

บทความพิเศษ

เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์

คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เทคนิคการเพิ่มขยายยีนถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการด้านอณูชีววิทยา ทั้งด้านงานวิจัยทางชีวโมเลกุล ด้านการแพทย์ การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การพิสูจน์หลักฐานทางนิติศาสตร์และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น เทคนิคการเพิ่มขยายยีนที่รู้จักกันแพร่หลายคือ เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ที่มีการใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่น PCR- sequence specific primers (PCR-SSP), PCR-sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSO), reverse transcription PCR (RT-PCR), nested PCR, multiplex PCR, real time PCR และ sequence base typing สำหรับในงานเวชศาสตร์การบริการโลหิต เทคนิคการเพิ่มขยายยีน ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบ และเชื้อเอชไอวีในเลือดผู้ป่วยบริจาค ที่เรารู้จักในชื่อของ nucleic acid testing (NAT) หรือนำมาตรวจหา ยีน human leukocyte antigens (HLA) เพื่อคัดเลือกรายละเอียดหรือสเต็มเซลล์สำหรับการปลูกถ่าย การตรวจหา ยีนแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงอันได้แก่เทคนิค PCR-SSP และ PCR-SSO micro bead arrays เป็นต้น

เทคนิค PCR ที่ใช้เป็นพื้นฐานทั่วไป จะใช้เวลาในการตรวจสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงขึ้นไป ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงเช่น เครื่อง PCR เครื่อง real time PCR ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้บางเทคนิคยังมีขั้นตอนการตรวจสอบยีนที่เพิ่มได้โดยใช้เครื่องมือเฉพาะ ทำให้ไม่สามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กๆ หรือใช้ในภาคสนามได้¹ ในปี ค.ศ. 2000 ได้มีรายงานการพัฒนาวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ขึ้นมาโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะ² ซึ่งได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR คือไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีน สามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65°C. และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน เทคนิคนี้จึงเหมาะกับประเทศที่กำลังพัฒนา หรือห้องปฏิบัติการเล็กๆ หรือสำหรับปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี

หลักการของเทคนิค LAMP²

โดยพื้นฐานของเทคนิค LAMP จะเพิ่มขยายยีนโดยใช้ primer จำนวน 4 เส้น ที่สามารถตรวจสอบยีนที่มีความจำเพาะถึง 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมาย การเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิคงที่ และใช้ปฏิกิริยา strand displacement ของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase การตรวจสอบยีนที่เพิ่มขยายได้ สามารถทำในขั้นตอนเดียวไปพร้อมๆ กันไม่จำเป็นต้องใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มขยายยีนในเทคนิค LAMP ทำให้มีสาร pyrophosphate เป็น by product สารดังกล่าวสามารถจับกับ magnesium กลายเป็น magnesium pyrophosphate ซึ่งจะตกตะกอนเป็นสีขาวสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณการเพิ่มขยายยีนนั้นๆ

Primers ในเทคนิค LAMP

Primers ที่มีจำนวน 4 เส้นจะถูกออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ทั้ง 6 ตำแหน่งคือตำแหน่ง F1, F2, F3, B1, B2 และ B3 ตามรูปที่ 1

การเพิ่มขยายยีนของเทคนิค LAMP

กลไกการทำงานของ LAMP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1. Starting structure producing step เพื่อสร้าง stem-loop ทั้งสองข้างของยีนเป้าหมาย
2. Cycle amplification step เป็นการเพิ่มขยายยีนจาก stem-loop โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase with strand displacement activity

ขั้นตอน starting structure producing step⁽³⁾

ขั้นตอนที่ 1 ที่อุณหภูมิประมาณ 65°C DNA สายคู่จะอยู่ในสภาวะ dynamic equilibrium คือมีการจับกันแบบสายคู่ (double stranded DNA) และคลายบางส่วนเป็นสายเดี่ยว (single stranded

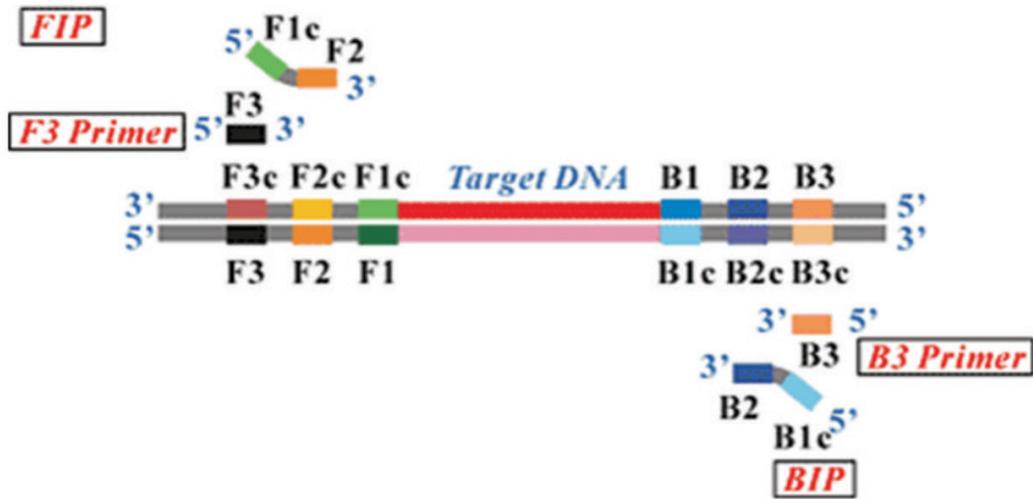


Figure 1 Schematic representation of primer design for LAMP technique³

- 1) Forward inner primer (FIP) consists of F1c-F2 region;
- 2) Forward outer primer (F3 Primer) consists of F3 region;
- 3) Backward inner primer (BIP) consists of B1c-B2 region;
- 4) Backward outer primer (B3 Primer) consists of B3 region

DNA) ตลอดเวลา ทำให้ FIP primer มีโอกาสเข้าไป anneal กับ complementary sequence ของยีนเป้าหมายได้ ดังรูปที่ 2A จากนั้น DNA polymerase with strand displacement จะเริ่มทำงานเกิด displacing และแยกสายคู่ของดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว

ขั้นตอนที่ 2 มีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้น (สายที่ 1) ดังรูปที่ 2B

ขั้นตอนที่ 3 ต่อมา F3 Primer (outer primer) จะเข้าไปจับ ดังรูปที่ 2C

ขั้นตอนที่ 4 F3 Primer เริ่มสร้าง DNA สายใหม่โดยอาศัยคุณสมบัติของ DNA polymerase with strand displacement ได้ DNA ลักษณะเหมือน template ดังรูปที่ 2D

ขั้นตอนที่ 5 ขณะเดียวกันจะปลดปล่อยสายที่ 1 ออกมาเป็น single strand ดังรูปที่ 2E

ขั้นตอนที่ 6 ทางด้าน 5' ของสายที่ 1 จะเป็นส่วนของ F1c (ปลายของ FIP) สามารถเข้าจับกับ F1 สร้าง loop ขึ้นทางด้าน Forward จากนั้น BIP primer จะเข้าจับและสร้าง DNA สายที่ 2 ขึ้นมา ดังรูปที่ 2F

ขั้นตอนที่ 7 ทำนองเดียวกัน B3 Primer จะเข้าไปจับและเริ่มสร้าง DNA สายใหม่ ดังรูปที่ 2G

ขั้นตอนที่ 8 ขณะเดียวกันจะปลดปล่อยสายที่ 2 ออกมาเป็น single strand ขณะนี้ที่ปลายด้าน forward จะเป็น F1 ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ F1c ทำนองเดียวกันด้าน backward จะเป็น B1c ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ B1 ทำให้ได้ stem loop ที่มีรูปคล้าย dumbbell shape เพื่อใช้ในขั้นตอน LAMP cycling ดังรูปที่ 2H

ขั้นตอน cycle amplification step (รูปที่ 3)

สามารถเกิด cycle amplification step (8-11) ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือสามารถมี self primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารถ hybridize กับ F2c ที่ loop forward (9) และสร้าง DNA สายใหม่ ได้เป็น 3 copies (10) และมี stem loop แบบ dumbbell (11) ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ (11) การทำงานจะต่อเนื่องกันตลอดเวลา วนเวียนกันอยู่ ทำให้ได้ target DNA ที่ยาวขึ้นหลายๆ copies ทำให้อัตราการสร้าง DNA ยิ่งมากขึ้น พบว่าสามารถสร้างได้ 10⁹-10¹⁰ copies ภายในเวลา 15-60 นาที ขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้สามารถดูรูปแอนิเมชันได้ในเว็บไซต์ <http://looplamp.eiken.co.th.jp>

วิธีการตรวจวัดยีนที่เพิ่มขยายขึ้น

1. การดูความขุ่น⁴

สามารถดูผลของปฏิกิริยาจากตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate โดยนำหลอดทดสอบไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่มขยายยีน จะพบตะกอนสีขาวมากดังรูปที่ 4

2. การดูสีฟลูออเรสเซนต์⁵

โดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์เช่น SYBR Green I เดิมหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP แล้ว ถ้ามี product เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียวเมื่อดูภายใต้แสง UV (302nm.) ดังรูปที่ 5 หรืออาจดูภายใต้แสงธรรมชาติ วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องเปิดฝา

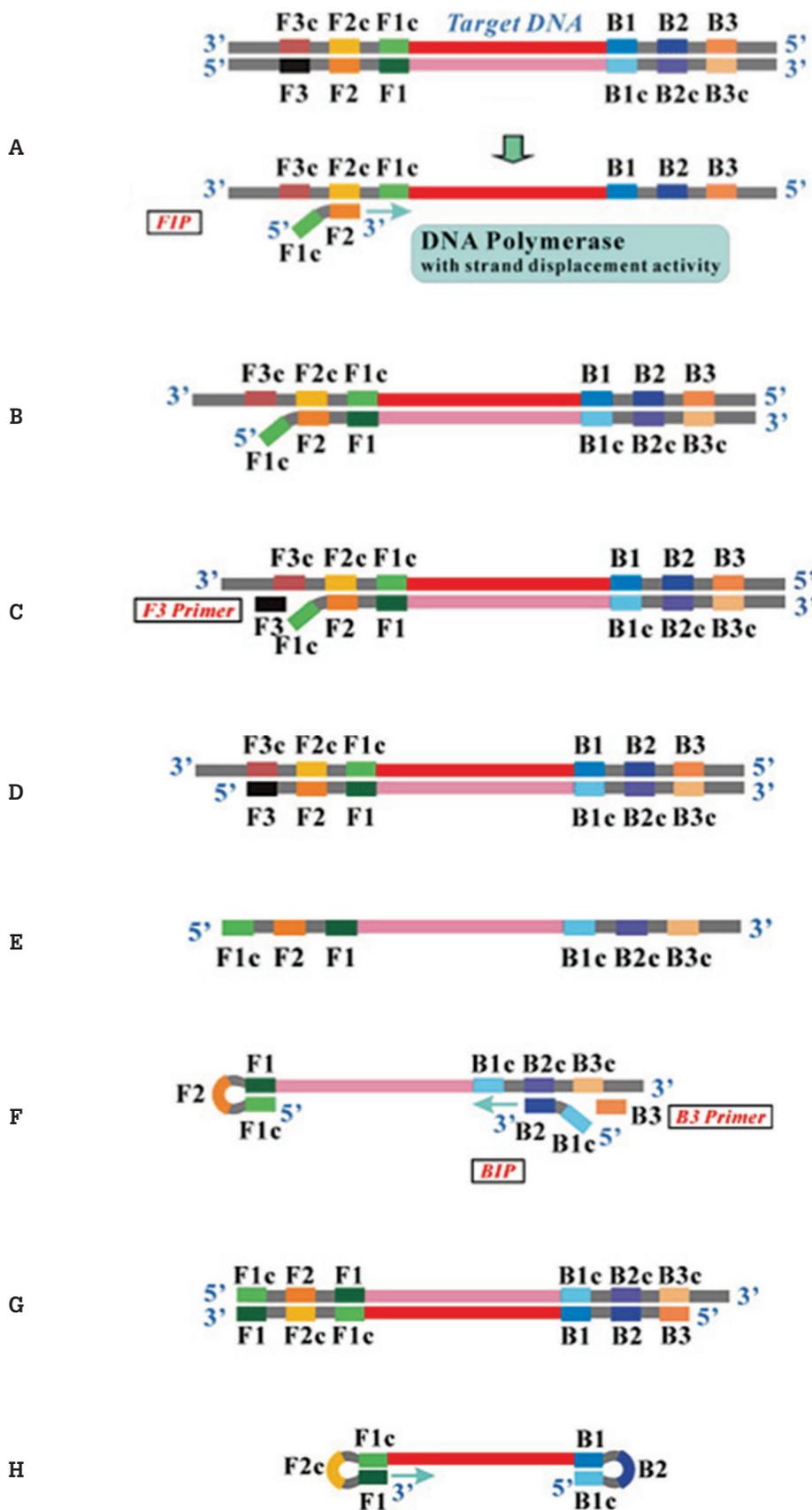


Figure 2 Principle of LAMP technique: starting structure producing step (A-H)

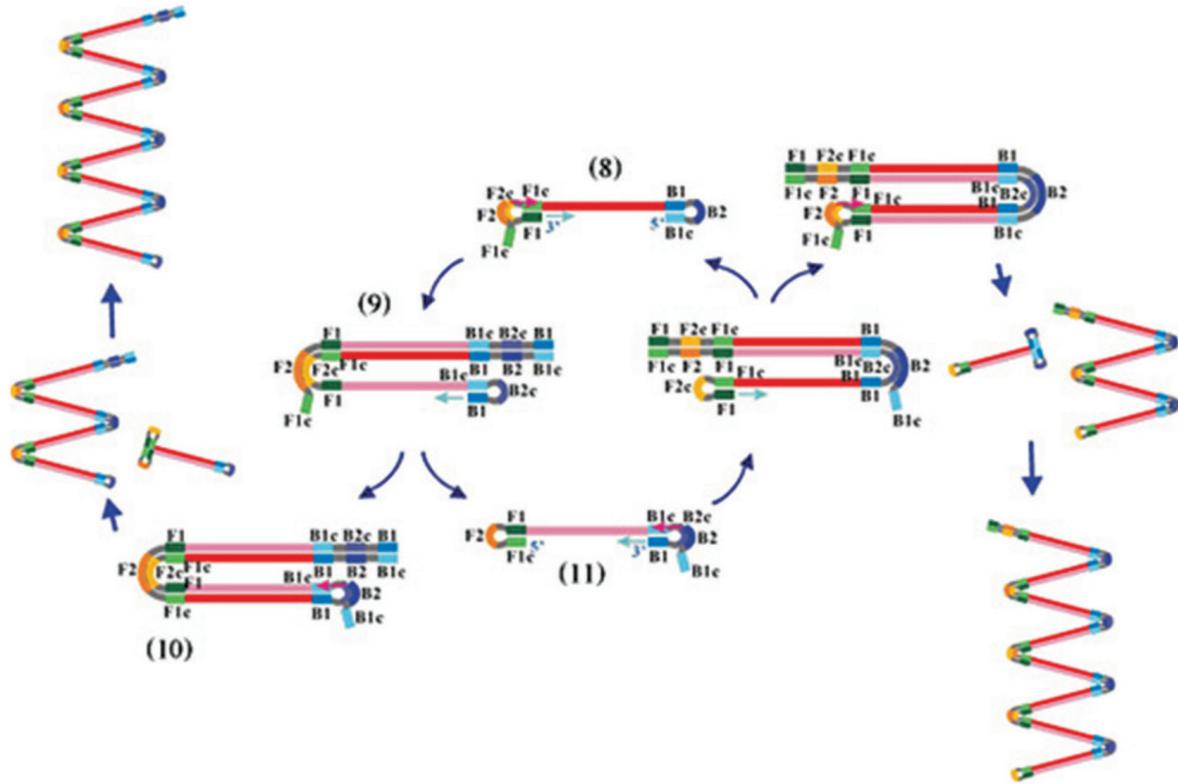


Figure 3 Principle of LAMP technique: cycle amplification step⁸⁻¹¹



ผลลบ

ผลบวก

Figure 4 Detection of LAMP amplification by turbidity. Left, without amplification product (negative) and right, with amplification product (positive).



ผลลบ

ผลบวก

Figure 5 Detection of LAMP amplification by fluorescence. Left, without amplification product (negative) and right, with amplification product (positive).

หลอดทดสอบเพื่อเติมสารฟลูออเรสเซนต์ ทำให้ product มีโอกาส ฟุ้งกระจายสูง เกิด carry over ได้ง่าย จึงได้มีผู้ดัดแปลงใช้สาร calcein แทน สารนี้สามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบ สาร calcein จะจับกับ magnesium ดังนั้นเมื่อมี product เกิดขึ้น จะมีสาร pyrophosphate เกิดขึ้นตาม สาร pyrophosphate จะแย่ง จับกับ magnesium ทำให้สาร calcein เป็นอิสระจึงให้แสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา

3. การใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

สามารถนำ product จากเทคนิค LAMP ไป run gel electrophoresis เพื่อดูยีนที่เพิ่มขยายได้ product ที่ได้จะให้ band หลายๆ ขนาด ต่างจากปฏิกิริยาของ PCR product ทั่วไปที่ ให้เพียง 1 band ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอน cycle amplification จะได้ขนาดของดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ข้อดีของเทคนิค LAMP⁽²⁾

1. มีประสิทธิภาพในการเพิ่มขยายยีนได้สูง ภายใต้สภาวะเดียวกัน ที่อุณหภูมิประมาณ 60-65°ซ มีความไวสูงในการตรวจ จับ DNA สามารถตรวจจับ DNA จำนวนน้อยๆ ได้ถึง 6 copies ในการตรวจหาเชื้อไวรัส เทคนิค LAMP มีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10-100 เท่า⁶⁻⁸
2. LAMP มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ specific sites ถึง 6 ตำแหน่ง โดยใช้ primers ถึง 4 เส้น ดังนั้นจะช่วยลด background จากการเพิ่มขยายยีนที่ไม่จำเพาะได้
3. เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบ ถ้าสามารถสร้าง primer ที่ เหมาะสมได้ ใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block
4. การตรวจวัดผลการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก และสามารถ เลือกวิธีการตรวจวัดได้ ปัจจุบันสามารถวัดแบบ real time ได้⁹
5. สามารถใช้ร่วมกับปฏิกิริยา reverse transcription ก็จะสามารถเพิ่มขยายยีน RNA ได้ในประสิทธิภาพสูง

ข้อด้อยของเทคนิค LAMP

1. การออกแบบ primer จะค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องให้จำเพาะ กับยีนเป้าหมายถึง 6 ตำแหน่ง
2. ใช้ primer ในปริมาณที่มากกว่าปกติโดยเฉพาะ primer FIP และ BIP

การประยุกต์ใช้งานของเทคนิค LAMP

เนื่องจากคุณสมบัติของเทคนิคที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ทำให้เทคนิคนี้ ถูกนำไปใช้งานในด้านต่างๆ เช่นใช้ในการตรวจหาพิษของเชื้อเพื่อช่วย

ในการวินิจฉัยโรค ในระยะแรกใช้ตรวจหาเชื้อที่สามารถติดต่อกันทางเดินอาหาร¹⁰ เช่น *Salmonella*, *Legionella*, *E.coli* เป็นต้น ต่อมาถูกใช้แพร่หลายมาตั้งแต่ปี 2003¹ ที่มีการระบาดของ West Nile และ SARS viruses จากข้อมูลที่ทำให้การรวบรวมโดย Parida M และคณะ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นว่าเทคนิค LAMP ถูกใช้งานอย่างมากในการตรวจจับไวรัส เนื่องจากการวินิจฉัยเชื้อไวรัสสามารถทำได้ยาก ปัจจุบันเทคนิค LAMP ถูกใช้งานในการตรวจหาการติดเชื้อที่ยังเป็นปัญหาทั่วไปในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น เชื้อวัณโรค¹¹ เชื้อมาเลเรีย¹² เชื้อ HIV¹³

สำหรับในประเทศไทยเราเทคนิค LAMP ถูกนำมาใช้งานทางด้านตรวจจับเชื้อไวรัสต่างๆ ที่ก่อโรคในสัตว์ เช่น โรคไวรัสในกึ่งไวรัสในหมูเป็นต้น มีการนำมาใช้ตรวจหาปรสิตในคน เช่นมาเลเรีย และตรวจหาอื่น ๆ มากขึ้น ส่วนในด้านเวชศาสตร์การบริการโลหิต ผู้เขียนเชื่อว่าเทคนิค LAMP นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดี ในการตรวจหาพิษที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนของเม็ดเลือด

Table 1 Applications of LAMP assay in various viral diseases¹

Human	
DNA	Adenoviral keratoconjunctivitis
	Human papillomavirus type 6, 11, 16 and 18
	Varicella-zoster virus
	Herpes simplex virus and varicella-zoster virus
	Cytomegalovirus
	Herpes simplex virus
	Human herpesvirus 6
	Human herpesvirus 7
	Human herpesvirus 8
	BK virus
RNA	Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus
	West Nile virus
	Japanese encephalitis virus
	Norovirus
	H5 avian influenza virus
	Chikungunya virus
	Dengue viruses (1,2,3 & 4)
Animal	
DNA	Plum pox virus
	Newcastle disease virus
RNA	Canine distemper virus
	Canine parvovirus
	Foot-and-mouth disease virus
	Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHS)

แดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด ตลอดจนการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่สามารถถ่ายทอดทางเลือดได้ เนื่องจากใช้เวลาสั้นและไม่ต้องใช้เครื่องมือยุ่งยาก จึงนับว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่น่าสนใจ น่าติดตาม การประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ในอนาคตอันใกล้

Reference

1. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, 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;18:407-21.
2. 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.
3. <http://looplamp.eiken.co.th.jp>
4. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:150-4.
5. 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;3:877-82.
6. Parida M, Horioko K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, Islam MA, Inoue S, Hosaka N, Morita K. Rapid detection and detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2895-903.
7. Hong TC, Mai OL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1956-61.
8. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol*. 2004;42:257-63.
9. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, Gupta N, Saxena P, Babu JP, Rao PV, Morita K. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45:351-7.
10. Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS*. 2004;112:908-29.
11. Keeler E, Perkins MD, Small P, Hanson C, Reed S, Cunningham J, Aledort JE, Hillborne L, Rafael ME, Girosi F, Dye C. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature*. 2006;444:49-57.
12. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, Chiodini PL, Sutherland CJ. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2866-71.
13. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods*. 2008;151:264-70.