

การสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรเรย์บนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว  
เพื่อใช้ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม

Synthesis of PNA Arrays on Modified Filter Papers  
for DNA Sequence Determination



โดย

นายเกรียงศักดิ์ ฝ้ายเครือ

นางสาวกชกร ศุภบวรสถิตย์

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรย์บนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิว เพื่อใช้ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม

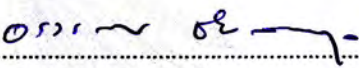
โดย นายเกรียงศักดิ์ ฝ่ายเครือ และ นางสาวกชกร ศุภวรรณสถิตย์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

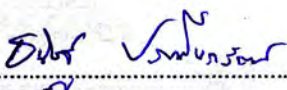
คณะกรรมการการสอบโครงการงาน

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล)

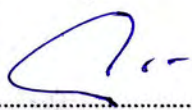
..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ธนิชู ปราณีนรรัตน์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 22 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรีย์บนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว เพื่อใช้ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม

ชื่อนิติในโครงการ 1. นายเกรียงศักดิ์ ฝ่ายเครือ เลขประจำตัว 5433064423  
2. นางสาวกชกร ศุภบรรสถิตย์ เลขประจำตัว 5433051223

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

### บทคัดย่อ

กระดาษกรองเป็นวัสดุที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้เป็นวัสดุของแข็งสำหรับการตรึงสารชีวโมเลกุลเพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดเชิงชีวภาพ เนื่องจากกระดาษกรองเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย, สามารถเข้ากันได้กับระบบชีวภาพ และสามารถดัดแปรพื้นผิวเป็นหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ได้หลากหลาย ในงานวิจัยนี้ นำโพลีไดนิทโรฟีเอ็นเอ ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (เอซีพีซีพีเอ็นเอ, ในงานนี้จะเรียกเป็นพีเอ็นเอ) ตรึงบนพื้นผิวเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นโพรบในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ ชั้นแรกเป็นสังเคราะห์ไดแอลดีไฮด์เซลลูโลส หรือ ดีเอซี โดยการดัดแปรพื้นผิวกระดาษกรองโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วนด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอดेटผสมลิเทียมคลอไรด์ และพิสูจน์เอกลักษณ์หมู่แอลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยใช้การทดสอบที่ทำให้เกิดสีโดย 2,4-dinitrophenylhydrazine จากนั้นเป็นการตรึงพีเอ็นเอโพรบลงบนกระดาษกรองที่ผ่านดัดแปรพื้นผิวด้วยปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันโดยมีโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์อยู่ด้วย การทดสอบโดยใช้พีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซินยืนยันว่าสามารถตรึงพีเอ็นเอบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวได้จริง ลำดับถัดมาเป็นการตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยใช้พีเอ็นเอไม่ติดฉลากกับดีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซิน พบว่าสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ภายใต้แสงยูวีได้ที่มีปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างเพียง 0.35 pmol แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของวิธีการตรึงพีเอ็นเอบนกระดาษดัดแปรพื้นผิวเป็นหมู่แอลดีไฮด์นี้ในการสร้างเป็นพีเอ็นเอแอรีย์ นอกจากนี้ ในงานวิจัยยังได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาสร้างสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยเอนไซม์ เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดและเลี่ยงการใช้วิธีติดฉลากฟลูออเรสซินที่มีราคาแพงบนสายดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยเมื่อเกิดการจับยี่ดระหว่างพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอติดฉลากไปโอติน แล้วเติมเอนไซม์ horseradish peroxidase ที่เชื่อมต่อกับสเตรปตาวิดิน ตามด้วย o-phenylenediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> จะได้ผลิตภัณฑ์สีเหลืองซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่ประกอบด้วยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาสร้างสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยเอนไซม์มีขีดจำกัดต่ำพอที่จะตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำกว่าระดับ picomole ได้ ทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงที่ดีโดยสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ติดฉลากไปโอติน 2 สายที่มีลำดับเบสต่างกันเพียง 1 ตำแหน่งได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ : โพลีไดนิทโรฟีเอ็นเอ, พีเอ็นเอแอรีย์, ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์, ปฏิกิริยาสร้างสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยอาศัยเอนไซม์, อุปกรณ์วิเคราะห์โดยใช้กระดาษ

Title Synthesis of PNA Arrays on Modified Filter Papers for DNA Sequence Determination

Student Names 1. Mr. Kriangsak Faikhruea ID 5433064423

2. Ms. Kotchakorn Supabowornsathit ID 5433051223

Advisor Professor Dr. Tirayut Vilaivan

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,  
Academic year 2014

### Abstract

Cellulose-based filter paper is an attractive material for immobilization of biomolecular probes for sensing applications due to its general availability, biocompatibility, and possibilities for a wide range of surface functionalizations. In this work, pyrrolidinyl peptide nucleic acid with a rigid D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA, will be simply referred to as PNA) is immobilized on to a cellulose surface to be used as a probe for DNA sequence determination. First, a dialdehyde-modified cellulose (DAC) was prepared by partial oxidation of cellulose paper with sodium periodate in the presence of lithium chloride. The presence of the aldehyde group was revealed by a color test with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The PNA probe was next immobilized by reductive alkylation in the presence of sodium cyanoborohydride. By employing a fluorescein-labeled acpcPNA probe, successful immobilization of the PNA was demonstrated. Next, the ability of the immobilized PNA probe to capture the DNA target from the sample was confirmed using unlabeled PNA probe and fluorescein-labeled DNA. As low as 0.35 pmol of fluorescein-labeled DNA could be detected under UV light, suggesting the potential of this aldehyde-based immobilization strategy in fabrication of PNA arrays. Furthermore, an enzyme-based colorimetric detection was also developed in order to improve the sensitivity and avoid the expensive fluorescence labeling of the DNA target. Upon hybridization between the immobilized PNA probe and biotinylated DNA target followed by treatment with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, a colorimetric reaction was achieved by treatment with *o*-phenylenediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which allowed visual detection of the yellow product formed. The cellulose-based DNA sensor with immobilized PNA probe and enzyme-based colorimetric detection is sensitive enough to detect sub-picomole amounts of synthetic DNA targets with sufficient specificity to discriminate between complementary and single base mismatch DNA targets.

Keywords: Pyrrolidinyl PNA, PNA array, DNA sensor, Enzyme-Based Colorimetric Detection, Paper-based Analytical Device

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง การสังเคราะห์พีเอ็นเอแอเรียบนกระดาศกรอง ดัดแปรพันผิว เพื่อใช้ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคามอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิด ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียน รายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อรรธรณ ชัยลภากุล และอาจารย์ ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรารัตน์ ที่ให้เกียรติสละเวลามาเป็น กรรมการประเมินโครงการนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่างๆ ขอขอบคุณ คุณโชติมา วิไลวัลย์ และนางสาวมาลินี ลีกระจ่าง ที่เอื้อเฟื้อพีเอ็นเอและสารเคมีบางส่วนสำหรับการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณ นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ นายฐิติพงษ์ คำเคนทรงพานุช และนายชญัญญ เจริญภักดี ที่คอยให้ คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ขั้นตอนของการทำวิจัย ขอขอบคุณทุกๆ กำลังใจจากพ่อ แม่ และ เพื่อนๆ และที่สำคัญ ขอขอบคุณสำหรับความอบอุ่น ความใส่ใจเหมือนคนในครอบครัวที่อาจารย์และพี่ๆ ใน ห้องปฏิบัติการได้มอบให้เสมอมา

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ และโครงการพัฒนากำลังคนด้าน วิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกใน ความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปประกอบ	ณ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญกราฟ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1    มูลเหตุจูงใจหรือแนวความคิด	1
1.2    ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1    เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ)	3
1.2.2    พีเอ็นเอแมโครแอเรียบนกระดาศกรองดัดแปรพื้นผิว	5
1.2.3    การตรวจวัดการจับยึดของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ	7
1.3    วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1    วิธีการทดลองทั่วไป	9
2.1.1    เครื่องมือและอุปกรณ์	9
2.1.2    สารเคมี	9
2.2    การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์กระดาศกรองที่ดัดแปรพื้นผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอดेटเพื่อให้เป็นหมู่แอลดีไฮด์	12
2.2.1    การหาสภาวะของระบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมกระดาศกรองดัดแปรพื้นผิว	12
2.2.2    การเตรียมกระดาศกรองดัดแปรพื้นผิวสำหรับการสังเคราะห์พีเอ็นเอแอเรีย	13
2.3    การตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาศกรองที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวเพื่อสังเคราะห์พีเอ็นเอแอเรีย และการตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรึงพีเอ็นเอ	13
2.3.1    การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง	14
2.3.2    การหาปริมาณพีเอ็นเอติดโมเลกุลฟลูออเรสเซนต์ที่น้อยที่สุดที่เมื่อตรึงบน	15

	กระดาศกรองดัดแปรพื้นผิวแล้วยังสามารถมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ด้วยตาเปล่า	
2.4	การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับยัติระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า	16
2.4.1	ภาวะมาตรฐานของการทดลอง	16
2.4.2	การตรวจสอบความสามารถในการจับยัติระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสซิน	17
2.4.2.1	การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Capillary Transport	17
2.4.2.2	การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง	18
2.4.3	การตรวจสอบความสามารถในการจับยัติระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็น คู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาส่งสีด้วยเอนไซม์	19
2.4.3.1	การทดลองตรึง horseradish peroxidase (HRP) โดยอาศัยหลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้า	19
2.4.3.2	การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการตรวจวัดด้วย Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) โดยใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเทียบกับตำแหน่งพีเอ็นเอที่ไม่ติดไบโอติน	20
2.5	การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความไวของการตรวจวัดและความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม	22
2.5.1	การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม	23
2.5.2	การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากขีดจำกัดของการตรวจวัด	24
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง		
3.1	การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์กระดาศกรองที่ดัดแปรพื้นผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอดेटเพื่อให้เป็นหมู่แอลดีไฮด์	25
3.1.1	การหาสภาวะของระบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมกระดาศกรองดัดแปรพื้นผิว	26
3.2	การตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาศกรองที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์และการตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรึงพีเอ็นเอ	26
3.2.1	การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง	28
3.2.2	การหาปริมาณพีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่เมื่อตรึงบนกระดาศกรองดัดแปรพื้นผิวแล้วยังสามารถมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ด้วยตาเปล่า	30

3.3	การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาสร้างสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า	31
3.3.1	การตรวจสอบความสามารถในการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากฟลูออเรสซิน	31
3.3.1.1	การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Capillary Transport	31
3.3.1.2	การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง	34
3.3.2	การตรวจสอบความสามารถในการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากไบโอดีนร่วมกับการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์	36
3.4	การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากความไวของการตรวจวัดและความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม	39
3.4.1	การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม	39
3.4.2	การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากขีดจำกัดของการตรวจวัด	41
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง		43
เอกสารอ้างอิง		44
ประวัติผู้วิจัย		49



## สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงหลักการทำงานของพีเอ็นเอแอเรียที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้	2
1.2	เปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง DNA และ Nielsen's PNA	3
1.3	แสดงส่วนประกอบของพีโรลิดินิลพีเอ็นเอ	4
1.4	แสดงโครงสร้างของพีโรลิดินิลพีเอ็นเอ ชนิด acpcPNA	4
1.5	แสดงการจับยึดในรูปแบบแอนติพาราเรลของ <i>cis</i> -D-SS-ACPC PNA และ ดีเอ็นเอ	5
1.6	แสดงปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันระหว่างสารประกอบแอลดีไฮด์ และสารประกอบเอมีนบนกระดาษกรองตัดแปรรูปผิว	6
2.1	แผนภาพแสดงวิธีการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรรูปผิวเพื่อสังเคราะห์พีเอ็นเอแอเรีย	13
2.2	การทดลองหาระบบตัวทำลายที่เหมาะสม สำหรับการสังเคราะห์พีเอ็นเอแอเรีย	14
2.3	การทดลองหาปริมาณพีเอ็นเอติดโมเลกุลฟลูออเรสซินที่น้อยที่สุดที่สามารถตรึงบนกระดาษกรองตัดแปรรูปผิวแล้วสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยตาเปล่า	15
2.4	แผนภาพแสดงวิธีการทดสอบการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซิน	17
2.5	การทดสอบการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Capillary Transport	17
2.6	การทดสอบการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง	18
2.7	การทดสอบเพื่อตรึง horseradish peroxidase (HRP) โดยอาศัยหลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้าระหว่างดีเอ็นเอและเอนไซม์	19
2.8	แผนภาพแสดงการทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) กับพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอติน	20
2.9	การทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) กับพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอติน เทียบกับตำแหน่งพีเอ็นเอที่ไม่ติดโมเลกุลไบโอติน	21
2.10	แผนภาพแสดงการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพีเอ็นเอแอเรีย ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สม โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าของเอนไซม์ Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP)	22
2.11	การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม (วิธี Capillary Transport)	23
2.12	การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม (วิธีหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง)	23
2.13	การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพีเอ็นเอแอเรีย จากขีดจำกัดของการตรวจวัด	24

3.1	กลไกการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ไอออกไซด์ออกซิเดชันของเซลลูโลส	25
3.2	ปฏิกิริยาการทดสอบสารประกอบคาร์บอนิลด้วย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน	27
3.3	ปฏิกิริยาการทดสอบแอลดีไฮด์ด้วย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน	27
3.4	วิธีการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรพื้นผิวเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์	28
3.5	สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอ Flu-TTTTTTTT-LysNH <sub>2</sub> ที่ถูกตรึง	29
3.6	สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอ Flu-TTTTTTTT-LysNH <sub>2</sub> ที่ถูกตรึงปริมาณต่างๆ	30
3.7	แผนภาพแสดงวิธีการทดสอบการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากฟลูออเรสซิน	32
3.8	ปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างออโร-ฟีนอลไดอะมิน (OPD) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	36
3.9	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการสร้างสีด้วยเอนไซม์ HRP ที่ pH ต่างๆ	37
3.10	แผนภาพแสดงการพิสูจน์หลักการตรวจวัดพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอตินโดยใช้ SA-HRP	38
3.11	ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง SA-HRP กับพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอตินเปรียบเทียบกับตำแหน่งพีเอ็นเอที่ไม่ติดโมเลกุลไบโอติน	38
3.12	แผนภาพแสดงการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมโดยใช้ปฏิกิริยาสร้างสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าของเอนไซม์ Streptavidin horseradish peroxidase (SA-HRP)	39
3.13	การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมจากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมโดยเทคนิค Capillary transport	40
3.14	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมจากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมโดยหยดดีเอ็นเอคู่สมโดยตรง	41

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการทดสอบเชิงคุณภาพของกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวที่สภาวะต่างๆด้วยสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนอลไฮดรอกซิน	26
2	สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 254 นาโนเมตรที่สังเกตเห็นเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสซินลง (การไฮบริไดซ์ทำโดยเทคนิค capillary transport)	32
3	สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 254 นาโนเมตรที่เกิดขึ้นเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซินลงเมื่อตรวจวัดโดยหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง	34
4	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากซีตจำกััดของการตรวจวัดโดยการลดปริมาณดีเอ็นเอติดฉลากไปโอดินที่เป็นคู่สมด้วยเทคนิค Capillary transport และวิธีการหยดดีเอ็นเอโดยตรง	42



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญญกราฟ

กราฟที่		หน้า
1	ค่าเฉลี่ยความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากการตรึงพีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซินด้วยระบบตัวทำละลายชนิดต่างๆจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง	29
2	ความสัมพันธ์ระหว่างความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆเปรียบเทียบกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปรที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (blank) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค capillary transport, error bar แสดงค่า SD จากการทดลอง 3 ครั้ง	33
3	ความสัมพันธ์ระหว่างความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆเปรียบเทียบกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปรที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (blank) ที่ตรวจวัดโดยการหยดดีเอ็นเอโดยตรง, error bar แสดงค่า SD จากการทดลอง 3 ครั้ง	35



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2,4-DNP	2,4-dinitrophenylhydrazine
$\mu\text{L}$	microlitre
$\mu\text{M}$	micromolar
ACN	acetonitrile
acpc	2-aminocyclopentanecarboxylic acid
aeg	<i>N</i> -2-aminoethylglycine
ALP	alkaline phosphatase
BSA	bovine serum albumin
$\text{cm}^2$	square centimeter
DAC	dialdehyde cellulose
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
g	gram
HRP	horseradish peroxidase
M	molar
mg	milligram
mL	milliliter
mM	millimolar
$\text{mm}^2$	square millimeter
mmol	millimole
nm	nanometer
OPD	<i>o</i> -phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
pmol	picomole

PNA	peptide nucleic acid
SA-HRP	streptavidin-horseradish peroxidase conjugate
SD	standard deviation
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
zmol	zeptomole



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

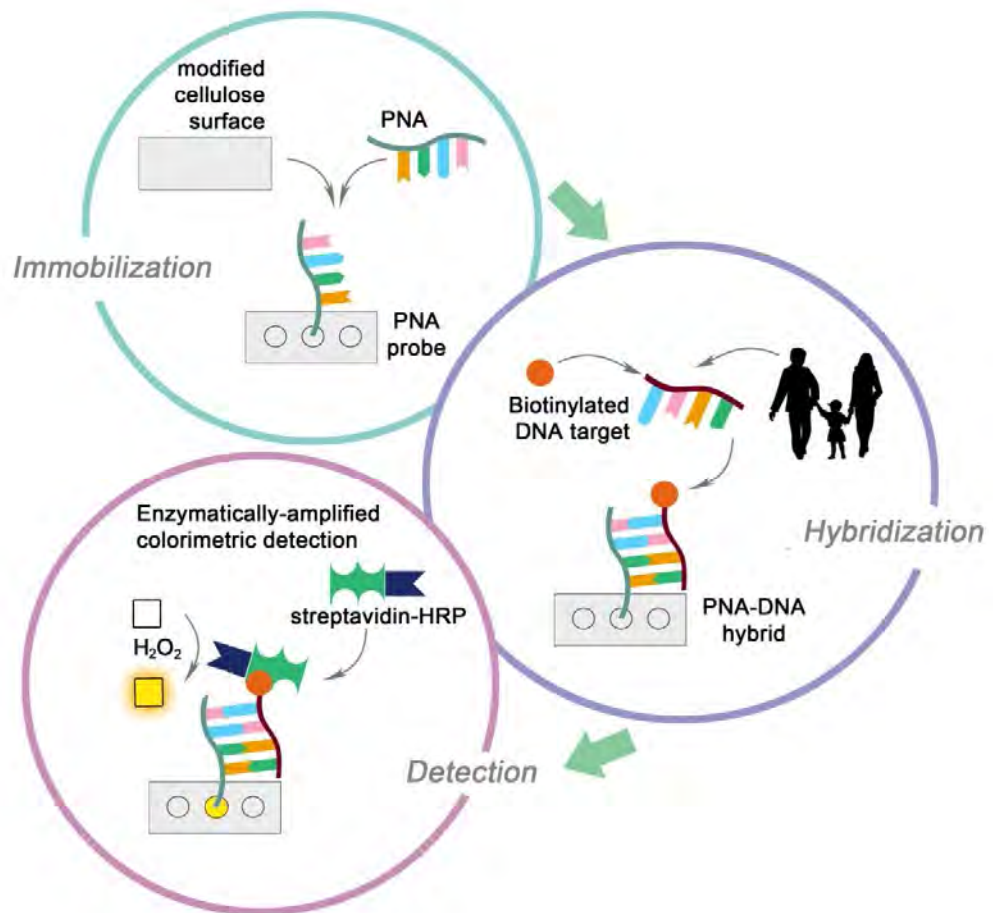
## บทนำ

### 1.1 มุมเหตุจูงใจหรือแนวความคิด

ในปัจจุบันการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA Sequence Determination) เป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่มีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านการแพทย์<sup>1</sup>, นิติวิทยาศาสตร์<sup>2</sup>, เกษตรกรรมและเทคโนโลยีทางอาหาร<sup>3</sup> โดยเทคนิคดังกล่าวได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ทำได้รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ มีความเลือกจำเพาะสูงและว่องไวต่อปฏิกิริยา ที่สำคัญผลที่ได้จะต้องมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้คือ การตรึงดีเอ็นเอสายสั้นๆบนพื้นผิววัสดุ เช่น กระจกสไลด์ หรือ silicon chips เพื่อนำไปใช้เป็นตัวติดตามหรือโพรบ (Probe) ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม ซึ่งการตรวจวัดสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคเชิงแสง<sup>4</sup> หรือวัดสมบัติอื่นๆที่เปลี่ยนแปลงไปของโพรบเมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สม อาจจะได้โดยตรงหรือมีตัวให้สัญญาณอื่นอยู่ด้วย<sup>5</sup> แต่เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตอยู่ในสายโซ่หลักเป็นองค์ประกอบซึ่งมีประจุลบภายใต้สภาวะปกติ จึงเกิดแรงผลักระหว่างดีเอ็นเอทั้งสองสาย ทำให้โมเลกุลลูกผสมที่เกิดขึ้นมีเสถียรภาพที่ไม่ดีนัก นอกจากนี้ดีเอ็นเอธรรมชาติยังถูกย่อยด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสได้ง่าย จึงมีนักวิจัยหลายคนพยายามเอาชนะข้อจำกัดเหล่านี้ของดีเอ็นเอโดยการพัฒนาโมเลกุลเลียนแบบดีเอ็นเอที่มีสมบัติการจับยึด (Hybridization) และมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอสที่ดีกว่าดีเอ็นเอธรรมชาติ

เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด หรือ พีเอ็นเอ (Peptide Nucleic Acid; PNA)<sup>6</sup> เป็นโมเลกุลสังเคราะห์เลียนแบบดีเอ็นเอที่มีเสถียรภาพสูงและไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอส เนื่องจากโครงสร้างหลักของพีเอ็นเอไม่มีประจุ เมื่อจับยึดกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจะเกิดเป็นโมเลกุลลูกผสมที่มีความเสถียรสูง โดยที่ความเสถียรไม่ขึ้นกับ ionic strength อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงในการจดจำกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริกที่สูงกว่าดีเอ็นเอธรรมชาติ การนำพีเอ็นเอมาใช้เป็นโพรบเพื่อใช้ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม โดยเฉพาะในรูปแบบที่เป็นแอเรีย คือตรึงพีเอ็นเอโพรบจำนวนมากบนระนาบพื้นผิวเดียวกัน จึงถือเป็นนวัตกรรมทางเลือกที่จะให้ผลการวิเคราะห์ที่เที่ยงตรงและแม่นยำ ทำได้รวดเร็วโดยวิธีที่ใช้ไม่ซับซ้อน ซึ่งในงานวิจัยนี้จะพัฒนาวิธีการเตรียมพีเอ็นเอแอเรียบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว เนื่องจากกระดาษกรองเป็นวัสดุที่หาง่ายและต้นทุนต่ำ ทั้งยังมีหมู่ฟังก์ชันที่เอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยาเพื่อดัดแปรพื้นผิว อีกทั้งจะพัฒนาวิธีการที่จะใช้ตรวจสอบการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมบนพื้นผิวกระดาษ โดยเน้นการเกิดสีที่เห็นได้ด้วย

ตาเปล่า และคาดว่าพีเอ็นเอแอเรียบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวจะเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่สะดวกต่อการใช้งาน ใช้ปริมาณโพรบและตัวอย่างน้อย และได้ผลการตรวจวัดที่ชัดเจนและรวดเร็ว

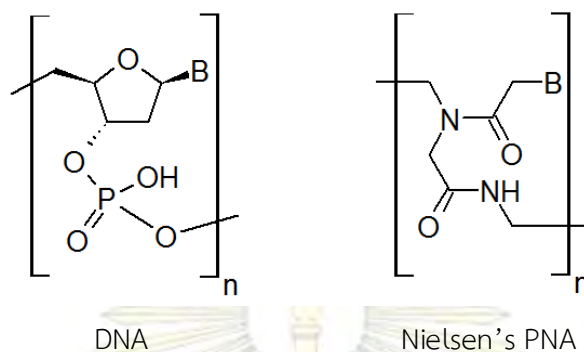


รูปที่ 1.1 แสดงหลักการทำงานของพีเอ็นเอแอเรียที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้



## 1.2 ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 1.2.1 เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ)

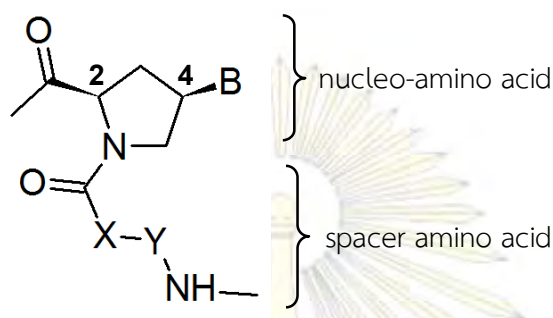


รูปที่ 1.2 เปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง DNA และ Nielsen's PNA

ในปี ค.ศ. 1991 Nielsen และคณะ<sup>7,8</sup> ได้คิดค้นโมเลกุลสังเคราะห์เลียนแบบดีเอ็นเอโดยการแทนที่ส่วนของน้ำตาลดีออกซีไรโบสและหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยสารคล้ายไคเพปไทด์ที่เรียกว่า เอ็น-2-อะมิโนเอทิลไกลซีน (*N*-2-aminoethylglycine; AEG) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 โดยได้ให้ชื่อเรียกโมเลกุลเลียนแบบดีเอ็นเอนี้ว่า เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (Peptide Nucleic Acid; PNA) หรือปัจจุบันจะเป็นที่รู้จักกันในชื่อของ aminoethylglycyl PNA หรือ aegPNA ซึ่งพีเอ็นเอดังกล่าวมีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (Watson-Crick) เกิดเป็นโมเลกุลลูกผสมแบบดับเบิลเฮลิกซ์ที่เสถียรมากกว่าโครงสร้างดับเบิลเฮลิกซ์ที่เกิดขึ้นระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอกับดีเอ็นเอตามธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างหลัก (backbone) ของพีเอ็นเอเป็นสายเพปไทด์หรือพอลิเอไมด์ ซึ่งมีจุดเด่นคือโครงสร้างมีความเป็นกลางทางไฟฟ้า ขณะที่โครงสร้างหลักของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต ทำให้เกิดแรงผลักกันระหว่างประจุลบของสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เข้าคู่กัน ในขณะที่โมเลกุลลูกผสมของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอจะไม่มีแรงผลักดังกล่าว ทำให้โมเลกุลลูกผสมที่เกิดขึ้นมีเสถียรภาพสูงแม้สภาวะที่มี ionic strength ต่ำ เนื่องจากไม่ต้องใช้ cation เพื่อดุลแรงผลักระหว่างประจุลบของโมเลกุลลูกผสมให้เป็นกลางทางไฟฟ้า นอกจากนี้พีเอ็นเอยังมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอส ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่สำคัญของดีเอ็นเอ และที่สำคัญคือพีเอ็นเอยังมีความจำเพาะเจาะจงในการจับยึดกับดีเอ็นเอสูง โดยในกรณีที่มีการเข้าคู่เบสที่ไม่เป็นไปตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริกที่สมบูรณ์ ความเสถียรของสายพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ จะลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับการเข้าคู่กันอย่างไม่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอ-อาร์เอ็นเอ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่สนใจนำพีเอ็นเอมาใช้เป็นโพรบ (probe) ในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ<sup>9</sup>

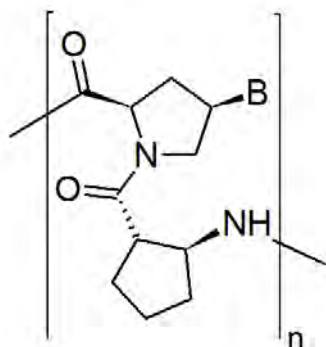
นอกจาก aegPNA ที่ถูกพัฒนาโดย Nielsen และคณะ ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็นเอ็น-อะมิโนเอทิลไกลซีน (AEG) แล้ว ในเวลาต่อมามีกลุ่มวิจัยอื่นได้พัฒนาพีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพในการจับยึดกับดีเอ็นเออย่างจำเพาะ

เจาะจงมากขึ้น<sup>10-12</sup> โดยพีเอ็นเอระบบหนึ่งที่มีสมบัติโดดเด่นคือ พีโรลิดินิลพีเอ็นเอ (pyrrolidinyl PNA) ที่พัฒนาโดย Lowe และ Vilaivan ในปี ค.ศ. 1997<sup>13, 14</sup> โดยแทนที่ส่วนของน้ำตาลดีออกซีไรโบสในดีเอ็นเอด้วย nucleo-amino acid ที่มาจากอนุพันธ์ของโพรสลิน และแทนที่ส่วนของพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ด้วย spacer amino acid ดังรูป 1.3

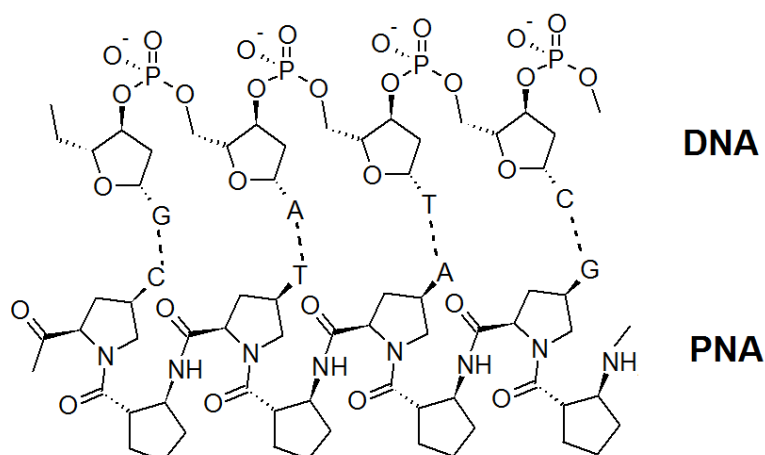


รูปที่ 1.3 แสดงส่วนประกอบของพีโรลิดินิลพีเอ็นเอ

ในปี ค.ศ. 2006 Vilaivan และคณะ<sup>15-18</sup> ได้พัฒนาพีโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนโพรสลินที่ถูกดัดแปรด้วยนิวคลีโอเบส (nucleo-amino acid) ที่มีสเตอริโอเคมีบนวงแหวนไพโรลิดินเป็น (2*R*,4*R*) หรือ *cis*-D ต่อสลับกับกรดเบต้าอะมิโนชนิดวงแหวนคือ 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) ที่มีสเตอริโอเคมีเป็น *SS*-ACPC โดยพีเอ็นเอระบบดังกล่าวซึ่งมีชื่อเรียกว่า acpcPNA มีความแข็งแรงในการยึดจับและมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอมากกว่า aegPNA ของ Nielsen รวมถึงสามารถจับกับดีเอ็นเอในรูปแบบแอนติพาราเรล (antiparallel) เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจาก aegPNA ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ทั้งสองทิศทาง ดังนั้น acpcPNA จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ที่พีเอ็นเอและดีเอ็นเอสามารถทำได้ และอาจขยายขอบเขตการใช้ประโยชน์ให้กว้างขวางขึ้นไปอีก



รูปที่ 1.4 แสดงโครงสร้างของพีโรลิดินิลพีเอ็นเอ ชนิด acpcPNA



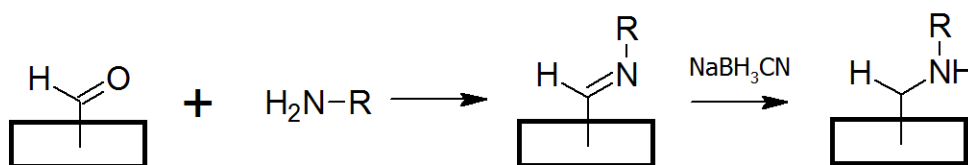
รูปที่ 1.5 แสดงการจับยึดในรูปแบบแอนติพาราเรลของ *cis*-D-SS-ACPC PNA และ ดีเอ็นเอ

### 1.2.2 พีเอ็นเอแม่โครแอเรียบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว

เทคโนโลยีการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอมีมาเป็นเวลานานแล้ว วิธีการที่สำคัญคือการใช้เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสในการอ่านลำดับเบส ซึ่งพัฒนาโดย Sanger ในปี 1977<sup>19</sup> แต่วิธีการดังกล่าวต้องอาศัย เครื่องมือที่ซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูง จากสมบัติการเข้าคู่เบสกับเบสคู่สมโดยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายดีเอ็นเอ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์สายสั้นๆ ที่เรียกว่า โพรบ ซึ่ง ออกแบบให้มีลำดับเบสให้สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งในระยะแรกเริ่มนิยมใช้ เทคนิค Southern Blot ซึ่งพัฒนาโดย Edwin Southern ในปี 1975<sup>20</sup> อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือ ต้อง อาศัยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งกินเวลานาน และยังมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก ต่อมาจึงได้เกิดการพัฒนาเพื่อให้ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลารวดเร็วโดยการตรึงดีเอ็นเอในลักษณะแอเรีย<sup>21</sup> คือตรึงโพรบหลาย ชนิดบนระนาบพื้นผิวเดียวกัน ซึ่งจะทำให้สามารถอ่านลำดับเบสได้หลายบริเวณพร้อมกัน ตัวอย่างเช่น งานวิจัย ของ Liepold และคณะ<sup>22</sup> ที่สร้างดีเอ็นเอแอเรียโดยตรึงดีเอ็นเอโพรบบนแผ่นทองคำที่ทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้า, งานวิจัยของ Aied และคณะ<sup>23</sup> ที่ตรึงดีเอ็นเอโพรบบนกระดาษเซลลูโลส, งานวิจัยของ Sanchez-Carbayo และ คณะ<sup>24</sup> ที่ใช้แก้วเป็นพื้นผิวในการตรึงดีเอ็นเอโพรบ หรืองานวิจัยของ Wood และคณะ<sup>25</sup> ที่นำ polydopamine เคลือบบนฟิล์มทองคำก่อนตรึงดีเอ็นเอโพรบบนพื้นผิว และเนื่องจากจุดเด่นต่างๆ ของพีเอ็นเอโดยเฉพาะสมบัติ การจับยึดที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอ จึงมีผู้สนใจนำพีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดดีเอ็นเอ (DNA biosensor) เพื่อให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดของดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นเพิ่มมากขึ้น<sup>26</sup> จึงไม่ เป็นที่น่าประหลาดใจที่จะมีผู้สนใจพัฒนาพีเอ็นเอแอเรีย<sup>27</sup> โดยการตรึงดีเอ็นเอโพรบจำนวนหลายๆ ตัวบนพื้นผิว ของวัสดุที่มีลักษณะเป็นระนาบ เช่น แก้ว, ทองคำ, silicon chips ตัวอย่างงานวิจัยที่พัฒนาพีเอ็นเอแอเรีย เช่น งานวิจัยของ Geiger และคณะ<sup>28</sup> ที่ตรึงพีเอ็นเอโพรบบน Activated Nylon Membranes, งานวิจัยของ Brandt

และคณะ<sup>29</sup> ที่ตรึงพีเอ็นเอบนมัลติ-เวลเพลต, งานวิจัยของ Arlinghaus และคณะ<sup>30</sup> ที่ใช้พื้นผิวเป็นแก้ว pyrex, ควอตซ์ และแพลตตินัม เป็นต้น ซึ่งพีเอ็นเอแอเรียที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบคือเพิ่มความเสถียรและความแข็งแรง รวมถึงความจำเพาะเจาะจงของการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งเป็นขีดจำกัดของดีเอ็นเอแอเรีย อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาพีเอ็นเอแอเรียอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้อุปกรณ์ที่ใช้งานได้สะดวกขึ้น ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อนในการวิเคราะห์ และใช้ต้นทุนที่ต่ำลง<sup>6</sup>

เมื่อไม่นานมานี้มีกลุ่มวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจพัฒนาไบโอเซนเซอร์แบบใช้ครั้งเดียวที่มีราคาถูกและใช้งานได้สะดวก โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนเพื่อการตรวจวิเคราะห์แบบ point of care diagnostic โดยกระดาษเซลลูโลส<sup>31, 32</sup> เป็นวัสดุรองรับหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีราคาถูก ย่อยสลายได้เองโดยธรรมชาติ (biodegradable) และสามารถเข้ากันได้กับระบบชีวภาพ (biocompatible) นอกจากนี้ การดัดแปรพื้นผิวกระดาษเซลลูโลสยังทำได้ง่าย เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลสเอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่หลากหลาย เช่น อีเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชัน ทำให้สามารถดัดแปรพื้นผิวกระดาษไปเป็นหมู่ฟังก์ชันต่างๆได้โดยไม่จำกัด<sup>33, 34</sup> เช่น ได้มีการดัดแปรพื้นผิวของเซลลูโลสโดยการใช้ bis-electrophile เช่น toluene diisothiocyanate<sup>35, 36</sup> หรือ divinyl sulfone<sup>37</sup> เพื่อให้ได้พื้นผิวที่ว่องไวสำหรับการตรึงโพรบที่เป็นสารชีวโมเลกุล วิธีการดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการตรึงพีเอ็นเอบนกระดาษกรอง<sup>38</sup> แต่ยังคงมีความยุ่งยากในทางปฏิบัติ เนื่องจากสารเคมีที่ใช้มีราคาแพงและไม่เสถียร อีกวิธีหนึ่งที่มีการใช้ดัดแปรพื้นผิวกระดาษเซลลูโลส คือ การออกซิไดส์ที่ตำแหน่งจำเพาะของเซลลูโลสด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอเดต (NaIO<sub>4</sub>) เกิดเป็นไดอัลดีไฮด์เซลลูโลส (dialdehyde cellulose; DAC)<sup>39</sup> ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลใดๆ ที่มีหมู่อะมิโนเกิดเป็นสารประกอบ Schiff base ซึ่งสามารถทำให้เสถียรขึ้นได้ด้วยปฏิกิริยารีดักชันโดยโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ (NaBH<sub>3</sub>CN) เรียกรวมว่าปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชัน ดังรูป 1.6 หลักการนี้มีจุดเด่นคือใช้รีเอเจนต์ที่หาง่าย ราคาถูก และใช้งานได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ในการตรึงสารชีวโมเลกุลที่หลากหลาย<sup>40</sup> แต่ยังไม่เคยมีผู้นำมาใช้กับการตรึงพีเอ็นเอมาก่อน

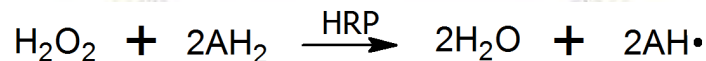


รูปที่ 1.6 แสดงปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันระหว่างสารประกอบแอลดีไฮด์ และสารประกอบเอมีนบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว

### 1.2.3 การตรวจวัดการจับยึดของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ

นอกจากการตรึงโพรบแล้ว การพัฒนาวิธีการตรวจวัดการจับยึดกันระหว่างพีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอ เป้าหมายสำหรับพีเอ็นเอแอเรียเป็นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งของงานวิจัยทางด้านนี้ โดยการตรวจวัดที่ดีควรมีความไวสูงและมีความเลือกจำเพาะสูง ตัวอย่างวิธีการตรวจวัดที่นิยมใช้ในเทคโนโลยีของดีเอ็นเอแอเรียคือ การติดฉลากดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยฉลากเรืองแสง<sup>41, 42</sup> แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดด้านค่าใช้จ่ายในการติดฉลากสารเรืองแสงและเครื่องอ่านผลเฉพาะซึ่งมีราคาแพง เพื่อหลีกเลี่ยงการติดฉลากสีเรืองแสงนี้ จึงมีการพัฒนาการตรวจวัดอื่น เช่นการใช้หลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้าของดีเอ็นเอที่โครงสร้างหลักเป็นประจุลบ โดยใช้อนุภาคประจุบวก ได้แก่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในการตรวจวัด<sup>43</sup> อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถใช้กับพื้นผิวที่เป็นกระดาษเซลลูโลสได้ เนื่องจากการดูดซับของอนุภาคทองคำบนกระดาษ นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดเป็นการใช้สีย้อมที่มีประจุบวก เช่น สีย้อม Azure A แต่วิธีตรวจวัดนี้มีขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ไม่ดีนัก (200 nM หรือ 3.3 pmol/spot)<sup>38</sup> อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันในการตรวจวัดดีเอ็นเอและโปรตีนคือการใช้ปฏิกิริยาส่งสีโดยอาศัยเอนไซม์ ซึ่งมีข้อได้เปรียบคือมีการขยายสัญญาณทำให้ขีดจำกัดของการตรวจวัดต่ำ โดยเอนไซม์ที่นิยมในการวิเคราะห์ดังกล่าวคือ horseradish peroxidase (HRP) และ alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) มีความไวในการใช้งานที่ดีกว่า จึงมีการนำ HRP มาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการใช้ในเทคนิค enzyme immunoassay (EIA) กับดีเอ็นเอโพรบ<sup>44</sup>

เอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) เป็นเอนไซม์ที่มี heme เป็นองค์ประกอบ และมีสมบัติเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟินอล, ฟีนอลิกแอซิด, อินโดล, เอมีน หรือซัลโฟเนต กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ<sup>45</sup>



ซึ่งเมื่อเลือกใช้สับสเตรตที่เหมาะสมจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสี ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือตรวจวัดได้โดยวิธีการทางสเปกโตรสโกปี ปฏิกิริยาดังกล่าวมีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิคที่เรียกว่า ELISA ซึ่งอาศัยหลักการของการจับยึดที่เฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน โดยใช้เอนไซม์ เช่น HRP หรือ alkaline phosphatase เป็นตัวตรวจวัดการจับยึด และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดการจับยึดของ ดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Su และคณะ<sup>46</sup> ที่นำพีเอ็นเอติดโมเลกุลไบโอตินตรงบนวัสดุของแข็งที่เคลือบด้วย streptavidin โดยใช้หลักการจับยึดที่จำเพาะเจาะจงระหว่างไบโอตินและ streptavidin<sup>47</sup> ส่วนขั้นตอนในการตรวจวัดการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ใช้หลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้า กล่าวคือ โครงสร้างหลักของดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตซึ่งเป็นประจุลบที่เอื้อต่อการดูดซับทางกายภาพกับเอนไซม์ HRP ซึ่งมีประจุบวกอยู่ที่พื้นผิวเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อมีการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ เอนไซม์ HRP จะดูดซับบนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิต และเมื่อเติมสารรีดิวซ์สับสเตรต คือ

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ซึ่งเป็นสารไม่มีสีกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระบบจะเกิดสีฟ้าที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้กรดจะได้สีเหลืองถาวร อีกรงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกันคือ งานวิจัยของ Laopa และคณะ<sup>48</sup> ที่ตรึงดีเอ็นเอตัวอย่างบนวัสดุของแข็งที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกโดยใช้แรงทางไฟฟ้าสถิต จากนั้นนำไปไฮบริดซ์กับพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอดีนเกิดเป็นโมเลกุลคู่ผสมระหว่างไบโอดีน-พีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน เมื่อเติมเอนไซม์ streptavidin-HRP จะเกิดการจับยึดอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างโมเลกุลไบโอดีนและ streptavidin และเมื่อเติมสับสเตรต o-phenylenediamine (OPD) ซึ่งเป็นสารไม่มีสีกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเกิดสีเหลืองที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และอีกตัวอย่างหนึ่งคือ งานวิจัยของ Zhang และคณะ<sup>26</sup> ที่นำพีเอ็นเอตัวที่หนึ่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอเป้าหมายตรึงบนวัสดุของแข็ง เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกจับยึดบนพื้นผิว จากนั้นใช้พีเอ็นเอตัวที่สองซึ่งติดโมเลกุลไบโอดีนเป็นตัวตรวจวัด นั่นคือหากพีเอ็นเอตัวที่สองมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสส่วนที่เหลือบนสายดีเอ็นเอ จะเกิดการจับยึดกับสายดีเอ็นเอเกิดเป็นโมเลกุลคู่ผสมที่มีลักษณะเป็นแซนวิช ซึ่งเมื่อเติมเอนไซม์ streptavidin-HRP จะเกิดการจับยึดอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างโมเลกุลไบโอดีนและ streptavidin และเมื่อเติมสับสเตรต คือ TMB กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดสี โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ต่ำมากถึงระดับ zmol ( $10^{-21}$  mol)

### 1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจพัฒนาวิธีใหม่ในการเตรียมพีเอ็นเอแอเรียโดยการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรรูปพื้นผิวให้เป็นหมู่แอลดีไฮด์โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอดेट จากนั้นจึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยเน้นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### การทดลอง

#### 2.1 วิธีการทดลองทั่วไป

##### 2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- การชั่งน้ำหนักสาร: เครื่องชั่งของ DKSH รุ่น AND GR-200
- การปิเปตสาร: ไมโครปิเปต ยี่ห้อ optipette ขนาด 0.1-2  $\mu\text{L}$ ,  
ยี่ห้อ RAININ Pipet-Lite XLS ขนาด 0.5-10  $\mu\text{L}$ , 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ ,  
ยี่ห้อ BOECO Germany ขนาด 100-1000  $\mu\text{L}$
- การสังเคราะห์พีเอ็นเอแอเรียบบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว: กระดาษกรอง Whatman™ No. 1, งานเพาะเชื้อ, หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 mL และ 1 mL, เครื่อง Shaker ยี่ห้อ IKA® รุ่น KS 130 basic, เครื่อง Vortex-genie® 2 ยี่ห้อ Scientific Industries
- การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผลการทดลอง: หลอดแสงยูวี Vilber Lourmat (254 nm, 365 nm), กล้องถ่ายรูป Canon PowerShot SX110 IS, iPhone6 smartphone, โปรแกรม ImageJ

##### 2.1.2 สารเคมี

- การสังเคราะห์กระดาษกรองที่ดัดแปรพื้นผิว ใช้โซเดียมเปอร์ไอโอดेट เกรด Analytical จากบริษัท CARLO ERBA reagents ประเทศอิตาลีและลิเทียมคลอไรด์ 99% เกรดสำหรับงานด้าน molecular biology จากบริษัท Acros Organics ประเทศสหรัฐอเมริกา
- การพิสูจน์เอกลักษณ์กระดาษกรองที่ดัดแปรพื้นผิว ใช้ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลไฮดรอกซีน 97% เกรด Reagent จากบริษัท H&W ประเทศสหรัฐอเมริกา
- การตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิว ใช้โซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ 95% จากบริษัท Acros Organics ประเทศสหรัฐอเมริกา, ไทเมทิลฟอรัมาไมด์ เกรด Analytical ( $\text{H}_2\text{O} \leq 0.01\%$ ) จาก

บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย, อะซิโตนไตรล์ เกรด Analytical จากบริษัท Burdick&Jackson ประเทศสหรัฐอเมริกา, ไดมethylซัลฟอกไซด์ เกรด Analytical จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, เมทานอล เกรด Analytical จากบริษัท Burdick&Jackson ประเทศสหรัฐอเมริกา, กรดไตรฟลูออโรแอซิดิก เกรด Analytical จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

- การตรวจสอบความสามารถในการจับยี้ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน ใช้ Blot-Qualified BSA จากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา, Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SA-HRP)  $\geq 100$  unit/mg protein จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, ออร์โธ-ฟีนิลีน ไดอะมีน  $\geq 98.0\%$  เกรด Analytical จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, ยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกรดสำหรับการสังเคราะห์ จากบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกาและ ทวิน 20 ( $H_2O \leq 3\%$ ) จากบริษัท CHEM-IMPEX ประเทศสหรัฐอเมริกา

- พีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Flu-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>, Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>, Ac-Lys-GCCTCACCACCA-NH<sub>2</sub>, Ac-Lys-GCCTTACCACCA-NH<sub>2</sub> ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณโชติมา วิไลวัลย์ และนิสิตปริญญาโท-เอกในกลุ่มวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์, biotinylated PNA (biotin-o-o-AACACACAGACT-LysNH<sub>2</sub>) ได้รับความอนุเคราะห์จาก น.ส.มาลินี ลี้กระจ่าง นิสิตปริญญาโทในกลุ่มวิจัยของ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ โฮვნ

- ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Flu-dAAAAAAAAA, CGAGGATGGCGCCCCGGGCGCCATG GATAGAGCAGGAGGGG (5701), biotin-dTGGTGGTAAGGC และ biotin-dTGGTGGTGAGGC สั่งซื้อจากบริษัท Bio Basic (Canada)

- น้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายได้แก่ น้ำ Milli-Q จากเครื่อง Millipak® 40 Express Filter Millipore (USA)

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### สารละลายบัฟเฟอร์ระบบต่างๆ มีวิธีการเตรียมดังนี้

- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 g, โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 g, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.44 g และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.24 g ในน้ำ 800 mL ปรับ pH ให้เป็น 7.4 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ก่อนปรับปริมาตรด้วยน้ำให้เป็น 1 L

- คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 10.1) เตรียมโดยผสมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 70 mL และสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 30 mL

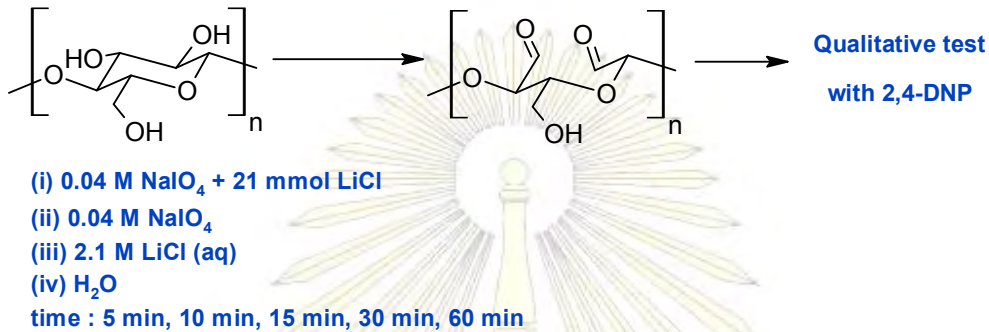
- โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 3.6) เตรียมโดยผสมสารละลายกรดแอสซิติค 0.2 M ปริมาตร 46.3 mL และสารละลายโซเดียมแอสซิเตต 0.2 M ปริมาตร 3.7 mL ก่อนปรับปริมาตรด้วยน้ำให้เป็น 100 mL

- โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 5.0) เตรียมโดยผสมสารละลายกรดแอสซิติค 0.1 M ปริมาตร 35.7 mL และสารละลายโซเดียมแอสซิเตต 0.1 M ปริมาตร 64.3 mL

- ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 5.0) เตรียมโดยผสมสารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 35 mL และสารละลายไตรโซเดียมซิเตรต 0.1 M ปริมาตร 65 mL

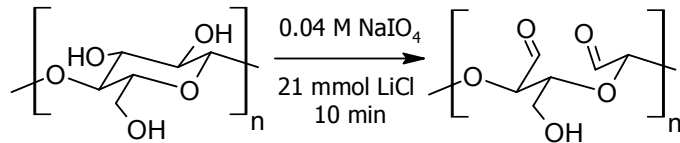
## 2.2 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์กระดาษกรองที่ตัดแปรพื้นผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอเดตเพื่อให้เป็นหมู่แอลดีไฮด์

### 2.2.1 การหาสถานะของระบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิว



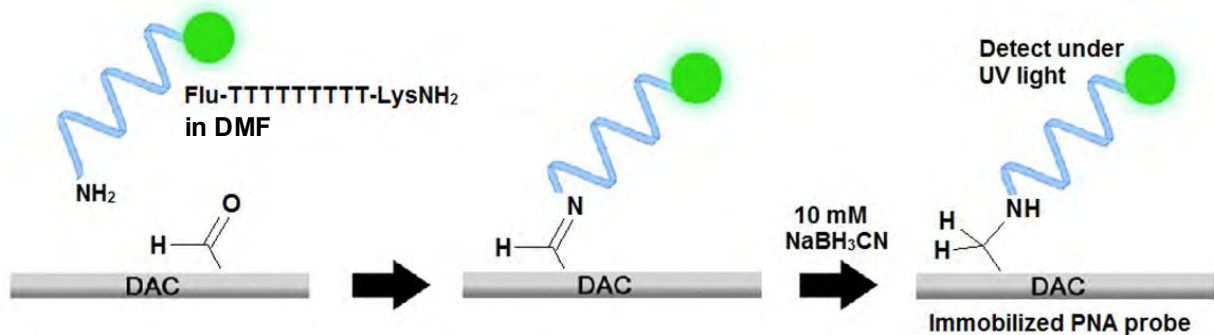
ละลายลิเทียมคลอไรด์ (0.89 g, 21 mmol) ในสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอเดต (0.04 M, 10 mL) แห่กระดาษกรอง ขนาด 1 cm x 1 cm จำนวน 5 แผ่นลงในสารละลายที่ได้ โดยหุ้ม Petri dish ที่ใช้ทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงที่อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายตัวของเปอร์ไอโอเดต คนสารละลายอย่างสม่ำเสมอโดยใช้เครื่อง shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที เมื่อครบแต่ละช่วงเวลา คีบกระดาษกรองครั้งละ 1 แผ่น ล้างกระดาษกรองด้วยน้ำเพื่อล้างเอาเกลือไอโอเดตออก แล้วทดสอบหมู่แอลดีไฮด์ที่พื้นผิวกระดาษกรองโดยหยดสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน 0.1 M ในตัวทำละลายเมทานอลบนกระดาษกรองที่ผ่านการล้างขณะกระดาษยังเปียก ทำการทดลองควบคุมเช่นเดียวกับข้างต้นโดยแช่กระดาษกรองลงในสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอเดต (0.04 M, 10 mL), สารละลายลิเทียมคลอไรด์ (2.1 M, 10 mL) และน้ำ 10 mL แยกกัน จากนั้นเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีนในแต่ละสถานะ เก็บข้อมูลโดยการถ่ายภาพหลังการหยดสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน เป็นเวลา 30 นาที

## 2.2.2 การเตรียมกระดาษกรองตัดแปรรูปผิวสำหรับการสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรีย์



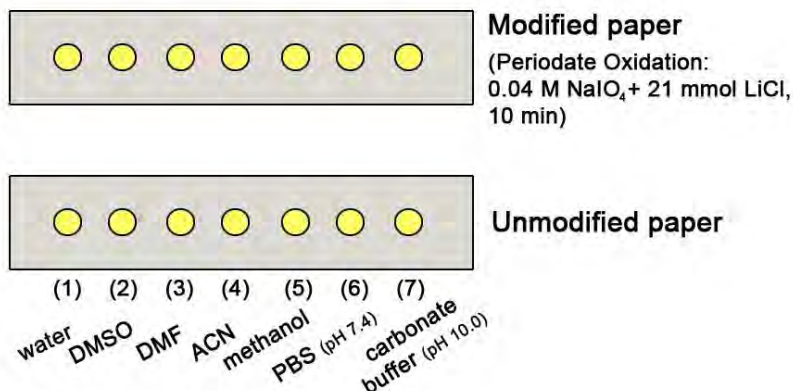
ละลายลิเทียมคลอไรด์ (0.89 g, 21 mmol) ในสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอดेट (0.04 M, 10 mL) สำหรับกระดาษกรอง 1-3 แผ่น ( $\leq 50 \text{ cm}^2$ ) แช่กระดาษกรองลงในสารละลายที่ได้ โดยหุ้ม Petri dish ที่ใช้ทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ คนสารละลายอย่างสม่ำเสมอโดยใช้เครื่อง shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วยน้ำเพื่อล้างเอาเกลือไอโอดेटออก แล้วทำกระดาษกรองนี้ให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง

## 2.3 การตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรรูปผิวเพื่อสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรีย์ และการตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรึงพีเอ็นเอ



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงวิธีการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรรูปผิวเพื่อสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรีย์

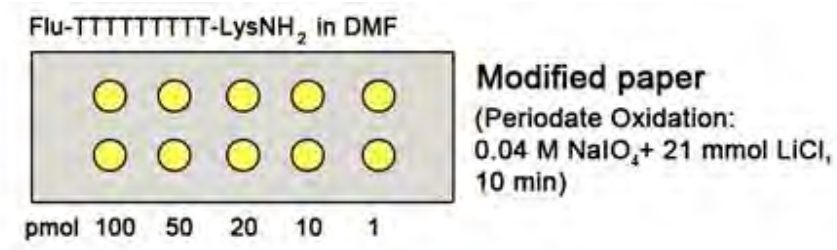
### 2.3.1 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง



รูปที่ 2.2 การทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับการสังเคราะห์พีเอ็นเอแอรีย์

เตรียมสารละลายของพีเอ็นเอติดโมเลกุลฟลูออเรสเซนต์ตัวอย่าง (Flu-TTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 100 μM ในระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 7 ชนิด คือ น้ำ, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์, ไดเมทิลฟอร์มาไมด์, อะซิโตนไนไตรล์, เมทานอล, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) และคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 10.0) เติมสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ (NaBH<sub>3</sub>CN) ความเข้มข้น 1 mg/mL (16 mM) ลงในสารละลายพีเอ็นเอทุกระบบตัวทำละลาย แบ่งสารละลายแต่ละระบบตัวทำละลายออกเป็น 2 ส่วน หยดสารละลายส่วนแรกลงบนกระดาษกรองที่ไม่ผ่านการตัดแปรพื้นผิว ที่ตำแหน่งของแต่ละระบบตัวทำละลายที่ต่างกัน ตำแหน่งละ 1 μL และหยดสารละลายส่วนที่สองลงบนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิว ตำแหน่งละ 1 μL เช่นกัน เก็บกระดาษกรองที่ได้ในกล่องบรรจุน้ำเพื่อให้ระบบมีความชื้น และเก็บกล่องในที่มีดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วยสารละลายผสมระหว่างน้ำและอะซิโตนไนไตรล์ (อัตราส่วน 1:1) ที่เติมกรดไตรฟลูออโรแอซิดิก 0.5% เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) 3 นาที ทำกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm

### 2.3.2 การหาปริมาณพีเอ็นเอติดโมเลกุลฟลูออเรสซินที่น้อยที่สุดที่เมื่อตรึงบนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิวแล้วยังสามารถมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ด้วยตาเปล่า



รูปที่ 2.3 การทดลองหาปริมาณพีเอ็นเอติดโมเลกุลฟลูออเรสซินที่น้อยที่สุดที่สามารถตรึงบนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิวแล้วสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ด้วยตาเปล่า

เตรียมสารละลายของพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซิน (Flu-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 100, 50, 20, 10 และ 1  $\mu$ M โดยใช้ไดเมทิลฟอร์มาไมด์เป็นตัวทำละลาย เติมสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ (NaBH<sub>3</sub>CN) ความเข้มข้น 1 mg/mL (16 mM) ลงในสารละลายพีเอ็นเอแต่ละความเข้มข้น หยดสารละลายแต่ละความเข้มข้นลงบนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิวที่ตำแหน่งที่ต่างกัน ตำแหน่งละ 1  $\mu$ L เก็บกระดาษกรองที่ได้ในกล่องบรรจุน้ำเพื่อให้ระบบมีความชื้น และเก็บกล่องในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วยสารละลายผสมระหว่างน้ำและอะซิโตนไตรล์ (อัตราส่วน 1:1) ที่มีกรดไตรฟลูออโรแอซิดิก 0.5% อยู่ด้วยเป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 3 นาที ทำกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm บันทึกภาพโดยกล้องถ่ายรูป Canon PowerShot SX110 IS (ตั้งค่า ISO เป็น 200, รูรับแสงเป็น 3.5 และ shutter speed เป็น 1 วินาที)

## 2.4 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับยัติระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

### 2.4.1 ภาวะมาตรฐานของการทดลอง

- การตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรองตัดแปรรูปผิว

เตรียมสารละลายของพีเอ็นเอตัวอย่างในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่ความเข้มข้น 10-100  $\mu\text{M}$  เตรียมสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) ความเข้มข้น 1 mg/mL (16 mM) ลงในสารละลายพีเอ็นเอ แล้วหยดสารละลายพีเอ็นเอลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรรูปผิว ตำแหน่งละ 0.1  $\mu\text{L}$  เก็บกระดาษกรองที่ได้ในเก็บกระดาษกรองที่ได้ในกล่องบรรจุน้ำเพื่อให้ระบบมีความชื้น และเก็บกล่องในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างกระดาษกรองด้วยสารละลายผสมระหว่างน้ำและอะซิโตนไตรล (อัตราส่วน 1:1) เป็นเวลา 30 นาที ทำกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

- การตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายโดยทำให้เกิดการจับยัติกับพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรองตัดแปรรูปผิว

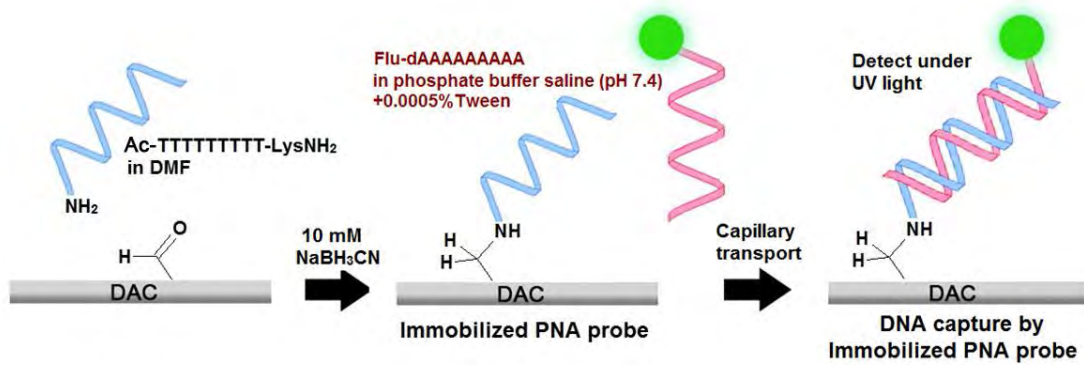
- วิธี Capillary Transport

จุ่มกระดาษกรองที่ตรึงพีเอ็นเอโพรบแล้วในสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาตร 5  $\mu\text{L}$  รอกระดาษกรองเคลื่อนที่จนสุดกระดาษกรอง และปล่อยกระดาษกรองไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะล้างกระดาษกรองด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 0.0005% เป็นเวลา 3 นาที และทำกระดาษกรองให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง

- วิธีหยดดีเอ็นเอโดยตรง

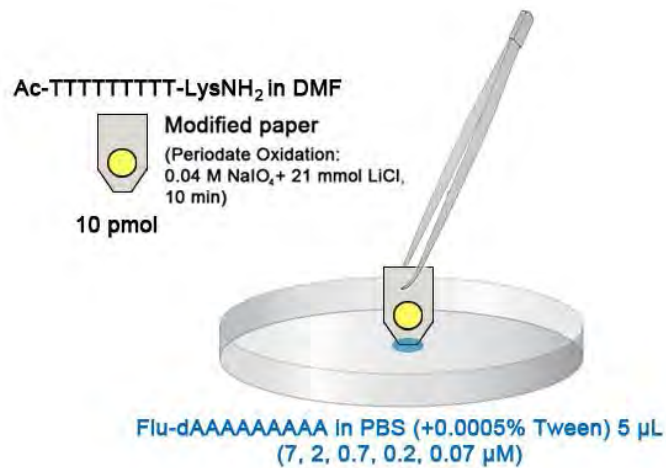
หยดสายละลายดีเอ็นเอลงบนตำแหน่งที่ตรึงพีเอ็นเอ ตำแหน่งละ 0.5  $\mu\text{L}$  ปล่อยกระดาษกรองไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะล้างกระดาษกรองด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 0.0005% เป็นเวลา 3 นาที และทำกระดาษกรองให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง

2.4.2 การตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสซิน



รูปที่ 2.4 แผนภาพแสดงวิธีการทดสอบการจับยี่ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซิน

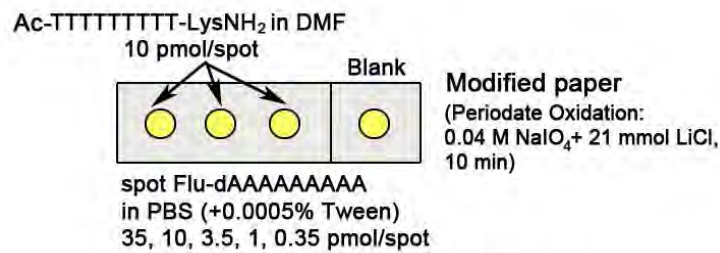
2.4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Capillary Transport



รูปที่ 2.5 การทดสอบการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Capillary Transport

ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง (Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 100  $\mu$ M บนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว (ปริมาณพีเอ็นเอต่อ 1 ตำแหน่งที่ตรึงคือ 10 pmol) ส่วนการทดลองควบคุมคือกระดาษดัดแปรพื้นผิวที่ไม่ได้ผ่านการตรึงพีเอ็นเอ หลังจากนั้นเตรียมสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซิน (Flu-dAAAAAAAA) ความเข้มข้น 7, 2, 0.7, 0.2 และ 0.07  $\mu$ M ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 (0.0005%) เป็นตัวทำละลาย ตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายโดยทำให้เกิดการจับยึดกับพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวโดยวิธี Capillary Transport บันทึกภาพโดยกล้องถ่ายรูป Canon PowerShot SX110 IS (ตั้งค่า ISO เป็น 200, รูรับแสงเป็น 3.5 และ shutter speed เป็น 1 วินาที) ตรวจสอบความสามารถในการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีพร้อมทั้งคำนวณความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้เทียบกับสัญญาณพื้นหลังด้วยโปรแกรม imageJ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ต่อ 1 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ

#### 2.4.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง



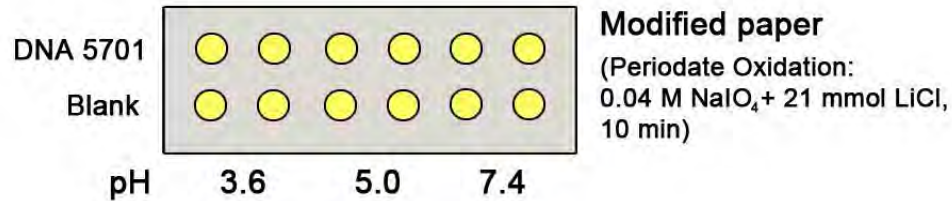
รูปที่ 2.6 การทดสอบการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง

ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง (Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 100  $\mu$ M บนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว (ปริมาณพีเอ็นเอต่อ 1 ตำแหน่งที่ตรึงคือ 10 pmol) ส่วนการทดลองควบคุมคือกระดาษดัดแปรพื้นผิวที่ไม่ได้ผ่านการตรึงพีเอ็นเอ หลังจากนั้นเตรียมสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซิน (Flu-dAAAAAAAA) ความเข้มข้น 70, 20, 7, 2 และ 0.7  $\mu$ M ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 0.0005% เป็นตัวทำละลาย ตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายโดยทำให้เกิดการจับยึดกับพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวโดยวิธีหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง บันทึกภาพและวิเคราะห์ข้อมูลเช่นเดียวกับวิธี Capillary Transport



### 2.4.3 การตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาส่งสีด้วยเอนไซม์

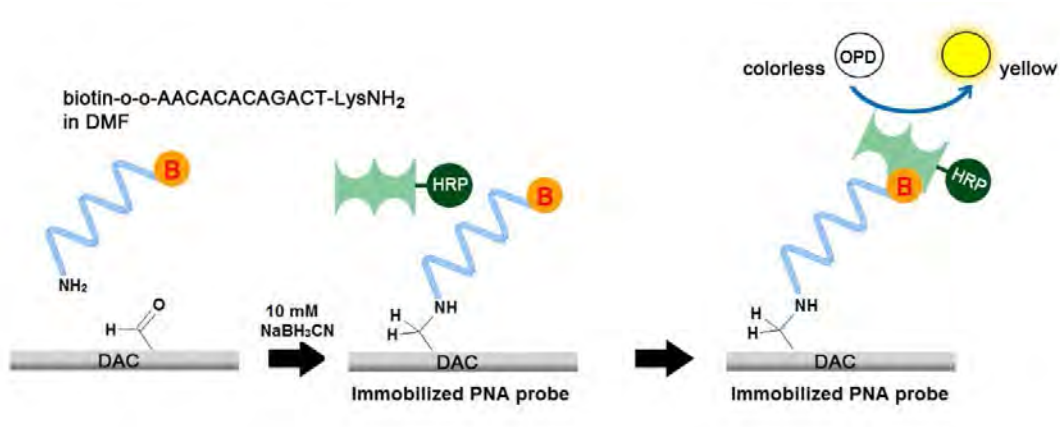
#### 2.4.3.1 การทดลองตรึง horseradish peroxidase (HRP) โดยอาศัยหลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้า



รูปที่ 2.7 การทดสอบเพื่อตรึง horseradish peroxidase (HRP) โดยอาศัยหลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้าระหว่างดีเอ็นเอและเอนไซม์

เตรียมสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่าง CGAGGATGGCGCCCCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGAGGGG (5701) ความเข้มข้น 0.1 mM ในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) แล้วหยดสารละลายดีเอ็นเอลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรรูปแล้ว ตำแหน่งละ 1  $\mu$ L ส่วนการทดลองควบคุมคือกระดาษตัดแปรรูปที่ไม่ได้ผ่านการตรึงดีเอ็นเอ ปล่อยกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะล้างกระดาษกรองด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ทำกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดสารละลายของ HRP ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ในตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 3.6), โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 5.0) และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ลงบนกระดาษกรองตัดแปรรูปบริเวณตำแหน่งต่างๆ ดังรูป 2.7 ตำแหน่งละ 1  $\mu$ L เก็บกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนล้างกระดาษกรองด้วยน้ำเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นแช่กระดาษกรองในสารละลายผสมระหว่างออโร-ฟีนีลีนไดอะมีน (1.6 mg/mL) และยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (1.6 mg/mL) ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายทันที รองจนกระทั่งครบ 1 นาทีแล้วล้างกระดาษกรองด้วยน้ำเป็นเวลา 3 นาที เปรียบเทียบการเกิดสีที่ตำแหน่งต่างๆ บนกระดาษกรอง และบันทึกภาพโดยใช้ iPhone6 smartphone

### 2.4.3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการตรวจวัดด้วย Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) โดยใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเทียบกับตำแหน่งพีเอ็นเอที่ไม่ติดไบโอติน

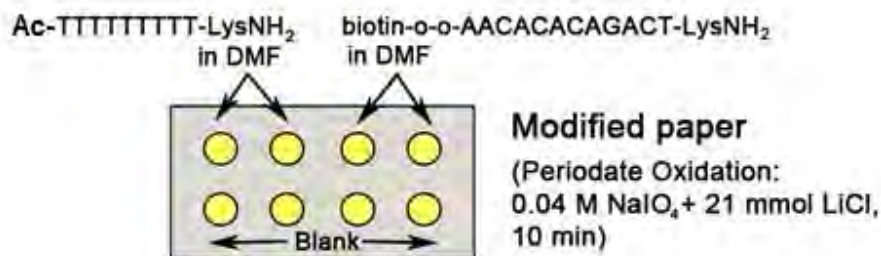


รูปที่ 2.8 แผนภาพแสดงการทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) กับพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอติน

การทดลองนี้พัฒนาขึ้นเนื่องจากการทดลองตรึง horseradish peroxidase (HRP) โดยอาศัยหลักอันตรกิริยาทางไฟฟ้าไม่ประสบผลสำเร็จ จึงเปลี่ยนวิธีโดยใช้ streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) ซึ่งอาศัยหลักการจับยึดการจำเพาะเจาะจงระหว่างไบโอตินและ streptavidin และปรับเปลี่ยนพื้นผิวก่อนการตรึง SA-HRP เพื่อลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง, ความเข้มข้นของ SA-HRP ที่ใช้, เวลาที่ใช้ตรึง SA-HRP และสภาวะที่ใช้ล้างกระดาดช โดยมียารละเอียดดังนี้

#### ภาวะมาตรฐานของการทดลอง

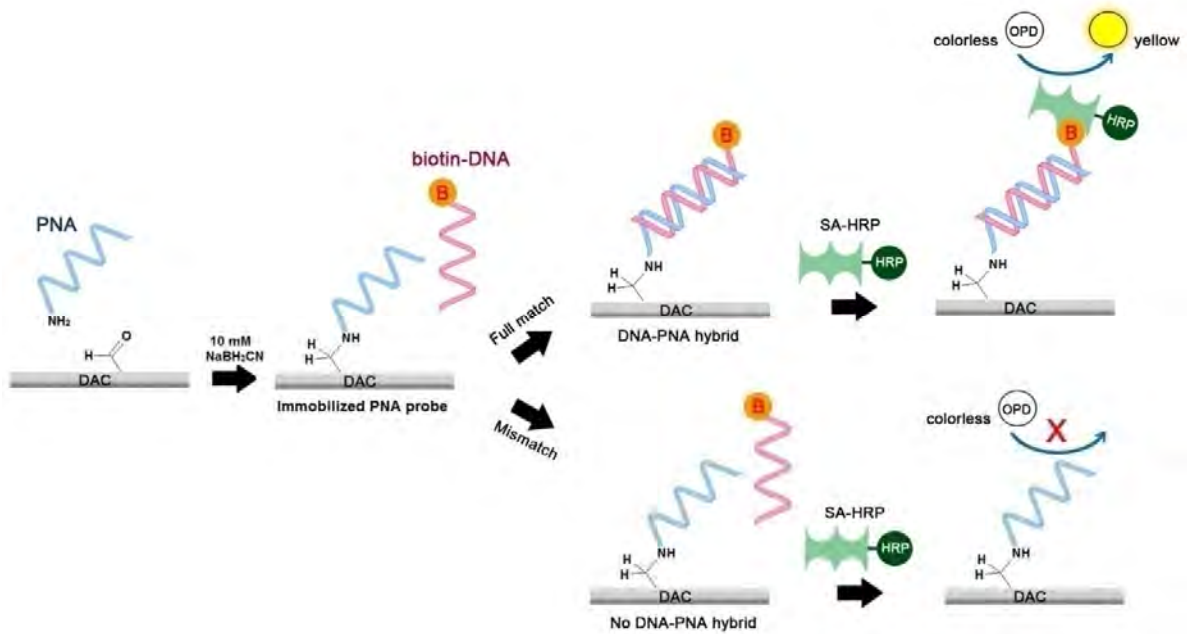
- การปรับเปลี่ยนพื้นผิวก่อนการตรึง SA-HRP: แช่กระดาดชกรองในสารละลาย 1% BSA เป็นเวลา 15 นาที
- การตรึง SA-HRP บนกระดาดชกรองตัดแปรพื้นผิวและการเกิดปฏิกิริยาส่งสี: หยดสารละลายของ SA-HRP ความเข้มข้น 20 µg/mL โดยมีโซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 5.0) เป็นตัวทำละลายลงบนกระดาดชกรองตัดแปรพื้นผิวบริเวณตำแหน่งที่ตรึงพีเอ็นเอและตำแหน่ง blank ตำแหน่งละ 0.5 µL ล้างกระดาดชกรองทันทีด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 0.05%, น้ำ และ ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 5.0) ชนิดละ 3 นาทีตามลำดับ จากนั้นแช่กระดาดชกรองในสารละลายผสมระหว่างออโร-ฟีนิลีนไดอะมีน (1.6 mg/mL) และยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (1.6 mg/mL) ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายทันที รอจนกระทั่งครบ 1 นาทีแล้วล้างกระดาดชกรองด้วยน้ำเป็นเวลา 3 นาที เปรียบเทียบการเกิดสีที่ตำแหน่งต่างๆ บนกระดาดชกรอง



รูปที่ 2.9 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) กับ พีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอติน เทียบกับตำแหน่งพีเอ็นเอที่ไม่ติดโมเลกุลไบโอติน

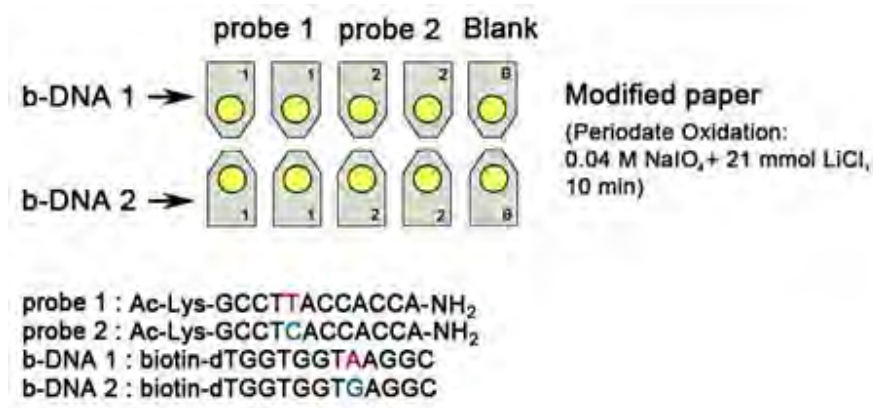
สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) กับ พีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอติน ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub> และ biotin-o-o-AACACACAGACT-LysNH<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10  $\mu$ M บนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิว (ปริมาณพีเอ็นเอต่อ 1 ตำแหน่งที่ตรึงคือ 1 pmol) ส่วนการทดลองควบคุมคือกระดาษตัดแปรพื้นผิวที่ไม่ได้ผ่านการตรึงพีเอ็นเอ ปรับเปลี่ยนพื้นผิวก่อนการตรึง SA-HRP และตรึง SA-HRP บนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิวและการเกิดปฏิกิริยาส่งสีตามภาวะมาตรฐานของการทดลอง บันทึกภาพโดยใช้ iPhone6 smartphone

2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความไวของการตรวจวัดและความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม

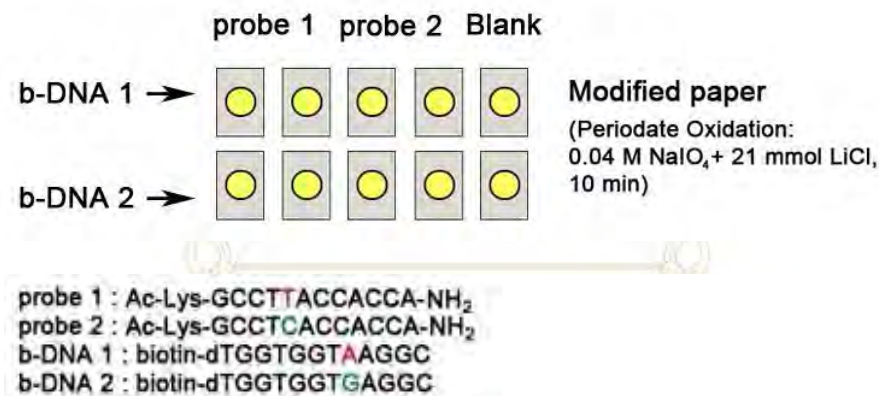


รูปที่ 2.10 แผนภาพแสดงการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพีเอ็นเอแอเรย์ ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สม โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าของเอนไซม์ Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP)

### 2.5.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความจำเพาะเจาะจงกับ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม



รูปที่ 2.11 การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม (วิธี Capillary Transport)

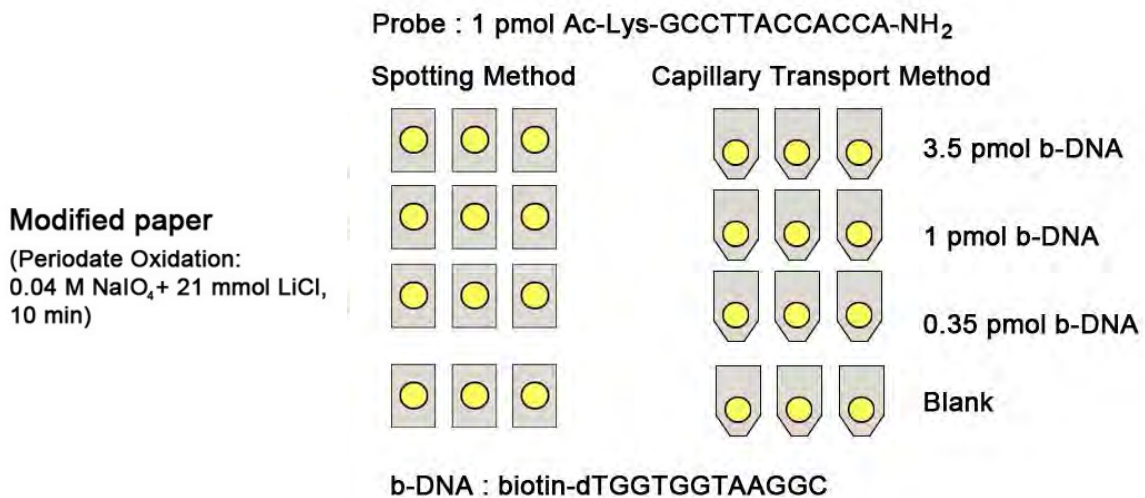


รูปที่ 2.12 การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม (วิธีหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง)

ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง Ac-Lys-GCCTCACCACCA-NH<sub>2</sub> และ Ac-Lys-GCCTTACCACCA-NH<sub>2</sub> ความเข้มข้น 100  $\mu$ M บนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิว (ปริมาณพีเอ็นเอต่อ 1 ตำแหน่งที่ตรึงคือ 10 pmol) สำหรับวิธี Capillary Transport และตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง Ac-Lys-GCCTCACCACCA-NH<sub>2</sub> และ Ac-Lys-GCCTTACCACCA-NH<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10  $\mu$ M บนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิว (ปริมาณพีเอ็นเอต่อ 1 ตำแหน่งที่ตรึงคือ 1 pmol) สำหรับวิธีหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง ส่วนการทดลองควบคุมคือกระดาษตัดแปรพื้นผิวที่ไม่ได้ผ่านการตรึงพีเอ็นเอ เตรียมสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่างได้แก่ biotin-dTGGTGGTAAGGC และ biotin-dTGGTGGTGAGGC ความเข้มข้น 2  $\mu$ M ในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 (0.0005%) ตรึง

ดีเอ็นเอโดยวิธี Capillary Transport โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ความเข้มข้น  $2 \mu\text{M}$  (รูปที่ 2.11) และใช้สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ความเข้มข้น  $2 \mu\text{M}$  นี้ สำหรับวิธีหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรงด้วย (รูปที่ 2.12) ปรับเปลี่ยนพื้นผิวก่อนการตรึง SA-HRP และตรึง SA-HRP บนกระดาษกรองตัดแปรรูปพื้นผิวและการเกิดปฏิกิริยาสร้างสีตามภาวะมาตรฐานของการทดลอง บันทึกภาพโดยใช้ iPhone6 smartphone ทำซ้ำ 2 ครั้ง ต่อ 1 ชนิดพีเอ็นเอ

## 2.5.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากขีดจำกัดของการตรวจวัด



รูปที่ 2.13 การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพีเอ็นเอแอเรียล จากขีดจำกัดของการตรวจวัด

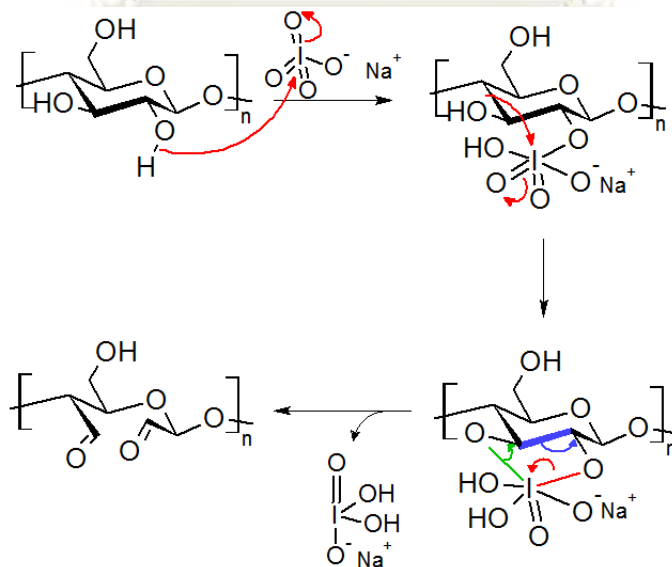
ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง Ac-Lys-GCCTTACCACCA-LysNH<sub>2</sub> ความเข้มข้น  $10 \mu\text{M}$  บนกระดาษกรองตัดแปรรูปพื้นผิว (ปริมาณพีเอ็นเอต่อ 1 ตำแหน่งที่ตรึงคือ 1 pmol) ส่วนการทดลองควบคุมคือกระดาษตัดแปรรูปพื้นผิวที่ไม่ได้ผ่านการตรึงพีเอ็นเอ เตรียมสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่าง biotin-dTGGTGGTAAGGC ความเข้มข้น  $0.2 \mu\text{M}$  และ  $2 \mu\text{M}$  โดยมีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ความเข้มข้น 0.01 M (pH 7.4) ผสมทวิน 20 0.0005% เป็นตัวทำละลาย ตรึงดีเอ็นเอโดยการให้เกิดการจับยึดกับพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรองตัดแปรรูปพื้นผิวทั้งวิธี Capillary Transport และการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง (เช่นเดียวกับวิธีในขั้นตอน 2.5.1) ปรับเปลี่ยนพื้นผิวก่อนการตรึง SA-HRP และตรึง SA-HRP บนกระดาษกรองตัดแปรรูปพื้นผิวและการเกิดปฏิกิริยาสร้างสีตามภาวะมาตรฐานของการทดลอง บันทึกภาพโดยใช้ iPhone6 smartphone ทำซ้ำ 3 ครั้ง ต่อ 1 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์กระดาษกรองที่ดัดแปรพื้นผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอเดตเพื่อให้เป็นหมู่แอลดีไฮด์

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจเตรียมดีเอ็นเอเซ็นเซอร์โดยมีวิวัฒนาการของแข็งที่เตรียมจากกระดาษกรอง เนื่องจากกระดาษกรองเป็นวัสดุหาง่าย, มีราคาถูก และที่สำคัญยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับสารชีวโมเลกุล โดยเซลลูโลสบนกระดาษกรองนั้นมีหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่พร้อมเกิดปฏิกิริยาต่างๆ<sup>33, 34</sup> โดยปัจจุบันมีการนำกระดาษกรองมาใช้เป็นวิวัฒนาการของแข็งในการเตรียมเซ็นเซอร์โดยผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการต่างๆเช่น การใช้ bis-electrophile<sup>35-37</sup> เพื่อให้ได้พื้นผิวที่ว่องไวสำหรับการตรึงโพรบที่เป็นสารชีวโมเลกุล หากแต่กระบวนการข้างต้นนั้นยุ่งยากและใช้สารเคมีที่มีราคาสูง ซึ่งผู้วิจัยเล็งเห็นถึงปัญหาดังกล่าวจึงได้พัฒนางานวิจัยที่มีจุดประสงค์มุ่งเน้นที่จะเตรียมดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่สามารถทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อนและมีราคาถูก โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลลูโลสด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอเดตโดยมีลิเทียมคลอไรด์ในระบบ ได้เป็นไดอัลไฮด์เซลลูโลสโดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ไอโอเดตออกซิเดชันของเซลลูโลส<sup>49</sup>

โดยโซเดียมเปอร์ไอโอเดตเป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีความเลือกจำเพาะต่อตำแหน่งในการเกิดปฏิกิริยา (Regioselectivity) ต่อหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็น 1,2-ไดออล ดังเช่นที่อยู่บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในโมเลกุลของกลูโคสของเซลลูโลส จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ระบบที่มีลิเทียมคลอไรด์จะส่งเสริมให้ปฏิกิริยาของโซเดียมเปอร์ไอโอเดตเกิดได้ดีขึ้น เนื่องจากลิเทียมไอออนจะเข้าไปแทรกตัวระหว่างหน่วยของกลูโคสในเซลลูโลส ทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสถูกทำลายจึงมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเพิ่มมากขึ้น สามารถเกิดปฏิกิริยาเปอร์ไอโอเดตออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น<sup>39</sup>

### 3.1.1 การหาสภาวะของระบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว

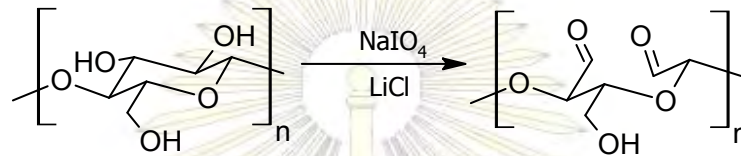
จากการทดลองศึกษาระบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวโดยเปรียบเทียบสภาวะในการออกซิไดซ์ทั้ง 4 สภาวะได้แก่ ระบบสารละลายผสมของโซเดียมเปอร์ไอโอเดต ( $\text{NaIO}_4$ ) และลิเทียมคลอไรด์ ( $\text{LiCl}$ ), ระบบที่มีเฉพาะโซเดียมเปอร์ไอโอเดต ( $\text{NaIO}_4$ ) 0.04 M, ระบบที่มีเฉพาะลิเทียมคลอไรด์ ( $\text{LiCl}$ ) 2.1 M และการทดลองควบคุมที่มีเฉพาะตัวทำละลายคือน้ำ ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้อ้างอิงจากงานวิจัยที่เคยศึกษาก่อนหน้านี้<sup>37</sup> และศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการออกซิไดซ์เซลลูโลสของแต่ละระบบในระยะเวลาต่างๆ โดยได้ทดลอง 5, 10, 15, 30 และ 60 นาทีตามลำดับ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเกิดหมู่ไดอัลดีไฮด์จากการเปลี่ยนสีของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลไฮดราซีน ซึ่งสามารถแสดงผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบเชิงคุณภาพของกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวที่สภาวะต่างๆด้วยสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนอลไฮดราซีน

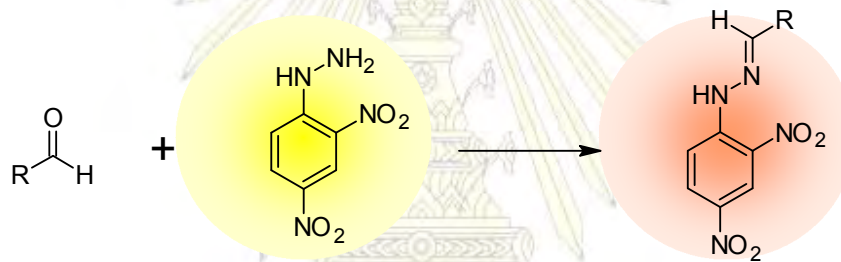
ระบบ	ระยะเวลา (นาที)				
	5	10	15	30	60
$\text{NaIO}_4$ (0.04 M) + $\text{LiCl}$ (2.1 M)					
$\text{NaIO}_4$ (0.04 M)					
$\text{LiCl}$ (2.1 M)					
น้ำ					



จากผลการทดลองพบว่าภายใน 5 นาทีแรก กระดาษกรองที่แช่ในระบบสารละลายผสมของโซเดียมเปอร์ไอโอดेटและลิเทียมคลอไรด์และระบบที่มีเฉพาะสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอดेटสามารถเปลี่ยนสีสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีนจากสีเหลืองเป็นสีส้มได้ ในขณะที่กระดาษกรองที่แช่ในสารละลายลิเทียมคลอไรด์และน้ำยังคงมีสีเหลืองเช่นเดิม ซึ่งสามารถเป็นการยืนยันว่าหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลสบนกระดาษกรองสามารถถูกออกซิไดซ์ด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอดेटได้เป็นสารประกอบไดแอลดีไฮด์ดังรูปที่ 3.2 ซึ่งหมู่คาร์บอนิลที่เกิดขึ้นสามารถเกิดปฏิกิริยาสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีนซึ่งมีสีเหลืองจนกลายเป็นสารประกอบไฮดราโซนซึ่งมีสีส้มแดง โดยมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.2 ปฏิกิริยาการทดสอบสารประกอบคาร์บอนิลด้วย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน



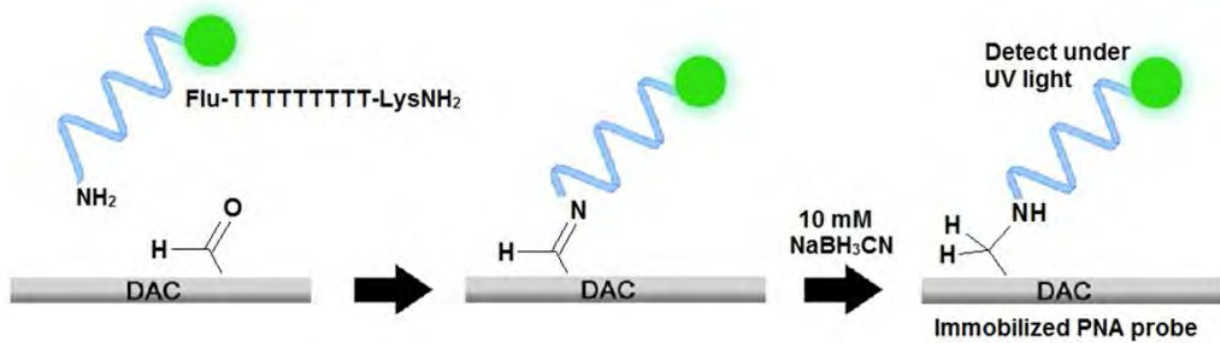
รูปที่ 3.3 ปฏิกิริยาการทดสอบแอลดีไฮด์ด้วย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสีส้มที่เกิดขึ้นระหว่างกระดาษกรองที่แช่ในระบบสารละลายผสมของโซเดียมเปอร์ไอโอดेटและลิเทียมคลอไรด์กับระบบที่มีเฉพาะสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอดेटที่ระยะเวลาเท่ากันพบว่ากระดาษกรองในระบบสารละลายผสมของโซเดียมเปอร์ไอโอดेटและลิเทียมคลอไรด์จะให้สีส้มที่เข้มกว่ากระดาษกรองจากระบบสารละลายที่มีเฉพาะโซเดียมเปอร์ไอโอดेट แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลสในระบบสารละลายผสมของโซเดียมเปอร์ไอโอดेटและลิเทียมคลอไรด์ถูกออกซิไดส์ได้มากกว่าทำให้ปริมาณแอลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นมีมากกว่าเช่นกัน ซึ่งผลของลิเทียมคลอไรด์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลลูโลสสอดคล้องกับที่ได้เคยมีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้<sup>50</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อกระดาษกรองถูกออกซิไดส์เป็นเวลานานกว่า 10 นาที กระดาษกรองที่ถูกดัดแปร มีลักษณะเปราะและเปื่อยยุ่ย ทั้งนี้เนื่องจากการดัดแปรพันธะโควาเลนต์จะทำให้เซลลูโลสสูญเสียความเป็นผลึก นั่นคือไดแอลดีไฮด์เซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างแบบอสัณฐานมากขึ้น อีกทั้งลิเทียมไอออนสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของเส้นใยเซลลูโลส ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น<sup>51</sup> ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระบบสารละลายผสมของโซเดียมเปอร์ไอโอดेट (0.04 M) และลิเทียมคลอไรด์ (2.1 M) และใช้เวลาในการออกซิไดซ์ 10 นาทีสำหรับเตรียมกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิว

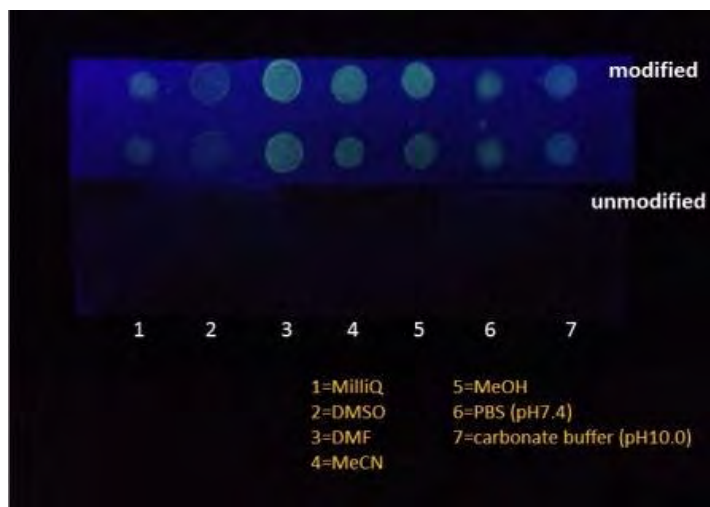
### 3.2 การตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรพื้นผิวเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์และการตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรึงพีเอ็นเอ

#### 3.2.1 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

หลังจากได้หาภาวะเหมาะสมในการตัดแปรพื้นผิวกระดาษกรอง และพิสูจน์ยืนยันการเกิดหมู่แอลดีไฮด์ได้แล้ว ในขั้นต่อมาเป็นการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างลงบนผิวของกระดาษกรองที่ถูกตัดแปร โดยเริ่มต้นจากการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง โดยระบบตัวทำละลายที่ผู้วิจัยต้องการศึกษานั้นได้แก่ น้ำ, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์, ไดเมทิลฟอร์มาไมด์, อะซิโตนไตรัล, เมทานอล, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.1 M (pH 7.4) และคาร์บอนเตตริเฟออร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 10.0) โดยพีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้คือ เอซีพีซีพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสซิน (Flu-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 100  $\mu$ M ที่เติมโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ (NaBH<sub>3</sub>CN) ความเข้มข้น 1 mg/mL (16 mM) โดยปริมาตรสุดท้ายที่ spot คือ 1  $\mu$ M ซึ่งคิดเป็นปริมาณพีเอ็นเอ 100 pmol/spot ติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ซึ่งจะบ่งบอกถึงปริมาณพีเอ็นเอที่ตรึงลงไปโดยผ่านปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิเลชัน ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นจากแอลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นบนผิวของกระดาษกรองเกิดปฏิกิริยา Schiff base กับหมู่อะมิโนของไลซีนที่ต่อกับปลายสายด้านหนึ่งของพีเอ็นเอตัวอย่างก่อนถูกรีดิวซ์ด้วยโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ดังรูปที่ 3.4

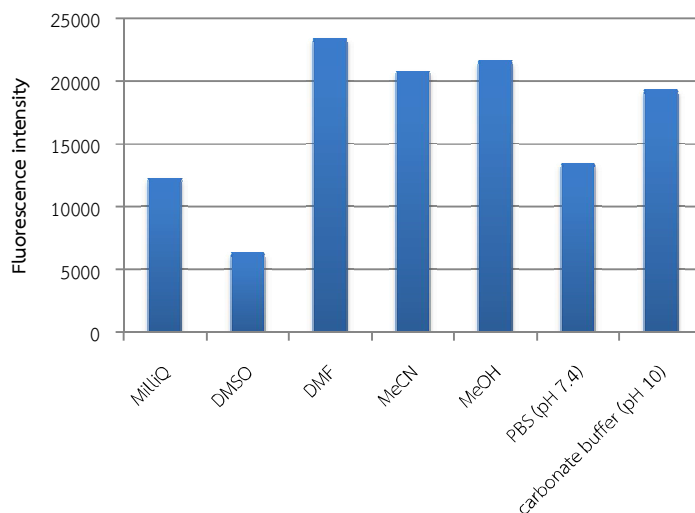


รูปที่ 3.4 วิธีการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปรพื้นผิวเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์



รูปที่ 3.5 สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอ Flu-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub> ที่ถูกตรึง

จากผลการทดลอง (รูปที่ 3.5) เมื่อให้ทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างพีเอ็นเอที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซิโตไนไตรล์ (อัตราส่วน 1:1) จากนั้นนำมาคำนวณความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ด้วยโปรแกรม ImageJ ของแต่ละระบบตัวทำละลายแล้วนำค่าที่ได้มาหักล้างกับสัญญาณพื้นหลัง (background) ได้ผลแสดงดังกราฟที่ 1

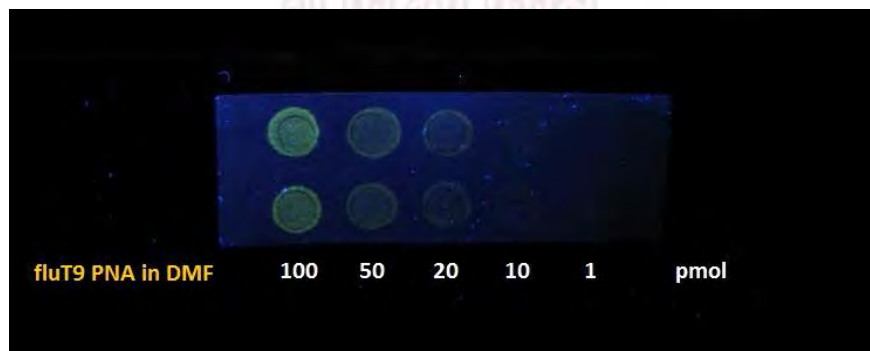


กราฟที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากการตรึงพีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซินด้วยระบบตัวทำละลายชนิดต่างๆจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

พบว่าระบบตัวทำละลาย ไดเมทิลฟอร์มาไมด์, อะซิโตไนไตรล์และเมทานอล ให้ค่าเฉลี่ยสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เข้มที่สุดเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ขณะที่ในน้ำ, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซาไลน์ (pH 7.4) และคาร์บอนเตตบัฟเฟอร์ (pH 10.0) ความเข้มข้น 0.1 M สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้เช่นกันแต่อ่อนกว่าใน 3 ระบบแรกทีกล่าวไปข้างต้น และในขณะที่ตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ให้สัญญาณที่อ่อนมากจนแทบไม่เห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เลยเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอ็นเอตัวอย่างที่ตรึงบนกระดาษกรองที่ไม่ได้ตัดแปรพื้นผิวพบว่าไม่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ในทุกกรณี ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการตรึงพีเอ็นเอเกิดผ่านปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันตามทีออกแบบไว้จริง ในการทดลองต่อไปได้เลือกใช้ระบบตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์เนื่องจากเป็นระบบที่ให้ประสิทธิภาพการตรึงที่ดี และเป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูง ขณะที่อะซิโตไนไตรล์และเมทานอลต่างก็มีจุดเดือดที่ต่ำทำให้การเตรียมสารละลายพีเอ็นเอตัวอย่างในไดเมทิลฟอร์มาไมด์มีความเข้มข้นที่แน่นอนกว่าในระบบอะซิโตไนไตรล์และเมทานอลซึ่งระเหยได้ง่าย นอกจากนี้การที่ตัวทำละลายมีจุดเดือดสูงจะทำให้พีเอ็นเอในสารละลายสัมผัสกับพื้นผิวกระดาษกรองยาวนานกว่าโดยไม่แห้งไปเสียก่อน ซึ่งน่าจะเป็นผลดีต่อประสิทธิภาพของการตรึงด้วย

### 3.2.2 การหาปริมาณพีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่เมื่อตรึงบนกระดาษกรองตัดแปรพื้นผิวแล้วยังสามารถมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ด้วยตาเปล่า

เมื่อได้สภาวะของการตรึงเรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนมาคือการศึกษากำหนดปริมาณของพีเอ็นเอที่ตรึงบนกระดาษที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจวัดสัญญาณได้ ขั้นตอนนี้มีความสำคัญเนื่องจากพีเอ็นเอโปรบสังเคราะห์ได้ยาก จึงจำเป็นต้องใช้ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจวัดสัญญาณได้ โดยเมื่อทดลองลดปริมาณของพีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซิน ( $\text{Flu-TTTTTTTTT-LysNH}_2$ ) จาก 100, 50, 20, 10 และ 1 pmol/spot ตามลำดับ แล้วสังเกตสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอ  $\text{Flu-TTTTTTTTT-LysNH}_2$  ที่ถูกตรึงปริมาณต่างๆ

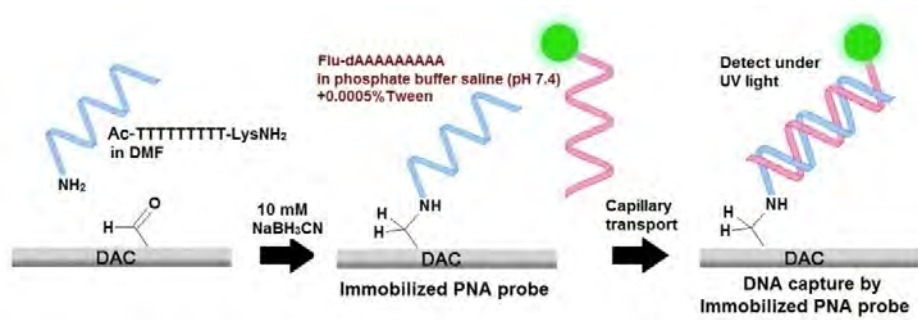
จากผลการทดลองพบว่าสามารถสังเกตสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสซินด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่ 254 นาโนเมตรตั้งแต่ 100, 50 และ 10 pmol/spot แสดงให้เห็นว่า ปริมาณต่ำสุดของพีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสซินที่ตรึงบนกระดาษกรองตัดแปรรูปผิวที่ยังคงสามารถเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ด้วยตาเปล่าคือ 10 pmol/4 mm<sup>2</sup>

### 3.3 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยอาศัยปฏิกิริยาส่งสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

#### 3.3.1 การตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากฟลูออเรสซิน

##### 3.3.1.1 การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Capillary Transport

เมื่อได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถตรึงพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงบนกระดาษกรองตัดแปรรูปผิวได้เป็นผลสำเร็จในขั้นตอนต่อไปเป็นการทดลองตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่ได้ติดฉลากเรืองแสง เพื่อใช้เป็นโพรบสำหรับดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ ซึ่งในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกใช้พีเอ็นเอตัวอย่างที่มีลำดับเบส Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub> ความเข้มข้น 100 μM ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่มีโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ (16 mM) อยู่ด้วย หยดพีเอ็นเอตัวอย่างลงบนกระดาษกรองที่ถูกตัดแปรรูปผิวจุดละ 0.1 μL เมื่อผู้วิจัยสามารถเตรียมดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ตามกระบวนการข้างต้นได้แล้ว ขั้นตอนจะนำดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่ได้มาตรวจสอบการจับยี่กับดีเอ็นเอตัวอย่าง ซึ่งในขั้นตอนของการพิสูจน์หลักการ ผู้วิจัยเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันกับพีเอ็นเอคือ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกับโพรบและติดฉลากด้วยฟลูออเรสซิน Flu-dAAAAAAAA เพื่อที่จะสามารถติดตามการจับยี่กันระหว่างพีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอจากการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของโมเลกุลฟลูออเรสซินที่ติดอยู่บนดีเอ็นเอตัวอย่าง ดังหลักการที่แสดงในรูปที่ 3.7



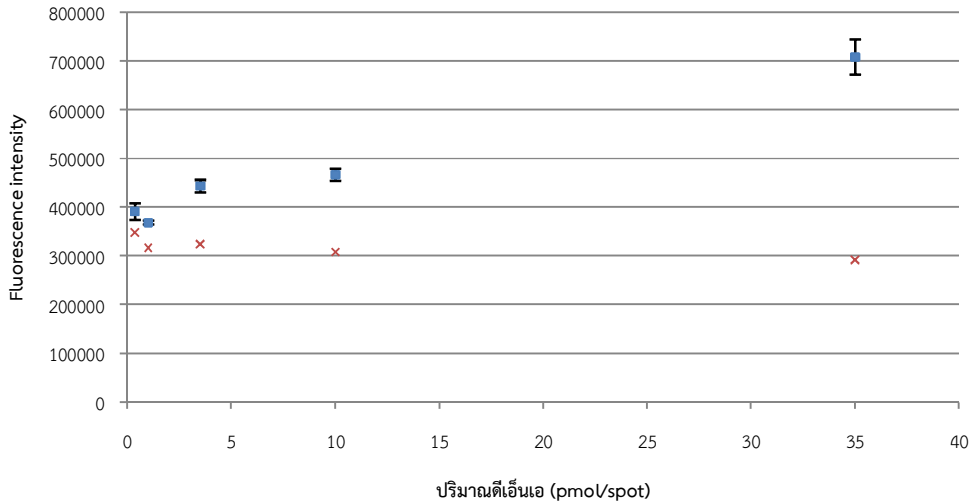
รูปที่ 3.7 แผนภาพแสดงวิธีการทดสอบการจับยี่ตรงระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากฟลูออเรสเซิน

โดยในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิค capillary transport<sup>52</sup> ในการตรวจวัด เนื่องจากการศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (อ้างถึง ณัฐพล จิระกิตติวุฒิ, ผลงานที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์) ได้พบว่ามียีนบาง sequence เกิด non-specific binding กับกระดาษกรอง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาข้างต้น ผู้วิจัยจึงใช้วิธี capillary transport แทนการหยดดีเอ็นเอโดยตรงโดยมีหลักการคือ ผู้วิจัยจะตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างลงบนกระดาษกรองจากนั้นจุ่มปลายด้านหนึ่งของกระดาษกรองลงในสารละลายดีเอ็นเอโดยค่อยๆให้สารละลายดีเอ็นเอถูกดูดซับขึ้นไปบนแผ่นกระดาษกรองจนทั่วทั้งแผ่นก่อนจะนำไปล้างสารละลายดีเอ็นเอออก ซึ่งในการทดลองนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้โดยสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากฟลูออเรสเซินที่ 35, 10, 3.5, 1.0 และ 0.35 pmol/spot ตามลำดับ ในขณะที่ใช้พีเอ็นเอโพรบตรึงลงบนกระดาษกรองตัดแปรในปริมาณคงที่ที่ 10 pmol/spot ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัญญาณฟลูออเรสเซินที่ 254 นาโนเมตรที่สังเกตเห็นเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสเซินลง (การไฮบริดซ์ทำโดยเทคนิค capillary transport)

ปริมาณ Flu-dAAAAAAAAA (pmol/spot)	สัญญาณฟลูออเรสเซินที่ 254 nm
35	
10	
3.5	
1.0	
0.35	

เมื่อนำภาพถ่ายที่ได้มาคำนวณความสว่างด้วยโปรแกรม ImageJ สามารถเปรียบเทียบระหว่างความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆเปรียบเทียบกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปรที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (Blank) ได้ดังกราฟที่ 2



กราฟที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆเปรียบเทียบกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปรที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (blank) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค capillary transport, error bar แสดงค่า SD จากการทดลอง 3 ครั้ง

- (■) สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัด
- (×) ความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปร






จากผลคำนวณเปรียบเทียบสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปร พบว่าเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสซินลง ความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ก็จะลดลงเช่นกันโดยที่ปริมาณ 0.35 pmol/spot เป็นปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสซินที่น้อยที่สุดที่ยังคงสามารถมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หากแต่เมื่อพิจารณาความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่คำนวณได้ โพรบที่ถูกตรึงบนดีเอ็นเอเช่นเซอร์นั้นมีความเข้มข้นจำกัดที่ 10 pmol/spot ดังนั้นความสว่างที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ปริมาณ 35 และ 10 pmol/spot ก็ควรจะมีความเท่ากัน เนื่องจากปริมาณของโพรบเป็นตัวกำหนด แต่จากผลการทดลองพบว่า ยิ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างมากขึ้น สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้กลับยิ่งสว่างมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการใช้เทคนิค capillary transport จะใช้ตัวทำละลายเป็นตัวกลางพาดีเอ็นเอตัวอย่างขึ้นไปหาพีเอ็นเอที่ถูกตรึง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวอาจทำให้ดีเอ็นเอตัวอย่างบางส่วนแพร่ไปยังบริเวณที่ไม่มีโพรบ ส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดการเข้าคู่กัน

กับพีเอ็นเอที่ถูกตรึงน้อยกว่า 100% หรืออีกเหตุผลหนึ่งคือประสิทธิภาพของการจับยี่ระหว่างดีเอ็นเอกับพีเอ็นเอโพรบที่ถูกตรึงไม่เป็น 100% โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำให้ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

### 3.3.1.2 การตรวจสอบความสามารถในการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอโดยการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง

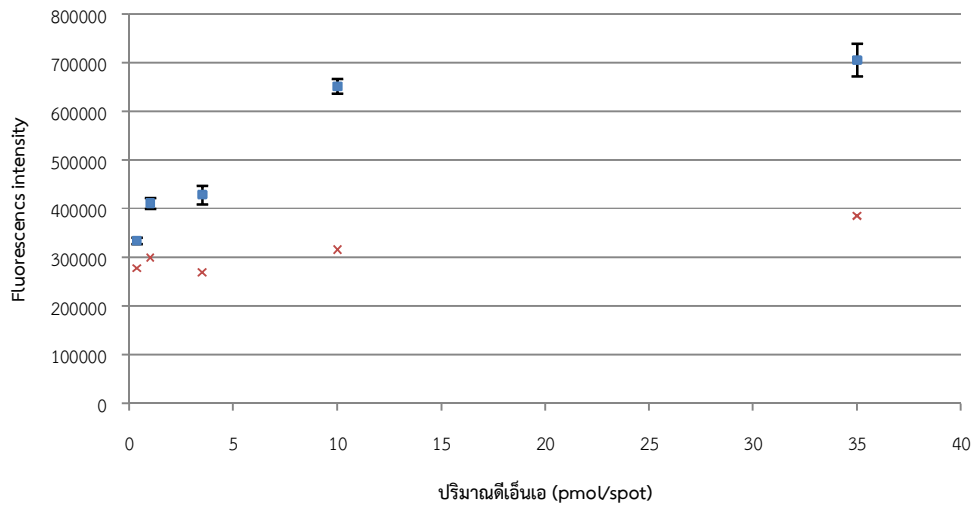
จากปัญหาการทดลองที่ 3.3.1.1 ผู้วิจัยจึงพัฒนาการตรวจวัดโดยใช้วิธีหยดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซินลงบนพีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรึงโดยตรงเพื่อเพิ่มปริมาณการจับกันระหว่างโพรบและดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรงพีเอ็นเอตัวอย่างที่มีลำดับเบส Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub> ปริมาณ 10 pmol/spot และใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซิน Flu-dAAAAAAAAA ที่ปริมาณ 35, 10, 3.5, 1.0 และ 0.35 pmol/spot ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 254 นาโนเมตรที่เกิดขึ้นเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซินลงเมื่อตรวจวัดโดยหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง

ปริมาณ Flu-dAAAAAAAAA (pmol/spot)	สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 254 nm
35	
10	
3.5	
1.0	
0.35	

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลฟลูออเรสซินปริมาณ 0.35 pmol/spot ยังสามารถมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อนำภาพถ่ายที่ได้มาคำนวณความสว่างด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่าเมื่อความสว่างของสัญญาณบริเวณโพรบที่ปริมาณต่างๆ สามารถเขียนความสัมพันธ์ได้ดังกราฟที่ 3





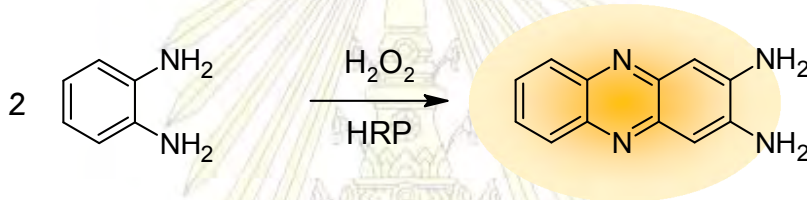
**กราฟที่ 3** ความสัมพันธ์ระหว่างความสว่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆ เปรียบเทียบกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปรที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (blank) ที่ตรวจวัดโดยการหยดดีเอ็นเอโดยตรง, error bar แสดงค่า SD จากการทดลอง 3 ครั้ง

- (■) สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัด
- (×) ความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปร

จากผลการคำนวณความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ โดยเปรียบเทียบสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จากการตรวจวัดกับความสว่างพื้นหลังของกระดาษกรองตัดแปร พบว่า ความสว่างที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีปริมาณ 35 และ 10 pmol/spot มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับความจริงที่ว่าโพรบที่ถูกตรึงมีปริมาณจำกัดเพียง 10 pmol/spot เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดโดยการหยดดีเอ็นเอโดยตรงนั้นสามารถลดปัญหาการสูญเสียดีเอ็นเอบางส่วนจากการแพร่ของตัวทำละลายและเพิ่มโอกาสให้ดีเอ็นเอตัวอย่างเข้าคู่กับพีเอ็นเอโพรบได้มากขึ้น

### 3.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตรึงกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันโดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากไบโอดีนร่วมกับการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์

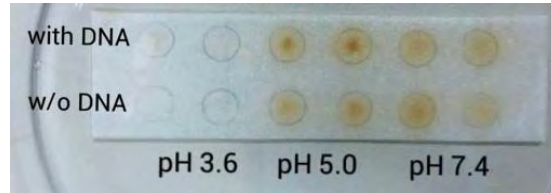
การทดลองมีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจสอบการยึดจับกันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอโพรบโดยมุ่งเน้นเทคนิคการตรวจวัดที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ฉลากเรืองแสง ซึ่งมีราคาแพง และความไวยังต่ำอยู่ ผู้วิจัยจึงสนใจนำปฏิกิริยาสีด้วยเอนไซม์ ที่ทำได้สะดวก และมีความไวสูง และเป็นที่ยอมรับใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอหรือโปรตีนโดยเทคนิค dot blot<sup>45</sup> และ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)<sup>30</sup> สำหรับงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจเลือกใช้ปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างโมเลกุลของออโร-ฟีนีลีนไดอะมีน (OPD) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองเข้มดังแสดงในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 ปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างออโร-ฟีนีลีนไดอะมีน (OPD) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เนื่องจากมีรายงานมาก่อนหน้านี้<sup>46</sup> ว่า HRP ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประจุบนพื้นผิวเป็นบวกสามารถยึดจับกับดีเอ็นเอได้โดยแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต จึงอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการจับยึดของดีเอ็นเอกับพีเอ็นเอโพรบบนพื้นผิวกระดาษได้โดยตรง โดยในขั้นตอนแรกผู้วิจัยได้พิสูจน์หลักการข้างต้นด้วยดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีลำดับเบสเป็น CGAGGATGGCGCCCCGGCGCCATGGATAGAGCAGGAGGGG ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนที่ทำให้เกิดการแพ้ยาซึ่งแสดงอาการออกทางผิวหนัง (HLA B\*5701)<sup>53</sup> ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าดีเอ็นเอลำดับเบสดังกล่าวสามารถยึดจับกับกระดาษกรองอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific binding) จึงสามารถตรงลงไปบนกระดาษเซลลูโลสที่ไม่ได้ดัดแปรพื้นผิวได้โดยตรง โดยจะใช้ HLA B\*5701 เข้มข้น 0.1 mM หยดบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวจุดละ 1  $\mu$ L แล้วหยดด้วยสารละลายของเอนไซม์ HRP เข้มข้น 0.5 mg/mL โดยในการทดลองจะศึกษาสถานะเหมาะสมที่ทำให้ปฏิกิริยาการสร้างสีเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆที่มี pH อยู่ในช่วงที่เป็นกรดส่วนใหญ่ เนื่องจากเอนไซม์ HRP ในพีเอชที่เป็นกรดจะอยู่ในรูปประจุบวกทำให้สามารถยึดจับด้วยอันตรกิริยาทางไฟฟ้ากับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบของหมู่ฟอสเฟตบนโครงสร้างได้ โดยในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบกันระหว่าง โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M (pH 3.6), โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M (pH 5.0) และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซาลีน ความเข้มข้น 0.1 M (pH 7.4) ตามลำดับ ลงบนบริเวณที่มีดีเอ็นเอ จุดละ 1  $\mu$ L ทำจุดละ 2

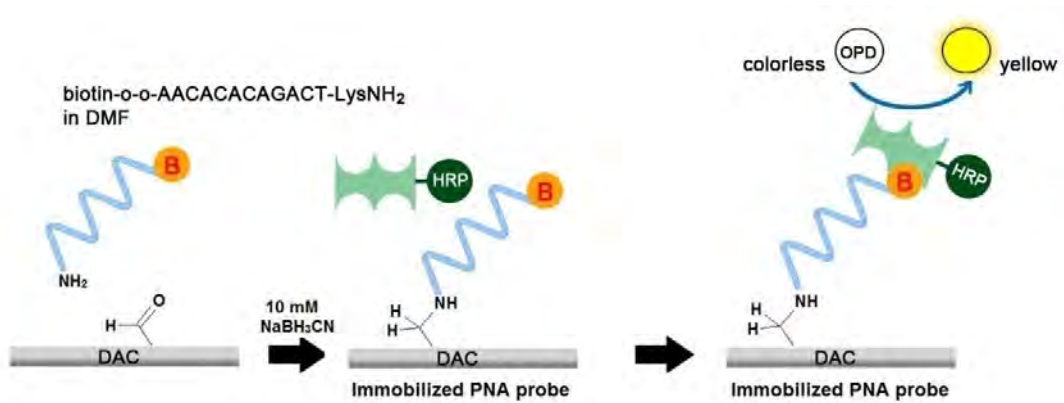
ซ้ำ รอกจนกระทั่งครบ 1 ชั่วโมงแล้วล้างออกด้วยน้ำ แข่งกระดาษกรองลงในสารละลายของ OPD และยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อทดสอบการเปลี่ยนสี ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการสร้างสีด้วยเอนไซม์ HRP ที่ pH ต่างๆ

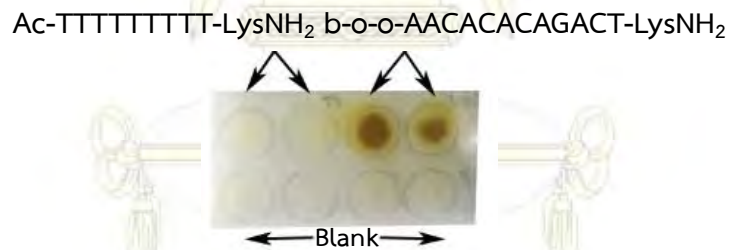
จากผลการทดลองพบว่า ที่ pH 5.0 เอื้อให้เกิดปฏิกิริยาสร้างสีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เพราะจะให้สีเหลืองเข้มชัดเจนที่สุด แต่พบว่าบริเวณที่มีดีเอ็นเอและบริเวณที่ไม่มีดีเอ็นเอ (blank) มีสีเข้มใกล้เคียงกัน แสดงว่าเอนไซม์ HRP สามารถเกิด non-specific binding กับกระดาษกรอง และเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอชต่ำเกินไปก็จะไม่เกิดสีเหลืองเลยทั้งในกรณีที่มีและไม่มีดีเอ็นเอ

จากปัญหาข้างต้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนไปใช้ปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นโดยการติดฉลากในส่วนของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยไบโอดีนและอาศัยอันตรกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างไบโอดีนและสเตรปตาวิดินเพื่อตรึงเอนไซม์ HRP ที่คอนจูเกตอยู่กับสเตรปตาวิดิน (SA-HRP) เข้าไปบนตัวอย่างและออกแบบการทดลองเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของการตรวจวัดโดยจะแช่ดีเอ็นเอเช่นเซอร์ที่ผ่านการไฮบริดลงในสารละลาย BSA เข้มข้น 1% และล้าง SA-HRP หลังหยดทันที เพื่อลดการเกิด non-specific binding ของ SA-HRP บนผิวกระดาษกรองตัดแปร โดยในการทดลองเบื้องต้นเพื่อพิสูจน์หลักการจะยังไม่ใช้ดีเอ็นเอ แต่จะนำพีเอ็นเอที่ติดฉลากไบโอดีนมาตรึงลงไปบนพื้นผิวกระดาษกรองที่ผ่านการตัดแปร เปรียบเทียบกับพีเอ็นเอที่ไม่ได้ติดฉลาก และนำไปทำปฏิกิริยาสร้างสีด้วยเอนไซม์ เพื่อดูว่าฉลากไบโอดีนที่อยู่บนพื้นผิวกระดาษจะสามารถจับยึด SA-HRP ไว้ได้ และสามารถทำให้เกิดสีได้จริง และไม่มี non-specific binding ระหว่าง SA-HRP กับกระดาษ และกับพีเอ็นเอโพรบ โดยมีหลักการดังแสดงในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 แผนภาพแสดงการพิสูจน์หลักการตรวจวัดพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอตินโดยใช้ SA-HRP

ในเบื้องต้นผู้วิจัยจะศึกษาความจำเพาะเจาะจงของการจับยี่ระหว่าง SA-HRP กับไบโอติน โดยเปรียบเทียบระหว่างพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (b-o-o-AACACACAGACT-LysNH<sub>2</sub>) และพีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่มีฉลากไบโอติน (Ac-TTTTTTTTT-LysNH<sub>2</sub>) ชนิดละ 10 pmol/2.5 mm<sup>2</sup> ทำซ้ำจุดละ 2 ครั้ง เปรียบเทียบกับบริเวณที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง (blank) หลังจากให้ทำปฏิกิริยาส่งสีกับออร์โธ-ฟีนีลีนไดอะมีน (OPD) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์-ยูเรีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.11



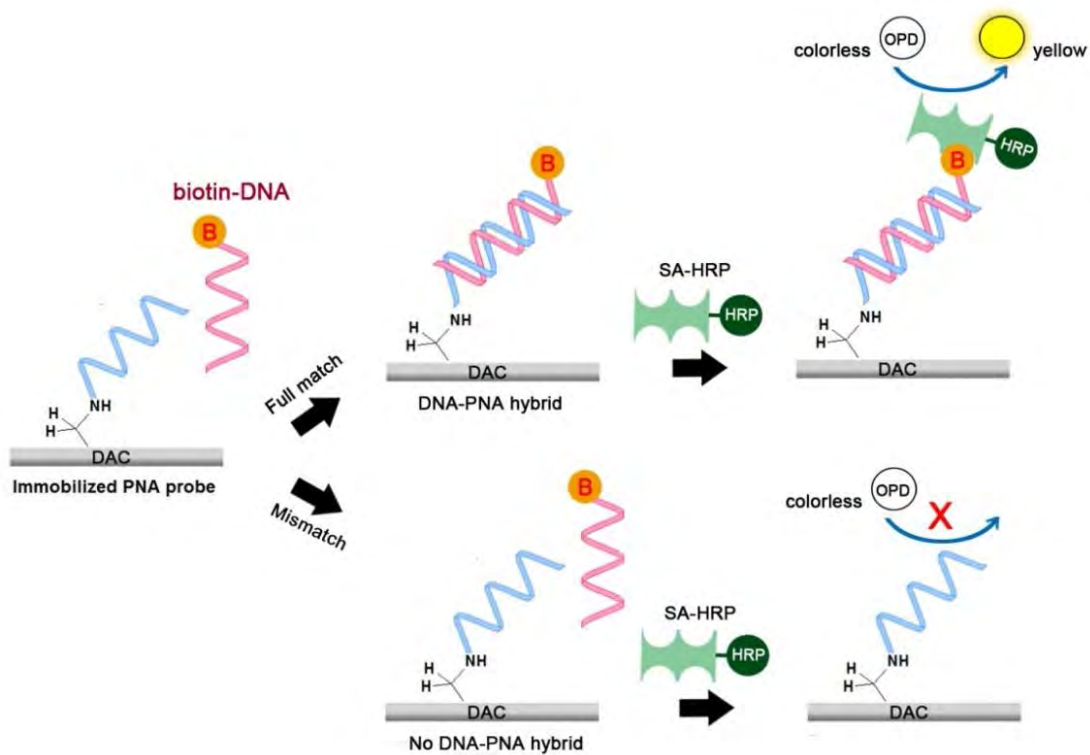
รูปที่ 3.11 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่าง SA-HRP กับพีเอ็นเอที่ติดโมเลกุลไบโอตินเปรียบเทียบกับตำแหน่งพีเอ็นเอที่ไม่ติดโมเลกุลไบโอติน

จากผลการทดลองพบว่า เฉพาะบริเวณที่มีการตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเท่านั้นที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรต OPD ได้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงได้จากเกิดจุดสีเหลืองที่บริเวณที่ตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลไบโอตินเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานานจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่บริเวณที่ตรึงพีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลากไบโอตินนั้นจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับบริเวณที่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (blank) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าการตรวจวัดพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินโดยใช้ปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสับสเตรต OPD และยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมี SA-HRP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับเฉพาะพีเอ็นเอที่ติดฉลากไบโอตินเท่านั้น โดยไม่มีการรบกวนโดยพีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลาก และพื้นผิวกระดาษ ทั้งที่ผ่านการดัดแปรให้เป็นแอลดีไฮด์และที่ไม่ผ่านการดัดแปร ทั้งยังสามารถตรวจวัดพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากด้วยไบโอตินได้แม้มีปริมาณเพียง 10 pmol/spot

### 3.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากความไวของการตรวจวัดและความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม

#### 3.4.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม

เมื่อผู้วิจัยสามารถทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการตรวจวัดพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดโมเลกุลไบโอดีนโดยใช้ปฏิกิริยารีดอกซ์ที่สามารถทำให้เกิดสีระหว่างสับสเตรต OPD และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมี SA-HRP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้แล้ว ต่อมาผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาวิธีการตรวจวัดการยึดจับกันระหว่างพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่เป็นคู่สมโดยใช้ปฏิกิริยาส่งสีด้วยเอนไซม์ โดยมีหลักการดังแสดงในรูปที่ 3.12



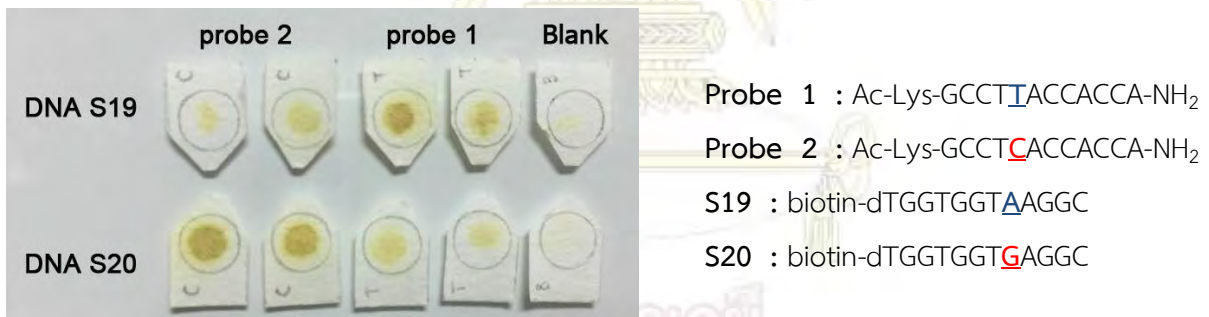
รูปที่ 3.12 แผนภาพแสดงการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมโดยใช้ปฏิกิริยาส่งสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าของเอนไซม์ Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP)

โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจะตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวเพื่อเป็นดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ จากนั้นนำมาตรวจวัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่เป็นคู่สมโดยใช้ดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอดีนที่ปลายสาย เมื่อเกิดการยึดจับกันระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน เมื่อเติม SA-HRP ลงไป ส่วนของ SA จะยึดจับกับโมเลกุลของไบโอดีนได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถเกิดปฏิกิริยาส่งสีของ OPD กับยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้บริเวณดังกล่าว แต่ถ้าดีเอ็นเอตัวอย่างมีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอโพรบก็จะไม่เกิดการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอ

และดีเอ็นเอ ทำให้ไม่เกิดการตรึง SA-HRP บนพื้นผิวกระดาษ เมื่อเติมสับสเตรต OPD และยูเรีย-ไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ก็จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ผู้วิจัยสนใจศึกษาประสิทธิภาพการตรวจสอบการยึดจับระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอตัวอย่างจากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเซ็นเซอร์อยู่ 1 ตำแหน่ง (single mismatch) ซึ่งเป็นการตรวจวัดแบบที่ทำหายที่สุด ในการทดลองนี้จะใช้พีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิด ได้แก่ Ac-Lys-GCCTIACCACCA-NH<sub>2</sub> (Probe 1) และ Ac-Lys-GCCTCACCACCA-NH<sub>2</sub> (Probe 2) ชนิดละ 10 pmol/spot และใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากด้วยไบโอดีน 2 ชนิด ได้แก่ ดีเอ็นเอตัวอย่าง biotin-dTGGTGGTAAGGC (S19) และ biotin-dTGGTGGTGAGGC (S20) ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับพีเอ็นเอ Probe 2 และพีเอ็นเอ Probe 1 ตามลำดับ ซึ่งดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของโปรตีนในเม็ดเลือดที่เรียกว่า Hemoglobin E (HbE) ซึ่งก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดบีต้า<sup>54</sup> โดยดีเอ็นเอ S19 คือ ยีนที่ปกติในมนุษย์ ขณะที่ดีเอ็นเอ S20 คือ ยีนผิดปกติ

ในการทดลอง ผู้วิจัยได้ทำให้พีเอ็นเอโพรบยึดจับกับดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิค capillary transport โดยจับคู่ระหว่างพีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอตัวอย่างให้ครบทั้ง 4 รูปแบบที่เป็นไปได้ โดยทำชนิดละ 2 ซ้ำและตรวจวัดโดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีเทียบกับบริเวณที่ผ่านชั้นตอนเดียวกันแต่ไม่ตรึงพีเอ็นเอ (blank) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 การทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมจากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมโดยเทคนิค Capillary transport

จากผลการทดลองพบว่า probe 1 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นจุดสีเหลืองเข้มกว่าในกรณีของการจับคู่กับดีเอ็นเอตัวอย่าง S19 เท่านั้น ขณะที่ probe 2 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงชัดเจนกว่าในบริเวณที่เกิดการเข้าคู่กับ S20 เนื่องจากพีเอ็นเอ probe 1 มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสบนดีเอ็นเอตัวอย่าง S19 อย่างสมบูรณ์แต่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สม 1 เบส (single mismatch) กับดีเอ็นเอตัวอย่าง S20 จึงทำให้ไม่เกิดการยึดจับกันระหว่าง probe 1 กับดีเอ็นเอตัวอย่าง S20 แต่จะเกิดการยึดจับกันดีกับดีเอ็นเอตัวอย่าง S19 จากนั้นเมื่อเติม SA-HRP สับสเตรต OPD กับยูเรีย-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป ดังนั้นจึงสามารถแสดงให้เห็นได้ว่าดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่ได้มีความจำเพาะ

เจาะจง (specificity) กับดีเอ็นเอที่ติดฉลากไปโอตินเป้าหมายที่เป็นคู่สมโดยสามารถแยกความแตกต่างของลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ และสามารถตรวจสอบความแตกต่างของการยึดจับกันระหว่างพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอคู่สมที่ติดฉลากไปโอตินได้ด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสับสเตรต OPD และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมี SA-HRP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามยังพบปัญหาอยู่บ้างคือมีการเกิดสีเหลืองอ่อนๆ เมื่อพีเอ็นเอและดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สมกัน ซึ่งแตกต่างจาก blank experiment แสดงว่าน่าจะเกิดจากการที่ single base mismatch PNA-DNA ไฮบริดยังมีความเสถียรพอสมควร จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไปเพื่อหาวิธีเพิ่มความจำเพาะเจาะจงให้ดียิ่งขึ้น

จากนั้นทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น หากแต่จะใช้วิธีการหยดดีเอ็นเอที่ติดฉลากไปโอตินลงบนพีเอ็นเอโพรบทั้งสองโดยตรงได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.14









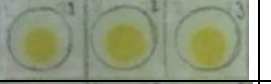



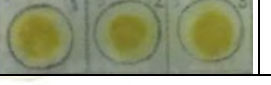

รูปที่ 3.14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมจากความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมโดยหยดดีเอ็นเอคู่สมโดยตรง

จากผลการทดลองพบว่าการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างติดฉลากไปโอตินโดยตรงก็ให้ผลสอดคล้องกับการใช้เทคนิค capillary transport แต่มี non-specific interaction มากกว่า สังเกตได้จาก background ที่ค่อนข้างเข้มใน blank ดังนั้นสำหรับการตรวจวัดด้วยปฏิกิริยาส่งสีด้วยเอนไซม์ การใช้วิธี capillary transport น่าจะให้ผลดีกว่า

### 3.4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากขีดจำกัดของการตรวจวัด

เมื่อได้ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมแล้ว ลำดับถัดมาเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากขีดจำกัดในการตรวจวัดโดยอาศัยปฏิกิริยาส่งสีด้วยเอนไซม์ในการทดลองนี้จะตรึงพีเอ็นเอตัวอย่าง Ac-Lys-GCCTIACCACCA-NH<sub>2</sub> (Probe 1) ปริมาณ 1 pmol/spot บนกระดาษกรองตัดแปรรูปและใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างติดฉลากไปโอติน biotin-dTGGTGGTAAGGC (S19) ในปริมาณ 3.5, 1.0 และ 0.35 pmol/spot โดยเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้เทคนิค capillary transport และการหยดดีเอ็นเอติดฉลากไปโอตินที่เป็นคู่สมโดยตรงได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอเซ็นเซอร์จากขีดจำกัดของการตรวจวัดโดยการลดปริมาณดีเอ็นเอติดฉลากไบโอดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมด้วยเทคนิค Capillary transport และวิธีการหยดดีเอ็นเอโดยตรง

DNA (pmol/spot)	Capillary Transport		Spotting Method	
		Blank		Blank
3.5				
1				
0.35				

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอติดฉลากไบโอดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมลงจาก 3.5 pmol/spot จนมีปริมาณเพียง 0.35 pmol/spot ยังคงสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีบริเวณพีเอ็นเอโพรบที่ตรวจวัดได้ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่ได้มีขีดจำกัดในการตรวจวัด (limit of detection) ต่ำ เนื่องจากเอนไซม์สามารถขยายสัญญาณ (signal amplification)<sup>44</sup> ทำให้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอติดฉลากไบโอดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอโพรบได้ในปริมาณที่น้อยมาก



## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์กระดาษกรองที่ดัดแปรพื้นผิวเพื่อให้เป็นหมู่แอลดีไฮด์โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยโซเดียมเปอร์ไอโอเดต-ลิเทียมคลอไรด์ เพื่อนำไปใช้เป็นวัสดุของแข็งในการตรึงพีเอ็นเอในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ โดยสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลไฮดราซีน

จากการทดลองตรึงพีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดฉลากฟลูออเรสซินบนกระดาษกรองที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรึงพีเอ็นเอภายใต้ภาวะของการตรึงต่างๆ โดยการสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าภาวะของการตรึงที่เหมาะสมคือ ระบบสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ที่มีไดเมทิลฟอร์มาไมด์เป็นตัวทำละลาย โดยปริมาณพีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซินที่น้อยที่สุดที่ยังมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ด้วยตาเปล่าเท่ากับ 10 pmol/spot จากนั้นจึงนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ไม่ติดฉลากเพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ โดยได้ตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ตรงระหว่างพีเอ็นเอโพรบที่ถูกตรึงบนกระดาษกรองดัดแปรพื้นผิวกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน เริ่มต้นจากการนำตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอติดฉลากฟลูออเรสซินที่เป็นคู่สมกันกับพีเอ็นเอโพรบ มาทำให้เกิดเป็นไฮบริดของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอบนพื้นผิวกระดาษด้วยเทคนิค capillary transport เปรียบเทียบกับการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง พร้อมทั้งตรวจสอบความสามารถในการจับยี่ตรงภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์มีขีดจำกัดในการตรวจวัด (detection limit) ที่ต่ำถึง 0.35 pmol/spot แล้วยังคงมองเห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ด้วยตาเปล่า โดยการหยดดีเอ็นเอโดยตรงให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ชัดเจน และมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากการทำ capillary transport มีดีเอ็นเอบางส่วนที่ไม่ได้เกิดเป็นไฮบริดกับพีเอ็นเอโพรบทั้งหมด

นอกจากนี้ เพื่อหลีกเลี่ยงการติดฉลากดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยฉลากเรืองแสงซึ่งมีราคาแพงและขีดจำกัดของการตรวจวัดยังไม่ดีนัก จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยอาศัยปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ o-phenylenediamine (OPD) โดยมีเอนไซม์ horseradish peroxidase ที่เชื่อมต่อกับสเตรปตาวิดิน (SA-HRP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสร้างสี ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สีเหลืองที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากการทดลองพบว่าสามารถตรึงพีเอ็นเอโพรบเพียง 1 pmol/spot แล้วยังเห็นจุดสีชัดเจนอยู่ และจากการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด พบว่าสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอติดฉลากไปโอตินที่มีปริมาณเพียง 0.35 pmol/spot แล้วยังมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจน อีกทั้งดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่ได้ยังมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ที่ดีโดยสามารถแยกแยะความ

แตกต่างของดีเอ็นเอที่ติดฉลากไปโอดิน 2 สายที่มีลำดับเบสต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง (single mismatch) ได้ทั้งเทคนิค capillary transport และการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างโดยตรง



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

- 1 Baur, J.; Gondran, C.; Holzinger, M.; Defrancq, E.; Perrot, H.; Cosnier S. Label-Free Femtomolar Detection of Target DNA by Impedimetric DNA Sensor Based on Poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid) Film. *Anal. Chem.* **2010**, *89*(3), 1066-1072.
- 2 Akane, A.; Seki, S.; Shiono, H.; Nakamura, H.; Hasegawa, M.; Kagawa, M.; Matsubara, K.; Nakahori, Y.; Nagafuchi, S.; Nakagome, Y. Sex Determination of Forensic Samples by Dual PCR Amplification of an X-Y Homologous Gene. *Forensic Sci. Int.* **1992**, *52*, 143-148.
- 3 Passamano, M.; Pighini, M. QCM DNA-Sensor for GMOs Detection. *Sens. Actuators, B.* **2006**, *118*, 177-181.
- 4 Berdat, D.; Marin, A.; Herrera, F.; Gijss M. A. M. DNA Biosensor Using Fluorescence Microscopy and Impedance Spectroscopy. *Sens. Actuators, B* **2006**, *118*, 53-59.
- 5 Wu, G.; Ji, H.; Hansen, K.; Thundat, T.; Datar, R.; Cote, R.; Hagan, M. F.; Chakraborty, A. K.; Majumdar, A. Origin of Nanomechanical Cantilever Motion Generated from Biomolecular Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 1560-1564.
- 6 Shi, H.; Yang, F.; Li, W.; Zhao, W.; Nie, K.; Dong, B.; Liu Z. A Review: Fabrications, Detections and Applications of Peptide Nucleic Acids (PNAs) Microarray. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 481-489.
- 7 Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Standard Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- 8 Nielsen, P. E., and Egholm, M. An Introduction to PNA. Peptide Nucleic Acid. *Molec. Biol.* **1999**, *1*, 89-104.
- 9 Briones, C.; Moreno, M. Applications of Peptide Nucleic Acids (PNAs) and Locked Nucleic Acids (LNAs) in Biosensor Development. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3071-3089.
- 10 Pokorski, J. K.; Witschi, M. A.; Purnell, B. L.; Appella, D. H. (*S,S*)-*trans*-Cyclopentane-Constrained Peptide Nucleic Acids. A General Backbone Modification that Improves Binding Affinity and Sequence Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15067-15073.
- 11 Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. Conformationally Constrained PNA Analogues: Structural Evolution toward DNA/RNA Binding Selectivity. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 404-412.
- 12 Sugiyama, T.; Kittaka, A. Chiral Peptide Nucleic Acids with a Substituent in the N-(2-Aminoethyl)glycine Backbone. *Molecules* **2013**, *18*, 287-310.

- 13 Lowe, G.; Vilaivan, T. Amino Acids Bearing Nucleobases for the Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1997**, 539-546.
- 14 Lowe, G.; Vilaivan, T. Dipeptides Bearing Nucleobases for the Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1997**, 547-554.
- 15 Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Properties of Novel Pyrrolodinyln PNA Carrying  $\beta$ -Amino Acid Spacers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533-5536.
- 16 Vilaivan, T.; Lowe, G. A Novel Pyrrolidinyln PNA Showing High Sequence Specificity and Preferential Binding to DNA over RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326-9327.
- 17 Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. Synthesis and Oligodeoxynucleotide Binding Properties of Pyrrolidinyln Peptide Nucleic Acids Bearing Prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic Acid (ACPC) Backbones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833-2837.
- 18 Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. Hybridization of Pyrrolidinyln Peptide Nucleic Acids and DNA: Selectivity, Base-Pairing Specificity, and Direction of Binding. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.
- 19 International Human Genome Sequencing Consortium. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- 20 Southern, E. Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **1975**, *98*, 503-517.
- 21 Weiler, J.; Gausepohl, H.; Hauser, N.; Jensen, O. N.; Hoheisel, J. D. Hybridisation Based DNA Screening on Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomer Arrays. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2792-2799.
- 22 Liepold, P.; Wieder, H.; Hillebrandt, H.; Friebel, A.; Hartwich, G. DNA-Arrays with Electrical Detection: A Label-Free Low Cost Technology for Routine Use in Life Sciences and Diagnostics. *Bioelectrochemistry* **2005**, *67*, 143- 150.
- 23 Aied, A.; Zheng, Y.; Pandit, A.; Wang, W. DNA Immobilization and Detection on Cellulose Paper using a Surface Grown Cationic Polymer via ATRP. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 826-831.
- 24 Sanchez-Carbayo, M.; Bornmann, W.; Cordon-Cardo, C. DNA Microchips: Technical and Practical Considerations. *Current Org. Chem.* **2000**, *4*, 945-971.

- 25 Wood, J. B.; Szyndler, M. W.; Halpern, A. R.; Cho, K.; Corn, R. M. Fabrication of DNA Microarrays on Polydopamine-Modified Gold Thin Films for SPR Imaging Measurements. *Langmuir* **2013**, *29*(34), 10868–10873.
- 26 Zhang, N.; Appella, D. H. Colorimetric Detection of Anthrax DNA with a Peptide Nucleic Acid Sandwich-Hybridization Assay. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(27), 8424–8425.
- 27 Singh, R.P.; Oh, B.-K.; Choi, J.-W. Application of Peptide Nucleic Acid towards Development of Nanobiosensor Arrays. *Bioelectrochemistry* **2010**, *79*, 153–161.
- 28 Geiger, A.; Lester, A.; Kleiber, J.; Drum, H. PNA Array Technology in Molecular Diagnostics. *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1717-1724.
- 29 Brandt, O.; Feldner, J.; Hellweg, S.; Schroöder, M.; Stephan, A.; Arlinghaus, H. F.; Hoheisel, J. D.; Jacob, A. Development towards Label- and Amplification-Free Genotyping of Genomic DNA. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *252*, 6935–6940.
- 30 Arlinghaus, H. F.; Kwoka, M. N. Analysis of Biosensor Chips for Identification of Nucleic Acids. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3747-3753.
- 31 Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1318–1320.
- 32 Cheng, C.; Martinez, A. W.; Gong, J.; Mace, C. R.; Phillips, S. T.; Carrilho, E.; Mirica, K. A.; Whitesides, G. M. Paper-Based ELISA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4771–4774.
- 33 Filpponen, I.; Kontturi, E.; Nummelin, S.; Rosilo, H.; Kolehmainen, E.; Ikkala, O.; Laine, J. Generic Method for Modular Surface Modification of Cellulosic Materials in Aqueous Medium by Sequential “Click” Reaction and Adsorption. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 736–742.
- 34 Orelma, H.; Teerinen, T.; Johansson, L.-S.; Holappa, S.; Laine, J. CMC-Modified Cellulose Biointerface for Antibody Conjugation. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1051-1058.
- 35 Araújo, A. C.; Song, Y.; Lundeberg, J.; Stahl, P. L.; Brumer, H. Activated Paper Surfaces for the Rapid Hybridization of DNA through Capillary Transport. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3311–3317.
- 36 Song, Y.; Gyarmati, P.; Araújo, A. C.; Lundeberg, J.; Brumer, H.; Stahl, P. L. Visual Detection of DNA on Paper Chips. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1575–1582.

- 37 Yu, A.; Shang, J.; Cheng, F.; Paik, B. A.; Kaplan, J. M.; Andrade, R. B.; Ratner, D. M., Biofunctional Paper via the Covalent Modification of Cellulose. *Langmuir* **2012**, *28*, 11265-11273.
- 38 Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T. Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids Immobilised on Cellulose Paper as a DNA Sensor. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 24110–24114.
- 39 Sirvio, J.; Hyvacko, U.; Liimatainen, H.; Niinimäki, J.; Hormi, O. Periodate Oxidation of Cellulose at Elevated Temperatures Using Metal Salts as Cellulose Activators. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1293-1297.
- 40 Lockett, M. R.; Shortreed, M. R.; Smith, L. M. Aldehyde-Terminated Amorphous Carbon Substrates for the Fabrication of Biomolecule Arrays. *Langmuir* **2008**, *24*, 9198-9203.
- 41 Hassibi, A.; Vikalo, H.; Riechmann, J. L.; Hassibi, B. Real-Time DNA Microarray Analysis. *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*(20), 1-12.
- 42 Itoh, M.; Kawamoto, T.; Tatsukawa, H.; Kojima, S.; Yamanishi, K.; Hitomi, K. In Situ Detection of Active Transglutaminases for Keratinocyte Type (TGase 1) and Tissue Type (TGase 2) Using Fluorescence-Labeled Highly Reactive Substrate Peptides. *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *59*(2), 180-187.
- 43 Kim, S. K.; Cho, H.; Jeong, J.; Kwon, J. N.; Jung, Y.; Chung, B. H. Label-Free and Naked Eye Detection of PNA/DNA Hybridization Using Enhancement of Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3315–3317.
- 44 Arakawa, H.; Nakabayashi, S.; Ohno, K.; Maeda, M. New Fluorimetric Assay of Horseradish Peroxidase Using Sesamol as Substrate and Its Application to EIA. *J. Pharm. Anal.* **2012**, *2*(2), 156–159.
- 45 Veitch, N. C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249–259.
- 46 Su, X.; Teh, H. F.; Lieu, X.; Gao, Z. Enzyme-Based Colorimetric Detection of Nucleic Acids Using Peptide Nucleic Acid-Immobilized Microwell Plates. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7192-7197.
- 47 González, M.; Bagatolli, L. A.; Echabe, I.; Arrondo, J. L. R.; Argaraña, C. E.; Cantor, C. R.; Fidelio, G. D. Interaction of Biotin with Streptavidin: Thermostability and Conformation Changes upon Binding. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11288-11294.

- 48 Laopa, P. S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Positively Charged Polymer Brush-Functionalized Filter Paper for DNA Sequence Determination Following Dot Blot Hybridization Employing a Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Probe. *Analyst* **2013**, *138*, 269–277.
- 49 Bunton C. A.; Shiner V. J. Periodate Oxidation of 1,2-diols, Diketones, and Hydroxy-ketones: The Use of Oxygen-18 as a Tracer. *J. Chem. Soc.* **1960**, 1593–1598.
- 50 Larsson, P. A.; Gimalsker, M.; Wagberg, L. Influence of Fibre Modification on Moisture Sorption and the Mechanical Properties of Paper. *Cellulose* **2008**, *6*, 837.
- 51 Leipner, H.; Fischer, S.; Brendler, E.; Voigt, W. Structural Changes of Cellulose Dissolved in Molten Salt Hydrates. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*(15), 2041–2049.
- 52 Araujo, A. C.; Song, Y. J.; Lundeberg, J.; Stahl, P. L.; Brumer, H. Activated Paper Surfaces for the Rapid Hybridization of DNA through Capillary Transport. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3311–3317.
- 53 Mallal, S.; Nolan, D.; Witt, C.; Masel, G.; Martin, A. M.; Moore, C.; Sayer, D.; Castley, A.; Mamotte, C.; Maxwell, D.; James I.; Christiansen, F. T. Association between Presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and Hypersensitivity to HIV-1 Reverse-Transcriptase Inhibitor Abacavir. *The Lancet* **2002**, *359*, 727–732.
- 54 Winichagoon, P.; Saechan, V.; Sripanich, R.; Nopparatana, C.; Kanokpongsakdi, S.; Maggio A.; Fucharoen, S. Prenatal Diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia by Reverse Dot-Blot Hybridization. *Prenatal Diagn.* **1999**, *19*, 428–435.



## ประวัติผู้วิจัย

นายเกรียงศักดิ์ ฝ้ายเครือ เกิดเมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย ชลบุรี จังหวัดชลบุรี เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ ห้างหุ้นส่วนจำกัด จมพล เลขที่ 241 ถนนอารีราษฎร์ 10 เขตเทศบาลนครระยอง ตำบลปากน้ำ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง รหัสไปรษณีย์ 21000 อีเมล k.faikhruea@gmail.com

นางสาวกชกร ศุภบรรลิตย์ เกิดเมื่อวันที่ 20 กันยายน พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 และรับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 47/146 หมู่ 3 ตำบลบ้านกรด อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา รหัสไปรษณีย์ 13160 อีเมล ks920920@gmail.com

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย