

ไพโรซีควนซิง เทคโนโลยี: หลักการ และการประยุกต์

Pyrosequencing Technology: Principle and Application

ยุทธนา เฟื่องแจ่ม

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

yutthana.p@hcu.ac.th โทร 02-312-6414

1. บทนำ

การตรวจสอบลำดับเบสดีเอ็นเอของยีนที่สนใจ หรือตรวจสอบความผิดปกติของยีน เช่นการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutation) นิยมตรวจสอบโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งปกตินิยมใช้วิธีดั้งเดิม (conventional method) โดยมีชื่อเรียกตามหลักการว่า dideoxy chain termination method ซึ่งคิดค้นและนำเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Sanger [34] ซึ่งวิธีนี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการหาลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่นใน bacterial, archeal, virus, fungi และ eukaryotic genomes ต่างๆ แต่ข้อจำกัดของวิธี dideoxy chain termination method คือความเร็วและผลของการวิเคราะห์ต่ำ ราคาของการศึกษาเพื่อตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างแต่ละครั้งสูง และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ถึงแม้ปัจจุบันหลักการนี้จะมีการใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติก็ตาม ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดค้นและพัฒนาวิธีหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ 3 วิธีดังนี้ วิธีที่ 1 คือการหาลำดับเบสโดยใช้หลักการ hybridization [5,13] วิธีที่ 2 คือการหาลำดับเบสโดยใช้หลักการของการ ligation และ cleavage [7] และวิธีที่ 3 คือการหาลำดับเบสโดยใช้วิธี pyrosequencing [29] ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะการหาลำดับเบสโดยใช้วิธี pyrosequencing

Pyrosequencing technology เป็นอีกเทคโนโลยีที่ใช้สำหรับตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยมีประโยชน์หลัก อยู่ 2 ประการซึ่งคล้ายกับวิธีดั้งเดิม คือเป็นเทคนิคเพื่อตรวจสอบ หรือยืนยันลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ตรวจพบ (confirm sequencing) หรือใช้เพื่อตรวจหาลำดับ

เบสของดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่ไม่เคยรู้จักมาก่อน (de novo sequencing) อย่างไรก็ตามข้อดีของ pyrosequencing technology ที่แตกต่างกับวิธีดั้งเดิมคือให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิมเมื่อใช้เวลาและตัวอย่างทดสอบเท่ากัน pyrosequencing technology เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาลำดับเบสของยีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 100 bp และยังเหมาะสำหรับตรวจหา genotyping หรือใช้ตรวจหาหยาณที่ผิดปกติซึ่งได้จากวิธีดั้งเดิม การหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing technology มีหลักการแตกต่างกับวิธีดั้งเดิมดังนั้นในรายงานนี้จึงได้ประมวลความรู้เกี่ยวกับหลักการ ข้อดี และการประยุกต์ใช้งานต่าง ๆ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อผู้ต้องการศึกษาและสนใจต่อไป

2. หลักการในการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของ pyrosequencing technology

Pyrosequencing technology มีชื่อเรียกตาม pyrophosphate (PPi) ซึ่งถูกปล่อยออกมาในระหว่างการเติมเบส (dNTP) คู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ (template) เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจำนวนของ PPi ที่ถูกปล่อยออกมาจะสัมพันธ์หรือมีปริมาณเท่ากับจำนวนเบสคู่สมที่ถูกเติมโดยเอนไซม์ DNA polymerase ดังนั้นจำนวน PPi จึงสามารถบ่งบอกปริมาณของ dNTP ที่เติมเข้าไปในระหว่างการสร้างเส้นดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase จากนั้น PPi ที่ปล่อยออกมาจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ให้พลังงานคือ ATP โดยเอนไซม์ ATP sulfurylase

ซึ่ง ATP ที่เกิดขึ้นนี้จะไปเปลี่ยน luciferin ให้กลายเป็น oxyluciferin ที่สามารถเปล่งแสงได้โดยเอนไซม์ luciferase นอกจากนี้ในปฏิกิริยาดังกล่าวเอนไซม์ apyrase ในการทำลาย dNTP และ ATP ที่เกินมา เพื่อไม่ให้ไปรบกวนต่อปฏิกิริยา หรือผลของการวิเคราะห์ในการเติมเบสของ DNA polymerase ของเบสคู่สมตัวต่อไป ดังนั้นในปฏิกิริยาการหาลำดับเบสโดยวิธี pyrosequencing จึงประกอบด้วย

1. สารตั้งต้นที่เป็นต้นแบบ คือดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA)
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (primer)
3. เอนไซม์ DNA polymerase
4. เอนไซม์ ATP sulfurylase
5. เอนไซม์ luciferase
6. เอนไซม์ apyrase
7. Substrates ประกอบด้วย adenosine 5' phosphosulfate (APS) และ luciferin

3. ขั้นตอนของ pyrosequencing technology

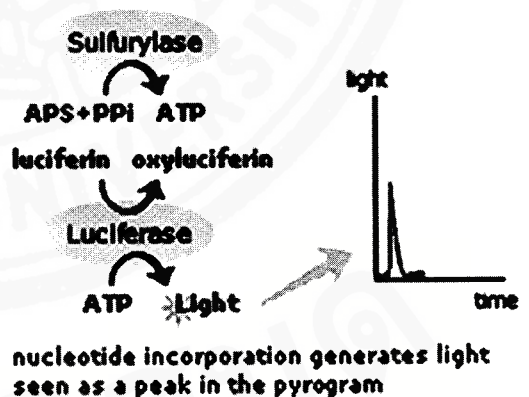
ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการเติมนิวคลีโอไทด์เบส (dNTP) หรือในที่นี้ขอแทนด้วยเบส โดยเบส 1 ใน 4 ตัว ถูกเติมลงไปปฏิกิริยา ถ้าเบสตัวที่เติมนั้นเป็นเบสคู่สม (complementary base) กับดีเอ็นเอตั้งต้น เช่นเบสตั้งต้นเป็น T ถ้ามีการเติมเบส A ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์ DNA polymerase ก็จะต่อเบส A ในปฏิกิริยาการสร้างเส้นดีเอ็นเอ แต่ถ้ามีการเติมเบสตัวอื่นเช่นเบส G ลงไปในปฏิกิริยาเบส G ไม่ใช่เบสคู่สมจึงไม่มีการต่อเบส G ในปฏิกิริยาของการสร้างเส้นดีเอ็นเอ เบส G จึงถูกทำลายโดยเอนไซม์ apyrase ขณะเดียวกันเมื่อมีการเติมเบส A ที่เป็นเบสคู่สมลงไปในปฏิกิริยา ก็จะปล่อย PPi ออกมา ในปริมาณที่เท่ากับเบส A ที่เติมลงไป ดังปฏิกิริยาของรูปที่ 1 ต่อไปนี้



รูปที่ 1 แสดงหลักการในการเติมเบสและปล่อย pyrophosphate (PPi) ออกมาในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=7454>

ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการเปลี่ยน PPi เป็น ATP โดยเอนไซม์ ATP sulfurylase ซึ่งอาศัย adenosine 5' phosphosulfate (APS) เป็นสารตั้งต้น (substrate) ต่อมาเอนไซม์ luciferase จะเปลี่ยน luciferin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นอีกชนิดหนึ่งที่เติมลงไปปฏิกิริยาให้กลายเป็น oxyluciferin โดยอาศัย ATP เป็นสารให้พลังงาน โดย oxyluciferin สามารถเปล่งแสงได้ และแสงที่ปรากฏสามารถแปลงออกมาเป็น pyrogram ดังภาพ



รูปที่ 2 แสดง pyrogram ที่ได้จากการเติมเบสของเอนไซม์ DNA polymerase

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=7454>

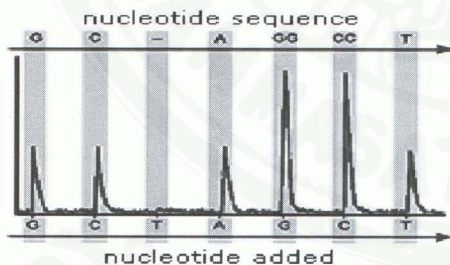
ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนการทำลาย dNTP และ ATP ที่เกินมา ซึ่งไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ หรือมีการเติมเบสที่ไม่ใช่เบสคู่สมในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase โดยเอนไซม์ apyrase เมื่อมีการทำลายสมบูรณ์แล้ว กระบวนการเติม dNTP ตัวใหม่ก็เริ่มขึ้น



รูปที่ 3 แสดงการทำลาย dNTP และ ATP ที่ไม่ถูกใช้หรือไม่ใช่เบสคู่สมในระหว่างการเติมเบสของเอนไซม์ DNA polymerase

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=7454>

ขั้นตอนที่ 4 เป็นขั้นตอนเติมเบส (dNTP) ตัวใหม่เมื่อเบสที่เติมใหม่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ก็จะมีการสร้างเส้นดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ DNA polymerase ต่อไป ดังนั้นจะปรากฏเป็น pyrogram ดังภาพข้างล่าง

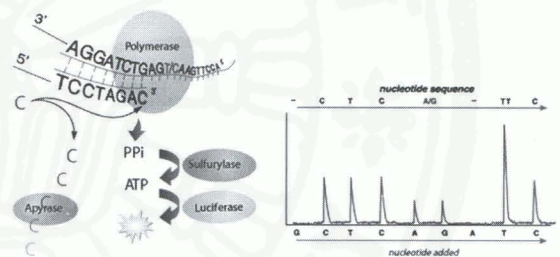


รูปที่ 4 แสดง pyrogram ที่ของการเติมเบสโดยเอนไซม์ DNA polymerase

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=7454>

รูปที่ 4 สามารถอธิบายดังนี้คือ นิวคลีโอไทด์ที่ถูกเติม (nucleotide added) ตัวแรกคือ G ตามด้วย C, T, A, G, C และ T ตามลำดับ ส่วนผลการอ่านลำดับเบส (nucleotide sequence) สามารถอ่านโดยเรียงลำดับดังนี้ G, C, A, G, G, C, T

C, C และ T ตามลำดับ จากการสังเกตความสูงของ pyrogram มี 2 ระดับ ระดับปกติและสูงกว่าปกติ ระดับปกติคือมีการปล่อย PPi 1 โมเลกุล ซึ่งเกิดจากการเติมเบสคู่สม 1 เบส ส่วน pyrogram ที่สูงกว่าปกติคือผลที่เกิดจากการได้ PPi 2 โมเลกุล ซึ่งเกิดจากการเติมเบสคู่สมชนิดเดียวกันติดกัน 2 เบส ซึ่งสาเหตุเป็นเพราะว่าในลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบมีเบสที่เหมือนกันติดกัน 2 เบส ดังนั้นจึงปรากฏ pyrogram ที่สูงกว่าปกติ เช่นตามภาพเมื่อเติมเบส G แต่ผลของ pyrogram ได้ peak สูงกว่าปกติ ดังนั้นจึงอ่านเป็น GG เป็นต้น ดังนั้นภาพข้างบนจึงสามารถอ่านลำดับเบสได้ดังนี้คือ 5'-GCAGGCCCT-3' ดังนั้นจึงสามารถสรุปกระบวนการของ pyrosequencing ตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงการวิเคราะห์ผลดังภาพข้างล่าง

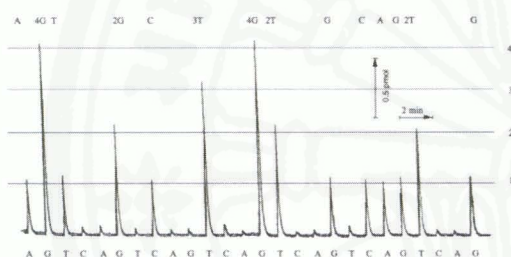


รูปที่ 5 แสดงกระบวนการของ pyrosequencing ตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงการวิเคราะห์ผล

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=7454>

รูปที่ 5 แสดงกระบวนการของเทคโนโลยีหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing ทั้งหมดตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงผลการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อเบส C ถูกเติม DNA polymerase จะสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ โดยขณะเมื่อเติมเบส C ในปฏิกิริยา จะมีการปล่อย PPi ออกมา และ PPi จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานแสงซึ่งสามารถแปลงผลเป็น pyrogram ดังภาพ ดังนั้นจึงสามารถอ่านลำดับเบส (nucleotide sequence) ได้ดังนี้คือ 5'-CTC (A/G) TTC-3' จากผลการหาลำดับเบสแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส หรือ polymorphism เกิดขึ้น 1 ตำแหน่งจากการ

สังเกตระดับความสูงของ pyrogram ดังภาพ พบว่ามี 3 ระดับคือ ระดับปกติ ระดับต่ำกว่าปกติ และสูงกว่าปกติ ระดับต่ำกว่าปกติ บ่งบอกว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส จากเบสปกติ (mutation) หรือ polymorphism เช่นตามภาพ เมื่อนิวคลีโอไทด์ที่เดิมคือ A และ G พบว่าได้ระดับ peak ที่ต่ำกว่าปกติ แสดงให้เห็นว่า PPI ที่ถูกปล่อยออกมา เกิดจากการเติมทั้งเบส A และ G อย่างละครึ่ง โดยเดิมเบส A ก่อน แล้วค่อยเติมเบส G เวลาอ่านผลจึงอ่าน A/G ส่วนเมื่อเติมเบส T พบว่า peak สูงกว่าปกติ แสดงว่าต้องมี PPI ที่ปล่อยออกมาปริมาณ 2 เท่าของปกติ เวลาอ่านผลลำดับเบสจึงอ่าน TT



รูปที่ 6 แสดง pyrogram ที่ได้จากการการทำให้ pyrosequencing

ที่มา Genome Res 2001; 11: 3-11.

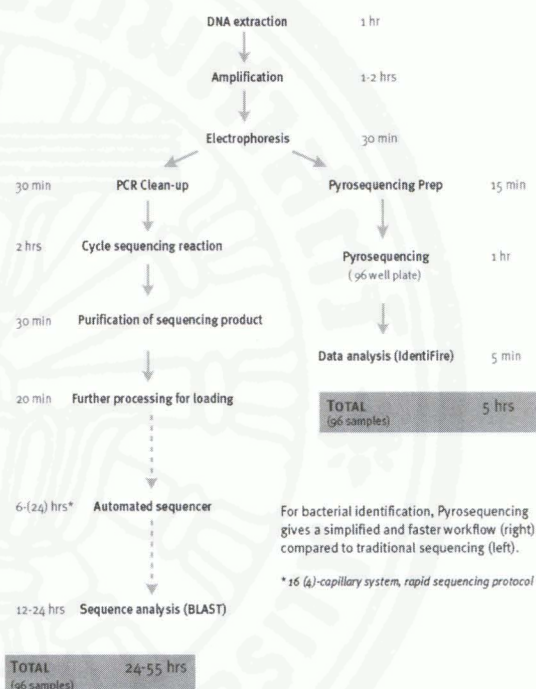
รูปที่ 6 แสดง pyrogram ซึ่งความสูงของ pyrogram แสดงจำนวนเบสที่ถูกเติมในระหว่างที่มีการสร้างดีเอ็นเอ หรือแสดงปริมาณ PPi ที่ถูกปล่อยมาในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจากรูปที่ 6 มี PPi เกิดขึ้นหลังจากการเติมเบสคู่สมได้ 4 เบส ทำให้เกิด pyrogram ที่มีความสูงอยู่ 4 ระดับคือ 1PPi เกิดจากการเติมเบสคู่สม 1 เบส 2PPi เกิดจากการเติมเบสคู่สมชนิดเดียวกันติดต่อกัน 2 เบส 3PPi เกิดจากการเติมเบสคู่สมชนิดเดียวกันติดต่อกัน 3 เบส และ 4PPi เกิดจากการเติมเบสชนิดเดียวกันติดต่อกัน 4 เบส ดังนั้นรูปที่ 6 สามารถอ่านลำดับเบสที่ได้ผลจากการทำ pyrosequencing ได้ดังนี้ (ด้านบน)

5'-AGGGGTGGCTTTGGGGTTGCAGTTG-3'

หลังจากมีการเติมเบสดังนี้ (ด้านล่าง)

AGTCAGTCAGTCAGTCAGT CAGTCAG

4.ข้อดีของ pyrosequencing technique เมื่อเปรียบเทียบกับ conventional technique



รูปที่ 7 แสดงเวลาของการหาลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างวิธี conventional method (ซ้าย) และวิธี pyrosequencing (ขวา)

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=29070&mn1=1373&mn2=1374>

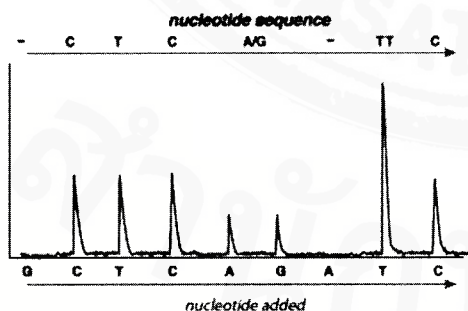
รูปที่ 7 แสดงขั้นตอน และเวลาเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างวิธีดั้งเดิม dideoxy chain termination method (ซ้าย) และ pyrosequencing technology (ขวา) เมื่อเปรียบเทียบเวลาของการหาลำดับเบสในตัวอย่าง 96 ตัวอย่างเท่ากัน พบว่าถ้าหาลำดับเบสด้วยวิธีดั้งเดิมจะต้อง

ใช้เวลาถึง 1 – 2 วัน (24 – 55 ชั่วโมง) ส่วนการหาลำดับเบสโดยวิธี pyrosequencing จะใช้เวลาเพียง 5 ชั่วโมง

5. การประยุกต์วิธี pyrosequencing technology สำหรับงานวิจัย

ปัจจุบันเทคโนโลยีในการหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing มีการพัฒนามาเป็นระบบเครื่องมืออัตโนมัติ (automated system เช่น PSQ 96 system (<http://www.pyrosequencing.com>)) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว (high throughput) เมื่อเทียบกับวิธี dideoxy chain termination technique จนมีผู้กล่าวว่า “Pyrosequencing: As Easy as PCR, and As Reliable as Sanger” ขยายความดังนี้คือเทคนิค pyrosequencing เป็นเทคนิคที่ทำงานเหมือนพีซีอาร์ และมีความน่าเชื่อถือเทียบเท่ากับวิธี dideoxy chain termination technique ที่ Sanger ได้คิดค้นขึ้นมา (Sanger et al. 1977) การหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ ดังนี้

1. เพื่อหาจีโนไทป์ของ SNP (genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms) หรือการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) [1,4,15]



รูปที่ 8 แสดงวิธี pyrosequencing ที่สามารถตรวจหา SNP หรือ mutation

ที่มา Anal Biochem., 280; pp. 103–110, 2000.

รูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเทคนิค pyrosequencing สามารถใช้ตรวจหา Single – Nucleotide Polymorphisms หรือ SNP จากภาพจะเห็นว่าผลของ pyrogram สามารถแสดงลำดับเบสได้ 2 แบบคือ แบบแรก 5'-CTCATTC-3' แบบที่ 2 คือ 5'-CTCGTTC -3' แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) หรือ polymorphism เกิดขึ้นในตำแหน่ง (A/G) ซึ่งระหว่าง mutation หรือ polymorphism แตกต่างกันที่ mutation ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน และให้การหน้าที่ของยีนนั้นเปลี่ยน ส่วน polymorphism ไม่ทำให้กรดอะมิโนและหน้าที่ของดีเอ็นเอหรือยีนเปลี่ยนไป ดังนั้นจะเห็นว่า pyrosequencing สามารถตรวจสอบหา Single – Nucleotide Polymorphisms หรือ SNP ได้โดยศึกษาผลของความสูงของ peak ของ pyrogram ซึ่งจะต่ำกว่าปกติเมื่อเทียบกับเบสอื่นๆ ดังแสดงจากภาพคือตำแหน่ง A/G

2. Microbiological typing

<http://www.biotagebio.com/DynPage.aspx?id=29086>

มีนัก Microbiologist กล่าวว่า “Pyrosequencing in Microbiology - As Reliable as Sequencing, as Easy as PCR” ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคของ pyrosequencing สามารถนำมาใช้ในงานทางจุลชีววิทยา ให้ผลน่าเชื่อถือสูงเป็นเทคนิคที่ทำงานให้ผลเร็วเหมือนกับการทำพีซีอาร์ ซึ่งมีการนำเทคนิคนี้ไปใช้เพื่อวินิจฉัย *Bordetella pertussis*, *Mycobacteria spp.*, *Neisseria spp.*, *Helicobacter pylori*, and *Streptococcus spp.* หรือมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านใช้เทคนิคนี้เพื่อวิเคราะห์หว่าส่งส่งตรวจที่ได้มาจากการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือไม่โดยวิเคราะห์ที่ 16S rDNA และ *rnpB* ยีน

เช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย ในการพิสูจน์ว่าในสิ่งส่งตรวจมีเชื้อราปนหรือไม่โดยการพิสูจน์ที่ *ITS2* ยีนโดยใช้เทคนิค pyrosequencing นอกจากนี้มีผู้นำเทคนิค pyrosequencing เพื่อพิสูจน์หาเชื้อราชนิดต่างๆ ได้แก่ *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp* เป็นต้น

ขณะเดียวกันมีรายงานพบว่า สามารถนำเอาเทคนิค pyrosequencing มาใช้เพื่อพิสูจน์เชื้อไวรัสต่อไปนี้ได้แก่ influenza, Human Papilloma Virus และ Herpes Simplex Virus

3. Resequencing [32]

เนื่องจากวิธี pyrosequencing เป็นเทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์เร็ว มีความถูกต้องสูง จึงนิยมนำมาใช้เพื่อเป็นการยืนยันเพื่อตรวจสอบลำดับเบสอีกครั้ง (ressequencing) เช่นในการหาลำดับเบสของจีโนมของแบคทีเรียบางชนิด ด้วยวิธีดั้งเดิมหลังจากนั้นต้องการตรวจสอบ หรือยืนยันว่า ลำดับเบสที่ทำโดยดั้งเดิม ว่าถูกต้องหรือไม่ โดยการใช้เทคนิค pyrosequencing เพื่อยืนยันลำดับเบสดังกล่าว จะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เร็วกว่าการใช้วิธีดั้งเดิมเพื่อยืนยันผล

4. Analysis of difficult Secondary Structures

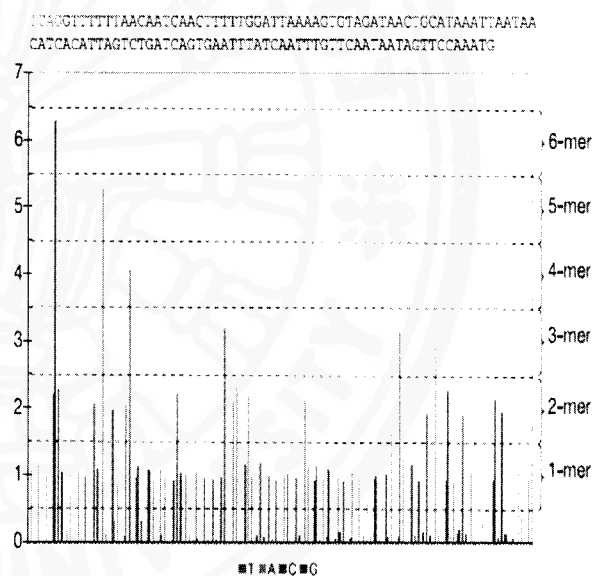
[30,31,32, 41]

ปัญหาของการหาลำดับเบสด้วยวิธี conventional method หรือ dideoxy chain termination technique คือ เมื่อดีเอ็นเอต้นแบบหรือ template มีรูปร่างที่เปลี่ยนไปไม่เป็นเส้นตรงหรือมีรูปร่างของดีเอ็นเอต้นแบบเป็นแบบ hairpin structures โดยโครงสร้างนี้พบได้บ่อย ซึ่งการใช้ hairpin structures เป็นต้นแบบมักทำให้ผลการหาลำดับเบสของวิธี conventional method ได้ผลไม่ดี ซึ่งจากการหาลำดับเบสโดยวิธี pyrosequencing มีการใช้ DNA polymerase ชนิด Klenow DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเติมเบสและสร้างเส้นดีเอ็นเอเมื่อเจอลำดับเบสแบบ hairpin structure ได้ ดังนั้นวิธี pyrosequencing จึงเหมาะกับการหาลำดับเบสของต้นแบบที่มีรูปร่างเป็นแบบ hairpin structure ได้

5. High -throughput 454 DNA sequencing technology (www.454.com)

454 DNA sequencing technology เป็นเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้หลักการของ pyrosequencing ซึ่งพัฒนาโดยบริษัท Roche Applies Science ซึ่งเมื่อ

เปรียบเทียบกับเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสที่ใช้หลักการของ Sanger พบว่า 454 DNA sequencing technology ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว (high-throughput) กว่ามากเมื่อใช้ตัวอย่างทดลองและเวลาเท่ากัน ดังเช่นมีการใช้เครื่อง 454 DNA sequencer ในการหาลำดับเบสของยีน (genomic sequencing) [42] การหาลำดับเบสของ cDNA (cDNA sequencing) [43] และในงาน ultra-deep amplicon sequencing [44] ต่อไปนี้เป็น pyrogram ตัวอย่างการใช้ 454 DNA sequencing technology เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสของ *M. genitalium* [45]



รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างผลของ pyrogram ในการใช้ 454 DNA sequencing technology เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสของ *M. genitalium*

ที่มา doi:10.1038/nature03959

จากรูปจะเห็นได้ว่า 454 DNA sequencing technology สามารถตรวจสอบเบสที่ซ้ำกันได้ถึง 6 เบส ตามรูปที่ 9 คือ TTTTTT

6.ข้อเสีย หรือ ข้อจำกัด ของ pyrosequencing technology [28,30,31,32.]

เนื่องจากเทคโนโลยี pyrosequencing เป็นเทคโนโลยีใหม่ และมีหลักการซับซ้อน ดังนั้นอาจทำให้ผู้ที่ศึกษาต่อการทำความเข้าใจ และเครื่องมือที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการนี้มีราคาแพง มีการใช้เทคโนโลยีในการแปลผลหลายอย่างซับซ้อนในการแปลผล เช่น การใช้เครื่องมือที่สามารถตรวจวัดการเปล่งแสงของ oxyluciferin เพื่อแปลมาเป็น program ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพงมาก

7. บทสรุป

การหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม คือมีความเร็วสูง ซึ่งส่วนใหญ่ นิยมหา genotyping ของเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และยังใช้ตรวจหา SNP หรือ mutation ต่างๆ ได้เร็วกว่าวิธีดั้งเดิม

8. เอกสารอ้างอิง

- [1] Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A.C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M. and Lundeberg, J., Single-nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Anal Biochem.*, 280; pp. 103–110, 2000.
- [2] Ahmadian, A., Lundeberg, J., Nyren, P., Uhlen, M. and Ronaghi, M., Analysis of the p53 Tumor Suppressor Gene by Pyrosequencing. *BioTechniques.*, 28; pp. 140–144, 2000.
- [3] Ahmadian, A., e.h.n, m. and Hober, S.S., Pyrosequencing: History, Biochemistry and Future. *Clinica Chimica Acta.*, 363; pp. 83-94, 2006.
- [4] Alderborn, A., Kristofferson, A. and Hammerling U., Determination of Single Nucleotide Polymorphisms by Real-time Pyrophosphate DNA Sequencing. *Genome Res.*, 10; pp. 1249–1258, 2000.
- [5] Bains, W. and Smith, G.C., A Novel Method for Nucleic acid Sequence Determination. *J Theoret Biol.*, 135; pp. 303–307, 1988.
- [6] Benkovic, S.J and Cameron C.E., Kinetic Analysis of Nucleotide Incorporation and Misincorporation by Klenow Fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. *Methods Enzymol.*, 262; pp. 257–269, 1995.
- [7] Brenner, S., Williams, S.R., Vermaas, E.H., Storck, T., Moon, K., McCollum, C., Mao, J.L., Luo, S., Kirchner, J.J., Eletr, S., In vitro Cloning of Complex Mixtures of DNA on Microbeads: Physical Separation of Differentially Expressed cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 97; pp. 1665–1670, 2000.
- [8] Canard, B. and Sarfati, R.S., DNA Polymerase Fluorescent Substrates with Reversible 3'-tags. *Gene.*, 148; pp. 1–6, 1994.
- [9] Capson, T.L., Peliska, J.A., Kaboord, B.F., Frey, M.W., Lively, C., Dahlberg, M., Benkovic, S.J., Kinetic Characterization of the Polymerase and Exonuclease Activities of the Gene 43 Protein of bacteriophage T4. *Biochemistry.*, 31; pp 10984–10994, 1992.
- [10] Cheesman, P.C. Method for Sequencing polynucleotides., US Patent no. 5302509, 1994.
- [11] Cline, J., Braman, J.C., Hogrefe, H.H., PCR Fidelity of pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 24; pp 3546–3551, 1996.
- [12] DeLuca, M. and McElroy, W.D., Two Kinetically Distinguishable ATP Sites in Firefly Luciferase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 123; pp 764–770, 1984.

- [13] Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I. and Crkvenjakov, R., Sequencing of Megabase plus DNA by Hybridization: Theory of the Method. *Genomics*, 4; pp 114-128, 1989.
- [14] Eckert, K.A. and Kunkel, T.A., High Fidelity DNA Synthesis by the *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 18; pp 3739-3744, 1990.
- [15] Ekstrom, B., Alderborn, A. and Hammerling, U., Pyrosequencing for SNPs. *Progress in Biomedical optics*, 1; pp 134-139, 2000.
- [16] Garcia, A.C., Ahamdian, A., Gharizadeh, B., Lundeberg, J., Ronaghi, M., Nyren, P., Mutation Detection by Pyrosequencing: Sequencing of Exons 5 to 8 of the p53 Tumour Suppressor Gene. *Gene*, 253; pp 249-257, 2000.
- [17] Gillin, F.D. and Nossal, N.G., Control of Mutation Frequency by Bacteriophage T4 DNA Polymerase. II. Accuracy of Nucleotide Selection by the L88 Mutator, CB120 Antimutator, and Wild Type Phage T4 DNA Polymerases. *J Biol Chem.*, 251; pp 5225-5232, 1976.
- [18] Holmberg, K., Persson, M.L., Uhlen, M., Odeberg, J., Pyrosequencing Analysis of Thrombosis-Associated Risk Markers. *Clinical Chemistry*, 51 (8); pp 1549-1552, 2005.
- [19] Hyman, E.D., A New Method of Sequencing DNA. *Anal. Biochem.*, 174; pp 423-436, 1988;
- [20] Karamohamed, S., Nilsson, J., Nourizad, K., Ronaghi, M., Pettersson, B., Nyren, P., Production, Purification, and Luminometric Analysis of Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* MET3 Adenosine Triphosphate Sulfurylase Expressed in *Escherichia coli*. *Prot Exp Purif.*, 15; pp 381-388, 1999.
- [21] Karamohamed, S., Nordstrom, T. and Nyren, P., Real-time Bioluminometric Method for Detection of Nucleoside Diphosphate Kinase Activity. *BioTechniques*, 26; pp 728-734, 1999.
- [22] Khrapko, K.R., Lysov, Yu., Khorlyn, A.A., Shick, V.V., Florentiev, V.L., Mirzabekov, A.D., An Oligonucleotide Hybridization Approach to DNA Sequencing. *FEBS Lett.*, 256; pp 118-122, 1989.
- [23] Melamede R.J. Automatable Process for Sequencing Nucleotide. US Patent no. US4863849, 1985.
- [24] Metzker, M.L., Raghavachari, R., Richards, S., Jacutin, S.E., Civitello, A., Burgess, K., Gibbs, R.A., Termination of DNA Synthesis by Novel 3'-modified - Deoxyribonucleoside 5'-triphosphates. *Nucleic Acids Res.*, 22; pp 4259-4267, 1994.
- [25] Nordstrom, T., Nourizad, K., Ronaghi, M., Nyren, P., Methods Enabling Pyrosequencing on Double-stranded DNA. *Anal. Biochem.*, 282; pp 186-193, 2000.
- [26] Nyren, P., Enzymatic method for Continuous Monitoring of DNA Polymerase Activity. *Anal Biochem.*, 167; pp 235-238, 1987.
- [27] Nyren, P. and Lundin, A., Enzymatic Method for Continuous Monitoring of Inorganic Pyrophosphate Synthesis. *Anal Biochem.*, 151; pp 504-509, 1985.
- [28] Ronaghi, M., 'Pyrosequencing: A Tool for Sequence-Based DNA Analysis.' Doctoral thesis, The Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden 1998.
- [29] Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., Nyren, P., Real-time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem.*, 242; pp 84-89, 1996.

- [30] Ronaghi, M., Pettersson, B., Uhlen, M., Nyren, P., PCR-introduced Loop Structure as Primer in DNA Sequencing. *BioTechniques.*, 25; pp 876–884, 1998.
- [31] Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P., A Sequencing Method Based on Real-time Pyrophosphate. *Science.*, 281; pp 363–365, 1998.
- [32] Ronaghi, M., Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res.*, 11; pp 3-11, 2001.
- [33] Rosenthal, A., Process for Solid Phase-sequencing of Nucleic Acid. US Patent no. US1985000761107, 1989.
- [34] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74; pp 5463–5467, 1977.
- [35] Shames, D., Minna, J., Gazdar, F., Method for Detecting DNA Methylation in Tumors: From Bench to Bedside. *Cancer Letters.*, 251; pp 187-198, 2007.
- [36] Southern, E.M., Analysing Polynucleotide Sequences. US Patent no. WO/10977, 1989.
- [37] Topal, M.D., DiGiuseppi, S.R., Sinha, N.K., Molecular Basis for Substitution Mutations. Effect of Primer Terminal and Template Residues on Nucleotide Selection by Phage T4 DNA Polymerase in vitro. *J Biol Chem.*, 255; pp 11717–11724, 1980.
- [38] Traverso-Cori, A., Chaimovich, H., Cori, O., Kinetic Studies and Properties of Potato Apyrase. *Arch Biochem Biophys.*, 109; pp 173–181, 1965.
- [39] Tsien, R.Y., Ross, P., Fahhnestock, M., Johnston, A.J., Method for DNA Sequencing. US Patent no. PCT WO 91/06678, 1991.
- [40] Van Draanen, N.A., Tucker, S.C., Boyd, F.L., Trotter, B.W., Reardon, J.E., Beta-L-thymidine 5'-Triphosphate analogs as DNA Polymerase Substrates. *J Biol Chem.*, 267; pp 25019–25024, 1992.
- [41] Wong, I., Patel, S.S., Johnson, K.A., An Induced-fit Kinetic Mechanism for DNA Replication Fidelity: Direct Measurement by Single-turnover Kinetics. *Biochemistry.*, 30; pp 526–537, 1991.
- [42] Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R.O., Unique Features of a Highly Pathogenic *Campylobacter* Jejuni Strain. *Infect. Immun.*, 74; pp 4694–4707, 2006.
- [43] Gowda, M., Li, H., Alessi, J., Robust Analysis of 50-Transcript ends (50-RATE): a Novel Technique for Transcriptome Analysis and Genome Annotation. *Nucleic Acids Res.*, 34; e126, 2006.
- [44] Thomas, R.K., Nickerson, E., Simons, J.F., Sensitive Mutation Detection in Heterogeneous Cancer Specimens by Massively Parallel Picoliter Reactor Sequencing. *Nat. Med.*, 12 : pp 852–855, 2006.
- [45] Marcel, M., Michael, E., William, E.A., Genome Sequencing in Microfabricated High-density Picolitre Reactors. doi: 10.1038/ nature 03959; pp 1-5, 2008.