

İnfeksiyonların Tanısında En Çok Kullanılan İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri

Mehmet ÜVEY¹, Nilgün ÜNAL^{2*}

¹ *Aniagen Anadolu Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarı, Ankara, Türkiye.*

² *Kırkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırkkale, Türkiye.*

*Corresponding author e-mail: nilkarakaya@hotmail.com

ÖZ

Nükleik asit amplifikasyonu, enfeksiyonların, tümörlerin, genetik anormalliklerin tanısında ve adli tıpta en fazla kullanılan yöntemlerdendir. İzotermal amplifikasyon yöntemleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metoduna göre sabit sıcaklıkta yapılmasıyla karmaşıklığı azaltır. Bu yöntemler, kullanılan enzim çeşitliliği, primerler, duyarlılıkları ile özgüllükleri bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu derlemede izotermal amplifikasyon yöntemlerinden en sık kullanılanları, prensipleri, kullanım alanları ve getirdikleri yenilikler ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: İzotermal Amplifikasyon, LAMP, NASBA, SDA, EXPAR

Isothermal Amplification Methods Most Used in the Diagnosis of Infections

ABSTRACT

Isothermal amplification of nucleic acid is one of the most commonly used methods to identify the infections, tumors, genetic abnormalities, and in forensic medicine. As isothermal amplification methods can be performed at one reaction temperature under simple conditions they are less complex in comparison to Polymerase Chain Reaction (PCR). These methods differ from each other with the diversity of enzymes, primers used, sensitivity and specificity. In this review, the most commonly used isothermal amplification methods, their principles, areas of use and innovations brought about are discussed.

Keywords: Isothermal Amplification, LAMP, NASBA, SDA, EXPAR

To cite this article: Üvey M, Ünal N. İnfeksiyonların Tanısında En Çok Kullanılan İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri. Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 86-95.

GİRİŞ

DNA genetik bilgileri depolayan, RNA ise hücre fonksiyonları için gerekli proteinlerin aminoasit dizisini kodlayan hücreler için hayati öneme sahip nükleik asitlerdir (Zhao ve ark. 2015). PCR pek çok alanda kullanılır ve amplifikasyon için ısı sikluslarına ihtiyaç duyulduğundan, thermocycler gibi pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Ünal ve Çınar 2012, Zhao ve ark. 2015). İzotermal amplifikasyon yöntemleriyle, PCR için gerekli olan ısı sikluslarına ihtiyaç duyulmadan sabit ısıda (su banyosu ile sağlanabilen) etkili ve hızlı bir şekilde nükleik asit amplifikasyonu yapılabilmektedir. İzotermal amplifikasyon yöntemleri ve nanoteknoloji kombinasyonlarına ilgi artmış olup bu metotlarla proteinlerin, hücrelerin, küçük moleküllerin ve iyonların tespiti yapılabilmektedir. İlk yıllarda test tüpünde yapılan izotermal amplifikasyon metotları, günümüzde mikro akışkan kanallar, kılcal kanallar ve test kâğıtlarında yapılabilmektedir (Zhao ve ark. 2015).

İzotermal amplifikasyon metotları

Belirlenmiş sabit bir ısıda amplifikasyonun yapıldığı izotermal amplifikasyon metotları, kullanılan enzim, primer, hedef nükleik asit ya da ürüne göre çok sayıda geliştirilmiş olup bu derlemenin amacı sahada en çok kullanım alanı bulunanların prensipleri ile kullanım alanlarının ele alınmasıdır.

Nükleik Asit Dizi Baz Amplifikasyonu (Nucleic Acid Sequence Base Amplification:NASBA)

İplikçik Yer Değiştirme Amplifikasyonu (Strand Displacement Amplification:SDA)

Yuvarlanan Çember Amplifikasyonu (Rolling Circle Amplification: RCA)

İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP)

Helikaz Bağımlı Amplifikasyon (Helicase Dependent Amplification:HDA)

Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (Recombinase Polymerase Amplification: RPA)

Üstel Amplifikasyon Reaksiyonu (Exponential Amplification Reaction: EXPAR)

Nükleik Asit Dizi Baz Amplifikasyonu (NASBA)

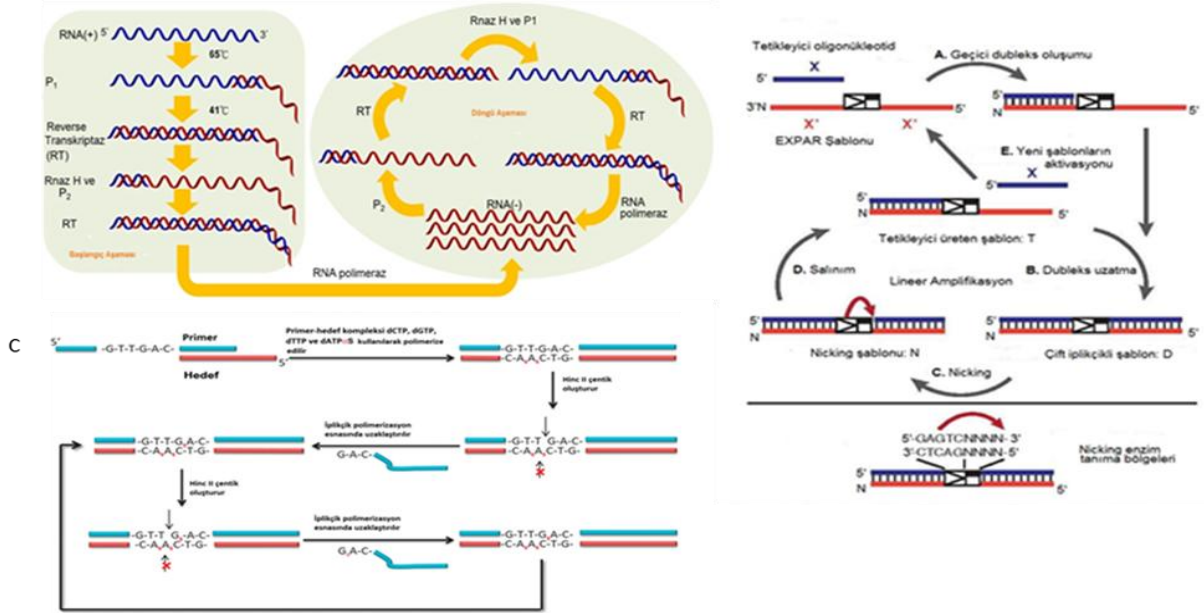
Örneklerdeki bakteriyel ve viral tek iplikçikli RNA'nın belirlenmesi için kullanılmaktadır (Ge ve ark. 2010, Mader ve ark. 2010, Won ve Min 2010, Won ve ark. 2010). Amplifikasyon için karışıma RNA'dan DNA sentezini sağlayan kanatlı Myeloblastosis virüsüne ait reverse transkriptaz

(AMV-RT), RNA-DNA hibridi oluştuğunda bu iplikçikteki RNA'yı parçalayan *E.coli* RnazH ve DNA'dan RNA sentezi sağlayan faj kökenli RNA polimeraz (T7 RNA polimeraz) olmak üzere üç farklı enzim ve ayrıca güçlü promotör bölgesine sahip iki primer ilave edilmektedir. Bu yöntemde kalıp RNA, üzerindeki hedef dizilerin karşılığı olan ve polimeraz promotör dizisi içeren primer I'le bağlanır ve reverse transkriptaz enzimiyle RNA/komplementer DNA (RNA/cDNA) elde edilir (Şekil 1). Daha sonra RnazH enzimiyle RNA parçalanarak cDNA üretilir. cDNA'nın promotör bölgesine primer II bağlanır ve reverse transkriptaz enzimi yardımıyla uzatılarak çift iplikçikli komplementer DNA (dscDNA) üretilir. Çift iplikçikli DNA zincirindeki yeni üretilen iplikçik kalıp RNA'nın homologudur. Üçüncü enzim olan T7 RNA polimeraz da güçlü promotör etkisiyle yüzlerce kopya RNA üretebilir. Üretilen her bir yeni RNA molekülü reverse transkriptaz için kalıp görevi yaparak bir sonraki turu başlatılmış olur. Tüm amplifikasyon reaksiyonu önceden tanımlanmış 41 °C sıcaklıkta gerçekleştirilir (Compton 1991).

NASBA insan ve hayvanlarda virüslerin tespitinde yoğun bir biçimde kullanılmıştır. Kanatlılarda; Newcastle hastalığının izlenmesi ve sürveyans çalışmalarında (Cui ve ark. 2007), Influenza virüsünün (Lau ve ark. 2004) tespiti için, insanlarda; hepatitis C virüs (Damen ve ark. 1999) ve SARS Coronavirüs (Keightley ve ark. 2005) tespitinde kullanıldığı bilinmektedir.

İplikçik Yer Değiştirme Amplifikasyonu (SDA)

Bu yöntemde, kullanılan primerin 5' ucunda bir restriksiyon enzim için özel bölge HincII (5'-GTT// GAC-3') ve hedefi tamamlayıcı bölge olmak üzere iki bölge bulunmaktadır. DNA polimeraz primeri uzatır ve deoksiadenosin 5'-[α-tiyo] trifosfat'ı (dATP[αs]) bünyesine katar (Şekil 1.). Daha sonra restriksiyon endonükleaz HincII enzimi tiyofosfat modifikasyonlarını içeren iplikçikleri ayıramadığından primer iplikçiginde HincII tanıma bölgesinde çentik oluşturarak iplikçigi uzaklaştırır. Endonükleazın etkisiyle 3'-OH açığa çıkar ve DNA polimeraz tarafından uzatılır. Yeni oluşturulmuş iplikçik, HincII için bir çentik bölgesi içermeye devam etmekte olup DNA polimeraz bu işlemi takip eden her sentez için ardışık bir izotermal amplifikasyonuna neden olur (Walker 1993).



Şekil 1. A: NASBA (Chang ve ark. 2012), B: EXPAR (Qian ve ark. 2012), C: SDA (Walker ve ark. 1992).
Figure 1. A: NASBA (Chang et al. 2012), B: EXPAR (Qian et al. 2012), C: SDA (Walker et al. 1992).

Yuvarlanan Çember Amplifikasyonu (RCA)

Phi29 bakteriyofaj polimerazının hedef moleküller üzerindeki iplikçik uzaklaştırma özelliğinden yararlanır (Banér ve ark. 1998, Dean ve ark. 2001). Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için çok farklı yaklaşımlar söz konusu olup lineer DNA'lar için başarıyla kullanılan asma kilit şekilli (padlock) problemlerin olduğu yöntem esas alınmıştır (Zhao ve ark. 2008, Johne ve ark. 2009, Conze ve ark. 2010). Bu problemler hibridizasyon ve ligasyonun sonrasında dairesel hale gelmeleri için tasarlanmış ve iki hedef spesifik sekansı içeren lineer oligonükleotidlerdir (Şekil 3.). Ligasyon reaksiyonunda çift tanıma yerinin var olmasıyla oldukça özgüdür. Asma kilit şekilli prob, ürünü sürekli uzatarak iplikçiklerin yerini değiştiren polimeraz için şablon görevi görür (Chang ve ark. 2012).

Çeşitli örneklerde *Salmonella enterica* dizilerinin tespit edilebilmesi amaçlı katı faz RCA tanımlanmış olup, ligasyon sonrasında lineer iplikçiklerin üretilip floresan problemlerle hibridize edilmesi sonucunda tespitin gerçekleştiği bildirilmiştir (Sato ve ark. 2010). Optimize edilmiş RCA sistemleriyle *Listeria monocytogenes*'den yaklaşık 60 molekül genomik DNA'nın tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Murakami ve ark. 2009).

İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

Son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan izotermal amplifikasyon yöntemidir. Umut veren bir yöntem olmasından dolayı çalışmalar en çok yöntemin basitleştirilmesi ve sahaya yönelik kullanımı alanlarındadır (Mori ve ark. 2013). Reaksiyonda hedef bölgeye özgü F3, F2, F1, B1c, B2c ve B3 olarak işaretlenmiş kalıp DNA'daki altı

ayırt edici bölgeyi tanıyabilen 4 primer kullanılmaktadır. Bu primerler biri ileri iç primer (FIP-Forward Inner Primer F2 ve F1c bölgelerini taşıyan) ve biri geri iç primer (BIP-Back Inner Primer B2 ve B1c bölgelerini taşıyan), iki tanede dış primer (outer primers- F3 ve B3)'ler olmak üzere toplam 4 adettir (Notomi ve ark. 2000). Reaksiyon süresinin ortalama 60 dakika olup sadece bir ısı bloğu veya termos benzeri bir ısıtıcı yardımıyla 60-65 °C ısıda yapılabildiği ve çıplak gözle sonuçların görülebileceği son derece özgün ve duyarlı bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Parida ve ark. 2008).

Primer tasarımı dikkate alındığında (Şekil 2), FIP ve BIP'in LAMP reaksiyonunda ana rolü oynadığı görülmektedir. "c" tamamlayıcı bir sekansı temsil ettiğinden dolayı, F1c dizisi F1 sekansına tamamlayıcıdır. FIP, F1c ve F2 dizilerinden, BIP, primeri de B1c ve B2 dizilerini taşıyan hibrid primerlerdir. Yapılanma aşamasında, FIP'den başlatılan DNA sentezi şu şekilde ilerler: F2 bölgesi, hedef DNA'nın F2c bölgesiyle bağlanır ve uzamayı başlatır. Benzer bir şekilde, BIP ile de DNA amplifikasyonu devam eder. F3 primeri hedef DNA'nın F3c bölgesiyle kaynaşır ve iplikçik uzaklaştırma DNA sentezi gerçekleşir. FIP'den gelen uzamış DNA iplikçığı yer değiştirerek serbest bırakılır. Serbest tek iplikli formlar 5' ucunda (şekildeki yapı 4) ilmiğe benzer bir döngü yapısı oluşturur (Tomita ve ark. 2008).

Aynı şekilde; tek iplikçikli DNA, BIP ve B3 primerleri bir şablon olarak görev alır ve Şekil 2'deki gibi her iki uçta halter benzeri ilmek yapı (şekildeki yapı 5) oluşturmak için DNA sentezi devam eder.

LAMP metodu bir reverse transkripsiyon aşaması (RT-LAMP) eklenerek sadece DNA'nın değil RNA'nın tespitinde de kullanılabilir (Parida ve ark. 2008). Reaksiyonun kontaminasyona neden olan faktörlerden PCR'a göre daha az etkilendiği ve bu yüzden de klinik örneklerin özel bir saflaştırmaya gidilmeden bile kullanılabilirliği bildirilmiştir (Kaneko ve ark. 2007). LAMP ve RT-LAMP'in yüksek sıcaklık kullanılarak proteinleri parçalayacak bir DNA ve RNA ekstraksiyonu aşamasını da içeren pek çok modifikasyonu mevcut olup tüm modifiye metodlar bir tüp içinde gerçekleştirildiğinden kontaminasyon riskinin son derece düşük olduğu bilinmektedir (Notomi ve ark. 2015).

Tüm olumlu yönlerine karşın modifiye LAMP ve RT-LAMP metodlarının çeşitli virüs türlerine göre reaksiyonun sıcaklık ve süre ihtiyaçlarının farklı olması nedeniyle özellikle de saflaştırılmış nükleik asit kullanıldığında sınırlamaları mevcut olup; herpes virüs tespiti için 96 °C de 5 dakika (Nemoto ve ark. 2011), enterovirüs tespiti için 95 °C de 30 saniye (Nie ve ark. 2012), Avian influenza virüs tespiti için 98-99 °C de 10 dakika (Mahony ve ark. 2013) bu sınırlamalara örnek olarak verilebilecek çalışmalardır. Oluşabilecek sorunların özellikle RNA virüslerinin tespitinde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Jayawardena ve ark. 2007, Nie ve ark. 2012).

LAMP amplifikasyon ürünleri gerçek zamanlı olarak bir turbiditemetre kullanılıp bulanıklığın ölçülmesiyle tespit edilebilir. Bulanıklık, DNA sentezi sırasında ortaya çıkan ve çözünmeyen büyük miktardaki pirofosfat'tan kaynaklanmaktadır (Mori ve ark. 2004). Pirofosfatlar, serbest kalsiyum iyonlarını bağlayan floresan bir metal indikatörü olan kalseinin kullanımıyla LAMP reaksiyonu esnasında gerçek zamanlı olarak da tespit edilebilmektedir (Tomita ve ark. 2008). SYBR Green gibi DNA boyalarının reaksiyona eklenmesi yoluyla tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Soliman ve El-Matbouli 2005).

Taşınabilir mini cihazların tespit amaçlı kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmış ve elektrokimyasal sensörlerin entegre edildiği bir LAMP cihazı mikro akışkanlarda kullanılmış olup cihaz; elektrokimyasal olarak DNA bağlayıcı özelliğe sahip metilen mavisinin bağlayıcı özelliğini kullanmaktadır (Hsieh ve ark. 2012).

Clostridium botulinum tip A ve B tespitinde de duyarlı bir hızlı test olarak kullanımına dair araştırmalar mevcuttur (Sakuma ve ark. 2009). Özellikle et örneklerinde *Clostridium perfringens* tespitinde (Kaneko ve ark. 2011), *Salmonella* serotiplerinin tespitinde (Zhang ve ark. 2011, Bulut ve ark. 2016), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) enfeksiyonlarının sebebi olan O157, O26 ve O111 serotiplerinin

(Hara-Kudo ve ark. 2008a, Hara-Kudo ve ark. 2008b), yine Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) O26, O45, O103, O111, O121 ve O145 serotiplerinin (Wang ve ark. 2012), Melioidosis etkeni olan *Burkholderia pseudomallei*'nin (Chantratita ve ark. 2008), *Brucella* spp.'nin (Ohtsuki ve ark. 2008), *Streptococcus pyogenes*'in (Altındış ve ark. 2017) LAMP kullanılarak hızlı ve etkin tespitine yönelik araştırmalar bulunmaktadır.

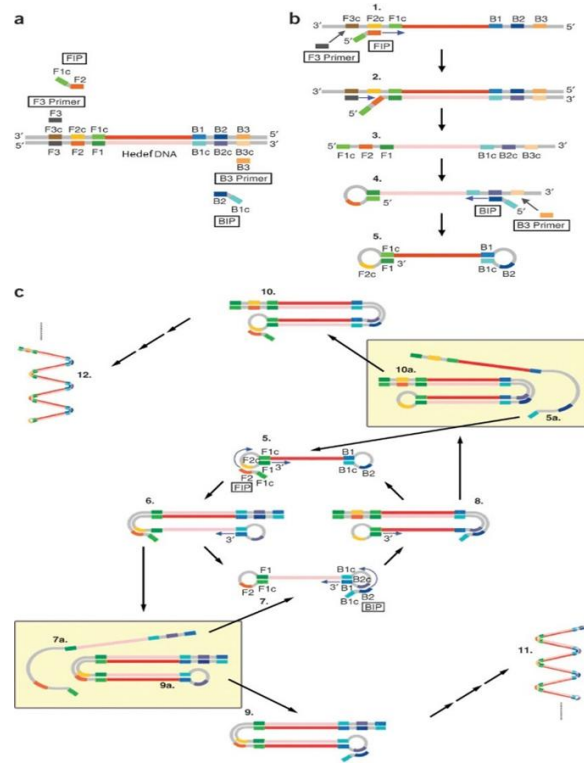
Kanatlılarda İnfeksiyöz Bursal Hastalık Virusunun (IBDV) (Chen ve ark. 2010, Tsai ve ark. 2012), Marek hastalığı serotip 1'inin (Angamuthu ve ark. 2012), İnfeksiyöz laryngotracheitis virusunun (ILTV) (Xie ve ark. 2010), Newcastle Hastalığı virusunun (NDV) (Li ve ark. 2009), *Mycoplasma synoviae*'nin (Kursa ve ark. 2015), *Mycoplasma gallisepticum*'un (Zhang ve ark. 2015), tavukları infekte eden *Eimeria* türlerinin (Barkway ve ark. 2015) belirlenmesinde sahada güvenilir bir metod olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir.

Helikaz Bağımlı Amplifikasyon (HDA)

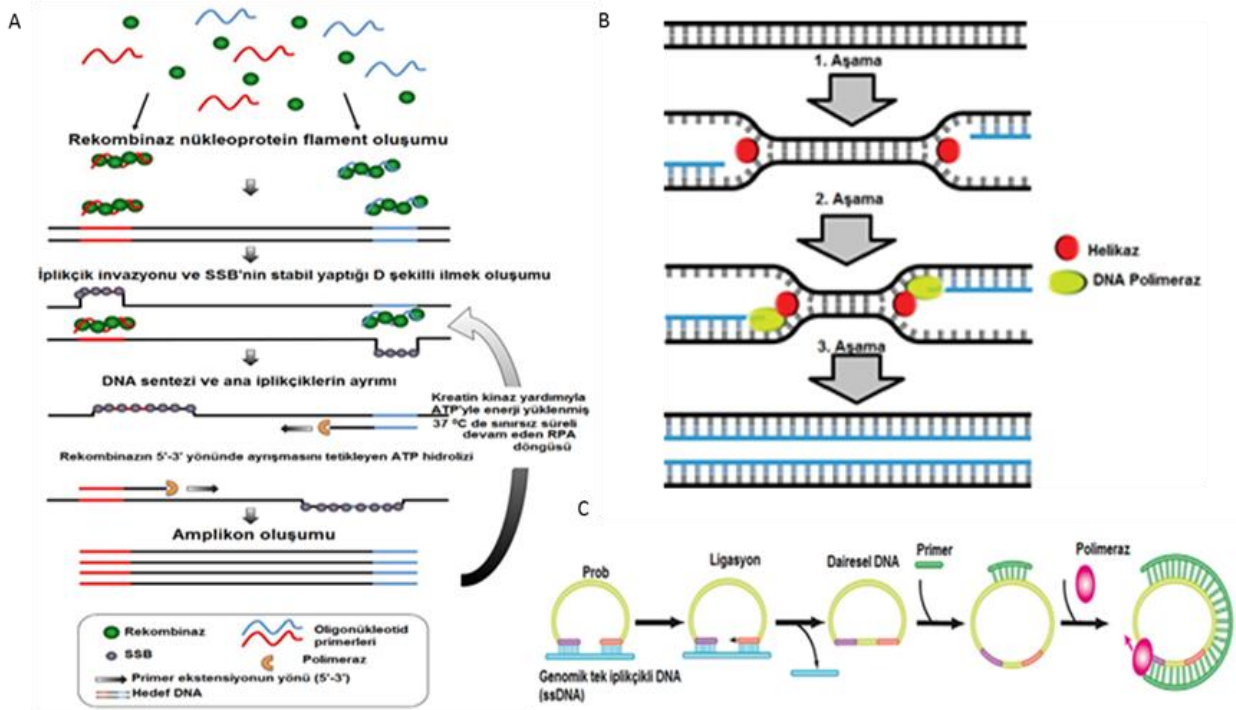
DNA helikaz, DNA polimeraz ve birden çok ssDNA binding proteinin uyum içinde çalışmasını gerektiren bir amplifikasyon türüdür. Birinci aşamada helikaz enzimi şablonun üzerine yüklenir ve hedef DNA boyunca ilerleyerek iki iplikçiyi birbirine bağlayan hidrojen bağlarını ayırıp tek iplikçikli yapıyı ortaya çıkartır (Şekil 3). Tek iplikçikli DNA'ya bağlanan (ssDNA binding) proteinler hibridizasyonu önleyerek, helikaz tarafından açığa çıkartılan tek iplikçik yapılara primerlerin bağlanmasına yardımcı olur. İkinci aşamada DNA polimeraz her primerin 3' ucunu serbest deoksiniükleotidleri (dNTP) kullanıp uzatarak iki DNA kopyası oluşturur. Üçüncü aşamada kopyalanmış olan DNA'lar bir öncekinden bağımsız olarak bir sonraki HDA döngüsüne katılıp üstel amplifikasyona sebep olurlar (Cao ve ark. 2013).

Burun sıvabı örneklerinde *Staphylococcus aureus*'un DNA gen dizisini yakalamak için hibridize edilmiş problarla HDA tekniği kullanılarak tespitine ilişkin araştırmalar mevcuttur (Frech ve ark. 2012).

Ayrıca, Herpes simplex virus 1 ve 2'nin tespitinde (Kim ve ark. 2011, Tong ve ark. 2012). *Clostridium difficile* kaynaklı ishallerin etiyolojik analizinde (Chow ve ark. 2008), Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*'un (MRSA) *mec A* ve *nuc* genlerinin tespitinde (Goldmeyer ve ark. 2007). *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi cinsel yolla bulaşan çok önemli iki hastalık etkeninin multipliks HDA yardımıyla belirlenmesinde kullanımına yönelik çalışmalar vardır (Doseeva ve ark. 2011).



Şekil 2. LAMP reaksiyonu (Tomita ve ark. 2008)
Figure 2. LAMP reaction (Tomita et al. 2008)



Şekil 3. A: RPA (Daher 2015), B: HDA (Lemieux ve ark. 2012), C: RCA (Tröger ve ark. 2015)
Figure 3. A: RPA (Daher 2015), B: HDA (Lemieux et al. 2012), C: RCA (Tröger et al. 2015)

Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (RPA)

RPA tekniği, rekombinazlar, primer ve problemlerin kullanılarak, nükleoprotein filamentlerinin oluşturulduğu ve bu filamentlerin aracılık ettiği bir

tekniktir. Bu filamentler homolog dizileri aramak üzere çift iplikçikli DNA (dsDNA) hedeflerini

tarar. Homolog bulunduğu, filament tek iplikçikli DNA'yı bağlayan protein tarafından

stabilize edilmiş çift iplikçikli DNA'da D şekilli ilmek yapısını oluşturur (Şekil 3). ATP hidrolizi ile rekombinazın nükleoprotein filamentinden ayrılması ve böylece polimeraz enziminin primerle bağlanması ve uzaması sağlanır. Oluşan dubleksler RPA döngüsünün başka bir turu için kullanılır. Sonuç olarak bu amplifikasyon metoduyla sınırsız olarak kendini devam ettirebilen RPA döngüsü gerçekleştirilir (Piepenburg ve ark. 2006).

Klinik örneklerde Leptosirozis'in teşhisine yönelik hızlı RPA testi üzerinde çalışmalar mevcuttur (Ahmed ve ark. 2014). Yine şap hastalığı etkeni olan Picornaviridae ailesinin *Aphthovirus* türüne ait şap virüsünün (FMDV) tespiti amaçlı reverse transkripsiyon RPA geliştirilmiş olup taşınabilir bir real time tarayıcıyla sadece 10 dakikada teşhis yapılabildiği rapor edilmiştir (El Wahed ve ark. 2013). Yine Middle Eastern Respiratory Syndrome (MERS) etkeni olan *Coronavirus* tespiti amaçlı RPA bazlı kitler hakkında çalışmalar mevcuttur (Sharma ve ark. 2014).

Üstel Amplifikasyon Reaksiyonu (EXPAR)

Kısa oligonükleotidlerin 55 °C'de amplifikasyonu esasına dayanan EXPAR metodunda (Van Ness ve ark. 2003) hedef genomik DNA'nın spesifik bölgelerinden enzimatik olarak oluşturulmuş ve tetikleyici X olarak adlandırılan oligonükleotidler

reaksiyonu başlatır (Tan ve ark. 2007). Tetikleyici X oligonükleotidinin amplifikasyonunu, reaksiyonda oluşan EXPAR amplifikasyon şablonu kolaylaştırır. Tetikleyici X oligonükleotidi amplifikasyon şablonunun 3' ucundaki tanıma dizisine geçici olarak bağlanır ve sekans DNA polimeraz tarafından en üstteki iplikçikte 5'-GAGTCNNNN-3' çentik atan enzim tanıma alanı oluşturularak uzatılır (Şekil 1). En üstteki iplikçik çentik atan endonükleaz Nt.BstNBI yardımıyla ayrılır. Reaksiyonun gerçekleştiği 55 °C'de amplifikasyon şablonundan yeni oluşan tetikleyiciler salınır. Tetikleyici üreten şablon yeniden lineer amplifikasyon döngüsüne katılarak dubleks uzatma, çentik atma ve salınma aşamalarıyla yeni tetikleyici oligonükleotidler oluşturulur. Oluşan bu oligonükleotidler de ilave şablonların oluşmasına yardımcı olarak tetikleyici X oligonükleotidinde bir çoğalma meydana getirir (Tan ve ark. 2008).

Şimdilik EXPAR metodunun en uygun kullanım alanı mikroRNA'ların tespiti olarak görülmekte olup çeşitli geliştirmeler yapılarak biyolojik örneklerdeki genomik DNA'nın tespiti yapılarak mutasyonlar, genotiplendirme ve patolojen etken belirleme gibi alanlarda daha yaygın olarak kullanımının hedeflendiği bildirilmiştir (Jia ve ark. 2010).

Tablo 1. Önemli İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri (Zhao ve ark. 2015)

Table 1. Important Isothermal Amplification Methods (Zhao et al. 2015)

Metod	Gerekli enzimler	Primer	Isı (°C)	Reaksiyon zamanı	Hedef	Amplikon	Verim
NASBA	Reverstranskriptaz ve RNA polimeraz (RNaz H)	2	~41	1.5-2	RNA (DNA)	RNA, DNA	10 ⁶ -10 ⁹
SDA	DNA polimeraz, NEaz	2 veya 4	37	2	DNA	dsDNA	10 ⁷
RCA	DNA polimeraz, NEaz	0	60	1-3	DNA (RNA)	DNA	Genomik DNA'nın yaklaşık 60 kopyası
LAMP	DNA polimeraz	4	60-65	<1	DNA	DNA	10 ⁹
HDA	DNA polimeraz, helikaz	2	37-65	0.5-2	DNA	DNA	10 ⁷
RPA	DNA polimeraz, Rekombinaz	2	37-42	0.5-1,5	DNA	DNA	Genomik DNA'nın yaklaşık 10 kopyası
EXPAR	DNA polimeraz, NEaz	0	~60	<0.5	DNA/ RNA	DNA	10 ⁶ -10 ⁸

SONUÇ

Son yirmi yılda; nükleik asitlerin basit ve hızlı bir şekilde ve oldukça yüksek bir hassasiyetle tespit edilmesi amacıyla çeşitli izotermal nükleik asit amplifikasyon teknikleri ardi ardına geliştirilmiştir. Biyoteknoloji, kimya ve nanoteknolojideki hızlı gelişmelerden yararlanan bu izotermal yöntemler hedefleri genişletilerek DNA ve RNA kadar

hücreler, proteinler, küçük moleküller ve hatta iyonları tespit etmek için de kullanılabilir olmuştur. Bu uygulamaların sekanslama, in situ ya da hücre içi biyogörüntüleme de kullanılabilirliği de fazlasıyla gösterilmiştir. Ayrıca, izotermal amplifikasyonun mikro sistemlere ve taşınabilir cihazlara entegrasyonu nükleik asit bazlı saha teşhislerinin yüksek hassasiyetle yapılmasını kolaylaştırmıştır.

Son yıllarda izotermal amplifikasyon yöntemlerinde önemli gelişme ve iyileşmeler sağlanmasına rağmen, hala bu teknolojilerin geliştirilebileceği alanlar mevcuttur. İzotermal reaksiyonların başlangıç noktasını ayarlamak için kontrol işlemlerinin yapılması (örneğin, bir ısı aktivasyonu aşaması) test performansı ve kantitatif potansiyelini artırmak için önemli bir etkiye sahiptir. Sonuç olarak, izotermal amplifikasyon teknolojilerinin moleküler tanının geleceğinde önemli ve büyüyen bir role sahip olduğu açıktır.

KAYNAKLAR

- Ahmed A, Van Der Linden H, Hartskeerl RA.** Development of a recombinase polymerase amplification assay for the detection of pathogenic *Leptospira*. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11:4953-4964.
- Altındış M, Elmas M, Kılıç Ü, Aslan F G, Küçükpara G, Köroğlu M.** Grup A Streptokokların hızlı moleküler tanısında loop-mediated isothermal amplification PCR (LAMP-PCR). J Biotechnol Strategic Health Res. 2017;1:11-16.
- Angamuthu R, Baskaran S, Gopal DR, Devarajan J, Kathaperumal K.** Rapid detection of the marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2012; 50:961-965.
- Banér J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U.** Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. Nucleic Acids Res. 1998; 26: 5073-5078.
- Barkway CP, Pocock RL, Vrba V, Blake DP.** Loop-mediated isothermal amplification (lamp) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. JoVE. 2015:e52552.
- Bulut E., Köker M. P., Ünal N., Yildirim M.** *Salmonella enterica*'nın LAMP ile belirlenmesi XII. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kongre Özet Kitabı p: 47-48 pp., 30 Ağustos-02 Eylül 2016 Kapadokya, Nevşehir, 2016.
- Cao Y, Kim H-J, Li Y, Kong H, Lemieux B,** (2013) Helicase-dependent amplification of nucleic acids current protocols in molecular biology. Eds: John Wiley & Sons, Inc., p: 15.11.01-15.11.012.
- Chang C-C, Chen C-C, Wei S-C, Lu H-H, Liang Y-H, Lin C-W.** Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. Sensors. 2012; 12: 8319-8337.
- Chantratita N, Meumann E, Thanwisai A, Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Wannapasni S, Tumapa S, Day NPJ, Peacock SJ.** Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *tts1* gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol, 2008; 46: 568-573.
- Chen H-T, Zhang J, Ma Y-P, Ma L-N, Ding Y-Z, Liu X-T, Cai X-P, Ma L-Q, Zhang Y-G, Liu Y-S.** Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of infectious bronchitis virus in infected chicken tissues. Mol Cell Probes. 2010; 24:104-106.
- Chow WHA, McCloskey C, Tong Y, Hu L, You Q, Kelly CP, Kong H, Tang Y-W, Tang W.** Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. J Mol Diagn. 2008; 10:452-458.
- Compton J.** Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 1991; 350:91-92.
- Conze T, Göransson J, Razzaghian HR, Ericsson O, Öberg D, Akusjärvi G, Landegren U, Nilsson M.** Single molecule analysis of combinatorial splicing. Nucleic Acids Res. 2010; 38:e163-163.
- Cui S-J, Fung Y-WW, Lau LT, Liu W-B, Wang Y-F, Tong G-Z, Chen J, Yu ACH.** Detection of Newcastle disease virus using nucleic acid sequence-based amplification. Biologicals. 2007; 35:13-18.
- Daher RK.** Recombinase polymerase amplification technology: Assessment for nucleic acid-based point-of-care diagnostics, Doktora Tezi (Ph.D.), L'Université Laval, Québec, Canada, 2015.
- Damen M, Sillekens P, Cuypers H, Frantzen I, Melsert R.** Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. J Virol Methods. 1999; 82:45-54.
- Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS.** Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. Genome Res. 2001; 11: 1095-1099.
- Doseeva V, Forbes T, Wolff J, Khripin Y, O'neil D, Rothmann T, Nazarenko I.** Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 71:354-365.
- El Wahed AA, El-Deeb A, El-Tholoth M, El**

- Kader HA, Ahmed A, Hassan S, Hoffmann B, Haas B, Shalaby MA, Hufert FT.** A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *PloS one*. 2013; 8:e71642.
- Frech GC, Munns D, Jenison RD, Hicke BJ.** Direct detection of nasal *Staphylococcus aureus* carriage via helicase-dependent isothermal amplification and chip hybridization. *BMC Res Notes*. 2012; 5:430.
- Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, Wu B, Wang H, Shi Z.** Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Virol Methods*. 2010; 163:495-497.
- Goldmeyer J, Kong H, Tang W.** Development of a Novel One-Tube Isothermal Reverse Transcription Thermophilic Helicase-Dependent Amplification Platform for Rapid RNA Detection. *J Mol Diagn*. 2007; 9:639-644.
- Hara-Kudo Y, Konishi N, Ohtsuka K, Hiramatsu R, Tanaka H, Konuma H, Takatori K.** Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: A collaborative study. *Int J Food Microbiol*. 2008a; 122:156-161.
- Hara-Kudo Y, Niizuma J, Goto I, Iizuka S, Kaji Y, Kamakura K, Suzuki S, Takatori K.** Surveillance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef with effective procedures, independent of serotype. *Foodborne Pathogen Dis*. 2008b; 5:97-103.
- Hsieh K, Patterson AS, Ferguson BS, Plaxco KW, Soh HT.** Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic dna at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Angewandte Chemie*. 2012; 124:4980-4984.
- Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, Chan KH, Chen H, Guan Y, Peiris J, Poon L.** Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13:899.
- Jia H, Li Z, Liu C, Cheng Y.** Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification. *Angew Chem Int Ed*. 2010; 49: 5498-5501.
- Johne R, Müller H, Rector A, Van Ranst M, Stevens H.** Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol*. 2009; 17: 205-211.
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T.** Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 499-501.
- Kaneko I, Miyamoto K, Mimura K, Yumine N, Utsunomiya H, Akimoto S, McClane BA.** Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples by using molecular methods. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:7526-7532.
- Keightley MC, Sillekens P, Schippers W, Rinaldo C, George KS.** Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J Med Virol*. 2005; 77:602-608.
- Kim H-J, Tong Y, Tang W, Quimson L, Cope VA, Pan X, Motre A, Kong R, Hong J, Kohn D.** A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Clin Virol*. 2011; 50:26-30.
- Kursa O, Woźniakowski G, Tomczyk G, Sawicka A, Minta Z.** Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* by loop-mediated isothermal amplification. *Arch Microbiol*. 2015; 197:319-325.
- Lau L-T, Banks J, Aherne R, Brown IH, Dillon N, Collins RA, Chan K-Y, Fung Y-WW, Xing J, Albert C.** Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313:336-342.
- Lemieux B, Li Y, Kong H, Tang Y-W.** Near instrument-free, simple molecular device for rapid detection of herpes simplex viruses. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012; 12:437-443.
- Li Q, Xue C, Qin J, Zhou Q, Chen F, Bi Y, Cao Y.** An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of Newcastle disease virus. *Arch Virol*. 2009; 154:1433-1440.
- Mader A, Riehle U, Brandstetter T, Stickeler E, Zur Hausen A, Rühle J.** Microarray-based amplification and detection of RNA by nucleic acid sequence based amplification. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 397:3533-3541.
- Mahony J, Chong S, Bulir D, Ruyter A, Mwawasi K, Waltho D.** Multiplex lamp (M-LAMP) assay for the detection of

- influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *J Clin Virol.* 2013; 58:127-131.
- Mori Y, Kanda H, Notomi T.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Inf Chemother.* 2013; 19:404-411.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T.** Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods.* 2004; 59:145-157.
- Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M.** Sensitive isothermal detection of nucleic acid sequence by primer generation–rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37:e19.
- Nemoto M, Ohta M, Tsujimura K, Bannai H, Yamanaka T, Kondo T, Matsumura T.** Direct detection of equine herpesvirus type 1 DNA in nasal swabs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Vet Med Sci.* 2011; 73:1225-1227.
- Nie K, Qi S-X, Zhang Y, Luo L, Xie Y, Yang M-J, Zhang Y, Li J, Shen H, Li Q, Ma X-J.** Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA extraction for the detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 in nasopharyngeal swab specimens. *PLoS ONE,* 2012; 7: e52486.
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 2015; 53:1-5.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:e63-e63.
- Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI.** Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008; 104:1815-1823.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K.** Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008; 18:407-421.
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA.** DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol,* 2006; 4:e204.
- Sakuma T, Kurosaki Y, Fujinami Y, Takizawa T, Yasuda J.** Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol.,* 2009; 106:1252-1259.
- Sato K, Tachihara A, Renberg B, Mawatari K, Sato K, Tanaka Y, Jarvius J, Nilsson M, Kitamori T.** Microbead-based rolling circle amplification in a microchip for sensitive DNA detection. *Lab Chip.* 2010; 10:1262-1266.
- Sharma N, Hoshika S, Hutter D, Bradley KM, Benner SA.** Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS). *Chem Bio Chem,* 2014; 15:2268-2274.
- Soliman H, El-Matbouli M.** An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol.* 2005; 2:1-8.
- Tan E, Erwin B, Dames S, Ferguson T, Buechel M, Irvine B, Voelkerding K, Niemz A.** Specific versus nonspecific isothermal dna amplification through thermophilic polymerase and nicking enzyme activities. *Biochemistry.* 2008; 47: 9987-9999.
- Tan E, Erwin B, Dames S, Voelkerding K, Niemz A.** Isothermal DNA Amplification with Gold Nanosphere-Based Visual Colorimetric Readout for Herpes Simplex Virus Detection. *Clin Chem.* 2007; 53:2017-2020.
- 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; 3:877-882.
- Tong Y, Mccarthy K, Kong H, Lemieux B.** Development and comparison of a rapid isothermal nucleic acid amplification test for typing of herpes simplex virus types 1 and 2 on a portable fluorescence detector. *J Mol Diagn.* 2012; 14:569-576.
- Tröger V, Niemann K, Gärtig C, Kuhlmeier D.** Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015;6:1-19.
- Tsai S-M, Liu H-J, Shien J-H, Lee L-H, Chang P-C, Wang C-Y.** Rapid and sensitive detection of infectious bursal disease virus by reverse transcription loop-mediated

- isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 2012; 181:117-124.
- Ünal N, Çınar OD.** Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod*, 2012; 44: 369-375.
- Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ.** Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *P Natl A Sci India B*. 2003; 100:4504-4509.
- Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP.** Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20:1691-1696.
- Walker GT.** Empirical aspects of strand displacement amplification. *Genome Res*, 1993; 3: 1-6.
- Walker GT, Nadeau JG, Spears PA, Schram JL, Nycz CM, Shank DD.** Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22:2670-2677.
- Wang F, Jiang L, Yang Q, Prinyawiwatkul W, Ge B.** Rapid and specific detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in ground beef, beef trim, and produce by loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78:2727-2736.
- Won JY, Min J.** Highly sensitive *Escherichia coli* O157: H7 detection in a large volume sample using a conical polymer tube chamber consisting of micro-glass beads. *Biosens Bioelectron*, 2010; 26:112-117.
- Won JY, Min J, Park J-H.** Bacteria adsorption on hydrophilic surfaces for the sensitive detection of pathogenic bacteria using a single tube chamber system. *Biosens Bioelectron*. 2010; 26:1763-1767.
- Xie Q-M, Ji J, Pickens TT, Du L-Q, Cao Y-C, Li H-M, Wang L-G, Ma J-Y, Bi Y-Z.** Rapid detection of infectious laryngotracheitis virus isolates by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 2010; 165:71-75.
- Zhang F, Bao S, Yu S, Cheng J, Tan L, Qiu X, Song C, Dai Y, Fei R, Ding C.** Development of a loop-mediated isothermal amplification targeting a gene within the pyruvate dehydrogenase complex, the *pdhA* gene, for rapid detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *J Vet Diagn Invest*. 2015; 27:260-267.
- Zhang G, Brown EW, González-Escalona N.** Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:6495-6501.
- Zhao W, Brook MA, Li Y.** (2008) Periodic Assembly of Nanospecies on Repetitive DNA Sequences Generated on Gold Nanoparticles by Rolling Circle Amplification Nanostructure Design: Methods and Protocols. Eds: Gazit E, Nussinov R. Totowa, NJ Humana Press, p: 79-90.
- Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C.** Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical Rev*. 2015; 115:12491-12545.