



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάπτυξη μιας ισοθερμικής
τεχνικής 'RT- Loop Mediated
Isothermal Amplification (LAMP)'
για την ανίχνευση εμβολιακών
στελεχών SABIN

Καραναστάσης Στυλιανός

Λάρισα 2016

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Ανάπτυξη μιας ισοθερμικής τεχνικής 'RT- Loop Mediated Isothermal Amplification

(LAMP)' για την ανίχνευση εμβολιακών

στελεχών SABIN

Development of an isothermal technique 'RT- Loop Mediated Isothermal

Amplification (LAMP)' for the detection of SABIN vaccine strains

Τριμελής Επιτροπή

1. **Π. Μαρκουλάτος** (Επιβλέπων) - Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. **Δ. Μόσιαλος**- Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Γ. Αμούτζιας**- Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Abstract

Although Enteroviruses are considered to be one of the simplest virus species, they still manage to show great diversity. Serologic studies have distinguished over 100 Human enterovirus serotypes on the basis of antibody neutralization tests.

All genera of the Picornaviridae family, including Enteroviruses, possess a positive-sense (+) single-stranded RNA molecule. Their genome consists of a highly conserved 5'-UTR, a single Open Reading Frame (ORF), a 3'-UTR and a poly(A)-tail.

Human Enteroviruses are associated with several diseases. Most attention has been drawn towards the Polioviruses, due to the severity of symptoms that may cause (Paralytic poliomyelitis, aseptic meningitis, e.t.c.). Therefore, its eradication seems utterly important for public health. Great progress has been achieved already over last years, as polio cases have decreased dramatically and wild type 2 PV has been officially eradicated.

In the present study, a LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) assay was developed, which can detect all three Sabin serotypes (the strains used for the attenuated Oral Polio Vaccine) in a simple, sensitive and specific way.

LAMP is a novel nucleotide acid amplification method that features high sensitivity, specificity, and rapidity under isothermal conditions. An additional advantage is its relatively low cost compared to conventional methods, e.g. PCR.

After standardization, the lowest concentration that LAMP can detect were 10 TCID₅₀ for all three SABIN strains. Furthermore, detection via LAMP was successful in ten clinical specimens of SABIN origin (10/10 positive). As a result, LAMP has proven once again its usefulness. It's pretty possible that it will gain even more popularity in the next few years.

Περίληψη

Παρά την εξαιρετικά απλοϊκή τους δομή (δομική και γενωμική), οι Εντεροϊοί εμφανίζουν εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία. Μέσω της διαδικασίας της οροεξουδετέρωσης έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 100 ορότυποι εντεροϊών του ανθρώπου.

Όλα τα γένη της οικογένειας Picornaviridae, συμπεριλαμβανομένων και των Εντεροϊών, διαθέτουν μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Το γονιδίωμά τους αποτελείται από μια υψηλά διατηρημένη 5' UTR, ένα μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μια 3' UTR και μια πολύ-A ουρά.

Οι εντεροϊοί έχουν συσχετισθεί με ένα πλήθος σοβαρών ασθενειών. Περισσότερη μελέτη έχει διεξαχθεί πάνω στον ιό της πολιομυελίτιδας λόγω της σοβαρότητας των ασθενειών που είναι σε θέση να προκαλέσει π.χ. πολιομυελίτιδα και άσηπτη μηνιγγίτιδα. Γι' αυτό τον λόγο, η εκρίζωσή τους θεωρείται υψίστης σημασίας για την παγκόσμια ανθρώπινη υγιεινή. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια είναι εκπληκτική: τα κρούσματα από πολιοϊό έχουν μειωθεί κατακόρυφα, ενώ η παγκόσμια εκρίζωση του άγριου πολιοϊού τύπου 2 είναι πλέον γεγονός.

Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου για την ανίχνευση όλων των οροτύπων SABIN (τα στελέχη που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του ζωντανού- εξασθενημένου εμβολίου OPV). Η μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτό τον σκοπό ήταν η LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).

Η LAMP, μία σχετικά νέα μέθοδος πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων, χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα εκτέλεσης κάτω από ισοθερμικές συνθήκες. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα είναι το σχετικά χαμηλότερο κόστος που απαιτεί η διεξαγωγή της σε σχέση με αυτό άλλων μοριακών μεθόδων, όπως π.χ. PCR.

Μετά την βελτιστοποίηση των συνθηκών του πρωτοκόλλου της LAMP, το τελικό όριο ανίχνευσης ήταν 10 TCID₅₀ και για τα τρία πρότυπα στελέχη SABIN 1, 2 και 3. Επίσης, η ανίχνευση των ιών SABIN ήταν επιτυχής και στα 10 κλινικά δείγματα που εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο. Συμπερασματικά, η LAMP επιβεβαιώνεται και πάλι ως ένα αξιόπιστο εργαλείο της μοριακής βιολογίας, το οποίο πιθανόν να κερδίσει περισσότερο έδαφος στα επόμενα χρόνια.

Περιεχόμενα

| | |
|------------------------------------------------------|----|
| 1. Εισαγωγή | 1 |
| 1.1 Γενικά στοιχεία περί ιολογίας & ιών..... | 1 |
| 1.2 Ταξινόμηση ιικών ομάδων | 2 |
| 1.3 Ιοί Picorna..... | 2 |
| 1.3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά..... | 2 |
| 1.3.2 Δομικά χαρακτηριστικά..... | 3 |
| 1.3.3 Οργάνωση γονιδιώματος | 4 |
| 1.3.4 Κύκλος αντιγραφής των picorna ιών..... | 8 |
| 1.4 Ιοί polio και στελέχη SABIN..... | 12 |
| 1.5 LAMP | 13 |
| 1.5.1 Εφαρμογές..... | 13 |
| 1.5.2 Γενικά χαρακτηριστικά LAMP..... | 14 |
| 1.5.3 Υλικά | 16 |
| 1.5.4 Ανάλυση των βημάτων..... | 18 |
| 2. Στόχος | 24 |
| 3. Υλικά και Μέθοδοι | 24 |
| 3.1 Ιοί, Κυτταρικές σειρές και κλινικά δείγματα..... | 24 |
| 3.2 Μέτρηση ιικού τίτλου | 25 |
| 3.3 Εκχύλιση γενετικού υλικού | 26 |
| 3.4 Αντίστροφη Μεταγραφή..... | 27 |
| 3.5 Εκκινητές LAMP | 28 |
| 3.6 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων LAMP | 29 |
| 4. Πειραματικό Μέρος | 30 |
| 5. Συζήτηση | 34 |
| 6. Βιβλιογραφία | 36 |

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά στοιχεία περί ιολογίας & ιών

Η ιολογία αποτελεί ένα ενδιαφέρον και ταχέως εξελισσόμενο αντικείμενο στον χώρο της επιστήμης, κυρίως για λόγους πρόληψης, πρόγνωσης και θεραπείας. Σε μερικές περιπτώσεις εμπλέκεται και ο οικονομικός τομέας, όπως σε διάφορα ζωικά και φυτικά προϊόντα [1-3].

Οι ιοί, το αντικείμενο μελέτης της ιολογίας, είναι μοναδικοί στην φύση τους. Πρόκειται για γενετικά στοιχεία, τα οποία αν και αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα χρωμοσώματα των κυττάρων, εξαρτώνται πλήρως από αυτά καθαυτά τα κύτταρα που μολύνουν, καθώς δεν εμφανίζουν δικό τους μεταβολισμό. Οι ξενιστές περιλαμβάνουν ανθρώπους, ζώα, έντομα, βακτήρια, μύκητες και φυτά. Γενικά, έχει απασχολήσει πολύ την επιστημονική κοινότητα το ερώτημα εάν η κατάταξη αυτών των υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικών παρασίτων ως 'μικροοργανισμοί' είναι έγκυρη ή όχι, διότι οι ιοί δεν είναι ικανοί να επιτελέσουν από μόνοι τους τις δικές τους βιολογικές λειτουργίες [4-6].

Η εξωκυτταρική μορφή του ιού, γνωστή και ως ιοσωμάτιο, του επιτρέπει να μεταδίδεται από το ένα ξενιστικό κύτταρο στο άλλο. Η σύσταση των ιικών σωματιδίων, στην απλούστερη της μορφή, περιλαμβάνει ένα μικρού μεγέθους γενετικό υλικό περιτυλιγμένο με ένα πρωτεϊνικό κέλυφος. Ωστόσο, η απλότητα στην δομή αυτή είναι παραπλανητική. Οι ιοί εμφανίζουν μια εξαιρετικά ευρεία ποικιλομορφία κι αυτό αποδεικνύεται εκ πρώτης όψεως από το γεγονός ότι έχουν παρατηρηθεί σε κάθε μορφή ζωής (προκαρυώτες και ευκαρυώτες) [4-6].

Βάσει όσων ειπώθηκαν παραπάνω, η ιική ταξινόμηση δεν έμοιαζε με ένα απλό ζήτημα. Αρχικά οι ιοί είχαν ταξινομηθεί βάσει των ασθενειών/ συμπτωμάτων που προκαλούσαν π.χ. ιοί της ηπατίτιδας για αυτούς που μόλυναν το ήπαρ. Αυτή η ταξινόμηση όμως παρουσίαζε πολλές αδυναμίες, κυρίως λόγω της λιτότητάς της. Καθώς αναπτύσσονταν νέες, πιο εξελιγμένες τεχνολογίες (π.χ. τεχνικές απομόνωσης και ηλεκτρονική μικροσκοπία), ο χαρακτηρισμός των ιών γινόταν ολοένα και πιο αναλυτικός. Η μορφολογία των ιοσωματίων, η δομή του γονιδιώματός τους και οι

αντιγονικές ιδιότητες τους συνέβαλλαν καθοριστικά στην θεμελιώδη μορφή ταξινόμησης που έχει διατηρηθεί έως και σήμερα. Η μόνη διαφορά είναι ότι η μορφή αυτή έχει επεκταθεί σε μεγάλο βαθμό από τότε (και συνεχίζει να επεκτείνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα από την ICTV).

1.2 Ταξινόμηση ικών ομάδων

Η κατηγοριοποίηση που έφερε επανάσταση στην ιολογία ήταν αυτή που είχε προτείνει ο David Baltimore το 1971, ένας επιστήμονας του οποίου η συνεισφορά σε θέματα ιολογίας, ανοσολογίας, βιοτεχνολογίας, ανασυνδυασμένου DNA και έρευνας του καρκίνου είναι αδιαμφισβήτητη. Ο Baltimore διέκρινε 7 βασικές ικές κατηγορίες [7-9], βάσει μορφής γονιδιώματος και μεθόδου αντιγραφής:

Τάξη I: Δίκλωνο DNA

Τάξη II: Μονόκλωνο DNA

Τάξη III: Δίκλωνο RNA

Τάξη IV: Μονόκλωνο RNA θετικής (+) πολικότητας

Τάξη V: Μονόκλωνο RNA αρνητικής (-) πολικότητας

Τάξη VI: Μονόκλωνο RNA θετικής (+) πολικότητας με ενδιάμεσο DNA

Τάξη VII: Δίκλωνο DNA με ενδιάμεσο RNA

1.3 Ιοί Picorna

1.3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Στην παρούσα εργασία θα γίνει εστίαση στην τάξη IV, μια πολυπληθέστατη κατηγορία στην οποία εμπεριέχεται μεταξύ των άλλων και η τάξη Picornavirales. Η τάξη αυτή διαθέτει, σύμφωνα με τα νεότερα πάντα δεδομένα, 5 οικογένειες (Picornaviridae, Dicistroviridae, Iflaviridae, Marnaviridae και Secoviridae) και 2 μη καταχωρημένα γένη προς το παρόν: *Bacillarnavirus* και *Labyrnavirus* [12-15].

Η οικογένεια Picornaviridae αποτελεί έναν κλάδο της τάξης αυτής και χωρίζεται σε 31 γένη (54 είδη), ένα εκ των οποίων είναι οι εντεροϊοί. Όλα τα μέλη παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

| | | | | |
|-------------|--------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| Aphovirus | <u>Aquamavirus</u> | <u>Avihepatovirus</u> | <u>Avisivirus</u> | <u>Cardiovirus</u> |
| Cosavirus | Dicipivirus | Enterovirus | Erbovirus | Gallivirus |
| Hepatovirus | Hunnivirus | Kobuvirus | Kunsagivirus | Limnivirus |
| Megrivirus | Mischivirus | Mosavirus | Oscivirus | Parechovirus |
| Pasivirus | Passerivirus | Potamipivirus | Rosavirus | Sakobuvirus |
| Salivirus | Sapelovirus | Senecavirus | Sicinivirus | Teschovirus |
| Tremovirus | | | | |

Πίνακας 1.3.1.1: Γένη της οικογένειας Picornaviridae

Υπάρχουν 12 είδη εντεροϊών (Enterovirus A, B, C, D, E, F, G, H & J και Rhinovirus A, B & C). Οι ιοί της πολιομυελίτιδας συγκαταλέγονται στους εντεροϊούς τύπου C και δεν θεωρούνται πλέον ως ανεξάρτητο είδος [10, 12-15]. Θα γίνει λόγος γι' αυτούς σε επόμενη παράγραφο. Προς το παρόν θα αναλυθούν τα δομικά χαρακτηριστικά, η οργάνωση του γονιδιώματος και ο κύκλος αντιγραφής των ιών picorna. Τονίζεται για άλλη μια φορά ότι όλα τα μέλη της οικογένειας των picorna ιών ανήκουν στην τάξη IV, διαθέτουν δηλαδή μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας [9].

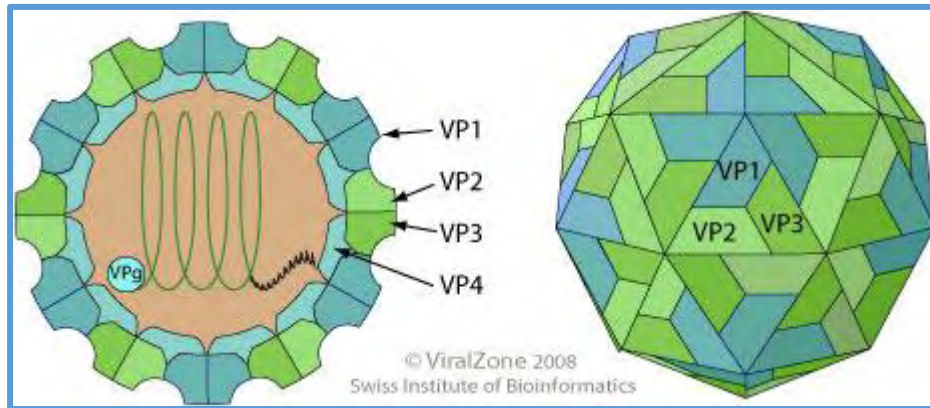
Οι φυσικοί ξενιστές των ιών picorna είναι τα σπονδυλωτά. Αρκετά είδη ιών αυτής της οικογένειας είναι ικανά να προσβάλλουν και τον άνθρωπο, όπως οι polio ιοί και ο ιός της ηπατίτιδας A [11]. Πρόκειται για μερικά από τα μικρότερα παθογόνα των ζώων και των ανθρώπων.

1.3.2 Δομικά χαρακτηριστικά

Προτού περάσουμε στον κύκλο αντιγραφής των picorna ιών, θα αναφερθούν εν συντομία μερικά σημαντικά δομικά τους χαρακτηριστικά. Πλέον, η δομή των ιών αυτών έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, κυρίως χάρις στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X [16-18].

Τα ισωμάτια όλων των picorna ιών είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας, διακρίνονται δηλαδή από μια σχεδόν σφαιρική δομή. Η κάθε έδρα, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, αποτελείται από ένα τριμερές πρωτεϊνών: την VP1, την VP2 και την VP3, οι οποίες είναι στο εύρος 240-290 καταλοίπων. Η έδρα αυτή, μαζί με

την εσωτερική πρωτεΐνη VP4, ονομάζεται πρωτομερές και αποτελεί τον δομικό λίθο του ιικού καψιδίου. Η VP4 δηλαδή δεν λαμβάνει μέρος στον σχηματισμό του 'κελύφους'. Επομένως, η εξωτερική επιφάνεια του ιοσωματίου είναι δομημένη από 60 πρωτεΐνες (20 x VP1,VP2,VP3) [10,17,19].

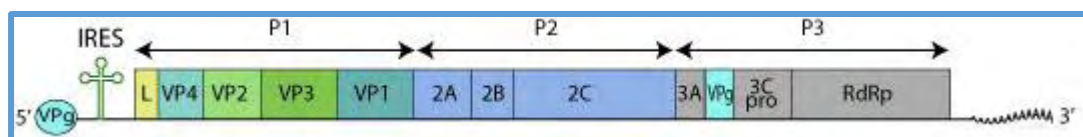


Εικόνα 0: Δομή ιοσωματίου ενός ιού picorna

Ορισμένες ιικές οικογένειες διαθέτουν εκτός από το νουκλεοκαψίδιο και ένα επιπλέον εξωτερικό περίβλημα/ έλυτρο, λιποπρωτεϊνικής φύσεως (π.χ. Orthomyxoviridae, Retroviridae), το οποίο δανείζονται από τις μεμβράνες των κυττάρων- ξενιστών τους. Οι picorna ιοί δεν ανήκουν σε αυτή την περίπτωση. Συμπερασματικά λοιπόν, η μορφή του ιοσωματίου είναι ιδιαίτερα απλή, με το γυμνό γένωμα να καλύπτεται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο. Η διάμετρος των συγκεκριμένων ιοσωματίων κυμαίνεται από 25- 30 nm, ένα σχετικά μικρό μέγεθος στην ιική κλίμακα, το οποίο συνοδεύεται από ένα επίσης μικρό γονιδίωμα [10,16-20].

1.3.3 Οργάνωση γονιδιώματος

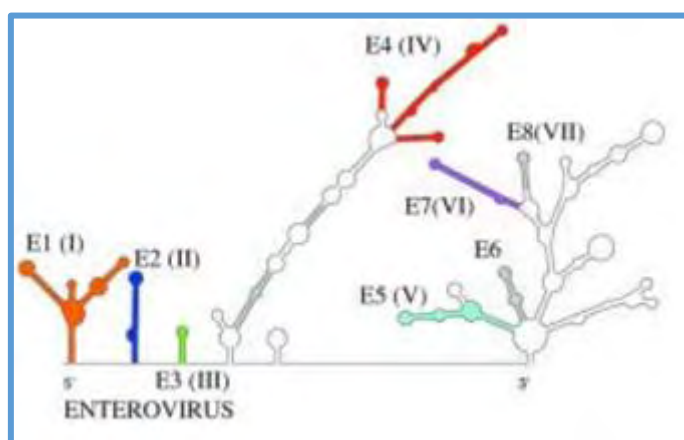
Το γονιδίωμα των picorna ιών (μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας) κυμαίνεται μεταξύ 7- 8,8 kbp [19-21]. Πρόκειται για ένα μικρό γονιδίωμα, το οποίο για λόγους διευκόλυνσης χωρίζεται σε έξι διαφορετικές περιοχές, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 1.3.3.1: Οργάνωση γονιδιώματος ιών picorna

Επισημαίνεται πως το συνθετικό ρισο- (= μικρός) αναφέρεται στο μέγεθος του γονιδιώματος τους, ενώ το συνθετικό -rna αναφέρεται στον τύπο του γονιδιώματος.

- 1) **5' UTR:** Η περιοχή αυτή εμφανίζει περιοχές με πολύ συντηρημένη πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή, υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αντιγραφής και της μετάφρασης. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο, η 5' UTR θεωρείται ένας εξαιρετικός στόχος για την ανίχνευση των ιών ρισοrna. Είναι επίσης αφύσικα μεγάλη, καταλαμβάνοντας περίπου το 10% του ιικού γονιδιώματος [5,21]. Στην 5' UTR συμπεριλαμβάνεται και το στοιχείο IRES (Internal Ribosome Entry Site), ένα δίκτυο δευτεροταγών δομών, πάνω στο οποίο προσδένονται τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή για την επακόλουθη μετάφραση του γονιδιώματος [16-20]. Το IRES διαδραματίζει ανάλογο ρόλο με την 5' καλύπτρα των κυτταρικών mRNAs. Από τα 4 είδη IRES, μόνο το IRES τύπου I εντοπίζεται στους εντεροϊούς. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως κάποιες δευτεροταγείς δομές είναι περισσότερο σημαντικές από κάποιες άλλες για την διαδικασία της μετάφρασης [30,31]. Χάρη στο IRES, η 5' UTR αναφέρεται σε μερικές περιπτώσεις ως 'RLP (Ribosome Landing Pad) region'[33]. Τέλος, εντοπίζεται και μία ακόμα δευτεροταγής δομή, σχήματος τριφυλλίου (84-86 nts) και κρίνεται απαραίτητη για την αντιγραφή των εντεροϊών, μέσω επικοινωνίας της με ιικές πρωτεΐνες και μέρος της 3' UTR [5, 22,23].



Εικόνα 1.3.3.2: Απεικόνιση δευτεροταγών δομών στην περιοχή IRES τύπου I

Σε αντίθεση με τα κυτταρικά mRNAs, δεν παρατηρείται 5' καλύπτρα στο ssRNA των ιών picorna. Αντί αυτού, στο 5' άκρο της 5' UTR προσδένεται με ομοιοπολικό δεσμό ένα μικρό πεπτίδιο 19-26 αμινοξέων (**Viral Protein genome-linked**), το οποίο συμμετέχει ενεργά στην αντιγραφή ως primer, αλλά και στο πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος. Το αμινοξύ που συμμετέχει στον ομοιοπολικό δεσμό πολυπεπτιδίου- 5' UTR είναι μία τυροσίνη, η οποία πάντα απαριθμείται ως το τρίτο αμινοξύ από το αμινοτελικό άκρο της VPg [36]. Η VPg απομακρύνεται νωρίς από το μολυσμένο κύτταρο με τη βοήθεια ενός unlinking enzyme του κυτταροπλάσματος [5,30].

- 2) **Περιοχή P1:** Κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου. Οι VP1, VP2 και VP3 εκτίθενται στο εξωτερικό, ενώ η VP4 είναι εξ' ολοκλήρου εσωτερική. Αρχικά παράγονται οι VP0, VP1 και VP3. Ύστερα από πρωτεόλυση με την ιική 3CDpro, η VP0 δίνει εν τέλει τις VP2 και VP4. Κάθε έδρα του καψιδίου αποτελείται από ένα τριμερές VP1, VP2 και VP3. Κάθε μία από αυτές τις τρεις πρωτεΐνες σχηματίζει δομές αντιπαράλληλων β-βαρελιών. Η VP1 είναι μια εξαιρετικά ευμετάβλητη περιοχή και έχει κριθεί κατάλληλη για την μοριακή ταυτοποίηση των picorna ιών [5,10,24]. Μόνο 2 γένη ιών picorna διαθέτουν L (Leader) πρωτεΐνη: οι cardio και οι artho ιοί. Τα συγκεκριμένα γένη διαθέτουν και μια πολύ-C αλληλουχία στην 5' UTR τους [36].
- 3) **Περιοχή P2:** Μέσω αυτής της περιοχής παράγονται μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν κυρίως στην αντιγραφή του γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη 2A είναι μια από τις πρωτεάσες του ιού. Οι πρωτεάσες αυτές έχουν την δράση τόσο cis, όσο και trans παραγόντων. Το γονιδίωμα των picorna ιών κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη, ακριβώς διότι υπάρχει μόνο ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η συγκεκριμένη πρωτεάση (όπως και η 3C της P3 περιοχής) με ενεργό κέντρο κυστεΐνης κόβει την πολυπρωτεΐνη αυτή σε συγκεκριμένα σημεία, έτσι ώστε να παραχθούν όλες οι επιμέρους πρωτεΐνες του ιού. Επιπλέον η 2A δρα και σε, ορισμένους πάλι, κυτταρικούς στόχους, π.χ. EIF4G1, με απώτερο σκοπό την παρεμπόδιση της έκφρασης των

γονιδίων του ξενιστή. Σε ορισμένα γένη *ricorna* ιών απουσιάζει τελείως από το γονιδιώμα τους η περιοχή υπεύθυνη για την κωδικοποίηση της 2A. Αντί αυτού, κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη- οδηγό (L protein), η οποία είναι τοποθετημένη στο αμινοτελικό άκρο της αρχικής πολυπρωτεΐνης. Οι εντεροϊοί ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, διαθέτουν δηλαδή πρωτεάση 2A, αλλά όχι πρωτεΐνη- οδηγό. Η 2B δρα ως ικκή πορίνη. Εκφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συντελεί στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}) στα μολυσμένα κύτταρα. Η αυξημένη συγκέντρωση Ca^{+2} φαίνεται πως συμβάλλει στην μετακίνηση διαφόρων ικκών πρωτεϊνών. Τέλος, η πρωτεΐνη 2C, εκτός από τη συμμετοχή της στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, μπορεί να παίζει επιπλέον ρόλο στην καψιδιώσή του και στην διαμόρφωση του ιοσωματίου [5,21,24].

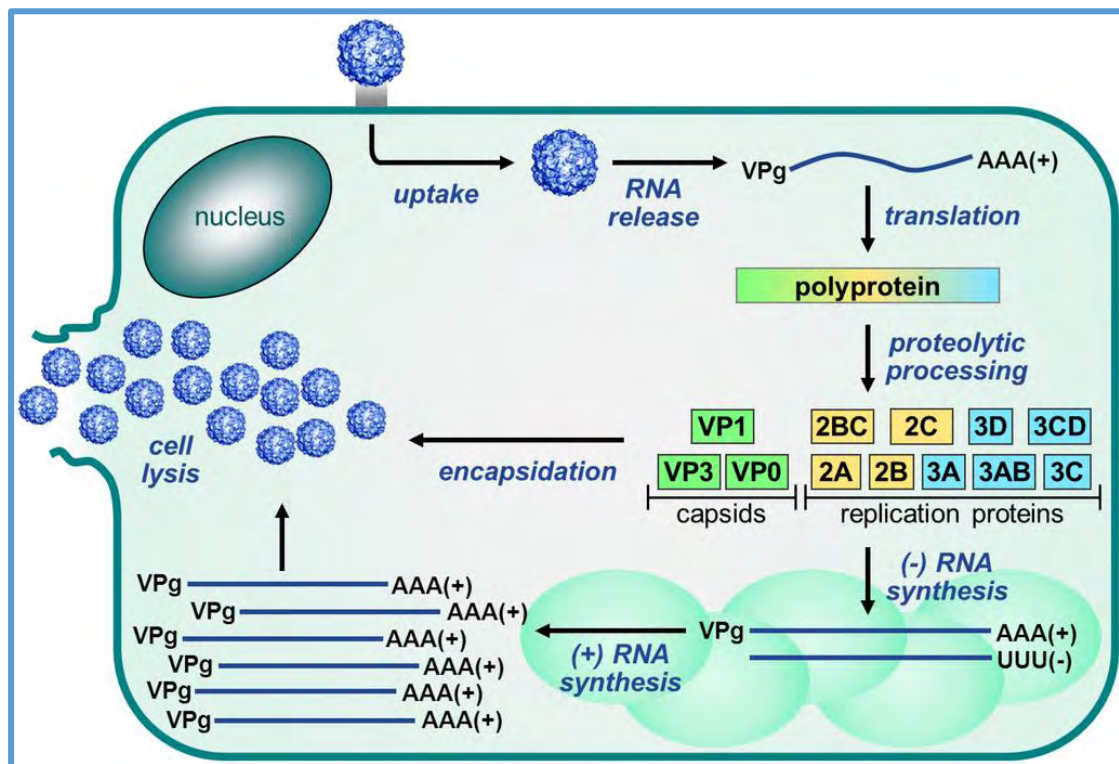
- 4) **Περιοχή P3:** Όπως και στην περίπτωση της P2, έτσι και από την P3 προκύπτουν μη δομικές πρωτεΐνες. Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες που παράγονται από αυτή την περιοχή είναι η VPg, η 3C (μια πρωτεάση που κωδικοποιείται απ' όλους τους *ricorna* ιούς, σε αντίθεση με την 2A [5,36]) και η RNA- εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η ικκή πολυμεράση χρησιμοποιεί ως καλούπι το θετικής πολικότητας RNA που διαθέτει ο ιός για να το μετατρέψει σε RNA αρνητικής πολικότητας (και το αντίστροφο). Περισσότερες λεπτομέρειες θα αναφερθούν στην ενότητα με τον κύκλο αντιγραφής των *ricorna* ιών. Αξιοσημείωτο θεωρείται πως και τα πρόδρομα μόρια είναι δυνατόν να επιτελούν λειτουργίες π.χ. η 3AB, που αργότερα πρωτεολύεται σε 3A και 3B (VPg), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση του συμπλόκου αντιγραφής [5,21,24].
- 5) **3' UTR:** Το μέγεθος της συγκεκριμένης περιοχής κυμαίνεται από 40- 330 νουκλεοτίδια και αποτελεί το μικρότερο τμήμα του ιικού γονιδιώματος. Παρ' όλα αυτά, είναι εξίσου σημαντικό, καθώς εντός αυτού εντοπίζεται μια δευτεροταγής δομή (pseudoknot), η οποία διαθέτει έναν σημαντικό ρόλο στην σύνθεση του ιικού RNA. Έρευνες έχουν επιβεβαιώσει το γεγονός ότι δεν είναι αναγκαία ολόκληρη η 3' UTR περιοχή για την μολυσματικότητα του ιού.

6) **Poly-A tract:** Καθοδικά της 3' UTR, υπάρχει μια poly-A ουρά, μήκους 65- 100 νουκλεοτιδίων, υπεύθυνη για τη σταθερότητα των μεταγράφων [20].

Επομένως, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι πολύ συγκεκριμένες: 4 δομικές πρωτεΐνες από την περιοχή P1 και 7 μη δομικές πρωτεΐνες από τις περιοχές P2 και P3 [5].

Παρά το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος, οι picorna ιοί, όπως και όλοι οι RNA ιοί, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία λόγω της υψηλής συχνότητας μεταλλάξεων και τα γεγονότα ανασυνδυασμών [25].

1.3.4 Κύκλος αντιγραφής των picorna ιών

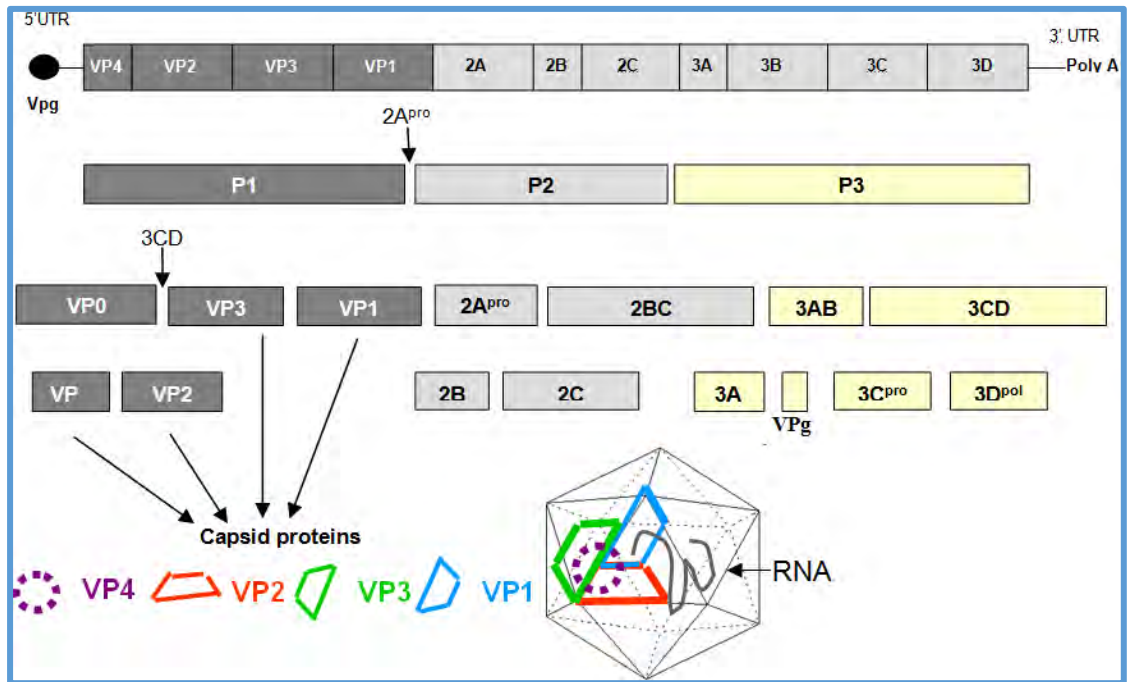


Εικόνα 1.3.4.1: Κύκλος Ζωής ιών picorna

Ο κύκλος αντιγραφής των picorna ιών ακολουθεί ένα βασικό σχεδιάγραμμα που αποτελείται από 8 στάδια. Θα δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα σε κάποια από αυτά, διότι συνδέονται άμεσα με το θέμα της εργασίας.

- 1) **Προσκόλληση:** Κάθε ιός προκειμένου να εισέλθει στο κύτταρο-ξενιστή του πρέπει να αναγνωρίσει έναν κατάλληλο υποδοχέα (μερικές φορές κι έναν συνυποδοχέα, όπως π.χ. στην περίπτωση του ιού HIV). Στην περίπτωση των πολιοϊών ο υποδοχέας είναι ο CD155 ή αλλιώς PVR (Polio Virus Receptor) και παρουσιάζει δομή ανάλογη των ανοσοσφαιρινών. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με πιθανό ρόλο στην εντερική χυμική ανοσοαπόκριση [5,26].
- 2) **Διείσδυση:** Μία πολύ καλά συγχρονισμένη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει σηματοδότηση και διαπέραση της κυτταρικής μεμβράνης, συνήθως μέσω ενδοκύτωσης [5,26].
- 3) **Απέκδυση:** Περιλαμβάνει δομικές ανακατατάξεις του καψιδίου, οι οποίες οδηγούν στην αποσταθεροποίηση και εν τέλει στην αποσυναρμολόγησή του. Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μεταφοράς του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα έχει κατανοηθεί σε πολύ χαμηλό βαθμό [21,26].
- 4) **Μετάφραση:** Αποτελεί το πρώτο βασικό βήμα του ιού μετά την επιτυχή είσοδό του στο κυτταρόπλασμα. Η μετάφραση προηγείται της αντιγραφής σε αυτή την περίπτωση, λόγω της απουσίας αντιγραφικών ενζύμων στα ιοσωμάτια των *ricorna* ιών και της φύσης του γενετικού του υλικού. Το RNA θετικής πολικότητας που διαθέτει ο ιός συμπεριφέρεται ακριβώς όπως ένα κυτταρικό mRNA, μπορεί απευθείας δηλαδή να μεταφραστεί από τα ριβοσώματα του ξενιστή. Η 40S υπομονάδα των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων είναι ικανή να δεσμευθεί στην περιοχή IRES που προαναφέρθηκε. Είναι αποδεδειγμένο μέσω ελλειμάτων πως είναι δυνατή η πρόσδεση των ριβοσωμάτων απευθείας στην IRES, δίχως να απαιτείται ολόκληρο το άκρο της 5' UTR (δίχως, δηλαδή, scanning των ριβοσωμάτων από το 5' άκρο, αλλά μέσω απευθείας πρόσδεσης) [32,33]. Μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών, οι ιοί *ricorna* παίρνουν τον έλεγχο του κυττάρου- ξενιστή και ουσιαστικά του απαγορεύουν την σύνθεση δικών του πρωτεϊνών π.χ. πρωτεόλυση του παράγοντα eIF-4F μέσω αποικοδόμησης [5,30]. Λόγω του ότι υπάρχει ένα και μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, η μετάφραση οδηγεί στον σχηματισμό μιας ενιαίας

πολυπρωτεΐνης ~2300 αμινοξέων. Η πολυπρωτεΐνη αυτή τροποποιείται (κυρίως μέσω πρωτεόλυσης) κατά την διάρκεια, αλλά και μετά το πέρας της μετάφρασης, γι' αυτό ποτέ δεν παρατηρείται ακέραιη [26,29,35].



Εικόνα 1.3.4.2: Απεικόνιση της πολυπρωτεΐνης και των διαδοχικών πρωτεολύσεων της στους ρικορνα ιούς.

- 5) **Αντιγραφή:** Λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, όπως συμβαίνει και στην πλειονότητα των RNA ιών, έτσι ώστε να μπορεί ο ιός να εκμεταλλευτεί τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή. Παρατηρούνται ειδικές δομές κυστιδίων γύρω από τον πυρήνα, τα σύμπλοκα αντιγραφής (RCs) [14]. Απαραίτητο βήμα για την αντιγραφή του ιικού γενώματος είναι η δημιουργία ενός συμπληρωματικού, αρνητικής πολικότητας κλώνου, ο οποίος θα χρησιμεύσει ως καλούπι για την μαζική παραγωγή κλώνων θετικής πολικότητας. Ένζυμο- κλειδί για την σύνθεση και των δύο ειδών RNA αποτελεί η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRP ή 3D^{pol}), την οποία φέρει κάθε ιός ρικορνα προκειμένου η μόλυνση να είναι επιτυχής. Πρέπει να τονιστεί πως η λειτουργικότητα αυτού του ενζύμου εξασφαλίζει όχι μόνο την αντιγραφή του ιού, αλλά και την ικανότητα προσαρμογής του. Η χαμηλή πιστότητα του ενζύμου σε συνδυασμό με

την απουσία επιδιορθωτικής ικανότητας (3' → 5' εξωνουκλεάση) έχουν ως αποτέλεσμα υψηλές συχνότητες μεταλλάξεων και συνεπώς, μια γρήγορη προσαρμογή του ιού σε μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Η αντιγραφή, όπως και η μετάφραση γίνονται σε αυτή την περίπτωση πάντα στο κυτταρόπλασμα, [5,26,27].

- 6) **Συναρμολόγηση:** προϋποθέτει ακριβή ρύθμιση, έτσι ώστε στα νεοσυντιθέμενα ιοσωμάτια να πακεταριστεί μόνο RNA (+) πολικότητας και όχι οποιοδήποτε άλλο είδος νουκλεϊκού οξέος (ικού ή κυτταρικού). Όπως και η αντιγραφή, η συναρμολόγηση στους ιούς ριόκορνα συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα. Μάλιστα, είναι πολύ πιθανό οι δύο αυτές διαδικασίες να είναι συζευγμένες [5,26,28]. Η σύζευξη αυτή πιθανώς οφείλεται στην επικοινωνία μεταξύ του συμπλόκου αντιγραφής και των καψιδιακών πρωτεϊνών του ιού [34].
- 7) **Ωρίμανση:** Περιλαμβάνει κυρίως δομικές αλλαγές στο ιικό σωματίδιο, οι οποίες επιτρέπουν την μετατροπή απλών, συσσωρευμένων προϊόντων σε ένα πλέον μολυσματικό ιοσωμάτιο [5,80].
- 8) **Απελευθέρωση:** Οι ριόκορνα ιοί, όπως και η πλειονότητα των ιών χωρίς εξωτερικό περίβλημα, είναι λυτικοί. Αυτό σημαίνει ότι το κύτταρο-ξενιστής θα οδηγηθεί σε θάνατο με την ολοκλήρωση του ιικού κύκλου [37].

Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι εντεροϊοί έχουν την δυνατότητα παραμονής σε μια περίοδο αδράνειας, δίχως να προκαλέσουν κάποια βλάβη στο κύτταρο. Όταν οι συνθήκες κριθούν κατάλληλες, ο κύκλος μπορεί να συνεχιστεί και πάλι. Σε αυτό το στάδιο 'προσωρινού ύπνου' είναι δυνατή η ανίχνευση ορισμένων ιικών αντιγόνων [38].

1.4 Ιοί polio και στελέχη SABIN

Οι Εντεροϊοί έχουν συσχετιστεί με ένα πλήθος σοβαρών , σε κάποιες περιπτώσεις θανάσιμων ασθενειών, χαρακτηριστικότερες των οποίων είναι η αιμορραγική επιπεφυκίτιδα, η άσηπτη μηνιγγίτιδα, η οξεία παράλυση και η οξεία μυοκαρδίτιδα [5,7,39]. Οι περισσότερες μολύνσεις είναι βέβαια ασυμπτωματικές ή πολύ ήπιες, όπως π.χ. κοινό κρυολόγημα. Γενικά έλαβαν την ονομασία αυτή, διότι εντοπίζονται στον εντερικό σωλήνα. Βέβαια, υπάρχουν και κάποιες εξαιρέσεις (π.χ. οι rhino ιοί προσβάλλουν κυρίως κύτταρα της μύτης και του λαιμού). Ωστόσο, οι εντεροϊοί είναι ικανοί να μολύνουν κι άλλα κύτταρα. Είναι δυνατή η απομόνωσή τους τόσο από τα κόπρανα, όσο και από τον φάρυγγα [6,41]. Η κατηγοριοποίησή τους σε οροτύπους έχει πραγματοποιηθεί βάσει δοκιμασιών οροεξουδετέρωσης, τα οποία απαιτούν μεταξύ των άλλων, καλλιέργεια του ιού και διαθεσιμότητα αντι-ορών [8,10].

Το γένος των Εντεροϊών περιλαμβάνει τους polio ιούς (PV, 3 ορότυποι) τους ιούς Coxsackie A (CAV) και B (CBV), τους ιούς Echo (ECV, 28 ορότυποι) και τους εντεροϊούς (EV) [40].

Οι ιοί polio είναι αδιαμφισβήτητα η κατηγορία των εντεροϊών με την μεγαλύτερη παθογένεια και ταυτόχρονα οι κύριοι αντιπρόσωποι των εντεροϊών τύπου C. Έχουν απασχολήσει την ανθρωπότητα από τότε που άρχισε να καταγράφεται η ιστορία: στους τάφους αρχαίων φαραώ έχουν ανευρεθεί πλάκες που απεικονίζουν πιστά αποδυναμωμένα άκρα, κυρίως πόδια, εξαιτίας της παραλυτικής ικανότητας των ιών [36]. Βάσει της ικανότητας αντιγραφής τους σε κύτταρα και κυρίως των αντιγονικών διαφορών τους, έχουν διακριθεί σε τρεις διακριτούς οροτύπους (serotypes). Η μόλυνση των περισσότερων ατόμων με τον ιό είναι συνήθως ασυμπτωματική (70-75%), με ένα 4-8% των ασθενών να εμφανίζει έναν πολύ ήπιο πυρετό. Ωστόσο αποτελούν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (0,1- 0,5%), μιας σοβαρής παραλυτικής ασθένειας, η οποία είναι απειλητική για τη ζωή και της άσηπτης μηνιγγίτιδας (1-5%), της συχνότερης ασθένειας που παρατηρείται στο κεντρικό νευρικό σύστημα λόγω μόλυνσης. Οι ιοί polio έχουν συσχετισθεί τόσο με οξείες, όσο και με χρόνιες ασθένειες [5,6,41].

Τα πιο επιτυχημένα εμβόλια που έχουν αναπτυχθεί κατά των polio ιών είναι δύο: το ζωντανό- εξασθενημένο εμβόλιο OPV (**O**ral **P**olio **V**accine) ή Sabin, του οποίου η χρήση περιορίζεται σε λιγοστές πλέον χώρες και το αδρανοποιημένο εμβόλιο IPV (**I**nactivated **P**olio **V**accine) ή Salk, το οποίο αν και ακριβότερο και λιγότερο αποτελεσματικό, θεωρείται σαφώς ασφαλέστερο από το αντίστοιχο ζωντανό. Επίσης είναι πιθανή η ανάπτυξη οικονομικότερων καθώς και ανθεκτικότερων εμβολίων, που θα στηρίζονται στο IPV. Αυτή την στιγμή, ο polio ιός τύπου 1 είναι αυτός που εμφανίζει τα περισσότερα κρούσματα [5,10].

Τα SABIN είναι ουσιαστικά εμβολιακά στελέχη (ή με άλλα λόγια εξασθενημένες μορφές) polio ιών. Πήραν το όνομά τους από τον επιστήμονα που εφηύρε το αντίστοιχο εμβόλιο (OPV) το 1957, τον Albert Sabin.

1.5 LAMP

1.5.1 Εφαρμογές

Η LAMP (**L**oop **M**ediated **I**sothermal **A**mplification) -ένα σχετικά πρόσφατο και αξιόπιστο εργαλείο της μοριακής βιολογίας- είναι μία ισοθερμική τεχνική, η οποία αποσκοπεί στον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου DNA/cDNA στόχου, μέσω της διαδικασίας της αυτόματης κυκλοποίησης. Η έξυπνη αυτή ιδέα αναπτύχθηκε από μία ομάδα επιστημόνων στο Τόκυο. Το ανάλογο άρθρο δημοσιεύτηκε το έτος 2000 [44].

Η χρήση της περιορίζεται προς το παρόν κυρίως στην ανίχνευση παθογόνων (ιών, βακτηρίων και παρασίτων) σε οργανισμούς (φυτά, ζώα, άνθρωπος) [54]. Μερικές από τις χαρακτηριστικότερες δημοσιεύσεις έχουν γίνει πάνω στο *Mycobacterium tuberculosis* (φυματίωση) [76,81] , Τρυπανόσωμα (ασθένεια του ύπνου) [55], *Plasmodium falciparum* (Μαλάρια) και *Staphylococcus aureus* ανθεκτικού στη μεθικιλίνη [56]. Άλλες εφαρμογές, σε μικρότερο βαθμό, αποτελούν η ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών- GMOs [58, 59], η διάκριση του φύλου στα έμβρυα [60,61] και ο εντοπισμός κάποιων μορφών όγκων [62].

Υπάρχουν και μελλοντικές προοπτικές σε άλλους τομείς, όπως π.χ. ανίχνευση γενετικών διαταραχών, φαρμακολογική έρευνα και περιβαλλοντική διατροφική υγιεινή [54].

1.5.2 Γενικά χαρακτηριστικά LAMP

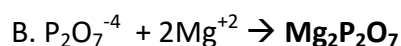
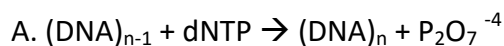
Αρχικά, η ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντεροϊών απαιτούσε την καλλιέργειά τους σε κατάλληλη κυτταρική σειρά και στην συνέχεια την προσθήκη αντι-ορού [10,42,43]. Η διαδικασία αυτή, παρά την σχετική ειδικότητάς της, έφερε ένα πλήθος ελαττωμάτων, όπως κατανάλωση μεγάλου χρονικού διαστήματος, υψηλό κόστος, πρόβλημα στην καλλιέργεια ορισμένων ιικών ομάδων και πολυπλοκότητα της μεθόδου [8,42]. Το λεγόμενο 'serotyping' αντικαταστάθηκε ταχύτατα από μοριακές μεθόδους, με κύριο αντιπρόσωπο την RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction).

Η LAMP φέρει αρκετές ομοιότητες με την PCR, την ευρέως διαδεδομένη πλέον τεχνική ενίσχυσης γενετικού υλικού. Ωστόσο, εμφανίζει μερικές πολύ χαρακτηριστικές ιδιαιτερότητες στην εκτέλεσή της, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η κατάταξή της ως παραλλαγή της PCR. Εκτός αυτού, ακριβώς λόγω αυτών των διαφορών, η LAMP θεωρείται απλούστερη, αποτελεσματικότερη, ταχύτερη και πιο οικονομική μέθοδος, όσον αφορά τον συγκεκριμένο σκοπό [44]. Οι διαφορές αυτές θα προκύψουν παρακάτω, καθώς γίνεται η ανάλυση των απαραίτητων αντιδραστηρίων για την διεξαγωγή της LAMP. Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων που πρέπει να τονιστεί από τώρα, είναι πως η LAMP, όπως άλλωστε υποδηλώνει το όνομά της, είναι μία ισοθερμική μέθοδος. Με άλλα λόγια, δεν υπάρχει θερμοκρασία αποδιάταξης, υβριδοποίησης, επιμήκυνσης, κ.τ.λ. όπως στην PCR, αλλά μία σταθερή θερμοκρασία επώασης (incubation) καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης, συνήθως μεταξύ 63- 65 °C. Υπάρχει λοιπόν μεγάλο συμφέρον από οικονομική πλευρά, καθώς η LAMP είναι δυνατόν να διεξαχθεί ακόμη και σε ένα απλό υδατόλουτρο [45] ή heat block, εξοπλισμός σαφώς φθηνότερος από τον κλασικό θερμοκυκλοποιητή. Σε περιπτώσεις που η ευαισθησία δεν αποτελεί την πρώτη προτεραιότητα, η μη αναγκαία εκχύλιση γενετικού υλικού από τα κύτταρα (όπως π.χ. στο ιό του έρπητα τύπου 6 [75,77]

μειώνει περαιτέρω το κόστος διεξαγωγής και τον χρόνο εκτέλεσης της LAMP, λόγω της αυξημένης ανεκτικότητας που αυτή παρουσιάζει σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα και συστατικά θρεπτικών μέσων [46].

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της LAMP είναι η ιδιαίτερα μεγάλη παραγωγή μιας σειράς προϊόντων. Πρέπει να γίνει κατανοητό πως παρά την ύπαρξη ενός μοναδικού DNA/RNA στόχου, στην LAMP παράγεται εν τέλει ένα εύρος προϊόντων με διάφορα μεγέθη.

Επιπρόσθετα, λαμβάνει σταδιακή συσσώρευση ενός παραπροϊόντος καθ' όλη την διαδικασία της αντίδρασης. Η παρουσία αυτού του παραπροϊόντος μετά το πέρας των επώσεων, μπορεί να λειτουργήσει ως μια μορφή διάκρισης ενός θετικού δείγματος από ένα αρνητικό [47,78]. Πρόκειται για το Πυροφωσφορικό ιόν, το οποίο τείνει να συζευχθεί με δισθενές μεταλλικό ιόν, κατά βάση Μαγνήσιο. Η σύζευξη φαίνεται να συμβαίνει μόνο όταν το πυροφωσφορικό ιόν βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση. Οι δύο αντιδράσεις που οδηγούν εν τέλει στον σχηματισμό του Πυροφωσφορικού Μαγνησίου είναι οι εξής:



Με μια σύντομη φυγοκέντρηση (π.χ. 5000 g για 10 λεπτά) γίνεται φανερό ένα λευκό ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου. Η ποσότητα του ιζήματος και συνεπώς η δυνατότητα διάκρισής του από τον παρατηρητή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Μάλιστα, υπάρχουν πολλές αναφορές που υποστηρίζουν την σταδιακή θολερότητα του μίγματος κατά την εξέλιξη της αντίδρασης. Η θολερότητα αυτή μπορεί, όπως και το ίζημα, να χρησιμοποιηθεί ως μια μορφή επιβεβαίωσης της αντίδρασης μετά το πέρας αυτής (παρατήρηση με γυμνό μάτι) ή ως δείκτης για την παρακολούθηση της αντίδρασης, σκεπτικό ανάλογο της qPCR. Το παραπροϊόν αυτό παράγεται και στην κλασική PCR, αλλά σε απειροελάχιστες ποσότητες (<0,1 μM), οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί εκμετάλλευσή του, παρά μόνο με τη δράση ενζύμων ή χρωστικών [47].

Μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική μέθοδος για την ανίχνευση των πυροφωσφορικών ιόντων είναι η προσθήκη ιόντων μαγγανίου και καλσεΐνης (φθορισμοφόρο). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αναίρεση της απόσβεσης φθορισμού της καλσεΐνης, λόγω αποδέσμευσης των ιόντων μαγγανίου από αυτήν (και επακόλουθη δέσμευσή τους στο παραπροϊόν της LAMP) [79].

Η παρακολούθηση της αντίδρασης στην LAMP είναι δυνατόν να μελετηθεί σε πραγματικό χρόνο ευκολότερα μέσω ενσωμάτωσης παρεμβαλλόμενων χρωστικών ουσιών π.χ. SYTO 9, SYBR green [48], κ.τ.λ. Μια άλλη μέθοδος για την επιβεβαίωση της αντίδρασης είναι η σήμανση των primers π.χ. με FITC, ένα παράγωγο της φλουορεσκεΐνης [49]. Γενικά υπάρχουν αρκετοί τρόποι για τον έλεγχο του αποτελέσματος, δίχως να καταναλωθεί άσκοπα χρόνος για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων.

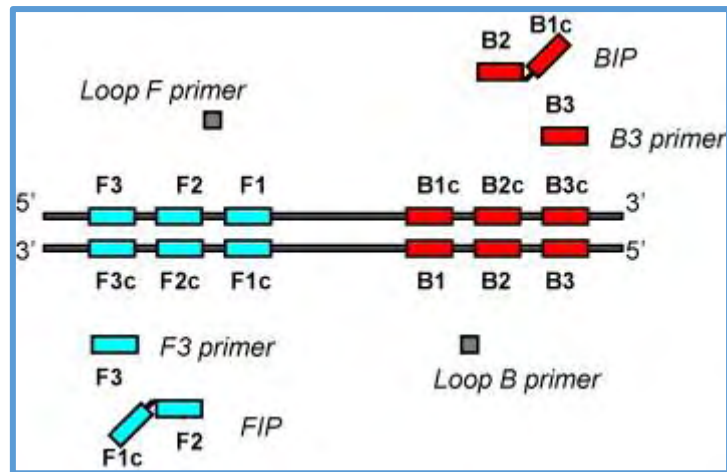
1.5.3 Υλικά

Μία αντίδραση LAMP προϋποθέτει τα εξής αντιδραστήρια:

- 1) Μια πολυμεράση με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου (high strand displacement activity) και ικανότητας αποδιάταξης του αρχικού δίκλωνου DNA- στόχου (εάν βέβαια ο στόχος είναι δίκλωνο DNA). Η DNA πολυμεράση I του *Bacillus Stearothermophilus*, γνωστή και ως Bst πολυμεράση, συμπληρώνει όλα αυτά τα κριτήρια. Μάλιστα, εργαστηριακά γίνεται χρήση *in silico* (=σχεδιασμένων με τη βοήθεια προσομοιώσεων σε υπολογιστή) σχεδιασμένων Bst πολυμερασών, οι οποίες διαθέτουν αναβαθμισμένες ιδιότητες σε σχέση με την κλασσική Bst π.χ. αυξημένη ταχύτητα πολυμερισμού, θερμοανθεκτικότητα και αντοχή σε άλατα. Μια από αυτές είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη στην LAMP, η Bst 3.0. Όπως και όλες οι πολυμεράσες, η Bst διαθέτει ενεργότητα 5'→3' πολυμεράσης. Το βήμα της μετάθεσης εκτελείται στην ουσία από αυτό το ένζυμο, το οποίο απομακρύνει οποιαδήποτε αλληλουχία νουκλεοτιδίων συναντήσει κατά τον πολυμερισμό. Παρ' όλα αυτά διαθέτει μειωμένη πιστότητα, καθώς στερείται ενεργότητα 3'→5'

εξωνουκλεάσης. Ωστόσο, η έλλειψη αυτού του χαρακτηριστικού δεν διαταράσσει την αρχή της μεθόδου. Το εύρος θερμοκρασίας για την βέλτιστη λειτουργία του ενζύμου κρίνεται από 60 - 65 °C. Θερμοκρασίες κάτω των 50 °C ή άνω των 72 °C δεν προτείνονται. Για τον τερματισμό της αντίδρασης, πραγματοποιείται επώαση στους 80 °C για 5-10 λεπτά (heat inactivation).

- 2) 2 ζεύγη primers, ένα εξωτερικό (F3 & B3) κι ένα εσωτερικό (FIP & BIP), τα οποία να αναγνωρίζουν 6 διαφορετικές περιοχές γύρω από τον στόχο και να τηρούν κάποιες επιπλέον αυστηρές προϋποθέσεις π.χ. να απέχουν συγκεκριμένα ζεύγη βάσεων μεταξύ τους. Ο σχεδιασμός των primers είναι αναμφίβολα το πιο απαιτητικό τμήμα της LAMP. Υπάρχει η δυνατότητα προσθήκης κι ενός τρίτου ζεύγους (loop primers), μέσω του οποίου αυξάνεται περαιτέρω η ταχύτητα της αντίδρασης και πιθανόν η ευαισθησία της μεθόδου, αλλά δεν κρίνεται απαραίτητο για την εκτέλεσή της. Στην περίπτωση που κριθεί αναγκαία η χρήση των loop primers (LB & LF), τις περισσότερες φορές λόγω πίεσης χρόνου, θα συμμετέχουν 6 primers, οι οποίοι θα έχουν σχεδιαστεί να αναγνωρίζουν 8 διαφορετικές περιοχές γύρω από τον στόχο. Γίνεται αντιληπτό ότι η ειδικότητα της LAMP είναι εξαιρετικά υψηλή, διότι απαιτείται η υβριδοποίηση όλων των primers προκειμένου να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός. Ο LF primer συνήθως σχεδιάζεται έτσι ώστε να υβριδίζεται στην περιοχή μεταξύ F1c και F2c, ενώ ο LB μεταξύ των B1c και B2c αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται οι loop primers να διαφεύγουν από αυτά τα όρια [50].



Εικόνα 1.5.3.1: Primers της LAMP και τοποθεσίες υβριδισμού τους γύρω από τον στόχο.

- 3) Buffer για τη σωστή λειτουργία του ενζύμου. Στο buffer περιέχονται ήδη ιόντα μαγνησίου, συνήθως υπό την μορφή του θεικού μαγνησίου ($MgSO_4$), αλλά αν η συγκέντρωσή του κριθεί ανεπαρκής, είναι δυνατή η προσθήκη περαιτέρω ποσότητας.
- 4) Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), τα ίδια που χρησιμοποιούνται και στην κλασική PCR και
- 5) DNA/RNA στόχος, ο οποίος μπορεί να περιλαμβάνεται σε κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα.

1.5.4 Ανάλυση των βημάτων

Στην τρέχουσα υποενότητα θα παρουσιαστεί συνοπτικά η μέθοδος νουκλεοτιδικού πολλαπλασιασμού μέσω της τεχνικής LAMP, με μεγαλύτερη έμφαση στα πρώτα βήματα.

Το αρχικό υπόστρωμα, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, είναι ένα τμήμα μονόκλωνου DNA. Ωστόσο, η διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και σε δίκλωνο DNA, παραλείποντας το βήμα της αρχικής θερμικής/ χημικής αποδιάταξης.



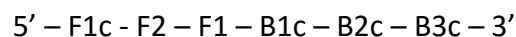
Εικόνα 1.5.4.1: Εναρκτήριο βήμα από εσωτερικό εκκινήτη

Σε μια πρώτη φάση, επιτυγχάνεται σύνθεση ενός νέου κλώνου με την βοήθεια ενός από τους εσωτερικούς εκκινήτες (στην εικόνα γίνεται μέσω του FIP), ο οποίος υβριδίζεται στον στόχο χάρις στην F2 περιοχή που διαθέτει. Στην συνέχεια, ακολουθεί ο υβριδισμός του F3 primer στο αντίστοιχο τμήμα του γενετικού υλικού (F3c). Εάν στο δείγμα εντοπίζεται και ο συμπληρωματικός κλώνος, τότε η εκκίνηση της αντίδρασης θα εκτελεστεί από τους primers BIP και B3 αντίστοιχα. Υπενθυμίζεται πως σε κάθε περίπτωση ο προσανατολισμός της μεταγραφής του νεοσυντιθέμενου κλώνου είναι $5' \rightarrow 3'$.

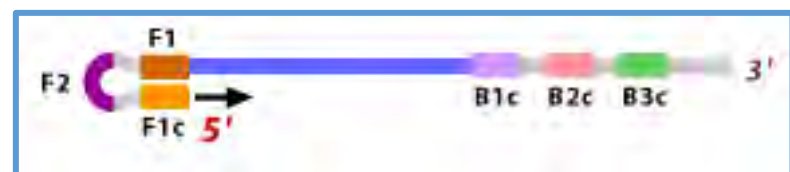


Εικόνα 1.5.4.2: Υβριδοποίηση εξωτερικού εκκινήτη

Η σύνθεση του νέου κλώνου, ο οποίος οφείλεται στον F3 primer, θα έχει ως αποτέλεσμα την εκτόπιση και απελευθέρωση του αρχικού (του F2- εξαρτώμενου). Από το σημείο αυτό, ρόλο- κλειδί στην LAMP κατέχει ο εκτοπιζόμενος κλώνος, ο οποίος διαθέτει τις εξής περιοχές:

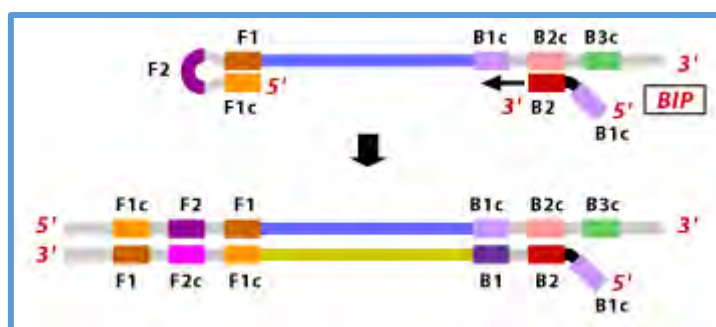


Λόγω της ενδογενούς συμπληρωματικότητας μεταξύ F1c και F1 περιοχών, οδηγούμαστε στον σχηματισμό μιας θηλειάς, όπως φαίνεται παρακάτω:



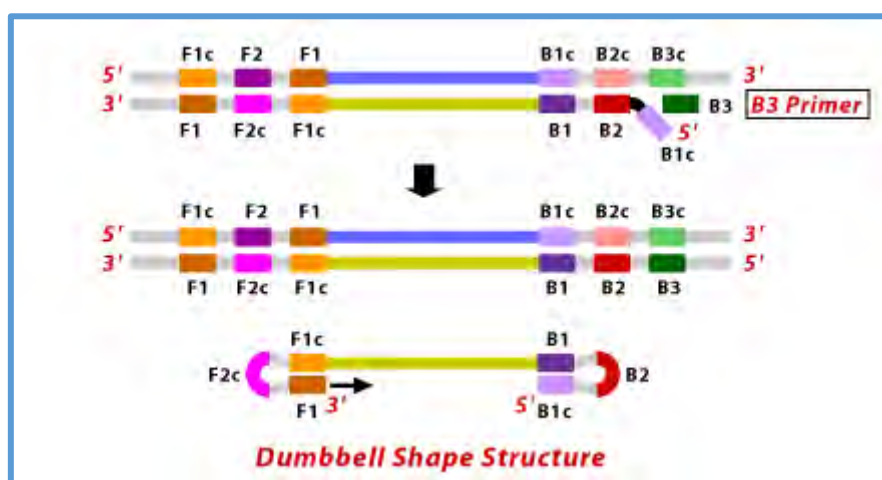
Εικόνα 1.5.4.3: Σχηματισμός θηλειάς λόγω εσωτερικής συμπληρωματικότητας

Η διαδικασία προχωράει με την δημιουργία του αντίστοιχου συμπληρωματικού κλώνου, ύστερα από τον υβριδισμό του BIP primer. Ο συγκεκριμένος εκκινητής διαθέτει δύο περιοχές: την B2, μέσω της οποίας προσδένεται εν μέρει με τον κλώνο και την B1c, η οποία θα φανεί χρήσιμη σε επόμενο βήμα.



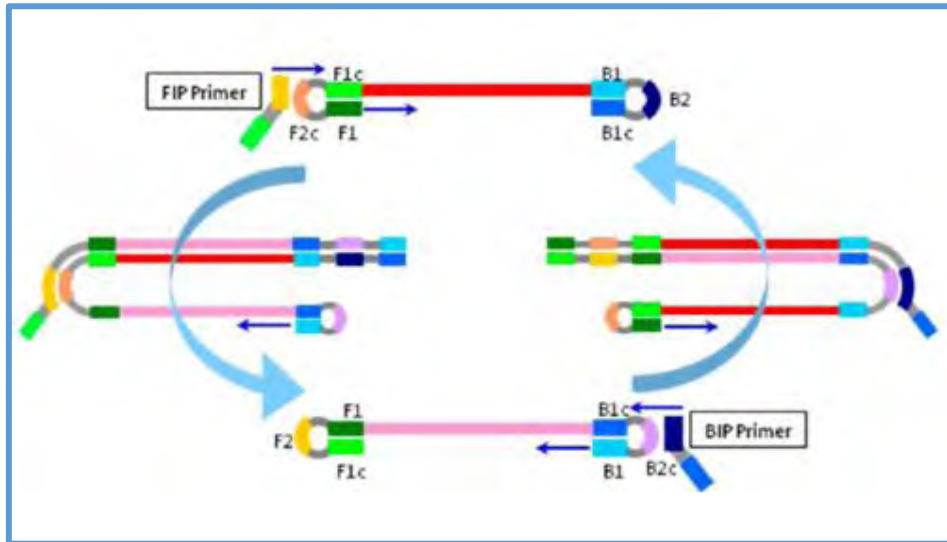
Εικόνα 1.5.4.4: Δράση του εσωτερικού εκκινητή στην δομή με την θηλιά

Με την ολοκλήρωση αυτής της επιμήκυνσης, ο primer B3 θα εκτοπίσει τον κλώνο που είχε μόλις συντεθεί. Έτσι, έχει παραχθεί μια από τις βασικότερες δομές στην LAMP, ένας κλώνος με χαρακτηριστική δομή αλτήρα (Dumbbell Shape Structure), στον οποίο εντοπίζονται δύο θηλειές: η μια χάρις στην συμπληρωματικότητα των περιοχών F1- F1c και η άλλη χάρις στην συμπληρωματικότητα των περιοχών B1 – B1c. Η δομή αυτή σηματοδοτεί την λήξη των εναρκτήριων βημάτων της LAMP (Starting material producing steps).



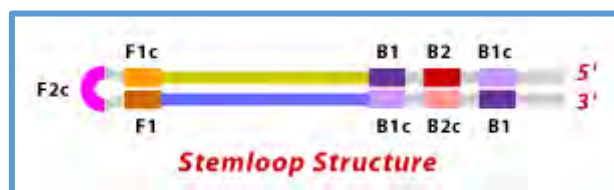
Εικόνα 1.5.4.5: Σχηματισμός δομής 'αλτήρα'

Η δομή αλτήρα κρίνεται ουσιώδης για τα επόμενα βήματα. Μάλιστα, είναι δυνατόν να ανακυκλώνεται με τη δράση των δύο εσωτερικών εκκινητών, όπως στην εικόνα που φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 1.4.5.6: Διαδικασία ανακύκλωσης δομής ‘αλτήρα’

Μια ακόμη δομή που διαδραματίζει ρόλο- κλειδί στην LAMP είναι αυτή που σχηματίζεται αμέσως μετά: η δομή στελέχους βρόγχου- θηλειάς (stemloop structure), η οποία αποτελεί εναρκτήριο σημείο για το δεύτερο στάδιο της LAMP, το λεγόμενο ‘LAMP cycling’. Εννοείται πως ο διαχωρισμός της διαδικασίας σε στάδια έχει πραγματοποιηθεί για λόγους διευκόλυνσης και μόνο (η LAMP είναι μία συνεχής διαδικασία, δίχως παύσεις).



Εικόνα 1.4.5.7: Απεικόνιση δομής ‘βρόγχου- θηλειάς’

Από αυτό το σημείο και μετά, δεν γίνεται χρήση των F3 και B3 primers, διότι οι αντίστοιχες περιοχές υβριδισμού απουσιάζουν πλέον από το προϊόν. Επίσης, δεν υπάρχει αναγκαιότητα εκτενούς ανάλυσης των επόμενων βημάτων. Βασικό σημείο

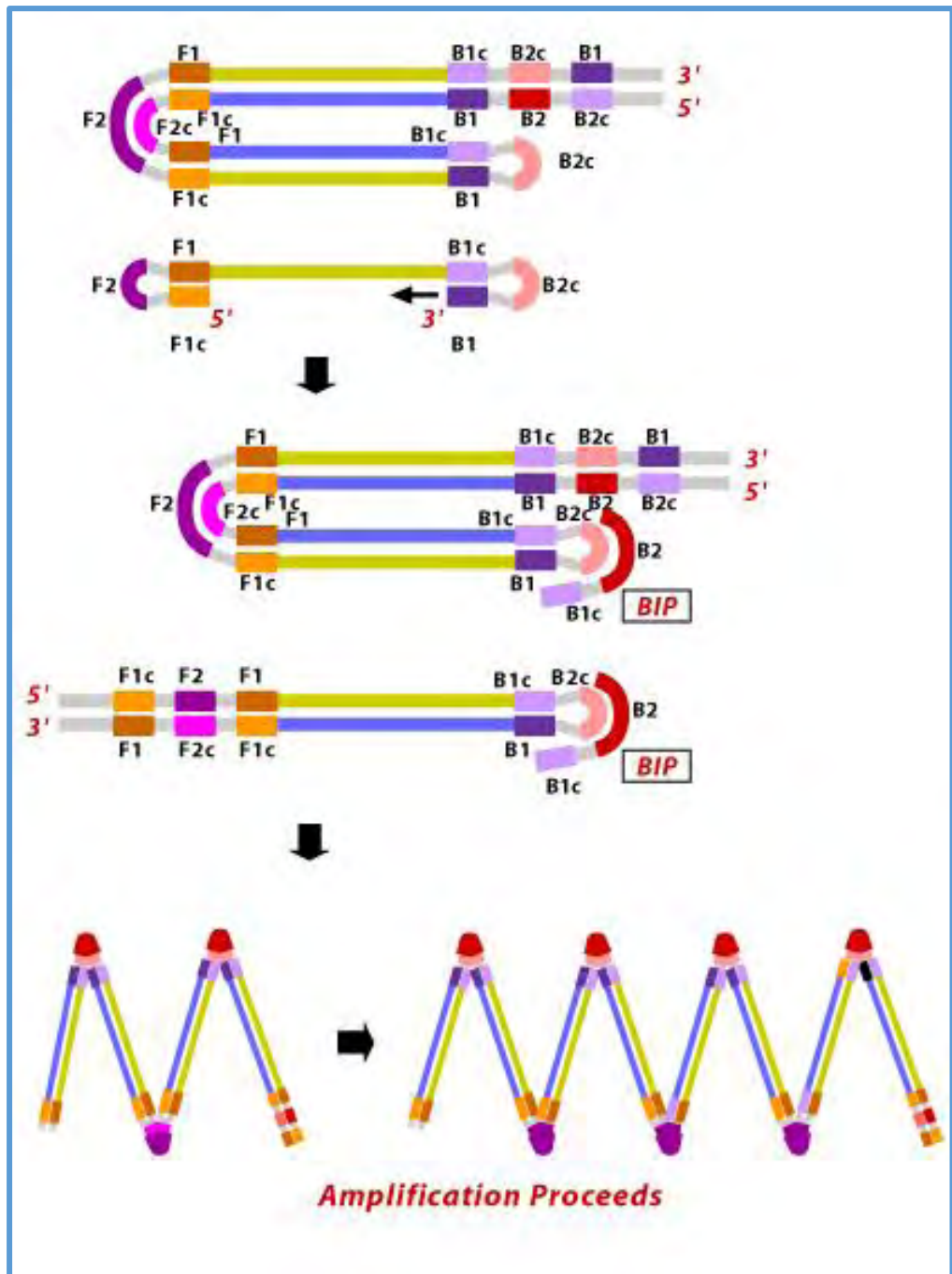
είναι το γεγονός ότι εν τέλει παρατηρείται συσσώρευση πολλών προϊόντων [Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε., 63], των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται εντός πολλών ζευγών βάσεων. Μετά το πέρας της αντίδρασης (< 1 h), υπάρχουν περίπου 10^9 αντίγραφα του στόχου.

Τα προϊόντα της LAMP ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

- 1) DNA αλυσίδες με πολλούς βρόγχους- θηλιές, το οποίο περιλαμβάνει έναν αρκετά υψηλό βαθμό ανεστραμμένων επαναλήψεων του στόχου και
- 2) DNA με χαρακτηριστικές δομές 'cauliflower' (σαν κουνουπίδι), οι οποίες προκύπτουν από τον υβριδισμό των ανεστραμμένων επαναλήψεων που προαναφέρθηκαν.

Ενδεικτικά παρουσιάζεται μέρος των προϊόντων αυτών. Οι επακόλουθες δομές είναι αρκετά περίπλοκες, με πολλές θηλιές η καθεμία. Στο κάτω μέρος της εικόνας είναι φανερές οι 'αλυσίδες' του πολλαπλασιασμένου πλέον στόχου.

Το βασικότερο σημείο όλης αυτής της διαδικασίας είναι πως αν και ο αρχικός RNA/DNA στόχος είναι ένας και μοναδικός, παράγεται τελικά ένα πλήθος προϊόντων με διάφορα μεγέθη.



Εικόνα 1.4.5.8: Συνοπτική απεικόνιση βημάτων κυκλοποίησης και επιμήκυνσης

2. Στόχος

Ο στόχος αυτής της εργασίας αποτελούταν από δύο σκέλη: το πρώτο ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου LAMP για την ανίχνευση ζωντανών εξασθενημένων πολιοϊών (εμβολιακά στελέχη SABIN) και το δεύτερο ήταν η επιτυχής εφαρμογή του σε συγκεκριμένα κλινικά δείγματα, τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί από προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου (ανασυνδυασμένα στελέχη SABIN). Στην πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε σε πρότυπα στελέχη, ενώ στην δεύτερη σε κλινικά στελέχη.

3. Υλικά και Μέθοδοι

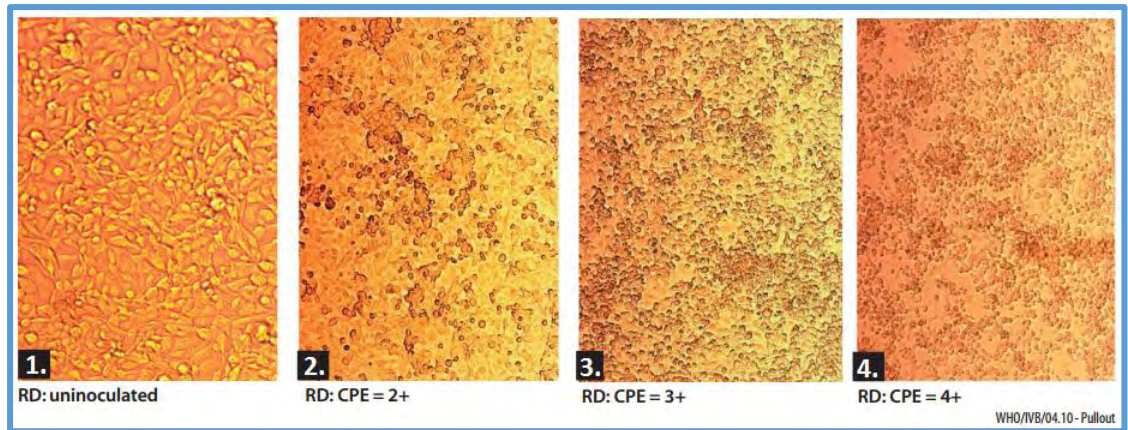
3.1 Ιοί, Κυτταρικές σειρές και κλινικά δείγματα

Στην παρούσα πτυχιική εργασία χρησιμοποιήθηκαν και τα τρία στελέχη SABIN (SABIN 1, SABIN 2 και SABIN 3). Τα ιικά αυτά στελέχη διατηρούνταν στο εργαστήριο, στους -80°C .

Η κυτταρική σειρά που διαθέταμε και υποστήριζε την ανάπτυξη των SABIN ήταν η RD, μια από τις πιο γνωστές πλέον κυτταρικές σειρές για την ανάπτυξη εντεροϊών [67]. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα που αρχικά προέρχονταν από ανθρώπινο ραβδομυοσάρκωμα (συνεχής κυτταρική σειρά). Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται μέσω προσκόλλησης σε στερεή επιφάνεια. Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες. Σε κάθε φλάσκα κυττάρων RD είχε πραγματοποιηθεί μεταφορά 1 ml ιικού δείγματος και 6 ml θρεπτικού υλικού.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των κυττάρων (μολυσμένων και μη) ήταν το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium). Το DMEM έχει κριθεί ιδανικό για την ανάπτυξη μιας ευρείας γκάμας κυττάρων θηλαστικών [68].

Η αναγνώριση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) στα RD κύτταρα ήταν σχετικά απλή, καθώς η μορφολογία τους μεταβαλλόταν δραματικά. Η παρατήρηση των κυττάρων για εντοπισμό κυτταροπαθογόνου δράσης πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Παρακάτω είναι φανερά τα διάφορα στάδια CPE, όσον αφορά τα κύτταρα RD:



Εικόνα 3.1.1: Απεικόνιση διαφόρων σταδίων CPE σε κυτταρική σειρά RD

Στην εικόνα 1 τα κύτταρα είναι υγιή/ μη ενοφθαλμισμένα. Στην δεύτερη εικόνα παρατηρείται 2+ CPE (καταστροφή 50% των κυττάρων), ενώ στην τρίτη και τέταρτη εικόνα παρατηρείται 3+ και 4+ CPE (75% και 100% καταστροφή των κυττάρων) αντίστοιχα.

3.2 Μέτρηση ιικού τίτλου

Η μέτρηση του ιικού τίτλου πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία των TCID₅₀ τόσο στα πρότυπα, όσο και στα ανασυνδυασμένα στελέχη SABIN (κλινικά δείγματα). Η διαδικασία διαρκούσε γύρω στις 5-7 ημέρες και συνοψίζεται παρακάτω:

1. Προσθήκη 100 μl κυττάρων ανά θέση σε πλάκα μικροτιτλοποίησης (96 well plate) (δείγματα προς εξέταση στις πρώτες στήλες, αρνητικοί μάρτυρες στις τελευταίες). Δύο δείγματα ήταν εφικτό να εξεταστούν ανά μικροπλάκα.
2. Ολονύκτια επώαση για την προσκόλληση των κυττάρων στην πλάκα.
3. Μόλυνση με σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις κάθε δείγματος έως την αραιώση 10^{-8} , συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών μαρτύρων (μη ενοφθαλμισμένα με τον ιό/ υγιή κύτταρα).
4. Τοποθέτηση πλάκας για επώαση στους 37 °C.
5. Παρακολούθηση των κυττάρων σε καθημερινή βάση σε ανάστροφο μικροσκόπιο και καταγραφή των κυτταρικών αλλοιώσεων.
6. Λήξη παρακολούθησης από την στιγμή εμφάνισης κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) στα κύτταρα – αρνητικούς μάρτυρες, λόγω του ότι ο θάνατος

των κυττάρων στα δείγματα δεν θα οφειλόταν στην κυτταροπαθογόνο δράση του ιού.

7. Υπολογισμός ιικού τίτλου βάσει του τύπου του Karber:

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d(S-0,5)$$

TCID_{50} → η συγκέντρωση του ιού που προκαλεί καταστροφή του 50% των κυττάρων της κυτταροκαλλιέργειας

L → log της χαμηλότερης αραιώσης του τεστ (στο πρωτόκολλο η χαμηλότερη αραιώση ήταν 10^{-1} , οπότε $L=-1$)

d → η λογαριθμική διαφορά μεταξύ των διαδοχικών αραιώσεων (στην προκειμένη περίπτωση $d = \log -1 - (-2) = 1$

S → το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση. Κάθε αραιώση είχε εξεταστεί εις τετραπλούν, οπότε για κάθε αραιώση μπορούσαμε να λάβουμε τιμές από το 0 (αν και στις τέσσερις θέσεις της αραιώσης δεν παρατηρούταν CPE, δηλαδή 0/4) έως το 1 (αν και στις τέσσερις θέσεις της αραιώσης παρατηρούταν πλήρης CPE, δηλαδή 4/4).

3.3 Εκχύλιση γενετικού υλικού

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας ένα πρωτόκολλο που ανέπτυξε η ομάδα του Casas στο τμήμα παθολογικών επιστημών, του πανεπιστημίου στη Manchester [69]. Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου εκχύλισης ήταν εφικτή όχι μόνο η ανάκτηση ικανοποιητικής ποσότητας ιικού γενετικού υλικού, αλλά και η καταστολή διάφορων πιθανών αναστολέων της LAMP. Τα βήματα ήταν τα εξής:

1. Προσθήκη 100μl δείγματος από φιάλη μολυσμένης κυτταροκαλλιέργειας σε eppendorf των 2ml.
2. Τοποθέτηση 300μl Buffer (4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate) για τη λύση των κυττάρων στο ίδιο eppendorf.
3. Προσθήκη 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) στο ίδιο eppendorf.
4. Vortex και επώαση του μίγματος για 20 λεπτά στους 4 °C .

5. Επακόλουθη προσθήκη 400 μl παγωμένης ισοπροπυλικής αλκοόλης (-20 °C).
6. Vortex και επώαση του μίγματος για 20 λεπτά στους 4 °C .
7. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14.000 g.
8. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 500 μl 70 % αιθανόλης.
9. Vortex και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14.000 g.
10. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 100 μl δισ-απεσταγμένου νερού, ελευθέρου DNAσών και RNAσών.
11. Φύλαξη εκχυλισμένου ιικού RNA στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

3.4 Αντίστροφη Μεταγραφή

Όπως προαναφέρθηκε, το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA. Η LAMP όμως, λειτουργεί πάνω σε DNA στόχους. Γι' αυτό τον λόγο ήταν απαραίτητη η αντίστροφη μεταγραφή, μέσω της οποίας το RNA μετατρέπεται σε cDNA. Για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής έγινε χρήση τυχαίων εκκινητών, βάσει του παρακάτω πρωτοκόλλου:

1. Προετοιμασία μίγματος με 1 μl Random primers (100 pmol/μl), 1 μl dNTPs (40 mM), 5 μl ddH₂O σε Eppendorf των 500 μl.
2. Προσθήκη 5 μl RNA που είχε προκύψει από την εκχύλιση στο μίγμα.
3. Spin down, θέρμανση στους 65 °C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή (Primus 25/96) και τοποθέτηση eppendorf στον πάγο.
4. Προετοιμασία ενός δεύτερου μίγματος, το οποίο περιέχει 4μl 5X first strand Buffer , 2μl DTT (0,1M), 0,5μl RNase out (20 units/μl), 0,5μl RT ενζύμου (100 units/ μl) και 1μl ddH₂O.
5. Προσθήκη και των 8 μl του παραπάνω δείγματος στο eppendorf.
6. Spin down και τρεις σταδιακές επώσεις: 10 min στους 25 °C, 50 min στους 37 °C και 15 min στους 70 °C.

Υπήρχε η δυνατότητα one-step RT LAMP, αλλά δεν δοκιμάστηκε σε αυτή την σειρά πειραμάτων. Η διαδικασία αυτή θα ήταν εφικτή με την τροποποίηση του πρωτοκόλλου της LAMP, έτσι ώστε να περιλαμβάνει, εκτός των άλλων, και την προσθήκη μιας αντίστροφης μεταγραφάσης στο μίγμα. Εναλλακτικά, θα μπορούσαμε να στηριχτούμε και στην ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης της

Bst πολυμεράσης. Η αποδοτικότητα της Bst σε αυτό τον τομέα είναι επαρκής, είναι ικανή να δράσει δηλαδή σαν μια RNA- εξαρτώμενη DNA πολυμεράση.

3.5 Εκκινητές LAMP

Η LAMP εφαρμοζόταν κάθε φορά πάνω στο cDNA, το οποίο προ- έκυπτε από την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.

Τα δύο ζεύγη primers για την LAMP είχαν σχεδιαστεί με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Αρχικά είχε πραγματοποιηθεί ομοπαράθεση των τριών αλληλουχιών SABIN μέσω του MEGA software. Στην συνέχεια, οι αλληλουχίες των primers σχεδιάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Primer Explorer V4. Τα κριτήρια σχεδιασμού primers για την LAMP είναι γενικά πολύ αυστηρά (σύνθετοι εσωτερικοί εκκινητές, συγκεκριμένες αποστάσεις μεταξύ του στόχου και των εκκινητών, παραπλήσια Tm και σε όλα τα ζεύγη των εκκινητών, κ.τ.λ.). Οι ανωτέρω προϋποθέσεις εφαρμόστηκαν σε ένα τμήμα της 5' UTR.

Στην εικόνα που ακολουθεί, αναγράφεται η αλληλουχία του κάθε Primer, καθώς και διάφορα άλλα στοιχεία, όπως το μήκος τους (len) και το % ποσοστό GC (GCrate).

| label | 5'pos | 3'pos | len | Tm | 5'dG | 3'dG | GCrate | Sequence |
|-------|-------|------------------------|-----|-------|-------|-------|--------|-----------------------------------------------|
| 1 | ID:1 | dimer(minimum)dG=-2.57 | | | | | | |
| F3 | 393 | 410 | 18 | 59.88 | -6.53 | -4.58 | 0.56 | ACGGGACGCTAGTTGTGA |
| B3 | 580 | 599 | 20 | 59.32 | -4.06 | -6.25 | 0.45 | ATTGTCACCATAAGCAGCCA [ENV-1 ⁽⁻¹⁾] |
| FIP | | 40 | | | | | | ATTAGCCGCATTCAGGGGCC - ACAGGGTGTGAAGAGCCTAT |
| BIP | | 40 | | | | | | TGTCGTAACGCGCAAGTCCG - GAAACACGGACACCCAAAGT |
| F2 | 411 | 430 | 20 | 60.03 | -5.84 | -4.81 | 0.50 | ACAGGGTGTGAAGAGCCTAT |
| F1c | 452 | 471 | 20 | 64.86 | -3.97 | -7.64 | 0.60 | ATTAGCCGCATTCAGGGGCC [ENV-2 ⁽⁺¹⁾] |
| B2 | 546 | 565 | 20 | 60.24 | -4.18 | -4.16 | 0.50 | GAAACACGGACACCCAAAGT |
| B1c | 512 | 531 | 20 | 64.93 | -5.74 | -6.02 | 0.60 | TGTCGTAACGCGCAAGTCCG |

Εικόνα 3.5.1: Χαρακτηριστικά των δύο ζευγών primers που χρησιμοποιήθηκαν.

Ο στόχος, ο οποίος εντοπίζεται ανάμεσα στο 5' άκρο του F1c και το 3' άκρο του B1 (ή ανάμεσα στο 3' άκρο του F1 και το 5' άκρο του B1c), αποτελείται από 41 bp ($512 - 471 = 41$), σύμφωνα με τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα.

3.6 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων LAMP

Το επόμενο βήμα μετά από την εκτέλεση της LAMP σε θερμοκυκλοποιητή (PRIMUS 25) που διέθετε το εργαστήριο μικροβιολογίας- ιολογίας, ήταν η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Η εξέταση των αποτελεσμάτων της LAMP πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%. Η επιτυχής ανίχνευση προϋπέθετε:

- Ανίχνευση θετικών δειγμάτων υπό τη χαρακτηριστική μορφή 'laddering pattern', δηλαδή πολλαπλών ζωνών [70] και
- Απουσία οποιασδήποτε ζώνης στα αρνητικά δείγματα/ control.

Η διαδικασία κατασκευής του gel αναγράφεται παρακάτω:

1. Προσθήκη 40 ml TBE και 0,48 g αγαρόζης σε κωνική φιάλη των 250 ml.
2. Θέρμανση του μίγματος για περίπου ένα λεπτό σε φούρνο μικροκυμάτων, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
3. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr2) με τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
4. Τοποθέτηση μίγματος σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης και αναμονή γύρω στα 10 λεπτά για την πήξη του.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής, ακολουθεί φόρτωση 5 μl από κάθε LAMP προϊόν, αναμιγμένα με τη χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης, στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Εκτός των δειγμάτων, είναι απαραίτητη και η χρήση ενός μάρτυρα μοριακού βάρους (Invitrogen), τον οποίο τοποθετούσαμε πάντα στην πρώτη θέση/πηγάδι (5 μl και πάλι). Ο μάρτυρας που επιλέχθηκε φανέρωνε ζώνες ανά 50 bp.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης για αυτή την σειρά πειραμάτων διαρκούσε γύρω στα 30 min. Η ένταση είχε ρυθμιστεί στα 50 mA, ενώ η τάση στα 120 V.

4. Πειραματικό Μέρος

Το πρώτο και ίσως το σημαντικότερο τμήμα του πειραματικού μέρους ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την λειτουργία του πρωτοκόλλου. Στην προσπάθεια αυτή έγιναν μεταβολές σε τρεις παραμέτρους:

- **Συγκέντρωση Θεικού Μαγνησίου** ([MgSO₄]): Το Buffer περιείχε ήδη 2 mM Θεικού Μαγνησίου. Η επιπλέον ποσότητα που προσθέσαμε για το σταντάρισμα ήταν μεταξύ 0 – 1,5 μl Θεικού Μαγνησίου, αρχικής συγκέντρωσης 100 mM.
- **Θερμοκρασία κύριας επώασης**: επιλογή μεταξύ 60 °C και 65 °C.
- **Χρόνος κύριας επώασης**: πραγματοποιήθηκαν δοκιμές επώασεων από 30 – 60 min.

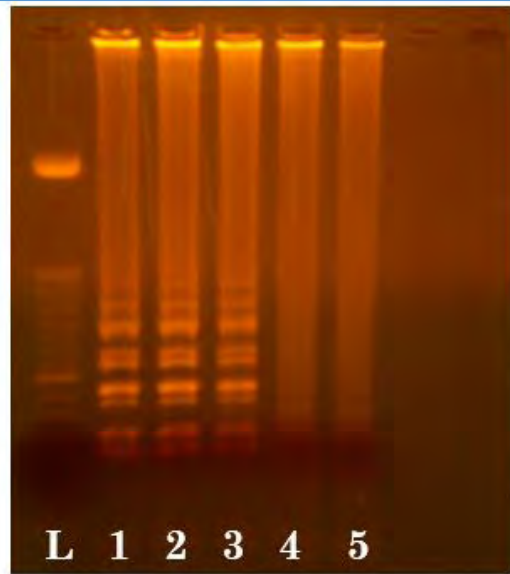
Τελικά καταλήξαμε στις συνθήκες που αναγράφονται παρακάτω:

| | ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ |
|-----------------------------|----------------|
| dNTPs (40 mM) | 3,5 μl |
| 10x Buffer | 2,5 μl |
| MgSO ₄ (100 mM) | 0,5 μl |
| FIP (50 pmol/μl) | 0,8 μl |
| BIP (50 pmol/μl) | 0,8 μl |
| F3 (50 pmol/μl) | 0,1 μl |
| B3 (50 pmol/μl) | 0,1 μl |
| Bst 3.0 DNA pol | 1 μl (8 Units) |
| ddH ₂ O | 12,7 μl |

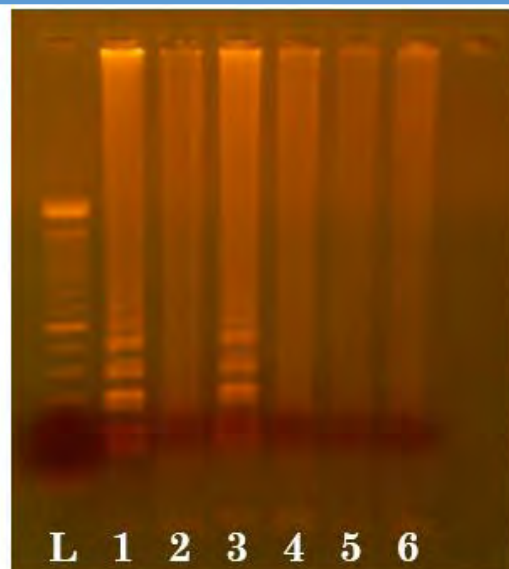
| ΕΠΩΑΣΗ | |
|--------|--------|
| 65 °C | 40 min |
| 80 °C | 5 min |

Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε και στα τρία στελέχη SABIN και στα κλινικά/περιβαλλοντικά δείγματα. Σε κάθε περίπτωση, ο τίτλος του μολυσματικού φορτίου είχε υπολογιστεί με την διαδικασία των TCID₅₀. Το όριο ανίχνευσης και στα 3 SABIN ήταν τα 10 TCID₅₀. Παρατίθενται και τα πηκτώματα των αντίστοιχων ηλεκτροφορήσεων:

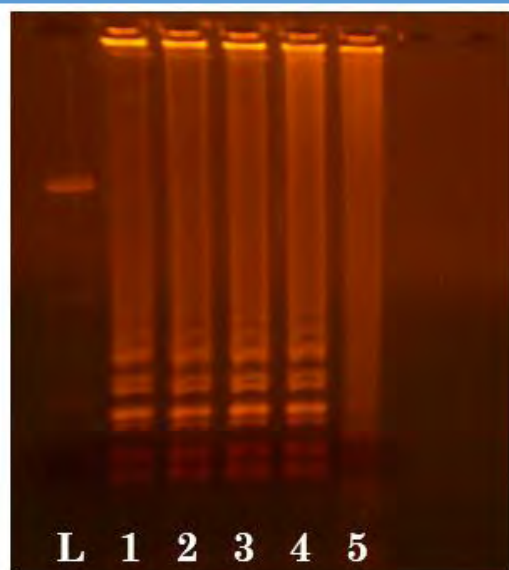
1. S1 [10^5] \rightarrow (+)
2. S1 [10^3] \rightarrow (+)
3. S1 [10] \rightarrow (+)
4. S1 [1] \rightarrow (-)
5. ddH₂O \rightarrow (-)



1. S2 [10^5] \rightarrow (+)
2. ddH₂O \rightarrow (-)
3. S2 [10] \rightarrow (+)
4. ddH₂O \rightarrow (-)
5. S2 [1] \rightarrow (-)
6. ddH₂O \rightarrow (-)

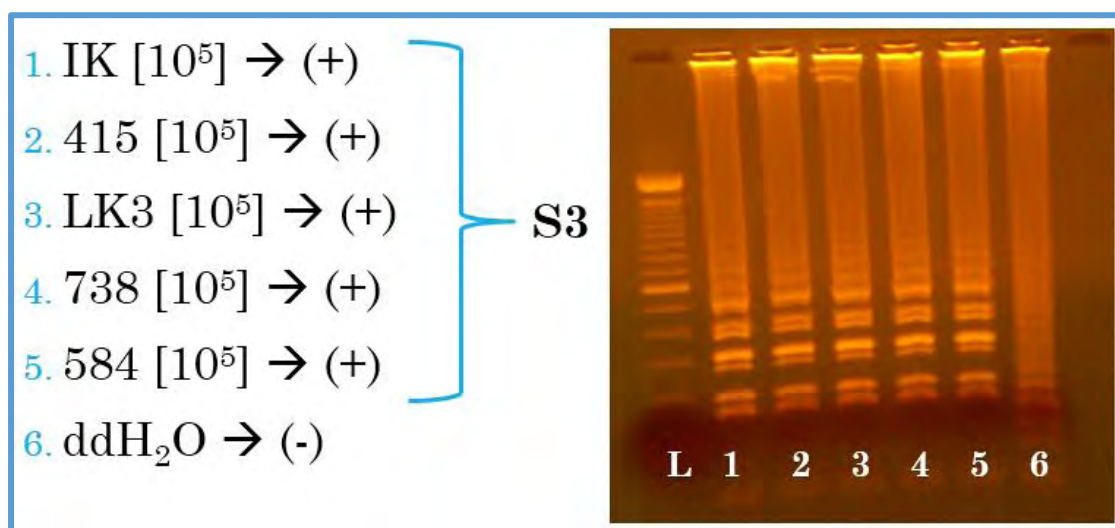
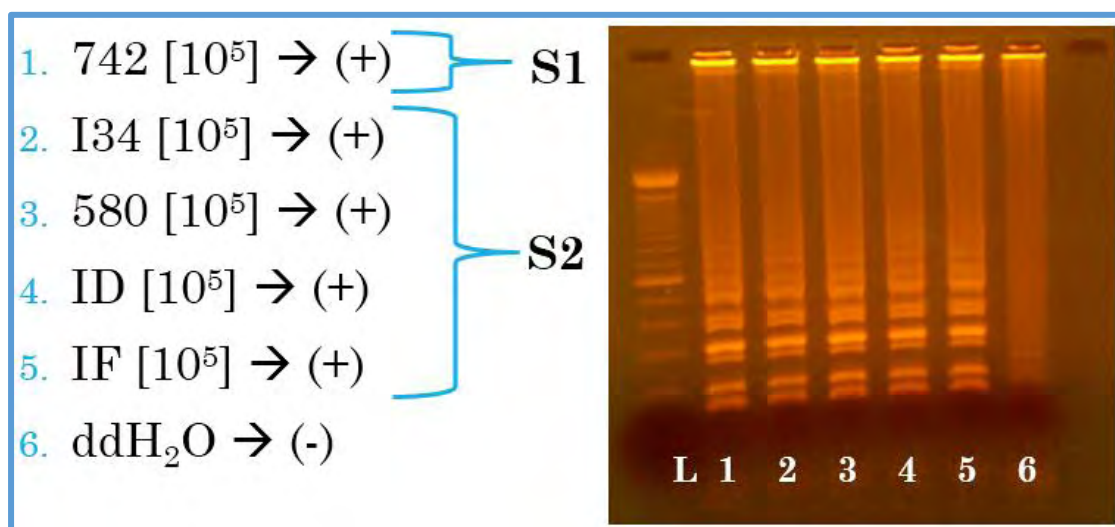


1. S3 [10^5] \rightarrow (+)
2. S3 [10^3] \rightarrow (+)
3. S3 [10] \rightarrow (+)
4. S3 [1] \rightarrow (+)
5. ddH₂O \rightarrow (-)



Παρατηρείται και στις τρεις περιπτώσεις η απουσία ζωνών στους αρνητικούς μάρτυρες (ddH₂O), γεγονός που εξασφαλίζει πως δεν υπήρξε καμία απολύτως επιμόλυνση. Με αυτές τις φωτογραφίες επιβεβαιώνεται και η βάση της τεχνικής: γίνεται αντιληπτό πως αν και ο στόχος είναι μοναδικός, εν τέλει παράγεται ένα πλήθος προϊόντων, διαφόρων ζευγών βάσεων, τα οποία περιέχουν τον αρχικό στόχο σε πολλά αντίγραφα. Γι' αυτό τον λόγο λαμβάνονται αυτές οι πολλαπλές ζωνώσεις.

Το δεύτερο σκέλος της εργασίας περιλάμβανε την εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε δέκα διαφορετικά κλινικά/περιβαλλοντικά δείγματα SABIN, τα οποία είχαν προηγουμένως επιβεβαιωθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως όλα τα στελέχη SABIN των κλινικών δειγμάτων ήταν ανασυνδυασμένα.



Παρατίθεται επιπλέον η προέλευση και των δέκα κλινικών δειγμάτων, τα οποία καταστράφηκαν σύντομα μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, την 17^η Δεκεμβρίου 2015, βάσει κανονισμών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO).

| Κλινικό δείγμα | Προέλευση |
|-----------------------|----------------------|
| 742 | Περιβάλλον |
| 134 | VAPP* |
| 580 | Υγιής εμβολιαζόμενος |
| ID | Υγιής εμβολιαζόμενος |
| IF | Υγιής εμβολιαζόμενος |
| IK | Ουδετεροπενία |
| 415 | VAPP* |
| LK3 | Περιβάλλον |
| 738 | Περιβάλλον |
| 584 | Περιβάλλον |

* Vaccine-associated paralytic poliomyelitis (τα άτομα αυτά εμφάνισαν συμπτώματα πολιομυελίτιδας εξαιτίας του OPV εμβολίου)

5. Συζήτηση

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ήμασταν σε θέση να δούμε κάποια από τα πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα της τεχνικής LAMP.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα ήταν αδιαμφισβήτητα η ταχύτητα της μεθόδου. Το κέρδος χρόνου ξεπερνούσε την μία ώρα, σε σχέση με την διαδικασία που ακολουθεί το εργαστήριο για την κλασσική RT-PCR. Ο χρόνος εκτέλεσης θα μπορούσε να είχε μειωθεί ακόμα περισσότερο, εάν η αντίστροφη μεταγραφή και η LAMP γίνονταν ταυτόχρονα (One step RT-LAMP) ή εάν είχε παραληφθεί η διαδικασία της εκχύλισης. Ωστόσο, η παράληψη της εκχύλισης θα μείωνε κατά πολύ το όριο ανίχνευσης. Η θυσία αυτή θα ήταν ιδιαίτερα αντιληπτή στα κλινικά δείγματα, τα οποία εκτός του χαμηλού ιικού φορτίου, φέρουν και πολύ υψηλή συγκέντρωση αναστολέων.

Ένα ακόμα δυνατό σημείο ήταν η ευαισθησία της μεθόδου. Η ανίχνευση 10 TCID₅₀ και οριακά ακόμα κι ενός TCID₅₀ στην περίπτωση των SABIN 3 φανερώνει την ισχύ της LAMP. Το 1 TCID θα ήταν δυνατό να ανιχνευτεί ωστόσο και με την κλασσική

PCR. Σε αρκετές μελέτες, η ευαισθησία της RT-LAMP φαίνεται να είναι 10-100 φορές μεγαλύτερη από αυτή της RT-PCR [71-74]. Παρ' όλα αυτά, η ευαισθησία των δύο μεθόδων ήταν παραπλήσια στην συγκεκριμένη περίπτωση.

Η ειδικότητα της μεθόδου ήταν ικανοποιητική, καθώς με αυτό το πρωτόκολλο ήταν δυνατή η ανίχνευση και των τριών εμβολιακών στελεχών SABIN. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο πως αυτό το πρωτόκολλο δεν ανιχνεύει μόνο SABIN. Πρακτικά, η θετικοποίηση αυτής της δοκιμής LAMP σε ένα άγνωστο δείγμα θα οδηγούσε στο συμπέρασμα ότι ο ασθενής έχει μολυνθεί με κάποιον εντεροϊό τύπου C. Για περαιτέρω πληροφορίες, θα χρειαζόνταν συμπληρωματικές μέθοδοι, κατά προτίμηση κλωνοποίηση και αλληλούχιση. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της φύσης των primers, οι οποίοι είχαν σχεδιαστεί να υβριδίζονται σε ένα τμήμα της 5' UTR, μιας πολύ υψηλά συντηρημένης περιοχής μεταξύ των εντεροϊών.

Το κόστος των αντιδραστηρίων ήταν περίπου παραπλήσιο με αυτό της PCR. Παρ' όλα αυτά η μη αναγκαιότητα θερμοκυκλοποιητή εξακολουθεί να είναι ένα μεγάλο προνόμιο της LAMP [70]. Γενικά, οι τεχνολογίες ισοθερμικής ενίσχυσης έχουν αυτό το προνόμιο π.χ. nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), transcription mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA) και rolling circle amplification (RCA) [71]. Εφόσον όμως το εργαστήριο διέθετε ήδη, αποφασίστηκε εν τέλει να χρησιμοποιηθεί.

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της LAMP, το οποίο κληθήκαμε να αντιμετωπίσουμε ήταν ο σχεδιασμός των εκκινητών. Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει μια σειρά αρκετών αυστηρών προϋποθέσεων που πρέπει να τηρούνται. Οι εκκινητές ήταν τέσσερις, δύο εκ των οποίων ήταν σύνθετοι. Είναι σαφές πως δεν υπάρχει τόση μεγάλη ελευθερία όσο στον αντίστοιχο σχεδιασμό εκκινητών PCR.

Τα δύο τελευταία μειονεκτήματα αφορούν την LAMP σε γενικότερο πλαίσιο: πρόκειται για το μέγεθος του στόχου και το εύρος χρήσης της. Η συγκεκριμένη ισοθερμική τεχνική δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική στον πολλαπλασιασμό στόχων άνω των 200 bp. Τέλος, το εύρος χρήσης της LAMP είναι αρκετά περιορισμένο προς το παρόν, το οποίο εστιάζεται κυρίως στην ανίχνευση παθογόνων. Υπάρχουν

μερικές δευτερεύουσες εφαρμογές, οι οποίες αναλύθηκαν στην ενότητα 'Εφαρμογές', αλλά η ανάπτυξη τους δεν είναι επαρκής (για την ώρα τουλάχιστον).

Εν κατακλείδι, η LAMP, παρά τα μειονεκτήματά της, θεωρείται μία πολύ χρήσιμη μοριακή τεχνική πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων. Είναι πολύ πιθανή η αύξηση της δημοφιλίας της μέσα στα επόμενα χρόνια.

6. Βιβλιογραφία

1. Michael J. Imperiale, A. Casadevall (2015). The Importance of Virology at a Time of Great Need and Great Jeopardy. *mBio* vol. 6, no. 2.
2. L. W. Enquist and for the Editors of the Journal of Virology (2009). Virology in the 21st Century. *J. Virol.* June 2009 vol. 83, no. 11: 5296-5308
3. Daniel DiMaio, Fellow, American Academy of Microbiology (2014). Is Virology Dead? *mBio* vol. 5 no. 2
4. BROCK: Βιολογία των Μικροοργανισμών, Τόμος Ι, M. Madigan, J. Martinko, J. Parker, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2010
5. Fields Virology, Fifth Edition, Volume I, David M. Knipe, Peter M. Howley, 2007
6. Virology: Principles and Applications, Second Edition, John B. Carter, Venetia A. Saunders, WILEY Press, 2012.
7. Μαρκουλάτος Παναγιώτης – Σημειώσεις Μοριακής Ιολογίας
8. Baltimore D (1971). "Expression of animal virus genomes". *Bacteriol Rev* 35 (3): 235–41
9. ICTV. "Virus Taxonomy: 2014 Release"
10. E. Wimmer, C.U.T. Hellen, X. Cao, *Annu. Rev. Genet.* Vol. 27, 353-436 (1993).
11. Viruses and Human Disease, Ellen G. Strauss, James H. Strauss, Academic Press, 2007
12. Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B. (2015). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of Virology*, Volume 160, Issue 7, pp 1837–1850.

13. Le Gall, O., Christian, P., Fauquet, C.M., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Nakashima, N., Stanway, G., Gorbalenya, E.E. (2008). Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo T = 3 virion architecture. *Archives of Virology* 153: 715-727.
14. Sanfaçon, H., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J. and Chen, Y. (2011). Picornavirales. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 835-839. San Diego: Elsevier.
15. Woo, P.C., Lau, S.K., Choi, G.K., Huang, Y., Teng, J.L., Tsoi, H.W., Tse, H., Yeung, M.L., Chan, K.H., Jin, D.Y. and Yuen, K.Y. (2012). Natural occurrence and characterization of two IRES elements in a novel virus, canine picodistrovirus, in the picornavirus-like superfamily. *J. Virol.* 86: 2797-2808. 2011 Dec 28. [Epub ahead of print]
16. Hogle, J. M., Chow, M., & Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of polio-virus at 2.9 Å resolution. *Science* 229(4720), 1358-65.
17. Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., & Brown, F. (1989). The threedimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337(6209), 709-16.
18. J. K. Muckelbauer, M. Kremer, I. Minor, G. Diana, F. J. Dutko, J. Groarke, D. C. Pevear, M. G. Rossmann, 1995 The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure* 3(7), 653-67.
19. M. Steven Oberste, Kaija Maher, David R. Kilpatrick & Mark A. Pallansch (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *J Virol.* Mar; 73(3): 1941–1948.
20. Smyth, M.S., & Martin, J.H. (2002). Picornavirus uncoating. *Mol Pathol.* 55(4), 214-9
21. *Encyclopaedia of Virology*, Second Edition, Academic Press. Allan Granoff, Robert G. Webster.

22. Encarnación M., Rosario F., Javier F., Gloria L., Rosa D.(2015). Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res.* 2015 Aug 3;206:62-73.
23. Jonathan B. Rohll, N. Percy, R. Ley, D. J. Evans, Jeffrey W. Almond, Wendy S. Barclay. (1994). The 5'-Untranslated Regions of Picornavirus RNAs Contain Independent Functional Domains Essential for RNA Replication and Translation. *J Virol.* 1994 Jul; 68(7): 4384–4391.
24. M. Steven Oberste, Kaija Maher, David R. Kilpatrick, Mary R. Flemister, Betty A. Brown, Mark A. Pallansch (1999). Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.37, No. 5, p. 1288–1293.
25. C. Muslin, M. Joffret, I. Pelletier, B. Blondel, F. Delpeyroux (2015). Evolution and Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination: Plasticity and Phenotypic Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region. *PLoS Pathog.* Nov 12;11(11):e1005266.
26. Didier Hober, Famara Sané, Karena Riedweg, Ilham Moumna, Anne Goffard, Laura Choteau, Enagnon Kazali Alidjinou and Rachel Desailoud. (2013). *Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the Enteroviruses.* book edited by Alan P. Escher and Alice Li.
27. C. E. Cameron, Oh. H. Suk, I. M. Moustafa. (2010). Expanding knowledge of 3proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiol.* 5(6), 867-81.
28. C. I. Nugent, K. L. Johnson, P. Sarnow, K. Kirkegaard. (1999). Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol* 73 1 427 35
29. Lin, J. Y., Chen, T. C., Weng, K. F., Chang, S. C., Chen, L. L., & Shih, S. R. (2009). Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci.* 16, 103.
30. Nicholson, R., J. Pelletier, S.-Y. Le, and N. Sonenberg. 1991. Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus type 2: in vivo translation studies. *J. Virol.* 65:5886–5894.

31. Pelletier, J., G. Kaplan, V. R. Racaniello, and N. Sonenberg. 1988. Capindependent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol. Cell. Biol.* 8:1103–1112.
32. Pelletier, J., and N. Sonenberg. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature (London)* 334:320–325.
33. Pelletier, J., and N. Sonenberg. 1989. Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J. Virol.* 63:441–444.
34. Jonathan B. Rohll, David H. Moon, David J. Evans, Jeffrey W. Almond, Nugent, C. I., Johnson, K. L., Sarnow, P., & Kirkegaard, K. (1999). Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol*, 73(1),427-35.
35. Saskia E. Bakker, E. Gropelli, Arwen R. Pearson, Peter G. Stockley, David J. Rowlands, Neil A. Ranson. (2014). Limits of Structural Plasticity in a Picornavirus Capsid Revealed by a Massively Expanded Equine Rhinitis A Virus Particle. *J. Virol.* June 2014 vol. 88 no. 11, 6093-6099.
36. Ann C. Palmenberg. (1990). Proteolytic Processing of Picorna Viral Polyprotein. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 44: 603-623.
37. Lwoff, A., Dulbecco, R., Vogt, M. & Lwoff, M. (1955) *Virology* 1, 128-139.
38. Colbere-Garapin, F., Christodoulou, C., Crainic, R., & Pelletier, I. (1989). Persistent poliovirus infection of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(19),7590-4.
39. Cristina Daleno, Antonio Piralla, Alessia Scala,^a Fausto Baldanti,^b Vytautas Usonis,^c Nicola Principi,^a and Susanna Esposito (2012). Complete Genome Sequence of a Novel Human Enterovirus C (HEV-C117) Identified in a Child with Community-Acquired Pneumonia. *PLOS ONE*, 2013.
40. N. Siafakas, P. Markoulatos, C. Vlachos, G. Stanway, G. Tzanakaki, J. Kourea-Kremastinou (2003). Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Molecular and Cellular Probes* [2003, 17(2-3):113-123].

41. Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου, Βασιλική Κυριαζοπούλου- Δαλαϊνά: Ιατρική Μικροβιολογία & Ιολογία, University Studio Press, Β' Έκδοση, 2004
42. P. Muir, U. Kämmerer, K. Korn, Mick N. Mulders, T.Pöyry, B. Weissbrich, R. Kandolf, Graham M. Cleator, Anton M. van Loon (1998). Molecular Typing of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):202-27.
43. Hua-Bing Zhao, Guang-Ya Yin, Guo-Ping Zhao, Ai-Hua Huang, Jun-Hong Wang, Shuang-Feng Yang, Hong-Sheng Gao, Wei-Jun Kang Wildin S. , Chonmaitree T. (1987). The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis.
44. T. Notomi, H. Okoyama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. (2000). Loop Mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic Acids Research, Vol. 28, Issue 12, pp e63.
45. Farooq, Latif, Irshad, Ullah, Zahur, Naeem, Khan, S. U. Ahmed, Rodriguez, Smoliga G. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP): a new approach for the detection of foot-and-mouth disease virus and its serotypes in Pakistan. Iranian Journal of Veterinary Research, Article 1, Volume 16, Issue 4, Autumn 2015, Page 331-334.
46. Kaneko H1, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. (2006). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods. 2007 Apr 10;70(3):499-501.
47. Yasuyoshi M., Kentaro N., Norihiro T., Tsugunori N. (2001) Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. Biochemical and Biophysical Research Communications 289, 150–154.
48. Amrita B., Somnath R., Susheel Kumar S., Sudip Kumar D., Satish C., SV Ngachan. (2016). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of chilli veinal mottle virus. Arch Virol. 2016 Apr 11. [Epub ahead of print].
49. Zengguo C., Hualei W., Lina W., Ling L., Hongli J., Changping X., Na F., Jianzhong W., Qian L. , Yongkun Z., Tiecheng W., Yuwei G., Yiyu L., Songtao Y., Xianzhu X. (2016). Visual Detection of West Nile Virus Using Reverse

- Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Vertical Flow Visualization Strip. *Front Microbiol.* 2016; 7: 554.
50. K. Nagamine, T. Hase, T. Notomi. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, Volume 16, Issue 3, Pages 223-229.
 51. X. Wang, J. Zhu, Q. Zhang, Z. Xu, F. Zhang, Z. Zhao, W. Zheng, L. Zheng. (2011). Detection of enterovirus 71 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods.* 2012 Feb;179(2):330-4.
 52. Arita M. , Ling H. , Yan D. , Nishimura Y. , Yoshida H. , Wakita T. , Shimizu H. (2009). Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases. *BMC Infect Dis.* 2009 Dec 16;9:208.
 53. X. Ding, K. Nie, L. Shi, Y. Zhang, L. Guan, D. Zhang, S. Qi, X. Ma. (2015). Improved Detection Limit in Rapid Detection of Human Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 by a Novel Reverse Transcription- Isothermal Multiple-Self-Matching-Initiated Amplification Assay. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun;52(6):1862-70.
 54. S. Fu, G. Qu, S. Guo, L. Ma, N. Zhang, S. Zhang, S. Gao, Z. Shen. (2010). Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011 Apr;163(7):845-850.
 55. Z. Kithinji Njiru, A. Stanislaw John Mikosza, T. Armstrong, J. Charles Enyaru, J. Mathu Ndung'u, A. Richard Christopher Thompson. (2008). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *e. PLoS Negl Trop Dis* 2(2): e147.
 56. Misawa, Y., Yoshida, A., Saito, R., Yoshida, H., Okuzumi, K., Ito, N., et al. (2007). *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13, 134–140
 57. Fukuta, S., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Hasegawa, M., Hayashi, I., et al. (2004). *European Food Research and Technology*, 218, 496–500.
 58. Lee, D., La Mura, M., Allnutt, T. R., & Powell, W. (2009). *BMC Biotechnology*, 9, 7.

59. Guan, X. Y., Guo, J. C., Shen, P., Yang, L. T., & Zhang, D. B. (2010). *Food Analytical Methods*.
60. Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S., Takahashi, Y., et al. (2004). *Theriogenology*, 62, 887–896.
61. Hirayama, H., Kageyama, S., Takahashi, Y., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S., et al. (2006). *Theriogenology*, 66, 1249–1256.
62. . Horibe, D., Ochiai, T., Shimada, H., Tomonaga, T., Nomura, F., Gun, M., et al. (2006). *International Journal of Cancer*, 120, 1063–1069.
63. T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, H. Kanda (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* (2015) Vol. 53, No. 1, pp. 1–5.
64. Yamazaki, W., Taguchi, M., Ishibashi, M., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., et al. (2008). *Journal of Medical Microbiology*, 57, 444–451.
65. Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., et al. (2009). *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1597–1603.
66. M. Kitamura, M. Araganec , K. Nakamurac , K. Watanabed , Y. Sasaki. (2016). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of Cannabis sativa. *Biol Pharm Bull*. 2016 Apr 27. [Epub ahead of print].
67. Eleanor J. Bell, Bonnie P. Cosgrove (Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bull World Health Organ*. 1980; 58(3): 423–428.
68. Antonio R. Pombinho, Vincent Laiz, Duarte M. Molha, Sandra M. P. Marques, M. Leonor Cancela. (2004) Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost Sparus aurata ; evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix Gla protein and osteocalcin. *Cell Tissue Res*. 2004 Mar;315(3):393-406.
69. Casas I., Powell L. , Klapper PE, Cleator GM. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*. 1995 May;53(1):25-36.
70. Hao L., Xin Tong Li, Bo Hu, Lei Zhang, Xiang-hong Xue, Shuang Lv, Rong-guang L., Ning S., Xi-jun Y. (2016). Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of

- Batai Virus in Cattle and Mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016 Jun;16(6):415-22.
71. M. Mashooqa, D. Kumarb, A. Kiran Niranjana, R. Kumar Agarwala, R. Rathore. (2016). Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for Salmonella: A new tool for DNA quantification. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 126, July 2016, Pages 24–29.
 72. Weidmann M, Rudaz V, Nunes MR, Vasconcelos PF, et al. Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3299–3305.
 73. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Johari J, et al. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect Dis* 2013; 13:387.
 74. Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, et al. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RTLAMP). *Virology* 2014; 11:139
 75. Ihira, M., Akimoto, S., Miyake, F., Fujita, A., Sugata, K., Suga, S., et al. (2007). *Journal of Clinical Virology*, 39, 22–26.
 76. Iwamoto, T., Sonobe, T., & Hayashi, K. (2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2616–2622.
 77. Ihira, M., Yoshikawa, T., Enomoto, Y., Akimoto, S., Ohashi, M., Suga, S., et al. (2004). *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 140–145
 78. Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91–92.
 79. N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda & T. Notomi (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008;3(5):877-82
 80. David Veessler, John E. Johnson (2013). Virus Maturation. *Annu Rev Biophys.* 2012; 41: 473–496.
 81. Geojith G, Dhanasekaran S, Chandran SP, Kenneth J (2011). "Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of Mycobacterium tuberculosis isolates in a resource limited setting". *J. Microbiol. Methods* 84 (1): 71–3.

Εικόνες

Εικόνα 1.3.2.1: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html

Εικόνα 1.3.3.1: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html

Εικόνα 1.3.3.2: Encarnación M., Rosario F., Javier F., Gloria L., Rosa D.(2015). Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. Virus Res. 2015 Aug 3;206:62-73.

Εικόνα 1.3.4.1: Lonneke van der Linden, Katja C. Wolthers, Frank J.M. van Kuppeveld. (2015). Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses . Viruses 2015, 7(8), 4529-4562;

Εικόνα 1.3.4.2: J. Lindsay Whitton, Christopher T. Cornell & Ralph Feuer. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. Nat Rev Microbiol. 2005 Oct;3(10):765-76.

Εικόνα 1.5.3.1: Kelly A. Curtis, , Donna L. Rudolph, S. Michele Owen (2008). Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). J Virol Methods. 2008 Aug;151(2):264-70.

Εικόνες 1.5.4.1 & 1.5.4.2: T. Notomi, H. Okoyama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. (2000). Loop Mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28(12):E63.

Εικόνες 1.5.4.3 -1.4.5.8: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html