

การพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่โดยใช้เทคโนโลยี  
CRISPR-Cas12a



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Development of Diagnostic Assays for Influenza Virus and Severe Acute Respiratory  
Syndrome Coronavirus 2 Detections Based on CRISPR-Cas12a Technology



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a
โดย	น.ส.อรพรรณ มยุรมาศ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงกร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.นพัต จันทรวิสูตร ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงกร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร.นพัต จันทรวิสูตร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ ปัญจวรรณ ต.เทียนประเสริฐ)

อรรถพรณ มยุรมาศ : การพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a. ( Development of Diagnostic Assays for Influenza Virus and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detections Based on CRISPR-Cas12a Technology) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.สัณชัย พยุงบวร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.นพัต จันทรวิสูตร,ศ. นพ.ยง ภู่วรรณ

ในงานวิจัยนี้ ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ จึงเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไข้หวัดใหญ่ และ โควิด-19 ในบริเวณที่มีอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่จำกัด ผลการทดสอบพบว่า การใช้เทคนิค RT-RPA ร่วมกับ CRISPR-Cas12a ตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ มีความไวคิดเป็นร้อยละ 96.23 และมีความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 100 สำหรับความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A และชนิด B คิดเป็นร้อยละ 85.07 และ 94.87 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A และชนิด B คิดเป็นประมาณร้อยละ 96 โดยสรุป เทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ด้วยวิธี CRISPR-Cas12a เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรอง และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับโรคติดเชื้อชนิดอื่นๆ ที่จะเกิดขึ้นในอนาคตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6074089830 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: CRISPR/Cas12a, Influenza viruses, Recombinase Polymerase Amplification, CRISPR-based diagnostic test

Oraphan Mayuramart : Development of Diagnostic Assays for Influenza Virus and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detections Based on CRISPR-Cas12a Technology. Advisor: Assoc. Prof. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D. Co-advisor: Naphat Chantaravisoot, Ph.D., Prof. YONG POOVORAWAN, M.D.

In this study, CRISPR-Cas12a-based detection was applied for simple, rapid turn-around time and cost-effective detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), influenza A virus (IAV) and influenza B virus (IBV) which would be a practical and attractive application for screening of patients with COVID-19 and influenza in areas with limited resources. The results revealed that the detection of influenza virus and SARS-CoV-2 by using RT-RPA and CRISPR-Cas12a technology reach 96.23% sensitivity and 100% specificity for SARS-CoV-2 detection. The sensitivity for influenza virus A and B detections were 85.07% and 94.87%, respectively. In addition, the specificity for influenza virus A and B detections were approximately 96%. In conclusion, the RT-RPA and CRISPR-Cas12a assays would be effective methods for the screening of influenza viruses and SARS-CoV-2 which could be applied to detect other emerging infectious diseases in the future.

Field of Study: Medical Sciences

Academic Year: 2019

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยร่างกาย แรงใจ และความอนุเคราะห์จากผู้มีอุปการะคุณหลายฝ่าย ที่คอยช่วยผลักดันให้เกิดความสำเร็จในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รวมถึง ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ และ อาจารย์ ดร.นพัต จันทรวิสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้ความรู้ ให้คำปรึกษา รวมถึงคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนแรงผลักดัน และกำลังใจ ตลอดการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.พญ.วิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล โอนมะศิริ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในหลักสูตร และ รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ ต.เทียนประเสริฐ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์และครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นผู้มอบทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทุนการศึกษา และค่าใช้จ่ายในการเรียนระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ด้านชีววิทยาเชิงระบบ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUSB) ที่สนับสนุนเครื่องมือและช่วยเหลือการทำวิจัยด้านการผลิตโปรตีน รวมถึงการยืนยันผลโปรตีนในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ด้วย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 716/1 (SP Family) สำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจ และคำแนะนำที่ดีที่ได้รับตลอดระยะเวลาการเข้าศึกษาในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ และเป็นแรงผลักดันที่ดี รวมถึงให้ความรัก ความเข้าใจ และคอยสนับสนุนตลอดการศึกษา

อรพรรณ มยุรมาศ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางานวิจัย (Background and Rationale).....	1
คำถามงานวิจัย (Research Questions).....	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives).....	2
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	3
คำนิยามเชิงปฏิบัติการ (Operational Definitions) .....	3
วิธีดำเนินการวิจัย (Research workflow).....	4
คำสำคัญ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	6
เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza viruses) .....	6
การแพร่กระจายและวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ .....	8
การวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่.....	10

เชื้อไวรัส Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.....	15
ระบบ CRISPR-Cas .....	19
Recombinase Polymerase Amplification (RPA).....	23
Histidine-tag purification .....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	26
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	26
3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
สารเคมีที่ใช้ในการผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1).....	27
สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน .....	28
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ SDS-PAGE .....	28
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Mass spectrometry.....	28
สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของโปรตีน และการตรวจหาสารพันธุกรรมโดยใช้ Cas12a .....	28
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสร้าง crRNA และ อาร์เอ็นเอมาตรฐาน (standard RNA).....	29
สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอเรส .....	29
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส.....	29
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการวัดปริมาณสารพันธุกรรม.....	29
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ RPA.....	29
สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Gel electrophoresis.....	30
3.5 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ .....	30
3.5.1 การพัฒนาตัวต้นแบบชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a.....	30



การสร้าง crRNA ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมเป้าหมาย .....	30
การออกแบบ crRNA .....	30
การผลิต crRNA.....	32
การเตรียมสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวก (positive control).....	36
การผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1) .....	47
การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection).....	54
การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่น (cross-reactivity).....	57
3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก.....	57
การเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a.....	57
การเตรียมตัวอย่างจากทางเดินหายใจส่วนต้นในตัวอย่างผู้ป่วยเพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a.....	58
วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคนิค qRT-PCR.....	59
วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค qRT-PCR.....	61
3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection).....	62
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	62
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	63
การเตรียมสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวก (positive control).....	63
การผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1).....	64
การทดสอบ crRNA และ DNA substrate .....	70
การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection) .....	71
การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่น (cross-reactivity) .....	72
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง .....	78
การผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1).....	78

การตรวจหาสารพันธุกรรมโดยใช้ CRISPR-Cas12a.....	78
ข้อเสนอแนะ.....	81
ภาคผนวก.....	82
บรรณานุกรม.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	90



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	แสดงภาพจำลองของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (17).....	7
ภาพที่ 2	แสดงวงจรชีวิตและกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (17) .....	9
ภาพที่ 3	แสดงภาพเซลล์ MDCK (ATCC®CCL-34™) ปกติที่สามารถส่องได้จากกล้องจุลทรรศน์ (ซ้าย) และเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัส influenza B (ขวา) (25) .....	11
ภาพที่ 4	แสดงวิธีการตรวจ Rapid cell cultures (28).....	11
ภาพที่ 5	แสดงหลักการตรวจด้วยวิธี lateral flow immunoassay (31) .....	15
ภาพที่ 6	ภาพจำลองการทำงานของระบบ CRISPR-Cas ในเซลล์แบคทีเรีย (38) .....	19
ภาพที่ 7	แสดงความแตกต่างของการทำงานของโปรตีน Cas12a และ Cas13 (46) .....	21
ภาพที่ 8	หลักการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยวิธี SHERLOCK (44) .....	22
ภาพที่ 9	หลักการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมจากผู้ป่วยด้วยวิธี DETECTR (8) .....	22
ภาพที่ 10	หลักการการทำงานของกระบวนการ (RPA) (47) .....	24
ภาพที่ 11	แสดงขั้นตอนการ purification ด้วย histidine tag (48).....	25
ภาพที่ 12	แสดงองค์ประกอบและทิศทางของ DNA ต้นแบบสำหรับการสร้าง crRNA และ crRNA 30	
ภาพที่ 13	แสดงแผนผังพลาสมิด 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 (20) .....	48
ภาพที่ 14	แสดง PCR Product ของสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวกของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ยีน Matrix (M), เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ยีน Matrix (M), เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ยีน Spike (S) และยีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งมีขนาด 219, 168, 201, 166 และ 256 bp ตามลำดับ.....	63
ภาพที่ 15	แสดงภาพ alignment ของลำดับเบส 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 ต้นแบบ (Ref) และลำดับเบส 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 ที่ได้จาก Sanger's sequencing (Plasmid).....	64
ภาพที่ 16	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน .....	65
ภาพที่ 17	แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Binding buffer.....	66
ภาพที่ 18	แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Washing buffer.....	67

ภาพที่ 19 แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Elution buffer ..... 67

ภาพที่ 20 แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Elution buffer ที่ผ่านการแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์และกำจัด  
โปรตีนขนาดเล็ก ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่สนใจ ..... 68

ภาพที่ 21 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมของโปรตีน Cas12a ที่ผลิตได้ (in house) กับโปรตีน  
Cas12a ที่ซื้อจากบริษัท NEB..... 70

ภาพที่ 22 แสดงแสง fluorescence ที่เรืองแสงจากการทดสอบ crRNA และ DNA substrate ด้วย  
เทคนิค CRISPR-Cas12a..... 71

ภาพที่ 23 แสดงผลการทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection) จาก standard RNA  
ความเข้มข้นตั้งแต่  $10^7$  ถึง  $10^0$  copies/ $\mu$ L..... 72

ภาพที่ 24 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่น (cross-reactivity) ..... 73

ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่างการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a .... 73

ภาพที่ 26 แสดงตัวอย่างการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a 76

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	การเปรียบเทียบจุดเด่นและข้อจำกัดของวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (5)	13
ตารางที่ 2	แสดงลำดับเบสของ crRNA template และไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้าง crRNA.....	32
ตารางที่ 3	แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ annealing .....	32
ตารางที่ 4	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการบวนการสร้าง crRNA .....	33
ตารางที่ 5	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ reverse transcription.....	37
ตารางที่ 6	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR.....	38
ตารางที่ 7	แสดงสถานะที่ใช้ในการทำ PCR.....	39
ตารางที่ 8	แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ และอุณหภูมิ annealing ที่ใช้กับไพรเมอร์ในแต่ละคู่.....	39
ตารางที่ 9	แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ ligation.....	42
ตารางที่ 10	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด restriction enzyme.....	44
ตารางที่ 11	แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ RT-RPA.....	46
ตารางที่ 12	แสดงรายละเอียดไพรเมอร์สำหรับใช้ในกระบวนการ RT-RPA .....	47
ตารางที่ 13	แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน .....	54
ตารางที่ 14	แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, ไข้หวัดใหญ่ชนิด B และ GAPDH โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a.....	55
ตารางที่ 15	แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a.....	56
ตารางที่ 16	แสดงการใช้ crRNA ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด .....	56
ตารางที่ 17	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคนิค qRT-PCR.....	59
ตารางที่ 18	แสดงไพรเมอร์และ Taq-Man probes ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค qRT-PCR (18).....	59
ตารางที่ 19	แสดงสถานะที่ใช้ในการทำ qRT-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ .....	60
ตารางที่ 20	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค qRT-PCR (49) ....	61
ตารางที่ 21	แสดงแสดงสถานะที่ใช้ในการทำ qRT-PCR ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-261	

ตารางที่ 22 ตารางสูตรคำนวณค่า sensitivity, sensitivity, PPV และ NPV .....	62
ตารางที่ 23 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง .....	65
ตารางที่ 24 แสดงผลการวิเคราะห์เปปไทด์จาก Mass spectrometry และโปรตีน 5 อันดับแรก... 69	69
ตารางที่ 25 สรุปผลการทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection) .....	72
ตารางที่ 26 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ด้วยวิธี qRT-PCR และชุดตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests .....	74
ตารางที่ 27 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ด้วยวิธี qRT-PCR และชุดตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests .....	74
ตารางที่ 28 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี CRISPR-Cas12a .....	75
ตารางที่ 29 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี CRISPR-Cas12a .....	75
ตารางที่ 30 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี CRISPR-Cas12a .....	76
ตารางที่ 31 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก.....	77

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
aM	Attomolar
Cas	CRISPR-associated
cDNA	Complementary DNA
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
DETECTR	DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter
fM	Femtomolar
IAV	Influenza A virus
IBV	Influenza B virus
kDa	Kilodalton
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
miRNA	Micro RNA
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
NPV	Negative Predictive Value
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPV	Positive Predictive Value
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
RPA	Recombinase Polymerase Amplification
RT	Reverse Transcription
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHERLOCK	Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking
U	Unit
$\mu$ l	Microliter

## บทที่ 1 บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางานวิจัย (Background and Rationale)

โรคไข้หวัดใหญ่ คือโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญ ทั้งยังเป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่ส่งผลกระทบเป็นวงกว้าง ทั้งในแง่ของสาธารณสุขและเศรษฐกิจ สาเหตุของไข้หวัดใหญ่นั้นก็คือเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) อยู่ในสกุล *Orthomyxoviridae* โดยมีสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์คือ influenza A และ influenza B ผู้ที่ป่วยเป็นโรคไข้หวัดใหญ่จะมีอาการของโรคได้แก่ มีไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ เจ็บคอ ไอ มีน้ำมูก รู้สึกอ่อนเพลีย และสำหรับผู้ป่วยบางรายอาจมีภาวะปอดอักเสบขึ้นได้ (1) จะเห็นได้ว่าอาการของโรคไข้หวัดใหญ่นั้นมีความคล้ายคลึงกับโรคไข้หวัดธรรมดาเป็นอย่างมาก แต่มีความรุนแรง จนสามารถทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ ซึ่งจากการสำรวจขององค์การอนามัยโลก (2) พบว่า มีผู้ติดเชื้อมากถึง 3-5 ล้านรายต่อปี และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 3-6 แสนรายต่อปี (2) ดังนั้นการป้องกันและควบคุมโรคที่สำคัญคือการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ และคัดแยกออกจากกลุ่มคนทั่วไปเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ

วิธีวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ที่หน่วยงานป้องกันโรคติดต่อในสหรัฐอเมริกาหรือ CDC (Center for Disease Control and Prevention) แนะนำ มีทั้งหมด 6 วิธี ได้แก่ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยใช้ชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid Influenza Diagnostic Test; RIDT) การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่อย่างรวดเร็ว (Rapid Molecular Assay) การตรวจหาเชื้อไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี immunofluorescence การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular technique) และการคัดแยกเชื้อไวรัสแบบมาตรฐาน รวมถึงการคัดแยกเชื้อไวรัสแบบรวดเร็ว (Rapid cell cultures)(3) โดยวิธีที่ถือเป็นมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดใหญ่คือการคัดแยกเชื้อไวรัสจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ซึ่งใช้เวลาในการวินิจฉัยนาน 3-10 วัน (3, 4) และยังคงอาศัยขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน ส่วนการตรวจด้วยวิธีอื่น ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของกระบวนการวินิจฉัยที่ยุ่งยาก อาศัยเครื่องมือราคาแพง ต้องปฏิบัติโดยผู้เชี่ยวชาญ และใช้เวลาในการตรวจที่นานหลายชั่วโมง (5) ปัจจุบันชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (rapid test) เป็นที่ได้รับความนิยมในการตรวจวินิจฉัยเนื่องจากใช้เวลาในการตรวจน้อย มีขั้นตอนการทำที่ไม่ซับซ้อน แต่ความไวของชุดตรวจนั้นยังมีระดับที่ต่ำกว่าวิธีการอื่น และยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสได้อย่างละเอียด (1, 6)

นอกจากนี้ในสถานการณ์ปัจจุบันยังมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค โควิด-19 (COVID-19) ซึ่งมีสถานการณ์ที่น่ากังวลและได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก จากข้อมูลในเว็บไซต์ worldmeters ปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อไปแล้ว กว่า 10 ล้านราย (<https://www.worldometers.info/coronavirus>) ซึ่งยังคงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นอย่าง



ต่อเนื่อง การตรวจคัดแยกโรคอาการทางคลินิกที่คล้ายคลึงกับอาการของโรคไข้หวัดใหญ่ จึงจำเป็นที่จะต้องมียุทธศาสตร์การตรวจที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งควรเป็นวิธีตรวจที่รวดเร็ว ใช้งานง่ายและได้ผลอย่างถูกต้องแม่นยำ

อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการคิดค้นเทคนิคการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas หรือเรียกว่า CRISPR-base diagnostics test (7-11) โดยนำหลักการตัดบริเวณสารพันธุกรรมของเป้าหมายอย่างจำเพาะของระบบ CRISPR-Cas ที่พัฒนามาจากระบบภูมิคุ้มกันในแบคทีเรีย (12) นำมาใช้ร่วมกับเทคนิค isothermal amplification ที่ทำให้ความไวของการตรวจสูงเพิ่มมากขึ้นถึงระดับอัตโตโมลาร์ (attomolar; aM;  $10^{-18}$ ) (8) และยังสามารถพัฒนาเทคนิคนี้ให้อยู่ในรูปแบบของ rapid test ได้อีกด้วย (11)

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นการพัฒนาการตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ร่วมกับตรวจตรวจเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ด้วยเทคโนโลยี CRISPR-Cas12a เพื่อการตรวจคัดกรองโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### คำถามงานวิจัย (Research Questions)

1. เทคนิคการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยี CRISPR-Cas12a สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่
2. เทคนิค CRISPR-Cas12a ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีประสิทธิภาพเป็นอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Rapid Influenza Diagnostic Tests และ qRT-PCR
3. เทคนิค CRISPR-Cas12a ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีประสิทธิภาพเป็นอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค qRT-PCR

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไวรัส Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี CRISPR-Cas12a โดยเปรียบเทียบกับเทคนิค Rapid Influenza Diagnostic Tests และ qRT-PCR

### สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไวรัส SARS-CoV-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### ขอบเขตของงานวิจัย

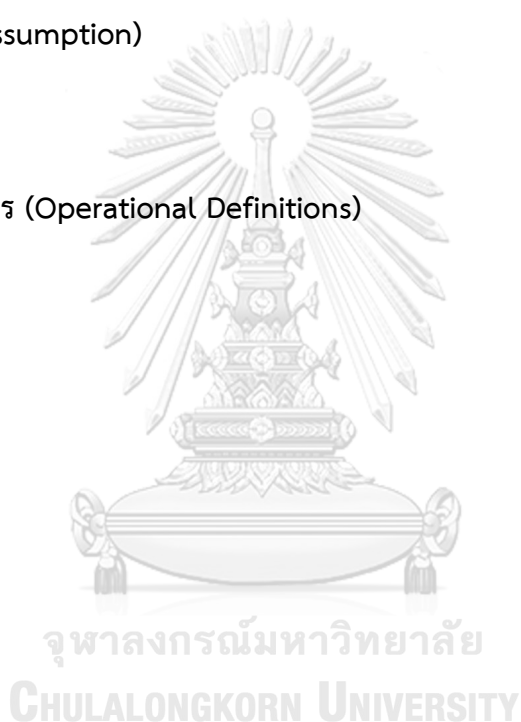
งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a และทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจโดยใช้สิ่งส่งตรวจ

### ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ไม่มี

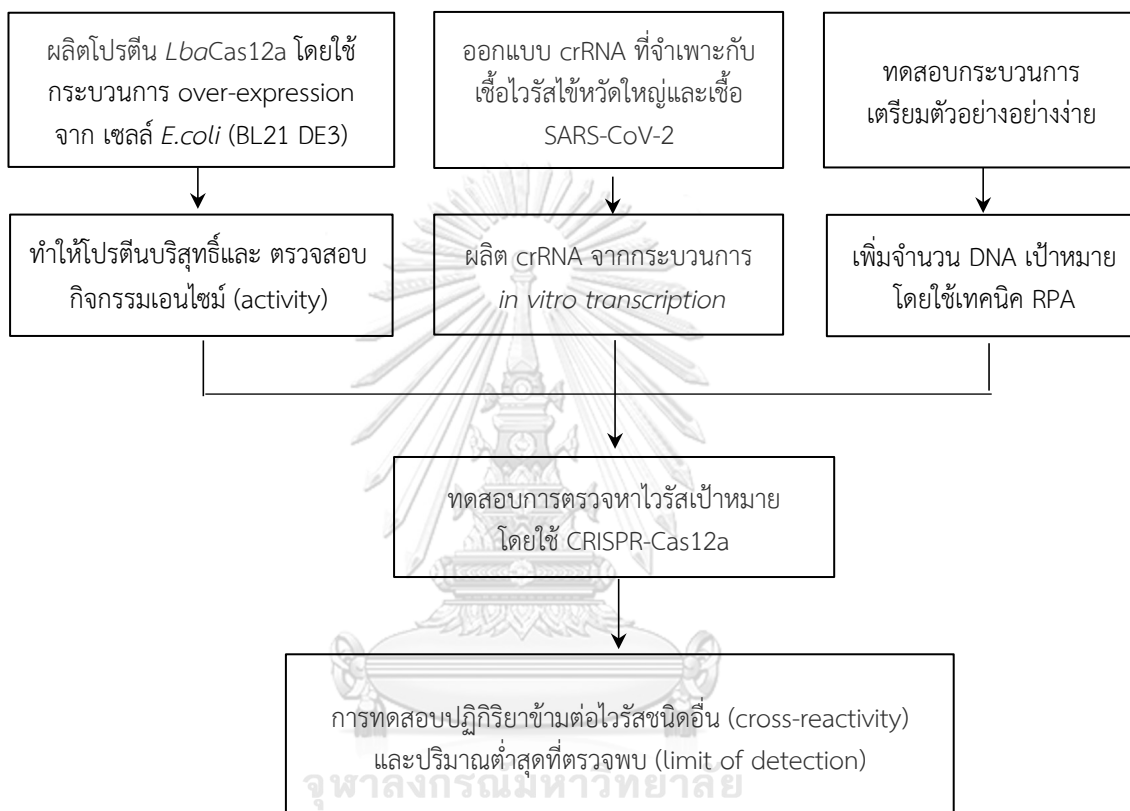
### คำนิยามเชิงปฏิบัติการ (Operational Definitions)

ไม่มี

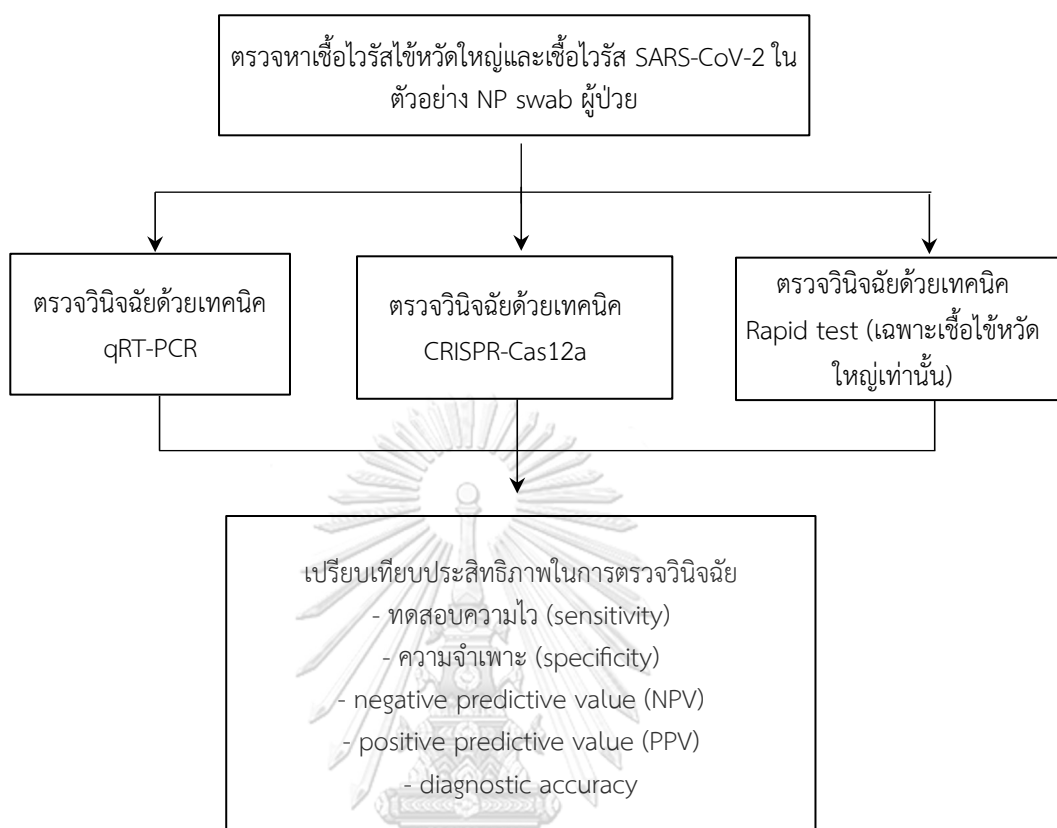


## วิธีดำเนินการวิจัย (Research workflow)

### 1. ผลิตตัวต้นแบบชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a



## 2. ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในตัวอย่างทางคลินิก



### คำสำคัญ

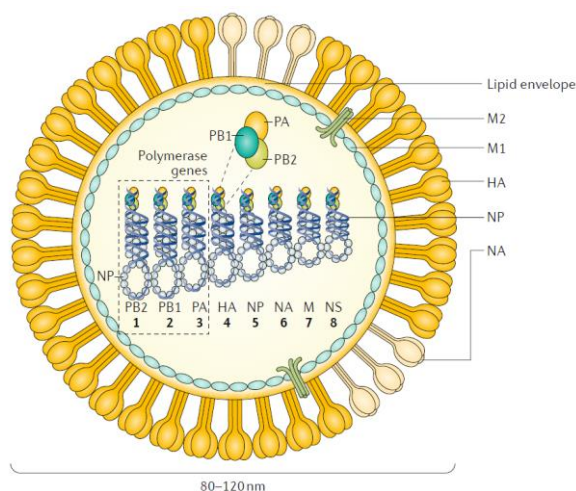
- CRISPR-Cas12a
- Influenza virus
- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
- COVID-19
- Recombinase Polymerase Amplification
- CRISPR-based diagnostic test

## บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza viruses)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza viruses) เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม ลักษณะกลมหรือรี มีขนาดประมาณ 80-120 นาโนเมตร (13) ถูกจัดอยู่ในวงศ์ (family) Orthomyxoviridae สามารถจำแนกได้ 4 สกุล (genera) ได้แก่ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, ชนิด B, ชนิด C และ ชนิด D ไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ได้ ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์ปีก โดยไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ที่รุนแรงในคนนั้นมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด A และ B (1) โดยไวรัสสายพันธุ์ A สามารถแบ่งสายพันธุ์ย่อยตามลักษณะของโปรตีน Haemagglutinin (HA) และ Neuraminidase (NA) ที่อยู่บนเปลือกผิวของไวรัส ซึ่งปัจจุบัน สามารถแบ่งโปรตีน HA ได้เป็น 18 ชนิด และแบ่งโปรตีน NA ได้เป็น 11 ชนิด (14) ส่วนไวรัสชนิด B จะจัดกลุ่มตามสายวิวัฒนาการ (lineages) ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Victoria lineage และ Yamagata lineage (15)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ สามารถก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ที่เป็นโรคติดต่อในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญ ซึ่งเกิดการระบาดขึ้นมาแล้วทั่วโลก อาการของผู้ป่วยในเบื้องต้นนั้นจะมีไข้สูง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ เจ็บคอ ไอ มีน้ำมูก รู้สึกไม่สบายตัว ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการรุนแรงขึ้น โดยสามารถเกิดภาวะปอดบวมและติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียได้ จนอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตในที่สุด (1) โดยบุคคลกลุ่มเสี่ยงที่จะเป็นโรคไข้หวัดใหญ่และพัฒนาอาการไปยังขั้นที่มีอาการรุนแรง ได้แก่ กลุ่มเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีและไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีน ผู้สูงอายุ (อายุมากกว่า 65 ปี) สตรีมีครรภ์ และผู้ป่วยโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และหอบหืด เป็นต้น (16) ในปัจจุบันยังสามารถพบการติดเชื้อและการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ในทุกปี จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลก หรือ WHO พบว่า มีผู้ติดเชื้อในแต่ละปีประมาณ 3-5 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตมากที่สุดถึง 650,000 คนต่อปี (2)



ภาพที่ 1 แสดงภาพจำลองของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (17)

หนึ่งในสาเหตุที่ทำให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่เกิดการระบาดขึ้นได้ในทุกปี อาจเกิดขึ้นจากลักษณะของสารพันธุกรรมที่เป็นอาร์เอ็นเอสายลบแบบท่อน (segmented negative single-strand RNA) ซึ่งมีทั้งหมด 8 ท่อน ประกอบด้วย PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS (ภาพที่ 1) และสามารถผลิตโปรตีนได้อย่างน้อย 12 ชนิดขึ้นกับชนิดของไวรัส (13, 15)

สารพันธุกรรมท่อนที่ 1-3 ได้แก่ Polymerase basic 2 (PB2) gene, Polymerase basic 1 (PB1) gene และ Polymerase acidic (PA) gene เป็นสารพันธุกรรมของไวรัสที่อยู่ในกลุ่มของ RNA polymerase complex มีขนาดประมาณ 2,100-2,300 เบส ซึ่งเมื่อถูกสังเคราะห์ออกมาเป็นโปรตีน จะได้เป็นกลุ่มของโปรตีน RNA polymerase ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการถอดรหัส (transcription) และการจำลองตัวเอง (replication)

สารพันธุกรรมท่อนที่ 4 และ 6 หรือ Haemagglutinin (HA) gene และ Neuraminidase (NA) gene มีขนาดประมาณ 1,800 เบส และ 1,500 เบสตามลำดับ ยีน HA และ NA เป็นยีนในกลุ่มของโปรตีนที่อยู่บนเปลือกผิวภายนอกของไวรัส ที่ทำหน้าที่ในการปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เจ้าบ้านเพื่อนำไวรัสเข้าสู่เซลล์และนำออกนอกเซลล์ นอกจากนี้สารพันธุกรรมทั้งสองท่อนและคุณสมบัติของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ ยังมีความสำคัญในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A อีกด้วย

สารพันธุกรรมท่อนที่ 5 หรือ Nucleoprotein (NP) gene มีขนาดประมาณ 1,500 เบส ในไวรัสชนิด A และขนาดประมาณ 1,600 ถึง 1,800 เบส ในไวรัสชนิด B เมื่อถูกสังเคราะห์ออกมาเป็นโปรตีน จะได้เป็นโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายลูกปัด มีหน้าที่พันสาย RNA ในแต่ละท่อนเข้าไว้ด้วยกัน และมัดรวมกับ RNA polymerase complex กลายเป็น viral Ribonucleoprotein (vRNP) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการขนส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ เพื่อเข้าสู่กระบวนการ transcription และ replication เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

สารพันธุกรรมตอนที่ 7 หรือ Matrix (M) gene มีความยาวประมาณ 1,000-1,100 เบส สามารถผลิตให้โปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีน M1 และ M2 (หรือ BM2 ในชนิด B) โปรตีน M1 เป็นโปรตีนเปลือกผิวภายในของไวรัส มีหน้าที่สำคัญหลายประการ เช่น ช่วยคงสภาพของอนุภาคไวรัส อีกทั้งยังสามารถนำ vRNP ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ในนิวเคลียสออกมาสู่ไซโทพลาสซึม เพื่อนำไปสู่การประกอบรวมอนุภาคใหม่ของไวรัส ส่วนโปรตีน M2 จะประกอบกันเป็น ion-channel ทำหน้าที่เป็นช่องทางการนำโปรตอนเข้าสู่ไวรัสและเหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อย vRNP ออกมาสู่เซลล์ของเจ้าบ้านได้ (19)

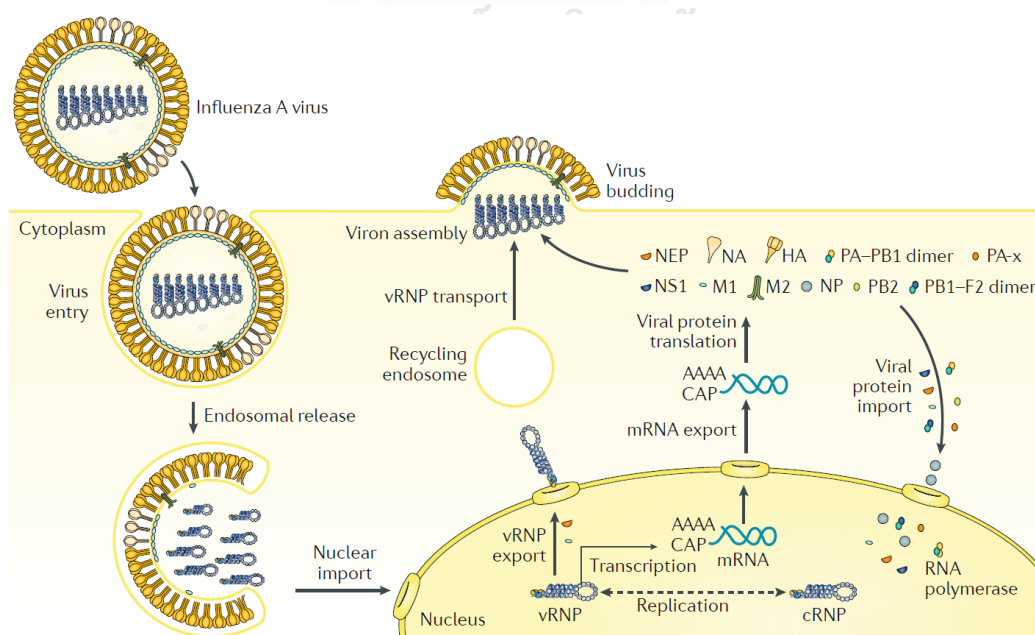
สารพันธุกรรมตอนที่ 8 หรือ Non-structural (NS) gene มีความยาวประมาณ 800 เบส ในไวรัสชนิด A และขนาดประมาณ 1,000 เบส ในไวรัสชนิด B สามารถผลิตเป็นโปรตีน NS1 และ nuclear export protein (20) หรือ NS2 ได้ โดย NS1 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงกระตุ้นการตายของเซลล์ขณะเกิดการติดเชื้อขึ้นด้วย ส่วนโปรตีน NEP มีหน้าที่ในการขนส่ง vRNP ออกมาสู่ไซโทพลาสซึม และยังมีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการ transcription และ replication ของเชื้อไวรัสผ่าน viral polymerase complex (21)

### การแพร่กระจายและวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เกิดขึ้นได้ทั้งจากสัตว์สู่คน (zoonosis) และจากคนสู่สัตว์ได้ในบางสายพันธุ์ (reverse zoonosis) เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pandemic H1N1) (1) การแพร่กระจายจากคนสู่คนนั้นจะแพร่ผ่านทางระบบทางเดินหายใจ โดยไวรัสจะออกมาสู่ภายนอกผ่านการไอ จาม หรือผ่านทางสารคัดหลั่งของผู้ติดเชื้อ และเชื้อจะเข้าสู่เยื่อผิวในระบบทางเดินหายใจกลายเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อดังต่อไปนี้

ในขั้นแรกเชื้อไวรัสจะจับกับเซลล์ของเจ้าบ้าน โดยอาศัยหลักการจับกันของโปรตีน Haemagglutinin บนเปลือกผิวของไวรัส กับ sialic acid ที่อยู่บน glycoprotein หรือ glycolipid บนผิวเซลล์ของเจ้าบ้าน โดยในขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่สามารถกำหนดความจำเพาะของเซลล์ที่ติดเชื้อได้ เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน จะเลือกจับกับ sialic acid ที่ต่อกับน้ำตาลกาแลคโตสบน glycoprotein หรือ glycolipid ด้วยพันธะ  $\alpha 2,6$ -linkage (Sia $\alpha 2,6$ Gal) แต่หากเป็นไวรัสไข้หวัดนก จะจับกับ Sia $\alpha 2,3$ Gal ได้มากกว่า (1, 17, 22) ซึ่งการจับกันระหว่าง HA และ sialic acid นั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis กลายเป็น endosome อยู่ภายในเซลล์ และรวมตัวกับผนังของ endosome ในเวลาต่อมา ทำให้ไวรัสปลดปล่อยสารพันธุกรรม (vRNP) ออกมาได้ และเข้าสู่นิวเคลียสโดยอาศัยโปรตีน importin- $\alpha$  และ importin- $\beta$  หลังจากนั้น

จะเข้าสู่กระบวนการ transcription เพื่อสร้าง viral mRNA และการจำลองตัวเอง (replication) การ transcription จะเริ่มต้นขึ้นหลังจากการนำปลาย 5' methylated cap ของ mRNA ในเซลล์เจ้าบ้านมาเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการ transcription และเรียกกระบวนการนี้ว่า cap-snatching (22, 23) โดยเริ่มจาก PB2 ใน viral RNA polymerase complex เข้ามาจับที่บริเวณปลาย 5' methylated cap ของ cellular mRNA หลังจากนั้น PA จะทำหน้าที่ตัดเบสที่ถัดจากปลาย 5' ไปประมาณ 10-13 เบส และเข้าสู่กระบวนการต่อสายโดยใช้ PB1 สร้างสาย RNA ไปจนถึงปลาย poly A-tail หลังจากนั้น viral mRNA จะถูกขนส่งไปยัง cytoplasm เพื่อผลิตเป็น viral protein ภายหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนเหล่านั้นจะถูกส่งกลับมายังนิวเคลียส เพื่อมาประกอบเป็น vRNP ยกเว้นโปรตีน HA NA และ M2 ที่จะถูกส่งไปยัง endoplasmic reticulum เพื่อเติมหมู่น้ำตาลและไขมัน ก่อนที่จะถูกส่งไปรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนในด้านการจำลองตนเอง (viral replication) จะเริ่มจากการสร้างสารพันธุกรรมสายบวก (positive single-strand RNA) หรือ complementary RNA (cRNA) ขึ้นมาเป็นต้นแบบก่อนโดยไม่ต้องอาศัย 5' methylated cap แล้วจึงสร้างสารพันธุกรรมสายลบ (vRNA) และประกอบรวมกับโปรตีนต่างๆของไวรัสในนิวเคลียสกลายเป็น vRNP จากนั้นจะถูกส่งออกไปยัง cytoplasm โดยอาศัยโปรตีน NEP และ M1 เมื่อองค์ประกอบพร้อมที่จะสร้างไวรัสอนุภาคใหม่ ไวรัสจะเกิดกระบวนการประกอบอนุภาคใหม่และแบ่งตัวออกมา (Packaging and budding) โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่หลักในการประกอบอนุภาคคือโปรตีน M1 และในขั้นตอนสุดท้าย จะอาศัยโปรตีน NA ที่ช่วยตัด sialic acid ออกจากโปรตีนบนผิวเซลล์ได้ ซึ่งเมื่อเซลล์ปล่อยไวรัสออกมาได้แล้วสามารถทำให้เซลล์ข้างเคียงติดเชื้อและแพร่กระจายไวรัสออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้ (ภาพที่ 2) (22, 24)



ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตและกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (17)

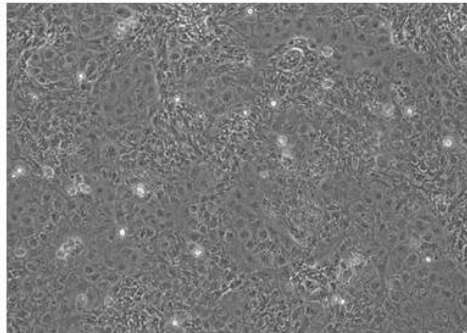


## การวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่

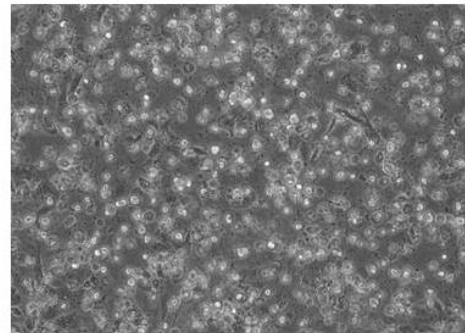
เนื่องจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่นั้น ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกคล้ายกับผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้หวัดธรรมดา ดังนั้นการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญที่สามารถช่วยควบคุมโรค ช่วยลดโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสและอาจลดอัตราการเสียชีวิตลงได้หากตรวจพบโดยเร็ว

วิธีการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ในปัจจุบัน ประกอบด้วย 5 วิธีหลัก ได้แก่ การคัดแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation), Immunofluorescence, วิธีการทางซีรัมวิทยา (serological assay), การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส (Nucleic Acid-Based Tests) และการตรวจโดยใช้ชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid Influenza Diagnostic Tests) ซึ่งวิธีที่หน่วยงานป้องกันโรคติดต่อในสหรัฐอเมริกาหรือ CDC (Center for Disease Control and Prevention) แนะนำ มีทั้งหมด 6 วิธี ดังตารางที่ 1 (4-6) โดยวิธีที่ถือเป็นมาตรฐานของการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่คือการคัดแยกเชื้อไวรัสจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงไวรัสร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ Madin Darby Canine Kidney cell (MDCK) โดยจะสังเกตลักษณะของเซลล์เป็นหลักร่วมกับความสามารถของเซลล์ในการจับเม็ดเลือดแดง หากเซลล์มีการติดเชื้อ ลักษณะของเซลล์จะเปลี่ยนแปลง เกิด Cytopathic effect (CPE) ดังภาพที่ 3 และสามารถจับเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งหากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงข้างต้น สามารถแปลผลได้ว่าตัวอย่างนั้นมีไวรัสไข้หวัดใหญ่อยู่ ซึ่งข้อดีของการคัดแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงคือสามารถเพาะเลี้ยงไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ทุกสายพันธุ์ ถึงแม้ว่าจะเกิดการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ใหม่และมีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนบนผิวก็ตาม แต่อาจมีข้อจำกัดในเรื่องของความปลอดภัยในกรณีที่เป็นไวรัสสายพันธุ์รุนแรง หรือไม่ทราบสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังต้องอาศัยผู้มีความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งยังใช้สารเคมีและอุปกรณ์ราคาแพง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ใช้เวลาในการตรวจทั้งสิ้นประมาณ 3-10 วัน

ATCC® Number: **VR-1807™**  
 Agent: **Influenza B virus**  
 Strain: **B/Virginia/ATCC5/2012**



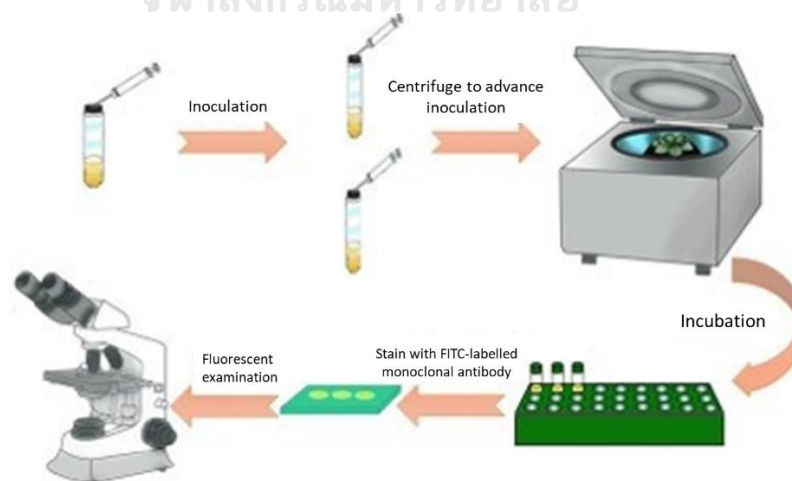
Uninfected host (ATCC® CCL-34™)



Infected host (ATCC® CCL-34™) showing CPE

ภาพที่ 3 แสดงภาพเซลล์ MDCK (ATCC®CCL-34™) ปกติที่สามารถส่องได้จากกล้องจุลทรรศน์ (ซ้าย) และเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัส influenza B (ขวา) (25)

วิธี Rapid cell cultures เป็นหนึ่งในการคัดแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยจะนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบนกระจกสไลด์ในหลอดเพาะเลี้ยง (เซลล์ที่นิยมใช้ได้แก่ primary Rhesus monkey kidney (pRhMK) cells, Madin Darby canine kidney (MDCK) cells, mink lung (26) epithelial cells หรือใช้เซลล์ดังกล่าวมากกว่า 1 ชนิด) และปั่นเหวี่ยงเซลล์ร่วมกับตัวอย่างจากคนไข้ เพื่อให้ประสิทธิภาพในการติดเชื้อของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น และใช้เทคนิคการย้อมโปรตีนของเชื้อไวรัสโดยใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (Immunofluorescence) ร่วมกับการสังเกต CPE เพื่อการตรวจหาไวรัสที่ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการตรวจโดยใช้วิธี Rapid cell cultures ยังคงมีข้อจำกัดในด้านการเลี้ยงเซลล์และยังต้องใช้ควบคู่กับวิธี Immunofluorescence ที่ต้องใช้อุปกรณ์และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอีกด้วย (ภาพที่ 4) (5, 27)



ภาพที่ 4 แสดงวิธีการตรวจ Rapid cell cultures (28)

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้วิธี Immunofluorescence เป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสิ่งส่งตรวจโดยตรง โดยใช้หลักการของแอนติบอดีที่ติดฉลากสีเรืองแสง จับกับแอนติเจนของไวรัส ทำให้สามารถย้อมสีของไวรัสในเซลล์เยื่อบุผิวที่ติดเชื้อได้ โดยวิธีนี้สามารถตรวจหาไวรัสได้มากกว่า 1 ชนิด ตามความจำเพาะของแอนติบอดีและการติดฉลากสี โดยวิธีนี้จะใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2 ชม. ซึ่งข้อจำกัดของวิธีนี้คือต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งมีราคาแพง และอาศัยประสบการณ์ในการตรวจวินิจฉัยสูง (4)

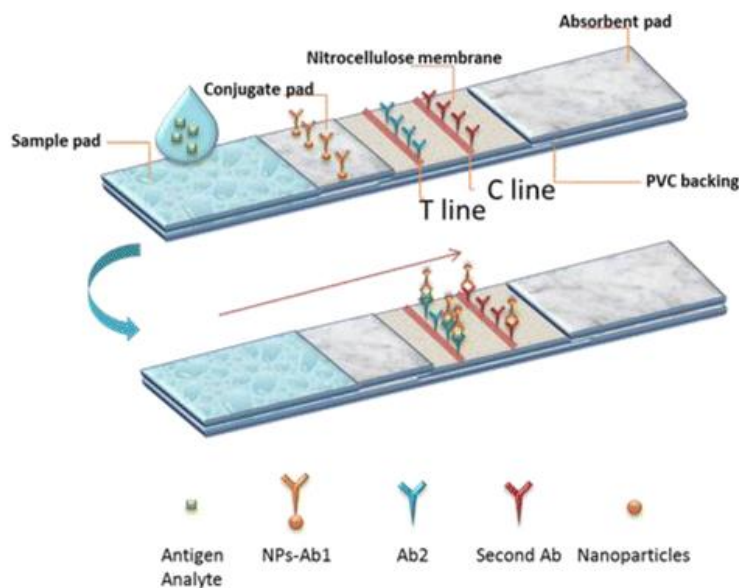
ส่วนวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นวิธีการตรวจวัดระดับแอนติบอดีของผู้ป่วย มีหลายวิธี เช่น การดูความสามารถในการป้องกันการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง หรือ hemagglutination inhibition assay (18) การวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือ Virus Neutralization Assay (VN), Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay หรือ ELISA อย่างไรก็ตามในปัจจุบันไม่นิยมใช้การตรวจทางซีรัมวิทยาในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ เนื่องจากจำเป็นต้องอาศัยตัวอย่างซีรัม 2 ช่วงเวลา คือช่วงเวลาที่เกิดอาการป่วยแบบฉับพลันและช่วงเวลาที่ถัดมา เพื่อวัดความแตกต่างของระดับแอนติบอดี และจะวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อหากมีปริมาณแอนติบอดีสูงขึ้น 4 เท่า ด้วยเหตุนี้ทำให้การวินิจฉัยทางซีรัมวิทยามีข้อจำกัดในเรื่องของเวลาในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งทำให้ผลการตรวจออกมาภายหลังอาการของผู้ป่วยดีขึ้น (5)

วิธีการถัดมาและเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา มีด้วยกันหลายวิธี และวิธีที่รู้จักกันดีก็คือ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การทำให้สายดีเอ็นเอคลายเกลียวโดยใช้อุณหภูมิสูง (Denaturation) การเข้าคู่กันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย (Annealing) และสุดท้ายคือการต่อสายดีเอ็นเอ (Extension) โดยปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนจะเกิดขึ้นเป็นวงรอบและซ้ำต่อเนื่องกันไป ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นของดีเอ็นเอแบบทวีคูณ (Exponential) ซึ่งการใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจหาสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ เรียกว่าเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) คือมีการเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอ (cDNA) ก่อนที่จะเพิ่มจำนวน cDNA ที่สนใจนั้นโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากนั้นจะตรวจหาการเพิ่มจำนวนของซีดีเอ็นเอ ด้วย gel electrophoresis หรือตรวจหาการเพิ่มจำนวนในเวลาจริงโดยใช้เทคนิค Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) (18) ซึ่งวิธีนี้ เป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยของไวรัสได้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของขั้นตอนการทำที่ต้องผ่านการสกัดอาร์เอ็นเอก่อน และเครื่องมือที่ใช้มีราคาสูง ทำให้ห้องปฏิบัติการบางแห่งไม่สามารถใช้วิธีการตรวจนี้ได้

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบจุดเด่นและข้อจำกัดของวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (5)

วิธีการตรวจ	เวลาที่ใช้	จุดเด่น	ข้อจำกัด
Conventional cell culture	2-10 วัน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถคัดแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้หลายสายพันธุ์</li> <li>- ใช้สำหรับการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจน</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้เวลาในการคัดแยกนานประมาณ 4 วันโดยเฉลี่ย</li> <li>- อาจต้องใช้มาตรฐานความปลอดภัยทางชีวอนามัยระดับ 3</li> <li>- ต้องมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์</li> </ul>
Rapid culture	1-2 วัน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- รวดเร็วกว่าการคัดแยกไวรัส</li> <li>- ใช้ทักษะในการตรวจน้อยกว่า</li> <li>- สามารถตรวจได้หลายไวรัสได้ในคราวเดียว</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่สามารถคัดแยกไวรัสแต่ละชนิดออกมาได้</li> <li>- ต้องมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์</li> </ul>
Direct immunofluorescence	< 2 ชั่วโมง	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้เวลาในการตรวจน้อย</li> <li>- สามารถตรวจได้หลายไวรัสได้ในคราวเดียว</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- อาศัยความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง</li> <li>- ต้องการเซลล์ที่สามารถติดเชื้อไวรัสที่ต้องการตรวจได้</li> </ul>
Antibody detection	>1 สัปดาห์	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ผลที่ได้จากการตรวจด้วย HAI และ NT สัมพันธ์กับระดับการป้องกันของร่างกายที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของไวรัส</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องการตัวอย่างซีรัมมากกว่า 1 ช่วงเวลา</li> <li>- บอกรผลการติดเชื้อในอดีต</li> <li>- ไม่นิยมนำมาวินิจฉัยผู้ป่วย</li> </ul>
Real-time RT-PCR	3-5 ชั่วโมง	<ul style="list-style-type: none"> <li>- กระบวนการทำไม่ยุ่งยาก</li> <li>- ใช้เวลาน้อย</li> <li>- สามารถวัดเป็นเชิงปริมาณหรือกึ่งปริมาณได้</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ชุดตรวจที่ได้รับการรับรองจาก FDA มีปริมาณน้อย</li> <li>- สามารถตรวจหาได้สูงสุด 4 สายพันธุ์</li> <li>- ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือราคาแพง</li> </ul>
Highly multiplexed conventional PCR	9 ชั่วโมง	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถตรวจไวรัสได้สูงสุด 9 ไวรัสในคราวเดียว</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้เวลาในการตรวจนานกว่า RT-qPCR</li> <li>- ไม่สามารถวัดเป็นเชิงปริมาณได้</li> <li>- ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือราคาแพง</li> </ul>
Rapid influenza diagnostic tests; RIDT)	30 นาที	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้เวลาในการตรวจน้อย</li> <li>- อาศัยเครื่องมือและความชำนาญเพียงเล็กน้อย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีความไว (sensitivity) น้อยกว่าวิธีอื่น</li> </ul>

อีกหนึ่งวิธีการที่ได้รับความนิยมก็คือ การตรวจโดยใช้ชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid Influenza Diagnostic Tests) ซึ่งในปัจจุบันมีชุดตรวจที่ได้รับมาตรฐานจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาหรือ FDA (Food and Drug Administration) ออกมาวางจำหน่ายเป็นจำนวนมาก ชุดตรวจประเภทนี้ ใช้หลักการของ lateral flow immunoassay คือการตรวจหาแอนติเจนหรือโปรตีนของไวรัสโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ โดยรูปแบบของชุดตรวจนี้ จะออกมาเป็นแบบการ์ดหรือแบบเป็นแถบ และแสดงผลเป็นขีด คล้ายชุดตรวจครรภ์ โดยจุดเด่นของชุดตรวจนี้ คือ สามารถตรวจได้ง่าย มีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญหรือมีประสบการณ์ สามารถแปลผลได้ง่าย จากการเกิดแถบเป็นขีดขึ้น และใช้เวลาในการตรวจไม่เกิน 30 นาที ซึ่งภายในชุดตรวจบางยี่ห้อสามารถตรวจหาและจำแนกเชื้อไวรัสได้ทั้งสองชนิด แต่บางชุดตรวจสามารถตรวจได้เพียงชนิดเดียว อีกทั้งชุดตรวจอย่างรวดเร็วที่ใช้หลักการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส นั้น ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของการติดเชื้อในสายพันธุ์ย่อยของไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง A และ B ได้ (4) จากการรายงานของ Busson L. และคณะพบว่า sensitivity ของการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และชนิด B เมื่อใช้ชุดตรวจอย่างรวดเร็วทั้ง 3 ยี่ห้อ (BinaxNOW Influenza A/B, Directigen EZ Flu A and B, และ bioNexia Influenza A+B) อยู่ระหว่าง 70-81% และ 36-52% เมื่อเปรียบเทียบกับการแยกเชื้อด้วยเซลล์และการใช้เทคนิค RT-PCR (29) และในการศึกษาแบบ meta-analysis ของ Chartrand C. พบว่า sensitivity โดยเฉลี่ยของชุดตรวจอย่างรวดเร็วอยู่ที่ 62.3% และความจำเพาะอยู่ที่ 98.2% ซึ่งหากวิเคราะห์ผลแบบแยกชนิดของไวรัส จะพบว่าความไวของการตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีมากกว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B (30) กล่าวโดยสรุปคือ การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว นั้น มีความจำเพาะสูง แต่มีความไวที่น้อยกว่าวิธีการตรวจอื่นๆ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบการตรวจวินิจฉัยรูปแบบใหม่ ที่มีทั้งความไวและความจำเพาะสูง ทั้งยังสามารถพัฒนาไปเป็นชุดตรวจแบบรวดเร็วได้โดยที่ราคาไม่แพง โดยการตรวจวินิจฉัยรูปแบบนี้จะตรวจหาสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง โดยใช้ระบบ CRISPR-Cas เป็นกลไกหลัก หรือ เรียกว่า CRISPR-Based diagnostic test



ภาพที่ 5 แสดงหลักการตรวจด้วยวิธี lateral flow immunoassay (31)

## เชื้อไวรัส Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

เชื้อไวรัส severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) หรือเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (COVID-19) ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีอาการปอดบวม (pneumonia) เริ่มตรวจพบเชื้อครั้งแรกช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 ที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน หลังจากนั้นเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ได้แพร่ระบาดไปทั่วโลกใน ช่วงเวลาเพียงไม่กี่เดือน เมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2563 องค์การอนามัยโลกจึงได้ประกาศเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 เป็นภาวะฉุกเฉินระหว่างประเทศ

SARS-CoV-2 เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้มจัดอยู่ในจีโนม Betacoronavirus จีโนมย่อย sarbecovirus ตระกูล *Coronaviridae* ตระกูลย่อย *Orthocoronavirinae* (32) โดยเชื้อไวรัสมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับ bat-derived severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronaviruses คิดเป็น 89.1% (33) เชื้อ SARS-CoV-2 มีขนาดประมาณ 120-160 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสเป็นทรงกลม ภายในอนุภาคไวรัสบรรจุด้วยสารพันธุกรรมชนิด RNA สายบวกที่มีลักษณะเป็นสายเดี่ยว (positive single strand RNA) ที่มีคุณสมบัติสามารถทำหน้าที่เป็น mRNA ที่สร้างโปรตีนได้

## โครงสร้างจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2

เชื้อ SARS-CoV-2 มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายบวกที่มีลักษณะเป็นสายเดี่ยว คือ มีคุณสมบัติสามารถทำหน้าที่เป็น mRNA ที่สร้างโปรตีนได้ ซึ่งมีความยาว 29,891 นิวคลีโอไทด์ ที่สามารถแปลรหัสได้ 9,860 กรดอะมิโน โดยมีปริมาณ GC อยู่ที่ 38% โดยจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 นั้นประกอบไปด้วย 12 open reading frame (ORF) และมีส่วนของ untranslated region (UTR) หนาบอยู่ด้านข้าง โดยมีการจัดเรียงตัวเริ่มจาก (5'-UTR), ORF 1a/b ตามด้วยบริเวณ 4 ยีนที่แปลรหัสให้เป็นโปรตีนโครงสร้างได้แก่ spike (S), envelop (E), membrane (M) และ nucleocapsid (N) protein บริเวณยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนอื่นๆ (accessory proteins) ได้แก่ ORF 3, 6, 7a, 7b, 8 และ 9b และต่อท้ายด้วยบริเวณ (3'-UTR) โดยจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 นั้นขาดส่วนของยีน hemagglutinin-esterase ไป (34)

### Untranslated region (UTR)

บริเวณ 5'-UTRs มีความยาว 265 นิวคลีโอไทด์ และบริเวณ 3'-UTRs ยาว 358 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ UTRs ของ SARS-CoV-2 มีความเหมือนกับไวรัสในจีแนส Betacoronavirus ตัวอื่นมากถึง 83.6%

### Open reading frame (ORF) 1a/b

Open reading frame (ORF) ซึ่งแปลรหัสเป็น polyprotein เช่นเดียวกับไวรัสในจีแนส Betacoronavirus ส่วนของ ORF 1a/b คลอบคลุมบริเวณถึง 2 ใน 3 ของสายไวรัส RNA นอกจากนี้บริเวณรอยต่อของปลาย 5'-UTRs และ ORF 1a/b สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ 2 polyproteins (pp1a และ pp1ab) เป็น 16 non-structural proteins (nsp) สำหรับการจำลองตัวเองของไวรัส (replication) โดยโปรตีน nsp ได้แก่ viral cysteine proteases 2 โปรตีน ประกอบด้วย nsp3 (papain-like protease และ nsp5 (chymotrypsin-like, 3C-like, หรือ main protease), nsp12 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp), nsp13 (helicase) และ โปรตีน nsp อื่นๆที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัส(transcription) และจำลองตัวเองของไวรัส (replication)

### Structural proteins

Spike (S) glycoprotein

S glycoprotein ส่งผลต่อการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) ของโฮสต์ ในส่วนของ spikes glycoprotein ยื่นอยู่บนผิวขนาดความยาว 9-12 nm โดย spikes จะเข้าจับกับ receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) เพื่อเข้าสู่เซลล์โฮสต์โปรตีนนี้ประกอบไปด้วย 2 subunits ได้แก่ S1 และ S2 โดย S1 ประกอบด้วย signal peptide, N-terminal

domain (NTD) และ receptor-binding domain (RBD) นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนของ S1 มีความคล้ายคลึงกับ bat SARS-like CoVs 2 สายพันธุ์ (SL-CoV ZXC21 และ ZC45) และ human SARS-CoV เพียง 70% ซึ่ง S1 มีส่วนประกอบของ epitopes ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (receptor) เพื่อเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์และเป็นแอนติเจนที่เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์สร้าง neutralizing antibodies ในการสร้าง protective immunity ส่วน ส่วน S2 ประกอบด้วย conserved fusion peptide (FP), heptad repeat (HR) 1 และ 2, transmembrane domain (TM) และ cytoplasmic domain (CP) ซึ่ง S2 ของเชื้อ SARS-CoV-2 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ bat SARS-like CoVs 2 ชนิด (SL-CoV ZXC21 และ ZC45) รวมถึง human SARS-CoV สูงถึง 99% และมีหน้าที่กระตุ้นการรวมกัน (fusion) ของเชื้อไวรัสบริเวณโดเมน heptad repeats 1 (HR1) และ HR1 เข้ากับผนังเซลล์ของโฮสต์ ดังนั้นบริเวณ S2 อาจมีบทบาทสำคัญในการใช้สร้างเปปไทด์ใช้ในการรักษาและต่อต้านไวรัส (35)

#### Envelop (E) protein

E protein เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (8.4-12 กิโลดาลตัน) ประกอบด้วย 2 โดเมนที่แตกต่างกัน ได้แก่ hydrophobic domain และ charged cytoplasmic tail โดยโครงสร้างของ E protein ของ CoV แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ซึ่ง E protein มีบทบาทหลากหลายเช่น การจัดรูปร่างของไวรัส (viral morphogenesis) ขณะที่ไวรัสเกิดการประกอบรูปร่าง (assembly) และ แยกชิ้นส่วนของไวรัส (egress) ที่มีผลต่อการ immature ของไวรัส และ ไวรัส progenies, เกี่ยวข้องกับ ion channels, virulence factor, เกี่ยวข้องกับกระบวนการ assembly และ budding formation นอกจากนี้ยังพบ E protein อยู่บริเวณรอบ ER และ Golgi body สำหรับลำดับอะมิโน E protein ของ SARS-CoV-2 พบว่ามีความอนุรักษ์เหมือนกับไวรัสอื่นๆในจีนัส Betacoronavirus และ SARS CoVs (36)

#### Nucleocapsid (N) protein

โครงสร้าง N protein มีความอนุรักษ์เหมือนกันในกลุ่มของ CoV ซึ่ง N protein สามารถแยกออกเป็น 3 บริเวณ ได้แก่ N-terminal domain, central linker และ the C-terminal domain โดย N-arm และ C-tail เป็นบริเวณหลักที่มีบทบาทสำคัญ N-arm ทำหน้าที่เป็น RNA binding และ C-tail ทำหน้าที่ dimerization รวมถึงการเกิด oligomerization และ N-M protein interactions สำหรับบริเวณ CL จะมีกรดอะมิโน arginine และ serine สูง จึงเป็นบริเวณที่เกิด phosphorylation ดังนั้น N protein จึงมีบทบาทการ formation และ maintenance ของ RNP complex ในการควบคุมการ replication and transcription ของไวรัส RNA ที่เกิดในโฮสต์, การ



ยับยั้งกระบวนการ translation ของโปรตีนผ่านการทำงานของ EF1 $\alpha$ -mediated action, ควบคุม metabolism รวมถึง cell cycle ของโฮสต์ ผ่านการยับยั้ง CDK4 และกระบวนการ apoptosis (36)

Membrane (M) protein

M protein มีบทบาทสำคัญในการคงสภาพรูปร่าง viral envelope โดยสามารถ interaction ร่วมกับ CoV อื่นๆผ่าน Membrane protein รวมตัวกับ Golgi complex ในการสร้าง virions ใหม่ขึ้น และรักษาสภาพ nucleocapsid protein โครงสร้างของ M protein ประกอบด้วย transmembrane 3 โดเมน ได้แก่ C-terminal ที่อยู่ภายในและยาวกว่าส่วนของ N-terminal ที่อยู่ภายนอก สำหรับการ interaction ระหว่างโปรตีน-โปรตีน ของไวรัส M protein มีส่วนช่วยเรื่อง viral intracellular homeostasis ตัวอย่างเช่น interaction ระหว่างโปรตีน M-S มีส่วนช่วย spike protein รวมตัวกับ Golgi complex ในการสร้าง virions ใหม่ขึ้น, interaction ระหว่างโปรตีน M-N ช่วยรักษาสภาพ RNP complex (nucleocapsid-RNA complex) ในการสร้างแกนของไวรัส (viral core) ซึ่งโปรตีน M และ N เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อ envelope protein รวมถึงกำหนดรูปร่างของไวรัส (36)

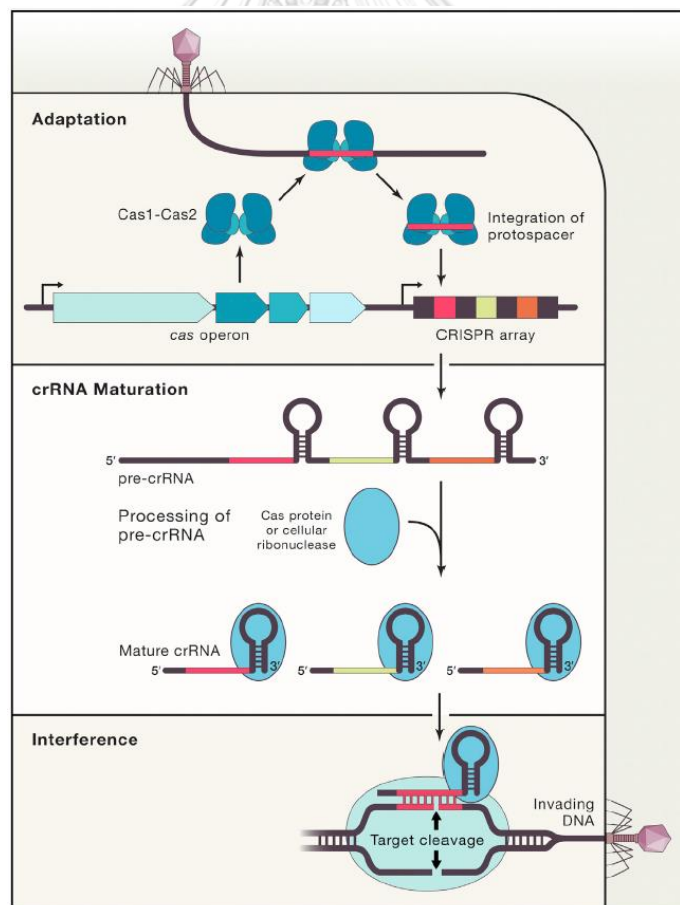
### Accessory proteins

Accessory proteins ของ SARS-CoV-2 ประกอบไปด้วย 6 โปรตีนคือ ORF3, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 และ ORF9b จากการศึกษาใน SARS-CoV ของ Zeng และคณะ พบว่า ORF3a, ORF3b, และ ORF6 มีความสามารถในการต้าน interferon (IFN) ของโฮสต์ที่ส่งผลต่อการเกิดโรค อีกทั้ง ORF3a, ORF7a, และ ORF8b ยังส่งผลการเพิ่มขึ้นของ NF-B, interleukin-8 (IL-8) และ CCL5 ส่วน ORF6 ยังทำงานร่วมกับ nsp8 ในขั้นตอนการ replication ของไวรัส ทั้งนี้ในส่วน ของ ORF8 ยังมีความสำคัญต่อการกระจายตัวของไวรัส เช่น เมื่อเปรียบเทียบกับโคโรนาไวรัสที่ก่อโรคในกลุ่มของซเมต โคโรนาไวรัสที่ก่อโรคในมนุษย์มีการหายไปถึง 28 นิวคลีโอไทด์ในยีน ORF8

## ระบบ CRISPR-Cas

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) และ CRISPR-associated protein (Cas) เป็นระบบที่เสมือนเป็นระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรีย (bacteria) และอาร์เคีย (Archaea) ทำหน้าที่ต่อต้านกับจุลชีพที่เข้ามารุกราน อย่างเช่น แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ พลาสมิด (plasmid) (12) ระบบ CRISPR-Cas ทำงานโดยอาศัย 2 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ แคลสโอเปอโรน (*cas operon*) ที่ผลิตให้โปรตีนแคส ซึ่งทำหน้าที่เป็น nuclease ย่อยสารพันธุกรรมแปลกปลอมที่รุกรานเชื้อแบคทีเรีย และ CRISPR array ที่ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นเบสซ้ำ (repeat base) และส่วนที่เป็นบริเวณจดจำสารพันธุกรรมแปลกปลอม (spacer) ทำหน้าที่ผลิต crRNA (crRNA Maturation) เพื่อกำหนดเป้าหมายให้แก่โปรตีนแคส (37)

ขั้นตอนการทำงานของระบบนี้มีด้วยกัน 3 ขั้นตอน ได้แก่ การปรับตัว (adaptation) การสร้าง crRNA และ กำจัดสิ่งแปลกปลอม (target interference) ดังภาพที่ 6 (38)



ภาพที่ 6 ภาพจำลองการทำงานของระบบ CRISPR-Cas ในเซลล์แบคทีเรีย (38)

ขั้นตอนแรก การปรับตัว (adaptation) เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นหลังจากเซลล์แบคทีเรียติดเชื้อในครั้งแรก เป็นการนำชิ้นส่วนของสิ่งแปลกปลอม (mobile genetic element) เข้ามาใน CRISPR array โดยโปรตีนแคสจะคัดเลือกชิ้นส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณจดจำของโปรตีน (Protospacer Adjacent Motif; PAM) และตัดชิ้นส่วนนั้นเข้ามาแทรกใน CRISPR array ในบริเวณที่เป็น spacer ซึ่งการอาศัย PAM ในการคัดเลือก หลังจากการนำลำดับเบสเข้ามาใน CRISPR array แล้ว ขั้นตอนถัดมาคือ กระบวนการสร้าง crRNA (crRNA Maturation) โดย CRISPR array จะถูกถอดรหัสออกมาเป็น pre-crRNA และถูกตัดแต่งเพื่อให้เหมาะสมแก่การรวมกับโปรตีน cas เมื่อรวมกับตัวโปรตีนแคสแล้ว จะสามารถจับกับสารพันธุกรรมแปลกปลอม เพื่อจำกัดสารพันธุกรรมเหล่านั้นได้ (target interference)

ระบบ CRISPR-Cas มีการจำแนกประเภทออกเป็น 2 คลาส (class) ซึ่งมีทั้งหมด 6 ชนิด (type) ตั้งแต่ I ถึง VI โดยมีหลักการจำแนก 4 ประการ ได้แก่ การทำงานของโปรตีนในระบบ ยีนที่เป็นเอกลักษณ์ใน CRISPR array (signature cas gene) ลำดับขั้นการวิวัฒนาการของโปรตีน Cas1 และการจัดเรียงตัวของยีนภายใน CRISPR array (38)

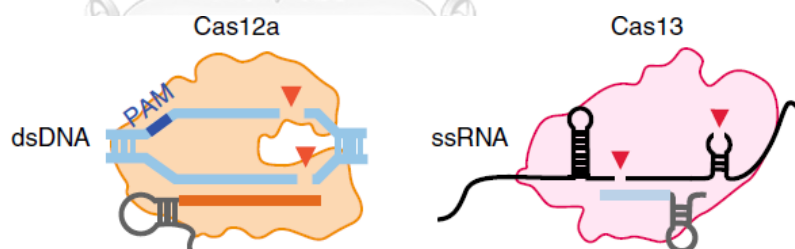
CRISPR-Cas class 1 ประกอบด้วย CRISPR-Cas ชนิด I, III และ IV เอกลักษณ์ของ CRISPR-Cas ในคลาสนี้คือ การมีโปรตีนแคสมากกว่า 1 โปรตีนที่ช่วยกันทำงานในกลไกต่อต้านสิ่งแปลกปลอม เช่น CRISPR-Cas ชนิด I จะมีโปรตีนแคส 5 แบบ ได้แก่ Cas3, Cas5, Cas7, Cas8 และ Cas11 เพื่อช่วยกันจับและทำลาย DNA แปลกปลอม (38)

CRISPR-Cas class 2 ประกอบด้วย CRISPR-Cas ชนิด II, V และ VI มีเอกลักษณ์ที่แตกต่างจาก CRISPR-Cas class 1 อย่างชัดเจนคือ ระบบการทำงานของ CRISPR-Cas class 2 อาศัยการทำงานของโปรตีนแคสเพียงตัวเดียว ในการจับและทำลาย DNA แปลกปลอม ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนแคส 12 (Cas12) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม CRISPR-Cas ชนิด V-a ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 1300 โมเลกุล ทำหน้าที่ตัดสายดีเอ็นเอทั้งสายที่เข้าคู่กับ crRNA (target strand) และสายตรงกันข้าม (non-target strand) ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ขาดออกจากกัน (Double-strand DNA breaks; DBS) โดยใช้ โดเมน (domain) Ruv-C เพียงโดเมนเดียว ลักษณะการตัดเช่นนี้ ทำให้สายดีเอ็นเอขาดออกจากกันแบบปลายไม่เท่า (sticky-end) ซึ่งจะหล่อกันประมาณ 5-8 นิวคลีโอไทด์ (39)

ในปัจจุบัน ระบบ CRISPR-Cas ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตัดแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายรูปแบบ เช่น การตัดแต่งพันธุกรรมพืชเพื่อให้พืชทนทานต่อการติดเชื้อมากขึ้น หรือจะเป็นการตัดแต่งพันธุกรรมในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพื่อศึกษากลไกการทำงานของยีนต่างๆ (40) อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการนำระบบ CRISPR-Cas มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรม เช่น ระบบ CRISPR-Cas9 (41-43), CRISPR-Cas12 (8, 10), CRISPR-Cas13 (9, 11, 44)

และระบบ CRISPR-Cas14 (45) โดยหลักการของวิธีการตรวจเหล่านี้ คือการนำ crRNA ที่จำเพาะกับสิ่งที่ต้องการตรวจหา เช่น การกลายพันธุ์ของยีน หรือเชื้อก่อโรค นำมาใช้ร่วมกับโปรตีนแคส หาก crRNA สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายในตัวอย่างได้ โปรตีนแคสจะถูกกระตุ้นให้ทำงาน และสามารถประเมินผลการทดสอบจากการวัดการทำงานของโปรตีนแคส

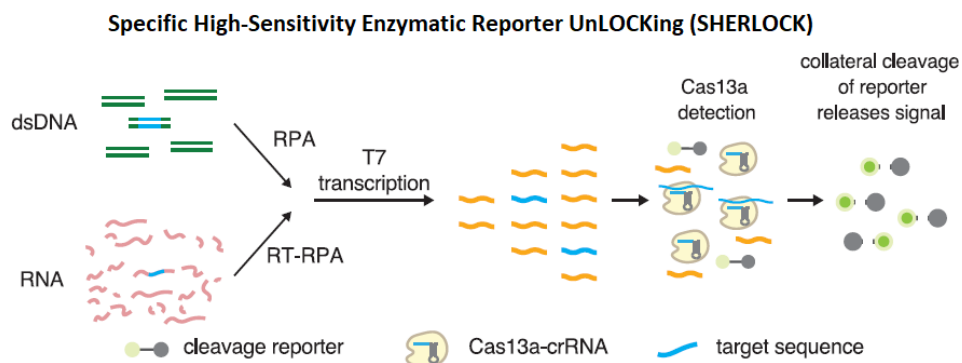
ต่อมามีการค้นพบว่าโปรตีนแคสจำพวกหนึ่ง ได้แก่ CRISPR-Cas12a, CRISPR-Cas13 และ CRISPR-Cas14 มีความสามารถในการตัดนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวแบบสุ่ม ภายหลังจากตัดแบบจำเพาะที่อาศัย crRNA กล่าวคือ หลังจากที่ crRNA ไปจับคู่กับเป้าหมายได้อย่างจำเพาะแล้ว จะเกิดการตัดลำดับเบสบริเวณข้างเคียงของ crRNA หลังจากนั้นโปรตีนแคสจะสามารถตัดนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว ที่มีอยู่ทั้งหมดในบริเวณนั้นได้ โดยความสามารถทั้งสองอย่างนี้ ถูกเรียกว่าเป็น collateral activities และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรม ซึ่งใช้ ssDNA/RNA reporter probe ที่มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ปลายข้างหนึ่งติดฉลากสารเรืองแสง (fluorescent) ส่วนปลายอีกข้างติดตัวยับยั้งการเปล่งแสง (quencher) เมื่อตัวยับยั้งอยู่ใกล้กับสารเรืองแสง สารเรืองแสงจะไม่ถูกเปล่งออกมา แต่หากอยู่ไกลกัน หรือขาดออกจากกัน สารเรืองแสงจะสามารถเปล่งแสงออกมาได้ ซึ่งการใช้ collateral activities นั้นมีจุดแข็งที่เหมือนเป็นการขยายสัญญาณของโปรตีนแคส ทำให้สามารถตรวจวัดการทำงานของแคสได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์มีความไวสูงขึ้น อีกทั้งยังสามารถพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบชุดตรวจอย่างรวดเร็วได้อีกด้วย ทั้งนี้ความแตกต่างของการทำงานระหว่างโปรตีน Cas12a และ Cas13 สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 7



PAM required	Yes	No
PAM identity	TTTV	Not applicable
Cleavage	Single staggered cut	Many cleavage sites
Target type	ssDNA, dsDNA	ssRNA only
Collateral	Yes	Yes

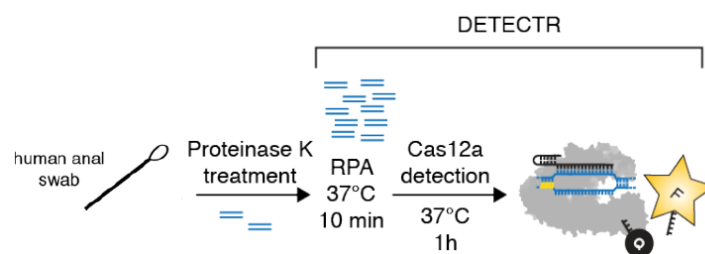
ภาพที่ 7 แสดงความแตกต่างของการทำงานระหว่างโปรตีน Cas12a และ Cas13 (46)

SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) เป็นหนึ่งใน CRISPR-Based diagnostic test ที่ใช้ CRISPR-Cas13 เป็นหัวใจสำคัญของการตรวจหาสารพันธุกรรม โดย CRISPR-Cas13 เป็นระบบที่ตรวจหาเป้าหมายและทำลายสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ (14) ซึ่งแตกต่างจากระบบของ CRISPR-Cas ในระบบอื่นๆ โดย Gootenberg J. S. และคณะ ได้พัฒนา SHERLOCK ขึ้นเพื่อการตรวจหาไวรัสในสิ่งส่งตรวจและตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีนของผู้ป่วย โดยได้นำเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยอุณหภูมิเดียว (isothermal amplification) เข้ามาร่วมกับการใช้โปรตีนแคส 13 และตรวจวัดการเรืองแสงของตัวอย่างโดยใช้เครื่องอ่าน fluorescent และ lateral flow dip stick ซึ่งความไวในการตรวจหาไวรัสของวิธีนี้อยู่ที่ 2 aM (attomolar;  $10^{-18}$ ) ต่อตัวอย่าง (ภาพที่ 8) (44)



ภาพที่ 8 หลักการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยวิธี SHERLOCK (44)

นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาเทคนิค CRISPR-Cas based diagnostic test ที่ตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยระบบ CRISPR-Cas12a อีกด้วย โดย Chen J. S. และคณะ ได้พัฒนา DNA Endonuclease Targeted CRISPR *Trans* Reporter หรือ DETECTR (ภาพที่ 9) ซึ่งนำระบบ CRISPR-Cas12a มาใช้ควบคู่กับเทคนิค RPA ซึ่งมีความไวของวิธีตรวจถึง 10 aM (8)



ภาพที่ 9 หลักการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมจากผู้ป่วยด้วยวิธี DETECTR (8)

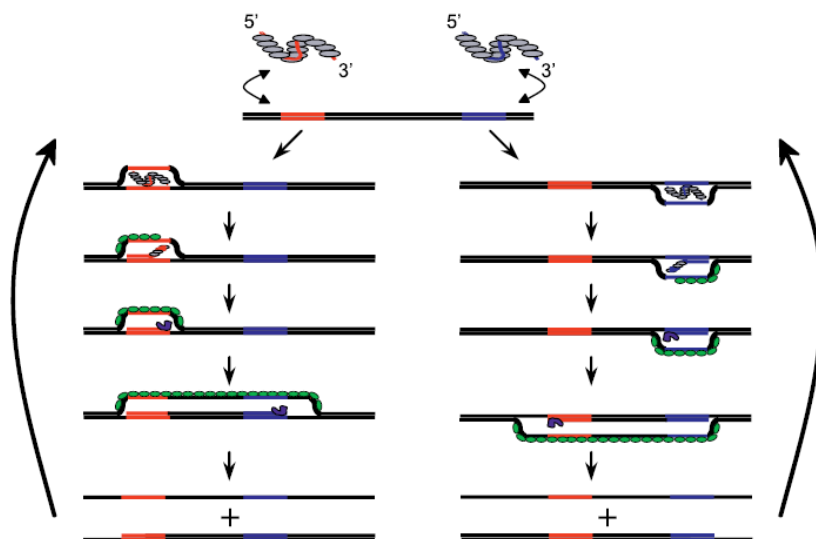
อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของทั้งสองระบบคือ ชนิดของสารพันธุกรรมที่ตรวจหา และชนิดของ probe ที่ใช้ โดยระบบ CRISPR-Cas13 เหมาะสำหรับการตรวจหา RNA แบบไม่ต้องเพิ่มจำนวน ซึ่งข้อจำกัดของระบบ CRISPR-Cas13 คือการต้องเปลี่ยนจาก cDNA ภายหลังจากเพิ่มจำนวน ให้กลายเป็น RNA ก่อนที่จะตรวจวัดด้วย CRISPR-Cas13 และต้องใช้ probe ที่เป็น RNA ซึ่งมีราคาแพง และมีเสถียรภาพน้อยกว่า DNA probe ส่วนระบบ CRISPR-Cas12a อาจจะเหมาะกับการตรวจหา DNA หรือตรวจวัดสารพันธุกรรมที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ มากกว่าการตรวจหา RNA โดยตรง การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในปัจจุบันมีหลากหลายรูปแบบ ดังเช่น PCR ดังที่กล่าวไปข้างต้น อย่างไรก็ตาม การทำ PCR จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือในการควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ (ในขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension) และควบคุมจำนวนรอบ (จำนวน 35-40 รอบ) ของการทำปฏิกิริยา ซึ่งมีราคาแพงและอาศัยเวลาในการทำประมาณ 2 ชั่วโมง โดยภายหลังได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิเดียวขึ้นมา (isothermal amplification) ซึ่งส่วนใหญ่จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในการแยกสายของดีเอ็นเอเป้าหมายแทนการใช้อุณหภูมิสูง จึงสามารถหุ่นเวลาในการทำได้เหลือเพียงไม่ถึง 30 นาทีต่อตัวอย่าง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการตรวจวินิจฉัยและประหยัดเวลาได้เป็นอย่างดี

### Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

RPA เป็นกระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยอาศัยเอนไซม์รีคอมบิเนส (recombinase) เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ใช้แยกสายดีเอ็นเอ ซึ่งทำงานร่วมกับเอนไซม์โพลีเมอเรส (Polymerase) ในการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมเป้าหมาย โดยหลักการทำงานของวิธีนี้คือ ใช้ recombinase ที่จะจับอยู่กับไพรเมอร์ สรรวจหาบริเวณที่สามารถเข้าคู่กับไพรเมอร์ได้ เมื่อเจอบริเวณนั้น เอนไซม์จะสับเปลี่ยนการเข้าคู่ จากดีเอ็นเอเป้าหมายที่จับกันเป็นสายคู่ เปลี่ยนให้มาจับกับไพรเมอร์แทน หลังจากนั้นสายดีเอ็นเอเป้าหมายที่หลุดออกมา จะถูก single-stranded binding protein ตรึงเอาไว้ เพื่อป้องกันมิให้กลับไปเข้าคู่กันตามเดิมและป้องกันไม่ให้ไพรเมอร์หลุดออกไป เมื่อไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าคู่กันแล้วเอนไซม์ polymerase I จะเข้ามาเติมเบสคู่สมต่อจากเส้นไพรเมอร์ จึงได้เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ในบริเวณที่ต้องการ (ภาพที่ 10) และจะเพิ่มจำนวนเป็นแบบทวีคูณจากปฏิกิริยาต่อเนื่องของเอนไซม์เหล่านี้ โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องทำอุณหภูมิราคาแพงและใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนที่น้อยกว่าการทำพีซีอาร์ (47)

สิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งสำหรับการทำ RPA นั่นคือไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออินเป้าหมาย ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของ RPA จะต้องการความยาวมากกว่าไพรเมอร์ PCR และความยาวนี้มีผลต่อการจับกันเป็น complex ระหว่าง recombinase enzyme และ primer หาก recombinase สามารถ

จับ primer ได้ดี ย่อมหมายถึงประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งความยาวโดยปกติของ RPA primer จะอยู่ที่ประมาณ 30-35 คู่เบส และควรมี %GC ที่ใกล้เคียงกันระหว่าง forward primer และ reverse primer



ภาพที่ 10 หลักการทำงานของกระบวนการ (RPA) (47)

เส้นสีแดง-เป็นตัวแทนของ forward primer; เส้นสีน้ำเงิน-เป็นตัวแทนของ reverse primer; วงรีสีเทา-เป็นตัวแทนของ recombinase; วงรีสีเขียว-เป็นตัวแทนของ single-stranded binding protein

เนื่องจากเทคนิคอาร์พีเอเป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในอุณหภูมิเดียว ที่มีประสิทธิภาพและใช้เวลาในการทำไม่ถึง 30 นาที ดังนั้น อาร์พีเอจึงถูกนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมนอกสถานที่อย่างแพร่หลาย ซึ่งการปฏิบัติการนอกสถานที่นั้นจะถูกจำกัดอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ให้สามารถใช้ได้ไม่มาก ดังนั้นเทคนิคอาร์พีเอจึงถูกนำไปพัฒนาควบคู่กับการอ่านผลหลากหลายรูปแบบที่ทำให้อ่านผลได้สะดวกมากยิ่งขึ้น เช่น นำมาประยุกต์กับเทคนิค lateral-flow dip stick (RT-RPA-LFD) ที่อาศัยหลักการจับกันของแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนแผ่นชุดตรวจ และแอนติเจนที่ติดอยู่กับไพรเมอร์ และ PCR product ทำให้เกิดเป็นแถบสีในบริเวณที่กำหนดไว้ ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า

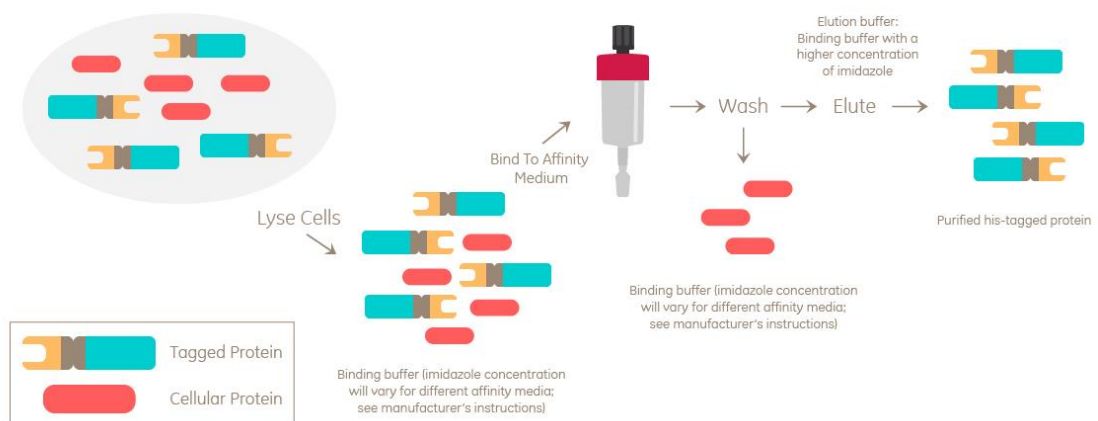
### Histidine-tag purification

กระบวนการ Histidine-tag purification หรือ His-tag purification เป็นกระบวนการทำให้ recombinant protein บริสุทธิ์โดยอาศัยความชอบ (affinity) ในการจับกันของโปรตีน histidine กับธาตุ metal ion (เช่น  $\text{Ni}^{2+}$  หรือ  $\text{Cu}^{2+}$ ) ที่ตรึงอยู่บนวัสดุยึดเกาะ (matrix) อย่างเช่น resin หรือ nitrilotriacetic acid (4) เทคนิคนี้เป็นหนึ่งในหลักการ immobilized metal ion

affinity chromatography หรือ IMAC ซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานที่มักถูกนำไปใช้ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยกรดอะมิโน histidine จะถูก translate ออกมาพร้อมกับโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งส่วนใหญ่จะติดอยู่บริเวณปลายหมู่อะมิโนอิสระ (N-terminus) ของโปรตีนและมีจำนวนประมาณ 6-10 กรดอะมิโน histidine tag ที่ติดออกมากับโปรตีนจะมีน้ำหนักเพียง 0.84 kDa ซึ่งทำให้ histidine tag ไม่ส่งผลกระทบต่อการ folding ของโปรตีน และไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน อีกทั้งยังมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มต่ำ จึงทำให้สามารถนำโปรตีนที่ติด histidine tag ไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วย histidine tag ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ขั้นแรก นำ cell lysate ผ่านลงไปคอลัมน์ หรือวัสดุยึดเกาะ ทำให้ recombinant protein สามารถจับกับ metal ion ได้ และล้างโปรตีนที่ไม่จับกับ metal ion ออก ซึ่งโปรตีนที่ไม่ได้ติดฉลาก histidine ส่วนใหญ่จะหลุดออกไปในขณะล้าง และสุดท้ายจะทำการชะ recombinant protein ออกมาด้วยการใช้ competitor ที่แย่งจับกับ metal ion เช่น Imidazole (ภาพที่ 11)

#### General Purification of Histidine-tagged (His-tagged) Proteins



ภาพที่ 11 แสดงขั้นตอนการ purification ด้วย histidine tag (48)



## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยโดยการทดลอง (Experimental Research)

### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 50 kDa และ 100 kDa Centrifugal Filter (Merck, Germany)

Balance (Precisa, UK)

Biosafety cabinet class 2a (Esco, Singapore)

BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-Helix, Taiwan)

Centrifuge (1.5mL) (Eppendorf, Germany)

Centrifuge (50mL) (Hettich, Singapore)

Easypet<sup>®</sup> 3-Pipette controller (Eppendorf, Germany)

Electrophoresis chamber set (Major science, USA)

Freezer -20°C (Sanyo, Japan)

Freezer -80°C (Panasonic, Japan)

Gel Doc 1000 (Vilber lourmat, Hong Kong)

Heat block (Eppendorf, Germany)

incubator shaker (Biosan, Lattvia)

Mastercycler<sup>®</sup> Thermocycler (Eppendorf, Germany)

Microplate reader (Teacan, Switzerland)

plate roller (Biosan, Lattvia)

Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, USA)

Qubit<sup>™</sup> Fluorometric Quantitation (Thermo fisher scientific, USA)

Refrigerator 4°C (Panasonic, Japan)

Sonicator (Kudos, China)

StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR (Thermo fisher scientific, USA)

Ultimate 3000 nano Liquid-Chromatography (Dionex, USA)

Vortex mixer (Scientific industry, USA)

### 3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 0.1 mL qPCR 8-strip with attached flat caps, clear (Kirgen, China)
- 0.2 mL microcentrifuge tube (Kirgen, China)
- 0.65 mL microcentrifuge tube (Axygen, USA)
- 1.5mL microcentrifuge Protein low-bind tube (Eppendorf, Germany)
- 96-well microtiter plate (Eppendorf, Germany)
- Conical flask 1 L (Pyrex, Germany)
- Serological pipette (SPL, Korea)
- Syringe (3 mL, 10 mL) (Nipro, Japan)

### 3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- สารเคมีที่ใช้ในการผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1)
- 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 expression vector (Addgene, USA)
- Agar (Becton, Dickinson and company (BD), USA)
- Ampicillin (M&H manufacturing, Thailand)
- Bacto™ tryptone (Becton, Dickinson and company (BD), USA)
- Bacto™ yeast extract (Becton, Dickinson and company (BD), USA)
- EDTA (Invitrogen, USA)
- Glucose (Cat No.783, Ajex Finechem, New Zeland)
- Glycerol (Merck, Germany)
- HEPES pH 7 (Gibco, USA)
- His- Buffer kit (GE Healthcare, USA)
- HisTrap™ FF (GE Healthcare, USA)
- imidazole (GE Healthcare, USA)
- Lysozyme (VWR amresco, USA)
- MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA)
- NaCl (Merck, Germany)
- Potassium chloride (VWR international, USA)
- Roche c0mplete™, EDTA-free (Roche, USA)
- Sodium chloride (Merck, Germany)

Terific broth (Himedia, India)

Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, TCEP (Aldrich, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน

BCA Protein Assay (Novagen<sup>®</sup>, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ SDS-PAGE

40% Acryl/Bis Solution (37.5:1) (Bio-Rad, USA)

Acetic acid (Merck, Germany)

Ammonium Persulfate (APS) (Merck, Germany)

Coomassie Blue (Merck, Germany)

Dual color Protein marker (Bio-Rad, USA)

Glycine (Merck, Germany)

Methanol (Merck, Germany)

SDS (Merck, Germany)

Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) (Merck, Germany)

Tris base (Vivantis, Malaysia)

Tris HCl (Invitrogen, USA)

$\beta$ -mercaptoethanol (Gibco, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Mass spectrometry

Acetonitrile, HPLC Grade (Honeywell, USA)

Ammonium bicarbonate ReagentPlus<sup>™</sup>  $\geq 99.0$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Sigma, Germany)

Formic acid, HPLC Grade (Fluka Analytical) (Sigma, Germany)

Trypsin 1 vial; 20  $\mu\text{g}$  (Promega, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของโปรตีน และการตรวจหาสารพันธุกรรมโดยใช้

Cas12a

10X NEBuffer 2.0 Reaction Buffer (New England Biolab, USA)

EnGen<sup>®</sup> *Lba* Cas12a, Cpf1 (New England Biolab, USA)

ssDNA fluorescent-quencher reporter probe (Macrogen, Korea)

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสร้าง crRNA และ อาร์เอ็นเอมาตรฐาน (standard RNA)

10X T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific, USA)  
 crRNA template ความเข้มข้น 10  $\mu$ M (Macrogen, Korea)  
 GenUP™ Total RNA kit (biotechrabbit, Germany)  
 miRNA isolation kit (GeneAid, Taiwan)  
 pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA)  
 Riboprobe® in vitro Transcription Systems (Promega, USA)  
 T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ L) (Thermo Scientific, USA)  
 T7 promoter primer ความเข้มข้น 10  $\mu$ M (Macrogen, Korea)  
 TURBO™ DNase (Ambion, USA)

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

10X reaction buffer (Biotechrabbit, Germany)  
 dNTPs (Thermo fisher scientific, USA)  
 Primer 10  $\mu$ M (Macrogen, Korea)  
 Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 unit/ $\mu$ l (Biotechrabbit, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส

GenUP™ Virus DNA/RNA kit (Biotechrabbit, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการวัดปริมาณสารพันธุกรรม

Qubit™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen™, USA)  
 Qubit™ HS RNA Assay Kit (Invitrogen™, USA)  
 Qubit™ microRNA Assay Kit (Invitrogen™, USA)

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ RPA

TwistAmp® Basic Kit (TwistDx, UK)

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Gel electrophoresis

Agarose (Invitrogen, USA)

Tris-base (Amresco, USA)

Boric acid (Merck, Germany)

100 bp DNA ladder (GeneDirex, Taiwan)

### 3.5 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

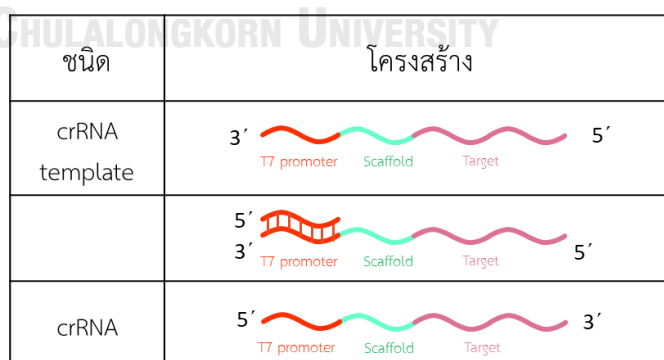
การดำเนินการทดลองในการศึกษานี้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกได้แก่ การพัฒนาตัวต้นแบบชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a และ ส่วนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก

#### 3.5.1 การพัฒนาตัวต้นแบบชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a

การสร้าง crRNA ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมเป้าหมาย

การออกแบบ crRNA

DNA ต้นแบบสำหรับการสร้าง crRNA ต้องประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ promoter, scaffold และ spacer ตามลำดับ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงองค์ประกอบและทิศทางของ DNA ต้นแบบสำหรับการสร้าง crRNA และ crRNA

- promoter ที่เลือกนำมาใช้ในการศึกษานี้คือ T7 promoter ซึ่งในส่วนนี้จะจุดเริ่มต้นของการสร้างสาย crRNA โดยใช้เอนไซม์ T7 RNA polymerase

- scaffold คือบริเวณที่จะขดเป็นโครงสร้างไว้สำหรับจับกับโปรตีน Cas12a มีความจำเพาะแยกไปตามสปีชีส์ของแบคทีเรียที่แยกมาได้

- spacer คือ บริเวณที่จะไปจับกับ DNA เป้าหมาย

1. ดาวน์โหลดยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV2 โดยสามารถดาวน์โหลดยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จาก Influenza Research Database (เข้าถึงได้จาก: <https://www.fludb.org/>) ส่วนเชื้อไวรัส SARS-CoV2 สามารถดาวน์โหลดได้จาก NCBI SARS-CoV-2 Resources (เข้าถึงได้จาก : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>) และดาวน์โหลดยีน Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ของมนุษย์จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) (เข้าถึงได้จาก : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) สำหรับเป็นสิ่งบ่งชี้คุณภาพตัวอย่าง

2. alignment เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) และบริเวณที่มีความหลากหลาย (variable region)

3. ออกแบบให้ spacer จับบริเวณ conserve region และจะต้องอยู่หลัง PAM sequence 5'-TTTV-3' หรือด้านหน้า PAM sequence 5'-BAAA-3'

4. ประกอบแต่ละส่วนของ crRNA เข้าด้วยกัน โดยขึ้นต้นด้วย promoter ต่อด้วย repeat และ spacer ตามลำดับ

5. หาก crRNA อยู่บริเวณด้านหลัง PAM ที่เป็น 5'-TTTV-3' สามารถนำมาประกอบกับส่วนที่เป็น repeat sequence ได้เลย แต่หาก crRNA อยู่บริเวณด้านหน้า PAM 5'-BAAA-3' จะต้อง reverse complement ก่อนที่จะต่อท้าย repeat sequence

6. reverse complement เส้น crRNA ทั้งเส้น กลายเป็น crRNA ต้นแบบ (crRNA template) ก่อนที่จะทำการสังเคราะห์ crRNA template โดยสามารถแสดง crRNA template ที่ใช้ในการทดลองได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของ crRNA template และไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้าง crRNA

ชื่อ	ลำดับเบส crRNA template	จำนวนเบส
Temp-crRNA_T7-huGAPDH-996	CAAATTCGTTGTCATACCAGATCTACACTTAGTAGAAATT ACCCTATAGTGAGTCGTATTA	61
Temp-crRNA_T7-fluA-M161	TGAGGCTCTCATGGAATGGCATCTACACTTAGTAGAAAT TACCCTATAGTGAGTCGTATTA	61
Temp-crRNA_T7-fluB-M113	TTCCAAGGCWGAGTCTAGGTATCTACACTTAGTAGAAAT TACCCTATAGTGAGTCGTATTA	61
Temp.-crRNA_T7 SARS2-Spike1	AGGGACTGGGTCTTCGAATCATCTACACTTAGTAGAAAT TACCCTATAGTGAGTCGTATTA	61
Temp.-crRNA_T7 SARS2-Spike2	GGTTGGAACCATATGATTGATCTACACTTAGTAGAAATT ACCCTATAGTGAGTCGTATTA	61
T7_F	TTGTAATACGACTCACTATAGGG	23

#### การผลิต crRNA

การสร้าง crRNA ในการศึกษาครั้งนี้ จะใช้ผลิตภัณฑ์ Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems (P1440, Promega, USA) และปฏิบัติตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การสร้างดีเอ็นเอสายคู่ (annealing) โดยการผสมสารเคมีดังตารางที่ 3  
ตารางที่ 3 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ annealing

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
10 µM crRNA template	4 µM	10
10 µM T7 promoter	4 µM	10
10X ligation buffer	1X	2.5
distilled water	-	2.5
รวม		25

2. นำสารละลายที่ผสมตามตารางที่ 3 บ่มตามอุณหภูมิดังต่อไปนี้

อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา	3 นาที
อุณหภูมิ 65°C	เป็นเวลา	3 นาที
อุณหภูมิ 42°C	เป็นเวลา	5 นาที
อุณหภูมิ 37°C	เป็นเวลา	45 นาที

3. วัดความเข้มข้นของ annealed crRNA template โดยใช้ Nanophotometer C40 (Implen, Germany)

4. สร้าง crRNA โดยการผสมสารเคมีดังตารางที่ 4 และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการบวกรสร้าง crRNA

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
5X Transcription Optimized Buffer	1X	4
2.5 mM rNTPs	0.5 mM	4
100 mM DTT	10 mM	2
20 U/μl T7 RNA Polymerase	20 U	1
40 U/μl RNasin® Ribonuclease Inhibitor	40 U	1
200 ng/μl annealed crRNA template	200 ng	1
distilled water		7
รวม		20

5. เติม 2U/μL TURBO™ DNase 1 μL ผสมให้เข้ากัน และ spin down

6. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

7. สกัด crRNA โดยใช้ชุดสกัด miRNA isolation kit (GeneAid, Germany) ตามขั้นตอนดังนี้

- นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6. เติม Lysis Buffer 200 μl
- ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- เติม Mi Buffer 20 μl, ddH<sub>2</sub>O saturated phenol 180 μl และ chloroform 40 μl



- ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- ดูดสารละลายใส่ส่วนบนมาใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่
- เติม absolute ethanol โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35% ethanol
- ผสมให้เข้ากันและนำสารละลายทั้งหมดที่ได้มาใส่ใน RNA column
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- ดูดส่วนใสที่ตกลงมาใน collection tube ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่
- เติม absolute ethanol โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 70% ethanol
- ผสมให้เข้ากันและนำสารละลายทั้งหมดที่ได้มาใส่ใน RNA column
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วนใสใน collection tube และเติม wash buffer 200  $\mu$ l
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วนใสใน collection tube และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- นำ RNA column มาสวมใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่
- เติม Release Buffer ที่อุณหภูมิ 65°C ปริมาตร 30  $\mu$ l
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- crRNA ที่สกัดออกมาได้ สามารถแบ่งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะนำออกมาใช้

8. วัดความเข้มข้น crRNA ด้วยชุด Qubit™ microRNA Assay Kit (Invitrogen™, USA) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- เตรียม Qubit™ working solution โดยใช้ Qubit™ microRNA buffer สำหรับวัด crRNA 199  $\mu$ l ผสมกับ Qubit® microRNA Reagent 1  $\mu$ l ต่อการวัด 1

ตัวอย่าง

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 2 ความเข้มข้น โดยใช้ Qubit™ working solution 190 µl ผสมกับ Qubit™ microRNA Standard #1 10 µl ใส่ลงในหลอด 0.65 ml microcentrifuge tube แบบใส และอีกหนึ่งหลอด ผสม Qubit™ working solution ปริมาตร 190 µl กับ Qubit™ microRNA Standard #2 ปริมาตร 10 µl จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
- เตรียมสารละลายสำหรับการวัดตัวอย่าง โดยใช้ Qubit™ working solution 199 µl ผสมกับตัวอย่าง 1 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
- เปิดเครื่อง Qubit™ 4.0 Fluorometer เลือก RNA จากนั้นเลือก microRNA
- ตั้งค่า Standard #1 และ Standard #2 หลังจากนั้นจึงสามารถวัดความเข้มข้นของตัวอย่างได้

9. เจือจาง crRNA ให้มีความเข้มข้นเป็น 300 nM โดยสามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้น crRNA ตั้งต้น (nM)} = \frac{\text{ความเข้มข้น crRNA (ng/}\mu\text{L)} \times 10^{-3}}{340 \times 41 \times 10^{-9}}$$

และเข้าสู่สูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

จะได้เป็น ปริมาตร crRNA ที่ใช้ ( $\mu\text{L}$ ) =  $\frac{300 \text{ (nM)} \times \text{ปริมาตรสุดท้าย}(\mu\text{L})}{\text{ความเข้มข้น crRNA ตั้งต้น (nM)}}$

## การเตรียมสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวก (positive control)

### ตัวอย่างไวรัสและ complementary DNA (cDNA)

ประกอบด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์ และ cDNA ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ดังนี้

- A/Thailand/104/2009 (สายพันธุ์ pH1N1)
- A/Thailand/CU-H1817/2010 (สายพันธุ์ H3N2)
- B/Thailand/CU-B5522/2011 (Victoria lineage)
- B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata lineage)
- SARS-CoV-2/human/THA/WU5/2020

### การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้เป็น positive control DNA

1. สกัดอาร์เอโดยใช้ชุดสกัด GenUP™ Virus DNA/RNA Kit (biotechrabbit, Germany) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

- นำสารละลายไวรัสปริมาตร 200  $\mu$ L ผสมกับ CARRIER-Buffer LYSIS LD ปริมาตร 200  $\mu$ L และ Proteinase K ปริมาตร 20  $\mu$ L
- ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- เติม BINDING BD ปริมาตร 400  $\mu$ L และผสมให้เข้ากัน
- นำสารละลายทั้งหมดเติมลงใน Mini Filter แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- นำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่
- เติม WASH A ปริมาตร 500  $\mu$ L แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- นำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่
- เติม WASH B ปริมาตร 650  $\mu$ L แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทำซ้ำอีก 1 รอบ
- นำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดสารละลายอื่นแล้ว

ทำให้คอลัมน์แห้ง

- นำ Mini Filter ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วเติม RNase-free water ปริมาตร 30  $\mu\text{L}$  ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- เติม RNase-free water ปริมาตร 30  $\mu\text{L}$  ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- RNA ที่สกัดได้สามารถนำไปเข้ากระบวนการ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA หรือนำไปเก็บไว้ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำออกมาใช้

## 2. สร้าง complementary DNA (cDNA)

- ผสม RNA sample 11.5  $\mu\text{L}$  กับ ไพรเมอร์ 100  $\mu\text{M}$  random hexamer ปริมาตร 1  $\mu\text{L}$  (ความเข้มข้นสุดท้าย 5  $\mu\text{M}$ )
- บ่มที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที
- แช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที
- เตรียม master mix สำหรับ reverse transcription ดังตารางที่ 5 และเติมลงในตัวอย่าง ปริมาตร 7.5  $\mu\text{L}$  (ปริมาตรสุดท้าย 20  $\mu\text{L}$ )

ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ reverse transcription

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร ( $\mu\text{L}$ )
5X Reaction Buffer	1X	4.0
10 mM dNTPs Mix	1 mM	2.0
200 U/ $\mu\text{L}$ RevertAid RT	200 U	1.0
40 U/ $\mu\text{L}$ RiboLock RNase Inhibitor	20 U	0.5
รวม		7.5

- ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

### 3. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

การออกแบบไพรเมอร์ สามารถใช้โปรแกรม BioEdit เวอร์ชัน 7.0.5.3 โดยต้องเลือกส่วนที่อนุรักษ์ (conserve) ในไวรัสแต่ละชนิด และออกแบบไพรเมอร์ให้ที่ครอบคลุมส่วนที่เป็น crRNA ซึ่งข้อกำหนดลักษณะของไพรเมอร์ที่จะออกแบบได้แก่

- มีขนาดประมาณ 18-25 base pairs
- %CG อยู่ในช่วง 40-60%
- Melting temperature (Tm) อยู่ที่ประมาณ 55-66°C และห่างกันไม่เกิน 2°C
- มีเบสซ้ำติดกันไม่เกิน 4 เบส
- หลีกเลี่ยงการเกิดโครงสร้างแบบทุติยภูมิ

### 4. ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

- ผสมสารเคมีที่ใช้สำหรับ PCR ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Reaction buffer	1X	2.50
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.75
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.50
10 μM Forward primer	0.2 μM	0.50
10 μM Reverse primer	0.2 μM	0.50
5 U/μl <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.5 U	0.1
distilled water	-	19.15
cDNA Template	-	1.0
รวม		25

- ตั้งอุณหภูมิในเครื่อง Mastercycler® (Eppendorf, Germany) ให้สอดคล้องกับคู่มือไพรเมอร์ดังตารางที่ 7 และ 8 ดำเนินการบ่มตามอุณหภูมิที่ตั้งไว้
- เมื่อเครื่องดำเนินการเรียบร้อยแล้ว สามารถเก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

ตารางที่ 7 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	2 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	40
Annealing*	50-60	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ และอุณหภูมิ annealing ที่ใช้กับไพรเมอร์ในแต่ละคู่

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing (°C)	PCR Product (basepair)
Influenza A M gene	FluA_M_F36	TAACCGAGGTCGAAACGTATG	53°C	218
	FluA_M_R253	TACGCTGCAGTCCTCGCTC		
Influenza B M gene	FluB_M_F16	GACACAATTGCCTACYTGCTT	53°C	178
	FluB_M_R193	AGATAGAKGCACCAATTAGTG		
SARS-CoV-2 S gene	SARS2_spike_F21843	CCACTGAGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTG	53°C	201
	SARS2_spike_R22013	AATAAACTCTGAACTCACTTTCCATCCAAT		
	SARS2_spike_F22975	AATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAAT	53°C	166
	SARS2_spike_R23109	TCCACAAACAGTTGCTGGTGATGTAGAAGTT		
GAPDH gene	GAPDH-F896	ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC	55°C	256
	GAPDH_R1151	GGACTGAGTGTGGCAGGGAC		

#### 5. การตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

- ละลาย 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ TBE และเทลงในถาด พร้อมกับหัวเสียบ
- เมื่อเจลแข็ง นำหัวเสียบออก และแช่เจลลงในแทงค์
- นำ PCR product ผสมกับ 6x loading dye ในอัตราส่วน 1:5 และปิเปตลงในหลุมเจล
- ปิเปต DNA Marker ขนาด 100-3,000 basepair (GeneDirex, Taiwan) ลงในหลุมสุดท้าย และ เปิดใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100-volt เป็นเวลา 45 นาที
- เมื่อครบเวลา นำไปส่องภายใต้แสงยูวี เพื่อสังเกตแถบ PCR ที่คาดหวัง

#### 6. การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR Purification)

- นำ PCR product ผสมกับ PB buffer ในอัตราส่วน 1:5 และ 3 mM Sodium acetate 10  $\mu$ L ผสมให้เข้ากัน
- ปิเปตส่วนผสมในข้อ 1.7.4.1 ลงใน QIAquick column
- ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วนใสใน collection tube และเติม PE buffer 750  $\mu$ L
- ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วนใสใน collection tube และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เป็นเวลา 1 นาที
- เติม EB buffer 30  $\mu$ L และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- เก็บ PCR product ที่ผ่านการ purification ไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้

#### 7. การวัดความเข้มข้นด้วยชุด Qubit™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen™, USA)

การวัดความเข้มข้น PCR product ด้วยชุด Qubit™ นั้น สามารถใช้ขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับการวัดความเข้มข้น crRNA แต่เปลี่ยนชุดผลิตภัณฑ์เป็น Qubit™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen™, USA) และเลือกโปรแกรมการตรวจเป็น DNA High sensitivity

## 8. การปรับความเข้มข้นสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวก

PCR product ในแต่ละยีน จะถูกนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 30 nM ในทุกๆยีน เพื่อเป็นตัวแปรควบคุมในการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย Cas12a และเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีน Cas12a โดยสามารถคำนวณความเข้มข้นตั้งต้นของ PCR product ได้ในสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น PCR product ตั้งต้น (nM)} = \frac{\text{ความเข้มข้น PCR product (ng/}\mu\text{L)} \times 10^{-3}}{660 \times \text{ความยาว PCR product} \times 10^{-9}}$$

และเข้าสู่สูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$\text{ดังนั้น ปริมาตร PCR product ที่ใช้ (}\mu\text{L)} = \frac{30 \text{ (nM)} \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (}\mu\text{L)}}{\text{ความเข้มข้น PCR product ตั้งต้น (nM)}}$$

## การเตรียม Recombinant vector สำหรับเป็นต้นแบบในกระบวนการ *in vitro* transcription ของอาร์เอ็นเอมาตรฐาน (standard RNA)

DNA ต้นแบบสำหรับการทำ *in vitro* transcription ของ standard RNA ต้องประกอบไปด้วยบริเวณ T7 promoter และบริเวณขึ้นส่วนที่ต้องการ transcribe ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเป็นการนำ specific DNA target ของไวรัสเข้าไปต่อกับ T7 promoter ที่อยู่ใน DNA plasmid จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนนั้นด้วยเทคนิค PCR

### 1. Ligation

- คำนวณอัตราส่วน molar ratio ระหว่าง DNA target กับ DNA plasmid ให้เป็นสัดส่วน 3 ต่อ 1 ตามลำดับ โดยสามารถคำนวณได้โดยใช้ Ligation Calculator - NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>)

- ผสมสารเคมีดังตารางที่ 9



ตารางที่ 9 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ ligation

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ )
5X rapid ligation buffer	1X	2.0
50 ng/ $\mu\text{l}$ pGEM®-T Easy Vector	1 Molar ratios	0.5
DNA template	3 Molar ratios	variable
2 U/ $\mu\text{l}$ T4 DNA ligase	1 U	0.5
distilled water	-	เติมจนปริมาตร 10 $\mu\text{l}$
รวม		10.0

- บ่มที่อุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

## 2. Transformation

- นำ plasmid ที่ผ่านกระบวนการ ligation แล้ว ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ผสมกับ competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ) ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$

- ผสมให้เข้ากัน และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

- บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที โดยระมัดระวังการสั่นสะเทือนขณะบ่ม

- นำมาแช่น้ำแข็งต่อเป็นเวลา 2 นาที

- เตรียม SOC media โดยใช้ LB broth 980  $\mu\text{l}$  ผสมกับ 2 M MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu\text{l}$  และ 2 M Glucose 10  $\mu\text{l}$

- เติมน้ำ SOC media 950  $\mu\text{l}$  ลงใน competent cell

- ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้ shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

- นำมาปั่นตกตะกอนแบคทีเรีย ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

- เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนแบคทีเรียกับ media ที่เหลืออยู่

- นำแบคทีเรียทั้งหมด spread ลงบน LB agar plate ที่มี Ampicillin (Ampicillin 100  $\mu\text{l}$  ต่อ media 100 ml)

- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชม.

- เลือกโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ใส่ลงใน LB broth 2 mL เพื่อเพิ่มจำนวน

- บ่ม 37°C เป็นเวลา 14-16 ชม.

- แบ่งอาหารเหลวนำมาทำเป็น glycerol stock bacteria โดยผสมอาหารเหลวปริมาตร 500  $\mu$ l กับ glycerol 500  $\mu$ l และเก็บในอุณหภูมิต่ำ  $-80^{\circ}\text{C}$  และเก็บอาหารเหลวที่เหลือนำมาสกัดพลาสมิด

3. การสกัดพลาสมิด ด้วยชุดสกัด PureDirex Plasmid *mini*PREP Kit (BIO-HELIX, Taiwan)

- นำเชื้อในอาหารเหลว ใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube ปริมาตร 1.5 mL
- ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใส่ส่วนบนออก
- ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Buffer S1 ปริมาตร 200  $\mu$ l
- เติม Buffer S2 ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับไปมา 10 ครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2 นาที
- เติม Buffer S3 ปริมาตร 300  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับไปมา 10 ครั้ง
- ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- เปิดสารละลายส่วนใส ใส่ลงใน PM column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- เทสารละลายส่วนใสใน collection tube ที่ตั้ง
- เติม Buffer W1 ปริมาตร 400  $\mu$ l ลงใน PD column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม Buffer W2 ปริมาตร 600  $\mu$ l ลงใน PD column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- เทสารละลายส่วนใสใน collection tube ที่ตั้ง และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- ย้าย PM column ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube และเติม Buffer E ปริมาตร 60  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

#### 4. ทำให้พลาสมิดเป็นเส้นตรงโดยใช้ restriction enzyme

- ผสมสารเคมีดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด restriction enzyme

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X CutSmart® Buffer	1X	1.0
Recombinant vector	1 μg	variable
20 U/μl SpeI-HF®		0.2
distilled water	-	เติมจนปริมาตร 10 μl
รวม		10.0

- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชม. และ 80°C เป็นเวลา 20 นาที
- นำมาเข้าสู่กระบวนการ purification โดยสามารถดำเนินการได้ตามหัวข้อ “การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR Purification)”

#### การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาตรฐาน (standard RNA) สำหรับใช้ทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection)

Standard RNA จะถูกสร้างจาก PCR product ที่มีปลาย T7 promoter อยู่ภายในชิ้น PCR product โดยการสร้าง standard RNA จะใช้กระบวนการ *in vitro* transcription ดังที่กล่าวไว้ในขั้นตอน “การสร้าง crRNA” และจะนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย ชุดสกัด GenUP™ Total RNA kit (biotechrabbit, Germany) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การทำให้ standard RNA บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด GenUP™ Total RNA kit (biotechrabbit, Germany)

- นำ standard RNA ที่ได้หลังจากการทำ *in vitro* transcription และย่อย template ด้วย DNase แล้ว นำมาใส่หลอด 1.5 microcentrifuge tube และผสม LYSIS LY buffer ปริมาตร 400 μL

- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

- นำสารละลายทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ Mini Filter DNA (สีฟ้า)
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- ทิ้ง Mini Filter DNA (สีฟ้า) และเก็บสารละลายที่ผ่านลงมายัง collection tube
- ใส่ 70% ethanol ปริมาตร 400  $\mu$ L ลงในสารละลาย และผสมให้เข้ากัน
- นำสารละลายทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ Mini Filter RNA (สีม่วง)
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- นำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่
- เติม WASH A ปริมาตร 500  $\mu$ L แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- นำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่
- เติม WASH B ปริมาตร 750  $\mu$ L แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- นำ Mini Filter สวมกับ collection tube ใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- นำ Mini Filter สวมกับ 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วเติม RNase-free water ปริมาตร 30  $\mu$ L ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- standard RNA ที่สกัดได้สามารถใช้ต่อได้ทันที หรือสามารถนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}$  ได้จนกว่าจะนำมาใช้

2. การวัดปริมาณ standard RNA ด้วยชุด Qubit™ HS RNA Assay Kit (Invitrogen™, USA)

การวัดปริมาณ standard RNA สามารถใช้ขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับการวัดความเข้มข้น crRNA แต่เปลี่ยนชุดผลิตภัณฑ์เป็น Qubit™ HS RNA Assay Kit (Invitrogen™, USA) และเลือกโปรแกรมการตรวจเป็น RNA High sensitivity

## การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Revers-transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA)

- 4.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, ชนิด B, เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 และ GAPDH
- ผสมสารเคมีดังตารางที่ 11 และผสมไพรเมอร์ของแต่ละยีน ดังตารางที่ 12 ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube โดยการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จะต่างจากยีนอื่น โดยจะใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 2 คู่ ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมภายในหลอดเดียว (ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์แต่ละเส้นจะอยู่ที่ 240 nM )
  - เติมสารเคมีที่ผสมไว้ลงในหลอด TwistAmp® Basic ผสมให้เข้ากันด้วยการดีดหลอด
  - แบ่งใส่ 0.2 mL microcentrifuge tube หลอดละ 4.95  $\mu$ l
  - เติม 280 mM Magnesium Acetate ปริมาตร 0.312  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้าย 14 mM) ไว้บนฝาด้านบนของหลอด
  - เติม cDNA หลอดละ 1  $\mu$ l และ spin down
  - ป้อนที่อุณหภูมิ 39°C เป็นเวลา 30 นาที และ 75°C เป็นเวลา 5 นาที
  - RPA Product สามารถเก็บไว้ที่ 4°C ได้ชั่วคราว และสามารถเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20°C ได้ในระยะยาว

ตารางที่ 11 แสดงสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ RT-RPA

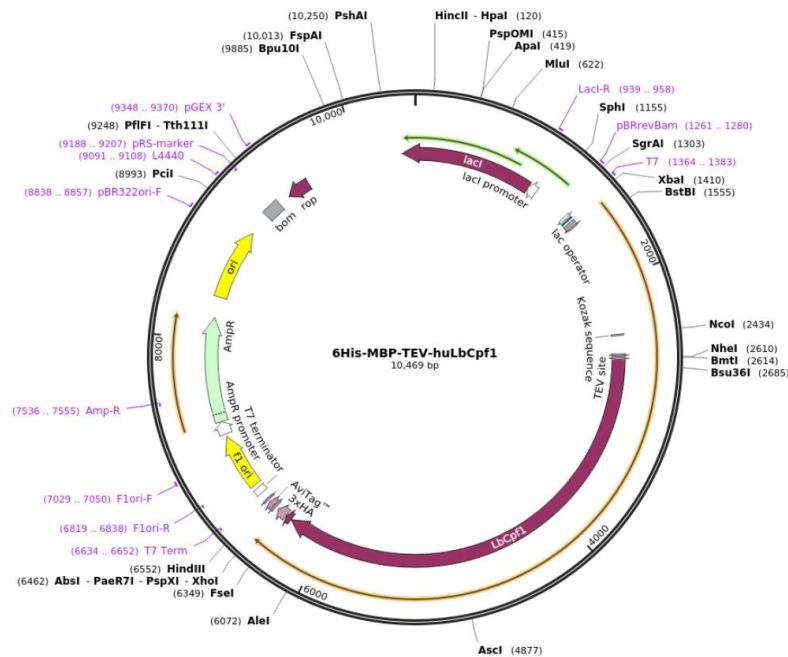
สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร ( $\mu$ l)
10 mM forward primer	480 nM	2.4
10 mM reverse primer	480 nM	2.4
primer free rehydration buffer	1X	29.5
200 U/ $\mu$ l RevertAid RT	200 U	1
distilled water	-	4.2
รวม		39.5

ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์สำหรับใช้ในกระบวนการ RT-RPA

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	PCR Product (bp)	ความเข้มข้นสุดท้าย (nM)
Influenza A M gene	FluA-M-F38	ACCGAGGTCGAAACGTATGTTCTCTCTATC	219	480
	FluA-M-R256	TCTACGCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCAC		480
Influenza B M gene	FluB_M-F18	CACAATTGCCTACYTGCTTTCATTRACAGAAGA	168	480
	FluB_M-R185	GCACCAATTAGTGCTTTCTGTATATCAGTTAAG		480
SARS-CoV-2 S gene	SARS2_S_F21843	CCACTGAGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTG	201	240
	SARS2_S_R22013	AATAAACTCTGAACTCACTTTCCATCCAAC		240
	SARS2_S_F22975	AATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAAT	166	240
	SARS2_S_R23109	TCCACAAACAGTTGCTGGTGCATGTAGAAGTT		240
GAPDH gene	GAPDH_F896	ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	256	480
	GAPDH_R1151	ATGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGAC		480

### การผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1)

โปรตีน Cas12a จะผลิตขึ้นโดยใช้ระบบ Bacterial expression plasmid จากพลาสมิด 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 (ภาพที่ 13) (Addgene, UK) โปรตีนจะถูกสร้างขึ้นด้วยกระบวนการ over-expression ในแบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 DE3 โดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพที่ 13 แสดงแผนผังพลาสมิด 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 (20)

1. การนำ expression plasmid เข้าเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3 (transform)
  - นำ plasmid 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 250 ng ผสมกับ competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21-DE3) ปริมาตร 100  $\mu$ l
  - ดำเนินการตามขั้นตอนการ “Transformation” ในหัวข้อ “การเตรียม Recombinant vector สำหรับเป็นต้นแบบในกระบวนการ *in vitro* transcription ของอาร์เอ็นเอมาตรฐาน (standard RNA)”
2. การสกัดพลาสมิด ด้วยชุดสกัด PureDirex Plasmid *mini*PREP Kit (BIO-HELIX, Taiwan) ตามหัวข้อ “การสกัดพลาสมิด” ในหัวข้อ “การเตรียม Recombinant vector สำหรับเป็นต้นแบบในกระบวนการ *in vitro* transcription ของอาร์เอ็นเอมาตรฐาน (standard RNA)”
3. ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยการส่งวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อยีน Cas12a (Macrogen, Korea)

#### 4. การสังเคราะห์โปรตีน Cas12a ในเซลล์แบคทีเรีย

- เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย โดยนำโคลนีนบนเพลท มาใส่ลงใน Terrific Broth 2 mL และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชม.
- นำหัวเชื้อ 0.5 mL ใส่ลงใน Terrific Broth 100 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 2 ชม. จนกระทั่งได้  $O.D._{600} = 0.2$
- ลดอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ เหลือ 21°C ประมาณ 30 นาที จนกระทั่งได้  $O.D._{600} = 0.6$
- เติม 0.1 M IPTG 5 mL (ความเข้มข้นสุดท้าย 500  $\mu$ M)
- บ่มที่อุณหภูมิ 21°C เป็นเวลา 18 ชม.
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งใส่ 50 mL centrifuge tube และปั่นตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- สามารถนำตะกอนเซลล์มาสกัดโปรตีนต่อไปได้ แต่หากยังไม่ใช้สามารถเก็บตะกอนเซลล์ และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C ได้จนกว่าจะสกัดโปรตีน

#### 5. การทำให้โปรตีน Cas12a บริสุทธิ์ (Purification) ด้วย HisTrap™ FF (GE health care, USA)

- ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Lysis buffer 5 mL ต่อ 1 หลอด และนำเข้าเครื่อง sonicator เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้ 40% power เปิดความถี่เป็นเวลา 10 วินาที สลับกับไม่เปิด ความถี่เป็นเวลา 10 วินาที รวมทั้งหมด 30 รอบ เป็นเวลา 10 นาที
- นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำสารละลายส่วนใสด้านบนกรองด้วยฟิลเตอร์ขนาดอนุภาค 0.22  $\mu$ m
- เตรียมคอลัมน์ HisTrap™ FF โดยเติมน้ำกลั่นลงใน syringe ขนาด 5 mL ให้เต็ม ต่อเข้ากับปลายสายยางที่ต่อกับวาล์ว 3 ทาง และปลายของ Luer female connector ของคอลัมน์ โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- หักจุกปิดคอลัมน์บริเวณท้ายคอลัมน์ออก
- ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น 5 mL โดยใช้ไอ้ตราบการไหล 1 mL ต่อนาที ตลอดการทดลอง
- ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วย binding buffer 5 mL
- นำตัวอย่างที่กรองเรียบร้อยแล้ว โหลลงคอลัมน์
- ล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer 15 mL และ wash buffer 5 mL



- เซโปรตีนที่เราต้องการออก โดยใช้ elution buffer 5 mL
- นำโปรตีนที่อยู่ใน elution buffer ทั้งหมด ใส่ลงใน Amicon® Ultra-15 50K Centrifugal Filter เพื่อลดปริมาตรสารละลาย พร้อมทั้งเปลี่ยนบัฟเฟอร์จาก elution buffer ให้เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บโปรตีนและคัดแยกโปรตีนขนาดเล็กออกไปจากสารละลาย โดยปั่น Amicon® Centrifugal Filter ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- ท้ายเติม storage buffer แบบไม่ใส่ glycerol ทีละ 10 mL แล้วปั่นด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จนกว่าจะครบ 30 mL โดยในรอบสุดท้ายของการเติม storage buffer จะปั่นด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- นำสารละลายที่คงเหลืออยู่บน filter มาใส่ใน Amicon® Ultra-0.5 100K Centrifugal Filter ปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อลดปริมาตรของสารละลายโปรตีนและเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน
- เติม storage buffer ปริมาตร 400  $\mu$ L แล้วปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที
- นำคอลัมน์ของ Amicon® Ultra-0.5 100K Centrifugal Filter พลิกกลับด้าน และใส่ลงในหลอด 2 mL ปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อนำสารละลายโปรตีนออกจากคอลัมน์
- แบ่งสารละลายโปรตีนส่วนหนึ่งออกไปผสมกับ 100% glycerol ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมและใช้สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรม อีกส่วนหนึ่งนำไปผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เพื่อนำไปวัดปริมาณโปรตีนและใช้เป็นตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE

#### 6. การวัดปริมาณโปรตีน ด้วย BCA Protein Assay

- เตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน แล้วเจือจางเป็นลำดับส่วน โดยให้เป็นความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 250, 125, 50, 25 และ 5  $\mu$ g/mL
- เตรียม BCA working reagent โดยผสมจาก BCA solution 200  $\mu$ L และ 4% Cupric Sulfate 4  $\mu$ L
- นำสารละลาย BSA มาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 30 เท่า ปริมาตร 25  $\mu$ L

ใส่ลงใน 96-microtiter plate

- เติม BCA working reagent หลุมละ 200  $\mu$ l
- ปั่นที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที
- ปลอ่ยให้เพลทเย็นที่อุณหภูมิห้อง และวัดการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยใช้เครื่อง plate reader
- สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA และหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากสมการเส้นตรง

#### 7. ตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

- ประกอบอุปกรณ์เตรียมเจล และปีเปิด 10% Separating gel ลงไปในกระจกจนห่างจากขอบกระจกประมาณ 1 ซม.
- ค่อยๆปีเปิดน้ำกลั่น ลงไปบน Separating gel แล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
- เทน้ำกลั่นออก แล้วปีเปิด Stacking gel ลงไปจนพอดีขอบกระจก
- เสียบหัวลิงไปบน Stacking gel แล้วรอให้เจลเซตตัวประมาณ 15 นาที จึงดึงหัวออก
- นำเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบในเครื่องสำหรับทำ SDS-PAGE
- เท 1X SDS Running buffer ลงไปใน chamber ด้านในเจล จนกระทั่งล้นออกมาจนถึงขีดบอกริมาตรด้านนอก chamber
- เตรียมโปรตีนตัวอย่างโดยควบคุมความเข้มข้นของโปรตีนให้เท่ากันอยู่ที่ 10  $\mu$ g จนได้ปริมาตร 15  $\mu$ L และผสมกับ 5X Laemmli buffer ปริมาตร 5  $\mu$ L และ 0.2 M DTT ปริมาตร 10  $\mu$ L
- นำโปรตีนตัวอย่างป่นที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที และนำโปรตีนตัวอย่างใส่ลงในเจล
- ใส่ Protein marker ขนาด 10–250 kD (BioRad, USA) ปริมาตร 4  $\mu$ l ลงไปในหลุมแรก
- รัน SDS-PAGE โดยใช้กำลังไฟ 80 volts 15 นาที และเปลี่ยนไปที่ 110 อีก 110 นาที
- นำเจลออกจากเครื่อง แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue เป็นเวลา 16 ชม.
- เทสี Coomassie blue ออกจากเจล และใส่ destain solution เพื่อล้างสีส่วนเกินออก
- สังเกตแถบของโปรตีน Cas12a ที่ขนาดประมาณ 150 kDa

## 8. การแปลงหน่วยโปรตีน LbCas12a

การแปลงหน่วยใช้เพื่อควบคุมปริมาณสัดส่วนโมเลกุลของโปรตีน Cas12a ให้อยู่ในหน่วยเดียวกับ crRNA (molar) เพื่อสามารถจับเข้าคู่กับ crRNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยโปรตีน Cas12a ที่สามารถผลิตได้มีขนาด 1,422 กรดอะมิโน และมีน้ำหนักโดยประมาณอยู่ที่ 156.42 kDa ดังนั้นจะสามารถคำนวณหน่วยจาก ng/ $\mu$ L เป็น  $\mu$ M ได้ดังนี้

$$\text{Molar} = \text{mol (g/L)/1000}$$

$$\text{Cas12a 1 Molar} = 156.42$$

ถ้าต้องการ Cas12a 1  $\mu$ M ในสารละลาย 1  $\mu$ L จะต้องใช้ โปรตีน Cas12a 156.42 ng

ดังนั้น ถ้าต้องการ Cas12a 1  $\mu$ M ในสารละลาย 20  $\mu$ L จะต้องใช้ โปรตีน Cas12a 3.13  $\mu$ g

## 9. ยืนยันความถูกต้องของโปรตีนโดยใช้ Mass spectrometry

- ตัดแบนโปรตีนที่สนใจ ใส่ลงในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วปั่นให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 มม.<sup>2</sup>
- ล้างสีออกด้วย 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ปริมาตร 200  $\mu$ L แช่ทิ้งไว้ และ vortex ทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที
- ตูดสารละลายออก และล้างชิ้นเจลด้วย organic buffer 100  $\mu$ L (50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ผสม acetonitrile อัตราส่วน 1:1) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- นำสารละลายออก และเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 70  $\mu$ L หรือพอท่วมชิ้นเจล
- ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าชิ้นเจลจะกลายเป็นสีขาวทั้งชิ้น
- นำ 100% acetonitrile ออก และทำให้ชิ้นเจลแห้งด้วยเครื่อง centrifugal vacuum concentrator
- เติม DTT solution (10mM DTT ใน 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) ปริมาตร 100  $\mu$ L บ่มที่ 56°C ใน incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำสารละลายส่วนใสออกและเติม iodoacetamide solution (10 mM iodoacetamide ใน 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) ปริมาตร 100  $\mu$ L และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด

- ล้างชิ้นเจลด้วย 50% acetonitrile ละลายใน 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ทิ้งไว้ และ vortex ทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที
- นำสารละลายส่วนใสออก และเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 70  $\mu\text{l}$  หรือพอท่วมเจล
- นำสารละลายส่วนใสออก และทำให้ชิ้นเจลแห้งด้วย centrifugal vacuum concentrator
- เติม 12.5 ng/ $\mu\text{l}$  trypsin ที่ละลายใน 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ประมาณ 25  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 60 นาที
- นำสารละลาย trypsin ออก และเติม 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  สัดส่วนเท่ากับ trypsin บ่มที่อุณหภูมิ บ่มที่ 37°C ใน incubator ข้ามคืน
- นำสารละลายส่วนใสออก เก็บไว้ใน 1.5 ml LoBind protein tube
- เติม 0.1% TFA ที่ผสมใน 50% acetonitrile จนพอท่วมชิ้นเจล หลังจากนั้น vortex เป็นเวลา 15 นาที
- เก็บส่วนใสในขั้นตอนนี้ ผสมกับในขั้นตอนก่อนหน้า และนำไปทดสอบด้วยเครื่อง Ultimate 3000 nano Liquid-Chromatography (Dionex, USA) และเครื่อง Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, USA)
- นำข้อมูลที่ได้จากเครื่อง mass spectrometer มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer version 2.1 โดยดาวน์โหลดฐานข้อมูลโปรตีนของ *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006) และ *E. coli* บน Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### 10. ตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน

ตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน โดยการนำโปรตีนที่สกัดได้มาทดสอบเปรียบเทียบกับโปรตีน EnGen® *Lba* Cas12a (NEB, England) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ผสมสารเคมีดังตารางที่ 13 ลงในหลอด 0.1 mL PCR tubes ชนิดใส

ตารางที่ 13 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน

สารเคมี	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร ( $\mu$ l)
10X NEBuffer 2.0	1X	1.50
300 nM crRNA	30 nM	1.50
15 $\mu$ M ssDNA fluorescent-quencher probe	660 nM	0.20
1 $\mu$ M Cas12a(Cpf1)	33 nM	0.75
30 nM DNA substrate	1 nM	1.00
distilled water	-	10.05
รวม	-	15.00

- บ่มที่อุณหภูมิ 39°C เป็นเวลา 5 นาที
- นำหลอดที่ทำการทดลองในข้อ 2 มาส่องภายใต้เครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (BIO-HELIX, Taiwan) และสังเกตสีที่แสดงออกมา หากเรืองแสงสีเขียว แปลว่าโปรตีน Cas12a สามารถทำงานได้
- บันทึกผลการทดลองเป็นภาพถ่ายทุกๆ 5 นาที เพื่อติดตามการเปล่งแสง fluorescent
- เปรียบเทียบการเรืองแสงระหว่าง EnGen® *Lba* Cas12a และ โปรตีน Cas12a ที่สามารถทำบริสุทธิ์

#### การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection)

การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ เป็นการทดสอบเพื่อบ่งบอกประสิทธิภาพของวิธีตรวจว่ามีความสามารถที่จะตรวจวินิจฉัยไวรัสในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดแล้วให้ผลเป็นบวก สามารถทดสอบได้ดังวิธีต่อไปนี้

- นำ standard RNA ที่ได้จากการทำ *in vitro* transcription ในข้างต้นและวัดความเข้มข้นด้วยน้ำยา Qubit™ แล้ว นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในช่วง  $10^0$ -  $10^7$  copies โดยใช้วิธีเจือจางทีละ 10 เท่าแบบเป็นลำดับส่วน (10-fold serial dilutions)

- เข้าสู่กระบวนการ RT-RPA โดยสามารถดำเนินการตามขั้นตอนในหัวข้อ “การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Revers-transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA)”
- ตรวจสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบโดยใช้ CRISPR-Cas12a สามารถผสมสารเคมีสำหรับการตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, ไข้หวัดใหญ่ชนิด B และ GAPDH ได้ดังตารางที่ 14 ส่วนสารเคมีสำหรับการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, ไข้หวัดใหญ่ชนิด B และ GAPDH โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a

สารเคมี	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X NEBuffer 2.0	1X	1.5
300 nM crRNA	30 nM	1.5
15 μM ssDNA fluorescent-quencher probe	200 nM	0.2
1 μM Cas12a(Cpf1)	33 nM	0.75
distilled water	-	10.0
รวม	-	15.0
RPA product	-	1

ตารางที่ 15 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a

สารเคมี	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร (µl)
10X NEBuffer 2.0	1X	1.5
300 nM crRNA SARS-2 Spike-21893	30 nM	1.5
300 nM crRNA SARS-2 Spike-23039	30 nM	1.5
15 µM ssDNA fluorescent-quencher probe	200 nM	0.2
1 µM Cas12a(Cpf1)	33 nM	0.75
distilled water	-	8.55
รวม	-	14.0
RPA product		1

ตารางที่ 16 แสดงการใช้ crRNA ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด

crRNA Name	จำเพาะต่อเป้าหมาย
Temp-crRNA_T7-fluA-M161	Influenza A – M gene
Temp-crRNA_T7-fluB-M113	Influenza B – M gene
Temp. crRNA_SARS2-Spike-21893	SARS-CoV-2 – S gene
Temp. crRNA_SARS2-Spike-23039	
Temp-crRNA_T7-huGAPDH-996	GAPDH

- ปุ่มที่อุณหภูมิ 39°C เป็นเวลา 15 นาที และสังเกตการณ์เรืองแสงภายในหลอด โดยใช้  
เครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator

### การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่น (cross-reactivity)

สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามได้จากการนำ crRNA ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์นำมาทดสอบกับไวรัสทางเดินหายใจชนิดอื่น ได้แก่ เชื้อไวรัส Respiratory syncytial virus, Human corona virus, Human Bocavirus, Human rhinovirus, Human parainfluenza virus, Human adenovirus และ Human metapneumovirus โดยสามารถดำเนินการตามวิธีการตามหัวข้อ การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection)

### 3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก

#### การเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a

เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria) : ผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ (influenza-like illness) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลบางปะกอก 1 โรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล โรงพยาบาลชุมแพ และผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มสอบสวนเฝ้าระวังโรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (Patient Under Investigation : PUI) ที่ส่งตัวอย่างเข้ารับการวินิจฉัยที่สถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง (สปคม.) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ เป็นตัวอย่างจากทางเดินหายใจส่วนต้น (nasal swab) ที่เหลือจากการวินิจฉัย และได้ขนส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างจากโครงการวิจัย “การวิเคราะห์ทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและลักษณะพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอและบีในประเทศไทย” ที่ได้รับเอกสารรับรองโครงร่างวิจัย เลขที่ IRB No. 337/57 และตัวอย่างจากโครงการวิจัย “การพัฒนาชุดตรวจ “COVID-19 SCAN” และการตรวจสอบทางคลินิกสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค ณ จุดดูแลผู้ป่วย” ที่ได้รับเอกสารรับรองโครงร่างวิจัย เลขที่ IRB No. 302/63



การคำนวณขนาดตัวอย่าง : สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 PQ}{d^2}$$

เมื่อ n แทน จำนวนตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

Z แทน ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เท่ากับ 1.96

P แทน Sensitivity ของชุดตรวจที่คาดการณ์ไว้ เท่ากับ 95%

Q แทน 1-P

d แทน acceptable error เท่ากับ 10%

$$\text{จะได้ } n = \frac{1.96^2 \times 0.95 \times 0.05}{0.1^2}$$

$$n = 18.2476$$

ดังนั้น จากการคำนวณดังที่กล่าวมาจึงสามารถสรุปได้ว่า จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างที่ศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เป็นจำนวน 19 ตัวอย่าง จึงจะสามารถดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจได้อย่างน่าเชื่อถือ

### การเตรียมตัวอย่างจากทางเดินหายใจส่วนต้นในตัวอย่างผู้ป่วยเพื่อการตรวจวินิจฉัย เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas12a

การเตรียมตัวอย่างทางเดินหายใจส่วนต้นของผู้ป่วย สามารถดำเนินการตามหัวข้อ “การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้เป็น positive control DNA” หัวข้อย่อย กระบวนการสกัดอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นนำตัวอย่างทางคลินิกเข้าสู่กระบวนการ RT-RPA โดยใช้สารเคมีตามตารางที่ 11 และไพรเมอร์ตามตารางที่ 12 และตรวจหาสารพันธุกรรมโดยใช้ CRISPR-Cas12a

### วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคนิค qRT-PCR

- ผสมสารเคมีดังตารางที่ 17 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามตารางที่ 18

ตารางที่ 17 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคนิค qRT-PCR

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	1X	5
10 µM Forward primer	0.3 µM	0.3
10 µM Reverse primer	0.3 µM	0.3
10 µM Taq-Man probes	0.2 µM	0.2
RiboSafe RNase Inhibitor	-	0.2
Reverse transcriptase	-	0.1
distilled water	-	1.9
RNA template	-	2
รวม		10

ตารางที่ 18 แสดงไพรเมอร์และ Taq-Man probes ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค qRT-PCR (18)

ยีนเป้าหมาย	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
Influenza A M Gene	FluA-M-F151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC
	FluA-M-P218	FAM-ACGCTCACCGTGCCAGT-BHQ1
	FluA-M-R276	AGGGCATTGGACAAKCGTCTA
Influenza B M Gene	FluB-MF439	CTCTGTGCTTTRTGCGARAAAC
	FluB-P135	Cy5-TCAGCAATGAACACAGCAA-BHQ3
	FluB-MR	CCTTCYCCATTCTTTTGACTIONTGC
SARS-CoV2 N2 gene	COVID-N2-F	CACATTGGCACCCGCAATC
	COVID-N2-R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG
	COVID-N2-Probe	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ

- ตั้งอุณหภูมิตั้งอุณหภูมิในเครื่อง Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australia)  
ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ qRT-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Reverse transcription	45	10	1
Pre-denaturation	95	2 นาที	1
Denaturation	95	10 วินาที	50
Annealing	55	10 วินาที	
	60	10 วินาที	
Extension and fluorescent detection	72	20 วินาที	

- ตั้งการตรวจจับสี fluorescent ในเครื่อง Rotor-Gene 3000 ดังนี้

สี FAM ตรวจหาที่ความยาวคลื่น 518 nm

สี Cy5 ตรวจหาที่ความยาวคลื่น 667 nm

- นำสารเคมีที่เตรียมไว้ในข้อ 2.6.1 ลงเครื่อง Rotor-Gene 3000
- สังเกตและบันทึกผลค่า Cycle threshold (49)

วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค qRT-PCR

- ผสมสารเคมีดังตารางที่ 20 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ตามตารางที่ 18

ตารางที่ 20 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค qRT-PCR (49)

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	1X	5
10 µM Forward primer	0.6 µM	0.6
10 µM Reverse primer	0.8 µM	0.8
10 µM Taq-Man probes	0.2 µM	0.2
RiboSafe RNase Inhibitor	-	0.2
Reverse transcriptase	-	0.1
distilled water	-	1.1
RNA template	-	2
รวม		10

- ตั้งอุณหภูมิตั้งอุณหภูมิในเครื่อง Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australia)

ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงแสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ qRT-PCR ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Reverse transcription	50	30 นาที	1
Pre-denaturation	95	2 นาที	1
Denaturation	95	5 วินาที	45
Annealing, Extension and fluorescent detection	58	20 วินาที	

### 3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ผลการทดลองทั้งหมดจะถูกบันทึกทั้งในสมุดจดบันทึกและในไฟล์คอมพิวเตอร์ รวมถึงบันทึกเป็นภาพถ่ายโดยใช้กล้องโทรศัพท์ ถ่ายภาพการทดลองที่ต้องประเมินผลด้วยตาเปล่าจากผู้ประเมินทั้งหมด 3 คน ผลการทดสอบที่ตรงกัน 2 ใน 3 จะถูกบันทึกและแปลผล จากนั้นข้อมูลทั้งหมดจะนำมารวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ที่มำคำนวณหาความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่า Positive Predictive Value (PPV) ค่า Negative Predictive Value (NPV) และค่า Diagnostic accuracy โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Sensitivity} = \frac{A}{(A+C)} \times 100$$

$$\text{Specificity} = \frac{D}{(D+B)} \times 100$$

$$\text{Positive Predictive Value (PPV)} = \frac{A}{(A+B)} \times 100$$

$$\text{Negative Predictive Value (NPV)} = \frac{D}{(C+D)} \times 100$$

$$\text{Diagnostic accuracy} = \frac{A+D}{(A+B+C+D)} \times 100$$

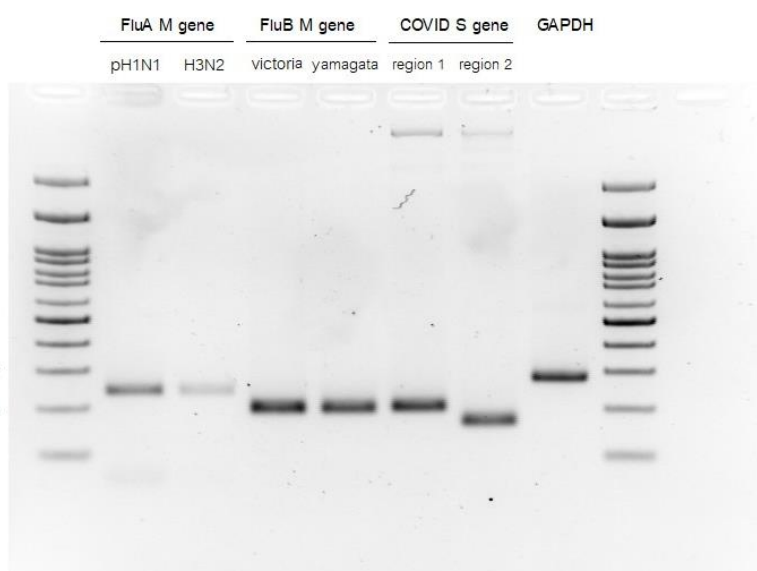
ตารางที่ 22 ตารางสูตรคำนวณค่า sensitivity, specificity, PPV และ NPV

	Gold standard	
	Influenza positive	Influenza negative
Test influenza positive	A (True Positive)	B (False Positive)
Test influenza negative	C (False Negative)	D (True Negative)

## บทที่ 4 ผลการศึกษา

### การเตรียมสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวก (positive control)

สารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวก สามารถสร้างได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ โดยใช้เทคนิค PCR และไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งสายพันธุ์ pH1N1 และ H3N2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดอยู่ทั่วโลก และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ได้ทั้ง Victoria lineage และ Yamagata lineage ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จะมี 2 คู่ ซึ่งทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ ก็สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ดีเช่นเดียวกัน โดยสามารถแสดงภาพจากกระบวนการ electrophoresis ดังภาพที่ 14

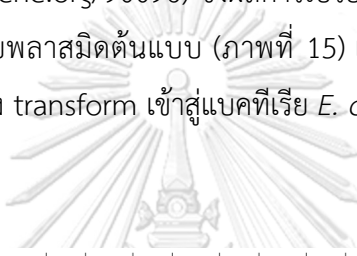


ภาพที่ 14 แสดง PCR Product ของสารพันธุกรรมควบคุมเชิงบวกของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ยีน Matrix (M), เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ยีน Matrix (M), เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ยีน Spike (S) และยีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งมีขนาด 219, 168, 201, 166 และ 256 bp ตามลำดับ

## การผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1)

### ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่สกัดได้โดยการส่งวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

การผลิตโปรตีน Cas12a ด้วยกระบวนการ over-expression จำเป็นต้องอาศัยพลาสมิดที่สามารถผลิตโปรตีน Cas12a ได้อย่างถูกต้อง ในขั้นตอนแรกพลาสมิด 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 จะถูก transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* strain DH5 $\alpha$  ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวน หลังจากนั้นจึงตรวจสอบความถูกต้องโดยวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อพลาสมิด 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 ด้วยเทคนิค Sanger's sequencing ซึ่งผลลำดับเบสที่ได้จะถูกนำมา alignment เข้ากับลำดับเบสต้นแบบของพลาสมิด 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 (ดาวโหลดได้จากเว็บไซต์ <https://www.addgene.org/90096>) ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับเบสนั้นพบว่า พลาสมิดที่สามารถสกัดได้นั้นเหมือนกับพลาสมิดต้นแบบ (ภาพที่ 15) และสามารถใช่พลาสมิดนี้ในการผลิตโปรตีน Cas12a ได้ จากนั้นจึง transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 DE3 ที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีน



Ref	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
Plasmid	GAAGCTGTAC	TCCTACGGCA	ACCGGATCAG	AATCTTCCGG	AATCCTAAGA	AGAACAACGT	GTTCGACTGG	GAGGAGGTGT	GCCTGACCAG	CGCCTATAAG
Ref	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195
Plasmid	GAGCTGTTCA	ACAAGTACGG	CATCAATTAT	CAGCAGGGCG	ATATCAGAGC	CCTGCTGTGC	GAGCAGTCCG	ACAAGGCCTT	CTACTCTAGC	TTTATGGCCC
Ref	205	215	225	235	245	255	265	275	285	295
Plasmid	TGATGAGCCT	GATGCTGCAG	ATGCGGAACA	GCATCACAGG	CCGCACCCGAC	GTGGATTTTC	TGATCAGCCC	TGTGAAGAAC	TCCGACGGCA	TCTTCTACGA
Ref	305	315	325	335	345	355	365	375	385	395
Plasmid	TAGCCGGAAC	TATGAGGCC	AGGAGAATGC	CATCCTGCCA	AAGAACGCCG	ACGCCAATGG	CGCCTATAAC	ATCGCCAGAA	AGGTGCTGTG	GGCCATCGGC
Ref	405	415	425	435	445	455	465	475	485	495
Plasmid	CAGTTCAAGA	AGGCCGAGGA	CGAGAAGCTG	GATAAGGTGA	AGATCGCCAT	CTCTAACCAAG	GAGTGGCTGG	AGTACGCCCA	GACCAAGCGTG	AAGCACAAAA
Ref	505	515	525	535	545	555	565	575	585	595
Plasmid	GGCCGGCGGC	CACGAAAAAG	GCCGGCCAGG	CAAAAAAGAA	AAAGGGATCC	TACCCATACG	ATGTTCCAGA	TTACGCTTAT	CCCTACGACG	TGCCTGATTA
Ref	605	615	625	635	645	655	665	675	685	695
Plasmid	TGCATACCCA	TATGATGTCC	CGACTATGC	CTAAAGCCTC	GAGGGTGGTG	GTAGCGATTA	TAAAGATGAT	GATGATARAAG	GCCTGAACGA	TATCTTTGAA
Ref	705	715	725	735	745	755	765			
Plasmid	GCCACAGAAA	TTGAATGGCA	CGAGTAAAAA	CTTGTCCGAGC	ACCACCACCA	CCACCACTGA	GATCCGGCT			

ภาพที่ 15 แสดงภาพ alignment ของลำดับเบส 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 ต้นแบบ (Ref) และ

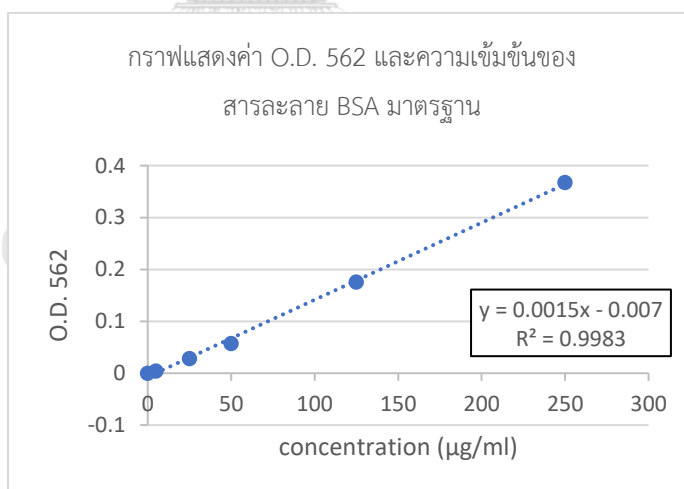
ลำดับเบส 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 ที่ได้จาก Sanger's sequencing (Plasmid)

### การวัดปริมาณโปรตีน Cas12a ที่สกัดได้ด้วย BCA Protein Assay

การทดสอบการวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA Protein Assay เป็นวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D. 562) ในโปรตีนตัวอย่างเทียบกับสารละลาย BSA มาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ โดยสามารถแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 23 และสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นในโปรตีนตัวอย่างได้ดังภาพที่ 16

ตารางที่ 23 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง

ตัวอย่าง	O.D.562
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน 250 µg/ml	0.3677
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน 125 µg/ml	0.1757
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน 50 µg/ml	0.0575
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน 25 µg/ml	0.0285
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน 5 µg/ml	0.0041
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน 0 µg/ml	0
โปรตีน <i>LbCas12a</i> เจือจาง 30 เท่า	0.1139



ภาพที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน



ดังนั้น จึงสามารถคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างได้ดังนี้

$$y = 0.0015x + 0.105$$

แทนค่า  $y =$  ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนตัวอย่าง

$x =$  ความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

จะได้  $x = (0.2259 - 0.105) \div 0.0015$

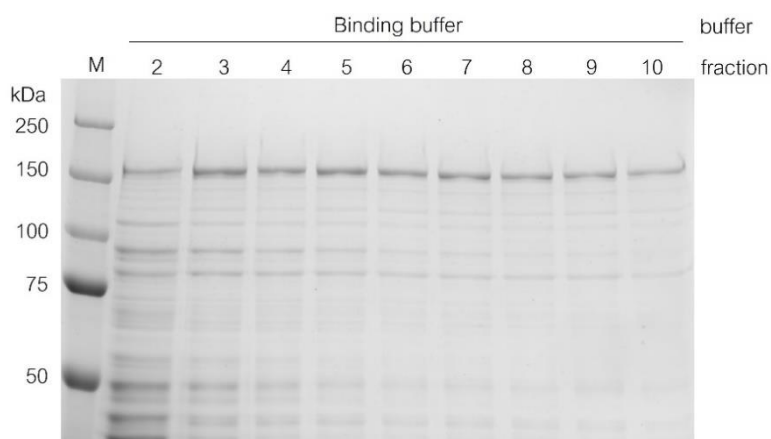
$$x = 80.6 \mu\text{g/ml}$$

ดังนั้น ความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายโปรตีน *LbCas12a* จะเท่ากับ

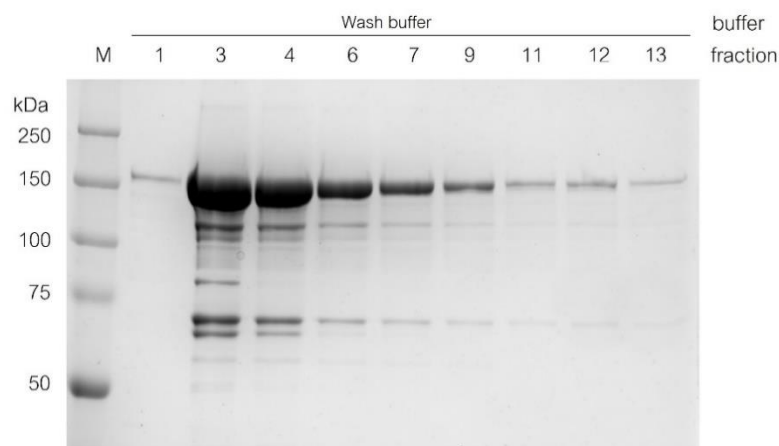
$$80.6 \times 30 = 2,418.0 \mu\text{g/ml หรือ } 2,418.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

### ตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

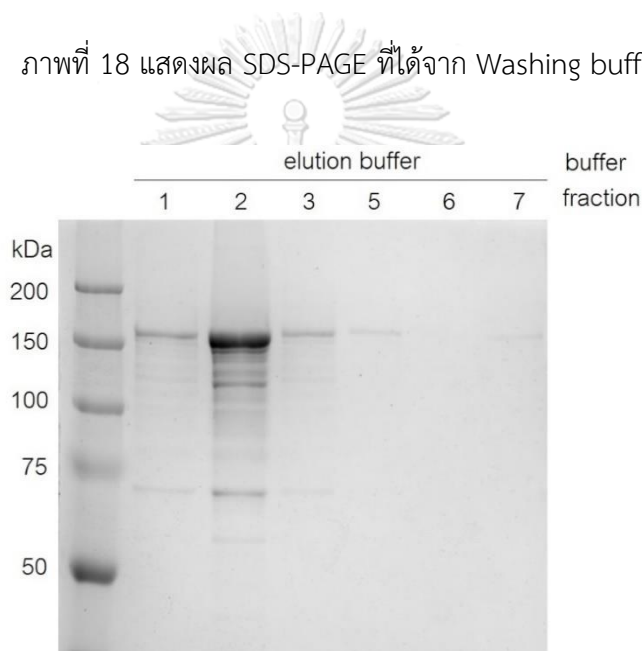
สารละลายโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ขณะสกัดในแต่ละขั้นตอน (fraction) จะถูกนำมาตรวจสอบขนาดของโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในสารละลายโดยใช้วิธี SDS-PAGE โดยคัดเลือก fraction ที่นำมาตรวจสอบจากค่า O.D. 280 ซึ่งหากมีความใกล้เคียงกันจะเลือก fraction หนึ่งมาเพื่อเป็นตัวแทน โดยสามารถแสดงผลการทดสอบได้ดังภาพที่ 17-19



ภาพที่ 17 แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Binding buffer



ภาพที่ 18 แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Washing buffer

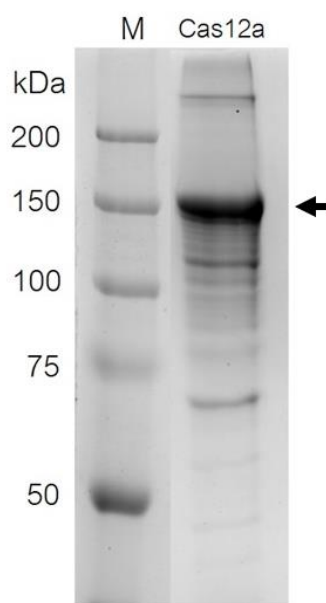


ภาพที่ 19 แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Elution buffer

จากการตรวจสอบด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศส์ (โปรแกรม BioEdit version: 7.0.5.3) พบว่า โปรตีน Cas12a มีขนาดประมาณ 1,422 กรดอะมิโน และมีน้ำหนักประมาณ 156.4 kDa สามารถหลุดออกมาได้ในทุก fraction ของการทำให้บริสุทธิ์ โดยในช่วงแรก หรือในขั้นตอน binding buffer 1 จะมีการใช้ imidazole ในความเข้มข้นต่ำที่สุด (20 mM imidazole) จึงสามารถเห็นโปรตีน Cas12a หลุดออกมาได้น้อยกว่า ส่วนในสารละลาย washing buffer มีปริมาณ imidazole ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น (60 mM imidazole) เพื่อชะล้างโปรตีนที่ติดอยู่กับคอลัมน์แบบไม่จำเพาะออก จึงสามารถเห็นแถบของ Cas12a หลุดติดออกมารวมกับโปรตีนอื่นได้มากขึ้น ส่วนในสารละลาย

elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ imidazole สูงที่สุด (250-350 mM imidazole) มีแถบโปรตีน Cas12a บางกว่าการใช้บัฟเฟอร์อื่น แต่ก็มีโปรตีนขนาดอื่นๆปนออกมาน้อยกว่าเช่นกัน

หลังจากนั้น โปรตีนใน elution buffer ทั้งหมดจะถูกนำมารวมกัน เข้าสู่ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์ และกำจัดโปรตีนขนาดเล็กโดยใช้ Amicon® Centrifugal Filter ซึ่งผล SDS-PAGE หลังจากขั้นตอนนี้สามารถแสดงได้ในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงผล SDS-PAGE ที่ได้จาก Elution buffer ที่ผ่านการแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์และกำจัดโปรตีนขนาดเล็ก ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่สนใจ

### ยืนยันความถูกต้องของโปรตีนโดยใช้ Mass spectrometry

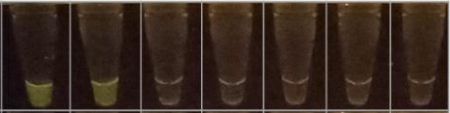

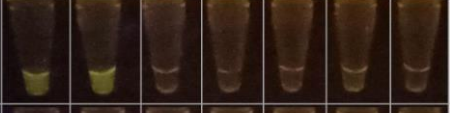
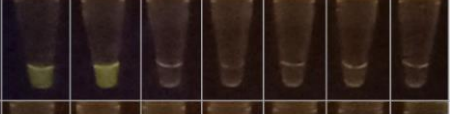

หลังจากการทำ SDS-PAGE จะสามารถเห็นแบนด์ของโปรตีนขนาดประมาณ 150 kDa ซึ่งคาดว่าจะโปรตีน Cas12a หลังจากนั้นจึงตรวจสอบแบนด์ของโปรตีนนั้นโดยการตัดชิ้นเจล SDS-PAGE ในบริเวณที่สนใจแล้วเข้าสู่กระบวนการตรวจสอบด้วยวิธี Mass spectrometry โดยผลการทดลองหลังจากการวิเคราะห์ข้อมูลเปปไทด์ที่ได้จาก Mass spectrometer เทียบกับเปปไทด์ในฐานข้อมูล จะได้รายการของโปรตีนที่มีความคล้ายกับโปรตีนในตัวอย่าง SDS-PAGE โดยสามารถแสดงโปรตีน 5 อันดับแรก รวมถึงผลการวิเคราะห์ที่ได้ดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แสดงผลการวิเคราะห์เปปไทด์จาก Mass spectrometry และโปรตีน 5 อันดับแรก

Accession	Description	Sum PEP Score	Unique Peptides	MW [kDa]
A0A182DWE3	Cpf1 ( <i>Lachnospiraceae bacterium</i> ND2006)	420.17	128	142.95
A0A271RAY8	Maltodextrin-binding protein ( <i>Escherichia coli</i> )	149.90	8	43.38
A0A0K4UU22	Maltodextrin-binding protein ( <i>Escherichia coli</i> )	110.96	1	43.32
A0A2U3EU09	Maltodextrin-binding protein ( <i>Escherichia spp.</i> )	66.80	1	43.16
H6VRG2	Keratin 1 ( <i>Homo sapiens</i> )	59.62	17	66.03

#### การตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน

โปรตีน Cas12a ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จะถูกนำมาทดสอบกิจกรรม โดยทดสอบร่วมกับ crRNA และ template ที่เข้าคู่กัน โดยผลการทดสอบสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 21 จากการทดสอบพบว่า โปรตีน Cas12a สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเกิดการเรืองแสง fluorescent ในหลอดที่มีองค์ประกอบครบเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน Cas12a ที่สามารถผลิตได้เอง (in house) กับโปรตีน Cas12a ที่ซื้อจากบริษัท NEB พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาและเรืองแสงได้ดีพอๆกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า โปรตีน Cas12a ที่ผลิตนั้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

	crRNA	+	+	-	+	+	+	-
	Cas12a	NEB	In house	+	-	+	+	-
	Substrate	+	+	+	+	D.W.	A549	-
ระยะเวลา	5 นาที							
	10 นาที							
	15 นาที							
	20 นาที							
	30 นาที							

ภาพที่ 21 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมของโปรตีน Cas12a ที่ผลิตได้ (in house) กับโปรตีน Cas12a ที่ซื้อจากบริษัท NEB

#### การทดสอบ crRNA และ DNA substrate

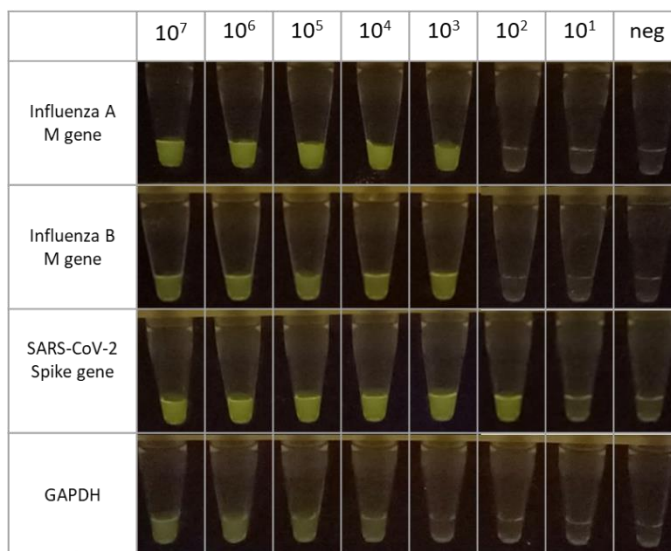
crRNA ที่ได้จากการกระบวนการ *in vitro* transcription และ DNA substrate ที่ได้จากการกระบวนการ PCR ได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพของ crRNA ควบคู่กับเอนไซม์ Cas12a จากผลการทดลองพบว่า crRNA และ DNA substrate ทั้งหมด สามารถทำให้ Cas12a เกิดกระบวนการตัดทั้งแบบ *cis*- และ *trans*-cleavage ได้ นอกจากนี้พบว่า แสง fluorescent เกิดการอิมิตัวที่เวลา 15 นาที (ภาพที่ 22) ดังนั้นการทดลองหลังจากนี้ จึงจะใช้เวลาตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย Cas12a เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ได้สัญญาณแสดงที่มีความเข้มที่สุดในเวลาที่น้อยที่สุด

crRNA	Influenza A - M gene			Influenza B - M gene			SARS-CoV-2 Spike gene		GAPDH	
	pH1N1	H3N2	negative	B/Victoria	B/Yamagata	negative	SARS-CoV-2	negative	GAPDH	negative
Template										
5 minute										
10 minutes										
15 minutes										
20 minutes										
30 minutes										

ภาพที่ 22 แสดงแสง fluorescence ที่เรืองแสงจากการทดสอบ crRNA และ DNA substrate ด้วยเทคนิค CRISPR-Cas12a

#### การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection)

ผลการทดสอบการวัดปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบจากการใช้ standard RNA ของแต่ละยีน พบว่าค่า limit of detection ของการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B เท่ากับ  $10^3$  copies/ $\mu$ L ส่วนเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 และยีน GAPDH มีค่า limit of detection เท่ากับ  $10^2$  และ  $10^4$  ตามลำดับ โดยผลการทดลองสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 23 และสามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 25



ภาพที่ 23 แสดงผลการทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection) จาก standard RNA ความเข้มข้นตั้งแต่  $10^7$  ถึง  $10^0$  copies/ $\mu$ L

ตารางที่ 25 สรุปผลการทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection)

Primer and crRNA	Limit of detection (copies)
crRNA influenza A-M	$10^3$
crRNA influenza B-M	$10^3$
crRNA SARS-CoV-2	$10^2$
crRNA GAPDH	$10^4$

#### การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่น (cross-reactivity)

การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่นนั้น สามารถทดสอบได้จากการนำ cDNA ของไวรัสที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดต่างๆ มาทดสอบกับไพรเมอร์และ crRNA ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, ชนิด B, และ เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยผลการทดสอบสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 24 จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าไพรเมอร์และ crRNA มีความจำเพาะต่อไวรัส และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่น

template \ crRNA	RSV	other HCoV	HBoV	HRV	HPIV	HAdV	hMPV	Flu A H1N1	Flu A H3N2	Flu B Vic	Flu B Yam	SARS-CoV-2
Influenza A M gene								+	+	+	+	
Influenza B M gene								+	+	+	+	
SARS-CoV-2 Spike gene												+

ภาพที่ 24 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่น (cross-reactivity)

### การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยเทคนิค CRISPR-Cas12a โดยใช้ตัวอย่างทางคลินิกนั้นจะตรวจควบคู่กันไปถึง 3 ยีน ได้แก่การตรวจหายีน GAPDH การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B โดยการอ่านผลการทดสอบคือสังเกตการเรืองแสง หากภายในหลอดที่ตรวจหาเชื้อไวรัสเรืองแสงขึ้น แสดงว่าตัวอย่างนั้นติดไวรัส โดยสามารถแสดงตัวอย่างการตรวจในได้ดังภาพที่ 25

	Sample positive Flu A	Sample positive Flu A	Negative sample	Sample positive Flu B	Sample positive Flu B	Negative sample	Positive	NTC
GAPDH gene	+	+		+	+		+	
Influenza A M gene	+	+					+	
Influenza B M gene				+	+		+	

NTC: non-template control

ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่างการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a จากการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และชนิด B ในตัวอย่างทางคลินิก ด้วยวิธี qRT-PCR และชุดตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests จำนวน 59 ตัวอย่าง สามารถ



แสดงผลการทดสอบได้ดังตารางที่ 26-27 และผลการทดสอบด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี CRISPR-Cas12a จำนวน 130 ตัวอย่าง สามารถแสดงผลการทดสอบได้ดังตารางที่ 28-29

ตารางที่ 26 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ด้วยวิธี qRT-PCR และชุด

ตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests

Assay		qRT-PCR		total
		Influenza A positive	Influenza A negative	
Rapid Influenza Diagnostic Tests	Influenza A positive	14	3	17
	Influenza A negative	1	41	42
total		15	44	59

ตารางที่ 27 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ด้วยวิธี qRT-PCR และชุด

ตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests

Assay		qRT-PCR		total
		Influenza B positive	Influenza B negative	
Rapid Influenza Diagnostic Tests	Influenza B positive	13	0	13
	Influenza B negative	7	39	46
total		20	39	59

ตารางที่ 28 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี

CRSIPR-Cas12a

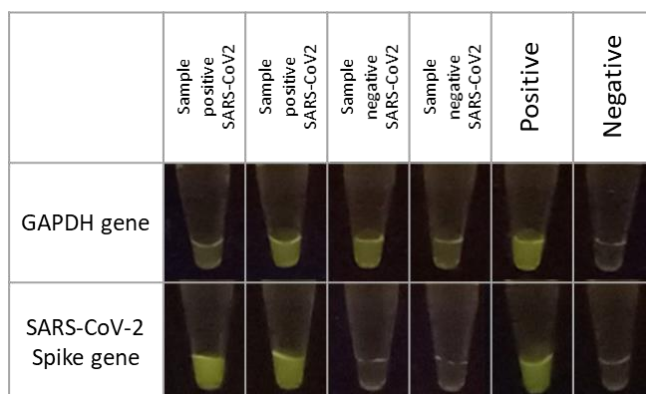
Assay		qRT-PCR		total
		Influenza A positive	Influenza A negative	
CRISPR- Cas12a	Influenza A positive	57	2	59
	Influenza A negative	10	61	71
total		67	63	130

ตารางที่ 29 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี

CRSIPR-Cas12a

Assay		qRT-PCR		total
		Influenza B positive	Influenza B negative	
CRISPR- Cas12a	Influenza B positive	37	3	40
	Influenza B negative	2	88	90
total		39	91	130

ผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิกด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี CRISPR-Cas12a จำนวน 164 ตัวอย่าง สามารถแสดงตัวอย่างผลการทดสอบได้ดังภาพที่ 26 และตารางที่ 30



ภาพที่ 26 แสดงตัวอย่างการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a

ตารางที่ 30 แสดงผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี qRT-PCR และวิธี

CRISPR-Cas12a

		qRT-PCR		total
		SARS-CoV-2 positive	SARS-CoV-2 negative	
CRISPR-Cas12a	SARS-CoV-2 positive	51	0	51
	SARS-CoV-2 negative	2	111	113
	total	53	111	164

จากการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิกทำให้สามารถคำนวณค่าที่สามารถบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของชุดตรวจได้ ได้แก่ ค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่า Positive Predictive Value (PPV) ค่า Negative Predictive Value (NPV) และ Diagnostic accuracy โดยสามารถแสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก

Test	CRISPR-Cas12a			Rapid Influenza Diagnostic Tests	
	Influenza A M gene	Influenza B M gene	SARS-CoV-2 S gene	Influenza A	Influenza B
<b>Sensitivity</b>	85.07 %	94.87 %	96.23 %	93.33 %	65.00 %
<b>Specificity</b>	96.83 %	96.70 %	100.00 %	93.18 %	100.00 %
<b>PPV</b>	96.61 %	92.50 %	100.00 %	82.35 %	100.00 %
<b>NPV</b>	85.92 %	97.78 %	98.23 %	97.62 %	84.78 %
<b>Diagnostic Accuracy</b>	<b>90.77 %</b>	<b>96.15 %</b>	<b>98.78 %</b>	<b>93.22 %</b>	<b>88.14 %</b>

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

### การผลิตโปรตีน Cas12a (Cpf1)

กระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์นั้นมีหลากหลายรูปแบบ หนึ่งในวิธีที่เป็นพื้นฐานสำหรับการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์คือกระบวนการแยกโปรตีนโดยใช้ affinity tag ซึ่งวิธีที่เลือกใช้ คือการใช้ Histidine-tag ที่ติดออกมาพร้อมกับโปรตีนที่สนใจ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen และคณะ ที่ใช้กระบวนการ Histidine-tag purification ในการทำให้โปรตีน Cas12a บริสุทธิ์ (8) อย่างไรก็ตามขนาดของโปรตีนที่ Chen ได้รายงาน มีขนาด 140 kDa ซึ่งแตกต่างกับการศึกษานี้เล็กน้อย ทั้งนี้ เป็นเพราะการศึกษานี้ได้ดัดแปลงกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ให้เป็นอย่างง่าย โดยข้ามขั้นตอนการตัดปลาย affinity tag ที่ติดอยู่กับโปรตีนออก ดังนั้นจึงทำให้มีขนาดเปลี่ยนแปลงไปได้ และหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ โปรตีน Cas12a ได้ถูกนำมาทดสอบกิจกรรม ซึ่งพบว่า affinity tag ที่ติดอยู่กับโปรตีนนั้น ไม่ได้ส่งผลต่อกิจกรรมของโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sundaresan และคณะ ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการตัด DNA ของโปรตีน Cas12a และ Cas9 (37) พบว่าขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ในการศึกษานี้ได้ข้ามขั้นตอนการตัด affinity tag ออกเช่นเดียวกัน ซึ่งขนาดของโปรตีน Cas12a ที่ได้มีขนาดประมาณ 150 kDa ใกล้เคียงกับผลการทดลองในภาพที่ 19 และ 20 ดังนั้นโปรตีน Cas12a ที่สามารถผลิตได้ จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่จำหน่าย พบว่าสามารถทำให้เกิดแสง fluorescent ได้ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 21) ดังนั้นจึงเป็นข้อยืนยันว่าโปรตีน Cas12a ที่สามารถผลิตได้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการซื้อโปรตีน Cas12a ที่มีราคาแพงได้เป็นอย่างดี

### การตรวจหาสารพันธุกรรมโดยใช้ CRISPR-Cas12a

การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อก่อโรคด้วยเทคนิค CRISPR-Cas ยังถือเป็นวิธีที่ใหม่และเพิ่งได้รับการพัฒนาต่อยอดมาจากการดัดแต่งพันธุกรรม อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค CRISPR-Cas ยังคงเป็นที่ได้รับความนิยมและถูกพัฒนาในการตรวจหาสารพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากระบบ CRISPR-Cas เป็นระบบที่มีความยืดหยุ่นสูง ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบของระบบ ประกอบด้วย crRNA ที่สามารถกำหนดเป้าหมายได้หลากหลายประกอบกับมีโปรตีน Cas หลายชนิด ที่มีระบบการทำงานที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาอีกจำนวนหนึ่งที่ประยุกต์ใช้ ระบบ CRISPR-Cas มาใช้ในกระบวนการตรวจหาสารพันธุกรรม หนึ่งในนั้นคือระบบ CRISPR-Cas13 ซึ่งเป็นระบบที่ตรวจหาสารพันธุกรรมชนิด RNA ซึ่งอาจมีความสะดวกเมื่อใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA แต่หากต้องการเพิ่มจำนวนไวรัสก่อนการตรวจ จะทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการเปลี่ยนสารพันธุกรรมแบบ RNA ให้เป็น DNA เพื่อการเพิ่มจำนวน และหลังจากนั้นจะต้องเปลี่ยนกลับ

เป็น RNA อีกครั้งเพื่อการตรวจโดยใช้ CRISPR-Cas13 ดังเช่นการศึกษาของ Gootenberg และคณะ ที่พัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกีและเชื้อไวรัสชิคา (44) โดยอาศัยขั้นตอน RT-RPA หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอน reverse transcription และ detection ซึ่งทำให้เกิดความซับซ้อนและอาศัยเอนไซม์ ในการทำปฏิกิริยามากขึ้น และส่งผลให้ชุดตรวจมีราคาที่สูงขึ้น

การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas12a นั้น ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้การตรวจหา เชื้อไวรัส HPV เป็นต้นแบบ จากงานวิจัย Chen และคณะ ได้นำเทคนิค CRISPR-Cas12a มาใช้ควบคู่ กับ RPA ที่เป็นเทคนิคที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยอุณหภูมิเดียว (8) โดยสามารถตรวจหาเชื้อ ไวรัส HPV ได้ถึงความเข้มข้นระดับ attomolar ( $10^{-18}$  molar) จาก plasmid DNA โดยใช้การ ตรวจวัดแสง fluorescence ด้วย fluorescent plate reader ซึ่งในการศึกษาปัจจุบัน เป็นการ ตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยสามารถวัดปริมาณต่ำสุดของชุดตรวจได้  $10^3$  copies/ $\mu$ L และ  $10^2$  copies/ $\mu$ L ตามลำดับ (ตารางที่ 25) เมื่อเทียบแล้ว คิดเป็นประมาณ 1-10 femtomolar ( $10^{-16}$  ถึง  $10^{-15}$  molar) ดังนั้นจะเห็นว่าค่าต่ำสุดที่ตรวจพบนั้นมีปริมาณสูงกว่าใน การศึกษาก่อนหน้า แต่หากเปรียบเทียบโดยละเอียดในวิธีการตรวจแล้ว การศึกษารุ่นนี้เป็น การตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น ssRNA ดังนั้นสารพันธุกรรมมาตรฐานจึงเป็น RNA ซึ่งมีความ เสถียรที่น้อยกว่า และยังต้องเพิ่มขั้นตอนการทำ RPA เป็น 1-step RT-RPA จึงอาจจะมีอัตราการเพิ่ม จำนวนสารพันธุกรรมไม่เทียบเท่า RPA ปกติ และนอกจากนั้นการศึกษานี้สามารถตรวจหาการ เรืองแสงโดยใช้เครื่อง BluPAD LED Transilluminator ซึ่งมีความสะดวกในการพกพาไปยังสถานที่ ต่างๆ และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า จึงอาจจะทำให้มีความไวในการตรวจจับแสง fluorescence ได้ดีไม่เท่า fluorescent plate reader ที่เป็นเครื่องมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ แต่ สามารถเพิ่มความสะดวกในการเข้าถึงการตรวจในพื้นที่ห่างไกลได้ และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ราคา แพง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาคิดค้นวิธีตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอและชนิดบี โดยใช้ เทคนิค CRISPR-Cas12a ซึ่งงานนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ตีพิมพ์ ซึ่งค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดอาจไม่สามารถ เทียบกับการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดอื่นได้

ถึงแม้ว่ายังไม่มีการศึกษาที่พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอและชนิดบี โดยใช้ เทคนิค CRISPR-Cas12a แต่ยังมีการศึกษาที่พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H7N9 โดยใช้เทคนิค CRISPR-Cas13a ซึ่ง Liu และคณะ (50) ได้ใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนสาร พันธุกรรมด้วย RT-RPA ควบคู่กับการใช้เอนไซม์ T7 RNA polymerase เพื่อใช้ในกระบวนการ transcription และตรวจหาเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ Cas13a จากผลการทดสอบพบว่า ค่า limit of detection อยู่ที่ 1 femtomolar ( $10^{-15}$  molar) สำหรับการตรวจหาฮีน HA จาก standard RNA ภายในเวลา 50 นาที และ 1 nanomolar ( $10^{-9}$ ) สำหรับการตรวจหาฮีน NA โดยใช้ การอ่านผลด้วย fluorescent plate reader ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกับการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม

การศึกษาของ Liu และคณะยังขาดในส่วนของการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก จึงยังไม่สามารถเปรียบเทียบค่า sensitivities และ specificity ได้โดยตรง

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ตรวจด้วย CRISPR-Cas12a และอ่านผลในรูปของ lateral flow immunoassay ซึ่งจากการทดลองในตัวอย่างทางคลินิก จำนวน 130 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธี qRT-PCR สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A พบว่ามีค่าความไว (sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 85.07 มีค่าความจำเพาะ (Specificity) อยู่ที่ร้อยละ 96.83 ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) อยู่ที่ร้อยละ 96.61 ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) อยู่ที่ร้อยละ 85.92 และค่าความแม่นยำของชุดตรวจ (diagnostic accuracy) อยู่ที่ร้อยละ 90.77 ซึ่งเป็นผลการทดสอบที่ถือว่ามีความแม่นยำและถูกต้องในระดับที่น่าพอใจ

ส่วนผลการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B พบว่ามีค่าความไวอยู่ที่ร้อยละ 94.87 มีค่าความจำเพาะ (Specificity) อยู่ที่ร้อยละ 96.70 ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) อยู่ที่ร้อยละ 92.5 ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) อยู่ที่ร้อยละ 97.78 และค่าความแม่นยำของชุดตรวจ (diagnostic accuracy) อยู่ที่ร้อยละ 96.15 ซึ่งหากเปรียบเทียบกับ การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี Rapid Influenza Diagnostic Tests การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A ในทั้งสองวิธีการมีความไวและน่าเชื่อถือใกล้เคียงกัน ซึ่งการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ B ด้วยวิธี CRISPR-Cas12a มีความไวและประสิทธิภาพมากกว่าการตรวจด้วยชุดตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests อย่างเห็นได้ชัด โดยที่ค่าความแม่นยำของชุดตรวจ Rapid Influenza Diagnostic Tests อยู่เพียงร้อยละ 88.14 เท่านั้น

อันเนื่องจากการระบาดของโรคโควิด-19 การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค CRISPR-Cas จึงเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ดังเช่นในการศึกษาของ Broughton และคณะ (51) ที่ได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยการเพิ่มจำนวนจากเทคนิค RT-LAMP ควบคู่กับการตรวจหาสารพันธุกรรมของ SARS-CoV-2 บริเวณ ยีน N ด้วย CRISPR/Cas12a จากผลการทดลอง พบว่าค่า limit of detection อยู่ที่ 10 copies/ $\mu$ L จาก standard RNA และอ่านผลโดยใช้ lateral flow immunoassay ซึ่งในการศึกษาของ Broughton มีการทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลการทดสอบถูกต้องทั้งหมด นอกจากเทคนิค CRISPR-Cas12a แล้วยังมีการศึกษาจาก Zhang และคณะ (52) ได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยระบบ CRISPR-Cas13a ควบคู่กับการอ่านผลแบบ lateral flow ซึ่งมีค่า limit of detection อยู่ที่ 10 copies/ $\mu$ L แต่ก็ยังขาดข้อมูลในด้านการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการตรวจในตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 10 ตัวอย่างอาจไม่เพียงพอในการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 บนยีน S ในตัวอย่างทางคลินิก จำนวน 164 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าความไว

(sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 96.23 มีค่าความจำเพาะ (Specificity) อยู่ที่ร้อยละ 100.00 ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) อยู่ที่ร้อยละ 100.00 ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) อยู่ที่ร้อยละ 98.23 และค่าความแม่นยำของชุดตรวจ (diagnostic accuracy) อยู่ที่ร้อยละ 98.78 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าความไวของชุดตรวจมีค่าสูงใกล้เคียงกับเทคนิค qRT-PCR อีกทั้งยังมีความจำเพาะต่อไวรัส SARS-CoV-2 สูงถึงร้อยละ 100.00 ซึ่งจากผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจชนิดอื่น ดังภาพที่ 24 ไม่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นรวมถึงโคโรนาไวรัสสายพันธุ์อื่นด้วย

การตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยใช้ยีนบนเปลือกผิวเช่นยีน Spike อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงเบส หรือเกิดการ mutation เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน ซึ่งจากข้อกังวลนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจหา mutation ในส่วนของตำแหน่ง crRNA และ primer จากลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI SARS-CoV-2 Resources (เข้าถึงได้จาก : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sarscov-2/>) กว่า 6,000 sequences ซึ่งในขณะนี้ยังไม่พบการ mutation ที่โดดเด่นว่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ crRNA หรือไพรเมอร์แต่อย่างใด นอกจากนี้ การตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 นั้นดำเนินการตรวจโดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ และใช้ crRNA จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะทำให้ลดโอกาสที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเกิด mutation จนทำให้ไม่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้

จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค CRISPR-Cas12a สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้นได้ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการตรวจที่ดี ราคาชุดตรวจต่อตัวอย่างไม่เกิน 400 บาท ทำให้ประชาชนสามารถเข้าถึงการตรวจได้มากขึ้น ทั้งยังใช้เวลาในการตรวจไม่เกิน 1 ชั่วโมง และใช้อุปกรณ์ที่ราคาไม่แพง ทำให้สามารถนำไปจัดตั้งในพื้นที่ที่มีอุปกรณ์จำกัดได้

### ข้อเสนอแนะ

การนำเทคโนโลยี CRISPR-Cas มาใช้ในกระบวนการตรวจหาสารพันธุกรรมเป็นกระบวนการที่น่าสนใจ อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่มีแนวโน้มในการพัฒนาต่อยอดไปสู่การนำไปเป็นการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็วได้ ทั้งนี้การอ่านผลการทดสอบที่เป็นแสง fluorescence ด้วยตาเปล่า อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบได้ อย่างไรก็ตามในอนาคตอาจมีการปรับปรุงไปสู่เครื่องช่วยอ่านแสง fluorescence แบบพกพา ที่นอกจากจะสามารถช่วยอ่านค่าแสงให้ออกมาอยู่ในรูปตัวเลขและทำให้ตัดสินใจง่ายขึ้นแล้ว ยังอาจพัฒนาความไวและความจำเพาะในการตรวจได้ นอกจากนี้ยังควรมีการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ซึ่งจะช่วยบ่งชี้ความถูกต้องและแม่นยำของชุดตรวจได้มากยิ่งขึ้น



### ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม lysis buffer

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ
0.5 M HEPES pH 7	50 mM	5.0 mL
5.0 M NaCl	2 M	20 mL
0.1 M MgCl <sub>2</sub>	5 mM	2.5 mL
2 M imidazole	20 mM	0.5 mL
Roche c0mplete™, EDTA-free	1X	1 เม็ด
Lysozyme	0.25 mg/mL	12.5 mg
Double distilled water		22 mL
รวม		50 mL

สารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับการแยกโปรตีนด้วย HisTrap™ FF (GE Healthcare, USA)

สารเคมี	ปริมาณ	ปริมาณ 2M Imidazole	ความเข้มข้น	ปริมาณ น้ำกลั่น	ปริมาณ สุดท้าย
	Phosphate buffer stock solution		สุดท้าย Imidazole (mM)		
Binding buffer	6.25	0.5	20	43.25	50
Wash buffer	6.25	1.5	60	42.25	50
Elution buffer	6.25	6.25	250	37.50	50
	6.25	8.75	350	35.00	50

สารละลายเพื่อคงสภาพโปรตีน Cas12a

Storage Buffer แบบไม่มี glycerol

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร
5 M NaCl	1000 mM	10 mL
3 M NaOAC	40 mM	600 $\mu$ L
250 mM EDTA	0.2 mM	40 $\mu$ L
500 mM TCEP	0.2 mM	20 $\mu$ L
Milli Q water		39.3 mL
รวม		50 mL

ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0

Storage Buffer แบบใส่ glycerol

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร
5 M NaCl	500 mM	10 mL
3 M NaOAC	20 mM	600 $\mu$ L
250 mM EDTA	0.1 mM	40 $\mu$ L
500 mM TCEP	0.1 mM	20 $\mu$ L
100% glycerol	50%	50 mL
Milli Q water		39.3 mL
รวม		100 mL

ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0

5X Laemmli buffer

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ
SDS	20% w/v	0.2 g
100% glycerol	50% v/v	500 $\mu$ L
1M Tris HCl pH 6.8	0.3 M	300 $\mu$ L
$\beta$ -mercaptoethanol	0.05% v/v	50 $\mu$ L
distilled water		150 $\mu$ L
รวม		1 mL

## Coomassie blue stain

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ
acetic acid	10% w/v	5 mL
Coomassie Blue	0.006% w/v	0.003 g
distilled water		45 mL
รวม		50 mL

## Destain Solution

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ
acetic acid	10% w/v	5 mL
methanol	40% v/v	20 mL
distilled water		25 mL
รวม		50 mL

## Stacking gel

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ
40% Acryl/Bis Solution	5% v/v	625 $\mu$ l
1.5 M Tris pH 6.8	0.187 M	625 $\mu$ l
10% SDS	0.1% v/v	50 $\mu$ l
10% APS	0.1% v/v	50 $\mu$ l
TEMED	0.1% v/v	5 $\mu$ l
distilled water		3.65 ml
รวม		5 mL

## 10% Separating gel

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ
40% Acryl/Bis Solution	5% v/v	2.5 mL
1.5M Tris pH 8.8	0.375 M	2.5 mL
10% SDS	0.1% v/v	100 $\mu$ l
10% APS	0.1% v/v	100 $\mu$ l
TEMED	0.1% v/v	4 $\mu$ l
distilled water		4.769 ml
รวม		10 mL

## บรรณานุกรม

1. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):1-21.
2. WHO. Influenza (Seasonal) 2018 [updated 30 March 2018. Available from: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
3. CDC. Influenza Virus Testing Methods 2017 [updated 22 May 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/table-testing-methods.htm>.
4. Vemula S, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. Viruses. 2016;8(4).
5. Landry ML. Diagnostic tests for influenza infection. Curr Opin Pediatr. 2011;23(1):91-7.
6. Kim DK, Poudel B. Tools to detect influenza virus. Yonsei Med J. 2013;54(3):560-6.
7. Sashital DG. Pathogen detection in the CRISPR-Cas era. Genome Med. 2018;10(1):32.
8. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science. 2018;360(6387):436-9.
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science. 2018;360(6387):439-44.
10. Li SY, Cheng QX, Wang JM, Li XY, Zhang ZL, Gao S, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. Cell Discov. 2018;4:20.
11. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. Science. 2018;360(6387):444-8.
12. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. J Bacteriol. 2018;200(7):1-17.
13. Noda T. Native morphology of influenza virions. Front Microbiol. 2011;2:269.

14. Jagadesh A, Salam AAA, Mudgal PP, Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Archives of Virology*. 2016;161(8):2087-94.
15. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(1):47-60.
16. Van Kerkhove MD, Vandemaele KA, Shinde V, Jaramillo-Gutierrez G, Koukounari A, Donnelly CA, et al. Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. *PLoS medicine*. 2011;8(7):e1001053.
17. Uyeki TM. Influenza. *Ann Intern Med*. 2017;167(5):ITC33-ITC48.
18. Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, Samransamruajkit R, Amonsin A, Songserm T, et al. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *J Virol Methods*. 2008;152(1-2):25-31.
19. Liu H, Grantham ML, Pekosz A. Mutations in the influenza A virus M1 protein enhance virus budding to complement lethal mutations in the M2 cytoplasmic tail. *Journal of virology*. 2018;92(1):e00858-17.
20. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*. 2017;35(1):31-4.
21. Lara-Sampablo A, Flores-Alonso JC, De Jesus-Ortega N, Santos-Lopez G, Vallejo-Ruiz V, Rosas-Murrieta N, et al. Transfection of influenza A virus nuclear export protein induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Virus Res*. 2014;185:1-9.
22. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*. 2009;82(4):153-9.
23. Sikora D, Rocheleau L, Brown EG, Pelchat M. Influenza A virus cap-snatches host RNAs based on their abundance early after infection. *Virology*. 2017;509:167-77.
24. Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Eisfeld AJ, Neumann G, Hase T, et al. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC systems biology*. 2013;7(1):97.
25. ATCC. Influenza B virus (ATCC® VR-1807™) [Available from: [https://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Viruses/Influenza\\_Research\\_Materials/VR-1807.aspx#characteristics](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Viruses/Influenza_Research_Materials/VR-1807.aspx#characteristics)].
26. Cruz AT, Demmler-Harrison GJ, Caviness AC, Buffone GJ, Revell PA. Performance

of a rapid influenza test in children during the H1N1 2009 influenza a outbreak.

*Pediatrics*. 2010;125(3):e645-50.

27. Johnston SL, Siegel CS. A comparison of direct immunofluorescence, shell vial culture, and conventional cell culture for the rapid detection of influenza A and B.

*Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1991;14(2):131-4.

28. Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R. Influenza Diagnosis with a Specific Emphasis on the M2e Antigen as a Diagnostic Tool. 2016. In: *Steps Forwards in Diagnosing and Controlling Influenza* [Internet]. InTech.

29. Busson L, Hallin M, Thomas I, De Foor M, Vandenberg O. Evaluation of 3 rapid influenza diagnostic tests during the 2012-2013 epidemic: influences of subtype and viral load. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;80(4):287-91.

30. Chartrand C, Leeflang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 2012;156(7):500-11.

31. Hou Y, Wang K, Xiao K, Qin W, Lu W, Tao W, et al. Smartphone-Based Dual-Modality Imaging System for Quantitative Detection of Color or Fluorescent Lateral Flow Immunochromatographic Strips. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):291.

32. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-33.

33. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9.

34. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):221-36.

35. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military Medical Research*. 2020;7(1):1-10.

36. Prajapat M, Sarma P, Shekhar N, Avti P, Sinha S, Kaur H, et al. Drug targets for corona virus: A systematic review. *Indian journal of pharmacology*. 2020;52(1):56.

37. Sundaresan R, Parameshwaran HP, Yogesha SD, Keilbarth MW, Rajan R. RNA-Independent DNA Cleavage Activities of Cas9 and Cas12a. *Cell Rep*. 2017;21(13):3728-

- 39.
38. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovic M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018;172(6):1239-59.
39. Bayat H, Modarressi MH, Rahimpour A. The Conspicuity of CRISPR-Cpf1 System as a Significant Breakthrough in Genome Editing. *Curr Microbiol*. 2018;75(1):107-15.
40. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78.
41. Jia C, Huai C, Ding J, Hu L, Su B, Chen H, et al. New applications of CRISPR/Cas9 system on mutant DNA detection. *Gene*. 2018;641:55-62.
42. Qiu XY, Zhu LY, Zhu CS, Ma JX, Hou T, Wu XM, et al. Highly Effective and Low-Cost MicroRNA Detection with CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol*. 2018;7(3):807-13.
43. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*. 2016;165(5):1255-66.
44. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017:eaam9321.
45. Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*. 2018:eaav4294.
46. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*. 2019;14(10):2986-3012.
47. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS biology*. 2006;4(7):e204.
48. Cytiva company. His-tagged protein purification [Available from: <https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/his-tagged-proteins>].
49. Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Zambon M, Organization WH. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. Geneva: World Health Organization, January. 2020;13.
50. Liu Y, Xu H, Liu C, Peng L, Khan H, Cui L, et al. CRISPR-Cas13a nanomachine based simple technology for Avian Influenza A (H7N9) virus on-site detection. *Journal of*

biomedical nanotechnology. 2019;15(4):790-8.

51. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020;38:870-4.

52. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. *A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics.* 2020;8.





## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	อรพรรณ มยุรมาศ
วัน เดือน ปี เกิด	21 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	เทคนิคการสัตวแพทย์ (วท.บ.)
ที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 66 ซอยสวนฝรั่ง ถนนประชาชื่น แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800
ผลงานตีพิมพ์	นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง "Expression and partial purification of Cas12a for nucleic acid-based diagnostic assay" ในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21 "พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน" ในระหว่างวันที่ 20-22 มิถุนายน พ.ศ. 2562 ณ โรงแรม The Zign Hotel เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี