



© Lorelyn Medina – FOTOLIA

DIE LABORSEITE

Isothermale Amplifikation – DNA vervielfältigen ohne PCR? Geht das?

Ja, das geht! Hinter dem Kürzel LAMP verbirgt sich eine Methode, mit der es möglich ist, ohne Thermocycler bei konstanter Temperatur DNA zu vervielfältigen. Prima, damit können wir also direkt an Ort und Stelle die DNA in einer frisch gesammelten Probe amplifizieren, um z. B. einen Erreger nachzuweisen.

Der Goldstandard versus LAMP

Seit mehr als 30 Jahren lernen und lehren wir, dass die Standardmethode zur schnellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten die Polymerasekettenreaktion – kurz PCR – ist. Wir alle wissen, dass man dafür die DNA zunächst bei etwa 95 °C denaturieren muss, dann lagern sich bei einer Temperatur zwischen 50 bis 70 °C die beiden Primer an, und schließlich werden bei 72 °C von der hitzestabilen DNA-Polymerase die neuen DNA-Stränge synthetisiert. Diese Temperaturwechsel erzeugt der Thermocycler („PCR-Maschine“) voll automatisch in schneller Abfol-

ge. Nach etwa 30 Zyklen – für die ein moderner Thermocycler etwa eine Stunde braucht – entstehen exponentiell Milliarden Kopien des gewünschten DNA-Fragments, das wir über die Wahl entsprechender Primer festgelegt haben.

Mit LAMP, der *Loop-mediated isothermal AMplifikation*, soll das alles nun bei gleichbleibender Temperatur – also ohne PCR-Maschine – gehen. Wie soll das funktionieren? Gleich vorneweg: Obwohl so einfach in der Anwendung, ist der zugrundeliegende Mechanismus, der von Notomie et al. 2000 erstmals beschrieben wurde [1], kompliziert,

und wir wollen hier nur das Grundprinzip vorstellen.

Ganz ähnlich wie bei der PCR werden für die isothermale Amplifikation Primer benötigt, die den Bereich eingrenzen, den man vervielfältigen möchte, aber anstelle von nur zwei Primern, werden vier bis sechs Primer benötigt. Außerdem muss man eine besondere DNA-Polymerase verwenden: Sie muss in der Lage sein, während der Elongation den Nicht-Matrizenstrang zu verdrängen. Das kann z. B. die *Bst*-DNA-Polymerase aus *Bacillus stearothermophilus* (Abbildung 1b und c).

Besonders kompliziert ist die Wahl und Verwendung der Primer. Auf jeder Seite werden mindestens zwei Primer benötigt (Abbildung 1a): ein Forward Internal Primer (FIP) bzw. Backward Internal Primer (BIP) sowie jeweils ein äußerer Primer dazu (F3 bzw. B3). Das Besondere am internen Primer ist, dass er am 5'-Ende mit einer Sequenz (F1c bzw. B1c) verlängert ist, die komplementär zu einer stromabwärts gelegenen Sequenz (F1 bzw. B1) ist, so dass der durch FIP bzw. BIP erzeugte DNA-Strang einen Loop (eine Schlaufe) ausbildet (Abbildung 1c). Daher also der Name *Loop-vermittelte Amplifikation* – der uns direkt zum eigentlichen LAMP-Grundprinzip führt: Zunächst werden in einem ersten Prozess hantelförmige DNA-Fragmente gebildet (Abbildung 2). An die äußeren Bereiche der Hanteln (den Loops) können nun wieder die FIP- bzw. BIP-Primer binden, so dass von hier ausgehend die DNA neu synthetisiert wird. Gleichzeitig findet auch eine Kettenverlängerung vom F1-Primer bzw. B1-Primer statt, was die „strangverdrängende“ DNA-Polymerase möglich macht. Am Ende entstehen fortwährend neue Fragmente, die aus Vielfachen der von den Primern eingerahmten Sequenz bestehen – Multimeren also, auch Konkatemere genannt (Abbildung 2). Die Choreographie dieses Prozesses ist so komplex, dass eine komplette Beschreibung das Format

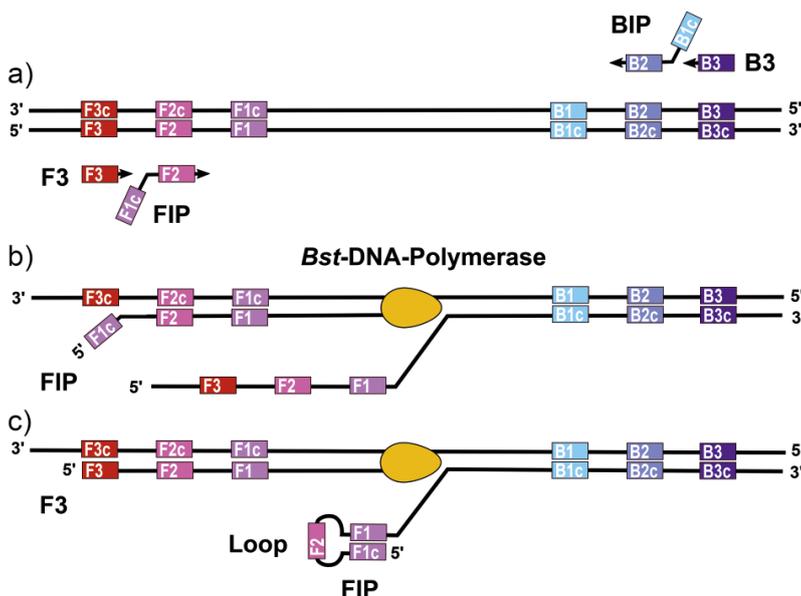


ABB. 1 Primer und Loopbildung unter Verwendung der strangverdrängenden *Bst*-DNA-Polymerase. a) Zielsequenz mit den Primer-Paaren FIP und BIP (Forward bzw. Backward Internal Primer) und den dazugehörigen äußeren Primern F3 und B3. Die identischen bzw. komplementären (mit c gekennzeichneten) Sequenzen sind auf der Ziel-DNA ebenfalls abgebildet. b) Polymerisation und Strangverdrängung durch die *Bst*-DNA-Polymerase ausgehend vom Primer FIP. c) Loop-Bildung im FIP-Primerbereich des verdrängten Stranges, Polymerisation des zweiten Stranges ausgehend von F3.

ABB. 2 Erzeugung der Hantelstrukturen und der konkateren Amplifikate. Ausgangspunkt der Konkaterbildung ist die Polymerisation der am Loop bindenden Primer FIP bzw. BIP sowie der Primerenden F1 bzw. B1. Die Konkaterbildung ist hier nur für eine Seite gezeigt.

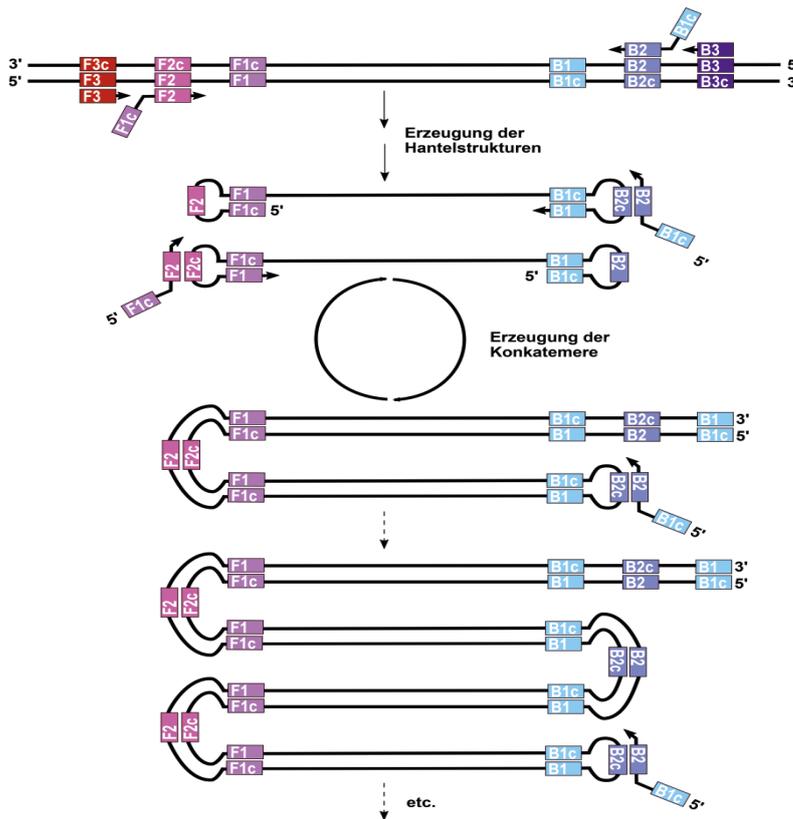


ABB. 3 Youtube-Video "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)" von New England Biolabs.

der „Laborseite“ sprengen würde. Eine sehr eindrucksvolle Animation der Abläufe finden Sie über den QR-Code (Abbildung 3), der zum Youtube-Video *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)* von New England Biolabs führt.

Nach maximal 30 Minuten – bei einer konstanten Temperatur von etwa 65 °C liegen Milliarden von Kopien des gewünschten Fragments vor, allerdings in Form von Multimeren in den unterschiedlichsten Längen („jüngere“ Fragmente sind kürzer, „ältere“ länger).

Nachweis der Amplifikate

Trennt man diese Fragmente im Agarosegel auf, erhält man eine ganze Leiter bis hin zu einem Schmier von Banden. Eine feinere Verfolgung der Amplifizierungsreaktion erfolgt mit der *Real Time*-Fluoreszenzmes- sung, indem man, ganz ähnlich wie bei der *Real Time PCR* mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs, der sich in die DNA einlagert, die zunehmende DNA-Menge verfolgt, wofür allerdings eine entsprechende Apparatur notwendig ist. Für den Einsatz „im

Feld“ kann die amplifizierte DNA auch einfach durch die Einlagerung eines Farbstoffes nachgewiesen werden, der als kolorimetrischer Nachweis direkt im Reaktionsgefäß sichtbar wird. Noch einfacher und basaler ist der Nachweis über Magnesiumphosphat-Präzipitate. Hört sich kompliziert an, ist es aber nicht: Werden bei der DNA-Polymerisation *Nukleotide* in die wachsende Kette eingebaut, entsteht, sozusagen als Abfallprodukt, Pyrophosphat. Gibt man nun Magnesium dazu, fällt dieses als weißer Niederschlag in Form von Magnesiumphosphat aus, was mit bloßem Auge im Reaktionsgefäß sichtbar ist. Eine Trübung zeigt also an, dass ein Amplifikat der gesuchten DNA vorliegt.

Vor- und Nachteile der isothermalen Amplifizierung

Die Vorteile der LAMP liegen auf der Hand: Es werden keine teuren und komplizierten Geräte benötigt; ein Heizblock, Pipetten, ein paar Eppis und die Reagenzien genügen, daher kann sie direkt vor Ort bzw. beim Endverbraucher angewandt werden.

Sie ist hoch sensitiv und spezifisch, sehr schnell und bringt eine hohe Ausbeute [1]. Ein Nachteil ist, dass sie mit diesen vielen Primern nicht so leicht zu entwickeln ist. Außerdem ist es schwierig, mehrere verschiedene DNA-Fragmente in einem Ansatz nachzuweisen (kein einfaches „Multiplexen“).

Anwendungsbereiche

Die LAMP kann hervorragend in der klinischen oder Felddiagnostik eingesetzt werden. Sie eignet sich sehr gut als diagnostisches Werkzeug für fast jeden Erregertyp, selbstverständlich auch für den Nachweis von SARS-CoV2 [2]. Für das RNA-Virus muss allerdings zunächst noch eine *Reverse Transkriptase* zugesetzt werden, um die RNA des Virus in DNA umzuschreiben, die dann amplifiziert werden kann. Anwendung findet die LAMP auch in der Lebensmittelkontrolle, hier kann z. B. der Befall mit Schimmelpilzen direkt vor Ort nachgewiesen werden [3]. Im Umweltmonitoring kann z. B. die Anwesenheit von invasiven Muscheln (genauer deren Eier und Larven) im Oberflächenwasser identifiziert werden [4].

Literatur

- [1] T. Notomi et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic acids research* 28, E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- [2] V. L. Dao Thi et al. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples, *Science translational medicine* 12, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
- [3] L. Niessen (2018). The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid diagnosis of food-borne mycotoxigenic fungi, *Current Opinion in Food Science* 23, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.007>
- [4] M. R. Williams et al. (2017). Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of Dreissena sp, *PLoS one* 12, e0186462, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186462>

Dr. Heike Ziegler, Universität Kassel, Schüler- und Öffentlichkeitslabor Science Bridge e.V., Kassel