เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาในงานโรคติดเชื้อ

ชญาภรณ์ ศรัณพฤฒิ*

บทคัดย่อ

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา วงการวิทยาศาสตร์หันมาให้ความสนใจเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมมากขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางความคิดและวิทยาการทางอณูชีววิทยา นำไปสู่เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่ เพื่อพัฒนาศักยภาพของจุลชีพและสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ให้เอื้อประโยชน์ต่อมวลมนุษยชาติ โดยอาศัยคุณสมบัติของยีนซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรม มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันและเป็นเอกลักษณ์ และมีความสำคัญต่อการกำหนดพฤติกรรมและลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ องค์ความรู้ทางอณูชีววิทยานำมาประยุกต์ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมและงานวิจัย อาทิ งานด้านการวินิจฉัย เภสัชกรรม การผลิตวัคซีน และการตรวจจับทางชีวภาพ เทคนิคทางอณูชีววิทยานำมาพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่ ก) การจับคู่สม ใช้ดีเอนเอตรวจสอบจับอย่างจำเพาะกับสายนิวคลีโอไทด์ของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจ ข) การเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลิอิก มีการพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์โดยเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลิอิกได้เป็นหลายล้านชุดในเวลารวดเร็ว วิธีนี้มีประโยชน์ในกรณีที่เชื้อในตัวอย่างส่งตรวจมีปริมาณน้อยมากหรือเชื้อที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ค) การตรวจลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความจำเพาะในจุลชีพแต่ละสายพันธุ์ เพื่อแยกแยะความใกล้เคียงของเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ ง) การตัดกรดนิวคลิอิกด้วยเอนไซม์จำเพาะ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสายดีเอนเอให้เป็นท่อนสั้น ๆ หลังจากการแยกในวุ้นแข็งที่ผ่านกระแสไฟฟ้า จำนวนและขนาดของสายดีเอนเอที่ถูกตัด มีลักษณะจำเพาะของจุลชีพหนึ่ง ๆ เทคนิคทางอณูชีววิทยานำมาพัฒนางานด้านเภสัชกรรม โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยและประหยัดกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเนื้อเยื่อสัตว์ เทคนิคทางอณูชีววิทยานำมาพัฒนาการผลิตวัคซีน โดยมีการนำยีนเข้าเซลล์ยีสต์หรือแบคทีเรีย จากนั้นเซลล์ดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีนปริมาณมากเพื่อใช้สำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เมื่อไม่นานมานี้มีการใช้วัคซีนชนิดดังกล่าวป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี และมะเร็งปากมดลูกในมนุษย์ ส่วนเทคนิคทางอณูชีววิทยานำมาพัฒนาการตรวจจับทางชีวภาพ ได้แก่ การตรวจหาร่องรอยของการได้รับอาวุธชีวภาพซึ่งต้องอาศัยการตรวจที่มีความไวสูง

คำสำคัญ: อณูชีววิทยา โรคติดเชื้อ พันธุวิศวกรรม พีซีอาร์ สารพันธุกรรม

วารสารสาธารณสุขศาสตร์ 2552; 39(2): 199-213.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

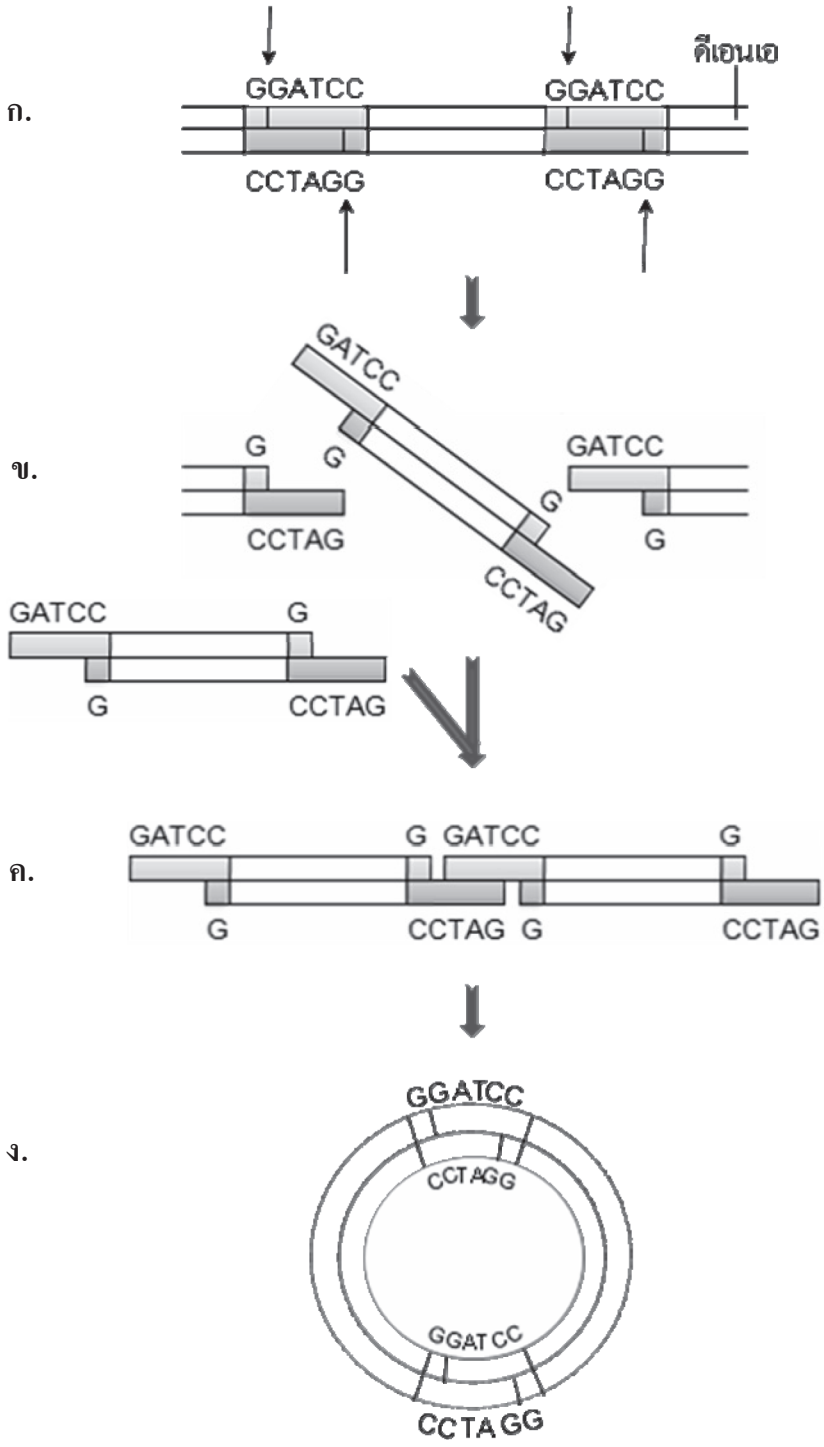
ในยุคเริ่มแรกของเทคโนโลยีชีวภาพ จุลชีพถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหาร ได้แก่ ไวน์ น้ำส้มสายชู โยเกิร์ต และยังใช้จุลชีพในการผลิตอาหารต่อมานานนับศตวรรษ จนกระทั่งเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่เริ่มพัฒนาอย่างจริงจังในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากทางแนวความคิดและเทคนิคทางอณูชีววิทยา มีการนำเทคโนโลยีดีเอนเอสายผสม (Recombinant DNA technology) มาพัฒนาศักยภาพของแบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ และเชื้อราให้เป็นเสมือนโรงงานผลิตสารชีวภาพขนาดย่อม การนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในพืชและสัตว์ และการผลิตโปรตีน วัคซีน และเอนไซม์ เพื่อใช้ในทางการแพทย์[1] และการสาธารณสุขทั้งระดับปฐมภูมิและทุติยภูมิ โดยเฉพาะการตรวจวินิจฉัยเชื้อที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในผู้ป่วยและชุมชน ในบทความนี้จะอธิบายถึงสาระสำคัญเกี่ยวกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ สาธารณสุขและเภสัชกรรมโดยเน้นเกี่ยวกับโรคติดเชื้อเป็นสำคัญ

พันธุวิศวกรรม

พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) มีต้นกำเนิดจาก genetic recombination หมายถึงการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต เพื่อเปลี่ยนลักษณะหรือเพื่อให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (โดยทั่วไปเป็นโปรตีน) ซึ่งเดิมก่อนมีการเปลี่ยนแปลงสิ่งมีชีวิตนั้นไม่สามารถสร้างได้[2]

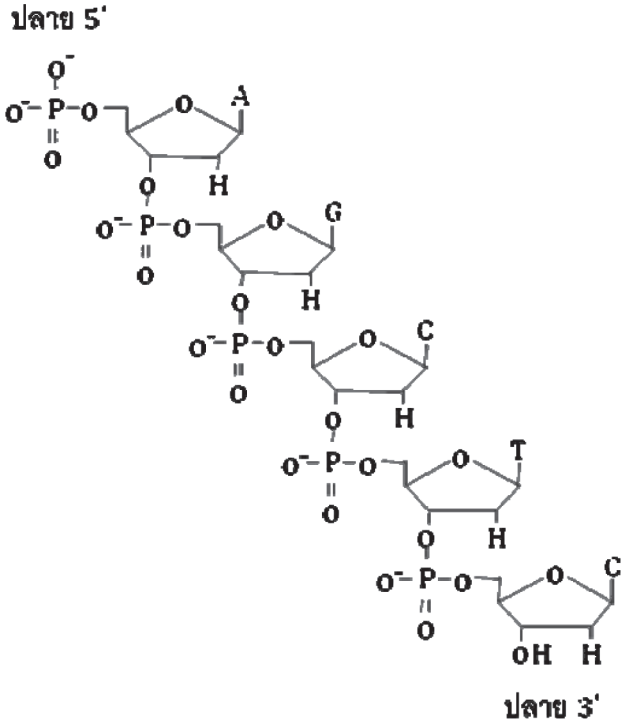
การบุกเบิกงานด้านพันธุวิศวกรรมเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1971 เมื่อ Berg และคณะแห่งมหาวิทยาลัยสแตนฟอร์ด แคลิฟอเนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา นำดีเอนเอ (DNA หรือ Deoxyribonucleic acid) ที่ได้จากไซเมียนไวรัส-40 (Simian virus-40; SV-40) มาตัดต่อเข้ากับโครโมโซมของแบคทีเรียเพื่อสร้างดีเอนเอสายผสม ในช่วงเวลาเดียวกัน Boyer และคณะแห่งมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย เมืองซานฟรานซิสโก ได้แยกเอนไซม์ที่เรียกว่า restriction endonuclease ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษสามารถตัดสายดีเอนเอที่ตำแหน่งจำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ทำให้ส่วนปลายของสายดีเอนเอเป็นสายเดี่ยวสั้นๆ เรียกว่า sticky ends ซึ่งพร้อมที่จะต่อกันใหม่อีกครั้งกับสายดีเอนเอที่จำเพาะต่อกัน[2] (ภาพที่ 1)

ดีเอนเอประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายหน่วยต่อกันเป็นเส้นยาวและเป็นสายคู่ แต่ละหน่วยของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบสและกลุ่มฟอสเฟต เชื่อมกับเบสหนึ่งชนิด คือ อะดินีน (A) กวานีน (G) ไซโตซีน (C) หรือไธมีน (T) (ภาพที่ 2) การเรียงลำดับเบสในสายดีเอนเอเหมือนกัน ไม่ว่าจะอ่านจากซ้ายไปขวาหรือขวาไปซ้าย (palindrome) เอนไซม์จึงตัดดีเอนเอได้ทั้งสองสาย ดังนั้นนักพันธุวิศวกรรมจึงใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเสมือนเป็นกรรไกรในการตัดสายดีเอนเอ และแทรกชิ้นส่วนดีเอนเอจากสิ่งมีชีวิตอื่นโดยใช้เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ดีเอนเอไลเกส (DNA ligase) เชื่อมดีเอนเอทั้งสองสายเข้า ก. เอนไซม์จำเพาะตัดดีเอนเอสายคู่ที่ตำแหน่งจำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ ข. ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ได้มี sticky ends ที่ปลายทั้งสองข้าง ค. ดีเอนเอนั้นสามารถต่อกันใหม่อีกครั้งกับสายดีเอนเอ



ภาพที่ 1 เทคโนโลยีดีเอนเอสายผสม (Recombinant DNA Technology)

จากแหล่งอื่นที่จำเพาะต่อกัน ได้แก่ พลาสมิด ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันหรือเอนไซม์ที่ตัดแล้วได้ sticky ends เหมือนกัน ง. ดีเอนเอไลเกสเชื่อมดีเอนเอทั้งสองสายเข้าด้วยกันได้ดีเอนเอสายผสมด้วยกัน โดยปกติ



ภาพที่ 2 โครงสร้างของดีเอนเอ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายหน่วยต่อเป็นเส้นยาว

แล้วเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เชื่อมชิ้นส่วนดีเอนเอในระหว่างการสร้างและการซ่อมแซมส่วนของดีเอนเอของสิ่งมีชีวิตอยู่แล้ว

ปัจจุบันเอนไซม์สำหรับตัดสายดีเอนเอจำนวนมากแยกได้จากแบคทีเรียการตั้งชื่อของเอนไซม์เหล่านี้จึงตั้งตามชื่อของจุลชีพที่แยกเอนไซม์มา เช่น เอนไซม์ *Eco*RI (*Escherichia coli* Restriction enzyme I) แยกได้จากแบคทีเรีย *E. coli* เป็นต้น

เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมอีกประการหนึ่งคือ การใส่ดีเอนเอหรือพลาสมิด (ดีเอนเอสายสั้น ๆ ที่อยู่นอกโครโมโซมมีลักษณะเป็นวง) เข้าไปในเซลล์ในปี ค.ศ. 1968 Cohen แห่งมหาวิทยาลัยสแตนฟอร์ด ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับพลาสมิดของ *E. coli* แยกพลาสมิดและนำพลาสมิดไปใส่ใน *E. coli* ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยแช่ *E. coli* ในแคลเซียมคลอไรด์และให้ความร้อนในทันที ทำให้ *E. coli* พร้อมที่จะรับพลาสมิดเข้าไปด้วยกระบวนการทรานสฟอร์เมชัน (transformation process) พลาสมิดที่เข้าสู่เซลล์แล้วสามารถเพิ่มจำนวนทันทีที่เข้าไปในเซลล์ โดยพลาสมิดที่เพิ่มขึ้นจะมีลักษณะเหมือน ๆ กัน ต่อมาในปี ค.ศ. 1972 Boyer และ Cohen ได้ทดลองตัดต่อยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้ากับพลาสมิด โดยแยกพลาสมิดจาก *E. coli* และตัดพลาสมิดนั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นจึงเชื่อมชิ้นส่วนของดีเอนเอที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นแทรกเข้าไปในพลาสมิดที่ตัดเตรียมไว้โดยใช้เอนไซม์ดีเอนเอไลเกส แล้วใส่พลาสมิดนั้นเข้าไปใน *E. coli*[2]

และในปี ค.ศ. 1973 การตัดต่อยีนจาก *Staphylococcus aureus* เข้าสู่ *E. coli* ประสบความสำเร็จ ทำให้วงการวิทยาศาสตร์เห็นความสำคัญและหันมาสนใจพันธุวิศวกรรมอย่างจริงจังมากขึ้น และมีการพัฒนาเทคโนโลยีดังกล่าวจนสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ที่สำคัญประการหนึ่งคือ การพัฒนาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

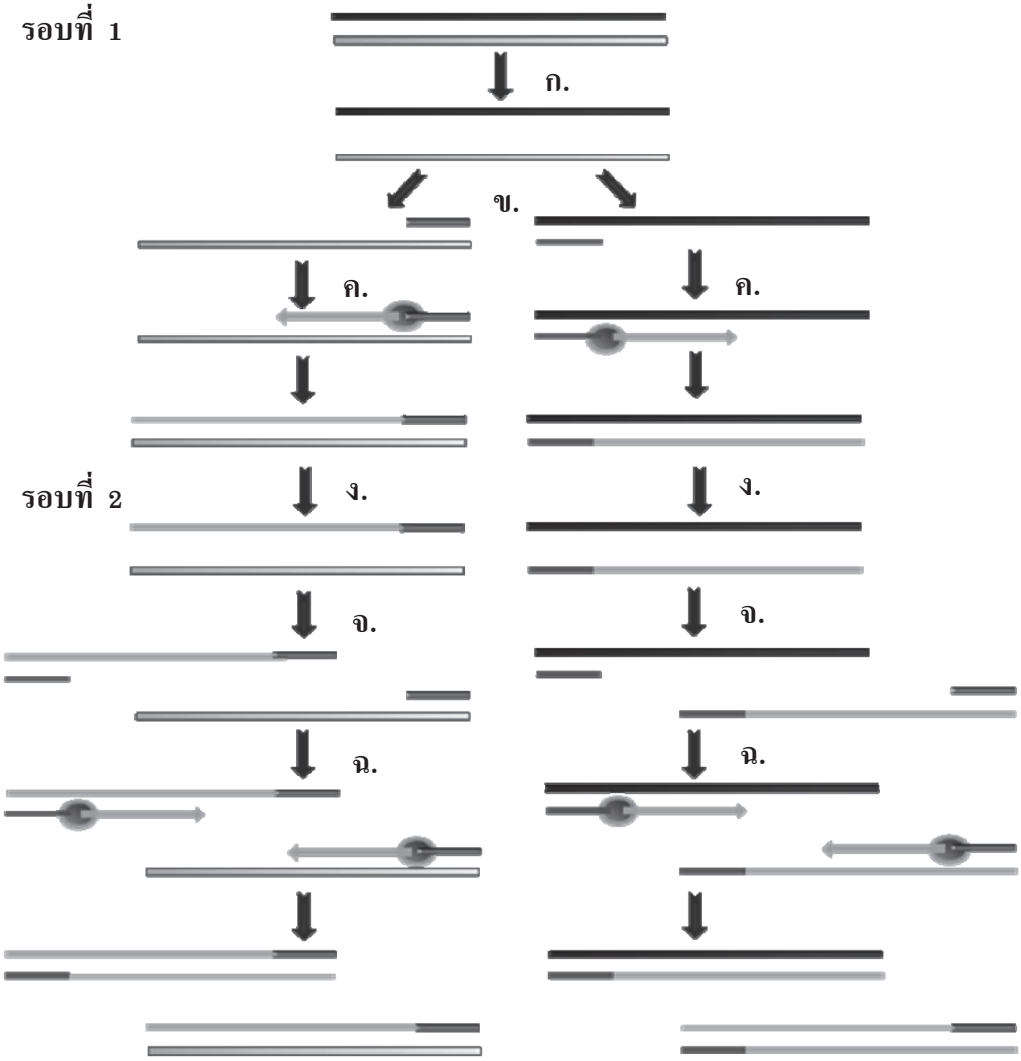
จุลชีพแต่ละชนิดรวมทั้งแบคทีเรียมีดีเอนเอหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์จำเพาะเปรียบเสมือนเอกลักษณ์ลายนิ้วมือของคน และด้วยความแตกต่างและความเป็นเอกลักษณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างแม่นยำ การตรวจทางอณูชีววิทยาใช้เทคนิค 4 วิธีการหลัก ดังนี้

1. การจับคู่สม (Hybridization) เป็นการจับคู่ของเบสบนกรดนิวคลิอิกสองเส้นอย่างเหมาะสม ซึ่งอะดินีนจะจับกับไธมีน และกวานีนจะจับกับไซโตซีนเสมอ การที่กรดนิวคลิอิกสองเส้นจะจับเข้าคู่กันได้พอดีจำเป็นต้องมีลำดับการเรียงตัวของเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น ด้วยหลักการนี้จึงนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุ โดยใช้ดีเอนเอตรวจสอบ (DNA probes) ซึ่งเป็นดีเอนเอสายเดี่ยวสั้น ๆ สามารถจับ (hybridize) อย่างจำเพาะกับสายนิวคลีโอไทด์ของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจ การผลิตดีเอนเอตรวจสอบต้องทราบก่อนว่าดีเอนเอส่วนใดหรือยีนใดที่เป็นเป้าหมายจำเพาะของตัวตรวจสอบ จากนั้นจึงใช้ข้อมูลดังกล่าวสร้างดีเอนเอตรวจสอบสายเดี่ยวขึ้นมา แล้วจึงนำมาทดสอบกับดีเอนเอที่เตรียมจากเชื้อจุลชีพที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ถ้าสองเส้นสามารถจับกันได้แสดงว่าเชื้อจุลชีพที่สงสัยเป็นเชื้อชนิดเดียวกับเชื้อจุลชีพที่นำมาเป็นตัวตรวจสอบ วิธีการจับคู่สมนี้นอกจากจะเป็นการจับในลักษณะดีเอนเอ-ดีเอนเอ อาจเป็นการจับในลักษณะอื่นได้ได้แก่ อาร์เอนเอ-อาร์เอนเอ หรือดีเอนเอ-อาร์เอนเอก็ได้ เมื่อมีการจับคู่สมของสองเส้นแล้ว เรายังไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ถ้าเช่นนั้นแล้วจะทราบได้อย่างไรว่าเกิดการจับคู่แล้ว? ในอดีตนิยมใช้สารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P, ^{125}I หรือ ^{35}S) นำมาติดฉลากกับดีเอนเอตรวจสอบและอ่านผลด้วยฟิล์มเอกซเรย์ การใช้สารกัมมันตภาพรังสีมีอันตราย ในปัจจุบันจึงนิยมใช้สารเคมี เช่น biotin หรือ digoxigenin ติดฉลากกับดีเอนเอตรวจสอบแทน การอ่านผลได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับสารเคมีเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำให้เกิดสีหรือการเรืองแสงได้ การเปลี่ยนแปลงของสีหรือการเรืองแสงสามารถวัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือเครื่องวัดการเรืองแสง ได้แก่ fluorometer, luminometer และ flow cytometer เป็นต้น

วิธีการจับคู่สม สามารถทำได้ 3 รูปแบบ คือ solid-phase hybridization, liquid-phase hybridization และ *in situ* hybridization การทำ solid-phase hybridization กรดนิวคลิอิกเป้าหมายถูกตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนหรือไนโตรเซลลูโลส การทำ liquid-phase hybridization กรดนิวคลิอิกเป้าหมายและตัวตรวจสอบอยู่ในสารละลาย ส่วนการทำ *in situ* hybridization เป็นการตรวจหากรดนิวคลิอิกเป้าหมายที่อยู่ภายในเซลล์ และสามารถประยุกต์ในสิ่งส่งตรวจหรือเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยได้ โดยทั่วไปเซลล์เหล่านั้นถูกตรึงอยู่บนแผ่นกระจกสไลด์ และสามารถตรวจดูผลจากการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า fluorescent *in situ* hybridization (FISH) ปัจจุบันการพัฒนาดีเอนเอตรวจสอบสำหรับตรวจหาจุลชีพก่อโรคมีมากกว่า 100 ชนิด จึงนับว่าการใช้ดีเอนเอตรวจสอบเป็นวิธีที่เชื่อถือได้และรวดเร็วในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในคน ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคการจับคู่สมในงานวินิจฉัยโรคติด

เชื้อ ได้แก่ การตรวจอย่างรวดเร็วและการแจงนับแบคทีเรียมีชีวิตในแหล่งน้ำ โดยใช้ peptide nucleic acid probe[3] การตรวจหา *Helicobacter pylori* ในสิ่งส่งตรวจโดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization[4] และการตรวจหา *Legionella* ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิค FISH[3] วิธีการจับคู่สมมีข้อดีในเรื่องระดับความจำเพาะที่สูง แต่ยังมีข้อจำกัดด้านความไว (ต้องมีดีเอนเอเป้าหมาย > 10^4โมเลกุล) ดังนั้นในบางกรณีจึงต้องทำการตรวจร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาอื่น ๆ เพื่อยืนยันผลการตรวจด้วย

2. การเพิ่มจำนวนกรดนิวคลิอิก (Amplification) การเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลิอิกที่มีจำนวนน้อยให้มากขึ้น สามารถทำได้และมีประโยชน์อย่างมากในกรณีที่เชื้อในตัวอย่างส่งตรวจมีปริมาณน้อยเกินไปที่จะตรวจพบได้โดยวิธีการจับคู่สม การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิกนี้อาจเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมาย หรือตัวตรวจสอบ หรือสัญญาณก็ได้ โดยใช้วิธีการที่เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลิอิกจาก 1 ชุดเป็นสิบล้านชุดได้ในเวลารวดเร็ว ผลผลิตของพีซีอาร์เรียกว่าแอมพลิคอน (amplicon) ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก (ภาพที่ 3) ขั้นตอนแรก เรียกว่า การแยกสายดีเอนเอด้วยความร้อน (heat denaturation) เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิในการแยกดีเอนเอสายคู่ให้เป็นดีเอนเอสายเดี่ยว (melting temperature) โดยดีเอนเอตั้งต้น (DNA template หรือ DNA target) ทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์สายดีเอนเอใหม่ต่อไป ขั้นตอนที่สอง เรียกว่า การเชื่อมไพรเมอร์เข้ากับสายดีเอนเอ (primer annealing) ใช้ไพรเมอร์ (primers) ซึ่งเป็นกรดนิวคลิอิกสายสั้นจับคู่สมที่ปลาย 3' ของดีเอนเอต้นแบบ และขั้นตอนที่สาม เรียกว่า การสร้างสายดีเอนเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยใช้เอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสทำหน้าที่เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เข้ากับไพรเมอร์ตามลำดับสอดคล้องกับดีเอนเอต้นแบบ จนได้ดีเอนเอสายใหม่ (complementary strands) ในปฏิกิริยาใช้ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟส (dNTP) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม หลังจากการสังเคราะห์แต่ละรอบดีเอนเอสายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะเป็นต้นแบบสำหรับสร้างดีเอนเอสายใหม่ในรอบถัดไปด้วย ดังนั้นจำนวนรอบที่มากขึ้น ทำให้ได้แอมพลิคอนที่มากขึ้นแบบทวีคูณตามไปด้วย การทำพีซีอาร์โดยทั่วไปใช้ 25-30 รอบ ทำในหลอดทดลองขนาดเล็ก และใช้เครื่อง thermalcycler แบบอัตโนมัติ ซึ่งสามารถตั้งอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของการทำพีซีอาร์ได้ เอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสที่นำมาใช้ได้จากแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ในน้ำพุร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส เช่น *Thermus aquaticus* ประสิทธิภาพของเอนไซม์จึงไม่ถูกทำลายในเวลารวดเร็วเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขณะทำพีซีอาร์ ก. และ ง. บ่มดีเอนเอเป้าหมายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อแยกดีเอนเอเป็นสายเดี่ยว ข. และ จ. บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ 2 เส้น จับกับดีเอนเอสายเดี่ยว ค. และ ฉ. บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อสังเคราะห์ดีเอนเอสายใหม่ต่อ ๆ ไป



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์

ในปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ได้รับการพัฒนาในรูปแบบต่างๆ เพื่อให้มีความจำเพาะและความไวมากขึ้นสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่

ก. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้อาร์เอนเอตั้งต้น เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ดีเอนเอ โดยใช้เอนไซม์รีเวอรสทรานสคริปเตส (reverse transcriptase) หรือดีเอนเอโพลีเมอเรสที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์รีเวอรสทรานสคริปเตส[5] ก่อนเริ่มกระบวนการพีซีอาร์ตามปกติ

ข. Nested PCR เป็นการทำพีซีอาร์ 2 ครั้ง และใช้ไพรเมอร์ครั้งละ 1 คู่ โดยออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ครั้งแรกให้จำเพาะกับดีเอนเอเป้าหมาย ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้ในพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ออกแบบให้อยู่ในส่วนของแอมพลิคอนที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในครั้งแรก และใช้แอมพลิคอนจากพีซีอาร์ครั้งแรกนั้นเป็นดีเอนเอตั้งต้นสำหรับทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ซึ่งวิธีนี้ช่วยเพิ่มความจำเพาะของเทคนิคพีซีอาร์

ค. Multiplex PCR เป็นการทำพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไปในแต่ละปฏิกิริยา โดยต้องเลือกอุณหภูมิที่ใช้ให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่นำมาใช้ทั้งหมด โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ต้องได้รับการออกแบบให้จำเพาะกับดีเอนเอเป้าหมายที่แตกต่างกันไป เทคนิคนี้จึงเป็นประโยชน์ในการตรวจคุณภาพตัวอย่างที่มีจุลชีพหรือดีเอนเอเป้าหมายมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป

ง. Real-time PCR สามารถตรวจดีเอนเอที่เพิ่มขึ้นในขณะทำพีซีอาร์ได้โดยมี 2 หลักการในการตรวจแอมพลิคอนที่เพิ่มขึ้น คือการใช้ดีเอนเอซึ่งติดสารเรืองแสง (DNA-binding fluorophores) เช่น SYBR Green, ethidium bromide และ YO-PRO-1 และการใช้ตัวตรวจสอบจำเพาะ (specific oligoprobes) ที่มี fluorescence reporter (R) และ quencher (Q) ซึ่งวิธี real-time PCR ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการตรวจสอบโดยบอกทั้งปริมาณและคุณภาพ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือที่ยังคงมีราคาสูง

ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์ในงานวินิจฉัยโรคติดเชื้อได้แก่ การตรวจคัดกรองผู้เป็นพาหะ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) อย่างรวดเร็วโดยวิธีพีซีอาร์[6], การตรวจหา *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* และ *Haemophilus influenzae* ในเลือดและน้ำไขสันหลังโดยใช้เทคนิค fluorescence-based PCR[3], การตรวจหา *Legionella* ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม โดยใช้เทคนิค nested PCR[7], การตรวจหายีนวีโรทอกซิน VT1 และ VT2 ใน *E. coli* O157:H7 ในเนื้อบดโดยใช้เทคนิค real-time PCR[3], การตรวจหา *Burkholderia pseudomallei* ในดินโดยวิธี real-time PCR[8], การตรวจหา *Helicobacter pylori* ในสิ่งส่งตรวจโดยใช้เทคนิค real-time RT-PCR[4] และการตรวจหา MRSA โดยใช้ hybridization probe ในการทำ real-time PCR[3]

วิธีพีซีอาร์มีข้อจำกัดและข้อควรระวัง เนื่องจากการตรวจหาเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารอาจมีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), ฮีม (heme), ฟีนอล (phenol) และสารที่มีประจุไฟฟ้า (cations)[5] การลดปริมาณสารยับยั้งจะช่วยป้องกันการเกิดผลลบปลอม นอกจากนี้ในการทำพีซีอาร์ควรมีตัวอย่างที่ทราบแล้วว่าให้ผลบวกหรือผลลบเพื่อเป็นตัวควบคุม โดยทำควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกครั้ง ซึ่งจะทำให้ผลตรวจตัวอย่างมีความน่าเชื่อถือ การเกิดผลบวกปลอมเป็นสิ่งที่ต้องระวังเช่นกัน เนื่องจากอาจเกิดขึ้นได้ง่ายจากการปนเปื้อนจากหลอดหนึ่งไปอีกหลอดหนึ่งในระหว่างการปฏิบัติงาน

นอกจากเทคนิคพีซีอาร์แล้ว ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้หลักของการแทนที่ (strand

displacement) ซึ่งไพรเมอร์ถูกออกแบบเป็นพิเศษอย่างน้อย 4 เส้น (2 คู่) และใช้เอนไซม์บีเอสทีดีเอนเอโพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดการแทนที่ของดีเอนเอทำให้แอมพลิคอนสามารถแยกออกจากกันได้ โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในขั้นตอนการแยกดีเอนเอ ดังนั้นจึงสามารถใช้เพียงอุณหภูมิเดียวตลอดปฏิกิริยาได้ (65 องศาเซลเซียส) มีรายงานการใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ (Herpes Simplex Virus)[9] ปัจจุบันบริษัทไอเคน (Eiken) ได้พัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป[10] ด้วยวิธี LAMP สำหรับตรวจ *Legionella*, *Salmonella*, verotoxin-producing *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* และ Norovirus GI/GII

3. การตรวจลำดับเบสของดีเอนเอ (DNA sequencing) ในการตรวจลำดับการเรียงตัวของเบสบนสายดีเอนเอหรือยีนซึ่งมีความจำเพาะในจุลชีพแต่ละสายพันธุ์ สามารถแยกแยะความใกล้เคียงของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ ในปัจจุบันมีเครื่องตรวจระบบอัตโนมัติทำให้ง่ายและสะดวกในการปฏิบัติงานตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคนี้ในงานวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่ การตรวจหา *Legionella* ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม[11] และการตรวจหาโปรตีนเพื่อการตรวจวินิจฉัย *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* โดยการวิเคราะห์ยีนทั้งหมด (whole genome analysis)[3] เป็นต้น

4. การตัดกรดนิวคลิอิกด้วยเอนไซม์ (Enzymatic digestion) วิธีนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัดสายดีเอนเอในตำแหน่งของกรดนิวคลิอิกที่มีการเรียงตัวที่จำเพาะ (ขนาดประมาณ 4-6 นิวคลีโอไทด์) ให้เป็นท่อนสั้นๆ แล้วนำไปแยกในวุ้นแข็งที่ผ่านกระแสไฟฟ้า ดีเอนเอจะวิ่งตามกระแสไฟฟ้าด้วยความเร็วต่างกันตามขนาดของสายดีเอนเอที่ถูกตัด เมื่อย้อมด้วยสาร ethidium bromide จะมองเห็นแถบดีเอนเอได้เมื่อส่องกับแสงอัลตราไวโอเลต จำนวนและขนาดของสายดีเอนเอที่ถูกตัดมีลักษณะจำเพาะของจุลชีพหนึ่งๆ และต่างจากจุลชีพชนิดอื่นๆ วิธีนี้นิยมใช้วิเคราะห์แยกความแตกต่างของจุลชีพที่มีความใกล้เคียงกันของสายพันธุ์ของเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคนี้ในงานโรคติดเชื้อได้แก่ การศึกษาวิทยาการระบาดของไวรัสตับอักเสบชนิดบี[12]

การวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาเพื่อการตรวจวินิจฉัย นับว่ามีความสำคัญต่อวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ในประเทศไทยอย่างมาก อาทิ ดร.แพทย์หญิงปนิษฎี อวิรุทธ์นันท์ จากหน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ร่วมกับ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ได้พัฒนาการตรวจและการพยากรณ์การเกิดโรคไข้เลือดออกชนิดรุนแรง ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการรักษาพยาบาลได้ทันท่วงที ช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการหมดสติ และเสียชีวิตในรายที่ป่วยหนัก ชุดตรวจนี้ได้รับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและเยอรมัน และขณะนี้อยู่ระหว่างการพัฒนารูปแบบการทดสอบให้ง่ายและรวดเร็วขึ้นไบโอเทค และ มหาวิทยาลัยมหิดล สนับสนุน รองศาสตราจารย์ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยวัณโรคแบบทราบผลเร็ว โดยตรวจหาดีเอนเอของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจเพื่อทราบชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรียในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ไบโอเทคสนับสนุน รองศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ออกแบบตัว

ตรวจจับจำเพาะในการเพิ่มจำนวนยีน และศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอนเอของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เป็นสาเหตุของโรคฉี่หนู เพื่อสามารถบ่งบอก serovar และวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปร่า ซึ่งมีประโยชน์ในการหาแหล่งต้นตอการแพร่ระบาดของเชื้อในงานด้านระบาดวิทยา

ซึ่งการเลือกใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาชนิดใดเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ขึ้นอยู่กับรายละเอียดและข้อมูลของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ว่ามีความเหมาะสมกับเทคนิคดังกล่าวมากน้อยเพียงไร นอกจากนี้ควรคำนึงถึงความสะดวกรวดเร็ว ไม่ซับซ้อน และงบประมาณที่ใช้ จึงจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์ การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาหรือเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในภาคสนามเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่น่าจับตามองและควรได้รับการสนับสนุนอย่างยิ่ง

เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่องานทางเภสัชกรรม

ปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อมีปริมาณสูงมาก ยาปฏิชีวนะที่มีจำหน่ายหลายชนิดผลิตขึ้นโดยตรงจากจุลชีพตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียหรือเชื้อราสร้างยาปฏิชีวนะได้ในปริมาณน้อยมาก ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมามีการพัฒนายาปฏิชีวนะให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่ไม่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะประเภทใหม่ๆ[2] ปัจจุบันจึงมีการดัดแปลงพันธุกรรมของจุลชีพ เพื่อให้ผลิตยาปฏิชีวนะในปริมาณที่มากขึ้น หรือดัดแปลงยาปฏิชีวนะเพื่อใช้กับจุลชีพก่อโรคที่ดื้อยาได้ ผลิตภัณฑ์ทางด้านเภสัชกรรมที่ใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการผลิตมีหลากหลาย[1] ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. coli* ได้แก่ Epidermal growth factor (EGF) - ใช้เพื่อรักษาบาดแผล แผลไฟไหม้ และแผลเนื่องจากฝี, Human growth hormone (hGH) - ใช้เพื่อแก้ไขการเจริญเติบโตบกพร่องในเด็ก, Human insulin - ใช้เพื่อรักษาโรคเบาหวาน, Interleukins - ใช้เพื่อควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน และรักษาโรคมะเร็ง, Relaxin - ใช้เพื่อช่วยให้ทารกคลอดง่ายขึ้น, Taxol - ใช้เพื่อรักษามะเร็งรังไข่, Tumor necrosis factor (TNF) - ใช้เพื่อให้เซลล์มะเร็งแยกตัวออกจากกัน เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. coli* และยีสต์ ได้แก่ Interferon-α- ใช้เพื่อต้านการติดเชื้อไวรัส โดยใช้ร่วมกับสารต้านไวรัสชนิดอื่น, Colony-stimulating factor (CSF) - ใช้เพื่อกระตุ้นการผลิตเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยเอดส์ รักษาลูคีเมีย, Prourokinase - ใช้เพื่อรักษาอาการหัวใจวาย เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย mammalian cell culture ได้แก่ Monoclonal antibodies - ใช้เพื่อรักษามะเร็ง การปฏิเสธอวัยวะปลูกถ่าย และใช้ในการตรวจวินิจฉัย, Bone morphogenic proteins - ใช้เพื่อกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ และช่วยในการศัลยกรรม, Tissue plasminogen activator (Activase) - ใช้เพื่อละลาย fibrin ในก้อนเลือด และรักษาอาการหัวใจวาย เป็นต้น

ในประเทศไทยมีการจัดตั้งศูนย์วิจัยเภสัชพันธุศาสตร์ โดยความร่วมมือของศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ของประเทศไทยและโรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้ดำเนินการศึกษาวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์ในโรคติดเชื้อเอชไอวี โรคธาลัสซีเมีย โรคมะเร็ง โรคลูคีเมียเฉียบพลันในเด็ก โรคระบบหลอดเลือดหัวใจ และภาวะแพ้ยาหรือภาวะไวเกินต่อยา การวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาเพื่องานทางเภสัชกรรมในประเทศไทย เริ่มพัฒนาเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ ได้แก่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) นำโดยศาสตราจารย์ ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ร่วมกับคณะวิทยาศาสตร์ และคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยเอดินเบอร์ก สหราชอาณาจักร คิดค้นยาต้านมาลาเรียชนิดใหม่ เภสัชภัณฑ์บางชนิด เช่น อิริโทรพอยเอทิน (Erythropoietin) ซึ่งอายุของสิทธิบัตรหมดลงแล้ว จึงมีการสร้างโรงงานเพื่อ

ผลิตสารดังกล่าว โดยความร่วมมือของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี นอกจากนี้ยังมีความร่วมมือของอินเดียร่วมกับหน่วยงานวิจัยในเมืองไทย (ไม่ระบุ) ในการผลิตจีเอ็มซีเอสเอฟ (GM-CSF) เพื่อใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็ง เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการผลิตยาบางชนิดอาจจะยังคงติดเงื่อนไขทางสิทธิบัตรและความเชี่ยวชาญของหน่วยงานภาครัฐ ในการพัฒนาวิทยาการระดับอณูชีววิทยาเพื่องานทางเภสัชกรรมของประเทศไทย

เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการผลิตวัคซีน

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านพันธุวิศวกรรม ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์วัคซีนมากขึ้นเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ ได้แก่ โรคมะเร็งปากมดลูก โรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี โรคหัด โรคพิษสุนัขบ้า โรคคอตีบ และโรคบาดทะยักในอดีตผู้ที่ได้รับวัคซีนตัวเป็น (live-attenuated vaccine) ซึ่งเตรียมจากจุลชีพโดยตรง มีโอกาสป่วยเป็นโรคหลังจากการได้รับวัคซีน การพัฒนาวัคซีนแบบหน่วยย่อย (subunit vaccines) ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการใช้จุลชีพทั้งตัวหรือสารพิษของจุลชีพทั้งโมเลกุล จึงไม่มีความเสี่ยงสำหรับผู้ได้รับวัคซีน วัคซีนชนิดนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของโปรตีนของเชื้อก่อโรค ผลิตขึ้นโดยการตัดต่อยีนที่สร้างโปรตีนที่ต้องการไปใส่ในโฮสต์ ได้แก่ ยีสต์ เพื่อให้ยีสต์สามารถผลิตโปรตีนของเชื้อจุลชีพก่อโรคได้ ทำให้สามารถเตรียมได้จำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ได้ง่าย[2] ตัวอย่างวัคซีนแบบหน่วยย่อย ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบชนิดบี ซึ่งเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของไวรัสตับอักเสบชนิดบี ดังนั้นผู้ได้รับวัคซีนจึงไม่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีดังเช่นในอดีต

ในช่วงที่ผ่านมามีการนำไวรัสบางชนิด เช่น vaccinia virus มาใช้ร่วมในการผลิตวัคซีน[1] โดยดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสให้สร้างโปรตีนของจุลชีพชนิดอื่นที่ส่วนผิวของไวรัส (surface protein) เมื่อนำไวรัสนี้ไปฉีดให้กับคน คนคนนั้นสามารถสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันจุลชีพอื่นได้ นอกจากนี้ยังมีการผลิตวัคซีนวีแอลพี (virus-like particle; VLP) โดยดัดแปลงพันธุกรรมของจุลชีพให้สร้างโปรตีนแคปสิดหลัก (major capsid proteins) ของไวรัส ตัวอย่างวัคซีน VLP ได้แก่ วัคซีน human papilloma virus (HPV)[13]

วัคซีนดีเอนเอ (DNA vaccines) เป็นวัคซีนแนวใหม่ที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้ในอนาคต โดยทั่วไปวัคซีนดีเอนเอเป็นพลาสมิดที่มียีนสร้างโปรตีนของไวรัส และสามารถเพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรีย ในขณะนี้ยังไม่มีวัคซีนดีเอนเอสำหรับคนออกมาวางขาย แต่การศึกษาในสัตว์ทดลองและคนแสดงให้เห็นว่าเมื่อฉีดวัคซีนดีเอนเอเข้าไปในกล้ามเนื้อ สามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ วัคซีนประเภทนี้ได้แก่ วัคซีนดีเอนเอต้านเอชไอวี ซาร์ส ไข้หวัดใหญ่ และมาลาเรีย ซึ่งอยู่ในขั้นทดสอบในมนุษย์แล้ว

ส่วนวัคซีนในรูปอาหาร (Edible vaccines) นั้น ยังคงอยู่ในขั้นทดลองเช่นกัน วัคซีนเหล่านี้พัฒนาให้อยู่ในรูปที่เป็นผลิตภัณฑ์มาจากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยกำลังเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากเด็กรับประทานดิบได้ และปลูกได้ในเขตร้อน[1]

การวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาเพื่อการผลิตวัคซีนในประเทศไทยกำลังมีการพัฒนามากขึ้น ก่อนหน้านี้ไบโอเทคได้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีน เพื่อเตรียมความพร้อมในการผลิตวัคซีนสำหรับไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) วัคซีนบางชนิด เช่น วัคซีนต้านโรคไอกรน มีการพัฒนาสายพันธุ์เชื้อสำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคไอกรน โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิตต์ บุญเฉิด ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศไทย และถ่ายโอนเทคโนโลยีไปยังบริษัท ไบโอเนท-เอเชีย คาดว่าในอีกไม่กี่ปีข้างหน้าประเทศไทยจะสามารถผลิตวัคซีนไอกรนแบบไร้เชื้อและนำมาฉีดให้เด็กไทยได้

ส่วนศูนย์พัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดล พัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบชนิดเชื้อตายจากเซลล์เพาะเลี้ยง วัคซีนรวมป้องกันคอตีบ ไอกรน บาดทะยัก และตับอักเสบชนิดบี (DTP-HP) วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกชนิดตัดต่อยีน เป็นสูตรรวมเข็มเดียวคุมได้ 4 สายพันธุ์ ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกปัจจุบันอยู่ระหว่างงานวิจัยทางคลินิกที่จังหวัดราชบุรี นอกจากนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีแผนสร้างโรงงานผลิตวัคซีนป้องกันโรคระบาด เพื่อทดลองผลิตวัคซีนโรคต่างๆ ที่ต้องเฝ้าระวังและยังไม่เคยผลิตในไทยมาก่อนได้แก่ โรคไข้หวัดใหญ่ ไข้หวัดนก ไข้เลือดออก เป็นต้น ซึ่งมีแนวโน้มประสบปัญหาด้านงบประมาณและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญ

วิทยาการระดับอณูชีววิทยา นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อวงการวัคซีน ทั้งการวิจัยและพัฒนาวัคซีนแบบหน่วยย่อย วัคซีนวีแอลพี วัคซีนดีเอนเอ และวัคซีนในรูปอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยและพัฒนาวัคซีนในรูปอาหารที่รับประทานดิบได้และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอากาศที่เหมาะสมของประเทศไทย หากงานวิจัยทางการแพทย์และสาธารณสุขของไทย สามารถพัฒนาสู่ภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมได้ น่าจะช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตในประเทศเพื่อการส่งออก และลดการขาดดุลทางการค้าของประเทศ ซึ่งอาจจะส่งผลให้เศรษฐกิจโดยรวมของประเทศดีขึ้น ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพของประเทศเป็นสำคัญ

การตรวจจับทางชีวภาพ (Biosensing)

จากเหตุการณ์ก่อการร้ายทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแอนแทรกซ์ (anthrax bioterrorism) ในปี ค.ศ. 2001 รวมถึงเหตุการณ์ที่เกี่ยวเนื่องต่อมา ส่งผลให้นักวิจัยมองหาทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วมากยิ่งขึ้นในการตรวจหาอาวุธชีวภาพ โดยพัฒนาการตรวจจับทางชีวภาพ เนื่องจากจุลชีพก่อโรคหลายชนิดมีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพได้ ผู้ที่ได้รับอาวุธชีวภาพในระยะแรกอาจไม่แสดงอาการเป็นเวลาหลายวัน และอาวุธชีวภาพบางชนิดก่อให้เกิดอาการเริ่มต้นคล้ายเป็นหวัด ดังนั้นการตรวจหาร่องรอยของการได้รับอาวุธชีวภาพจึงต้องอาศัยวิธีการตรวจที่มีความไวสูง ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้าและทราบลำดับเบสทั้งหมดของสารพันธุกรรมของจุลชีพก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ ไวรัสเอชไอวี ไวรัสโปลิโอ ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า ไวรัสโรคซาร์ส *Haemophilus influenza, Bacillus anthracis, Clostridium tetani, Escherichia coli* O157:H7, *Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma genitalium, Staphylococcus aureus, Treponema pallidum* และ *Vibrio cholera*[2,14,15] ทำให้เป็นประโยชน์มากในการออกแบบระบบการตรวจที่รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ (biosensors) หรืออุปกรณ์ที่สามารถตรวจจับและส่งสัญญาณชีวภาพออกมาโดยอุปกรณ์ดังกล่าวประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ตัวแปลงสัญญาณ และสารชีวภาพ ใช้กลไกการจดจำทางชีวภาพ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะซึ่งอาจเป็นอิเล็กตรอน แสง และอื่นๆ เข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ ซึ่งแปลงสัญญาณทางกายภาพเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเครื่องอ่านสัญญาณให้ผู้ใช้อุปกรณ์อ่านค่าได้[16] ตัวอย่างการตรวจโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ อาทิ การตรวจกลูโคสในผู้ป่วยเบาหวาน สารพิษ สารปลอมปนในอาหารส่งออก สารฆ่าแมลง โลหะหนัก สารก่อมลพิษ บีโอดี อาวุธชีวภาพ เชื้อก่อโรคพี่พบในดิน อาหาร หรือน้ำ เช่น การตรวจหาแบคทีเรียและสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร เป็นต้น[3] ในประเทศไทยนั้นนักวิจัยไทยได้ค้นคว้าและวิจัยไบโอเซนเซอร์อย่างต่อเนื่องมานานกว่า 20 ปี ปัจจุบันมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ซึ่งน่าจะได้รับการผลักดันให้มีการผลิตเพื่อวางจำหน่ายในอนาคต ตัวอย่างของความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีชั้นสูงของ

ประเทศไทยได้แก่ ความร่วมมือของไบโอเทคและบริษัท อินโนวา ไบโอเทคโนโลยี จำกัด ต่อยอดงานวิจัยของ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงธารารัชต์ ธารากุล จาก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและคณะ โดยการ พัฒนา "ชุดตรวจวินิจฉัยไข้หวัดนก โดยใช้หลักการ ไบโอเซนเซอร์" ซึ่งเป็นชุดตรวจไข้หวัดนกแบบ ไบโอเซนเซอร์ที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ชุดแรกของโลก และได้ยื่นจดทะเบียนสิทธิบัตรแล้ว โดยผสมผสาน เทคโนโลยีชีวภาพเข้ากับนาโนเทคโนโลยี ลดการนำเข้า ชุดตรวจวินิจฉัยจากต่างประเทศ และลดความสูญเสีย จากการระบาดของโรคไข้หวัดนกอีกด้วย

บทสรุป

เทคนิคทางอณูชีววิทยาสามารถนำมา ประยุกต์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การเลือกใช้ เทคนิคใดขึ้นอยู่กับรายละเอียดและข้อมูลของจุลชีพ ก่อโรคที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ว่ามีความเหมาะสม กับเทคนิคดังกล่าวมากน้อยเพียงไร ปัจจุบันมีการ ดัดแปลงพันธุกรรมของจุลชีพเพื่อใช้ในการผลิตยา ปฏิชีวนะ รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นทางด้านเภสัชกรรม เพื่อการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ เนื่องจากโรคติด เชื้อที่มีมาแต่เดิมยังคงมีอยู่ในปัจจุบันและโรคติดเชื้อ ใหม่ก็มีเพิ่มมากขึ้น วิทยาการระดับอณูชีววิทยาน่าจะ เป็นทางออกสำคัญต่อวงการสาธารณสุข ถึงแม้ ปัจจุบันจะยังมีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากรทั้ง บุคลากรและอุปกรณ์ แต่หากมีการประสานการ ทำงานอย่างเป็นระบบ ใช้ทรัพยากรร่วมกัน มุ่งตรง ต่อปัญหาและคำนึงถึงการแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อ ของประเทศเป็นสำคัญ ผลสำเร็จย่อมเกิดขึ้นและก่อ ให้เกิดสุขภาวะของประชาชน ภายใต้บริบทของ ประเทศไทยอย่างแท้จริง

เอกสารอ้างอิง

1. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology. 9th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2007.
2. Pommerville JC. Alcamo's fundamentals of microbiology. 8th ed. Sudbury: Jones and Bartlett, 2006.
3. O'Connor L. Diagnostic Bacteriology Protocols. 2nd ed. New Jersey: Humana, 2006.
4. Liu H, Rahman A, Semino-Mora C, Doi SQ, Dubois A. Specific and sensitive detection of *Helicobacter pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and *in situ* hybridization. PLoS ONE 2008; 3(7): 1-7.
5. Goyal SM. Viruses in foods. New York: Springer, 2006.
6. Bühlmann M, Bögli-Stuber K, Droz S, Mühlemann K. Rapid screening for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR and associated costs. J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2151-4.
7. Nintasen R, Utrarachkij F, Siripanichgon K, Bhumiratana A, Suzuki Y, Suthienkul O. Enhancement of *Legionella pneumophila* culture isolation from microenvironments by macrophage infectivity potentiator *(mip)* gene-specific nested polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 2007; 51(8): 777-85.
8. Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Watt F, Hill J, Gal D, et al. Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei,* the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia. Appl Environ Microbiol 2007; 73(21): 6891-7.

9. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, et al. Rapid diagnosis of Herpes Simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2005; 43(2):951-5.
10. Eiken genome site. Available at http://loopamp.eiken.co.jp/e/products/index.html, accessed Jul 1, 2005.
11. Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, et al. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. J Appl Microbiol 2008; 105: 2104-14.
12. Datta S, Biswas A, Chandra PK, Banerjee A, Panigrahi R, Mahapatra PK, et al. Molecular epidemiology and clinical significance of Hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations in eastern India. Intervirology 2008; 51: 275-84.
13. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT. Microbiology: a human perspective. 6th ed. New York: McGraw Hill; 2009.
14. Chan VL, Sherman PM, Bourke B. Bacterial genomes and infectious diseases. New Jersey: Humana; 2006.
15. Cowan MK, Talaro KP. Microbiology: a systems approach. Boston: McGraw-Hill; 2006.
16. มาลินี อัศวดิษฐเลิศ. What's biosensor? Available at http://www.vcharkarn.com/varticle/ 38381, accessed Feb 8, 2009.

Molecular Biology Technology in Infectious Diseases

Chayaporn Saranpuetti*

ABSTRACT

Genetic engineering brought biotechnology into a new era by a revolution in molecular biology which has occurred over the past several decades. The rapid developments in recombinant DNA techniques have made it possible to genetically alter organisms to give them more useful traits. Molecular biology provided a powerful tool for manipulation microorganisms for medical, industrial, and research uses i.e. detection of infectious diseases, pharmaceutical production, vaccine production, and biosensing. The knowledge in molecular biology leads to the development in detection of infectious diseases: A) hybridization, DNA probes are used to locate nucleotide sequences of interest in individual cells or nucleic acid extracted from samples. B) amplification, the polymerase chain reaction (PCR) and its application can be used to create millions copies of target sequences within a few hours to detect organisms present in extremely small numbers as well as those that cannot yet be grown in culture. C) DNA sequencing, provides a mechanism for determining the evolutionary relatedness of organisms. D) enzymatic digestion, restriction enzymes cut interest DNA into fragments. Each microorganism can be identified by numbers and size of DNA fragments in gel electrophoresis. Many pharmaceutical products are now produced by genetically engineered microorganisms which are safer and more economical than extracting it from animal tissues. In vaccine production, the genes can be cloned into yeast or bacteria so that these cells produce large amount of immunizing proteins. This type of vaccine is currently used to prevent hepatitis B and cervical cancer in humans. Molecular biology also leads to the development of biosensing. High sensitivity of biosensing is necessary for the detection of bioterrorism clues.

Key words: Molecular biology, infectious diseases, genetic engineering, PCR, DNA

J Public Health 2009; 39(2): 199-213.

Correspondence: Dr.Chayaporn Saranpuetti, Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University 420/1 Rajavithi Road, Rachathevee, Bangkok 10400, Thailand

* Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University