

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Петруша О.А., Файзулов Е.Б.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия

Метод петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP) был разработан Т. Notomi с соавт. в 2000 г. и, благодаря своей точности, чувствительности и простоте исполнения, стал одним из самых перспективных методов для осуществления диагностики на месте лечения («point-of-care»). В настоящем обзоре рассмотрены разные способы детекции результатов реакции LAMP, выявлены их преимущества и недостатки. Методы детекции результатов LAMP могут быть условно подразделены на косвенные и прямые. К косвенным методам, направленным на выявление изменений в химическом составе реакционной смеси, можно отнести турбидиметрию в реальном времени, флуоресцентную детекцию с кальцеином, колориметрическую детекцию с гидроксинафтоловым синим и детекцию с использованием модифицированных наночастиц золота. Прямые методы, основанные на выявлении накопления в процессе реакции ампликонов, включают в себя флуориметрическое выявление ампликонов с применением интеркалирующих красителей, резонансный перенос энергии флуоресценции, иммуноферментный анализ, реакцию иммунохроматографии, использование катионных полимеров и наночастиц золота.

Для разработок в области диагностики «point-of-care» характерна выраженная тенденция к миниатюризации, проведению реакции LAMP на микрочипах и микрофлюидных устройствах с электрохимическим или оптическим способом детекции.

Наиболее перспективными для диагностики инфекционных заболеваний являются методы турбидиметрии и использование интеркалирующих красителей. Разработка отечественных портативных приборов для детекции результатов LAMP, основанных на флуоресцентной детекции или турбидиметрии в реальном времени будет способствовать широкому внедрению метода в практику клинической лабораторной диагностики.

Поиск литературы проводился в базе данных Pubmed.ncbi по ключевым словам.

Ключевые слова: быстрая молекулярная диагностика; инфекционные заболевания; петлевая изотермическая амплификация ДНК; LAMP; методы детекции; обзор литературы.

Для цитирования: Петруша О.А., Файзулов Е.Б. Методы детекции результатов реакции петлевой изотермической амплификации ДНК. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 67-72. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72>

Petrusha O.A., Faizuloev E.B.

DETECTION METHODS FOR RESULTS OF A LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

The loop mediated isothermal amplification (LAMP) was developed by T. Notomi et al. in 2000. It has become one of the most promising methods for point-of-care diagnostics due to its accuracy, sensitivity and ease of execution. In this review, various methods for detecting the results of the LAMP reaction are considered; their advantages and disadvantages are revealed. Methods for detecting LAMP results can be divided into indirect and direct. Indirect methods aimed at detecting changes in the chemical composition of the reaction mixture include real-time turbidimetry, fluorescence detection with calcein, colorimetric detection with hydroxynaphthol blue, and detection using modified gold nanoparticles. Direct methods based on the detection of accumulation amplicons during the reaction include fluorimetric detection with intercalating dyes, resonance fluorescence energy transfer, enzyme immunoassay, immunochromatography, using cationic polymers and gold nanoparticles.

The development in the field of point-of-care diagnostics is characterized by a pronounced tendency to miniaturization, the LAMP reaction on microchips and microfluidic devices with an electrochemical or optical detection method.

The most promising for the diagnosis of infectious diseases are turbidimetry methods and the use of intercalating dyes. The development of portable domestic instruments for detecting of LAMP results based on real-time fluorescence detection or turbidimetry will contribute to the widespread introduction of the method into clinical laboratory diagnostic practice.

A literature research was conducted in the Pubmed.ncbi based on keywords.

Key words: rapid molecular diagnostics; infectious diseases; loop-mediated isothermal amplification of DNA; LAMP; detection methods; review.

For citation: Petrusha O.A., Faizuloev E.B. Detection methods for results of a loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (1):67-72 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72>

For correspondence: Petrusha Olga, junior researcher of Molecular Virology Laboratory; e-mail: petrusha.olga@gmail.com

Information about authors:

Petrusha O.A. - <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Faizuloev E.B. - <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 03.12.2019
Accepted 09.12.2019

Введение. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря своей универсальности, высокой специфичности и чувствительности стал «золотым стандартом» молекулярной диагностики многих инфекционных заболеваний, как в медицине, так и в ветеринарии. Однако применение метода ПЦР для диагностики на месте оказания медицинской помощи («point-of-care»), в походно-полевых условиях или в животноводческих хозяйствах крайне затруднительно. Высокая потребность в средствах диагностики «point-of-care» заставляет искать подходящие методы, в числе которых особый интерес представляют методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот (ИАНК).

На данный момент описано более десяти методов ИАНК [1], из которых наиболее часто применяются методы транскрипционной амплификации РНК NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), амплификация по типу катящегося кольца RCA (Rolling Circle Amplification), хеликазо-зависимая амплификация HDA (Helicase-Dependent Amplification) и метод петлевой изотермической амплификации ДНК LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification). Последний, на наш взгляд, представляет особый интерес. Метод LAMP был разработан Т. Notomi с соавт. в 2000 г. [2]. В состав реакционной смеси LAMP как правило входит ДНК-полимераза термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* (Bst ДНК-полимераза), которая обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, способностью к замещению (вытеснению) цепей ДНК и не проявляет 5'-3'-экзонуклеазной активности. Благодаря использованию Bst ДНК-полимеразы, реакция LAMP проходит при постоянной температуре и не требует применения термочиклера. Продукты реакции накапливаются в количестве, многократно превышающем количество продуктов ПЦР, что позволяет проводить визуальную детекцию результата прямо в пробирке. В классическом варианте LAMP в состав реакционной смеси входит четыре олигонуклеотидных праймера, что обеспечивает высокую специфичность метода, при чувствительности, сопоставимой с ПЦР.

За рубежом такие компании как Eiken Chemical (Япония) и OptiGene (Великобритания) выпускают коммерческие наборы реагентов на основе метода LAMP для использования в диагностике инфекционных заболеваний, мониторинга окружающей среды и оценки безопасности продуктов питания. Для детекции результатов LAMP предложено большое разнообразие методов.

В настоящем обзоре рассмотрены разные способы детекции результатов реакции LAMP, выявлены их преимущества и недостатки. Методы детекции результатов LAMP можно условно подразделить на косвенные, направленные на выявление изменений в химическом составе реакционной смеси, и прямые, основанные на выявлении накопления в процессе реакции ампликонов.

Косвенные методы детекции. Турбидиметрия в реальном времени. Турбидиметрический метод возможен благодаря чрезвычайно высокому выходу продуктов реакции LAMP. Во время полимеризации молекулы ДНК из нуклеотидов высвобождается ион пиррофосфата, который затем вступает в реакцию с ионами Mg^{2+} из реакционного буфера, в результате чего образуется пиррофосфат магния, который выпадает в осадок (рис.1, а, см.обложку). Именно на образовании нерастворимого осадка и взаимодействии с ионами пиррофосфата основан турбидиметрический метод детекции реакции LAMP.

На следующий год после публикации статьи, в которой впервые описывался метод LAMP, вышла работа Y. Mori и соавт. [3], предложившего для детекции результатов метод турбидиметрии. В процессе реакции амплификации увеличивается мутность раствора, по изменению которой судят о ходе реакции. Для образования осадка концентрация пиррофосфата в реакционной смеси должна превышать 0,5 мМ. Согласно исследованиям Y.Mori, в реакции LAMP концентрация иона пиррофосфата в 2,5 раза превышает необходимый минимум, а в реакции ПЦР составляет всего 0,02 мМ, чего недостаточно для образования осадка. Также в этом исследовании была доказана зависимость увеличения мутности раствора от накопления ДНК-продукта LAMP, т.е. возможность проводить детекцию результата в режиме реального времени. В 2004 г. та же группа ученых представила устройство, способное поддерживать постоянную температуру для проведения реакции LAMP и одновременно измерять мутность нескольких образцов в режиме реального времени. Измерение мутности проводят каждые 30 с в течение 60 минут [4]. В дальнейшем, метод LAMP с турбидиметрической детекцией в реальном времени показал высокую эффективность в исследованиях по диагностике инфекционных заболеваний [5-7], причем чувствительность измерений соответствовала таковой для ПЦР-РВ. К недостаткам турбидиметрического метода детекции можно отнести риск снижения чувствительности, к которой приводят такие факторы как неравномерность пространственного распределения частиц и их размера, повторное растворение $Mg_2P_2O_7$ и снижение мутности раствора. Также сложности связаны с необходимостью детекции результатов в небольших объемах реакционной смеси.

Флуоресцентная детекция с кальцеином. Простой способ визуальной детекции с использованием металлоиндикатора кальцеина предложен в 2008 г. N. Tomita и соавт. [8]. В начале реакции кальцеин образует комплекс с ионом марганца, который гасит его свечение. В ходе реакции амплификации этот комплекс разрушается, ион марганца образует нерастворимый осадок с ионом пиррофосфата, а высвободившийся кальцеин начинает флуоресцировать (рис.1, б, см.обложку). Свечение также может усиливаться благодаря объединению кальцеина с ионами Mg^{2+} из реакционной смеси. Флуоресценция кальцеина хорошо видна в ультрафиолетовом излучении (365 нм), но изменение цвета реакционной смеси заметно невооруженным глазом и при дневном освещении. Благодаря своей простоте и наглядности этот метод детекции используется для детекции различных инфекционных агентов. [9-11]. Также этот метод был использован для детекции по конечной точке в переносном микрокапиллярном устройстве для проведения LAMP, учет результатов в котором можно проводить помощью смартфона [12].

Колориметрическая детекция с гидроксинафтоловым синим. Еще один метод детекции с использованием металлоиндикатора предложил M. Goto и соавт. [13]. В этой работе индикатором выступали молекулы гидроксинафтола синего (ГНС). В ходе реакции цвет смеси менялся с фиолетового на голубой в результате связывания ионов Mg^{2+} с пиррофосфатом (рис.1, в, см.обложку). Изменение цвета можно было наблюдать невооруженным глазом, в ультрафиолетовом свете и измерять спектрофотометрически при длине волны 650 нм. Аналитиче-

ская чувствительность метода - около $6,4 \times 10^3$ копий/мл ДНК фага λ , что эквивалентно чувствительности анализа с использованием SYBR Green I, и в 10 раз выше чувствительности метода с использованием кальцеина. По мнению авторов, данное различие вызвано ингибирующим эффектом ионов Mn^{2+} , добавляемых в реакционную смесь с кальцеином. Реакция проводится в закрытой пробирке. Изменение цвета реакционной смеси оценивается визуально, что делает метод удобным для качественной детекции в полевых условиях, но при этом отсутствует возможность провести количественную оценку или мультиплексный анализ. Метод не получил такого широкого применения как турбидиметрия, но также используется при детекции в реакции LAMP различных инфекционных агентов [14-17] и для оценки резистентности микроорганизмов к лекарственным средствам [17]. Существуют варианты с лиофилизированными реакционными смесями, которые могут долго храниться при положительной температуре и использоваться в полевых условиях [14].

Модифицированные наночастицы золота. Золотые наночастицы (AuNP), обладающие уникальными колориметрическими свойствами, хорошо подходят для детекции результатов LAMP. AuNP имеют характерную полосу поглощения поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в области видимого света, точный спектр которого зависит от расстояния между частицами. В частности, агрегация частиц вызывает смещение полосы поглощения SPR в красную сторону и сопутствующее изменение цвета от красного к фиолетовому. Был описан колориметрический способ детекции с использованием наночастиц золота, модифицированных 11-меркаптоундекановой кислотой (MUA-AuNP). Частицы агрегировали в присутствии ионов Mg^{2+} , окрашивая реакционную смесь в фиолетовый цвет. Затем, в процессе реакции амплификации, в присутствии ионов пирофосфата, частицы дезагрегируют и выпадают в виде осадка красного цвета [18] (рис.1, з, см.обложку). Чувствительность метода составила 200 копий ДНК-гена фага λ при объеме реакционной смеси в 20 мкл. Для детекции результатов на основе этого метода, другой группой ученых был разработан портативный прибор для «point-of-care» диагностики [19], позволяющий одновременно поддерживать температуру реакции и проводить измерение абсорбции света в реальном времени, отправляя результаты на смартфон или другое мобильное устройство.

Прямые методы детекции. В отличие от косвенных методов детекции результатов LAMP, прямые методы нацелены на обнаружение самих ампликонов, образующихся в результате реакции.

Флуориметрическое выявление ампликонов с применением интеркалирующих красителей. Может проводиться как в режиме реального времени (рис.2, а, см.обложку), так и путем электрофореза продуктов реакции в агарозном геле, что является классическим подходом к детекции результатов LAMP (рис.2, б, см.обложку). Из-за особенностей механизма протекания реакции LAMP, на электрофореграмме выявляется характерная «лестница», по которой можно судить об успешном протекании реакции. Электрофорез надежен и до сих пор используется как референсный метод детекции продуктов LAMP [10, 20]. В то же время этот метод имеет ряд существенных недостатков, таких как высокий риск контаминации ампликонами, относительно большую трудоемкость,

необходимость работать с токсичными красителями, невозможность количественной оценки и учета результатов в режиме реального времени.

Интеркалирующие красители могут использоваться как для детекции продуктов LAMP по конечной точке, так и для детекции в режиме реального времени. В качестве примера детекции по конечной точке можно привести работу М. Parida и соавт. [21]. SYBR Green I, использованный в этой работе, дает возможность быстрой детекции, как при дневном свете – при положительной реакции происходит изменение цвета с оранжевого на зеленый; так и для детекции в ультрафиолетовом излучении – в присутствии ампликонов наблюдается зеленое свечение (рис.2, в, з, см.обложку). Несмотря на высокий риск контаминации и невозможность количественного анализа, SYBR Green I широко используется в различных LAMP тест-системах [20]. Примерно в это же время появились ряд статей в которых описано использование SYBR Green I для детекции в режиме реального времени [22], но поскольку этот краситель является достаточно сильным ингибитором реакции, были предложены и другие интеркалирующие красители, такие как EvaGreen [23], PicoGreen [24], SYTO-9 [25], берберин [26] и другие.

Согласно проведенному сравнению шести интеркалирующих красителей (SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold и EvaGreen), наилучшими характеристиками для реакции LAMP в режиме реального времени обладают красители SYTO-9 и SYTO-82, т.к. обеспечивают наибольшее отношение сигнал/фон, демонстрируют быстрое появление положительного сигнала и в меньшей степени ингибируют реакцию амплификации [27]. Последнее, вероятнее всего, связано с низкой, относительно других красителей, аффинностью SYTO-9 и SYTO-82 к двухцепочечной ДНК [28].

FRET. В основе этого метода детекции лежит резонансный перенос энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer, FRET), который заключается в обмене энергии между двумя фотоактивными молекулами или группами: донором и акцептором (темновой тушитель) энергии. Впервые это метод для детекции LAMP использовали Р.Н. Chou и соавт. в 2011 г. [29], который синтезировал два специфических зонда, нацеленных на петлевые участки в продуктах амплификации. Акцепторный зонд был помечен LightCycler Red 640 на 5'-конце и фосфорилирован на 3'-конце, чтобы избежать нежелательного удлинения. Когда оба зонда гибридизуются с целевой последовательностью, энергия флуоресценции передается от флуоресцеинового красителя к акцепторному красителю LC640, что приводит к его эмиссии. Детекция проводится в режиме реального времени.

Иммуноферментный анализ. Комбинацию иммуноферментного анализа (ИФА) с LAMP предложил Н. Ravan и соавт. [30]. В реакции использовались меченые диоксигенином нуклеотиды, которые встраивались в ампликоны и 5'-биотинилированные зонды, нацеленные на последовательность внутри ампликона. После проведения реакции ее продукты фиксировались на стенках планшета с иммобилизованным стрептавидином, а неспецифические продукты удалялись с помощью многократных отмывок. Затем проводили инкубацию с мечеными пероксидазой антителами к диоксигенину. В усовершенствованном варианте этого метода [31] пара биотинилированных петлевых праймеров заранее

сорбировалась на поверхности микропланшета. Это позволило уменьшить общее время детекции и снизить риск перекрестной контаминации, однако по этим параметрам ИФА-LAMP по-прежнему проигрывает другим методам детекции.

Иммунохроматография. В 2008 г. W. Kiatpathomchai и соавт. [32] предложили новый способ детекции результатов LAMP, основанный на методе иммунохроматографии. В реакции использовались праймеры, меченные FITC и биотином, благодаря которым продуктом амплификации была ДНК с двумя метками. Биотинилированный гибридный продукт LAMP наносился на участок специальной тест-полоски, содержащей красящие вещества - наночастицы коллоидного золота, покрытые антителами к FITC. Комплекс ДНК-наночастица проходит по мембране к линии со стрептавидином и, связываясь с ним, остается на тест полоске, образуя цветную линию. Для положительного контроля реакции используется полоска, содержащая антитела, связывающая непосредственно красящие частицы.

В последующих исследованиях этот метод был модифицирован, для проведения мультиплексной реакции с использованием различных комбинаций репортерных молекул (FITC [33], DIG [34], TEXAS RED [35]). Метод не требует специальной аппаратуры и подходит для диагностики «point-of-care». Аналитическая чувствительность составила от 50 до 5 пкг РНК/мкл, что сопоставимо с чувствительностью ПЦР-РВ и RT-LAMP, электрофоретической детекцией, и в десять раз превышает чувствительность RT-LAMP с использованием кальцеина [32]. К недостаткам можно отнести высокий риск контаминации и невозможность количественного определения. Показана возможность применения метода для детекции ДНК различных инфекционных агентов (бактерий, вирусов, грибов, простейших) [33-35] как в медицине, так и в ветеринарии, в том числе для оценки чистоты продуктов питания [36], контроля за генетически модифицированными культурами [37] и анализа биоматериала в криминалистике [38].

Использование катионных полимеров. Метод был разработан Y. Mori и соавт. [39] и апробирован на плазмидных ДНК с фрагментами геномов вирусов гепатита

В и С. В реакционную смесь добавляется два олигонуклеотидных зонда, причем зонд к геному вируса гепатита В - помечен красителем FITC, а гепатита С – ROX. По завершению реакции амплификации в пробирку добавляли раствор низкомолекулярного ($M_r = 600$) полиэтиленimina (ПЭИ), который, благодаря положительному заряду, образует нерастворимый комплекс с продуктами амплификации LAMP, гибридными зондами. После краткого центрифугирования, осадок облучали ультрафиолетом (длина волны – 365 нм), получая видимое глазом свечение, окрашенное в соответствии с красителем зонда. Использование различных красителей позволяет проводить детекцию в мультиплексном формате. Необходимость добавлять ПЭИ после завершения реакции может привести к контаминации продуктами амплификации, однако эту проблему можно решить различными механическими приспособлениями, например, использованием восковой пробки, которая плавится под воздействием высоких температур по завершении реакции LAMP.

Данный метод не получил широкого распространения, в дальнейшем его использование упоминается всего в одной статье: Т. Khamlog и соавт. [40] использовали его в системе определения пола эмбрионов крупного рогатого скота.

Наночастицы золота могут использоваться не только для непрямого метода детекции, описанного выше, но также и для детекции непосредственно ампликонов. В этом случае наночастицы конъюгируются не с 11-меркаптоундекановой кислотой, а с олигонуклеотидными зондами к целевым последовательностям ДНК. После проведения реакции в раствор добавляется соль $MgSO_4$, которая, в случае отрицательного результата LAMP, индуцирует агрегацию частиц, и, как следствие, изменение цвета раствора с красного на серый или синий. Если реакция положительная, зонды связываются с наработанными ампликонами и агрегации частиц при добавлении соли не происходит – окраска реакционной смеси остается красной [41].

Микрочипы и микрофлюидные системы. Для разработок в области диагностики «point-of-care» имеется выраженная тенденция к миниатюризации, про-

Сравнительная характеристика различных методов детекции LAMP

Метод детекции	Оборудование	Риск контаминации	Возможность количественной оценки	Возможность детекции в режиме реального времени	Возможность мультиплексной реакции
Турбидиметрия	Турбидиметр	Низкий	Да	Да	Нет
Кальцеин	Не обязательно	Низкий	Нет	Нет	Нет
Гидроксинафтоловый синий	Не обязательно	Низкий	Нет	Нет	Нет
Модифицированные наночастицы золота	Не обязательно	Низкий	Нет	Нет	Нет
Электрофорез	Камера для электрофореза	Высокий	Нет	Нет	Нет
Интеркалирующие красители	Флуориметр	Низкий	Да	Да	Нет
LAMP-ИФА	Флуориметр	Высокий	Нет	Нет	Нет
Иммунохроматография	Нет	Высокий	Нет	Нет	Да
ПЭИ	Источник УФ-излучения	Высокий	Нет	Нет	Да
Наночастицы золота	Не обязательно	Высокий	Нет	Нет	Нет
FRET	Флуориметр	Низкий	Да	Да	Нет

ведению реакции на микрочипах и микрофлюидных устройствах. *Электрохимические чипы* для детекции продуктов амплификации LAMP использовались в работе N. Nakamura и соавт. [42] для определения однонуклеотидных полиморфизмов. Специально синтезированные зонды с тиольной группой на 3'-концах, иммобилизовались на золотом электроде. На чип наносилась реакционная смесь, затем чип промывался и реагировал с фосфатным буфером с добавлением интеркалирующего красителя ДНК Hoechst 33258. Результат учитывается по анодному пику методом вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала. Реакция гибридизации, промывка, детекция и анализ результатов проводится в автоматическом режиме. В отличие от микрочипов с флуоресцентным анализом, метод не требует сложной маркировки флуорохромами и оборудования для учета результатов флуоресценции, что упрощает использование, пробоподготовку и снижает стоимость анализа. Однако время реакции при этом достигает двух часов. Детекцию на электрохимических микрочипах можно проводить без иммобилизованных на электроде зондов. В таких случаях используется редокс-соединения (например, RuHex) и GspSSD ДНК-полимераза, т.к. она обладает толерантностью к высокой концентрации интеркалирующих окислительно-восстановительных соединений, высокая концентрация которых может привести к ингибированию активности Bst ДНК-полимеразы. По мнению K. Hashimoto и соавт. [43] сигнал может усиливаться путем взаимодействия RuHex с пирофосфатом. Измерение проводится по катодному пику.

Существует большое количество разработок микрочипов с оптической детекцией, как на основе вышеописанных косвенных методах детекции (кальцеин [44], HNB [45]), так и прямых, с добавлением интрекалирующих красителей (SYBR Green I [46, 47], SYTO-82 [48], SYTO-9 [49] и т.д.) и электрофорезом [50]. Ряд публикаций описывает системы с возможностью детекции результатов через смартфоны и другие мобильные устройства, что несомненно является огромным преимуществом для диагностики в полевых условиях. При этом смартфоны со специальными приложениями могут выступать как устройства для анализа результата, переданного по Bluetooth [51], так и как считывающее устройство, заменяющее собой флуоресцентные детекторы [52].

Заключение. За 20 лет с момента появления петлевой изотермической амплификации было разработано множество подходов к детекции результатов LAMP. Самыми перспективными для «point-of-care» диагностики инфекционных заболеваний являются методы турбидиметрии и использование интеркалирующих красителей. Оба этих метода являются реакциями с закрытым контуром (т.е. не требуют открытия пробирок после завершения реакции), а значит сопряжены с низким риском контаминации, они универсальны, подходят для детекции в реальном времени и количественной оценки результата, не требуют дорогого оборудования и могут осуществляться быстро в портативных приборах (см. таблицу). Разработаны также приборы для детекции результатов LAMP методами турбидиметрии и флуориметрии (Loopamp Realtime Turbidimeter (LA-500), Eiken Chemical, Япония и Genie® II, «OptiGene Limited», Великобритания). Разработка подобных отечественных приборов является актуальной задачей, решение которой бу-

дет способствовать широкому внедрению метода LAMP в практику клинической лабораторной диагностики.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kumar S., Kumar A., Venkatesan G. Isothermal Nucleic Acid Amplification System: An Update on Methods and Applications. *Journal of Genetics and Genomes*. 2018;2(1):Isothermal amplification; Advantages; Disadvantages; Applications.
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63.
3. 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; 289(1):150-4.
4. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004;59(2): 145-57.
5. Yuan X., Bai C., Cui Q., Zhang H., Yuan J., Niu K., et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification assay. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(25):e10806.
6. Kumar J.S., Saxena D., Parida M., Rathinam S.. Evaluation of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for clinical diagnosis of West Nile virus in patients. *Indian J. Med. Res*. 2018;147(3):293-8.
7. Aydin-Schmidt B., Xu W., Gonzalez I.J., Polley S.D., Bell D., Shakely D., et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS One*. 2014;9(8):e103905.
8. 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;3(5):877-82.
9. Zhao J., Feng R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. *Virus Genes*. 2018.
10. Besuschio S.A., Llano Murcia M., Benatar A.F., Monnerat S., Cruz I., Picado A., et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of Trypanosoma cruzi DNA in human blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2017;11(7): e0005779.
11. Zhang Q., Shavali M., Standish I., Glenney G.W., Loch T.P., Faisal M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection and quantification of epizootic epitheliotropic disease virus (salmonid herpesvirus-3). *J. Virol. Methods*. 2019;264: 44-50.
12. Hui J., Gu Y., Zhu Y., Chen Y., Guo S.J., Tao S.C., et al. Multiplex sample-to-answer detection of bacteria using a pipette-actuated capillary array comb with integrated DNA extraction, isothermal amplification, and smartphone detection. *Lab. Chip*. 2018;18(18):2854-64.
13. 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; 46(3): 167-72.
14. Chen H.W., Weissenberger G., Ching W.M. Development of Lyophilized Loop-Mediated Isothermal Amplification Reagents for the Detection of Leptospira. *Mil. Med*. 2016;181(5 Suppl): 227-31.
15. Choopara I., Arunrut N., Kiatpathomchai W., Dean D., Somboonna N. Rapid and visual Chlamydia trachomatis detection using loop-mediated isothermal amplification and hydroxynaphthol blue. *Let. Appl. Microbiol*. 2017;64(1): 51-6.
16. Meena P.N., Kharbikar L.L., Rana R.S., Satpathy S., Shanware A., Sivalingam P.N., et al. Detection of Mesta yellow vein mosaic virus (MeYVMV) in field samples by a loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods*. 2019;263: 81-7.
17. Chahar M., Anvikar A., Dixit R., Valecha N.. Evaluation of four novel isothermal amplification assays towards simple and rapid genotyping of chloroquine resistant Plasmodium falciparum. *Exp. Parasitol*. 2018;190:1-9.

18. 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;10(8):1495-9.
19. Qin A., Fu L.T., Wong J.K., Chau L.Y., Yip S.P., Lee T.M. Precipitation of PEG/Carboxyl-Modified Gold Nanoparticles with Magnesium Pyrophosphate: A New Platform for Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017;9(12):10472-80.
20. Huang Q., Li Z., Ma Z., Li H., Mao R. Specific and rapid identification of the *Pheretima aspergillum* by loop-mediated isothermal amplification. *Biosci. Rep.* 2019; 39(2).
21. Parida M., Horioka K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(6): 2895-903.
22. Maeda H., Koikeguchi S., Fujimoto C., Tanimoto I., Yoshizumi W., Nishimura F., et al. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005;43(2):233-9.
23. Mair G., Vilei E.M., Wade A., Frey J., Unger H. Isothermal loop-mediated amplification (LAMP) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. *BMC Vet. Res.* 2013;9:108.
24. Qin C., Jian L., Xue-En F., Wei X.. Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Intervirol.* 2009;52(2): 86-91.
25. Patel J.C., Oberstaller J., Xayavong M., Narayanan J., DeBarry J.D., Srinivasamoorthy G., et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*. *PLoS One*. 2013;8(1): e54986.
26. Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glöckler J.F. Shining a light on LAMP assays—a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4): 189-94.
27. Osorbin 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; 61(1): 20-5.
28. Gudnason H., Dufva M., Bang D.D., Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(19): e127.
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;173(1): 67-74.
30. Ravan H., Yazdanparast R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D. *Anal. Chim. Acta*. 2012;733: 64-70.
31. Ravan H., Yazdanparast R. Loop region-specific oligonucleotide probes for loop-mediated isothermal amplification-enzyme-linked immunosorbent assay truly minimize the instrument needed for detection process. *Anal. Biochem.* 2013;439(2):102-8.
32. 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;153(2): 214-7.
33. Deng J., Pei J., Gou H., Ye Z., Liu C., Chen J. Rapid and simple detection of Japanese encephalitis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods*. 2015;213: 98-105.
34. Tomlinson J.A., Dickinson M.J., 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. *Phytopathology*. 2010;100(2): 143-9.
35. 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;966:71-80.
36. Lalle M., Possenti A., Dubey J.P., Pozio E. Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiol.* 2018;70:137-42.
37. Takabatake R., Kagiya Y., Minegishi Y., Futo S., Soga K., Nakamura K., et al. Rapid Screening Detection of Genetically Modified Crops by Loop-Mediated Isothermal Amplification with a Lateral Flow Dipstick. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66(29):7839-45.
38. 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;2018:2981862.
39. Mori Y., Hirano T., Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol.* 2006;6:3.
40. Khamlor T., Pongpiachan P., Parnpai R., Punyawai K., Sangsritavong S., Chokesajjawatee N. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*. 2015;83(5):891-6.
41. 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;27(2):71-9.
42. Nakamura N., Ito K., Takahashi M., Hashimoto K., Kawamoto M., Yamanaka M., et al. Detection of Six Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Rheumatoid Arthritis by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method and an Electrochemical DNA Chip. *Analytical Chemistry*. 2007;79: 9484-93.
43. 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;539:113-7.
44. Fang X., Chen H., Xu L., Jiang X., Wu W., Kong J. A portable and integrated nucleic acid amplification microfluidic chip for identifying bacteria. *Lab. Chip*. 2012;12(8):1495-9.
45. Safavieh M., Ahmed M.U., Sokullu E., Ng A., Braescu L., Zourob M. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection. *Analyst*. 2014;139(2): 482-7.
46. Connelly J.T., Rolland J.P., Whitesides G.M. «Paper Machine» for Molecular Diagnostics. *Anal. Chem.* 2015;87(15):7595-601.
47. Lam L., Sakakihara S., Ishizuka K., Takeuchi S., Arata H.F., Fujita H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber. *Biomed. Microdevices*. 2008;10(4): 539-46.
48. Ahmad F., Seyrig G., Tourlousse D.M., Stedtfeld R.D., Tiedje J.M., Hashsham S.A. A CCD-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips. *Biomed. Microdevices*. 2011;13(5): 929-37.
49. Liu C., Mauk M.G., Hart R., Bonizzoni M., Yan G., Bau H.H. A low-cost microfluidic chip for rapid genotyping of malaria-transmitting mosquitoes. *PLoS One*. 2012;7(8): e42222.
50. 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;76(13): 3689-93.
51. Wang H., Ma Z., Qin J., Shen Z., Liu Q., Chen X. et al. A versatile loop-mediated isothermal amplification microchip platform for *Streptococcus pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* testing at the point of care. *Biosens. Bioelectron.* 2019;126:373-80.
52. Loo J.F., But G.W., Kwok H.C., Lau P.M., Kong S.K., Ho H.P. et al. A rapid sample-to-answer analytical detection of genetically modified papaya using loop-mediated isothermal amplification assay on lab-on-a-disc for field use. *Food Chem.* 2019;274:822-30.

Поступила 03.12.19

Принята к печати 09.12.19

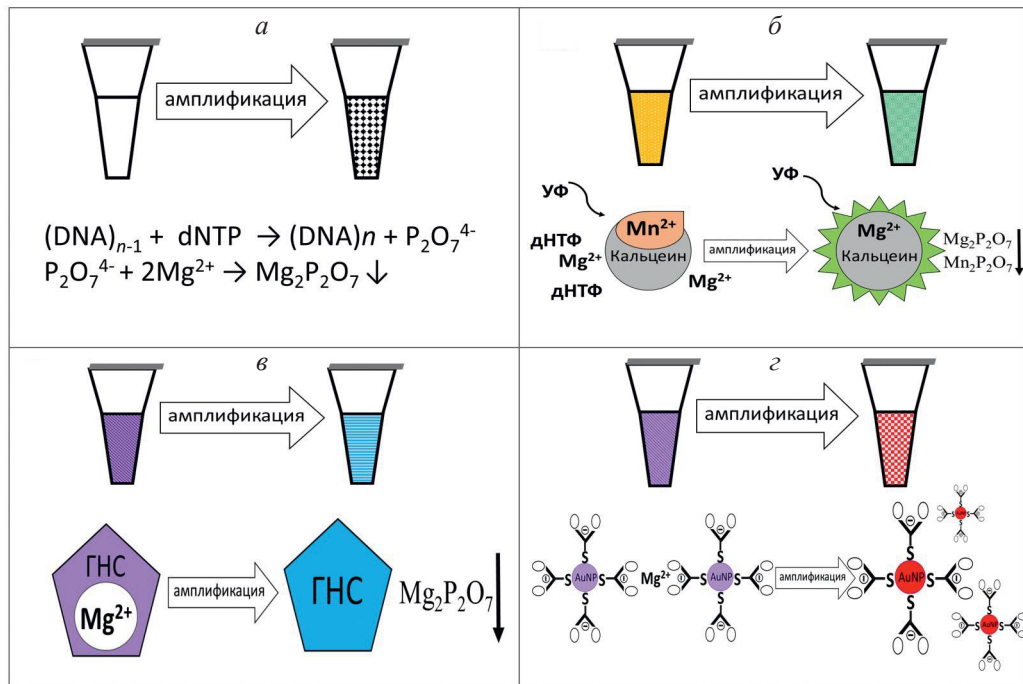


Рис. 1. Колориметрические методы детекции результатов LAMP. *а* - турбидиметрический метод: высвободившийся в ходе полимеризации ДНК ион пирогосфата реагирует с Mg^{2+} , образуя нерастворимый осадок. Повышение мутности раствора свидетельствует о положительном результате; *б* - флуоресцентная детекция с кальцеином: в ходе реакции амплификации разрушается комплекс Mn^{2+} - кальцеин, высвободившийся кальцеин начинает флуоресцировать; *в* - детекция с гидроксинафтоловым синим (ГНС): ГНС меняет цвет с фиолетового на голубой в результате связывания Mg^{2+} с пирогосфатом; *з* - модифицированные наночастицы золота (AuNP): в результате взаимодействия Mg^{2+} с пирогосфатом происходит диссоциация наночастиц и изменение цвета раствора с фиолетового на красный.

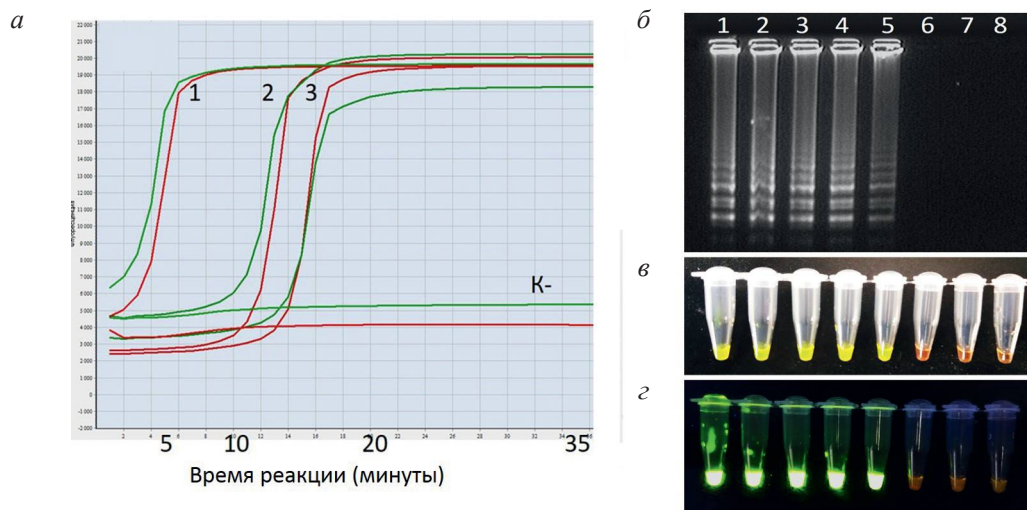


Рис. 2. Использование интеркалирующих красителей для детекции результатов реакции LAMP. *а* - SYTO-9 для детекции результатов реакции LAMP в режиме реального времени; кривые 1 - 3 - образцы, содержащие ДНК, К- - отрицательный контроль; *б* - бромистый этидий для электрофоретической детекции в агарозном геле; 1 - 5 образцы содержащие ДНК, 6 - 7 - образцы не содержащие ДНК, 8 - отрицательный контроль; *в*, *з* - SYBR-Green I для визуальной детекции ампликонов при дневном освещении и в ультрафиолетовом свете, соответственно.