

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ LAMP В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.Д. Показеев, Ю.А. Белов, М.Ю. Щелканов

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF LAMP IN LABORATORY DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES

V.D. Pokazeev, Yu.A. Belov, M.Yu. Shchelkanov

G.P. Somov Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Vladivostok, Russia

В 1983 г. американским биохимиком Кэри Мюллисом был предложен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на избирательной амплификации определенного участка ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы в условиях *in vitro*. Метод произвел революцию в молекулярной биологии и медицине, и в 1993 г. К. Мюллис получил за свою разработку Нобелевскую премию в области химии.

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода. В 2000 г. биохимик Цугонори Нотоми с соавторами предложил способ амплификации, получивший название петлевая изотермическая амплификация (LAMP – Loop mediated isothermal amplification). Метод LAMP основан на автоматическом цикле синтеза цепи ДНК с использованием ДНК-полимераз с высокой активностью смещения и четырех праймеров, узнающих различные участки искомой ДНК: *Bst*-полимераза, которая является субъединицей ДНК-полимеразы непатогенной бактерии *Bacillus stearothermophilus* и отличается выраженной способностью вытеснять комплементарную цепь ДНК в условиях постоянной температуры около 65 °C [3]. Внешние F3 (forward outer primer) и B3 (backward outer primer) комплементарны участкам матрицы за пределами праймеров FIP и BIP. Внутренние – FIP (forward inner primer) и BIP (backward inner primer) – состоят из двух фрагментов: первый, F2 (B2); второй, F1c (B1c), прикрепленный к 5' концу F2 (B2) и комплементарный участку F1 (B1) матрицы. Перед началом амплификации праймеры образуют шпильчатую структуру, на основе которой впоследствии формируются конкатемерные молекулы (длинная непрерывная молекула ДНК, которая содержит множество копий одной и той же последовательности ДНК, соединенных последовательно), содержащие первоначальный ампликон. Концентрация внешних праймеров в реакционной смеси несколько раз выше, используются они только для эффективного образования шпильчатой структуры. При температуре от 60-65 °C фрагмент F2 отжигается на матрице, активируется полимеразой и начинается элонгация. Праймер F3 гибридизуется с областью F3c, в ходе чего происходит синтез ДНК, способствующий вытеснению цепи. В результате освобождается одноцепочечная ДНК. В дальнейшем происходит формирование так называемой петли на 3'-конце фрагмента, под действием BIP и B3, и на 5'-конце с помощью фрагмента F1c на участке F1. Полученная матрица создаёт более 10⁹ копий необходимого фрагмента ДНК [3-6].

LAMP может содержать ещё два других праймера: LFP (loop forward primer) и LBP (loop backward primer), которые подбираются к участкам ампликона, расположенным между сегментами, комплементарными праймерам FIP и BIP. При использовании 6 праймеров результат можно оценивать уже через 10-15 минут после начала амплификации [5-6].

К преимуществам LAMP относится сокращение времени реакции до 15-40 мин, возможность проводить детекцию при помощи электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием или нитратом серебра, флуоресценции в растворе интеркалирующими агентами. Для постановки LAMP допускается использование любого термоблока, водяной бани, химического термopakета и других.

Bst-полимераза использовавшаяся в LAMP вытесняет вторую цепь ДНК без участия ферментов и использования высоких температур, что является преимуществом перед Taq-полимеразой и исключает необходимость в периодическом подъёме температуры для денатурации двойной спирали ДНК. LAMP более специфична к последовательности амплифицируемого фрагмента, и имеет более высокую чувствительность. Реакцию обратной транскрипции (которая требуется для амплификации последовательностей РНК) можно проводить вместе с праймерами LAMP.

Несмотря на то, что технология LAMP имеет множество преимуществ перед классической ПЦР, к недостаткам можно отнести трудоёмкость подбора праймеров, нестабильность *Bst*-

полимеразы при 95 °С, более высокой потенциальной контаминационной опасности. Кроме того, LAMP ограничена в идентификации нескольких мишеней в одной пробирке.

Литература

13. Медицинская вирусология. Под ред.: ДК Львова. М.: МИА, 2008. 655 с.
14. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред.: ДК Львова. М.: МИА, 2013. 1200 с.
15. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(12):7.
16. Yan J, Zhou J, Zheng Y, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Molecular Bio-Systems*. 2014;10:970-1003.
17. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. 2008;18(6):407-421.
18. Миронова ЛВ, Адельшин РВ, Бикетов СФ и др. Петлевая изометрическая амплификация ДНК: принцип метода и перспективы применения в молекулярной диагностике холеры (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62(2):120-124.
19. Щит ИЮ, Игнатов КБ, Кудрявцева ТЮ и др. Использование петлевой изотермической амплификации ДНК для выявления и идентификации сибиреязвенного микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017;2:69-76.