

พิมพ์ภา รองกระโทก : การตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี CRISPR/CAS12a (DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING CRISPR/CAS12a TECHNOLOGY) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.ชมพูนุท วังบุญ, 51 หน้า.

คำสำคัญ: เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* / *orf2* / *orf11*/ CRISPR/CAS12a

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคติดเชื้อรุนแรง เมลิออยโดสิส การเกิดโรคนี้นั้นในคนพบว่ามีอาการแสดงได้หลายรูปแบบตั้งแต่ไม่แสดงอาการ แสดงอาการเฉพาะที่ หรือแสดงอาการรุนแรงจากการติดเชื้อในกระแสเลือดถึงขั้นสูญเสียชีวิต อาการทางคลินิกและการตรวจหาเชื่อนี้อย่างรวดเร็วในผู้ป่วยจึงมีความจำเป็นต่อการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การวินิจฉัยการติดเชื้อแบบที่เรียบง่ายแต่เดิมจะใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งต้องใช้เวลานาน นอกจากนี้ เครื่องตรวจหาเชื้ออัตโนมัติยังไม่มีการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ดังนั้นการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ที่มีความจำเพาะและความไวสูงจึงมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับการวินิจฉัยโรคนี้ได้ทันทั่วทั้ง ในปัจจุบัน การใช้เทคโนโลยีคริสเปอร์แคส (CRISPR-Cas) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ โดยอาศัยหลักการที่ไกด์อาร์เอ็นเอ (gRNA) เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายและกระตุ้นโปรตีนแคสซึ่งเป็นเอนไซม์ให้เกิดการตัดที่ตำแหน่งจำเพาะก่อน จากนั้นโปรตีนแคสยังถูกกระตุ้นให้เกิดการตัดดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* โดยใช้เทคโนโลยีคริสเปอร์แคส และใช้เฟรมเปิดในยีน T3SS-1 (*orf2* และ *orf11*) ที่อยู่ในกลุ่มของ T3SS ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* มาทำการออกแบบ gRNA ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อใช้วิธีการที่แตกต่างกัน การสกัดดีเอ็นเอด้วยการต้มและไม่ตกตะกอนดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่รวดเร็วและทำได้ง่ายที่สุด ผลการศึกษาพบว่า *orf2* และ *orf11* มีแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Cas12a เกิดขึ้น จึงสรุปได้ว่า gRNA ที่ออกแบบมีความจำเพาะและส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการตัด DNA เป้าหมายโดยเอนไซม์ Cas12a ตามมา อีกทั้งการทดสอบกับเชื้อ *Burkholderia thailandensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในระดับจีโนมเดียวกันด้วย PCR ไม่พบว่ามีแถบของ *orf2* และ *orf11* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ยีนที่เลือกมามีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความจำเพาะของ gRNA และเมื่อทำการทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่ามีการตัดของเอนไซม์ Cas12a ที่ DNA เป้าหมายเกิดขึ้นจริงโดยการเติม ssDNA-FQ reporter เพื่อดูการเรืองแสงที่เกิดขึ้นหากตำแหน่ง DNA เป้าหมายมีการเข้าจับของ gRNA และ กระตุ้นให้เกิดการตัดของเอนไซม์ Cas12a ที่เป้าหมาย และสามารถตัดอย่างไม่จำเพาะกับ ssDNA-FQ ตามมาหลังจากถูกกระตุ้น ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า สัญญาณการเรืองแสงเพิ่มขึ้นในตัวอย่าง *B. pseudomallei* strain K96423 และ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากตัวอย่างทาง

คลินิก แต่ไม่พบในตัวอย่างของ *B. thailandensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในระดับจีโนมเดียวกัน จึงสามารถสรุปได้ว่า gRNA ที่ทำการออกแบบใหม่จากการศึกษานี้ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีตรวจแบบเร็วและมีความจำเพาะได้ อีกทั้งจะช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยให้การตรวจพบการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางคลินิกของโรงพยาบาลชุมชนขนาดเล็กมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ของ gRNA ทั้ง *orf2* และ *orf11* ต้องทำการศึกษาต่อไป

สาขาวิชาปริคลินิก

ปีการศึกษา 2566

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

PIMPAKA RONGKRATOK : DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING CRISPR/CAS12a TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR : CHOMPUNOOT WANGBOON, Ph.D. 51 PP.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei* / *orf2* / *orf11* / CRISPR/CAS12a

Burkholderia pseudomallei is the etiologic pathogen of a severe infectious disease known as melioidosis. The disease in humans ranges from asymptomatic to focal infection and could be life-threatening by rapid fatal septicemia. Clinical presentation and rapid detection of the microorganism are necessary for early diagnosis of melioidosis. The conventional culture of the microbe is time-consuming and requires a full set of biochemical tests. Moreover, automatic machines for identification of the bacteria are not available in small microbiology laboratories. Hence, a simple and rapid detection with high specificity as well as sensitivity of the test is required for its early diagnosis. Currently, CRISPR-Cas12a technology is an attractive tool for infectious disease diagnostic applications. The detection relies on the target-activated nonspecific endonuclease activity of Cas12a after binding to a specific target DNA via programmable guide RNAs. In this study, we developed a new methodology for a rapid detection of *B. pseudomallei* using CRISPR-Cas12a technology. The specific markers of *B. pseudomallei*, *orf2* and *orf11* in T3SS-1, located on T3SS gene cluster were selected for gRNA design. The DNA of *B. pseudomallei* was extracted from the colony suspension by different methods and the boiling method without DNA precipitation gave the fastest and simplest methodology for DNA extraction. The results showed that the digestion reaction involving the gRNA specific for *orf2* and *orf11* generated DNA fragments. Therefore, this finding suggests that the newly designed gRNA was specific to the target genes leading to the digestion activity by Cas12a enzyme. In addition, the investigation in *Burkholderia thailandensis* which is classified in the same genus as *B. pseudomallei* did not show the *orf2* and *orf11* band when tested by PCR. Therefore, this finding suggests that the newly designed gRNAs were specific to the target DNA sequences leading to the digestion activity by Cas12a enzyme. Subsequently, the target-activated CRISPR/Cas12a cleavage activity was verified based

on signal amplification of ssDNA-FQ reporter. The result revealed that an increase of collateral cleavage activity of the FAM fluorophore from its quencher, leading to an increased generation of fluorescence signal, which was observed in the wild type *B. pseudomallei* strain K96243 and *B. pseudomallei* isolated from clinical sample but not in *B. thailandensis* which is classified in the same genus as *B. pseudomallei*. This concludes that the newly designed gRNAs of *orf2* and *orf11* in this study could specifically detect *B. pseudomallei*, but not other pathogens and can be used for the development of a rapid diagnostic tool for melioidosis. This could facilitate a clinical microbiological laboratory in small community hospitals to detect and interpret the infection from *B. pseudomallei* more efficiently. For the further study the sensitivity of gRNA of *orf2* and *orf11* for *B. pseudomallei* detection should be determined.

School of Preclinical Sciences
Academic Year 2023

Student's Signature Pimpraka Panjiraratok
Advisor's Signature Chompunat Wangboon
Coadvisor's Signature Jif Jia