

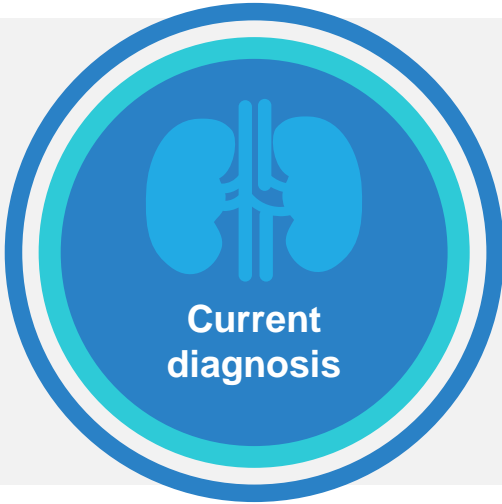
การพัฒนาเทคนิค Real-time LAMP

เพื่อการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน IP-10
เครื่องหมายชีวภาพของโรคไตอักเสบลูปัสในปัสสาวะ

วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย
นักวิจัยอาวุโส

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช.

Lupus nephritis



- การเจาะชิ้นเนื้อไต (Biopsy)
 - ใช้เวลานาน (longer for results)
 - ผู้ป่วยได้รับความเจ็บปวด

- วิธีการทางอณูชีววิทยา (PCR, real-time PCR)

- มีความจำเพาะสูง (High specific)
- มีความไวในการตรวจสูง (High sensitive)
- ใช้เครื่องมือและสารเคมีที่ราคาแพง (More expensive)

	Class II	Class III	Class IV	Class V	Class VI	P-value
IP-10	0.86 ± 0.27	1.55 ± 0.50	2.44 ± 0.14	1.25 ± 0.26	1.1 ± 0.1	<0.001
CXCR3	1.12 ± 0.26	1.53 ± 0.24	1.81 ± 0.17	0.84 ± 0.20	0.5 ± 0.1	0.005
TGF- β	1.64 ± 0.26	2.0 ± 0.52	3.24 ± 0.13	1.40 ± 0.44	3.03 ± 0.38	<0.001
VEGF	0.27 ± 0.27	1.91 ± 0.15	2.39 ± 0.20	0.29 ± 0.29	3.03 ± 0.62	<0.001

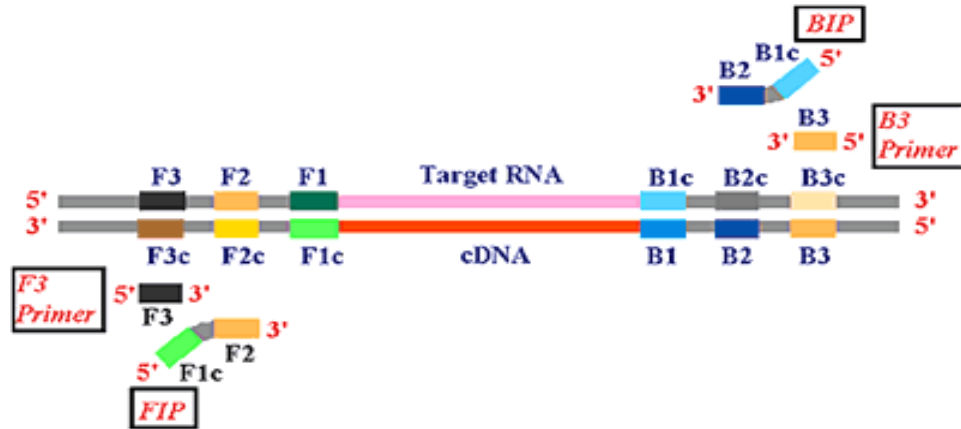
^aData expressed as mean \pm s.e.m. of log copies/ μ g total RNA.

^bThe groups of patients were identified by kidney biopsy based on WHO classification.

IP-10: interferon-producing protein 10, TGF- β : transforming growth factor- β , VEGF: vascular endothelial growth factor.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)


- Can amplify target nucleic acid to 10^9 copies within 30-60 min.
- Allows amplification of DNA with specificity, and sensitivity under isothermal conditions at 60–65 °C.
- Relies on autocycling strand displacement DNA synthesis by the *Bst* DNA polymerase
- LAMP is highly specific because LAMP reaction requires 4 primers recognizing 6 independent target sequences.
- As the reaction is conducted under isothermal conditions, it can be performed with a simple and inexpensive heating block.




Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Primer

1 Outer Primer

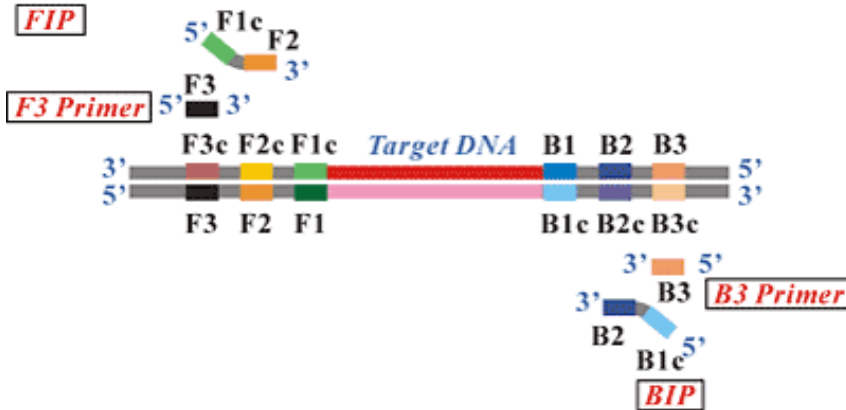
F3 : 

B3 : 

2 Inner Primer

FIP :  5'-F1c - F2

BIP :  5'-B1c - B2



Rapid

Inexpensive

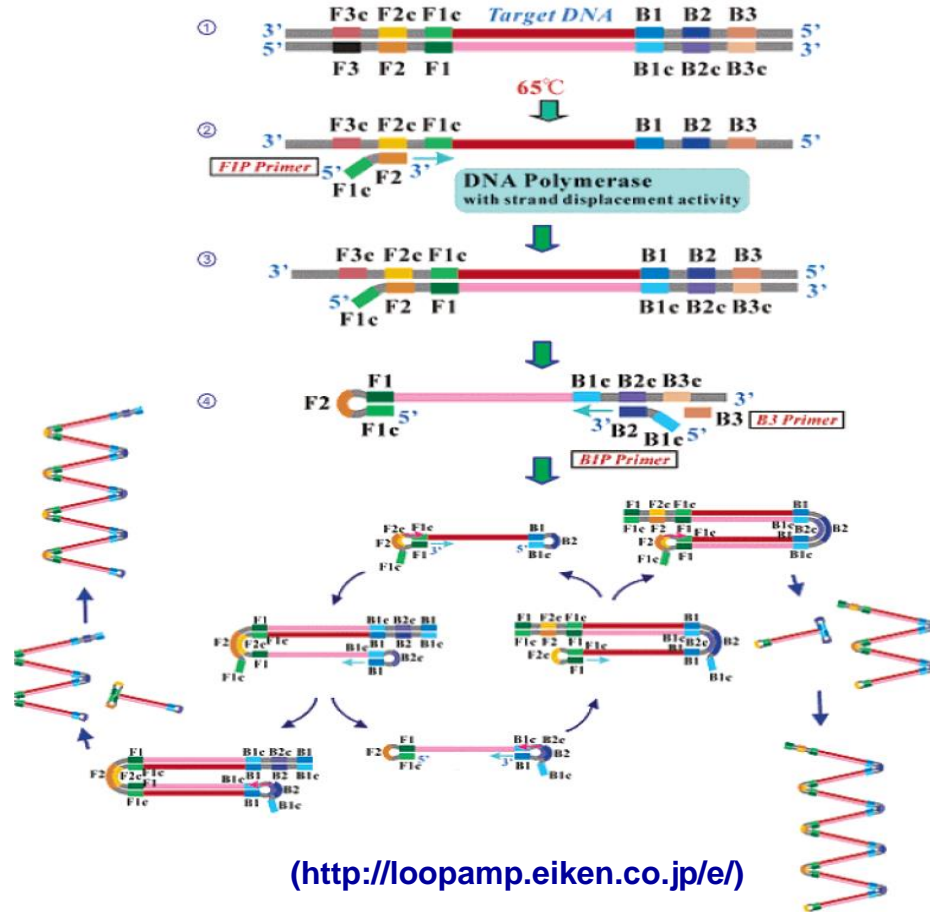
Specificity

Sensitivity

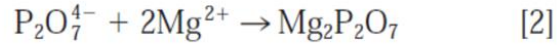
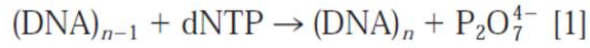
Simple

- 4 primers recognize 6 specific gene sequences
- *Bst* DNA Polymerase strand-displacing activity and autocycling

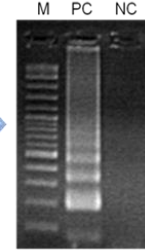
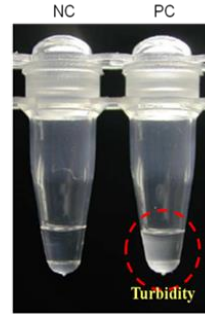
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)



Turbidity

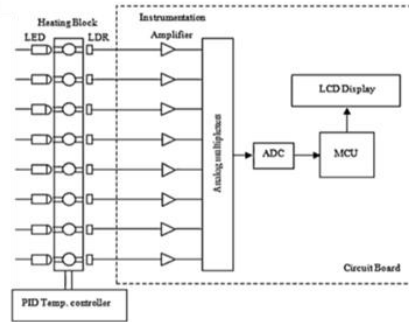


Agarose gel electrophoresis

LAMP products



LED

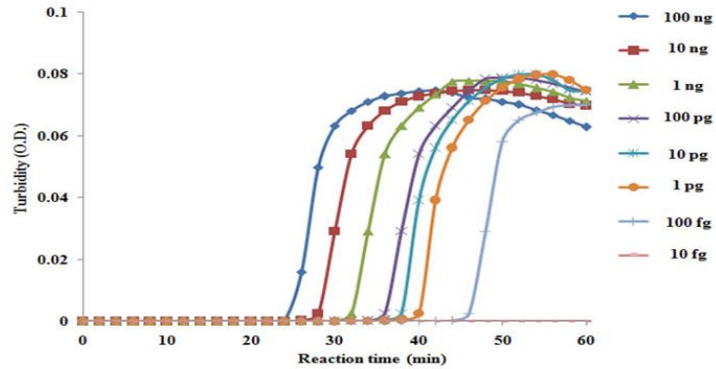


Sample wells

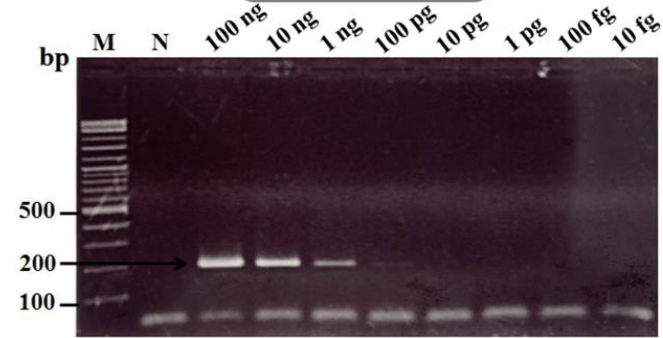


Sensitivity test จากการพัฒนาเทคนิค Real-time LAMP ในโรคกึ่งโตช้า

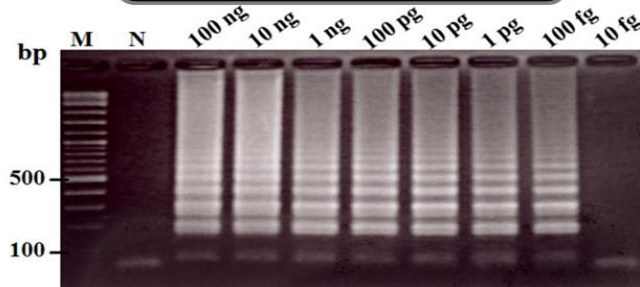
Real-time RT-LAMP



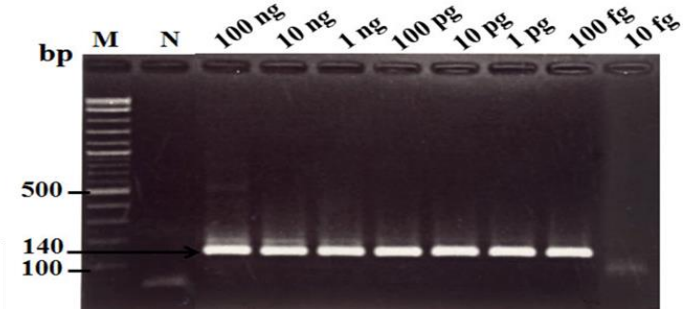
RT-PCR



RT-LAMP by AGE



Nested RT-PCR



เปรียบเทียบค่าใช้จ่าย

ระหว่างเทคนิค Real-time LAMP กับเทคนิค Real-time

เทคนิค	Real-time PCR	Real-time LAMP
ต้นทุน 1 ตัวอย่าง	1,500 บาท	200 บาท
ราคาเครื่องมือ	1 ล้านบาท	1 แสนบาท



วัตถุประสงค์



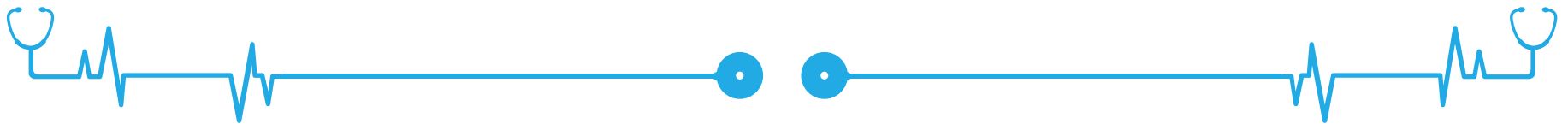
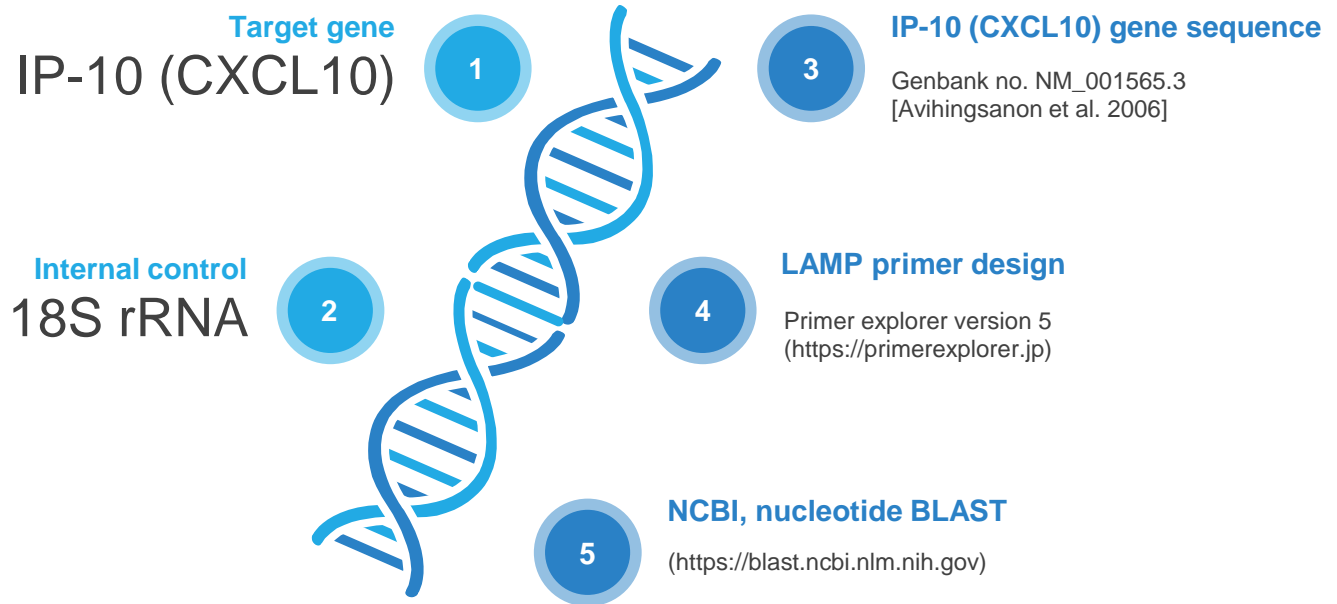
เพื่อพัฒนาเทคนิค Real-time LAMP

ในการตรวจเชิงปริมาณ urine mRNA

ของยีน IP-10 ซึ่งเป็น Biomarker ที่สำคัญ

ของโรคไตอักเสบเรื้อรัง

LAMP Design



การประเมินประสิทธิภาพ เทคนิค Real-time LAMP

ตรวจวินิจฉัย

ใช้ RNA ที่สกัดได้ 200 ng มาตรวจวัดค่า IP10

ด้วยเทคนิค Real-time LAMP

เก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บปัสสาวะผู้ป่วยที่มารับบริการที่หน่วยโรคไต
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย โดยเก็บปัสสาวะให้ได้ 100 ml



สกัด RNA

ใช้วิธีเดียวกับทางที่วิจัย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ คือ

QIAamp RNA Blood Mini Kit ของ QIAGEN

สรุปผลการพัฒนาเทคนิค Real-time LAMP เพื่อการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน IP-10

- เทคนิค Real-time LAMP สามารถตรวจ IP-10 ในเชิงคุณภาพได้ความแม่นยำ 98% เมื่อเทียบกับเทคนิค Real-time PCR (จากการทดสอบที่ 50 ตัวอย่าง)
- เทคนิค Real-time LAMP สามารถตรวจในเชิงปริมาณได้ โดยจะให้ค่าสอดคล้องกับ Real-time PCR ถ้ามีค่า IP-10 มากที่ระดับ 10^3 copies ขึ้นไป
- กำลังตรวจตัวอย่างมากขึ้นอีก 100 ตัวอย่าง
- อาจต้องทำการเพิ่ม sensitivity เพื่อให้ตรวจวัดค่าที่ระดับน้อยกว่า 10^3 copies ให้แม่นยำขึ้น



ขอขอบคุณที่มวิจัย

สวทช.

นายณรงค์ อรัญรุตม์
นส. เบญญาทิพย์ ตนดี
นส. จันทนา คำภีระ
นายอัครพงศ์ ทรัพย์พัฒน์
ดร. อติสร เตื่อนทรานนท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศ.นพ. ยี่งยศ อวิหิงसानนท์
ดร. ธิติมา เบ็ญจะชาติ
พญ. วรณงาม กิจธนามงคลชัย
นส. นันทวัน วงศ์ชิตววรรณ



Thank you

ทุนวิจัย สวทช.