การพัฒนาเทคนิค Real-time LAMP

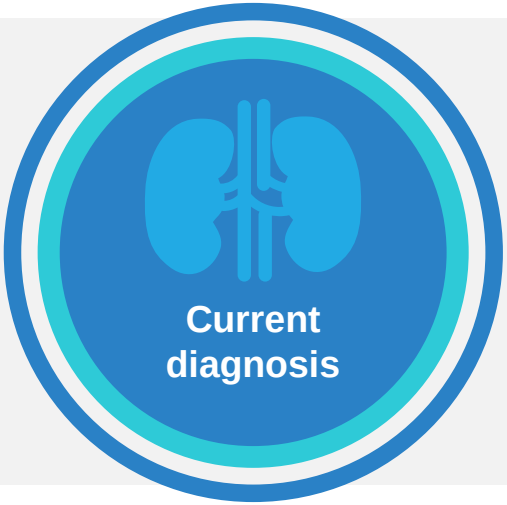
เพื่อการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน IP-10 เครื่องหมายชีวภาพของโรคไตอักเสบลูปัสในปัสสาวะ

วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย

นักวิจัยอาวุโส

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช.

Lupus nephritis



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

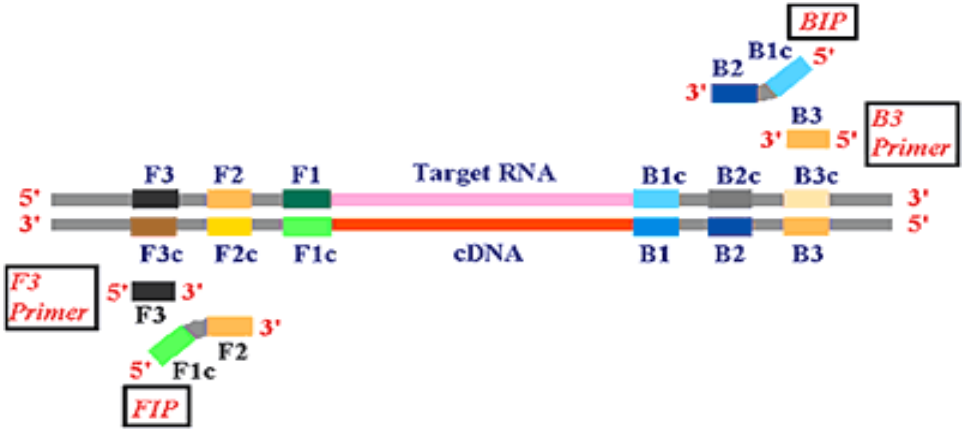
- วิธีการทางอณูชีววิทยา (PCR, real-time PCR)
  - มีความจำเพาะสูง (Hight specific)
  - มีความไวในการตรวจสูง (Hight sensitive)
  - ใช้เครื่องมือและสารเคมีที่ราคาแพง (More expensive)

	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

[a]Data expressed as mean ± s.e.m. of log copies/μg total RNA.
[b]The 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 in expensive heating block.



Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Primer

1 Outer Primer

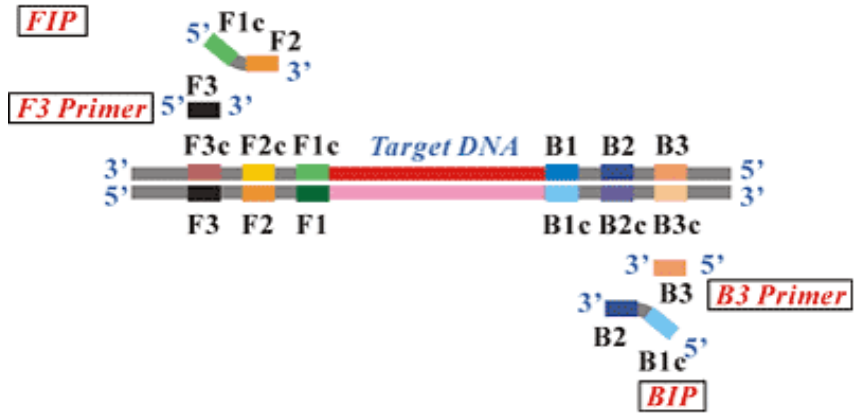
F3 :

B3 :

2 Inner Primer

FIP : 5’-F1c - F2

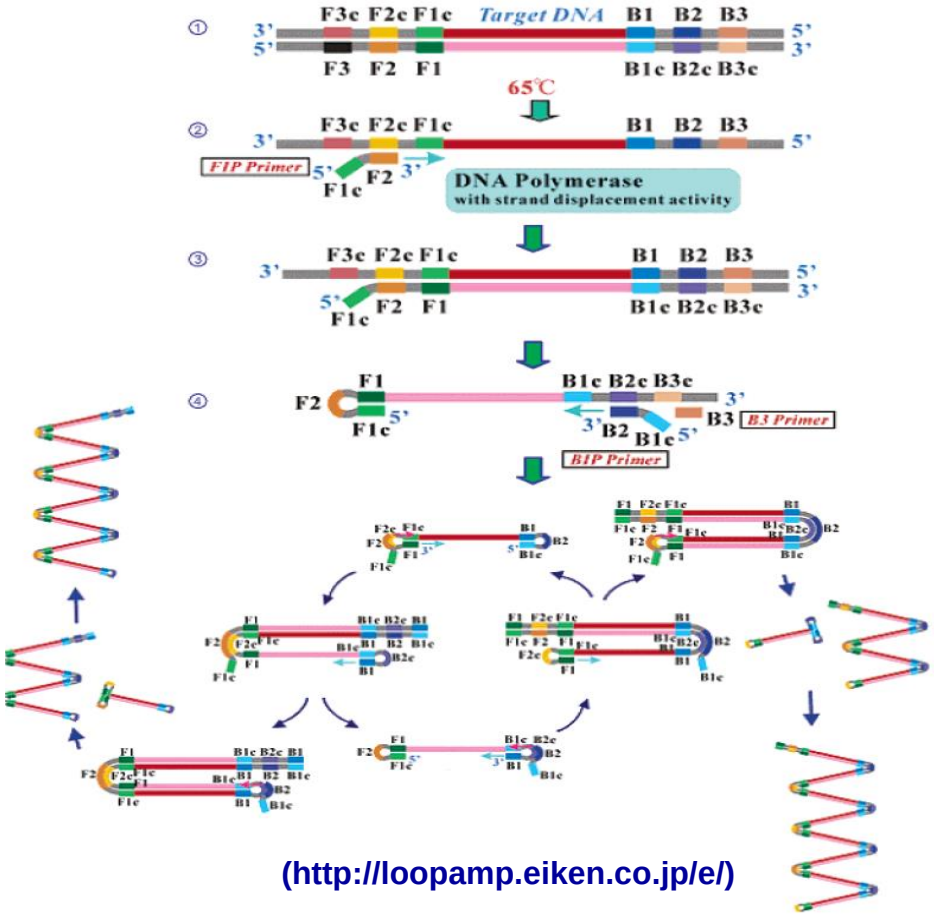
BIP : 5’-B1c - B2



- Rapid
- Inexpensive
- Specificity
- Sensitivity
- Simple

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

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)



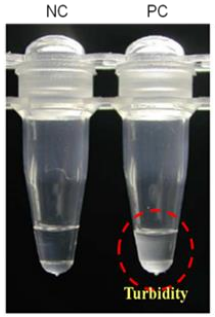
(http://loopamp.eiken.co.jp/e/)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

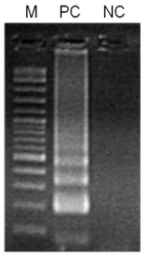
$$(DNA)_{n-1} + dNTP \rightarrow (DNA)_n + P_2O_7^{4-} \quad [1]$$

$$P_2O_7^{4-} + 2Mg^{2+} \rightarrow Mg_2P_2O_7 \quad [2]$$

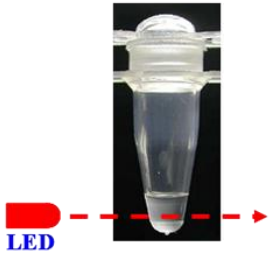
Turbidity

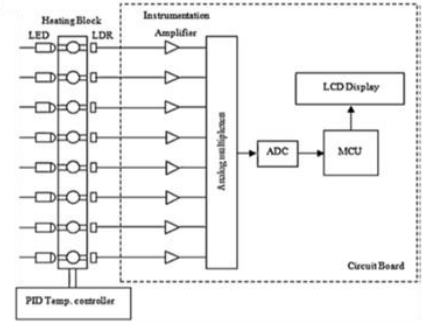


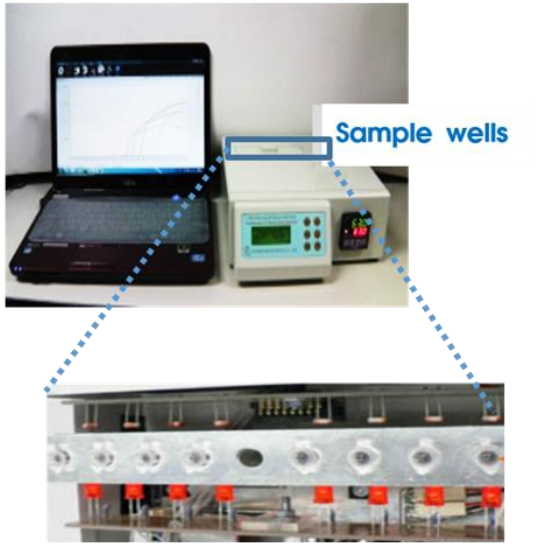
LAMP products



Agarose gel electrophoresis

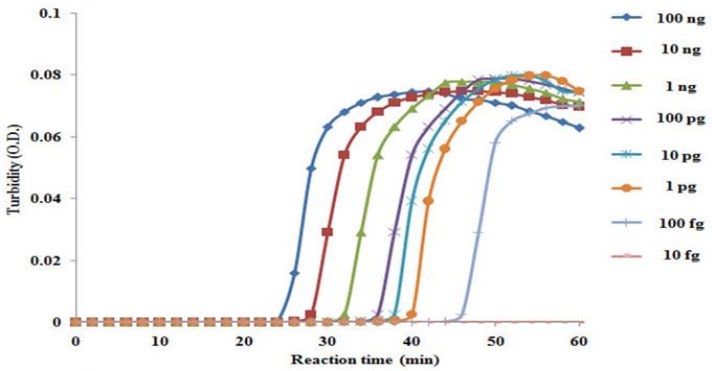




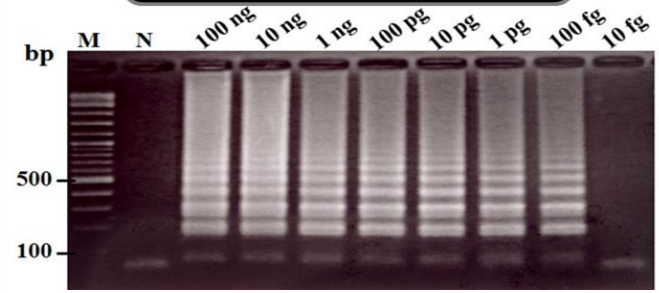


Sensitivity test จากการพัฒนาเทคนิค Real-time LAMP ในโรคกุ้งโตช้า

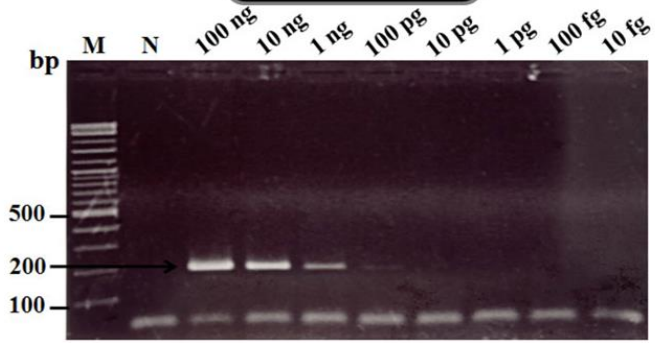
Real-time RT-LAMP



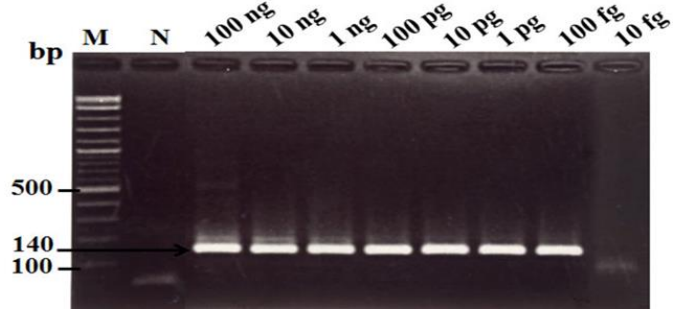
RT-LAMP by AGE



RT-PCR



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 ที่สำคัญของโรคไตอักเสบลูปัส

LAMP Design

Target gene

IP-10 (CXCL10)

1

3

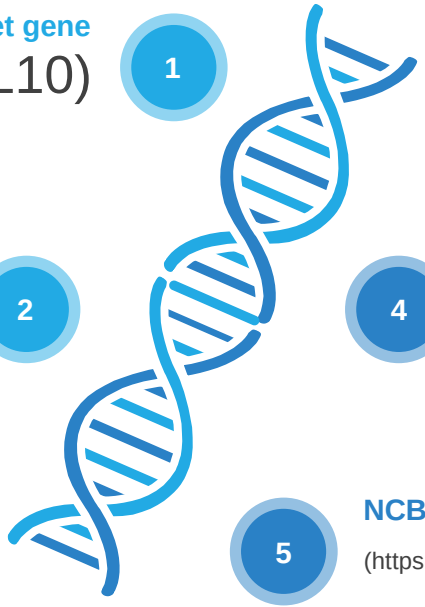
IP-10 (CXCL10) gene sequence

Genbank no. NM_001565.3
[Avihingsanon et al. 2006]

Internal control

18S rRNA

2



4

LAMP primer design

Primer explorer version 5
(https://primerexplorer.jp)

5

NCBI, nucleotide BLAST

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

การประเมินประสิทธิภาพ เทคนิค Real-time LAMP

ตรวจวินิจฉัย

ใช้ RNA ที่สกัดได้ 200 ng มาตรวจวัดค่า IP10 ด้วยเทคนิค Real-time LAMP

เก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บปัสสาวะผู้ป่วยที่มารับบริการที่หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บปัสสาวะให้ได้ 100 ml

สกัด RNA

ใช้วิธีเดียวกับทางทีมวิจัย 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 10^3copies ให้แม่นยำขึ้น

ขอขอบคุณทีมวิจัย

สวทช.

นายณรงค์ อรัญรุตม์

นส. เบญญาทิพย์ ตนดี

นส. จันทนา คำภีระ

นายอัศวพงศ์ ทรัพย์พัฒน์

ดร. อดิสร เตือนตรานนท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศ.นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

ดร. ธิติมา เบ็ญจะชาติ

พญ. วรรณงาม กิจธนามงคลชัย

นส. นันทวัน วงศ์ชิดวรรรณ

Thank you

ทุนวิจัย สวทช.