วิวัฒนาการของเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรม เพื่อการวินิจฉัยเชื้อจุลชีพ

วิทูร ธีระกิตติวัฒนา, วิชญะ สุทธิสัณหกุล, ปิยะ วงศ์ญาณิน, พจมาน ผู้มีสัตย์*

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร
*Corresponding author email: potjaman.pu@bsru.ac.th

ได้รับบทความ: 27 กรกฎาคม 2568
ได้รับบทความแก้ไข: 19 ตุลาคม 2568
ยอมรับตีพิมพ์: 30 ตุลาคม 2568

บทคัดย่อ

กว่าทศวรรษที่เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในวงการจุลชีววิทยาทางการแพทย์ เทคโนโลยีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับโรคทางพันธุกรรมที่พบได้ยาก ใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียและจุลชีพอื่น ๆ รวมไปถึงใช้ในการศึกษาลำดับพันธุกรรมสมบูรณ์ของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ ปัจจุบันเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมแบ่งออกเป็น 3 รุ่น คือ รุ่นแรก เทคโนโลยีของแซงเกอร์ เป็นวิธีการที่ใช้เทคโนโลยีที่เรียกว่า เซนเทอมิเนติ้ง และการทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส รุ่นที่ 2 เทคโนโลยีของอิลลูมิน่า จะอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า บริจด์ แอมพลิฟิเคชั่น นอกจากนี้ ยังมีเทคโนโลยีอย่างไอออน ทอร์เรน และโซลิดอีกด้วย รุ่นที่ 3 เทคโนโลยีของแพคไบโอ มีการพัฒนาให้สามารถหาลำดับพันธุกรรมที่มีขนาดยาวกว่าได้ การพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ ๆ เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อจะช่วยในการลดค่าใช้จ่าย (ต้นทุน), เพิ่มความแม่นยำและลดระยะเวลาดำเนินการ อ็อกฟอร์ดนาโนพอร์เทคโนโลยี จัดเป็นรุ่นล่าสุดของเทคโนโลยีที่ถูกพัฒนาขึ้น (รุ่นที่ 3) โดยเทคโนโลยีนี้จะอาศัยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปของโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ เป็นต้น ที่เคลื่อนที่ผ่านรูขนาดเล็กในระดับนาโนในขณะช่วงเวลานั้น ๆ ทันที แม้ว่าเทคโนโลยีนี้จะมีการประยุกต์ใช้ในวงการจุลชีววิทยาทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีนี้ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ไม่สามารถตรวจหาแบคทีเรียใน

สิ่งส่งตรวจที่พบเชื้อมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป รวมไปถึงราคาต้นทุนของการหาลำดับพันธุกรรมยังคงมีมูลค่าสูงเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่าง ๆ เป็นต้น

คำสำคัญ: การหาลำดับพันธุกรรม/ เทคโนโลยี/ วิวัฒนาการ

The Evolution of Sequencing Technology for Microbial Diagnosis

Witoon Thirakittiwatthana, Vichaya Suttisunhakul, Piya Wongyanin, Potjaman Pumeesat*

[1]Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
*Corresponding author email: potjaman.pu@bsru.ac.th

Received: 27 July 2025
Revised: 19 October 2025
Accepted: 30 October 2025

Abstract

Over the past few decades, gene sequencing technology has become one of the most prominent tools in medical microbiology, widely applied in areas such as cancer diagnosis, the study of rare genetic diseases, microbial detection, and genome assembly. Currently, sequencing technologies can be classified into three main generations. The first-generation method, Sanger sequencing, employs chain-termination and gel electrophoresis to sequence DNA. In the second generation, Illumina sequencing utilizes bridge amplification for high-throughput sequencing, while other technologies such as Ion Torrent and SOLiD offer alternative approaches. The third-generation technology, exemplified by PacBio sequencing, allows for long-read sequencing, enabling the analysis of more complex genomic regions.

As sequencing technologies evolve, the focus has shifted toward reducing costs, improving accuracy, and minimizing processing times. Oxford Nanopore Technology (ONT), a more recent advancement, is often considered a part of third-generation sequencing. It enables real-time monitoring by

detecting changes in electrical current as DNA or RNA molecules pass through a nanopore.

Despite the widespread application of these technologies in medical microbiology, certain limitations remain. For instance, current sequencing methods struggle to simultaneously detect multiple bacterial species in mixed samples. Additionally, compared to traditional diagnostic methods, the high costs of sequencing technologies present a significant barrier to their broader adoption in clinical settings.

Keywords: Gene sequencing/ Technology/ Evolution

บทนำ

ก่อนหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกัน James Watson และนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ Francis Crick จะค้นพบดีเอ็นเอในช่วงทศวรรษที่ 1950 นั้น ก็พบว่ามีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่ศึกษาถึงดีเอ็นเออยู่ก่อนหน้านี้เป็นจำนวนไม่น้อย ไม่ว่าจะเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวสวิตซ์ Friedrich Miescher ที่ได้ค้นพบ “Nuclein” ที่อยู่ในนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ ซึ่งต่อมาได้ถูกเปลี่ยนเป็น Nucleic acid และได้กลายมาเป็น deoxyribonucleic acid หรือ DNA ที่รู้จักกันในปัจจุบัน แต่หลังจากนั้นราว 50 ปี Phoebus Levene นักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซีย ได้ค้นพบ 3 องค์ประกอบหลักของ Nucleotide คือ ฟอสเฟต (Phosphate), น้ำตาล (Sugar) และเบส (Base) และยังมีนักวิทยาศาสตร์อีกมากมายที่ทำการศึกษาเรื่องนี้ จนกระทั่งมาถึงยุคของ Watson และ Crick ที่ประสบความสำเร็จในการบัญญัติสูตรโมเลกุลของดีเอ็นเอได้อย่างครบถ้วน หลังจากนั้นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ หรือลำดับพันธุกรรมก็ได้รับการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการระบุลำดับสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำให้เกิดความเข้าใจและใช้ในการรักษาโรคทางพันธุกรรมเท่านั้นในช่วงแรกเริ่ม [1]

ปัจจุบัน เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรม (Sequencing technology) ได้รับการพัฒนาและจัดให้เป็นเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่เข้ามามีบทบาทในทางจุลชีววิทยาและชีวการแพทย์มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากมีการพัฒนาเทคโนโลยีนี้ให้มีความถูกต้องแม่นยำ และสะดวกมากยิ่งขึ้น ซึ่งทำให้ช่วยลดต้นทุน เพิ่มกำลังการทดสอบ และลดเวลาที่ใช้ในการทำการทดสอบอีกด้วย [2] [3]

เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมเป็นเทคนิควิธีการกำหนดลำดับของสารพันธุกรรม (นิวคลีโอไทด์เบส) ซึ่งประกอบไปด้วยเบสต่าง ๆ คือ Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C) และ Thymine (T) ของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ โดยการหาลำดับพันธุกรรมสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคทางพันธุกรรมที่พบได้ยาก โรคติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ปรสิตต่าง ๆ เป็นต้น การนำมาใช้ในการติดตามการรักษาและการป้องกันการติดเชื้อได้อีกด้วย [3] [4] [5] [6] เนื่องด้วยประโยชน์ของเทคโนโลยีนี้ที่สามารถทำการวิเคราะห์จากสารพันธุกรรมโดยตรง ทำให้ใช้ปริมาณตัวอย่างตรวจน้อยกว่าและมีความแม่นยำสูง นอกจากนี้เทคโนโลยีเหล่านี้ยังได้รับการพัฒนาให้สามารถตรวจ

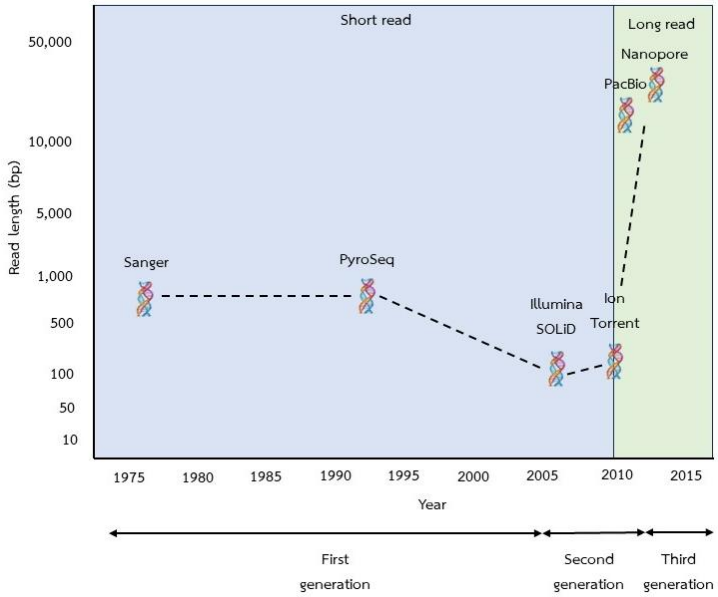
วิเคราะห์เชื้อจุลชีพที่ดื้อยาได้จากตัวอย่างตรวจโดยตรง จึงช่วยลดระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อ พิสูจน์ชนิดเชื้อและการทดสอบหายีนดื้อยา เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อแบบดั้งเดิมที่ต้องอาศัยระยะเวลาหลายวัน และในบางกรณีที่พบว่า เชื้อจุลชีพสามารถเพาะเชื้อให้เจริญได้ยาก หรือต้องใช้เวลาหลายวัน เทคโนโลยีเหล่านี้จึงเข้ามามีบทบาท เพื่อช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จในการรักษาผู้ป่วย และช่วยลดอัตราการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากการติดเชื้อจุลชีพดื้อยาอีกด้วย [7]

จากการที่เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมนี้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และเมื่อได้ทำการศึกษาย้อนกลับไปทำให้สามารถจัดแบ่งเทคโนโลยีนี้ออกเป็นรุ่น ๆ ได้ ซึ่งเทคโนโลยีเหล่านี้ในแต่ละรุ่นต่างก็มีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไป ซึ่งจะได้ถูกนำมารวบรวมไว้ในบทความนี้ เพื่อให้ผู้สนใจได้เข้าใจถึงหลักการ ข้อดีและข้อจำกัด รวมไปถึงความเป็นไปได้ในอนาคตของเทคโนโลยีนี้

เนื้อหา

เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมได้รับการคิดค้นและพัฒนามามากกว่า 70 ปี ตั้งแต่ ค.ศ. 1950 มาจนถึงปัจจุบันนี้ ซึ่งจะพบว่า เทคโนโลยีนี้ถูกพัฒนามาตั้งแต่รุ่นที่ 1 จนถึงรุ่นที่ 3 (ภาพที่ 1) โดยในแต่ละรุ่นจะได้รับการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงในส่วนของหลักการวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมที่มีขนาดยาวมากยิ่งขึ้น และเพิ่มปริมาณตัวอย่างตรวจให้สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างตรวจในครั้งเดียว (ตารางที่ 1) [2] [3] [6] [7]

1. เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 1 หรือ First generation sequencing นั้นมีจุดเริ่มต้นภายหลัง Watson และ Crick ได้ค้นพบรูปทรงสามมิติของดีเอ็นเอในช่วงปีทศวรรษที่ 1950 แต่อย่างไรก็ตามในช่วงแรกเริ่มของการศึกษาหาลำดับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น กลับเป็นการศึกษาหาลำดับพันธุกรรมจากอาร์เอ็นเอของไวรัสในแบคทีเรีย (Bacteriophage) โดยการใช้เอนไซม์ RNase เพื่อตัดสายลำดับพันธุกรรมให้สั้นลงก่อนจะทำการศึกษา จนกระทั่งราวปี ค.ศ. 1965 Robert Holley และคณะวิจัยสามารถทำการศึกษาและสร้างลำดับพันธุกรรมของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สมบูรณ์ได้เป็นครั้งแรก [1]



ภาพที่ 1 วิวัฒนาการของเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรม

1.1 การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีของแซงเกอร์ (Sanger sequencing)

ช่วงทศวรรษที่ 1970 นักชีวเคมีชาวอังกฤษ นามว่า Frederick Sanger ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับขั้นตอนการหาลำดับพันธุกรรมในช่วงเดียวกันกับที่ Robert Holley และคณะวิจัยได้ทำการศึกษาถึงลำดับพันธุกรรมของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เริ่มจากการนำสายคู่ของดีเอ็นเอมาทำการคลายเกลียว ให้ได้สายเดี่ยว ก่อนจะทำการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยนิวคลีโอไทด์เบสคู่สม (deoxynucleotide; dNTPs) ร่วมกับเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น DNA polymerase, DNA helicase, DNA topoisomerase และ DNA gyrase โดยจะอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมที่สนใจร่วมกับการใช้นิวคลีโอไทด์เบสชนิดพิเศษ (deoxydinucleotide; didNTPs หรือ ddNTPs) ที่ออกแบบมาเพื่อหยุดการยืดขยายของสายพันธุกรรม (Elongation) เมื่อมีการจำลองเพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่สนใจ เรียกเทคนิคนี้ว่า Chain Termination ก่อนจะนำไปแยกขนาดของสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis ขนาดที่แตกต่างกันของสารพันธุกรรม ทำให้ได้สายดีเอ็นเอเป็นสายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 100 นิวคลีโอไทด์เบส ซึ่งจะถูกตรวจจับและแสดงผลออกมาเป็นรูปแบบของคลื่นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์

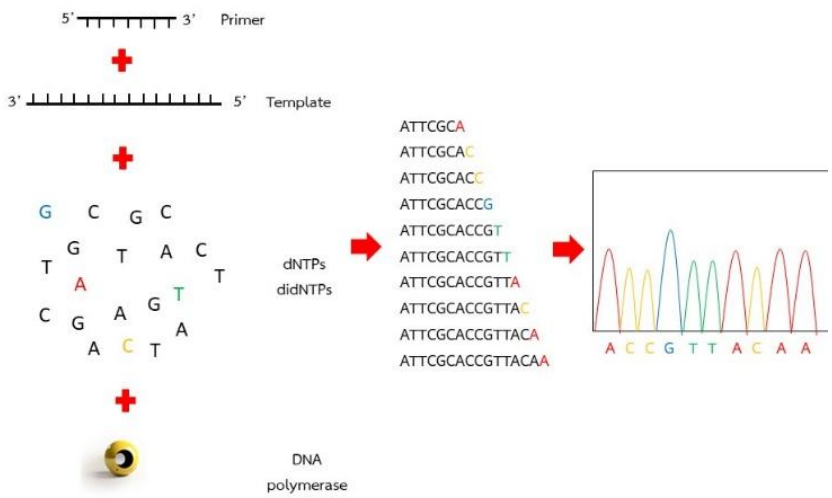
(Fluorescent peak) ที่มีสีแตกต่างกัน ก่อนจะนำมาจัดเรียงและแปลผลออกมาเป็นลำดับพันธุกรรม (ภาพที่ 2) [6] [8] [9]

ต่อมาราวปี ค.ศ. 1987 ได้มีการผลิตเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมอัตโนมัติเป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกา คือ เครื่อง Applied Biosystems ABI 370 ซึ่งอาศัยการติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์บน didNTPs และการทำ Capillary electrophoresis เพื่อหาลำดับพันธุกรรมด้วยวิธี Sanger sequencing ซึ่งสามารถเพิ่มความเร็วและเพิ่มความถูกต้องของผลที่ได้ในการจรวจวิเคราะห์ ต่อมาเทคโนโลยีนี้ได้ถูกนำไปใช้เป็นต้นแบบของการพัฒนาความสามารถของเครื่องวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมอัตโนมัติ โดยปรับปรุงเพื่อเพิ่มศักยภาพให้สามารถหาลำดับพันธุกรรมได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียว (High - throughput) และยังเพิ่มความสามารถในการอ่านลำดับพันธุกรรมที่มีขนาดความยาวมากขึ้นอีกด้วย (Long reads) [10] [11]

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นต่าง ๆ

	เทคโนโลยี	หลักการ	Throughput	ความยาวของสายพันธุกรรม (คู่เบส)
First Generation	Sanger	Chain-termination ร่วมกับ Gel electrophoresis	ต่ำ	700-900 [7]
	Pyrosequencing	ตรวจหาไพโรฟอสเฟตในขณะสังเคราะห์สารพันธุกรรม	สูง	400-1,000 [6]
Second Generation	Ion torrent	ตรวจหาไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในขณะสังเคราะห์สารพันธุกรรม	สูง	200-400 [6]
	Illumina	Bridge amplification	สูง	36-300 [6]
	SOLiD	Oligonucleotide Ligation	สูง	75 [6]

	เทคโนโลยี	หลักการ	Throughput	ความยาวของสายพันธุกรรม (คู่เบส)
Third Generation	PacBio	Single-molecule real-time (SMRT) ใช้ zero-mode wavelength (ZMW) เป็นโครงสร้างระดับนาโนที่สามารถตรวจวัดระดับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ติดฉลากไว้บนสารพันธุกรรม	กลาง	10,000-25,000 [6]
	Oxford Nanopore	Single-molecule real-time (SMRT) ใช้ solid-state nanopore และ biological nanopore แทน ZMW	กลาง	10,000-30,000 [6]



ภาพที่ 2 กระบวนการหาลำดับพันธุกรรม โดยเทคโนโลยี Sanger sequencing

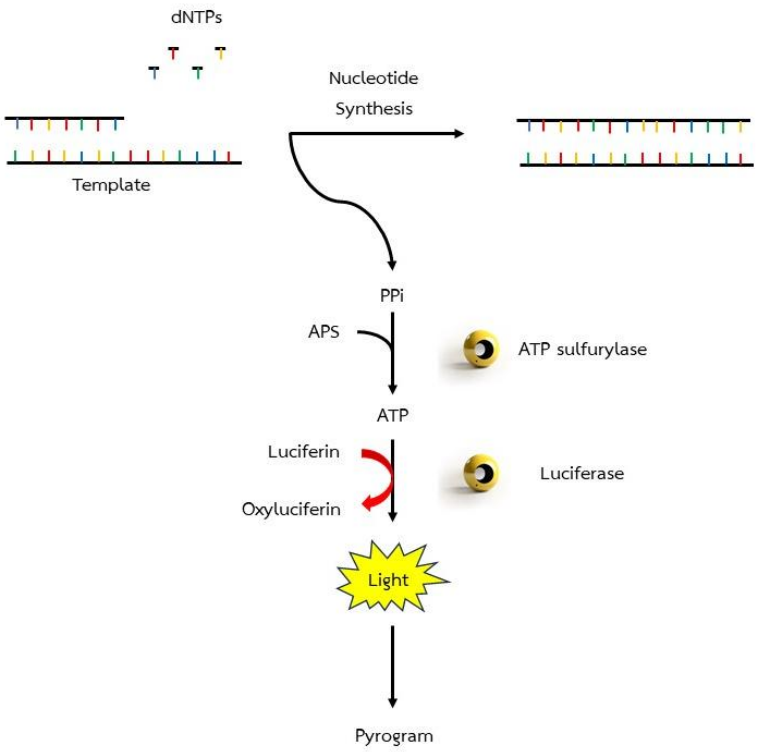
1.2 การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีไพโรซีเควนซิ่ง (Pyrosequencing)

ถึงแม้ว่า Sanger sequencing จะได้รับการพิจารณาให้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการหาลำดับพันธุกรรมในสมัยนั้น อย่างไรก็ตาม Sanger sequencing ก็ยังคงมีข้อจำกัดในหลาย ๆ ประเด็น เช่น ต้องการขั้นตอนการทำ Gel electrophoresis, การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ทำได้ยาก, ราคาแพง, ความผิดพลาดที่เกิดในขั้นตอน sequencing, มีความไวไม่มากพอที่จะตรวจจับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในหน่วยพันธุกรรม เป็นต้น [11] จากข้อจำกัดดังกล่าว Pyrosequencing จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นมา โดยอาศัยหลักการ การสังเคราะห์และตรวจหาไพโรฟอสเฟต (PPi) ในขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีการใช้เอนไซม์เข้ามาช่วยในการตรวจหาลำดับพันธุกรรม เช่น DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase และ apyrase นอกจากนี้ยังต้องมีการใช้สารตั้งต้น หรือ Substrate อย่าง adenosine 5' phosphosulfate (APS) และ luciferin ร่วมด้วย ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำ Pyrosequencing จะมีการตรวจวัดระดับของแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตามลำดับและจะมีการวิเคราะห์ พร้อมทั้งแสดงผลออกมาเป็น Pyrogram (ภาพที่ 3) [12]

1.3 ข้อดีและข้อกำจัด

เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 1 จัดเป็นเทคโนโลยีที่มีความสำคัญ ซึ่งเปรียบเสมือนเป็นหลักเริ่มต้นให้มีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมในรุ่นต่อ ๆ มา ทำให้เกิดการค้นพบใหม่ ๆ ในแวดวงชีววิทยา ชีววิทยาทางการแพทย์ รวมไปถึงทำให้เกิดความเข้าใจใหม่ ๆ ในระดับโมเลกุล ชีววิทยาโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต

อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีในรุ่นนี้นั้น ยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก ไม่ว่าจะเป็นความถูกต้องของลำดับพันธุกรรมที่ยังพบการเพิ่มเข้ามาหรือหายไป (Insertion, Deletion) ของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ตั้งแต่ 2 ลำดับเบส ไปจนถึงร้อยเบส, ความสามารถในการอ่านลำดับเบสได้เพียงแค่เป็นสายสั้น ๆ เท่านั้น รวมไปถึงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่ค่อนข้างซับซ้อน



ภาพที่ 3 กระบวนการหาลำดับพันธุกรรม โดยเทคโนโลยี Pyrosequencing

2. เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 2 หรือ Second generation sequencing ในช่วงแรก ๆ ของปี ค.ศ. 2005 ได้มีการคิดค้นพัฒนาเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติโดยอาศัยหลักการของ Pyrosequencing คือ Roche 454 sequencing ซึ่งสามารถทำ *de novo* sequencing ได้ โดยไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลของลำดับพันธุกรรมอยู่ก่อนหน้า ในขณะที่ Sanger sequencing ไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ได้อีกหลากหลายไม่ว่าจะเป็น Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่จะพบในหน่วยพันธุกรรม, การช่วยพิสูจน์ชนิดและจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส (identification and typing) รวมไปถึงสามารถทำ Whole genome sequencing ได้อีกด้วย [13]

2.1 การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีไอออน ทอร์เรนท์ (Ion torrent sequencing)

ต่อมาภายหลังได้มีการพัฒนาปรับปรุงการหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีไอออน ทอร์เรนท์ (Ion torrent) ที่อาศัยการตรวจหาไฮโดรเจนไอออน (H^+) ที่ปล่อยออกมาในระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและตรวจวัดด้วยเซนเซอร์ pH ของตัวเครื่องวิเคราะห์ ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และยังสามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีราคาถูกกว่าอีกด้วย

2.2 การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีของอิลลูมิน่า (Illumina sequencing)

การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีของอิลลูมิน่า (Illumina sequencing) นั้นจะอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า Bridge amplification เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบน flow cell โดยจะมีการเชื่อมต่อกันของสารพันธุกรรมที่สนใจกับ flow cell ที่มีสารพันธุกรรมคู่สมที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับสารพันธุกรรมที่สนใจ (Primer) เกิดเป็นสะพาน (Bridge) หลังจากนั้นจะมีการย่อยให้กลับเป็นสายสั้น ๆ ก่อนจะทำการตรวจหาสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ติดฉลากไว้บนสารพันธุกรรม และแสดงผลออกมาเป็นกลุ่มก้อนของสารพันธุกรรมที่ติดสารเรืองแสงแบบจำเพาะตามขนาดและความเข้มของสัญญาณสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งสามารถตรวจจับสาย DNA เป็นสายขนาดยาวมากขึ้น โดยจะมีขนาดประมาณ 1,000 – 1,000,000 นิวคลีโอไทด์เบสของสารพันธุกรรมทั้งหมด (ภาพที่ 4) [8] [9] [14] [15]

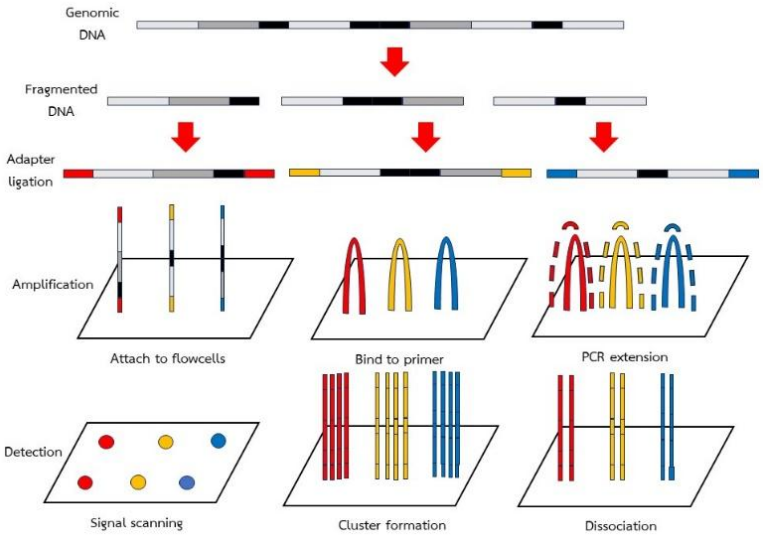
2.3 การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยี Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection (SOLiD) จัดเป็น Second generation sequencing เช่นเดียวกัน แต่จะอาศัยเอนไซม์ DNA ligase ในการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา ligation และมีการใช้โพรบ (Probe) ที่มีการติดฉลากสารเรืองแสงร่วมด้วย ก่อนจะทำการตรวจหาสารเรืองแสงที่ติดอยู่กับโพรบ เทคโนโลยีนี้แตกต่างจากเทคโนโลยีอื่น คือ มีการใช้เอนไซม์ DNA ligase แทน DNA polymerase [16]

2.4 ข้อดีและข้อกำจัด

เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 2 นั้น ได้รับการพัฒนามาจากรุ่นที่ 1 ทำให้สามารถดำเนินการในขั้นตอนต่าง ๆ ได้เร็วขึ้น อีกทั้งยังสามารถนำประยุกต์ในงานที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น เช่น การหาลำดับพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต (whole-genome

sequencing), การหาลำดับพันธุกรรมเฉพาะส่วนที่สนใจ (targeted sequencing) รวมไปถึงการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ (Transcription) แบบองค์รวม (transcriptomic analysis) เป็นต้น

สำหรับเทคโนโลยีในรุ่นนี้จะมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เช่น Ion torrent จะสามารถพบการแทนที่เบสได้ (Substitution) บ้าง เป็นต้น และความสามารถในการอ่านลำดับเบสยังคงอ่านได้เพียงสายสั้น ๆ เท่านั้น



ภาพที่ 4 กระบวนการหาลำดับพันธุกรรม โดยเทคโนโลยี Illumina sequencing

3. เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 3 หรือ Third generation sequencing

เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมที่ได้รับการพัฒนาล่าสุด ซึ่งสามารถก้าวข้ามข้อจำกัดต่าง ๆ ของรุ่นก่อน ๆ ซึ่งเทคโนโลยีในรุ่นนี้สามารถที่จะทำการหาลำดับพันธุกรรมที่มีขนาดยาวกว่ารุ่นก่อน ๆ (Long read sequencing) โดยมีความยาวของลำดับพันธุกรรมถึง 10,000 นิวคลีโอไทด์เบสขึ้นไป อีกทั้งยังสามารถติดตามผลได้แบบ real-time และไม่ต้องการขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม (Polymerase chain reaction; PCR) อย่างในรุ่นที่ 2 อีกด้วย

3.1 เทคโนโลยีของแพคไบโอ (PacBio sequencing) เป็นเทคโนโลยีที่มีการใช้ zero-mode wavelength (ZMW) เป็นโครงสร้างระดับนาโนที่สามารถตรวจวัดระดับ

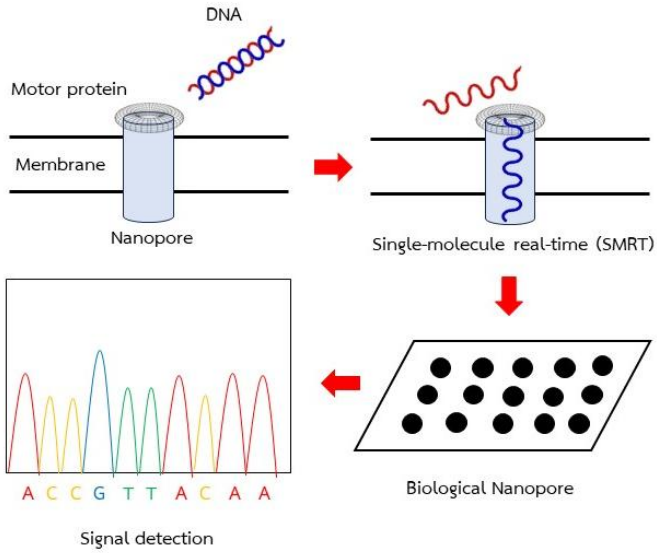
สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ติดฉลากไว้บนนิวคลีโอไทด์เบส แต่จะเป็นการวัดในขณะช่วงเวลานั้น ๆ ทันที (real-time) และสามารถหาลำดับพันธุกรรมที่ยาวกว่าในเทคโนโลยีรุ่นก่อน ๆ โดยจะมีการวัดระดับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแต่ละโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์เบสแยกเป็นโมเลกุลเดี่ยวของสายพันธุกรรมที่จำลองขึ้นซึ่งเข้าคู่กับสายพันธุกรรมที่สนใจ เรียกเทคโนโลยีนี้ว่า Single-molecule real-time (SMRT) [8] [14] [17]

3.2 การหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีของอ็อกฟอร์ดนาโนพอร์เทคโนโลยี (Oxford Nanopore Technology: ONT sequencing) เทคโนโลยีนี้จะอาศัยหลักการ Single-molecule real-time (SMRT) คล้ายกับ PacBio sequencing คืออาศัยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปของโมเลกุลขนาดเล็กที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว (ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ, อื่น ๆ) ที่เคลื่อนที่ผ่านรูขนาดเล็กในระดับนาโนแบบ real-time แต่จะมีการใช้ solid-state nanopore และ biological nanopore แทน ZMW ของ PacBio sequencing (ภาพที่ 5) [2] [3] [18] [19]

โดยจะพบว่า solid-state nanopore จะมีความเสถียรหรือทนทานกว่าเมื่อเทียบกับ biological nanopore อีกทั้งยังสามารถควบคุมหรือปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของพื้นผิวของตัว nanopore ได้ง่าย สำหรับ solid-state nanopore จะพบว่านิยมใช้ซิลิคอนไนไตรด์ (Silicon nitride: Si_3N_4) และซิลิคอนไดออกไซด์ (Silicon dioxide: SiO_2) เป็นวัสดุสำหรับทำพื้นผิวของ nanopore [20]

สำหรับ biological nanopore ส่วนมากจะสร้างจากโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากธรรมชาติ หรืออาจจะเป็น nanopore สังเคราะห์ที่สร้างโดยอาศัยพันธุวิศวกรรม แต่จะพบว่า nanopore ชนิดนี้ มักจะไม่ค่อยทนทาน ใช้งานได้จำกัดจำนวนไม่กี่ครั้ง และอาจจะต้องการสิ่งแวดล้อมที่จำเพาะเพื่อใช้ช่วยยืดอายุการใช้งาน ตัวอย่าง biological nanopore เช่น alpha-hemolysin pore protein, *Mycobacterium smegmatis* porin A (Msp A) จาก *Mycobacterium smegmatis* เป็นต้น [3]

สำหรับขั้นตอนของการหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีของอ็อกฟอร์ดนาโนพอร์เทคโนโลยีจะประกอบไปด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ 1. การเตรียมฐานข้อมูล (Library preparation), 2. การหาลำดับพันธุกรรม (Sequencing Process) และ 3. การแปลงผลให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เบส (Basecaller) [3]



ภาพที่ 5 กระบวนการหาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยี Oxford nanopore sequencing

ตัวอย่างการนำเอาเทคโนโลยี nanopore sequencing มาใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง เช่น การตรวจหาดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) ไม่ว่าจะเป็น DNA, RNA, เอนไซม์, โปรตีน รวมไปถึงตัวเซลล์มะเร็งเอง โดยอาศัย nanopore sequencing ซึ่งมีความไวสูงในระดับอัลตร้า จึงสามารถตรวจหาดัชนีชี้วัดทางชีวภาพเหล่านี้ได้ แม้จะมีเพียงน้อยนิด ยิ่งไปกว่านั้นเทคโนโลยีนี้ก็สามารถช่วยในการพยากรณ์โรคได้ด้วย หากนำเอาไปใช้ในการตรวจหาดัชนีชี้วัดทางชีวภาพในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง เป็นต้น [21]

สำหรับการตรวจหาจุลชีพอย่างแบคทีเรีย และไวรัสนั้น เทคโนโลยีนี้ก็นับว่ามีประโยชน์อย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้, ลดเวลาที่ใช้ในการวินิจฉัย ทำให้ทราบผลในเวลาไม่กี่ชั่วโมงเมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงที่ใช้เวลาเป็นวัน, สามารถตรวจหาการดื้อยาซึ่งสามารถตรวจพบได้ในลำดับพันธุกรรม ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อไม่สามารถบอกได้ นำไปสู่การรักษาและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้อีกด้วย [22]

ในส่วนของการนำเอาเทคโนโลยี gene sequencing อย่าง Next generation sequencing มาใช้ประโยชน์ในทางระบาดวิทยา เช่น การศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ

Neisseria gonorrhoeae ในประเทศไทย ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยอาศัยการใช้เทคโนโลยีของ Next generation sequencing ทำให้สามารถตรวจได้ปริมาณมากในคราวเดียว (High throughput Multi-locus sequence typing: HiMLST) และสามารถลดค่าใช้จ่ายลงเหลือเพียง 1 ใน 10 ของวิธีดั้งเดิม ซึ่งผลที่ได้ทำให้ทราบว่า มีการระบาดของเชื้อดังกล่าว เป็น “Sexual network” ของกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อร่วมกัน [23]

3.3 ข้อดีและข้อจำกัด

สำหรับเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 3 นั้น สามารถนำประยุกต์ในงานที่หลากหลายเช่นเดียวกับรุ่นที่ 2 มีความสามารถในการอ่านลำดับเบสที่ยาวมากยิ่งขึ้นกว่าใน 2 รุ่นก่อน อีกทั้งยังสามารถทำการตรวจได้ปริมาณมากในคราวเดียว (High throughput) ทำให้ช่วยประหยัดเวลาในการดำเนินการ และยังสามารถลดขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ได้อีกด้วย

แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีนี้ยังคงมีต้นทุนที่สูงอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับรุ่นก่อน ๆ กล่าวคือ ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีมูลค่าค่อนข้างแพง และเมื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับพันธุกรรมที่ได้ อาจจะด้อยกว่า หากทำการหาลำดับพันธุกรรมแบบ long read เป็นต้น [24]

4. เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 4 หรือ Fourth generation sequencing เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมที่ได้รับการพัฒนาให้สามารถทำการหาลำดับพันธุกรรมในสิ่งส่งตรวจได้โดยตรง (*in situ* sequencing; ISS) โดยลำดับพันธุกรรมที่เป็นเป้าหมายนั้นจะเป็นสารพันธุกรรมทั้งหมดที่สามารถตรวจหาในตัวอย่างตรวจนั้น ๆ ทำให้ทราบถึงภาพรวมในระดับจุลภาค หรือระดับที่เล็กลงไปกว่าเซลล์ (molecular/subcellular mapping) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการรักษาและพยากรณ์โรคได้ [25] [26]

สำหรับวิธีการที่นำมาใช้ในเทคโนโลยีนี้ อย่าง metagenomic sequencing นั้น จัดเป็นหนึ่งในวิธีการหาสารพันธุกรรมทั้งหมดที่สามารถตรวจหาในตัวอย่างตรวจนั้น ๆ ซึ่งจะอาศัย 2 เทคนิคหลัก ๆ ในการตรวจ คือ

1. Whole genome shotgun (WGS) metagenomic sequencing ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อการหาลำดับของสารพันธุกรรมทั้งหมดที่สามารถตรวจพบในตัวอย่างตรวจนั้น ๆ ทำให้สามารถนำเอาข้อมูลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ใน

การศึกษาถึงการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ หรือกลุ่มเซลล์ที่อยู่ในตัวอย่างตรวจนั้น เช่น ใช้ศึกษาจุลชีพทั้งหมดในลำไส้ (Gut microbiome) ซึ่งในหลาย ๆ งานวิจัยพบว่าจุลชีพในลำไส้เหล่านี้มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อ (Infectious and non - infectious disease) ทำให้สามารถนำเอาข้อมูลที่ได้มาปรับใช้เพื่อการรักษาและการพยากรณ์โรคได้ [27] [28] [29]

2. Marker gene study หรือการศึกษาหน่วยพันธุกรรมที่ใช้ในการบ่งชี้/ระบุความแตกต่างลักษณะปรากฏ (Phenotype) ได้ ซึ่งมักจะศึกษาเฉพาะในส่วนของหน่วยพันธุกรรม หรือยีนที่สนใจเท่านั้น แต่จะทำการศึกษายีนเหล่านี้ในกลุ่มจุลินทรีย์ หรือกลุ่มเซลล์ที่อยู่ในตัวอย่างตรวจนั้นทั้งหมด ซึ่งยีนที่จำเพาะที่สำคัญในงานจำแนกชนิดเชื้อจุลชีพนั้นประกอบไปด้วยหลายยีน เช่น 16S rRNA ยีน ที่พบในเชื้อแบคทีเรีย, ยีนที่จำเพาะกับบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ที่จะใช้ในการศึกษาเชื้อรา, 18S rRNA ยีน ที่พบในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต เช่น มนุษย์และสัตว์ต่าง ๆ เป็นต้น [27]

ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมจะมีส่วนช่วยในงานจุลชีววิทยาและชีวการแพทย์ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง, ใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียและจุลชีพอื่น ๆ ที่เจริญเติบโตช้าหรือต้องการสภาวะพิเศษในการเพาะเลี้ยง, ใช้ในการรวบรวมข้อมูลเชิงระบาดวิทยาเพื่อการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยา รวมไปถึงการใช้ในการจัดรวมข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ [3] [30] แต่จะพบว่าเทคโนโลยีนี้ยังคงมีข้อจำกัด เช่น การพยากรณ์โรค ในกรณีที่มีการพบลำดับพันธุกรรมของเชื้อ อาจจะบอกไม่ได้แน่ชัดว่าเป็นซากเชื้อ หรือเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค, ไม่สามารถตรวจหาแบคทีเรียในสิ่งส่งตรวจที่พบเชื้อมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป, รวมไปถึงราคาต้นทุนของการหาลำดับพันธุกรรมยังคงมีมูลค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่าง ๆ จึงอาจจะไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในงานห้องปฏิบัติการ routine [31]

สรุป

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 3 หรือ Third generation sequencing นั้น ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เช่น เทคโนโลยี Oxford Nanopore Technology: ONT sequencing เนื่องด้วย ความสามารถในการตรวจได้ปริมาณมากในคราวเดียว อีกทั้ง

ยังได้รับการพัฒนาปรับปรุงฐานข้อมูลอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ผลที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังสามารถดำเนินการได้ในราคาต้นทุนที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งเหมาะกับงานวิจัยและพัฒนาทางด้านพันธุศาสตร์และการนำไปประยุกต์ใช้กับเชื้อจุลชีพต่าง ๆ เทคโนโลยีเหล่านี้น่าจะทำให้วงการจุลชีววิทยาและชีวการแพทย์ได้รับองค์ความรู้ใหม่ ๆ และเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง และในอนาคตอันใกล้นี้ เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมรุ่นที่ 4 หรือ Fourth generation sequencing นั้น เช่น metagenomic sequencing จะถูกนำมาใช้เพื่อช่วยขยายองค์ความรู้ในวงการจุลชีววิทยาและชีวการแพทย์ ซึ่งจะนำไปสู่ยุคของ Precision medicine หรือยุคที่การแพทย์มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ในแง่ของการวินิจฉัย การป้องกันและการรักษาโรคที่ออกแบบมาเฉพาะบุคคล (Personalized medicine) โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรม (genetics) ที่ได้มาจากการใช้เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมของมนุษย์ (DNA sequencing) ที่ลงรายละเอียดลึกระดับ DNA หรือการหาลำดับพันธุกรรมของจุลชีพที่ปรากฏในร่างกายของมนุษย์ (Microbiome metagenomics)

เอกสารอ้างอิง

1. Pray L. Discovery of DNA structure and function: Watson and crick. Nat Educ [Internet]. 2008 [cited 2025 Decl 23];1(1):100. Available from: https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/marcostulioliveira/discovery-of-dna-double-helix_-watson-and-crick-_-learn-science-at-scitable.pdf
2. Hilt EE, Ferrieri P. Next generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases. Genes (Basel). 2022 Aug 31;13(9):1566. doi:10.3390/genes13091566
3. Lin B, Hui J, Mao H. Nanopore technology and its applications in gene sequencing. Biosensors. 2021 Jun 30;11(7):214. doi:10.3390/bios11070214
4. Sivaradjy M, Rajkumari N. Role of gene sequencing in the diagnosis, tracking and prevention of parasitic diseases–A brief review. J Acad Clin Microbiol. 2022 Nov;24(Suppl 1):S32-5. doi:10.4103/jacm.jacm_15_22

5. Bhar A. The application of next generation sequencing technology in medical diagnostics: a perspective. Proc Indian Natl Sci Acad. 2022 Aug;88: 592–600. doi:10.1007/s43538-022-00098-x
6. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. Biology. 2023 Jul;12(7):997. doi:10.3390/biology12070997
7. Yu X, Jiang W, Shi Y, Ye H, Lin J. Applications of sequencing technology in clinical microbial infection. J Cell Mol Med. 2019;23(11):7143-50. doi:10.1111/jcmm.14624
8. Church DL. Principles of Capillary-Based Sequencing for Clinical Microbiologists. Clin Microbiol Newsl. 2013 Jan 15;35(2):11-8. doi:10.1016/j. clinmicnews.2012.12.003.
9. Mehdi K, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of sequencing technologies: from first to next generation. Electromagn Biol Med (Aligarh). 2017 Mar;9(395):1-8. doi:10.4172/0974-8369.1000395
10. Tipu HN, Shabbir A. Evolution of DNA sequencing. J Coll Physicians Surg Pak. 2015 Mar;25(3):210-5.
11. Barba M, Czosnek H, Hadidi A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses. 2014 Jan 6;6(1):106-36. doi:10.3390/v6010106.
12. Hutchison III CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Nucleic Acids Res. 2007;35(18):6227-37. doi:10.1093/nar/gkm688.
13. Rybicka M, Stalke P, Bielawski KP. Current molecular methods for the detection of hepatitis B virus quasispecies. Rev Med Virol. 2016 Sep;26(5):369-81. doi:10.1002/ rmv.1897
14. Fakruddin M, Chowdhury A, Hossain N, Mahajan S, Islam S. Pyrosequencing: A next generation sequencing technology. World Appl Sci J. 2013;24(12):1558-71. doi:10.5829/idosi.wasj.2013.24.12.2972

15. Buermans H PJ, Den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2014 Oct;1842(10):1932-41. doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015
16. Hackl ST, Harbig TA, Nieselt K. Technical report on best practices for hybrid and long read de novo assembly of bacterial genomes utilizing Illumina and Oxford Nanopore Technologies reads. bioRxiv. 2022 Oct;10(25):513682; doi:10.1101/2022.10.25.513682
17. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, มาริสา รักสุขสมบัติ, สุภาภรณ์ ขานโบ. เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคที่สองและสาม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2015;23(4),633-50.
18. Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2015 Oct;13(5):278-89. doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002.
19. Magi A, Semeraro R, Mingrino A, Giusti B, D'aurizio R. Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. Brief Bioinform. 2018 Nov;19(6):1256-72. doi:10.1093/bib/bbx062.
20. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nat Biotechnol. 2021 Nov;39(11):1348-65. doi:10.1038/s41587-021-01108-x
21. Chou YC, Masih Das P, Monos DS, Drndić M. Lifetime and stability of silicon nitride nanopores and nanopore arrays for ionic measurements. ACS Nano. 2020 Jun 23;14(6):6715-28. doi:10.1021/acsnano.9b09964.
22. Bhatti H, Lu Z, Liu Q. Nanopore detection of cancer biomarkers: A challenge to science. Technol Cancer Res Treat. 2022 Jan-Dec;21:15330338221076669. doi:10.1177/15330338221076669.
23. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์. การศึกษาอณูพันธุศาสตร์และระบาดวิทยาของแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS). ใน: การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18. พันธุศาสตร์ก้าวหน้าสู่อาเซียน (Genetics towards ASEAN); 17-19 ก.ค. 2556; กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย; Thai J Genet; 2013;S(1):46-51. doi:10.14456/tjg.2013.105

24. Zhu X, Yan S, Yuan F, Wan S. The applications of nanopore sequencing technology in pathogenic microorganism detection. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2020 Dec 31;2020:6675206. doi:10.1155/2020/6675206.
25. Mignardi M, Nilsson M. Fourth-generation sequencing in the cell and the clinic. Genome Med. 2014 Apr 28;6(4):31. doi:10.1186/gm548
26. Ke R, Mignardi M, Hauling T, Nilsson M. Fourth generation of next-generation sequencing technologies: Promise and consequences. Hum Mutat. 2016 Dec;37(12):1363-7. doi:10.1002/humu.23051
27. Pérez-Cobas AE, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. Microb Genomics. 2020 Aug;6(8):e000409. doi:10.1099/mgen.0.000409.
28. Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LM. The interplay between the gut microbiome and the immune system in the context of infectious diseases throughout life and the role of nutrition in optimizing treatment strategies. Nutrients. 2021 Mar 9;13(3):886. doi:10.3390/nu13030886.
29. Hosseinkhani F, Heinken A, Thiele I, Lindenburg PW, Harms AC, Hankemeier T. The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases. Gut Microbes. 2021 Jan-Dec;13(1):1882927. doi:10.1080/19490976.2021.1882927.
30. Nakayama SI, Tribuddharat C, Prombhul S, Shimuta K, Srifuengfung S, Unemo M, et al. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae isolates in Bangkok, Thailand. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Feb;56(2):916-20. doi:10.1128/AAC.05665-11
31. Bryan G. The pros and cons of NGS-based microbe detection [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 23]. Available from: https://www.clinicallab.com/trends/clinical-microbiology/the-pros-and-cons-of-ngs-based-microbe-detection-26167