

การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

เพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum*

สายพิน ชุมทรัพย์

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* โดยการออกแบบชุดไพรเมอร์ (primer) จำนวน 4 สาย (MG_FIP MG_BIP MG_LF loop และ MG_LB loop) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของ *Mycoplasma gallisepticum* str. R (high), complete genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP001872.1?from=334116&to=335620>) เมื่อนำ primer ไปทดสอบกับ gDNA ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* และ *Mycoplasma hyorhinis* เครื่อง isothermal ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าชุด primer มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* และมีความไวแม้จะมีปริมาณ gDNA เพียงเล็กน้อย (1 µg/ml)

คำสำคัญ: LAMP, *Mycoplasma gallisepticum*, primer

การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

เพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum*

บทนำ

ในกระบวนการผลิตวัคซีนสัตว์ปีก ที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักจะต้องไม่มีการปนเปื้อนเชื้อมัคโคพลาสมา (mycoplasma) โดยเฉพาะ *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีก สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ ทำให้น้ำหนักลด การวางไข่ลดลง และอัตราการตายของตัวอ่อนสูงขึ้น หากมีการติดเชื้อร่วมกับโรคนิวคาสเซิลหรือโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันในไก่จะทำให้ความรุนแรงของโรคมักขึ้น เชื้อ mycoplasma สามารถมีชีวิตอยู่ได้ 1-14 วันภายนอก host แพร่กระจายโดยการสัมผัส ทางน้ำเชื้อของเพศผู้ และจากแม่ไก่สู่ไข่หรือแม่ไก่ในวัคซีนที่ไม่ได้ผลิตจากไข่ปลอดเชื้อเฉพาะ การตรวจวินิจฉัยต้องทำในห้องปฏิบัติการซึ่งมีหลายวิธีที่แตกต่างกัน (Stipkovits and Kempf, 1996)

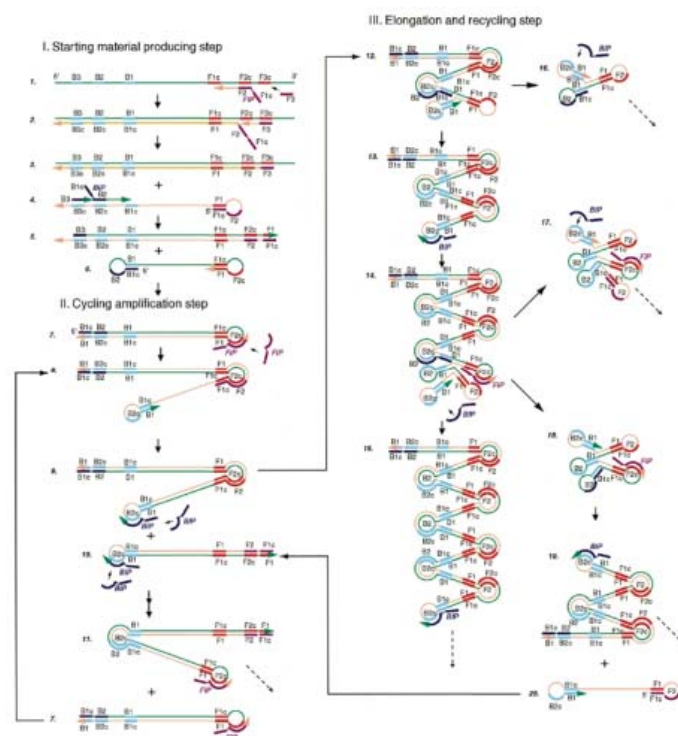
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) ตรวจการปนเปื้อนเชื้อ mycoplasma ของวัคซีนโดยใช้วิธีตรวจปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งเป็นการตรวจเอนไซม์ที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อ mycoplasma (Lonza, 2011) และตรวจยืนยันเชื้อ mycoplasma ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีมาตรฐานในการตรวจการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อ mycoplasma จากสิ่งส่งตรวจ (OIE, 2008) แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตช้าและหากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดอื่นร่วมด้วยจะไม่สามารถเพาะเชื้อ mycoplasma ได้ (Kleven, 2008) ในการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อต้องเพิ่มปริมาณเชื้อ จึงมีโอกาที่เชื้อจะแพร่กระจายสู่สภาพแวดล้อม ปัจจุบันมีเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เรียกว่า Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ที่พัฒนาโดยทีมนักวิจัยชาวญี่ปุ่น (Notomi et al., 2000)

มีการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในการทดสอบหาเชื้อหลายชนิด เช่น การทดสอบหาเชื้อวัณโรค หาเชื้อ *Mycoplasma synoviae* การตรวจหาเชื้อไวรัสในพืช (รังชัยและคณะ 2013 Panno et.al., 2020 Kursu et.al., 2015 Zhang et.al., 2023) โดยเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA หรือ RNA ที่ทำงานที่ อุณหภูมิคงที่ (isothermal) 60 – 65 °C ซึ่งต่างจาก PCR ที่ต้องใช้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (thermocycling) หลักการสำคัญคือการใช้ เอนไซม์ DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ strand displacement และ primer หลายสายที่จำเพาะต่อเป้าหมาย โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA template (หรือ RNA ถ้าเป็น RT-LAMP) primer 4-6 สาย (2 primer ภายใน (FIP และ BIP) 2 primer ภายนอก (F3 และ B3) บางระบบใช้ loop primers (LF, LB) เพื่อเพิ่มความเร็ว) DNA polymerase ที่มี strand displacement activity (เช่น Bst polymerase) dNTPs buffer Mg²⁺, และบางครั้งอาจมี dye หรือสารฟลูออเรสเซนต์ (Notomi et.al., 2000)

การเกิดปฏิกิริยาของ LAMP เริ่มต้น (Initial priming) โดย primer FIP (Forward Inner Primer) จับกับตำแหน่ง F2 บนดีเอ็นเอเป้าหมาย และเริ่มการจำลองดีเอ็นเอใหม่ primer F3 จับบริเวณ F3 (อยู่ถัดไปทาง 5') และสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ ดันสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์โดย FIP ออก (strand displacement) สายดีเอ็นเอที่หลุดออกมาจะมีโครงสร้างกลายเป็น “ห่วง (loop)” เพราะส่วนปลายของ primer FIP มีลำดับ F1c ที่

สามารถจับกับลำดับ F1 จะได้โครงสร้าง “stem-loop DNA” ที่สามารถทำหน้าที่เป็น template สำหรับปฏิกิริยารอบถัดไป ส่วนการจำลองดีเอ็นเอทางฝั่งตรงข้าม (ทางด้าน 3′) กระบวนการเหมือนกันกับฝั่ง 5′ โดยใช้ primer BIP (Backward Inner primer) และ primer B3 จะได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองด้านเป็น “loop” เพื่อใช้ในการจำลองดีเอ็นเอแบบต่อเนื่อง (Cycling Amplification) โดยสายที่มีปลายเป็น loop จะใช้เป็น template ให้ primer FIP/BIP จับและขยายต่อ เมื่อใช้ loop primers (LF, LB) จะยิ่งเร่งให้ปฏิกิริยาเร็วขึ้น เพราะเพิ่มจุดเริ่มต้นให้การจำลอง (Notomi et. al., 2000) ทุกๆ รอบของปฏิกิริยาจะสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ที่มีปลายเป็น loop เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เกิด DNA หลายขนาด (ladder-like pattern) และจำนวนมาก ภายในเวลาสั้น (30–60 นาที) และทำให้เกิด magnesium pyrophosphate ทำให้สารละลายขุ่นจนสามารถสังเกตด้วยตาเปล่าได้ (Mori et.al., 2001)

การตรวจวัดผลของปฏิกิริยา LAMP การตรวจวัดผลทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีมีความเหมาะสมแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ เช่น การตรวจในห้องปฏิบัติการ หรือการตรวจภาคสนาม (point-of-care testing) โดยการสังเกตความขุ่น (Turbidity detection) การเรืองแสง (Fluorescence detection) เกิดจาก dye ที่จับกับ DNA และตรวจดูภายใต้แสง UV การตรวจด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) จะพบแถบดีเอ็นเอหลายขนาด เป็นต้น (อมรรัตน์ 2554)



รูปที่ 1 ปฏิกิริยา Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ที่มา Notomi et.al., 2000

อุปกรณ์และวิธีการ

ออกแบบ primer

ออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ MG จากลำดับ nucleotide ของ *Mycoplasma gallisepticum* str. R(high), complete genome

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATTAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGATCGGATGTAGCA
ATACATTAGAGGCGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTGCCTTATAGTGGGGGATAACTAGTCGAAA
GATTAGCTAATACCGCATAACAAGTTAACTATCGCATGAGAATAACTTTAAAGAAGCAACTGCTTCGCTA
TAAGATGAGGGTGCGGCATATCAGCTAGTTGGTGAGGATAATGGCCACCAAGGCGATGACGTGTAGTTA
TGCTGAGAGGTAGAATAACCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATTTTTCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTTTAGATTGTA
AAGTTCTTTTATTTGGGAAGAACAGTTAATAGAGTGGAAGCTATTAATTTGACTGTACCATTTGAATAA
GTAACGACTAACTATGTGCCAGCAGTCGCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGC
GTAAACAAGCGCAGGCGGATTAGAAAGTCTGGTGTTAAAGCAATTGCTTAACGATTGTATGCATTGGA
AACTTCTAGTCTAGAGTTTGGTAGAGAGTCTGGAACCTCATGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
GAAGAACACCAGAGGCGAAGGCGAGGACTTGGGCCAATACTGACGCTTAGGCTTGAAAGTGTGGGGAGCA
AATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACTGTAAACGATGGATGTTAAGTGTGCGAGCGAATACTTCGG
TGCTGCAGTTAACACATTAAACATCCTGCCTGAGTAGTACATTGCAAGAATGAAACTCAAACGGAATTG
ACGGGGACCCGCAACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGGTACACGAAAAACCTTACCTAGACTT
GACATCTTGGGCGAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTCAACCCAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCGTTAGTTACTTTGTCTA
ACGAGACTGCCAACGTAAGTTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGG
CTGCAAACGTGCTACAATGGCCAATACAATCAGTTGCAAATCCGTAAGGTGGAGCTAATCTGTAAAGTTG
GTCTCAGTTCGGATTGAGGGCTGCAATTCGCCCTCATGAAGTCGGAATCACTAGTAATCGCGAATCAGCC
ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCAAACCTATGAGAGCTGGTAATATCTA
AAACCGTGTTGCTAACCGCAAGGAAGCGCATGTCTAGGGTAGGGCCGGTGATTGGAGTTAAGTCGTAACA
AGGTACCCCTACGAGAACGTGGGGGTGGATTACCT

ที่มา :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP001872.1?from=334116&to=335620>

gDNA

gDNA (*M. gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*) และ *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*)) ได้รับอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

ปฏิกิริยา LAMP

1. เตรียมปฏิกิริยาโดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

Components	Volume for 1 rxn (μl)
10X Bsm buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	4
10 mM dNTP mix	3.5
40 μM FIP primer	1
40 μM BIP primer	1
10 μM F3 primer	0.5
10 μM B3 primer	0.5
10 μM Loop F primer	1
10 μM Loop B primer	1
Nuclease-free water	8
8 U/μl Bsm DNA polymerase, large fragment	1
DNA template	1
total	25

2. นำหลอดที่เตรียมปฏิกิริยาแล้ว ไปใส่เครื่อง isothermal¹ ตั้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้หยุดปฏิกิริยา (inactivate) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยแสง UV-vis

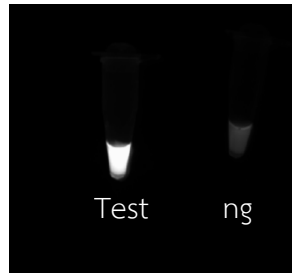
เติม 1X SYBR Safe ปริมาตร 1 μl ลงในหลอดปฏิกิริยา แล้วนำไปตรวจสอบด้วยการดูสีฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยเครื่อง Chemiluminescence² ถ้ามี product เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้นจากสีส้ม ให้กลายเป็นสีเขียว เมื่อดูภายใต้แสง UV (302 nm) ดังรูปที่ 2 และจะเรืองแสงเมื่อดูภายใต้แสง UV (365 nm) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2 ตรวจสอบด้วยการดูสีฟลูออเรสเซนซ์เมื่อดูภายใต้แสง UV (302 nm)

¹ Flex Cycler 2, Germany

² Omega Lum G, USA



รูปที่ 3 ตรวจสอบด้วยการดูสีฟลูออเรสเซนซ์เมื่อฉายด้วยแสง UV (365 nm)

ทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ทดสอบ specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* โดยนำชุด primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* ไปทำปฏิกิริยากับ gDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ที่ความเข้มข้นชนิดละ 5 µg/ml โดยมี Nuclease-free water เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) แล้วนำไปตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยแสง UV-vis 365 nm

การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบ sensitivity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* โดยนำชุด primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* ไปทำปฏิกิริยากับ gDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2 และ 1 µg/ml โดยมี Nuclease-free water เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) แล้วนำไปตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยแสง UV-vis 365 nm

ผล

การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum*

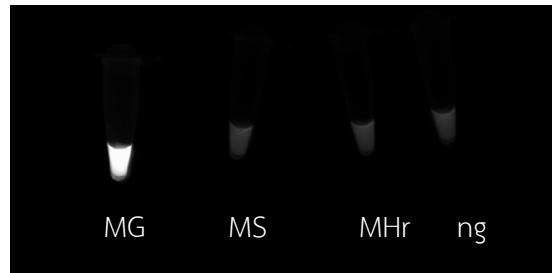
ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum*

Primer	sequence
MG_F3 ^a	TGACATCTTGGGCGAAGC
MG_B3 ^a	GCCCTAGACATAAGGGGCAT
MG_FIP	CCAACATCTCACGACACGAGCT-AGTGGAGGTCAACCCAATGA
MG_BIP	CAACGAGCGCAACCCTTATCGT-ACGTCATCCCCACCTTCC
MG_LF loop	GACAACCATGCACCACTG
MG_LB loop	TAGTTACTTTGTCTAACGAGACTGC

ที่มา: ^aที่มา: OIE, 2008

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

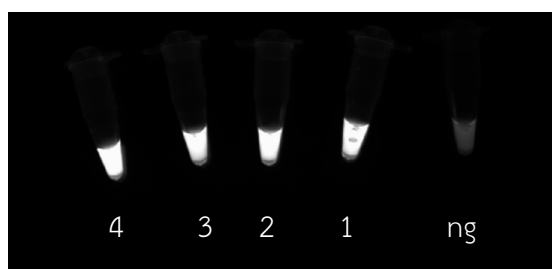
ผลการทดสอบ specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* โดยนำชุด primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* ไปทำปฏิกิริยากับ gDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ที่ความเข้มข้นชนิดละ 5 µg/ml พบว่าชุด primer ทำปฏิกิริยาได้เฉพาะ gDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* เท่านั้น แสดงว่าชุด primer มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* ดังแสดงผลในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การทดสอบ specificity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* *M. synoviae* และ *M. hyorhinis* ที่ความเข้มข้นชนิดละ 5 µg/ml

การทดสอบความไว (sensitivity)

ผลการทดสอบ sensitivity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* โดยนำชุด primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* ไปทำปฏิกิริยากับ gDNA ของเชื้อ *M. gallisepticum* ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2 และ 1 µg/ml พบว่าชุด primer ทำปฏิกิริยาได้แม้ความเข้มข้นของ gDNA จะมีปริมาณน้อยเพียง 1 µg/ml แสดงว่าชุด primer มีความไวแม้จะมีปริมาณ gDNA เพียงเล็กน้อย



รูปที่ 5 การทดสอบ sensitivity ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* ที่ความเข้มข้น 4 3 2 และ 1 µg/ml

สรุปและวิจารณ์

ชุด primer ที่ใช้ในการทดลองนี้มีจำเพาะต่อเชื้อ *M. gallisepticum* และมีความไวสูง แต่ควรจะมีการทดสอบต่อเชื้อมัคโคพลาสมาชนิดอื่นๆเพิ่มเติมให้มากกว่านี้เพื่อเพิ่มความมั่นใจว่าชุดไพรเมอร์ที่ได้จะสามารถตรวจสอบแยกเชื้อ *M. gallisepticum* ออกจากเชื้อ *Mycoplasma* ชนิดอื่นๆได้อย่างถูกต้อง และการทดสอบความไวควรทดสอบปริมาณเชื้อที่น้อยกว่า 1 µg/ml เพื่อให้สามารถหาปริมาณที่น้อยที่สุดที่ชุด primer นี้จะสามารถตรวจพบได้ และควรมีการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างจริงเช่น ใน allantoic fluid ตัวอย่างจากไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ เพื่อให้สามารถตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* ในเบื้องต้นก่อนการนำไปใช้ในการผลิตวัคซีนต่อไป

การทดสอบทางชีวโมเลกุลมีหลายเทคนิค แม้การทดสอบโดยเทคนิค LAMP จะมีข้อดีคือสามารถทดสอบได้ด้วยอุณหภูมิเดียว ไม่ต้องใช้เครื่อง thermocycler ใช้เวลาน้อยเพียง 30–60 นาที และมีความไวสูง แต่ก็มีข้อเสียคือออกแบบ primer ยากกว่าการปฏิกิริยา PCR ทั่วไป ดีเอ็นเอมีขนาดหลากหลายทำให้ไม่สามารถใช้ gel electrophoresis วัดขนาดเฉพาะได้ง่าย ดังนั้นการเลือกเทคนิคเพื่อใช้ในการทดสอบควรคำนึงถึงหลายปัจจัยและความเหมาะสมเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่อนุเคราะห์ gDNA เพื่อใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ธงชัย แก้วพินิจ สมชาย สันติวัฒนกุล และโกสุม จันทศิริ 2556 เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) สำหรับตรวจเชื้อวัณโรค Journal of medicine and health science 20(1): 13-20
- อมรรัตน์ ร่มพฤษ 2554 เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 21(3): 201-206
- Kleven, S.H. 2008. Mycoplasmosis. Introduction. In: Diseases of poultry, 12th. Ed. Y.M. Saif, ed. lackwell publishing. Iowa. USA . pp. 805-807.
- Kursa, O., Wozniakowski, G., Tomczyk, G., Sawicka, A. and Minta, Z. 2015. Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* by loop-mediated isothermal amplification. Arch. Microbiol. 197: 319-325.

- Lonza. 2011. MycoAlert™ mycoplasma detection kit, BioResearch catalog 2011-2012.
- Office International des Epizooties. 2008. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*) In: OIE terrestrial manual. pp.482-496. Available source: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf. [Accessed 16 May 2012.]
- Mori, Y, Nagamine, K, Tomita N, Tomita, N. and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun ;289:150-4.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28 (12) : e63
- Panno, S., Matic, S., Tiberini, A., Caruso, A.G., Bella, P., Torta, L., Stassi, R. and Davino, S. 2020. Loop mediated isothermal amplification: principles and applications in plant virology. Plants. 9: 461.
- Stipkovits, L. and Kempf, I. 1996. Mycoplasmoses in poultry. Rev.sci.tech.Off.int.Epiz. 15 (4): 1495-1525.
- Zhang, X., Zhao, Y., Zeng, Y. and Zhang, C. 2023. Evolution of the probe-based loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays in pathogen detection. Diagnostics. 13 : 1530