



คู่มือ

เทคนิค Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA) ร่วมกับ Nanopore sequencing เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสในสัตว์

ISBN 978-616-630-074-1

นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์





คู่มือ เทคนิค Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA) ร่วมกับ Nanopore sequencing เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสในสัตว์

เรียบเรียงโดย

นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน เล่ม

ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2568

ข้อมูลทางบรรณานุกรม

จัดทำโดย นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล

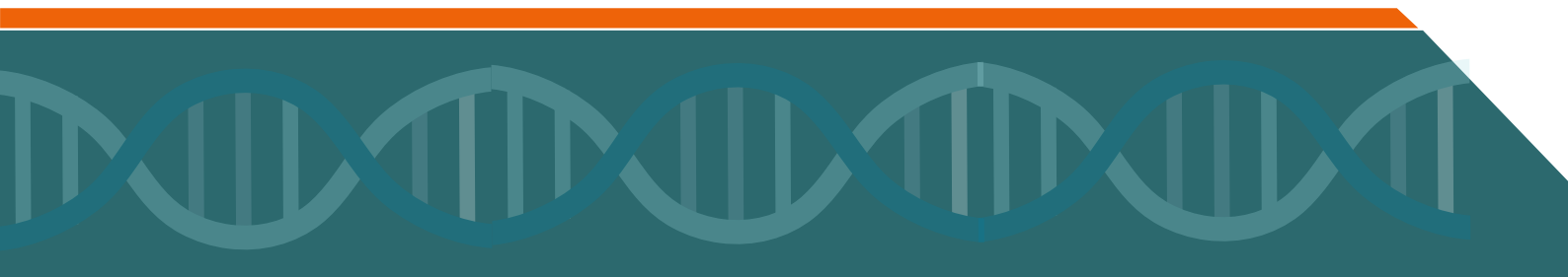
เรื่อง คู่มือ เทคนิค Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA)

ร่วมกับ Nanopore sequencing เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสในสัตว์

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568, 49 หน้า

ISBN (e-book) 978-616-630-074-1

สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามคัดลอก จัดพิมพ์ หรือทำซ้ำรวมทั้งดัดแปลงเป็นสื่ออื่น ๆ ก่อนได้รับอนุญาต



คำนำ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสในสัตว์เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรค เนื่องจากการระบาดของเชื้อไวรัสในสัตว์ไม่เพียงส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์และเศรษฐกิจการปศุสัตว์เท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยทางอาหารและสาธารณสุข ดังนั้นการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ ความไว และความจำเพาะสูง จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการรับมือกับโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ

เทคนิค Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA) ร่วมกับ Nanopore sequencing โดย Nanopore sequencing เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ (next-generation sequencing; NGS) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการตรวจวินิจฉัยและเฝ้าระวังโรค เนื่องจากสามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แบบ real-time เมื่อประยุกต์ร่วมกับเทคนิค SISPA ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสได้อย่างไม่จำกัดสายพันธุ์และไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อน เทคนิค SISPA-Nanopore sequencing นี้จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการค้นหาสาเหตุการติดเชื้อไวรัสที่ไม่ทราบชนิดมาก่อน และการเฝ้าระวังเชิงรุก ตลอดจนการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยโรค และการศึกษาทางระบาดวิทยา รวมทั้งการทำความเข้าใจกลไกการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คู่มือฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อหวังให้บุคลากรห้องปฏิบัติการ นักวิจัย และผู้สนใจ เข้าใจพื้นฐานและหลักการที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค SISPA-Nanopore sequencing ตลอดจนสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสในสัตว์ให้มีความทันสมัยและยั่งยืนต่อไป

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล

ตุลาคม 2568

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำคู่มือ เทคนิค Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA) ร่วมกับ Nanopore sequencing เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสในสัตว์ ฉบับนี้ เป็นผลจากความร่วมมือของบุคลากรหลายฝ่ายภายในสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนด้านข้อมูลทางวิชาการ รวบรวมเอกสารอ้างอิง ตรวจสอบความถูกต้องของเนื้อหา และให้ข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคู่มือเล่มนี้ ซึ่งมีส่วนสำคัญทำให้เอกสารมีความครบถ้วน ชัดเจน และเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณ คุณศรดา หวังอนุรักษกุล สำหรับการประสานงาน จัดเตรียมข้อมูล และสนับสนุนกระบวนการเรียบเรียงเนื้อหาเพื่อจัดทำคู่มือฉบับนี้ และขอขอบคุณ คุณกุลฐ์ญรัตน์ ภาคะ และ คุณชนกพร บุญศาสตร์ ในการตรวจสอบต้นฉบับ การจัดรูปแบบ และการจัดทำเล่ม ให้คู่มือเล่มนี้ออกมาสมบูรณ์ สวยงาม และพร้อมใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 เชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์	1
บทที่ 2 เทคโนโลยี next-generation sequencing	10
บทที่ 3 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสด้วยเทคโนโลยี Nanopore sequencing	19
บทที่ 4 เทคนิค Sequence-Independent Single-Primer Amplification	30
บทที่ 5 เทคนิคการตรวจจับและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัส ด้วยวิธี probe-based hybridization capture	36
บทที่ 6 การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี SISPA Nanopore sequencing	43

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อไวรัสก่อโรคสำคัญในปศุสัตว์	5
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการ	9
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเทคโนโลยี NGS	17
ตารางที่ 4 ประเภทของการเตรียมไลบรารีสำหรับ Nanopore sequencing	22
ตารางที่ 5 รูปแบบเครื่องมือและแพลตฟอร์ม Nanopore sequencing	24
ตารางที่ 6 รูปแบบการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมและเครื่องมือ bioinformatics สำหรับ Nanopore sequencing	27
ตารางที่ 7 ขั้นตอนและรายละเอียดทางเทคนิคของวิธี SISPA	32
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบ viral probe hybridization กับเทคนิค enrichment อื่น ๆ	38
ตารางที่ 9 ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digestion) สำหรับเตรียมตัวอย่าง	45
ตารางที่ 10 รูปแบบของวิธีการสกัดและทำให้สารพันธุกรรมของไวรัสมีความบริสุทธิ์	46
ตารางที่ 11 รูปแบบของวิธีการตรวจวัดคุณภาพและความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไวรัสที่บริสุทธิ์	47

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของเชื้อไวรัส	2
ภาพที่ 2 ความแตกต่างระหว่างโครงสร้างของเชื้อไวรัสชนิด naked virus และ enveloped virus	3
ภาพที่ 3 การจัดจำแนกเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ตามการจำแนกของ ICTV	4
ภาพที่ 4 หลักการของเทคนิค Sanger sequencing	11
ภาพที่ 5 หลักการของเทคโนโลยี Illumina sequencing	12
ภาพที่ 6 หลักการของเทคโนโลยี Roche 454 sequencing	13
ภาพที่ 7 หลักการของเทคโนโลยี ion torrent	14
ภาพที่ 8 หลักการของเทคโนโลยี SMRT (single-molecule real-time)	15
ภาพที่ 9 หลักการของเทคโนโลยี Nanopore sequencing	16
ภาพที่ 10 กระบวนการของ Nanopore sequencing	21
ภาพที่ 11 แพลตฟอร์มต่างๆของ Nanopore sequencing	24
ภาพที่ 12 หลักการของเทคนิค SISPA	33
ภาพที่ 13 หลักการของ probe-based hybridization capture	38

บทที่ 1

เชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์

โรคติดเชื้อไวรัสในสัตว์เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์และระบบการผลิตปศุสัตว์ทั่วโลก ไวรัสเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสามารถในการปรับตัวสูง สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว การแพร่ระบาดของโรคไวรัสในสัตว์ไม่เพียงส่งผลกระทบต่ออัตราการตายและการลดประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์เท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อ นม และไข่ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของความมั่นคงด้านอาหารและความปลอดภัยของมนุษย์ ความซับซ้อนของโรคไวรัสในสัตว์ที่ความรุนแรงมากขึ้นจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม การเคลื่อนย้ายสัตว์ระหว่างประเทศ การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ และการขยายตัวของการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นตัวเร่งให้เกิดโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ (emerging and re-emerging viral diseases) ซึ่งเป็นความท้าทายสำคัญต่อระบบการเฝ้าระวัง การป้องกัน และการควบคุมโรคในปัจจุบัน (Prasad et al, 2024; Bayry, 2013)

ความสำคัญของโรคไวรัสในสัตว์

โรคไวรัสในสัตว์มีความสำคัญทั้งในด้านสุขภาพสัตว์ เศรษฐกิจ การปศุสัตว์ และสาธารณสุข เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease; FMD), โรคไข้หวัดนก (Avian influenza; AI) และ โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever; ASF) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการสูญเสียครั้งใหญ่จากการตายของสัตว์ การลดประสิทธิภาพการผลิต การจำกัดการเคลื่อนย้ายสัตว์ และข้อจำกัดทางการค้า ความถี่ของการเกิดโรคระบาดยังสะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงเชิงนิเวศ รวมถึงความเชื่อมโยงของระบบการ

ผลิตสัตว์ทั่วโลก (Bayry, 2013; Prasad et al., 2024) นอกจากนี้ ไวรัสบางชนิด เช่น Rabies virus และ Influenza A virus ยังสามารถติดต่อสู่คนได้ ทำให้โรคไวรัสในสัตว์เป็นประเด็นสำคัญภายใต้แนวคิด one health ซึ่งบูรณาการสุขภาพสัตว์ สุขภาพคน และสิ่งแวดล้อมเข้าด้วยกัน (Destoumieux-Garzón et al., 2018)

ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ เศรษฐกิจ และความมั่นคงทางอาหาร

ผลกระทบของโรคไวรัสในสัตว์ครอบคลุมตั้งแต่ระดับฟาร์มไปจนถึงระดับเศรษฐกิจโลก การติดเชื้อไวรัสมักก่อให้เกิดการป่วย การตาย การลดอัตราการเจริญเติบโต การสูญเสียความสามารถในการสืบพันธุ์ และการลดคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์ เช่น เนื้อ นม และไข่ เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นและลดผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ การระบาดครั้งใหญ่ เช่น การระบาดของ ASF ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และยุโรป ส่งผลให้ต้องทำลายสุกรหลายร้อยล้านตัว ทำให้เกิดภาวะขาดแคลนเนื้อสุกรและความผันผวนของราคาสินค้าอาหาร (Ceruti et al., 2025) นอกจากนี้ การแพร่ระบาดของโรคไวรัสนำไปสู่ข้อจำกัดด้านการค้า การกีดกันทางการตลาด ตลอดจนความสูญเสียจากการดำเนินมาตรการการเฝ้าระวัง การควบคุมโรค และการฉีดวัคซีน อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหารของประชากร โดยเฉพาะในประเทศที่พึ่งพาการเลี้ยงสัตว์เป็นแหล่งโปรตีนหลัก (Jones et al., 2008; Bayry, 2013) ผลกระทบเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นของระบบเฝ้าระวังและการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันและลดความเสียหายจากโรคไวรัสในสัตว์

โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัส

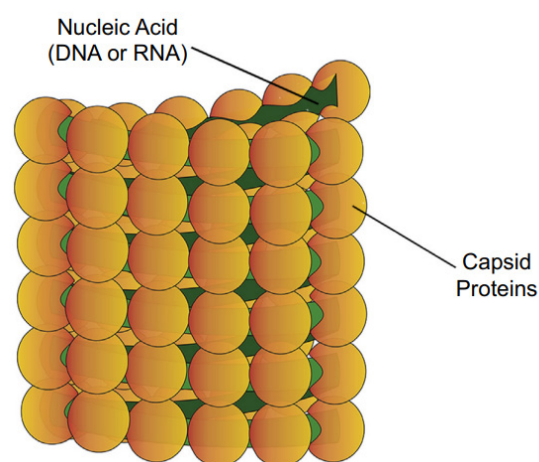
ไวรัส (virus) เป็นเชื้อก่อโรคที่จัดอยู่ในกลุ่ม obligate intracellular parasite ซึ่งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตนเองในสิ่งแวดล้อม แต่จำเป็นต้องอาศัยกลไกทางชีวภาพของเซลล์เจ้าบ้าน (host) ในการสังเคราะห์โปรตีนและจำลองสารพันธุกรรม ด้วยเหตุนี้ ไวรัสจึงจัดอยู่กึ่งกลางระหว่างสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต เนื่องจากมีสารพันธุกรรม (DNA หรือ RNA) และสามารถวิวัฒนาการได้ แต่ไม่มีระบบเมแทบอลิซึมเป็นของตนเอง การเพิ่มจำนวนของไวรัสจึงต้องพึ่งพาเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย พืช สัตว์ หรือมนุษย์ ภายในกลไกของเซลล์เจ้าบ้านในการจำลอง (replicate) และประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่ (virion) ทำให้ไวรัสสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว

อนุภาคไวรัส (virion) ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน ตามภาพที่ 1 ได้แก่

1. **แกนกลาง (core):** บรรจุสารพันธุกรรมของไวรัส ซึ่งอาจเป็นกรดนิวคลีอิกชนิด DNA หรือ RNA โดยสามารถจำแนกเป็น 4 ประเภทหลัก ได้แก่ DNA สายเดี่ยว หรือ single-stranded DNA (ssDNA), DNA สายคู่ หรือ double-stranded DNA (dsDNA), RNA สายเดี่ยว หรือ single-stranded RNA (ssRNA) และ RNA สายคู่ หรือ double-stranded RNA (dsRNA)

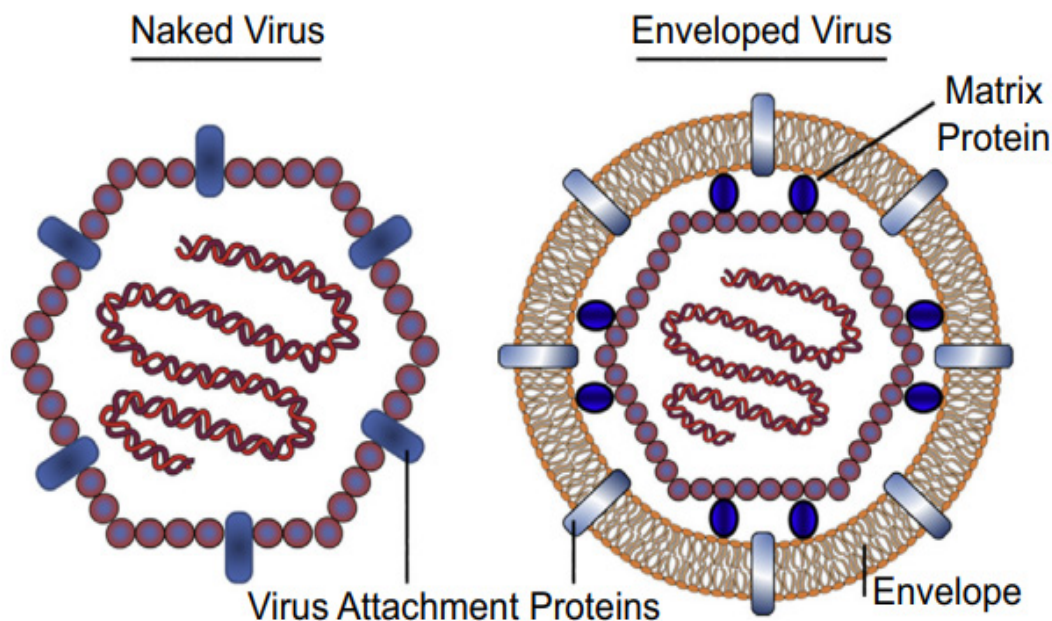
2. **แคปซิด (capsid):** เป็นเปลือกโปรตีนที่หุ้มแกนกลางไว้ ทำหน้าที่ปกป้องกรดนิวคลีอิกและช่วยในการเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยโปรตีนที่เรียกว่า capsomeres

3. **เปลือกหุ้ม (envelope):** เป็นเยื่อหุ้มที่ประกอบด้วยไลพิดสองชั้น ร่วมกับโปรตีนและไกลโคโปรตีน ทำหน้าที่หุ้มรอบแคปซิดของไวรัสพบได้ในไวรัสบางชนิด



ภาพที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของเชื้อไวรัส (Louten, 2016a)

ลักษณะทางโครงสร้างของไวรัส โดยเฉพาะการมีหรือไม่มีเปลือกหุ้ม มีผลโดยตรงต่อความทนทานของไวรัสในสิ่งแวดล้อม ไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) มักไวต่อสารละลายไขมัน เช่น แอลกอฮอล์และสบู่ เนื่องจากเปลือกหุ้มไขมันสามารถถูกทำลายได้ง่าย ในทางตรงกันข้าม ไวรัสเปลือย (naked virus) ที่ไม่มีเปลือกหุ้มจะมีความทนทานสูงกว่า (ภาพที่ 2) ทำให้การกำจัดไวรัสกลุ่มนี้จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ทำลายโปรตีนมากกว่าเพื่อลดความคงทนของแคปซิด ความแตกต่างด้านโครงสร้างเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาในการกำหนดนโยบายและแนวทางปฏิบัติในการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคไวรัสในสัตว์ (Louten, 2016a)



ภาพที่ 2 ความแตกต่างระหว่างโครงสร้างของเชื้อไวรัสชนิด naked virus และ enveloped virus (Louten, 2016a)

การจำแนกและการจัดกลุ่มของไวรัสก่อโรคในสัตว์

การจำแนกประเภทไวรัสเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจความสัมพันธ์และกลไกการทำงานของไวรัส ระบบการจำแนกไวรัสที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมีสองระบบหลัก ได้แก่

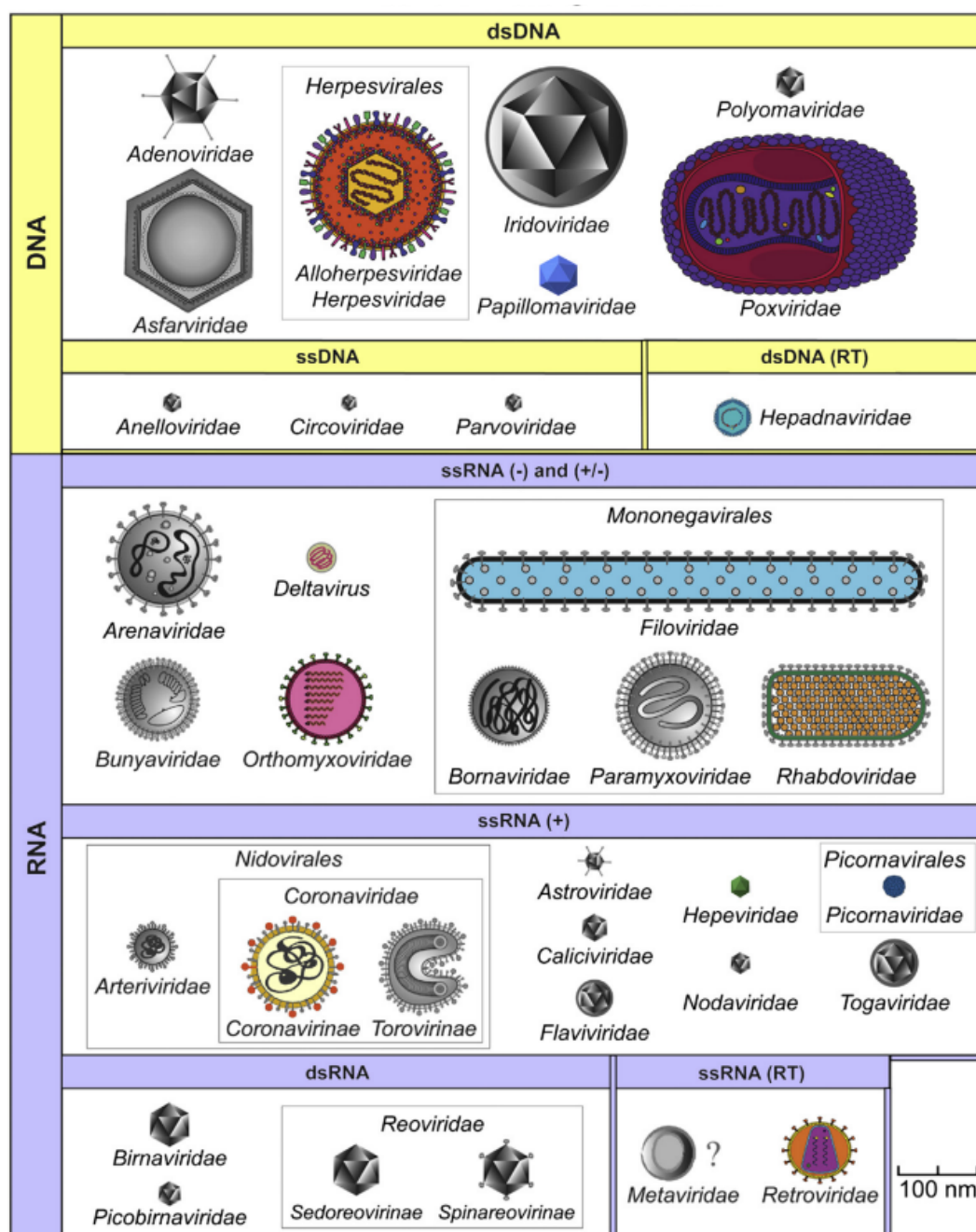
1. Baltimore classification

ระบบ Baltimore classification คิดค้นโดย David Baltimore ระบบนี้แบ่งไวรัสออกเป็น 7 กลุ่ม (groups I–VII) โดยอาศัยกลไกหลักในการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน ระบบนี้ช่วยให้เข้าใจวงจรชีวิตและพยาธิกำเนิดของไวรัสแต่ละชนิด และสนับสนุนการพัฒนากลยุทธ์ในการรักษาและยาด้านไวรัสได้อย่างตรงจุด โดยการจำแนกไวรัสตาม Baltimore classification มีดังนี้ (Louten, 2016a):

- Class I: dsDNA viruses
- Class II: ssDNA viruses
- Class III: dsRNA viruses
- Class IV: positive-sense ssRNA viruses
- Class V: negative-sense ssRNA viruses
- Class VI: RNA viruses that reverse transcribe
- Class VII: DNA viruses that reverse transcribe

2. ICTV classification

เป็นระบบอนุกรมวิธานสากล (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) ซึ่งเป็นมาตรฐานสากลในการจัดหมวดหมู่ไวรัสตามลักษณะทางพันธุกรรม โครงสร้างแคปซิด ชนิดของกรดนิวคลีอิก คุณสมบัติทางกายภาพ เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ และโรคที่ก่อขึ้น โดยมีลำดับชั้น (ranks) ตั้งแต่ realm, kingdom, phylum, class, order, family, genus จนถึง species (ภาพที่ 3) ซึ่งทำให้สามารถเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างไวรัสชนิดต่าง ๆ ได้อย่างเป็นระบบ (ICTV, 2024)



ภาพที่ 3 การจัดจำแนกเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ตามการจำแนกของ ICTV (Louten, 2016a)

ระบบ Baltimore และ ICTV ทำงานเสริมซึ่งกันและกัน โดยระบบ Baltimore เน้นกลไกการทำงานของไวรัสในระดับโมเลกุล ช่วยทำนายพฤติกรรมของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านได้ ในขณะที่ระบบ ICTV เน้นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและโครงสร้าง ทำให้สามารถจัดหมวดหมู่ไวรัสอย่างครอบคลุมและเป็นระบบ การใช้ทั้งสองระบบควบคู่กันช่วยเพิ่มความเข้าใจในไวรัสวิทยาและสนับสนุนการพัฒนากลยุทธ์ป้องกัน ควบคุม และวินิจฉัยโรคไวรัสในสัตว์ (Louten, 2016a) ตัวอย่างเชื้อไวรัสก่อโรคสำคัญในปศุสัตว์สามารถแสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อไวรัสก่อโรคสำคัญในปศุสัตว์ (ICTV, 2024; Prasad et al., 2024)

กลุ่มโรค	ชื่อโรค	ไวรัส	วงศ์/สกุล	สารพันธุกรรม	ชนิดสัตว์	ลักษณะโรคเด่น
โรคในสุกร	โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever)	African swine fever virus (ASFV)	Asfarviridae / Asfivirus	dsDNA	สุกร, หมูป่า	ติดเชื้อง่าย, ตายสูง, การติดเชื้อมีระยะยาวหรือถาวร
	โรคอหิวาต์สุกร (Classical swine fever)	Classical swine fever virus (CSFV)	Flaviviridae / Pestivirus	(+)ssRNA	สุกร	ไข้, มีภาวะเลือดออก, ตายสูง
	โรคพอร์อาร์อาร์เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS)	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	Arteriviridae / Betaarterivirus	(+)ssRNA	สุกร	ทำให้แท้ง, โรคระบบทางเดินหายใจ
	โรคพีเอ็มดีบีเอ็มเอส (Post-weaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)	Porcine circovirus type 2 (PCV2)	Circoviridae / Circovirus	ssDNA	สุกร	น้ำหนักลด, ต่อมามีไข้, ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง, อัตราการเจริญเติบโตลดลง
	โรคท้องร่วงติดต่อในสุกร (Porcine epidemic diarrhea)	Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)	Coronaviridae / Alphacoronavirus	(+)ssRNA	สุกร	ท้องเสียรุนแรง, ตายสูงในลูกสุกร
	โรคไข้หวัดใหญ่ในสุกร (Swine influenza)	Swine influenza virus (SIV)	Orthomyxoviridae / Influenzavirus A	(-)ssRNA	สุกร	ไข้, ไอ, โรคในระบบทางเดินหายใจ
โรคในสัตว์ปีก	โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease)	Newcastle disease virus (NDV)	Paramyxoviridae / Orthoavulavirus	(-)ssRNA	ไก่, นกป่า	โรคระบบทางเดินหายใจ, ระบบประสาท, ตายสูง
	โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (Infectious bronchitis)	Infectious bronchitis virus (IBV)	Coronaviridae / Gammacoronavirus	(+)ssRNA	ไก่	โรคระบบทางเดินหายใจ, ลดการผลิตไข่
	โรคไข้หวัดนก (Avian influenza)	Avian influenza virus (AIV)	Orthomyxoviridae / Influenzavirus A	(-)ssRNA	ไก่, เป็ด, นกน้ำ	อาการทางระบบทางเดินหายใจ, จุดเลือดออก, อัตราตายสูง
	โรคมาเร็กซ์ (Marek's disease)	Marek's disease virus (MDV)	Herpesviridae / Mardivirus	dsDNA	ไก่	อัมพาต, เส้นประสาทอักเสบ, เนื้องอกในอวัยวะภายใน
	โรครีโอไวรัสในไก่ (Avian reovirus disease)	Avian reovirus (ARV)	Reoviridae / Orthoreovirus	dsRNA	ไก่, นกป่า	ข้ออักเสบ, เอ็นข้ออักเสบ
	โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อ (Infectious laryngotracheitis)	Infectious laryngotracheitis virus (ILT)	Herpesviridae / Iltovirus	dsDNA	ไก่	ไข้, ระบบทางเดินหายใจ, ตาอักเสบ, หายใจลำบาก
	โรคกาฬโรคเป็ด (Duck plague/ Duck virus enteritis)	Duck plague virus (DPV / Anatid herpesvirus 1)	Herpesviridae / Mardivirus	dsDNA	เป็ด, ห่าน	ตายสูง, มีภาวะเลือดออก, เลือดออกตามอวัยวะ
	โรคติดเชื้อเอวียนพารามิกโซไวรัส-2 (Avian paramyxovirus-2)	Avian paramyxovirus-2 (APMV-2)	Paramyxoviridae / Avulavirus	(-)ssRNA	ไก่, นก	โรคระบบทางเดินหายใจ
	โรคกัมโบโร (Infectious bursal disease/Gumboro)	Infectious bursal disease virus (IBDV)	Birnaviridae / Avibirnavirus	dsRNA	ไก่	ภูมิคุ้มกันบกพร่อง, ท้องเสีย

กลุ่มโรค	ชื่อโรค	ไวรัส	วงศ์/สกุล	สารพันธุกรรม	ชนิดสัตว์	ลักษณะโรคเด่น
	โรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Infectious Anemia)	Chicken Anemia Virus (CAV)	Anelloviridae / Gyrovirus	ssDNA	ไก่	ภาวะโลหิตจางรุนแรง, ภูมิคุ้มกันบกพร่อง, ต่อมามีน้ำเหลือง/ม้ามฝ่อ, ผิวหนังมีเลือดออก, อัตราการตายสูง
	โรคสมองและไขสันหลังอักเสบในสัตว์ปีก (Avian encephalomyelitis)	Avian encephalomyelitis virus (AEV)	Picornaviridae / Tremovirus	(+)ssRNA	ไก่, นก	โรกระบบประสาท, อาการสั่น
	โรคไข่น้ำหรือโรคไข่ลด (Egg drop syndrome)	Egg drop syndrome virus (EDSV)	Adenoviridae / Atadenovirus	dsDNA	ไก่, นก	ผลผลิตไข่ลดลง, ไข่ผิดปกติ, ภาวะการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ
	โรคโลหิตในสัตว์ปีก (Avian Leukosis)	Avian leukosis virus (ALV)	Retroviridae / Alpharetrovirus	ssRNA-RT	ไก่	ซีด, เนื้องอกในตับ ม้าม หรือถุงฟองไข่, การเจริญเติบโตช้า, ผลผลิตไข่ลดลง
โรคในโค/ กระบือ	โรคไอบีอาร์ (Infectious bovine rhinotracheitis; IBR)	Infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV / BHV-1)	Herpesviridae / Varicellovirus	dsDNA	โค	โรกระบบทางเดินหายใจ, โรกระบบสืบพันธุ์, ทำให้แท้ง
	โรคบวเวยไวรัสไดอะเรีย (Bovine viral diarrhea; BVD)	Bovine viral diarrhea virus (BVDV)	Flaviviridae / Pestivirus	(+)ssRNA	โค	ท้องเสีย, แท้งลูก, ภูมิคุ้มกันบกพร่อง
	โรคล้มปัส สกิน (Lumpy skin disease)	Lumpy skin disease virus (LSDV)	Poxviridae / Capripoxvirus	dsDNA	โค, กระบือ	มีไข้, ก้อนนูนที่ผิวหนัง, ต่อมามีน้ำเหลืองโต, ผิวหนังอักเสบ, ผลผลิตน้ำนมลดลง
	โรคติดเชื้อโคโรนาไวรัสในโค (Bovine coronavirus infection)	Bovine coronavirus (BCoV)	Coronaviridae / Betacoronavirus	(+)ssRNA	โค	ท้องเสีย, โรกระบบทางเดินหายใจ, ภาวะสูญเสียผลิตภาพ
โรคใน แกะ/ แพะ	โรคข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะ (Caprine arthritis-encephalitis)	Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV)	Retroviridae / Lentivirus	ssRNA-RT	แพะ	ข้ออักเสบ, ระบบประสาท, ลดการเจริญเติบโต
	โรคปากเปื่อยในแพะและแกะ (Contagious ecthyma/Orf)	Contagious ecthyma virus (Orf virus)	Poxviridae / Parapoxvirus	dsDNA	แกะ, แพะ	แผลและตุ่มน้ำรอบปาก, ลิ้น, แผลในหัวนม
	โรคพีพีอาร์ (Peste des Petits ruminants; PPR)	Peste des Petits ruminants virus (PPRV)	Paramyxoviridae / Morbillivirus	(-)ssRNA	แกะ, แพะ	ไข้, ท้องเสีย, การตายสูง, ภูมิคุ้มกันลด
โรคในม้า	โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African horse sickness)	African horse sickness virus (AHSV)	Reoviridae / Orbivirus	dsRNA	ม้า, ลา, ล่อ, ม้าลาย	มีไข้, ตายสูงในม้า, ภาวะมีไวรัสในเลือด
	โรคไข้หวัดใหญ่ในม้า (Equine influenza)	Equine influenza virus	Orthomyxoviridae / Influenzavirus A	(-)ssRNA	ม้า	ไข้, ไอ, น้ำมูก, ระบบทางเดินหายใจอักเสบ
	โรคติดเชื้อโรตาไวรัสในม้า (Equine rotavirus infection)	Equine rotavirus	Reoviridae / Rotavirus	dsRNA	ม้า	ท้องเสียรุนแรง, อาจทำให้ลูกม้าตาย
	โรคโพรงจมูกและปอดอักเสบในม้า (Equine rhinopneumonitis)	Equine rhinopneumonitis virus (EHV-1, EHV-4)	Herpesviridae / Varicellovirus	dsDNA	ม้า	ไข้, ระบบทางเดินหายใจ, แท้งลูก, ระบบประสาท
	โรคเส้นเลือดแดงอักเสบในม้า (Equine viral arteritis)	Equine viral arteritis virus (EVAV)	Arteriviridae / Alphaarterivirus	(+)ssRNA	ม้า	ไข้, อัมพาต, แท้งลูก, อวัยวะเพศบวม
	โรคโลหิตจางติดต่อในม้า (Equine infectious anemia)	Equine infectious anemia virus (EIAV)	Retroviridae / Lentivirus	ssRNA-RT	ม้า	ไข้, ซีด, บวมหน้า, โลหิตจาง, ภูมิคุ้มกันบกพร่อง

กลุ่มโรค	ชื่อโรค	ไวรัส	วงศ์/สกุล	สารพันธุกรรม	ชนิดสัตว์	ลักษณะโรคเด่น
โรคในสัตว์หลายชนิด	โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot-and-mouth disease)	Foot-and-mouth disease virus (FMDV)	Picornaviridae / Aphthovirus	(+)ssRNA	โค, กระบือ, สุกร, แกะ, แพะ	แผลในปาก/ฝ่าเท้า, ผลผลิตน้ำนมลดลง
	โรคแคปรีพอกซ์ (Capripox Diseases)	Capripoxviruses	Poxviridae / Capripoxvirus	dsDNA	โค, แกะ, แพะ	มีตุ่มขึ้นตามผิวหนัง, ตุ่มน้ำ, ลดการผลิตน้ำนม, แท้ง
	โรคอาคาบานะ (Akabane disease)	Akabane virus	Simbu serogroup, Peribunyaviridae	(+)ssRNA	โค, แกะ, แพะ	พิการในลูกสัตว์, ทำให้แท้ง
	โรคติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminant herpesvirus infections)	Herpesvirus (AHV-1, OHV-2)	Herpesviridae	dsDNA	โค, แกะ, แพะ	ไข้, น้ำตาไหล, ระบบทางเดินหายใจผิดปกติ, อาการทางระบบทางเดินอาหารและประสาท
	โรคปากอักเสบพุพอง (Vesicular stomatitis)	Vesicular stomatitis virus	Rhabdoviridae / Vesiculovirus	(-)ssRNA	โค, กระบือ, สุกร, ม้า	มีไข้, ตุ่มพองและแผลที่ปาก ลิ้น และเท้า, ผลิตน้ำนมลดลง, เบื่ออาหาร
	โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease/Pseudorabies)	Pseudorabies virus (PRV)	Herpesviridae / Alphaherpesvirus	dsDNA	สุกร, สุนัข, โค	โรคระบบประสาท, ไข้, หายใจลำบาก, ตายสูงในลูกสุกร, อาจทำให้สัตว์อื่นติดเชื้อและตาย
โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน	โรคไข้เวสต์ไนล์ (West nile fever)	West Nile virus (WNV)	Flaviviridae / Flavivirus	(+)ssRNA	นก, ม้า, มนุษย์	ระบบประสาทผิดปกติ, อัมพาต, อาจตาย
	โรคพิษสุนัขบ้า (Rabies)	Rabies virus (RABV)	Rhabdoviridae / Lyssavirus	(-)ssRNA	สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุนัข, แมว, โค, ม้า, มนุษย์	โรคระบบประสาทรุนแรง, พฤติกรรมผิดปกติ, อาการน้ำลายไหล, ทำให้ตาย
	โรคไข้หวัดนก (Avian Influenza)	Avian influenza virus (AIV)	Orthomyxoviridae / Influenzavirus A	(-)ssRNA	ไก่, เป็ด, นกน้ำ, มนุษย์	อาการทางระบบทางเดินหายใจ, จุดเลือดออก, อัตราตายสูง

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง การตรวจทางซีรัมวิทยา และเทคนิคชีวโมเลกุลสมัยใหม่ แต่ละวิธีมีข้อดี ข้อจำกัด และความเหมาะสมในการใช้งานที่แตกต่างกัน ดังสรุปตามตารางที่ 2 โดยมีรายละเอียดของวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. วิธีเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture approach)

วิธีเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเทคนิคดั้งเดิมที่ใช้ค้นพบไวรัส โดยเริ่มจากการกรอตัวอย่างทางคลินิก เพื่อกำจัดเซลล์โฮสต์และจุลินทรีย์อื่น ๆ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น การเกิด syncytia, การสลาย (lysis), การหลุดลอก (detachment) หรือการเกิด inclusion bodies ซึ่งรวมเรียกว่า cytopathic effect (CPE) การสังเกต CPE ช่วยบ่งชี้การมีอยู่และการเพิ่มจำนวนของไวรัส หลังจากนั้นไวรัสจะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แม้ว่าวิธีนี้จะใช้เวลานานและต้องอาศัยความชำนาญสูง แต่ยังคงเป็นวิธีสำคัญสำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสให้เพียงพอสำหรับการทดสอบทางซีรัมวิทยาและอณูชีววิทยา อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่ทุกชนิดของไวรัสสามารถเติบโตได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง ทำให้เป็นข้อจำกัดสำคัญต่อการตรวจพบและการศึกษาลักษณะของไวรัสบางชนิด (Flint et al., 2015; Louten, 2016b)

2. การตรวจทางซีรัมวิทยา (serological approach)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาที่นิยมใช้สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนของไวรัสในตัวอย่างเลือดหรือซีรัม ข้อดีของ ELISA คือสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากภายในเวลาอันสั้น มีความไวและความจำเพาะในระดับที่ยอมรับได้ จึงเหมาะสมกับการเฝ้าระวังโรคในระดับประชากรสัตว์ วิธีนี้ยังสามารถปรับรูปแบบให้เหมาะสมกับการตรวจแอนติบอดีหรือแอนติเจนเฉพาะ เช่น indirect ELISA, competitive ELISA, หรือ sandwich ELISA นอกจากนี้ ยังมีวิธีทางซีรัมวิทยาอื่น ๆ เช่น virus neutralization test (VNT) และ agar gel immunodiffusion (AGID) ซึ่งมีความซับซ้อนของขั้นตอน ใช้เวลานาน และต้องอาศัยความเชี่ยวชาญในการทดสอบและการอ่านผล (Datta et al., 2015)

3. วิธีที่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid sequence-dependent approach)

เทคนิคที่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก เช่น PCR และ ไมโครอาร์เรย์ (microarrays) มีความรวดเร็วกว่าเทคนิคดั้งเดิม เช่น วิธีเพาะแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง และสามารถค้นพบจีโนมใหม่ของไวรัสที่ทราบชนิดแล้วได้อย่างมีประสิทธิภาพ PCR เป็นวิธีที่นิยมสูง เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณลำดับกรดนิวคลีอิกของไวรัสจากตัวอย่างทางคลินิกเพียงเล็กน้อยได้อย่างรวดเร็ว แม้ว่าวิธีนี้เหมาะสำหรับค้นหาไวรัสที่ทราบชนิดแล้ว แต่ข้อจำกัดสำคัญคือ ต้องทราบลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่สนใจแน่ชัดก่อนจึงจะออกแบบไพรเมอร์ได้ ส่วนเทคนิค degenerate PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดนี้โดยรองรับความหลากหลายของไวรัสในระดับหนึ่ง แต่ยังคงพึ่งพาข้อมูลลำดับของสกุลหรือวงศ์ของไวรัส และการเพิ่มปริมาณจีโนมมักทำได้เพียงส่วนเล็ก ๆ ของไวรัส ซึ่งบางครั้งไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์เชิงลึก (Mahony, 2008; Datta et al., 2015)

4. วิธีที่ไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid sequence-independent approach)

วิธีที่ไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก เช่น เมทาจีโนมิกส์ (metagenomics) ช่วยให้สามารถศึกษาสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่างได้โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิต และไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับกรดนิวคลีอิกของไวรัสที่ทราบแน่ชัดการวิเคราะห์เมทาจีโนมิกส์ในยุคแรกใช้การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วย PCR, การโคลน และ

การถอดรหัสพันธุกรรม ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกแบบสุ่มสำหรับไวรัสเมทาจีโนมิกส์ เช่น SISPA (sequence-independent single-primer amplification), VIDISCA (virus discovery based on cDNA-AFLP) และ RCA (rolling circle amplification) ทำให้สามารถค้นพบไวรัสชนิดใหม่หลายชนิดจากตัวอย่างทางคลินิกและสิ่งแวดล้อม (Datta et al., 2015)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการ

วิธีตรวจ	ข้อดี	ข้อจำกัด	ความเหมาะสมในการใช้งาน
การแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง	- สามารถเพิ่มปริมาณไวรัสได้สูง - ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำลองตัวเองของไวรัส	- ใช้เวลานานและต้องอาศัยความชำนาญสูง - ใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม - ไวรัสบางชนิดไม่สามารถเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยง	- การยืนยันการติดเชื้อ - การผลิตไวรัสสำหรับการทดสอบทางซีรัมวิทยาและอนุชีววิทยา
การตรวจทางซีรัมวิทยา	- ตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้รวดเร็ว (ELISA) - มีความแม่นยำสูง (VNT, AGID) - ใช้ประเมินภูมิคุ้มกันหรือการแพร่กระจายของโรค	- VNT และ AGID ใช้เวลานานและต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ - ELISA อาจมีความจำเพาะต่ำกว่าในบางกรณี	- ฝ้าระวังโรคในระดับประชากรสัตว์ - ประเมินผลวัคซีน - ยืนยันผลตรวจเบื้องต้น
เทคนิคที่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก	- ตรวจพบไวรัสได้รวดเร็วและแม่นยำ - เหมาะกับการค้นพบจีโนมใหม่ของไวรัสที่ทราบชนิดแล้ว	- ต้องมีข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิกที่ทราบแน่ชัด - เพิ่มปริมาณลำดับกรดนิวคลีอิกได้เพียงบางส่วนของจีโนม - อาจไม่เหมาะกับไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยพบ	- ตรวจไวรัสที่ทราบชนิดแล้ว - ฝ้าระวังเชิงโมเลกุล - วิเคราะห์จีโนม
เทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก	- ไม่ต้องมีข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิกของไวรัส - สามารถค้นพบไวรัสใหม่จากตัวอย่างคลินิกและสิ่งแวดล้อม - ครอบคลุมไวรัสหลายชนิดในตัวอย่างเดียว	- ต้องใช้เทคนิคขั้นสูงและค่าใช้จ่ายสูง - การวิเคราะห์ข้อมูลซับซ้อน - อาจได้จีโนมที่ไม่สมบูรณ์	- การค้นพบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ - ฝ้าระวังไวรัสในประชากรสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม - การวิจัยไวรัสวิทยาเชิงลึก

เอกสารอ้างอิง

- Bayry, J. (2013). Emerging viral diseases of livestock in the developing world. *Indian J. Virol.*, 24, 291–294. doi:10.1007/s13337-013-0164-x
- Ceruti, A., Kobialka, R. M., Abd El Wahed, A. and Truyen, U. (2025). African Swine Fever: A One Health Perspective and Global Challenges. *Animals*, 15(7), 1-16. doi:10.3390/ani15070928
- Datta, S., Budhauya, R., Das, B., Chatterjee, S., Vanlalhmuka and Veer, V. (2015). Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. *World J. Virol.*, 4(3), 265–276. doi:10.5501/wjv.v4.i3.265
- Destoumieux-Garzon, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., ...and Voituren, Y. (2018). The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front. Vet. Sci.*, 5, 1-13. doi:10.3389/fvets.2018.00014
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. and Skalka, A. M. (2015). Principles of virology, volume 1: Molecular biology, 4th ed. ASM Press, Washington, DC, USA.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2024). Current ICTV Taxonomy Release. [Online] Available: <https://ictv.global/taxonomy>. Accessed August 1, 2025
- Jones, K. E., Patel, N., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L. and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993. doi:10.1038/nature06536
- Louten, J. (2016a). Chapter 2: Virus structure and classification, In: Essential human virology. 26 May 2016. Academic Press, London, UK. pp. 19-29.
- Louten, J. (2016b). Chapter 7 - Detection and Diagnosis of Viral Infections, In: Essential human virology. 26 May 2016. Academic Press, London, UK. pp. 111-132.
- Mahony, J. B. (2008). Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(4), 716–747. doi:10.1128/CMR.00037-07
- Prasad, R. D., Sonawane, K. D., Prasad, R. S., Prasad, N., Shrivastav, R. K., Shrivastav, O. P., ...and Guo, Z. (2024). A review on livestock viral disease and their management. *ES General*, 5, 1-29. doi:10.30919/esg1227

บทที่ 2

เทคโนโลยี next-generation sequencing

เทคโนโลยีการถอดรหัสพันธุกรรมยุคใหม่ (next-generation sequencing; NGS) เป็นเครื่องมือสำคัญในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และการชันสูตรโรคสัตว์ เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA หรือ RNA ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ เทคโนโลยีนี้ช่วยลดข้อจำกัดของวิธีดั้งเดิม เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีขั้นตอนซับซ้อนและใช้เวลานาน นอกจากนี้ NGS ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์แบบ metagenomics เพื่อระบุเชื้อโรคทั้งหมดในตัวอย่างเดียว ทำให้สามารถค้นพบไวรัสชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีข้อมูลพันธุกรรมมาก่อน (novel virus) เทคโนโลยี NGS จึงมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการระบาด การวางแผนมาตรการป้องกันโรค โดยเฉพาะในกรณีของไวรัสอุบัติใหม่ ทั้งยังช่วยให้นักวิจัยสามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่กำลังระบาด รวมถึงตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่อาจส่งผลกระทบต่อความรุนแรงหรือการแพร่กระจายของเชื้อ

วิวัฒนาการของเทคโนโลยีการถอดรหัสพันธุกรรม

วิวัฒนาการของการถอดรหัสพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็นสามยุคหลัก ดังนี้

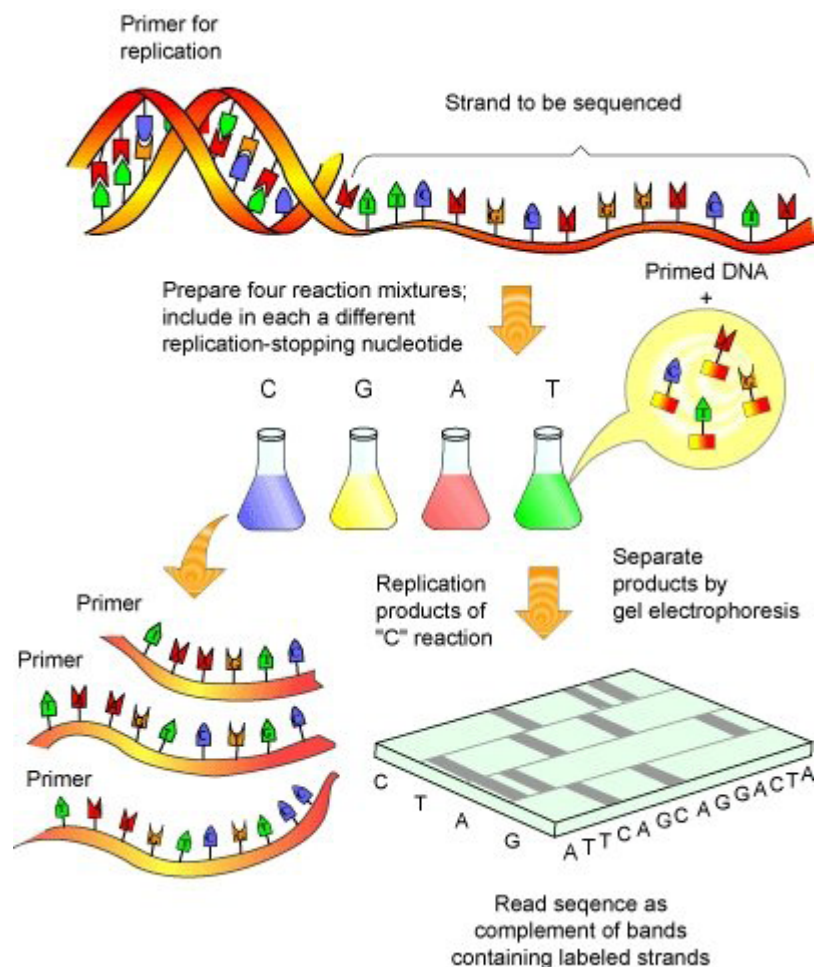
1. การถอดรหัสพันธุกรรมยุคแรก (first-generation sequencing)

การถอดรหัสพันธุกรรมยุคแรก หรือที่รู้จักกันในชื่อ Sanger sequencing เป็นเทคนิคที่พัฒนาโดย Frederick Sanger และคณะในปี 1977 โดยอาศัยหลักการ dideoxynucleotide chain termination ซึ่งอาศัยการสังเคราะห์สาย DNA ใหม่จากสายแม่แบบ (DNA template)

โดยมีทั้งนิวคลีโอไทด์ปกติ (dNTP) และนิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษ คือ dideoxynucleotide (ddNTP) ซึ่งเมื่อถูกนำเข้าสู่สาย DNA จะหยุดการสร้างสาย DNA เนื่องจากขาดหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3' (3'-OH) ที่จำเป็นต่อการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Heather and Chain, 2016) เทคโนโลยีนี้ได้พัฒนาต่อยอดด้วยการติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่นิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (A, T, G, C) ด้วยสีที่แตกต่างกัน (fluorescent labeling) ทำให้สามารถตรวจจับเบสสุดท้ายของสาย DNA ที่หยุดการสังเคราะห์ได้อย่างแม่นยำและอัตโนมัติ โดยผลลัพธ์จะถูกอ่านด้วยเครื่อง capillary electrophoresis และแสดงในรูปแบบ chromatogram ซึ่งช่วยให้การวิเคราะห์ลำดับเบสมีความรวดเร็วและแม่นยำกว่าการใช้รังสีแบบดั้งเดิม (Goodwin et al., 2016) ตามภาพที่ 4

ข้อดีของ Sanger sequencing คือ มีความแม่นยำสูง สามารถอ่านลำดับเบสได้ยาวประมาณ 800–1,200 bp ต่อการรันหนึ่งครั้ง เหมาะสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของผล NGS และการวิเคราะห์ยีนสั้นหรือการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งได้ (Slatko et al., 2018) อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญคือ ปริมาณงานต่อรอบต่ำ ใช้เวลาและต้นทุนสูง และต้องอาศัยไพรเมอร์จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของ DNA template ทำให้ไม่เหมาะสำหรับการถอดรหัสจีโนมขนาดใหญ่หรือการวิเคราะห์ตัวอย่างหลายตัวอย่างพร้อมกัน (Goodwin et al., 2016; Heather and Chain, 2016)

แม้ว่าเทคโนโลยี NGS จะเข้ามาแทนที่ในการถอดรหัสจีโนมขนาดใหญ่ แต่ Sanger sequencing ที่ใช้ฟลูออเรสเซนต์ยังคงมีบทบาทสำคัญในการยืนยันผล PCR และตรวจสอบความถูกต้องของผล NGS การวิเคราะห์ตัวอย่างที่ซับซ้อนน้อย และการตรวจสอบการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ซึ่งถือเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับงานวิจัยด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลและงานด้านพันธุศาสตร์โรคนปัจจุบัน (Heather and Chain, 2016)



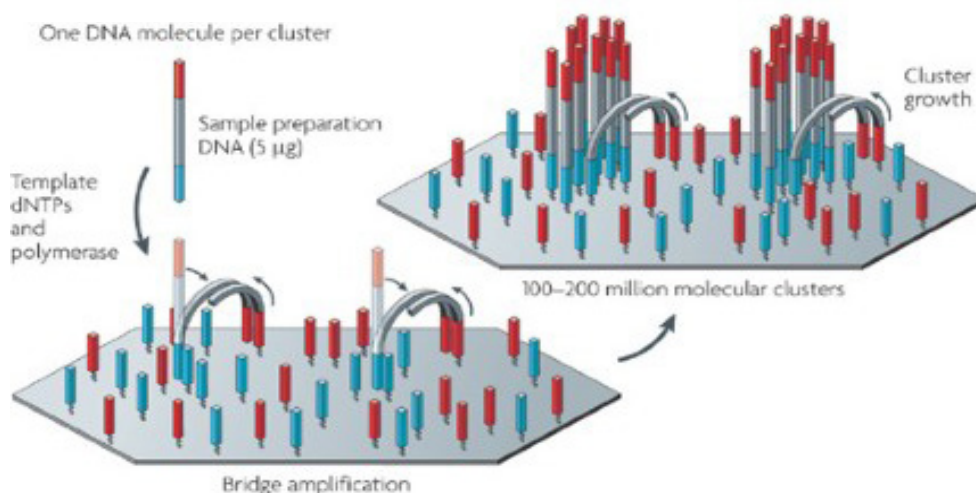
ภาพที่ 4 หลักการของเทคนิค Sanger sequencing (Antal et al., 2014)

2. การถอดรหัสพันธุกรรมยุคที่สอง (second-generation sequencing)

การถอดรหัสพันธุกรรมยุคที่สอง หรือที่รู้จักกันในชื่อ next-generation sequencing (NGS) เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถอดรหัส DNA โดยอาศัยนวัตกรรมในหลายด้าน เช่น เคมีของการถอดรหัส, microfluidics, และชีวสารสนเทศ แพลตฟอร์ม NGS ยุคที่สองมีความสามารถในการถอดรหัสแบบ massively parallel sequencing ซึ่งสามารถสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้จากเครื่อง sequencer (read) นับล้านถึงพันล้าน read ต่อการรันหนึ่งครั้ง เทคโนโลยีเหล่านี้มักถูกเรียกว่า short-read sequencing เนื่องจาก read แต่ละอันมีความยาวสั้นกว่าวิธียุคแรก แม้จะมีข้อจำกัดด้านความยาว แต่ NGS ยุคที่สองยังสามารถถอดรหัสและวิเคราะห์ข้อมูล DNA ขนาดใหญ่และซับซ้อนได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง (Slatko et al., 2018) โดยแพลตฟอร์มที่ได้รับความนิยมอย่างมากในยุคนี้ ได้แก่

2.1 เทคโนโลยี Illumina

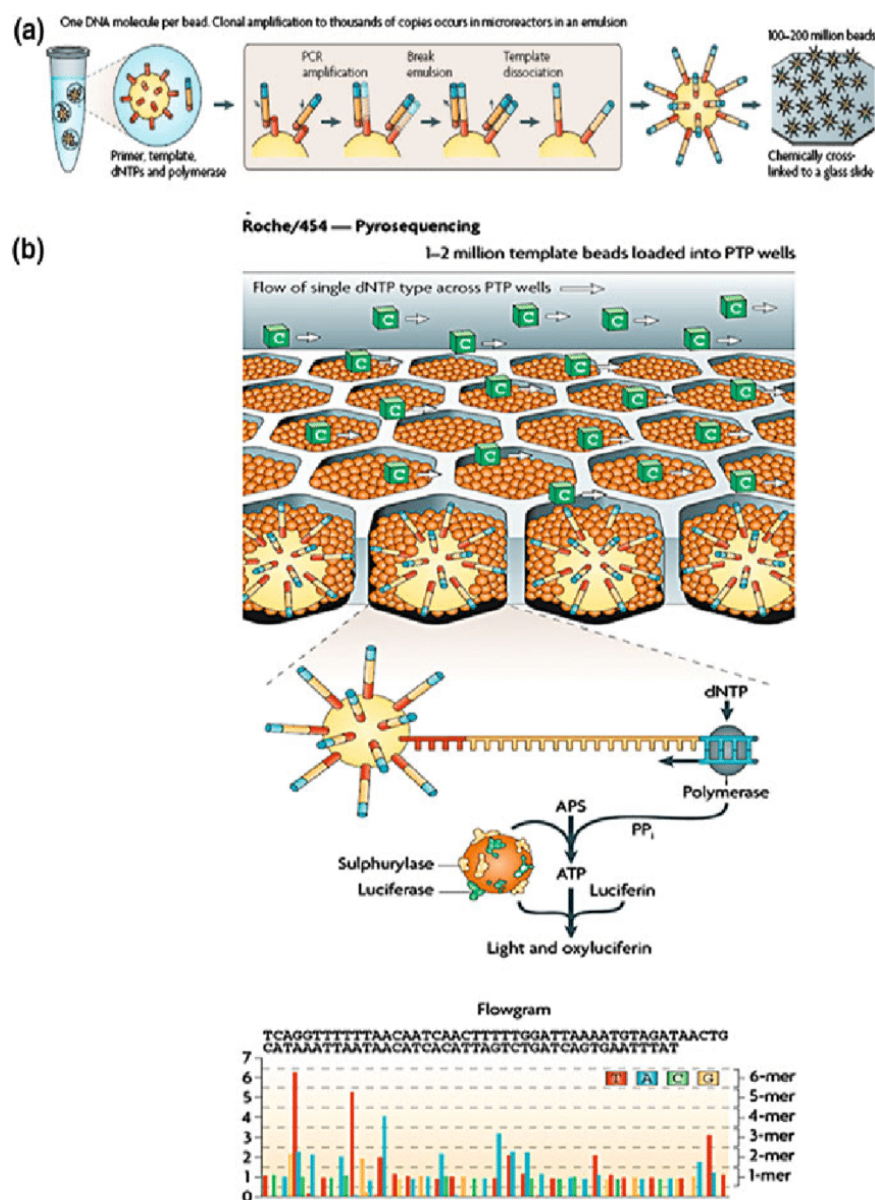
เทคโนโลยี Illumina ใช้หลักการ sequencing by synthesis (SBS) ซึ่งเป็นวิธีการถอดรหัส DNA โดยการสังเคราะห์สาย DNA ใหม่จาก DNA template พร้อมกับตรวจจับเบสแต่ละตัวที่ถูกสังเคราะห์ ซึ่งอาศัยการเตรียม DNA library โดยตัด DNA ต้นแบบเป็นชิ้นสั้น ๆ และต่อเข้ากับ adapters เพื่อให้จับกับพื้นผิว flow cell ของเครื่อง จากนั้น DNA แต่ละสายจะถูกเพิ่มปริมาณด้วย solid-phase bridge amplification ทำให้เกิดกลุ่มสาย DNA ที่เหมือนกันจำนวนมาก (clonal clusters) เพื่อให้สามารถตรวจจับสัญญาณได้ชัดเจน ในขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA แต่ละรอบ นิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (A, T, G, C) จะถูกติดฉลากด้วย fluorescent reversible terminators ซึ่งจะหยุดการต่อเติมชั่วคราวเมื่อกล้องของเครื่องตรวจจับสัญญาณ fluorescence ของแต่ละเบสแล้ว กลุ่ม terminator จะถูกปล่อยออก ทำให้สามารถสังเคราะห์เบสตัวถัดไปได้ซ้ำ ๆ จนกว่าจะได้ลำดับเบสทั้งหมด ตามภาพที่ 5 ผลลัพธ์คือ short reads ขนาด 100–300 bp ต่อรัน โดยมีความถูกต้องสูงกว่า 99.5% และผลผลิตสูง ต้นทุนต่อเบสต่ำ อย่างไรก็ตาม แพลตฟอร์มนี้อาจเกิด base calling bias ในบาง motif ของลำดับ เช่น GGC และอาจมีข้อจำกัดในการประกอบจีโนมขนาดใหญ่แบบ de novo (Goodwin et al., 2016; Mardis, 2017; Slatko et al., 2018)



ภาพที่ 5 หลักการของเทคโนโลยี Illumina sequencing (Metzker , 2010)

2.2 เทคโนโลยี Roche 454

เทคโนโลยี Roche 454 ใช้หลักการ pyrosequencing โดยตรวจจับการปล่อยแสงจากปฏิกิริยาทางเคมี เมื่อเอนไซม์ DNA polymerase เพิ่มนิวคลีโอไทด์ลงในสาย DNA ที่กำลังสังเคราะห์ ขั้นตอนเริ่มจากการเตรียม library DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย emulsion PCR (emPCR) เพื่อสร้างอนุภาค DNA คล้ายโคลนบนเม็ดไมโครบีดส์แต่ละเม็ด ไมโครบีดส์จะถูกบรรจุลงในหลุม (wells) ของ plate ที่อุปกรณ์สามารถตรวจจับแสงได้ เมื่อ DNA polymerase นำ dNTP ตัวใดเข้ามาและจับกับเบสที่ตรงกันของ template จะเกิดปฏิกิริยาเคมีที่ปล่อย pyrophosphate (PPi) ซึ่งจะถูเอนไซม์ cascade แปลงเป็นแสงฟลูออเรสเซนซ์ ปริมาณแสงที่ปล่อยออกมาตรงกับจำนวนเบสที่ถูกต่อเติมต่อรอบ ทำให้สามารถระบุลำดับเบสของ DNA ได้ ตามภาพที่ 6 เทคนิคนี้สามารถสร้าง reads ที่ยาวกว่า short-read sequencing ของ Illumina จึงเหมาะสำหรับการประกอบลำดับแบบ de novo ของจีโนมที่ไม่มี reference genome แต่ข้อจำกัดคือ อัตราความผิดพลาดสูงในบริเวณที่มี homopolymer หรือเบสซ้ำหลายตัวต่อเนื่อง (Goodwin et al., 2016; Mardis, 2017; Slatko et al., 2018)



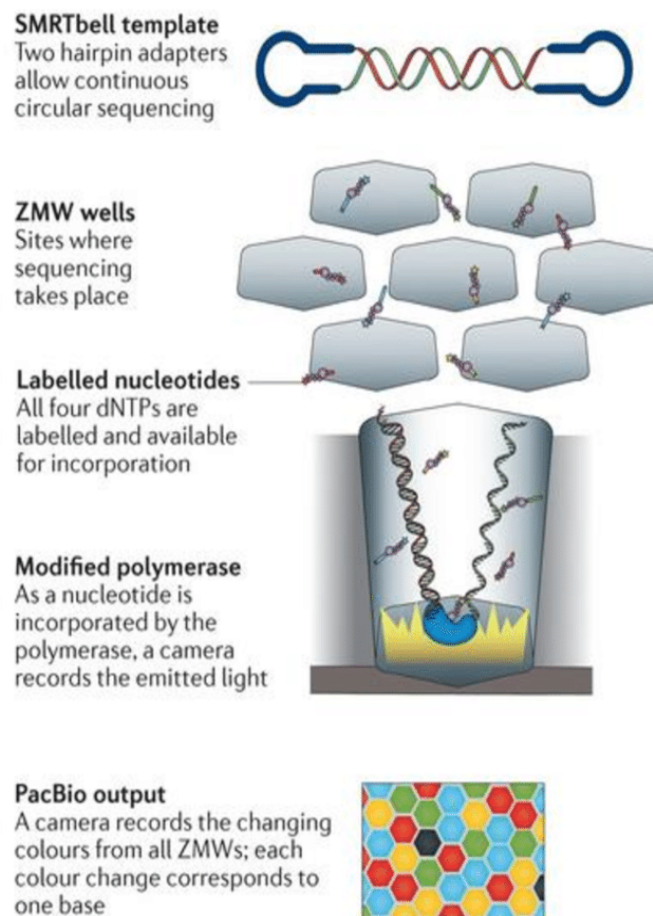
ภาพที่ 6 หลักการของเทคโนโลยี Roche 454 sequencing (Masoudi-Nejad et al., 2013)

เทคโนโลยี third-generation sequencing ที่ได้รับความนิยม ได้แก่

3.1 เทคโนโลยี SMRT (single-molecule real-time)

เทคโนโลยี SMRT อาศัยหลักการโดยเตรียม DNA ให้เป็นวงกลม (SMRTbell) และยึดติดกับ DNA polymerase ก่อนที่จะใส่ลงใน zero-mode waveguides (ZMWs) ซึ่งเป็นช่องนาโนที่สามารถตรวจจับแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้อย่างแม่นยำ ในระหว่างการสังเคราะห์ DNA เอนไซม์ polymerase จะเพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่มีสารฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่างกันเข้าไปในสาย DNA ซึ่งจะปล่อยสัญญาณแสงที่สามารถตรวจจับได้ทันทีโดยกล้อง CCD ที่ติดตั้งอยู่ใน ZMWs (Ardui et al., 2018) ตามภาพที่ 8

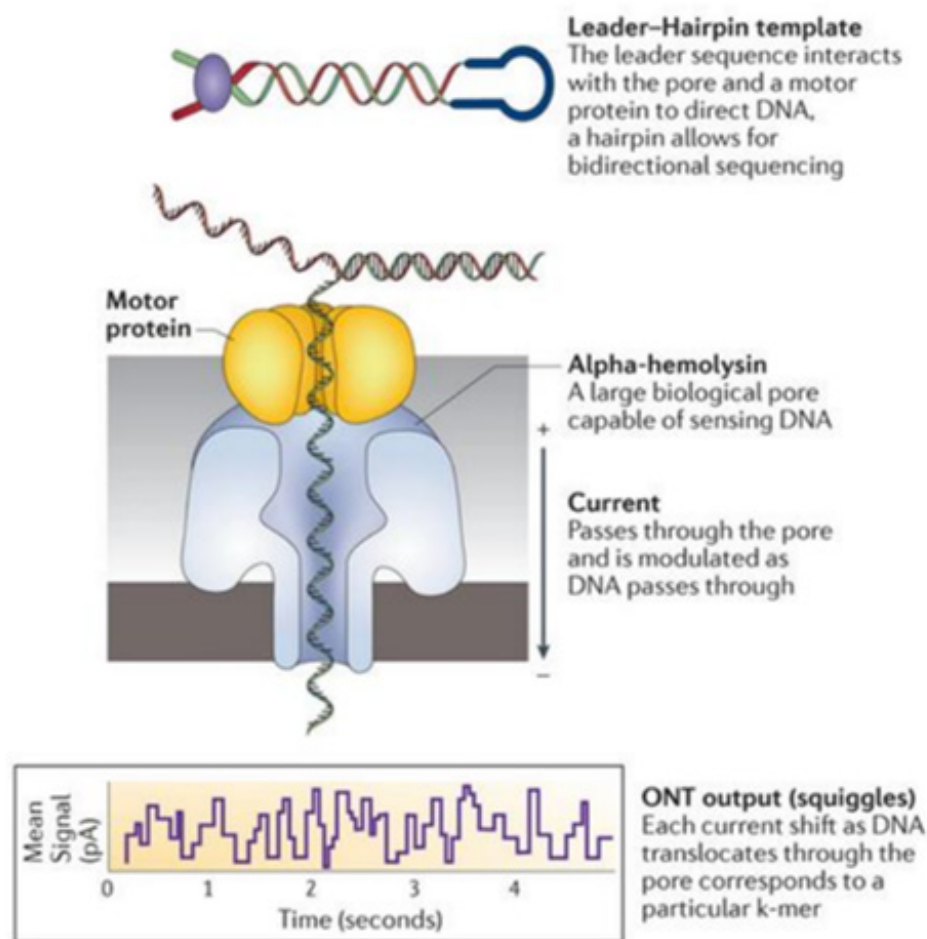
เทคโนโลยีนี้มีข้อดีหลายประการที่ทำให้โดดเด่นในการถอดรหัสจีโนม เช่น สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ยาวถึง 20–30 กิโลเบส ซึ่งช่วยให้การประกอบจีโนมที่ซับซ้อนและมีลำดับซ้ำซ้อนแม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้การเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วย PCR จึงลดความผิดพลาดจากกระบวนการขยาย และสามารถตรวจจับการดัดแปลงทางพันธุกรรม เช่น การเมทิลเลชันของ DNA ได้โดยตรง อีกทั้งการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดยาวและความสามารถในการตรวจจับการดัดแปลงช่วยเพิ่มความแม่นยำในการประกอบจีโนม (Liu et al., 2015; Ardui et al., 2018; Slatko et al., 2018) อย่างไรก็ตาม SMRT ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เช่น อัตราความผิดพลาดของเบสในการอ่านครั้งเดียวสูงกว่าการถอดรหัสแบบ short-read แม้ว่าจะสามารถแก้ไขได้ด้วยเทคนิค circular consensus sequencing แต่มีต้นทุนทั้งเครื่องมือและสารเคมีค่อนข้างสูง ต้องใช้ DNA ต้นแบบในปริมาณมากกว่าบางเทคโนโลยีและอัตราของ read ต่อรันต่ำกว่าเทคโนโลยี short-read ทำให้เหมาะกับการวิเคราะห์จีโนมขนาดกลางหรือใหญ่แบบละเอียด ไม่เหมาะกับงาน high-throughput ขนาดมหาศาล (Liu et al., 2015; Ardui et al., 2018)



ภาพที่ 8 หลักการของเทคโนโลยี SMRT (single-molecule real-time) (Goodwin et al., 2016)

3.2 เทคโนโลยี Nanopore sequencing

เทคโนโลยี Nanopore sequencing เป็นหนึ่งในแพลตฟอร์มการถอดรหัสพันธุกรรมยุคที่สามที่มีจุดเด่นแตกต่างจากวิธีอื่น โดยอาศัยหลักการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าเมื่อสาย DNA หรือ RNA เดี่ยวเคลื่อนผ่านรูโปรตีนขนาดนาโน (nanopore) ที่ฝังอยู่ในเมมเบรน เมื่อนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดผ่าน nanopore จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณกระแสไฟฟ้าเฉพาะ ซึ่งสามารถแปลงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แบบเรียลไทม์ (Deamer et al., 2016) ตามภาพที่ 9 เทคโนโลยี Nanopore sequencing มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ความสามารถในการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวมากตั้งแต่หลายหมื่นจนถึงล้านเบส ทำให้เหมาะสำหรับการประกอบจีโนมที่ซับซ้อนและการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจีโนม อีกทั้งยังสามารถตรวจจับการดัดแปลงทางพันธุกรรม เช่น DNA methylation ได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติม และมีอุปกรณ์ที่มีขนาดเล็กพกพาได้ เช่น MinION ซึ่งสามารถใช้งานได้ในภาคสนาม รวมถึงยังสามารถถอดรหัส RNA ได้โดยตรงโดยไม่ต้องย้อนกลับเป็น cDNA (Deamer et al., 2016; Jain et al., 2016; Wang et al., 2021) อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีนี้ยังมีข้อจำกัด เช่น อัตราความผิดพลาดของการถอดรหัสยังคงสูงกว่าการถอดรหัสแบบ short-read แม้ว่าจะมีการพัฒนาอัลกอริทึมทางชีวสารสนเทศเพื่อเพิ่มความแม่นยำ แต่ความสามารถในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันที่เรียงต่อกันซ้ำ ๆ ในสาย DNA หรือ RNA โดยไม่มีเบสอื่นคั่น (homopolymer) และความซับซ้อนของการวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนคุณภาพของตัวอย่างที่เตรียม ทำให้การประยุกต์ใช้ในเชิงวินิจฉัยทางคลินิกหรือการวิเคราะห์เชิงปริมาณยังคงต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องเพิ่มเติม (Deamer et al., 2016; Rang et al., 2018; Logsdon et al., 2020)



ภาพที่ 9 หลักการของเทคโนโลยี Nanopore sequencing (Goodwin et al., 2016)

ความท้าทายทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics challenges) สำหรับเทคโนโลยี NGS และ TGS

หนึ่งในความท้าทายสำคัญของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NGS และ TGS คือปัญหา “ข้อมูลมหาศาล” (data deluge) ที่เกิดจากความสามารถของแพลตฟอร์ม NGS และ TGS ในการสร้างข้อมูลที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและหลากหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นข้อมูลจากการศึกษาในมนุษย์ สัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์ การผลิตข้อมูลขนาดใหญ่เช่นนี้ส่งผลกระทบต่อทั้งการจัดเก็บ การถ่ายโอน การวิเคราะห์ และการตีความข้อมูลทางชีววิทยา เพื่อรองรับข้อมูลดิบเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ความต้องการทรัพยากรด้านการประมวลผลและโครงสร้างพื้นฐาน เช่น ซูเปอร์คอมพิวเตอร์และเครือข่ายความเร็วสูง ยังคงเป็นอุปสรรคสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด ซึ่งมักเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการอุบัติใหม่ของไวรัสสูง (Stephens et al., 2015; Goodwin et al., 2016) อีกประเด็นท้าทายคือความซับซ้อนของการวิเคราะห์ข้อมูล เนื่องจากชุดข้อมูลจาก NGS และ TGS ต้องผ่านขั้นตอนหลายกระบวนการ ได้แก่ การประเมินคุณภาพของข้อมูลดิบ การประกอบลำดับ (sequence assembly) และการระบุตำแหน่งบนจีโนม (genome annotation) โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนที่มีอยู่เดิม ในกรณีที่ทำการศึกษาสายพันธุ์ไวรัสใหม่ซึ่งยังไม่มีจีโนมอ้างอิง จำเป็นต้องใช้วิธีการ de novo assembly เพื่อสร้างลำดับจีโนมขึ้นใหม่โดยไม่อาศัยฐานข้อมูลจีโนม (genome database) นอกจากนี้ เครื่องมือทางชีวสารสนเทศอย่าง BLAST (basic local alignment search tool) มักถูกนำมาใช้ในการค้นหาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ genome database ที่มีอยู่ แต่ถึงแม้จะมีเครื่องมือดังกล่าวการวิเคราะห์ข้อมูลเมทาจีโนมของไวรัสยังคงเผชิญข้อจำกัด โดยเฉพาะในกรณีของไวรัสที่เพิ่งค้นพบหรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งอาจไม่มีตัวแทนใน genome database ทำให้การตีความข้อมูลยังคงเป็นเรื่องที่ซับซ้อนและท้าทายอย่างมาก (Mokili et al., 2012; Nooij et al., 2018)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเทคโนโลยี NGS

ยุค	เทคโนโลยี	หลักการ	ความยาว read	ความถูกต้องของเบส	ข้อดี	ข้อจำกัด
First-generation sequencing	Sanger sequencing	dideoxynucleotide chain termination, capillary electrophoresis	800–1,200 bp	>99.99%	ความแม่นยำสูง, เหมาะกับ targeted sequencing, ตรวจตำแหน่งกลายพันธุ์	throughput ต่ำ, ต้นทุนสูง, ใช้เวลา, ต้องใช้ primer เฉพาะ
Second-generation sequencing	Illumina	sequencing by synthesis (fluorescent reversible terminators)	100–300 bp	>99.5%	throughput สูง, ต้นทุนต่อเบสต่ำ, แม่นยำมาก	read สั้น, bias บาง motif, ประกอบจีโนมใหม่ยาก
	Roche 454	pyrosequencing (ตรวจจับแสงจาก PPi)	~400–700 bp	~99%	read ยาวกว่า Illumina, เหมาะกับ de novo assembly	error สูงใน homopolymer, เลิกผลิตแล้ว
	Ion Torrent	ตรวจจับการเปลี่ยนแปลง pH จากการปล่อยโปรตอน	~200–400 bp	~98–99%	ความเร็วสูง, ไม่ใช่เลเซอร์/กล้อง, ต้นทุนต่ำ	ปัญหา, accuracy ต่ำกว่า Illumina
Third-generation	SMRT, PacBio	ตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ fluorescent nucleotides	10–30 kb (HiFi CCS ~15–20 kb)	Raw ~85–90%, HiFi >99.9%	long read, ตรวจ methylation ได้, ไม่มี PCR bias	ค่าใช้จ่ายสูง, ต้องใช้ DNA ปริมาณมาก, throughput ต่ำกว่า Illumina
	Nanopore, Oxford Nanopore	ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าเมื่อ DNA/RNA ผ่าน nanopore	หลายหมื่นถึง >1 Mb	Raw ~90–95%, ปรับแก้ (consensus) >98–99%	read ยาวมาก, portable (MinION), ตรวจ modification และ RNA ได้โดยตรง	error สูงกว่า short-read, เกิด homopolymer bias, วิเคราะห์ข้อมูลซับซ้อน

เอกสารอ้างอิง

- Antal, P., Arany, Á., Bolgár, B., Gézsi, A., Hajós, G., Hullám, G., ...and Sárközy, P. (2014). Introduction In Bioinformatics. Typotex Kiadó, Budapest, Hungary. pp. 1–28.
- Ardui, S., Ameur, A., Vermeesch, J. R. and Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: Applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res.*, 46(5), 2159–2168. doi:10.1093/nar/gky066
- Deamer, D., Akeson, M. and Branton, D. (2016). Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 34(5), 518–524. doi:10.1038/nbt.3423
- Goodwin, S., McPherson, J. D. and McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.*, 17(6), 333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49
- Heather, J. M. and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genome Biol.*, 17, 1–8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B. and Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Nat. Biotechnol.*, 34(7), 695–696. doi: 10.1186/s13059-016-1103-0
- Kohn, A. B., Moroz, T. P., Barnes, J. P., Netherton, M. and Moroz, L. L. (2013). Single-cell semiconductor sequencing. *Methods Mol. Biol.*, 1048, 247–284. doi:10.1007/978-1-62703-556-9_18
- Liu, Y., Wang, L. and Yu, L. (2015). The principle and application of the single-molecule real-time sequencing technology. *Yi Chuan*, 37(3), 259–268. doi:10.16288/j.ycz.14-323
- Logsdon, G. A., Vollger, M. R. and Eichler, E. E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat. Rev. Genet.*, 21(10), 597–614. doi:10.1038/s41576-020-0236-x
- Mardis, E. R. (2017). Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 10, 387–407. doi:10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- Masoudi-Nejad, A., Narimani, Z. and Hosseinkhan, N. (2013). Emergence of next-generation sequencing. In Next generation sequencing and sequence assembly: Methodologies and algorithms. Springer, New York, NY, USA. pp. 11–38.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, 11, 31–46. doi:10.1038/nrg2626
- Mokili, J. L., Rohwer, F. and Dutilh, B. E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr. Opin. Virol.*, 2(1), 63–77. doi:10.1016/j.coviro.2011.12.004
- Nooij, S., Schmitz, D., Vennema, H., Kroneman, A. and Koopmans, M. P. (2018). Overview of virus metagenomic classification methods and their biological applications. *Front. Microbiol.*, 9, 1–21. doi:10.3389/fmicb.2018.00749
- Rang, F. J., Kloosterman, W. P. and de Ridder, J. (2018). From squiggle to basepair: Computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol.*, 19, 1–11. doi:10.1186/s13059-018-1462-9
- Slatko, B. E., Gardner, A. F. and Ausubel, F. M. (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 122(1), 1–15. doi:10.1002/cpmb.59
- Stephens, Z. D., Lee, S. Y., Faghri, F., Campbell, R. H., Zhai, C., Efron, M. J., ...and Robinson, G. E. (2015). Big data: Astronomical or genomic? *PLoS Biol.*, 13(7), 1–11. doi:10.1371/journal.pbio.1002195
- Vogel, U., Szczepanowski, R., Claus, H., Jünemann, S., Prior, K. and Harmsen, D. (2012). Ion Torrent Personal Genome Machine sequencing for genomic typing of *Neisseria meningitidis* for rapid determination of multiple layers of typing information. *J. Clin. Microbiol.*, 50(6), 1889–1894. doi:10.1128/JCM.00038-12
- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. and Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Brief. Bioinform.*, 22(2), 1–12. doi:10.1038/s41587-021-01108-x
- Xiao, T. and Zhou, W. (2020). The third generation sequencing: The advanced approach to genetic diseases. *Transl. Pediatr.*, 9(2), 163–173. doi:10.21037/tp.2020.03.06

บทที่ 3

การตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของไวรัส ด้วยเทคโนโลยี Nanopore sequencing

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเป็นเครื่องมือสำคัญในงานตรวจวินิจฉัยและเฝ้าระวังโรค เนื่องจากช่วยให้สามารถระบุชนิดและสายพันธุ์ของไวรัสได้อย่างแม่นยำ รวมถึงตรวจจับการกลายพันธุ์ที่อาจมีผลต่อความรุนแรงของโรค ประสิทธิภาพของวัคซีนหรือการดื้อยา อีกทั้งยังสามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งมีความสำคัญต่อความเข้าใจความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัส โดยเฉพาะไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA ที่มักมีการกลายพันธุ์สูง นอกจากนี้ลำดับพันธุกรรมที่ได้จากหลายพื้นที่และหลายช่วงเวลายังสามารถถูกนำมาใช้สร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของเชื้อในระดับประชากร ตลอดจนมีบทบาทในการค้นพบเชื้อก่อโรคใหม่ผ่านวิธี metagenomic sequencing ด้วยเทคนิค NGS และ TGS จึงทำให้การหาลำดับสารพันธุกรรมกลายเป็นองค์ประกอบสำคัญในการรับมือกับโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (Morelli et al., 2011; Kafetzopoulou et al., 2019; Markov et al., 2023) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี sequencing ต่างๆ ตามที่ได้กล่าวแล้วในบทที่ 2 เช่น Sanger sequencing และ Illumina sequencing เป็นต้น พบว่าเทคโนโลยี Nanopore sequencing มีข้อได้เปรียบหลายประการกว่าวิธีอื่น ๆ โดยสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวต่อเนื่อง (long reads) ได้ จึงเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่ซับซ้อนและการตรวจจับการกลายพันธุ์ที่อยู่ห่างกันในโมเลกุลเดียว อีกทั้งยังมีคุณสมบัติการถอดรหัสพันธุกรรมแบบ real-time ทำให้ผู้ใช้สามารถติดตามผลลัพธ์ได้ทันทีโดยไม่ต้องรอให้การรันเสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ เครื่องมือบางรุ่น เช่น MinION จะมีขนาดเล็ก

สามารถใช้งานภาคสนามได้ ซึ่งแตกต่างจาก PacBio และ Illumina sequencing ที่มีขนาดใหญ่ และต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมสูง แม้ว่าความแม่นยำของ Nanopore sequencing ยังต่ำกว่าเทคโนโลยี short-read sequencing แต่การพัฒนาทางเคมีและอัลกอริทึมในการประมวลผลสัญญาณได้ลดข้อจำกัดนี้ลงอย่างต่อเนื่อง (Deamer et al., 2016; Loose et al., 2016; Leggett and Clark, 2017)

ด้วยคุณลักษณะดังกล่าว Nanopore sequencing จึงถูกยอมรับว่าเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพสูงสำหรับการเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ โดยเฉพาะในสถานการณ์ที่ต้องการผลการวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว เทคโนโลยีนี้สามารถประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัดหรือภาคสนามเพื่อเฝ้าระวังเชื้อโรคในสัตว์และมนุษย์ อีกทั้งยังเหมาะกับการค้นพบไวรัสที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนผ่านการวิเคราะห์เชิง metagenomics ความยืดหยุ่นในการประยุกต์ใช้ตั้งแต่การตรวจตัวอย่างจำนวนน้อยไปจนถึงการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในการเฝ้าระวังระดับประเทศ ทำให้ Nanopore sequencing เป็นเทคโนโลยีที่ตอบโจทย์ทั้งงานวิจัย การชันสูตรโรค ตลอดจนระบบสาธารณสุขระหว่างประเทศ ยิ่งไปกว่านั้น การพัฒนาเครื่องมือ bioinformatics เพื่อเพิ่มความถูกต้องในการวิเคราะห์ยังช่วยยกระดับศักยภาพของเทคโนโลยีนี้ให้เหมาะสมกับใช้งานในการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว (Lu et al., 2016; Quick et al., 2016)

หลักการของ Nanopore sequencing

เทคโนโลยี Nanopore sequencing ซึ่งพัฒนาโดยบริษัท Oxford Nanopore technologies (ONT) จัดเป็นเทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถวิเคราะห์สารพันธุกรรมทั้ง DNA และ RNA ได้ในลักษณะสายยาวต่อเนื่อง (long-read sequencing) โดยอาศัยโปรตีนที่มีรูตรงกลางระดับนาโน (nanopore) ฝังอยู่บนแผ่นโพลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นฉนวนไฟฟ้า เมื่อตั้งค่าความต่างศักย์คงที่ กระแสไอออนจะเคลื่อนผ่าน nanopore จากขั้วลบไปยังขั้วบวก ในกระบวนการนี้ DNA สายคู่ จะถูกแยกเป็น DNA สายเดี่ยว ด้วย motor protein ซึ่งทำหน้าที่เป็น helicase จากนั้น ssDNA จะเคลื่อนผ่าน nanopore โดยนิวคลีโอไทด์แต่ละเบส (A, G, C, T) จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไอออนในลักษณะเฉพาะ การเปลี่ยนแปลงของกระแสนี้สามารถตรวจวัดและประมวลผลด้วยอัลกอริทึมคอมพิวเตอร์ ข้อมูลสัญญาณถูกบันทึกในรูปแบบไฟล์ Fast5 หรือ POD5 และสามารถถอดรหัสเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ (Meyer et al., 2025) (ภาพที่ 10)

หลักการทำงานของ Nanopore sequencing อาศัยเคมีไฟฟ้าและฟิสิกส์เชิงโมเลกุล โดยใช้หลักการอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เพื่อนำสาย DNA หรือ RNA ผ่าน nanopore ที่ฝังอยู่ในเมมเบรนซึ่งมีความต้านทานไฟฟ้า เมื่อสายโมเลกุลเคลื่อนผ่าน pore โมเลกุลของนิวคลีโอไทด์เบสจะขัดขวางการไหลของไอออนชั่วคราว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่มีความจำเพาะต่อชนิดของนิวคลีโอไทด์เบสแต่ละตัว การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณนี้เป็นข้อมูลหลักที่ใช้ในการอนุมานลำดับนิวคลีโอไทด์ ความแม่นยำขึ้นอยู่กับขนาดและคุณสมบัติของ pore รวมถึงความเข้มข้นของอิเล็กโตรไลต์รอบ ๆ pore ซึ่งความผันผวนทางฟิสิกส์และเคมีรอบ pore อาจทำให้เกิดสัญญาณรบกวนและส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของ basecalling ดังนั้นการออกแบบ nanopore และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมีความสำคัญสูงต่อการสร้างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อถือได้ (Wanunu, 2012; Deamer et al., 2016)

ชนิดของ pore ที่ใช้ในเทคโนโลยี Nanopore sequencing มี 2 แบบ คือ

1. pore protein

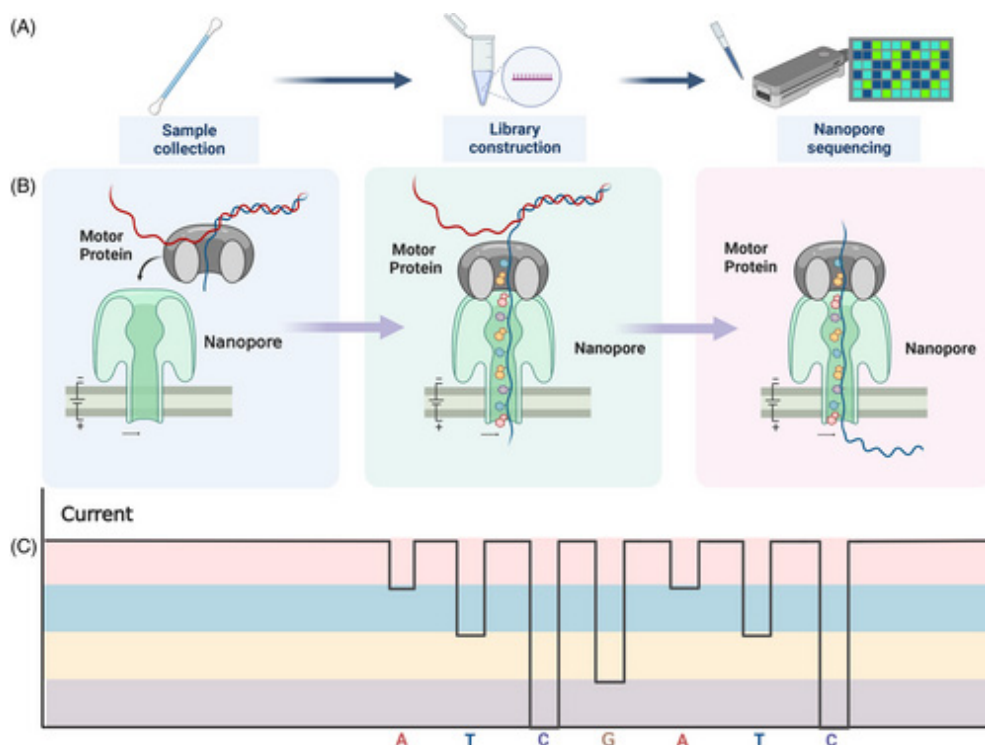
ในช่วงแรกของการพัฒนา Nanopore sequencing ใช้ pore โปรตีนทางชีวภาพ เช่น α -hemolysin (aHL) ซึ่งฝังในเยื่อหุ้มเซลล์และมีรูปร่างคล้ายเห็ดกลวง มีจุดภายในสามตำแหน่งที่ช่วยให้แยกเบสได้ ต่อมาได้พัฒนา

Mycobacterium smegmatis porin A (MspA) ซึ่งให้ความแม่นยำสูงกว่า แต่แกนกลางของ pore ซึ่งมีการดัดแปรที่มียาประจุลบสามตัวอาจรบกวนการเคลื่อนที่ของ DNA และทำให้เกิดสัญญาณรบกวน การปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นแอสพาราจีนที่ไม่มีประจุช่วยให้สภาพแวดล้อมทางไฟฟ้าเสถียรขึ้น ทำให้การตรวจจับสัญญาณกระแสไอออนแม่นยำขึ้นหลายเท่า (Clarke et al., 2009; Deamer et al., 2016)

2. solid nanopore

solid nanopore ผลิตจากวัสดุอินทรีย์ เช่น ซิลิคอนไนไตรด์ กราฟีน หรือโลหะผสม ใช้หลักการ tunneling current ของกลศาสตร์ควอนตัมในการตรวจจับนิวคลีโอไทด์ โมเลกุลของ DNA หรือ RNA ที่เคลื่อนผ่าน solid nanopore จะทำให้กระแสเทอร์เนลลิงเปลี่ยนแปลงในลักษณะเฉพาะ ซึ่งสามารถระบุนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวได้ solid nanopore มีความทนทานและเสถียรกว่า pore protein แต่ต้องอาศัยเทคนิคการตรวจวัดที่ซับซ้อน เช่น scanning probe microscope (Heerema and Dekker, 2016)

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของ pore ทั้ง pore protein และ solid nanopore พบว่า pore protein อาจไวต่อปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและค่า pH ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนในแต่ละ lot การผลิต ในขณะที่ solid nanopore มีความเสถียรและทนทานกว่า จึงเหมาะกับการใช้งานในสภาวะที่ต้องการความคงที่สูงและงานที่ต้องการความทนทานต่อการใช้งานซ้ำหลายครั้ง (Heerema and Dekker, 2016) สำหรับกระบวนการตรวจจับสัญญาณไฟฟ้าจะถูกแปลงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ (basecalling) ผ่านอัลกอริธึมประมวลผลทั้งแบบ classical เช่น hidden Markov model และแบบเทคนิคการเรียนรู้เชิงลึก (deep learning) โดย basecaller รุ่นใหม่ เช่น Guppy และ Bonito ให้ความแม่นยำและความเร็วของการถอดรหัสสูงขึ้นอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเทคโนโลยีอื่น จึงทำให้ Nanopore sequencing มีความโดดเด่นด้านความเร็วและการอ่าน long reads ที่ช่วยลดความซับซ้อนในการประกอบจีโนมและช่วยในการตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจีโนม (structural variants) แม้ความแม่นยำยังต่ำกว่า Illumina แต่การปรับปรุงทั้งเคมีของ pore และซอฟต์แวร์ทำให้ consensus sequence มีความแม่นยำเพียงพอสำหรับงานตรวจวินิจฉัยโรคและระบาดวิทยา (Jain et al., 2016; Tyler et al., 2018; Wick et al., 2019)



ภาพที่ 10 กระบวนการของ Nanopore sequencing (Zheng et al., 2023)

การเตรียมไลบรารี (library preparation) สำหรับ Nanopore sequencing

การเตรียมไลบรารีเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการ Nanopore sequencing เนื่องจากการกำหนดความเหมาะสมของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และความแม่นยำในการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับไวรัสประเภทต่าง ๆ ซึ่งสามารถเตรียมได้หลายรูปแบบ เช่น DNA sequencing, cDNA sequencing และ direct RNA sequencing กรณีของไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA การเตรียมไลบรารีมักเริ่มจากการแยก DNA ของไวรัสและตัดให้ได้สาย DNA ขนาดเหมาะสม ต่อมาจะทำการต่อ adapter ที่ช่วยให้โมเลกุลของสายลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถเข้าสู่ nanopore ได้ สำหรับไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA การเตรียมไลบรารีสามารถทำได้สองวิธี คือ วิธี cDNA sequencing ซึ่งจำเป็นต้องสร้างสาย cDNA จากสาย RNA ก่อน sequencing และอีกวิธีคือ วิธี direct RNA sequencing ที่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA สายเดียวโดยตรงโดยไม่ต้องสร้าง cDNA ซึ่งวิธี direct RNA sequencing นี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาการดัดแปลงหลังการถอดรหัส (post-transcriptional modifications) และรูปแบบพื้นฐานของ RNA (Jain et al., 2016) การเลือกวิธีเตรียมไลบรารีที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับชนิดของสารพันธุกรรมของไวรัสและวัตถุประสงค์ของการศึกษา สำหรับไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด dsDNA นั้นสามารถใช้การเตรียมไลบรารี DNA แบบมาตรฐานเพียงพอ แต่สำหรับไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA การสร้าง cDNA ก่อน sequencing จะช่วยเพิ่มความเสถียรของโมเลกุลของสายลำดับนิวคลีโอไทด์และลดความผิดพลาดจากการสลายตัวของ RNA ในขณะที่ direct RNA sequencing จะเหมาะกับงานที่ต้องการศึกษา RNA transcriptome หรือการตรวจจับการดัดแปลงของเบสโดยตรง (Depledge et al., 2019) ในงานวิจัยเชิงระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังโรค มักใช้ barcode และ multiplex sequencing เพื่อประหยัดเวลาและทรัพยากร โดยการติด barcode เฉพาะบนไลบรารีแต่ละตัวอย่าง ทำให้สามารถผสมตัวอย่างหลายตัวอย่างเข้าด้วยกันในรันเดียว (multiplexing) และแยกข้อมูลกลับตาม barcode หลังการ sequencing วิธีนี้ช่วยเพิ่มความคุ้มค่าและประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หลายตัวอย่างพร้อมกัน ลดค่าใช้จ่าย และช่วยให้สามารถติดตามการแพร่ระบาดของไวรัสในหลายพื้นที่หรือหลายช่วงเวลาได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม การเลือกจำนวนตัวอย่างในการทำ multiplex ควรพิจารณาความลึกของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing depth) เพื่อให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพียงพอในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสแต่ละตัวอย่างอย่างแม่นยำ (Quick et al., 2016)

ตารางที่ 4 ประเภทของการเตรียมไลบรารีสำหรับ Nanopore sequencing (ONT, 2025a)

ประเภทไลบรารี	วิธีเตรียมไลบรารี	ชนิดไวรัสที่เหมาะสม	ข้อดี	ข้อจำกัด	การประยุกต์ใช้งาน	ตัวอย่าง ชุดน้ำยาจาก ONT
DNA sequencing	แยก DNA และตัดเป็นสายสั้นและต่อ adapter	dsDNA virus	ง่ายและไม่ซับซ้อน สามารถอ่าน long reads	ใช้ไม่ได้กับ RNA virus จะต้องสร้างเป็น cDNA ก่อน	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA virus, การประกอบจีโนม	SQK-DNA001 / SQK-DNA002
cDNA sequencing	เปลี่ยน RNA เป็น cDNA ก่อนต่อ adapter	RNA virus	เพิ่มความเสถียรของโมเลกุลและลดการสลายตัวของ RNA	ไม่สามารถตรวจจับการดัดแปลง RNA ได้	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA virus, ศึกษา expression	SQK-PCS109 / SQK-PCS111
direct RNA sequencing	ต่อ RNA สายเดียวเข้ากับ adapter โดยตรง	RNA virus	ตรวจสอบ RNA transcriptome และ post-transcriptional modification ได้	RNA สลายง่าย ความแม่นยำต่ำกว่า cDNA sequencing	การศึกษา RNA virus, ศึกษา transcriptome การวิเคราะห์การดัดแปลง RNA	SQK-RNA002
multiplex sequencing with barcode	ติด barcode ที่ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างแล้ว ผสมหลายตัวอย่างในรันเดียว	DNA / RNA virus หลายตัวอย่าง	ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย วิเคราะห์หลายตัวอย่างพร้อมกัน	ต้องควบคุม sequencing depth ให้เพียงพอ	งานระบาดวิทยา, การเฝ้าระวังไวรัสหลายพื้นที่	EXP-NBD104 / EXP-NBD114

กระบวนการทำงานสำคัญของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี Nanopore

การหาลำดับสารนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี Nanopore เป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนมีความสำคัญต่อความแม่นยำและคุณภาพของข้อมูล ได้แก่

1. การเตรียมไลบรารี (library preparation)

หลังจากได้ DNA หรือ RNA ที่บริสุทธิ์จากตัวอย่าง สิ่งสำคัญต่อไปคือการ เตรียมไลบรารี โดยการเชื่อมต่อ sequence adapters เฉพาะเจาะจงเข้ากับปลายของโมเลกุล DNA หรือ RNA โดย adapters เหล่านี้จะช่วยให้โมเลกุลของสายนิวคลีโอไทด์สามารถจับกับ motor protein ซึ่งเป็นโปรตีนเอนไซม์ที่ขับเคลื่อนโมเลกุลของสายนิวคลีโอไทด์ผ่าน nanopore ได้อย่างสม่ำเสมอและควบคุมความเร็ว นอกจากนี้ การเตรียมไลบรารียังรวมถึงการติด barcode หากต้องการทำ multiplex sequencing ซึ่งช่วยให้สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหลายตัวอย่างพร้อมกันในรันเดียว (Jain et al., 2016; ONT, 2025b)

2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

กระบวนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุล DNA หรือ RNA เคลื่อนผ่าน nanopore ภายใต้การควบคุมของ motor protein โปรตีนเอนไซม์นี้ควบคุมความเร็วในการผ่านของนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวผ่าน pore เพื่อให้แต่ละนิวคลีโอไทด์อยู่ในพื้นที่ที่ตรวจจับของ pore ในเวลาที่เหมาะสมที่สุด การไหลของโมเลกุลของสายนิวคลีโอไทด์ผ่าน pore จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไอออนที่เป็นเอกลักษณ์ตามลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว โดย flow cell ของ Nanopore sequencing ประกอบด้วย 2,048 nanopore แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 512 pore แต่ละ pore สามารถตรวจจับโมเลกุลที่ผ่านได้พร้อมกัน การต่อ adapter เข้ากับปลายสาย DNA หรือ RNA ทำให้โมเลกุลของสายนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ pore ได้อย่างเหมาะสมและสามารถตรวจจับสัญญาณได้ครบถ้วน (Meyer et al., 2025) เมื่อโมเลกุลของสายนิวคลีโอไทด์ผ่าน pore ครบทั้งสาย โปรตีนมอเตอร์จะหลุดออก ทำให้ pore พร้อมสำหรับโมเลกุลของสายนิวคลีโอไทด์ถัดไป กระบวนการนี้ทำให้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างต่อเนื่องและแม่นยำ

3. การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล (data acquisition and analysis)

สัญญาณไฟฟ้าที่ได้จากการผ่าน pore จะถูกตรวจจับโดยวงจรรวม (ASIC) ภายในอุปกรณ์ และส่งต่อไปยังซอฟต์แวร์ เช่น MinKNOW เพื่อประมวลผลสัญญาณไฟฟ้าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ (basecalling) กระบวนการนี้เปลี่ยนข้อมูลไฟฟ้าในรูป Fast 5 หรือ POD5 ให้เป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ในรูป Fastq ซึ่งสามารถนำไปสร้างไฟล์ FASTA และนำไปวิเคราะห์ชีวสารสนเทศต่อไปได้ เช่น การประกอบจีโนม การวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัส หรือการศึกษาความหลากหลายของไวรัสในงานเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ (Clarke et al., 2009; Jain et al., 2016)

เครื่องมือและแพลตฟอร์ม Nanopore sequencing

Nanopore sequencing มีการพัฒนาแพลตฟอร์มและเครื่องมือหลายรุ่นที่ตอบสนองต่อวัตถุประสงค์การใช้งานที่แตกต่างกัน ตั้งแต่การวิเคราะห์ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยไปจนถึงการทำ sequencing แบบ high-throughput โดยมีรูปแบบของเครื่องมือหลักหลายแพลตฟอร์ม ดังนี้ MinION, Flongle, GridION และ PromethION (ภาพที่ 11) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. MinION เป็นอุปกรณ์ขนาดเล็ก น้ำหนักเบา สามารถต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์พกพา เหมาะสำหรับงานภาคสนามและการศึกษาที่ต้องการความยืดหยุ่นสูง มี throughput ปานกลางและสามารถทำ sequencing แบบ long-read ได้เหมาะสมกับการตรวจหาไวรัสหรือจีโนมขนาดเล็ก

2. Flongle เป็นรุ่นย่อยของ MinION ออกแบบมาเพื่อรันตัวอย่างขนาดเล็กหรือ single-use sequencing chip ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาสำหรับตัวอย่างจำนวนน้อย

3. GridION เป็นแพลตฟอร์มขนาดกลาง รองรับการรันพร้อมกันได้สูงสุด 5 flow cell และสามารถประมวลผลแบบ real-time เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการ throughput มากขึ้น

4. PromethION เป็นแพลตฟอร์ม high-throughput ที่รองรับ flow cell จำนวนมากพร้อมกัน เหมาะสำหรับ การทำ sequencing ของจีโนมขนาดใหญ่หรือการเฝ้าระวังไวรัสในระดับประชากร โดย throughput สูงสุดสามารถเกิน 100 Gb ต่อ flow cell ต่อวัน

ความแตกต่างหลักระหว่างแพลตฟอร์มเหล่านี้อยู่ที่ throughput, ความยืดหยุ่น และความสะดวกในการใช้งาน ภาคสนาม นอกจากนี้ Nanopore sequencing ยังมีความก้าวหน้าในการพัฒนา flow cell และ nanopore chemistry อย่างต่อเนื่อง เช่น การปรับปรุงจำนวน pore ต่อ flow cell, การพัฒนา nanopore protein ให้เสถียรขึ้น, และการปรับปรุง motor protein และ buffer system เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความทนทานของสัญญาณกระแสไอออน ทำให้ปัจจุบันสามารถถอดรหัสลำดับสารพันธุกรรมได้รวดเร็วและเชื่อถือได้มากขึ้น (Jain et al., 2016; ONT, 2025c)



ภาพที่ 11 แพลตฟอร์มต่าง ๆ ของ Nanopore sequencing (Hall et al., 2020)

ตารางที่ 5 รูปแบบเครื่องมือและแพลตฟอร์ม Nanopore sequencing (ONT, 2025c)

เครื่องมือ/ แพลตฟอร์ม	throughput	ความ ยืดหยุ่น	การใช้งานเชิงภาคสนาม	จุดเด่น	ข้อจำกัด
MinION	ปานกลาง (~10–20 Gb/วัน)	สูง	เหมาะสำหรับภาคสนาม พกพาง่าย	ขนาดเล็ก น้ำหนักเบา เชื่อมต่อกับ คอมพิวเตอร์พกพาได้	throughput จำกัดสำหรับ โครงการขนาดใหญ่
Flongle	ต่ำ (~1–2 Gb/วัน)	สูง	เหมาะสำหรับตัวอย่าง จำนวนน้อย	ใช้ single-use flow cell ลดค่าใช้จ่าย ประหยัดเวลา	ไม่เหมาะสำหรับงาน high-throughput
GridION	ปานกลาง-สูง (~50–60 Gb/วัน, 5 flow cell)	ปานกลาง	ใช้ในห้องปฏิบัติการ เหมาะสำหรับงาน semi-high-throughput	รันพร้อมกันได้หลาย flow cell ประมวลผล real-time	ขนาดใหญ่ ไม่สะดวกพกพา
PromethION	สูงมาก (>100 Gb/flow cell/วัน)	ต่ำ- ปานกลาง	เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการ ระดับ high-throughput	Throughput สูง เหมาะสำหรับจีโนม ขนาดใหญ่และการเฝ้าระวังประชากร	ขนาดใหญ่ ค่าอุปกรณ์สูง ใช้พื้นที่มาก

ชีวสารสนเทศศาสตร์สำหรับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี Nanopore

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เป็นศาสตร์สหวิทยาการที่ผสมผสานชีววิทยา วิทยาการคอมพิวเตอร์ คณิตศาสตร์ และสถิติ เพื่อจัดเก็บ วิเคราะห์ และตีความข้อมูลทางชีววิทยาที่มีความซับซ้อนและมีปริมาณมาก เช่น ข้อมูลจีโนม ข้อมูลการแสดงออกของยีน (gene expression) และโครงสร้างโปรตีน เป็นต้น การประยุกต์ใช้งานครอบคลุมการหาลำดับสารพันธุกรรม และโปรตีน การกำหนดฟังก์ชันของยีน การทำ genome annotation การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับโรค รวมถึงการสร้างแบบจำลองเชิงทฤษฎีเพื่อการทำนายทางชีววิทยา (Makowski and Shabardina, 2020)

การประมวลผลข้อมูลเบื้องต้นสำหรับเทคโนโลยี Nanopore

การประมวลผลข้อมูลเบื้องต้น (initial data processing) เป็นขั้นตอนสำคัญที่มุ่งเน้นการเปลี่ยนสัญญาณข้อมูลดิบ (raw data) ที่ได้จากเครื่องให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ต่อได้ โดยครอบคลุมทั้งการจัดการกับชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดใหญ่และการแก้ปัญหาด้านความถูกต้องของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ กระบวนการหลักที่เกี่ยวข้องคือ basecalling ซึ่งเป็นการแปลงสัญญาณทางกายภาพที่บันทึกได้จากเครื่องวิเคราะห์ที่เป็นสัญญาณกระแสไฟฟ้าให้กลายเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ (A, T, C, G) ความถูกต้องของ basecalling เป็นปัจจัยที่กำหนดคุณภาพของข้อมูล โดยทั่วไปจะประเมินด้วยค่าคุณภาพ (quality score หรือ phred score, Q) ซึ่งสะท้อนความน่าจะเป็นที่เบสจะถูกระบุผิด เช่น Q30 หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เกิดความผิดพลาดเพียง 1 ใน 1,000 หรือความแม่นยำ 99.9% (Ewing and Green, 1998) สำหรับเทคโนโลยี Nanopore ข้อมูลดิบจะอยู่ในรูปคลื่นกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงตามชนิดของนิวคลีโอไทด์เบสที่ผ่าน Nanopore โดยใช้โปรแกรม basecaller เช่น Guppy หรือ Dorado ซึ่งจะใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์และ deep learning ในการตีความคลื่นสัญญาณเพื่อเพิ่มความแม่นยำและลดอัตราความผิดพลาด (error rate) (Wick et al., 2019; Zhang et al., 2023) ซึ่งช่วยให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพสูงขึ้นและเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศในขั้นถัดไป

การเตรียมข้อมูลเพื่อให้เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ผลทางชีวสารสนเทศศาสตร์

การเตรียมข้อมูลก่อนการวิเคราะห์ผลทางชีวสารสนเทศศาสตร์เป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีคุณภาพและเชื่อถือได้ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ เช่น mapping, assembly ตลอดจนการตรวจหาสายพันธุ์ ให้มีความแม่นยำและเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้น โดยประกอบด้วยกระบวนการหลักดังนี้

1. Demultiplex

เป็นกระบวนการแยกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของหลายตัวอย่างที่อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมกันในรอบเดียว (multiplexing) ออกเป็นชุดข้อมูลย่อยของแต่ละตัวอย่าง โดยอาศัยบาร์โค้ด (barcode) หรือ Index ที่ติดมากับไลบรารีเครื่องมือที่นิยมใช้ในข้อมูล Nanopore ได้แก่ qcat และ Porechop รวมถึง AdapterRemoval ซึ่งรองรับหลายแพลตฟอร์ม (Lindgreen, 2012)

2. Quality filtering

เป็นกระบวนการกรองข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพต่ำออก โดยอาศัยเกณฑ์จากค่า Q score หรือความยาวของ sequence read เพื่อคงไว้เฉพาะข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความน่าเชื่อถือ เครื่องมือที่นิยมใช้ ได้แก่ NanoFilt, PRINSEQ และ FASTX-Toolkit (Schmieder and Edwards, 2011; De Coster et al., 2018)

3. Adapter trimming

เป็นกระบวนการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วน adapter จากขั้นตอนการเตรียมไลบรารีออกจาก sequence read เพื่อป้องกันการกระทบต่อการประกอบ mapping หรือ assembly เครื่องมือที่นิยมใช้สำหรับ Nanopore ได้แก่ Cutadapt (Martin, 2011), Skewer (Jiang et al., 2014) และ Porechop (Lindgreen, 2012)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการประยุกต์ใช้งานสำหรับเทคโนโลยี Nanopore

1. การเทียบข้อมูลกับจีโนมอ้างอิง (mapping to reference genome)

การเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับ Nanopore เป็นการจัดเรียงสายนิวคลีโอไทด์ของ sequence read เข้ากับจีโนมอ้างอิงของไวรัสที่ทราบแล้ว เพื่อตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรม เช่น การกลายพันธุ์และการระบุสายพันธุ์ เครื่องมือที่นิยมใช้คือ Minimap2 ซึ่งรองรับ long-reads ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Li, 2018) วิธีนี้เหมาะสำหรับไวรัสที่มีจีโนมอ้างอิงอยู่แล้ว เช่น SARS-CoV-2 หรือ Influenza virus

2. การประกอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (De Novo assembly)

สำหรับไวรัสชนิดใหม่หรือไวรัสที่ไม่มี reference genome จำเป็นต้องประกอบ sequence reads จาก Nanopore sequencing ด้วยอัลกอริทึม overlap layout consensus (OLC) เพื่อสร้าง contig/scaffold เครื่องมือที่นิยมใช้สำหรับ Nanopore sequencing ได้แก่ Canu, Miniasm, Flye, VICUNA (Koren et al., 2017) การประกอบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบนี้ช่วยให้ได้จีโนมทั้งหมด (whole genome) ของไวรัสใหม่และสามารถนำไปวิเคราะห์ downstream ต่อไปได้

3. การจำแนกไวรัสและสายพันธุ์ (virus identification and lineage typing)

การจำแนกไวรัสและสายพันธุ์ สามารถใช้ BLAST เปรียบเทียบกับ genome database เช่น GenBank (Altschul et al., 1990) หรือใช้เครื่องมือ kraken2 และ centrifuge สำหรับการจำแนกเชิงอนุกรมวิธานในงาน metagenomics (Wood and Salzberg, 2014; Kim et al., 2016) ส่วนการจำแนกสายพันธุ์ทำได้โดย multiple sequence alignment (MSA) เช่น MAFFT (Katoh and Standley, 2013) และสร้าง phylogenetic tree ด้วย RAxML หรือ Nextstrain (Stamatakis, 2014; Hadfield et al., 2018)

4. การวิเคราะห์การกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัส (mutation and genetic diversity analysis)

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์จาก Nanopore ใช้ variant calling เช่น SNP และ InDel โดยเครื่องมือที่รองรับ long-reads ได้แก่ Medaka และ Nanopolish สำหรับการติดตามการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ที่น่ากังวล (variants of concern (VOCs)) หรือการติดตามการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ที่น่าสนใจ (variants of interest (VOIs)) และใช้ Intra-host diversity scripts, Allele Frequency calculators ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ครอบคลุมทั้งความหลากหลายภายในโฮสต์ (intra-host diversity) และความหลากหลายระหว่างโฮสต์ (inter-host diversity) ซึ่งสำคัญต่อการทำความเข้าใจกระบวนการแพร่ระบาดและกลไกการดื้อยา (Hall et al. 2024)

ตารางที่ 6 รูปแบบการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเครื่องมือ bioinformatics สำหรับ Nanopore sequencing

รูปแบบการวิเคราะห์	หลักการ/วัตถุประสงค์	ตัวอย่างเครื่องมือ/ซอฟต์แวร์ (Nanopore)	การประยุกต์ใช้
mapping to reference genome	จัดเรียง sequence reads เข้ากับจีโนมอ้างอิง เพื่อตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรม	Minimap2, GraphMap	ตรวจสอบการกลายพันธุ์, ระบุสายพันธุ์, วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม
De Novo assembly	ประกอบ reads ทับซ้อนกันเป็น contig/scaffold โดยไม่ใช้ reference	Canu, Miniasm, Flye, VICUNA	ศึกษาไวรัสอุบัติใหม่หรือไวรัสที่ไม่มี reference genome
virus identification (taxonomic classification)	ระบุชนิดไวรัสจาก sequence reads โดยเปรียบเทียบกับ genome database	BLAST, kraken2, centrifuge	การจำแนกชนิดไวรัส, การวิเคราะห์ metagenomics
lineage typing / phylogenetic analysis	จัดเรียง sequences และสร้าง phylogenetic tree เพื่อระบุสายพันธุ์และวิวัฒนาการ	MAFFT, Clustal Omega, RAxML, Nextstrain, Pangolin	ติดตามการแพร่ระบาด, ระบุสายพันธุ์, วิเคราะห์วิวัฒนาการของไวรัส
variant calling	ตรวจหาการกลายพันธุ์ เช่น SNP, InDel	Medaka, Nanopolish, iVar	ระบุ variants of concern (VOCs) / variants of interest (VOIs), ติดตามการกลายพันธุ์
genetic diversity analysis	วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างโฮสต์	Intra-host diversity scripts, Allele Frequency calculators	ศึกษา Intra-host diversity (quasispecies), Inter-host diversity, พลวัตการแพร่ระบาด, กลไกการดื้อยา

ข้อจำกัดและความท้าทายของเทคโนโลยี Nanopore

เทคโนโลยี Nanopore ยังคงมีข้อจำกัดและความท้าทายหลายประการที่ควรพิจารณา ประเด็นหลักคือ ความแม่นยำของการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ แม้ว่าเทคโนโลยี basecaller ที่ใช้ deep learning เช่น Guppy หรือ Dorado จะช่วยลดอัตราความผิดพลาดได้บ้าง แต่ความผิดพลาดประเภท insertion และ deletion (indels) ยังคงสูงกว่าเทคโนโลยี short-read ในบางกรณี (Jain et al., 2016; Wick et al., 2019)

นอกจากนี้คุณภาพของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเทคนิคหลายด้าน เช่น คุณภาพตัวอย่างเริ่มต้นซึ่งรวมถึงความสมบูรณ์ของ DNA/RNA และเสถียรของ pore ระหว่างการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (Payne et al., 2019) นอกจากนี้ไฟล์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จาก Nanopore เป็นไฟล์ raw signal ที่ซับซ้อน ทำให้การประมวลผลและการวิเคราะห์ข้อมูลต้องอาศัยความชำนาญด้าน bioinformatics โดยเฉพาะในการจัดการ long-read data (De Coster et al., 2018) อีกหนึ่งข้อจำกัดคือ ความล่าช้าในการประมวลผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาดใหญ่ เนื่องจากไฟล์ long-read มีขนาดใหญ่และต้องใช้หน่วยความจำสูงในการ mapping, assembly หรือ variant calling จำเป็นต้องใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงและซอฟต์แวร์ที่เหมาะสม (Shafin et al., 2020) นอกจากนี้ความหลากหลายของ error profiles ในแต่ละ flow cell และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมขณะทดลอง เช่น อุณหภูมิหรือความชื้น อาจส่งผลต่อ reproducibility ของการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณหรือ comparative analysis ระหว่างตัวอย่างต้องระมัดระวัง (Wick et al., 2019)

ดังนั้น แม้ว่าเทคโนโลยี Nanopore จะมีข้อดีด้านความยืดหยุ่น ความสามารถในการอ่าน long-read และความสะดวกในการใช้งาน แต่การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลอย่างถูกต้องต้องอาศัยความเชี่ยวชาญด้าน bioinformatics และควรมี hardware ที่เหมาะสมและเพียงพอ รวมถึงการควบคุมคุณภาพของตัวอย่างที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือได้

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S. and Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.*, 4(4), 265–270. doi:10.1038/nnano.2009.12
- De Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M. and Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669. doi:10.1093/bioinformatics/bty149
- Deamer, D., Akeson, M. and Branton, D. (2016). Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 34(5), 518–524. doi:10.1038/nbt.3423
- Depledge, D. P., Wilson, A. C. and Simmonds, P. (2019). Direct RNA sequencing on nanopore arrays redefines the transcriptional complexity of a viral pathogen. *Nat. Commun.*, 10, 1–13. doi:10.1038/s41467-019-08734-9
- Ewing, B. and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, 8(3), 175–185. doi:10.1101/gr.8.3.175
- Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., ...and Neher, R. A. (2018). Nextstrain: Real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, 34(23), 4121–4123. doi:10.1093/bioinformatics/bty407
- Hall, C. L., Zascavage, R. R., Sedlazeck, F. J. and Planz, J. V. (2020). Potential applications of nanopore sequencing for forensic analysis. *Forensic Sci. Rev.*, 32(1), 23–54.
- Hall, M. B., Wick, R. R., Judd, L. M., Nguyen, A. N. T., Steinig, E. J., Xie, O., ...and Coin, L. J. M. (2024). Benchmarking reveals superiority of deep learning variant callers on bacterial nanopore sequence data. *eLife*, 13:RP98300, 1–23. doi:10.7554/eLife.98300
- Heerema, S. J. and Dekker, C. (2016). Graphene nanodevices for DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.*, 11(2), 127–136. doi:10.1038/nnano.2015.307
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B. and Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol.*, 17, 1–11. doi:10.1186/s13059-016-1103-0
- Jiang, H., Lei, R., Ding, S.-W. and Zhu, S. (2014). Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics*, 15, 1–12. doi:10.1186/1471-2105-15-182
- Kafetzopoulou, L. E., Pullan, S. T., Lemey, P., Suchard, M. A., Ehichioya, D. U., Pahlmann, M., ...and Durauffour, S. (2019). Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*, 363(6422), 74–77. doi:10.1126/science.aau9343
- Katoh, K. and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30(4), 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F. P. and Salzberg, S. L. (2016). Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res.*, 26(12), 1721–1729. doi:10.1101/gr.210641.116
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H. and Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.*, 27(5), 722–736. doi:10.1101/gr.215087.116
- Leggett, R. M. and Clark, M. D. (2017). A world of opportunities with nanopore sequencing. *J. Exp. Bot.*, 68(20), 5419–5429. doi:10.1093/jxb/erx289
- Li, H. (2018). Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094–3100. doi:10.1093/bioinformatics/bty191
- Lindgreen, S. (2012). AdapterRemoval: Easy cleaning of next-generation sequencing reads. *BMC Res. Notes*, 5, 337. doi:10.1186/1756-0500-5-337
- Loose, M., Malla, S. and Stout, M. (2016). Real-time selective sequencing using nanopore technology. *Nat. Methods*, 13(9), 751–754. doi:10.1038/nmeth.3930
- Lu, H., Giordano, F. and Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genom. Proteom. Bioinform.*, 14(5), 265–279. doi:10.1016/j.gpb.2016.05.004
- Makałowski, W. and Shabardina, V. (2020). Bioinformatics of nanopore sequencing. *J. Hum. Genet.*, 65(1), 61–67. doi:10.1038/s10038-019-0659-4
- Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M., Lythgoe, K., Simmonds, P., Stilianakis, N. I. and Katzourakis, A. (2023). The evolution of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.*, 21(4), 273–288. doi:10.1038/s41579-023-00878-2

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12. doi:10.14806/ej.17.1.200
- Meyer, D., Goettisch, W., Spannenberg, J., Stieber, B., Krautwurst, S., Hölzer, M., ...and Marz, M. (2025). Unlocking the full potential of nanopore sequencing: Tips, tricks, and advanced data analysis techniques. *bioRxiv*, 1–31. doi:10.1101/2023.12.06.570356
- Morelli, M. J., Wright, C. F., Knowles, N. J., Juleff, N., Paton, D. J., King, D. P., Haydon, D. T. and Pybus, O. G. (2011). Evolution of foot-and-mouth disease virus intra-sample sequence diversity during serial transmission in bovine hosts. *Vet. Res.*, 42(1), 1–15. doi:10.1186/1297-9716-44-12
- Oxford Nanopore Technologies (ONT). (2025a). Sequencing kits. [Online] Available: <https://store.nanoporetech.com/us/sequencing-kits.html>. Accessed August 1, 2025
- Oxford Nanopore Sequencing (ONT). (2025b). Microbe Notes. [Online] Available: <https://microbenotes.com/oxford-nanopore-sequencing/>. Accessed August 1, 2025
- Oxford Nanopore Sequencing (ONT). (2025c). Store. [Online] Available: <https://store.nanoporetech.com/us/>. Accessed August 1, 2025
- Payne, A., Holmes, N., Rakyen, V. and Loose, M. (2019). BulkVis: A graphical viewer for Oxford Nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics*, 35(13), 2193–2198. doi:10.1093/bioinformatics/bty841
- Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., Cowley, L., Bore, J. A., ...and Carroll, M. W. (2016). Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 530(7589), 228–232. doi:10.1038/nature16996
- Schmieder, R. and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- Shafin, K., Pesout, T., Lorig-Roach, R., Haukness, M., Olsen, H. E., Bosworth, C., ...and Paten, B. (2020). Nanopore sequencing and the Shasta toolkit enable efficient de novo assembly of eleven human genomes. *Nat. Biotechnol.*, 38, 1044–1053. doi:10.1038/s41587-020-0503-6
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
- Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Mulvey, M. R. and Corbett, C. R. (2018). Evaluation of Oxford Nanopore’s MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications. *Sci. Rep.*, 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-29334-5
- Wanunu, M. (2012). Nanopores: A journey towards DNA sequencing. *Phys. Life Rev.*, 9(2), 125–158. doi:10.1016/j.plrev.2012.05.010
- Wick, R. R., Judd, L. M. and Holt, K. E. (2019). Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.*, 20, 1–10. doi:10.1186/s13059-019-1727-y
- Wood, D. E. and Salzberg, S. L. (2014). Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.*, 15(3), 1–12. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46
- Zheng, P., Zhou, C., Ding, Y., Liu, B., Lu, L., Zhu, F. and Duan, S. (2023). Nanopore sequencing technology and its applications. *MedComm.*, 4(4), 1–34. doi:10.1002/mco2.316

บทที่ 4

เทคนิค

Sequence-Independent Single-Primer Amplification

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสมีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัยโรค การเฝ้าระวังเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่ และการศึกษาวิวัฒนาการของไวรัส โดยการหาจีโนมทั้งหมด (whole genome sequencing) สามารถระบุชนิดไวรัส ติดตามสายพันธุ์ และตรวจจับการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อความรุนแรงหรือการแพร่กระจายได้ อย่างไรก็ตามการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสโดยตรงจากตัวอย่างทางคลินิกหรือสิ่งแวดล้อมมักพบข้อจำกัดจากปริมาณไวรัสที่ต่ำและการปะปนของสารพันธุกรรมจากโฮสต์ เทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Nanopore sequencing แม้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้หลากหลายชนิด แต่ปัญหาสำคัญคือการมีสารพันธุกรรมของโฮสต์ในปริมาณสูงกว่าสารพันธุกรรมของไวรัส ดังนั้นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจพบไวรัส เทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA) ซึ่งสามารถประยุกต์ร่วมกับเทคโนโลยี Nanopore sequencing เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส

SISPA ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างไม่จำเพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์สุ่มที่มีส่วนปลาย (tagged random primer) เพื่อสร้างตำแหน่งจับไพรเมอร์ร่วมกัน (universal primer binding site) ในทุกโมเลกุลของสารพันธุกรรมในตัวอย่าง จากนั้นสามารถใช้เพียง tagged random primer เส้นเดียวในการเพิ่มปริมาณ ทำให้ได้ปริมาณ DNA เพียงพอสำหรับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเป้าหมาย (Reyes and Kim, 1991; Bahador et al., 2021) ความสามารถนี้ทำให้ SISPA มีความสำคัญอย่างมากในการศึกษาจีโนมไวรัสที่

ไม่เคยพบมาก่อนและการวิจัยเชิงเมตาจีโนมิกส์ (Djikeng et al., 2008) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา เทคโนโลยี Nanopore sequencing ได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากสามารถอ่านลำดับ DNA หรือ RNA ได้แบบเรียลไทม์ ให้ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาว (long-read sequencing) และมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ภาคสนามทำให้เหมาะสมต่อการตรวจหาไวรัสในสถานการณ์จริง เช่น การเฝ้าระวังโรคระบาดหรือการวิเคราะห์เชิงนิเวศวิทยาของไวรัส (Jain et al., 2016) การผสมผสาน SISPA เข้ากับ Nanopore sequencing จึงช่วยขยายศักยภาพของการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมไวรัส โดย SISPA ช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสน้อยหรือหลากหลายชนิดเชื้อ ขณะที่ Nanopore sequencing ช่วยให้ได้ข้อมูลเชิงลึกของจีโนมทั้งในด้านโครงสร้างและความหลากหลายเชิงพันธุกรรม การผสมผสานเทคนิคทั้งสองจึงเป็นแนวทางที่ทรงพลังในการค้นพบไวรัสใหม่ การเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ และการทำความเข้าใจการแพร่กระจายของไวรัสในระดับโมเลกุล

หลักการของเทคนิค SISPA

SISPA เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อรองรับการศึกษาจีโนมที่ไม่เคยพบหรือมีปริมาณน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการค้นพบไวรัสใหม่ (viral discovery), การหาลำดับจีโนมทั้งหมด (whole genome sequencing) และการวิเคราะห์เชิงเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics) หลักการสำคัญของ SISPA อยู่ที่การใช้ tagged random primer เพื่อทำให้ทุกโมเลกุลของ DNA ที่สกัดมามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นตำแหน่งจับร่วมกัน (universal primer binding site) ส่งผลให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่างได้โดยใช้เพียงไพรเมอร์เส้นเดียว (Reyes and Kim, 1991; Davood et al., 2021)

กระบวนการ SISPA ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก (ภาพที่ 12) ดังนี้

1. การสร้างสายกรดนิวคลีอิกเริ่มต้น (initial strand synthesis)

การสร้างสายกรดนิวคลีอิกเริ่มต้นเป็นขั้นตอนแรกของเทคนิค SISPA โดยหากเป็นตัวอย่าง RNA เช่น ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA จะต้องผ่านกระบวนการ reverse transcription (RT) เพื่อเปลี่ยน RNA ให้เป็นสาย cDNA ก่อนนำไปใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ (Djikeng et al., 2008; Davood et al., 2021) ส่วนกรณีที่เป็น DNA เช่น ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สามารถใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอน RT โดยในกระบวนการนี้จะใช้ tagged random primer ซึ่งประกอบด้วยสองส่วนหลัก คือ ส่วน random sequence (N-mer) เช่น N6, N8 หรือ N14 ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ซึ่งทำหน้าที่สุ่มจับกับตำแหน่งต่าง ๆ ของสาย template (random priming) และทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ใหม่ และส่วน defined tail sequence ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบล่วงหน้าและจะถูกผนวกรวมเข้ากับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ ทำให้โมเลกุล DNA ทั้งหมดมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันที่ปลาย ซึ่งจะเป็ตำแหน่งจับสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในขั้นตอนถัดไป (Reyes and Kim, 1991; Davood et al., 2021)

2. การสังเคราะห์ DNA สายคู่ (second-strand synthesis)

การสังเคราะห์ DNA สายคู่ เป็นขั้นตอนต่อจากการสร้างสายกรดนิวคลีอิกเริ่มต้น เพื่อเปลี่ยนสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากขั้นตอนแรกให้เป็น dsDNA ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในขั้นตอนถัดไป สายนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่จากการใช้ tagged random primer จะมี defined tail sequence ติดอยู่ที่ปลาย 5' ของสายที่สร้างขึ้น ทำให้สามารถใช้ tail นี้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ตรงข้ามเพื่อให้ได้ dsDNA กระบวนการนี้สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ Klenow fragment ซึ่งเป็น DNA polymerase I ที่ผ่านการย่อยด้วย subtilisin หรือ trypsin เพื่อตัดส่วน N-terminal ที่มี 5'→3' exonuclease activity

ออกไป เหลือเพียง 5'→3' polymerase activity และ 3'→5' exonuclease activity (proofreading) สำหรับการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ตรงข้ามที่มีสายนิวคลีโอไทด์ที่มี tail sequence เป็นแม่แบบ ผลลัพธ์ที่ได้คือ DNA สายคู่ ซึ่งมี tail sequence อยู่ปลายทั้งสองด้านของทุกสายนิวคลีโอไทด์ การที่สายนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดถูกทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันทั้งสองปลายนี้ถือเป็นหัวใจสำคัญต่อการใช้ไพรเมอร์เพียงเส้นเดียวในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบไม่จำเพาะเจาะจงในขั้นตอนต่อไป (Reyes and Kim, 1991; Djikeng et al., 2008; Davood et al., 2021)

3. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplification)

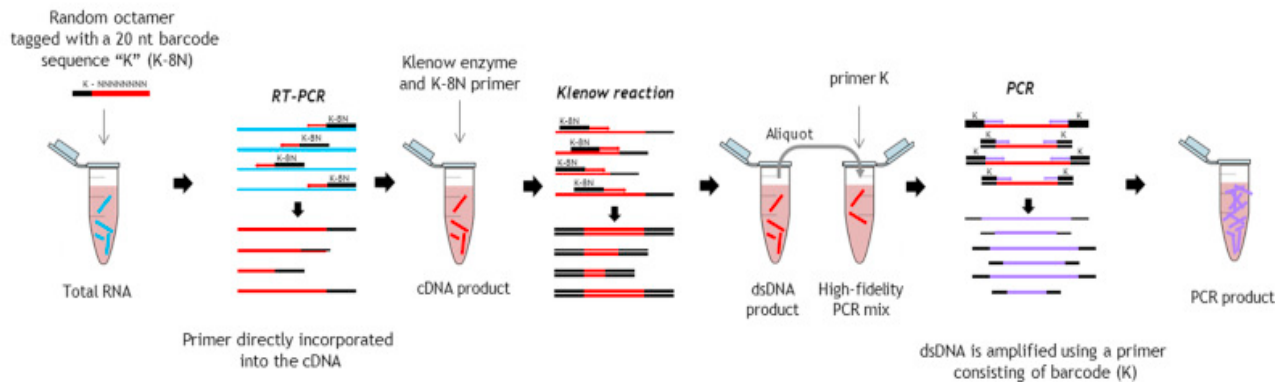
การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นขั้นตอนที่ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จากการสังเคราะห์ dsDNA โดยอาศัยหลักการของปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) หรือเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอื่น ๆ ในกระบวนการนี้จะใช้ SISPA primer ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ defined tail sequence ที่ถูกติดไว้ที่ปลายทั้งสองข้างของทุกสายของ DNA ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ เนื่องจากสาย DNA ทั้งหมดมีลำดับ tail เดียวกัน จึงสามารถใช้ไพรเมอร์เดียวเพื่อเพิ่มปริมาณได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ทุกสาย DNA ถูกเพิ่มปริมาณในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน กระบวนการนี้ช่วยเพิ่มปริมาณ DNA ให้เพียงพอสำหรับการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Nanopore sequencing โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเป้าหมายล่วงหน้า (Reyes and Kim, 1991; Djikeng et al., 2008; Davood et al., 2021)

ดังนั้น ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจึงเป็นหัวใจสำคัญที่ทำให้ SISPA สามารถใช้ตรวจหาหรือศึกษาจีโนมของไวรัสที่ไม่เคยพบและมีปริมาณไวรัสน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสรุปขั้นตอนและรายละเอียดของเทคนิค SISPA ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ขั้นตอนและรายละเอียดทางเทคนิคของวิธี SISPA (Reyes and Kim, 1991; Chrzastek et al., 2017; Lewandowska et al., 2021)

ขั้นตอน	รายละเอียด
1. การเตรียมสารพันธุกรรมแม่แบบ (template preparation)	- การสกัด (extraction): ใช้ชุดน้ำยามาตรฐานในการสกัดกรดนิวคลีอิกทั้งหมด (DNA และ RNA) จากตัวอย่างชีวภาพ เช่น ซีรัม เซลล์เพาะเลี้ยง หรือสิ่งส่งตรวจทางคลินิก เช่น RNeasy Mini Kit (QIAGEN) - การลดสารพันหลัง (background reduction): ใช้วิธีการกรองผ่านเมมเบรน 0.22 µm เพื่อลดปริมาณของเซลล์เจ้าบ้านและแบคทีเรียขนาดใหญ่ และการย่อยด้วย DNase เพื่อลด DNA ของโฮสต์และแบคทีเรียปนเปื้อน - การประเมินคุณภาพ: ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมที่เตรียมด้วย NanoDrop หรือ Qubit dsDNA/RNA HS assay
2. การต่ออะแดปเตอร์ (adapter ligation) หรือ การเติมไพรเมอร์แบบแท็กสุ่ม (tagged random priming)	- การต่ออะแดปเตอร์/ลิงเกอร์ (ligation - classical SISPA): ใช้ DNA ligase เชื่อมอะแดปเตอร์/ลิงเกอร์เข้ากับปลาย dsDNA ที่เป็น blunt end - การใช้ไพรเมอร์แบบแท็กสุ่ม (tagged random priming - modern SISPA): ใช้ chimeric primer ประกอบด้วย 5' tag sequence และ 3' random hexamer/octamer เพื่อจับไม่จำเพาะเจาะจง - การเติมหางโพลี (poly-tailing/poly-gaiting): การเติมหาง poly-A หรือ poly-G ที่ปลาย 3' ของ RNA/cDNA แล้วใช้ไพรเมอร์เสริมที่มีแท็ก
3. การสังเคราะห์สาย cDNA สายแรก (first-strand cDNA synthesis) และสาย DNA สายที่สอง (second-strand cDNA synthesis)	- หากสารพันธุกรรมแม่แบบเป็น RNA จะใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (เช่น SuperScript IV) ร่วมกับ tagged random primers (เช่น FR26.RV-N, K-8N) เพื่อสร้าง cDNA สายแรกที่มีลำดับแท็กที่ปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase เช่น Klenow fragment หรือ sequenase 2.0 เพื่อสร้าง dsDNA ที่มีแท็กทั้งสองปลาย
4. ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยว (single-primer amplification)	- ใช้ไพรเมอร์เดี่ยวที่เป็น tag sequence จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ ขยายปริมาณ dsDNA ด้วย PCR ประกอบด้วย denaturation, annealing, extension ทำซ้ำ 30–40 cycles โดยใช้ thermostable polymerase เช่น phusion หรือ Taq polymerase
5. การวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR (PCR product analysis)	- การตรวจสอบเบื้องต้น: วิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis เพื่อดู DNA smear - การเตรียมไลบรารี: ทำ clean-up และตรวจสอบปริมาณ/คุณภาพ (Qubit) ก่อนทำ NGS library

Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA)



ภาพที่ 12 หลักการของเทคนิค SISPA (Chrastek et al., 2017)

การประยุกต์ใช้ SISPA สำหรับงานวิจัยและงานตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส

SISPA เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่สารพันธุกรรมเป้าหมายมีปริมาณจำกัดหรือไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงมีการนำเทคนิค SISPA ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค Nanopore sequencing รวมถึงเทคนิค NGS อื่น ๆ อย่างกว้างขวางในงานวิจัยและงานตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส ดังนี้

1. ใช้เพื่อการค้นพบและจำแนกชนิดเชื้อไวรัสก่อโรคใหม่ (viral discovery and identification)

SISPA เหมาะสำหรับการค้นหาไวรัสชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีในฐานข้อมูล ซึ่งใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มที่มีแท็ก ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสทั้ง DNA และ RNA ได้โดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เป้าหมาย SISPA product ที่ได้จึงสามารถนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเปรียบเทียบกับ genome database เช่น GenBank จึงมีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิดไวรัส หรือแม้กระทั่งไวรัสที่ไม่เคยถูกค้นพบมาก่อน (Reyes and Kim, 1991; Chrastek et al., 2017)

2. ใช้เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity study)

เนื่องจาก SISPA สามารถเพิ่มลำดับพันธุกรรมจากหลายตำแหน่งทั่วทั้งจีโนมพร้อมกัน เทคนิคนี้จึงเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายของไวรัสหรือการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดเดียวกัน ไพรเมอร์แบบสุ่มช่วยให้สามารถเข้าถึงลำดับเบสที่ครอบคลุมทั้งจีโนมมากกว่าการทำ PCR แบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการประกอบจีโนมทั้งหมด (genome assembly) โดยเฉพาะไวรัสที่มีจีโนมแบ่งเป็นหลายส่วน (segmented genomes) นอกจากนี้ การใช้ SISPA กับตัวอย่างที่มีความซับซ้อน เช่น ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมหรือตัวอย่างทางคลินิกที่มีจุลินทรีย์หลายชนิด การช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดอย่างไม่จำเพาะ ทำให้สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบและความหลากหลายทางสายพันธุ์ของไวรัส (virome) ได้อย่างแม่นยำ (Chrastek et al., 2017)

3. ใช้เพื่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดจากตัวอย่างปริมาณน้อย (whole genome amplification from limited samples)

SISPA เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการเพิ่มปริมาณจีโนมทั้งหมด (whole genome amplification; WGA) จากตัวอย่างที่มีปริมาณ template ต่ำมาก เทคนิคนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างทางคลินิกที่มีปริมาณไวรัสต่ำ หรือผ่านการจัดเก็บที่อาจทำให้สารพันธุกรรมบางส่วนเสื่อมสภาพ ความไวในการตรวจจับสูงของ SISPA ช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแม้มีสารพันธุกรรมเริ่มต้นเพียง 1 พิโคกรัม (pg) หรือน้อยกว่า ทำให้เหมาะสำหรับงานตรวจวินิจฉัยโรคและการค้นหาไวรัสในตัวอย่างที่ทำลาย (Chrastek et al., 2017; Bahador et al., 2021)

4. ใช้เพื่อการเตรียมตัวอย่างสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ด้วยเทคนิค NGS และ TGS

SISPA มีบทบาทสำคัญในการเตรียมตัวอย่างสำหรับเทคโนโลยี NGS และ TGS ซึ่งการรวม SISPA เข้ากับ NGS เช่น Illumina หรือ TGS เช่น Nanopore เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการระบุไวรัสที่ไม่รู้จักมาก่อน เทคนิคนี้ช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้เพียงพอต่อการสร้างไลบรารี ในขณะที่ลดสัดส่วนของสารพันธุกรรมพื้นหลัง (background) ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้การพัฒนาบางรูปแบบ เช่น ligation-free SISPA (LF-SISPA) ช่วยให้อาจสามารถต่ออะแดปเตอร์และบาร์โค้ดสำหรับ NGS โดยตรง ลดขั้นตอนที่ซับซ้อนและลดต้นทุนการเตรียมไลบรารี (Chrzastek et al., 2017)

ข้อดีและข้อจำกัดของ SISPA

SISPA เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และมีปริมาณจำกัด อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดที่นักวิจัยควรตระหนัก โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Nanopore sequencing

1. ข้อดี

SISPA เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในงานไวรัสวิทยาและเมทาจีโนมิกส์ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นสามประการ ประการแรกคือความสามารถในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ไม่ทราบเป้าหมาย SISPA สามารถเพิ่มปริมาณจีโนมทั้งหมด (whole genome amplification) ของไวรัสในตัวอย่างได้โดยไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญต่อการค้นพบเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่และการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ประการที่สองคือไม่ต้องออกแบบไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง เนื่องจากใช้ chimeric single primer ที่ประกอบด้วยส่วนแท็กที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และส่วน random oligomer จึงช่วยลดเวลาและขั้นตอนในการออกแบบและตรวจสอบไพรเมอร์เฉพาะเป้าหมาย (Reyes and Kim, 1991) ประการที่สามคือความไวสูง SISPA สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมจากปริมาณเริ่มต้นน้อยมาก เช่น ในระดับพิโคกรัม (pg) ทำให้เหมาะสมสำหรับตัวอย่างทางคลินิกหรือสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณไวรัสต่ำ

2. ข้อจำกัด

แม้ SISPA จะมีข้อดีหลายประการ แต่ก็มีข้อจำกัดหลายประการ ข้อจำกัดแรกคือความเสี่ยงของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ไม่เกี่ยวข้อง (nonspecific amplification risk) เนื่องจากไพรเมอร์สามารถจับกับสายนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้ ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเจ้าบ้าน (host DNA/RNA) หรือจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย ซึ่งอาจลดจำนวน sequence read ของไวรัสเป้าหมายในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Nanopore sequencing ข้อจำกัดที่สองคือปัญหาการปนเปื้อน (contamination issues) ความไวสูงของ SISPA ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ปนเปื้อนมาจากสภาพแวดล้อม น้ำยา หรือรีเอเจนต์ที่ใช้ในการสกัดและ PCR เช่น สารพันธุกรรมของพลาสมิดหรือสารพันธุกรรมของ rRNA จากชุดน้ำยา cDNA synthesis kit ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false-positive results) ข้อจำกัดสุดท้ายคือความซับซ้อนของการวิเคราะห์ข้อมูล (complexity of data analysis) SISPA product จะเป็น heterogeneous library ที่ครอบคลุมจีโนมไม่สม่ำเสมอและมี bias ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างแท็กของไพรเมอร์ นักวิจัยจึงต้องใช้เครื่องมือชีวสารสนเทศซับซ้อนในการจัดการข้อมูลจำนวนมาก เพื่อลบลำดับแท็กที่ไม่เกี่ยวข้องและประกอบจีโนมให้สมบูรณ์ (Bahador et al., 2021 Haagmans et al., 2025)

เอกสารอ้างอิง

- Bahador, D., Mohammadi, A., Foroughi, A. and Alirezaie, B. (2021). Sequence-independent single-primer-amplification (SISPA) as a screening technique for detecting unexpected RNA viral adventitious agents in cell cultures. *Adv. Biotechnol. Bioeng.*, 9, 1–9. doi:10.29328/journal.abb.1001022
- Chrzastek, K., Lee, D.-H., Smith, D., Sharma, P., Suarez, D. L., Pantin-Jackwood, M. and Kapczynski, D. R. (2017). Use of sequence-independent, single-primer-amplification (SISPA) for rapid detection, identification, and characterization of avian RNA viruses. *Virology*, 509, 159–166. doi:10.1016/j.virol.2017.06.019
- Davood, B., Mohammadi, A., Foroughi, A. and Alirezaie, B. (2021). Sequence-independent single-primer-amplification (SISPA) as a screening technique for detecting unexpected RNA viral adventitious agents in cell cultures. *Arch. Biotechnol. Biomed.*, 5(1), 008–012. doi:10.29328/journal.abb.1001022
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., ...and Spiro, D. J. (2008). Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics*, 9, 1-9. doi:10.1186/1471-2164-9-5
- Fomsgaard, A. S., Rasmussen, M., Spiess, K., Fomsgaard, A., Belsham, G. J., Fonager, J. (2022). Improvements in metagenomic virus detection by simple pretreatment methods. *J. Clin. Virol. Plus*, 2(4), 1-7. doi:10.1016/j.jcvp.2022.100120
- Haagmans, R., Charity, O. J., Baker, D., Telatin, A., Savva, G. M., Adriaenssens, E. M., ... Carding, S. R. (2025). Assessing Bias and Reproducibility of Viral Metagenomics Methods for the Combined Detection of Faecal RNA and DNA Viruses. *Viruses*, 17(2), 1-31. doi:10.3390/v17020155
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B. and Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol.*, 17, 1–11. doi:10.1186/s13059-016-1103-0
- Reyes, G. R. and Kim, J. P. (1991). Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol. Cell. Probes*, 5(6), 473–481. doi:10.1016/S0890-8508(05)80020-9

บทที่ 5

เทคนิคการตรวจจับและ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของไวรัสด้วยวิธี probe-based hybridization capture

เทคนิค probe-based hybridization capture ได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการเตรียมตัวอย่างสำหรับ NGS เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคทางไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสในตัวอย่างมีน้อยมากหรือมีสารพันธุกรรมของโฮสต์ (host background) ปนเปื้อนสูง ในตัวอย่างทางคลินิกสารพันธุกรรมของไวรัสมักมีสัดส่วนต่ำมากเมื่อเทียบกับสารพันธุกรรมของโฮสต์ หรือน้อยกว่า 1% ของสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่าง ทำให้การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสทำได้จำนวน sequence read น้อยไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์และแปลผลได้ชัดเจน เทคนิค hybridization capture ที่ใช้ biotinylated probes จับกับสายนิวคลีโอไทด์เป้าหมายของไวรัส และตามด้วยการดึงแยกสายนิวคลีโอไทด์ของไวรัส ด้วย streptavidin-coated magnetic beads จึงสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไวรัสได้หลายร้อยถึงหลายพันเท่า (Wylie et al., 2015; Gaudin and Desnues, 2018) ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า target enrichment ซึ่งช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของไวรัสเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพหลายร้อยถึงหลายพันเท่า ทำให้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสได้ลึกยิ่งขึ้น (deep sequencing) ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเฝ้าระวังการระบาดของไวรัส การค้นพบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ การวิเคราะห์ไวโรม (virome analysis) และการศึกษาการกลายพันธุ์ของไวรัสในระดับจีโนม (Wylie et al., 2015)

หลักการออกแบบโพรบสำหรับ hybridization capture

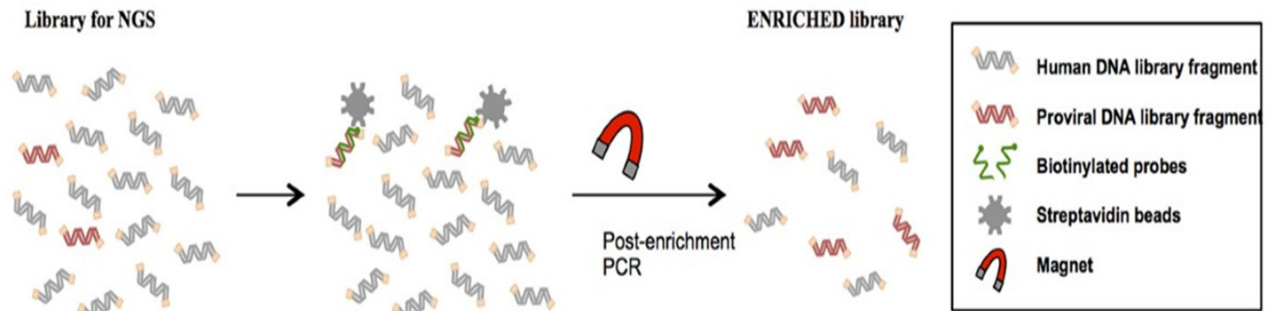
การออกแบบโพรบ เพื่อใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของสายนิวคลีโอไทด์ของไวรัสสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Nanopore sequencing ต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพและความแม่นยำในการจับเป้าหมายจากตัวอย่างที่มีความซับซ้อนสูง (Mamanova et al., 2010; Briesse et al., 2015; Wylie et al., 2015) ดังนี้

1. การครอบคลุมเป้าหมาย (target tiling and redundancy) โพรบจะถูกออกแบบให้วางซ้อนกัน (overlap) และเรียงตัวเป็นแนว (tile) ครอบคลุมจีโนมไวรัสเป้าหมายทั้งหมด เพื่อให้แน่ใจว่าแต่ละชิ้นส่วนของจีโนมไวรัสจะถูกจับได้
2. การรองรับการกลายพันธุ์ (mismatch tolerance) โพรบมักถูกออกแบบให้มีความยาวเหมาะสม เพื่อให้สามารถจับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายได้แม้จะมีจุดกลายพันธุ์เล็กน้อย (mismatches) ซึ่งสำคัญสำหรับไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงของจีโนมอย่างรวดเร็ว
3. การควบคุมค่า Tm ในชุดโพรบ จำเป็นต้องมีการควบคุมค่า Tm ให้มีค่าใกล้เคียงกันที่สุด เพื่อให้ทุกโพรบมีประสิทธิภาพในการ hybridization ที่สภาวะเดียวกัน
4. การติดฉลาก biotin โพรบทั้งหมดจะถูกติดฉลากด้วย biotin ที่ปลาย 5' (หรือ 3') เพื่อใช้สำหรับการดึงแยกสายนิวคลีโอไทด์ของไวรัสด้วย streptavidin-coated magnetic beads ในภายหลัง กระบวนการนี้เป็นหัวใจสำคัญของกลไกการคัดเลือกเป้าหมาย (target selection)

หลักการของเทคนิค probe-based hybridization capture

เทคนิค hybridization capture หรือ target enrichment เป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสที่สนใจ ก่อนนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Nanopore sequencing โดยมีกระบวนการประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ๆ (ภาพที่ 13) (Mamanova et al., 2010; Wylie et al., 2015) ดังนี้

1. การเตรียมไลบรารี (library preparation) สารพันธุกรรมของไวรัสและโฮสต์ที่สกัดได้จะถูกตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (fragmentation) แล้วทำการเชื่อมต่อกับโมเลกุล adaptors ที่ปลายทั้งสองด้านเพื่อสร้างไลบรารี ทั่วไป หรืออาจมีการใช้เทคนิค SISPA เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
2. การผสมกันของโพรบและเป้าหมาย (hybridization) นำไลบรารีหรือสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มปริมาณมาผสมกับชุดโพรบที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งโพรบเหล่านี้เป็น oligonucleotide สายเดี่ยวที่ติดฉลาก biotin ไว้ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสที่ต้องการ (target viral sequences) เพื่อให้โพรบจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงเท่านั้น
3. การดึงแยก (capture) โมเลกุลโพรบที่จับกับสายนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเป้าหมายจะถูกดึงแยกออกจากสารละลายโดยใช้ streptavidin-coated magnetic beads เนื่องจาก biotin บนโพรบมีความจำเพาะสูงต่อโปรตีน streptavidin (biotin-streptavidin affinity) จากนั้นจึงนำไปล้าง (washing) เพื่อกำจัดสารพันธุกรรมของโฮสต์ที่ไม่ได้จับออกไป
4. การเพิ่มปริมาณหลังการดึงแยก (post-capture amplification) สายนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่ถูกดึงแยกและติดอยู่กับ beads จะถูกชะออกมา (elution) และนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับกับ adaptors ที่ติดไว้ก่อนหน้า และทำให้บริสุทธิ์จะได้สารพันธุกรรมของไวรัสเป้าหมายที่พร้อมสำหรับนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 13 หลักการของ probe-based hybridization capture (Miyazato et al., 2016)

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบ viral probe hybridization กับเทคนิค enrichment อื่น ๆ

รูปแบบเทคนิค	หลักการ	ความไว (Sensitivity)	ความจำเพาะ (Specificity)	การครอบคลุมจีโนม	ข้อจำกัด/ความท้าทาย
viral probe hybridization (VPH) (Wylie et al., 2015; Gaudin & Desnues, 2018)	ใช้สายโพรบจำเพาะ จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายของไวรัส จากนั้นแยกสารพันธุกรรมที่จับได้	สูง: สามารถจับไวรัสปริมาณต่ำได้	สูง: โพรบออกแบบเฉพาะ ทำให้ลด background ของ host	ขึ้นอยู่กับจำนวนและการออกแบบตำแหน่งให้โพรบ สามารถครอบคลุมจีโนมหลัก ๆ ได้	ค่าใช้จ่ายสูง, ต้องออกแบบโพรบอย่างระมัดระวัง, อาจพลาดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ต่างจากโพรบ
PCR-based enrichment (Briese et al., 2015)	ใช้ primer จำเพาะ เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัส	สูงในบริเวณที่ primer ครอบคลุม	สูงสำหรับสายพันธุ์ที่ primer จับได้	จำกัดบริเวณที่ primer ออกแบบไว้, ไม่ครอบคลุมทั้งจีโนม	sensitive ต่อ mutations ในบริเวณ primer binding site, multiplexing มีข้อจำกัดจำนวน target
random amplification / SISPA (Smits et al., 2013)	เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่าง โดยไม่จำเพาะ	ปานกลาง-สูง	ต่ำ: background host DNA/RNA มาก	สามารถครอบคลุมทั้งจีโนม	ไม่จำเพาะ, ต้องการ sequencing depth สูง, background มาก
capture by CRISPR/Cas systems (Lopatriello et al., 2023)	ใช้ gRNA นำ Cas9 ตัดและ enrich สายนิวคลีโอไทด์บริเวณเป้าหมาย	สูง	สูง, ขึ้นอยู่กับ gRNA	ครอบคลุมได้ตามจำนวน gRNA	ต้องออกแบบ gRNA หลายตัว, เทคนิคซับซ้อน, ยังไม่แพร่หลายเชิงพาณิชย์
physical/chemical depletion of host DNA/RNA (Sajib et al., 2024)	ลดสารพันธุกรรมของ host เพื่อลด background	ขึ้นอยู่กับปริมาณไวรัส	ปานกลาง	สามารถเพิ่ม coverage ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสได้โดยไม่จำเพาะ	ไม่สามารถเลือกสายพันธุ์เฉพาะ, ไม่ได้เพิ่มปริมาณไวรัสโดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ viral probe hybridization มีดังนี้

1. ความจำเพาะและความไวของโพรบ (probe specificity and sensitivity)

ความจำเพาะของโพรบขึ้นอยู่กับความสามารถของโพรบในการจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายโดยไม่เกิดการจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโฮสต์หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ การออกแบบโพรบที่เหมาะสมจำเป็นต้องตรวจสอบกับฐานข้อมูลจีโนมของโฮสต์และเชื้ออื่น ๆ เพื่อลดการเกิด cross-hybridization หากความจำเพาะต่ำจะส่งผลให้เกิดสัญญาณรบกวน (background noise) สูงและทำให้การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แม่นยำ (Ceballos-Garzon et al., 2024) ส่วนความไวของโพรบขึ้นอยู่กับความสามารถของโพรบในการตรวจจับสารพันธุกรรมของไวรัสที่มีปริมาณต่ำ โดยการใชปริมาณโพรบที่เพียงพอและการจับของโพรบที่มีความเสถียร (stable hybridization) จะช่วยเพิ่มสัดส่วน

ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโฮสต์ อีกทั้งการใช้ probe tiling หรือการออกแบบโพรบหลายตัวซ้อนทับในบริเวณเดียวกันยังสามารถเพิ่มความไวและครอบคลุมสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้ (Kuchinski et al., 2022)

2. ความยาวและความเข้มข้นของโพรบ (probe length and concentration)

ความยาวและความเข้มข้นของโพรบ เป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดประสิทธิภาพของการ hybridization โดยโพรบที่มีขนาดสั้นเกินไป (<30 bp) อาจไม่จำเพาะและมีโอกาสเกิดการจับผิดเป้าหมายได้ง่าย ในขณะที่โพรบที่มีขนาดยาวเกินไป (>150 bp) แม้จะเพิ่มความจำเพาะ แต่กลับลดประสิทธิภาพการจับและอาจเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) โดยทั่วไปโพรบที่มีความยาว 50–120 นิวคลีโอไทด์ถือว่าเหมาะสมสำหรับการทำ hybridization-based enrichment ส่วนความเข้มข้นของโพรบที่ต่ำเกินไปจะไม่เพียงพอต่อการจับไวรัสที่มีปริมาณน้อย ในทางตรงกันข้าม หากสูงเกินไปอาจเพิ่มการจับที่ไม่จำเพาะ (nonspecific binding) และเพิ่มค่า background ดังนั้นปริมาณโพรบที่ใช้ควรสัมพันธ์กับอัตราส่วนของไวรัสเป้าหมายและขนาดจีโนมของไวรัสที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Öhrmalm et al., 2010; Munyuza et al., 2022)

3. อัตราส่วนระหว่างสารพันธุกรรมไวรัสกับโพรบ (ratio of viral nucleic acids to probes)

อัตราส่วนระหว่างสารพันธุกรรมไวรัสกับโพรบมีผลต่อประสิทธิภาพของ hybridization โดยปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสต่ำเกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของโฮสต์ จะต้องมีโพรบที่มีปริมาณมากพอให้สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสได้ครอบคลุมทั้งหมดในทางตรงกันข้าม หากมีโพรบมากเกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสอาจเพิ่ม background noise และทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสและแปลผลผิดพลาดได้ ดังนั้นการหาอัตราส่วนระหว่างสารพันธุกรรมไวรัสกับโพรบที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อทั้งประสิทธิภาพการจับและคุณภาพของข้อมูล sequencing ที่ได้ (Paskey et al., 2019; Jia et al., 2024)

ประโยชน์ของ viral probe hybridization ต่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส

1. ความสามารถในการเพิ่มความไว (high sensitivity): เทคนิคนี้ช่วยเพิ่มสัดส่วนของ viral reads ต่อ total reads ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างมาก ทำให้สามารถตรวจพบไวรัสในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย (<1%) ซึ่งเป็นปัญหาหลักของตัวอย่างทางคลินิก (Gaudin and Desnues, 2018)

2. ความทนต่อการไม่จับคู่ของนิวคลีโอไทด์ (tolerance to mismatches): เนื่องจากโพรบที่ใช้มีความยาว (เช่น 80–120 bp) จึงสามารถทนต่อการไม่จับคู่ของนิวคลีโอไทด์เบสบางส่วนของจีโนมไวรัสได้ดีกว่าวิธี amplicon-based ที่ต้องอาศัย primer ที่สั้นกว่า ทำให้เหมาะสำหรับการตรวจจับไวรัสที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง (Briese et al., 2015)

ข้อดีและข้อจำกัดของวิธี viral probe hybridization

วิธี viral probe hybridization นิยมใช้ในงานตรวจวินิจฉัยและการเฝ้าระวังเชื้อไวรัส โดยมีข้อดีสำคัญคือการเพิ่มความไวของการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัส เนื่องจากโพรบสามารถเพิ่มสัดส่วนของสารพันธุกรรมไวรัสให้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับ host nucleic acids ทำให้สามารถตรวจจับไวรัสที่มีปริมาณต่ำได้ดียิ่งขึ้น (Paskey et al., 2019) นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถออกแบบโพรบให้ครอบคลุมไวรัสหลายชนิด จึงรองรับการตรวจจับเชื้อไวรัสหลายชนิดที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในเวลาเดียวกัน ตลอดจนการติดเชื้อร่วม (co-infection) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kuchinski

et al., 2022) อีกทั้งยังช่วยลดปัญหา background ที่เกิดจากสารพันธุกรรมของโฮสต์ ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสมีความแม่นยำสูงขึ้นและลดปริมาณข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่จำเป็นในกระบวนการ sequencing (Ceballos-Garzon et al., 2024) อย่างไรก็ตาม วิธี viral probe hybridization ก็มีข้อจำกัดที่ควรพิจารณาเช่นกัน หนึ่งในข้อจำกัดหลักคือค่าใช้จ่ายที่สูงทั้งในแง่ของการออกแบบและสังเคราะห์โพรบ รวมถึงการใช้สารเคมีและเครื่องมือที่มีความซับซ้อน (Jia et al., 2024) อีกทั้งการออกแบบโพรบต้องอาศัยข้อมูลจีโนมของไวรัสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล หากข้อมูลไม่ครอบคลุมหรือไม่เป็นปัจจุบัน อาจทำให้โพรบไม่สามารถจับกับสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีผลต่อ sensitivity ที่ลดลง (Öhrmalm et al., 2010) ข้อจำกัดอีกประการคือการตรวจจับไวรัสสายพันธุ์ใหม่หรือไวรัสที่มีความแตกต่างสูงจาก reference genome database เนื่องจากโพรบไม่สามารถจับได้หากมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากเกินไป ส่งผลให้ไวรัสชนิดใหม่อาจตรวจไม่พบ (Ceballos-Garzon et al., 2024)

แนวทางการประยุกต์ใช้ viral probe hybridization มีดังนี้

1. เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังโรคไวรัสในสัตว์ (viral disease surveillance in animals)

เทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากต่อการเฝ้าระวังโรคในปศุสัตว์และสัตว์ป่า เนื่องจากสามารถตรวจจับไวรัสหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกัน และมีความไวสูงเหมาะสมสำหรับตัวอย่างชีวภาพที่มีปริมาณไวรัสต่ำ ซึ่งสามารถติดตามการแพร่กระจายของไวรัส และการตรวจจับการติดเชื้อแบบร่วม (co-infections) รวมถึงการตรวจหาความหลากหลายของไวรัสในสิ่งแวดล้อม (Ceballos-Garzon et al., 2024; Jia et al., 2024)

2. เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอุบัติใหม่ (diagnosis of emerging viruses)

ในกรณีที่มีการระบาดของไวรัสอุบัติใหม่ เทคนิคนี้สามารถช่วยตรวจหาไวรัสที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสที่ทราบชนิดแล้วได้ แม้ไวรัสดังกล่าวจะกลายพันธุ์บางตำแหน่งก็ตาม การใช้ probe tiling หรือ probe panels ที่ครอบคลุมกลุ่มไวรัสกว้าง ๆ (pan-viral probes) สามารถเพิ่มโอกาสในการตรวจจับไวรัสอุบัติใหม่หรือสายพันธุ์กลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kuchinski et al., 2022)

3. เพื่อใช้ในการวิจัยพันธุศาสตร์เชิงลึกของไวรัส (viral genomics research)

viral probe hybridization ยังเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงลึกของไวรัส (deep viral genomics) เช่น การวิเคราะห์ความหลากหลายของจีโนม การศึกษาการวิวัฒนาการของไวรัส และการติดตามการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคหรือการดื้อต่อวัคซีน เทคนิคนี้ช่วยเพิ่มคุณภาพของข้อมูล sequencing โดยลด background host DNA และเพิ่มความครอบคลุมของจีโนมไวรัส ซึ่งเอื้อต่อการทำความเข้าใจความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสในระดับประชากร (population genomics) และการศึกษาพลวัตเชิงวิวัฒนาการและการแพร่ระบาดของไวรัส (phylodynamics) (Paskey et al., 2019; Ceballos-Garzon et al., 2024)

การพัฒนาวิธีหาลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสโดยการประยุกต์เทคนิค viral probe hybridization ร่วมกับ SISPA - Nanopore Sequencing

การบูรณาการเทคนิค viral probe hybridization เข้ากับวิธี sequence-independent single primer amplification (SISPA) และ Nanopore sequencing เป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูงในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจจับและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เนื่องจากแต่ละเทคนิคสามารถเสริมข้อจำกัดของกันและกันได้อย่างลงตัว โดยเทคนิค SISPA มีจุดแข็งในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสโดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

จึงเหมาะสำหรับการตรวจหาไวรัสอุบัติใหม่หรือสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์สูง (Brinkmann et al., 2021) ขณะที่เทคโนโลยี Nanopore sequencing มีความสามารถในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดยาว (long-read sequencing) อีกทั้งยังให้ผลลัพธ์แบบ real-time และเหมาะสำหรับการใช้งานในภาคสนาม (Kafetzopoulou et al., 2019) แต่ทั้งสองวิธียังมีข้อจำกัด เช่น error rate ที่ค่อนข้างสูงของเทคโนโลยี Nanopore และการเกิด amplification bias ของ SISPA ซึ่งอาจทำให้ปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสในตัวอย่างไม่สมดุล การผสมผสานเทคนิค viral probe hybridization จึงเข้ามาเติมเต็มด้วยการเพิ่มสัดส่วนสารพันธุกรรมของไวรัส (viral nucleic acid enrichment) และลดสัดส่วนสารพันธุกรรมของโฮสต์ จึงช่วยเพิ่ม coverage ของจีโนมไวรัสโดยเฉพาะในตัวอย่างที่มี viral load ต่ำ (Faria et al., 2016; Ceballos-Garzon et al., 2024) ได้ ดังนั้นวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส โดยการประยุกต์เทคนิค viral probe hybridization ร่วมกับ SISPA - Nanopore sequencing จึงเป็นหนึ่งในเครื่องมือของการตรวจวินิจฉัยไวรัสและการเฝ้าระวังเชิงจีโนมิกส์ที่สำคัญในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Briese, T., Kapoor, A., Mishra, N., Jain, K., Kumar, A., Jabado, O. J. and Lipkin, W. I. (2015). Virome capture sequencing enables sensitive viral diagnosis and comprehensive virome analysis. *mBio*, 6(5), 1–11. doi:10.1128/mBio.01491-15
- Brinkmann, A., Uddin, S., Krause, E., Surtees, R., Dinçer, E., Kar, S., Hacıoğlu, S., Özkul, A., Ergünay, K. and Nitsche, A. (2021). Utility of a sequence-independent, single-primer-amplification (SISPA) and nanopore sequencing approach for detection and characterization of tick-borne viral pathogens. *Viruses*, 13(2), 1–6. doi:10.3390/v13020203
- Ceballos-Garzon, A., Comtet-Marre, S. and Peyret, P. (2024). Applying targeted gene hybridization capture to viruses with a focus to SARS-CoV-2. *Virus Res.*, 340, 1–10. doi:10.1016/j.virusres.2023.199293
- Faria, N. R., Sabino, E. C., Nunes, M. R. T., Alcântara, L. C. J., Loman, N. J. and Pybus, O. G. (2016). Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. *Genome Med.*, 8(1), 1–5. doi:10.1186/s13073-016-0356-2
- Gaudin, M. and Desnues, C. (2018). Hybrid capture-based next generation sequencing and its application to human infectious diseases. *Front. Microbiol.*, 9, 2924. doi:10.3389/fmicb.2018.02924
- Jia, X., Li, Z., Wang, Y., Zhang, Q. and Liu, H. (2024). Empirical assessment of enrichment-based metagenomic methods in identifying diverse respiratory pathogens. *Sci. Rep.*, 14, 1–11. doi:10.1038/s41598-024-75120-x
- Kafetzopoulou, L. E., Pullan, S. T., Lemey, P., Suchard, M. A., Ehichioya, D. U., Pahlmann, M., ...and Duraffour, S. (2019). Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*, 363(6422), 74–77. doi:10.1126/science.aau9343
- Kuchinski, K. S., Duan, J., Himsworth, C., Hsiao, W. and Prystajek, N. A. (2022). ProbeTools: Designing hybridization probes for targeted genomic sequencing of diverse and hypervariable viral taxa. *BMC Genomics*, 23, 1–14. doi: 10.1186/s12864-022-08790-4
- Lopatrillo, G., Maestri, S., Alfano, M., Papa, R., Di Vittori, V., De Antoni, L., ...and Rossato, M. (2023). CRISPR/Cas9-mediated enrichment coupled to nanopore sequencing provides a valuable tool for the precise reconstruction of large genomic target regions. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(2), 1–16. doi:10.3390/ijms24021076
- Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, H. S., Peckham, H. E., Chin, S. W., Schaffner, S. F., ...and Sebat, J. (2010). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat. Methods*, 7(2), 111–118. doi:10.1038/nmeth.1419
- Miyazato, P., Katsuya, H., Fukuda, A., Uchiyama, Y., Matsuo, M., Tokunaga, M., Hino, S., Nakao, M. and Satou, Y. (2016). Application of targeted enrichment to next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. *Sci. Rep.*, 6, 1–10. doi:10.1038/srep28324
- Munyuz, C., Ji, H. and Lee, E. R. (2022). Probe capture enrichment methods for HIV and HCV genome sequencing and drug resistance genotyping. *Pathogens*, 11(6), 1–11. doi:10.3390/pathogens11060693
- Öhrmalm, C., Jobs, M., Eriksson, R., Golbob, S., Elfaitouri, A., Benachenhou, F., Strømme, M. and Blomberg, J. (2010). Hybridization properties of long nucleic acid probes for detection of variable target sequences, and development of a hybridization prediction algorithm. *Nucleic Acids Res.*, 38(21), 1–23. doi:10.1093/nar/gkq777
- Paskey, A. C., Frey, K. G., Schroth, G. P. and Bishop-Lilly, K. A. (2019). Enrichment post-library preparation enhances the sensitivity of viral detection. *BMC Genomics*, 20, 1–14. doi:10.1186/s12864-019-5543-2

- Sajib, M. S. I., Brunker, K., Oravcova, K., Everest, P., Murphy, M. E. and Forde, T. (2024). Advances in host depletion and pathogen enrichment methods for rapid sequencing-based diagnosis of bloodstream infection. *J. Mol. Diagn.*, 26(9), 741–753. doi:10.1016/j.jmoldx.2024.05.008
- Smits, S. L., Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Baumgärtner, W., Koopmans, M. P., Osterhaus, A. D. M. E. and Schürch, A. C. (2014). Assembly of viral genomes from metagenomes. *Front. Microbiol.*, 5, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00714
- Wylie, K. M., Wylie, T. N., Herter, J. R., Storch, G. A. and Fadrosh, D. W. (2015). Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture. *Genome Res.*, 25(12), 1910–1920. doi:10.1101/gr.191049.115

บทที่ 6

การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี SISPA Nanopore sequencing

การเตรียมตัวอย่างมีบทบาทสำคัญนอกจากจะช่วยเพิ่มความเข้มข้นและคุณภาพของกรดนิวคลีอิกของไวรัสเพื่อให้เหมาะสมต่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ยังเป็นขั้นตอนสำคัญในการลดสัญญาณรบกวนที่เกิดจากสารพันธุกรรมของโฮสต์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือโปรตีนจากเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจขัดขวางการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสได้ การกำจัดหรือทำให้สารพันธุกรรมเหล่านี้อัตถกจะสามารถช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะของการตรวจ โดยเฉพาะในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณสารพันธุกรรมของโฮสต์ เทคนิคที่นิยมใช้ในการลดปริมาณสารพันธุกรรมของโฮสต์และสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ การกรอง (filtration) เพื่อกำจัดเศษเซลล์และจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคไวรัส การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digestion) เช่น nuclease treatment ซึ่งช่วยสลายกรดนิวคลีอิกอื่น ๆ ที่ไม่ได้ห่อหุ้มในแคปซิดของไวรัส และการใช้โพรบจำเพาะ (virus-specific probes หรือ hybrid capture) เพื่อคัดเลือกเฉพาะสารพันธุกรรมของไวรัสในการเพิ่มสัดส่วนสารพันธุกรรมของไวรัสต่อสารพันธุกรรมของโฮสต์ เทคนิคเหล่านี้ไม่เพียงช่วยลด background signal แต่ยังเพิ่มความไวของการตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสโดยใช้วิธี SISPA Nanopore sequencing ได้ (Hall et al., 2014; Conceição-Neto et al., 2015)

การเก็บและจัดเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบสำหรับ NGS มีดังนี้

1. เลือด (Blood samples)

เลือดถือเป็นหนึ่งในตัวอย่างหลักที่ใช้สำหรับการตรวจหาไวรัส ทั้งในรูปแบบของ whole blood, serum และ plasma โดย serum เหมาะสมต่อการตรวจทางซีรัมวิทยาเพื่อหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส ขณะที่ plasma มักเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมกว่าสำหรับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เนื่องจากการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมอื่น ๆ ที่อยู่ในเซลล์ (cellular nucleic acids) น้อยกว่า จึงทำให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิธี Nanopore sequencing มีคุณภาพ อีกทั้งการใช้ anticoagulant เช่น EDTA ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการคงสภาพของกรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะ RNA ของไวรัสที่มีความไม่เสถียร การเก็บและการรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เช่น การแช่แข็งที่ -70°C เป็นสิ่งจำเป็นในการป้องกันการสลายตัวของสารพันธุกรรมของไวรัส เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีคุณภาพสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Damen et al., 1998; Shi et al., 2016)

2. น้ำลาย (saliva samples)

น้ำลายจัดเป็น non-invasive specimen ที่สะดวกและปลอดภัยต่อการเก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างน้ำลายเหมาะสำหรับไวรัสที่ถูกขับออกมาทางทางเดินหายใจหรือต่อมน้ำลาย เช่น ไวรัสโคโรนา การประยุกต์ใช้ SISPA-Nanopore sequencing กับน้ำลายมีความท้าทายสำคัญ คือ เอนไซม์ที่ย่อย RNA และ microbiota ในตัวอย่างซึ่งทำให้เกิดการเร่งกระบวนการเสื่อมสลายของสารพันธุกรรมของไวรัสได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้ RNase inhibitors หรือสารกันเสียเฉพาะเพื่อรักษาความเสถียรของ RNA นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำยังสามารถช่วยเพิ่มความไวของวิธี SISPA-Nanopore sequencing ในการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสจากน้ำลายได้ (To et al., 2019; Wyllie et al., 2020)

3. เนื้อเยื่อ (Tissue samples)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะเป้าหมายของไวรัส เช่น สมอง ปอด หรือต่อมน้ำเหลือง เป็นอวัยวะเป้าหมายโดยตรงของไวรัสและมักถูกใช้ในการยืนยันการติดเชื้อในสัตว์ที่ตายหรือมีอาการรุนแรง โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะเหล่านี้มีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วย SISPA-Nanopore sequencing เนื่องจากมีปริมาณ viral nucleic acids ที่สูงเมื่อเทียบกับตัวอย่างชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม การจัดการตัวอย่างมีความสำคัญยิ่ง โดยต้องเก็บในสภาวะปลอดเชื้อ และหากใช้สำหรับการตรวจทางชีวโมเลกุลควรเก็บที่ -70°C เพื่อคงคุณภาพของกรดนิวคลีอิก (Shi et al., 2006) การเก็บรักษาตัวอย่างที่ถูกต้องจะสามารถลดการเสื่อมสลายของ viral RNA/DNA และช่วยให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น long-read จาก SISPA-Nanopore sequencing สำหรับวิเคราะห์ที่มีคุณภาพสูง เพียงพอและเหมาะสมต่อการประกอบจีโนมไวรัส

4. น้ำทิ้ง/สิ่งแวดล้อม (wastewater and environmental samples)

ตัวอย่างน้ำทิ้งและตัวอย่างสิ่งแวดล้อมถูกนำมาใช้ในแนวทาง wastewater-based epidemiology (WBE) สำหรับการเฝ้าระวังไวรัสในระดับชุมชนหรือฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากสามารถบ่งชี้การแพร่ระบาดของไวรัสได้แม้ผู้ติดเชื้อไม่มีอาการ การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสในน้ำทิ้งด้วย SISPA-Nanopore sequencing ต้องอาศัยกระบวนการเพิ่มความเข้มข้นของไวรัส เช่น ultrafiltration, polyethylene glycol (PEG) precipitation หรือ electronegative membrane filtration เพื่อลดปริมาณสารพันธุกรรมจากโฮสต์และจุลินทรีย์ และเพิ่มความไวของวิธีจึงจะสามารถวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมไวรัสที่ซับซ้อนและตรวจพบไวรัสหลากหลายชนิดในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมได้พร้อมกันด้วย (Bibby and Peccia, 2013; Ahmed et al., 2020; Polo et al., 2020)

วิธีการเตรียมตัวอย่าง มีขั้นตอนหลักดังนี้

1. ขั้นตอนการลดสารพันธุกรรมของโฮสต์และสิ่งปนเปื้อน มีดังนี้

1.1. การกรอง (filtration)

การกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 μm เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการกำจัดเศษเซลล์และจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคไวรัส เช่น เซลล์โฮสต์ที่ตายแล้วหรือสิ่งปนเปื้อนที่มีขนาดใหญ่กว่าไวรัส อย่างไรก็ตาม ควรพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ร่วมด้วย เช่น ประเภทของเมมเบรน ความเข้มข้นของไวรัส ขนาดของไวรัส และลักษณะของสิ่งปนเปื้อน (Wright et al., 2022)

1.2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digestion)

การย่อยด้วยเอนไซม์ นิยมใช้เอนไซม์ benzonase, DNase, RNase และ protease ซึ่งเป็นเทคนิคสำคัญในการลดปริมาณสารพันธุกรรมของโฮสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการแยกไวรัส เช่น การผลิตวัคซีนหรือยารักษาโรคที่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ โดยเอนไซม์จะช่วยลดปริมาณสารพันธุกรรมของเซลล์โฮสต์และสารพันธุกรรมปนเปื้อนในตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างการศึกษาและวิจัยด้วยเทคนิคนี้ได้สรุปตามตารางที่ 9 (Konz et al., 2005; Hansson et al., 2008; Victoria et al., 2009; Zhu et al., 2013; Fomsgaard et al., 2022) มีดังนี้

1.3. การใช้โพรบจำเพาะ (virus-specific probes หรือ hybrid capture)

เทคนิคนี้ใช้โพรบที่จำเพาะต่อลำดับสายนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเพื่อจับและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสก่อนการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น probe-based hybridization capture เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจจับไวรัสที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่าง ซึ่งได้กล่าวรายละเอียดแล้วในบทที่ 5

ตารางที่ 9 ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digestion) สำหรับเตรียมตัวอย่าง

เอนไซม์	หลักการ	ผลลัพธ์	การประยุกต์ใช้
DNase (benzonase)	ลด DNA ของเซลล์โฮสต์ในกระบวนการผลิตไวรัสออนโคไลติก	ลด DNA ของโฮสต์ >97%	ใช้ร่วมกับ filtration และ chromatography
DNase	ลด DNA ที่ไม่ได้ห่อหุ้มในแคปซิดไวรัส	ลด DNA ที่ไม่ได้ห่อหุ้มได้อย่างมีประสิทธิภาพ	ใช้สำหรับแยกไวรัสบริสุทธิ์
RNase (RNase A)	ลด RNA ของโฮสต์ในตัวอย่างไวรัส RNA ก่อน sequencing	ลด RNA ของโฮสต์ >90%	ใช้ร่วมกับ DNase และ filtration
RNase (RNase H)	ลด RNA ของโฮสต์และไวรัสที่ไม่ต้องการใน NGS	เพิ่มความไวของการตรวจจับไวรัส	ใช้ใน metagenomic sequencing
Protease (Proteinase K)	ลดโปรตีนของเซลล์โฮสต์ที่ปนเปื้อน	ลดโปรตีนของโฮสต์ >99%	ใช้ร่วมกับ DNase/benzonase และ filtration

2. ขั้นตอนการสกัดและทำให้สารพันธุกรรมของไวรัสมีความบริสุทธิ์

การสกัดและทำให้สารพันธุกรรมของไวรัสบริสุทธิ์เป็นขั้นตอนสำคัญในงานวิจัยทางด้านไวรัสวิทยาและการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เทคนิคที่ใช้มีทั้งแบบดั้งเดิมและเทคโนโลยีสมัยใหม่ (Chomczynski and Sacchi, 1987; Sambrook and Russell, 2001; Bergallo et al., 2006; Wozniak et al., 2020; NEB, 2025; Qiagen, 2025; Vutukuru et al., 2025) ตามตารางที่ 10 ดังนี้

ตารางที่ 10 รูปแบบของวิธีการสกัดและทำให้สารพันธุกรรมของไวรัสมีความบริสุทธิ์

วิธีการสกัด	หลักการ	ตัวอย่าง kit / protocol	ข้อดี	ข้อเสีย
ดั้งเดิม (chemical extraction, trizol / phenol-chloroform)	ใช้สารเคมี เช่น guanidinium thiocyanate, phenol, chloroform แยก RNA/DNA ออกจากโปรตีนและไขมัน	trizol (RNA), phenol-chloroform (DNA)	- ราคาถูก - สามารถปรับ protocol ได้ตามตัวอย่าง - ให้ผลลัพธ์บริสุทธิ์สูง	- ใช้เวลานาน - ต้องใช้สารเคมีอันตราย - ไม่เหมาะสำหรับ high-throughput
spin column (silica-based)	RNA/DNA จับบนเมทริกซ์ซิลิกาในคอลัมน์ จากนั้นล้างและ elute	Qiagen QIAamp, Viral RNA Mini Kit, NucleoSpin® DNA Virus	- รวดเร็วและสะดวก - ลดการปนเปื้อน - เหมาะกับตัวอย่าง low volume - ให้ RNA/DNA บริสุทธิ์สูง	- ราคาค่อนข้างสูง - ต้องใช้วัสดุ kit ต่อเนื่อง
magnetic bead-based	RNA/DNA จับกับอนุภาคแม่เหล็กเคลือบซิลิกา สามารถล้างและ elute ด้วยแม่เหล็ก	Thermo MagMAX Viral/Pathogen, Monarch Viral DNA/RNA Kit	- เหมาะกับ high-throughput - ลดความเสี่ยงปนเปื้อน - ให้ RNA/DNA คุณภาพสูง	- ราคาสูง - ต้องมีอุปกรณ์แม่เหล็ก/automation

3. ขั้นตอนการตรวจวัดคุณภาพและความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไวรัสที่บริสุทธิ์ (Wilfinger et al., 1997; Schroeder et al., 2006; Gallagher, 2011)

1. การวัดความเข้มข้น (quantification) ได้แก่

1.1 nanodrop / spectrophotometry

หลักการ: วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260)

ข้อดี: รวดเร็ว, ใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย

ข้อจำกัด: ไม่สามารถแยกสิ่งเจือปน (เช่น โปรตีน, phenol) ได้อย่างชัดเจน

1.2 fluorometric assays (Qubit, PicoGreen, RiboGreen)

หลักการ: ใช้สียฟลูออเรสเซนต์ที่จับกับ nucleic acid

ข้อดี: ความไวสูง, ตรวจความเข้มข้นตัวอย่างน้อยได้

ข้อจำกัด: ต้องใช้ reagent และสารมาตรฐานเทียบเคียง

เหมาะสำหรับ: ตัวอย่าง RNA/DNA ที่มีปริมาณต่ำหรือปนเปื้อน

2. การตรวจคุณภาพ (quality / purity assessment)

2.1 A260/A280 ratio (spectrophotometry)

หลักการ: ตรวจความบริสุทธิ์ของ RNA/DNA โดยเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm เกณฑ์มาตรฐาน: RNA: 1.8–2.1 และ DNA: 1.8–2.0 ความหมาย: ค่า ratio ต่ำกว่า 1.8 บ่งชี้โปรตีนปนเปื้อน

2.2 electrophoresis (agarose gel / bioanalyzer)

หลักการ: แยก nucleic acid ตามขนาดโมเลกุลและดูความสมบูรณ์

ข้อดี: ตรวจ degradation ของ RNA/DNA, ตรวจ contamination

การป้องกัน contamination และการควบคุมคุณภาพในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

การป้องกันการปนเปื้อน (contamination) และการควบคุมคุณภาพ (quality control, QC) เป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการสกัดและตรวจวัดสารพันธุกรรมของไวรัส เนื่องจากตัวอย่าง RNA และ DNA มีความไวต่อการสลาย (degradation) และสามารถปนเปื้อนข้ามตัวอย่างหรือจากสิ่งแวดล้อมได้ง่าย การควบคุม contamination จึงต้องอาศัยการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการมาตรฐานชีวอนามัย (BSL-2 หรือ BSL-3 ตามชนิดไวรัส) การใช้อุปกรณ์แยกสำหรับ pre-PCR และ post-PCR การเปลี่ยนปิเปตและ tip แบบ sterile พร้อม filter tips และการทำงานภายใต้ biosafety cabinet ช่วยลดความเสี่ยงของ cross-contamination (Kwok and Higuchi, 1989) นอกจากนี้การควบคุมคุณภาพของขั้นตอนการสกัดและการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมควรรวมถึงการใช้ positive control และ negative control สำหรับทุก batch ของการสกัด เพื่อยืนยันความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของผลทดสอบ การตรวจสอบ RNA/DNA integrity และ purity อย่างสม่ำเสมอ เช่น การวัดค่า A260/A280 และการประเมิน RIN (RNA integrity number) สำหรับ RNA ช่วยให้เห็นใจว่าสารพันธุกรรมที่ได้มีคุณภาพเพียงพอ (Wilfinger et al., 1997; Schroeder et al., 2006)

ตารางที่ 11 รูปแบบของวิธีการตรวจวัดคุณภาพและความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไวรัสที่บริสุทธิ์ (Wilfinger et al., 1997; Schroeder et al., 2006; Gallagher 2011)

วิธีการ	หลักการ	ตัวอย่างชุดตรวจ / อุปกรณ์	ข้อดี	ข้อเสีย
spectrophotometry (nanodrop)	วัดการดูดกลืนแสงที่ 260 nm (A260) เพื่อหาความเข้มข้นของ RNA/DNA และตรวจ purity ด้วยอัตราส่วน A260/A280	nanodrop spectrophotometer	- รวดเร็วและง่าย - ใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย - ประเมินความบริสุทธิ์ได้	- ไม่สามารถแยกสิ่งเจือปน เช่น โปรตีน หรือ phenol ได้ - ความไวต่ำสำหรับตัวอย่างเข้มข้นต่ำ
fluorometric assays (Qubit, PicoGreen, RiboGreen)	ใช้สียฟลูออเรสเซนต์ที่จับกับ RNA/DNA; ความเข้มของ fluorescence เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้น	Qubit RNA/DNA Assay Kit, PicoGreen, RiboGreen	- ความไวสูง - แม่นยำสำหรับตัวอย่างที่มีกรดนิวคลีอิกความเข้มข้นต่ำ - มีค่า bias จากสิ่งเจือปนต่ำ	- ต้องใช้ reagent และสารมาตรฐาน (standard) - ใช้เวลามากกว่า spectrophotometry เล็กน้อย
agarose gel electrophoresis	แยก nucleic acids ตามขนาดโมเลกุล; ตรวจ degradation และ contamination	agarose gel + ethidium bromide หรือ SYBR safe	- ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ RNA/DNA โดยตรง - ตรวจพบการ degradation หรือสิ่งเจือปน	- เป็น qualitative หรือ semi-quantitative - ต้องเตรียมเจลและใช้เครื่อง imaging
automated electrophoresis (Bioanalyzer, TapeStation)	microfluidics-based electrophoresis; ให้ค่า RNA integrity number (RIN) สำหรับ RNA	Agilent Bioanalyzer, TapeStation	- มีความ reproducibility สูง - ประเมิน integrity ในเชิงปริมาณได้ - ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย	- อุปกรณ์และ consumables มีราคาแพง - throughput จำกัดต่อรอบ

เอกสารอ้างอิง

- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., ...and Mueller, J. F. (2020). First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.*, 728, 1–8. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138764
- Bergallo, M., Costa, C., Gribaudo, G., Tarallo, S., Baro, S., Negro Ponzi, A. and Cavallo, R. (2006). Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol.*, 29(2), 111–119
- Bibby, K. and Peccia, J. (2013). Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 47(4), 1945–1951. doi:10.1021/es305181x
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1), 156–159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Conceição-Neto, N., Zeller, M., Lefrère, H., De Bruyn, P., Beller, L., Deboutte, W., ...and Matthijnsens, J. (2015). Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: A reproducible protocol for virome analysis. *Sci. Rep.*, 5, 1–14.
- Damen, M., Sillekens, P., Sjerps, M., Melsert, R., Frantzen, I., Reesink, H. W., Lelie, P. N. and Cuypers, H. T. (1998). Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. *J. Virol. Methods*, 72(2), 175–184. doi:10.1016/S0166-0934(98)00024-X
- Fomsgaard, A. S., Belsham, G. J., Bødker, R., Rasmussen, T. B. and Bøtner, A. (2022). Improvements in metagenomic virus detection by simple pretreatment methods. *J. Clin. Virol. Plus*, 2(4), 1–7. doi:10.1016/j.jcvp.2022.100120
- Hall, R. J., Wang, J., Todd, A. K., Bissielo, A. B., Yen, S., Strydom, H., ...and Peacey, M. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J. Virol. Methods*, 195, 194–204. doi:10.1016/j.jviromet.2013.08.035
- Hansson, O., Valgren, C. and Wester, S. (2008). Proteinase K challenged by a novel protease. *Res. Artic.*, 1(1), 32–34. doi:10.1016/j.fsigss.2007.10.207
- Gallagher, S. R. (2011). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr. Protoc. Neurosci.*, 1–14. doi:10.1002/0471142301.nsa01ks56
- Konz, J. O., Lee, A. L., Lewis, J. A. and Sagar, S. L. (2005). Development of a purification process for adenovirus: Controlling virus aggregation to improve the clearance of host cell DNA. *Biotechnol. Prog.*, 21(2), 466–472. doi:10.1021/bp049644r
- Kwok, S. and Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237–238. doi:10.1038/339237a0
- NEB. (2025). Protocol for manual isolation of viral DNA/RNA in microfuge tubes. New England Biolabs. [Online] Available: <https://www.neb.com/protocols/2024/01/09/protocol-for-manual-isolation-of-viral-dna-rna-in-microfuge-tubes-1-5-or-2-ml>. Accessed August 1, 2025
- Polo, D., Quintela-Balaja, M., Corbishley, A., Jones, D. L., Singer, A. C., Graham, D. W. and Romalde, J. L. (2020). Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – Approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Res.*, 186, 1–10. doi:10.1016/j.watres.2020.116404
- Qiagen. (2025). QIAamp Viral RNA Mini Kit. Qiagen. [Online] Available: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/rna/viral-rna/qiaamp-viral-rna-mini-kit>. Accessed August 1, 2025
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ...and Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.*, 7, 1–14. doi:10.1186/1471-2199-7-3
- Shi, H. and Bressan, R. (2006). RNA extraction. *Methods Mol. Biol.*, 323, 345–348. doi:10.1385/1-59745-003-0:345
- Shi, M., Lin, X.-D., Tian, J.-H., Chen, L.-J., Chen, X., Li, C.-X., ...and Zhang, Y.-Z. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540(7634), 539–543. doi:10.1038/nature20167
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., ...and Zhang, Y.-Z. (2019). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2. *Lancet Infect. Dis.*, 20(5), 565–574. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1
- Victoria, J. G., Kapoor, A., Li, L., Blinkova, O., Slikas, B., Wang, C., ...and Delwart, E. (2009). Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J. Virol.*, 83(9), 4642–4651.

- Vutukuru, M. R., Sharma, D. K., Chakraborty, I., Mukhopadhyay, D. and Mitra, N. (2025). A rapid and high-yield method for nucleic acid extraction. *Sci. Rep.*, 15, 1–14. doi:10.1038/s41598-025-95226-0
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. doi:10.2144/97223st01
- Wozniak, A., Cerda, A., Ibarra-Henríquez, C., Sebastian, V., Armijo, G., Lamig, L., ...and García, P. (2020). A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. *Sci. Rep.*, 10, 1–8. doi:10.1038/s41598-020-73616-w
- Wright, E., Kawka, K., Medina, M. F. C. and Latulippe, D. R. (2022). Evaluation of host cell impurity effects on the performance of sterile filtration processes for therapeutic viruses. *Membranes*, 12(4), 1–17. doi:10.3390/membranes12040359
- Wyllie, A. L., Fournier, J., Casanovas-Massana, A., Campbell, M., Tokuyama, M., Vijayakumar, P., ... Ko, A. I., Ott, I. M., Fauver, J. R. (2020). Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.*, 383(13), 1283–1286. doi:10.1056/NEJMc2016359
- Zhu, Y., Yang, T., Chen, Y., Fan, C. and Yuan, J. (2013). The smart solution for DNA removal in biopharmaceutical production by Benzonase Endonuclease. *J. Appl. Virol.*, 2(1), 25–30. doi:10.21092/jav.v2i1.26

