

## WYKORZYSTANIE IZOTERMALNEJ AMPLIFIKACJI DNA ZA POŚREDNICTWEM PĘTLI W DIAGNOSTYCE ROŚLIN

### EXPLORATION OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA IN PLANT DIAGNOSTICS

Ewa CISZKOWICZ

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza

*Streszczenie:* Izotermalna amplifikacja DNA za pośrednictwem pętli (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP*) jest skuteczną techniką amplifikacji wybranej sekwencji DNA, stanowiącą szybkie i proste narzędzie w diagnostyce roślin. Metoda wymaga zestawu czterech (lub sześciu) specjalnie zaprojektowanych starterów oraz polimerazy DNA o aktywności wymiany nici. Produktami amplifikacji są struktury pętli zawierające powtórzenia sekwencji docelowych, wykrywane poprzez elektroforezę agarozową lub metody oparte na ocenie jakościowej ubocznych produktów reakcji LAMP – jonów pirofosforanowych. LAMP to metoda detekcji specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych, która pokonuje wiele ograniczeń metod opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy. Metoda LAMP przeprowadzana jest w warunkach izotermalnych i eliminuje konieczność stosowania termocyklerów, co umożliwia jej zastosowanie przy wykorzystaniu mało skomplikowanego sprzętu (blok grzejny lub łaźnia wodna). Ponadto uproszczona metoda detekcji produktów amplifikacji pozwala na jej wdrożenie w słabiej wyposażonych laboratoriach lub warunkach polowych. Metoda LAMP znalazła zastosowanie w diagnostyce patogenów roślinnych, identyfikacji genetycznie modyfikowanych organizmów roślinnych oraz identyfikacji gatunkowej roślin.

*Słowa kluczowe:* LAMP, izotermalna amplifikacja, diagnostyka roślin

*Summary:* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an effective method for amplification of a target DNA sequence, representing a fast and simple plant diagnostic tool. This method requires a set of four (or six) specifically designed primers and a DNA polymerase with strand displacing activity. Amplification products contain single-stranded loops with repeated target sequences, detected by agarose electrophoresis or methods based on the qualitative assessment of reaction by-products – pyrophosphate ions. Detection of specific nucleic acid sequences by LAMP overcomes many limitations of methods based on polymerase chain reaction – PCR. LAMP method is performed in isothermal conditions, which eliminates the need for thermocyclers and enables the reaction with no need for sophisticated equipment

(heating block or water bath). In addition, a simplified method for detection of amplification products makes it applicable in the field or less equipped laboratories. LAMP is a highly effective method for plant pathogens diagnosis, identification of genetically modified organisms or authentication of plant species.

*Key words:* LAMP, isothermal amplification, plant diagnostics

## WSTĘP

Sprawna detekcja patogenów u roślin jest konieczna dla skutecznego zapobiegania lub ograniczania rozprzestrzeniania się chorób roślinnych, których występowanie ma znaczące konsekwencje ekonomiczne. Patogeny roślinne mogą być wykrywane za pomocą wielu metod, poczynając od oceny symptomów choroby lub obserwacji mikroskopowej patogenów, do metod opartych na zastosowaniu przeciwciał (analizy immunochromatograficzne) lub metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych.

Klasyczne metody identyfikacji patogenów stanowią testy fizjologiczne i biochemiczne określające właściwości fenotypowe. Ich największym ograniczeniem jest niska czułość oraz czasochłonność, która w przypadku bakterii polega na konieczności prowadzenia hodowli kultur bakterii izolowanych z zainfekowanych roślin. Powszechnie stosowane są również metody serologiczne, test pośredniej immunofluorescencji – IIF (ang. *Indirect Immunofluorescence*) [6] oraz test immunoenzymatyczny – ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) [7]. Test ELISA jest jednak metodą niedostatecznie czułą do identyfikacji małych ilości inokulum patogena [3].

Czułość detekcji patogennych mikroorganizmów została wyraźnie poprawiona przez wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) do amplifikacji fragmentów DNA genomowego lub plazmidowego patogenów [21]. Metody oparte na PCR [28] są bardzo często stosowane w diagnostyce ze względu na ich wysoką czułość oraz specyficzność. Metoda PCR posiada jednak kilka podstawowych wad, takich jak: konieczność stosowania drogich termocyklorów (zwłaszcza *Real-Time* PCR), ograniczona specyficzność i wydajność amplifikacji [8], może wymagać stosowania wysoko oczyszczonych kwasów nukleinowych [38] oraz rozdzielania elektroforetycznego produktów reakcji [48]. Powyższe czynniki ograniczają często stosowanie diagnostyki bazującej na PCR do wyspecjalizowanych laboratoriów dysponujących wykwalifikowanymi pracownikami. W sprawnej diagnostyce chorób roślinnych istotna jest możliwość natychmiastowego przeprowadzenia testów, wskazujących na zakażenie danym patogenem, już w warunkach polowych. Jednym ze sposobów pokonania wspomnianych ograniczeń jest stosowanie izotermalnych metod amplifikacji DNA takich jak metoda LAMP (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA*).

Po raz pierwszy LAMP została opisana w 2000 roku przez zespół japońskich badaczy prowadzony przez Tsugunori Notomi [34]. Metoda ta umożli-

wia szybko, dokładną i niskonakładową amplifikację kwasów nukleinowych, co znalazło oddźwięk w licznych doniesieniach, oraz pozwoliło na opracowanie dostępnych komercyjnie zestawów diagnostycznych. Metoda LAMP została zaliczona do metod diagnostycznych opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych, oficjalnie rekomendowanych do przeprowadzania rutynowej identyfikacji oraz analizy patogenów [27]. Metody izotermalnej amplifikacji, w przeciwieństwie do PCR, nie wymagają użycia drogich termocyklerów, umożliwiając przeprowadzenie reakcji w kąpielii wodnej lub na prostym bloku grzejmym [12]. LAMP jest molekularną metodą umożliwiającą amplifikację wybranej sekwencji DNA z dużą czułością oraz specyficznością w warunkach izotermalnych. Pozwala ona na namnożenie fragmentu DNA w ilości  $10^9$  kopii w przeciągu godziny, a więc w czasie krótszym niż standardowe procedury metody PCR.

Porównując metodę LAMP z innymi metodami wykrywania patogenów roślinnych, głównie z metodą PCR, stwierdzono większą czułość i specyficzność metody LAMP [9, 17, 38, 47]. Chen i wsp. [5] podają, że granica detekcji DNA genetycznie modyfikowanej kukurydzy w mieszaninie reakcyjnej przy zastosowaniu metody LAMP oraz PCR wynosi odpowiednio 0,65 fg i 6,5 fg. Moradi i wsp. [26] podają granicę detekcji DNA *Erwinia amylovora* wynoszącą dla metody LAMP i nested PCR  $2 \times 10^4$  CFU/ml, a dla konwencjonalnej PCR  $2 \times 10^3$  CFU/ml. Zatem zarówno LAMP jak i wewnętrzny PCR (ang. *nested* PCR) są 100-krotnie czulsze od klasycznej PCR. Prace Li i wsp. [22] oraz Tomlinson i wsp. [45] wskazują, iż metodą czulszą od wyżej wymienionych jest *Real-Time* PCR. Prowadzono także badania porównujące metody RT-LAMP (ang. *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*) oraz RT-PCR (ang. *Reverse Transcription* PCR), w wyniku których uznano, że pierwsza metoda jest 10-krotnie [52] lub 100-krotnie [2, 25, 51] czulsza od drugiej. Metoda LAMP jest także bardziej specyficzna niż PCR ze względu na zastosowanie co najmniej czterech starterów, rozpoznających sześć sekwencji na matrycowym DNA, podczas gdy w metodzie PCR stosowane są zwykle dwa startery specyficzne dla danej sekwencji DNA.

Metoda LAMP ma także pewne ograniczenia, które niekiedy powstrzymują badaczy przed jej zastosowaniem, dotyczą one głównie trudności w projektowaniu starterów. Wybór starterów LAMP jest bardzo złożoną i skomplikowaną procedurą, wymagającą przeszukiwania wielu sekwencji genomowych. Jest to decydujący krok w wykorzystaniu tej metody i jedynie bardzo precyzyjny dobór starterów może stanowić o powodzeniu amplifikacji wybranej sekwencji. Gdy odpowiedni zestaw starterów zostanie zaprojektowany, sama metoda LAMP jest prosta do przeprowadzenia. Do projektowania starterów wykorzystywany jest program Primer Explore (Fujitsu, Tokyo, Japan) [27].

Celem pracy jest przegląd literatury na temat metody LAMP, obejmujący zasadę działania i przebieg reakcji, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania tej metody w diagnostyce chorób roślinnych.

## ZASADA DZIAŁANIA METODY LAMP

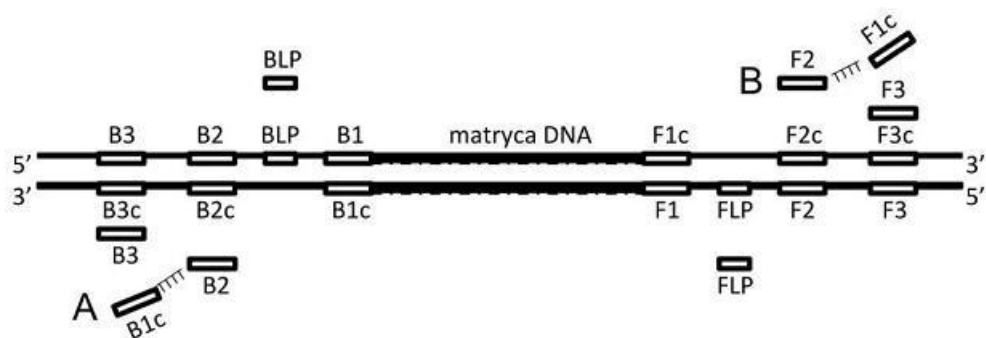
### SKŁADNIKI REAKCJI LAMP

Metoda LAMP oparta jest na cyklicznej amplifikacji wybranego fragmentu DNA z zastosowaniem polimerazy DNA o aktywności wymiany (przemieszczania) nici (ang. *strand displacement*). Stosowanym enzymem jest duży fragment umiarkowanie termostabilnej polimerazy *Bst* izolowany z *Bacillus stearothermophilus*. Enzym ten bardzo dobrze nadaje się do syntezy DNA w reakcjach wymagających wymiany nici DNA, ponieważ jest pozbawiony aktywności 5'→3' egzonukleazy. Dzięki tej właściwości w trakcie syntezy nowej nici na bazie częściowo dwu-niciowego DNA, stara nić nie ulega degradacji tylko jest uwalniana do roztworu. Polimeraza *Bst* wykazuje optymalną aktywność w temperaturze 65°C, natomiast powyżej 80°C ulega inaktywacji [34]. Wiele innych polimeraz, w tym bakteriofaga Φ29 i *Escherichia coli*, wykazuje aktywność wymiany nici, chociaż w znacznie niższej temperaturze optymalnej, co wyklucza ich stosowanie w reakcji LAMP [49].

Metoda LAMP wykazuje dużą specyficzność, ponieważ do reakcji amplifikacji dochodzi jedynie wtedy, gdy dwa wewnętrzne (ang. *inner primers*) oraz dwa zewnętrzne startery (ang. *outer primers*) prawidłowo rozpoznają sześć regionów na matrycowym DNA. Do starterów wewnętrznych należą: FIP (ang. *Forward Inner Primer*) oraz BIP (ang. *Backward Inner Primer*), oba zawierające po dwie sekwencje odpowiadające odcinkom sensownej i antysensownej nici matrycowego DNA. Jak już wspomniano wcześniej, podstawą projektowania starterów LAMP jest wyodrębnienie na matrycy DNA sekwencji flankujących wybrany fragment.

Ogólna budowa starterów oraz pozycje na matrycowym DNA, do których one hybrydują zostały przedstawione na rycinie 1. Sekwencje o długości 23-24 nukleotydów znajdujące się najbliżej sekwencji docelowej (na obu wewnętrznych końcach sekwencji flankujących) zostały oznaczone jako F1c i B1. Sekwencje znajdujące się w środku obu końców sekwencji docelowej nazwano F2c i B2 (najczęściej o długości 23-24 nukleotydów), natomiast fragmenty DNA znajdujące się na obu zewnętrznych końcach matrycowego DNA – F3c oraz B3 (zazwyczaj o długości 17-21 nukleotydów). Biorąc pod uwagę taką strukturę matrycowego DNA, starter FIP składa się z regionu F1c, łącznika TTTT oraz sekwencji F2 (komplementarnej do F2c). Podobnie starter BIP złożony jest z sekwencji B1c (komplementarnej do B1), łącznika TTTT oraz fragmentu B2. Startery zewnętrzne zbudowane są z sekwencji F3 oraz B3, komplementarnych odpowiednio do sekwencji F3c oraz B3c na DNA matrycowym [34]. Trzecia, opcjonalna para starterów pętli F oraz B (ang. *loop primers*) może być dodana do reakcji w celu jej przyspieszenia oraz zwiększenia specyficzności [23]. Mieszanina zawierająca próbkę DNA z sekwencją docelową oraz co najmniej czterema (opcjo-

nalnie sześcioma) starterami jest poddawana denaturacji cieplnej i natychmiastowo schładzana na lodzie, w celu zapobieżenia powtórnej hybrydyzacji rozdzielonych nici DNA. Następny krok stanowi właściwa reakcja LAMP, inicjowana dodaniem *Bst* polimerazy DNA i przeprowadzana przez godzinę w temperaturze 65°C [34].



RYCINA 1. Schemat budowy starterów reakcji LAMP z uwzględnieniem miejsc ich hybrydyzacji w rejonach flankujących wybrane sekwencje DNA. Startery wewnętrzne: A. BIP, B. FIB; startery zewnętrzne: B3, F3; startery pętli: BLP, FLP

FIGURE 1. Schematic representation of primer design for LAMP assay showing the position of primers spinning the target DNA sequences. Inner primers: A. BIP, B. FIB; outer primers: B3, F3; loop primers: BLP, FLP

## MECHANIZM LAMP

Mechanizm działania reakcji LAMP można podzielić na trzy etapy: wstępny, cyklicznej amplifikacji oraz elongacji (ryc. 2). Etap wstępny jest inicjowany poprzez hybrydyzację startera FIP do regionu F2c na matrycy DNA, co prowadzi do rozpoczęcia syntezy nici komplementarnej. Starter zewnętrzny F3, którego ilość w mieszaninie jest mniejsza od FIP, powoli hybryduje do regionu F3c na matrycy DNA. Rozpoczyna to syntezę nowej komplementarnej do matrycy nici DNA. Proces ten może zaistnieć ze względu na zastosowanie polimerazy DNA o aktywności wymiany nici DNA. W wyniku tych reakcji powstają dwa produkty w postaci podwójnej nici oraz nici DNA tworzącej strukturę pętli na końcu 5', dzięki wcześniejszemu dołączeniu startera z regionem F1c hybrydującym z regionem F1 na nowopowstałej nici. Pojedyncza nić DNA służy jako matryca zarówno do syntezy DNA inicjowanej przyłączeniem startera BIP, jak i późniejszej syntezy DNA, inicjowanej przyłączeniem startera B3 oraz przesunięciem nowo powstałej nici DNA. Powstaje w ten sposób struktura hantli, która zostaje szybko przekształcona w strukturę spinki do włosów (ang. *stem-loop* lub ang. *hairspin*), w której można wyodrębnić pętlę zawie

rającą region F2c oraz pień z regionem hybrydyzacji startera BIP. Struktura ta stanowi produkt wyjściowy do następnego etapu reakcji LAMP: cyklicznej amplifikacji. Opisane wyżej reakcje stanowią podstawę reakcji LAMP z zastosowaniem polimerazy DNA o aktywności wymiany nici [27, 37].

Na etapie cyklicznej amplifikacji, w wyniku syntezy DNA zapoczątkowanej przyłączeniem starterów FIP lub BIP oraz inicjowanej przesunięciem nici DNA pod wpływem działania polimerazy DNA, powstają bardziej złożone struktury. Wśród nich występują: struktury będące produktami pośrednimi posiadające podwojoną sekwencję docelową (produkty wyjściowe do kolejnego etapu reakcji LAMP – elongacji) oraz oryginalne struktury spinki do włosów będące zarazem produktami wyjściowymi i końcowymi etapu cyklizacji zapewniając jego ciągłość. W momencie dołączania startera BIP do struktur pośrednich etapu cyklicznej amplifikacji, czyli w połowie tego etapu, dochodzi do potrojenia ilości sekwencji docelowych [34].

Produkty końcowe reakcji LAMP, powstałe na etapie elongacji, stanowi mieszanina struktur DNA o różnej długości i złożoności form, przypominających w wyglądzie kalafior (ang. *cauliflower-like structures*), ze zwielokrotnionymi pętlami oraz sekwencjami docelowymi. Oprócz czterech starterów rozpoznających sześć różnych sekwencji, we wstępnych etapach reakcji LAMP można również zastosować dwa dodatkowe, tzw. startery pętli (ang. *Loop Primers* – FLP oraz BLP [37] lub *F-loop* oraz *B-loop* [48]), rozpoznające dwie różne sekwencje, co zapewnia wysoką specyficzną amplifikacji sekwencji docelowej oraz skraca czas przebiegu reakcji [42]. W przeciwieństwie do czterech starterów: FIP, BIP, F3 oraz B3, które są wykorzystywane na etapie inicjacji reakcji LAMP, dodatkowe startery są aktywne dopiero, gdy powstaną produkty *stem-loop*, wyjściowe do etapu cyklicznej amplifikacji. Zatem przy zastosowaniu takiej dużej liczby starterów, selektywność amplifikacji sekwencji docelowych w metodzie LAMP jest znacznie wyższa niż w reakcjach PCR lub SDA (ang. *Stand Displacement Amplification*) [37].

Zastosowanie starterów pętli może przyspieszyć przebieg reakcji LAMP [10, 29]. Produkty amplifikacji DNA przy zastosowaniu czterech starterów (F3, B3, FIP oraz BIP) pojawiły się w mieszaninie po 50 minutach od rozpoczęcia reakcji, natomiast przy zastosowaniu sześciu starterów (dodatkowe dwa startery pętli) produkty uwidocznione były już po 20 minutach (pomiar mętności mieszaniny, czyli obecności produktów ubocznych reakcji – jonów pirofosforanowych). Inne badania [38, 43] wskazują, iż użycie dodatkowych starterów pętli destabilizuje reakcję LAMP i wymaga dodatkowej optymalizacji warunków reakcji.



## SPOSOBY DETEKCJI PRODUKTÓW REAKCJI LAMP

W diagnostyce chorób roślinnych istotna jest informacja o pozytywnym lub negatywnym wyniku reakcji, czyli występowaniu lub braku DNA danego czynnika chorobotwórczego w próbce. W detekcji produktów reakcji LAMP wykorzystywane są metody detekcji o zróżnicowanych wymaganiach sprzętowych. Produkty amplifikacji metodą LAMP mogą być wykrywane poprzez elektroforezę w żelu agarozowym, pomiar mętności roztworu przy użyciu spektrofotometru, zastosowanie fluorescencyjnych barwników interkalujących z DNA lub poprzez wzrokową ocenę zmian mętności lub koloru roztworu, czy też immunodetekcję znakowanych produktów amplifikacji [48].

Częstą metodą sprawdzenia wyników reakcji LAMP jest elektroforeza na żelu agarozowym z wybarwianiem bromkiem etydyny. Jest to metoda standardowa, stosunkowo czasochłonna i kosztowna, wymagająca specjalistycznych sprzętów diagnostycznych. Nie [30] badał wpływ długości amplifikowanych fragmentów na efektywność reakcji LAMP. Stosując elektroforezę na żelu agarozowym stwierdzono, że intensywność amplifikacji fragmentów cDNA o długości od 209 do 977 par zasad jest większa w porównaniu do amplifikacji produktów o długości 1197 par zasad [30].

Prostym testem wykrywającym produkty amplifikacji LAMP jest pomiar mętności roztworu. Zwiększenie mętności zachodzi poprzez reakcję produktów ubocznych amplifikacji DNA – jonów pirofosforanowych z jonami magnezu, tworząc w rezultacie nierozpuszczalny pirofosforan magnezu. Mętność roztworu może być oceniana za pomocą spektrofotometru lub wzrokowo. Na podstawie reakcji jonów pirofosforanowych z magnezem, Tomita i wsp. [44] zaproponowali użycie do detekcji produktów amplifikacji barwnika fluorescencyjnego – kalceiny. Fluorescencja kalceiny jest wygaszana występowaniem wolnych jonów magnezu w roztworze, które w przypadku metody LAMP są wiązane przez jony pirofosforanu. Dobór metody detekcji pozwala na zwiększenie czułości i specyficzności reakcji LAMP. Problemy z zanieczyszczeniem krzyżowym, związanym z dużą ilością produktów reakcji LAMP, mogą prowadzić do pojawienia się pozytywnych wyników w próbkach kontrolnych, nie zawierających matrycy DNA. Przeprowadzanie detekcji produktów amplifikacji za pomocą barwnika fluorescencyjnego – kalceiny, bezpośrednio w próbce reakcyjnej zamiast elektroforezy na żelu agarozowym wyeliminowało ten problem [31].

Do kolorymetrycznej oceny efektów amplifikacji stosowany jest również wskaźnik metali – błękit hydroksynaftolowy (HNB), którego barwa ulega zmianie od fioletowej (negatywny wynik, brak produktów amplifikacji) do niebieskiej (pozytywny wynik). Hadersdorfer i wsp. [14] zaproponowali nazwę Blue LAMP dla metody wykorzystującej błękit hydroksynaftolowy (HNB) do wizualizacji efektów reakcji LAMP.



Barwnikiem fluorescencyjnym interkalującym DNA jest SYBR Green, który w przypadku pozytywnej reakcji zmienia swój oryginalny pomarańczowy kolor na zielony, widoczny zarówno w świetle naturalnym, jak i UV (302 nm) [37]. Jest to barwnik dodawany do roztworu po zakończonej reakcji LAMP; otwarcie próbki prowadzi do zwiększonego ryzyka jej zanieczyszczenia i fałszywie pozytywnych wyników detekcji. W przeciwieństwie do SYBR Green, kalceina oraz błękit hydroksynaftolowy są dodawane do mieszaniny reakcyjnej przed rozpoczęciem amplifikacji, co redukuje problem kontaminacji próbki [13].

Kolejną metodą wykrywania produktów amplifikacji jest immunodetekcja przeprowadzana za pomocą rozdziału chromatograficznego z przepływem poprzecznym (ang. *Lateral-Flow Devices*, LFD). Reakcja LAMP jest przeprowadzana przy wykorzystaniu znakowanych starterów, np. starter BLP znakowany na końcu 5' biotyną, a starter FLP znakowany na końcu 5' digoksygeniną lub izotiocyanianem fluoresceiny. Metoda LFD działa na zasadzie immunochromatografii. Wynik pozytywny zostaje uzyskany jedynie wtedy, gdy oba znakowane startery zostały wbudowane w produkt w reakcji amplifikacji. W wyniku przeprowadzonej chromatografii na płycie uwidocznioma jest linia testowa, wskazująca na pozytywny przebieg reakcji amplifikacji oraz linia kontrolna, która wskazuje czy rozdziel chromatograficzny został przeprowadzony poprawnie [48].

## ZASTOSOWANIE METODY LAMP W DIAGNOSTYCE ROŚLIN

Od czasu opisanego metody LAMP przez Notomi i wsp. w 2000 roku [34] znalazła ona wszechstronne zastosowanie w diagnostyce klinicznej chorób zakaźnych, a także identyfikacji zwierzęcych czynników chorobotwórczych, w szczególności bakterii i wirusów. Pierwsza praca na organizmach roślinnych została opublikowana w 2003 roku przez Fukuta i wsp. [8] i dotyczyła identyfikacji japońskiego wirusa mozaiki jama (ang. *Japanese Yam Mosaic Virus*, JYMV) w ekstraktach zainfekowanych liści pochrzynu japońskiego. Od tego czasu ilość doniesień naukowych dotyczących zastosowania metody LAMP u roślin regularnie się zwiększa.

Metoda LAMP łączy czułość i swoistość metod opartych na kwasach nukleinowych ze skróconym czasem potrzebnym do przeprowadzenia reakcji oraz brakiem konieczności zastosowania zaawansowanego sprzętu diagnostycznego. Cechy te sprawiają, iż nadaje się ona do wykonywania testów w warunkach polowych lub w przemyśle żywnościowym, bezpośrednio w łańcuchu produkcyjnym [47]. Wiele badań zmierza do stworzenia szybkich i wiarygodnych metod rutynowej identyfikacji zainfekowanych roślin w celu niedopuszczenia do rozprzestrzenienia się patogenów poprzez szybkie przeprowadzenie ich w stan kwarantanny [8, 15, 33]. Istotnym zastosowaniem metody LAMP jest wykrywanie genetycznie zmodyfikowanych orga-

nizmów (ang. *Genetically Modified Organisms*, GMO) roślinnych [5, 19, 20, 24]. Ahmed i wsp. [1] badali linię CBH 351 kukurydzy, zwaną StarLink™, w kierunku detekcji genu *cry9c* z *Bacillus thuringiensis* ssp. *Tolworthi*, którego produkt zmniejsza uszkodzenia powstałe przez działanie owadów z rzędu *Lepidoptera*. Kukurydza StarLink™ początkowo wprowadzona do konsumpcji, została z niej wycofana, gdyż na skutek zapylenia gen *cry9c* dostał się do innych odmian kukurydzy, pierwotnie niezmodyfikowanych genetycznie. Technika LAMP została zaproponowana przez Ahmed i wsp. [1] do bardzo szybkiej detekcji organizmów niosących dodatkowy gen. Lee i wsp. [19] stworzyli procedurę LAMP opartą na szybkiej ekstrakcji DNA z genetycznie modyfikowanej kukurydzy oraz rzepaku, zmiażdżonych w wodzie za pomocą tłuczka, z pominięciem długotrwałego oczyszczania. Wydajna amplifikacja DNA wskazywała na brak inhibicji reakcji LAMP, pomimo zastosowania nieoczyszczonego materiału biologicznego [19]. Z kolei w innych badaniach występowanie w mieszaninie reakcyjnej PCR takich czynników biologicznych jak białka, węglowodany, czy chlorofil hamowało amplifikację DNA [40]. W badaniach Lee i wsp. [19] specyficzność i czułość metody LAMP pozwoliła na wykrycie obecności od 0,01% domieszek do pojedynczych kopii sekwencji wektorowych, tj. promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora (ang. *Cauliflower Mosaic Virus 35S promotor*) oraz promotora i terminatora genu syntazy nopaliny z *Agrobacterium* spp.

Gatunkowo-specyficzna identyfikacja z wykorzystaniem metody LAMP znalazła zastosowanie w ziołarstwie, gdy klasyczne metody identyfikacji bazujące na obserwacjach makro- i mikroskopowych stały się niewystarczające. Pierwszym doniesieniem o wykorzystaniu LAMP u roślin leczniczych była praca Sasaki i wsp. [41], która opisuje procedurę umożliwiającą identyfikację wśród wielu jego imitacji żeńszenia właściwego – Ginseng Radix, pochodzącego z korzenia *Panax ginseng*. Chaudhary i wsp. [4] dostosowali metodę LAMP do potwierdzania autentyczności barwinka różowego (*Catharanthus roseus*), rośliny stosowanej w leczeniu niektórych typów nowotworów (ziarnica złośliwa, nowotwór sutka).

Najliczniejszą grupę badań z zastosowaniem metody LAMP stanowią prace nad detekcją chorobotwórczych patogenów roślinnych. W 2003 roku pierwszą pracą opisującą zastosowanie metody LAMP do detekcji genomowego RNA wirusa mozaiki jama przedstawił Fukuta i wsp. [8], wykorzystując odwrotną transkryptazę AMV (ang. *Avian Myeloblastosis Virus*, wirus ptasiej białaczki) w celu transkrypcji RNA wirusa na cDNA. Stąd nazwa metody RT-LAMP (ang. *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*), która łączy w sobie dwie reakcje, odwrotną transkrypcję oraz reakcję LAMP [34]. Mimo, że optimum aktywności odwrotnej transkryptazy AMV to około 40°C, zastosowanie wyższej temperatury nie wpływa niekorzystnie na jej aktywność. Umożliwia to przeprowadzenie

odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacji DNA na wysokim poziomie w temperaturze aktywności *Bst* polimerazy DNA (około 65°C). Ostatecznie Fukuta i wsp. [8] zaproponowali wykonanie reakcji RT-LAMP w jednej probówce w warunkach izotermalnych w 65°C, przez 60 minut. Badacze wprowadzili także dodatkową modyfikację procedury LAMP poprzez przeprowadzanie ekstrakcji RNA wirusa z liści pochryznu japońskiego (*Dioscorea japonica*) przy użyciu jedynie 0,5 M NaOH, co znacznie przyspieszyło całą procedurę. Prace badawcze Varga i Jamesa [50] na wirusie ospy śliw (ang. *Plum Pox Virus*, PPV) potwierdziły, że nie ma istotnych różnic pomiędzy dwustopniową procedurą RT-LAMP (różne temperatury reakcji odwrotnej transkrypcji oraz LAMP) oraz jednostopniową RT-LAMP (obie reakcje w temperaturze 63°C). W celu identyfikacji wirusa brązowej plamistości pomidora (ang. *Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV) wyekstrahowanego z chryzantem (*Dendranthema grandiflora*) zmodyfikowano metodę RT-LAMP do IC/RT-LAMP (ang. *ImmunoCapture RT-LAMP*) [10]. Modyfikacja ta pozwala na wychwytywanie wirionów na drodze immunosorpcji z nieoczyszczonych materiałów roślinnych w celu zagęszczenia i wstępnego oczyszczenia cząstek wirusa.

W 2005 roku pojawiło się pierwsze doniesienie naukowe o zastosowaniu metody LAMP do badań nad patogenami bakteryjnymi [36]. Prowadzono badania nad rozróżnieniem izolatów bakteryjnych wywołujących chorobę zielenienia cytrusów (ang. *citrus greening*) przenoszoną przez insekty *Diaphorina citri* oraz *Trioza erytraeae*. Udowodniono, że szczepy bakterii pochodzące z Japonii i Indonezji różnią się w sekwencji genu *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* trzema nukleotydami, co wystarczy do ich odróżnienia. Harper i wsp. [15] zwracają szczególną uwagę na możliwość wykorzystania metody LAMP do opracowywania szybkich, prostych i uniwersalnych procedur służących eliminacji patogenów roślinnych. Metoda LAMP została wykorzystana do szybkiej detekcji między innymi *Xylella fastidiosa* [15], *Erwinia amylovora* [26], *Ralstonia solanacearum* [18], *Xanthomonas citri* [39], wywołujących choroby o istotnym znaczeniu ekonomicznym.

Niessen i Vogel [31] zastosowali metodę LAMP do wykrywania genu *gaoA* obecnego w izolatach *Fusarium graminearum*, grzyba wywołującego rdzę żdźbłową zbóż. Metodę LAMP wykorzystano również do wykrywania obecności arbuskularnych grzybów mikoryzowych (AGM), mających znaczny wpływ na ekosystemy lądowe, współżyjąc w obligatoryjnej symbiozie z co najmniej 80% wszystkich roślin kuli ziemskiej [11, 16]. Procedura LAMP stworzona została przy użyciu starterów zaprojektowanych na podstawie konserwatywnego genu  $\beta$ -tubuliny, występującego u grzybów z gromady *Glomeromycota*, a DNA izolowano z zarodników pochodzących z hodowli *in vitro* [11]. Metoda LAMP znalazła również zastosowanie w detekcji nicieni pasożytniczych roślin z gatunku *Meloidogyne* spp. [32] a także fitoplazm [35, 46].

## PODSUMOWANIE

Zwiększająca się liczba pozycji światowej literatury naukowej jest dowodem na użyteczność i skuteczność metody LAMP. W czasie ostatnich 10 lat metoda ta była z powodzeniem stosowana w molekularnej detekcji i diagnostyce chorób roślinnych wywołanych przez patogeniczne mikroorganizmy. Biorąc pod uwagę zalety metody, do których należą szybka amplifikacja sekwencji docelowych, prostota wykonania oraz możliwość szybkiej detekcji, metoda LAMP jest odpowiednia do obserwacji chorób roślin i szybkiej diagnostyki, a także szeroko rozumianej identyfikacji roślin (np. GMO), bez konieczności stosowania zaawansowanego sprzętu oraz wysoko wykwalifikowanej kadry.

## PODZIĘKOWANIA

Praca dofinansowana w ramach projektu MRiRW HORhn-801-2/12 pt. Wprowadzenie odporności na wirus żółtej karłowatość jęczmienia oraz odporności na rdzę brunatną *Lr 19* do polskich materiałów hodowlanych pszenicy.

## LITERATURA

- [1] AHMED MU, SAITO M, MOSHARRAF HM, RAMACHANDARA R, FURUI S, HI-NO A, TAKAMURA Y, TAKAGI M, TAMIYA E. Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification. *Analyst*, 2009; **134**: 966-972.
- [2] BOUBOURAKAS I, FUKUTA S, KYRIAKOPOULOU P. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 2009; **160**: 63-68.
- [3] CANDRESSE T, MACQUAIRE G, LANNEAU M, BOUSALEM M, WETZEL T, QUIOT-DOUINE L, QUIOT JB, DUNEZ J. Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immuno-capture-PCR. *EPPO Bull* 1994; **24**: 585-594.
- [4] CHAUDHARY AA, HEMANT, MOHSIN M, AHMAD A. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based technology for authentication of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Protoplasma* 2011; **249**: 417-722.
- [5] CHEN J, HUANG C, ZHANG X, YU R, WU Z. Detection of herbicide-resistant maize by using loop-mediated isothermal amplification of the pat selectable marker gene. *Afr J Biotechnol* 2011; **10**: 17055-17061.
- [6] DE BOER SH, COPEMAN RJ. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. *Am J Potato Res* 1980; **57**: 457-465.
- [7] DRENNAN JL, WESTRA AG, SLACK SA, DELSERONE LM, COLLOMER A. Comparison of DNA hybridization probe and ELISA for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field grown potatoes. *Plant Dis* 1993; **77**: 1243-1247.
- [8] 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; **148**: 1713-1720.

- [9] FUKUTA S, KATO S, YOSHIDA K, MIZUKAMI Y, ISHIDA A, UEDA J, KANBE M, ISHIMOTO Y. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J Virol Methods* 2003; **112**: 35-40.
- [10] FUKUTA S, OHISHI K, YOSHIDA K, MIZUKAMI Y, ISHIDA A, KANBE M. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *J Virol Methods* 2004; **121**: 49-55.
- [11] GADKAR V, RILLIG MC. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to rapidly detect arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 2008; **40**: 540-543.
- [12] GILL P, GHAEMI A. Nucleic acid isothermal amplification Technologies – a review. *Nucleos Nucleot Nucl Acids* 2008; **27**: 224-243.
- [13] GOTO M, HONDA E, OGURA A, NOMOTO A, HANAKI KI. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 2009; **46**: 167-172.
- [14] HADERSDORFER J, NEUMÜLLER M, TREUTTER D, FISCHER TC. Fast and reliable detection of *Plum pox virus* in woody host plants using the Blue LAMP protocol. *Ann Appl Biol* 2011; **159**: 456-466.
- [15] HARPER SJ, WARD LI, CLOVER GRG. Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella fastidiosa* for Quarantine and Field Applications. *Phytopathol* 2010; **100**: 1282-1288.
- [16] KOWALCZYK S, BŁASZKOWSKI J. Arbuskularne grzyby mikoryzowe gleb województwa lubuskiego. *Acta Agrobotanica* 2005; **58**: 453-474.
- [17] KUAN CH, WU M, LU Y, HUANG H. Rapid detection of squash leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 2010; **169**: 61-65.
- [18] KUBOTA R, VINE BG, ALVAREZ AM, JENKINS DM. Detection of *Ralstonia solanacearum* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Bacteriology* 2008; **98**: 1045-1051.
- [19] LEE D, LA MURA M, ALLNUTT TR, POWELL W. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences. *BMC Biotechnol* 2009; **9**: 7.
- [20] LEE D, LA MURA M, ALLNUTT TS, POWELL W, REENLAND AG. Isothermal Amplification of Genetically Modified DNA Sequences Directly from Plant Tissues Lowers the Barriers to High-Throughput and Field-Based Genotyping. *J Agricult Food Chem* 2009; **57**: 9400-9402.
- [21] LEE IM, BARTOSZYK IM, GUNDERSEN DE, MOGEN B, DAVIS RE. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Appl Environ Microbiol* 1997; **63**: 2625-2630.
- [22] LI W, HARTUNG JS, LEVY L. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “*Candidatus Liberibacter species*” associated with citrus huanglongbing. *Plant Dis* 2007; **91**: 51-58.
- [23] LI X, NIE J, WARD L, MADANI M, HSIANG T, ZHAO Y, DE BOER SH. Comparative genomics-guided loop-mediated isothermal amplification for characterization of *Pseudomonas syringa* pv. *Phaseolicola*. *J Appl Microbiol* 2009; **107**: 717-726.
- [24] LIU M, LUO Y, TAO R, HE R, JIANG K, WANG B, WANG L. Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (Roundup Ready) by loop-mediated isothermal amplification. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; **73**: 2365-2369.
- [25] LIU Y, WANG Z, QIAN Y, MU J, SHEN L, WANG F, YANG J. Rapid detection of tobacco mosaic virus using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Arch Virol* 2010; **155**: 1681-1685.
- [26] MORADI A, NASIRI J, ABDOLLAHI H, ALMASI M. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. *Euro J Plant Pathol* 2012; DOI: 10.1007/s10658-012-9939-y.
- [27] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 2002; **15**: 62-69.
- [28] MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335-350.
- [29] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002; **16**: 223-229.

- [30] NIE X. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of Potato virus Y. *Plant Dis* 2005; **89**: 605-610.
- [31] NIESSEN L, VOGEL RF. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int J Food Microbiol* 2010; **140**: 183-191.
- [32] NIU JH, JIAN H, GUO QX, CHEN CL, WANG XY, LIU Q, GUO YD. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology BSPP* 2011; DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02562.x.
- [33] NIU JH, GUO QX, JIAN H, CHEN CL, YANG D, LIU Q, GUO YD. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 2011; **30**: 1063-1069.
- [34] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: E63.
- [35] OBURA E, MASIGA D, WACHIRA F, GURJA B, KHAN ZR. Detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). *J Microbiol Meth* 2010; **84**: 312-316.
- [36] OKUDA M, MATSUMOTO M, TANAKA Y, SUBANDIYAH S, IWANAMI T. Characterization of the *tufB*-*secE*-*nusG*-*rplK*AJL-*rpoB* Gene Cluster of the Citrus Greening Organism and Detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis* 2005; **89**: 705-711.
- [37] PARIDA M, SANNARANGAIAH S, DASH PK, RAO PVL, MORITA K. Loop Mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious disease. *Rev Med Virol* 2008; **18**: 407-421.
- [38] PILLAI D, BONAMI JR, SRI WIDADA J. Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J Fish Dis* 2006; **29**: 275-283.
- [39] RIGANO LA, MARANO MR, CASTAGNORO AP, DO AMARAL AM, VOJNOV AA. Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 176.
- [40] ROGERS HJ, PARKES HC. Direct PCR amplification from leaf disco. *Plant Sci* 1999; **143**: 183-186.
- [41] SASAKI Y, KOMATSU K, NAGUMO S. Rapid Detection of *Panax ginseng* by Loop-Mediated Isothermal Amplification and Its Application to Authentication of Ginseng. *Biol Pharm Bull* 2008; **31**: 1806-1808.
- [42] SAVAN R, KONO T, ITAMI T, SAKAI M. Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of Fish and shellfish pathogens. *J Fish Dis* 2005; **28**: 573-581.
- [43] TENG PH, CHEN CL, SUNG PF, LEE FC, OU BR, LEE PY. Specific detection of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification amplicons for Taura syndrome virus by colorimetric dot-blot hybridization. *J Virol Methods* 2007; **146**: 317-326.
- [44] TOMITA N, MORI Y, KANDA H, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 2008; **3**: 877-882.
- [45] TOMLINSON JA, BARKER I, BOONHAM N. Faster, Simpler, More-Specific Methods for Improved Molecular Detection of *Phytophthora ramorum* in the Field. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 4040-4047.
- [46] TOMLINSON JA, BOONHAM N, DICKINSON M. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathol* 2010; **59**: 465-471.
- [47] TOMLINSON JA, DICKINSON MJ, BOONHAM N. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Lett Appl Microbiol* 2010; **51**: 650-657.
- [48] TOMLINSON JA, DICKINSON MJ, BOONHAM N. Rapid Detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by Two-Minute DNA Extraction Followed by Isothermal Amplification and Amplicon Detection by Generic Lateral Flow Device. *Phytopathol* 2010; **100**: 143-149.
- [49] WARD L, HARPER S, CLOVER G. Development of a LAMP assay for *Xylella fastidiosa*. *MAF Biosec New Zeal Technic Paper* 2010; **14**: 1.

- [50] VARGA A, JAMES D. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. J Virol Methods 2006; **138**: 184-190.
- [51] ZHANG Z, LIU X, LI D, YU J, HAN CH. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Virol J 2011; **8**: 550.
- [52] ZHOU T, DU L, FAN Y, ZHOU Y. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of RNA for Sensitive and rapid detection of southern rice black-streaked dwarf virus. J Virol Methods 2012; **180**: 91-95.

*Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski*

*Otrzymano: 11.05.2012*

*Przyjęto: 12.11.2012*

*Ewa Ciszkowicz*

*Katedra Biochemii i Biotechnologii*

*Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza*

*al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów*

*tel.: 17 856 18 97*

*e-mail: eciskow@prz.edu.pl*

