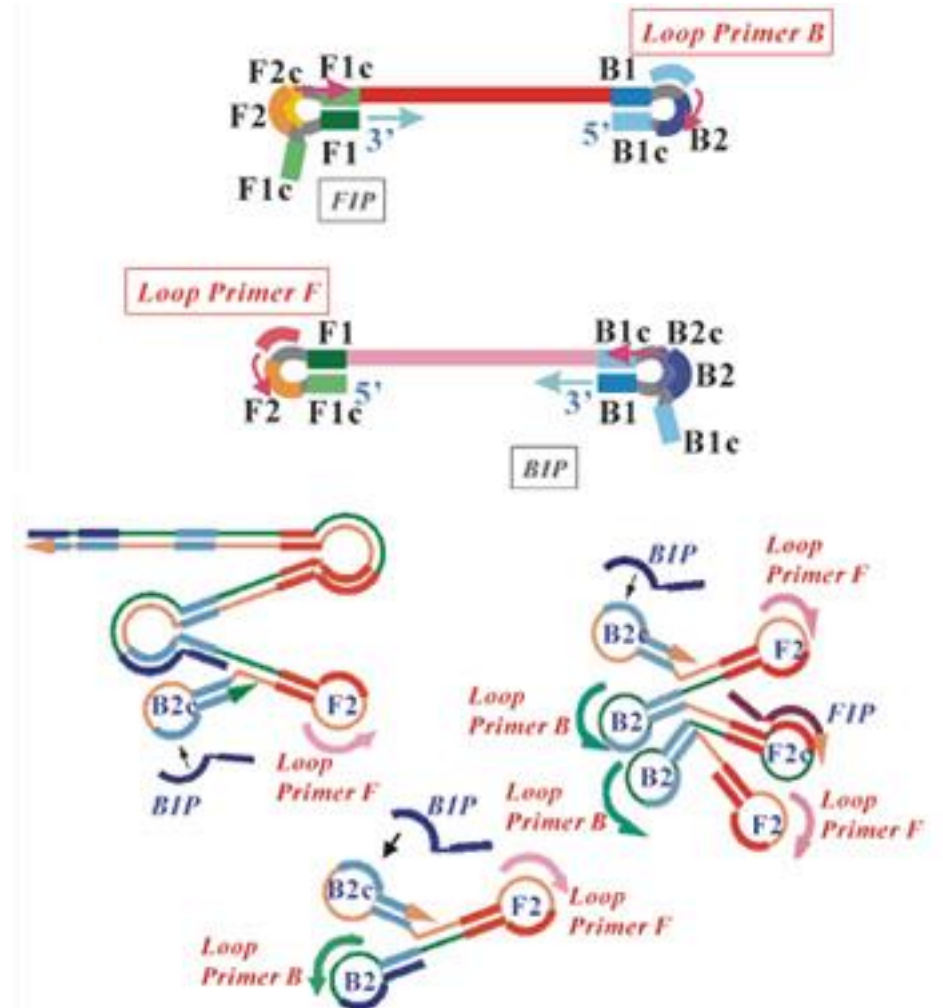




Startery loop (albo starter loop B oraz starter loop F), zawierające sekwencje komplementarne do jednoniciowego regionu pętli (między regionami B1 i B2 lub między regionami F1 i F2) na końcu 5' struktury hantli, zapewniają zwiększoną liczbę punktów wyjścia do syntezy DNA w metodzie LAMP.

Na rysunku widoczna jest reakcja, gdzie amplifikowany jest produkt zawierający sześć pętli. W oryginalnej metodzie, cztery z tych pętli nie byłyby używane.

Dzięki zastosowaniu Loop Primers wszystkie jednoniciowe pętle mogą być użyte jako punkty wyjścia do syntezy DNA.



W pierwszym etapie starter BIP przyłącza się do matrycowego RNA, a dzięki aktywności odwrotnej transkryptazy dochodzi do syntezy cDNA.

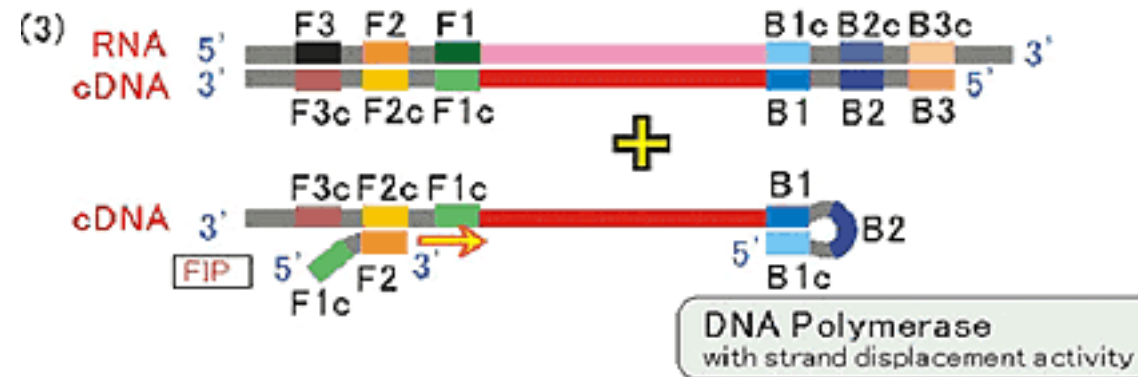


Starter B3 łączy się z regionem wykraczającym poza starter BIP.

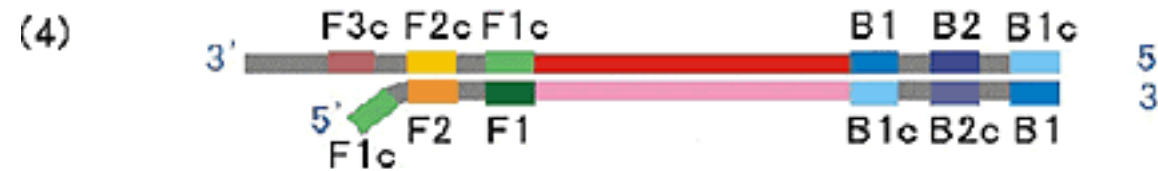
Dzięki aktywności odwrotnej transkryptazy syntetyzowany jest nowy cDNA, jednocześnie uwalniając nić cDNA utworzoną wcześniej przez BIP.



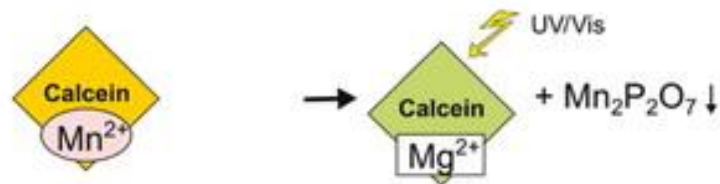
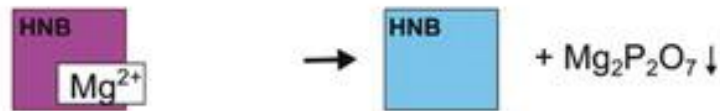
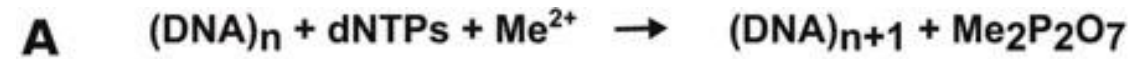
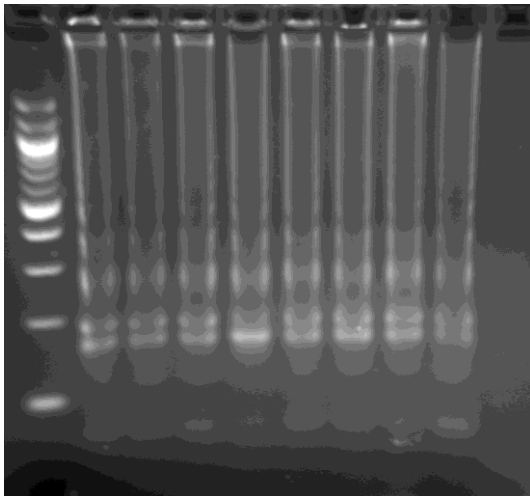
Z etapu (2) uwalniany jest jednoniciowy cDNA syntetyzowany z BIP.
Następnie starter FIP przyłącza się do tego jednoniciowego cDNA.



Po zakończeniu etapu odwrotnej transkrypcji (etap 3), dzięki aktywności polimerazy DNA koniec 3' regionu F2 w FIP staje się punktem wyjścia do syntezy komplementarnej nici DNA (jest to etap tożsamy dla etapu II reakcji LAMP).

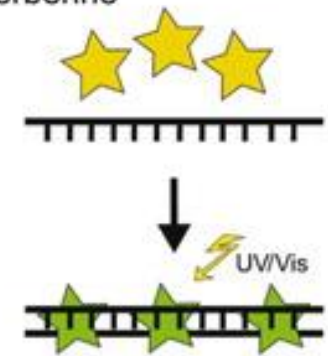


- Detekcja fluorescencyjna
 - Barwniki interkalujące
 - Sondy
- Detekcja kolorymetryczna
- Detekcja turbidymetryczna
- Wykorzystanie elektroforezy żelowej

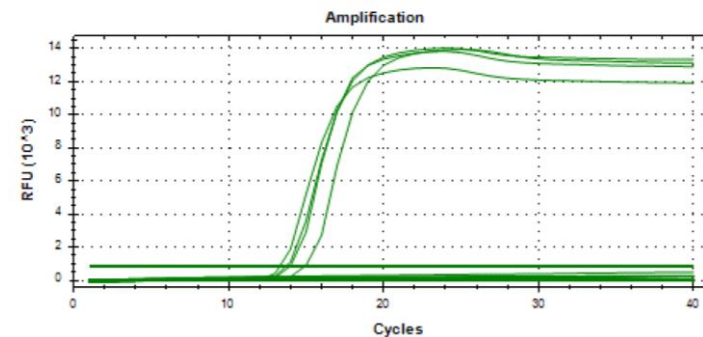


DNA-intercalating dyes

SYBR Green I, EvaGreen, berberine



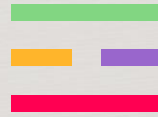
B



C

PCR	LAMP
Wymaga cykli temperaturowych	Izotermalny – jedna stała temperatura
Wymaga 2 starterów	Wymaga 6 starterów
Wolny: zwykle ponad 1 godz.	Szybki: zwykle <30 min
Wymaga osobnego etapu odwrotnej transkrypcji	Odwrotna transkrypcja zachodzi razem z etapem amplifikacji
Typowa wydajność ok. 0,2 µg	Typowa wydajność ok. 10-20 µg
Wrażliwy na inhibitory pochodzące z próbki biologicznej - konieczne jej oczyszczenie	Niewrażliwy na inhibitory – możliwość użycia natywnej próbki biologicznej
Wymaga denaturacji termicznej	Rozplecenie nici jest powodowane przez polimerazę
Wymaga zaawansowanego termocyklera	Kompatybilny zarówno z termocyklerami, jak i czytnikami płytek, oraz blokami grzejnymi
Pozwala wykryć specyficzny fragment DNA na poziomie nanogramowym (10 ⁻⁹ g)	Pozwala wykryć specyficzny fragment DNA na poziomie femtogramowym (10 ⁻¹⁵ g)
Wysoka specyficzność	Bardzo wysoka specyficzność z uwagi na większe pokrycie namnażanego odcinka DNA/RNA przez startery

GENOMTEC



support@genomtec.com

Genomtec SA
Stabłowicka 147
54-066 Wrocław, Poland