บทความวิชาการ

Pyrosequencing: วิธีการใหม่สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการประยุกต์ในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา

Pyrosequencing: New Approach for Nucleotides Sequencing and Application in Microbiological Research

มณฑล เลิศวรปรีชา[1*]

Monthon Lertworapreecha[1*]

คำนำ

ความรู้และความเข้าใจในลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นเป็นกระบวนทัศน์พื้นฐานในการศึกษาทางอณูชีวโมเลกุลด้านต่างๆ เช่นทางการแพทย์ จุลชีววิทยาและชีววิทยาเป็นต้น การศึกษาเพื่อทำความเข้าใจการทำงานของยีนต่างๆ รวมทั้งการจำแนกเชื้อทางด้านจุลชีววิทยาจำเป็นต้องมีความรู้ลงไปในเรื่องลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ปัจจุบันเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรียและไวรัสหลายๆ ชนิด ดังนั้นเครื่องมือในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จึงมีความสำคัญอย่างมากที่จะช่วยให้นักวิทยาศาสตร์สามารถทำงานดังกล่าวให้บรรลุวัตถุประสงค์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาของเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เริ่มขึ้นในช่วงปี 1970 ช่วงเวลาดังกล่าวมีเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ 2 เทคนิค คือเทคนิคที่พัฒนาโดย Allan Maxam และ Walter Gilbert เรียกกันว่าวิธี Maxam-Gilbert [1] และวิธีที่เรียกว่า dideoxy chain termination หรือ Sanger method พัฒนาโดย Frederick Sanger และคณะ [2] Maxam-Gilbert sequencing เป็นวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการตัดสายดีเอ็นเอให้สั้นลงด้วยสารเคมีที่มีความจำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเพื่อเข้าไปตัดสายดีเอ็นเอในแต่ละหลอดทดลองทำให้สายสั้นลงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาของ Maxam-Gilbert เป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงมาก นอกจากนี้ในดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะต้องติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (P^{32}) เพื่อใช้ในการติดตามดีเอ็นเอ ในขณะที่แยกดีเอ็นเอในpolyacry lamide gel electrophoresis ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานอีกเช่นกันสำหรับหลักการของSanger method นั้นจะแตกต่างกันออกไป คือใช้หลักการของchain terminator ซึ่งคล้ายคลึงกับการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)เพียงแต่มีการแยกปฏิกิริยา

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ (วิทยาเขตพัทลุง) อ.ป่าพะยอม จ. พัทลุง 93110

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University (Phatthalung Campus), Pa Phayom, Phatthalung, 93110, Thailand

* Corresponding author: worapreecha@gmail.com

เป็น 4 หลอด โดยแต่ละหลอดจะเติม substrates ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยา PCR ลงไปเหมือนๆ กัน ที่แตกต่าง คือในแต่ละหลอดจะมีการเติม dideoxy nucleotides ได้แก่ ddATP, ddGTP, ddCTP, และ ddTTP ที่แตกต่างกันลงไป ผลที่ได้ในปฏิกิริยาที่มีการนำเอา ddNTPs เข้าไปต่อในสายดีเอ็นเอ จะทำให้การสร้างสายดีเอ็นเอนั้นสิ้นสุดลง ดังนั้นในแต่ละหลอดที่ได้รับ ddNTPs ที่ต่างกัน เช่น หลอดที่ 1 เติม ddATP ลงไป สายของดีเอ็นเอจะสิ้นสุดลงในตำแหน่งที่มีการนำ ddATP เข้าไปต่อเสมอ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีความสั้นยาวที่แตกต่างกัน สามารถอ่านผลได้โดยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis เช่นกัน ปัจจุบันเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ได้ก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการพัฒนาของเครื่องมือในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ (automate sequencer) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการพัฒนาจากหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการของ Sanger method เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ สามารถช่วยประหยัดระยะเวลาในศึกษาวิจัยจีโนมที่มีขนาดใหญ่ได้ โดยอาจจะลดระยะเวลาจากเป็นปี เหลือเพียงในเวลาไม่กี่เดือน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติที่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดหรือความเหมาะสมในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน เช่นไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในหลายๆ ตัวอย่างพร้อมกันได้ในเวลาเดียวกัน (high throughput) โดยเฉพาะการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีไทด์ที่แตกต่างกันและกระจายตัวกันอยู่ภายในจีโนม ที่เรียกว่า Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้เรื่องของต้นทุนที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง มีการประมาณราคาต้นทุนในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติจะอยู่ที่1ดอลลาร์สหรัฐต่อ1กิโลเบส(Kb)แต่หากจะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม ที่มีขนาดใหญ่มาก เช่นตั้งแต่ 1 กิกกะเบส (Gb) ถึง 100 Gb นั้นต้นทุนอาจจะสูงมากกว่า 1,000,000 ดอลลาร์สหรัฐ ทำให้ห้องปฏิบัติการทั่วไปไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดใหญ่ๆได้ [3] นอกจากนี้การวิเคราะห์ตำแหน่งการกลายพันธุ์ในยีน การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายที่จำเพาะในยีนเพียงบางยีนที่มีขนาดเล็กๆ ก็สามารถจำแนกความแตกต่างนั้นได้ โดยไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งยีน ซึ่งอาจจะต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายที่สูงเกินความจำเป็น

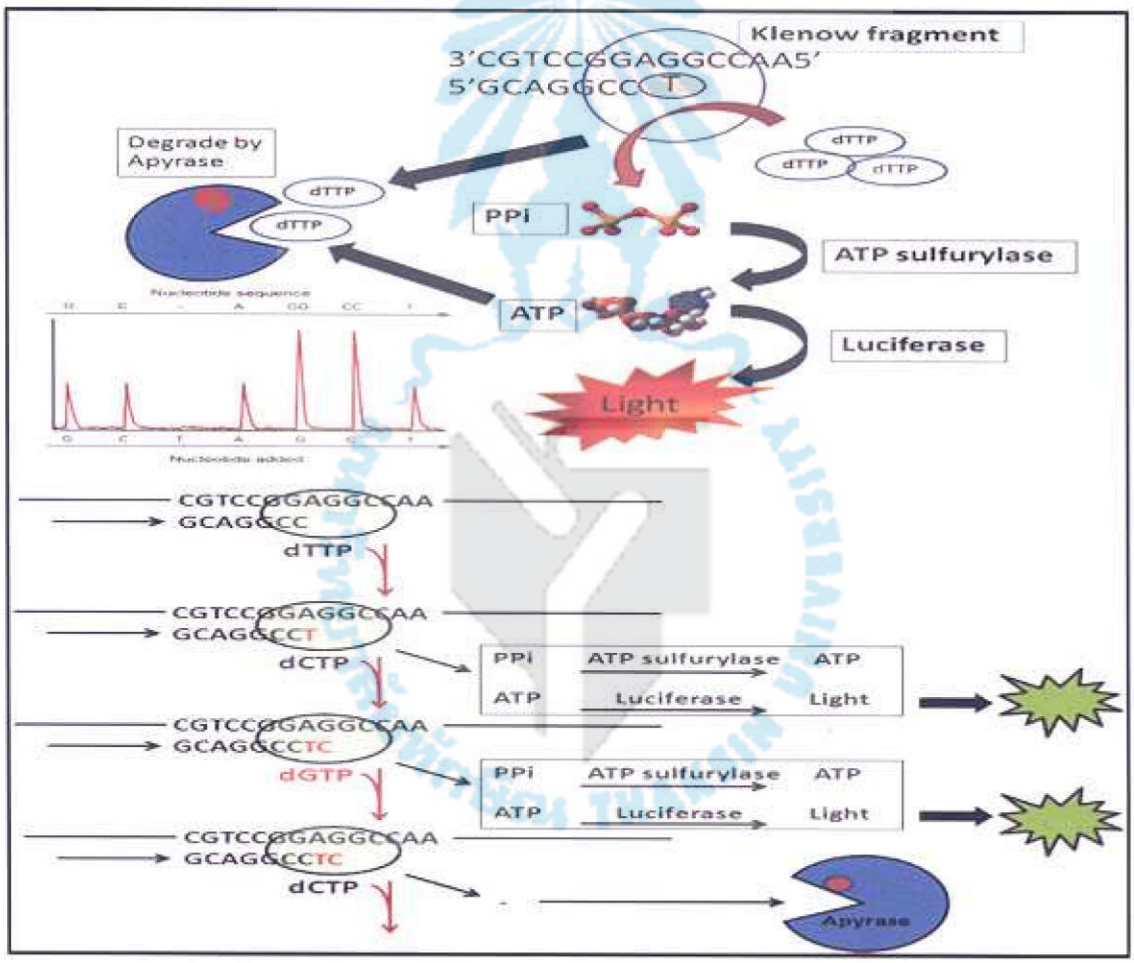
ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงได้มีการพยายามที่จะศึกษาพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ เพื่อลดข้อจำกัดของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หนึ่งในการศึกษาพัฒนาในแนวทางใหม่ก็คือเทคนิค pyrosequencing ซึ่งในบทความนี้จะได้กล่าวถึงทั้งในด้านของหลักการการทำงาน องค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระบบ และการประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ รวมทั้งจุลชีววิทยา

หลักการของ pyrosequencing

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยการตรวจวัด inorganic pyrophosphate (PPi) นั้น เริ่มต้นมีการศึกษาใช้ในช่วงปี 1988 โดย Hayman และคณะ [4] และถูกพัฒนาต่อมาจนเป็นเทคนิค pyrosequencing โดยศาสตราจารย์ทางชีวเคมี ชื่อ Pål Nyrén แห่ง Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm ในปี 1990 [5] หลักการของ pyrosequencing เป็นการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (synthesis sequencing) และอาศัยการตรวจจับ PPi ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก nucleotide triphosphate ในระหว่างการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอโดยจะสามารถแสดงผลให้เห็นเป็นแบบ real time การทำงานในระบบของ pyrosequencing อาศัยการทำงานของ เอนไซม์ 4 ชนิดด้วยกันคือ 1. Klenow fragment of DNA polymerase 2. ATP sulfurylase 3. Luciferase และ 4. Apyrase

เอนไซม์ klenow fragment ซึ่งเป็น ดีเอ็นเอ polymerase ทำหน้าที่ในการสร้างสาย ดีเอ็นเอจากต้นแบบ

(template) โดยจะมีการเติม dNTP ลงไปในปฏิกิริยาทีละชนิด หาก dNTP ที่เติมลงไปตัวนั้นเป็นเบสคู่สมกับ template ดีเอ็นเอก็จะถูก klenow fragement นำเข้าไปต่อในสาย ดีเอ็นเอผลในปฏิกิริยา polymerization จะทำให้ PPi นั้นถูกปล่อยปล่อยออกมา และจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของ เอนไซม์ luciferase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน luciferin ให้กลายเป็น oxyluciferin ที่สามารถให้แสงออกมาในปฏิกิริยา แสงที่ออกมาจะถูกตรวจวัดด้วยเซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับแสง Charge Coupled Device (CCD)แล้วแปลงสัญญาณแสงที่ได้เป็นระดับความเข้มของแสงอีกทีหนึ่งโดยความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับนิวคลีโอไทด์ที่ถูก นำเข้าไปต่อในสาย ดีเอ็นเอ (ภาพที่ 1)

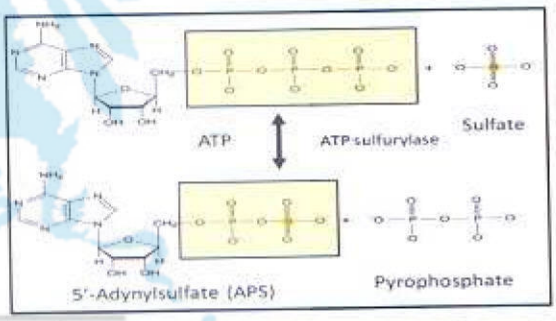


ภาพที่ 1 หลักการของ Pyrosequencing โดย dNTPs แต่ละตัวจะถูกนำเข้ามาครั้งละ 1 ชนิด ซึ่งจะถูก klenow fragment นำเข้าไปต่อในสายดีเอ็นเอผลที่ได้จะมีการปลดปล่อย PPi ออกมา โดย PPi จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ATP ด้วย ATP sulfurylase ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแสง โดย luciferase ในขั้นตอนต่อไป

เอนไซม์ในระบบ pyrosequencing

Klenow fragment เป็น large subunit ของเอนไซม์ polymerase I ที่แยกได้จากเชื้อ *E.coli* ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ subtilisin ทำให้ได้ small subunit และ klenow fragment โดย klenow fragment ยังคงมีคุณสมบัติของ 5'-3' polymerase ไม่มีคุณสมบัติของ 3'→5' exonuclease หลงเหลืออยู่ แต่ยังคงคุณสมบัติของ 3'→5' exonuclease ที่ทำหน้าที่ในการตัดเอานิวคลีโอไทด์ที่ผิดในขณะที่มีการนำเข้ามาต่อในสายดีเอ็นเอจากปลายด้าน 3' ไปทางด้าน 5' ของดีเอ็นเอ [6] ในระยะแรกของการพัฒนาเทคนิค pyrosequencing ยังคงมีปัญหาหลายๆ อย่างเช่นพบว่าในปฏิกิริยามักจะเกิดปัญหาจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่าง ดีเอ็นเอเดียวกันนั้นให้ผลไม่ตรงกัน (non synchronized extension) อันเป็นผลเกิดขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติของ 3'→5' exonuclease ของ klenow fragment การแก้ปัญหาในระยะต่อมาคือการใช้ klenow fragment ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตัวในสายของเอนไซม์ทำให้คุณสมบัติของ 3'→5' exonuclease นั้นสูญเสียไป (Exo) ซึ่งพบว่าสามารถช่วยลดการเกิด non synchronized extension ได้เป็นอย่างดี [7] ถึงแม้ว่า klenow fragment (Exo) จะขาดคุณสมบัติของ 3'→5' exonuclease ไปก็ตาม แต่จากรายงานการศึกษาก็พบว่าโอกาสที่ klenow fragment (Exo) จะนำนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดเข้าไปต่อในสายดีเอ็นเอนั้นกลับมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมากๆ ประมาณ 10^{-5}-10^{-6} ต่อเบส [8] ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการจับกับนิวคลีโอไทด์ตัวที่เป็นคู่สมที่จะนำเข้ามาต่อในสายดีเอ็นเอนั้นจะมีความแข็งแรง และมีความจำเพาะมากกว่าเมื่อเทียบกับนิวคลีโอไทด์ตัวที่ไม่ใช่คู่สม [9] นอกจากนี้ในกระบวนการของ pyrosequencing นอกจากจะมีการเติม dNTP ลงไปครั้งละชนิดแล้ว ยังมีเอนไซม์ apyrase ที่ทำหน้าที่ในการกำจัด dNTP ที่หลงเหลืออยู่ให้หมดไปก่อนที่จะมีการเติม dNTP ตัวใหม่ลงไป

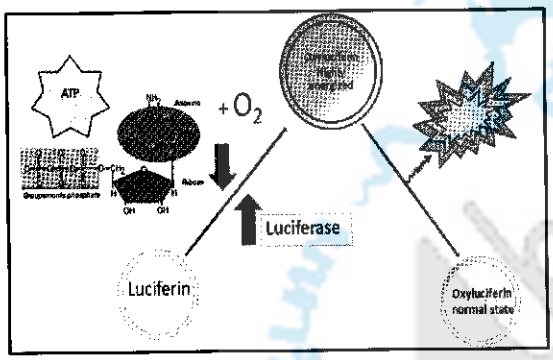
ATP sulfurylase เป็นเอนไซม์ในระบบตัวที่สองทำหน้าที่ในการเปลี่ยน PPi ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ polymerization ให้กลายเป็น ATP โดยในปฏิกิริยานั้นจะมีการเติม adenosine phosphosulfate (APS) ลงไปด้วย APS จะจับกับ PPi โดยอาศัย ATP sulfurylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้เป็น ATP (ภาพที่ 2) ATP sulfurylase สามารถพบในสิ่งมีชีวิตได้หลายๆ ชนิด เช่น ยีสต์ ใบผักโขม (spinach leaf) [10] สำหรับ ATP sulfurylase ที่ได้มีการใช้ในงานของ pyrosequencing เป็น recombinant ที่ได้จากการโคลนยีน *MET3* ของ *Saccharomyces cerevisiae* เข้าสู่เชื้อ *E.coli* [11]



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก PPi โดยอาศัยการทำงานของ ATP sulfurylase

Luciferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตรวจจับ (detection) ของปฏิกิริยา pyrosequencing แสงที่เกิดในปฏิกิริยา pyrosequencing นั้นเกิดจากการที่ luciferin ที่เติมลงไปในปฏิกิริยาทำปฏิกิริยากับออกซิเจน และ ATP จนได้เป็น oxyluciferin ที่สามารถให้แสงออกมาอยู่ในช่วง 550-590 นาโนเมตร (nm) การเปลี่ยน luciferin นี้อาศัยการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ luciferase (ภาพที่ 3) ใน 1 รอบของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้เวลาประมาณ 3-4 วินาที โดย 1 pmole ของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาของ pyrosequencing จะให้ ATP สูงถึง $6X\ 10^{11}$ โมเลกุล ซึ่งผลสุดท้ายจะให้โปรตรอนออกมาได้สูงถึง $6X10^{6}$ โปรตรอน [11] เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi ให้เป็น ATP โดยใช้เวลาเพียงประมาณ 1.5 วินาที และกระบวนการการเกิดแสงโดย luciferase จะใช้เวลาน้อยกว่า 0.2 วินาที

[8] เอนไซม์ luciferase ที่ใช้กันมากในงาน pyrosequencing เป็นเอนไซม์ที่ได้จากแมลงพวกหิ่งห้อย คือ North American firefly (*Photinus pyralis*) มีขนาดประมาณ 61 กิโลดาลตัน (kDa)จะให้แสงเป็นสีเหลือง-เขียว ในช่วงคลื่นแสงที่ประมาณ 550-590 nm [12] ในระยะแรกของการพัฒนา pyrosquencing มักจะพบปัญหาการเกิด false signal อยู่เสมอในเวลาที่มีการเติม dATP ลงไปในปฏิกิริยา ซึ่งต่อมาพบว่า dATP นั้นเป็น substrate ตัวหนึ่งของ luciferase ดังนั้นจึงเกิด false signal ขึ้นเสมอเมื่อมีการเติม dATP ลงไป ปัญหานี้ได้รับการแก้ไขโดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ dATP จากเดิมให้เป็น dATPαS (deoxyadenosine thio-triphosphate) ซึ่งไม่เป็น substrate ของ luciferase และไม่มีผลต่อการทำงานของ klenow fragment [13]



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการเกิดแสงในกระบวนการตรวจจับ PPi ที่เกิดขึ้นในระบบของ pyrosequencing PPi ที่เกิดขึ้นถูกเปลี่ยนเป็น ATP และจะเป็นแหล่งพลังงานให้กับ luciferase ใช้ในการเปลี่ยน luciferin ให้เป็น oxyluciferin ที่สามารถให้แสงสว่างออกมา

Apyrase: การพัฒนาของ pyrosequencing ในระยะต่อมาคือมีการเพิ่มเอนไซม์ apyrase ลงไปในปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ apyrase จะทำหน้าที่กำจัด dNTPs และ ATPs ที่หลงเหลืออยู่ในปฏิกิริยา เป็นการช่วยลดขั้นตอนในการที่จะต้องล้างลงไปได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดการเกิด non synchornized extensionอันเป็นผลจากการหลงเหลืออยู่ของ dNTPs [14] เอนไซม์ apyrase พบได้ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด แต่ที่มีการนำมาผลิตในเชิงการค้าสำหรับงาน pyrosequencing เป็นเอนไซม์ apyrase ที่สกัดได้จากหัวมันฝรั่ง *(Solanum tuberosum)* [15] นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการศึกษาโดยมีการเติม E.coli single stranded DNA binding protein (SSB) เป็นโปรตีนที่จะทำน้าที่ในการจับกับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกทำให้แยกออกจากกัน (single stranded DNA) ป้องกันไม่ให้สายดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันนั้นถูกทำลายและเกิดการจับกันเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) [16] รายงานการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเติม SSB ลงในปฏิกิริยา pyrosequencing สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรณีที่ตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีขนาดยาวมากได้ดีขึ้น โดย SSB นั้นจะช่วยทำให้ค่า readlengthหรือค่าความสามารถในการอ่านสายดีเอ็นเอต่อครั้งทำได้ยาวขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีการเติม SSB ลงไป [10]

การประยุกต์ใช้ pyrosequencing ในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา

Pyrosequencing ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านการแพทย์ และจุลชีววิทยาทางการแพทย์เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถช่วยในการวินิจฉัยเชื้อ และการจำแนกเชื้อได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เช่น งานทางด้านไวรัสวิทยา ในเชื้อไวรัสที่ก่อโรคบางชนิดจะมีความสามารถในการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูง ทำให้พบลักษณะของเชื้อไวรัสที่แตกต่างกันทางพันธุกรรมเป็นจำนวนมากในตัวของผู้ป่วย (viral quasispecies) เช่น กรณีของเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) มีรายงานพบว่าเชื้อ HIV เกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็วหลังจากที่ได้รับการรักษาในระยะเวลาเพียงไม่กี่เดือน เนื่องจากมีไวรัสที่

กลายพันธุ์ ที่หลากหลายในตัวผู้ป่วย เมื่อผู้ป่วยได้รับยาต้านไวรัสซึ่งจะกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่ไวต่อยาต้านไวรัส แต่ไม่สามารถกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่กลายพันธุ์และดื้อต่อยาต้านไวรัสได้ เป็นผลให้ไวรัสกลุ่มหลังนี้สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเกิดการดื้อยาในเวลาอันสั้น อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสที่พบกลายพันธุ์และมีแนวโน้มในการดื้อยาในผู้ป่วยมักจะเป็นประชากรส่วนน้อย และโอกาสที่จะตรวจพบไวรัสในกลุ่มนี้จะน้อยมาก แม้กระทั่งใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จำเป็นต้องใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความละเอียดสามารถตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับที่เรียกว่า ultra-deep sequencing ตัวอย่างการใช้งานในผู้ติดเชื้อ HIV ในรายงานการศึกษาหนึ่งพบว่า pyrosequencing สามารถตรวจพบความหลากหลายของไวรัสสูงถึง 58 แบบ ใน 1 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย ในขณะที่เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ จะพบความหลากหลายของไวรัสเพียงประมาณ 8 ชนิด ต่อ 1 ตัวอย่างผู้ป่วยเท่านั้นข้อมูลที่ได้ทำให้สามารถที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการพยากรณ์โอกาสที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านไวรัสแล้วจะเกิดการดื้อยาของไวรัสได้เป็นอย่างดี [17]

ในการศึกษากรณีของการดื้อยาต้านไวรัสในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี (Hepatitis B virus) โดยเฉพาะยา lami-vudine ซึ่งเป็นยาที่ใช้แทน α-interferon รายงานการศึกษาพบว่าไวรัสมักจะเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็วหากมีการใช้ lamividine เพียงชนิดเดียวในการรักษา ซึ่งการศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ดื้อต่อยาในผู้ป่วยด้วยวิธี Sanger method กับ pyrosequencing พบว่าจะตรวจพบการกลายพันธุ์ในเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นั้นอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน แต่สิ่งที่ให้ผลแตกต่างกันคือระยะเวลาในการทำงาน ในขณะที่เครื่องpyrosquencing ใช้เวลาในการตรวจตัวอย่าง 96 ตัวอย่าง เพียง 10 นาที เครื่องอัตโนมัติ ที่ใช้หลักการของ Sanger method ทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ใน 1 ชั่วโมงตรวจได้เพียง 16 ตัวอย่างเท่านั้น [18]

ในกรณีของเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูก เชื้อ HPV มีอยู่หลายชนิด (type) ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกจะเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ HPV ในกลุ่มเสี่ยงสูงได้แก่ HPV type 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 58 เป็นต้น การตรวจและจำแนก type ของไวรัสมีความจำเป็นต่อแพทย์ที่จะวางแผนให้การดูแลผู้ป่วยในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการดำเนินของโรคไปเป็นมะเร็งปากมดลูก วิธีการที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นการใช้เทคนิค hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ที่จำเพาะต่อ HPV type แต่วิธีดังกล่าวก็ยังคงมีข้อจำกัดในหลายๆ ด้าน เช่นมีโอกาสเกิด cross hybridization ได้ง่าย และวิธีการดังกล่าวไม่สามารถที่จะให้ข้อมูลในระดับของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสได้ ไม่สามารถทราบได้ว่าไวรัสมีการกลายพันธุ์หรือไม่อย่างไร รายงานการศึกษาในการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPV จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยพบว่าเทคนิค pyrosequencing นี้สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้มีความละเอียดและตรวจได้ในระดับที่อาจจะมีการติดเชื้อร่วมกันของ HPV มากกว่า 1 สายพันธุ์ [19-21]

นอกจากนี้ได้มีการนำเทคนิคนี้มาเพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ *Mycobacterium spp.* โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริเวณ hypervariable region ของ 16s rRNA เปรียบเทียบกับวิธีการ HPLC ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย pyrosequencing มากกว่า 90% สอดคล้องกับวิธีปัจจุบันที่มีการใช้กัน แต่สามารถทำได้รวดเร็วกว่า และประหยัดกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีปัจจุบัน [22] ปัจจุบันเทคโนโลยีของ pyrosequencing ได้มีหลายๆ บริษัทพัฒนาจนเป็นเครื่องอัตโนมัติที่ศักยภาพสูงในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว เช่น มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเครื่องมือสามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ *M. smegmatis*

ซึ่งมีขนาดประมาณ 6 ล้านคู่เบส 3 สายพันธุ์ และ *M. tubercu-losis* ที่มีจีโนมขนาดประมาณ 4 ล้านคู่เบส 1 สายพันธุ์โดยใช้เวลาเพียง 1 สัปดาห์ ในขณะที่หากเป็นระบบSanger method อาจต้องใช้เวลาหลายเดือน [23]

สรุป

เทคนิค pyrosequencing เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบใหม่ที่ได้รับการพัฒนาโดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPi ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization การทำงานนั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดด้วยกันคือ klenow fragment ทำหน้าที่ต่อสาย ดีเอ็นเอ เอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน PPi ที่เกิดขึ้นให้เป็น ATP ซึ่งจะเป็นพลังงานให้กับเอนไซม์ luciferase ที่จะเปลี่ยน luciferin ให้เป็น oxyluciferin ซึ่งสามารถให้แสงออกมาได้ โดยแสงที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจจับด้วยเซ็นเซอร์ของกล้อง CCD นอกจากนี้ยังมี เอนไซม์ apyrase ทำหน้าที่ในการกำจัด dNTPs และ ATP ที่หลงเหลืออยู่ในระบบ เทคนิค pyrosequencing มีข้อดีในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคของ Sanger method คือ ความเร็วในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำได้รวดเร็วและในปริมาณที่มากกว่า และต้นทุนค่าใช้จ่ายถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Sanger method นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่เป็นสายสั้นๆ ก็สามารถทำได้มีประสิทธิภาพดีกว่า ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค pyrosequencing กับงานทางด้านจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และทางชีววิทยาเป็นจำนวนมากเช่นการตรวจหา SNPs การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้านคลีนิค เช่นการตรวจหาการกลายพันธุ์เพื่อพยากรณ์การดื้อยาของเชื้อ หรือการพยากรณ์การตอบสนองต่อยาของผู้ป่วย ทั้งหมดเป็นเพียงส่วนหนึ่งที่ได้เริ่มมีการศึกษาวิจัยประยุกต์ใช้ประโยชน์ของเทคนิค pyrosequencing ซึ่งยังคงเปิดกว้างให้สามารถทดลองนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

[1] Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74**, 560-564.

[2] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, 1977. **Biotechnology. 24**, 104-108.

[3] Janitz, M. (2008). **Next Generation Genome Sequencing.** 1 edition ed: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co 2008.

[4] Hyman, E.D. (1988). A new method of sequencing DNA. **Analytical biochemistry. 174**, 423-436.

[5] Nyren, P. (2007). The history of pyrosequencing. **Methods in molecular biology. 373**, 1-14.

[6] Klenow, H. and Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of theUnited States of America. 65**, 168-175.

[7] Nyren, P. (1987). Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. **Analytical biochemistry. 167**, 235-238.

[8] Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome research.** 11, 3-11.

[9] Hopfield, J.J. (1974). Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic **processesrequiringhighspecificity.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 71**, 4135-4139.

[10] Ahmadian, A., Ehn, M. and Hober, S. (2006). Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **Clinica chimica acta; international**

journal of clinical chemistry. 363, 83-94.

[11] Karamohamed, S., Nilsson, J., Nourizad, K., Ronaghi, M., Pettersson, B. and Nyren, P. (1999). Production, purification, and luminometric analysis of recombinant Saccharomyces cerevisiae MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in Escherichia coli. **Protein expression and purification. 15**, 381-388.

[12] DeWet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R. and DeLuca, M. (1986). Cloning firefly luciferase. **Methods in enzymology**. 133, 3-14.

[13] Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996). Realtime DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical biochemistry. 242**, 84-89.

[14] Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998). A sequencing method based on Real time pyrophosphate. **Science. 281**, 363- 365.

[15] Handa, M. and Guidotti, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum). **Biochemical and biophysical research communications. 218**, 916-923.

[16] Lohman, T.M. and Ferrari, M.E. (1994). Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. **Annual review of biochemistry. 63**, 527-570.

[17] Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M. and Shafer, R.W. (2007). Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. **Genome research. 17**, 1195-1201.

[18] Lindstrom, A., Odeberg, J. and Albert, J. (2004). Pyrosequencing for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. **Journal of clinical microbiology. 42**, 4788-4795.

[19] Travasso, C.M., Anand, M., Samarth, M., Deshpande, A. and Kumar-Sinha, C. (2008). Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical cancer patients from India. **Journal of biosciences. 33**, 73-80.

[20] Gharizadeh, B., Kalantari, M., Garcia, C.A, Johansson, B. and Nyren, P. (2001). Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 81**, 673-679.

[21] Swan, D.C, Limor, J.R., Duncan, K.L, Rajeevan, M.S. and Unger, E.R. (2006). Human papillomavirus type 16 variant assignment by pyrosequencing. **Journal of virological methods. 136**, 166-170.

[22] Heller, L.C., Jones, M. and Widen, R.H. (2008). Comparison of DNA pyrosequencing with alternative methods for identification of mycobacteria. **Journal of clinical microbiology. 46**, 2092-2094.

[23] Rothberg, J.M. and Leamon, J.H. (2008). The development and impact of 454 sequencing. **Naturebiotechnology. 26**, 1117-1124.