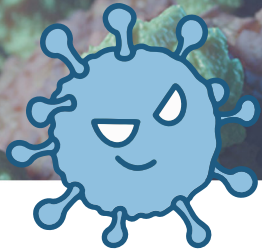




จดหมายข่าว

กุมภาพันธ์ - มีนาคม 2567 Volume 23 February - March 2024



Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Promising point-of-care detection



นางสาวสุรตนา บุญใส นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

เทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA) เป็นหนึ่งในเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (nucleic acid) โดยใช้อุณหภูมิคงที่ตลอดการเกิดปฏิกิริยา (isothermal amplification) ซึ่งเทคนิค RPA นั้น สามารถเกิดปฏิกิริยาในช่วงอุณหภูมิ 37 – 42 องศาเซลเซียส โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler ในการเพิ่มหรือลดอุณหภูมิ และใช้เวลาเพียงประมาณ 5-20 นาที อีกทั้งสามารถตรวจจับ nucleic acid ได้หลายประเภท ได้แก่ RNA, microRNA, single strand DNA (ssDNA) และ double strand DNA (dsDNA) จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และจากตัวอย่างหลายประเภท (Tan *et al.*, 2022)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิค RPA ในการตรวจเชื้อก่อโรคหลายกลุ่ม ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรียและยีสต์ และปรสิต เนื่องจากสามารถตรวจได้ง่ายและรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีถึงแม้ตัวอย่างจะมี inhibitor ต่อปฏิกิริยาสูง และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาสูงในห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้ในภาคสนาม ลดขั้นตอนการในการเก็บรักษาและขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรหรือเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถตรวจคัดกรองโรคเบื้องต้นได้รวดเร็วขึ้น ช่วยให้การควบคุมป้องกันโรคติดเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Feng *et al.*, 2023)

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค RPA ตรวจเชื้อก่อโรคในสัตว์

Virus

Monkeypox virus (Li *et al.*, 2023)
African swine fever virus (ASFV) (Ceruti *et al.*, 2021)
Porcine epidemic diarrhea virus (Ma *et al.*, 2022)

Bacteria

Pasteurella multocida (Zhao *et al.*, 2019)
pathogenic *Leptospira* (Ahmed *et al.*, 2014)
Klebsiella pneumoniae (N. Li *et al.*, 2022)

Antimicrobial resistance gene

Carbapenem-resistance genes bla_{oxa}-23 of *Acinetobacter baumannii*. (Liu *et al.*, 2020)
Methicillin-resistant *Staphylococci* (MRS) (Srisrattakarn *et al.*, 2020)
Vancomycin resistant *Enterococci* (Panpru *et al.*, 2021)

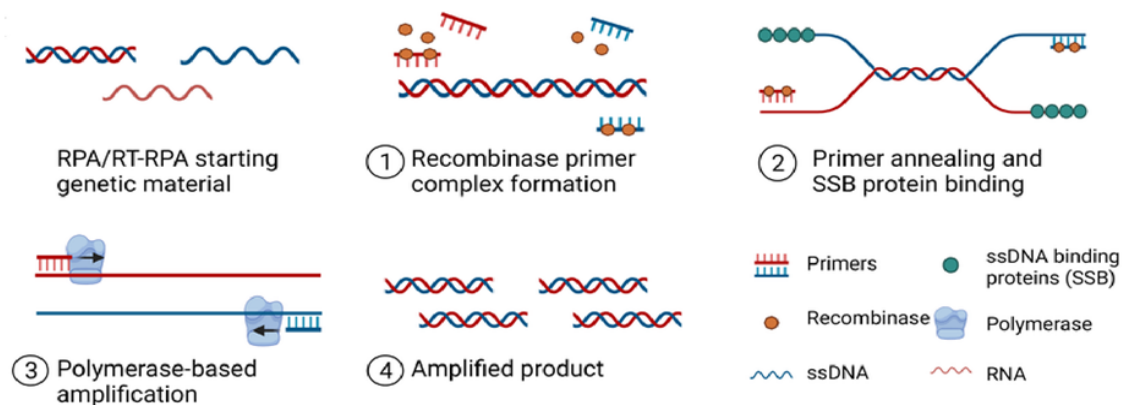
Parasite

Plasmodium malariae (Liu *et al.*, 2013)
Babesia species (Onchan *et al.*, 2022)

หลักการทำงาน

เทคนิค RPA นั้น สามารถตรวจจับ nucleic acid เป้าหมายได้ โดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ 3 ชนิดหลัก ประกอบด้วย recombinase UvsX ที่ได้จาก T4 phage, Single-strand binding protein (SSB) และ DNA polymerase และเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 1





ภาพที่ 1 การเกิดปฏิกิริยา Recombinase Polymerase Amplification
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Bhat *et al.*, 2022)

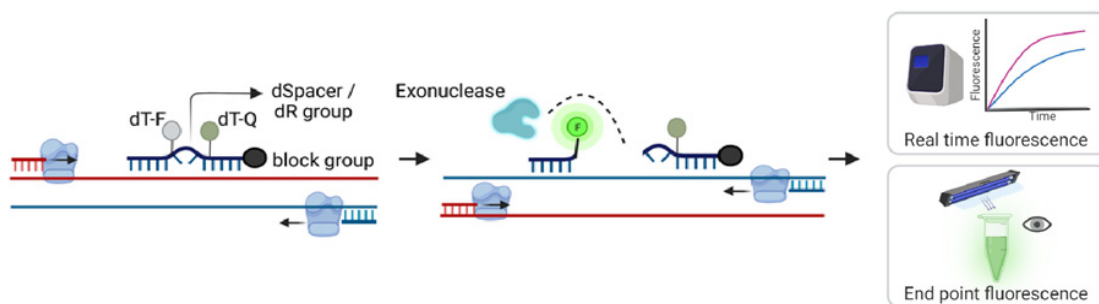
- 1) เอนไซม์ recombinase จับกับ RPA primer แต่ละเส้น เกิดเป็น nucleoprotein filament complex
- 2) ซึ่งช่วยให้ primers สามารถ anneal กับ dsDNA template บริเวณ homologous sequence ได้ จากนั้น dsDNA template จะถูกแยกออกเป็น 2 สาย แล้ว SSB จะเข้ามาจับ ssDNA สายที่ไม่ถูก hybridize
- 3-4) ทำให้ DNA polymerase สามารถนำ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) มาสร้าง polynucleotide สายใหม่ได้ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา 1 รอบ จะมี loading factor ช่วยให้ recombinase สามารถจับกับ primer และเกิดปฏิกิริยา RPA ได้อีก แล้วเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องหลายซ้ำทำให้ได้เป็น DNA สายใหม่จำนวนมาก

การอ่านผล RPA

ปัจจุบันสามารถอ่านผลปฏิกิริยา RPA ได้หลายวิธี โดยวิธีที่ได้รับความนิยม ได้แก่

1. อ่านผลจากสี fluorescence

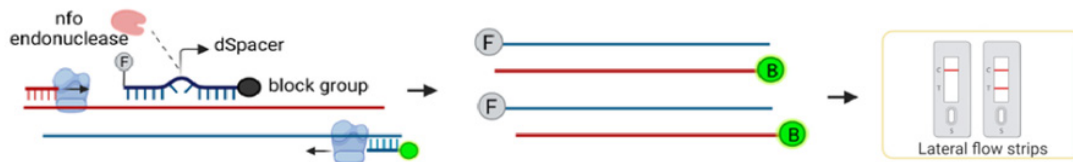
การอ่านผลของปฏิกิริยา RPA จากสี fluorescence จะมีการใช้เอนไซม์ exonuclease และมีการใช้ exo probe ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอความยาว 46-52 คู่เบส ซึ่งติดฉลากด้วย quencher ที่ปลาย 5' และติด fluorophore ที่ปลาย 3' นอกจากนี้แล้ว exo probe จะมี tetrahydrofuran (THF) หรือเรียกว่า dSpacer ซึ่งเมื่อ probe ตรวจพบสารพันธุกรรมเป้าหมาย จะไป hybridize กับสารพันธุกรรมเป้าหมาย แล้วจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ exonuclease จะทำให้ fluorophore แยกออกจาก quencher เกิดการเรืองแสงเกิดขึ้น ซึ่งเป็นบ่งชี้การตรวจพบสารพันธุกรรมเป้าหมาย สามารถตรวจวัดได้แบบ real time ด้วยเครื่อง real time PCR และแบบ end point ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าเมื่อฉายแสงสีฟ้า ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การอ่านผลปฏิกิริยา Recombinase Polymerase Amplification จากสี fluorescence
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Bhat *et al.*, 2022 และ Li *et al.*, 2022)

2. อ่านผลด้วย lateral flow strips

การอ่านผลของปฏิกิริยา RPA ด้วย lateral flow strips จะมีการใช้เอนไซม์ endonuclease ร่วมกับ probe ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอ ความยาว 46-52 คู่เบส ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เช่น FAM สำหรับจับกับสารพันธุกรรมเป้าหมาย ซึ่งเมื่อ probe ตรวจพบสารพันธุกรรมเป้าหมาย จะเกิด hybridization กับสารพันธุกรรมเป้าหมาย แล้ว probe จะถูกเอนไซม์ nfo ตัด ทำให้ปลาย 3' ว้าง และถูกใช้เป็น primer ในปฏิกิริยาขั้นตอนถัดไป ทำให้เกิดเป็น amplicon ที่ติดสี FAM และ Biotin ที่ reverse primer เรียก double labelled amplicon ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วย lateral flow strips ได้ ดังภาพที่ 3



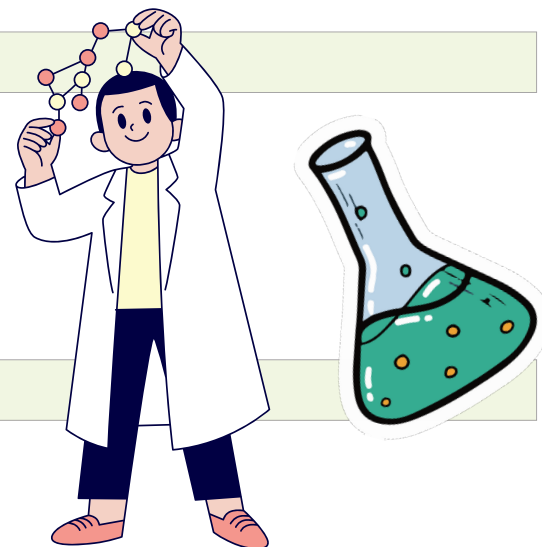
ภาพที่ 3 การอ่านผลปฏิกิริยา Recombinase Polymerase Amplification ด้วย lateral flow strips
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Bhat et al., 2022 และ Li et al., 2022)

ข้อได้เปรียบของเทคนิค RPA

- ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาสั้น
- มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูง
- สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมหลายเป้าหมายในครั้งเดียว (multiplex) ได้
- สามารถทำได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย
- สามารถเก็บสารเคมีไว้ที่อุณหภูมิห้องและนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้

ข้อด้อยของเทคนิค RPA

- ยังไม่มีโปรแกรมสำหรับออกแบบ primer



เอกสารอ้างอิง

- Tan, M., Liao, C., Liu, L., Yi, X., Zhou, Z., & Wei, G. (2022). Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.
- Feng, X., Yan, L., Zhao, Y., Sun, Z., Xu, N., Zhao, C., & Xia, W. (2023). Recombinase polymerase Amplification-Based biosensors for rapid zoonoses screening. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 18, 6311–6331.
- Yu, L., Xiao, F., Peng, B., Jia, N., Fu, J., Chen, M., Wang, Y., Zhou, J., & Meng, L. (2024). Rapid, sensitive and highly specific diagnosis of *Moraxella catarrhalis* by recombinase polymerase amplification-based biosensor and fluorescence detection. *Sensors and Actuators Reports*, 7, 100181.

จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

ISSN 1685-2206

วัตถุประสงค์

เพื่อเผยแพร่วิชาการด้านสุขภาพสัตว์โดยเป็นสื่อกลางแลกเปลี่ยนข่าวสารวิชาการเสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหาด้านสุขภาพสัตว์และการเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งการประชาสัมพันธ์กิจกรรมด้านสุขภาพสัตว์

เจ้าของ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2579-8908-14 โทรสาร.0-2579-8918-19

ที่ปรึกษา

นายสัตวแพทย์สมชวน รัตนมังคลานนท์ อธิบดีกรมปศุสัตว์
นายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ
หัวหน้ากลุ่ม / ส่วน / ศูนย์ / ฝ่าย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

กองบรรณาธิการ

นายสัตวแพทย์เจษฎา รัตนโณภาสี (บรรณาธิการ)
นายสัตวแพทย์นพพร โต๊ะมี
สัตวแพทย์หญิง ดร.รุ่งรัตน์ ไสยสมบัติ
สัตวแพทย์จันทรา วัฒนเมธานนท์

นายสัตวแพทย์พีรวิทย์ บุญปางบรรพ
นายสัตวแพทย์วรรณพล บุทเสน
สัตวแพทย์หญิงกฤดากร วงษ์ทองสาลี
นายอนุสรณ์ อยู่เย็น

นางสาวกุลฐ์ณรัตน์ ภาคะ
นางสาวปิยะวรรณ เกิดพันธ์
นางสาวชนกพร บุญศาสตร์
นายพลกฤต มหานาม

จัดทำโดย

กลุ่มบริหารจัดการสุขภาพสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

สำนักงาน

กลุ่มบริหารจัดการสุขภาพสัตว์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

เผยแพร่

เผยแพร่บนเว็บไซต์สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

สามารถหาข้อมูลเรื่องที่ลงจดหมายข่าวปีย้อนหลังเพิ่มเติมได้ที่ <https://niah.dld.go.th>

