

## Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – Eine Technologie macht Schlagzeilen und eröffnet neue Möglichkeiten



von Joanne Gibson, Ph.D., New England Biolabs, Inc.

### Polymerase Chain Reaction – PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein unverzichtbares Werkzeug in vielen molekulargenetischen Laboren und hat die Forschung und medizinische Diagnostik in den letzten Jahrzehnten grundlegend beeinflusst. Im Laufe der Jahre hat diese Technik unglaubliche Fortschritte gemacht. Bevor es Thermocycler gab, saßen die Forscher tatsächlich noch mit einem Timer in der Hand an drei verschiedenen temperierten Wasserbädern und setzten die Röhrchen für jeden PCR Schritt - Denaturierung, Annealing und Extension - von einem ins Nächste. Und bevor die Thermocycler beheizte Deckel hatten, wurde noch Mineralöl auf die Reaktion geschichtet, damit sie

nicht verdunstete. Die ersten Polymerasen mussten mühsam vor jedem Zyklus hinzugefügt werden, da sie hitzelabil waren und durch die hohen Temperaturen im Denaturierungsschritt zerstört wurden. Erst mit Einführung der hitzelabilen *Taq* DNA Polymerase (#M0273) konnte man die Polymerase einmalig für das gesamte Experiment hinzufügen. Der Reaktionsansatz wurde später durch die sog. Hot Start Polymerasen noch anwenderfreundlicher. Hier wird das Enzym erst nach Hitzedissoziation eines Inhibitors aktiv, was nicht nur die Vorbereitung der Reaktion bei Raumtemperatur ermöglicht, sondern auch die Spezifität der Amplifikation erhöht.

Heute ist die PCR viel einfacher und effizienter geworden und die bevorzugte Methode zur DNA-Amplifikation. Allerdings erfordert sie elektrische Geräte wie den Thermocycler und die Gelektrophorese zur Analyse. Zwar gehören diese heute quasi zur Grundausstattung jedes modernen Labors, aber wenn die Probennahme nicht im Labor erfolgt, kann der Transport zum nächsten Cycler schlachtweg zu lange dauern. Hierfür bieten sich alternative Nukleinsäureamplifikationen an – nicht etwa als Ersatz für die PCR, sondern als Option für andere Anwendungsbereiche.

### Loop-Mediated Isothermal Amplification – LAMP

Eine Möglichkeit zur einfacheren Nukleinsäure-Amplifikation ist die Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) (1). Vereinfacht ausgedrückt ist die LAMP eine effektive Methode zur Vervielfältigung einer Zielsequenz in einer Reaktion bei konstanter Temperatur, kombinierbar mit einer Vielzahl von einfachen Nachweismethoden.

LAMP verwendet 4 bis 6 Primer mit 6 bzw. 8 Bindestellen auf der Zielsequenz (Abbildung 1). Zwei Primer davon bewirken dabei gezielt selbsthybridisierende DNA-Schleifen, Loops, die zur sogenannten Hantelstruktur führen. Die Hantel bietet dann zahlreiche neue Initiationsstellen für weitere Strangsynthesen und ist somit der Amplifikationskeim. Die Polymerase für diese Reaktion muss zum einen bei höheren Temperaturen aktiv sein, um das Anneling zu erlauben und zum anderen den Gegenstrang während der Amplifikation verdrängen. Die *Bst* DNA Polymerase, Large Fragment (NEB #M0275) eignet sich beispielsweise ideal für diese Anwendung. Diese Besonderheiten von LAMP – also das „Hyperpriming“ auf der Zielsequenz in Verbindung mit einer strangverdrängenden DNA-Polymerase – führen mit hoher Geschwindigkeit zu einer exponentiellen Amplifikation, die nach nur 30 Minuten mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden kann. NEBs Weiterentwicklungen der *Bst* Polymerase haben dabei den Nutzwert der LAMP noch einmal gesteigert, da sie deutlich robuster gegen dUTP und gängige Inhibitoren sind. Die erhöhte dUTP-Toleranz ermöglicht jetzt erstmals für LAMP auch eine Carryover-Präven-

tion: „alte“ UTP-haltige Amplifikate werden durch das Enzym UDG vor Beginn der LAMP-Reaktion abgebaut. Dies wurde bislang nur in der qPCR eingesetzt. Und auch RNA-basierte LAMP-Reaktionen sind möglich, einfach durch Zugabe des WarmStart RTx-Enzyms, das übrigens in NEBs LAMP-Mastermixen eingesetzt wird.

Der LAMP Reaktionsverlauf kann in Echtzeit verfolgt werden z.B. mit einem dsDNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff. Für höheren Durchsatz bieten sich automatisierte Arbeitsabläufe an und Plattenlesegeräte o.ä. für Fluoreszenz- oder Absorptionsmessungen (2). LAMP wird auch außerhalb von Laboren angewendet, man benötigt lediglich eine Wärmequelle, beispielsweise ein Wasserbad bei 65°C. Dabei ist eine möglichst einfache Auswertungsmethode der DNA-Amplifikation besonders hilfreich. Verschiedene Detektionsmethoden wurden hierzu bereits getestet, z.B. das Ausfällen von Magnesiumpyrophosphat oder die Faränderung eines Metallindikators. Leider sind beide Methoden mit dem bloßen Auge kaum zu erkennen und benötigen etwa 60 Minuten, bevor die Detektion überhaupt zuverlässig möglich ist.

NEBs Wissenschaftler haben nun eine clevere Lösung entwickelt: (3). Während der Amplifikation wird mit jedem dNTP, das in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wird, ein Proton freigesetzt. In leicht gepufferter Lösung führt daher die erfolgreiche, exponentielle Amplifikation zu einer pH-Absenkung um 2-3 Einheiten. Ein pH-sensitiver Farbindikator im Ansatz macht die Amplifikation durch einfachen Farbumschlag von

Pink zu Gelb sichtbar. Somit kann die LAMP auch außerhalb des Labors in abgelegenen Regionen, in der Point-of-Care-Diagnostik oder in Hochdurchsatzanalysen in Feldstudien besonders gut angewendet werden.

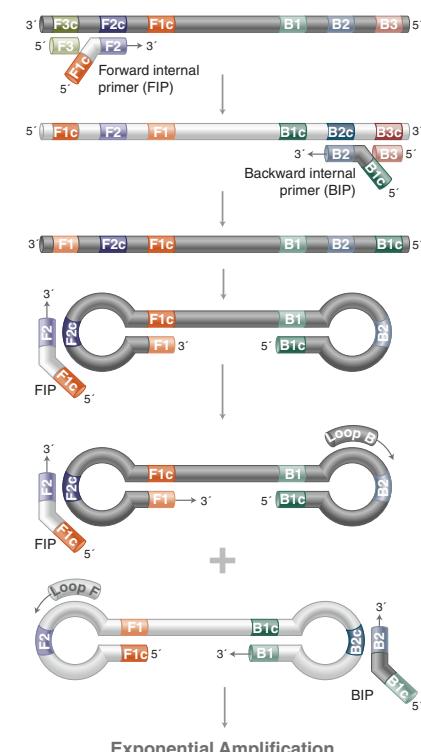
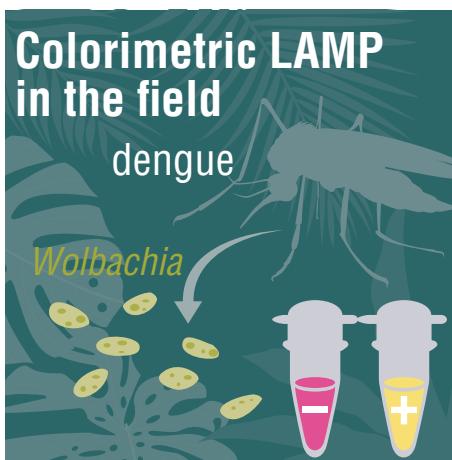


Abb 1: Schematische Darstellung der LAMP Reaktion



Es gibt kaum ein besseres Beispiel für die Vorteile einer Amplifikation vor Ort als die Arbeit des World Mosquito Program (*WMP, worldmosquitoprogram.org*), dessen Forschung darauf abzielt, Infektionskrankheiten auszurotten.

Dengue-, Chikungunya- und Zika-Viren werden durch stechende blutsaugende Arthropoden übertragen, die den Virus von Mensch zu Mensch weitergeben. Die Stechmücke (*Aedes aegypti*), ist einer

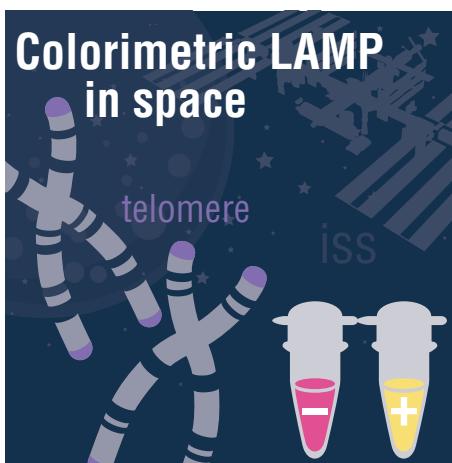
dieser arbovirensen Krankheitsüberträger. Die WHO schätzt, dass 2,5 Milliarden Menschen in Dengue-Übertragungsgebieten leben. Dengue gehört damit zu den zehn größten globalen Bedrohungen für die Gesundheit und ist die sich am schnellsten ausbreitende, durch Mücken übertragene Krankheit.

40-60% aller Insektenarten weltweit (einschließlich Schmetterlinge und Libellen) führen in ihren Fortpflanzungszellen ein mütterlich übertragenes, endosymbiotisches, gramnegatives Bakterium namens *Wolbachia pipiens*. Sobald ein Virus (z.B. Dengue) in die Wirtszellen eindringt, verhindert die Anwesenheit von *Wolbachia* das virale Wachstum, indem es die Replikation verlangsamt und die virale RNA schnell abbaut (4), wodurch Infektionen von Menschen verhindert werden. Die *Aedes aegypti*-Mücke ist eine der wenigen Ausnahmen, die *Wolbachia* normalerweise nicht tragen. Diesen Sachverhalt hat die *WMP* als potenzielle biologische Kontrollstrategie erkannt und bereits massive Anstrengungen unternommen, um die Virus-Übertragung in Dengue-endemischen Ländern Mittel- und Südamerikas sowie in Asien und im Pazifikraum durch die Verbreitung von *Wolbachia*-haltigen Moskitos zu stoppen. Die Forscher injizierten dazu in Pilotexperimenten in Nordaustralien den

*wMel*-Stamm von *Wolbachia* aus Fruchtfliegen in Eier von *Aedes aegypti* und ließen diese nach einem kontrollierten Zeitplan frei. Innerhalb weniger Monate enthielten fast 100% der Moskitos *Wolbachia*, was auch über Jahre hinweg stabil blieb (5).

Zum Screening nutzte das *WMP* LAMP in Feldanalysen und verglich die Methode mit dem etablierten *TaqMan*-qPCR-Assay. Die LAMP-Primer wurden zum Nachweis des *wsp*-Gens von zwei *Wolbachia*-Stämmen entwickelt. Mit dem WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB #M1800), passenden Primern und der Ziel-DNA konnten Sie in nur 30 Minuten bei 65°C durch einen einfachen Farbwechsel zuverlässig feststellen, ob die Mücken mit dem Endosymbionten infiziert sind: rosa = negativ (Mücke enthält keine *Wolbachia*-DNA), gelb = positiv (Mücke enthält *Wolbachia*-DNA) (6).

Das Screening von Stechmücken vor Ort mittels colorimetrischer LAMP ist im Vergleich zum *Taq-Man*-qPCR-Assay kostengünstiger und vermeidet den langwierigen Transport der Proben ins Analyselabor. Die Ergebnisse liegen außerdem in Echtzeit vor, was die Genauigkeit hinsichtlich der geografischen Lokalisierung der *Wolbachia*-Mücken entscheidend verbessert.



Das Gebiet der Weltraumbiologie steckt zwar noch in den Kinderschuhen, aber mit jedem Jahr werden

auf der Internationalen Raumstation (ISS) mehr biologische Experimente durchgeführt – zum Teil mit Hilfe von Studenten, die diese Experimente im Rahmen des jährlichen Wettbewerbs "Genes in Space" (<https://www.genesinspace.org>) entwickeln. Anfänglich wurden die Experimente für die ISS-Besatzung noch auf der Erde vorbereitet, bevor sie im Weltraum ausgeführt wurden, um sie anschließend wieder auf der Erde zu analysieren und zu interpretieren. Auf diese Weise wurde z.B. die erste PCR im Jahr 2016 an Bord der ISS im Weltraum durchgeführt (7). Die Astronauten der Station sollten die Reaktionen aber selber durchführen und analysieren können, ohne Proben zurück zur Erde schicken zu müssen. Im März 2017 wurden daher erstmals auf der ISS colorimetrische LAMP-Experimente durchgeführt, um eine spezifische repetitive Telomer-DNA-Sequenz nachzuweisen

(8). Telomere sind DNA-Proteinstrukturen an den Enden von Chromosomen, die die chromosomal Stabilität unterstützen, indem sie vor Abbau schützen; eine abnormale Telomerverkürzung ist mit menschlichen Krankheiten assoziiert. Die colorimetrischen LAMP-Assays zur Analyse der Telomerdynamik wurden dann vor Ort mit einem tragbaren Instrument miniPCR™ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte direkt auf der Station durch den einfachen Farbwechsel als Indikator, dokumentiert durch ein Foto der Röhrchen gegen ein weißes Blatt Papier. Zur Kontrolle wurden alle Reaktionen auch mit herkömmlicher PCR mittels *Taq* und Q5 DNA Polymerasen (NEB #M0494) und noch einmal parallel auf der Erde durchgeführt und letztendlich das Resultat bestätigt. Die sofortige Auswertung auf der ISS ist ein sehr beeindruckendes Beispiel für Einsatzmöglichkeiten außerhalb des Labors.

*weiter auf Seite 4...*

## Unser Tipp:

# NEB bietet praktische WarmStart LAMP Kits & Master Mixes für zuverlässige und sensitive DNA/RNA Detektion!

Jetzt bestellen:

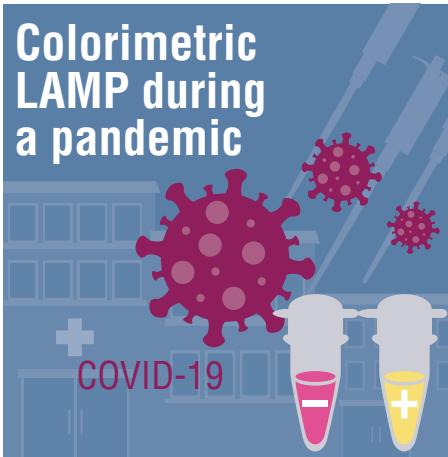
Produkt	NEB #	Größe
WarmStart LAMP Kit (DNA & RNA)	E1700S/L	100/500 rnx

Produkt	NEB #	Größe
WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA)	M1800S/L	100/500 rnx

Produkt	NEB #	Größe
WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (for carryover prevention)	M1804S/L	100/500 rnx



Detaillierte Informationen, Erklärungen, Tipps und Tricks finden Sie unter  
[www.neb.com/IsoAmp](http://www.neb.com/IsoAmp)



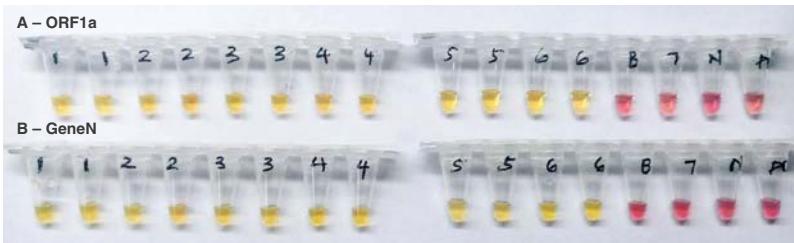
Während der aktuellen SARS-CoV-2 Pandemie ist ein schneller, flächendeckender Test auf den Infektionserreger von entscheidender Bedeutung - nicht nur, um symptomatische Fälle zu testen, sondern vor allem auch als Screening-Methode, z.B. bei der Rückkehr an den Arbeitsplatz und zur allgemeinen Überwachung des Infektionsgrades der Gesellschaft.

Das SARS-CoV-2-Virus verursacht bekanntlich grippeähnliche Symptome, sodass eine genaue molekulare

Diagnose für die Bestätigung der Infektion und die epidemiologische Überwachung unerlässlich sind. RT-qPCR ist derzeit der Standard für die Diagnose akuter Infektionen und wird anhand von Proben aus dem oberen und unteren Respirationstrakt in akkreditierten Labors durchgeführt. Die wissenschaftliche Gemeinschaft arbeitet jedoch gemeinsam an der Entwicklung schnellerer, alternativer Ansätze zum Nachweis dieses Erregers.

NEBs Wissenschaftler konnten jüngst einen colorimetrischen LAMP-Tests zum Nachweis von RNA aus dem SARS-CoV-2-Virus publizieren (9). Der Test wurde mit Proben aus Atemwegsabstrichen von bestätigten Infektionen von Patienten in Wuhan, China, durchgeführt (Abbildung 2). Die isotherme Amplifikation der SARS-CoV-2-RNA führte dabei zu einem Farbwechsel von pink zu gelb (Abbildung 3). In weiteren Studien wurde die colorimetrische LAMP mit kommerziellen RT-qPCR-Tests verglichen (10). LAMP konnte auch direkt an Proben ohne RNA-Isolierung durchgeführt werden (11), sogar mit menschlichem Speichel (12). NEB hat vor kurzem einen entsprechenden Assay zur Anwendung in der Forschung herausgebracht, das SARS CoV-2 Rapid Colorimetric LAMP Assay Kit (NEB #E2019).

Weitere Einzelheiten finden Sie auf Seite 5. Die



**Abb.: 2:** Colorimetrische LAMP bestätigt das Ergebnis einer RT-qPCR basierten SARS-CoV-2-Detektion an COVID-19-Patientenproben aus Wuhan, China. Dazu wurden RT-qPCR-positive Proben (1–6) bzw. RT-qPCR-negative Proben (7) mit Primer-Sets für ORF1a (A) und GeneN (B) per colorimetrischem LAMP untersucht. Der gelbe Farbumschlag belegt einen positiven Nachweis nach 30-minütiger Inkubation. Die Probe 7 blieb auch im LAMP-Test wie erwartet rosa, d.h. negativ. N: Negativkontrolle; B: Blindkontrolle ohne Template; P: Positivkontrolle (Plasmid als Template)

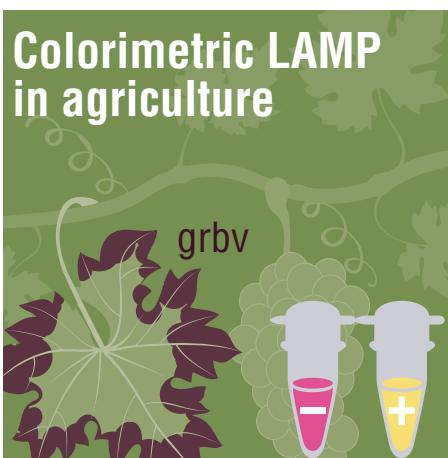
colorimetrische LAMP hat ein enormes Potenzial als Überwachungstest während der Pandemie: Sie verursacht geringe Kosten, liefert schnelle Ergebnisse und ist sehr einfach in der Anwendung. Die schnelle Probenvorbereitung und die Mobilität dieses Assays machen das System für alle Forscher interessant, die bessere Möglichkeiten zur Prävention oder Eindämmung von Krankheiten suchen.

#### Schneller und einfacher Farbumschlag zur SARS-CoV-2 RNA-Detektion per RT-LAMP



NTC = Non-Template Control  
PC = Positive Control  
IC = Internal Control

**Abb.: 3:** NEBs SARS-CoV-2 Rapid Colorimetric LAMP Assay wurde nach Protokollempfehlung mit den angegebenen Kontrollen bzw. auf positivem Material (d.h. humane Gesamt-RNA + synthetische SARS-CoV-2 RNA) bzw. einer negativen Probe (nur humane Gesamt-RNA) durchgeführt. Ein positiver Test, d.h. die isothermale Amplifikation der SARS-CoV-2 RNA ist am Farbumschlag von Pink zu Gelb leicht und zuverlässig erkennbar.



Colorimetrische LAMP Tests werden aufgrund ihrer Empfindlichkeit und der geringen Kosten (unter zwei Euro pro Reaktion) auch in der Landwirtschaft eingesetzt. Das *Grapevine Red Blotch Virus* (GRBV) wird durch die Buckelzikade *Spissistilus festinus* verbreitet und plagt die Weinbauindustrie in Nordamerika. Es verursacht eine Ertragsminderung und Einbußen in der Qualität. Bei infizierten Pflanzen können zwar charakteristische Blattveränderungen beobachtet werden, doch sind diese allein kein zuverlässiger Indikator für eine Infektion. Es sind diagnostische Tests erforderlich. Die Probenentnahme ist dabei leicht: einfach eine sterile Pipette in den Blattstiel einführen und anschließend die Pipettenspitze in steriles Wasser inkubieren. Der colorimetrische LAMP-Test findet dann vor Ort

statt (13). Kein Vergleich mit dem Zeit- und Kostenaufwand für ein herkömmliches PCR-Screening auf GRBV: Probenentnahme, Transport ins Labor, zweistündige DNA-Extraktion, PCR-Analyse und Rückübermittlung der Ergebnisse. Zwar wurde berichtet, dass die Sensitivität des LAMP-Tests um 2 Größenordnungen niedriger sein kann als bei herkömmlicher qPCR, der Vorteil der colorimetrischen LAMP liegt aber in ihrer einfachen und kostengünstigen Anwendung und Auswertung. Sie eröffnet neue Möglichkeiten als Alternative zur traditionellen PCR nicht nur für die medizinische Diagnostik.

Für alle, die Gentests außerhalb spezialisierter PCR-Labore durchführen, ist die colorimetrische LAMP mehr als eine Überlegung wert.

#### Referenzen

1. Notomi, T. et al. (2000) *Nucl. Acids. Res.*, 28:12, e63. PMID: 10871386.
2. Zhang, Y. et al. (2020) *BioTechniques*. DOI 10.2144/btn-2020-0078.
3. Tanner, N.A. et al. (2015) *BioTechniques*, 58(2):59-68. PMID: 25652028.
4. Thomas, S. et al. (2018) *PLoS Pathogens*, 14 (3): e1006879. PMID: 29494679.
5. Ryan, P.A. et al. (2020) *Gates Open Res.* 3:1547.
6. Joubert, D.A. and O'Neill, S.L. (2017) *PLoS Negl Trop Dis.*, 11:e0005275. PMID: 28052065.
7. Bogorav, A.S. et al. (2017) *NPJ Microgravity* 3:26.
8. Rubenfen, J. et al. (2020) *FASEB BioAdvances*, 2:160-165. PMID: 32161905.

9. Zhang, Y. et al. (2020) *medRxiv*, 2020.02.26.20028373.
10. Anahar, M.N. et al. (2020) *medRxiv*, 2020.05.12.20095638.
11. Dao Thi, V.L. et al. (2020) *medRxiv*, 2020.05.05.20092288.
12. Lalli, M.A. et al. (2020) *medRxiv*, 2020.05.07.20093542.
13. Romero, J.L.R. et al. (2019) *Arch Virol*, 164(5):1453-1457.