

### Tecniche di Amplificazione

La tecnica di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* più utilizzata attualmente è la PCR. L'amplificazione è molto utile per la ricerca in svariate applicazioni. La PCR ha diversi limiti, tra cui il costo (??), rischio di contaminazione, sensibilità ad inibitori, necessita di personale di laboratorio specializzato.

Sono state sperimentate diverse tecniche diverse da PCR per l'amplificazione di acidi nucleici.

### **LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)**

La LAMP è una tecnica di amplificazione isotermica. L'amplificazione avviene quindi senza i tipici cicli della PCR.

I vantaggi di questa metodica sono la semplicità nell'interpretazione del dato e la velocità nell'esecuzione dell'esperimento. La LAMP ha alta specificità e sensibilità, e non necessita di strumentazioni sofisticate.

Questa metodica permette di analizzare campioni *in situ*, con risultati in tempi rapidi (Point of care diagnostics).

### **Funzionamento**

La LAMP è una amplificazione isotermica che procede a temperatura costante di circa 65°C.

La polimerasi usata è una polimerasi termostabile con attività di *strand displacement*. Viene usata la Bst polimerasi di *Bacillus stearothermophilus*.

Si utilizzano 4 primer che riconoscono 6 regioni sul DNA target prescelto.

### *I primer*

Si vuole determinare in un campione biologico la presenza di un DNA target corrispondente ad un certo microorganismo patogeno.

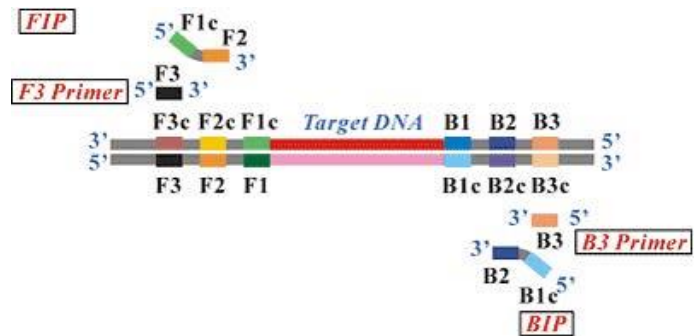
I primers vanno disegnati in modo che si appaiano alle regioni che fiancheggiano il DNA target. Andranno disegnati 2 primer interni, *FIP* e *BIP*, e due primers esterni, *F3* e *B3*.

### **FIP**

Il primer FIP, Forward Inner Primer, è costituito da 2 porzioni: F2 al 3' ed F1c al 5'. La porzione F2 è complementare alla sequenza F2c.

### F3

Il primer F3, Forward Outer Primer, è costituito dalla regione F3, che è complementare alla regione F3c.



### BIP

Il primer BIP, Backward Inner Primer, è costituito da 2 porzioni: B2 al 3' e B1c al 5'. La porzione B2 è complementare alla sequenza B2c.

### B3

Il primer B3, Backward Outer Primer, è costituito dalla regione B3, che è complementare alla regione B3c.

## Processo

L'amplificazione LAMP richiede tre passaggi:

1. Produzione della struttura iniziale
2. Amplificazione ciclica
3. Allungamento

La produzione della struttura iniziale richiede la presenza di tutti i primer prima descritti.

Le altre due fasi non necessitano della presenza dei due primer esterni F3 e B3.

### Produzione della struttura iniziale

Ipotizziamo di dover amplificare una regione target di un genoma.

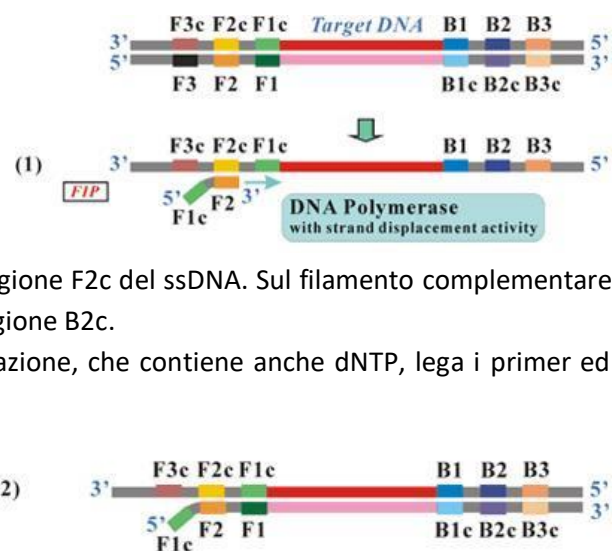
1. Alla temperatura di 65°C si ha una condizione di equilibrio dinamico per cui in parte si trova come dsDNA mentre l'altra parte si trova come ssDNA.

I primi primer introdotti sono i primer interni FIP e BIP.

Il primer FIP si associa, con la regione F2, alla regione F2c del ssDNA. Sul filamento complementare il primer BIP si associa, con la regione B2, alla regione B2c.

La DNA polimerasi presente nella miscela di reazione, che contiene anche dNTP, lega i primer ed inizia la replicazione.

2. A partire dalla regione F2 su un filamento e B2 sull'altro filamento, avviene la sintesi del filamento complementare.



3. Il primer F3 si appaia alla regione F3c. La polimerasi *Bst* ha una attività di strand displacement che gli permette di replicare il filamento di DNA, scalzando il filamento precedentemente prodotto dal primer FIP.



4. Si ottengono 2 molecole:

- a. una molecola di dsDNA, formata dal filamento prodotto a partire dal primer F3, e dalla molecola templato.

(4)



- b. una molecola di ssDNA, che è quella scalzata dalla polimerasi che ha allungato il primer F3.

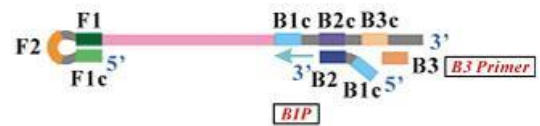
5. La molecola di ssDNA scalzata dalla polimerasi porta all'estremità 5' due regioni complementari: la regione F1 e la regione F1c, e sono intervallate dalla regione F2. Questa estremità può richiudersi formando un'ansa, grazie all'appaiamento delle regioni F1 ed F1c.

(5)



6. La regione B2c del filamento ssDNA lega la porzione B2 del primer BIP. La polimerasi sintetizza il filamento complementare, fino a quando non incontra l'ansa, linearizzandola grazie all'attività di strand displacement.

(6)



Alla regione B3c del ssDNA si lega il primer

B3, da cui la DNA polimerasi inizia la sintesi del filamento complementare, scalzando il filamento precedentemente sintetizzato a partire dal primer BIP.

7. Si ottengono due molecole:

- a. una molecola di dsDNA in cui un filamento è quello in grado di formare l'ansa,

(7)



- b. Una molecola di ssDNA, che è stata prodotta a partire dal primer BIP e scalzata dal filamento sintetizzato a partire dal primer B3.

8. La molecola di ssDNA sintetizzata a partire dal primer BIP ha alla estremità 5' una porzione B1 complementare alla porzione B2c,

(8)



intervallate dalla regione B2 ed in grado di appaiarsi per formare un'ansa. Alla estremità 3' ha la regione F1c complementare alla regione F1, intervallate dalla regione F2, ed anche queste sono in grado di appaiarsi per formare un'ansa. Questo filamento può formare quindi una **struttura a manubrio**.

Affinché si possa formare la *struttura a manubrio* sono necessari quindi tutti e quattro i primer FIP, BIP, F3 e B3.

## Amplificazione ciclica

Formatasi la struttura di DNA a manubrio ha inizio la seconda fase, rappresentata dalla amplificazione ciclica.

Grazie ai ripetuti legami dei primer FIP e BIP viene prodotta una sequenza di DNA composta da singoli frammenti di DNA target, ripetuti più volte.

La struttura a manubrio viene convertita in una struttura a forcina dall'appaiamento sulla porzione F2c dell'ansa alla porzione F2 presente sul primer FIP. Si ha quindi l'allungamento del primer, sempre in senso 5'-3', da parte della polimerasi, che scalzerà il filamento precedente.

Si formeranno così sempre molecole in grado di formare anse e forcine, che fungeranno da primer per l'amplificazione.

## Allungamento

La fase di allungamento prevede la replicazione della sequenza target mediante l'azione dei primers FIP e BIP. Si formano strutture che contengono molte copie della sequenza target, dette **strutture a cavolfiore**.

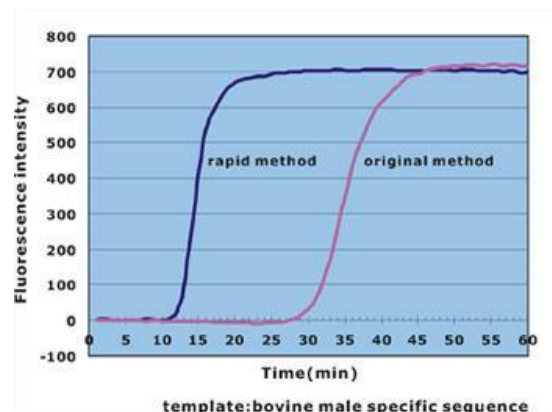
Il risultato della LAMP è una miscela di molecole di DNA di lunghezza diversa. Si parla di concatameri, dove la sequenza target è presente in più copie.

## Loop primers

Allo scopo di aumentare la velocità di amplificazione della LAMP è possibile introdurre nella miscela di reazione due ulteriori primer: Loop Forward Primer, LF, e Loop Backward Primer, LB.

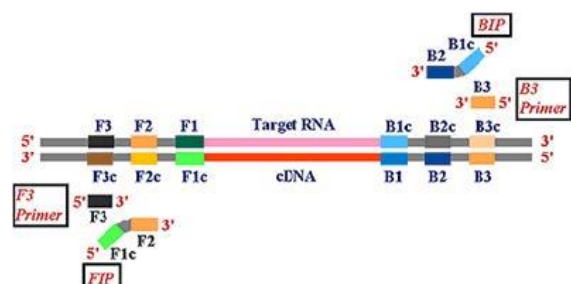
Questi primer sono complementari alle porzioni di DNA F1 ed F2 per il primer LF e B1 e B2 per il primer LB. Il legame dei primer a queste sequenze aumenta il numero di siti in cui la polimerasi può iniziare la sintesi di DNA.

L'aumento di velocità permette di abbassare notevolmente il tempo necessario per l'amplificazione.



## RT-LAMP

La procedura LAMP può essere fatta anche su RNA, utilizzando una trascrittasi inversa per convertire a DNA.



## Disegno dei primers

Il corretto disegno dei primers è fondamentale per la corretta riuscita dell'amplificazione LAMP. Esistono diversi software che permettono il design dei primers.

Ci sono comunque dei parametri di design a cui è utile fare attenzione.

- La distanza tra la regione F2 e la regione B2 deve essere compresa tra le 120 -160 basi-
- La distanza delle regioni loop, da 5' di F2 a 3' di F1, 5' di B2 e 3' di B1, deve essere compresa tra le 40 e le 60 basi.
- La distanza tra le regioni F2 ed F3, e B2 e B3 deve essere compresa tra le 0 e le 20 paia di basi.

La temperatura di melting a cui avviene la reazione, è di solito compresa tra 60-65°C, che scende a 55-60° per primers ricchi di AT.

La percentuale di GC deve essere compresa tra il 40 e il 60%.

I primers devono essere disegnati in modo che non si appaiano tra loro.

Nei primer possono essere presenti siti di taglio per enzimi di restrizione.

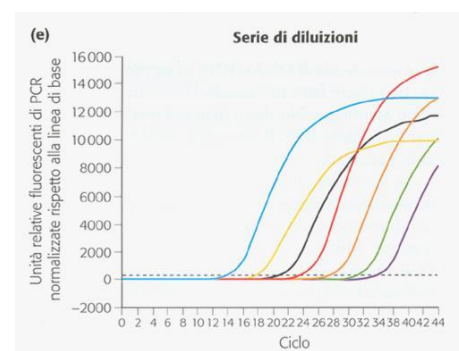
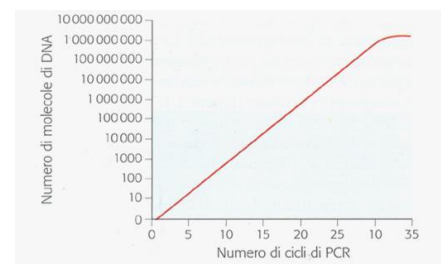
## Metodi di visualizzazione dei prodotti di reazione

Sono presenti diversi metodi per la visualizzazione dei prodotti di amplificazione LAMP. Si possono utilizzare coloranti fluorescenti intercalanti, indicatori di ioni metallici oppure si può rilevare la torbidità della soluzione attraverso un Turbidimetro.

I prodotti LAMP possono essere visualizzati sia in *Real-Time* che in *End-Point*. Nella PCR il grafico della quantità di amplificato rispetto al numero di cicli di amplificazione dà un aumento esponenziale del numero di molecole di DNA in soluzione al passare dei cicli. I risultati di una PCR tradizionale si verificano all'End-Point, cioè alla fine della procedura, spesso mediante elettroforesi. La visualizzazione nella PCR può anche essere fatta in Real-Time, ed in questo caso la visualizzazione avverrà nella fase esponenziale della PCR. La real-time PCR è quantitativa, perché l'intensità del segnale rilevato in fase esponenziale dipende dalla quantità di amplificato presente nella soluzione, che a sua volta è direttamente proporzionale alla quantità di template presente all'inizio della PCR.

Si possono fare diluizioni 1:10 del prodotto di partenza. Maggiore è la quantità di DNA stampo, minore è il numero di cicli necessari per cominciare a rilevare la formazione di prodotto.

In una PCR real time si determina il numero di cicli necessario ad ottenere una certa quantità di prodotto.

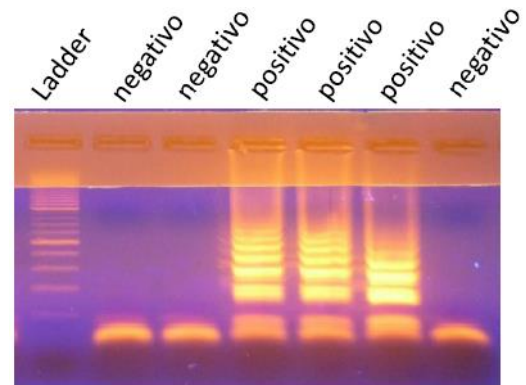


## Coloranti fluorescenti intercalanti

### Etidio Bromuro

Coloranti fluorescenti intercalanti, come l'*etidio bromuro* possono essere usati nella visualizzazione dei prodotti LAMP. L'agente intercalante può essere aggiunto nella preparazione del gel per l'elettroforesi. In seguito ad esposizione a raggi UV il prodotto della LAMP mostra un pattern simile a quello di una DNA ladder, in quanto nella miscela sono presenti prodotti di lunghezza diversa, che migrano in maniera diversa nel gel.

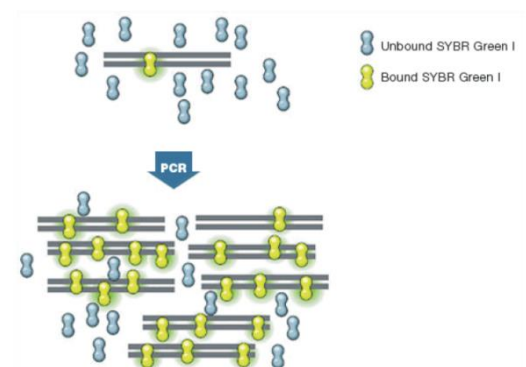
Questo è un metodo di visualizzazione dei prodotti *End-point*.



### SYBR green I

Il SYBR green è un colorante fluorescente intercalante che lega il DNA a doppia elica ne suo solco minore. È una molecola fluorescente, la cui fluorescenza aumenta notevolmente quando si lega al DNA.

Se il SYBR green viene incluso nella miscela della reazione LAMP, la fluorescenza aumenta man mano che il prodotto si accumula. Questo colorante può essere utilizzato sia *End-point* che *Real-time*.



Il SYBR green è meno pericoloso dell'*etidio bromuro*, che è un agente mutagenizzante, ma va comunque usato con cautela.

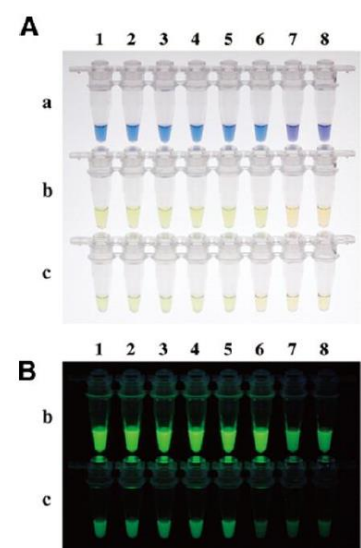
Con successive diluizioni del campione colorato con SYBR green diminuisce l'intensità della colorazione verde.

### Indicatori di Ioni

La reazione LAMP produce un'ampia quantità di ioni pirofosfato, che possono legarsi agli ioni  $Mg^{2+}$  formando *magnesio pirofosfato*. Man mano che la reazione LAMP procede, diminuisce la quantità di ioni  $Mg^{2+}$  nella miscela di reazione.

**A)** Visualizzazione day-light **a)** HNB: il colore vira da violetto (reazione negativa) al blu cielo (reazione positiva) **b)** SYBR Green e **c)** calceina: il colore vira dall'arancione (reazione negativa) al giallo (reazione positiva).

**B)** Visualizzazione in seguito ad esposizione ai raggi UV **b)** SYBR Green e **c)** calceina: la spiccata fluorescenza indica una reazione positiva. Tubi da 1 a 7: diluizioni seriali di DNA su base 10. Tubo 8: controllo negativo (Goto et al., 2009).



La reazione può essere così quantificata misurando la concentrazione di  $Mg^{2+}$  presente nella miscela di reazione. Per fare questo si usano rilevatori di ioni metallici, come il **blu di idrossinaftolo** oppure la **calceina**.

La **calceina** è un indicatore di ioni metallici che può essere incluso nella miscela di reazione della LAMP. Quando la calceina è complessata con lo ione *manganese*  $Mn^{2+}$  non mostra fluorescenza. Il pirofosfato prodotto dalla reazione LAMP può legarsi non solo agli ioni  $Mg^{2+}$  ma anche agli ioni  $Mn^{2+}$  se presenti. Nel caso in cui sia presente  $Mn^{2+}$  e calceina, il pirofosfato legherà il  $Mn^{2+}$ , scalzando la calceina che inizierà ad emettere fluorescenza, che può essere facilmente rilevata.

### Torbidità

La turbidimetria è una metodica ottica di analisi che permette di misurare la torbidità di un liquido.

L'analisi può essere fatta ad occhio nudo o mediante uno strumento quale il turbidimetro.

La reazione LAMP produce una grande quantità di pirofosfato in seguito alla sintesi di DNA. La reazione tra pirofosfato e magnesio  $Mg^{2+}$  dà luogo al *magnesio pirofosfato*, che è insolubile e precipita, aumentando la torbidità della soluzione. Questo può essere visualizzato ad occhio nudo, da usare come metodica end-point. L'analisi turbidimetrica può essere usata come metodica real-time, rilevando alterazioni nella trasmittanza della soluzione, per quantificare il materiale genetico amplificato.



rilevazione visiva di un precipitato bianco (pirofosfato di magnesio) in campioni positivi (A) ma non in campioni negativi (B)

### Applicazioni della LAMP

La metodica LAMP ha varie applicazioni.

Questo metodo di amplificazione è tra i più usati per la diagnosi rapida di malattie infettive e per la rilevazione di microorganismi patogeni nei cibi.

La LAMP è utile per la ricerca di patogeni che non crescono in coltura, o crescono in tempi troppo lunghi.

È una metodica molto utile nella diagnostica Point-of-Care ed esistono kit commerciali di diagnosi rapida di molti patogeni, tra cui SARS-Cov.

### LAMP based SNPs typing

La tecnologia LAMP può essere utilizzata per identificare la presenza di SNPs.

Vengono disegnati primer appositi, in modo da contenere ad una estremità il nucleotide WT dello SNPs che si sta cercando. Se il SNPs non è presente e l'allele è quindi WT, si avrà la complementarità dei primer e quindi l'amplificazione della sequenza.



Se l'allele è mutato, e contiene quindi un SNP non si avrà l'appaiamento delle regioni complementari dei primer, per cui non ci sarà amplificazione.

