



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่
ให้ผลเร็ว

โดย อธิยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ

เดือน-ปี ที่เสร็จโครงการ กุมภาพันธ์ 2563

สัญญาเลขที่ RGU6180001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ให้ผลเร็ว

คณะผู้วิจัย

ชื่อ	สังกัด	บทบาท
1. ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	หัวหน้าโครงการ
2. ผศ.ดร. ธนิษฐ์ ปราณีนรรัตน์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	หัวหน้าโครงการย่อย 1
3. รศ.ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	หัวหน้าโครงการย่อย 2
4. อ.ดร. ทวีนนท์ เชี่ยวชาญชำนาญกิจ	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการย่อย 1
5. นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 1
6. นางวรรณสิกา เกียรติปฐมชัย	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ	ผู้ร่วมโครงการย่อย 2
7. น.ส. ไอลดา ชูภารา	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2
8. น.ส. สิริกานต์ จันทร์ประอบ	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2
9. น.ส. กชกร ศุภาวรสถิตย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2
10. น.ส. บุญส่ง ดิษมังคล์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2
11. ศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ที่ปรึกษา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกสว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องอุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ให้ผลเร็ว ได้ดำเนินการไปจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของหลายฝ่าย กระผมในฐานะหัวหน้าโครงการขอขอบคุณแหล่งเงินทุนสนับสนุน ได้แก่ ทุนวิจัยเพื่อต่อยอดองค์ความรู้สู่การใช้ประโยชน์ ประจำปี พ.ศ. 2561 (RGU6180001) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และแหล่งทุนอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้อง เช่น ทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ขอขอบคุณสถาบันต้นสังกัดของหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ ระบบสาธารณูปโภค และการสนับสนุนอื่นๆ ที่จำเป็น สุดท้ายต้องขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่าน ทั้งที่ปรึกษา อาจารย์ผู้ร่วมโครงการ และนิสิต/ผู้ช่วยวิจัยที่อยู่ในโครงการทุกท่าน หากปราศจากท่านเหล่านี้แล้วงานคงจะดำเนินไปไม่ได้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RGU6180001

ชื่อโครงการ: อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ให้ผลเร็ว

ชื่อนักวิจัย: ธีรยุทธ วิไลวัลย์และคณะ

E-mail address: vtirayut@chula.ac.th

ระยะเวลาของโครงการ: 1 ปี (15 สิงหาคม 2561 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2562 ขยายเวลาถึง 14 กุมภาพันธ์ 2563)

การปนเปื้อนของแบคทีเรียสู่อาหารและเครื่องดื่มซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค นับเป็นปัญหาที่มีความสำคัญระดับประเทศในแง่ของปลอดภัยของผู้บริโภคโดยตรง และในระดับโลก ในฐานะที่ประเทศไทยมีความโดดเด่นเรื่องการท่องเที่ยว ซึ่งอาหาร โดยเฉพาะอาหารแบบ street food มีบทบาทสำคัญในการสร้างรายได้เป็นอย่างมาก และประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกอาหารรายใหญ่ของโลกอีกด้วย ตัวอย่างของเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยและมีผลกระทบสูง เช่น *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, และ *Clostridium perfringens* การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เป็นได้ตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการ และชีวอนามัยในการเตรียมอาหาร ฯลฯ ดังนั้นการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อจึงมีความสำคัญ โดย วิธียมาตรฐานในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารยังมีข้อจำกัดอย่างใดอย่างหนึ่งหรือมากกว่า เช่น ใช้เวลานาน ความถูกต้องและความไวต่ำ ไม่สามารถแยกแยะระหว่างเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้ ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง อีกทั้งยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการวิเคราะห์และแปลผล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร ที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะ ในขณะเดียวกันก็ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำเทียบเคียงได้กับวิธีการมาตรฐาน ซึ่งอย่างน้อยควรจะบ่งชี้ได้ถึงระดับ species ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาอุปกรณ์และวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมใหม่เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร โดยงานวิจัยจะแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อย ทั้งสองส่วนจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อที่สนใจ และตรวจสอบความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้น โดยจะมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วไปเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่ใช้งานได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนในการทดลอง อ่าน และแปลผล เช่นเดียวกับแถบทดสอบทางอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่มีใช้กันอย่างแพร่หลาย

โครงการย่อยที่หนึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้เทคโนโลยีของพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษร่วมกับการสร้างสีโดยใช้เอนไซม์ เพื่อนำไปประดิษฐ์เป็นอุปกรณ์ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจง และได้พัฒนาอุปกรณ์ให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้ง่ายโดยการสร้างปลอกบรรจุ และแท่นวางสำหรับถ่ายรูปโดยใช้สมาร์ทโฟน ส่วนโครงการย่อยที่สองเป็นการนำสีย้อมประจุบวกที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอไปใช้ร่วมกับเทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เรียกว่าลูบเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) ทำให้ได้วิธีตรวจวัดดีเอ็นเอที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าในหลอดทดลอง และในรูปแบบของปฏิกิริยาบนกระดาษ โดยได้ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างอาหาร ผลการศึกษาพบว่าปฏิกิริยา LAMP-4QL²⁺ ในหลอดทดลองและบนฐานกระดาษสามารถตรวจพบ *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษ staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยพบว่าสามารถตรวจวัดเชื้อได้อย่างมี specificity สูง แต่ประสิทธิภาพในเชิงของ sensitivity ยังต้องมีการปรับปรุง

คำสำคัญ: อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ; ดีเอ็นเอ; แบคทีเรีย; พีเอ็นเอ; LAMP, อาหารปลอดภัย, การตรวจวัดเชิงสี, การทดสอบสารพันธุกรรม

Abstract

Project Code : RGU6180001

Project Title : Paper-based devices for rapid sensing of bacterial contamination in foods

Investigators : Tirayut Vilaivan and co-workers

E-mail Address : vtirayut@chula.ac.th

Project Period : 1 year (15 August 2018 - 14 August 2019 extended to 14 February 2020)

Contamination of bacteria in food and drink which causes food poisoning is not only a nationwide important problem in terms of safety of local consumers but is also important worldwide since Thailand major incomes are from the tourism industry whereby Thai food, especially street food plays an important role. Besides, Thailand is also a world major food exporter. Examples of foodborne pathogens that can be found frequently and create high impact include *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens*. The contamination can result from several factors including raw materials, process, and hygiene of the food preparation etc. Accordingly, the detection of contamination is highly important. The standard methods for the detection of bacterial contamination in food have one or more limitations including long waiting time, low specificity and sensitivity, inability to distinguish between similar bacterial strains, the requirement of expensive instruments and/or highly trained personnel. As a result, it is necessary to develop new diagnostic methods for the detection of bacterial contamination in foods that are convenient, rapid, do not require complicated instruments nor highly trained personnel while can still provide accurate results that are comparable with the standard methods, and should be able to identify the bacteria at species levels. This project aims to develop novel devices and methods for the detection of nucleic acids as an alternative for the detection of bacterial contamination in foods. The research was divided into two sub-projects, both involve amplification of the nucleic acids that are specific for the bacterial strains of interest and the success of the nucleic acid amplification is evaluated via paper-based devices that are easy to use and do not require special equipment for the experiment, collect and interpret the data in a similar way to the widely used immunochromatographic devices.

The first sub-project involved the use of PNA probes immobilized on filter paper in combination with an enzymatic colorimetric reaction to develop a sensing device for the detection of *B. cereus* in food with high sensitivity and specificity. The device was designed to be used easily by including a frame and a photographing stage suitable for any smartphones. The second sub-project employed a cationic DNA-binding dye in combination with a DNA amplification technique called loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to give a DNA sensing system that can be judged by naked eyes both in the PCR tube and on the paper. The efficiency of the method for the detection of contamination of *E. coli* and the enterotoxin A-producing strain (SEA) of *S. aureus* in food samples. The results show that the LAMP-dye combination in the PCR tube and on the paper can detect *E. coli* and *S. aureus* SEA with high specificity but the sensitivity should require further improvement.

Keywords: paper-based analytical devices; DNA; bacteria; PNA; LAMP; food safety; DNA binding dye; colorimetry; nucleic acid testing

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)
ทุนวิจัยเพื่อต่อยอดองค์ความรู้สู่การใช้ประโยชน์ (RGU6180001)

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ให้ผลเร็ว

ภาษาอังกฤษ Paper-based devices for rapid sensing of bacterial contamination in food

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: 022187627 ต่อ 101

โทรศัพท์เคลื่อนที่: 0839868772

โทรสาร: 022187598

อีเมล: vtirayut@chula.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย เคมี

4. งบประมาณทั้งโครงการ 1,000,000.- (หนึ่งล้านบาทถ้วน)

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

☒ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☐ เสนอ

ต่อ _____

ชื่อโครงการที่เสนอ _____

กำหนดทราบผล(หรือสถานภาพเท่าที่ทราบ) _____

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

การปนเปื้อนของแบคทีเรียสู่อาหารและเครื่องดื่ม ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค นับเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่อาหารแบบ street food ได้รับความนิยม เช่นในประเทศไทยแถบเอเชีย จึงมีความเสี่ยงสูง ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยจึงจำเป็นต้องมีการ

ประกันคุณภาพอาหารเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและผู้ส่งออก ตัวอย่างของเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยและมีผลกระทบสูง เช่น *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, และ *Clostridium perfringens* การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เป็นได้ตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการ และชีวอนามัยในการเตรียมอาหาร ฯลฯ ในปัจจุบัน มาตรฐานในการตรวจอาหารที่อาจปนเปื้อนแบคทีเรียมีสามวิธีหลัก ได้แก่การคัดแยกเชื้อ (cultural methods) การใช้วิธีทางอิมมูโนวิทยา (immunological methods) และการทดสอบสารพันธุกรรม (nucleic acid based methods) โดยวิธีหลังสุดกำลังได้รับความนิยมมากขึ้นและมีศักยภาพที่จะมาแทนที่วิธีการคัดแยกเชื้อหรือวิธีทางอิมมูโนวิทยาเนื่องจากให้ความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งอาจทำได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยตรง แต่ยังมีข้อจำกัดอยู่คือ ค่าใช้จ่ายที่สูง ไม่สามารถทำในลักษณะ routine, high throughput ได้ อีกวิธีการหนึ่งคือการใช้เทคโนโลยีของ polymerase chain reaction (PCR) เข้าช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนใดยีนหนึ่งที่เป็นเครื่องหมายเฉพาะของแบคทีเรียที่สนใจจะตรวจสอบ ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โพรบไฮบริไดเซชัน หรือเพิ่มปริมาณพร้อมตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค real time PCR แต่วิธีการเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาตรวจวัดที่มีราคาแพง อีกทั้งยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการวิเคราะห์และแปลผล

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่ายังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร ที่สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะ ในขณะเดียวกันก็ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ เทียบเคียงได้กับวิธีการมาตรฐาน ซึ่งอย่างน้อยควรจะบ่งชี้ได้ถึงระดับ species ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาอุปกรณ์และวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมใหม่เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร โดยงานวิจัยจะแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อย ทั้งสองส่วนจะเกี่ยวข้องเนื่องกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อที่สนใจ และตรวจสอบความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้น โดยจะมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วไปเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดานกรองหรือวัสดุที่มีรูพรุนอื่นที่ใช้งานได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนในการทดลอง อ่าน และแปลผล เช่นเดียวกับแถบทดสอบทางอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่มีใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังอาจผนวกขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างและการตรวจวัดไว้ในอุปกรณ์ชิ้นเดียว ซึ่งอุปกรณ์ในลักษณะดังกล่าวกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มมีผลิตภัณฑ์จำหน่ายในเชิงพาณิชย์บ้างแล้ว แต่ส่วนใหญ่จะจำกัดอยู่ในแวดวงของอุปกรณ์ตรวจวัดทางการแพทย์

8. วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร
2. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดานที่ใช้งานได้ง่ายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร
3. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในตัวอย่างจริง
4. เพื่อพัฒนารูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดให้อยู่ในลักษณะพร้อมใช้งาน

9. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการนี้แบ่งออกเป็นสองโครงการย่อย ซึ่งมีระเบียบวิธีวิจัยดังนี้

โครงการย่อยที่ 1: การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาศเพื่อบ่งชี้เชื้อก่อโรคในอาหารโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ

1. การค้นหาลำดับดีเอ็นเอของแบคทีเรียก่อโรคที่เหมาะสมที่จะใช้ยึดจับกับพีเอ็นเอโพรบบนกระดาศ และทำการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับการยึดจับกับพีเอ็นเอโพรบ

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยจะเริ่มจากการค้นหาลำดับดีเอ็นเอที่เหมาะสม โดยอาศัยการค้นหาข้อมูลทางชีวสารสนเทศ ร่วมกับการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการศึกษายีนต่าง ๆ ในแบคทีเรีย B.

cereus เมื่อได้ candidate ที่เหมาะสม จึงจะทำการสกัดดีเอ็นเอพร้อมเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR และเตรียมตัวอย่างเพิ่มเติมจากสปีชีส์ใกล้เคียงดังกล่าวไว้อีก 1 สายพันธุ์ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

ความจำเพาะเจาะจงของการยึดจับกับพีเอ็นเอในภายหลัง

2. การพัฒนากระดาศดัดแปรที่ถูกตรึงด้วยพีเอ็นเอโพรบเพื่อการตรวจวิเคราะห์การปรากฏอยู่ของส่วนดีเอ็นเอที่เฉพาะต่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่สนใจ

ดัดแปรพื้นผิวของกระดาศโดยการตรึงพีเอ็นเอโพรบ และนำสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่ม

ปริมาณด้วย PCR โดยใช้ biotinylated primer มาทำการยึดจับกับพีเอ็นเอโพรบบนกระดาศ

จากนั้นใช้ปฏิกิริยาส่งสัญญาณด้วยเอนไซม์หรือวิธีการอื่นที่เหมาะสมในการสร้างสัญญาณที่ทำให้มองเห็น

ด้วยตาเปล่า โดยจะต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดกับการเกิดปฏิกิริยาแต่ละขั้น โดยจะต้อง

คำนึงถึงความไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) เป็นเกณฑ์

3. การประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในตัวอย่างจริง

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมกับตัวอย่างจำลองแล้ว จะมีการนำไปทดสอบกับตัวอย่างจริง โดยจะเริ่ม

ตั้งแต่การ spike ตัวอย่างด้วยแบคทีเรียสปีชีส์ที่ต้องการในตัวอย่าง เช่น นม ข้าว เนื้อสัตว์ (เนื้อวัว

และเนื้อหมู สดและปรุงสำเร็จ) เพื่อทดสอบผลกระทบของตัวอย่าง (matrix effect) ว่ามีผลรบกวน

การวิเคราะห์ใด ๆ หรือไม่ โดยจะใช้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่มีการรายงานมาแล้ว จากนั้นจะนำไป

วิเคราะห์ตัวอย่างจริงที่มากพอที่จะให้ได้ข้อมูลที่มีนัยสำคัญในเชิงสถิติเพื่อนำไปประเมินประสิทธิภาพ

ของตัวตรวจวัดในแง่ของ ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ความไว (sensitivity) ข้อมูลบวกปลอม

(false positive) ข้อมูลลบปลอม (false negative) เป็นต้น และเปรียบเทียบความจำเพาะ ความไว

ระยะเวลาทดสอบ และค่าใช้จ่าย กับวิธีมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับ

4. การประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดที่เป็นลักษณะพร้อมใช้งาน

ขั้นตอนนี้จะเป็นการพัฒนาอุปกรณ์ให้มีลักษณะใช้งานได้ง่าย พกพาสะดวก รวมไปถึงสามารถอ่านค่า

เป็นตัวเลขเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ รวมถึงออกแบบให้สามารถตรวจวัดแบบ duplicate

detection หรือแบบ high throughput เพื่อให้ทำไปตรวจวิเคราะห์ในพื้นที่จริง ทั้งนี้ เพื่อให้สามารถ

นำไปทดสอบกับตัวอย่างอาหารได้หลากหลาย โดยเฉพาะการนำไปใช้ในพื้นที่จริง เช่น ฟาร์มเลี้ยงสัตว์

หรือตลาดสด

โครงการย่อยที่ 2: ปฏิกิริยา LAMP บนกระดาศที่อ่านผลเชิงปริมาณด้วยสีภายในขั้นตอนเดียวเพื่อ
การตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ LAMP เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ E. coli/S. aureus

- 1.1 เตรียมตัวอย่างควบคุมบวกที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่างๆ และตัวอย่างควบคุมลบ มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดมาตรฐาน
 - 1.2 สังเคราะห์สีย้อมในกลุ่ม styryl dye เพื่อนำมาใช้ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค LAMP กับสีย้อม dsDNA ที่มีจำหน่ายในเชิงการค้า โดยมีเป้าหมายที่จะเลือกสีย้อมที่ให้ผลชัดเจนที่สุดและไม่รบกวนการเกิดปฏิกิริยา และสามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้แบบ real-time
 - 1.3 หาสัดส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบปฏิกิริยา LAMP ร่วมกับสีย้อมสังเคราะห์ และสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความจำเพาะและความไว และระยะเวลาของปฏิกิริยา
 2. การพัฒนากระดาษดัดแปรที่ถูกตรึงด้วยองค์ประกอบปฏิกิริยาแลมป์และสีย้อมสังเคราะห์ต่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่สนใจ
- นำสภาวะที่ได้จากข้อ 1 มาทำบน paper chip โดยการนำไพรเมอร์ เอนไซม์ และสีย้อม มาหยดลงบนกระดาษหรือวัสดุรองรับที่เป็นรูพรุนอื่นที่เหมาะสมเช่น glass fiber จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้ได้แผ่นกระดาษที่ถูกเคลือบด้วยไพรเมอร์และเอนไซม์ ในสภาพพร้อมใช้ เมื่อจะใช้งานจึงเติมส่วนประกอบที่เหลือ และปรับปรุงวิธีในขั้นที่เกี่ยวข้องที่อาจส่งผลกับประสิทธิภาพของปฏิกิริยา
3. การประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในตัวอย่างจริง มีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการเช่นเดียวกับโครงการย่อยที่ 1 แต่ตัวอย่างเชื้อจะเป็น *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษ staphylococcal enterotoxin A โดยเปรียบเทียบความจำเพาะ ความไว ระยะเวลาทดสอบ และค่าใช้จ่าย ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้น กับวิธี LAMP และวิธี PCR ร่วมกับเจลอเล็กโตรโฟรีซิส
 4. การประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดที่เป็นลักษณะพร้อมใช้งาน พกพาได้ และสามารถอ่านค่ากึ่งเชิงปริมาณได้ (semi-quantitative) มีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการเช่นเดียวกับโครงการย่อยที่ 1

10. ผลการดำเนินงาน

ผลการดำเนินการในภาพรวมตัวงานเสร็จสมบูรณ์ตามข้อเสนอโครงการ และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ ได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร โดยของ *Bacillus cereus* ได้จากการประมวลข้อมูลทางชีวสารสนเทศ ส่วนของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้จากข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และจากงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ และได้นำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาษที่ใช้งานได้ง่ายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร โดยแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วน งานส่วนแรกได้ต้นแบบอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิด *B. cereus* ที่อาศัยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษ โดยประกอบด้วยพีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับยีน *GroEL*, *MotB* ของ *B. cereus* และยีน 16S rRNA ที่อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้สะดวก มีกรอบจับพร้อมแท่นถ่ายรูป ในการใช้งานต้องสกัดดีเอ็นเอ นำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และนำมาไฮบริดซ์กับพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษ และสร้างสัญญาณสีด้วยเอนไซม์ ที่สามารถอ่านผลได้ด้วยการสังเกตการเกิดสีด้วยตาเปล่า และได้ประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับตัวอย่างข้าวที่มีเชื้อ 25 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเชื้อ 1 ตัวอย่าง ได้ผลเป็นไปตามที่คาดทุกประการ แสดงถึงประสิทธิภาพของอุปกรณ์

ตรวจหาเชื้อนี้ทั้งในเชิงของ sensitivity และ specificity โดยใช้ระยะเวลาวิเคราะห์ประมาณ 3–4 ชั่วโมงตั้งแต่การเตรียมตัวอย่างถึงขั้นตอนการอ่านสี (ไม่รวมขั้นตอนเตรียมกระดาษที่ตรึงพีเอ็นเอโพรบ) งานในส่วนที่ 2 ได้กรรมวิธีตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยใช้วิธี LAMP ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอ 4QL²⁺ ซึ่งพัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการและสามารถเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นน้ำเงินเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย โดยได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดในรูปแบบหลอดพีซีอาร์ที่ประกอบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP และให้ทำปฏิกิริยาต่อกับสีย้อม (ไม่สามารถทำให้เป็นขั้นตอนเดียวโดยการเติมสีย้อมตั้งแต่ต้นดังที่ตั้งเป้าไว้ตอนแรกเนื่องจากสีย้อม 4QL²⁺ รบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP) พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อทั้งสองชนิดได้ที่ระดับ 33.9 สำเนาของดีเอ็นเอ/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวเทียบเท่ากับวิธีตรวจวัดที่ใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับสีย้อมที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ และเทียบเท่ากับวิธีพีซีอาร์ร่วมกับเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แต่ทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่ามาก โดยใช้เวลาตั้งแต่เตรียมตัวอย่างถึงอ่านผลไม่เกิน 60–75 นาที นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการทำ LAMP และการตรวจวัดให้อยู่บนฐานกระดาษ พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *E. coli* ได้ที่ระดับ 33.9 สำเนาของดีเอ็นเอ/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวเทียบเท่ากับที่ทำในหลอดพีซีอาร์ และ *S. aureus* ที่ 100 สำเนาของดีเอ็นเอ/ปฏิกิริยา ซึ่งมีความไวน้อยกว่าที่ทำในหลอดพีซีอาร์เล็กน้อย และได้ประเมินประสิทธิภาพในการตรวจหา *S. aureus* กับตัวอย่างเนื้อหมูปรุงสุกที่เก็บจากภาคสนามจำนวน 45 ตัวอย่าง เทียบกับวิธีอ้างอิง โดยพบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นให้ specificity 100% (ไม่มีผลบวกปลอม) แต่ sensitivity มีค่าเพียง 78% (มีบางตัวอย่างให้ผลลบปลอม) ภายในระยะเวลา 75 นาที (เตรียมตัวอย่าง 45 นาที ทำให้เกิดสี 30 นาที) จึงแสดงให้เห็นว่าระบบ paper-LAMP สามารถใช้งานได้จริง แต่ยังอาจพัฒนาต่อไปได้อีกโดยการหาสีย้อมที่มีการเปลี่ยนสีชัดเจนขึ้นกว่า 4QL²⁺ เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจวัดให้ดียิ่งขึ้น

ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์/ตอบรับให้ตีพิมพ์จำนวน 2 เรื่องและอีกหนึ่งเรื่องหนึ่งอยู่ระหว่างรอผลการพิจารณา และยังมีอีก 1 เรื่องอยู่ระหว่างเก็บรวบรวมข้อมูล นอกจากนี้ยังมีสิทธิบัตร 1 เรื่องที่ยื่นคำขอไปแล้ว และอีก 2 เรื่องอยู่ระหว่างดำเนินการร่าง โดยผู้วิจัยจะรายงานเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ยังได้ต้นแบบของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารที่ได้รับการประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการจำนวน 2 ต้นแบบ และในระดับพิสูจน์หลักการจำนวน 1 ต้นแบบ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ดำเนินการต่อยอดโดยการสร้างความร่วมมือกับทั้งนักวิจัยและภาคเอกชนเพื่อพัฒนาสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป ในด้านการสร้างคน โครงการวิจัยนี้ได้มีส่วนในการพัฒนานักวิจัยในระดับปริญญาเอก 3 คน และปริญญาตรี 1 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 1 สรุปผลงานที่ได้ตลอดโครงการเชิงปริมาณ (ตัวเลขในวงเล็บคือเป้าหมายที่ตั้งไว้ในข้อเสนอโครงการ)

ผลผลิต	รวม
1 จำนวนนักวิจัยที่สร้างจากโครงการ	
1.1 สถาบันเดียวกัน	4
1.2 ต่างสถาบัน	2
1.3 นักศึกษาระดับปริญญาเอก	4
1.4 นักศึกษาระดับปริญญาโท	0
1.5 ผู้ช่วยวิจัย	1
2. จำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ¹	2 (1)
3. จำนวนผลงานการจดสิทธิบัตรในประเทศ ²	1 (2)
4. ต้นแบบของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารที่ได้รับการประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการ	2 (2)

¹ เฉพาะที่ตีพิมพ์หรือได้รับตอบรับให้ตีพิมพ์แล้ว ยังมีที่อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณา 1 เรื่อง และเตรียมบทความอีก 1 เรื่อง

² สิทธิบัตรยื่นจด และยังมีอยู่ระหว่างดำเนินการอีก 1 เรื่อง

สัญญาเลขที่ RGU6180001

โครงการ อุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่ให้ผลเร็ว

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นายธีรยุทธ วิไลวัลย์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 สิงหาคม 2561 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2562 ขยายเวลาถึง 14 กุมภาพันธ์ 2563

1. ความสำคัญ-ที่มาของปัญหา

การปนเปื้อนของแบคทีเรียสู่อาหารและเครื่องดื่ม และก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค นับเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่อาหารแบบ street food ได้รับความนิยม เช่นในประเทศแถบเอเชีย จึงมีความเสี่ยงสูง ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยจึงจำเป็นต้องมีการประกันคุณภาพอาหาร เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและผู้ส่งออก ตัวอย่างของเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยและมีผลกระทบสูง เช่น *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, และ *Clostridium perfringens* การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เป็นได้ตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการ และชีวอนามัยในการเตรียมอาหาร ฯลฯ ในปัจจุบัน มาตรฐานในการตรวจอาหารที่อาจปนเปื้อนแบคทีเรียมีสามวิธีหลัก ได้แก่ การคัดแยกเชื้อ (cultural methods) การใช้วิธีทางอิมมูโนวิทยา (immunological methods) และการทดสอบสารพันธุกรรม (nucleic acid based methods) (Rohde et al., 2017) โดยการคัดแยกเชื้อจากอาหารที่ต้องการตรวจสอบทำได้โดยใช้อาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสม ตามด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้ ซึ่งมีข้อเสียคือใช้เวลานาน (5-7 วัน) เพราะต้องรอแบคทีเรียเจริญ มีความจำเพาะต่ำเนื่องจากเชื้อที่ไม่ต้องการอาจเจริญได้ ง่ายต่อการปนเปื้อน มีความไวหรือ detection limit จำกัด กล่าวคือต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณค่อนข้างมาก (100 มิลลิลิตร) ให้ผลไม่คงที่หากเชื้อมีปริมาณต่ำที่ระดับ 10-100 โคโลนี และมีค่าใช้จ่ายสูง (~500 บาทต่อการตรวจ) วิธีที่นิยมอีกวิธีคือวิธีทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งอาศัยหลักการจดจำของแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อที่สนใจ และใช้เอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีในการทำให้เกิดสีที่จำเพาะกับการจับกับเชื้อ ปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จในรูป ELISA และ reverse passive latex agglutination (RPLA) แต่วิธีนี้แม้จะทำได้สะดวกรวดเร็วกว่าการคัดแยกเชื้อ แต่ก็มีราคาแพงเนื่องจากต้นทุนในการผลิตแอนติบอดีที่สูง นอกจากนี้ การใช้แอนติบอดียังมีปัญหาเรื่อง cross reactivity และ reproducibility เนื่องจาก batch-to-batch variation (Baker, 2015) อีกวิธีหนึ่งที่ได้รับนิยมนมากขึ้นและมีศักยภาพที่จะมาแทนที่วิธีการคัดแยกเชื้อหรือวิธีทางอิมมูโนวิทยา คือวิธีการตรวจในระดับสารพันธุกรรม เนื่องจากให้ความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งโดยปกติจะทำได้สองรูปแบบคือการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยตรง ด้วยเครื่อง Next Generation Sequencing วิธีนี้แม้จะให้ความถูกต้องแม่นยำสูง และให้ข้อมูลที่ละเอียดมาก แต่ก็มีค่าใช้จ่ายสูงมาก ไม่สามารถทำในลักษณะ routine, high throughput ได้ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้แม้จะละเอียดมาก แต่ก็อาจมากเกินไปจนจำเป็นและได้มาโดยการอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่จะต้องมีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง อีกวิธีการหนึ่งคือการใช้เทคโนโลยีของ polymerase chain reaction (PCR) เข้าช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนใดยีนหนึ่งที่เป็นเครื่องหมายเฉพาะของแบคทีเรียที่สนใจจะตรวจสอบ ซึ่งจะถูกกำหนดโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม และจะต้องมีการนำไปตรวจสอบโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่เกิดขึ้นว่าสอดคล้องกับที่ควรจะเป็นหรือไม่ แต่

เทคนิคนี้ใช้เวลานาน (3-3.5 ชั่วโมงในการทำ PCR และ 0.5-1 ชั่วโมงในการวิเคราะห์ผลโดยการทำเจล) และอาจไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างได้ถึงระดับ species ได้เสมอไปเนื่องจากยีนอาจจะมีความคล้ายคลึงกัน ในบางกรณี จึงมักจะจำเป็นที่ต้องอาศัยเทคนิคอื่นเพิ่มเติม เช่นการทำ nested PCR หรือการทำ probe hybridization หรืออาจใช้เทคนิค real time PCR ที่ต้องออกแบบไพรเมอร์หรือโพรบที่จำเพาะ และติดตามการเกิด PCR product ที่จำเพาะโดยการเรืองแสง โดยหลักการแล้วเทคนิค real time PCR จะให้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง ทำได้สะดวกรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาตรวจวัดที่มีราคาแพง อีกทั้งยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการวิเคราะห์และแปลผล

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่ายังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร ที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะ ในขณะเดียวกันก็ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ เทียบเคียงได้กับวิธีการมาตรฐาน ซึ่งอย่างน้อยควรจะบ่งชี้ได้ถึงระดับ species (Law et al., 2015) ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมใหม่ที่มีลักษณะเฉพาะดังกล่าวเพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร โดยงานวิจัยจะแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อย ทั้งสองส่วนจะเกี่ยวเนื่องกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อที่สนใจ และตรวจสอบความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้น โดยจะมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วไปเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดานหรือวัสดุที่มีรูปทรงอื่นที่ใช้งานได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนในการทดลอง อ่าน และแปลผล เช่นเดียวกับแถบทดสอบทางอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่มีใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังอาจผนวกขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างและการตรวจวัดไว้ในอุปกรณ์ชิ้นเดียว ซึ่งอุปกรณ์ในลักษณะดังกล่าวกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มมีผลิตภัณฑ์จำหน่ายในเชิงพาณิชย์บ้างแล้ว แต่ส่วนใหญ่จะจำกัดอยู่ในแวดวงของอุปกรณ์ตรวจวัดทางการแพทย์ซึ่งผู้สนใจสามารถศึกษารายละเอียดและตัวอย่างที่เกี่ยวข้องได้จากเอกสารอ้างอิง (Choi et al., 2017)

งานวิจัยในส่วนแรกภายใต้ชื่อโครงการ "การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาดเพื่อบ่งชี้เชื้อก่อโรคในอาหารโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ" จะอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบการเกิดสารพันธุกรรมที่จำเพาะโดยใช้หลักการของ probe hybridization โดยคณะผู้วิจัยมีเทคโนโลยีของสารเลียนแบบสารพันธุกรรมที่เรียกว่าเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดหรือพีเอ็นเอ ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสกว. มาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ทุนนักวิจัยรุ่นกลาง (2 รอบ) ทุนวิจัยมุ่งเป้า (DBG5580007) เมธีวิจัยอาวุโส (RTA5280002) และศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น (DPG5780002) ซึ่งพบว่าพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นคือฟิโรลิดินิลพีเอ็นเอมีสมบัติที่โดดเด่นเหนือกว่าดีเอ็นเอและพีเอ็นเอที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในแง่ของการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเออย่างแข็งแรงและจำเพาะเจาะจง (Vilaivan, 2015) และมีสิทธิบัตรคุ้มครองแล้ว (Lowe and Vilaivan, 2006) ดังนั้นฟิโรลิดินิลพีเอ็นเอจึงมีสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นโพรบเพื่อการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่ต้องการความจำเพาะเจาะจงสูง เช่นการจำแนกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสผิดกันเพียงหนึ่งตำแหน่ง ซึ่งทำได้ยากโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบทั่วไป นอกจากนี้การที่พีเอ็นเอจับยึดได้อย่างแข็งแรงมากทำให้ไม่จำเป็นต้องออกแบบโพรบให้มีความยาวมากนัก จึงเป็นการลดต้นทุน และเพิ่มความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากโพรบที่สั้นจะแยกแยะความแตกต่างของเป้าหมายที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งได้ดีกว่าโพรบที่ยาว ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบตรวจวัดสารพันธุกรรมที่อาศัยฟิโรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นโพรบในหลากหลายรูปแบบเช่น โพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริด (Boonlua et al., 2011; Ditmangklo et al., 2013; Dangsoyon et al., 2016; Yotapan et al., 2016; Nim-anussornkul and Vilaivan, 2017) อุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอโดยใช้

เทคนิคเคมีไฟฟ้า (Jampasa et al., 2014; Jampasa et al., 2018; Kongpeth et al., 2016; Teengam et al., 2017a; Thipmanee et al., 2016) และอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอบนกระดาษที่อาศัยการสังเกตการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่า (Laopa et al., 2013; Jirakittiwut et al., 2015; Teengam et al., 2017b) ซึ่งวิธีการหลังสุดนี้มีศักยภาพมากในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสำหรับผู้ใช้งานทั่วไป โดยคณะผู้วิจัยได้ต่อยอดงานวิจัยนี้ไปใช้กับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์คือการตรวจการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย ภายใต้การสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ (ศทพ.) ประจำปีงบประมาณ 2560 ซึ่งผลเบื้องต้นพบว่าการใช้พีเอ็นเอโพรบช่วยให้ความจำเพาะดีขึ้นกว่าดีเอ็นเอ และสามารถแยกแยะความแตกต่างของ single mismatch DNA ได้ที่อุณหภูมิห้อง คณะผู้วิจัยจึงเชื่อว่าวิธีการดังกล่าวน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อก่อโรคในอาหารได้ด้วย

ในงานวิจัยนี้จะเลือกเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นตัวแทนของเชื้อที่จะนำมาทดสอบโดยอุปกรณ์ตรวจวัดเชื้อฐานกระดาษที่อาศัยพีเอ็นเอเป็นไฮบริดโตเซชันโพรบ โดย *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแบบแท่ง และสามารถสร้างสปอร์ได้ในภาวะที่ไม่เหมาะกับการเจริญเติบโต แบคทีเรียชนิดนี้มักพบทั่วไปในดินและมักถูกแยกจากนมดิบ อาหารนม รวมไปถึงธัญพืช จึงจัดเป็นเชื้อก่อโรคในอาหารที่มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะในประเทศที่มีเศรษฐกิจเกี่ยวข้องกับผลิตผลทางเกษตรกรรม เช่น ประเทศไทย ความรุนแรงของการก่อโรคจาก *Bacillus cereus* เนื่องมาจากการสร้าง enterotoxin ที่มีผลโดยตรงต่อมนุษย์และแมลง และยังเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิดซึ่งส่งผลให้เกิดท้องร่วงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูง ในทางพันธุกรรมพบว่า *Bacillus cereus* มีความใกล้ชิดกับ *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, และ *Bacillus mycoides* อย่างมาก (McDowell and Friedman, 2017; Sánchez-Maldonado et al., 2018) ดังนั้นกระบวนการตรวจหาการปนเปื้อน *Bacillus cereus* ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *Bacillus cereus* กับสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้น ที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่ำ โดยให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำสูง เป็นสิ่งที่ควรได้รับการพัฒนา และคณะผู้วิจัยเชื่อว่าการใช้เทคโนโลยีของพีเอ็นเอโพรบที่มีความจำเพาะสูงน่าจะตอบโจทย์ดังกล่าว

งานวิจัยในส่วนที่สองภายใต้ชื่อโครงการ "ปฏิบัติการ LAMP บนกระดาษที่อ่านผลเชิงปริมาณด้วยสีภายในขั้นตอนเดียวเพื่อการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร" จะอาศัยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เทคนิคนี้อาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะ 4-6 เส้น และเป็นเทคนิค isothermal amplification จึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler ซึ่งมีข้อได้เปรียบในแง่ของ ความง่าย ความจำเพาะเจาะจง และประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เหนือกว่า PCR โดยจะพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจวัดด้วยตาเปล่าให้อยู่บนอุปกรณ์ฐานกระดาษชิ้นเดียว เพื่อการขนส่งและเก็บรักษาที่สะดวกและประหยัด โดยจะอาศัยใช้สีย้อมที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณและให้การเปลี่ยนแปลงสีหรือการเรืองแสงที่อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าในการบ่งชี้ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ปฏิบัติการทั้งหมดตั้งแต่ขั้นใส่ตัวอย่างที่ต้องการตรวจจนถึงขั้นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและอ่านผลสีด้วยตาเปล่า เกิดภายในขั้นตอนเดียว จึงเหมาะกับการตรวจระดับท้องถิ่น หรือ ณ จุดดูแล (point-of-care) และการพัฒนาสู่ชุดตรวจสำเร็จรูป โดยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP เพื่อการตรวจเชื้อและจดอนุสิทธิบัตรมาแล้วกว่า 30 เรื่อง ตัวอย่างเช่น ชุดตรวจ VIP Safe Plus สำหรับ *E. coli* O157 รวมถึงต้นแบบชุดตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *Staphylococcus aureus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษเชิงปริมาณที่มีความจำเพาะและความไวสูงโดยการผนวกเทคนิค LAMP เข้ากับการใช้สีย้อมเรืองแสงในกลุ่ม styryl dye ที่พัฒนาขึ้นโดยหัวหน้าโครงการ ภายใต้ทุนศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น (DPG5780002) (นราพร สมบูรณ์นะ และคณะ, 2560) โดยสามารถตรวจจับเชื้อได้ในเชิงปริมาณตั้งแต่ความ

เข้มข้น 1-10 colony forming units (CFU) ใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่า 30 นาที และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler และเครื่องเจลอเล็กโตรโฟรีซิส ขั้นตอนการทำได้ง่าย สะดวก และสารเคมีที่ใช้มีความปลอดภัยสูง แต่ยังคงอยู่ในรูปของการทำ LAMP ในหลอดทดลอง และยังต้องมีขั้นตอนการเติมสีย้อมแยกต่างหาก หลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ซึ่งไม่ค่อยสะดวกนักสำหรับการใช้งานในภาคสนาม ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงต้องการต่อยอดโดยการพัฒนาชุดตรวจให้ใช้งานง่ายยิ่งขึ้น โดยการพัฒนาชุดตรวจให้อยู่ในรูปแบบ paper chip ที่มีไพรเมอร์ เอนไซม์ และสีย้อมสำเร็จรูป ในรูปแบบพร้อมใช้ และง่ายต่อการใช้งาน การเก็บรักษา และการขนส่ง ตลอดจนสามารถใช้งานได้จริงโดยผู้ใช้และผู้ประกอบการในระดับท้องถิ่น

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ของคนและสัตว์ และไม่ทำอันตรายหรือก่อโรค อย่างไรก็ตาม มี *E. coli* หลายสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อ เช่น โรคอุจจาระร่วง โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคระบบทางเดินปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น โดยโรคอุจจาระร่วงเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ตามกลไกการก่อโรคและลักษณะอาการของผู้ป่วย อาทิเช่น enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษเรียก enterotoxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ และ enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) สร้างสารพิษ Shiga ทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด เม็ดเลือดแดงแตก และไตวายเฉียบพลัน ทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ (Ali et al., 2012; Brooks et al., 2005) ทำให้ European Commission หรือ EU จึงมีข้อบังคับห้ามปริมาณ *E. coli* ในเนื้อสัตว์และชิ้นเนื้อเกิน 50-500 และ 500-5000 colony forming units (CFU) ต่อกรัม ตามลำดับ ด้วยเหตุนี้การตรวจจับ *E. coli* ที่อาจปนเปื้อนจึงจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่ง ทำให้ในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่พัฒนาวิธีการตรวจ *E. coli* ทั้งจากโปรตีนเช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และจากสารพันธุกรรมเช่น polymerase chain reaction (PCR) และ real-time PCR อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีชุดตรวจสำเร็จที่พกพาสะดวก ใช้งานง่าย ใช้เวลาในการทำรวดเร็ว อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการ/ผู้เชี่ยวชาญ/เครื่องมือจำเพาะ และยังคงมีความแม่นยำ ความไว และความจำเพาะที่สูง ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์จะพัฒนาชุดตรวจที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ สำหรับตรวจ *E. coli* ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม

สารพิษ staphylococcal enterotoxin A (SEA) จากแบคทีเรีย *S. aureus* พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ ทางเดินหายใจ และบนผิวหนังของมนุษย์จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ง่าย หากรับประทานอาหารที่ดิบ หรือใช้ความร้อนและระยะเวลาในการปรุงไม่เพียงพอต่อการทำลาย SEA ซึ่งทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาถึง 30 นาที และที่ระดับ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาที อีกทั้งแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ในสภาวะความเค็มระดับปานกลาง จึงทำให้เชื้อหรือสารพิษนี้ถูกพบได้ในอาหารที่หลากหลายส่วนใหญ่ได้แก่ อาหารประเภทไขมันและมีเชื้อคู่แข่งน้อย เช่น นม เนยแข็ง คัสตาร์ด ชนมอบ ไอศกรีม และเนื้อสัตว์ โดยอาหารที่มี SEA ปนเปื้อนมักมีกลิ่น รส และสภาพอาหารปกติ ทำให้ผู้ผลิตและผู้บริโภค ไม่ทราบ ว่าอาหารนั้นมี SEA ปนเปื้อนอยู่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (Argudín et al., 2010) การป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่มียีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ (sea) ที่สามารถผลิต SEA คือป้องกันการปนเปื้อนจากคนและสิ่งแวดล้อม เช่น ไม่ควรสัมผัสอาหาร หรือใช้มือในการหยิบหรือจับอาหารที่ปรุงสุกแล้ว ไม่ตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานก่อนรับประทาน ควรเก็บอาหารไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อไม่ให้ *S. aureus* เพิ่มจำนวน ทั้งนี้ *S. aureus* สายพันธุ์ที่มี sea สามารถผลิต SEA เมื่อเจริญในอาหารที่อุณหภูมิระหว่าง 15.6 และ 46.1 องศาเซลเซียส และผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารพิษนี้ก่อให้เกิดโทษกับผู้บริโภคได้เมื่อได้รับในปริมาณตั้งแต่ 100 นาโนกรัมต่อ 100 กรัมของอาหาร และตามมาตรฐานอาหารกำหนดว่าอาหารที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ อาหารปรุงสุกทั่วไป และปรุงสุกแล้วแช่เย็น ต้องไม่มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* มากกว่า 100 เซลล์หรือ CFU ต่อกรัมอาหาร อาการของโรคได้แก่ อาเจียน

คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน ปวดบิดในท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ เป็นตะคริว และอาจมีอาการร่วมอื่นๆ เช่น ปวดศีรษะ เหนื่อยออก หนาวสั่น ช็อค หรือมีเลือดปนในอุจจาระ โดยเฉพาะในเด็กเล็กและผู้สูงอายุอาการอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้

2. การทบทวนวรรณกรรม

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษและการประยุกต์ใช้กับเชื้อก่อโรค

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษได้ถูกทำให้ได้รับความนิยมขึ้นเมื่อไม่นานมานี้โดยกลุ่มวิจัยของ Whitesides (Martinez et al., 2007) เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่มีราคาถูก สามารถปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันได้ง่าย และมีคุณสมบัติพิเศษคือการดูดซับของไหล ทำให้ของไหลสามารถเคลื่อนที่ไปบนกระดาษได้ ในแง่นี้อาจถือว่าอุปกรณ์ตรวจวัดประเภท immunochromatographic strip หรือ lateral flow device (LFD) เป็นสับเซตหนึ่งของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่มีรูปแบบการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อนเนื่องจากการไหลในทิศทางเดียวและมักจะตรวจวัดเป้าหมายเพียงชนิดเดียว แต่อุปกรณ์ฐานกระดาษในยุคหลังสามารถพัฒนาการทำงานให้ซับซ้อนมากขึ้น เช่นสามารถควบคุมรูปแบบหรือทิศทางของการไหลได้โดยการสร้างช่องทางไหล (flow channels) ด้วยการพิมพ์ไข (wax printing) นอกจากนี้ยังสามารถนำชิ้นกระดาษมาประกอบกันเป็นชั้นๆ ทำให้เกิดอุปกรณ์ตรวจวัดในรูปกระดาษที่เป็นสามมิติ (Martinez et al., 2008) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ได้หลากหลายตามลำดับขั้นตอนในลักษณะที่ควบคุมได้ เช่น การเตรียมตัวอย่าง การตรวจวัดตัวอย่าง ซึ่งอาจทำได้หลายเป้าหมายพร้อมกัน (Martinez et al., 2010; Fernandes et al., 2017) อุปกรณ์ฐานกระดาษได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดเชื้อก่อโรค ซึ่งอาจทำได้โดยการตรวจวัดสมบัติบางประการของเชื้อโดยตรง เช่น ลักษณะของประจุบนพื้นผิว (Ceran et al., 2014) หรือการผลิตเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงของกลุ่มหรือสปีชีส์ของแบคทีเรีย เช่น *E. coli* (ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase และ β -glucuronidase), *Enterococcus* sp. (ผลิตเอนไซม์ β -glucosidase), *Streptococcus aureus* (ผลิตเอนไซม์ protease) ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนไซม์จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่าจากสี (Jokerst et al., 2012; Hossain et al., 2012; Adkins et al., 2017; Suaifan et al., 2017) หรือโดยปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า (Adkins et al., 2017) การตรวจวัดด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา โดยอาศัยแอนติบอดี (Li et al., 2011; Terao et al., 2013; Yonekita et al., 2013) หรือแอฟตาเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ (Bruno, 2014) ตัวอย่างที่น่าสนใจหนึ่งผู้วิจัยได้ออกแบบอุปกรณ์ที่สามารถตรวจวัดเชื้อก่อโรคในอาหารถึง 10 ชนิดได้พร้อมกันโดยใช้เทคโนโลยีของ upconverting phosphor มีความไวอยู่ในช่วง 10^3 - 10^5 CFU/mL และมีความจำเพาะอยู่ในช่วง 80-100% (Zhao et al., 2016) วิธีทางอิมมูโนวิทยาและการตรวจเอนไซม์นี้มีจุดเด่นคือสามารถตรวจวัดแบคทีเรียได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่าง (whole cell detection) แต่มีจุดด้อยคือยังมีความไวค่อนข้างต่ำ จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนของการ enrichment ซึ่งอาจใช้เวลาจนถึง 12 ชั่วโมง อีกวิธีหนึ่งคือการตรวจวัดในระดับสารพันธุกรรมบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ วิธีดังกล่าวมีความไวสูงกว่า เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR หรือเทคนิคอื่นที่ใกล้เคียงกัน และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าอีกสองวิธีที่กล่าวมาแล้วมากเนื่องจากการเป็นการตรวจวัดในระดับสารพันธุกรรม แต่มีข้อเสียคือต้องมีขั้นตอนการสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อน (Dineva et al., 2007) อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนนี้ใช้เวลาราว 2-3 ชั่วโมง ซึ่งไม่เหมาะสำหรับการทำ enrichment

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดสารพันธุกรรมโดยหลักการของไฮบริดเซชันโพรบ

การตรวจวัดสารพันธุกรรมบนอุปกรณ์ฐานกระดาษอาจทำโดยอาศัยไฮบริดเซชันโพรบที่จำเพาะกับลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่จะตรวจสอบ หรือการตรวจวัดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยไม่ต้องอาศัยโพรบ

รูป การตรวจวัดแบบที่ต้องอาศัยไฮบริดเคชันโพรบส่วนใหญ่จะอาศัยการตรึงดีเอ็นเอโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะในรูปแบบของ array เพื่อเป็นโพรบสำหรับจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Call et al., 2003; Rasooly et al., 2008; Severgnini et al., 2011) ซึ่งมักจำเป็นต้องติดฉลากที่ตัวอย่าง เช่น ฉลากเรืองแสง (Fluorescein, Cy3, Cy5 etc) หรือไบโอติน เพื่อให้สามารถตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิคการเรืองแสง หรือการทำให้เกิดสีที่เร่งด้วยเอนไซม์ (enzymatically generated colorimetric reaction) ในกลุ่ม peroxidase หรือ alkaline phosphatase โดยการติดฉลากสามารถทำได้ไม่ยากนักโดยการติดฉลากที่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่น งานของ Noor and Krull (2013), Araújo et al. (2012), Song et al. (2014), Zhou et al. (2014), Glavan et al. (2016) และนอกจากนี้ยังได้มีผู้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดสารพันธุกรรมในรูปแบบของ LFD (Posthuma-Trumpie et al., 2009) ซึ่งส่วนใหญ่อาศัยหลักการของ sandwich hybridization assay โดยใช้อุณหภูมิของคานาโนหรือการติดฉลากชนิดอื่น เช่น อนุภาคคาร์บอนที่ติดฉลากด้วยดีเอ็นเอเพื่อทำให้เกิดสี (Glynou et al., 2003; Litos et al., 2007; Mao et al., 2009) วิธีนี้มีข้อดีคือไม่ต้องการการติดฉลากที่ดีเอ็นเอตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มความไวของการตรวจวัดได้ถึง 3 orders of magnitude โดยการใช้อุณหภูมิที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์ horse radish peroxidase ทำให้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำถึงระดับ 10 fM โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน (He et al., 2011) ข้อจำกัดของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ซึ่งต้องอาศัยเครื่อง thermal cycler สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยใช้เทคนิค isothermal amplification เช่น recombinase polymerase amplification (RPA) (El-Shahawi et al., 2016; Magro et al., 2017) หรือ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Kongkasuriyachai et al., 2017; Kaewphinit et al., 2013) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอบนกระดาษที่ผนวกขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจวัดโดยเทคนิค LFD ไปด้วยกันในอุปกรณ์ชิ้นเดียวที่ทำให้ใช้งานได้สะดวกมากยิ่งขึ้น (Choi et al., 2015; Choi et al., 2016a; Choi et al., 2016b; Tang et al., 2017; Xu et al., 2017) เทคโนโลยีเหล่านี้ได้เริ่มมีการนำไปใช้งานทางด้านการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหารบ้างแล้ว ตัวอย่างเช่น การตรวจหา *Listeria* sp และ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างอาหาร (Blažková et al. 2009a; Blažková et al. 2009b) การใช้ LAMP-LFD เพื่อตรวจหาเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในอาหารสำเร็จรูป (Lalle et al., 2018) ในประเทศไทยเองก็มีผู้พัฒนาชุดทดสอบสารพันธุกรรมในรูปแบบของ LFD เพื่อการตรวจวัดเชื้อก่อโรคอยู่บ้าง ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ โกสุม จันทรศิริ และคณะ (2560)

เทคโนโลยีพีเอ็นเอกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

ในงานที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดจะใช้เทคโนโลยีของดีเอ็นเอ หรือแอนติบอดี เพื่อเป็นตัวจับสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาแล้ว ในช่วงประมาณ 20 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาโอลิโกนิวคลีโอไทด์แอนะล็อกที่โดดเด่นอันหนึ่งคือพีเอ็นเอ ซึ่งเกิดจากการแทนที่โครงสร้างของดีออกซีไรโบสฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยเพปไทด์ พีเอ็นเอมีความเสถียร และแสดงสมบัติการจับยึดที่เหนือกว่าดีเอ็นเอ ทั้งในแง่ของความแข็งแรงและจำเพาะเจาะจง มันจึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นไฮบริดเคชันโพรบแทนดีเอ็นเอที่ใช้กันโดยทั่วไป โดยมีหลักฐานว่าการใช้พีเอ็นเอโพรบที่มีความแข็งแรงในการจับยึดสูงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดียิ่งขึ้น (Pokorski et al., 2005; Zhang and Appella, 2007) มีตัวอย่างมากมายที่ใช้พีเอ็นเอเป็นไฮบริดเคชันโพรบสำหรับตรวจวัดกรดนิวคลีอิกที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งโดยทั่วไปจะต้องตรึงพีเอ็นเอโพรบบนวัสดุรองรับ เช่น ขั้วไฟฟ้าทองหรือคาร์บอน กระดาษสไลด์ ซิลิคอนชิป หรือพอลิเมอร์ (Brandt, 2004) จากนั้นจึงนำไปไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมายและตรวจวัดโดยเทคนิคต่างๆ เช่น ตัวอย่างเช่น เคมีไฟฟ้า, Surface Plasmon Resonance (SPR), การตรวจวัดการเรืองแสง โดยข้อได้เปรียบของพีเอ็นเอ

นอกเหนือจากความแข็งแรงของการจับยึดและความจำเพาะเจาะจงที่มากกว่าการใช้ดีเอ็นเอเป็นโพรบดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นคือโครงสร้างที่ปราศจากประจุลบเนื่องจากไม่มีหมู่ฟอสเฟตของพีเอ็นเอทำให้สามารถใช้หลักการตรวจวัดอื่นที่ไม่สามารถทำได้เมื่อใช้ดีเอ็นเอปกติเป็นโพรบ เช่น การตรวจวัดจากหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอที่เมาไฮบริดซ์กับพีเอ็นเอโพรบด้วยเทคนิค TOF-SIMS (Arlinghaus et al., 1997; Brandt et al., 2006) การตรวจวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าที่เกิดจากสีย้อมประจุบวกหรือสีย้อมที่จับได้เฉพาะกับดีเอ็นเอหรือไฮบริดของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (Raymond et al., 2005; Yildiz et al., 2013; Hejazi et al., 2010) หรือการตรวจวัดจากการจับของอนุภาคเงินหรือทองคำที่มีประจุบวกตามด้วยการขยายสัญญาณโดยการตกตะกอนของโลหะ (Pokorski et al., 2005; Kim et al., 2010) เป็นต้น ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้หลักการของ sandwich hybridization assay แม้จะมีงานวิจัยจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดสารพันธุกรรมฐานกระดาษในรูปของ array (Choi et al., 2017) แต่ก็มีงานวิจัยน้อยมากที่ใช้พีเอ็นเอเป็นโพรบ โดยนอกจากงานชิ้นหนึ่งที่ตีพิมพ์มานานแล้ว (Hoffmann et al., 1997) ที่เหลือล้วนแต่เป็นผลงานที่มาจากห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยเอง ทั้งสิ้น (Laopa et al., 2013; Jirakittiwut et al., 2015; Teengam et al., 2017a; Teengam et al., 2017b) ในส่วนของ LFD ที่เกี่ยวข้องกับพีเอ็นเอโพรบเพิ่งมีงานเพียงสองชิ้นเท่านั้นที่ได้รับการตีพิมพ์ (Sayers et al., 2018; Xu et al., 2018) โดยทั้งสองชิ้นเป็นงานในปี ค.ศ. 2018 และใช้พีเอ็นเอชนิดดั้งเดิมคือ aegPNA ที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าพีโรลิดีนิลพีเอ็นเอที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Vilaivan, 2015) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้พีเอ็นเอเพื่อเป็นโพรบแทนดีเอ็นเอในอุปกรณ์ตรวจวัดสารพันธุกรรมฐานกระดาษทั้งในรูปแบบ array และ LFD ยังมีผู้ศึกษาไม่มากนัก แต่ก็มีตัวอย่างเพียงพอที่จะแสดงให้เห็นว่าแนวคิดนี้เป็นไปได้และสมควรจะศึกษาพัฒนาต่อไปเป็นอย่างยิ่ง

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดสารพันธุกรรมโดยอาศัยหลักการ LAMP

ดังที่กล่าวไปแล้วว่าขั้นตอนหนึ่งที่เป็นข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรม คือ การที่ต้องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ซึ่งต้องอาศัยเครื่อง thermal cycler อย่างไรก็ตามข้อจำกัดนี้สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยใช้เทคนิค isothermal amplification เช่น recombinase polymerase amplification (RPA) (El-Shahawi et al., 2016; Magro et al., 2017) หรือ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Kongkasuriyachai et al., 2017; Kaewphinit et al., 2013) โดยเฉพาะเทคนิค LAMP ซึ่งทำได้ที่อุณหภูมิคงที่ค่าเดียวจึงไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่อง thermal cycler อีกทั้งยังให้ประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่สูงและจำเพาะเจาะจงกว่า PCR นอกจากนี้ยังให้ by-product คือ magnesium pyrophosphate ซึ่งจะตกตะกอนทำให้สารละลายขุ่น ซึ่งใช้บ่งบอกความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยตัวเอง อย่างไรก็ตาม การอ่านผลด้วยตาเปล่าจากความขุ่นของตะกอนสังเกตได้ยาก จึงมีผู้พัฒนาใช้สีย้อมหรือตัวตรวจวัดอื่นในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เพื่อช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะในการวิเคราะห์ผล ตัวอย่างเช่น การใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนที่ตรึงด้วยดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะ (Arunrut et al., 2013; Suebsing et al., 2013) การใช้สีย้อม hydroxynaphthol blue (HNB) ซึ่งเปลี่ยนแปลงสีได้ตามปริมาณของแมกนีเซียมไอออนในปฏิกิริยา ทำให้สามารถตรวจสอบความสำเร็จของปฏิกิริยาได้จากปริมาณของ Mg^{2+} ที่ลดลง (Goto et al., 2009; Bearinger et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการใช้รีเอเจนต์ที่เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตที่ปลดปล่อยออกมาแล้วเกิดเป็น blue phosphomolybdenum complex (Zhang et al., 2014) การใช้สีย้อมเรืองแสงที่จำเพาะกับดีเอ็นเอ เช่น SYBR Green (Parida et al., 2005; Hill et al., 2008) หรือ Gel red (Herrera-Vasquez et al., 2018) ที่เข้าจับโดยตรงกับดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก LAMP ทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวเมื่ออ่านผลภายใต้เครื่องฉายแสงยูวี การใช้ silver nanoplate ที่เปลี่ยนสีเมื่อจับกับดีเอ็นเอ (Chaumpluk and Suriyasomboon, 2014) หรือสีย้อม crystal violet (CV) ที่ในสภาพ

เป็น sulfite adduct จะไม่มีสี แต่เมื่อจับกับดีเอ็นเอจะเกิดการหลุดออกของหมู่ซัลไฟต์ เกิดเป็นสีม่วง-น้ำเงิน ขึ้น (Miyamoto et al., 2015) ซึ่งหลักการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด LAMP บนกระดาษได้ แต่ส่วนใหญ่จะเป็นการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลอง แล้วนำผลิตภัณฑ์มาตรวจวัดบนกระดาษโดยการเปลี่ยนสี ด้วยตาเปล่า (Zhang et al., 2015; Hongwarittorn et al., 2017; Roy et al., 2017) ซึ่งหากสามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจวัดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในเชิงปริมาณไปด้วยกันในอุปกรณ์ชิ้นเดียวกันจะทำให้ใช้งานได้ สะดวกมากยิ่งขึ้นดังเช่นตัวอย่างในงานวิจัยของ Seok et al. (2017)

โดยสรุป การตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค LAMP นี้ใช้เพียงอุปกรณ์ให้ความร้อน ที่ช่วง 60-65 องศาเซลเซียส และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า วิธีการตรวจสอบนี้จึงมีความเหมาะสมกับการตรวจในระดับ ท้องถิ่นและ ณ จุดดูแล มีความไวสูงกว่า เมื่อเทียบกับเทคนิค PCR (0.01-1 fg DNA vs 0.2-10 fg DNA) (Techathuvanan et al., 2010; Suebsing et al., 2013; Ranasinghe et al., 2015) ให้ความจำเพาะสูง รวดเร็ว ง่าย และราคาไม่แพง โดยคณะผู้วิจัย (WK, NS) ได้พัฒนาชุดตรวจวัดที่อาศัยเทคโนโลยีของ LAMP ขึ้นมาเป็นจำนวนมากตัวอย่างเช่น ชุดตรวจโรคกุ้งตายด่วนด้วยเทคนิค LAMP-nano gold (วรรณสิกา เกียรติ ปฐมชัย และคณะ, 2559) แต่ยังไม่เคยพัฒนาอุปกรณ์สำเร็จรูปบนกระดาษที่ใช้งานได้สะดวก และให้ผลดี เทียบเท่ากับการทำ LAMP ปกติในหลอดทดลอง อีกทั้งจากตัวอย่างที่ยกมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสามารถ เลือกใช้สีย้อมที่หลากหลายสำหรับตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือลดลงจากปฏิกิริยา LAMP ไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอ แมกนีเซียม หรือฟอสเฟตไอออน และยังสามารถนำไปใช้สีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ ที่สังเคราะห์ ได้เอง ที่อาจมีราคาถูกและ/หรือมีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือดีกว่าสีย้อมที่มีการใช้งานกับเทคนิค LAMP อยู่ แล้ว ตัวอย่างหนึ่งคือสีย้อมชนิด styryl dye ที่มีผู้พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้เพื่อใช้เป็นสีย้อมดีเอ็นเอ (Bohländer and Wagenknecht, 2015; Lee et al., 2003) และคณะผู้วิจัยได้เคยแสดงให้เห็นโดยหลักการ แล้วว่าสามารถใช้ติดตามปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลองได้เป็นอย่างดี (นราพร สมบูรณ์นะ และคณะ, 2560)

3. วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร
2. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาษที่ใช้งานได้ง่ายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร
3. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในตัวอย่างจริง
4. เพื่อพัฒนารูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดให้อยู่ในลักษณะพร้อมใช้งาน

4. เนื้อหางานวิจัยโดยสรุป

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็นสองโครงการย่อย เกี่ยวเนื่องกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อ ที่สนใจ และตรวจสอบความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้น โดยจะมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีที่ ได้เคยพัฒนามาแล้วจากงานวิจัยที่ได้รับทุน สกว. ก่อนหน้านี้ไปเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่ใช้งานได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนในการทดลอง อ่าน และแปลผล โดยรายละเอียดการดำเนินงานของแต่ละ โครงการสามารถสรุปได้ดังนี้ (สามารถดูรายละเอียดทางวิชาการของทั้งแต่ละโครงการย่อยในภาคผนวก)

โครงการย่อยที่ 1 : การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาศเพื่อบ่งชี้เชื้อก่อโรคในอาหารโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ

โครงการนี้มีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับการพัฒนาตัวตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาศจากพีเอ็นเอโพรบ โดยประยุกต์จากปฏิกิริยาการตรึงพีเอ็นเอบนกระดาศที่ได้พัฒนามาอย่างต่อเนื่องในกลุ่มวิจัย (Laopa et al. 2013; Jirakittiwut et al. 2015; Leekrajang, 2019) เพื่อใช้ตรวจวัด *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่ง และมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับ *Bacillus* สายพันธุ์อื่นอย่างมาก ดังนั้นกระบวนการตรวจหาการปนเปื้อน *B. cereus* ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. cereus* กับสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้น ที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่ำ โดยให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำสูง เป็นสิ่งสำคัญ โดยคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการใช้เทคโนโลยีของฟิโรลิตินิลพีเอ็นเอโพรบที่มีความจำเพาะสูง (Vilaivan, 2015) น่าจะเหมาะสมกับโจทย์ดังกล่าว

อุปกรณ์ตรวจวัดเชื้อ *B. cereus* ที่พัฒนาขึ้นภายใต้โครงการนี้ประกอบด้วยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาศกรงที่ผ่านการตัดแปรด้วย carboxymethylcellulose เพื่อให้มีพื้นผิวเป็นหมู่คาร์บอกซิลิกที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของพีเอ็นเอได้โดยปฏิกิริยาเอไมด์คัปปลิง ซึ่งเป็นหลักการที่คณะผู้วิจัยในการประดิษฐ์ได้พัฒนาขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์อื่นมาก่อนแล้ว (Jirakittiwut et al. 2020) โดย ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ เพื่อคัดเลือกยีนที่เป็นเอกลักษณ์ของ *B. cereus* มา 2 ตัวคือ *GroEL* (chaperonin) และ *MotB* (flagella motor protein) และได้คัดเลือกยีนควบคุมอีกตัวหนึ่งคือยีน 16S rRNA ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียทั่วไป และได้นำลำดับเบสของยีนดังกล่าวมาออกแบบดีเอ็นเอโพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอโพรบสำหรับระบุตัวตนของ *B. cereus* โดยในอุปกรณ์ตรวจวัดแต่ละชิ้นประกอบด้วยพีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับยีนทั้งสองตัวของ *B. cereus* และยีนควบคุม ในการใช้งานจะต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยไบโอดีนแยกกัน 3 คู่ สำหรับเพิ่มปริมาณของยีน *GroEL*, *MotB* และ 16S rRNA ตามลำดับ และนำ PCR amplicon ที่ได้ไปไฮบริดซ์กับพีเอ็นเอโพรบซึ่งตรึงอยู่บนกระดาศที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยการทำปฏิกิริยาสร้างสีโดยใช้เอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่เชื่อมต่อกับสเตรปตาวิดิน หากมีเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างควรจะเห็นจุดที่ตรงกับยีนทั้งสามตำแหน่ง กระบวนการนี้อาศัยการขยายสัญญาณสองครั้ง (PCR และการใช้เอนไซม์) จึงน่าจะทำให้การตรวจวัดนี้มีความไวที่สูง

ในงานวิจัยได้พิสูจน์ความสำเร็จของการออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีนทั้งสามว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และความจำเพาะเจาะจงกับ *B. cereus* โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งแสดงให้เห็นแถบของ PCR amplicon ที่มีขนาดตรงกับที่ออกแบบไว้ และมีความจำเพาะกับเฉพาะ *B. cereus* กล่าวคือจะไม่เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือได้ amplicon ที่ไม่ตรงกับขนาดที่คำนวณไว้สำหรับเชื้ออื่นที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น *Bacillus* ชนิดอื่นๆ จากนั้นจึงได้พิสูจน์หลักการของการตรวจวัดโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาศ ซึ่งพบว่าได้ผลตามที่คาดไว้ทุกประการ เว้นแต่ตำแหน่งของยีน 16S rRNA ที่ให้สัญญาณไม่ค่อยชัดเจนนักเมื่อเทียบกับอีกสองยีนที่เหลือ และได้ทดสอบความไวความไว (sensitivity) ของการตรวจวัด ด้วยการเปลี่ยนปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบของกระบวนการ PCR ตั้งแต่ 0.5 – 100 ng พบว่าสามารถเห็นผลได้ชัดเจน แม้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ (0.5/2.5 ng DNA/reaction สำหรับยีน *GroEL* และ *MotB* ตามลำดับ) จึงยังไม่สามารถวัดขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดได้ บอกได้แต่ว่าต่ำมาก ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดลองเพิ่มเติม เพื่อหาขีดจำกัดของอุปกรณ์ตรวจวัดต่อไป นอกจากนี้ยังได้ประเมินประสิทธิภาพการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวัดฐานกระดาศกับตัวอย่างจริง ซึ่งเป็นข้าวสารบดที่ผ่านการ spike ด้วยเชื้อ *B. cereus* ที่ 1000 CFU/g ซึ่งเป็นตัวเลขมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่าในอาหารที่ยังไม่ผ่านการปรุงสุกไม่ควรจะเชื่อเกินค่านี้ จำนวน 25 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุมอีก 1 ตัวอย่าง ซึ่งผลการตรวจวัดพบว่าให้ผลบวกกับทั้งสองยีนอย่างชัดเจนในทุก

ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อลงไป ในขณะที่ยีนควบคุม 16S rRNA นั้น แม้จะให้สัญญาณที่ไม่เข้มเทียบเท่ายีนหลักทั้งสอง แต่ก็ให้สัญญาณที่แตกต่างชัดเจนกว่าพื้นหลังในทุกกรณี และในตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อลงไปก็ไม่ให้สัญญาณที่ตำแหน่งของยีน *GroEL* และ *MotB* ที่เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ *B. cereus* แต่เห็นสัญญาณจางๆ ที่ยีนควบคุม 16S แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียอื่นปนเปื้อนอยู่ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการที่ไม่เห็นสัญญาณของ *GroEL* และ *MotB* เป็น true negative โดยไม่ได้เกิดจากปัญหาระหว่างกระบวนการ PCR

ท้ายที่สุด คณะผู้วิจัยได้ออกแบบชุดอุปกรณ์ตรวจวัด โดยใช้กระบวนการพิมพ์ในสามมิติ เพื่อให้การใช้งานอุปกรณ์ตรวจวัดสะดวกขึ้น ทั้งในการหยิบจับ ลดการปนเปื้อน ทำผู้ปฏิบัติมีความปลอดภัยมากขึ้นจากการลดการสัมผัสกับตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการตรวจวัด และยังได้ออกแบบแท่นสำหรับถ่ายภาพอุปกรณ์ ในกรณีที่ต้องการนำไปผ่านกระบวนการวิเคราะห์ภาพต่อไป โดยอาศัยหลักการพิมพ์ในสามมิติเช่นกัน โดยแท่นดังกล่าวได้ออกแบบให้สามารถถ่ายภาพได้โดยไม่มีเงาของสมาร์ตโฟนมาบัง และมีระยะห่างและตำแหน่งที่คงที่ อีกทั้งยังสามารถปรับระดับความสูงได้เพื่อให้เหมาะสมกับสมาร์ตโฟนแต่ละรุ่น ซึ่งชุดอุปกรณ์ประกอบดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีตามที่คาดหวังไว้

โครงการย่อยที่ 2: ปฏิบัติการ LAMP บนกระดาษที่อ่านผลเชิงปริมาณด้วยสีภายในขั้นตอนเดียวเพื่อการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดดีเอ็นเอที่อ่านผลเชิงปริมาณได้โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) ร่วมกับสีย้อมที่เปลี่ยนแปลงสีหรือการเรืองแสง เพื่อนำไปพัฒนาต่อเป็นอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารที่ให้ผลแม่นยำ และทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน และ/หรือบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ทั้งในรูปแบบที่เป็นหลอดทดลองและฐานกระดาษ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา LAMP ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องเทอร์มอลไซเคิล (thermal cycler) และมีข้อได้เปรียบอื่นทั้งในแง่ของความง่าย ความจำเพาะเจาะจง และประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เหนือกว่า PCR ที่เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป การใช้งานร่วมกับสีย้อมประจุบวกซึ่งมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ ได้แก่ 4-(4-(N,N-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)-butoxy)ethenyl)-1-methylquinolinium ($4QL^{2+}$) ที่พัฒนาขึ้นในกลุ่มของผู้วิจัยเองทำให้สามารถบ่งชี้ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากการเปลี่ยนแปลงสีที่อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าแทนที่จะใช้วิธีเจลอเล็กโตรโฟรีซิส โดยเชื้อที่เลือกมาเป็นเป้าหมายของการตรวจวัดได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ โดยบางสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อ เช่น โรคอุจจาระร่วง นอกจากนี้ *E. coli* ยังเป็นตัวบ่งชี้สุขอนามัยของการเตรียมอาหาร โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้กำหนดมาตรฐานไม่เกิน 3-100 MPN (most probable number)/กรัมของอาหาร ขึ้นกับประเภทของอาหาร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) และต้องไม่พบเลยในน้ำดื่ม (ต่อมิลลิลิตร) อีกเป้าหมายหนึ่งคือเชื้อ *Staphylococcal aureus* ซึ่งพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ ทางเดินหายใจ และบนผิวหนังของมนุษย์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ง่าย บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ staphylococcal enterotoxin A (SEA) ซึ่งทนความร้อนได้ดี ตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อาหารที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ อาหารปรุงสุกทั่วไป และปรุงสุกแล้วแช่เย็นต้องไม่มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* มากกว่า 100 เซลล์หรือ CFU ต่อกรัมอาหาร

ในงานวิจัยนี้ใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ของ PCR และ LAMP ที่ได้จากเอกสารอ้างอิง สำหรับ *E. coli* (Stratakos et al., 2016) และสำหรับ *S. aureus* (sea) ที่ได้พัฒนาขึ้นมาเองในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยซึ่งได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (นราพร สมบูรณ์นะ และคณะ, Petty patent no. 1603001252) ใน

ระยะแรกได้พิสูจน์การเกิด LAMP ด้วยชุดไพรเมอร์ข้างต้นในภาวะของหลอดทดลอง โดยได้หาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม โดยพบว่าเชื้อทั้งสองมีภาวะที่เหมาะสมตรงกันคืออุณหภูมิ 63 °C และเวลาทำปฏิกิริยา 30 นาที จากนั้นจึงได้พยายามหาภาวะที่จะทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนสีได้อย่าง real time โดยใช้วิธีการผสมสีย้อมเข้าไปกับปฏิกิริยา LAMP เลย แต่พบว่าสีย้อมไปรบกวนการเกิดปฏิกิริยา LAMP จึงต้องเปลี่ยนวิธีการเป็นทำ LAMP ให้เสร็จก่อน แล้วจึงเติมสีย้อม 4QL²⁺ โดยได้ปรับปรุงสัดส่วนของผลิตภัณฑ์จาก LAMP ต่อสีย้อม จนได้การเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนที่สุด แล้วนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐานได้แก่การใช้ LAMP ร่วมกับสีย้อม HNB การใช้ LAMP ร่วมกับเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (LAMP-GE) และวิธี PCR ร่วมกับเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (PCR-GE) ซึ่งสำหรับทั้งสองเชื้อ พบว่าวิธี LAMP-4QL²⁺ ให้ความไวเทียบเท่ากับวิธี LAMP-HNB และ PCR-GE โดยอยู่ที่ 33.9 สำเนาของดีเอ็นเอ ซึ่งน้อยกว่าวิธี LAMP-GE ที่สามารถตรวจวัดลงไปได้ถึง 3.39 สำเนาของดีเอ็นเอ และทั้งสองกรณีมีความจำเพาะเจาะจงที่สูง โดยเกิดการเปลี่ยนสีที่จำเพาะกับเชื้อที่ตรวจวัดเท่านั้น

เมื่อได้ประเมินประสิทธิภาพของวิธี LAMP-4QL²⁺ ในหลอดทดลองสำเร็จแล้ว จึงได้เปลี่ยนจากการทำปฏิกิริยาในหลอดมาอยู่บนฐานกระดาษ (paper-based LAMP) (Seok et al., 2017) เพื่อเป็นการพัฒนาชุดตรวจให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในภาคสนามและจุดตรวจมากขึ้น โดยตรึงเฉพาะไพรเมอร์ FIP ผ่านอันตรกิริยาระหว่าง biotin และ streptavidin ที่ถูกตรึงบนกระดาษ ส่วนไพรเมอร์และตัวอย่างที่เหลือนิยมลงไปในภาวะสารละลาย ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นพบว่าสามารถทำปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบได้ชัดเจนนักด้วยสีย้อม 4QL²⁺ คาดว่าว่าผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ติดอยู่บนฐานกระดาษมากกว่าอยู่ในส่วนน้ำ ดังนั้นการตรวจความสำเร็จของการทำปฏิกิริยาจึงต้องทำการชุดผลิตภัณฑ์ที่ติดอยู่บนกระดาษให้หลุดออกมาบางส่วนเพื่อให้สีจับกับดีเอ็นเอได้ดีขึ้น ซึ่งภายใต้ภาวะดังกล่าวจะสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบด้วยตาเปล่าได้ค่อนข้างชัดเจน และสามารถยืนยันโดยด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400 – 700 nm พบว่าวิธี LAMP สำหรับ *E. coli* บนฐานกระดาษสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 33.9 สำเนาดีเอ็นเอ ภายในเวลาปฏิกิริยา 60 นาที ซึ่งมีความไวเทียบเท่ากับการทำปฏิกิริยาในภาวะสารละลายที่ใช้เวลา 45 นาที ส่วนวิธี LAMP สำหรับ *S. aureus* บนกระดาษสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 100 สำเนาดีเอ็นเอ ภายในเวลาปฏิกิริยา 60 นาที ซึ่งมีความไวน้อยกว่าการทำปฏิกิริยาในหลอดที่สามารถตรวจวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 33 สำเนาดีเอ็นเอ ภายในเวลาเพียง 45 นาที อย่างไรก็ตามความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ระดับนี้ยังคงอยู่ในมาตรฐานอ้างอิงอาหารพร้อมบริโภคทั่วไปคือ ไม่เกิน 100 CFU ต่อกรัมอาหาร จึงน่าจะสมารถนำมาใช้ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหารนอกห้องปฏิบัติการหรือในภาคสนามได้

จากนั้นจึงได้ประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค LAMP บนฐานกระดาษในการตรวจหาการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อหมูปรุงสุก ที่เก็บจากภาคสนามทั้งหมด 45 ตัวอย่าง โดยใช้สีย้อม 4QL²⁺ เปรียบเทียบกับสีย้อม Novel Juice (NJ) ซึ่งเป็นสีย้อมเรืองแสงที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ และเทียบกับเทคนิค LAMP-GE พบว่าการใช้ LAMP ร่วมกับสีย้อม 4QL²⁺ บ่งชี้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนได้ 7 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ถูกบ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนโดยเทคนิค LAMP-GE (มี false negative 2 ตัวอย่าง) ในขณะที่สีย้อม NJ บ่งชี้ได้ถูกต้องทั้ง 9 ตัวอย่าง เมื่อคำนวณ specificity -ของสีย้อมทั้งสองจะได้ 100% แต่ sensitivity ของ paper-based LAMP-4QL²⁺ มีค่าเพียง 78% ซึ่งต่ำกว่า paper-based LAMP-NJ ที่ให้ sensitivity สูงถึง 100% จึงแสดงให้เห็นว่าระบบ paper-LAMP สามารถใช้งานได้จริง แต่ยังสามารถพัฒนาต่อไปได้อีกโดยการหาสีย้อมที่มีการเปลี่ยนสีชัดเจนขึ้นกว่า 4QL²⁺ เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจวัดให้ดียิ่งขึ้น

5. ผลงาน

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ/หนังสือ/สิทธิบัตร

5.1.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Published/Accepted

5.1.1.1 Ditmangklo, B.; Taechalertrpaisarn, J.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. Clickable styryl dyes for fluorescence labeling of pyrrolidiny PNA probes for the detection of base mutations in DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 9712–9725.

5.1.1.2 Muangkaew, P.; Vilaivan, T. Modulation of DNA and RNA by PNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, accepted (<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127064>)

Submitted

5.1.1.3 Srimongkol, G.; Ditmangklo, B.; Choopara, I.; Thaniyavarn, J.; Dean, D.; Kokpol, S.; Vilaivan, T.; Somboonna, N. Rapid and hypersensitive colorimetric loop-mediated isothermal amplification for point-of-care *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene detection in milk and pork products. *Sci. Rep.* submitted.

In Preparation

5.1.1.4 Jirakittiwut, N.; Cheiwchanchamnangij, T.; Waditee-Sirisattha, R.; Rengpipat, S.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T. Chemical immobilization of pyrrolidiny peptide nucleic acid on paper yields an efficient probe for the detection of the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Agric. Food Chem.* in preparation.

5.1.2 หนังสือ

-

5.1.3 สิทธิบัตร

5.1.3.1 นราพร สมบูรณ์นะ, ธีรยุทธ วิไลวัลย์, สิริกานต์ จันทร์ประกอบ, กชกร ศุภบวรสถิตย์, บุญส่ง ดิษมงคล "กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่" คำขอสิทธิบัตรการประดิษฐ์ เลขที่ 1901005841

และกำลังอยู่ระหว่างเตรียมร่างสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรอีก 2 เรื่อง

5.2 ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย

ได้สร้างทีมนักวิจัยระดับปริญญาโทและเอกที่เป็นอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษาจำนวน 20 คนที่มีความสนใจร่วมกันในการพัฒนาและใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอ โดยหัวหน้าโครงการได้พบปะเพื่อสอบถามความก้าวหน้าของโครงการวิจัยและปัญหา-อุปสรรคอย่างสม่ำเสมอ ทั้งในรูปแบบตัวต่อตัวและการใช้อีเมลรายนามของนักวิจัยผู้ร่วมโครงการมีดังนี้

ชื่อ	สังกัด	บทบาท
1. ศ.ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	หัวหน้าโครงการ
2. ผศ.ดร. ธนิษฐ์ ปราณีนรัตน์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์	หัวหน้าโครงการย่อย 1

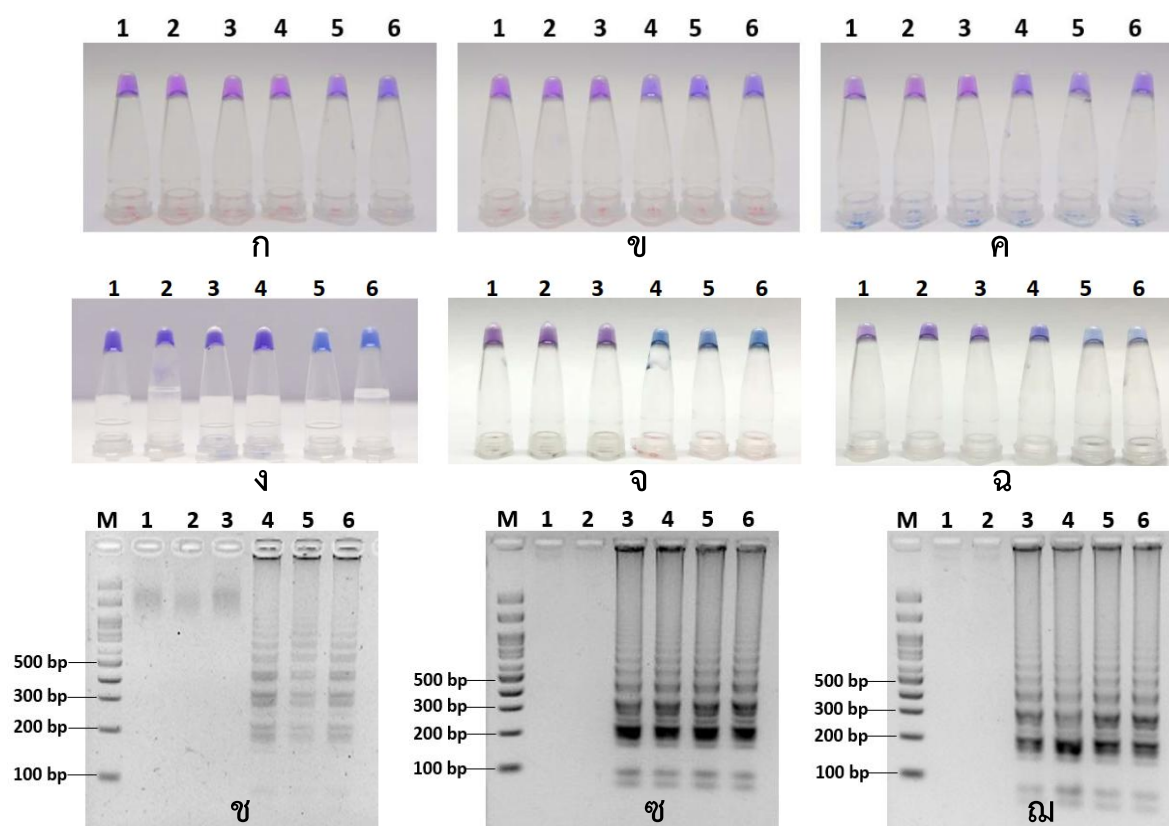
3. รศ.ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ์ สิริศรัทธา	มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	หัวหน้าโครงการย่อย 2
4. อ.ดร. ทวีนนท์ เชี่ยวชาญชำนาญกิจ	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการย่อย 1
5. นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 1
6. นางวรรณสิกา เกียรติปฐมชัย	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ	ผู้ร่วมโครงการย่อย 2
7. น.ส. ไอลดา ชูภารา	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2 (นิสิตปริญญาเอก)
8. น.ส. สิริกานต์ จันทร์ประอบ	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2 (นิสิตปริญญาตรี - สำเร็จ การศึกษาแล้ว)
9. น.ส. กชกร ศุภาวรสถิตย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2 (นิสิตปริญญาเอก)
10. น.ส. บุญส่ง ดิษมังคล้อ	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ผู้ช่วยวิจัยโครงการย่อย 2 (นิสิตปริญญาเอก - สำเร็จ การศึกษาแล้ว)
11. ศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ที่ปรึกษา

5.3 ต้นแบบอุปกรณ์

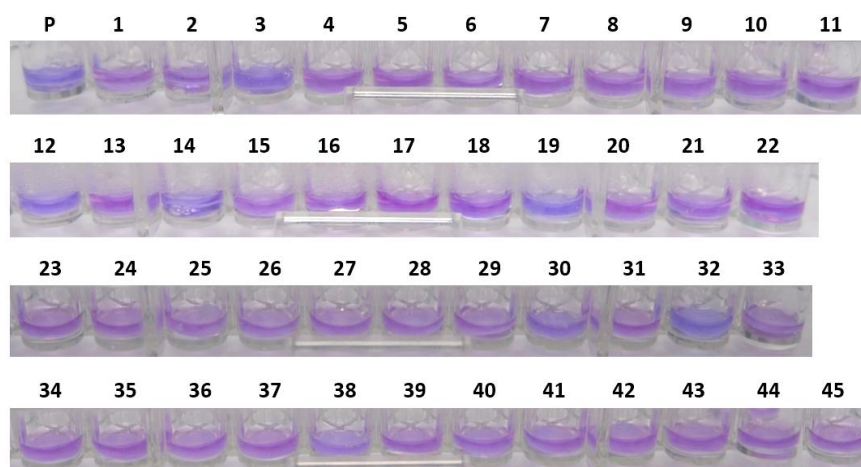
5.3.1 ต้นแบบอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* ที่อาศัยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษ โดยประกอบด้วยพีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับยีน *GroEL*, *MotB* ของ *B. cereus* และยีน 16S rRNA ที่อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้สะดวก มีกรอบจับพร้อมแท่นถ่ายรูป และได้ประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการ (TRL4)



5.3.2 กรรมวิธีตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcal aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยใช้วิธี LAMP ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอ ในรูปแบบหลอดพีซีอาร์ (*E. coli* และ *S. aureus*) (TRL3)



5.3.3 กรรมวิธีตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcal aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยใช้วิธี LAMP ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอ ในรูปแบบฐานกระดาษ โดยได้พิสูจน์หลักการกับเชื้อทั้งสอง (TRL3) แต่ได้ประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการ เฉพาะกรณีของ *S. aureus* โดยยังพบว่าประสิทธิภาพในเชิงของ sensitivity ยังต้องมีการปรับปรุง



6. กิจกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

6.1 ผลงานอื่นๆ เช่นการไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร การได้รับรางวัล

6.1.1 การได้รับเชิญเป็นวิทยากร

-

6.1.2 การเสนอผลงานระดับนานาชาติ

6.1.2.1 Vilaivan, T. Pyrrolidiny peptide nucleic acids: Synthesis, properties and applications. The 20th Tetrahedron Symposium, 18th-21st Jun 2019, Swissotel Bangkok Ratchada, Bangkok, Thailand.

6.1.2.2 Vilaivan, T. Cationic styryl dyes for dual-mode colorimetric and fluorescence sensing of DNA. Gordon Research Conference on Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, 23th-28th Jun 2019, Salve Regina University, Newport, Rhode Island, USA. (oral, invited speaker)

6.1.2.3 Vilaivan, T. Pyrrolidiny Peptide Nucleic Acids: From Design to Applications. Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 07th-09th Nov 2019, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea. (oral, invited speaker)

6.1.2.4 Vilaivan, T. Pyrrolidiny peptide nucleic acid for paper-based DNA biosensors. Trace Analysis and Biosensors International Symposium, 10th-11th February 2020, LRC1, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand. (oral, invited speaker)

6.1.3 การเสนอผลงานระดับชาติ

6.1.3.1 Supabowornsathit, K.; Vilaivan, T. Design, synthesis and structure-properties studies of cationic styryl dyes for DNA sensing applications. The 45th Congress on Science and Technology of Thailand (STT45), Oct 7th-9th, 2019, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

6.1.3.2 Vilaivan, T. Quinoline-based styryl dyes for dual-mode colorimetric and fluorescence sensing of DNA. The 44th Congress on Science and Technology of Thailand (STT44), Oct 29th - 31st, 2018, BITEC, Bangkok, Thailand. (oral, invited)

6.1.4 การได้รับรางวัล

-

6.2 กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

-

6.3 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

6.3.1 ศ.นพ.สุทัศน์ พุเจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรคธาลัสซีเมียแบบครบวงจร มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปใช้เป็นโพรบในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค reversed dot blot

6.3.2 ศ.ดร.อรรณพ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านการวิเคราะห์โดยเทคนิคเคมีไฟฟ้า และ paper-based devices มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปใช้เป็นโพรบในการตรวจดีเอ็นเอในหลากหลายรูปแบบ

6.3.3 ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซ็นเซอร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) และบุคลากรของศูนย์ นำโดย รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร ภาควิชาฟิสิกส์ ได้รับทุนเครือข่ายวิจัยนานาชาติ (IRN) ของสกว. ระยะเวลาดำเนินงาน 1 กันยายน 2562 ถึง 31 สิงหาคม 2565 โดยมีงานบางส่วนที่ได้ต่อยอดไปจากสัณยัติเอ็นเอที่ได้พัฒนาจากงานวิจัยนี้และงานวิจัยก่อนหน้านี้

7. สรุปผลงานวิจัย

ผลการดำเนินการในภาพรวมตัวงานเสร็จสมบูรณ์ตามข้อเสนอโครงการ และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ ได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร โดยของ *Bacillus cereus* ได้จากการประมวลข้อมูลทางชีวสารสนเทศ ส่วนของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้จากข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ และได้นำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาศที่ใช้งานได้ง่ายสำหรับตรวจวัดแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร โดยแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วน งานส่วนแรกได้ต้นแบบอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิด *B. cereus* ที่อาศัยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาศ โดยประกอบด้วยพีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับยีน *GroEL*, *MotB* ของ *B. cereus* และยีน 16S rRNA ที่อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้สะดวก มีการอบจับพร้อมแท่นถ่ายรูป และได้ประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการ งานในส่วนที่ 2 ได้กรรมวิธีตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยใช้วิธี LAMP ร่วมกับสัณยัติเอ็นเอ ในรูปแบบหลอดพีซีอาร์ (*E. coli* และ *S. aureus*) และในรูปแบบฐานกระดาศ โดยได้พิสูจน์หลักการกับเชื้อทั้งสองชนิดในรูปแบบหลอดพีซีอาร์และฐานกระดาศ และได้ประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงที่เก็บจากภาคสนามในรูปแบบฐานกระดาศเฉพาะกรณีของ *S. aureus* โดยพบว่าสามารถตรวจวัดเชื้อได้อย่างมี specificity สูง แต่ประสิทธิภาพในเชิงของ sensitivity ยังต้องมีการปรับปรุง

ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์/ตอบรับให้ตีพิมพ์จำนวน 2 เรื่อง อีกหนึ่งเรื่องหนึ่งอยู่ระหว่างรอผลการพิจารณา และยังมีอีก 1 เรื่องอยู่ระหว่างเก็บรวบรวมข้อมูล นอกจากนี้ยังมีสิทธิบัตร 1 เรื่องที่ยื่นคำขอไปแล้ว และอีก 2 เรื่องอยู่ระหว่างดำเนินการร่าง โดยผู้วิจัยจะรายงานเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ยังได้ต้นแบบของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารที่ได้รับการประเมินประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงในระดับห้องปฏิบัติการจำนวน 2 ต้นแบบ และในระดับพิสูจน์หลักการจำนวน 1 ต้นแบบ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ดำเนินการต่อยอดโดยการสร้างความร่วมมือกับทั้งนักวิจัยและภาคเอกชนเพื่อพัฒนาสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป ในด้านการสร้างคน โครงการวิจัยนี้ได้มีส่วนในการพัฒนานักวิจัยในระดับปริญญาเอก 3 คน และปริญญาตรี 1 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

8. เอกสารแนบ

8.1 reprint หรือ manuscript

8.1.1 reprint ของผลงานหมายเลข 5.1.1.1 – 5.1.1.2 ต้นฉบับ manuscript ของผลงานหมายเลข 5.1.1.3 และหลักฐานการส่งคำขอสิทธิบัตร 5.1.3.1 (ภาคผนวก 2)

8.1.2 บทคัดย่อของงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (6.1.2.1 – 6.1.2.4) (ภาคผนวก 3)

8.1.3 บทคัดย่อของงานประชุมวิชาการระดับชาติ (6.1.3.1 – 6.1.3.2) (ภาคผนวก 3)

8.2 ผลงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

8.2.1 รายละเอียดการดำเนินการของโครงการย่อย (ภาคผนวก 1)

ลงนาม
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

เอกสารอ้างอิง

- Adkins, J. A.; Boehle, K.; Friend, C.; Chamberlain, B.; Bisha, B.; Henry, C. S. Colorimetric and electrochemical bacteria detection using printed paper- and transparency-based analytic devices. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3613–3621.
- Ali, M. M. M.; Mohamed, Z. K.; Klena, J. D.; Ahmed, S. F.; Moussa, T. A. A.; Ghenghesh, K. S. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from Libya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *86*, 866–871.
- Araújo, A. C.; Song, Y.; Lundeborg, J.; Ståhl, P. L.; Brumer, III, H. Activated paper surfaces for the rapid hybridization of DNA through capillary transport. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3311–3317.
- Argudín, M. Á.; Mendoza, M. C.; Rodicio, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* **2010**, *2*, 1751–1773.
- Arlinghaus, H. F.; Kwoka, M. N.; Jacobson, K. B. analysis of biosensor chips for identification of nucleic acids. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3747–3753.
- Arunrut, N.; Kampeera, J.; Suebsiing, R.; Kiatpathomchai W. Rapid and sensitive detection of shrimp infectious myonecrosis virus using a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and visual colorogenic nanogold hybridization probe assay. *J Virol Methods* **2013**, *193*, 542–547.
- Baker, M. Blame it on the antibodies. *Nature* **2015**, *521*, 274–276.
- Bearinger, J. P.; Dugan, L. C.; Baker, B. R.; Hall, S. B.; Ebert, K.; Mioulet, V.; Madi, M.; King, D. P. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2011**, *58*, 805–808.
- Bhowmik, S.; Ghosh, B. N.; Marjomäki, V.; Rissanen, K. Nanomolar pyrophosphate detection in water and in a self-assembled hydrogel of a simple terpyridine-Zn²⁺ complex *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5543–5546.
- Blažková, M.; Koets, M.; Rauch, P.; van Amerongen, A. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in food. *Eur. Food Res. Technol.* **2009a**, *229*, 867.
- Blažková, M.; Koets, M.; Wichers, J. H.; van Amerongen, A.; Fukal, L.; Rauch, P. Nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of pathogenic bacteria from food. *Czech J. Food Sci.* **2009b**, *27*, S350–S353.
- Bohländer, P. R.; Wagenknecht, H.-A. Bright and photostable cyanine-styryl chromophores with green and red fluorescence colour for DNA staining. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 044003.
- Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. 5-(Pyren-1-yl)uracil as a base-discriminating fluorescent nucleobase in pyrrolidinyl peptide nucleic acids. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 3251–3259.
- Brandt, O.; Hoheisel, J. D. Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 617–622.
- Brandt, O.; Feldner, J.; Hellweg, S.; Schröder, 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.
- Brooks, J. T.; Sowers, E. G.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Griffin, P. M.; Hoekstra, R. M.; Strockbine, N. A. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983–2002. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1422–1429.
- Call, D. R.; Borucki, M. K.; Loge, F. J. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *53*, 235–243.

- Chaumpluk, P.; Suriyasomboon, A. A simple paper-based lab-on-a-chip for the detection of a highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Aust. J. Chem.* **2014**, *67*, 1434–1440.
- Choi, J. R.; Tang, R.; Wang, S.; Wan Abas, W. A.; Pingguan-Murphy, B.; Xu, F. Paper-based sample-to-answer molecular diagnostic platform for point-of-care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 427–439.
- Choi, J. R.; Hu, J.; Tang, R.; Gong, Y.; Feng, S.; Ren, H.; Wen, T.; Li, X.; Wan Abas, W. A.; Pingguan-Murphy, B.; Xu, F. An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care. *Lab. Chip* **2016a**, *16*, 611–621.
- Choi, J. R.; Hu, J.; Gong, Y.; Feng, S.; Wan Abas, W. A.; Pingguan-Murphy, B.; Xu, F. An integrated lateral flow assay for effective DNA amplification and detection at the point of care. *Analyst* **2016b**, *141*, 2930–2939.
- Choi, J. R.; Yong, K. W.; Tang, R.; Gong, Y.; Wen, T.; Li, F.; Pingguan-Murphy, B.; Bai, D.; Xu, F. Advances and challenges of fully integrated paper-based point-of-care nucleic acid testing. *Trends Analyt. Chem.* **2017**, *93*, 37–50.
- Creran, B.; Li, X.; Duncan, B.; Kim, C. S.; Moyano, D. F.; Rotello, V. M. Detection of bacteria using inkjet-printed enzymatic test strips. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 19525–19530.
- Dineva, M. A.; MahiLum-Tapay, L.; Lee, H. Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. *Analyst* **2007**, *132*, 1193–1199.
- Dangsohon, A.; Poomsuk, N.; Siri Wong, K.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 74314–74322.
- Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom C.; Vilaivan T. Reductive alkylation and sequential reductive alkylation-click chemistry for on-solid-support modification of pyrrolidinyl peptide nucleic acid. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614–625.
- Fernandes, S. C.; Walz, J. A.; Wilson, D. J.; Brooks, J. C.; Mace, C. R. Beyond wicking: expanding the role of patterned paper as the foundation for an analytical platform. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5654–5664.
- Glavan, A. C.; Niu, J.; Chen, Z.; Güder, F.; Cheng, C.-M.; Liu, D.; Whitesides, G. M. Analytical devices based on direct synthesis of dna on paper. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 725–731.
- Glynou, K.; Ioanno, P. C.; Christopoulos, T. K.; Syriopoulou, V. Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for dna analysis by hybridization. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4155–4160.
- Goto, M.; Honda, E.; Ogura, A.; Nomoto, A.; Hanaki, K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* **2009**, *46*, 167–72.
- He, Y.; Zhang, S.; Zhang, X.; Baloda, M.; Gurung, A. S.; Xu, H.; Zhang, X.; Liu, G. Ultrasensitive nucleic acid biosensor based on enzyme-gold nanoparticle dual label and lateral flow strip biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2018–2024.
- Hejazi, M. S.; Pournaghi-Azar, M. H.; Ahour, F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. *Anal. Biochem.* **2010**, *399*, 118–124.
- Herrera-Vasquez, J. A.; Puchades, A. V.; Elvira-Gonzalez, L.; Jaen-Sanjur, J. N.; Carpino, C.; Rubio, L.; Galipienso, L. Fast detection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the three begomovirus species infecting tomato in Panama. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *151*, 243–250.

- Hill, J.; Beriwal, S.; Chandra, I.; Paul, V. K.; Kapil, A.; Singh, T.; Wadowsky, R. M.; Singh, V.; Goyal, A.; Jahnukainen, T. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2800–2804.
- Hoffmann, R.; Ertl, H. C. J.; Pease, A. M.; He, Z.; Rovera, G.; Otvos Jr, L. Low scale multiple array synthesis and DNA hybridization of peptide nucleic acids in Peptides Frontiers of Peptide Science, Kluwer Academic Press, **1997**, pp 233-234.
- Hongwarittorn, I.; Chaichanawongsaroj, N.; Laiwattanapais, W. Semi-quantitative visual detection of loop mediated isothermal amplification (LAMP)-generated DNA by distance-based measurement on a paper device. *Talanta* **2017**, *175*, 135–142.
- Hossain, S. M.; Ozimok, C.; Sicard, C.; Aguirre, S. D.; Ali, M. M.; Li, Y.; Brennan, J. D. Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection. *Anal Bioanal Chem.* **2012**, *403*, 1567-1576.
- Jampasa, S.; Wonsawat, W.; Rodthongkum, N.; Siangproh, W.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 428–434.
- Jampasa, S.; Siangproh, W.; Laocharoensuk, R.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. A new DNA sensor design for the simultaneous detection of HPV type 16 and 18 DNA. *Sens. Actuators B: Chem.* **2018**, *265*, 514–521.
- 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.
- Jokerst, J. C.; Adkins, J. A.; Bisha, B.; Mentele, M. M.; Goodridge, L. D.; Henry, C. S. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2900–2907.
- Kaewphinit, T.; Arunrut, N.; Kiatpathomchai, W.; Santiwatanakul, S.; Jaratsing, P.; Chansiri, K. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 926230.
- Kargl, R.; Mohan, T.; Bračić, M.; Kulterer, M.; Doliška, A.; Stana-Kleinschek, K.; Ribitsch, V. Adsorption of carboxymethyl cellulose on polymer surfaces: evidence of a specific interaction with cellulose. *Langmuir* **2012**, *28*, 11440–11447.
- 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.
- Kongkasuriyachai, D.; Yongkiettrakul, S.; Kiatpathomchai, W.; Arunrut, N. Loop-mediated isothermal amplification and lfd combination for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1572*, 431-443.
- Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T. Immobilization-Free Electrochemical DNA Detection with Anthraquinone-Labeled Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Probe. *Talanta* **2016**, *146*, 318–325.
- Lalle, M.; Possenti, A.; Dubey, J. P.; Pozio, E. Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiol.* **2018**, *70*, 137–142.
- Laopa, P.S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Positively charged polymer brushes-functionalized filter paper for DNA sequence determination following Dot Blot hybridization employing pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe. *Analyst* **2013**, *138*, 269–277.

- Law, J.; Ab Mutalib, N.-S.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* **2015**, *5*, 770.
- Lee, J. W.; Jung, M.; Rosania, G. R.; Chang, Y.-T. Development of novel cell-permeable DNA sensitive dyes using combinatorial synthesis and cell-based screening. *Chem. Commun.* **2003**, 1852–1853.
- Li, C. Z.; Vandenberg, K.; Prabhulkar, S.; Zhu, X.; Schneper, L.; Methee, K.; Rosser, C.J.; Almeida, E. Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis. *Biosens Bioelectron.* **2011**, *26*, 4342–4348.
- Litos, I. K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K.; Traeger-Synodinos, J.; Kanavakis, E. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by primer extension reaction in a dry-reagent dipstick format. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 395–402.
- Lowe, G.; Vilaivan, T. Homologous peptide nucleic acids. United States Patent US7098321 B2 date: August 29, 2006.
- Mao, X.; Ma, Y.; Zhang, A.; Zhang, L.; Zeng, L.; Liu, G. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1660–1668.
- 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.
- Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Whitesides, G. M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 19606–19611.
- Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Whitesides, G. M.; Carrilho, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3–10.
- McDowell, R. H.; Friedman, H. *Bacillus cereus* from StatPearls via NCBI Pubmed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/> (accessed 16 April 2018.)
- Miyamoto, S.; Sano, S.; Takahashi, K.; Jikihara, T. Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes. *Anal. Biochem.* **2015**, *473*, 28–33.
- Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid bearing a base discriminating fluorescence nucleobase 8-(pyrene-1-yl)-ethynyladenine.
- Noor, M. O.; Krull, U. J. Paper-based solid-phase multiplexed nucleic acid hybridization assay with tunable dynamic range using immobilized quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7502–7511.
- Parida, M.; Horioka, K.; Ishida, H.; Dash, P. K.; Saxena, P.; Jana, A. M.; Islam, M. A.; Inoue, S.; Hosaka, N.; Morita, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 2895–2903.
- Pokorski, J. K.; Nam, J.-M.; Vega, R. A.; Mirkin, C. A.; Appella, D. H. Cyclopentane-modified PNA improves the sensitivity of nanoparticle-based scanometric DNA detection. *Chem. Commun.* **2005**, 2101–2103.
- Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; van Amerongen, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 569–582.
- Ranasinghe, S.; Wickremasinghe, R.; Hulangamuwa, S.; Sirimanna, G.; Opathella, N.; Maingon, R. D. C.; Chandrasekharan, V. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania donovani*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2015**, *110*, 1017–1023.

- Rasooly, A; Herold, K. E. Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathog.* **2008**, *5*, 531–550.
- Raymond, F. R.; Ho, H.-A.; Peytavi, R.; Bissonnette, L.; Boissinot, M.; Picard, F. J.; Leclerc, M.; Bergeron, M. G. Detection of target DNA using fluorescent cationic polymer and peptide nucleic acid probes on solid support. *BMC Biotechnology* **2005**, *5*, 10.
- Rohde, A.; Hammerl, J. A.; Boone, I.; Jansen, W.; Fohler, S.; Klein, G.; Dieckmann, R.; Al Dahouk, S. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *62*, 113–118.
- Roy, S.; Mohd-Naim, N. F.; Safavieh, M.; Ahmed, M. U.; Colorimetric nucleic acid detection on paper microchip using loop mediated isothermal amplification and crystal violet dye. *ACS Sens.* **2017**, *2*, 1713–1720.
- Sánchez-Maldonado A. F.; Lee, A.; Farber, J. M. Methods for the control of foodborne pathogens in low-moisture foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *25*, 9, 177–208.
- Sayers, J.; Payne, R. J.; Winssinger, N. Peptide nucleic acid-templated selenocystine–selenoester ligation enables rapid miRNA detection. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 896–903
- Seok, Y.; Joung, H. A.; Byun, J. Y.; Jeon, H. S.; Shin, S. J.; Kim, S.; Shin, Y. B.; Han, H. S.; Kim, M. G. A paper-based device for performing loop-mediated isothermal amplification with real-time simultaneous detection of multiple dna targets. *Theranostics* **2017**, *7*, 2220–2230.
- Severgnini, M.; Cremonesi, P.; Consolandi, C.; de Bellis, G.; Castiglioni, B. Advances in DNA microarray technology for the detection of foodborne pathogens. *Food Bioprocess Tech.* **2011**; *4*: 936–953.
- Song, Y.; Gyarmati, P.; Araújo, A. C.; Lundeberg, J.; Brumer, III, H.; Ståhl, P. L. Visual detection of DNA on paper chips. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1575–1582.
- Stratakos, A.; Linton, M.; Millington, S.; Grant, I. R. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection and differentiation of nonpathogenic and verocytotoxigenic *Escherichia coli* in beef and bovine faeces. *J Appl Microbiol.* **2016**, *122*, 817–828.
- Suaifan, G. A.; Alhogail, S.; Zourob, M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron.* **2017**, *90*, 230–237.
- Suebsing, R.; Prombun, P.; Srisala, J.; Kiatpathomchai, W. Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *J Appl Microbiol.* **2013**, *114*, 1254–1263.
- Tang, R.; Yang, H.; Gong, Y.; You, M.; Liu, Z.; Choi, J. R.; Wen, T.; Qu, Z.; Mei, Q.; Xu, F. A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection. *Lab. Chip* **2017**, *17*, 1270–1279.
- Techathuvanan, C.; Draughon, F. A.; D'Souza, D. H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium from pork. *J. Food. Sci.* **2010**, *75*, 165–172.
- Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Henry, C. S.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. *Anal. Chim. Acta* **2017a**, *952*, 32–40.
- Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O.; Henry, C.S. Multiplex paper-based colorimetric DNA sensor using pyrrolidinyI peptide nucleic acid-induced AgNPs aggregation for detecting MERS-CoV, MTB, and HPV oligonucleotides. *Anal. Chem.* **2017b**, *89*, 5428–5435.

- Terao, Y.; Yonekita, T.; Morishita, N.; Fujimura, T.; Matsumoto, T.; Morimatsu, F. Potential rapid and simple lateral flow assay for Escherichia coli O111. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 755–761.
- Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Buranachai, C.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Hirankarn, N.; Thavarungkul, P. Enhancing capacitive DNA biosensor performance by target overhang with application on screening test of HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 99–104.
- Vilaivan, T. Pyrrolidinyl PNA with α/β -dipeptide backbone: from development to applications. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656.
- Xu, Y.; Wei, Y.; Cheng, N.; Huang, K.; Wang, W.; Zhang, L.; Xu, W.; Luo, Y. Nucleic acid biosensor synthesis of an all-in-one universal blocking linker recombinase polymerase amplification with a peptide nucleic acid-based lateral flow device for ultrasensitive detection of food pathogens. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 708–715.
- Xu, Y.; Xiang, W.; Wang, Q.; Cheng, N.; Zhang, L.; Huang, K.; Xu, W. A smart sealed nucleic acid biosensor based on endogenous reference gene detection to screen and identify mammals on site. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43453.
- Yildiz, U. H.; Alagappan, P.; Liedberg, B. Naked eye detection of lung cancer associated mirna by paper based biosensing platform. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 820–824.
- Yonekita, T.; Fujimura, T.; Morishita, N.; Matsumoto, T.; Morimatsu, F. Simple, rapid, and reliable detection of Escherichia coli O26 using immunochromatography. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 748–754.
- Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid terminally labeled with fluorophore and end-stacking quencher as a probe for highly specific DNA sequence discrimination. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7992–7999.
- Zhang, F.; Wang, R.; Wang, L.; Wu, J.; Ying, Y. Tracing phosphate ions generated during DNA amplification and its simple use for visual detection of isothermal amplified products. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14382–14385.
- Zhang, F.; Wang, L.; Wang, R.; Ying, Y.; Wu, J. Simple screening strategy with only water bath needed for the identification of insect-resistant genetically modified rice. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1523–1526.
- Zhang, N.; Appella, D. H. Colorimetric detection of anthrax DNA with a peptide nucleic acid sandwich-hybridization assay. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8424–8425.
- Zhao, Y.; Wang, H.; Zhang, P.; Sun, C.; Wang, X.; Wang, X.; Yang, R.; Wang, C.; Zhou, L. Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay. *Sci. Rep.* **2016**, 21342.
- Zhou, F.; Noor, M. O.; Krull, U. J. Luminescence resonance energy transfer-based nucleic acid hybridization assay on cellulose paper with upconverting phosphor as donors. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2719–2726.
- โกสุม จันทรศิริ และคณะ "ชุดตรวจดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคที่แสดงผลรวดเร็วด้วยแถบสี"
https://www.thailandtechshow.com/view_techno.php?id=474 (เข้าถึงเมื่อวันที่ 16 เมษายน 2561)
- นราพร สมบูรณ์นะ, ธีรยุทธ วิไลวัลย์, ไอลตา ชูอารา, บุญส่ง ดิษมังคล้อ, วรณสิกา เกียรติปฐมชัย, จิราภรณ์ ธนียวัน
 "กรรมวิธีการตรวจหาเอ็นเอของโรคพิษสุนัขบ้าของ Staphylococcus aureus ก่อโรคอาหารเป็นพิษในเชิงปริมาณด้วยเทคนิคลูบเมดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันร่วมกับสีย้อมเรืองแสง" เลขที่คำขออนุญาตสิทธิบัตร 1703000138 (วันยื่นคำขอ 27 มกราคม 2560)
- วรณสิกา เกียรติปฐมชัย และคณะ "ชุดตรวจโรคกึ่งตายด่วน (EMS) ด้วยเทคนิค LAMP Nano gold"
https://www.thailandtechshow.com/view_techno.php?id=512 (เข้าถึงเมื่อวันที่ 19 เมษายน 2561)

ภาคผนวก 1

รายละเอียดทางวิชาการของโครงการย่อย

ชื่อโครงการย่อย การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาศเพื่อบ่งชี้เชื้อก่อโรคในอาหารโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ
ระยะเวลาโครงการ 15 สิงหาคม 2561 – 14 สิงหาคม 2562 (ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 14 กุมภาพันธ์ 2563)
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 สิงหาคม 2561 **ถึงวันที่** 14 กุมภาพันธ์ 2563

หัวหน้าโครงการย่อย

ผศ.ดร. ธนิษฐ์ ปรามินทร์รารัตน์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการ

รศ.ดร. รุ่งอรุณ วาติลี สิริศรัทธา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ.ดร. ทวีนนท์ เชี่ยวชาญชำนาญกิจ

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

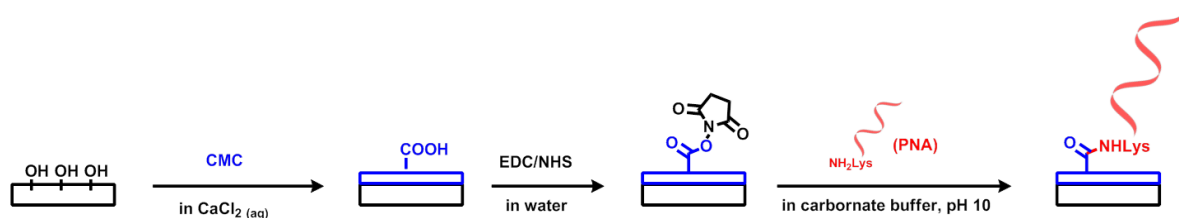
นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาตัวตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาศจากพีเอ็นเอโพรบ โดยประยุกต์จากปฏิกิริยาการตรึงพีเอ็นเอบนกระดาศที่ได้พัฒนามาอย่างต่อเนื่องในกลุ่มวิจัย (Laopa et al. 2013; Jirakittiwut et al. 2015; Leekrajang, 2019) เพื่อใช้ตรวจวัดเชื้อก่อโรคในอาหารที่สำคัญ อันได้แก่ *Bacillus cereus* โดย *B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแบบแท่ง และสามารถสร้างสปอร์ได้ในภาวะที่ไม่เหมาะกับการเจริญเติบโต แบคทีเรียชนิดนี้มักพบทั่วไปในดินและมักถูกแยกจากนมดิบ อาหารนม รวมไปถึงธัญพืช จึงจัดเป็นเชื้อก่อโรคในอาหารที่มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะในประเทศไทยที่มีเศรษฐกิจเกี่ยวข้องกับผลิตผลทางเกษตรกรรม เช่น ประเทศไทย ความรุนแรงของการก่อโรคจาก *B. cereus* เนื่องมาจากการสร้าง enterotoxin ที่มีผลโดยตรงต่อมนุษย์และแมลง และยังเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิดซึ่งส่งผลให้เกิดท้องร่วงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขั้นสูง ในทางพันธุกรรมพบว่า *B. cereus* มีความใกล้ชิดกับ *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, และ *Bacillus mycoides* อย่างมาก (McDowell and Friedman, 2017; Sánchez-Maldonado et al., 2018) ดังนั้นกระบวนการตรวจหาการปนเปื้อน *B. cereus* ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. cereus* กับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่ำ โดยให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำสูง เป็นสิ่งที่ควรได้รับการพัฒนา และคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการใช้เทคโนโลยีของฟิโรลิดินิลพีเอ็นเอโพรบที่มีความจำเพาะสูง (Vilaivan, 2015) น่าจะตอบโจทย์ดังกล่าว

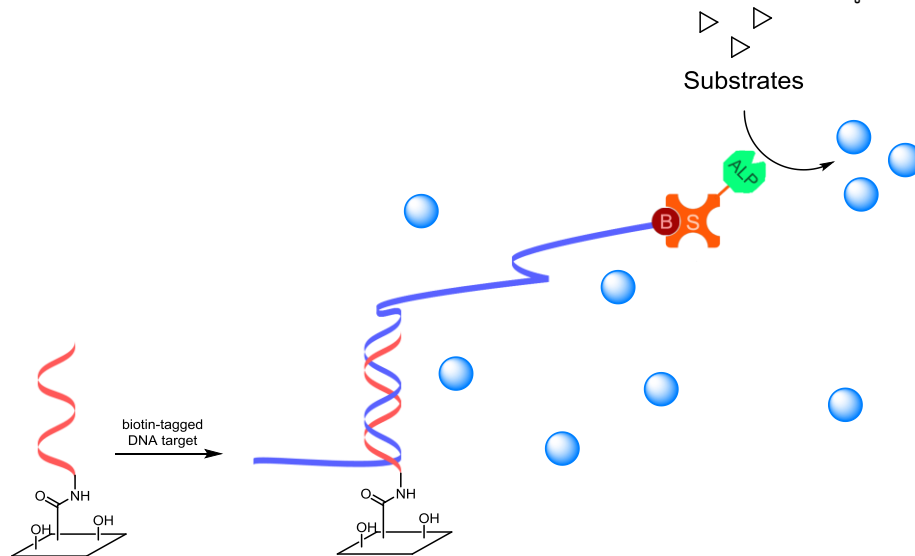
โดยหลักการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดเชื้อ *B. cereus* ของโครงการนี้ มีหัวใจสำคัญอยู่ที่การตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาศดัดแปรด้วยปฏิกิริยาการเคลือบผิวเซลลูโลสบนกระดาศด้วย carboxymethylcellulose (CMC) โดยมี Ca^{2+} เป็นตัวช่วยในการสร้างอันตรกิริยากับกระดาศ ซึ่งถือเป็นปฏิกิริยาที่มีการค้นพบมาก่อนในกลุ่มวิจัยอื่น (Orelma et al., 2012) และได้รับการพัฒนาปรับปรุงสถานะด้วยคณะผู้วิจัยในการประดิษฐ์ตัวตรวจวัดในโครงการอื่นมาก่อนแล้ว (Jirakittiwut et al. 2020) จากนั้นจึงทำการดัดแปรหมู่ฟังก์ชัน carboxyl บน CMC ต่อ ด้วยปฏิกิริยาการ coupling ประเภท carbodiimide (EDC และ NHS) โดยมีพีเอ็นเอโพรบที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่อะมิโนเป็นนิวคลีโอไทด์ หลังจากขั้นตอนการล้างสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป ก็จะได้กระดาศดัดแปรที่มีพีเอ็นเอโพรบถูกตรึงอยู่อย่างถาวร (แผนภาพที่ 1)



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาศกรองที่ถูกดัดแปรด้วย carboxymethylcellulose

หลังจากได้กระดาศดัดแปรที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอโพรบแล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการบ่มกับสารละลายตัวอย่างที่มีสารพันธุกรรมอยู่ได้โดยตรงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในอดีตของคณะผู้วิจัย โดยเฉพาะกับการประดิษฐ์

ตัวตรวจวัดสำหรับยีนธาลัสซีเมีย (Jirakittiwut et al. 2020) ซึ่งมีหัวใจสำคัญอยู่ที่การใช้พีเอ็นเอโพรบซึ่งให้ความจำเพาะเจาะจงที่สูงกว่าแทนที่ดีเอ็นเอโพรบ และสามารถขยายสัญญาณได้ด้วยกระบวนการทำให้เกิดสีที่เร่งด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase (แผนภาพที่ 2) โดยในการเตรียมตัวอย่างเริ่มจากการการทำ PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการติดฉลาก biotin เอาไว้ก่อน หลังปฏิกิริยา PCR จะได้ amplicon ที่มี biotin ตรงปลาย ซึ่งจะจับกับพีเอ็นเอโพรบที่อยู่บนกระดาษที่ออกแบบมาเพื่อให้มีลำดับเบสคู่สมกันกับบางส่วนของ amplicon นั้น จากนั้นก็จะทำการบ่มด้วยโปรตีน streptavidin ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP-streptavidin) ซึ่ง streptavidin จะเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงและจำเพาะเจาะจงมากกับ biotin ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงอยู่บนกระดาษผ่านอันตรกิริยาระหว่าง PNA-DNA และ biotin-streptavidin ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการสร้างสัญญาณสีโดยอาศัย substrate ของเอนไซม์ดังกล่าว นั่นคือ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ที่เร่งด้วยเอนไซม์ ตามด้วยปฏิกิริยา redox ต่อเนื่องกับ co-substrate ได้แก่ *p*-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) เกิดเป็นสารสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจากเอนไซม์สามารถเร่งการเปลี่ยนแปลงสีของโมเลกุล substrate ได้จำนวนมากกว่าจำนวนโมเลกุลเอนไซม์อย่างมากจึงจัดเป็นการตรวจวัดที่มีการขยายสัญญาณ จากการขยายสัญญาณสองครั้งดังกล่าว (PCR และการใช้เอนไซม์) จึงทำให้วิธีตรวจวัดนี้มีความไว (sensitivity) ที่สูงมาก



แผนภาพที่ 2 กระบวนการทำให้เกิดสัญญาณสีของการจับกันระหว่างพีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอเป้าหมาย. สายสีแดง = พีเอ็นเอโพรบ; สายสีน้ำเงิน = ดีเอ็นเอเป้าหมาย; B = biotin; S = streptavidin; ALP = alkaline phosphatase; substrates = 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate (BCIP)

หลังจากการประดิษฐ์เสร็จสิ้น ก็จะนำไปทดสอบกับตัวอย่างจริงในรูปแบบต่าง ๆ ดังได้อธิบายในส่วนผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลองต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาทางชีวสารสนเทศเพื่อค้นหาลำดับดีเอ็นเอของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุ *B. cereus*

ด้วยความก้าวหน้าของชีวสารสนเทศที่มีในปัจจุบัน สามารถนำฐานข้อมูลที่มีมาใช้ในการจัดเรียงเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมไปถึง *in silico* approach ได้นำมาใช้ในการประเมินและวิเคราะห์รวม เพื่อหาความแตกต่างของยีนในสิ่งมีชีวิตเป้าหมายเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ในการทดลองครั้งนี้ฐานข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ของ *B. cereus* และอื่นๆ ได้สืบค้นจากฐานข้อมูลหลัก คือ KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: https://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html โดยทำการวิเคราะห์ฐานข้อมูลและค้นหา Open reading frame (ORF) ใน *B. cereus* โดยมุ่งเป้าใน ORF ที่แสดงเปอร์เซ็นต์จากการทำ BLASTn ที่ต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มยีน *Bacillus* อันประกอบไปด้วย *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus subtilis*

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF เป้าหมายมาจัดเรียงเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างละเอียดโดยใช้การจัดเรียงเทียบของ 2 อัลกอริทึม คือ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) และ Clustal W multiple sequence alignment (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) บริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความแตกต่างใน ORF จะถูกนำมาวิเคราะห์อย่างละเอียด เพื่อหาบริเวณที่อาจเป็น semi conservative หรือ distinct pattern เพื่อใช้ในการกำหนดและออกแบบไพรเมอร์ต่อไป

2. การสกัดแยกสารพันธุกรรมและการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และเชื้ออื่นที่เกี่ยวข้อง
- เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อก่อโรคตาม พรบ. เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคทั้งหมดในขั้นตอนนี้จึงจำเป็นต้องผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (SC CU-IBC-012/2018) โดยมี รศ.ดร.รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้ดำเนินการหลัก

การเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบ ประกอบไปด้วย *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ในอาหาร Nutrient Broth (NB) หรือ อาหาร Luria-Bertani (LB) ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้เครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัด genomic DNA โดยใช้ชุด kit GF-1 (Vivantis) ตามวิธีการที่กำหนดไว้โดยผู้ผลิต ทำการตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ที่ได้โดยทำอิลเลคโตรโฟรีซิส ทำการรันในตัวกลางที่เป็นอะกาโรส (1% w/v) และวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยใช้นาโนดรอป สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

Genomic DNA ที่ได้นำมาเป็นแม่แบบ (template) เพื่อเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย คือ *GroEL* และ *MotB* รวมทั้งใช้ 16s rRNA เป็น internal control โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 predenaturation (95 องศาเซลเซียส 5 นาที)
- ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย denaturation (95 องศาเซลเซียส 30 วินาที) annealing (50 องศาเซลเซียส 30 วินาที) และ extension (72 องศาเซลเซียส 30 วินาที) ทำซ้ำ 35 รอบ
- ขั้นตอนที่ 3 termination (72 องศาเซลเซียส 5 นาที)]

ในส่วนของการทดลองเติมเชื้อแบคทีเรียลงในตัวอย่างข้าวนั้น กระบวนการเลี้ยงเชื้อในช่วงต้นเป็นเช่นเดียวกับสภาวะข้างต้น โดยเลี้ยงจนกระทั่งอยู่ในการเจริญระยะ mid log phase แล้วจึงทำการเติม (1000 CFU/g ข้าว) ลงในตัวอย่างข้าวบด (25 g) ซึ่งได้ทำให้ปลอดเชื้อด้วยกระบวนการ autoclave มาก่อนแล้วที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการเติมอาหารเหลว LB เพิ่มลงไปเป็นจำนวน 225 mL ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้เครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวตัวอย่างมาทำการสกัด genomic DNA ตรวจสอบความบริสุทธิ์และคุณภาพเช่นเดียวกับกระบวนการเลี้ยงข้างต้น

3. การตรึงพีเอ็นเอโพรบลงบนกระดาษดัดแปร

แช่กระดาษโครมาโตกราฟีในสารละลายที่ประกอบด้วย carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 2 mg/mL และ CaCl_2 ความเข้มข้น 10 mM ในน้ำ DI ปริมาตร 20 mL และเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ล้างแผ่นกระดาษด้วยน้ำ, สารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 10 mM และน้ำ โดยแต่ละรอบทำบนเครื่องเขย่า รอบละ 5 นาที จากนั้นนำกระดาษมาแช่ในสารละลาย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ความเข้มข้น 0.1 M และ *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ความเข้มข้น 0.4 M ในน้ำ DI ปริมาตร 20 mL และเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำบนเครื่องเขย่า 10 นาที ทิ้งไว้ในแห้งก่อนนำไปตรึงพีเอ็นเอ เตรียมสารละลายมาตรฐานของพีเอ็นเอโพรบที่ความเข้มข้น 50 μM ในน้ำดีไอเออโนซ์ที่มีคาร์บอนเตตราฟลูออไรด์ (pH 10) ความเข้มข้น 0.05 M หยดสารละลายของพีเอ็นเอโพรบปริมาตร 0.2 μL คิดเป็นปริมาณพีเอ็นเอโพรบ 10 pmol ลงบนช่องในตารางที่กำหนดไว้บนกระดาษ จากนั้นนำไปใส่ไว้ในกล่องที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 1 คืน ล้างด้วย phosphate buffer (pH 7.0) ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 20 mL บนเครื่องเขย่า 10 นาที

4. การแสดงสัญญาณการจับกันของพีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการเร่งปฏิกิริยาให้เกิดสีของเอนไซม์

ปรับสภาพกระดาษที่ตรึงพีเอ็นเอโพรบโดยนำไปแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.33X SSC และ 0.017% SDS เป็นเวลา 5 นาที ระหว่างนั้นแยกสายดีเอ็นเอโดยนำสารละลาย 0.33X SSC และ 0.017% SDS

ปริมาณ 100 μ L ในหลอด microcentrifuge ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม PCR product ปริมาตร 10 μ L ลงไปในหลอด microcentrifuge แล้วต้มต่อ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที นำกระดาดจากการปรับสภาพมาแช่ในสารละลายในหลอด microcentrifuge ซึ่งเป็นสารละลายที่ได้ผ่านการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวแล้วตามอธิบายข้างต้น โดยแช่ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) บนเครื่องเขย่า จากนั้นจึงนำไปล้างโดยแช่ในกล่องที่มี 2X SSC และ 0.1% SDS ที่อยู่ในถาดและแช่ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ขึ้นถัดมานำกระดาดที่ผ่านการไฮบริไดซ์แล้วมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย alkaline phosphatase-streptavidin conjugate (KPL, Gaithersburg, MD) ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ใน 2X SSC ที่มี 0.1% SDS อยู่ด้วย ปริมาตรสุดท้าย 2 mL จากนั้นนำไปแช่ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีบนเครื่องเขย่า ล้างด้วย 2X SSC และ 0.1% SDS เป็นเวลา 5 นาที และ Genius buffer (Tris ความเข้มข้น 100 mM, pH 9.5, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM, NaCl ความเข้มข้น 100 mM) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นผสม substrate ที่ทำให้เกิดสีซึ่งประกอบด้วยสารละลายของ *p*-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) ความเข้มข้น 0.42 g/L และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (KPL, Gaithersburg, MD, USA) ความเข้มข้น 0.21 g/L ปริมาตร 200 μ L และ Genius buffer 200 μ L แช่กระดาดที่ผ่านการไฮบริไดซ์และล้างแล้วในสารละลายนี้ และแช่ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการล้างด้วยน้ำดีไอออนเป็นเวลา 5 นาที ทำขึ้นกระดาดให้แห้ง และสแกนหรือถ่ายภาพ สีที่เกิดขึ้นจะคงอยู่ได้หลายสัปดาห์หากเก็บไว้ในที่มืด

5. การประดิษฐ์กรอบสำหรับอุปกรณ์ที่สะดวกแก่การพกพาและการบันทึกภาพ ด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ

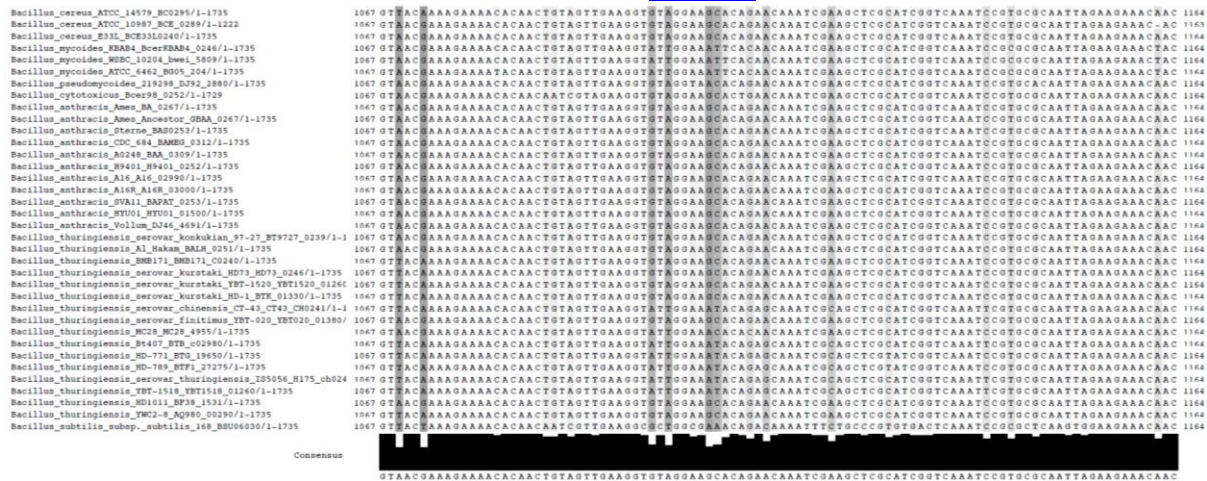
เทคนิคการพิมพ์สามมิติแบบ Fused Deposition Modeling (FDM) ถูกนำมาใช้ในการผลิตบล็อกบรรจุอุปกรณ์ตรวจวัดฐานกระดาด โดยใช้วัสดุเป็น acrylonitrile butadiene styrene (ABS) ในกรณีของบล็อกบรรจุอุปกรณ์นั้น หลังจากพิมพ์แล้วได้นำมาจุ่มใน acetone เพื่อทำให้ผิวของวัสดุมันวาวและลดการรั่วซึมระหว่างรอยต่อของแนวการพิมพ์ซึ่งเป็นธรรมชาติของเทคนิค FDM ได้ บล็อกหนึ่งชิ้นใช้เวลาพิมพ์ประมาณ 30 นาที และใช้วัสดุประมาณ 10 กรัม คิดเป็นต้นทุนวัสดุประมาณ 8 บาท ในขณะที่การผลิตแท่นจับตัวอย่างสำหรับการถ่ายภาพ จะใช้เวลาในการพิมพ์แท่นจับหนึ่งชุดจะอยู่ที่ประมาณ 6 ชั่วโมง ใช้พลาสติกประมาณ 120 กรัม คิดเป็นต้นทุนค่าพลาสติกประมาณ 100 บาทต่อชุด

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

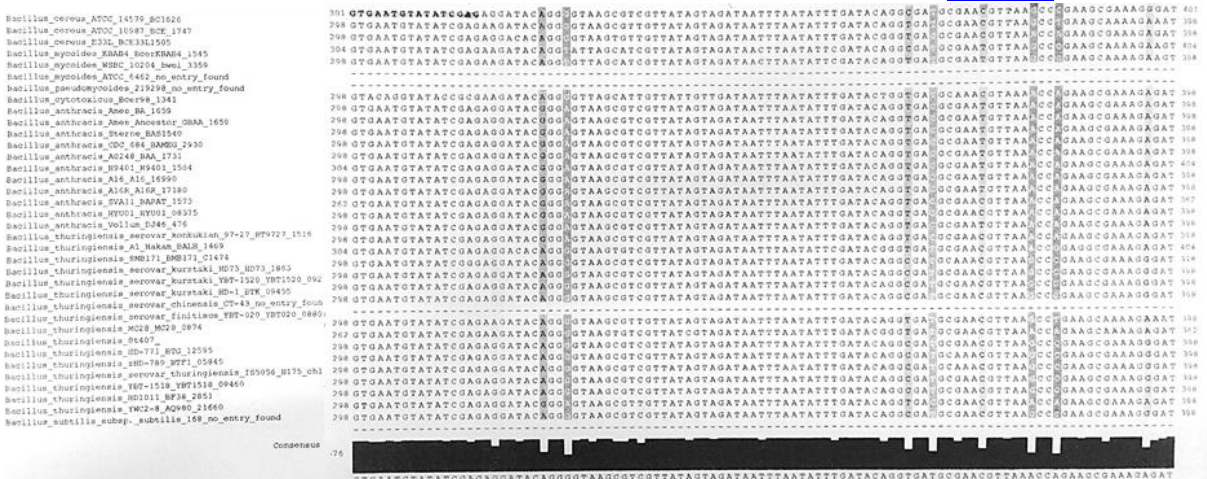
1. การศึกษาทางชีวสารสนเทศเพื่อค้นหาลำดับดีเอ็นเอของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุ *B. cereus*

จากการพิจารณาในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้พิจารณาเลือกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bacillus cereus* มาเป็นเชื้อต้นแบบในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดังกล่าว โดยการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* นี้ มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ในอาหาร ทำให้เกิดอาการอาเจียน (Emetic syndrome) และถ่ายเหลว (Diarrhea syndrome) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กำหนดมาตรฐานของเชื้อไว้ไม่เกิน 100 7/g ในอาหารปรุงสุก และ 1000 CFU/g สำหรับอาหารที่ไม่ได้ผ่านการปรุง (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) การตรวจพบเชื้อดังกล่าวอย่างทัน่วงทีจึงเป็นสิ่งที่ป้องกันการเกิดอาการอาหารเป็นพิษในมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการวิเคราะห์ Open reading frame (ORF) ของลำดับจีโนมสมบูรณ์ใน *B. cereus* เปรียบเทียบกับหลายสปีชีส์ในจีนัส *Bacillus* เช่น *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomyoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringensis* และ *Bacillus subtilis* (สืบค้นจากฐานข้อมูล KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: https://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html) พบว่ามี ORFs ที่เป็นเป้าหมายซึ่งแสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่ม คือ ORFs ของ heat-inducible genes, cytochrome P450 และ flagella motile protein และเมื่อทำการวิเคราะห์เชิงลึก โดยเรียงเทียบอย่างละเอียดของทั้งหมด 36 สปีชีส์ พบว่ามีเพียง 2 ORFs ที่มีความแตกต่าง คือ ORF ที่กำหนดรหัส GroEL (chaperonin) และ MotB (flagella motor protein) ได้แสดงตัวอย่างการเรียงเทียบของยีน *GroEL* ของ 36 สปีชีส์ใน รูปที่ 1 และ 2

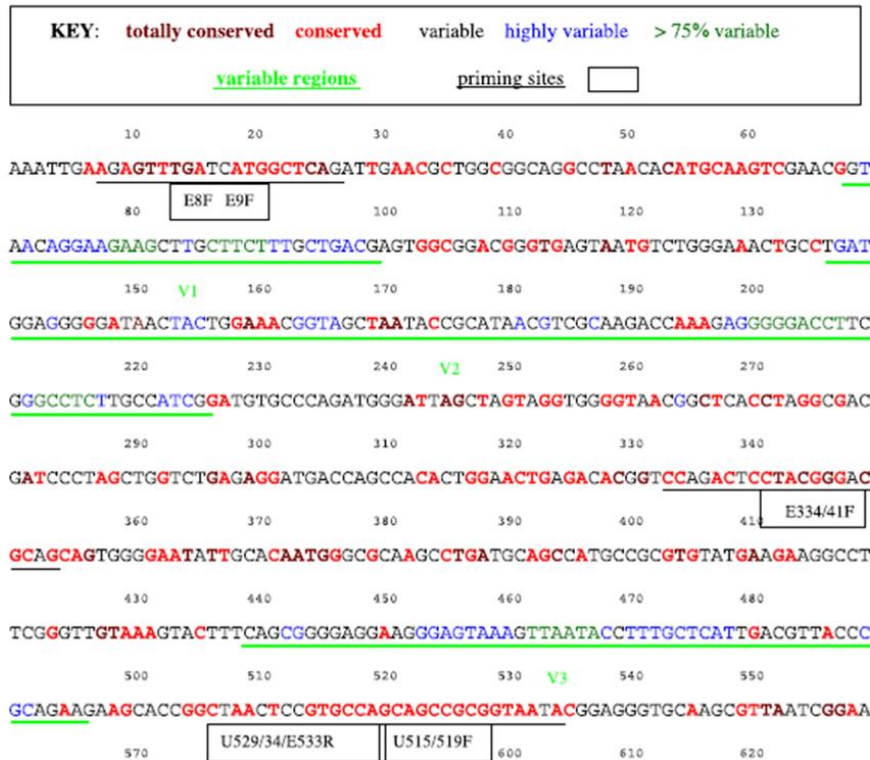
GroEL – **GTA** GGA AGC ACA G

รูปที่ 1 การจัดเรียงเทียบของลำดับเบสของบริเวณยีน *GroEL* ใน *B. cereus* เทียบกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม โดยใช้ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) โดยลำดับเบสที่จำเพาะกับ *B. cereus* ถูกระบายทึบเอาไว้

MotB – **CGA** ACG TTA AGC C

รูปที่ 2 การจัดเรียงเทียบลำดับเบสของบริเวณยีน *MotB* ใน *B. cereus* เทียบกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่ใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม โดยใช้ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) โดยลำดับเบสที่จำเพาะกับ *B. cereus* ถูกระบายทึบเอาไว้

นอกจากยีนดังกล่าวแล้ว คณะผู้วิจัยยังได้พิจารณาเลือกยีนอื่นเพิ่มเติมเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม เพื่อยืนยันว่าการทดลองในแต่ละครั้ง ประสบผลสำเร็จหรือไม่โดยตัดปัจจัยแทรกซ้อนอื่น ๆ ออกไป เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่สำเร็จเนื่องจากภาวะของการทำ PCR ไม่เหมาะสม โดยในที่นี้ได้เลือกยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่ปรากฏในแบคทีเรียทุกชนิด มีลำดับเบสที่ค่อนข้าง conserve และมีจำนวนซ้ำที่มาก จากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ พบว่าบริเวณที่เหมาะสมได้แก่บริเวณที่อยู่ระหว่าง U529/34/E533R และ U515/519F ดังแสดงในรูปที่ 3



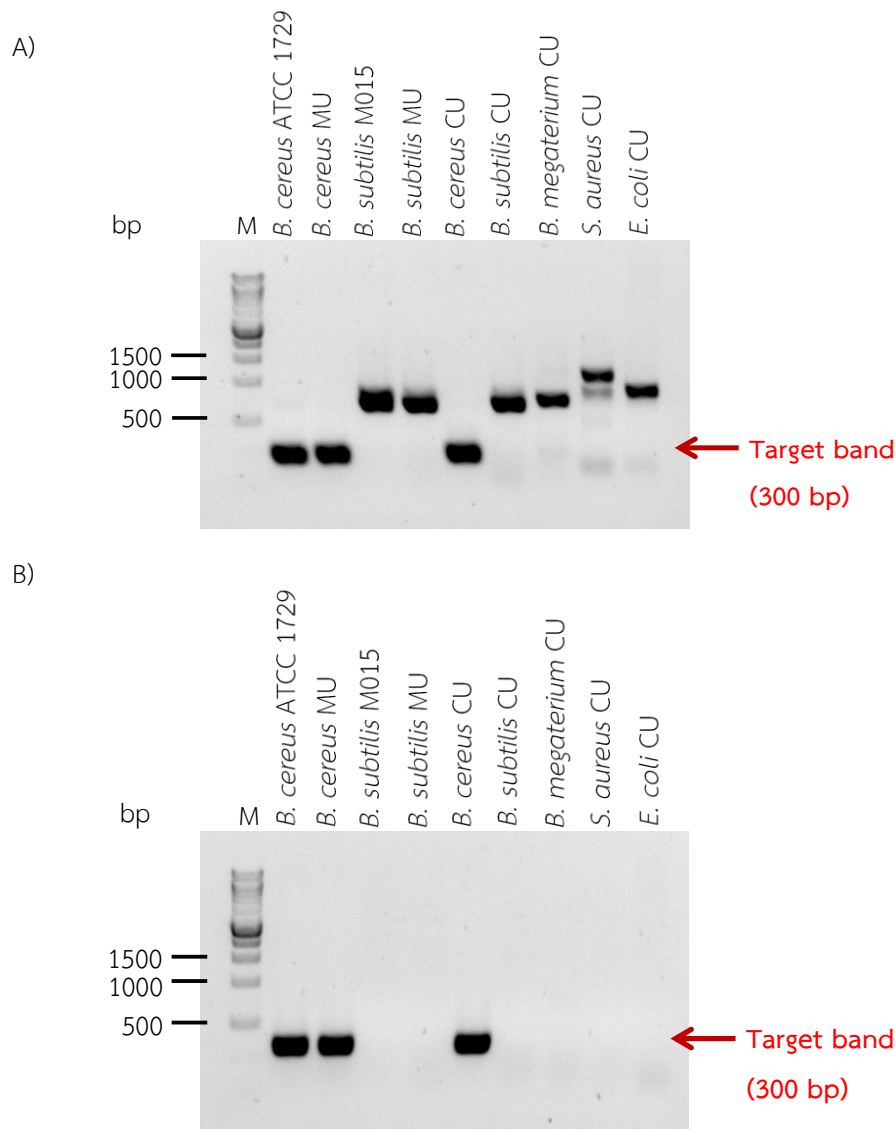
รูปที่ 3 ลำดับเบสของบริเวณยีน 16S rRNA ในโพรคาริโอต ที่ใช้เป็นตัวยืนยันความสำเร็จของการทดลอง

จากข้อมูลดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบลำดับจดจำ (recognition sequence) ซึ่งจะถูกใช้ในการสร้างพีเอ็นเอโพรบ ที่มาจากบริเวณยีน *GroEL* และ *MotB* พร้อมทั้งยีน 16S rRNA ที่ใช้เป็นตัวควบคุม นอกจากนี้ ยังได้ออกแบบลำดับเบสสำหรับการเป็นไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) สำหรับการตรวจวัด *B. cereus* ด้วยพีเอ็นเอโพรบต่อไป โดยกระบวนการจะพิจารณาจากปัจจัยที่เป็นที่ยอมรับทั่วไป เช่น การควบคุมปริมาณเบส G/C ในลำดับไพรเมอร์ให้ไม่มากหรือน้อยเกินไป การออกแบบเพื่อให้ได้สาย amplicon ที่ไม่มีขนาดใหญ่หรือเล็กเกินไป เป็นต้น ซึ่งสามารถสรุปผลการออกแบบได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลของยีนที่จะทำการเพิ่มจำนวนสัญญาณสำหรับการทดลองบ่งชี้เชื้อก่อโรค *B. cereus*

ยีน	ประเภทลำดับเบส	ลำดับเบส	ขนาด amplicon (bp)
GroEL (ยีนบ่งชี้)	ลำดับจดจำ	5'-GTAGGAAGCACAG-3'	≈300
	ลำดับพีเอ็นเอโพรบ	N-GTAGGAAGCACAG-C	
	Forward primer	5'-CTGTAGTTGAAGGT-3'	
	Reverse primer	5'-CACGAGTTGAGTT-3'	
MotB (ยีนบ่งชี้)	ลำดับจดจำ	5'-CGAACGTTAAGCC-3'	≈300
	ลำดับพีเอ็นเอโพรบ	N-CGAACGTTAAGCC-C	
	Forward primer	5'-GTGAATGTATATCGA-3'	
	Reverse primer	5'-CTGCATATCCTAC-3'	
16S rRNA (ยีนควบคุม)	ลำดับจดจำ	5'-CAGCCGCGGTAA-3'	≈100
	ลำดับพีเอ็นเอโพรบ	N-CAGCCGCGGTAA-C	
	Forward primer	5'-GACGGTACCTAACCA-3'	
	Reverse primer	5'-TGGCAAGCGTTATCC-3'	

หลังจากได้ข้อมูลดังกล่าวแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้เริ่มดำเนินการทดสอบความเป็นไปได้ของการใช้ลำดับเบสของยีนดังกล่าว โดยทำตามขั้นตอนวิธีทางอนุชีววิทยาแบบมาตรฐาน อันได้แก่การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างจากเชื้อก่อโรคจริงตามรายละเอียดในส่วนวิธีการทดลอง (พร้อมการสกัดดีเอ็นเอจากสปีชีส์ใกล้เคียงเพื่อทดสอบความจำเพาะ) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR โดยผลทดสอบเบื้องต้นพบว่า หลังการปรับปรุงภาวะที่เหมาะสม ลำดับไพรเมอร์ดังที่ได้ออกแบบไว้สามารถนำไปสู่การเพิ่มจำนวนของ amplicon ที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดไว้จริง (รูปที่ 4) ซึ่งนอกจากการได้ amplicon ที่บริสุทธิ์และมีจำนวนมากแล้ว ประเด็นสำคัญคือการเพิ่มปริมาณดังกล่าวจะทำให้เกิด PCR amplicon ที่มีขนาดที่ตรงกับที่ออกแบบไว้เฉพาะจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจาก *B. cereus* เท่านั้น (มีทั้งหมด 3 แหล่งได้แก่ ATCC 1729, MU และ CU) โดยสปีชีส์ที่ใกล้เคียงใน genus เดียวกันก็จะไม่ให้ amplicon ที่มีขนาดเดียวกัน หรือไม่ให้ product เลย เช่นในกรณี *MotB* (รูปที่ 4B) จากผลดังกล่าว จึงสรุปได้ว่า primer ชุดดังกล่าวน่าจะมีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจจับด้วยพีเอ็นเอโพรบต่อไป

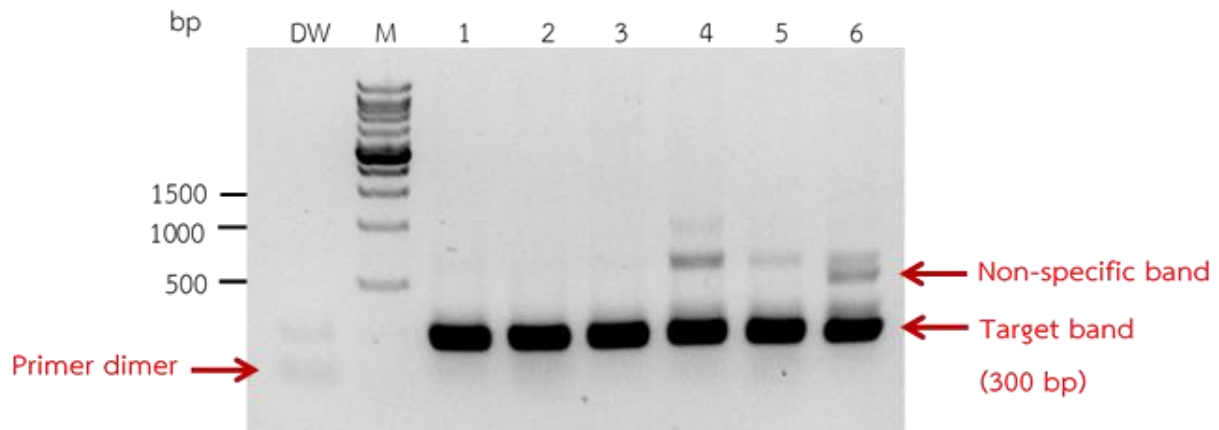


รูปที่ 4 ผลการรัน gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ PCR ยีน A) *GroEL* และ B) *MotB* บน 1.2% (w/v) agarose gel ที่ถูกย้อมด้วยสี SYBR® Safe DNA gel stain เพื่อยืนยันขนาดของ amplicon ที่ต้องการ (ประมาณ 300 bp ทั้งสองกรณี)

2. การบ่งชี้ *B. cereus* ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษโดยใช้พีเอ็นเอโพรบ

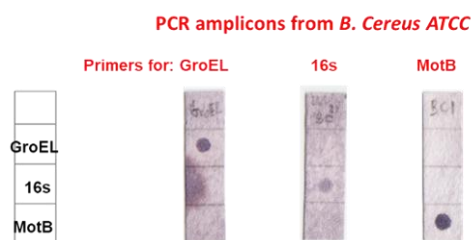
หลังจากการยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สามารถให้ amplicon ที่มีขนาดที่สอดคล้องกับที่ออกแบบไว้ จึงเชื่อได้ว่าจะต้องมีลำดับจดจำที่ต้องการอยู่ในสาย amplicon เหล่านี้ด้วย ขั้นตอนถัดไปคือการนำ amplicon ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์ด้วยพีเอ็นเอโพรบที่ได้ออกแบบให้มีลำดับเบสที่ตรงกับลำดับจดจำ โดยอาศัยหลักการให้สัญญาณสีที่เร่งด้วยเอนไซม์ดังอธิบายไว้ข้างต้น (แผนภาพที่ 2)

ขั้นตอนแรกของการทดลอง เริ่มจากการทำ PCR เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่ติดฉลาก biotin ด้าน 5' แทน เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์พิเศษนี้จะรบกวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างหรือไม่ ผลปรากฏว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีการรบกวนบ้าง แต่หลังจากการปรับปรุงสภาวะที่ใช้ในกระบวนการ PCR แล้ว (ตัวแปรสำคัญคือการเพิ่มจำนวน PCR เป็น 50 cycles เทียบกับ 35 cycles) ให้ผลเป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่ง โดยมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงปนมาบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 5) ซึ่งจากกระบวนการยัดจับและให้สัญญาณดังแผนภาพที่ 2 นั้น จะเห็นว่าการที่ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่บริสุทธิ์ 100% ไม่ได้เป็นปัญหาแต่อย่างใด เนื่องจากจะต้องไปถูกคัดแยกด้วยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษกรองอยู่แล้ว จากผลเบื้องต้นดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้นำสภาวะนี้มาใช้ในการขยายสัญญาณเพื่อให้เกิด amplicon สำหรับใช้งานต่อไป โดยได้ทำซ้ำในลักษณะเดียวกับยีนที่เหลืออีกสองยีน



รูปที่ 5 ผลการรัน gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์ PCR ยีน *GroEL* ใน *B. cereus* บน 1.2% (w/v) agarose gel ที่ถูกย้อมด้วยสี SYBR® Safe DNA gel stain โดยการใช้ไพรเมอร์แบบปกติ (lane 1-3) และไพรเมอร์แบบติดฉลาก biotin (lane 4-6) และการใช้แหล่ง genomic DNA ที่แตกต่างกัน (lane 1,3 = ATCC 1729; 2, 4 = MU; 3-6 = CU)

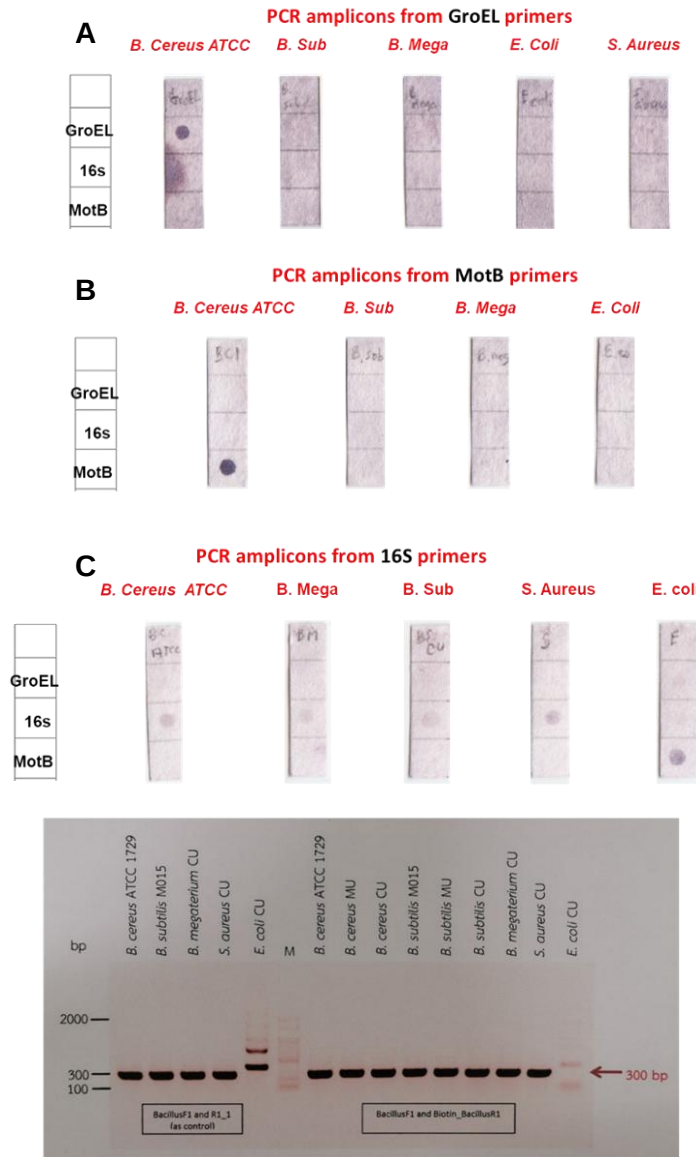
ผลการทดลองตรวจวัด PCR amplicon ด้วยพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษ เบื้องต้นพบว่า กรณียของ *GroEL* และ *MotB* ให้ผลเป็นไปตามคาด นั่นคือเกิดสีน้ำเงินเข้มกับบริเวณที่มีพีเอ็นเอโพรบที่มีลำดับเบสจำเพาะกับลำดับจดจำที่วางแผนไว้ในตารางที่ 1 แต่ไม่เกิดสัญญาณใด ๆ กับบริเวณที่มีพีเอ็นเอโพรบอื่น ๆ (รูปที่ 6) อย่างไรก็ตาม การบ่มกับ amplicon ที่มาจาก 16S rRNA นั้น พบว่าสัญญาณที่ได้ค่อนข้างอ่อน แม้จะได้พยายามปรับปรุงลำดับเบสของ primer ที่ใช้และภาวะอื่นๆ แล้ว อย่างไรก็ตาม สัญญาณที่ได้พอจะสังเกตเห็นได้ คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจใช้สภาวะนี้สำหรับ 16S rRNA ไปพลางก่อน



รูปที่ 6 ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดฐานกระดาษแสดงการติดสีของยีนทั้งสามยีน

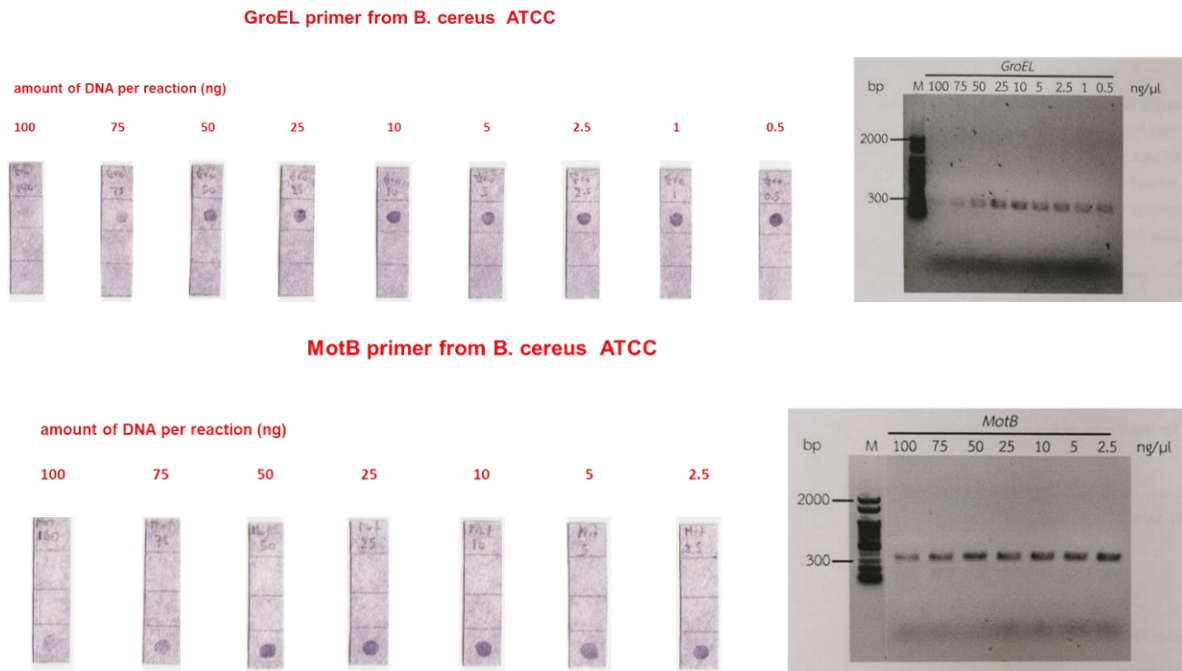
การทดลองในส่วนถัดมาคือความจำเพาะเจาะจงของอุปกรณ์ตรวจวัดต่อ *B. cereus* เทียบกับแบคทีเรียอื่นๆ โดยจะนำดีเอ็นเอของแต่ละสปีชีส์มาเพิ่มจำนวนของยีนทั้ง 3 แล้วนำมาทดสอบกับอุปกรณ์ตรวจวัด จากผลการทดลองสัญญาณของโพรบ *GroEL* และ *MotB* มีเฉพาะกระดาษที่ทดสอบกับ *B. cereus* เท่านั้นที่จะให้สัญญาณในลักษณะจุดสีน้ำเงินเข้ม (รูปที่ 7A-B) ซึ่งสอดคล้องกับยีน *GroEL* และ *MotB* ที่มีแต่ใน *B. cereus* ส่วนสัญญาณจากโพรบ 16S นั้น พบว่ายังคงมีสัญญาณ

ค่อนข้างอ่อน แต่ก็ปรากฏบนกระดาษที่ทดสอบกับทุกสปีชีส์ ยกเว้น *E. coli* (รูปที่ 7C) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ gel electrophoresis ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนของยีน 16S RNA ของดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *E. coli* ได้

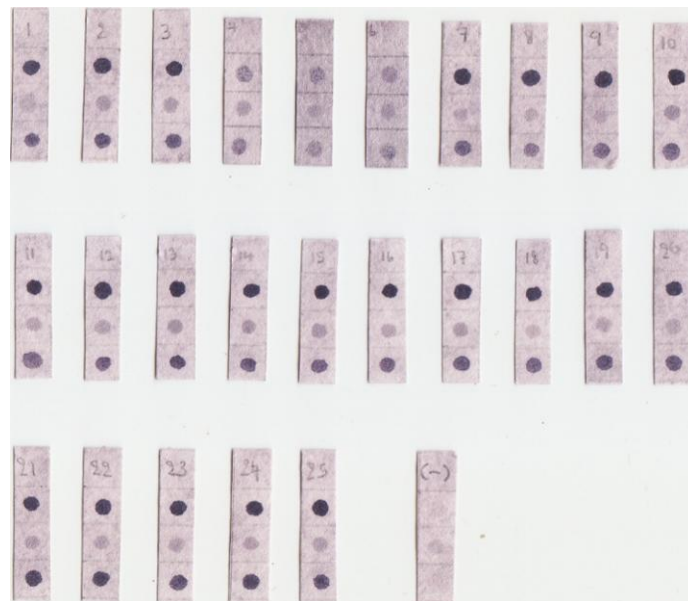


รูปที่ 7 การทดลองแสดงความเลือกจำเพาะ (specificity) ของการแสดงสัญญาณของยีนต่อ *B. cereus* เทียบกับสปีชีส์ต่าง ๆ A) ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดกับโพรบ GroEL B) ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดกับโพรบ MotB และ C) ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดกับโพรบ 16S rRNA พร้อมภาพ gel electrophoresis

ความไว (sensitivity) ของการตรวจวัด ถือเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของตัวตรวจวัดที่ดี คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความไวด้วยการเปลี่ยนปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบของกระบวนการ PCR ตั้งแต่ 0.5 – 100 ng เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณ ผลการทดลองดังรูปที่ 8 พบว่า ทั้งยีน *GroEL* และ *MotB* ให้สัญญาณที่ค่อนข้างเข้มสังเกตเห็นได้ชัดเจน แม้ในจุดที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ใช้ (0.5/2.5 ng DNA/reaction สำหรับยีน *GroEL* และ *MotB* ตามลำดับ) จึงยังไม่สามารถวัดขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดได้ แต่บอกได้ว่าการตรวจวัดมีความไวสูงมาก แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินไปกลับทำให้ความเข้มของสัญญาณลดน้อยลง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจะทำการทดลองเพิ่มเติม โดยจะมุ่งเน้นไปที่ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยลงไปอีก เพื่อทดสอบขีดจำกัดของอุปกรณ์ตรวจวัดต่อไป



รูปที่ 8 ภาพการทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดของยีน *GroEL* (บน) และ *MotB* (ล่าง) เมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบของกระบวนการ PCR (ภาพด้านขวาในแต่ละยีนแสดงผล gel electrophoresis)



รูปที่ 9 ภาพการพิสูจน์ประสิทธิภาพกับการเติมเชื้อ (spike) ลงไปในตัวอย่างข้าวสารบดจำนวน 25 ตัวอย่าง พร้อมทั้งตัวอย่างควบคุม

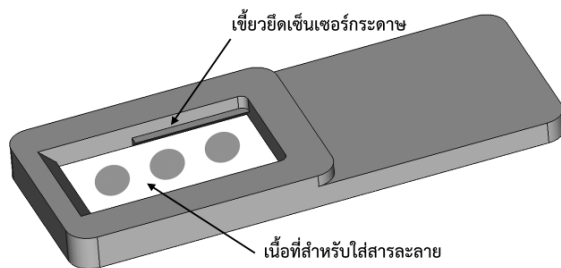
ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดของการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัด ได้แก่ การพิสูจน์ประสิทธิภาพการตรวจวัดในตัวอย่างจริง ซึ่งอาจซับซ้อนกว่าการตรวจวัดจากเชื้อบริสุทธิ์เนื่องจากมีปัจจัยของเมทริกซ์เข้ามาเกี่ยวข้อง ที่อาจมีผลรบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR หรือรบกวนการตรวจวัดโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษ ในการทดสอบกับตัวอย่างจริงได้เติมเชื้อ *B. cereus* ลงไปในตัวอย่างข้าวสารบดจำนวน 25 ตัวอย่างที่ 1000 CFU/g และตัวอย่างควบคุมอีก 1 ตัวอย่าง ซึ่งผลการตรวจวัดให้ผลตามที่คาดไว้ทุกประการดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่ประดิษฐ์ขึ้นสามารถตรวจวัดยีนทั้งสองยีนที่ต้องการได้อย่างชัดเจนในทุกตัวอย่าง ในขณะที่ยีนควบคุม 16S rRNA นั้น แม้จะให้สัญญาณที่ไม่เข้มเทียบเท่ายีน

หลักทั้งสอง แต่ก็ให้สัญญาณที่แตกต่างชัดเจนกว่าพื้นหลังในทุกกรณี และในตัวอย่างควบคุมที่เตรียมจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าวตามขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่นแต่ไม่มีการเติม *B. cereus* ลงไป ก็ไม่ให้สัญญาณที่มีนัยสำคัญในยีน *GroEL* และ *MotB* ที่เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ *B. cereus* แต่เห็นสัญญาณจางๆ ที่ยีนควบคุม 16S แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียอื่นปนเปื้อนอยู่ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการที่ไม่เห็นสัญญาณของ *GroEL* และ *MotB* เป็น true negative โดยไม่ได้เกิดจากปัญหาระหว่างกระบวนการ PCR

3. การประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดและติดตั้งสำหรับการใช้งานภาคสนาม

ในขั้นตอนสุดท้าย คณะผู้วิจัยได้ทำการประดิษฐ์ชุดอุปกรณ์ตรวจวัดและติดตั้งสำหรับการใช้งานจริง เนื่องจากหากนำอุปกรณ์ตรวจวัดฐานกระดาษมาใช้โดยตรงจะทำให้ยากในการจุ่มสารละลายและการยกออก และยากต่อการใช้งานโดยทั่วไป ที่ต้องมีการหยิบจับ เสี่ยงต่อการปนเปื้อน และมีประเด็นเรื่องความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานจากการสัมผัสกับตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการตรวจวัด คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบอุปกรณ์บรรจุเซ็นเซอร์กระดาษขึ้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยคณะผู้วิจัยได้ออกแบบให้อุปกรณ์บรรจุทำหน้าที่เป็นภาชนะใส่สารละลายไปในตัวด้วย ซึ่งทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะใส่สารละลายแยกต่างหาก การยึดแผ่นอุปกรณ์ฐานกระดาษสอดแผ่นกระดาษเข้าไปในช่องที่ออกแบบไว้ได้โดยไม่ต้องใช้กาวยึดซึ่งตัดปัญหาของปฏิกิริยาที่เป็นไปได้ระหว่างกาวกับสารละลายที่ใช้ออกไป โดยแผนภาพจำลองสามมิติแสดงอุปกรณ์บรรจุอุปกรณ์ฐานกระดาษแสดงไว้ในรูปที่ 10A และภาพของอุปกรณ์จริงแสดงไว้ในรูปที่ 10B

A



B



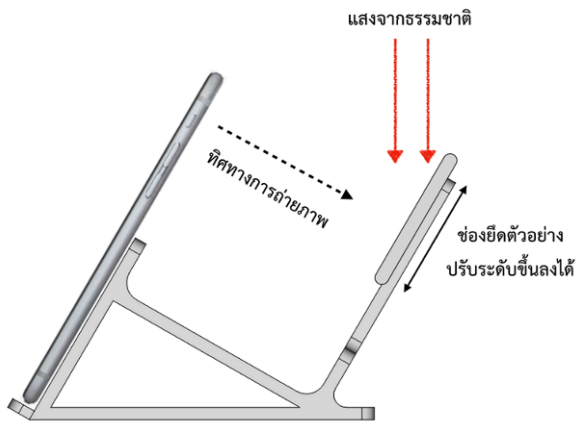
รูปที่ 10 แผนภาพจำลอง 3 มิติ (A) พร้อมภาพจริง (B) แสดงการออกแบบอุปกรณ์บรรจุอุปกรณ์ฐานกระดาษและการเป็นภาชนะบรรจุสารละลาย

อย่างไรก็ตาม แม้จะมีอุปกรณ์ที่เหมาะสมแก่การพกพาแล้ว แต่การเก็บสัญญาณเพื่อการวิเคราะห์นั้น บางครั้งจำเป็นจะต้องอาศัยการถ่ายภาพสัญญาณจุดบนอุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับการบันทึกข้อมูลอย่างถาวร หรือเพื่อส่งต่อไปยังผู้เชี่ยวชาญต่อไป ในปัจจุบันกล้องที่ติดตั้งมากับสมาร์ตโฟนมีความละเอียดและความคมชัดสูงเพียงพอสำหรับวัตถุประสงค์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามการวางตัวอย่างบนโต๊ะและจับโทรศัพท์ด้วยมือเปล่าขณะถ่ายภาพ จะทำให้ได้ภาพที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เช่น ตำแหน่งตัวอย่างไม่ได้อยู่กึ่งกลางภาพ แนวการวางที่อาจจะบิดเบี้ยว มุมมองภาพไม่ตั้งฉากกับระนาบของตัวอย่าง และเงาของโทรศัพท์ที่อาจจะบดบังตัวอย่างพอดี เป็นต้น คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบแท่นจับตัวอย่างสำหรับถ่ายภาพมาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

โดยหลักการประดิษฐ์นั้น มีประเด็นสำคัญที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ ใช้งานได้กับโทรศัพท์ทุกรุ่น มีน้ำหนักเบา และไม่ต้องอาศัยแหล่งกำเนิดไฟเพิ่มเติม ซึ่งนำไปสู่การออกแบบตามรูปที่ 11A โดยแท่นจับตัวอย่างสำหรับถ่ายภาพได้ถูกออกแบบให้เมื่อวางโทรศัพท์และตัวอย่างลงไปบนแท่นจับแล้ว ทิศทางการถ่ายภาพจะตั้งฉากกับตัวอย่างที่เราต้องการถ่ายภาพพอดี โทรศัพท์และตัวอย่างทำมุม 60 องศาเทียบกับแนวระดับทำให้มีช่องว่างให้แสงจากธรรมชาติตกลงไปยังตัวอย่างได้อย่างเพียงพอ และ

ทำให้ไม่เกิดเงาของโทรศัพท์ที่ตกลงบนตัวอย่าง ส่วนของช่องยึดตัวอย่างสามารถปรับระดับขึ้นลงได้เพื่อให้รองรับโทรศัพท์ที่มีขนาดแตกต่างกันได้ นอกจากนั้นช่องยึดตัวอย่างได้ถูกออกแบบมาสองแบบเพื่อรองรับทั้งโทรศัพท์ที่มีกล้องอยู่กลางเครื่องและโทรศัพท์ที่มีกล้องอยู่ที่มุมของเครื่อง (ภาพจริงตามรูปที่ 11B และภาพที่ได้จากการถ่ายบนแท่นตามรูปที่ 12)

A



B



รูปที่ 11 แผนภาพจำลอง 3 มิติ (A) และภาพอุปกรณ์จริง (B) แสดงแท่นจับตัวอย่างและลักษณะการถ่ายภาพด้วยสมาร์ทโฟน

A



B



รูปที่ 12 ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดจากกล้องของโทรศัพท์ iphone 8 (A) ภาพเต็มของอุปกรณ์ตรวจวัดในบล็อกบรรจุ (B) ภาพตัดเฉพาะบริเวณที่มีการให้สัญญาณ ซึ่งแสดงให้เห็นความคมชัดที่สูงมาก

4. บทสรุปและแผนงานในอนาคต

โครงการนี้ ประสบความสำเร็จในการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดสัญญาณจากยีนที่จำเพาะของ *B. cereus* จำนวน 2 ยีน ได้แก่ *GroEL* และ *MotB* โดยใช้เทคโนโลยีของพีเอ็นเอโพรบที่ตรึงบนกระดาษร่วมกับการสร้างสีโดยใช้เอนไซม์ ซึ่งสามารถตรวจวัด *B. cereus* ได้อย่างรวดเร็วและจำเพาะเจาะจง โดยได้ทดสอบกับตัวอย่างจริง จำนวน 25 ตัวอย่าง ให้ผลถูกต้องทั้งหมด และได้ออกแบบอุปกรณ์สำหรับตรวจวัดให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้ง่าย อย่างไรก็ตาม มีประเด็นเพิ่มเติมที่คณะผู้วิจัยจะปรับปรุง/ศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

1. การปรับปรุงสัญญาณที่ได้จาก 16S rRNA เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม ให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น
2. การทำการศึกษา selectivity ของการตรวจวัดระดับสปีชีส์ให้ครบถ้วนสมบูรณ์
3. การทำการศึกษา sensitivity อีกครั้ง เพื่อหาขีดจำกัดการตรวจวัดที่แท้จริงของอุปกรณ์นี้

หลังจากทำการศึกษานครบถ้วน จะดำเนินการเผยแพร่ผลงานอย่างเป็นทางการต่อไป เช่น การจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และ/หรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 24110–24114.
- Jirakittiwut, N.; Munkongdee, T.; Wongravee, K.; Sripichai, O.; Fucharoen, S.; Praneenarat, T.; Vilaivan, T. *Microchim Acta* 2020, accepted.
- Laopa, P.S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. *Analyst* **2013**, *138*, 269–277.
- Leekrajang, M.; Sae-ung, P.; Vilaivan, T.; Hoven, V.P. *Colloids Surf. B.* **2019**, *173*, 851–859.
- McDowell, R. H.; Friedman, H. *Bacillus cereus* from StatPearls via NCBI Pubmed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/> (accessed 16 April 2018.)
- Orelma, H.; Teerinen, T.; Johansson, L.-S.; Holappa, S.; Laine, J. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1051–1058.
- Sánchez-Maldonado A. F.; Lee, A.; Farber, J. M. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *25*, 9, 177–208.
- Vilaivan, T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560).

ภาคผนวก - รายละเอียดทางวิชาการของโครงการย่อย 2

1-1

ชื่อโครงการย่อย ปฏิบัติการ LAMP บนกระดาษที่อ่านผลเชิงปริมาณด้วยสีภายในขั้นตอนเดียวเพื่อการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหาร

ระยะเวลาโครงการ 15 สิงหาคม 2561 – 14 สิงหาคม 2562 (ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 14 กุมภาพันธ์ 2563)

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 สิงหาคม 2561 ถึงวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2563

หัวหน้าโครงการย่อย

รศ.ดร. นราพร สมบูรณ์นะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการ

นางวรรณสิกา เกียรติปฐมชัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

น.ส. ไอลดา ชูการา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส. สิริกานต์ จันทร์ประอบ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส. กชกร ศุภบรรณสิทธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส. บุญส่ง ดิษมังคล์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

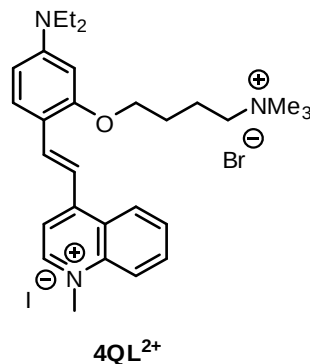
บทนำ

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดดีเอ็นเอที่อ่านผลเชิงปริมาณได้โดยอาศัยสีย้อมที่เปลี่ยนแปลงสีหรือการเรืองแสงเพื่อเป็นต้นแบบอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหาร ณ จุดดูแล โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร ที่ให้ผลแม่นยำ และทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน และ/หรือบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ จึงเป็นที่มาของการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องเทอร์มอลไซเคิล (thermal cycler) จึงมีข้อได้เปรียบในแง่ของความง่าย ความจำเพาะเจาะจง และประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เหนือกว่า PCR ร่วมกับการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดังกล่าวด้วยสีย้อมประจุบวกซึ่งมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ ได้แก่ 4-(4-(N,N-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)ethenyl)-1-methylquinolinium ($4QL^{2+}$) ที่พัฒนาขึ้นในกลุ่มของผู้วิจัยเอง โดยให้การเปลี่ยนแปลงสีที่อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าในการบ่งชี้ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาการตรวจเชื้อให้ทำได้สะดวกขึ้นโดยการเปลี่ยนจากการทำปฏิกิริยาในหลอดมาอยู่บนฐานกระดาษ (paper-based LAMP) ตามหลักการที่เสนอโดย Seok et al. (2017) เพื่อเพิ่มความสะดวกและเหมาะกับการตรวจระดับท้องถิ่น หรือ ณ จุดดูแล (point-of-care) และการพัฒนาสู่ชุดตรวจสำเร็จรูปมากขึ้น โดยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จการประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์ เพื่อการตรวจเชื้อและจดอนุสิทธิบัตรมาแล้วกว่า 10 เรื่อง ตัวอย่างเช่น ต้นแบบชุดตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *Staphylococcus aureus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษเชิงปริมาณที่มีความจำเพาะและความไวสูงโดยการผนวกเทคนิคแลมป์เข้ากับการใช้สีย้อมเรืองแสง ในงานวิจัยนี้จะเป็นการพัฒนาต่อยอดโดยการใช้สีย้อม $4QL^{2+}$ ที่เมื่อจับกับดีเอ็นเอสายคู่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งจะเป็นรูปแบบที่ใช้งานในภาคสนามได้สะดวกกว่าการใช้สีย้อมเรืองแสง ซึ่งจำเป็นต้องใช้แสงยูวีเป็นแหล่งกระตุ้น จากนั้นจะนำระบบตรวจวัดที่พัฒนาได้ดังกล่าวไปสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดในรูปแบบฐานกระดาษสำหรับตรวจยีนก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ แม้ส่วนใหญ่จะไม่ทำให้เกิดอันตรายหรือก่อโรค แต่ก็มี *E. coli* หลายสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อ เช่น โรคอุจจาระร่วง โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคระบบทางเดินปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น นอกจากนี้ *E. coli* ยังเป็นตัวบ่งชี้สุขอนามัยของการเตรียมอาหารได้ โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้กำหนดมาตรฐานไม่เกิน 3-100 MPN (most probable number)/กรัมของอาหาร ขึ้นกับประเภทของอาหาร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560) และต้องไม่พบเลยในน้ำดื่ม (ต่อมิลลิลิตร) สารพิษ staphylococcal enterotoxin A (SEA) จากแบคทีเรีย *Sphylococcal aureus* ซึ่งพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ ทางเดินหายใจ และบนผิวหนังของมนุษย์ อีกทั้งยังเจริญได้ในสภาวะความเค็มระดับปานกลาง จึงทำให้เชื้อหรือสารพิษนี้ถูกพบได้ในอาหารที่หลากหลาย และทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากรับประทานอาหารที่ดิบ หรือใช้ความร้อนและระยะเวลาในการปรุงไม่เพียงพอต่อการทำลาย SEA ซึ่งทนความร้อนได้ดี นอกจากนี้อาหารที่มี SEA ปนเปื้อนมักมีกลิ่น รส และสภาพอาหารปกติ ทำให้ผู้ผลิตและผู้บริโภค ไม่ทราบว่ามีอาหารนั้นมี SEA ปนเปื้อนอยู่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

(Argudin et al, 2010) ตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อาหารที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ อาหารปรุงสุกทั่วไป และปรุงสุกแล้วแช่เย็น ต้องไม่มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* มากกว่า 100 เซลล์หรือ CFU ต่อกรัมอาหาร

โดยหลักการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดเชื้อก่อโรคของโครงการนี้มีหัวใจสำคัญอยู่ที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP และสีย้อมสังเคราะห์ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยสีย้อมประจุบวกซึ่งมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ ได้แก่ 4-(4-(N,N-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)ethenyl)-1-methylquinolinium (4QL²⁺) (รูปที่ 1) ซึ่งให้การเปลี่ยนแปลงสีที่อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากสีม่วง (ผลลบ) เป็นสีน้ำเงิน (ผลบวก) ในการบ่งชี้ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับสีย้อมเรืองแสงที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนามาก่อนหน้านี้ (อังกูณสิทธิบัตร) ดังที่ได้กล่าวไปแล้วคือไม่ต้องใช้แหล่งกำเนิดแสงยูวี และสีย้อมอื่นๆ ที่เคยมีผู้พัฒนามาก่อน เช่น hydroxynaphthol blue (HNB) หรือเทคนิคอื่นๆ เช่นการวัดความขุ่น ซึ่งทั้งสองเทคนิคเป็นการวัดโดยอ้อมจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg²⁺ และการตกตะกอนของแมกนีเซียมฟอสเฟต ซึ่งอาจเกิดผลบวก/ลบปลอมได้ง่าย เนื่องจากไม่ได้เป็นการวัดปริมาณของดีเอ็นเอโดยตรง



รูปที่ 1 โครงสร้างของสีย้อมสไตริลประจุบวก 4-(4-(N,N-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)ethenyl)-1-methylquinolinium (4QL²⁺)

วิธีการทดลอง

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย

สายพันธุ์แบคทีเรียทั้งหมดได้รับมาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ตารางที่ 1) โดยเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดได้ทำการเพาะเลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วน *Staphylococcus* spp. ทั้งหมดได้ทำการเพาะเลี้ยงใน Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่ 37°C, 200 rpm เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Strains
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	MCCU 0349
<i>Enterobacter cloacae</i>	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	MCCU0357
<i>Staphylococcus aureus</i>	MCCU0370
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305

2. การสกัดแยกสารพันธุกรรม

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อก่อโรคตาม พรบ. เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2558 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคทั้งหมดในขั้นตอนนี้จึงจำเป็นต้องผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (SC CU-IBC-013/2018) โดยมี รศ.ดร.นราพร สมบูรณ์นะ จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้ดำเนินการหลัก

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ: สกัดดีเอ็นเอของทุกสายพันธุ์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยการดูดเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตรผสมกับ TE buffer 1 มิลลิลิตรในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสเพื่อเป็น ดีเอ็นเอ แม่แบบ และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง: นำตัวอย่างอาหารปริมาณ 1 กรัมมาสกัดดีเอ็นเออย่างหยาบ โดยผสมกับ TE buffer 1 มิลลิลิตรในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบดเล็กน้อย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 10 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 100 ไมโครลิตรของ 1% Triton-x 100 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกมาใส่หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

การวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ: หาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280} ตามลำดับ) โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop2000, Thermo Scientific, New York, UK) ซึ่งความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอควรมีอัตราส่วนของ $A_{260} : A_{280}$ อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 ส่วนการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอจะใช้เครื่อง Qubit®3.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Malaysia) ซึ่งจะตรวจวัดเฉพาะดีเอ็นเอสายคู่ จากนั้นนำไปคำนวณโดยสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.1 การออกแบบไพรเมอร์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจจับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ จึงต้องทำไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ซึ่งประกอบไปด้วย 2 inner primer, 2 outer primer และ 2 loop primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละตัว โดยไพรเมอร์สำหรับเชื้อ *E. coli* อ้างอิงจากงานวิจัยของ Stratakis *et al.* (2017) ที่จำเพาะต่อ *E. coli* phosphate regulon gene A (*phoA* gene) ที่จำเพาะต่อทุกสายพันธุ์ของ *E. coli* ส่วนไพรเมอร์สำหรับ *S. aureus* อ้างอิงมาจากอนุสิทธิบัตรเลขที่ 1603001252 ของคณะผู้วิจัย (นราพร สมบูรณ์ และคณะ, 2560) ที่จำเพาะต่อยีน *sea* ของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษ staphylococcal enterotoxin A (ตารางที่ 4)

3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR

ปฏิกิริยา PCR ทำที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (TakaRa Bio, Shiga, Japan) 12.5 ไมโครลิตร forward และ reverse primers อย่างละ 0.3 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 2) และดีเอ็นเอต้นแบบ เข้าเครื่อง thermal cycler โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้

PCR สำหรับ *E. coli* เริ่มจาก Initial denaturation 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบของ

- Denaturation 94°C เป็นเวลา 2 วินาที
- Annealing 64°C เป็นเวลา 1 นาที
- Extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที
- และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

PCR สำหรับ *S. aureus* เริ่มจาก Initial denaturation 94°C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบของ

- Denaturation 94°C เป็นเวลา 2 วินาที
- Annealing 55°C เป็นเวลา 2 นาที
- Extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที
- และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบความสำเร็จของการทำปฏิกิริยา โดยใช้ 1.75% agarose gel รันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 100 V เป็นเวลา 35 นาที และดูผลภายใต้แสงยูวี

ตารางที่ 2 Oligonucleotide primers สำหรับ PCR

Bacteria (gene)	Primer names	Primer sequences (5'-3')	Reference
<i>E. coli</i> (<i>phoA</i>)	Ec phoA F3	5'-AAGTTGAAGGTGCGTCAAT-3'	Stratakis <i>et al.</i> , 2017
	Ec phoA B3	5'-CTTGTGAATCCTCTTCGGAG-3'	
<i>S. aureus</i> (<i>sea</i>)	SEA-F	5'-TTGGAAACGGTTAAAACGAA-3'	Petty patent no. 1603001252
	SEA-R	5'-GAACCTTCCCATCAAAAACA-3'	

3.3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี LAMP

ไพรเมอร์ LAMP ประกอบด้วย FIP, BIP, F3, B3, LF และ LB (ตารางที่ 3) แต่ละปฏิกิริยา LAMP จะมีปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย F3 และ B3 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ FIP และ BIP อย่างละ 0.8 ไมโครโมลาร์ LF และ LB อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ สำหรับ LAMP *E. coli* และ F3 และ B3 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ FIP และ BIP อย่างละ 1.6 ไมโครโมลาร์ LF และ LB อย่างละ 1.6 ไมโครโมลาร์ สำหรับ LAMP *S. aureus* ตามด้วย dNTPs 1.4 มิลลิโมลาร์, บีเทน 0.3 โมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต 6 มิลลิโมลาร์, *Bst* DNA polymerase 8 ยูนิต และดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ไมโครลิตร ในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยทำการทดสอบอุณหภูมิที่ 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการบ่มที่ 30, 45 และ 60 นาที เพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยพิจารณาจากค่าความจำเพาะและความไว (detection limit) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนสีของสีสังเคราะห์ 4QL²⁺ โดยนำผลิตภัณฑ์ LAMP 2 ไมโครลิตรผสมกับสีย้อม 2 ไมโครโมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใช้ปรับให้มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ควบคู่กับการดูแบนของผลิตภัณฑ์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้น 1.75% 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 3 Oligonucleotide primers สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP

Bacteria (gene)	Primer names	Primer sequences (5'-3')	Reference
<i>E. coli</i> (<i>phoA</i>)	Ec phoA F3	5'-AAGTTGAAGGTGCGTCAAT-3'	Stratakis <i>et al.</i> , 2017
	Ec phoA B3	5'-CTTGTGAATCCTCTTCGGAG-3'	
	Ec phoA FIP	5'GTGATCAGCGGTGACTATGACCT/iBiodT/TTCTCGATGAAGCCGTACA -3'	GTGATCAGCGGTGACTATGACCTCTCGATGAAGCCGTACA
	Ec phoA BIP	5'ATTGTCGCGCCGGATACCTCATCACCATCACTGCG-3'	
	Ec phoA LoopF	5'-AGCGTGTGCCATCCTTT-3'	
	Ec phoA LoopB	5'-CAGGCGCTAAATACCAAAGATG-3'	

ตารางที่ 3 Oligonucleotide primers สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP (ต่อ)

Bacteria (gene)	Primer names	Primer sequences (5'-3')	Reference
<i>S. aureus</i> (sea)	SEA_F3	5'- TCTATTATTACAATGAAAA -3'	Petty patent no. 1603001252
	SEA_B3	5'- ATTGATAACCATAATAAGCA -3'	
	SEA_FIP	5'CTGTAAAAAAGCCTTTAAACAATATT/iBiodT/TGCTA AAACTGAAAAATAAGAGAG -3'	
	SEA_BIP	5'GGTATAACGATTTATTAGTAGATTTTTATACAAGTCT ACTTTTTTCCCTT -3'	
	SEA_LF	5'- TGCTAGTTAAAAATGTCGTATGAT -3'	
	SEA_LB	5'- GATTCAAAGGATATTGTTGAT -3'	

4. การเตรียมสีย้อมดีเอ็นเอ 4-(4-(*N,N*-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)ethenyl)-1-methylquinolinium (4QL²⁺)

4.1 การสังเคราะห์ 1,4-dimethylquinolinium iodide

ผสม 4-methylquinoline (0.66 mL, 5 mmol) และ iodomethane (0.62 mL, 10 mmol) ในหลอดทดลองฝาเกลียว ให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองเก็บของแข็งสีเหลืองที่ได้ด้วยวิธีการกรองสุญญากาศ ล้างของแข็งที่ได้ด้วยไดเอทิลอีเทอร์และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ 1,4-dimethylquinolinium iodide 1.4188 g

4.2 การสังเคราะห์ 4-(*N,N*-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)benzaldehyde

ผสม 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde (0.4831 g, 2.5 mmol), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (0.691 g, 5 mmol) และ 1,4-ไดโบรโมเบนซีน (0.36 mL, 3 mmol) ใน anhydrous DMF (3 mL) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำของผสมที่ได้มาเจือจางด้วยไดคลอโรมีเทนและสกัดด้วยน้ำเพื่อกำจัด DMF จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ และทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาละลายในเทตระไฮโดรฟิวแรน (5 mL) เติมไตรเมทิลามีน (1 mL) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ ล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ จะได้ผลิตภัณฑ์ 0.5750 g

4.3 การสังเคราะห์ 4-(4-(*N,N*-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)ethenyl)-1-methylquinolinium (4QL²⁺)

ละลาย 1,4-dimethylquinolinium iodide (0.2850 g, 1 mmol) และ 4-(*N,N*-diethylamino)-2-(4-(trimethylammonium)butoxy)benzaldehyde (0.3870 g, 1 mmol) ในเอทานอล (5 mL) ให้ความร้อนโดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองเก็บของแข็งสีน้ำตาลเงินม่วงที่ได้ด้วยวิธีการกรองสุญญากาศ ล้างของแข็งที่ได้ด้วยน้ำและ ethanol ตามลำดับ และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ 4QL²⁺ 0.1310 g (20% yield) m.p. = 216-217 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.96-6.26 (m, 11H, aromatic region), 4.43 (s, 3H, N⁺-CH₃), 4.23 (s, 2H, (CH₃)₃N⁺-CH₂-), 3.50 (s, 6H, -N-(CH₂CH₃)₂), 3.09 (s, 9H, -N⁺-(CH₃)₃), 1.95 (s, 4H, -N-(CH₂CH₃)₂), 1.19 (s, 6H, -O-CH₂CH₂-)

5. เปรียบเทียบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของวิธี LAMP-4QL²⁺ กับวิธี LAMP-GE, LAMP-HNB และ วิธี PCR

ในการทดสอบความจำเพาะเพื่อวัดประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาที่จะให้ผลบวกต่อดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายทุกสายพันธุ์และต้องให้ผลลบต่อดีเอ็นเอของเชื้ออื่นๆที่ไม่ใช่เป้าหมาย โดยจะใช้ตัวควบคุมบวกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบหลายๆสายพันธุ์และตัวควบคุมลบเป็นแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ได้จำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้ (ตารางที่ 4) โดยจะนำผลที่ได้จากวิธี LAMP-4QL²⁺ เปรียบเทียบกับ LAMP-HNB และวิธีมาตรฐาน LAMP-GE, PCR-GE

สำหรับการทดสอบความไวจะทำ 10-fold serial dilutions เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ สำหรับ *E. coli* จะใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* ATCC 25922 ความเข้มข้นระหว่าง 3.39×10^2 ถึง 3.39 สำเนาดีเอ็นเอต้นแบบ และสำหรับ *S. aureus* จะใช้ดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 25923 ความเข้มข้นระหว่าง 3.3×10^2 ถึง 3.3 สำเนาดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของ 4QL²⁺ และเปรียบเทียบกับวิธี LAMP-HNB, LAMP-GE และ PCR-GE

ตารางที่ 4 แบบที่เรียที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ ในการทดสอบความจำเพาะ

แบคทีเรีย	ตัวควบคุมบวก	ตัวควบคุมลบ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i> MCCU 0349	<i>Enterobacter cloacae</i> N/A <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> MCCU0357 <i>Staphylococcus aureus</i> MCCU0370	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305

6. การพัฒนา paper-based LAMP

6.1 การดัดแปลงโครงสร้างกระดาษและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ paper-based LAMP

เป็นการศึกษาสมบัติและประสิทธิภาพของ LAMP บนกระดาษ โดย LAMP-primer จะถูกติดบนกระดาษด้วยไบโอติน (biotin) และสเตรปตาวิดอิน (streptavidin) ปัจจุบันพบว่าปฏิกิริยาระหว่าง Streptavidin และ biotin สามารถนำมาใช้พัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น เนื่องจากเป็นพันธะที่แน่นที่สุดของ non-covalent งานวิจัยชิ้นนี้จะทำการติด streptavidin บนกระดาษ โดยดัดแปลงโครงสร้างพันธะของเซลลูโลสบนกระดาษด้วย TEMPO, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) จากนั้นจะติด LAMP-primer ด้วย biotin และนำไปหยดบนกระดาษที่เติม streptavidin แล้วเพื่อให้ไพรเมอร์ถูกยึดติดอยู่บนกระดาษ จากนั้นเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยา LAMP อื่นๆ ก่อนนำไปป้อนในอุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วจึงนำมาตรวจสอบความสำเร็จของการทำปฏิกิริยาด้วยสีย้อม

6.2 การใช้สีย้อม 4QL²⁺ ร่วมกับ paper-based LAMP

หาอัตราส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการใช้สีย้อม 4QL²⁺ ในการตรวจสอบความสำเร็จในการทำปฏิกิริยา LAMP บนฐานกระดาษ เพื่อให้สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบได้อย่างชัดเจนที่สุด

6.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของ paper-based LAMP

สำหรับการทดสอบความไวจะทำ 10-fold serial dilutions เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ โดยการ spike เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ATCC 25923 ลงในเนื้อหมู ความเข้มข้นระหว่าง 3.39×10^3 ถึง 3.39×10^{-1} สำเนาดีเอ็นเอต้นแบบ และ 3.3×10^2 ถึง 3.39×10^{-2} สำเนาดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของ 4QL²⁺ และเปรียบเทียบกับวิธี LAMP-HNB, LAMP-GE และ PCR-GE

7. การประเมินประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารจริง

$$\text{คำนวณจำนวนตัวอย่างที่มีนัยทางสถิติโดยใช้สูตร } n = (p(1-p)z^2)/e^2$$

โดย n = sample size

p = percentage picking a choice (จากการทบทวนอัตราที่พบ สมมติร้อยละที่พบคือ 0.05-0.15)

z = the z-score (1.75 for a 95% confidence interval) และ

e = margin of error (0.1)

ดังนั้น $n = 44.55$ ตัวอย่างกรณีร้อยละที่พบคือ 0.05 และ $n = 39.05$ ตัวอย่างกรณีร้อยละที่พบคือ 0.15

สรุปว่าควรใช้จำนวนตัวอย่างอาหารอย่างน้อยที่สุด $n = 45$ ตัวอย่าง

ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจโดยการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ enterotoxin A ในอาหารที่ทำจากเนื้อหมู ประเภทหมูปิ้ง ทอด และย่าง จากร้านอาหารริมทางในกรุงเทพฯ จำนวน 45 ตัวอย่าง โดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม

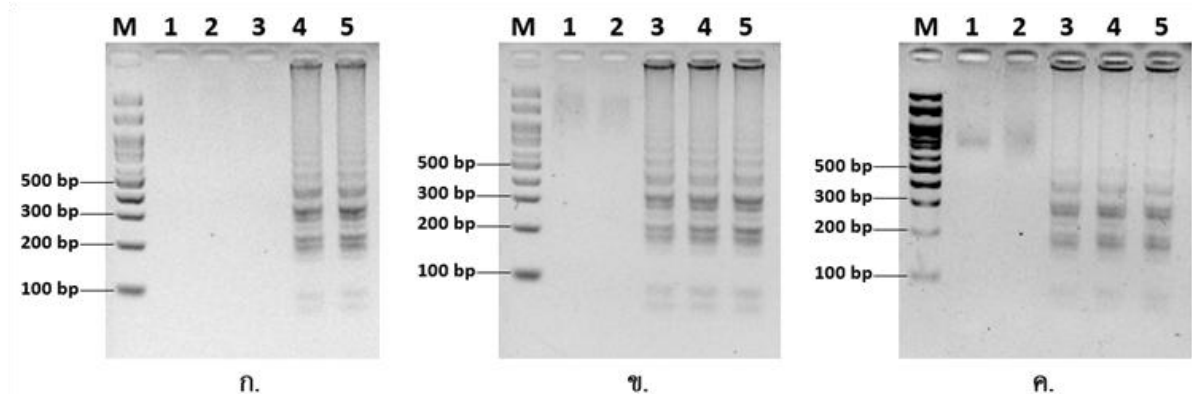
45 นาที และตรวจสอบผลด้วยสีย้อม 4QL²⁺ เปรียบเทียบกับการตรวจผลด้วยสีย้อมดีเอ็นเอฟลูออเรสเซนซ์ Novel Juice (GeneDireX, Inc.)

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP

1.1 สภาวะเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP สำหรับ *E. coli*

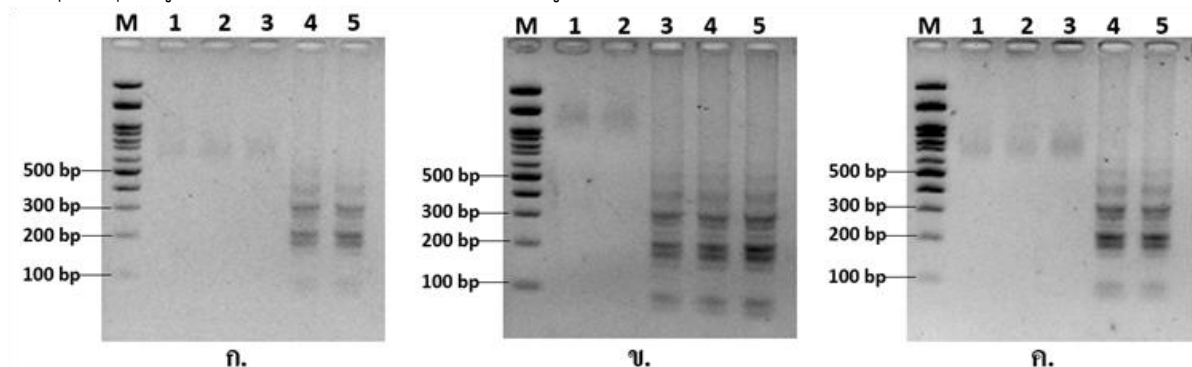
จากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *phoA* ของ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ ที่อ้างอิงมาจากการวิจัยของ Stratakos et al. (2017) และผลวิจัยของการศึกษาครั้งนี้ซึ่งใช้ดีเอ็นเอสกัดหยาบของ *E. coli* ATCC 25922 ในการหาสภาวะที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยา LAMP โดยทำการทดลองบ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที พบอุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ให้ความจำเพาะและความไว และสามารถให้ผลบวกได้โดยใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดคืออุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที



รูปที่ 2 ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ที่ ก.) 61 องศาเซลเซียส ข.) 63 องศาเซลเซียส และ ค.) 65 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่ต่างกัน; แถว M แถวดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 1 ตัวควบคุมลบ, แถวที่ 2 ที่ระยะเวลาบ่ม 15 นาที, แถวที่ 3 30 นาที, แถวที่ 4 45 นาที และ แถวที่ 5 60 นาที ตามลำดับ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 3.39×10^3 copies/reaction

1.2 สภาวะเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP สำหรับ *S. aureus*

จากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *sea* ของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษ ที่อ้างอิงมาจากอนุสิทธิบัตรเลขที่ 1603001252 ของคณะผู้วิจัย (นราพร สมบูรณ์และคณะ, 2560) และผลวิจัยของการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งใช้ดีเอ็นเอสกัดหยาบของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยการทดลองบ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที พบอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับความจำเพาะและความไว และที่สามารถเกิดผลบวกได้โดยใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดคืออุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที (รูปที่ 3)

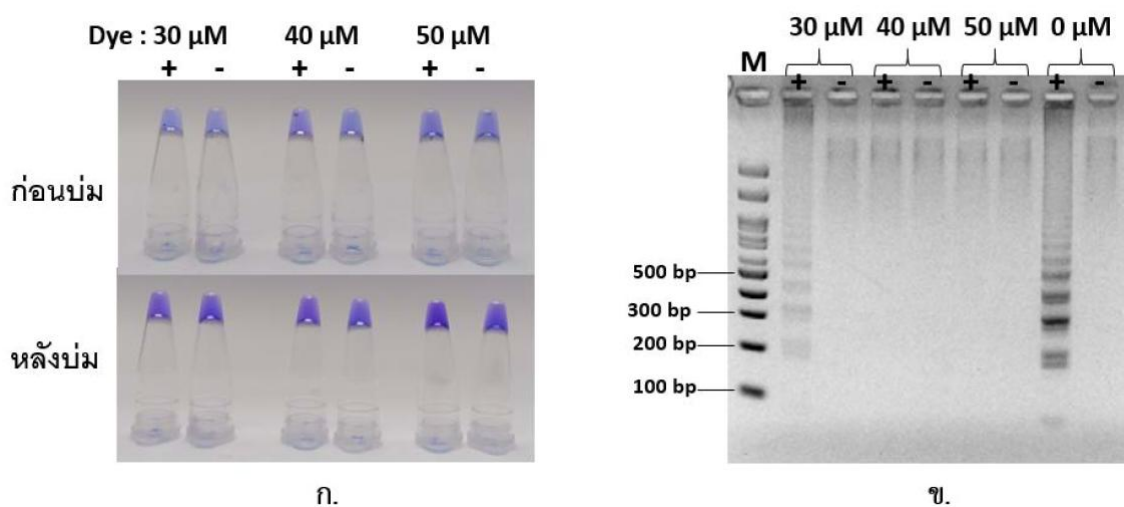


รูปที่ 3 ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ที่ ก.) 61 องศาเซลเซียส ข.) 63 องศาเซลเซียส และ ค.) 65 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่ต่างกัน โดยเลน M แทนดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, หมายเลข 1 ตัวควบคุมลบ, 2 ที่ระยะเวลาบ่ม 15 นาที, 3 30 นาที, 4 45 นาที และ 5 60 นาที ตามลำดับ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจาก *S. aureus* ATCC 25932 ปริมาณ 3.3×10^3 copies/reaction

2. ปฏิกริยา LAMP ร่วมกับสีย้อม 4QL²⁺ (ในหลอด PCR)

2.1 ปฏิกริยา LAMP ร่วมกับสีย้อม 4QL²⁺ ภายในขั้นตอนเดียว

เนื่องจากการพัฒนาการทำปฏิกริยา LAMP ให้สามารถทำปฏิกริยาและตรวจสอบความสำเร็จของปฏิกริยาได้ภายในขั้นตอนเดียวจะช่วยลดขั้นตอนในการตรวจสอบและลดความเสี่ยงจากการเกิดการปนเปื้อนได้ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา LAMP ร่วมกับสีย้อมที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอได้แก่ 4QL²⁺ โดยใส่สีย้อมไปพร้อมกับองค์ประกอบ LAMP อื่นๆ แล้วนำไปปั่นเพื่อให้เกิดปฏิกริยา โดยทดสอบที่ความเข้มข้นสี 30, 40 และ 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองตามรูปที่ 4 พบว่ามีความแตกต่างของผลบวกและผลลบเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสี 30 ไมโครโมลาร์ แต่สีค่อนข้างจางเนื่องจากความเข้มข้นของสีต่ำ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ LAMP ที่ได้ไปตรวจสอบโดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า มีเพียงหลอดบวกที่ความเข้มข้นสี 30 ไมโครโมลาร์เท่านั้นที่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ LAMP ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่สีย้อมไปจับกับไพรเมอร์หรือดีเอ็นเอต้นแบบ ส่งผลให้ไปยับยั้งการเกิดปฏิกริยา LAMP ทำให้เมื่อความเข้มข้นของสีย้อมต่ำลง ปฏิกริยา LAMP จึงเกิดได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของสีย้อมต่ำจะไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของผลบวกได้ด้วยตาเปล่า จึงทำให้ไม่สามารถใช้สีย้อม 4QL²⁺ ร่วมกับการทำปฏิกริยา LAMP ภายในขั้นตอนเดียวได้



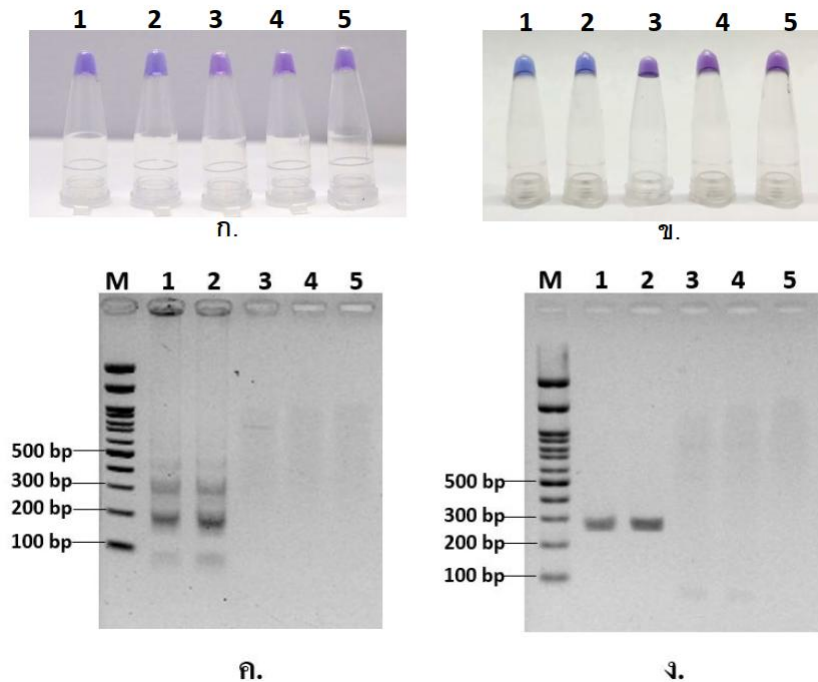
รูปที่ 4 การทำปฏิกริยา LAMP พร้อมกับสีย้อม ก) ผลจากการดูการเปลี่ยนแปลงของสีย้อมก่อนและหลังทำปฏิกริยา ของตัวอย่างควบคุมบวกและตัวอย่างควบคุมลบ และ ข) ผลจากเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นสี 30, 40, 50 และ 0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้ ใช้ดีเอ็นเอจาก *E. coli* ATCC 25922 10 ng (ควบคุมบวก) และน้ำกลั่น (ควบคุมลบ)

2.2 ปฏิกริยา LAMP ร่วมกับสีย้อม 4QL²⁺ แบบ 2 ขั้นตอน

จากการที่พบว่าสีย้อม 4QL²⁺ ยับยั้งการเกิดปฏิกริยา LAMP ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องแบ่งการตรวจสอบเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP และขั้นการตรวจสอบผลด้วยสีย้อม โดยในการตรวจสอบผลจะใช้สีย้อมความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และ LAMP product 2 ไมโครลิตร เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกริยา LAMP มีความเข้มข้นสูงมาก หากใส่สีย้อมลงไปโดยตรงจะเข้มข้นมากเกินไปจนไม่สามารถแยกความแตกต่างของผลบวกได้ ขณะเดียวกันถ้าหากความเข้มข้นของสีย้อมมากเกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณของผลิตภัณฑ์ LAMP อาจส่งผลให้เกิดผลลบปลอมได้ เนื่องจากมีสีที่ไม่ได้จับกับผลิตภัณฑ์เหลืออยู่ ทำให้รบกวนการสังเกตสีที่เปลี่ยนไป

2.2.1 ความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจ *E. coli*

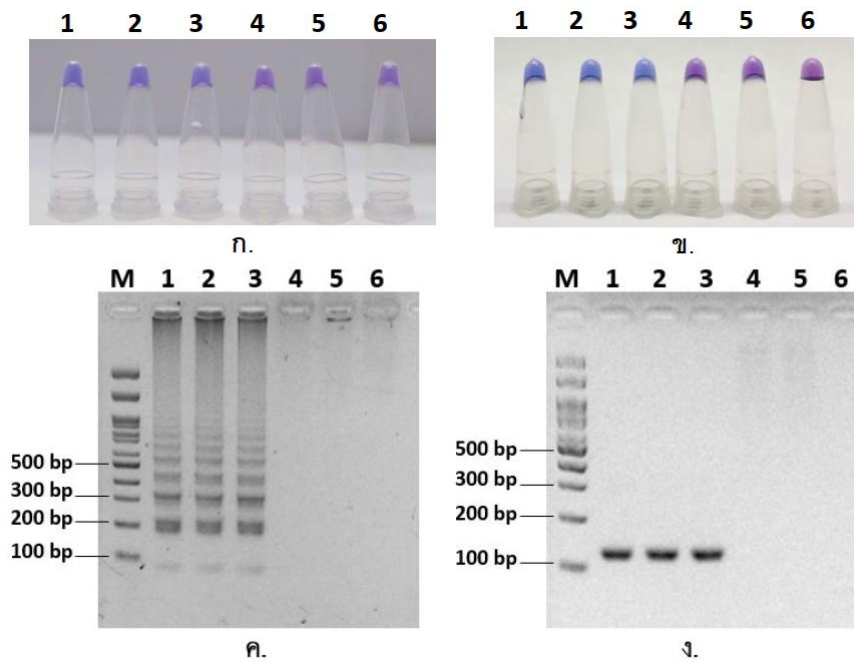
สำหรับสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบยืนยันผลการทดสอบควบคุมผลบวก ได้แก่ ดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 และ MCCU0349 ที่ได้จากการสกัดหยาบ และสำหรับเชื้อที่ใช้ทดสอบผลลบ คือดีเอ็นเอจากแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *E. coli* ได้แก่ *E. cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และน้ำกลั่น พบว่า ผลที่ได้จากวิธี LAMP-4QL²⁺ ให้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอของ *E. coli* เท่านั้น ซึ่งตรงกับวิธี LAMP-HNB และวิธีมาตรฐาน LAMP-GE จึงสรุปได้ว่าวิธี LAMP-4QL²⁺ ในการตรวจหา ยีน *phoA* ของ *E. coli* นี้มีความจำเพาะสูง (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลการทดสอบความจำเพาะของการตรวจหา *E. coli* โดยวิธี ก) LAMP-4QL²⁺ ข) LAMP-HNB ค) LAMP-GE และ ง) PCR-GE โดย แถว M แทนแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, หมายเลข 1 คือตัวอย่าง *E. coli* ATCC 25922, 2 คือ *E. coli* MCCU0349, 3 คือ *E. cloacae* N/A, 4 คือ *S. aureus* ATCC 25923 และ 5 คือ *S. epidermidis* ATCC 12228 ตามลำดับ

2.2.2 ความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจ *S. aureus*

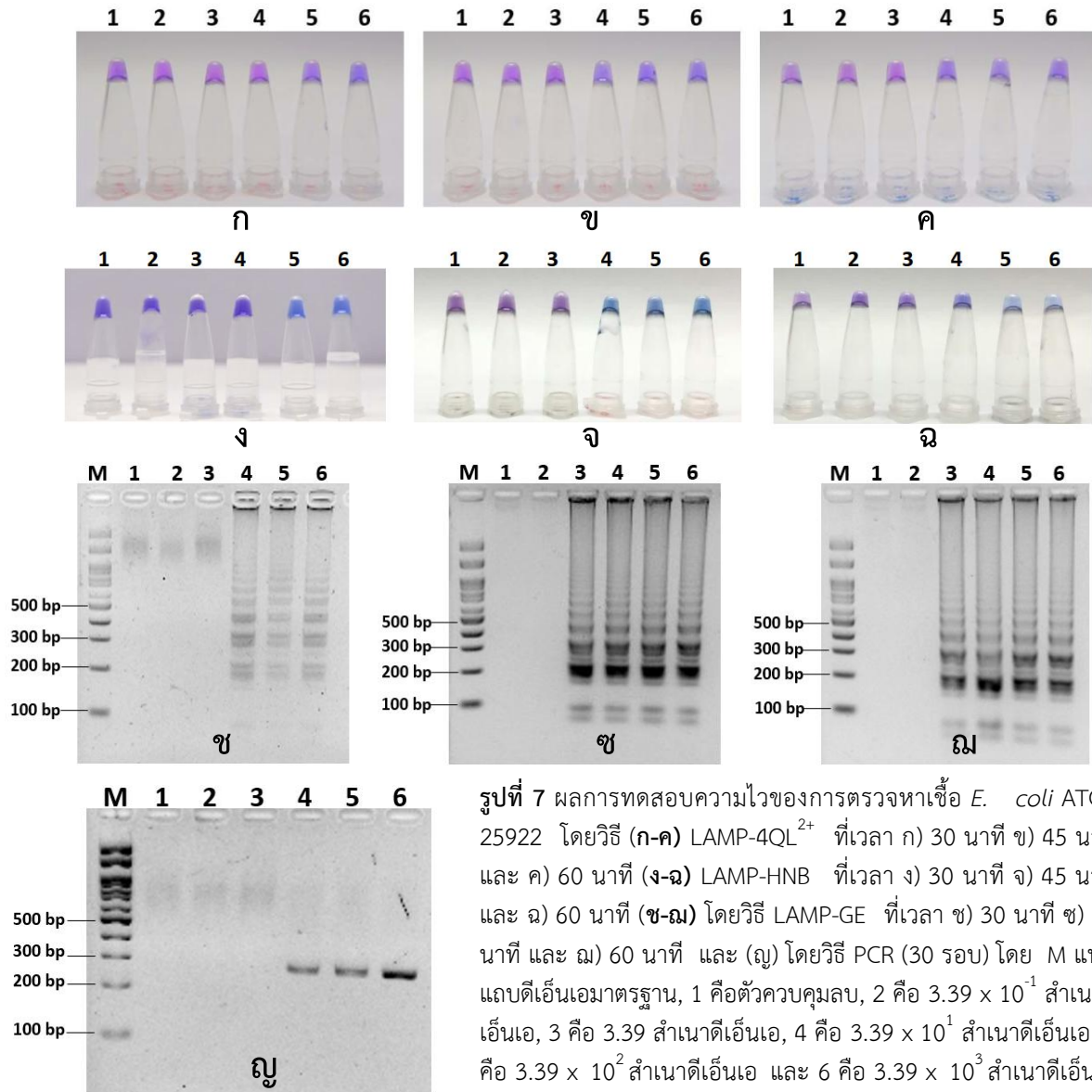
สำหรับสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบยืนยันผลการทดสอบควบคุมผลบวกได้แก่ ดีเอ็นเอของ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923, MCCU0357 และ MCCU0370 ที่ได้จากการสกัดหยาบ และเชื้อที่ใช้ทดสอบผลลบ คือดีเอ็นเอจากแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *E. coli* และน้ำกลั่น พบว่า ผลที่ได้จากวิธี LAMP-4QL²⁺ ให้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษเท่านั้น ซึ่งตรงกับวิธี LAMP-HNB และวิธีมาตรฐาน LAMP-GE จึงสรุปได้ว่าวิธี LAMP-4QL²⁺ ในการตรวจหา *sea* ของ *S. aureus* นี้มีค่าความจำเพาะสูงเช่นกัน



รูปที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะของการตรวจหา *S. aureus* โดยวิธี ก) LAMP-4QL²⁺ ข) LAMP-GE ค) LAMP-HNB และ ง) PCR-GE โดย แถว M แสดงแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, หมายเลข 1 คือตัวอย่าง *S. aureus* ATCC 25923, 2 คือ *S. aureus* MCCU0357, 3 คือ *S. aureus* MCCU0370, 4 คือ *S. epidermidis* ATCC 12228, 5 คือ *S. saprophyticus* ATCC 15305 และ 6 คือ *E. coli* ATCC 25922 ตามลำดับ

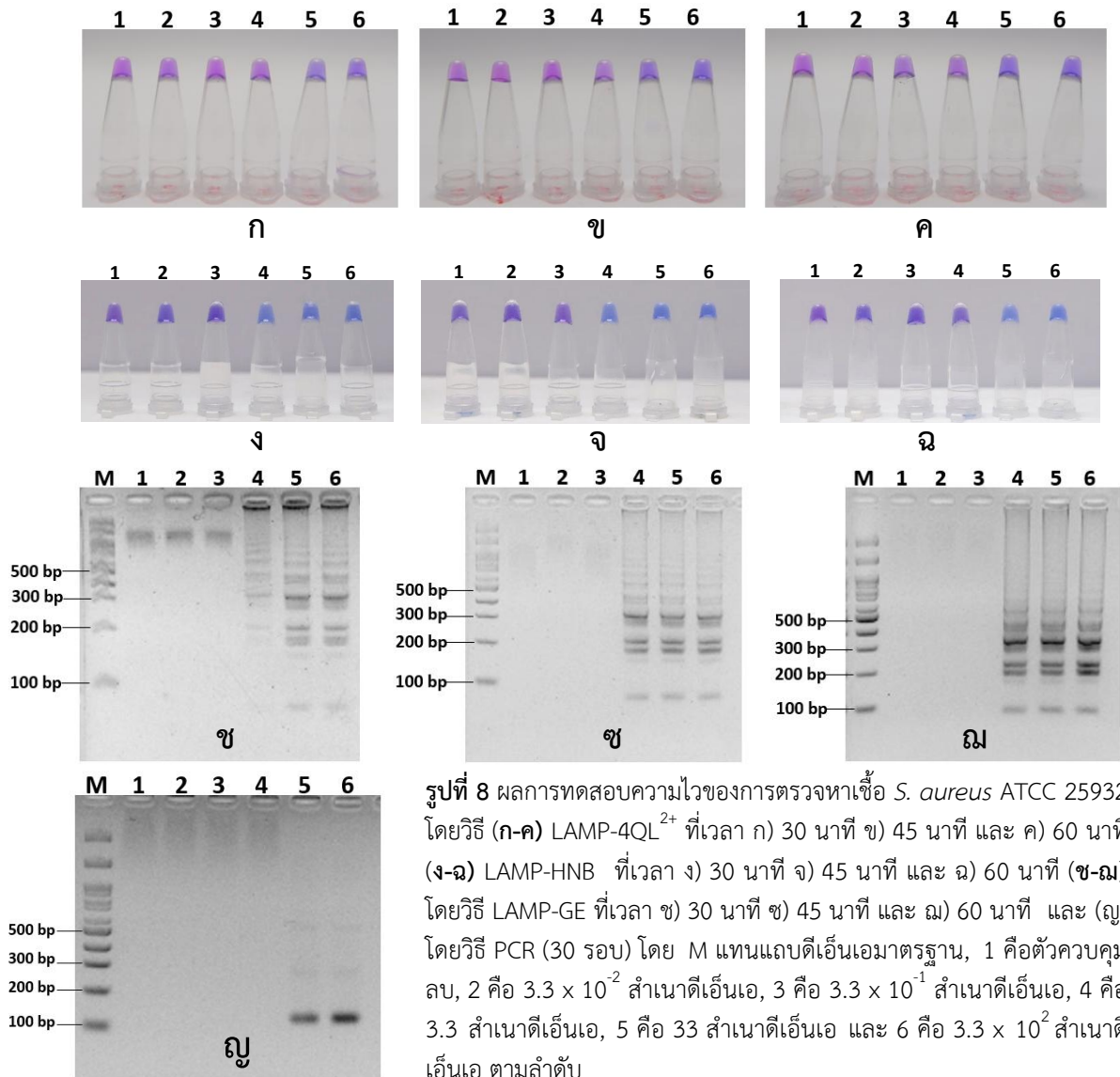
2.2.3 ความไวสำหรับการตรวจ *E. coli*

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR และทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10^{-3} – 10^{-7} เท่าหรือเทียบเท่า 3.39×10^3 ถึง 3.39×10^{-1} สำเนาดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาทำ LAMP-4QL²⁺ พบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ คือ 33.9 สำเนาของดีเอ็นเอเป้าหมาย (รูปที่ 7) ซึ่งมีความไวเท่ากับวิธี LAMP-HNB และวิธี PCR แต่น้อยกว่าวิธี LAMP-GE (3.39 สำเนา) อาจเนื่องมาจากวิธี LAMP-4QL²⁺ เป็นการดูผลจากความแตกต่างของสีด้วยตาเปล่า ทำให้หากมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจะทำให้สังเกตได้ยาก ในขณะที่วิธี LAMP-GE ต้องใช้เครื่อง gel electrophoresis เพื่อใช้กระแสไฟฟ้าแยกตามขนาดความยาวของลำดับเบสดีเอ็นเอ และนำไปดูผลภายใต้แสงยูวี ทำให้แม้จะมีการเพิ่มปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเห็นแถบของผลิตภัณฑ์ได้ชัดกว่า อย่างไรก็ตามความสามารถในการตรวจวัดของ LAMP-4QL²⁺ ที่ 33.9 สำเนาดีเอ็นเอ ถือว่าเพียงพอแล้วสำหรับการตรวจวัดมาตรฐานการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในอาหาร



2.2.4 ความไวสำหรับการตรวจ *S. aureus*

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR และทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว มาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10^{-3} - 10^{-7} เท่าหรือเทียบเท่า 3.39×10^2 ถึง 3.39×10^{-2} สำเนาดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาทำ LAMP-4QL²⁺ พบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ คือ 33.9 สำเนาของดีเอ็นเอเป้าหมาย (รูปที่ 8) ซึ่งมีความไวเท่ากับวิธี LAMP-HNB และ วิธี PCR แต่น้อยกว่าวิธี LAMP-GE (33.9 สำเนา) อาจเนื่องมาจากวิธี LAMP-4QL²⁺ เป็นการดูผลจากความแตกต่างของสีด้วยตาเปล่า ทำให้หากมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจะทำให้สังเกตได้ยาก ในขณะที่วิธี LAMP-GE ต้องใช้เครื่อง gel electrophoresis เพื่อใช้กระแสไฟฟ้าแยกตามขนาดความยาวของลำดับเบสดีเอ็นเอ และนำไปดูผลภายใต้แสงยูวี ทำให้แม้จะมีการเพิ่มปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถเห็นแถบของผลิตภัณฑ์ได้ชัดกว่า แต่ความสามารถในการตรวจวัดของ LAMP-4QL²⁺ ที่ 33.9 สำเนาดีเอ็นเอ ถือว่าเพียงพอเช่นกันในการตรวจวัดมาตรฐานการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร

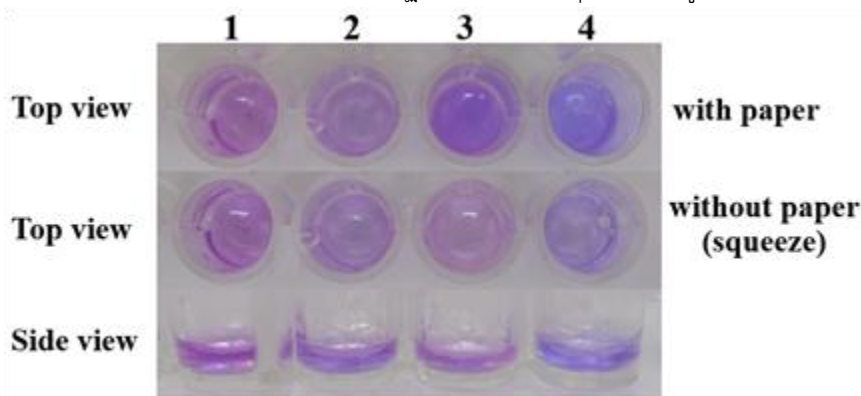


3. การพัฒนาการทำปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษ

3.1 การพัฒนาฐานกระดาษและทดสอบประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยา

เพื่อเป็นการพัฒนาชุดตรวจให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในภาคสนามและจุดตรวจมากขึ้นจึงได้พัฒนาจากการทำปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลองมาอยู่บนฐานกระดาษ โดยตรงเฉพาะไพรเมอร์ FIP ผ่านอันตรกิริยาระหว่าง biotin และ streptavidin ที่ถูกตรึงบนกระดาษ ส่วนไพรเมอร์และตัวอย่างที่เหลือเติมลงไปในการสารถละลาย และทดสอบประสิทธิภาพว่าสารถสำหรับการทำปฏิกิริยาในหลอดยังคงให้ผลดีในการทำปฏิกิริยาบนกระดาษหรือไม่ จากผลที่ได้พบว่า เมื่อทำการปรับสัดส่วน ได้สารถที่สามารถเกิดปฏิกิริยา LAMP ได้ดีบนฐานกระดาษ ซึ่งสอดคล้องกันทั้งผลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis และการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นจึงได้หาสารถของการใช้สีย้อม 4QL²⁺ ในการใช้ร่วมกับปฏิกิริยา LAMP บนฐานกระดาษ โดยเริ่มต้นจากการทำปฏิกิริยา LAMP สังเกตผลในหลอด จากนั้นนำสีที่ได้มาหยดลงบนกระดาษเพื่อดูว่าสีที่เห็นความแตกต่างได้ภายในหลอด แต่เมื่อนำมาหยดลงบนกระดาษพบว่าการแยกแยะความแตกต่างของสีระหว่างผลบวกและผลลบทำได้ยาก เนื่องจากความเข้มข้นของสีน้อยและปริมาณของสารถละลายที่หยดลงบนกระดาษน้อยเกินไป ทำให้ถูกดูดซึมเข้าไปในเนื้อกระดาษจนหมด จึงต้องปรับสารถและอัตราส่วนของสีใหม่เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการอ่านแปลผลสีบนฐานกระดาษ และเมื่อทดลองผสมสีย้อมและบัฟเฟอร์เตรียมไว้ก่อน และเมื่อทำปฏิกิริยา LAMP บนฐานกระดาษเสร็จก็สามารถนำมาจุ่มลงในสารถละลายผสมของสีย้อมกับบัฟเฟอร์ได้ทันที โดยทดลองที่ความเข้มข้นสี 50 ไมโครโมลาร์และ 100 ไมโครโมลาร์ ผลพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบได้

จากนั้นจึงพัฒนาต่อโดยปรับปริมาตรของบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นของสีย้อมที่เหมาะสม โดยทดลองจากการดูดส่วนน้ำมาใส่ในหลอด PCR พบว่าสีไม่ต่างกันชัดเจนนัก จึงคาดว่าว่าผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ติดอยู่บนฐานกระดาษมากกว่าอยู่ในส่วนน้ำ ดังนั้นการตรวจสอบความสำเร็จของการทำปฏิกิริยาจึงต้องชุตๆ บนแผ่นกระดาษเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ติดอยู่บนกระดาษหลุดออกมาบางส่วนเพื่อให้สีจับกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอได้ดีขึ้น โดยทดลองที่ความเข้มข้นสี 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบได้ค่อนข้างชัดเจนที่ความเข้มข้นสี 50 ไมโครโมลาร์ ทั้งแบบที่มีกระดาษและเอากระดาษออก (หลังจากชุตกระดาษและเติมสีย้อมแล้ว) อย่างไรก็ตาม วิธีที่เอากระดาษออกสีจะค่อนข้างจางกว่าเนื่องจากสีส่วนใหญ่ยังคงติดอยู่บนกระดาษด้วยผลิตภัณฑ์แลมป์ที่เกิดขึ้นบนฐานกระดาษ แล้วจึงทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าการทำปฏิกิริยาเกิดอยู่บนกระดาษ ซึ่งพบว่าเมื่อนำเฉพาะส่วนกระดาษที่เกิดปฏิกิริยาแล้วมายังหลุมใหม่ (หลุมที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา) และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา โดยขยี้ส่วนกระดาษเล็กน้อยสามารถเห็นความแตกต่างสีของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาส่วนใหญ่ติดอยู่บนกระดาษที่เป็นฐาน ขณะที่ในหลุมที่ใช้ทำปฏิกิริยาที่เหลือเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำ พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างสีของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบได้เพียงเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากมีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาบางส่วนหลุดออกมาอยู่ในส่วนน้ำได้บ้าง (รูปที่ 9)



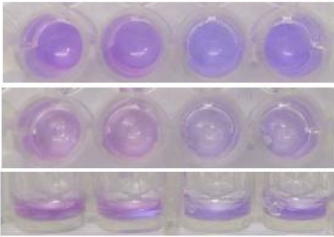
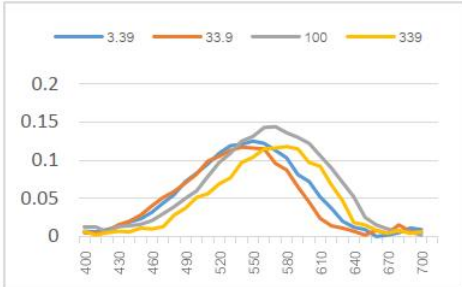
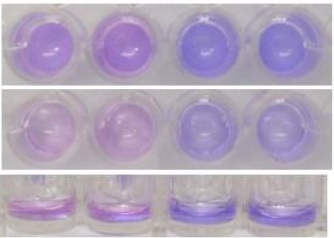
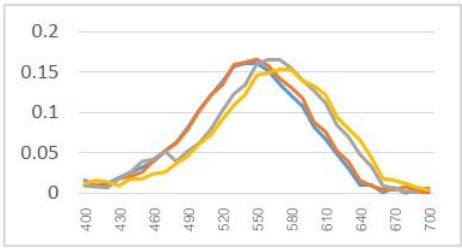
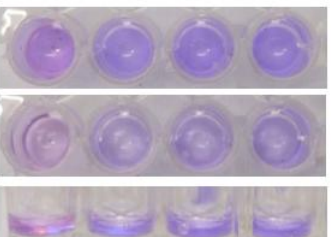
รูปที่ 9 ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา LAMP บนฐานกระดาษสำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* ATCC 25932 โดยคอลัมน์ที่ 1 คือหลุมที่ทำปฏิกิริยาตัวอย่างควบคุมลบ (ส่วนน้ำ) และคอลัมน์ที่ 2 คือหลุมที่ทำปฏิกิริยาตัวอย่างควบคุมบวก (ส่วนน้ำ) ซึ่งทั้งสองคอลัมน์นี้ควรให้ผลลบเพราะปฏิกิริยาอยู่บนกระดาษ, คอลัมน์ที่ 3 คือหลุมใหม่ที่กระดาษปฏิกิริยาย้ายมา ของตัวอย่างควบคุมลบ และคอลัมน์ที่ 4 คือหลุมใหม่ที่กระดาษปฏิกิริยาย้ายมา ของตัวอย่างควบคุมบวก ตามลำดับ ทั้งนี้ตัวควบคุมบวกคือดีเอ็นเอ *S. aureus* ATCC 25932 10 ng

3.2 การทดสอบปฏิกิริยาบนฐานกระดาษกับตัวอย่างจริง

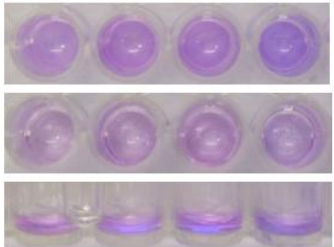
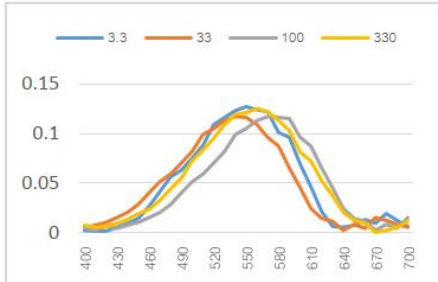
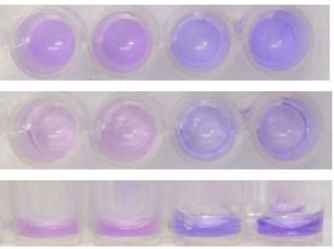
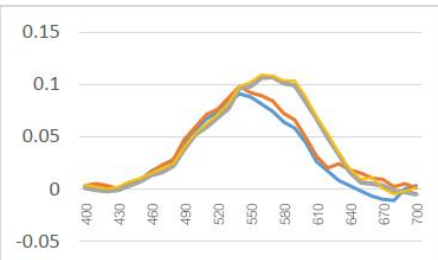
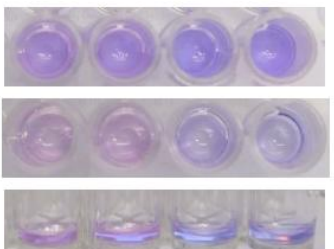
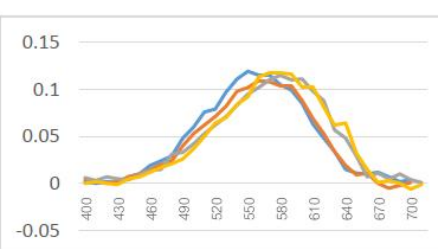
เนื่องจากผลการทดสอบเบื้องต้นแสดงว่า matrix จากอาหาร รวมทั้งสารปรุงรส (ใช้ตัวอย่างเป็นเนื้อหมูปรุงสุก) สามารถขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา LAMP จึงจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเออย่างหยาบก่อนที่จะไปทดสอบในขั้นต่อไป การทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของเชื้อที่สามารถตรวจจับได้โดยต้นแบบชุดตรวจ paper LAMP-4QL²⁺ สำหรับ *E. coli* และ *S. aureus* โดยการ spike เชื้อลงในเนื้อหมูและสังเกตผลด้วยตาเปล่า และยืนยันผล ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมในช่วง 400 – 700 nm พบว่าวิธี LAMP สำหรับ *E. coli* บนฐานกระดาษสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 33.9 สำเนาดีเอ็นเอ ภายในเวลาปฏิกิริยา 60 นาที (ซึ่งมีความไวเท่ากับการทำปฏิกิริยาในหลอด PCR ที่ใช้เวลา 45 นาที) ส่วนวิธี LAMP สำหรับ *S. aureus* บนกระดาษสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 100 สำเนาดีเอ็นเอ ภายในเวลาปฏิกิริยา 60 นาที (ซึ่งมีความไวน้อยกว่าการทำปฏิกิริยาในหลอดที่สามารถตรวจวัดได้ถึงระดับต่ำสุดที่ 33 สำเนาดีเอ็นเอ ภายในเวลา 45 นาที) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ในหลอดใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงโดยตรงทำให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบมีค่าที่แน่นอน แต่การทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP บนฐานกระดาษใช้การจำลองสภาวะการตรวจจริงคือ นำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไป spike ลงในเนื้อหมูแล้วสกัดดีเอ็นเออย่างหยาบจากเนื้อหมูมาทดสอบ หรืออีกกรณีอาจเกิดจากปัจจัยของความแตกต่างในการถ่ายเทความร้อนเพื่อทำปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่าง PCR tube ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาในหลอดและ ELISA plate ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาบนฐานกระดาษ มีความสามารถในการนำพาความร้อนได้แตกต่างกัน โดยหลอด PCR จะค่อนข้างบางและภายในเป็นน้ำทำให้นำพาความร้อนได้ดี อุณหภูมิภายในหลอดจึงเท่ากับอุณหภูมิที่ต้องการ ส่วน ELISA plate จะค่อนข้างหนาและการทำปฏิกิริยายังเกิดบน

กระดาษ ซึ่งนำพาและกระจายความร้อนได้ไม่ดีเท่าในหลอด อาจส่งผลให้อุณหภูมิภายในที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาค่าที่ต่ำกว่าค่าที่ต้องการ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาไม่ดีเท่ากับการทำปฏิกิริยาในหลอด อย่างไรก็ตามความสามารถในการตรวจสอบเชื้อได้ในระดับ 100 สำเนาของเชื้อยังคงอยู่ในมาตรฐานอ้างอิงอาหารพร้อมบริโภคทั่วไปคือ ไม่เกิน 100 CFU ต่อกรัมอาหาร ด้วยเหตุนี้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นจึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหารนอกห้องปฏิบัติการหรือในภาคสนาม

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา paper LAMP-4QL²⁺ ในการตรวจหา *E. coli* และ *S. aureus* จากการสังเกตสีด้วยตาเปล่า และยืนยันผลด้วย spectrophotometry

เชื้อ	เวลา	สังเกตสีด้วยตาเปล่า	A400 – A700 (nm)
<i>E. coli</i>	30 นาที	3.39 33.9 100 339 	
	45 นาที		
	60 นาที		

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา paper LAMP-4QL²⁺ ในการตรวจหา *E. coli* และ *S. aureus* จากการสังเกตสีด้วยตาเปล่า และยืนยันผลด้วย spectrophotometry (ต่อ)

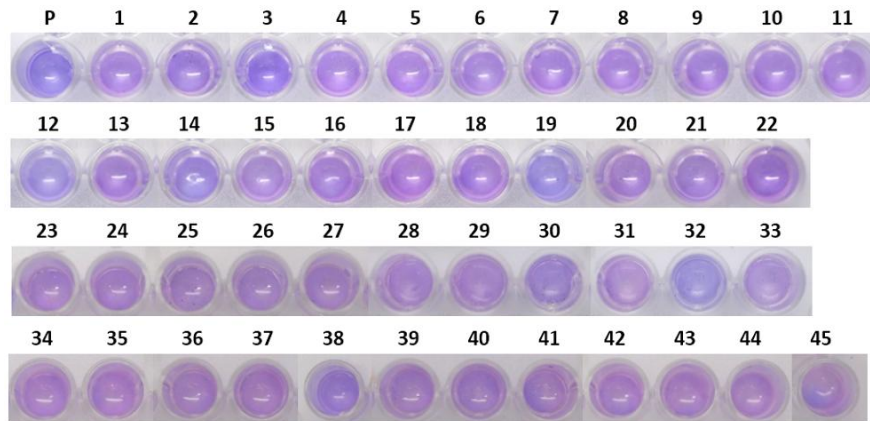
เชื้อ	เวลา	สังเกตสีด้วยตาเปล่า	A400 – A700 (nm)
<i>S. aureus</i>	30 นาที	3.3 33 100 330 	
	45 นาที		
	60 นาที		

ส่วนการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมในช่วง 400 – 700 nm พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการอ่านแปลผลจากสีด้วยตาเปล่า โดยที่ผลลบจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 540-550 นาโนเมตร และผลบวกจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 560-580 นาโนเมตร

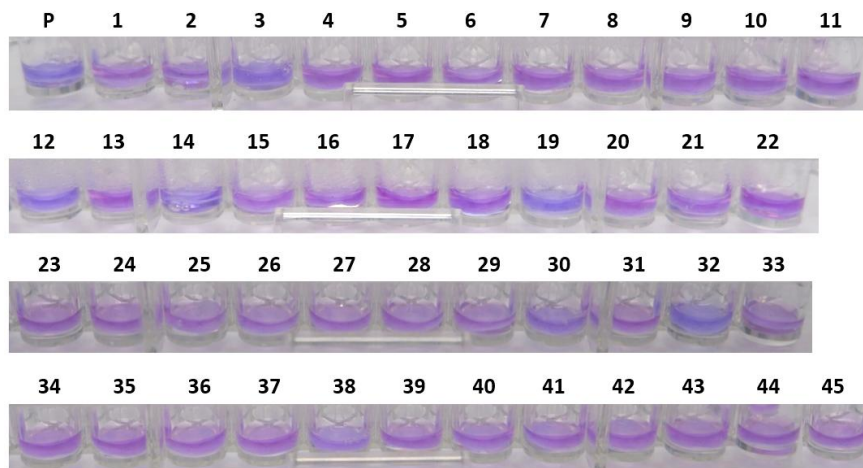
3.3 การประเมินประสิทธิภาพต้นแบบชุดตรวจในการตรวจตัวอย่างจริงตามจำนวนนัยทางสถิติ

การทดสอบการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ ในอาหารพร้อมบริโภคทั่วไปที่เคยมีรายงานพบปนเปื้อนเชื้อก่อโรค ได้แก่ เนื้อหมูปรุงสุกประเภทปิ้ง ทอด ย่าง โดยวิธีสกัดหยาบร่วมกับ paper LAMP-4QL²⁺ เปรียบเทียบกับ LAMP ร่วมกับการตรวจผลด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ Novel Juice ซึ่งเป็นสีย้อมที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน แต่การอ่านผลต้องใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการใช้สี 4QL²⁺ จำนวน 7 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 3, 12, 14, 19, 30, 32, 38) และผลบวกที่ได้จากการใช้สีฟลูออเรสเซนซ์ จำนวน 9 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 3, 12, 14, 18, 19, 26, 30, 32, 38) และเมื่อนำสองตัวอย่างที่ให้ผลแตกต่างกัน (ตัวอย่างที่ 18 และ 26) มายืนยันโดยวิธีการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (LAMP-GE) พบว่า ให้ผลบวกทั้ง 2 ตัวอย่าง แต่มีแถบที่ค่อนข้างจาง จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างที่ 18 และ 26 มีการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ แต่มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณต่ำสุดที่ปฏิกิริยา LAMP-4QL²⁺ สามารถตรวจได้ แต่ยังอยู่ในปริมาณที่สามารถตรวจจับได้โดยสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ Novel Juice และ gel electrophoresis อย่างไรก็ดี ในขั้นการเตรียมตัวอย่างได้ใช้ตัวอย่างเทียบเท่า 0.01 กรัม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสองตัวอย่างนี้มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อน้อยกว่า 100 สำเนาดีเอ็นเอต่อกรัมอาหาร (เกณฑ์บังคับของมาตรฐานอาหารพร้อมบริโภคทั่วไป) โดยเมื่อได้นำ

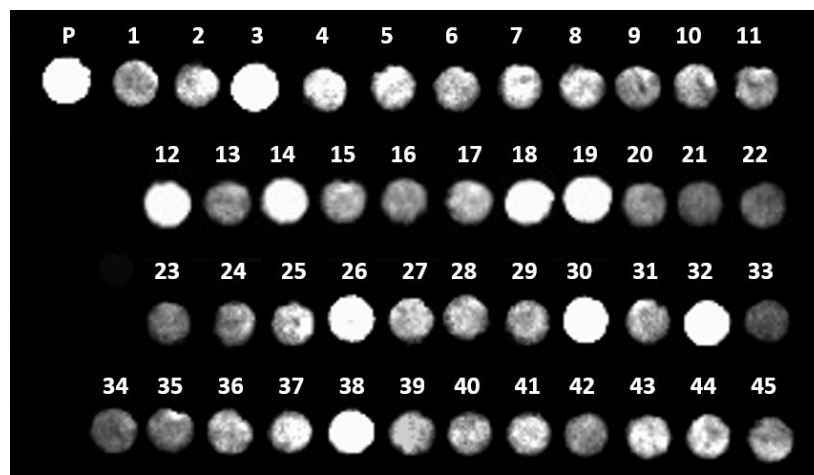
ตัวอย่างอาหารที่ปริมาณมากขึ้นคือ 0.3 กรัม มาทำ paper LAMP-4QL²⁺ พบผลทดสอบเป็นบวกในสองตัวอย่างดังกล่าว จากนั้นนำผลที่ได้มาหาค่าความไว ความจำเพาะ และเปรียบเทียบกับวิธี LAMP-GE ในภาวะสารละลายเป็นวิธีอ้างอิง ผลที่ได้เป็นดังแสดงในรูปที่ 10 และตารางที่ 6 และ 7



ก



ข



ค

รูปที่ 10 ผลการทดสอบการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 45 ตัวอย่าง (ก-ข) ด้วย paper LAMP-4QL²⁺ และวิเคราะห์ผลจากการสังเกตสีด้วยตาเปล่า ก) มุมมองด้านบน ข) มุมมองด้านข้าง โดย (ค) ด้วย paper LAMP-สีย้อมเรืองแสง Novel Juice และวิเคราะห์ผลโดยใช้แสงยูวี โดย P คือตัวควบคุมบวก (*S. aureus* ATCC 25932)

ตารางที่ 6 ค่าผลบวกจริงและผลลบปลอม ที่พบจากต้นแบบชุดตรวจ paper LAMP-4QL²⁺ (อ้างอิง GE แทนวิธีมาตรฐาน)

LAMP-GE paper LAMP-4QL ²⁺	ผลบวก	ผลลบ
ผลบวก	ผลบวกจริง 7	ผลบวกปลอม 0
ผลลบ	ผลลบปลอม 2	ผลลบจริง 36

$$\% \text{ ความไว} = \frac{\text{ผลบวกจริง}}{\text{ผลบวกจริง} + \text{ผลลบปลอม}} \times 100 = \frac{7}{7+2} \times 100 = 77.78 \%$$

$$\% \text{ ความจำเพาะ} = \frac{\text{ผลลบจริง}}{\text{ผลลบจริง} + \text{ผลลบปลอม}} \times 100 = \frac{36}{36} \times 100 = 100 \%$$

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจ *S. aureus* สายพันธุ์สร้างสารพิษในอาหาร ระหว่าง paper LAMP-4QL²⁺ และ paper LAMP-NJ โดยอ้างอิงผลของ LAMP-GE ในภาวะสารละลายเป็นมาตรฐาน

ตัวแปร	Paper-based LAMP-4QL ²⁺	Paper-based LAMP-NJ
Detection limit	100 สำเนาดีเอ็นเอ	N.D.
Specificity (%)	100	100
Sensitivity (%)	78	100
Diagnosis time	เตรียมตัวอย่าง 30 นาทีและทำปฏิกิริยา 45-60 นาที (เดิมสีย้อมแล้วดูผลได้ทันที)	เตรียมตัวอย่าง 30 นาทีและทำปฏิกิริยา 45-60 นาที (เดิมสีและดูผลด้วยเครื่อง Gel Doc)
Detection method	ดูการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่า	ดูการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์

NJ= Novel Juice fluorescencet DNA dye; GE= gel electrophoresis; N/A = ไม่ได้วัด

4. บทสรุปและแผนงานในอนาคต

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าวิธีการ paper-LAMP ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอในการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว เหมาะกับการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม โดยมีความไวของการตรวจวัดอยู่ที่ระดับ 33.9 สำเนา สำหรับ *E. coli* และ 100 สำเนาสำหรับ *S. aureus* ซึ่งเพียงพอต่อการตรวจวัดตามมาตรฐานอาหารปรุงสุกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และได้ validate กับตัวอย่างจริงซึ่งเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในเนื้อหมูปรุงสำเร็จจำนวน 45 ตัวอย่าง เทียบกับวิธีมาตรฐาน คือการใช้ LAMP ร่วมกับ gel electrophoresis โดยพบว่าสีย้อม 4QL²⁺ มีข้อดีคือ สามารถสังเกตสีได้ด้วยตาเปล่า แต่มีความไวต่ำ เมื่อเทียบกับการใช้สีย้อมเรืองแสง Novel Juice (NJ) ซึ่งต้องอาศัยเครื่องอ่านเจลประกอบ โดยผลจากการใช้สีย้อมทั้งสองให้ specificity 100% แต่ sensitivity ของ paper-based LAMP-4QL²⁺ มีค่าเพียง 78% ซึ่งต่ำกว่า paper-based LAMP-NJ ที่ให้ sensitivity สูงถึง 100% จึงแสดงให้เห็นว่าระบบ paper-LAMP สามารถใช้งานได้จริง แต่อาจพัฒนาต่อไปได้อีกโดยการหาสีย้อมที่มีการเปลี่ยนสีชัดเจนขึ้นกว่า 4QL²⁺ เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจวัดให้ดียิ่งขึ้น หลังจากทำการศึกษานี้จนครบถ้วน จะดำเนินการเผยแพร่ผลงานอย่างเป็นทางการต่อไป เช่น การจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และ/หรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

เอกสารอ้างอิง

Argudín, M. Á.; Mendoza, M. C.; Rodicio, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* **2010**, *2*, 1751–1773.

Seok, Y.; Joung, H. A.; Byun, J. Y.; Jeon, H. S.; Shin, S. J.; Kim, S.; Shin, Y. B., Han, H. S.; Kim, M. G. *Theranostics* **2017**, *7*, 2220–2230.

Stratakos, A.; Linton, M.; Millington, S.; Grant, I.R. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 817-828.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560).

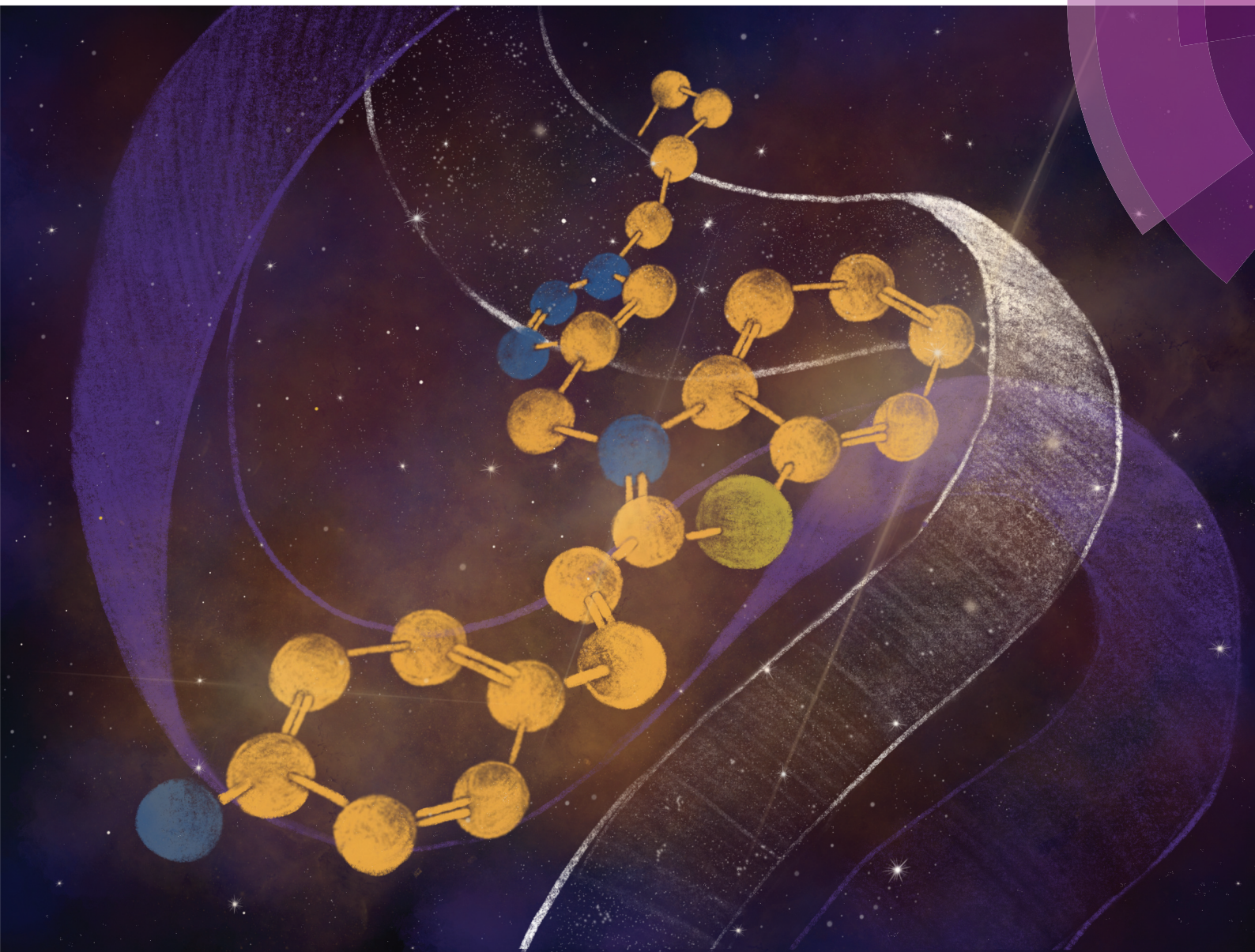
คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 1603001252 (นราพร สมบูรณ์นะ และคณะ, 2560)

ภาคผนวก 2

reprint, manuscript, คำขอสิทธิบัตร

Organic & Biomolecular Chemistry

rsc.li/obc



ISSN 1477-0520



ROYAL SOCIETY
OF CHEMISTRY

Celebrating
IYPT 2019

PAPER

Tirayut Vilaivan *et al.*

Clickable styryl dyes for fluorescence labeling of pyrrolidiny
PNA probes for the detection of base mutations in DNA



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**, 9712

Clickable styryl dyes for fluorescence labeling of pyrrolidinyl PNA probes for the detection of base mutations in DNA†

Boonsong Ditmangklo,^a Jaru Taechalerpaisarn,^{a,b} Khatcharin Siriwong^c and Tirayut Vilaivan^a ^{*}

Fluorescent hybridization probes are important tools for rapid, specific and sensitive analysis of genetic mutations. In this work, we synthesized novel alkyne-modified styryl dyes for conjugation with pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) by click chemistry for the development of hybridization responsive fluorescent PNA probes. The free styryl dyes generally exhibited weak fluorescence in aqueous media, and the fluorescence was significantly enhanced (up to 125-fold) upon binding with DNA duplexes. Selected styryl dyes that showed good responses with DNA were conjugated with PNA *via* sequential reductive alkylation-click chemistry. Although these probes showed little fluorescence change when hybridized to complementary DNA, significant fluorescence enhancements were observed in the presence of structural defects including mismatched, abasic and base-inserted DNA targets. The largest increase in fluorescence quantum yield (up to 14.5-fold) was achieved with DNA carrying base insertion. Although a number of probes were designed to give fluorescence response to complementary DNA targets, probes that are responsive to mutations such as single nucleotide polymorphism (SNP), base insertion/deletion and abasic site are less common. Therefore, styryl-dye-labeled acpcPNA is a unique probe that is responsive to structural defects in the duplexes that may be further applied for diagnostic purposes.

Received 4th July 2019,
Accepted 10th September 2019

DOI: 10.1039/c9ob01492f

rsc.li/obc

Introduction

Detection of genetic variations or mutations including single nucleotide polymorphism (SNP), base deletion, abasic site, insertion and tandem repeats has important applications in many areas.¹ Although the continuously developed sequencing-based methods have provided very detailed information at a reasonable time scale and cost over the past few years, a large investment in terms of instruments and skilled operators is still required and these methods often provide too much information that requires complicated analyses. On the other hand, the use of fluorescent hybridization oligonucleotide probes that are capable of detecting specific nucleic acid targets in homogeneous solution is still of importance due to

its simplicity and efficiency in terms of sensitivity and specificity.² In addition, it can provide information about the concentration and location of the nucleic acid target in real-time and non-invasive fashion that cannot be equaled to that provided by other methods. The first generation hybridization probes consist of an oligonucleotide strand carrying two dyes that interact differently in response to the hybridization-induced conformational change, leading to a fluorescence change in response to the presence or absence of the target.³ Later, singly-labeled probes have been developed whereby the dye must be able to change its fluorescence upon hybrid formation.⁴ This can be achieved by employing the interaction of the dye with double-stranded DNA (dsDNA) *via* intercalation or groove binding, or by sensing of the local environment change such as polarity. Examples of such environment-sensitive dyes which have been successfully used to develop hybridization responsive oligonucleotide probes are pyrene⁵ and thiazole orange (TO)^{6–8} or related cyanine dyes.⁹

Styryl dyes are a class of fluorescent dyes that consist of an electron-deficient *N*-alkylated heterocyclic ring and an electron-rich aromatic ring connected to each other *via* a double bond to create an extended π -conjugated system.^{10,11} The excellent fluorescence properties of styryl dyes that are dependent on the environment make them useful as optical sensitizers,¹²

^aOrganic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: vtirayut@chula.ac.th

^bNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand

^cMaterials Chemistry Research Center, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9ob01492f

as sensors for various ions or small molecule targets such as cyanide,^{13,14} silver,¹⁵ hydrogen peroxide,^{16,17} and thiols,¹⁸ for biomolecular labeling,^{19,20} and bioimaging application.^{21–23} Although certain styryl dyes are known to bind to DNA with concomitant fluorescence enhancement,^{24,25} their use has been limited to DNA staining and very few of these dyes have been further developed into fluorescent hybridization probes. In this context, the Wagenknecht group had prepared a clickable quinoline-indole cyanine (CyIQ) dye and incorporated it into DNA probes, but the singly-labeled probe showed only a small response to DNA targets.²⁶ Therefore, an additional dye such as thiazole red (TR) was required and the fluorescence resonance energy transfer (FRET) principle was employed to create a wavelength-shifting probe that can change its color from yellow (CyIQ) to red (TR) upon hybridization with complementary DNA due to the change in FRET efficiencies between the two dyes.²⁷ A similar wavelength-shifting probe has been applied for the detection of adenosine using a labeled adenosine aptamer.²⁸

However, oligonucleotide probes are readily degraded by nucleases, and their target specificities are not always ideal.^{29,30} Several synthetic oligonucleotide analogues have been developed in order to address these problems. Peptide nucleic acid (PNA) is a remarkable example of an oligonucleotide analogue in which the deoxyribose–phosphate backbone of DNA is completely replaced by a peptide-like backbone. PNA not only offers excellent chemical and biological stabilities, but it also recognizes complementary nucleic acid targets with even greater affinity and specificity compared to natural nucleic acids.^{31,32} PNA is therefore a promising candidate for the development of fluorescent probes for the homogeneous detection of nucleic acid both *in vitro* and for real-time detection in living cells.³³ Pyrrolidiny PNA with an α/β -dipeptide backbone deriving from proline/2-aminocyclopentane carboxylic acid (acpcPNA) is a new generation of PNA that binds to DNA with higher affinity and specificity compared to aegPNA because of the more rigid conformation.³⁴ Several singly-labeled fluorogenic acpcPNA probes have been developed by using fluorescence nucleobases^{35,36} or by backbone modification with pyrene,³⁷ carbazole,³⁸ thiazole orange³⁹ and Nile red.⁴⁰ Only one example of styryl-dye-labeled acpcPNA probe was reported, and it was used in combination with another label on the DNA strand for the monitoring of strand displacement and invasion into DNA duplexes.⁴¹

The main objective of this study is to investigate the potential of using styryl-dye-labeled acpcPNA as a new fluorescent probe for DNA sequence analysis. Alkyne-functionalized styryl dyes were synthesized and conjugated to the backbone of acpcPNA *via* the sequential reductive alkylation-click chemistry previously developed in our group.³⁹ Next, the optical properties of the styryl-dye-labeled acpcPNA probes were investigated in the presence of various DNA targets. In contrast to our expectation, the styryl-dye-labeled acpcPNA probes were more responsive to the presence of structural defects, most notably base insertion, than to perfectly complementary DNA targets. This suggests potential application of the developed

styryl-dye-labeled acpcPNA probes for the detection of base insertion in the DNA targets.

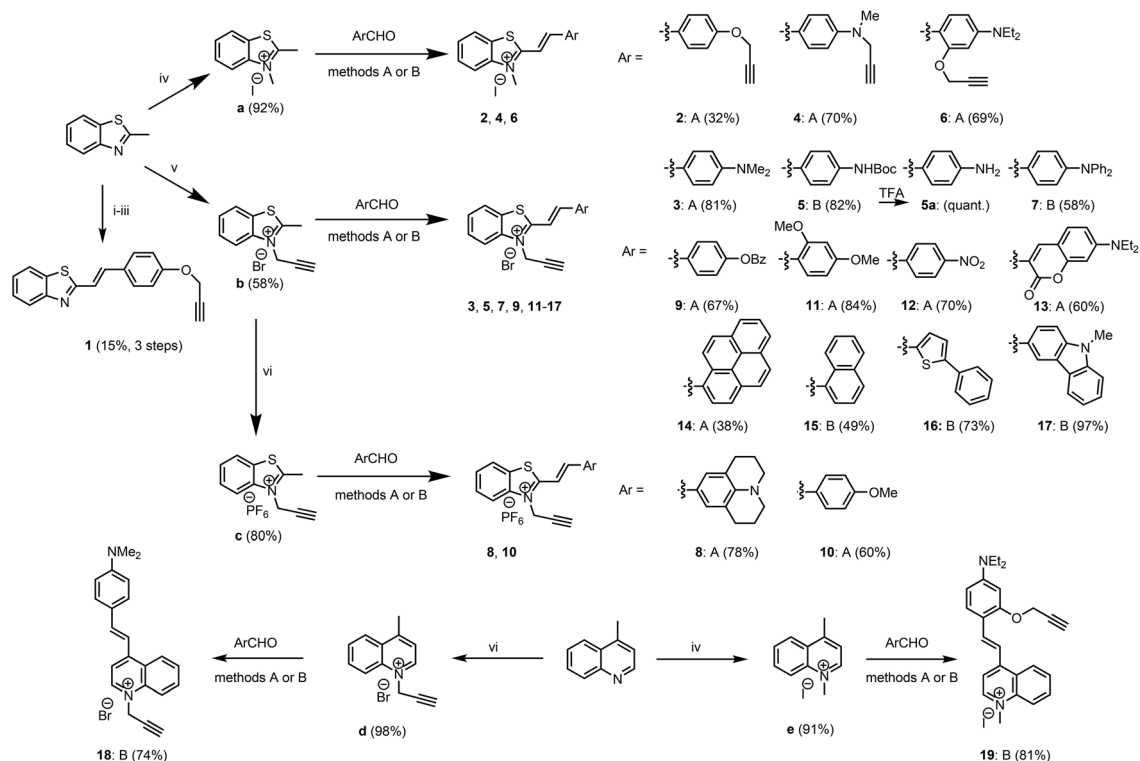
Results and discussion

Synthesis of clickable styryl dyes

A library of styryl dyes bearing a propargyl group for further conjugation to the azide-modified acpcPNA backbone *via* click chemistry³⁹ was first synthesized. Synthesis of styryl dyes required two building blocks: an *N*-alkylated heterocyclic ring system carrying an acidic methyl group (2-methylbenzothiazolium and 4-methylquinolinium salts) and an aromatic aldehyde carrying different aromatic ring systems (benzene with various electron-donating or -withdrawing substituents, thiophene, carbazole, coumarin, and pyrene). In the first step, 2-methylbenzothiazole and 4-methylquinoline were reacted with propargyl bromide or methyl iodide (when the propargyl group was to be attached elsewhere in the dye molecule) to afford *N*-methyl/*N*-propargylbenzothiazolium (**a**, **b**, and **c**) and *N*-propargyl/*N*-methylquinolinium (**d** and **e**) salts. Next, these salts were condensed with an appropriate aromatic aldehyde *via* an aldol-type reaction to afford the alkyne-modified styryl dyes in 15–97% yield. The reactions were carried out either in acetic anhydride²⁴ or in refluxing ethanol. Counterion exchange to PF₆[−] was carried out when the bromide or iodide salts of the products did not spontaneously precipitate. The primary amino-substituted dye **5a** was prepared and stored in the *N*-Boc-protected form (**5**), but the optical properties were measured after the removal of the Boc group by treatment with trifluoroacetic acid (TFA). With the exception of a known compound **3**,¹⁹ all other alkyne-modified styryl dyes have not been previously reported in the literature. The synthetic scheme of these novel clickable benzothiazolium (**1–17**) and quinolinium (**18–19**) styryl dyes is shown in Scheme 1.

Optical properties of free styryl dyes

Dependency of optical properties of structurally related styryl dyes on both polarity and viscosity of the medium has been well-recognized.^{42–45} The absorption properties of **3** as a representative styryl dye in solvents with different polarities (water, MeOH, MeCN, DMSO, EtOAc and THF) clearly show its solvatochromic behavior (Fig. 1A, Table S1†). The plot of the absorption energy *vs.* the ET(30) solvent parameter shows a good correlation (Fig. S33†). The observed negative solvatochromism (blue-shifted absorption maxima in more polar solvents) indicates better stabilization of the ground state dye relative to the excited state, which is typical of $n \rightarrow \pi^*$ donor-acceptor dyes.⁴⁶ On the other hand, no clear correlation between the emission energies and solvent polarity could be deduced. This may be explained by the presence of multiple twisted excited states that can contribute to the fluorescence emission.^{47,48} It should also be noted that the ET30 parameter reflects the combination of solvent properties based on a single reference dye which may not necessarily be the same as the styryl dyes being



Scheme 1 Synthesis of alkyne-modified styryl dyes **1–19**. Reagent and conditions: (i) 4-Hydroxybenzaldehyde, Ac_2O , 90 °C, 24 h, (ii) 10% NaOH 80 °C, 5 h, (iii) propargyl bromide, K_2CO_3 , DMF, 50 °C, 8 h, (iv) MeI, MeCN, reflux, 8 h, (v) propargyl bromide, 95 °C, 2 days, (vi) NH_4PF_6 , MeOH; Method A: Ac_2O , 90 °C, 8–10 h. Method B: EtOH, reflux, 8 h.

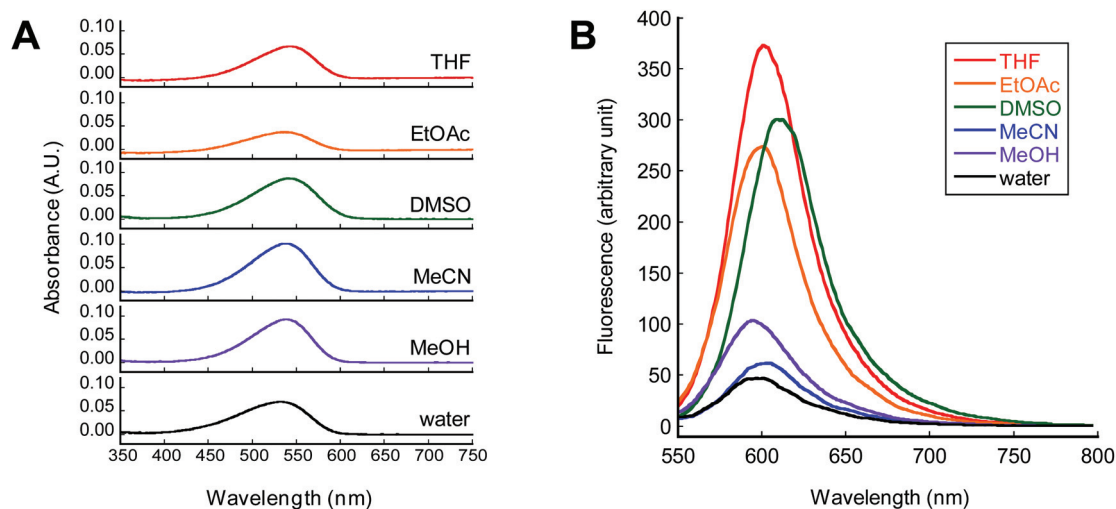


Fig. 1 (A) Absorption and (B) fluorescence spectra of styryl dye **3** in various solvents. Conditions: $[\mathbf{3}] = 1 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$. The spectra in water were recorded in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0.

investigated. Hence, a multi-parameter correlation such as the Kamlet–Taft solvatochromic scale may be necessary for more precise analyses,⁴⁶ but this is beyond the scope of the present work.

The fluorescence quantum yield of **3** as the free dye was generally small ($\Phi_{\text{F}} = 0.001\text{--}0.02$) which could be ascribed to the rapid internal rotation leading to the enhanced radiation-

less decay of the excited states. This was supported by the strong fluorescence increase of the dye in high viscosity media such as glycerol (Fig. S34†). A significant fluorescence increase together with red-shifting of the absorption maxima was also observed in non-viscous low-polarity solvents, such as ethyl acetate and THF (Fig. 1B, Table S1†). The fluorescence increase in these cases may also involve a local change in micropolarity

Table 1 Optical properties of alkyne-modified styryl dyes: absorption maxima $\lambda_{\text{max}}(\text{abs})$, extinction coefficients (ϵ), emission maxima $\lambda_{\text{max}}(\text{em})$, fluorescence quantum yield (Φ) and fluorescence enhancement ratio (F/F_0)^a

Dye	ϵ ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)		F/F_0 ^b	Φ_{F} ^c		Brightness ^d		Φ_{F} (DNA) Φ_{F} (dye)
		abs	em		Dye	+DNA	Dye	+DNA	
1	1.3	297	475	1.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	3.5	399	498	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	6.2	533	605	25.6	0.001	0.032	81	1.9×10^3	32.0
4	4.1	486	590	23.4	0.009	0.142	3.6×10^2	4.6×10^3	15.8
5a	3.5	477	579	14.3	0.003	0.036	1.1×10^2	1.2×10^3	12.0
6	6.9	519	584	41.1	0.003	0.134	2.1×10^2	9.2×10^3	44.7
7	3.1	516	671	17.9	<0.001	0.002	~3	60	>20
8	2.3	578	628	20.8	0.005	0.083	1.0×10^2	1.8×10^3	16.6
9	2.7 ^e	387 ^e	447	1.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	3.0	413	514	1.0	0.003	0.003	81	77	1.0
11	0.8	439	529	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	2.2 ^e	373 ^e	450	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	7.6	551	639	3.4	0.043	0.162	3.3×10^3	1.2×10^4	3.8
14	2.8	479	632	1.0	0.010	0.011	2.8×10^2	2.9×10^2	1.1
15	1.2 ^e	281 ^e	552	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	2.8	292	376	1.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	1.7	468	595	4.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	4.4	541	702	37.8	<0.001	0.024	26	1.0×10^3	>24
19	3.3	537	668	124.8	0.001	0.102	40	2.8×10^3	102

^a Conditions; [Dye] = 2 μM , [DNA] = 1 μM ; [DNA(in bp)] : [Dye] = 15 : 1; all measurements were performed in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 unless otherwise stated. dsDNA = 5'-CGCGGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG-3' + 3'-GCGCCGCATGTCAGTAGATGGTACGGGACC-5'.

^b Fluorescence intensity with dsDNA (F) and without dsDNA (F_0). ^c See the ESI† for the details of the fluorescence quantum yield (Φ_{F}) calculation.

^d Brightness = $\epsilon \times \Phi_{\text{F}}$. ^e In MeOH. n.d. = not determined due to the very weak fluorescence intensity or small fluorescence response with DNA.

that can affect the rate of non-radiative decay of the excited states of the dye molecules.⁴⁹ Although quenching due to self-aggregation of the dyes can be proposed as an alternative fluorescence change mechanism,^{26,50} the absorption maxima and molar absorptivity of **3** in aqueous buffer solution were essentially constant over the concentration range of 0.1 to 5 μM (Fig. S35†), indicating no aggregation of the dye at the experimental concentrations. Such sensitivity of absorption and fluorescence properties of styryl dyes to the environment suggest their potential utility as a label for the development of hybridization responsive fluorescent probe.

The fluorescence quantum yields and fluorescence enhancements of all clickable styryl dyes in the presence of a random sequence 30 base pair DNA duplex (dsDNA) were determined in aqueous phosphate buffer. The ratio of the dye and DNA was first optimized by titration of **3** into a fixed concentration of a 30 bp dsDNA (1 μM) (Fig. S36†). The fluorescence was rapidly increased until the concentration of **3** reached 2 μM (equivalent to 15 bp per dye molecule) which indicated the saturation of all available binding sites. Therefore, all subsequent experiments were performed at a concentration dye = 2 μM and dsDNA = 1 μM . Based on the non-linear fitting of the titration curve of **3** with dsDNA, a binding constant of $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ was estimated, which was in good agreement with the values of related dyes reported in the literature.^{51,52}

Next, the optical properties including absorption maxima [$\lambda_{\text{max}}(\text{abs})$], molar extinction coefficients (ϵ), fluorescence emission [$\lambda_{\text{max}}(\text{em})$] and fluorescence quantum yield (Φ_{F}) of all alkyne-modified styryl dyes in aqueous phosphate buffer were investigated in the absence and presence of dsDNA (Table 1).

Although most of the styryl dyes are weakly emissive in the free state as shown by the very low fluorescence quantum yields, the fluorescence emission intensities of dyes **3–8** and **18–19** were significantly increased (14 to 125-fold) in the presence of dsDNA (Table 1, Fig. 2). In contrast, no or very small fluorescence enhancement was observed for dyes **1–2** and **9–17** (Table 1). The increase in fluorescence emissions/quantum yields upon binding of the styryl dyes to dsDNA can be explained by both the restriction of internal bond rotation and the change in local micropolarity around the dye molecule as a result of intercalative or groove binding. To further confirm that the fluorescence increase of the styryl dye is selective to DNA, dye **3** was tested with two other anionic polymers including heparin and poly(styrenesulfonate) at a similar dye/negative charge ratio. No fluorescence change was observed with heparin, and a smaller response was observed in the case of poly(styrenesulfonate) (Fig. S37†). Considering the presence of both negative charge and hydrophobic/aromatic moiety in poly(styrenesulfonate), such a non-specific interaction is not entirely unexpected and has been observed in other DNA-binding dyes.⁵³ Nevertheless, the results clearly indicate that the dye responds to DNA in a fairly selective fashion.

Conjugation of styryl dyes to acpCPNA probes by click chemistry

Since styryl dyes bind to any DNA sequences without specificity, combination with a probe such as PNA was necessary to target specific DNA sequences. The dyes that showed a good response with dsDNA including **3–8** and **18–19** were therefore selected for PNA labeling to create a hybridization responsive

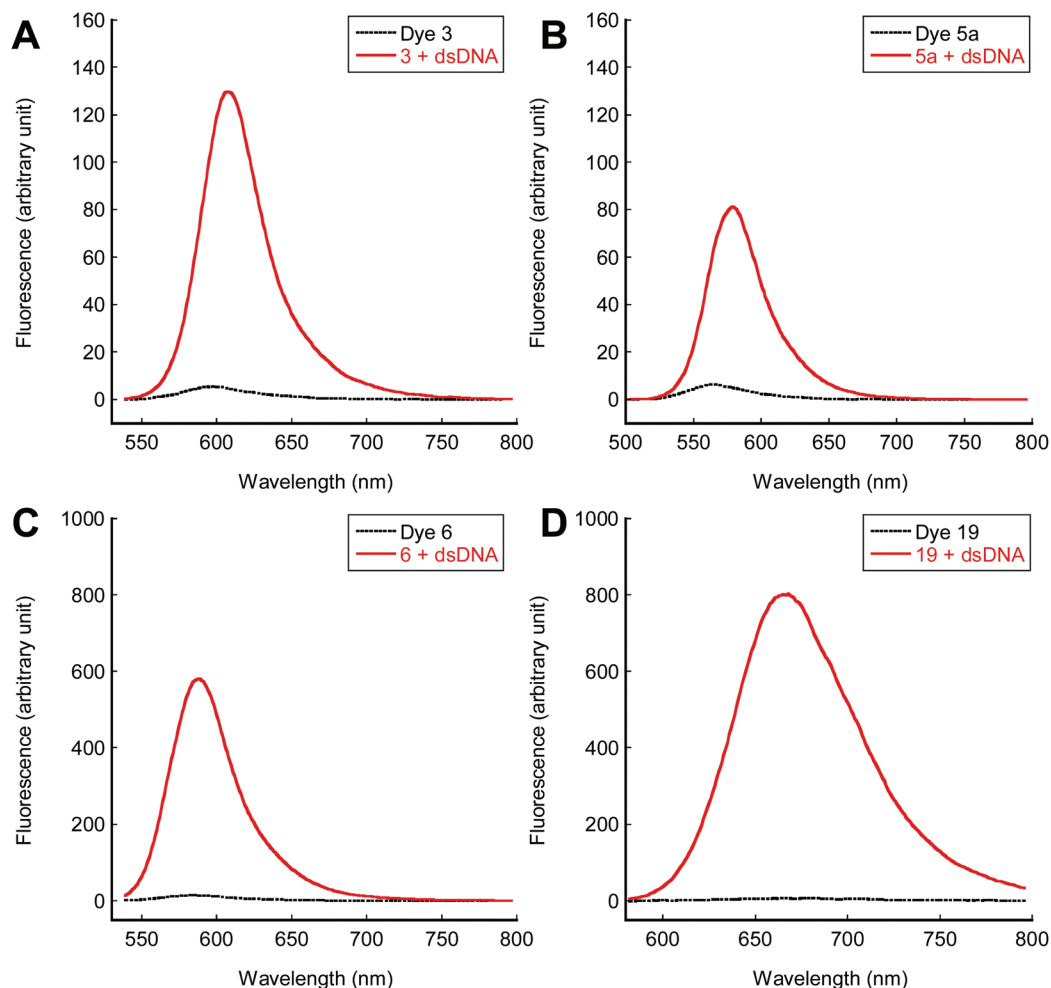
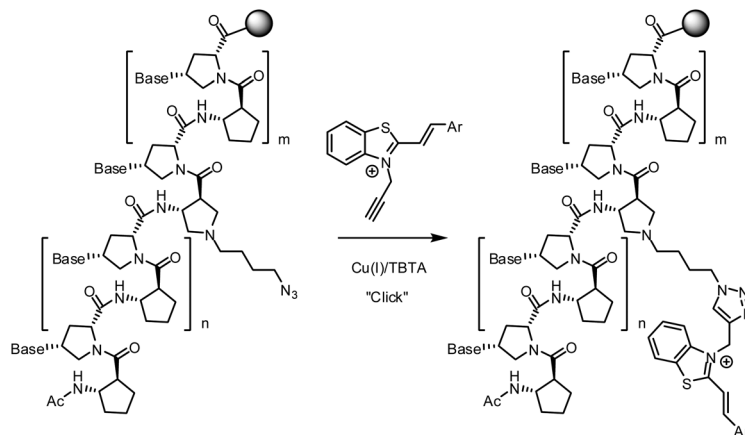


Fig. 2 Fluorescence spectra of styryl dyes in the absence and presence of DNA: (A) **3**, (B) **5a**, (C) **6** and (D) **19**; conditions [dsDNA] = 1 μ M, [Dye] = 2 μ M in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, λ_{ex} = 525 (**3**, **6**), 487 (**5a**), λ_{ex} 568 (**19**) nm.



Scheme 2 Conjugation of styryl dyes to the backbone of acpcPNA by click chemistry.

probe, with the assumption that the dyes that show good responses to the DNA duplex would bind to PNA-DNA duplexes in the same way. The selected dyes were post-synthetically conjugated onto the backbone of azide-modified acpcPNA by

click chemistry in the presence of tetrakis(acetonitrile)copper(i) hexafluorophosphate/tris((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine (TBTA) (Scheme 2).³⁹ The progress of the click reaction was conveniently monitored by MALDI-TOF MS

(Fig. S38†). Two model acpcPNA sequences (**T9** and **M10**) bearing various styryl dye labels were synthesized and characterized by MALDI-TOF MS (Table 2). It should be noted that the acidolytic cleavage of the PNA labeled with dye **5** from the solid support resulted in the simultaneous deprotection of the Boc group to give dye **5a** carrying a free NH₂ group. The yields of isolated products (ranging from 4 to 19% at a 0.5 μmole scale) were somewhat lower than the typical range (10–30%) for the synthesis of unlabeled acpcPNA. This could be attributed to the inefficiency of the click reaction because some styryl dyes were partially decomposed under the reaction conditions, as well as to some loss during reverse-phase HPLC purification at such small scale syntheses.

Optical properties and DNA binding studies of styryl-dye-labeled acpcPNA probes

All synthesized PNA probes and their respective hybrids with complementary, single mismatched, base-inserted and abasic

DNA targets were evaluated in terms of thermal stabilities and optical properties. The thermal stability data showed that the styryl-dye-labeled acpcPNA retained the ability to strongly hybridize with complementary DNA (Table 3). The specificity of the recognition of the DNA target by the PNA probe was confirmed by the large decrease in thermal stability in the presence of non-complementary DNA targets carrying single base mismatch (–23 to –30 °C for **T9** and –17 to –25 °C for **M10**), base insertion (–13 to –26 °C for **T9** and –6 to –19 °C for **M10**) and abasic site (–18 to –25 °C for **T9** and –16 to –26 °C for **M10**). Interestingly, DNA targets with base insertion appeared to give a consistently smaller *T_m* decrease when compared to other types of mismatches. The effects can be most clearly observed in probes **M10-5a**, **M10-18** and **M10-19** (Table 3).

The single-stranded PNA probes were generally more fluorescent by an order of magnitude when compared to the free dyes (Table 3). For example, the fluorescence quantum yields (Φ_F) of dye **3** in the free form and when incorporated into the

Table 2 Yield of isolated products and mass (MALDI-TOF) data of styryl-dye-labeled acpcPNAs obtained via sequential reductive alkylation-click reaction

PNA	Sequence (N → C)	<i>t_R</i> ^a (min)	Yield ^b (%)	<i>m/z</i> (calcd)	<i>m/z</i> (found)
T9-3	Ac-TTTT(3)TTTTT-LysNH ₂	33.3	19	3598.0	3599.8
T9-5a	Ac-TTTT(5a)TTTTT-LysNH ₂	32.3	14	3569.9	3570.9
T9-6	Ac-TTTT(6)TTTTT-LysNH ₂	34.4	11	3656.1	3656.5
T9-8	Ac-TTTT(8)TTTTT-LysNH ₂	32.4	10	3650.1	3648.3
T9-18	Ac-TTTT(18)TTTTT-LysNH ₂	33.7	15	3592.0	3594.6
T9-19	Ac-TTTT(19)TTTTT-LysNH ₂	34.1	11	3650.0	3651.6
M10-3	Ac-GTAGA(3)TCACT-LysNH ₂	31.2	9	3977.4	3978.4
M10-4	Ac-GTAGA(4)TCACT-LysNH ₂	30.4	12	3977.4	3980.7
M10-5a	Ac-GTAGA(5a)TCACT-LysNH ₂	31.3	12	3949.3	3952.9
M10-6	Ac-GTAGA(6)TCACT-LysNH ₂	31.0	16	4035.5	4034.7
M10-18	Ac-GTAGA(18)TCACT-LysNH ₂	33.9	4	3971.4	3971.4
M10-19	Ac-GTAGA(19)TCACT-LysNH ₂	33.4	14	4029.4	4029.1

^a HPLC conditions: C18 column, 4.6 × 150 mm, 3 μ, gradient 0.1% TFA in H₂O:MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL min^{–1}, 260 nm. ^b Purified by HPLC (>90% purity), spectrophotometrically determined based on the scale of the synthesis.

Table 3 Thermal stability and fluorescence data of styryl-dye-labeled PNA probes with various DNA targets^{a,b}

PNA	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_F^c (ss)	<i>T_m</i> (ΔT_m) (°C)				$\Phi_F(\text{ds})/\Phi_F(\text{ss})^c$			
				Complementary	Single mismatched	Base-inserted	Abasic	Complementary	Single mismatched	Base-inserted	Abasic
T9-3	525	595	0.018	73	45 (–28)	50 (–23)	49 (–24)	0.7	2.1	5.6	6.8
T9-5a	487	571	0.027	73	46 (–27)	53 (–20)	50 (–23)	0.9	6.2	8.7	8.6
T9-6	525	586	0.040	73	43 (–30)	56 (–17)	48 (–25)	0.8	1.1	1.4	1.1
T9-8	565	622	0.001	68	45 (–23)	55 (–13)	50 (–18)	0.7	1.4	1.2	1.1
T9-18	560	682	0.006	73	45 (–28)	57 (–16)	48 (–25)	1.4	2.9	4.8	3.8
T9-19	568	668	0.023	71	41 (–30)	45 (–26)	50 (–21)	0.7	1.0	1.1	0.8
M10-3	525	602	0.019	52	35 (–17)	33 (–19)	36 (–16)	3.2	4.1	11.9	3.6
M10-4	510	588	0.065	57	41 (–17)	41 (–17)	38 (–19)	1.5	2.4	3.1	3.3
M10-5a	487	577	0.026	59	38 (–21)	54 (–6)	40 (–19)	1.8	4.2	14.5	3.6
M10-6	525	592	0.049	59	35 (–24)	42 (–17)	40 (–19)	1.5	2.9	4.5	3.3
M10-18	560	692	0.007	59	34 (–25)	45 (–14)	33 (–26)	1.6	2.3	3.6	2.2
M10-19	568	663	0.025	60	35 (–25)	49 (–11)	37 (–23)	1.6	2.9	2.0	2.4

^a DNA sequences for **T9** series: complementary = dAAAAAAAAA, mismatched = dAAAAATAAAA, base-inserted = dAAAACAAAAA, abasic = dAAAAAXAAAA; for **M10** series: complementary = dAGTGATCTAC, mismatched = dAGTGCTCTAC, base-inserted = dAGTGACTCTAC, abasic = dAGTGXTCTAC. ^b Conditions: Phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1.0 μM, [DNA] = 1.2 μM. ^c See the ESI† for the details of the fluorescence quantum yield (Φ_F) calculation.

PNA probe **T9-3** were 0.001 and 0.018, respectively. This can be explained by the interaction between the dye and the PNA molecule, which resulted in a change in local microenvironment and restriction of the internal rotation of the dye. This proposal was supported by the significant red-shifting of the absorption maxima of the dyes in the single-stranded PNA probes relative to the free dyes under the same conditions (Tables 1 and S2†). Such dye-PNA interactions had been previously observed⁵⁴ and were indeed the basis of the working principle of many singly-labeled PNA beacons.³³

The fluorescence quantum yields of the single-stranded PNA probes changed only a little in the presence of the complementary DNA target for all dyes tested (**3**, **4**, **5**, **6**, **8**, **18** and **19**) regardless of the PNA sequence (0.7–1.4 fold for **T9** and 1.5–3.2 fold for **M10**). This is in sharp contrast to our original expectation and could reflect the different interactions between the dye and PNA-DNA vs. DNA-DNA duplexes (*vide infra*). On the other hand, significant increases in the fluorescence were unexpectedly observed in certain PNA

probes including **T9-3**, **T9-5a**, **M10-3** and **M10-5a** in the presence of DNA targets carrying mismatch, base insertion and abasic site (Table 3). For example, probe **T9-3** gave 2.1, 5.6 and 6.8-fold increase in quantum yields for the mismatched, base-inserted and abasic DNA targets, respectively, while the quantum yield was decreased by 0.7 fold with the complementary DNA. For both PNA probe sequences, dyes **3** and **5a** which bear structural resemblance showed the most significant fluorescence change in the presence of these “defective” DNA targets. In the case of mix-sequence PNA probes **M10-3** and **M10-5a**, the best responses were observed for the base-inserted DNA, which showed the increase in fluorescence quantum yields of 11.7–14.5 fold (Fig. 3, Table S2†). These changes were much higher than the mismatched and abasic targets, and the fluorescence change can be visible by the naked eye under UV light (Fig. 3C). The structurally related dyes **4** and **6** whereby the position of the alkyne attachment was on the benzene ring rather than on the benzothiazole ring showed strong fluorescence enhancement as a free dye upon binding to DNA, but

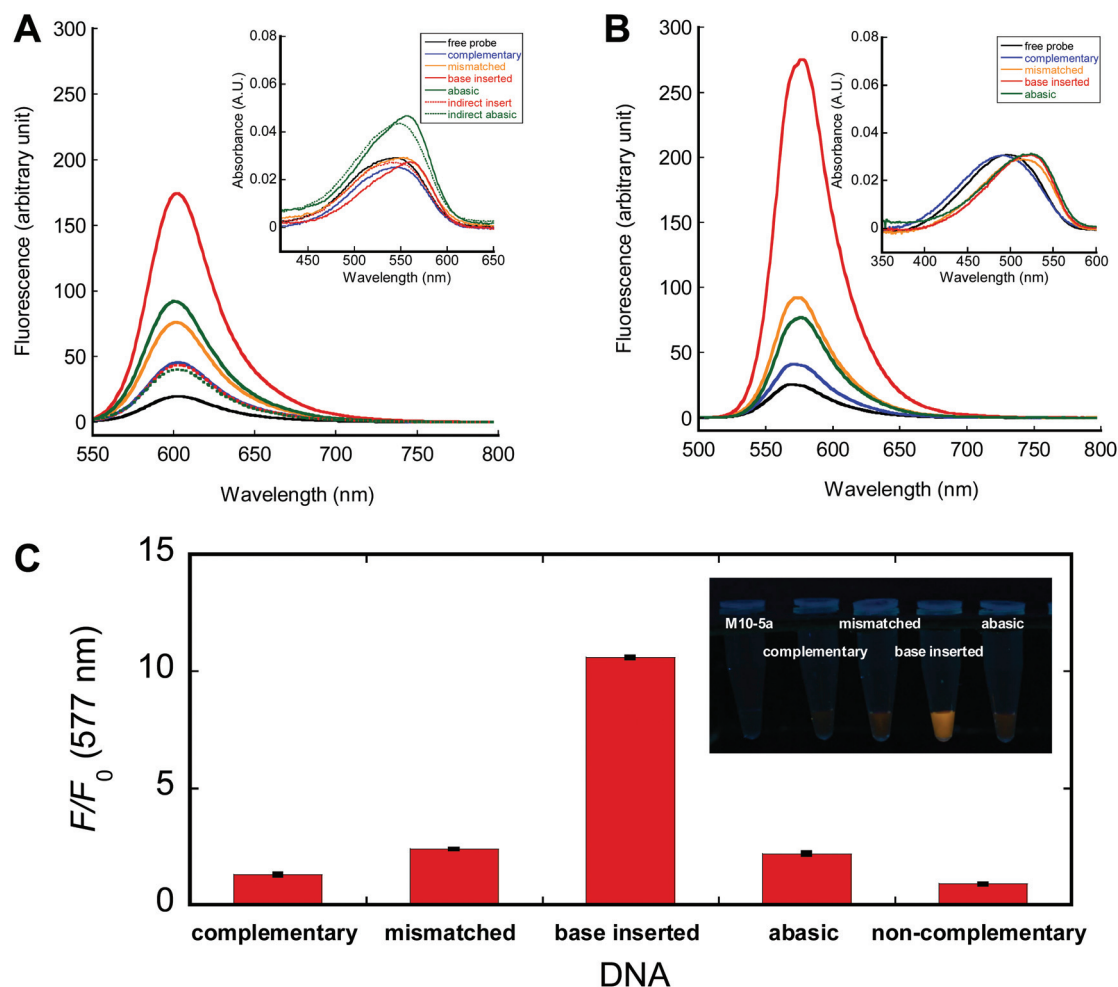


Fig. 3 Fluorescence and absorption spectra (insets) of (A) **M10-3** and (B) **M10-5a**. Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 1 μ M, [DNA] = 1.2 μ M. (C) Fluorescence enhancement ratio of **M10-5a** in the presence of various DNA. Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 0.1 μ M, [DNA] = 0.12 μ M. Error bars represent standard deviations of three experiments. Inset shows photographs under UV light (315 nm) at [PNA] = 5 μ M, [DNA] = 6 μ M; see Table 3 for the DNA sequences.

not when attached to the PNA probes. This suggests the crucial role of the position of the dye attachment. Likewise, despite their good responsiveness to dsDNA as the free dyes, the rather sterically hindered dyes **8**, **18** and **19** when incorporated into the PNA probes showed little fluorescence change towards all types of DNA targets.

Since these styryl dyes exhibit solvatochromic properties, additional insightful information about the local environment of the dyes in different types of PNA-DNA duplexes could be obtained from the absorption spectra. Pronounced red-shifting in the absorption maxima of the PNA probes (13–22 nm for **M10-3** and 28–29 nm for **M10-5a**) was observed upon binding with DNA targets carrying a single base insertion or abasic site located near the position of the dye (Fig. 3A and B). This indicates that the dye in these defective PNA-DNA duplexes experienced a less polar environment compared to the complementary duplex, whereby such large red-shifting was not observed. Importantly, when the base insertion or the abasic site was located away from the position of the dye, only small red-shifting of the absorption maxima (Fig. 3A) along with a very small fluorescence change was observed (Fig. 3A, Table S2†). The experiments with DNA carrying different base insertion 5'-AGTGANTCTAC-3' (N = C, A, T, G) confirmed that the large fluorescence increase and the red-shifting of the absorption spectra were general for all base-inserted DNA targets (Table S2†). A negligible fluorescence change was observed in the case of the non-complementary DNA target (1.2 fold), thus further confirming the specificity of the fluorescence enhancement.

The results presented so far revealed that the styryl-dye-labeled PNA probes gave distinctive optical responses to the base insertion, and smaller extents for the abasic site and single base mismatch, but not to complementary DNA targets as most conventional hybridization probes do. The conformation of different types of PNA-DNA duplexes was further investigated using circular dichroism (CD) experiments (Fig. 4).

The CD spectra revealed that in all cases the hybrid was formed as shown by a marked difference between the spectra of the duplex and the sum of the spectra of the free probe and DNA target. Interestingly, the CD spectrum of the duplex with the base-inserted DNA target showed a positive band between 250 and 300 nm as a distinctive feature that was not observed in other types of PNA-DNA duplexes suggesting subtle structural difference among these duplexes. No induced CD signal in the region of dye absorption could be observed in all cases. Strong induced CD has been observed in certain styryl dyes-DNA complexes and was attributed to the formation of chiral aggregates,⁶⁵ but there are also styryl dyes-DNA complexes that show very small⁶⁵ or no induced CD at all.⁶⁴ Although the reason for this is unclear at present, the absence of the induced CD signal in this case is not unique and should warrant further studies.

Applications of styryl-dye-labeled acpcPNA probes for the detection of base insertion

To demonstrate potential applications of the styryl-dye-labeled PNA probe for the detection of base insertion mutation, the sequence of Liddle's syndrome whereby a single cytosine base insertion in the β -subunit of the human epithelial sodium channel gene was chosen as a test case.⁵⁵ We investigated the optical properties of acpcPNA probe **M12-5a** (Ac-CCCAGT(5a) GTTGGG-LysNH₂) in the presence of wild type DNA (5'-CCCAACTGGG-3', $T_m > 80$ °C) which are fully complementary to the probe, and the Liddle's syndrome sequence which contained a single G base insertion (5'-CCCAACGACTGGG-3', $T_m = 62$ °C). The fluorescence data showed that the **M12-5a** probe gave a larger increase in the fluorescence quantum yield by 6-fold ($\Phi_F = 0.157$) relative to the single-stranded probe ($\Phi = 0.026$) after hybridized with the Liddle's syndrome DNA (Fig. 5A). A smaller increase in the fluorescent quantum yield was observed with the wild type DNA (2.4-fold, $\Phi = 0.063$). Moreover, the absorption spectra showed a more pronounced

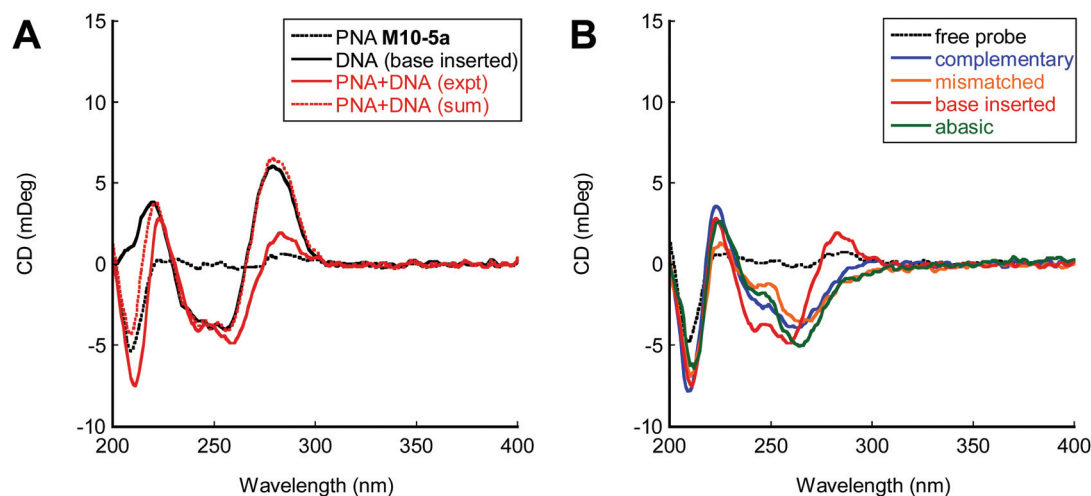


Fig. 4 CD spectra of (A) **M10-5a** + base-inserted DNA in comparison with the sum of the two components (B) **M10-5a** in the absence and presence of complementary, mismatched, base-inserted and abasic DNA targets. Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 at 20 °C; [PNA] = 2.5 μ M, [DNA] = 3.0 μ M; see Table 3 for the DNA sequences.

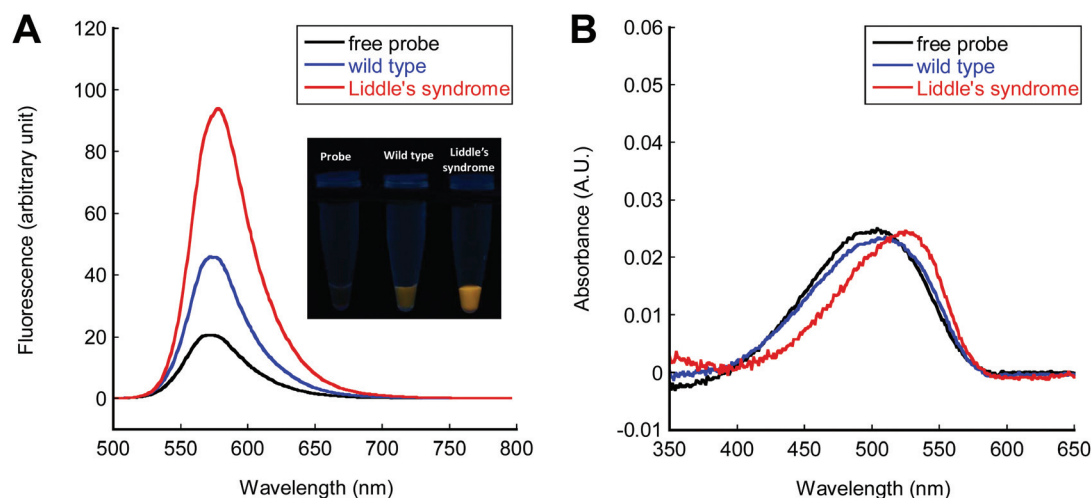


Fig. 5 (A) Fluorescence spectra and (B) UV-vis spectra of PNA probe **M12-5a** in the presence of wild type and Liddle's syndrome DNA in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 1.0 μ M, [DNA] = 1.2 μ M, λ_{ex} = 487 nm. Inset shows photographs under UV light (315 nm) at [PNA] = 10 μ M, [DNA] = 12 μ M.

red-shifting in the case of the Liddle's syndrome sequence (25 nm, λ_{max} = 525 nm) than the wild type DNA (5 nm, λ_{max} = 505 nm) relative to the free PNA probe (λ_{max} = 500 nm) (Fig. 5B). Due to the small fluorescence signal difference between the base-inserted and complementary DNA targets, a quantitative measurement of the signal with appropriate calibration may be necessary for practical applications. Nevertheless, this example clearly showcases the potential applicability of the styryl-labeled PNA probes in distinguishing between base insertion mutation and wild type DNA targets.

Structural insights into the interaction of styryl dyes with PNA-DNA and DNA-DNA duplexes

To gain further understanding of the interaction of styryl dyes and PNA-DNA vs. DNA-DNA duplexes, fluorescence experiments between free styryl dyes (**3** and **18**) and various unlabeled acpcPNA and DNA hybrids were investigated. The experiments showed that the fluorescence of both dyes was almost unchanged in the presence of the complementary PNA-DNA hybrid (Fig. S39†). This behavior is in contrast with DNA-DNA duplexes whereby significant fluorescence increases were observed for both dyes (Table 1), indicating the difference in the binding of styryl dyes to DNA-DNA and PNA-DNA duplexes. This is consistent with the fact that a very little fluorescence change was observed with styryl dye-labeled acpcPNA probes, thus making these probes less useful for the detection of complementary DNA target as originally intended. On the other hand, significant fluorescence increases of both dyes were observed with the hybrids of PNA and mismatched, base-inserted and abasic DNA (Fig. S39†), indicating that the dye can only interact with the PNA-DNA duplexes when there is a defect in the structure that may facilitate the interaction between the dye and the duplex. It is known that typical intercalators and groove binders interact less strongly with aegPNA-DNA than DNA-DNA duplexes.⁵⁶ A cyanine dye DiSC2

(**5**) can aggregate within the minor groove aegPNA-DNA duplex templates,⁵⁷ but the same aggregation was not observed with aegPNA variants containing a substituent that can block the minor groove, and therefore prevent the dye binding.⁵⁸

To explain the unexpectedly small response of the styryl-dye-labeled acpcPNA probe towards its complementary DNA target, the interactions between DNA-DNA and acpcPNA-DNA duplexes with the styryl dye **3** were explored by molecular modeling. The minor groove of the DNA-DNA duplex (PDB ID = 4c64)⁵⁹ was wider (~ 6 Å) and much deeper (~ 5 Å) compared to the corresponding acpcPNA-DNA duplex⁶⁰ (width ~ 2 – 3 Å and very shallow) (Fig. S40A†). The dimension of the groove suggests that the styryl dyes should fit nicely into the minor groove of DNA-DNA duplexes. A docking simulation with Autodock Vina^{61,62} revealed that both **3** and **18** fit well into the minor groove of the DNA-DNA duplex, whereas the backbone of acpcPNA blocked styryl dyes from binding in the minor groove of the acpcPNA-DNA duplex (Fig. S40B†). Collectively, these *in silico* studies were in agreement with experiments in which fluorescence intensities of styryl dyes significantly enhanced in the presence of complementary DNA-DNA but not PNA-DNA duplexes.

Although previous experimental studies with structurally related styryl dyes indicated that they predominantly interact with dsDNA by groove binding,^{63,64} the intercalative binding mode has also been observed.^{52,65} Molecular dynamics (MD) simulations were performed to gain further understanding of the interactions between the dyes and the PNA-DNA duplexes. The MD structure averaged along 10 000 structures of the last 10 ns MD trajectory for each system illustrated in Fig. 6 revealed that, for the **M10-5a**-DNA duplex carrying a base insertion, the styryl dye was located in the PNA-DNA duplex and partially stacked with the adjacent base pairs, while the inserted cytosine base pointed outside the duplex. It can thus be concluded that the presence of a defect in the structure creates a

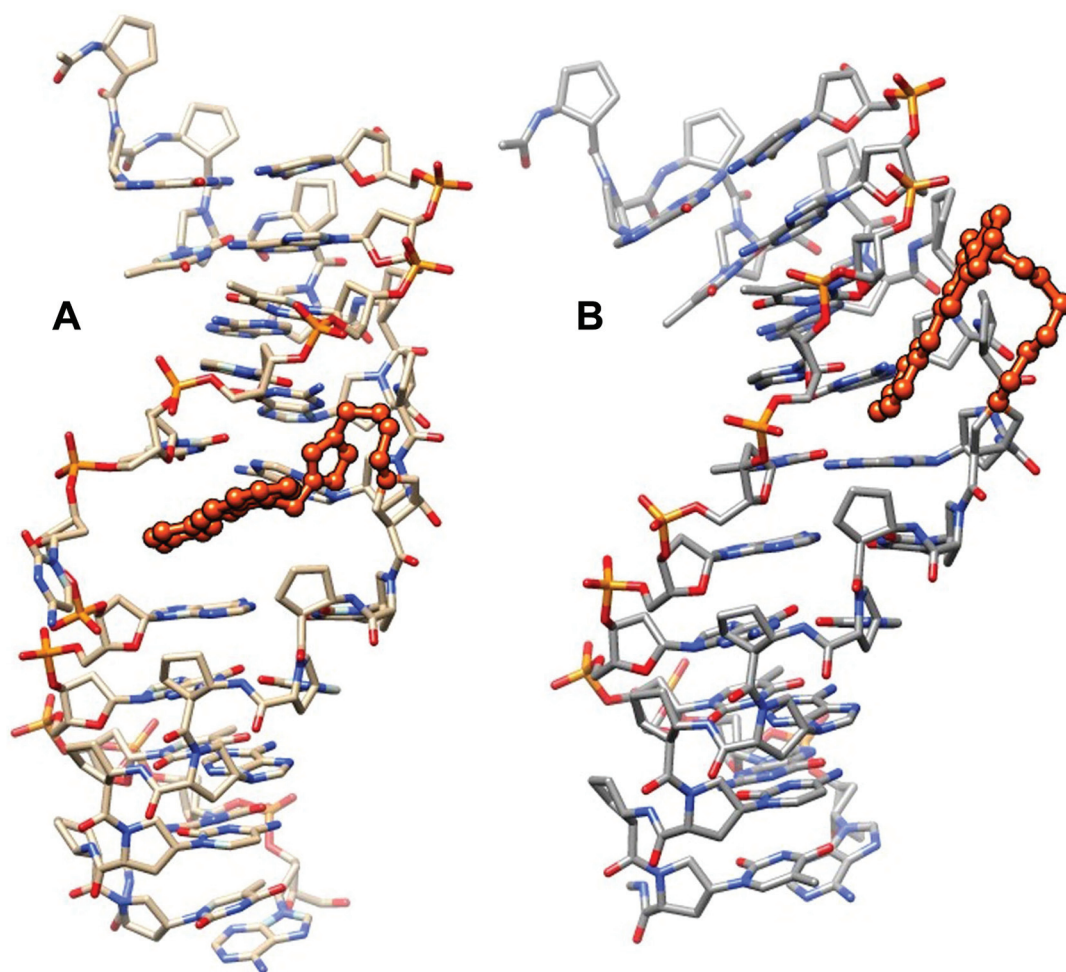


Fig. 6 Averaged MD structures of **M10-5a** binding to (A) base-inserted and (B) complementary DNA. See Table 3 for the DNA sequences.

binding site that allows the dye to fit in, resulting in the observed fluorescence enhancement. Similar effects had been previously observed in other acpcPNA probes, although with a decrease in fluorescence^{35,37} or a much smaller degree of fluorescence increase.⁴⁰ In contrast, only part of the dye molecule was placed in the minor groove of the complementary **M10-5a**-DNA duplex. This leads to a larger fluctuation of the dye molecule in the complementary compared to the base-inserted duplexes as confirmed by the root-mean-square deviation (RMSD) of atomic positions. The RMSDs of dye structures in the MD trajectory with respect to its averaged structure, which refers to a change in the simulated dye structures along a simulation time, were 0.5 ± 0.2 and 0.8 ± 0.3 Å for the base-inserted and complementary duplexes, respectively. Such a large degree of flexibility is in good agreement with the observed small response of the probe to complementary DNA.

Conclusion

In this work, we successfully synthesized novel alkyne-modified styryl dyes and conjugated them onto the conformation-

ally rigid pyrrolidinyl PNA by click chemistry. The alkyne-modified styryl dye exhibited low fluorescence in the free state but yielded large fluorescence enhancement (up to 125-fold) in the presence of DNA. The styryl-dye-labeled acpcPNA probes retained the ability to bind to their complementary DNA target, but the fluorescence change was small. On the other hand, the probes yielded strongly enhanced fluorescence with mutated DNA carrying base mismatch, abasic site and, most notably, base insertion. Based on spectroscopic studies and modeling, we propose that the defect in the PNA-DNA duplex structure provides a binding site that can accommodate the styryl dye located nearby, thus resulting in the observed fluorescence enhancement. The unique fluorescence response of the styryl-dye-labeled acpcPNA probes can be considered to be a valuable addition to only a few reported examples of fluorescent oligonucleotide probes that are responsive to base insertion⁶⁶ or abasic sites^{67–69} in the DNA targets. As a result, the present styryl-dye-labeled acpcPNA probes are potentially useful for the detection of specific types of mutated DNA targets such as base insertion mutations that generally do not respond to conventional probes.

Experimental

Synthesis of clickable styryl dyes

All styryl dyes were synthesized by condensation of 2-methylbenzothiazolium or 4-methylquinolinium salts and an appropriate aldehyde in acetic anhydride at 90 °C for 8–10 h (Method A for **1–4**, **6**, and **8–14**) or in refluxing ethanol for 8 h (Method B for **5**, **7**, and **15–19**). They are generally isolated with the same counterion as the benzothiazolium or 4-methylquinolinium salt used (iodide for *N*-methyl and bromide for *N*-propargyl salts). In some cases when the product did not precipitate, the counterion was replaced with PF₆[−] by the treatment of the bromide or iodide salts with ammonium hexafluorophosphate in methanol.

(E)-2-(2-(4-(2-Propynyloxy)phenyl)ethenyl)benzo[d]thiazole (1). Yield 15% (3 steps, from 2-methylbenzothiazole); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.65 (s, 2H), 2.47 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.3, 158.6, 153.8, 137.2, 134.2, 129.0, 128.9, 126.3, 125.2, 122.8, 121.4, 120.4, 115.4, 78.2, 75.9, 55.9; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₁₈H₁₄NOS⁺: 292.0796 [*M* + H]⁺ found: 292.0796.

(E)-3-Methyl-2-(2-(4-(2-propynyloxy)phenyl)ethenyl)benzo[d]thiazolium iodide (2). Yield 32%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.32 (s, 3H), 3.65 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.0, 160.7, 148.4, 142.0, 131.9, 129.3, 128.3, 127.6, 127.4, 124.2, 116.7, 115.6, 111.7, 78.8, 78.6, 56.0, 55.9, 36.3, 18.5; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₁₉H₁₆NOS⁺: 306.0947 [*M*]⁺ found: 306.0952.

(E)-2-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (3). Yield 81%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.74–7.67 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.78 (s, 2H), 3.72 (s, 1H), 3.15 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 189.8, 171.4, 153.9, 151.6, 140.4, 133.4, 129.0, 127.5, 126.6, 124.1, 121.5, 115.6, 112.1, 111.0, 105.2, 78.1, 76.0, 37.6; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₂₀H₁₉N₂S⁺: 319.1263 [*M*]⁺ found: 319.1265.

(E)-3-Methyl-2-(2-(4-(*N*-methyl-*N*-2-propynyl)phenyl)ethenyl)benzo[d]thiazolium iodide (4). Yield 70%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.75–7.67 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.34 (s, 2H), 4.27 (s, 3H), 3.24 (s, 1H), 3.09 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.6, 152.2, 149.8, 141.9, 132.4, 128.9, 127.6, 127.0, 123.8, 122.7, 116.1, 113.0, 107.7, 79.4, 74.8, 41.0, 38.0, 35.8; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₂₀H₁₉N₂S⁺: 319.1263 [*M*]⁺ found: 319.1270.

(E)-2-(2-(4-(*N*-tert-Butoxycarbonylamino)phenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (5). Yield 82%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.93 (s, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.1 Hz,

1H), 8.31–8.23 (m, 2H), 8.04–7.99 (m, 3H), 7.91 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.93 (s, 2H), 3.79 (s, 1H), 1.51 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.6, 152.4, 150.3, 144.3, 140.5, 131.5, 129.6, 128.4, 127.7, 124.5, 118.0, 116.4, 110.6, 80.0, 78.7, 75.7, 38.4, 28.0; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₂₃H₂₃N₂O₂S⁺: 391.1480 [*M*]⁺ found: 391.1471.

(E)-2-(2-(4-(Diethylamino)-2-(2-propynyloxy)phenyl)ethenyl)-3-methylbenzo[d]thiazolium iodide (6). Yield 69%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.24 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.15 (s, 3H), 3.75 (s, 1H), 3.53 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.1, 159.7, 153.4, 143.9, 142.0, 133.0, 128.7, 127.0, 126.3, 123.6, 115.6, 111.1, 106.5, 105.0, 95.0, 79.0, 78.7, 56.3, 44.5, 35.2, 12.6; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₂₃H₂₅N₂OS⁺: 377.1682 [*M*]⁺ found: 377.1684.

(E)-2-(2-(4-(*N,N*-Diphenylamino)phenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (7). Yield 58%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.26–8.20 (m, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.92–7.85 (m, 2H), 7.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 4H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.86 (s, 2H), 3.76 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.2, 151.8, 150.3, 145.3, 140.5, 132.2, 130.0, 129.4, 128.2, 127.4, 126.3, 126.0, 125.6, 124.4, 118.8, 116.2, 109.1, 78.5, 75.7, 38.1; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₃₀H₂₃N₂S⁺: 443.1576 [*M*]⁺ found: 443.1579.

(E)-3-(2-Propynyl)-2-(2-(2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-9-yl)ethenyl)benzo[d]thiazolium hexafluorophosphate (8). Yield 78%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.70 (s, 1H), 3.41 (m, 4H), 2.74 (m, 4H), 1.91 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.9, 151.4, 148.6, 140.4, 131.0, 128.8, 127.0, 126.1, 123.8, 121.5, 120.8, 115.0, 102.8, 77.8, 76.2, 49.8, 37.0, 26.8, 20.4; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₂₄H₂₃N₂S⁺: 371.1576 [*M*]⁺ found: 371.1579.

(E)-2-(2-(4-(Benzoyloxy)phenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (9). Yield 67%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.23–8.17 (m, 5H), 7.96 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.86 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.66 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.82 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.7, 164.2, 153.8, 149.0, 140.6, 134.3, 131.8, 131.4, 129.9, 129.8, 129.0, 128.8, 128.6, 128.1, 124.7, 123.0, 116.8, 113.5, 78.9, 75.6, 38.7; HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₂₅H₁₈NO₂S⁺: 396.1058 [*M*]⁺ found: 396.1054.

(E)-2-(2-(4-(Methoxyphenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium hexafluorophosphate (10). Yield 60%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.34–8.26 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.91 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H),

5.91 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.78 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.8, 163.4, 150.4, 140.5, 132.5, 129.6, 128.4, 127.6, 126.8, 124.5, 116.4, 115.0, 110.4, 78.6, 75.7, 55.8, 38.4; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NOS}^+$: 306.0947 $[M]^+$ found: 306.0962.

(E)-2-(2-(2,4-Dimethoxyphenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (11). Yield 84%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.40 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.32–8.25 (m, 2H), 8.12 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.89 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.86 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.79 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 173.0, 165.7, 161.4, 144.8, 140.6, 132.4, 129.5, 128.2, 127.3, 124.4, 116.3, 115.5, 109.9, 107.8, 98.4, 78.6, 75.6, 56.4, 56.0, 38.2; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{S}^+$: 336.1053 $[M]^+$ found: 336.1058.

(E)-2-(2-(4-Nitrophenyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (12). Yield 70%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.56 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.48–8.38 (m, 5H), 8.35 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.99 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.89 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 3.84 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.1, 148.9, 146.6, 140.6, 139.8, 130.7, 130.6, 130.1, 129.1, 128.6, 124.9, 124.2, 117.2, 117.0, 79.1, 75.5; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$: 321.0692 $[M]^+$ found: 321.0685.

(E)-2-(2-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (13). Yield 60%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.65 (s, 1H), 8.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.12 (m, 2H), 7.88 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.77 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 9.1, 1.8 Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 3.81 (s, 1H), 3.56 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.18 (t, J = 7.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.3, 159.4, 157.4, 153.6, 148.8, 146.0, 140.6, 132.1, 129.5, 128.2, 127.4, 124.5, 116.1, 111.9, 111.1, 110.3, 109.1, 96.6, 78.7, 75.3, 44.7, 38.7, 12.4; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$: 415.1475 $[M]^+$ found: 415.1468.

(E)-3-(2-Propynyl)-2-(2-(1-pyrenyl)ethenyl)benzo[d]thiazolium bromide (14). Yield 38%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.31 (d, J = 15.1 Hz, 1H), 9.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.55–8.31 (m, 9H), 8.20 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.97 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.88 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.08 (s, 2H), 3.83 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.2, 145.9, 140.6, 134.1, 130.8, 130.6, 130.2, 130.1, 129.8, 129.7, 128.7, 128.2, 127.4, 127.2, 127.2, 127.0, 126.9, 125.8, 125.5, 124.6, 124.0, 123.5, 122.7, 116.7, 114.6, 78.9, 75.8, 38.7; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{NS}^+$: 400.1154 $[M]^+$ found: 400.1149.

(E)-2-(2-(1-Naphthyl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (15). Yield 49%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.06 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 8.58–8.53 (m, 2H), 8.48 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.98 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.88 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.80–7.75 (m, 2H), 7.69 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 3.84 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.4, 146.1, 140.6, 133.4, 133.2, 131.0, 130.6, 129.9, 129.0, 128.8, 128.3, 127.8, 127.6, 126.8, 125.8, 124.7, 123.5, 116.8, 115.4, 78.9, 75.6, 38.8; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{NS}^+$: 326.0998 $[M]^+$ found: 326.1001.

(E)-2-(2-(5-Phenylthiophen-2-yl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (16). Yield 73%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.58 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 7.92 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.83 (m, 5H), 7.54 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.50–7.45 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 3.82 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 171.8, 151.9, 142.4, 140.5, 138.4, 137.8, 132.5, 129.6, 129.6, 129.5, 128.5, 127.7, 126.2, 126.0, 124.6, 116.4, 110.8, 78.8, 75.7, 38.4; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{NS}_2^+$: 358.0719 $[M]^+$ found: 358.0717.

(E)-2-(2-(9-Methyl-9H-carbazol-3-yl)ethenyl)-3-(2-propynyl)benzo[d]thiazolium bromide (17). Yield 97%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.91 (s, 1H), 8.49 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.29–8.23 (m, 3H), 8.10 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.87 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.76 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.77 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.5, 152.4, 143.5, 141.4, 140.5, 129.4, 128.2, 128.2, 127.4, 126.9, 125.1, 124.4, 124.2, 122.8, 122.0, 120.4, 116.2, 110.3, 110.2, 109.3, 78.6, 75.8, 38.3, 29.4; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{S}^+$: 379.1263 $[M]^+$ found: 379.1258.

(E)-4-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)ethenyl)-1-(2-propynyl)quinolinium bromide (18). Yield 74%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.19 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 9.07 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.41–8.38 (m, 2H), 8.29–8.22 (m, 2H), 8.03 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 5.82 (s, 2H), 3.89 (s, 1H), 3.09 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 154.4, 152.6, 146.1, 145.5, 137.5, 134.9, 131.8, 128.6, 126.7, 126.0, 123.0, 118.8, 114.0, 113.0, 111.9, 80.1, 76.3, 45.6, 39.7; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2^+$: 313.1699 $[M]^+$ found: 313.1696.

(E)-4-(2-(4-(Diethylamino)-2-(propynyloxy)phenyl)ethenyl)-1-methylquinolinium bromide (19). Yield 81%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.00 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.24–8.15 (m, 3H), 8.06 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.97 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.42 (s, 3H), 3.78 (s, 1H), 3.50 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.19 (t, J = 7.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 159.0, 153.3, 151.6, 146.5, 139.5, 138.8, 134.4, 132.4, 128.4, 125.8, 125.6, 119.0, 113.2, 112.8, 112.2, 105.6, 95.4, 79.2, 78.8, 56.0, 44.2, 43.8, 12.6; HRMS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}^+$: 371.2118 $[M]^+$ found: 371.2117.

Synthesis of styryl-dye-labeled acpCPNA probes

The (3R,4S)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC)-modified acpCPNAs were synthesized manually on Tentagel S-RAM resin from the respective Fmoc-protected monomers (A^{Bz} , C^{Bz} , T, and G) and spacer (APC^{Tfa} and ACPC) at 1.5 μmol scales as described earlier.³⁹ After completion of the synthesis, the N-terminal Fmoc group was removed and capped by acetylation. The resin was split into 0.5 μmol portions and the side-chain protecting groups of nucleobases A and C (Bz) and the APC spacer (Tfa) were removed by treatment with 1:1 ammonia-dioxane at 65 °C overnight. The deprotected APC-

modified acpcPNA was reacted with 4-azidobutanol (30 equiv.) in the presence of NaBH_3CN (60 equiv.) and HOAc (60 equiv.) in MeOH (100 μL) at room temperature overnight.³⁹ The azide-modified acpcPNA on the solid support was split into 0.5 μmol portions for labeling experiments. This azide-modified acpcPNA was reacted with alkynyl-modified styryl dye (15 equiv.) in the presence of tetrakis(acetonitrile) copper(i) hexafluorophosphate (30 equiv.) in DMSO/ $t\text{BuOH}$ (3:1) at room temperature overnight. After the reaction was completed as monitored by MALDI-TOF mass spectrometry, the PNA was cleaved from the solid support by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) (500 μL , 30 min, 3 times). The cleavage solution was combined and dried under a stream of nitrogen and the crude styryl-dye-labeled acpcPNA was precipitated by the addition of diethyl ether and purified by reverse-phase HPLC. The HPLC experiments were performed using a Water Delta 600™ system equipped with a gradient pump by using 0.1% TFA in H_2O :acetonitrile (9:1 to 1:9) as a mobile phase. The purified styryl-dye-labeled acpcPNA were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry using a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) as a matrix.

MD simulation

To investigate the positioning of the styryl dye in the styryl-dye-labeled acpcPNA-DNA duplex, molecular dynamics (MD) simulations of **M10-5a** binding to the base-inserted and complementary DNA targets were carried out in an aqueous solution with the OL15 force field.⁷⁰ The starting structures of the simulated systems, atomic point charges and missing force field parameters of styryl dye and acpcPNA units, and the setup of the simulations were constructed in a similar manner to that of previous work.^{38,60,71} MD simulations were performed using the Sander module in the AMBER 2017 suite program.⁷² The production runs were carried out for 20 ns and the coordinates were stored every 1 ps, totally 20 000 simulated structures.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Thailand Research Fund (DPG5780002 and RGU6180001 to T. V.), Chulalongkorn University (The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Scholarship, to B. D.), the Science Achievement Scholarship of Thailand (to B. D.) and the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) (Research Chair Grant #P1850116). The National e-Science Infrastructure Consortium (URL: <http://www.e-science.in.th>) is also acknowledged for providing computing resources.

References

- 1 N. Mahdiah and B. Rabbani, *Iran. J. Pediatr.*, 2013, **23**, 375.
- 2 B. Juskowiak, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 3157.
- 3 J. Zheng, R. Yang, M. Shi, C. Wu, X. Fang, Y. Li, J. Lia and W. Tan, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3036.
- 4 G. T. Hwang, *Molecules*, 2018, **23**, 124.
- 5 M. E. Østergaard and P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5771.
- 6 P. Klimkowski, S. De Ornellas, D. Singleton, A. H. El-Sagheer and T. Brown, *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**, 5943.
- 7 F. Hövelmann and O. Seitz, *Acc. Chem. Res.*, 2016, **49**, 714.
- 8 A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5815.
- 9 R. Lartia and U. Asseline, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 2270.
- 10 T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova and J. J. Vaquero, *Color. Technol.*, 2010, **126**, 55.
- 11 M. Panigrahi, S. Dash, S. Patel and B. Mishra, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 781.
- 12 T. Dentani, K.-I. Nagasaka, K. Funabiki, J.-Y. Jin, T. Yoshida, H. Minoura and M. Matsui, *Dyes Pigm.*, 2008, **77**, 59.
- 13 J. Li, W. Wei, X. Qi, G. Zuo, J. Fang and W. Dong, *Sens. Actuators, B*, 2016, **228**, 330.
- 14 Y. Shiraishi, M. Nakamura and T. Hirai, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **17**, 25027.
- 15 Q. Liu, C. Liu, L. Chang, S. He, Y. Lu and X. Zeng, *RSC Adv.*, 2004, **4**, 14361.
- 16 R. Krieg, A. Eitner, W. Günther and K.-J. Halbhüser, *Biotech. Histochem.*, 2007, **82**, 235.
- 17 R. Krieg, A. Eitner, W. Günther, C. Schurer, J. Lindenau and K.-J. Halbhüser, *J. Mol. Histol.*, 2008, **39**, 169.
- 18 X.-D. Liu, R. Sun, Y. Xu, Y.-J. Xu, J.-F. Ge and J.-M. Lu, *Sens. Actuators, B*, 2013, **178**, 525.
- 19 W.-H. Zhan, H. N. Barnhill, K. Sivakumar, H. Tian and Q. Wang, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 1691.
- 20 A. Herner, I. Nikic, M. Kállay, E. Lemke and P. Kele, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 3297.
- 21 N. Narayanaswamy, M. Kumar, S. Das, R. Sharma, P. K. Samanta, S. K. Pati, S. K. Dhar, T. K. Kundu and T. Govindaraju, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 6476.
- 22 G. Hao, J. Sun and C. Wei, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26**, 285.
- 23 Á. S. Eördögh, K. Peewasan, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht and P. Kele, *Bioconjugate Chem.*, 2016, **27**, 457.
- 24 V. B. Kovalska, D. V. Kryvorotenko, A. O. Balanda, M. Y. Losytskyy, V. P. Tokar and S. M. Yarmoluk, *Dyes Pigm.*, 2005, **67**, 47.
- 25 C.-Q. Zhu, S.-J. Zhuo, H. Zheng, J.-L. Chen, D.-H. Li, S.-H. Lia and J.-G. Xu, *Analyst*, 2004, **129**, 254.
- 26 M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Böhländer and H.-A. Wagenknecht, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 1299.
- 27 P. R. Böhländer and H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, 7547.

- 28 H. K. Walter, P. R. Bohländer and H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen*, 2015, **4**, 92.
- 29 A. K. Chen, M. A. Behlke and A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, e105.
- 30 B. C. Satterfield, M. Bartosiewicz, J. A. A. West and M. R. Caplan, *J. Mol. Diagn.*, 2010, **12**, 359.
- 31 P. E. Nielsen, *Chem. Biodiversity*, 2010, **7**, 786.
- 32 R. Gambari, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2014, **24**, 267.
- 33 T. Vilaivan, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2018, **14**, 253.
- 34 T. Vilaivan, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 1645.
- 35 D. Nim-anussornkul and T. Vilaivan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, **25**, 6388.
- 36 C. Boonlua, C. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht and T. Vilaivan, *Chem. – Asian J.*, 2011, **6**, 3251.
- 37 C. Boonlua, B. Ditmangklo, N. Reenabthue, C. Suparpprom, N. Poomsuk, K. Siri Wong and T. Vilaivan, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 8817.
- 38 A. Dangsopon, N. Poomsuk, K. Siri Wong, T. Vilaivan and C. Suparpprom, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 74314.
- 39 B. Ditmangklo, C. Boonlua, C. Suparpprom and T. Vilaivan, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 614.
- 40 N. Yotapan, C. Charoenpakdee, P. Wathanathavorn, B. Ditmangklo, H.-A. Wagenknecht and T. Vilaivan, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 2166.
- 41 P. R. Bohländer, T. Vilaivan and H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 9223.
- 42 I. V. Valyukh, V. V. Vyshnyak, A. V. Slobodyanyuk and S. M. Yarmoluk, *Funct. Mater.*, 2003, **10**, 528.
- 43 P. Sarkar, R. Luchowski, S. Raut, N. Sabnis, A. Remaley, A. G. Lacko, S. Thamake, Z. Gryczynski and I. Gryczynski, *Biophys. Chem.*, 2010, **153**, 61.
- 44 H. Doan, M. Castillo, M. Bejjani, Z. Nurekeyev, S. V. Dzyuba, I. Gryczynski, Z. Gryczynski and S. Raut, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 29934.
- 45 D. V. Berdnikova, O. A. Fedorova, E. V. Tulyakova, H. Li, S. Kölsch and H. Ihmels, *Photochem. Photobiol.*, 2015, **91**, 723.
- 46 S. Nigam and S. Rutan, *Appl. Spectrosc.*, 2001, **55**, 362A.
- 47 B. Strehmel and W. Rettig, *J. Biomed. Opt.*, 1996, **1**, 98.
- 48 B. Strehmel, H. Seifert and W. Rettig, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 2232.
- 49 V. I. Stsiapura, S. A. Kurhuzenkau, V. A. Kuzmitsky, O. V. Bouganov and S. A. Tikhomirov, *J. Phys. Chem. A*, 2016, **120**, 5481.
- 50 M. D. Green and G. Patonay, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 1992, **18**, 181.
- 51 P. R. Bohländer and H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 7458.
- 52 N. Akbay, M. Yu, M. Y. Losytskyy, V. B. Kovalska, A. O. Balanda and S. M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.*, 2008, **18**, 139.
- 53 I. Moreno-Villoslada, C. Torres, F. González, T. Shibue and H. Nishide, *Macromol. Chem. Phys.*, 2009, **210**, 1167.
- 54 N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman and M. Kubista, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 803.
- 55 T. Inoue, Y. Okauchi, Y. Matsuzaki, K. Kuwajima, H. Kondo, N. Horiuchi, K. Nakao, M. Iwata, Y. Yokogoshi, Y. Shintani, H. Bando and S. Saito, *Eur. J. Endocrinol.*, 1998, **138**, 691.
- 56 P. Wittung, S. K. Kim, O. Buchardt, P. Nielsen and B. Norden, *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 5371.
- 57 J. O. Smith, D. A. Olson and B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2686.
- 58 I. Dilek, M. Madrid, R. Singh, C. P. Urrea and B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3339.
- 59 L. Lercher, M. A. McDonough, A. H. El-Sagheer, A. Thalhammer, S. Kriaucionis, T. Brown and C. J. Schofield, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 1794.
- 60 N. Poomsook, T. Vilaivan and K. Siri Wong, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2018, **84**, 36.
- 61 O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 455.
- 62 C. G. Ricci and P. A. Netz, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, **49**, 1925.
- 63 C. V. Kumar, R. S. Turner and E. H. Asuncion, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1993, **74**, 231.
- 64 D. Sahoo, P. Bhattacharaya and S. Chakravorti, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 2044.
- 65 D. V. Berdnikova, N. I. Sosnin, O. A. Fedorova and H. Ihmels, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 545.
- 66 A. Okamoto, T. Ichiba and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8364.
- 67 S. G. Srivatsan, H. Weizman and Y. Tor, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1334.
- 68 S. G. Srivatsan, N. Greco and Y. Tor, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 6661.
- 69 N. J. Greco and Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10784.
- 70 R. Galindo-Murillo, J. C. Robertson, M. Zgarbovic, J. Sponer, M. Otyepka, P. Jureska and T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.*, 2016, **12**, 4114.
- 71 N. Poomsuk and K. Siri Wong, *Chem. Phys. Lett.*, 2013, **588**, 237.
- 72 AMBER 2017, University of California, San Francisco, 2017.



Digest

Modulation of DNA and RNA by PNA

Penthip Muangkaew, Tirayut Vilaivan

Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Antisense
Antigene
Gene edit
Oligonucleotide therapeutics
Peptide nucleic acid

ABSTRACT

Peptide nucleic acid (PNA), a synthetic DNA mimic that is devoid of the (deoxy)ribose-phosphate backbone yet still perfectly retains the ability to recognize natural nucleic acids in a sequence-specific fashion, can be employed as a tool to modulate gene expressions via several different mechanisms. The unique strength of PNA compared to other oligonucleotide analogs is its ability to bind to nucleic acid targets with secondary structures such as double-stranded and quadruplex DNA as well as RNA. This *digest* aims to introduce general readers to the advancement in the area of modulation of DNA/RNA functions by PNA, its current status and future research opportunities, with emphasis on recent progress in new targeting modes of structured DNA/RNA by PNA and PNA-mediated gene editing.

Introduction

The ability to control the genetic expressions of any living organisms has broad implications in various areas, especially in therapeutics and biotechnology. The universality of genetic codes allows modulation and manipulation of gene expressions by the targeting of DNA or RNA in a sequence-specific fashion. This can be achieved by direct binding to the nucleic acid targets or by promoting/inhibiting the functions of other control elements that interact with the nucleic acid targets at any stage of the transcription/translation processes or even at the epigenetic level. The key advantage of targeting nucleic acids over proteins lies in its simplicity since the interactions between nucleic acids can be predicted by a few simple base-pairing rules that are highly specific and predictable. In principle, as long as the desired target DNA/RNA sequence is unique in the genome of interest, one can straightforwardly design a nucleic acid or analog that can specifically bind to that target region without interfering with other parts and other non-nucleic acid targets. The agent that specifically binds to the DNA/RNA target is a critical component to the success of such process. In this respect, it should be noted that natural DNA or RNA are not suitable for this purpose, and generally require chemical modification to improve biological stabilities and other properties such as binding strengths.

The term PNA, originally standing for “polyamide nucleic acid” rather than “peptide nucleic acid” as commonly used nowadays, was first introduced in 1991 to describe an oligomer of N-2-aminoethylglycine with the nucleobase attached via a methylene carbonyl linker.^{1,2} This aminoethylglycine PNA system became known as aegPNA to distinguish it from other PNA subsequently developed, although it is often being referred to as “PNA”. Among several modified

oligonucleotides and analogs, PNA is unique in the sense that the entire sugar-phosphate backbone is completely replaced by a peptide-like backbone. Quite surprisingly, not only PNA can retain the ability to recognize DNA/RNA following the highly specific Watson-Crick base pairing rules, it does so with a much higher affinity and even better specificity than natural DNA/RNA and most other oligonucleotide analogs. Besides, PNA can sequence-specifically interact with structured DNA/RNA targets in various ways. This point is especially important for targeting cellular nucleic acids, which are often present in structured forms under physiological conditions which make them not freely accessible. These features of PNA together with its excellent stability towards nucleases and proteases make it a potential candidate for controlling gene expressions via the antisense/antigene approaches, and more recently, gene editing. This *digest* summarizes the important landmark events (Scheme 1) starting from explaining different modes in which PNA can bind to structured DNA targets, then discussing the principle and current achievement in using PNA to control gene expression and to induce gene editing, and ending with cellular delivery of PNA, followed by conclusion and outlooks.

Targeting DNA duplexes with PNA

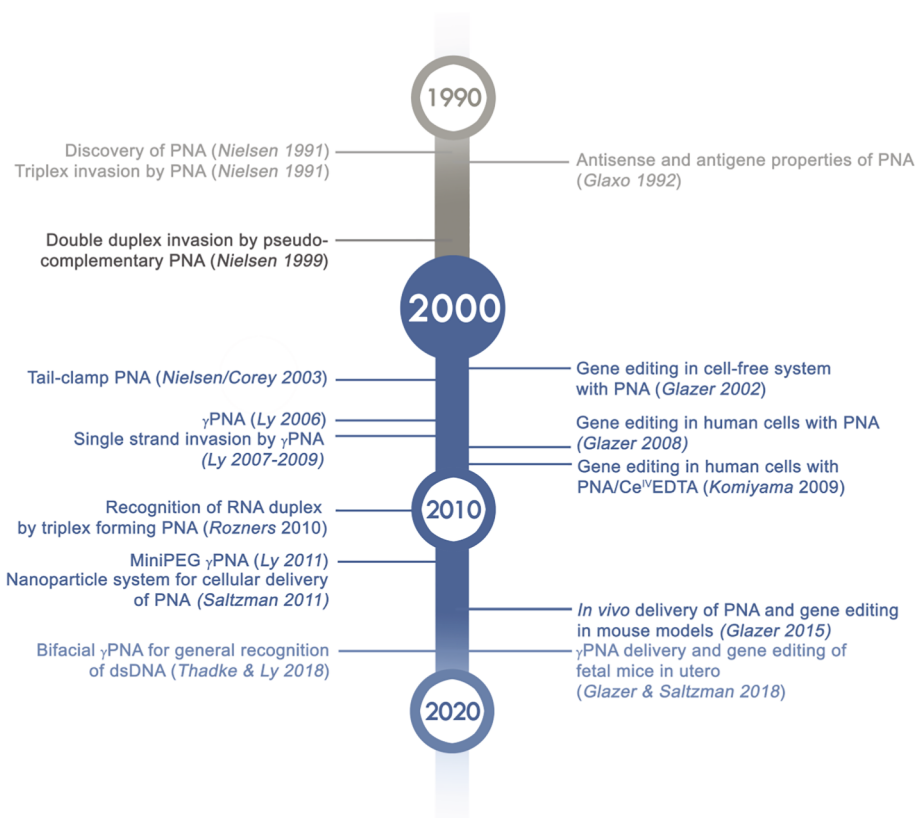
PNA can bind to double-stranded DNA (dsDNA) via base pairing in several different modes (Scheme 2). DNA triplex invasion is perhaps the most reliable and the most widely utilized strategy for the targeting of dsDNA by PNA. This binding requires a long stretch of purine bases on one of the DNA strands, which forms Watson-Crick base pairs with one PNA strand and Hoogsteen base pairs with another PNA strand. Targeting guanine requires protonation of the cytosine base on the

E-mail address: vtirayut@chula.ac.th (T. Vilaivan).

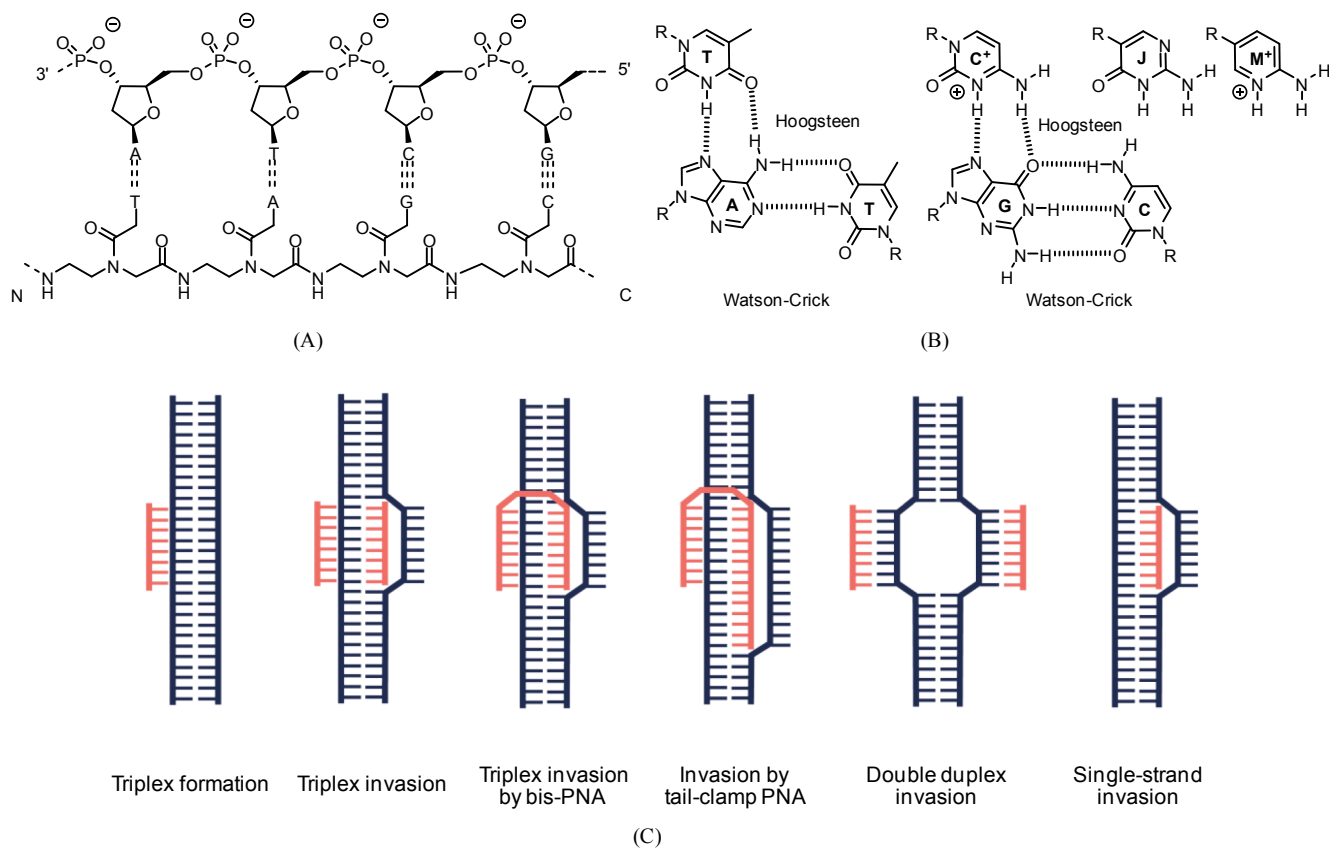
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127064>

Received 14 December 2019; Received in revised form 22 February 2020; Accepted 24 February 2020

0960-894X/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Scheme 1. Timeline of important events in the area of PNA research (left: fundamental technology, right: application).



Scheme 2. (A) The structure of a duplex formed between PNA and DNA (B) Base pairing schemes involved in the triplex formation/invasion and structures of C+ analogs (J and M+) (C) Different modes of targeting DNA duplexes by PNA.

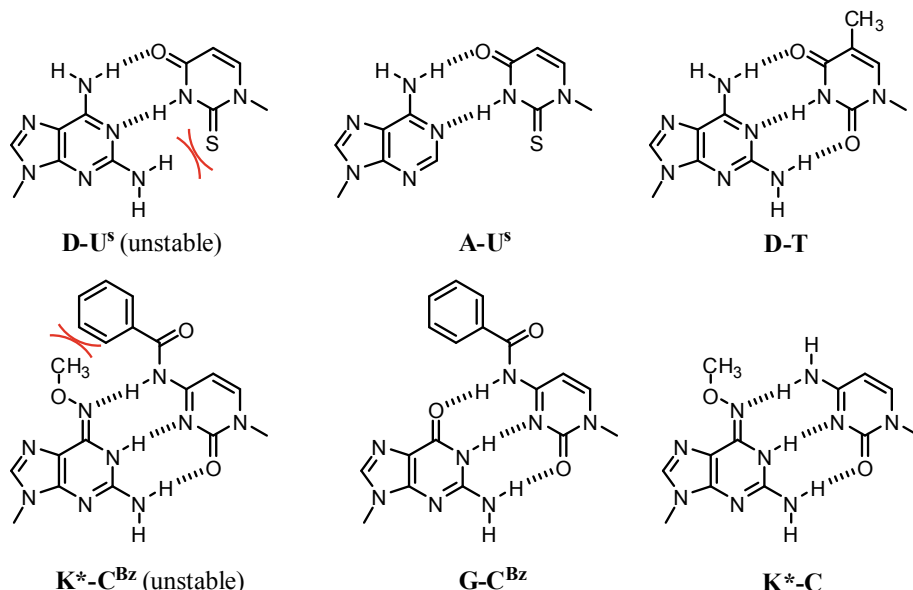
Hoogsteen PNA strand, which can occur only at low pH. Substitution of the cytosine with pseudoisocytosine (J), which remains protonated over a broad pH range, allows the triplex invasion at physiological pH.³ The invasion efficiency can be further increased by incorporating acridine or polylysine,⁴ or by joining the two PNA strands via a flexible linker to form a bis-PNA that takes advantage of the more entropically favorable intramolecular binding.³ Although being more kinetically favored, the PNA-DNA₂ triplex initially formed by the binding of PNA to the major groove of dsDNA eventually converts to the more thermodynamically stable invasion complex.⁵ Although highly sequence-specific in both cases, the recognition of dsDNA by PNA through the triplex formation and the triplex invasion has a sequence limitation in which a long stretch of homopurine/homopyrimidine duplex is required. The conceptually related tail-clamping strategy which involves both triplex and duplex invasion by PNA can reduce this constraint but a short stretch of purine bases is still required.^{6,7}

The double duplex invasion strategy is more relaxed regarding the sequence requirement, but it is necessary to modify the nucleobase so that the PNA-PNA duplex is destabilized while the PNA-DNA duplex stability is improved. While the 2,4-diaminopurine:2-thiouracil (D-U^S) “pseudocomplementary” base pair can reliably replace A-T, the equivalent pseudocomplementary base pairs for G-C remain elusive (Scheme 3). Although some progress has been made in recent years, the presently available pseudocomplementary G-C pairs such as N⁶-methoxy-2,6-diaminopurine:N⁴-benzoylcytosine (K^{*}-C^{Bz}) are still far from ideal since both PNA-PNA and PNA-DNA duplexes with such pseudocomplementary G-C pairs are destabilized, and the K^{*} can pair equally well to both C and T.⁸ This means that targeting dsDNA by pseudocomplementary PNA (pcPNA) pairs is limited to sequences with relatively high A-T content. Additional modification of the PNA strands with multiple positive charges that can further destabilize PNA-PNA duplexes and stabilize the PNA-DNA duplexes by electrostatic interactions allows DNA double-duplex invasion even in GC rich (up to 80%) regions.⁹ Alternatively, the PNA with a bulky pyrrolidine-based backbone that cannot form stable self-pairing hybrids offers a solution for the double duplex invasion of dsDNA in a more general sequence context without the requirement of base modifications.¹⁰ Efficient double duplex invasion by such inherently pseudocomplementary pyrrolidinyl PNA has been demonstrated in the context of short synthetic DNA oligonucleotides, but it remains to be seen how general the process is for longer DNA sequences and under physiologically relevant conditions.^{11,12} It should be noted that the double-duplex invasion of

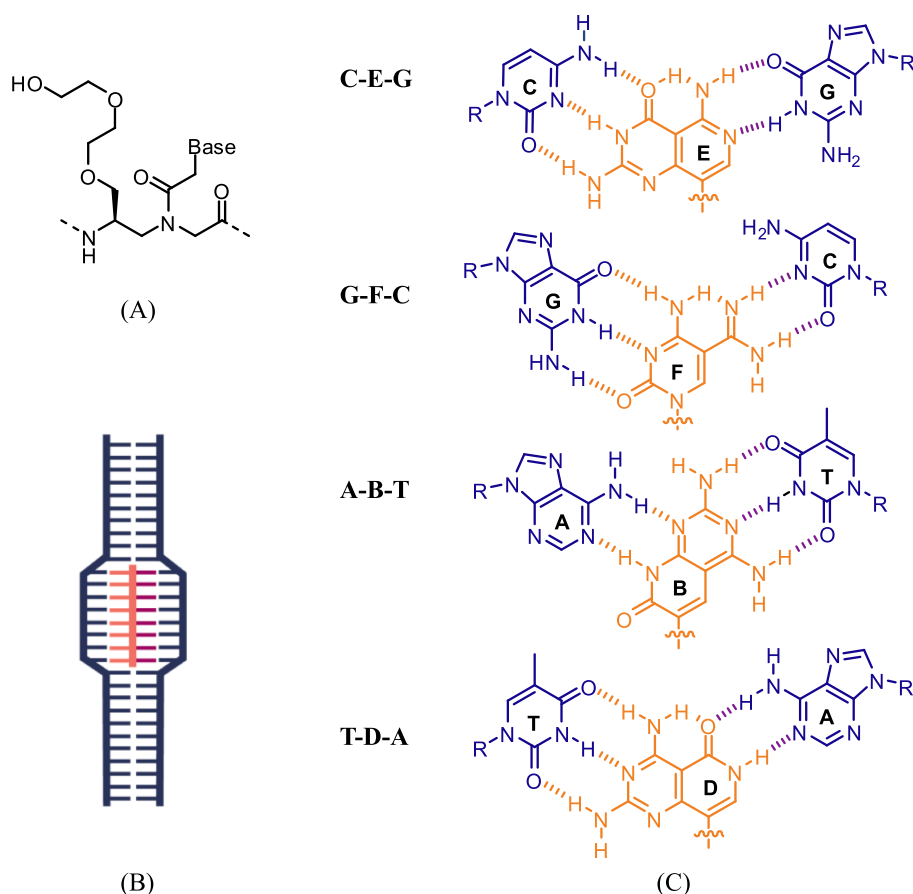
dsDNA by pcPNA is generally ineffective under physiological conditions. However, several strategies are available to address this problem including modification of either or both of the PNA strands with nuclear localization signal peptide (NLS),¹³ ruthenium complex,¹⁴ pyrrole/imidazole polyamide,¹⁵ or photo-crosslinker¹⁶ that can provide additional stabilization of the invasion complex by electrostatic interaction, intercalation, groove binding or covalent bond formation, respectively. Interestingly, under molecular crowding conditions typically found inside the cells, double-duplex invasion of dsDNA by pcPNA became favorable even under high salt conditions.¹⁷

When compared to the triplex invasion or double-duplex invasion, the invasion of DNA duplex by single-stranded PNA (single-strand invasion) is much less efficient.¹⁸ Several approaches have been proposed to improve the efficiency of the duplex invasion by single-stranded PNA. These include the use of additional components that can stabilize the invasion complex such as the use of PNA openers,¹⁹ single-stranded binding proteins,^{20,21} or ribonuclease A.²² Although proof-of-principle experiments have been demonstrated in vitro, the requirement to co-deliver these additional components for in vivo/in cellular applications remains a challenge. The improved DNA affinity of the conformationally preorganized γ PNA²³ makes the single-strand invasion of dsDNA by γ PNA more efficient. Originally, the γ PNA backbone was used in combination with an affinity-enhancing moiety such as acridine²⁴ or G-clamp^{25,26} to enhance the single-strand invasion efficiencies of short (10mer) γ PNA oligomers. It was subsequently found that unmodified γ PNA with sufficient length (15–20mer) can also invade dsDNA over a wide sequence context.²⁷ Very recently, Shigi et al. observed an efficient single-strand invasion of dsDNA by aegPNA carrying partial D/U^S modifications.²⁸ Evidence of single-strand invasion by aegPNA conjugated to a nuclear localizing peptide was also demonstrated by the Ce(IV)-EDTA-promoted DNA hydrolysis of the exposed single-stranded DNA.²⁹ Although the efficiency in terms of yield and speed remains to be improved, the fact that such invasion is feasible for GC rich sequences under physiologically-relevant conditions employing only conventional PNA with minimal modifications is notable.

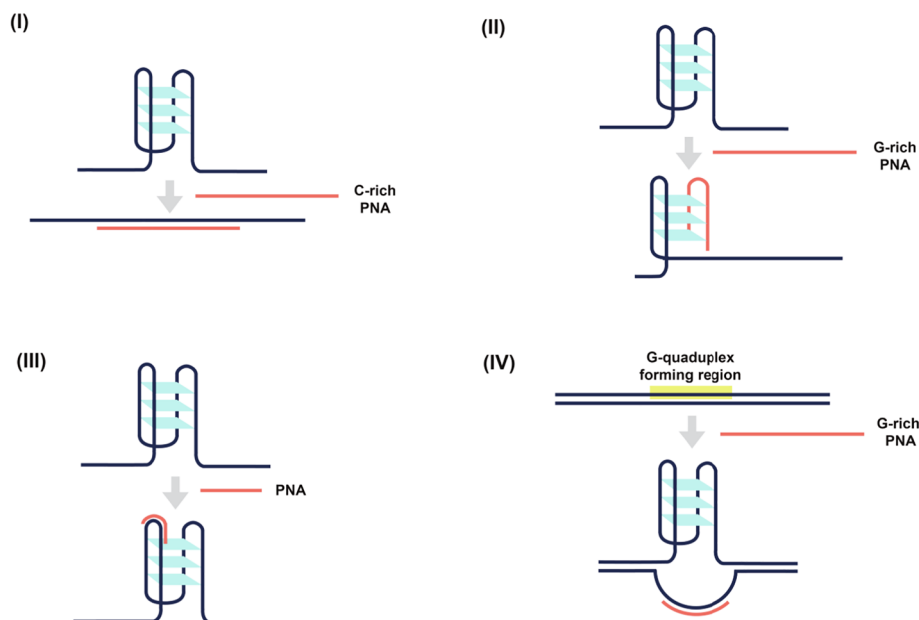
Ly et al. have recently introduced a new mode of dsDNA targeting by designing a set of bifacial nucleobases that can be inserted in between the A-T, C-G, T-A, and G-C pairs and specifically recognize the respective nucleobase on each side (Scheme 4).³⁰ The formation of such base triplets would provide additional binding energy that compensates for the breaking of the original base pairs. The concept of such Janus bases has previously been explored in the PNA context,^{31,32} but this is



Scheme 3. Examples of pseudocomplementary base pairs.



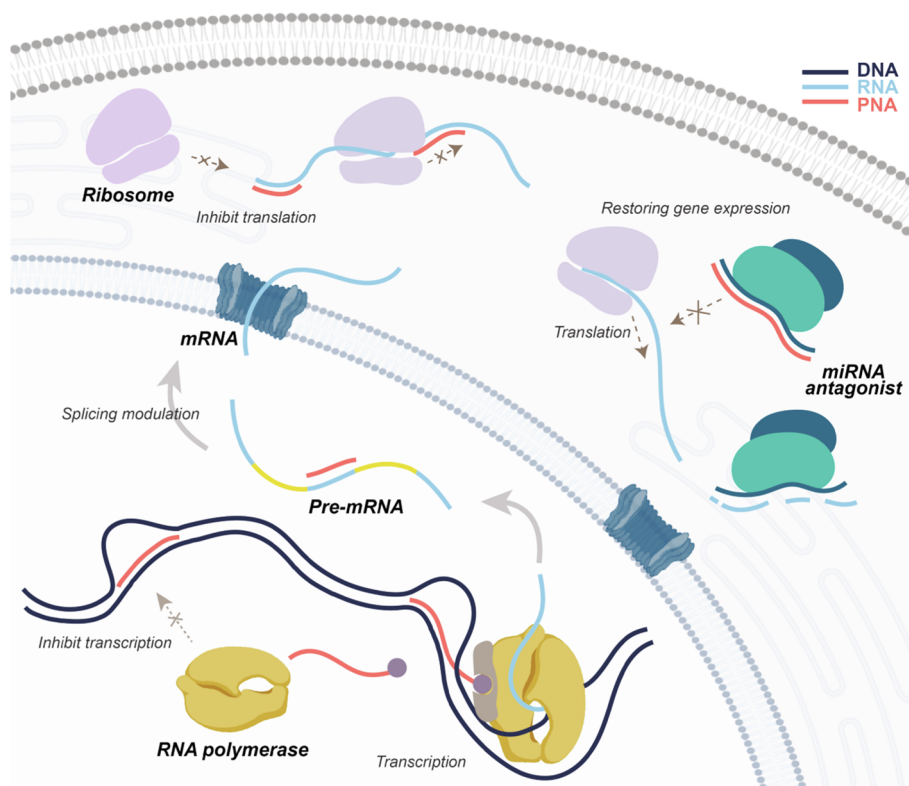
Scheme 4. (A) Structure of (R)-miniPEG γ PNA (B) Recognition of duplex DNA by bifacial PNA (C) The design of Janus base capable of recognition of all canonical DNA base pairs.



Scheme 5. Targeting of quadruplex DNA by PNA: (I) Invasion leading to quadruplex disruption (II) Invasion to form mix PNA-DNA quadruplexes (III) Loop binding, and (IV) Binding to the opposite C-rich strand.

the first complete isosteric base set that can be combined for specific recognition of any canonical Watson-Crick base pairs with the ability to distinguish between A-T/T-A and C-G/G-C pairs. Molecular dynamics simulations confirmed that the use of γ PNA backbone was essential in

providing a steric clash that suppressed the self-pairing of the Janus bases – a common problem in other systems. Such Janus base miniPEG γ PNA as short as 6 bases can efficiently invade dsDNA under physiological conditions with much faster kinetics (time scale in the order of



Scheme 6. Controlling gene expression with PNA via antisense and antigene approaches.

10 mins) than conventional DNA duplex invasion (time scale in the order of several hours to days). Complementarities between the central Janus base on the PNA strand and the nucleobases on both DNA strands are essential for the effective invasion. This can be regarded as a universal approach to recognize dsDNA that can overcome most of the limitations associated with other modes of DNA duplex invasion currently available. It remains to be seen how this system performs in biological contexts.

Targeting DNA G-quadruplexes with PNA

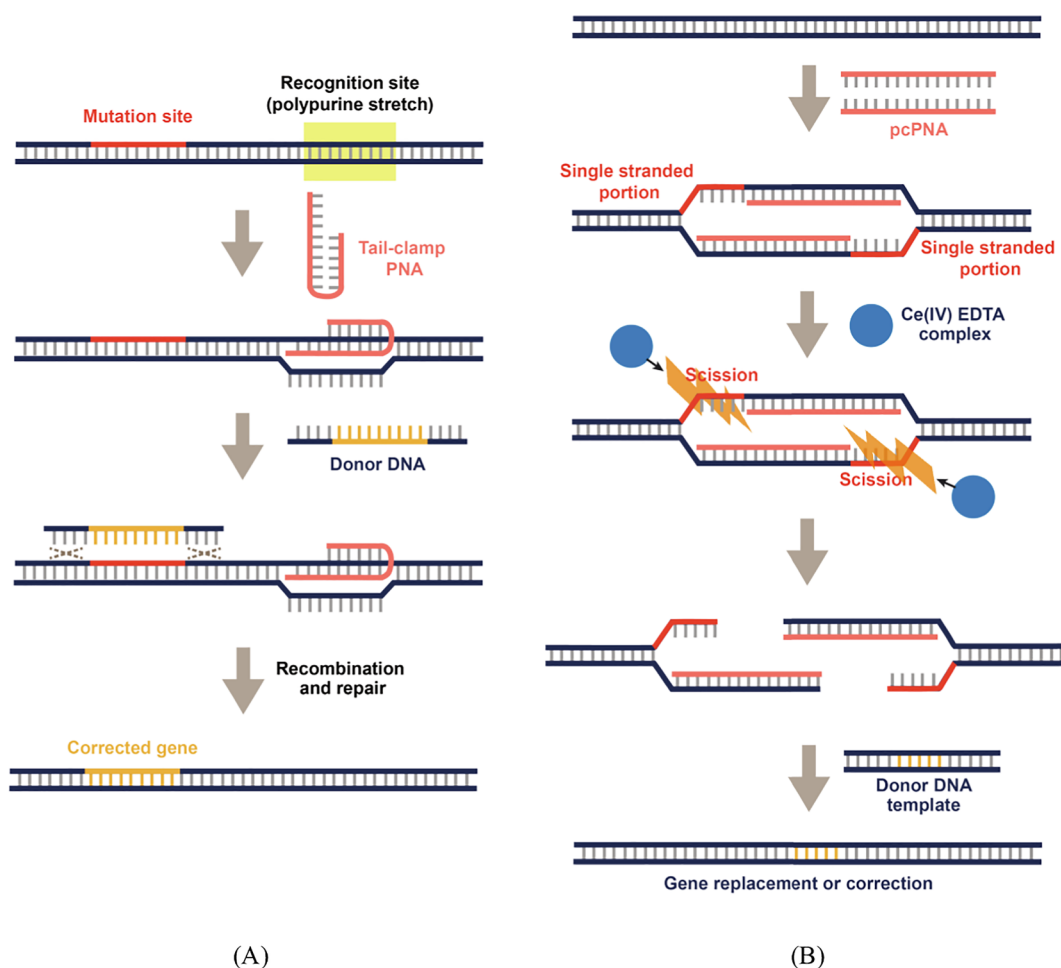
Guanine-rich DNA sequences that contain a series of three to four G-base runs separated by a short nucleobase spacer can potentially exist in G-quadruplex structures. The ubiquitous presence of these sequences in non-coding but functional regions such as promoters and telomeres in the human genome suggests their regulatory roles, and therefore targeting these sequences should have important implications in the gene regulation.³³ While several G-quadruplex small molecule ligands are available, they generally do not offer sufficient specificity to distinguish between closely related quadruplex-forming sequences. PNA offers a unique advantage in this respect as a potential candidate for sequence-specific targeting DNA G-quadruplexes.³⁴ There are at least three possible modes in which PNA can interact with G-quadruplexes: invasion by C-rich PNA leading to the disruption of the quadruplex, invasion leading to the formation of mix PNA-DNA quadruplexes, and loop binding (Scheme 5). Instead of direct binding to the G-quadruplex, the G-rich PNA can bind to the opposite C-rich DNA strand in the DNA duplex thereby promoting the formation of G-quadruplex.

The DNA G-quadruplex invasion first observed by Datta and Armitage in 2001 follows the first scenario, whereby a C-rich PNA bound to a single-stranded DNA G-quadruplex causing its disruption to form a PNA-DNA duplex under low ionic strength conditions.³⁵ PNA sequences carrying at least two G_n tracts can invade DNA G-quadruplexes by the formation of mix PNA-DNA quadruplexes, which has

been repeatedly observed in single-stranded G-quadruplexes.^{36,37} Modification of the nucleobase³⁸ or PNA backbone^{39,40} can facilitate the targeting of DNA G-quadruplexes by modulating the propensity of homo- vs hetero-quadruplex formation. The simultaneous formation of DNA G-quadruplex was shown to facilitate the single-strand invasion of PNA into dsDNA, which is otherwise very difficult.⁴¹ Komiyama and Xu demonstrated invasion of a DNA carrying a quadruplex forming sequence by a short (8mer) G-rich unmodified PNA and its subsequent scission by Ce(IV)-EDTA induced hydrolysis.⁴² In this case, both the quadruplex invasion and binding to the C-rich region in the opposite DNA strand were essential for the invasion process, and the specificity was sufficient to target and cleave only one site in the entire human genome.

Targeting structured RNA with PNA

PNA can bind to double-stranded RNA targets via triple helix formation⁴³ or triplex invasion.^{44,45} PNA-RNA₂ triplexes are more stable than PNA-DNA₂ triplexes and thus a specific recognition of very short dsRNA was achieved with as short as 6 bases PNA sequence. Similar to the case of DNA, the recognition of dsRNA by PNA through the Hoogsteen base pairing also requires protonation of cytosine, hence the triplex is only stable at low pH. Stable triple helix formation under physiological conditions was made possible by the replacement of cytosine with the more easily protonated 2-aminopyridine (M⁺, see the structure in Scheme 2).⁴⁶ Not only this base replacement resulted in superior binding than both cytosine and the permanently protonated pseudoisocytosine, but the cellular uptake was also enhanced presumably due to the cationic nature of the M⁺-modified PNA.⁴⁷ The replacement of cytosine with thio-pseudoisocytosine enabled the selective targeting of duplex RNA without the competing PNA-RNA duplex formation.⁴⁸ With additional base modifications, the RNA duplex recognition by triplex-forming PNA can be expanded beyond the polypurine sequence.⁴⁹ C-rich and G-rich PNA sequences can also bind



Scheme 7. The concepts of gene editing mediated by (A) PNA invasion and (B) PNA-based artificial DNA cutter.

to RNA quadruplexes, resulting in the formation of PNA-RNA duplexes and mixed PNA-RNA quadruplexes, respectively.⁵⁰ Given the potential importance of regulatory roles of structured RNA targets, the ability to target RNA in a sequence-specific and position-dependent fashion by PNA opens up new directions of research that may allow precise control of the translation process.^{51,52}

Controlling gene expressions with PNA

Shortly after the discovery of PNA, its applications in controlling gene expression have been actively explored.⁵³ Although considerable success has been achieved to the point of potential commercial development,⁵⁴ progress in this area is relatively slow compared to conventional antisense oligonucleotides (ASOs) or newer competing technologies such as RNA interference (RNAi), where many have already been approved or are under clinical development.⁵⁵ The topic is only discussed briefly to show the principle (Scheme 6), with some recent advancement highlighted and the readers should consult other more specific reviews for more detailed examples.^{56,57,58}

Unlike several other ASOs that can recruit RNase-H to degrade the target mRNA strand or siRNA that can catalytically degrade the bound RNA target via the RNA-induced silencing complex (RISC), antisense PNA can only inhibit the translation process through the steric blockage. As a result, a stoichiometric amount of the PNA is required and the effectiveness is dependent on the stability of the PNA-RNA hybrid. However, the PNA structure can be modified by incorporating phosphate or other types of oligonucleotides to enable the RNase-H-mediated cleavage pathway.^{59,60} In addition to direct binding with

mRNA, PNA can be used to control the gene expression by modulating the splicing of pre-mRNA, or by targeting other regulatory elements such as microRNA (miRNA). As an example, an antisense PNA designed to mediate exon skipping of a pre-mRNA encoding the dystrophin protein could restore the protein expression (up to 40%) in dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) treatment.⁶¹ Targeting miRNA by PNA has potential applications in the area of cancer therapy.⁶² In one example, the new generation miniPEG γ PNA was found to be a more potent inhibitor of miRNA-210 than regular PNA, and targeting miRNA-210 could significantly reduce the growth of human tumors in mouse models.⁶³ In another example, the combined treatment of two PNA sequences designed to target miRNAs involved in the caspase-3 mRNA regulation was effective in inducing apoptosis of the temozolomide-resistant T98G glioma cell line.⁶⁴

Despite being potentially more powerful, the targeting of DNA – which is structured, well-packed within the chromosome that is located inside the nucleus – by antigene PNA is more difficult compared to the antisense approach. While transcription arrest by PNA was demonstrated in vitro long time ago,⁶⁵ the antigene effect of PNA inside living cells was not reported until 2000 – whereby PNAs conjugated to NLS protein were shown to inhibit *c-myc* expression.⁶⁶ The invasion of DNA may not be mandatory since short mix-base PNA sequences that do not normally invade dsDNA under physiological conditions could still exert the antigene effects, presumably by intercepting the open complex formed during the initiation of the transcription process.⁶⁷ Experiments involving suppression of tumor growth by an anti-*c-myc* PNA in animal models have also been achieved.⁶⁸ The targeting of DNA by PNA can also be used to activate gene expression (the “progene” approach). For

example, a γ -globin gene targeting PNA sequence conjugated to two short peptides acting as a cellular delivery domain and an artificial activator domain was shown to increase the level of mRNA and protein expression in mouse models and human primary peripheral blood cells.⁶⁹

In addition to the classical antisense/antigene concepts, the recent demonstration that PNA conjugated with epigenetic factors can regulate histone methylation suggests the possibilities of using PNA to control gene expression at the epigenetics level.⁷⁰

PNA-mediated gene editing

Disturbance of the DNA structure by introducing strand breakage or other types of lesions is a strategy that can be used to provoke genome editing through the natural DNA-repair machinery. Triplex-forming oligonucleotides were shown to induce targeted-mutagenesis and recombination of DNA in mammalian cells more than 20 years ago by Glazer et al.^{71,72} In 2002, site-specific gene editing in cell-free extracts was achieved when a triplex-forming PNA was co-administered with a single-stranded donor DNA either covalently linked to the PNA or as a separate entity (Scheme 7A).⁷³ Correction of a splice-site mutation in the β -globin gene in human cells by triplex-forming PNA/donor DNA was subsequently realized in 2008.⁷⁴ The mechanism of the gene edit was thought to involve the nucleotide excision repair (NER) pathway that was known to be responsible for repairing DNA helix-distorting lesions as shown by the modulation of the gene editing efficiency by an NER factor called XPA (xeroderma pigmentosum complementary group A protein).^{72,73} While the efficiency was rather low (up to 0.4%), these pioneer studies paved the way towards the exciting new area of using PNA as a potential tool for precise genome editing. Considerable progress has been made during the past decade and the topic has been the subject of several recent reviews.^{75,76,77,78} Detailed protocols for targeted genome modification via triple helix formation were also published.^{79,80} Only highlights of new developments during the past few years are included here (Table 1 and additional discussion below) to demonstrate the present status of the technology.

The applications of triplex-forming bis-PNA or tail-clamp PNA as shown in Table 1 were limited by the requirement of short (8–10 bp) purine stretches located close (up to several hundred bps) to the targeted modification site. The use of pcPNAs allows for a more relaxed sequence requirement but this strategy still requires the presence of some A + T bases (at least 40%) for efficient duplex invasion. Up to 0.012% gene correction frequency was obtained and this could be improved to 0.78% when the pcPNA/donor DNA was administered with S-phase cell synchronization and histone deacetylase (HDAC) inhibitor.⁸⁷ The use of the high-affinity miniPEG γ PNA allows sequence-unrestricted targeting and gene editing by single-stranded PNA without the requirement of base modification. Up to 0.8% gene editing frequency was observed *ex vivo*, although it should be noted that the formulation of the delivery nanoparticles played critical roles here. In *in vivo* experiments showed the gene editing frequency at 0.1% for the correction of the IVS2-654 (C → T) mutation in mouse bone marrow with less than 10^{-4} fold off-target frequency.⁸⁸

Even though short mix-sequence unmodified aegPNA strands are unlikely to invade dsDNA under physiological conditions, Bertoni et al. showed that the administration of short PNA oligonucleotides into mice muscle cells could repair the single point mutation in the DMD gene at frequencies of ~3–7% which were much higher than that achieved by conventional oligonucleotides.⁸⁹ The gene repair boosted the expression level of full-length dystrophin to 1–2% of the wild-type cells *in vitro*.⁹⁰ Transplantation of the gene-edited stem cells to mice models showed a stable production of dystrophin-positive muscle fibers. In this case, the gene editing mechanism is likely to be different from the approach developed by Glazer et al. above since no donor DNA was required and the gene correction occurred in the PNA-binding region. It appears that the information used for the gene correction derived from

the PNA sequence itself, although how this could be transferred to the DNA is still not fully understood.

The combination of pcPNA and Ce^{IV} -EDTA complex as an artificial DNA cutter (ARCUT) was found to induce double-strand breaks at a specific location in a dsDNA strand by Kmoiyama et al.^{91,92} This technology can be used for gene editing purposes like other targetable endonucleases such as zinc-finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and CRISPR-Cas9. In the presence of donor dsDNA, the targeted gene repairs by homologous recombination have been achieved with high efficiency (> 50%) and with sufficiently high specificity to target a single site in the human genome in cultured cells (Scheme 7B).^{93,94}

Cellular delivery of PNA

Despite the favorable binding properties of PNA, the poor cellular uptake and rapid clearance *in vivo* impair its potential use in therapeutics. The introduction of PNA into the cells is, therefore, another critical factor that determines the eventual successful use of PNA to modulate the biological functions of cellular nucleic acids. The carrier must not only carry the PNA into the cells/nuclei but should also efficiently release it. In some delivery methods, the PNA was permanently trapped inside endosomes and therefore could not exert the desired biological effects despite apparent good uptake.⁹⁵ Unfortunately, while several delivery methods are available, only a few studies systematically compare different methods side-by-side. Early delivery technologies involve mechanical delivery, conjugating the PNA to a peptide-based delivery module (such as polylysine, cell-penetrating peptides, NLSs or ligands for specific receptors),^{96,97,98,99} or by modification of the PNA backbone to include positive charges.^{100,101,102} However, these delivery techniques are not easy to implement for *in vivo* applications and/or in large scales like clinical studies. Non-covalent approaches for PNA delivery such as direct transfection (only applicable to negatively-charged PNA),¹⁰³ co-transfection with DNA,¹⁰⁴ a synthetic transporter,¹⁰⁵ or nanoparticles-based delivery technology offer a solution to these problems.¹⁰⁶ The particles may be formed by a variety of materials including peptides,¹⁰⁷ biodegradable polymers,¹⁰⁸ lipids,¹⁰⁹ carbonaceous,¹¹⁰ and other inorganic materials.^{111,112,113} Recently, oncolytic adenovirus (OAd) was employed for the cancer-cell specific delivery of a quadruplex-disrupting PNA that targets proto-oncogene promoters, and synergistic cytotoxic effects of the PNA and the OAd were observed.¹¹⁴ For gene editing applications, early approaches for PNA delivery employed electroporation or nucleofection. This was subsequently superseded by the use of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) particles which were made from FDA-approved materials.¹¹⁵ The PLGA nanoparticle technology not only allowed simultaneous delivery of PNA and DNA but also increased the efficiency of the intracellular gene modification by over 60 folds compared to the nucleofection method.¹¹⁶ The polymer materials can be further modified to enhance the gene editing efficiency, for example by combination with poly β -amino ester (PBAE)⁸⁸ and cell-penetrating/nuclear localizing peptide.⁸⁴ This nanoparticles-based delivery strategy is also effective for *in vivo* delivery via intravenous and nasal administrations (see Table 1).

Conclusion and outlooks

PNA is a unique class of oligonucleotide mimics that shows distinctive features from other conventional oligonucleotide analogs. The strong and specific base-pairing properties, the ability to recognize structured nucleic acid targets through various binding modes, and the chemical and biological stabilities led to the initial expectation that PNA should be a promising candidate as therapeutic agents that operate at the gene level. However, despite almost 30 years having passed since the first introduction of PNA, advancing the antisense/antigene PNA from proof-of-concept to practical uses is still a long way to go. The

Table 1
Summary of recent achievements in gene editing mediated by triplex-forming and tail-clamp PNA.

Reference	PNA design	PNA type	Delivery	Gene	System	Results
[81] (2013)	triplex-forming bis-PNA	aegPNA	electroporation	introduction of HPFH mutations to the promoter region of endogenous γ -globin gene <i>CCR5</i> (inactivation)	human hematopoietic progenitor cells	1.63% modification (0.29% with donor DNA alone)
[82] (2013)	tail-clamp	aegPNA	PLGA nanoparticles		human peripheral blood mononuclear cells (PMBCs)	0.97% correction 0.004% off-target (<i>CCR2</i>)
[83] (2013)	tail-clamp	aegPNA	PLGA nanoparticles with DSPE-PEG-TAT modification	<i>CCR5</i> (inactivation)	human hematopoietic cells in mouse models (i.v.)	- spleen: 0.43% correction 0.004% off-target (<i>CCR2</i>) - bone marrow: 0.05% correction < 0.0006% off-target (<i>CCR2</i>) splice site correction detected by the restoration of EGFP expression
[84] (2015)	tail-clamp	aegPNA	PLGA/PBAE/MPG nanoparticles	β -globin gene IVS2-654 (C→T) F508del <i>CFTR</i> (correction) F508del <i>CFTR</i> (correction)	transgenic mice carrying the IVS-654 splice-site mutation human CFBE cells Cystic fibrosis (CF) mouse model (intranasal delivery)	9.2% correction < 0.00001% off-target - nasal epithelium : 5.7% correction < 0.0001% off-target
[85] (2016)	tail-clamp	R-MP γ PNA	PLGA nanoparticles	β -globin gene IVS2-654 (C→T)	c-Kit + bone marrow cells	- lung: 1.2% correction < 0.0001% off-target - 8% correction (3–4 fold higher than aeg PNA) (without SCF) - 15% correction (with SCF treatment)
[86] (2018)	tail-clamp	R-MP γ PNA	PLGA nanoparticles	β -globin gene IVS2-654 (C→T)	human CD34 + haematopoietic cells	5% modification 0.00012% total off-target (with SCF treatment)
				β -globin gene IVS2-654 (C→T)	β -Thalassemic mouse model (i.v.)	bone marrow: 3.9% correction 0.0032% total off-target (with SCF administration)
				β -globin gene IVS2-654 (C→T)	mouse fetus (intravenous, intra-amniotic)	6.2% correction in total bone marrow cells < 0.000002% total off-target

aegPNA: aminoethylglycyl PNA.
 DSPE: distearoylphosphatidylethanolamine.
 EGFP: Enhanced green fluorescent protein.
 HPFH: hereditary persistence of fetal haemoglobin.
 i.v.: intravenous administration.
 MPG: nuclear-localization sequence-containing cell-penetrating peptide.
 PBAE: poly β -amino ester.
 PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid).
 R-MP γ PNA: (R)-miniPEG γ PNA.
 SCF: stem cell factor.

inherently non-catalytic mode of action together with the issues of inefficient delivery and poor bioavailability necessitate high dosage and/or repeated administration of PNA in animal experiments. The efficacy and physiological stability still need further improvement before the PNA-based antisense/antigene therapy as well as the more recently developed PNA-mediated epigenetic controls can be moved on to clinical stages.

On the other hand, the discovery that PNA could induce gene editing has revived the excitement in the therapeutic potentials of PNA in recent years. Unlike the antisense and antigene approaches, the effect of gene editing is permanent (i.e., once the gene is corrected, no more PNA administration is necessary). Even though the issues associated with the *in vivo* use of PNA mentioned above has not yet been fully resolved, the gene edit can be performed *ex vivo* on isolated stem cells before injection to the patient. Having said that, with the use of conformationally preorganized γ PNA and an advanced nanoparticles-based delivery technique, successful gene editing and restoring of the gene function have already been achieved *in vivo*.^{85,86} At present, the technological advancement of the PNA-mediated gene editing is still far from being competitive with the well-established CRISPR-Cas9 or its variants,^{117,118} whereby efficacy and safety have already been demonstrated in clinical trials.¹¹⁹ For the purpose of therapeutic uses, off-target gene modification is another area of potential concern given that triplex-forming oligonucleotides can induce spontaneous mutagenesis.⁷¹ While the off-target effects have been estimated to be very low based on studies in a limited number of partially homologous genes, the safety cannot be ascertained without more thorough studies. Despite these shortcomings, the PNA-mediated gene editing technology offers promising potentials for therapeutic applications and beyond e.g. synthetic biology, plant, and animal breeds development. There are still rooms for further improvements with more understanding of mechanisms of the gene repair process, the use of new delivery formulations, PNA modifications (currently only standard PNA and γ PNA have been extensively explored) and new modes of DNA targeting (currently only the tail-clamp PNA has been extensively explored) or combinations thereof.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial supports from the Thailand Research Fund (DPG5780002 and RGU6180001 to T.V.) and the Science Achievement Scholarship of Thailand (to P.M.). We also thank Miss Kotchakorn Supabowornsathit and Mr. Kriangsak Faikhruea for the preparation of illustrations, and Mr. Alexandre Marouen for the proof-reading.

References

- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. *Science*. 1991;254:1497.
- Nielsen PE. *Acc Chem Res*. 1999;32:624.
- Egholm M, Christensen L, Dueholm KL, Buchardt O, Coull J, Nielsen PE. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:217.
- Hansen ME, Bentin T, Nielsen PE. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:4498.
- Bentin T, Hansen GI, Nielsen PE. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:5790.
- Bentin T, Larsen HJ, Nielsen PE. *Biochemistry*. 2003;42:13987.
- Kaihatsu K, Shah RH, Zhao X, Corey DR. *Biochemistry*. 2003;42:13996.
- Olsen AG, Dahl O, Petersen AB, Nielsen J, Nielsen PE. *Artif. DNA PNA XNA*. 2011;2:32.
- Ishizuka T, Yoshida J, Yamamoto Y, et al. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:1464.
- Vilaivan T. *Acc Chem Res*. 2015;48:1645.
- Bohländer PR, Vilaivan T, Wagenknecht H-A. *Org Biomol Chem*. 2015;13:9223.
- Yotapan N, Nim-anussornkul D, Vilaivan T. *Tetrahedron*. 2016;72:7992.
- Aiba Y, Honda Y, Komiyama M. *Chem Eur J*. 2015;21:4021.

- Hibino M, Aiba Y, Watanabe Y, Shoji O. *ChemBioChem*. 2018;19:1601.
- Kameshima W, Ishizuka T, Minoshima M, et al. *Angew Chem Int Ed*. 2013;52:13681.
- Nakamura S, Kawabata H, Fujimoto K. *Chem Commun*. 2017;53:7616.
- Sumaoka J, Komiyama M. *Chem Lett*. 2014;43:1581.
- Nielsen PE, Christensen L. *J Am Chem Soc*. 1996;118:2287.
- Bukanov NO, Demidov VV, Nielsen PE, Frank-Kamenetskii MD. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:5516.
- Machnik G, Buldak L, Ruczyński J, et al. *J Mol Recognit*. 2017;30:e2600.
- Ishizuka T, Otani K, Sumaoka J, Komiyama M. *Chem Commun*. 2009;1225.
- Tanaka M, Shigi N, Komiyama M. *Chem Lett*. 2016;45:767.
- Dragulescu-Andrasi A, Rapireddy S, Frezza BNM, Gayathri C, Gil RR, Ly DH. *J Am Chem Soc*. 2006;128:10258.
- Rapireddy S, He G, Roy S, Armitage BA, Ly DH. *J Am Chem Soc*. 2007;129:15596.
- Chenna V, Rapireddy S, Sahu B, Ausin C, Pedrosa E, Ly DH. *ChemBioChem*. 2008;9:2388.
- Rapireddy S, Bahal R, Ly DH. *Biochemistry*. 2011;50:3913.
- He G, Rapireddy S, Bahal R, Sahu B, Ly DH. *J Am Chem Soc*. 2009;131:12089.
- Shigi N, Mizuno Y, Kunifuda H, Matsumura K, Komiyama M. *Bull Chem Soc Jpn*. 2019;92:330.
- Aiba Y, Hamano Y, Kameshima W, et al. *Org Biomol Chem*. 2013;11:5233.
- Thadke SA, Hridya VM, Dinithi J, et al. *Comm Chem*. 2018;1:79.
- Piao X, Xia X, Bong D. *Biochemistry*. 2013;52:6313.
- Zeng Y, Pratumyot Y, Piao X, Bong D. *J Am Chem Soc*. 2012;134:832.
- Rhodes D, Lipps HJ. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:8627.
- Panyutin IG, Onyshchenko MI, Englund EA, Appella DH, Neumann RD. *Curr Pharm Des*. 1984;2012:18.
- Datta B, Armitage B. *J Am Chem Soc*. 2001;123:9612.
- Datta B, Schmitt C, Armitage BA. *J Am Chem Soc*. 2003;125:4111.
- Gupta A, Lee L-L, Roy S, et al. *ChemBioChem*. 2013;14:1476.
- Englund EA, Gupta P, Micklitsch CM, et al. *ChemBioChem*. 1887;2014:15.
- Lusvarghi S, Murphy CT, Roy S, et al. *J Am Chem Soc*. 2009;131:18415.
- Englund EA, Xu Q, Witschi MA, Appella DH. *J Am Chem Soc*. 2006;128:16456.
- Onyshchenko MI, Gaynutdinov TI, Englund EA, Appella DH, Neumann RD, Panyutin IG. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:7114.
- Ishizuka T, Yang J, Komiyama M, Xu Y. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51:7198.
- Li M, Zengya T, Rozners E. *J Am Chem Soc*. 2010;132:8676.
- Dias N, Sénaud-Beaufort C, le Forestier E, Auvin C, Hélène C, Saison-Behmoaras TE. *J Mol Biol*. 2002;320:489.
- Gupta P, Muse O, Rozners E. *Biochemistry*. 2012;51:63.
- Zengya T, Gupta P, Rozners E. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51:12593.
- Hnedzko D, McGee DW, Karamitas YA, Rozners E. *RNA*. 2017;23:58.
- Devi G, Yuan Z, Lu Y, Zhao Y, Chen G. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:4008.
- Gupta P, Zengya T, Rozners E. *Chem Commun*. 2011;47:11125.
- Marin VL, Armitage BA. *J Am Chem Soc*. 2005;127:8032.
- Endoh T, Hnedzko D, Rozners E, Sugimoto N. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55:889.
- Oyaghire SN, Cherubim CJ, Telmer CA, Martinez JA, Bruchez MP, Armitage BA. *Biochemistry*. 1977;2016:55.
- Hanvey JC, Pfeffer NJ, Bisi JE, et al. *Science*. 1992;258:1481.
- Gambari R. *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24:267.
- Smith CIE, Zain R. *Annu Rev Pharmacol*. 2019;59:605.
- Braasch DA, Corey DR. *Biochemistry*. 2002;41:4503.
- Nielsen PE. *Curr Pharm Des*. 2010;16:3118.
- Montazersaheb S, Hejazi MS, Charoudeh HN. *Adv Pharm Bull*. 2018;8:551.
- Malchère C, Verheijen J, van der Laan S, et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2000;10:463.
- Debacker AJ, Sharma VK, Meda Krishnamurthy P, O'Reilly D, Greenhill R, Watts JK. *Biochemistry*. 2019;58:582.
- Gao X, Shen X, Dong X, et al. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4:e255.
- Gambari R, Gasparello J, Finotti AJ. *Cancer Metastasis Treat*. 2019;5:55.
- Gupta A, Quijano E, Liu Y, et al. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;9:111.
- Milani R, Brognara E, Fabbri E, et al. *Int J Oncol*. 2019;55:59.
- Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O. *Gene*. 1994;149:139.
- Cutrona G, Carpaneto EM, Ulivi M, et al. *Nat Biotechnol*. 2000;18:300.
- Janowski BA, Kaihatsu K, Huffman KE, et al. *Nat Chem Biol*. 2005;1:210.
- Matis S, Mariani MR, Cutrona G, Cilli M, Piccardi F, Daga A, Damonte G, Millo E, Moroni M, Roncella S, Fedeli F, Boffa LC, Ferrarini M. *Cancer Gene Ther*. 2009;16:786.
- Chen J, Peterson KR, Iancu-Rubin C, Bieker JJ. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:16846.
- Brown ZZ, Miller MM, Kong HE, Lewis PW, Muir TW. *Angew Chem Int Ed*. 2015;54:6457.
- Wang G, Seidman MM, Glazer PM. *Science*. 1996;271:802.
- Faruqi AF, Datta HJ, Carroll D, Seidman MM, Glazer PM. *Mol Cell Biol*. 2000;20:990.
- Rogers FA, Vasquez KM, Egholm M, Glazer PM. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:16695.
- Chin JY, Kuan JY, Lonkar PS, et al. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 2008;105:13514.
- Nielsen PE. *ChemBioChem*. 2010;11:2073.
- Quijano E, Bahal R, Ricciardi A, Saltzman WM, Glazer PM. *Yale J Biol Med*. 2017;90:583.
- Ricciardi AS, Quijano E, Putman R, Saltzman WM, Glazer PM. *Molecules*. 2018;23:632.
- Malik S, Oyaghire S, Bahal R. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:1057.
- Ricciardi, A.S.; McNeer, N.A.; Anandalingam, K.K.; Saltzman, W.M.; Glazer, P.M. In *Cancer Genomics and Proteomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Wajapeyee, N. Ed.; Humana Press: New York, 2014; Vol. 1176, pp 89–106.

80. Schleifman E, Glazer PM. *Peptide Nucleic Acids: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2014:207–222.
81. Chin JY, Reza F, Glazer PM. *Mol Ther*. 2013;21:580.
82. Schleifman EB, McNeer N, Jackson A, et al. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2:e135.
83. McNeer NA, Schleifman EB, Cuthbert A, et al. *Gene Ther*. 2013;20:658.
84. McNeer NA, Anandalingam K, Fields RJ, et al. *Nat Commun*. 2015;6:6952.
85. Bahal R, McNeer NA, Quijano E, et al. *Nat Commun*. 2016;7:13304.
86. Ricciardi AS, Bahal R, Farrelly JS, et al. *Nat Commun*. 2018;9:2481.
87. Lonkar P, Kim K-H, Kuan JY, et al. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:3635.
88. Bahal R, Quijano E, McNeer NA, et al. *Curr Gene Ther*. 2014;14:331.
89. Kayali R, Bury F, Ballard M, Berton C. *Hum Mol Genet*. 2010;19:3266.
90. Nik-Ahd F, Berton C. *Stem Cells*. 1817;2014:32.
91. Miyajima Y, Ishizuka T, Yamamoto Y, Sumaoka J, Komiyama M. *J Am Chem Soc*. 2009;131:2657.
92. Aiba Y, Sumaoka J, Komiyama M. *Chem Soc Rev*. 2011;40:5657.
93. Katada H, Chen HJ, Shigi N, Komiyama M. *Chem Commun*. 2009:6545.
94. Katada H, Komiyama M. *Curr Gene Ther*. 2011;11:38.
95. Abes S, Williams D, Prevot P, Thierry A, Gait MJ, Lebleu B. *J. Control. Release*. 2006;110:595.
96. Gait MJ. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:844.
97. Wolf Y, Pritz S, Abes S, Bienert M, Lebleu B, Oehlke J. *Biochemistry*. 2006;45:14944.
98. Hu J, Corey DR. *Biochemistry*. 2007;46:7581.
99. Soudah T, Mogilevsky M, Karni R, Yavin E. *Bioconjugate Chem*. 2017;28:3036.
100. Sahu B, Chenna V, Lathrop KL, et al. *J Org Chem*. 2009;74:1509.
101. Jain DR, Anandi VL, Lahiri M, Ganesh KN. *J Org Chem*. 2014;79:9567.
102. Pansuwan H, Ditmangklo B, Vilaivan C, et al. *Bioconjugate Chem*. 2017;28:2284.
103. Avitabile C, Moggio L, Maltieri G, et al. *PLoS One*. 2012;7:e35774.
104. Rasmussen FW, Bendifallah N, Zachar V, et al. *Oligonucleotides*. 2006;16:43.
105. Gasparello J, Manicardi A, Casnati A, et al. *Sci Rep*. 2019;9:3036.
106. Malik S, Asmara B, Moscato Z, Mukker JK, Bahal R. *Curr Pharm Des*. 2018;24:5164.
107. Morris MC, Gros E, Aldrian-Herrada G, et al. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:e49.
108. McNeer NA, Schleifman EB, Glazer PM, Saltzman WM. *J. Control Release*. 2011;155:312.
109. Rad AT, Malik S, Yang L, Oberoi-Khanuja TK, Nieh M-P, Bahal R. *Nanoscale*. 2019;11:12517.
110. Arayachukiat S, Seemork J, Pan-In P, et al. *Nano Lett*. 2015;15:3370.
111. Bertucci A, Lülfi H, Septiadi D, Manicardi A, Corradini R, De Cola L. *Adv Healthcare Mater*. 1812;2014:3.
112. Ma X, Devi G, Qu Q, Toh DF, Chen G, Zhao Y. *Bioconjugate Chem*. 2014;25:1412.
113. Beavers KR, Mares JW, Swartz CM, Zhao Y, Weiss SM, Duvall CL. *Bioconjugate Chem*. 2014;25:1192.
114. Falanga AP, Cerullo V, Marzano M, et al. *Bioconjugate Chem*. 2019;30:572.
115. Gupta A, Bahal R, Gupta M, Glazer PM, Saltzman WM. *J Control Release*. 2016;240:302.
116. McNeer NA, Chin JY, Schleifman EB, Fields RJ, Glazer PM, Saltzman WM. *Mol Ther*. 2011;19:172.
117. Sander JD, Young JK. *Nat Biotechnol*. 2014;32:347.
118. Dai WJ, Zhu L-Y, Yan Z-Y, Xu Y, Wang Q-L, Lu X-J. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e349.
119. Zipkin M. *Nat Biotechnol*. 2019. <https://doi.org/10.1038/d41587-019-00035-2>.

Title: Rapid and hypersensitive colorimetric loop-mediated isothermal amplification for point-of-care *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene detection in milk and pork products

Running Title: Hypersensitive point-of-care *S. aureus* sea LAMP

Grittaya Srimongkol¹, Boonsong Ditmangklo², Ilada Choopara¹, Jiraporn Thaniyavarn³, Deborah Dean^{4,5,6}, Sirirat Kokpol², Tirayut Vilaivan², and Naraporn Somboonna^{3,*}

¹ Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³ Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴ Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA 94609, USA

⁵ Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143, USA

⁶ UC Berkeley/UCSF Graduate Program in Bioengineering, University of California, Berkeley, CA 94720, USA

* Corresponding author: Naraporn Somboonna, Department of Microbiology, Faculty of
Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand;
email: Naraporn.S@chula.ac.th

23

Email addresses:

GS: Faiiz_Grit@hotmail.co.th

BD: boonsongd@gmail.com

IC: diary_g_roe@hotmail.com

JT: Jiraporn.Th@chula.ac.th

DD: ddean@chori.org

SK: siriratkokpol@gmail.com

TV: Tirayut.V@chula.ac.th

NS: Naraporn.S@chula.ac.th

33

Abstract

Staphylococcus aureus strains carrying enterotoxin A gene (*sea*) causes food poisoning and cannot be distinguished from non-pathogenic strains by the culture method. Here, we developed a rapid, specific and sensitive visual detection of *sea* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with nanogold probe (AuNP) or styryl dye (STR). LAMP-AuNP and LAMP-STR can detect as low as 9.7 fg (3.2 *sea* copies) and 7.2 *sea* copies, respectively, which were lower than PCR (97 fg or 32 *sea* copies). The

41 excellent performance of the new assays was demonstrated in food samples using crude DNA
42 lysates. While the culture method detected 10^4 CFU/g in ground pork and 10 CFU/mL in
43 milk in 5-7 days, LAMP-AuNP could detect down to 10 CFU/g for both samples in 27
44 minutes. Analyzing 80 pork and milk samples revealed that the LAMP-AuNP showed 100%
45 sensitivity, 97-100% specificity and 97.5-100% accuracy, which were superior to the culture
46 method, and comparable to PCR but without requirement of a thermal cycler. Furthermore,
47 our LAMP-AuNP can detect *sea* in a range below food safety control (<100 CFU/g). The
48 LAMP-STR can quantitate *sea* in the range of 10-1,000 CFU (7.2-720 copies). Our crude
49 DNA lysis combined with LAMP-AuNP/STR assay present effective point-of-care detection.

50

51 **Introduction**

52 *Staphylococcus aureus* strains with the staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*)
53 bacteriophage, is a common cause of foodborne disease and outbreaks worldwide including
54 the United States and countries of the European Union¹⁻⁵. In Thailand, one of the largest
55 outbreaks was reported in 2009 when 573 people became ill after consumption of
56 contaminated sticky rice custard⁶. *S. aureus* is commonly found in soil, water, air, as well as
57 human respiratory tract and skin. The *sea* toxin is relatively heat stable (e.g. up to 100°C for
58 30 min) therefore, food contamination generally occurs when cooking is performed without
59 sufficient hygiene. Frequently reported contaminated foods include dairy products (milk,
60 cheese, ice cream, etc.), and fresh and cooked meat⁷⁻⁸. Importantly, contaminated food may
61 not be easily identified by sensory evaluation such as odor or appearance. Clinical symptoms
62 from *sea* food poisoning include vomiting, abdominal cramps, diarrhea, and dysentery, often
63 within 1-6 h after consumption. Occasional symptoms include sweating, chills, rectal
64 bleeding, and shock⁹⁻¹¹. The severity of illness depends on the concentration of the toxin.

65 Consumption of merely 20-100 ng of *sea* toxin can cause clinical symptoms and more than
66 that may be fatal, therefore a sensitive detection of *sea* is very important for the food safety
67 control. Detection is usually performed using culture based on a selective Baird-Parker
68 medium¹², with a limit of < 100 bacterial colony forming unit (CFU) per g or mL of food and
69 drink¹³⁻¹⁵. Nonetheless, this culture method supports both the growth of *sea* and non-*sea*
70 strains, and thus lacks specificity in detecting the pathogenic *sea* strains. In addition, some
71 food ingredients can affect the ability to culture leading to false negative results.

72

73 An alternative method for highly specific analysis of a food-borne pathogen is the
74 nucleic acid-based assay, which generally requires an amplification prior to the detection to
75 achieve the desired sensitivity. Recently, LAMP presents an attractive alternative to a more
76 traditional amplification method like PCR due to its low cost, ease-of-use and rapidity. Most
77 importantly, the expensive thermal cycler and specialized kits for DNA extraction and
78 purification are not required. The strand displacement characteristic of the *Bst* DNA
79 polymerase and the loop-intercalating primers allow amplification of the targets at a single
80 temperature with high sensitivity (e.g. 10-100 genome copies), and the product can be
81 visualized, albeit indirectly, by the formation of magnesium pyrophosphate as a white
82 precipitate¹⁶. Goto et al.² has previously developed a LAMP technique to detect *sea*, *seb*, *sec*
83 and *sed* genes, and reported that it is more sensitive and specific than PCR by an order of
84 magnitude^{2,17}. Still, previous analyses of LAMP results indirectly performed by monitoring
85 the formation of magnesium pyrophosphate precipitate showed limited accuracy since the
86 precipitate formation affects the reading accuracy. The alternative analysis by agarose gel-
87 electrophoresis requires electrophoresis instrumentation, extra laboratory time (0.5-1.5 h),
88 safety issues due to exposure to high voltage and ethidium bromide, and perhaps false
89 positive due to misamplification¹⁸. Here, we present the use of a nanogold-appended *sea*

probe (AuNP), which is specific for the target DNA, to eliminate the false positive problem. The high molar extinction coefficient of the AuNP supports simple visualization by naked eyes, and the functionalization with the probe increases the specificity of the assay¹⁹⁻²⁴. Together, we designed new LAMP primers based on additional *sea* sequences from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) along with two inner loop primers that can speed up the amplification by parallel-amplifying DNA loops outward on both ends²⁵ and determined the optimal reaction conditions. The LAMP-AuNP assay was validated by testing with food samples that are commonly found contaminated (ground pork and milk) to show improved specificity and sensitivity²⁶⁻²⁸ compared to the standard nucleic acid-based assay (PCR). We also demonstrated that the combination of a simple crude DNA lysis method and LAMP is appropriate for point-of-care and resource-restrained diagnostics. Further, since the visual reading from LAMP-AuNP cannot quantitate the number of bacterial CFU (or copy), which is important when the contamination level is below the food and drink safety control (< 100 CFU) but which the hypersensitive LAMP can detect^{26,29}, an alternative detection employing a cationic styryl dye (STR) as a fluorescent DNA stain^{30,31} was developed for quantifying the LAMP product. The LAMP-STR can quantify *sea* levels below 100 CFU, which a conventional culture method could not detect. Our two methods therefore help improve early identification of contaminated meat and dairy products to mitigate outbreaks of food poisoning.

Materials and Methods

Bacteria strains and culture

All bacteria strains were provided by the Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University; Department of Medical Sciences, Ministry of Public

Health; and Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Ministry of Public Health (Supplemental Table 1). *S. aureus* ATCC 13565 and ATCC 25923 strains contain *sea*, representing a positive control. All other *S. aureus* strains and other bacteria species contain no *sea* and were used as negative controls. All bacteria strains were cultured in tryptic soy broth (Himedia, Mumbai, India) at 37°C¹⁷.

DNA extraction by commercial kit

GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, California, USA) was used to extract DNA from bacteria culture for preparation of strains, and from ground pork and milk samples for PCR. Following manufacturer's protocols, 1 mL of bacterial cultures or 1 mL of aqueous extracts from minced ground pork (1 g/ 9 mL ddH₂O) was centrifuged at 13,000 rpm 30 min at 4°C to pelletize the bacterial cells. The pellet was then resuspended in Buffer R1 (Vivantis), and lysozyme and proteinase K were added to lyse the bacterial cell membranes. The purified DNA was eluted in 50-100 µL of elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) and stored at -20°C.

***S. aureus sea* PCR**

The PCR reaction for *S. aureus sea* (15 µL) comprised 12.5 µL EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (TakaRa Bio, Shiga, Japan), 0.3 µM primers SEA-F and SEA-R (Supplemental Table 2), and 100 ng DNA (unless specified). Thermocycling conditions were as follow: 94°C 2 min, followed by 35 cycles of 94°C 2 s, 55°C 2 min and 72°C 1 min, and final extension at 72°C 7 min³²⁻³³. The PCR product was analyzed by 1.75% agarose gel electrophoresis (120 base pairs (bp) amplicon).

***S. aureus* sea LAMP assays by Goto et al.² and our designed primers**

Our designed LAMP primers were based on multiple sequence alignment of *sea* and non-*sea* sequences from GenBank. The 11 *sea* sequences were ATCC13565 (GenBank accession no. M18970), ATCC25923 (EF520720.1), MW2 (NC003923.1), TW20 (FN433596.1), phiNM3 (DQ530361.1), phiSa119 (KJ596420.1), Z172 (CP006838.1), MSSA476 (BX571857.1), MRSA252 (BX571856.1), ST228 (HE579073.1), and T0131 (CP002643.1). Primer Explorer V4 (Eiken Chemical, Tokyo, Japan; <http://primerexplorer.jp/elampn4.0.0/index.html>) along with manual design were performed. The primers specificity was validated by BLASTN against GenBank nucleotide database. The sequences of primers from Goto et al.² and our designed LAMP primers were compared (Supplemental 2). The LAMP reaction (15 µL) comprised 1.6 µM each of primers FIP, BIP, LF and LB, 0.2 µM primers F3 and B3, 1.4 mM dNTP (SibEnzyme Ltd., Novosibirsk, Russia), 0.3 M betaine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 6 mM MgSO₄, 8 U *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs Inc., MA, USA), 1× ThermoPolTM Reaction Buffer (New England Biolabs Inc.), and 100 ng DNA (unless specified). The reaction conditions (shortest incubation time with highest sensitivity and correct specificity) were optimized using incubation temperatures of 60, 63 and 65°C, and incubation periods of 15, 30, 45 and 60 min. Heating at 80°C for 2 min was next applied to terminate the reaction. The LAMP products appeared as intercalating bands of various bp sizes by 1.75% agarose gel electrophoresis.

Preparation of nanogold probe and optimization for our LAMP-AuNP

The Probe-Sa_SEA (Supplemental Table 2) used for LAMP product detection was manually designed, and checked specificity by BLASTN against the GenBank nucleotide database. Gold nanoparticles of 20 nm diameter (Sigma-Aldrich) were appended to the Probe-Sa_SEA following methods of Jaroenram et al.²³ and Somboonna et al.²². In brief, 50 µL of

the Probe-Sa_SEA and 10 mL of gold nanoparticles were hybridized at 150 rpm and 50°C in a hybridization oven (Thermo Scientific, New Jersey, USA), for 22 h. Next, 1 mL of 100 mM PBS, 10 µL of 10% SDS and 500 µL of 2 M NaCl, at 50°C, were added, and the mixture was hybridized at 150 rpm and 50°C for another 4 h. The mixture was centrifuged at 13,000 rpm 4°C for 30 min. The clear solution was removed, and the precipitate was re-suspended in 10 mM phosphate buffer (100 mM NaCl and 0.01% (w/v) SDS), and centrifuged again. The pellet was finally re-suspended in 10 mM phosphate buffer (100 mM NaCl and 0.01% (w/v) SDS) to give the gold nanoparticles-probe solution (AuNP) that showed the absorbance of 0.3-0.4 at 525 nm, and was stored protected from light at 4°C. To determine the optimal conditions for the colorimetric LAMP-AuNP reaction, mixtures with different volume ratios of LAMP:AuNP (1:9 to 9:1) (10 µL total volume) were incubated at 63°C for 10 min, and 0.01-1 M MgSO₄ was then added. When a sufficient concentration of Mg²⁺ was present in the absence of the LAMP product, the AuNP agglomerated and changed its color. However, the positive LAMP products hybridize with the AuNP via their specific complementary strands, and the agglomeration induced by the salt addition was inhibited^{20,22,24}. The LAMP-AuNP results could be interpreted by naked eyes via their color: red/purple (positive) or clear/very light purple (negative), which could be further confirmed by UV-vis spectrophotometry. Controls included AuNP only, AuNP with MgSO₄, and no template control (DNA was replaced by ddH₂O). The AuNP only shows the same color as the positive LAMP results, while the AuNP with salt and no template control with salt show the same color as the negative LAMP results. All controls showed the expected colors for all tests (data not shown).

Comparison of specificity and sensitivity among *S. aureus sea* PCR, LAMP, and LAMP-AuNP methods

LAMP assays by Goto et al.² (60°C 30 min), as well as our LAMP (63°C 15 min) and LAMP-AuNP (5:5 vol./vol.) were carried out at the optimal conditions. Bacterial strains including *S. aureus (sea)*, *S. aureus (no sea)*, and other food poisoning bacteria (Supplemental Table 1), were tested for specificity. No template control referred the LAMP reaction where DNA was replaced by ddH₂O. For sensitivity, 10-fold serial dilutions of *S. aureus (sea)* DNA, or from live culture, were used as template to determine the minimum limit of detection.

Crude DNA lysis for ground pork and milk

Simple and rapid crude DNA lysis protocols for ground pork and milk were adapted from Reischl et al.³⁴ and Sowmya et al.³⁵. For ground pork and milk, the sample was stirred in a pellet pestle stirrer, and 1 mL of the liquid suspension was aliquoted into a microcentrifuge tube and centrifuged at 13,000 rpm 10 min. The supernatant was discarded, the pellet was suspended in 100 µL 1% Triton X-100 (Sigma-aldrich), heated at 95°C 10 min, centrifuged at 13,000 rpm 10 min, and the supernatant was used as a DNA template for LAMP. The supernatant was stored at -20°C.

Comparison of specificity and sensitivity for *S. aureus sea* assays between culture and crude DNA lysis coupled with LAMP-AuNP methods using ground pork and milk spiked-in live bacteria culture

S. aureus sea strains ATCC13565 and ATCC25923 were cultured until an OD₆₀₀ equal to 1 (10⁸ CFU) was obtained¹⁷. Samples with 10-fold serial dilutions were prepared ranging

from 10^5 to 10^6 CFU/mL, and 1 mL of each was spiked-in and mixed with 1 g pork or 1 mL milk samples, respectively. The samples were previously autoclaved and verified *sea*-free by *sea* PCR. For the pork samples, 9 mL of ddH₂O were further added. For culture assay, the samples were analyzed by a certified ISO/IEC 17025 laboratory, Food Research and Testing Laboratory (FRTL, Faculty of Science, Chulalongkorn University), following the FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM) for *S. aureus* protocols (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus>) that include: cultivation on selective Baird-Parker agar, followed by biochemical tests (oxidase test, catalase test, coagulase test and mannitol salt agar growth, and *S. aureus* should result catalase-positive and the rests are negative). For the LAMP-AuNP assay, the DNA was crude lysis, amplified and detected according to the protocols described above.

Study design to compare the performance between the culture and our crude DNA lysis coupled with LAMP-AuNP assays

To determine the performance of the culture and our crude DNA lysis coupled with LAMP-AuNP methods, the extraction of DNA with GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis) followed by *sea* PCR was used as the reference method. Statistically required sample numbers (N) were calculated according to the equation: $N = (p(1-p)z^2)/e^2$, given p at an average incidence of 18% (reported by Food Sanitation Division, Department of Health, in 2007 and 2008³⁶, and Bureau of Epidemiology, in 2009³), z score of 1.65 for 90% confidence interval, and e of 10% for margin of error. This yielded an N of 40.18. Therefore, we used 40 ground pork and 40 milk samples purchased from local markets in Bangkok (Samyan and Kingpetch districts) and nearby provinces (Nakhon Pathom and Suphan Buri). The assay efficacy was calculated based on the following equations: sensitivity = true positive ÷ (true

positive + false negative), specificity = true negative ÷ (true negative + false positive), false positive = 1 – specificity, false negative = 1 – sensitivity, and accuracy = (true positive + true negative) ÷ total samples. Verification of all samples included a minimum of two independently confirmed GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis) followed *sea* PCR³⁰.

LAMP-STR for colorimetric quantitation

The optimization experiments for LAMP-STR included testing different styryl dyes structures³⁷, different dilutions, and different LAMP product diluent-to-STR diluent (vol./vol.), that yielded the best fit data (R^2 , goodness of fit) for the regression equation analysis. In brief, the fluorescent DNA-binding styryl dye stock solution (20 μ M) was diluted in phosphate buffer (pH 7.0); the LAMP product was diluted in double distilled water, then the appropriate LAMP-to-STR ratio was mixed by vortexing, the fluorescent red color (positive) result was visualized under a 315 nm UV light and the photograph was taken. ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) was used to convert the image into numerical data by determining the color intensity from the fluorescent image.

Results

Optimal isothermal conditions of *sea* LAMP assays by Goto et al. and our designed primers

The conditions were first optimized over a temperature range of 60-65°C and incubation periods of 15-60 min using 100 ng genome of *S. aureus* strains *sea* as template, and our designed LAMP primers that consisted of two inner loop primers (Supplemental

Table 2, Sa_SEA LF and Sa_SEA LB) versus Goto et al.'s LAMP primers² that contain only one inner loop primer (SEA_LB). Our LAMP primers showed the appearance of LAMP products as early as 15 min at 60, 63 and 65°C incubations. Goto et al.'s LAMP primers meanwhile showed the earliest observable amplification at 30 min (Supplemental Figure 1). Noted without inner loop primers, both Goto et. al.'s and our LAMPs showed the same optimal isothermal condition at 30 min and 65°C (data not shown). The tentative isothermal conditions (15 min, and 60, 63 or 65°C for our LAMP; 30 min, and 60, 63 or 65°C for Goto et. al.'s LAMP) were further selected based on specificity and sensitivity evaluations. A total of 14 foodborne bacterial strains (Supplemental Table 1, 2 *sea* and 12 non- *sea*) served as standard controls for *sea* PCR³², as well as Goto et al.'s and our LAMP specificity evaluation. All methods could correctly identify positive (PCR product appeared as a single band at ~120 bp, LAMP product appeared as multiple bands of different sizes) and negative control strains showed no bands (data not shown). This confirms the BLASTN results that our LAMP primer sequences were specific to only *S. aureus sea* (see Materials and Methods, details on the primer design requirement). For sensitivity determination, 10-fold serial dilution containing 9.7 ng to 0.97 fg of *S. aureus* ATCC13565 genome served as templates. We selected 30 min at 63°C as the isothermal condition for Goto et al.'s LAMP, and 15 min at 63°C for our LAMP since these are the conditions that the smallest amount of template could be successfully amplified in each case. Hence, the detection limit of *sea* PCR and Goto et al.'s LAMP were found to be 0.097 pg (32 *sea* copies) while our LAMP was 9.7 fg (Figure 1). The limit of detection results suggested a 10-fold increase in sensitivity for our LAMP compared to both PCR and Goto et al.'s LAMP. Proper specificity was found for all methods (Figure 2).

Specificity and sensitivity of our LAMP-AuNP

Next, we attempted to combine our LAMP with AuNP probe to allow visual color detection through the specific complementary binding between the LAMP product and our designed *sea* oligonucleotide probe (Supplemental Table 1, Probe-Sa_SEA) attached to gold nanoparticles. The LAMP products corresponding to positive and negative samples were mixed with the AuNP probe at different ratios of 1:9 to 9:1 (vol./vol., total volume = 10 μ L), and different amounts of salt (MgSO_4), and the appropriate condition was selected where a significant color difference between positive (red/purple) and negative (clear/very light purple) could be clearly observed by naked eyes within 1-2 min. The optimal condition was found to be 5:5 of LAMP:AuNP (vol./vol., 5 μ L/5 μ L) and 5 μ L of 0.5 M MgSO_4 . Noted that other ratios also caused the color change, but at a slower rate (up to 10 min), for examples the 3:7 and 4:6 LAMP:AuNP (vol./vol) (Supplemental Figure 2). At 1:9 ratio of LAMP:AuNP, the LAMP product was not present in sufficient amounts to inhibit the aggregation of the AuNP probe, while at too high amounts of the LAMP product (e.g. at 8:2 or 9:1), the color of the AuNP probe was difficult to observe. Hence, the ratio of 5:5 was most appropriate for the optimal detection since both positive and negative results could be judged relatively quickly within 1-2 min. The color difference as observed by naked eyes was confirmed by UV-vis spectrophotometry reading (wavelength scanning from 400 nm to 700 nm): positive peak at $\sim$ 550 nm corresponded to red-purple color and negative results were observed as no peak (clear) or very minor peak (very light purple) (Supplemental Figure 2, at 5:5 LAMP-to-AuNP). This appropriate LAMP:AuNP condition was used to evaluate specificity and sensitivity. Fourteen bacterial strains, in Supplemental Table 1, served as control for specificity evaluation, and our LAMP-AuNP correctly identified the positive and negative controls (Figure 3A). In term of sensitivity, the LAMP-AuNP results as determined by naked eyes were fully consistent with our LAMP results as determined by agarose gel

electrophoresis, showing a limit of detection as low as 9.7 fg, or equivalent to 3.2 *sea* copies (Figures 1C and 3B). The color visualization of the LAMP-AuNP product was also further confirmed by UV-vis spectrophotometry (Figure 3C)^{20-21,24}.

Crude DNA lysis coupled LAMP-AuNP assay is hypersensitive and effective in real ground pork and milk sample tests

We evaluated the feasibility of using the assay for the point-of-care diagnostic by employing DNA samples obtained from simple crude DNA lysis instead of from DNA extraction kits as a template for the LAMP-AuNP assay. In the crude DNA lysis, we compared different lysis buffer (TE Buffer³⁴, 0.25 N NaCl and 0.0125% SDS³⁸, and 1% Triton X-100³⁶) from a minimum of three independent experiments and found that 1% Triton X-100 gave the highest DNA yield as determined by Nanodrop spectrophotometer. The average yield of crude DNA extracted by TE buffer, 0.25 N NaCl and 0.0125% SDS, and 1% Triton X-100 was 1.34, 1.68 and 1.99 ng/ μ L, respectively. Therefore 1% Triton X-100 was used for the preparation of the crude DNA lysates. Live cultures of individual bacterial strains in Supplemental Table 1 were used to spiked ground pork at 10⁵ CFU/g and milk at 10⁵ CFU/mL, and our crude DNA lysis coupled with LAMP-AuNP assay was evaluated for specificity in comparison with the culture method due to its wide use and acceptance as an ISO/IEC 17025 standard assay for *S. aureus* diagnostics in local settings in Thailand. Our method correctly identified positive and negative results for *S. aureus sea*, and the culture method showed positive results for all *S. aureus sea* and non-*sea* strains (Table 1). For sensitivity evaluation, ground pork and milk with 10-10⁵ CFU/g and CFU/mL of *S. aureus (sea)* were tested. The culture method could detect as low as 10⁴ CFU/g whereas our assay could detect as low as 10 CFU/g of *sea* in ground pork samples. For milk samples, both the

330 culture and our assays could detect as low as 10 CFU/mL (Table 2). Here, the nature of food
331 matrices affected the limit of detection to culture *S. aureus*. It should be noted that there were
332 differences in the sample preparation for the two assays. To maintain the bacterial viability
333 for culture, the sample preparation method for culture is simply a mixing step between
334 ground pork and ddH₂O to obtain a liquid suspension without the use of harsh reagents or
335 heat, so that live *S. aureus* could remain in pork debris. On the other hand, the method of the
336 crude DNA lysate preparation for LAMP required a mild detergent (Triton X-100) and
337 boiling.

338
339 Next, we determined the statistical efficacy of our assay, and compared with the
340 culture method. A total of 80 ground pork and milk samples were analyzed and the standard
341 DNA-based diagnostic method (commercial DNA extraction kit (GF-1 Bacterial DNA
342 Extraction Kit, Vivantis) and *sea* PCR³²) was used as the reference. The validity of the
343 commercial DNA extraction kit combined *sea* PCR³² assay was first verified with ground
344 pork and milk samples spiked with *S. aureus sea* at 10⁵ CFU/g and 10⁵ CFU/mL,
345 respectively, as well as with live cultures of individual bacterial strain employing a similar
346 experimental setup as in Table 1. The reference method properly identified positive and
347 negative samples in all cases. Our assay could correctly detect *sea* positive and negative
348 ground pork samples, giving identical results to the reference method (100% sensitivity,
349 100% specificity, 0% false positive and false negative, and 100% accuracy). For milk
350 samples, our assay showed one false-positive resulting in the decrease in specificity (97%)
351 and accuracy (97.5%). On the other hand, the culture assay showed only 0-40% sensitivity,
352 90-97% specificity and 75-90% accuracy (Table 3).

LAMP-STR for *sea* colorimetric quantitation

The LAMP-AuNP method, while showing excellent specificity and sensitivity, could not easily quantitate the results. Small amounts of contamination may be present (e.g. <100 CFU), which could be in the borderline case and can be acceptable under certain circumstances. However, a highly sensitive method that is qualitative in nature would simply indicate that such sample is positive. Hence, there are needs for a method that allow quantitation of small amounts of DNA. In this context, we developed a new cationic fluorescent styryl dye (STR) (Figure 4A) that can brighten up in the presence of DNA. Such dyes can be used in combination with the developed LAMP method to detect and quantitate low level of LAMP products. Several styryl dyes were screened (data not shown), and only the cationic benzothiazolium dye designated as STR (see synthesis details in Supplementary Information³⁹) was identified as the most appropriate dye that can respond to the presence of LAMP product by showing bright orange fluorescence when visualized under UV light. At 5 μ M of the dye STR and 80-fold dilution of the LAMP product (Figure 4B), the assay can correctly identify the *S. aureus sea* from negative controls (non-template and *E. coli*). Moreover, a different level of color intensity was observed at different amounts of the DNA template, suggesting the possibilities of performing a semi-quantitative analysis. A minimum of 5 independent experiments containing 0, 10, 100 and 1,000 CFU LAMP products were thus analyzed and the linear calibration plot between the fluorescent intensity (Y variable) and the log CFU (X variable) was obtained (Figure 5A). To back confirm our derived quantitative equation, the live *S. aureus (sea)* culture (10, 100 and 1,000 CFU), the genomic DNA at the limit of detection of the LAMP-AuNP method (9.7 fg, or 3.2 copies), and the negative LAMP by the negative control strains or no template were evaluated. Our LAMP-STR was able to quantitate 10-1,000 CFU of *S. aureus (sea)*, and for 3.2 copies LAMP the

color intensity was found too small to be differentiated from the background density (Figure 5B).

Discussion

While not every enterotoxin type (such as type F) plays a significant role in food poisoning outbreaks in humans, the staphylococcal enterotoxin A represents the most commonly detected enterotoxin type associated with food poisoning outbreaks in humans, and in a minimal dose such as 20 ng can cause diseases⁴⁰. Staphylococcal enterotoxin A contamination is prevalent in meats, milk, eggs and foods high in fat. Conventional method involves culturing on selective Baird-Parker agar, in which *S. aureus* colonies should appear shiny black and circular surrounded by clear zone. *S. aureus* confirmation may be optionally performed by four biochemical tests (catalase, oxidase, coagulase and mannitol salt tests). Yet the culture method cannot differentiate *sea* from non-*sea* strains. This method is also labor and time intensive (2-4 days), expensive (> 10 USD per test), and the sensitivity and specificity were limited compared to the DNA-based diagnostic. In DNA diagnostics, although PCR gives excellent performance in terms of sensitivity and specificity, the major limitation is its requirement of an expensive thermal cycler and 3-4 h diagnostic time. This study developed a combined crude DNA lysis as a means for sample preparation with *S. aureus sea* LAMP-AuNP and LAMP-STR that offers similar performance to PCR but much faster (< 1 h) and required no thermal cycler or electrophoresis instruments. LAMP offers a simple, rapid and effective target amplification, while AuNP (visual color) and STR (fluorescent) offer easy color readouts.

401 The two inner loop primers, LF and LB, that we designed could accelerate the DNA
402 amplification by producing loop amplicons from multiple sized LAMP amplicons from the
403 inside outward to both ends. This increased the amount of LAMP product, so the assay time
404 was reduced by a half from 30 to 15 min compared with Goto et al.'s LAMP (and our LAMP
405 without inner loop primers, data not shown), and the limit of detection according to gel
406 electrophoresis was also higher^{20,23-24} (from 97 fg to 9.7 fg genome, or equivalent 3.2 *sea*
407 copies). To enable point-of-care and resource-constrained diagnosis, AuNP functionalized
408 with a probe complementary to the LAMP product was employed to replace the agarose gel
409 electrophoresis for the detection of the specific LAMP products. This allows naked eyes
410 detection with high accuracy due to the complementary binding between the target (in LAMP
411 product) and the probe⁴¹⁻⁴². Moreover, since the *Bst* DNA polymerase used in LAMP is much
412 less sensitive to inhibitions than the *Taq* DNA polymerase typically employed in PCR, the
413 sample preparation can be greatly simplified. The crude DNA lysis from real food samples,
414 which often contain inhibitor to the culturing or the *Taq* DNA polymerase in PCR^{17,38,43-44},
415 was successfully employed. This study selected ground pork and milk as food samples, given
416 that ground pork often showed problems with the culture method, and both ground pork and
417 milk required commercial DNA extraction kits for the PCR method. While the efficiency of
418 the culture method was biased to sample types (poor limit of detection and assay accuracy for
419 ground pork samples), our crude DNA lysis coupled with LAMP-AuNP showed a better limit
420 of detection and a much higher assay accuracy for both ground pork and milk samples (10
421 CFU/g or mL, and 97.5-100% accuracy). Our assay accuracy was comparable to using
422 commercial DNA extraction kit together with the PCR methods. Despite the fact that
423 enterotoxin A accounts > 50% of causes in some areas, the ability to detect every enterotoxin
424 type gene that causes food poisoning is important. With appropriate primers and reaction

condition, our assay can be adapted for detecting and quantitating other enterotoxin type genes even in a minimal contamination.

Recently, several LAMP-based assays have developed to detect foodborne pathogens, such as staphylococci⁴⁵, *Listeria monocytogenes*⁴⁶, *Vibrio parahaemolyticus*⁴⁷ and *Escherichia coli*⁴⁸. Whilst our research reported the similarly high assay sensitivity and specificity, our LAMP-based assay targeted the major enterotoxin gene *sea*, a direct detection to the pathogenic *S. aureus* strain with *sea*, and compared the complete assay efficiencies including detection limit, sensitivity, specificity, false positive, false negative and accuracy, between culture methods and our crude DNA lysis coupled LAMP-AuNP methods, in both laboratory and real food sample tests with either spiked-in or natural *S. aureus sea* contaminations (statistical number of samples). Our assay also contained the double inner loop primers to allow a rapid 15 min LAMP reaction time, and had combined STR quantitation methods, so the total detection time starting from raw sample to analyze data in color readout is within 1 h.

Conclusion

The data supported the reliability of our assay for *S. aureus sea* without the requirement of a commercial DNA extraction kit nor expensive instruments like a thermal cycler, electrophoresis apparatus, and spectrophotometer. Only a simple heat block or water bath and readily available reagents are sufficient to perform our diagnostic at the point-of-care settings in less than 1 h (30 min crude sample lysis, 15 min LAMP, and 7 min AuNP steps) with minimal expertise required, yet giving high accuracy and hypersensitivity. Our assay was effective with various types of samples including DNA, live bacterial culture, pork

and milk spiked-in live bacterial culture, and throughout a statistic number of market samples surveillance (pending Thai petty patent no. 16030012151 for LAMP-AuNP). An additional assay, LAMP-STR, was also developed to quantitate low levels of *S. aureus sea* contamination between 10-1,000 CFU (pending Thai petty patent no. 1703000138). This facilitates the case when < 100 CFU/g or mL diet is acceptable so the LAMP-STR will allow proper management of diets with contamination but under the control standard.

References

1. Balaban, N., & Rasooly, A. *Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol.* **61**, 1-10 (2000).
2. Goto, M., Hayashidani, H., Takatori, K. & Hara-Kudo, Y. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, *SEA, SEB, SEC* and *SED*, by loop mediated isothermal amplification assay. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 100-107 (2007).
3. Di, G.E., Prencipe, V., Tonelli, A., Marfoggia, C. & Migliorati, G. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. *Vet. Ital.* **47**, 165–173 (2011).
4. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. p. 1-191 (2015).
5. Nia, Y., Mutel, I., Assere, A., Lombard, B., Auvray, F. & Hennekinne, J.A. Review over a 3-year period of European Union proficiency tests for detection of *Staphylococcal* enterotoxins in food matrices. *Toxins* **8**, 107 (2016).

- 471 6. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health (Thailand). Food poisoning, p. 621
472 (2009).
- 473 7. Hatakka, M., Bjorkroth, K. J., Asplund, K., Maki-Petays, N. & Korkeala, H. J. Genotypes
474 and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of
475 flight catering employees. *J. Food Prot.* **11**, 1487-1491 (2000).
- 476 8. Argudin, M., Mendoza, M.C. & Rodicio, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus*
477 enterotoxins. *Toxins* **2**, 1751-1773 (2010).
- 478 9. Bhatia, A. & Zahoor, S. *Staphylococcus Aureus* enterotoxins: a review. *J. Clin. Diagn. Res.*
479 **3**, 188-197 (2007).
- 480 10. Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R. & Galvez, A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus*
481 enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic
482 resistance. *Toxins* **2**, 2117-2131 (2010).
- 483 11. Hennekinne, J.A., Buyser, M.L.D. & Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food
484 poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**,
485 815–836 (2012).
- 486 12. Baird-Parker, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase
487 positive staphylococci. *J. Bacteriol.* **25**, 12–19 (1962).
- 488 13. Ministry of Public Health (Thailand). Standards for pathogenic microorganisms in food.
489 p. 42 (2013).
- 490 14. Centre for Food Safety. Microbiological guidelines for food (for ready-to-eat food in
491 general and specific food items). p. 19 (2014).

- 492 15. Standardization Organization for GCC (Gulf Cooperation Council). Microbiological
 493 criteria for foodstuffs, final draft GSO/ FDS 1016/ 2014. Online material URL:
 494 https://members.wto.org/crnattachments/2014/sps/.../14_5658_00_e.pdf (2016).
- 495 16. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*
 496 **28**,1-6 (2000).
- 497 17. Suwanampai, T. *et al.* Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for
 498 detecting enterotoxin A gene of *Staphylococcus aureus* in pork. *Southeast Asian J. Trop.*
 499 *Med. Public Health* **42**, 1489-1497 (2011).
- 500 18. Hardinge, P. & Murray, J.A.H. Reduced false positives and improved reporting of loop-
 501 mediated isothermal amplification using quenched fluorescent primers. *Sci. Rep.* **14**, 7400
 502 (2019)
- 503 19. Jayawardena, S. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1)
 504 virus. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 899-901 (2007).
- 505 20. Jaroenram, W., Arunrut, N. & Kiatpathomchai, W. Rapid and sensitive detection of
 506 shrimp yellow head virus using loop-mediated isothermal amplification and a colorogenic
 507 nanogold hybridization probe. *J. Virol. Methods* **186**, 36-42 (2012).
- 508 21. Seetang-Nun, Y., Jaroenram, W., Sriurairatana, S., Suebsing, R. & Kiatpathomchai, W.
 509 Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold
 510 nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Mol. Cell*
 511 *Probes* **27**, 71-79 (2013).
- 512 22. Zhang, Y. *et al.* New gold nanostructures for sensor applications: a review. *Materials* **7**,
 513 5169-5201 (2014).

- 514 23. Choopara, I., Arunrut, N., Kiatpathomchai, W., Dean, D. & Somboonna, N. Rapid and
 515 visual *Chlamydia trachomatis* detection using loop-mediated isothermal amplification and
 516 hydroxynaphthol blue. *Lett. Appl. Microbiol.* **64**, 51-56 (2017).
- 517 24. Somboonna, N. *et al.* Rapid and sensitive detection of *Chlamydia trachomatis* by loop-
 518 mediated isothermal amplification and gold nanoparticle probes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*
 519 **12**, e0006900 (2018).
- 520 25. Wang, Y. *et al.* The novel multiple inner primers-loop-mediated isothermal
 521 amplification (MIP-LAMP) for rapid detection and differentiation of *Listeria*
 522 *monocytogenes*. *Molecules* **20**, 21515-21531 (2015).
- 523 26. Arunrut, N. *et al.* Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated
 524 isothermal amplification combined with DNA functionalized gold nanoparticles as
 525 probes. *Plos One* **11**, 1-18 (2016).
- 526 27. Ye, X., Fang, X., Li, X., & Kong, J. Gold nanoparticle-mediated nucleic acid isothermal
 527 amplification with enhanced specificity. *Anal. Chim. Acta* **1043**, 150-157 (2018).
- 528 28. Arunrut, N., Jitrakorn, S., Saksmerprome, V., & Kiatpathomchai, W. Double-loop-
 529 mediated isothermal amplification (D-LAMP) using colourimetric gold nanoparticle
 530 probe for rapid detection of infectious *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) with
 531 reduced false-positive results from endogenous viral elements. *Aquaculture* **510**, 131-
 532 137 (2019).
- 533 29. Panek, J. & Frac, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for
 534 detection of heat-resistant *Talaromyces flavus* species. *Sci. Rep.* **9**, 5846 (2019).
- 535 30. Zhu, C.Q. *et al.* Fluorescence enhancement method for the determination of nucleic
 536 acids using cationic cyanine as a fluorescence probe. *Analyst* **129**, 254-258 (2004).

- 537 31. Ditmangklo, B., Taechalertrpaisarn, J., Siriwong, K. & Vilaivan, T. Clickable styryl dyes
538 for fluorescence labeling of pyrrolidinyl PNA probes for the detection of base mutations
539 in DNA. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 9712-9725 (2019).
- 540 32. Johnson, W.M. *et al.* Detection of gene for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic
541 shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J.*
542 *Clin. Microbiol.* **29**, 426-430 (1991).
- 543 33. Sharma, N.K., Rees, C.E. & Dodd, C.E. Development of a single-reaction multiplex
544 PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* Stains. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**,
545 1347-1353 (2000).
- 546 34. Reischl, U., Linde, H.J., Metz, M., Leppmeier, B. & Lehn, N. Rapid identification of
547 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using
548 real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2429-2433 (2000).
- 549 35. Sowmya, N., Thakur, M.S. & Manonmani, H.K. Rapid and simple DNA extraction
550 method for the detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* directly from food
551 samples: comparison of PCR and LAMP methods. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 106–113
552 (2012).
- 553 36. Specifications and Standards for Foods, Food Additives, etc. Under the Food Sanitation
554 Act. Online material: [https://www.jetro.go.jp/ext_images/en/reports/regulations/pdf/](https://www.jetro.go.jp/ext_images/en/reports/regulations/pdf/foodext2010e.pdf)
555 [foodext2010e.pdf](https://www.jetro.go.jp/ext_images/en/reports/regulations/pdf/foodext2010e.pdf) (2011).
- 556 37. Deligeorgiev, T., Vasilev, A., Kaloyanova, S., & Vaquero, J.J. Styryl dyes – synthesis
557 and applications during the last 15 years. *Color Technol.* **126**, 55-80 (2010).

- 558 38. Nimitphak, T., Kiatpathomchai, W. & Flegel, T.W. Shrimp hepatopancreatic parvovirus
559 detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow
560 dipstick. *J. Virol. Methods* **154**, 56-60 (2008).
- 561 39. Han, G., Kim, D., Park, Y., Bouffard, J. & Kim, Y. Excimers beyond pyrene: a far-red
562 optical proximity reporter and its application to the label-free detection of DNA. *Angew.
563 Chem. Int. Ed.* **54**, 3912-3916 (2015).
- 564 40. Xu, Z., Peters, B.M., Li, B., Li, L. & Shirtliff, M.E. Significance, prevention and control
565 of food related diseases: staphylococcal food poisoning and novel perspectives in food
566 safety (ed. Makun, H.). doi: 10.5772/62177 (IntechOpen, 2016).
- 567 41. Jaroenram, W., Arunrut, N. & Kiatpathomchai, W. Rapid and sensitive detection of
568 shrimp yellow head virus using loop-mediated isothermal amplification and a
569 colorogenic nanogold hybridization probe. *J. Virol. Methods* **186**, 36-42 (2012).
- 570 42. Suebsing, R., Prombun, P., Srisala, J. & Kiatpathomchai, W. Loop-mediated isothermal
571 amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian
572 *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1254-1263
573 (2013).
- 574 43. Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. & Rasmussen, O.F. Inhibition of PCR by
575 components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.
576 *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 37-45 (1992).
- 577 44. Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E. & Suzutani, T. Tolerance of loop-mediated
578 isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem.
579 Biophys. Methods* **70**, 499-501 (2007).

45. Xu, Z. *et al.* Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains. *Food Res. Int.* **47**, 166-173 (2012).
46. Wang, L., Li, Y., Chu, J., Xu, Z. & Zhong, Q. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 445-9 (2012).
47. Zhao, X. *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains and virulent factors by loop-mediated isothermal amplification assays. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 1191–1197 (2010).
48. Zhao, X. *et al.* Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 2183-2188 (2010).

Acknowledgements

The authors would like to thank Louis Pitcher for language editing. This research was supported by Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University (to N. Somboonna), and Thailand Research Fund (RGU6180001).

Authors' Contributions

GS, BD and IC performed experiments. JT and SK advised. DD helped draft manuscript. TV coordinated experiment on fluorescent dyes and revised manuscript. NS

conceived of the study, coordinated and participated in experiments and data analyses,
drafted and revised manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

Figure Captions

Figure 1. Limit of *sea* detection by (A) PCR, (B) Goto's LAMP incubation period 30 min and temperatures 60, 63 and 65 °C, and (C) our LAMP incubation period 15 min and temperatures 60, 63 and 65 °C, using *S. aureus* ATCC13565 as template.

Lane M represents 100 bp DNA ladder (GeneDireX Inc.); N, no template control; 1, 9.7 ng; 2, 0.97 ng; 3, 0.097 ng; 4, 9.7 pg; 5, 0.97 pg; 6, 0.097 pg; 7, 9.7 fg (equivalent to 3.2 *sea* copies); 8, 0.97 fg.

Figure 2. Specificity of *sea* detection by (A) PCR, (B) Goto's optimal LAMP condition (60 °C 30 min), and (C) our LAMP optimal condition (63 °C 15 min).

Lane M represents 100 bp DNA ladder (GeneDireX Inc.); N, no template control; 1, *S. aureus* ATCC13565; 2, *S. aureus* ATCC25928; 3, *S. aureus* ATCC144925; 4, *S. epidermidis* ATCC12228; 5, *S. saprophyticus* ATCC15305; 6, *V. funisii*; 7, *S. flexneri*; 8, *E. coli* ATCC25922; 9, *E. coli* ATCC35218; 10, *S. typhimurium* ATCC14026; 11, *E. cloacae*; 12, *A. sobria*; 13, *E. faecalis* ATCC25912.

623

624 **Figure 3.** (A) Specificity, and sensitivity determined by (B) visual color and (C)
 625 spectrophotometry of LAMP-AuNP.

626 In A, tube N represents no template control; 1, *S. aureus* ATCC13565; 2, *S. aureus* ATCC
 627 25923; 3, *S. aureus* ATCC25928; 4, *S. aureus* ATCC144925; 5, *S. epidermidis* ATCC12228;
 628 6, *S. saprophyticus* ATCC15305; 7, *V. funissii*; 8, *S. flexneri*; 9, *E. coli* ATCC25922; 10, *E.*
 629 *coli* ATCC35218; 11, *S. typhimurium* ATCC14026; 12, *E. cloacae*; 13, *A. sobria*; 14, *E.*
 630 *faecalis* ATCC25912.

631 In B and C, *S. aureus* ATCC13565 DNA was as template; lane 1, 9.7 ng/μL; 2, 0.97 ng/μL;
 632 3, 0.097 ng/μL; 4, 9.7 pg/μL; 5, 0.97 pg/μL; 6, 0.097 pg/μL; 7, 9.7 fg/μL; 8, 0.97 fg/μL.

633

634 **Figure 4.** (A) Chemical structure of STR dye, and (B) photograph of STR dye (5 μM) with
 635 various LAMP samples at 80-fold dilution under UV light (315 nm).

636 Tube 1 represents no LAMP product; 2-4 are LAMP products obtained from crude lysis DNA
 637 of *S. aureus* ATCC13565 (10, 100 and 1,000 CFU); 5, *E. coli* (1,000 CFU).

638

639 **Figure 5.** Accepted quantitative equation from 315 nm UV irradiation reading to CFU by (A)
 640 Goodness of fit (R^2) of 0.99 from 5 independent experiments, and (B) blind testing with
 641 LAMP samples of known *S. aureus* sea concentrations (10, 100 and 1,000 CFU) and other
 642 bacterial species (negative).

643

644

645 **Tables**

646 **Table 1.** Specificity comparing between culture method by ISO/IEC 17025 laboratory and
 647 our crude DNA lysis coupled LAMP-AuNP on ground pork and milk samples spiked-in live
 648 individual bacterial strain at 10^5 CFU per g of ground pork (or mL of milk).
 649 Record result of culture method was CFU/g (ground pork) or CFU/mL (milk), and when the
 650 culture resulted < 10 CFU the analysis was recorded undetermined as “+/-”.

Pork	Culture (CFU/g)	LAMP-AuNP	Milk	Culture (CFU/mL)	LAMP-AuNP
<i>S. aureus</i> ATCC13565	+ (3,000,000)	+	<i>S. aureus</i> ATCC13565	+ (360,000)	+
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+ ($< 110,000,000$)	+	<i>S. aureus</i> ATCC25923	+ ($< 110,000,000$)	+
<i>S. aureus</i> ATCC25928	+ ($< 110,000,000$)	-	<i>S. aureus</i> ATCC 25928	+ ($< 110,000,000$)	-
<i>S. aureus</i> ATCC144925	+ ($< 110,000,000$)	-	<i>S. aureus</i> ATCC144925	+ ($< 110,000,000$)	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	+/- (< 10)	-	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	+/- (< 10)	-
<i>S. saprophyticus</i> ATCC15305	+/- (< 10)	-	<i>S. saprophyticus</i> ATCC15305	+/- (< 10)	-
<i>V. funissii</i>	+/- (< 10)	-	<i>V. funissii</i>	+/- (< 10)	-
<i>S. flexneri</i>	+/- (< 10)	-	<i>S. flexneri</i>	+/- (< 10)	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	+/- (< 10)	-	<i>E. coli</i> ATCC25922	+/- (< 10)	-
<i>E. coli</i> ATCC35218	+/- (< 10)	-	<i>E. coli</i> ATCC35218	+/- (< 10)	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC14026	+/- (< 10)	-	<i>S. typhimurium</i> ATCC14026	+/- (< 10)	-
<i>E. cloacae</i>	+/- (< 10)	-	<i>E. cloacae</i>	+/- (< 10)	-
<i>A. sobria</i>	+/- (< 10)	-	<i>A. sobria</i>	+/- (< 10)	-
<i>E. faecalis</i> ATCC25912	+/- (< 10)	-	<i>E. faecalis</i> ATCC25912	+/- (< 10)	-

651

652 **Table 2.** Sensitivity comparing between culture method by ISO/IEC 17025 laboratory (10-
653 10^5 CFU per g of ground pork, or mL of milk) and our crude DNA lysis coupled LAMP-
654 AuNP (1- 10^5 CFU per g of ground pork, or mL of milk) using spiked-in live *S. aureus*
655 ATCC13565.

Pork (CFU/g)	Culture (CFU/g)	LAMP-AuNP	Milk (CFU/mL)	Culture (CFU/mL)	LAMP-AuNP
10^5	+ (3,000,000)	+	10^5	+ (360,000)	+
10^4	+ (320,000)	+	10^4	+ (34,000)	+
10^3	+/- (< 10)	+	10^3	+ (1,900)	+
10^2	+/- (< 10)	+	10^2	+ (235)	+
10	+/- (< 10)	+	10	+ (20)	+
1	N/A*	-	1	N/A	-

656 N/A represents data is not available, because 1 CFU spiked-in experiment was not performed
657 for the culture method.

658

659

660 **Table 3.** Comparison of assay efficacies between culture method by ISO/IEC 17025
 661 laboratory and our crude DNA lysis coupled with LAMP-AuNP, against reference *sea*
 662 detection method (GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis) followed by *sea* PCR)^{24,30}
 663 on 40 ground pork and 40 milk samples surveillance from local markets in Bangkok and
 664 nearby provinces

Samples	Reference <i>sea</i> detection method (number)	Culture method		Crude DNA extraction coupled LAMP-AuNP	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Pork	Positive (7)	0	7	7	0
	Negative (33)	3	30	0	33
	Sensitivity	0.00		1.00	
	Specificity	0.90		1.00	
	False Positive	0.10		0.00	
	False Negative	1.00		0.00	
	Accuracy	0.75		1.00	
Milk	Positive (5)	2	3	5	0
	Negative (35)	1	34	1	34
	Sensitivity	0.40		1.00	
	Specificity	0.97		0.97	
	False Positive	0.03		0.03	
	False Negative	0.60		0.00	
	Accuracy	0.90		0.975	

667

บันทึกข้อตกลงการรับคำขอ

1901005841

ส่วนราชการ กองสิทธิบัตร

เลขที่บันทึกข้อตกลง A256204322

วันที่ 20 เดือน กันยายน พ.ศ. 2562

ส่วนที่ 1: สำหรับผู้ยื่นคำขอ

ข้าพเจ้า (ชื่อ-สกุล) นายมงคล วรรณมพิทักษ์ ที่อยู่ สถาบันทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัย
254

หมู่ที่ ตระก/ซอย ถนน พญาไท ตำบล/แขวง วังใหม่
อำเภอ/เขต ปทุมวัน จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330 เบอร์โทรศัพท์ 02-2184180

อีเมล หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3101600911378

ได้มายื่นคำขอ คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร เลขที่ 1901005841

ส่วนที่ 2: สำหรับพนักงานเจ้าหน้าที่

ข้าพเจ้า (ชื่อ-สกุล) นางสาวจันทร์สุดา จันทร์รุ่ง ตำแหน่ง พนักงานเจ้าหน้าที่
ได้ตรวจสอบเอกสารประกอบการยื่นคำขอ คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร เลขที่ 1901005841

แล้วเห็นว่าผู้ยื่นคำขอได้ยื่นเอกสารตามแบบรายการเอกสาร (Checklist) ตามที่แนบแล้วปรากฏว่า

☒ เอกสารไม่ครบถ้วนโดยมีรายละเอียดตามแบบรายการเอกสาร (Checklist) ตามแนบ

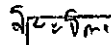
จึงได้แจ้งให้ผู้ยื่นคำขอดำเนินการแก้ไขให้ถูกต้องครบถ้วนแล้ว และผู้ยื่นคำขอตกลงว่าจะดำเนินการ

การแก้ไขหรือยื่นเอกสารเพิ่มเติมภายในวันที่ 19 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2562

(ระยะเวลาที่แก้ไขเพิ่มเติมหรือส่งเอกสารให้ครบถ้วน จะต้องไม่เกิน 90 วันนับแต่วันที่ผู้ยื่นคำขอ)

"บันทึกข้อตกลงการรับคำขอ" นี้ทำขึ้นสองฉบับ โดยมีข้อความถูกต้องตรงกัน ทั้งสองฝ่ายได้อ่าน
และเข้าใจโดยตลอด จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นหลักฐานสำคัญ และพนักงานเจ้าหน้าที่ได้มอบสำเนาให้ผู้ยื่น
คำขอไว้เป็นหลักฐานหนึ่งฉบับด้วยแล้ว

ลงชื่อ  พนักงานเจ้าหน้าที่ ลงชื่อ  ผู้ยื่นคำขอ
(นางสาวจันทร์สุดา จันทร์รุ่ง) (นายมงคล วรรณมพิทักษ์)

ลงชื่อ  พนักงานเจ้าหน้าที่
(นางสาวปิยะฉัตร เนียมแสง)

หมายเหตุ 1. ในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอไม่แก้ไขเพิ่มเติมคำขอหรือไม่ส่งเอกสารหรือหลักฐานเพิ่มเติมตามที่พนักงานเจ้าหน้าที่แจ้งหรือตามที่ปรากฏ
ในบันทึกข้อตกลงการรับคำขอ พนักงานเจ้าหน้าที่จะคืนคำขอให้แก่ผู้ยื่นคำขอ พร้อมทั้งแจ้งเป็นหนังสือถึงผู้ยื่นคำขอและสิทธิในการ
อุทธรณ์ให้ผู้ยื่นคำขอทราบ ทั้งนี้ เมื่อผู้ยื่นคำขอได้ชำระค่าธรรมเนียมใดๆ ให้แก่ กรมทรัพยากรชีวภาพไปแล้ว จะขอคืนค่าธรรมเนียม
ดังกล่าวไม่ได้ไม่ว่าในกรณีใดๆ เว้นแต่ (1) มีกฎหมายบัญญัติไว้ให้ คืนค่าธรรมเนียม หรือ (2) ชำระค่าธรรมเนียมตั้งก่อนหรือชำระคืนซึ่งการ
ชำระดังกล่าว เกิดขึ้นจากความผิดพลาดของเจ้าหน้าที่รัฐ โดยมีข้อความของผู้ชำระซึ่งกรมทรัพยากรชีวภาพจะได้นำพิจารณาเป็นกรณีไป
2. ในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอหรือตัวแทนผู้ยื่นคำขอไม่มีอำนาจโดยมอบหมายให้บุคคลอื่นเป็นผู้ยื่นคำขอแทน
ควรมีหนังสือมอบอำนาจล่วงหน้าหรือหนังสือมอบอำนาจเฉพาะการให้บุคคลนั้นมีอำนาจยื่นคำขอและลงนามในบันทึกข้อตกลงการรับคำขอแทน
ผู้ยื่นคำขอหรือตัวแทนผู้ยื่นคำขอไม่ถูกต้องหรือเอกสารหลักฐานไม่ครบถ้วนและบุคคลผู้ยื่นคำขอไม่มีอำนาจลงนามในบันทึกดังกล่าว
เจ้าหน้าที่ไม่อาจรับคำขอของท่านไว้ได้

รายการเอกสารหลักฐาน (Checklist)

ประกอบการยื่นคำขอ

วันที่รับคำขอ

20 กันยายน 2562

เลขที่คำขอ

1901005841

ประเภทคำขอ	☒ ผู้ขอเป็นนิติบุคคล	☐ ผู้ขอเป็นบุคคลธรรมดา
☒ สิทธิบัตรการประดิษฐ์	☒ ไทย	ครบกำหนดระยะเวลายื่นแก้ไขพร้อมส่งเอกสารเพิ่มเติม วันที่ 19 ธันวาคม 2562
☐ อนุสิทธิบัตร	☐ ต่างประเทศ	
☒ ยกเว้นค่าธรรมเนียม ☒ หนังสือมอบอำนาจช่วงหรือหนังสือมอบอำนาจเฉพาะกาล** (กรณีผู้ได้รับการมอบอำนาจจากผู้ยื่นคำขอได้มอบอำนาจช่วงให้บุคคลอื่นเป็นผู้ยื่นคำขอแทน) (ถ้ามี)	รายการเอกสาร	
	☒ แบบพิมพ์คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร** ☒ (รายละเอียดการประดิษฐ์ ☒ ข้อถ้อยสิทธิ ☒ รูปเขียน ☒ บทสรุปการประดิษฐ์) ☐ รายละเอียดภาษาต่างประเทศ (☐ มี ☐ ไม่มี) ☐ คำแปล (☐ มี ☐ ไม่มี) ☐ คำขอถ้อยสิทธิวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นครั้งแรก	
	เอกสารประกอบคำขอ	
	☒ ต้นฉบับหรือสำเนาของหนังสือมอบอำนาจ ☒ ตามกฎหมายไทย (☐ มี ☒ ไม่มี) ☐ ตามกฎหมายต่างประเทศ/รับรองโดยโนตารีปับลิก (☐ มี ☐ ไม่มี) ☐ คำแปล (☐ มี ☐ ไม่มี)	
	☒ หนังสือ/สัญญาโอนสิทธิ ☒ ตามกฎหมายไทย (☐ มี ☒ ไม่มี) ☐ ตามกฎหมายต่างประเทศ/รับรองโดยโนตารีปับลิก (☐ มี ☐ ไม่มี) ☐ คำแปล (☐ มี ☐ ไม่มี)	
	☐ คำรับรองเกี่ยวกับสิทธิขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร (ใช้ในกรณีที่ผู้ประดิษฐ์เป็นผู้ขอเองหรือขอร่วมกับบุคคลอื่นๆ) (☐ มี ☐ ไม่มี)	
	☐ ต้นฉบับหรือสำเนาหนังสือรับรองนิติบุคคล ซึ่งออกให้ไม่เกิน 6 เดือน หรือเอกสารตามกฎหมายว่าด้วยการจัดตั้งนิติบุคคล (☐ มี ☐ ไม่มี)	
	☒ สำเนาบัตรประจำตัวประชาชนพร้อมรับรองสำเนาถูกต้อง ☒ ผู้ประดิษฐ์ (☐ มี ☒ ไม่มี)	
	☒ ผู้ขอรับสิทธิบัตร (☐ มี ☒ ไม่มี) (เช่น กรรมการบริษัท หัวหน้าส่วนราชการ ผู้ได้รับมอบอำนาจให้ลงนามแทน อธิการบดี ประธานมูลนิธิ เป็นต้น)	
	☒ เอกสารอื่นใดที่ผู้ยื่นคำขอได้อ้างถึงในคำขอและเป็นประโยชน์ในการพิจารณาคำขอ (ถ้ามี). ขาดคำสั่งแต่งตั้งฯ, ขาดพระราชบัญญัติ	

หมายเหตุ : 1. กรณีที่คำขอหรือเอกสารหลักฐานไม่ถูกต้องครบถ้วน เจ้าหน้าที่จะจัดทำบันทึกความบกพร่องของรายการเอกสารหรือเอกสารหลักฐานที่ต้องยื่นเพิ่มเติม โดยผู้ยื่นคำขอจะต้องดำเนินการแก้ไขและยื่นเอกสารเพิ่มเติมภายในกำหนดระยะเวลา 90 วันนับแต่วันที่ผู้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร และในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอไม่ดำเนินการส่งเอกสารเพิ่มเติมให้ครบถ้วนภายในกำหนดระยะเวลาดังกล่าวให้ถือว่าผู้ยื่นคำขอละทิ้งคำขอ โดยเจ้าหน้าที่จะดำเนินการคืนคำขอให้แก่ผู้ยื่นคำขอพร้อมทั้งแจ้งเหตุแห่งการคืนคำขอและสิทธิในการอุทธรณ์ให้ทราบด้วย

2. ในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอต้องนำเอกสารหรือหลักฐานหลายรายการมายื่นเพิ่มเติมให้ครบถ้วน (เช่น ผู้ยื่นคำขอมีเอกสารหรือหลักฐานมายื่นพร้อมกันทั้งหมดในคราวเดียวกัน)

3. ในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอต้องส่งสำเนาเอกสารหลักฐานให้ผู้ยื่นคำขอรับรองความถูกต้องของสำเนาเอกสารหลักฐานนั้นด้วย

4. ในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอต้องส่งเอกสารเป็นภาษาต่างประเทศ ให้ผู้ยื่นคำขอส่งเอกสารนั้นพร้อมด้วยคำแปลเป็นภาษาไทยของผู้แปลที่ได้รับการรับรองของผู้แปลว่าเป็นคำแปลที่ถูกต้อง

5. ในกรณีที่ผู้ยื่นคำขอหรือตัวแทนผู้รับมอบอำนาจไม่ได้เป็นผู้ยื่นคำขอด้วยตนเองโดยมอบหมายให้บุคคลอื่นเป็นผู้ยื่นคำขอแทน ควรมีหนังสือมอบอำนาจช่วงหรือหนังสือมอบอำนาจเฉพาะกาลให้บุคคลอื่นมีอำนาจยื่นคำขอและลงนามในบันทึกข้อตกลงการรับคำขอแทนผู้ยื่นคำขอหรือตัวแทนได้ เพราะหากคำขอไม่ถูกต้องหรือเอกสารหลักฐานไม่ครบถ้วนและบุคคลผู้ยื่นคำขอไม่มีอำนาจลงนามในบันทึกดังกล่าว เจ้าหน้าที่ไม่อาจรับคำขอของท่านไว้ได้



สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 254 อาคารเฉลิมราชกุมารี 60 พรรษา (อาคารจามจุรี 10) ชั้น 2 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
 Chulalongkorn University Intellectual Property Institute
 254 Chaloem Rajakumari 60 Building 2nd Floor, Phayathai Road, Wangmai, Pathumwan, Bangkok, 10300, Thailand
 Tel: (+66) 2-218-4195-7 E-Mail: info@cuip.chula.ac.th Website: www.cuip.chula.ac.th

สำเนา

20 กันยายน 2562

ฝ่ายรับคำขอขึ้น ๓
กองสิทธิบัตร 1901005841
เลขรับที่.....
วันที่ 20 ก.ย. 2562

เรื่อง ขออนุญาตยื่นการส่งเอกสารประกอบคำขอรับสิทธิบัตร

เรียน ผู้อำนวยการกองสิทธิบัตร

ด้วยสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้รับมอบหมายจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้ดำเนินการยื่นคำขอรับสิทธิบัตร เรื่อง "กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่" โดยผู้ประดิษฐ์ นายวี วงษ์เทียนกุล ตัวแทนสิทธิบัตรเลขที่ 2520 เป็นผู้ดำเนินการ ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างการดำเนินการให้ผู้ที่เกี่ยวข้องลงนามในสัญญาโอนสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร และหนังสือมอบอำนาจซึ่งจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาหนึ่งในการดำเนินการ แต่เนื่องจากการผลงานทางประดิษฐ์มีความประสงค์จะเผยแพร่ผลงานวิจัย ซึ่งหากมีการนำไปเผยแพร่ผลงานก่อนที่จะได้มีการยื่นคำขอรับสิทธิบัตรเข้าพิจารณาแล้วจะส่งผลต่อการพิจารณาจดทะเบียนของคำขอรับสิทธิบัตรฉบับนี้ได้

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ข้าพเจ้าจึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติผ่อนผันการยื่นเอกสารประกอบคำขอรับสิทธิบัตรพร้อมกับคำขอรับสิทธิบัตรด้วย จักขอบพระคุณยิ่ง

ขอแสดงความนับถือ

(นายวี วงษ์เทียนกุล)

ผู้รับมอบอำนาจ

ตัวแทนสิทธิบัตร เลขที่ 2520



สำเนา

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
 ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 20 ก.ย. 2562

เลขที่คำขอ

วันยื่นคำขอ 20 ก.ย. 2562

1901005841

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
 ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☒ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ

ชื่อ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ 254 ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่

อำเภอ/เขต ปทุมวัน

จังหวัด กรุงเทพมหานคร

รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล

☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☒ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร

0 9 9 1 0 1 5 9 0 7 2

☒ เพิ่มเติม (ตั้งแบบ)

ในกรณีที่มีการทำ สือสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☒ อีเมลตัวแทน

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ

☒ ผู้รับโอน

☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

สำหรับสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร และประกาศคณะกรรมการสิทธิบัตร

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

ชื่อ นายวี วงษ์เทียนกุล

ที่อยู่ สถาบันทรัพยากรชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 อาคารเฉลิมราชกุมารี 60 พรรษา (อาคารจามจุรี 10) ชั้น 2 ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่

อำเภอ/เขต ปทุมวัน

จังหวัด กรุงเทพฯ

รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล Veepayupong.w@chula.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน 3 1 9 1 1 0 0 0 7 1 7 1 1

☒ เพิ่มเติม (ตั้งแบบ)

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกับผู้ขอ

ชื่อ รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ

ที่อยู่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่

อำเภอ/เขต ปทุมวัน

จังหวัด กรุงเทพฯ

รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล Naraporn.S@chula.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน 3 1 0 1 9 0 0 3 8 4 4 1 1

☒ เพิ่มเติม (ตั้งแบบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่มีอาจะรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ กลุ่มวิศวกรรม

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)

☐ กลุ่มเคมี

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไบโอเคมี)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)

สิทธิบัตรการออกแบบ

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)

อนุสิทธิบัตร

☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)

☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)

8. การยื่นคำขออนุญาตจำหน่าย ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย ☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด				
วันแสดง	วันเปิดงานแสดง	ผู้จัด		
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ		10.2 วันที่ฝากเก็บ		10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอเป็นภาษา ☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ☐ ในการประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย			14. เอกสารประกอบคำขอ	
ก. แบบพิมพ์คำขอ	3	หน้า	☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์	7	หน้า	☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์	
ค. ข้อถ้อยสิทธิ	3	หน้า	☐ หนังสือมอบอำนาจ	
ง. รูปเขียน	4	รูป	3	หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ ☐ รูปเขียน		รูป		หน้า
☐ ภาพถ่าย		รูป		หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์	1	หน้า	☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ	
			☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย	
			☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ	
			☐ เอกสารอื่นๆ	
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน ☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก				
16. ลายมือชื่อ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☒ ตัวแทน  (นายวี วงษ์เทียนกุล)				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบต่อแนบท้าย แบบ สป/สพ/อสป/001-ก

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ชื่อ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

อยู่ที่ 9797/17-21 ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ ถนนพหลโยธิน

ตำบล/แขวง สามเสนใน อำเภอ/เขต พญาไท จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400 ประเทศ ไทย

อีเมล -

เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 009-4-00250119-3

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 02-278-8200

5.3 โทรสาร 02-298-0476

5. ตัวแทน(ถ้ามี)

ชื่อ นายมงคล แก้วมหา

อยู่ที่ สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 อาคารเฉลิมราชกุมารี 60 พรรษา (จามจุรี 10) ชั้น 2 ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่ อำเภอ/เขต ปทุมวัน จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล -

เลขประจำตัวประชาชน 3840100084785

5.1 ตัวแทนเลขที่ 1453

5.2 โทรศัพท์ 02-218-4195-7

5.3 โทรสาร 02-218-4198

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์

ชื่อ ศาสตราจารย์ ดร. จิรยุทธ วิไลวัลย์

อยู่ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่ อำเภอ/เขต ปทุมวัน จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล vtirayut@chula.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน 3-2007-00139-47-1

ชื่อ นางสาวสิริกานต์ จันทร์ประอบ

อยู่ที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่ อำเภอ/เขต ปทุมวัน จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล preaw-ja_845@hotmail.com

เลขประจำตัวประชาชน 1-7099-01000-06-0

ชื่อ นางสาวกชกร สุภวรรสภิตย์

อยู่ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่ อำเภอ/เขต ปทุมวัน จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล ks920920@gmail.com

เลขประจำตัวประชาชน 1-1499-00273-44-1

ชื่อ นางสาวบุญส่ง ดิษมังคัล

อยู่ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท

ตำบล/แขวง วังใหม่ อำเภอ/เขต ปทุมวัน จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330 ประเทศ ไทย

อีเมล boonsongd@gmail.com

เลขประจำตัวประชาชน 1-6108-00004-62-3

หน้า 1 ของจำนวน 7 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมติเอ็นเอสายคู่

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับสิ่งประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพด้านพันธุวิศวกรรมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมติเอ็นเอสายคู่ ซึ่งเป็นการพัฒนาสีย้อมติเอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับติเอ็นเอสายคู่ ร่วมกับการกรรมวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำหรับอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งได้แก่ ลูบเมดิเอเตทไอโซ

10 เทอมอลแอมพลิฟิเคชันและปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

การปนเปื้อนของแบคทีเรียสู่อาหารและเครื่องดื่ม และก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค นับเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่อาหารริมถนน (street food) ได้รับความนิยม เช่น ในประเทศไทย จึงมีความเสี่ยงสูง ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยจึงจำเป็นต้องมีการประกันคุณภาพอาหารเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและผู้ส่งออก ตัวอย่างเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยและมีผลกระทบสูง เช่น *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* และ *Bacillus cereus* การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เป็นได้ตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการและชีวอนามัยในการเตรียมอาหาร ฯลฯ ยกอาหารที่มักปนเปื้อนจาก *E. coli* เช่น ผักกาด ผักเขียว ผักสลัด นมเนย แป้ง เนื้อสัตว์ และถั่ว อาหารที่มักปนเปื้อน *S. aureus* เช่น เนื้อสัตว์และนม

20 ในปัจจุบัน วิธีมาตรฐานในการตรวจหาอาหารที่อาจปนเปื้อนแบคทีเรียมีสามวิธีหลัก ได้แก่ การคัดแยกเชื้อ (cultural methods) การใช้วิธีทางอิมมูโนวิทยา (immunological methods) และการทดสอบสารพันธุกรรม (nucleic acid based methods)¹ โดยการคัดแยกเชื้อจากอาหารที่ต้องการตรวจสอบทำได้โดยใช้อาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสม ตามด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้ ซึ่งมีข้อเสียคือใช้เวลา (5-7 วัน) เพราะต้องรอแบคทีเรียเจริญ มีความจำเพาะต่ำเนื่องจากเชื้อที่ไม่ต้องการอาจเจริญได้ง่าย

25 ต่อการปนเปื้อน มีความไวหรือขีดจำกัดในการตรวจหาคำ กล่าวคือต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณค่อนข้างมาก (100 มิลลิลิตร) ให้ผลไม่คงที่หากเชื้อมีปริมาณต่ำที่ระดับ 10-100 โคโลนี และมีค่าใช้จ่ายสูง (~500 บาทต่อการตรวจ) วิธีที่นิยมอีกวิธีคือวิธีทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งอาศัยหลักการจดจำของแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อที่สนใจ และใช้เอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีในการทำให้เกิดสีที่จำเพาะกับการจับกับเชื้อ ปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จในรูปแบบวิธีตรวจที่ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน (enzyme linked

30 immunosorbent assay, ELISA) และวิธีการตรวจหาแอนติเจนโดยการเคลือบแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนลาเท็กซ์เพื่อตรวจการเกาะกลุ่มกระจายที่กันหลุม (reverse passive latex agglutination, RPLA) แต่วิธีนี้แม้จะทำได้สะดวกเร็วกว่าการคัดแยกเชื้อ แต่ก็มีราคาแพงเนื่องจากต้นทุนในการผลิตแอนติบอดีที่สูง นอกจากนี้ การใช้แอนติบอดีบางครั้งยังมีปัญหาเรื่องแอนติบอดีที่อาจไม่จำเพาะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียง และในการให้ผลซ้ำ (reproducibility) กรณีความไม่แน่นอนใน

35 คุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีที่เตรียมได้ในแต่ละครั้ง อีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมมากขึ้นและมีศักยภาพที่จะมาแทนที่วิธีการคัดแยกเชื้อหรือวิธีทางอิมมูโนวิทยา คือวิธีการตรวจในระดับสารพันธุกรรมเนื่องจากให้ความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งโดยปกติจะทำได้สองรูปแบบคือการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยตรง ด้วยเครื่องเทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสรุ่นใหม่ (next generation sequencing) วิธีการนี้

แม้จะมีความถูกต้องแม่นยำสูง และให้ข้อมูลที่ละเอียดมาก แต่ก็มีค่าใช้จ่ายสูงมาก ไม่สามารถทำในห้องถิ่นหรือในภาคสนามได้ ดังนั้นอีกวิธีมาตรฐานที่นิยมในปัจจุบันคือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction, PCR) เข้าช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนใดยีนหนึ่งที่เป็นเครื่องหมายเฉพาะของแบคทีเรียที่สนใจจะตรวจสอบ ซึ่งถูกกำหนดโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม และจะต้องมีการนำไปตรวจสอบโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นว่าสอดคล้องกับที่ควรจะเป็นหรือไม่ แต่เทคนิคนี้ใช้เวลานาน (3-3.5 ชั่วโมงในการทำ PCR และ 0.5-1 ชั่วโมงในการวิเคราะห์ผลโดยการทำเจล) ต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาตรวจวัดที่มีราคาแพง อีกทั้งยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการวิเคราะห์และแปลผล

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่ายังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในอาหาร ที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ เป็นที่มาของปฏิกิริยาลูปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องเทอร์มอลไซเคิล (thermal cycler) ซึ่งมีข้อได้เปรียบในแง่ของความง่าย ความจำเพาะเจาะจง และประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เหนือกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยได้พัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และในสิทธิบัตรนี้ได้ดำเนินการร่วมกับสีย้อมสังเคราะห์ ทำให้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยสีย้อมประจุบวกซึ่งมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ได้แก่ 4-(4-(N,N-ไดเอทิลลามิโน)-2-(4-(ไตรเมทิลแลมโมเนียม)บิวทอกซี)เอทิล)-1-เมทิลควิโนลิเนียม ($4QL^{2+}$) (รูปที่ 1) โดยให้การเปลี่ยนแปลงสีที่อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าในการบ่งชี้ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงเหมาะกับการตรวจระดับห้องถิ่น หรือ ณ จุดดูแล (point-of-care) และการพัฒนาสู่ชุดตรวจสำเร็จรูป โดยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จการประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์ เพื่อการตรวจเชื้อและจดอนุสิทธิบัตรมาแล้วกว่า 10 เรื่อง ตัวอย่างเช่น ต้นแบบชุดตรวจยีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ *Staphylococcus aureus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษเชิงปริมาณที่มีความจำเพาะและความไวสูงโดยการผนวกเทคนิคแลมป์เข้ากับการใช้สีย้อมเรืองแสง ในสิทธิบัตรนี้ได้มีการพัฒนาต่อยอดโดยการใช้สีย้อม $4QL^{2+}$ ซึ่งเมื่อจับกับดีเอ็นเอสายคู่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นรูปแบบที่ใช้งานในระดับห้องถิ่นได้สะดวกกว่าการใช้สีย้อมเรืองแสง โดยได้สร้างต้นแบบสำหรับตรวจ *E. coli* และ *S. aureus* ยีนก่อโรค ในอาหารและน้ำดื่ม

E. coli เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ *E. coli* มีหลายสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อ เช่น โรคอุจจาระร่วง โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคระบบทางเดินปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น โดยโรคอุจจาระร่วงเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม อาทิเช่น เอนเทอโรท็อกซิเจนิกอีโคไล (ETEC) เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ เรียกเอนเทอโรทอกซิน ทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ และ เอนเทอโรฮีโมเรจิกอีโคไล (EHEC) สร้างสารพิษชิก้า ทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด เม็ดเลือดแดงแตก และไตวายเฉียบพลัน ทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ ทำให้คณะกรรมการอาหารยุโรป (European Commission, EU) จึงมีข้อบังคับปริมาณ *E. coli* ในเนื้อสัตว์และชิ้นเนื้อห้ามเกิน 50-500 และ 500-5000 จำนวนโคโลนี (colony forming units, CFU) ต่อกรัม ตามลำดับ ด้วยเหตุนี้การตรวจจับ *E. coli* ที่อาจปนเปื้อนจึงจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่ง

สารพิษสแตปฟีโลคอคคัลเอนเทอโรทอกซินเอ (staphylococcal enterotoxin A, SEA) จากแบคทีเรีย *S. aureus* พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ ทางเดินหายใจ และบนผิวหนังของมนุษย์จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ง่าย หากรับประทานอาหารที่ดิบหรือใช้ความร้อนและระยะเวลาในการปรุงไม่เพียงพอต่อการทำลาย SEA ซึ่งทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาถึง 30 นาที และที่ระดับ 143.3 องศา

หน้า 3 ของจำนวน 7 หน้า

เซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาที อีกทั้งแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ในสภาวะความเค็มระดับปานกลาง จึงทำให้เชื้อหรือสารพิษนี้ถูกพบได้ในอาหารที่หลากหลาย ได้แก่ อาหารประเภทไขมันและมีเชื้อคู่แข่งน้อย เช่น นม เนยแข็ง คัสตาร์ด ชนมอบ ไอศกรีม และเนื้อสัตว์ เป็นต้น โดยอาหารที่มีสารพิษสแตปฟีโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินเอนเป็นอันมากมีกลิ่น รส และสภาพอาหารปกติ ทำให้ผู้ผลิตและผู้บริโภค ไม่ทราบว่าอาหารนั้นมีสารพิษ

5 สแตปฟีโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินเอนเป็นอันอยู่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ การป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่มีเอนเทอโรทอกซินชนิดเอ (sea) ที่สามารถผลิตสารพิษสแตปฟีโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินเอนคือป้องกันการปนเปื้อนจากคน และสิ่งแวดล้อม สารพิษนี้ก่อให้เกิดโทษกับผู้บริโภคได้เมื่อได้รับในปริมาณตั้งแต่ 100 นาโนกรัมต่อ 100 กรัมของอาหาร และตามมาตรฐานอาหารกำหนดว่าอาหารที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ อาหารปรุงสุกทั่วไป และปรุงสุกแล้วแช่เย็น ต้องไม่มีการปนเปื้อนของ

10 *S. aureus* มากกว่า 100 เซลล์หรือ หน่วยก่อรูปโคโลนีหรือซีเอฟยู (colony forming units, CFU) ต่อกรัมของอาหาร อาการของโรคได้แก่ อาเจียน คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน ปวดบิดในท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ เป็นตะคริว และอาจมีอาการร่วมอื่นๆ เช่น ปวดศีรษะ เหงื่อออก หนาวสั่น ช็อค หรือมีเลือดปนในอุจจาระ โดยเฉพาะในเด็กเล็กและผู้สูงอายุอาการอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้

การพัฒนาเทคนิคลูโปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชันและปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ 4QL²⁺ เพื่อการอ่านผลทดสอบได้ด้วยตาเปล่า

การพัฒนาเทคนิคให้สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าที่มีประสิทธิภาพแม่นยำ รวดเร็ว ไม่ต้องการขั้นตอนหรือเครื่องมือที่ยุ่งยากซับซ้อนกรรมวิธีนี้จึงสามารถนำไปใช้ได้จริงนอกห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของสีย้อมสังเคราะห์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอสายคู่ 4QL²⁺ ผสมในสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูโปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ซึ่งทำ

20 หน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ความสำเร็จของการทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจ โดยการเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า กล่าวคือจากสีม่วง (ผลลบ) เป็นสีน้ำเงิน (ผลบวก)

ลักษณะและความมุ่งหมายของงานประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวกับกรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งเป็นพัฒนากรรมวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม ด้วยเทคนิคลูโปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (หรือปฏิกิริยา

25 ลูกโซ่พอลิเมอเรส) เปลี่ยนสีของสีย้อมดีเอ็นเอ 4QL²⁺ ที่ผสมลงในผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาแลมป์และพีซีอาร์ในอัตราส่วนจำเพาะ โดยวิธีการตรวจในระดับดีเอ็นเอนี้มีความไวต่อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่มีสารพิษ (เนื่องจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่มีสารพิษสามารถพบได้ทั่วไป) วิธีการตรวจสอบ รวดเร็ว

30 ง่ายต่อผู้ใช้งาน ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากซับซ้อน และประหยัดค่าใช้จ่าย

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้ คือเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรียก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม (*E. coli* และ *S. aureus*) แบบใหม่ด้วยเทคนิคลูโปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชันหรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เปลี่ยนสีของสีย้อมสังเคราะห์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอสายคู่ที่ทำการเพิ่มปริมาณ และสามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทาง ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ และใช้ระยะเวลาในการ

35 ตรวจที่รวดเร็ว เหมาะสำหรับการทดสอบทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวกับกรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งประกอบรวมด้วยขั้นตอนดังนี้

หน้า 4 ของจำนวน 7 หน้า

กรณี 1: แบบปฏิบัติการยาลูบเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (แลมป์) ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของเหลวปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร

ข. นำเอาผลิตภัณฑ์อาหารจากข้อ ก. เติมลงในสารละลายแลมป์เปลี่ยนสี ที่ประกอบไปด้วย

5 - เอาท์เทอร์ไพรเมอร์ Ec phoA F3 (ลำดับเบส 5'- AAGTTGAAGGTGCGTCAAT -3') และ Ec phoA B3 (5'- CTTGTGAATCCTCTTCGGAG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือ SEA_F3 (ลำดับเบส 5'- TCAATTTATGGCTAGACGGT -3') และ SEA_B3 (5'- CTTGAGCACCAAATAAATCG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 0.1-1 ไมโครโมลาร์

- อินเนอร์ไพรเมอร์ Ec phoA FIP (5'-

10 GTGATCAGCGGTGACTATGACCTCTCGATGAAGCCGT ACA -3') และ Ec phoA BIP (5'- ATTGTCGCGCCGGATACCCTCATCACCATCACTGCG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือ SEA_FIP (ลำดับเบส 5'- GATCCAACCTCCTGAACAGTTACAATACA GTACCTTTGGAAACG -3') และ SEA_BIP (5'- CTGATGTTTTTGTATGGGAAGGTTCCCGAAGG TTCTGTAGAAGT -3') สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 0.5-5 ไมโครโมลาร์

15 - ลูปไพรเมอร์ Ec phoA LF (5'- AGCGTGTGGCCATCCTTT -3') และ Ec phoA LB (5'- CAGGCGCTAAATACCAAAGATG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือ SEA_LF (ลำดับเบส 5'- CGTCAGTTAAAAATGTCGTATGAT-3') และ SEA_LB (5'- AGAGGGGATTAATCGTGTTCAT -3') สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 0.5-5 ไมโครโมลาร์

- สารดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs)

20 0.5-5 มิลลิโมลาร์

- สารเบตาอิน 0.1-3 โมลาร์

- สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 1-10 มิลลิโมลาร์

- เอนไซม์ *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) ดีเอ็นเอ โพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) 3-20 หน่วย

25 - บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 1 เท่า (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 มิลลิโมลาร์, KCl 10 มิลลิโมลาร์, MgSO_4 2 มิลลิโมลาร์, Triton X-100 0.1 เปอร์เซ็นต์, pH 8.8)

- น้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้ 15 ไมโครลิตร

- นำส่วนผสมจากข้อ ข. อุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-90 นาที

30 ค. วิเคราะห์ผลโดยนำผลิตภัณฑ์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมในน้ำหรือในทริสบัฟเฟอร์ 7.5 ไมโครลิตร และสีย้อม 0.5 ไมโครลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อม 4QL^{2+} เท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์ และอ่านผลด้วยตาเปล่าทันที โดยสีม่วงแสดงผลทดสอบลบ สีน้ำเงินแสดงผลทดสอบบวก หมายถึงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ

35 กรณี 2: แบบปฏิบัติการยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (พีซีอาร์) ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของเหลวปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร

ข. นำเอาผลิตภัณฑ์อาหารจากข้อ ก. เติมลงในสารละลายแลมป์เปลี่ยนสี ที่ประกอบไปด้วย

หน้า 5 ของจำนวน 7 หน้า

- ไพรมเมอร์ Ec phoA F3 และ Ec phoA B3 สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือไพรมเมอร์ SEA-F และ SEA-R สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 1-1 ไมโครโมลาร์

- สารดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) 0.2-2 มิลลิโมลาร์

- 5 - เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) 5-20 หน่วย
- บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10 เท่า
- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 1-2 มิลลิโมลาร์
- สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ 1 อัดโดกรัม – 500 นาโนกรัม

- 10 - น้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้ 25 ไมโครลิตร
- นำส่วนผสมทั้งหมดมาทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่องเทอร์มอลไซเคิล โดย ฟิชอาร์ สำหรับ *E. coli* เริ่มจาก 95°C เป็นเวลา 2-4 นาที ตามด้วย 30 รอบของ

- 15 { ขั้นการแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) 94-96°C เป็นเวลา 30-60 วินาที
- { ขั้นการจับของไพรมเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) 60-65°C เป็นเวลา 40-60 วินาที
- { ขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) 70-72°C เป็นเวลา 1-1.45 นาที
- และขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ที่ 72°C เป็นเวลา 7-10 นาที

ฟิชอาร์ สำหรับ *S. aureus* เริ่มจาก 94°C เป็นเวลา 2-4 นาที ตามด้วย 30 รอบของ

- 20 { ขั้นการแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) 94-96°C เป็นเวลา 2-20 วินาที
- { ขั้นการจับของไพรมเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) 50-55°C เป็นเวลา 2-4 นาที
- { ขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) 70-72°C เป็นเวลา 1-4 นาที
- และขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) ที่ 72°C เป็นเวลา 7-10 นาที

- 25 ค. วิเคราะห์ผลโดยนำผลิตภัณฑ์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมในน้ำหรือในทริสบัฟเฟอร์ 7.5 ไมโครลิตร และสีย้อม 0.5 ไมโครลิตรให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อม 4QL²⁺ เท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์และอ่านผลด้วยตาเปล่าทันที โดยสีม่วงแสดงผลทดสอบลบ สีน้ำเงินแสดงผลทดสอบบวกหมายถึงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ

2. กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ 4-(4-(N,N- ไดเอทิลลามิโน)-2-(4-(ไตรเมทิลแลมโมเนียม)บิวทอกซี)เอทิล)-1-เมทิลควิโนลิเนียม (4QL²⁺) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- ก. การสังเคราะห์ 1,4-ไดเมทิลควิโนลิเนียม ไอโอไดด์ โดยผสม 4-เมทิลควิโนลีน (0.66 มิลลิลิตร, 5 มิลลิโมล) และไอโอโดเมทาอิน (0.62 มิลลิลิตร, 10 มิลลิโมล) ในหลอดทดลองฝาเกลียว ให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองเก็บของแข็งที่เหลือทิ้งได้ด้วยวิธีการกรองสุญญากาศ ล้างของแข็งที่ได้ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ 1,4-ไดเมทิลควิโนลิเนียม ไอโอไดด์ 1.4188 กรัม
- 30

หน้า 6 ของจำนวน 7 หน้า

ข. การสังเคราะห์ 4-(N,N-ไดเอทิลามีน)-2-(4-(ไตรเมทิลแอมโมเนียม)บิวทอกซีเบนซาลดีไฮด์) โดยผสม 4-(ไดเอทิลามีน)-2-ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ (0.4831 กรัม, 2.5 มิลลิโมล), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (0.691 กรัม, 5 มิลลิโมล) และ 1,4-ไดโพรโมบิวเทน (0.36 มิลลิลิตร, 3 มิลลิโมล) ในแอนไฮดรัส DMF (3 มิลลิลิตร) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำของผสมที่ได้มาเจือจางด้วยไดคลอโรมีเทนและสกัดด้วยน้ำเพื่อกำจัด DMF จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ และทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาละลายในเททระไฮโดรฟิวแรน (5 มิลลิลิตร) เติมไตรเมทิลามีน (1 มิลลิลิตร) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ ล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ จะได้ผลิตภัณฑ์ 0.5750 กรัม

ค. การสังเคราะห์ 4-(4-(N,N-ไดเอทิลามีน)-2-(4-(ไตรเมทิลแอมโมเนียม)บิวทอกซี)เอทิลนิล)-1-เมทิลควิโนลิเนียม (4QL²⁺) โดยละลาย 1,4-ไดเมทิลควิโนลิเนียม ไฮโอไดด์ (0.2850 กรัม, 1 มิลลิโมล) และ 4-(N,N-ไดเอทิลามีน)-2-(4-(ไตรเมทิลแอมโมเนียม)บิวทอกซีเบนซาลดีไฮด์) (0.3870 กรัม, 1 มิลลิโมล) ในเอทานอล (5 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนโดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองเก็บของแข็งสีน้ำตาลที่ไดด้วยวิธีการกรองสุญญากาศ ล้างของแข็งที่ได้ด้วยน้ำและเอทานอลตามลำดับ และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ 4QL²⁺ 0.1310 g (20% โดยน้ำหนัก) m.p. = 216-217 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.96-6.26 (m, 11H, aromatic region), 4.43 (s, 3H, N⁺-CH₃), 4.23 (s, 2H, (CH₃)₃N⁺-CH₂-), 3.50 (s, 6H, -N-(CH₂CH₃)₂), 3.09 (s, 9H, -N⁺-(CH₃)₃), 1.95 (s, 4H, -N-(CH₂CH₃)₂), 1.19 (s, 6H, -O-CH₂CH₂-). การใช้ประโยชน์จากการประดิษฐ์

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะในการตรวจสอบ สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียปนเปื้อน *E. coli* และ *S. aureus* และวิเคราะห์ผลโดยการอ่านสีด้วยตาเปล่า ดังแสดงผลในรูปที่ 3 และ 4 เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการระบาดของโรคจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม โดยเฉพาะกรณีที่มีปริมาณเชื้อเพียงไม่กี่เชื้อ เนื่องจากตรวจวัดโดยอาศัยการใช้ปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จึงให้ความไวสูง

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์สีย้อม 4QL²⁺
รูปที่ 2 ผลการทดสอบการเปลี่ยนสีของสีย้อม 4QL²⁺ ในการตรวจสอบความสำเร็จในการทำปฏิกิริยาโดยใช้สีย้อมความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร

หลอดที่ 1 : สีย้อมในน้ำ

หลอดที่ 2 : สีย้อมในผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลลบ (*Staphylococcus aureus*)

หลอดที่ 3 : สีย้อมในผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลบวก (*Escherichia coli*)

รูปที่ 3 ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิคแลมป์เปลี่ยนสีของสีย้อม ในการตรวจหา *E. coli* เปรียบเทียบระหว่าง (ก) ด้วยตาเปล่า (ข) แยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอะกาโรส

หลอดหรือแถวที่ 1-2 : ผลผลิตแลมป์ที่เป็นบวก (positive control) ของ *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* MCCU 0349 ตามลำดับ

หลอดหรือแถวที่ 3-4 : ผลผลิตแลมป์ที่เป็นลบ (negative control) ของ *Enterobacter cloacae* และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ตามลำดับ

หลอดหรือแถวที่ 5 : ผลผลิตแลมป์ที่เป็นลบของน้ำเปล่า

หน้า 7 ของจำนวน 7 หน้า

แถว M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ใช้ OneMARK 100, GenDireX, Inc.)

รูปที่ 4 ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิคแลมป์เปลี่ยนสีของสีย้อม 4QL²⁺ ในการตรวจหา *S. aureus* เปรียบเทียบระหว่าง (ก) ด้วยตาเปล่าและ (ข) การแยกสารพันธุกรรมด้วย กระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอะกาโรส

5 หลอดหรือแถวที่ 1-3 : ผลผลิตแลมป์ที่เป็นบวก (positive control) ของ *S. aureus* ที่มียืน sea ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MCCU 0357 และ *S. aureus* MCCU 0370 ตามลำดับ

 หลอดหรือแถวที่ 4-5 : ผลผลิตแลมป์ที่เป็นลบ (negative control) ของ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 ตามลำดับ

 หลอดหรือแถวที่ 6 : ผลผลิตแลมป์ที่เป็นลบของน้ำเปล่า

10 แถว M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ใช้ OneMARK 100, GenDireX, Inc.)

 วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

 เหมือนที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

15

หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งประกอบรวมด้วยขั้นตอนดังนี้

กรณี 1: แบบปฏิกิริยาลูบเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (แลมป์) ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของเหลวปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร

ข. นำเอาผลิตภัณฑ์อาหารจากข้อ ก. เติมลงในสารละลายแลมป์เปลี่ยนสี ที่ประกอบรวมด้วย

- เอาท์เทอร์ไพรเมอร์ Ec phoA F3 (ลำดับเบส 5'- AAGTTGAAGGTGCGTCAAT -3')

และ Ec phoA B3 (5'- CTTGTGAATCCTCTTCGGAG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือ SEA_F3 (ลำดับ

เบส 5'- TCAATTTATGGCTAGACGGT -3') และ SEA_B3 (5'- CTTGAGCACCAAATAAATCG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 0.1-1 ไมโครโมลาร์

- อินเนอร์ไพรเมอร์ Ec phoA FIP (5'-

GTGATCAGCGGTGACTATGACCTCTCGATGAAGCCGT ACA -3') และ Ec phoA BIP (5'-

ATTGTCGCGCCGGATACCCCTCATCACCATCACTGCG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือ SEA_FIP (ลำดับ

เบส 5'- GATCCAACTCCTGAACAGTTACAATACA GTACCTTTGGAAACG -3') และ SEA_BIP (5'-

CTGATGTTTTTGTGAGGAAGGTTCCCGAAGG TTCTGTAGAAGT -3') สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 0.5-5 ไมโครโมลาร์

- ลูปไพรเมอร์ Ec phoA LF (5'- AGCGTGTGCCATCCTTT -3') และ Ec phoA LB

(5'- CAGGCGCTAAATACCAAAGATG -3') สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือ SEA_LF (ลำดับเบส 5'-

CGTCAGTTAAAAATGTCGTATGAT-3') และ SEA_LB (5'- AGAGGGGATTAATCGTGTTCAT -3') สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 0.5-5 ไมโครโมลาร์

- สารดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs)

0.5-5 มิลลิโมลาร์

- สารเบตาอิน 0.1-3 โมลาร์

- สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 1-10 มิลลิโมลาร์

- เอนไซม์ *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) ดีเอ็นเอ โพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) 3-20 หน่วย

- บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 1 เท่า (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 มิลลิโมลาร์, KCl 10 มิลลิโมลาร์, MgSO_4 2 มิลลิโมลาร์, Triton X-100 0.1 เปอร์เซ็นต์, pH 8.8)

- น้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้ 15 ไมโครลิตร

- นำส่วนผสมจากข้อ ข. อุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-90 นาที

ค. วิเคราะห์ผลโดยนำผลิตภัณฑ์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมในน้ำหรือในทริสบัฟเฟอร์ 7.5 ไมโครลิตร และสีย้อม 0.5 ไมโครลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อม 4QL^{2+} เท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์ และอ่านผลด้วยตาเปล่าทันที โดยสีม่วงแสดงผลทดสอบลบ สีน้ำเงินแสดงผลทดสอบบวก หมายถึงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ

หน้า 2 ของจำนวน 3 หน้า

กรณี 2: แบบปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรส (พีซีอาร์) ร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งประกอบด้วย
ขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของเหลวปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร

ข. นำเอาผลิตภัณฑ์อาหารจากข้อ ก. เติมนลงในสารละลายแลมป์เปลี่ยนสี ที่ประกอบไปด้วย

5 - ไพรเมอร์ Ec phoA F3 และ Ec phoA B3 สำหรับตรวจเชื้อ *E. coli* หรือไพรเมอร์ SEA-F และ SEA-R สำหรับตรวจเชื้อ *S. aureus* อย่างละ 1-1 ไมโครโมลาร์

- สารดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) 0.2-2 มิลลิโมลาร์

- เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) 5-20 หน่วย

10 - บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10 เท่า

- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 1-2 มิลลิโมลาร์

- สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ 1 อัดโตกรัม – 500 นาโนกรัม

- น้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้ 25 ไมโครลิตร

15 - นำส่วนประกอบทั้งหมดมาทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่องเทอร์โมลไซเคิล โดย พีซีอาร์ สำหรับ *E. coli* เริ่มจาก 95°C เป็นเวลา 2-4 นาที ตามด้วย 30 รอบของ

ขั้นการแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) 94-96°C เป็นเวลา 30-60 วินาที

ขั้นการจับของไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) 60-65°C เป็นเวลา 40-60 วินาที

ขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) 70-72°C เป็นเวลา 1-1.45 นาที

20 และขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ที่ 72°C เป็นเวลา 7-10 นาที

พีซีอาร์ สำหรับ *S. aureus* เริ่มจาก 94°C เป็นเวลา 2-4 นาที ตามด้วย 30 รอบของ

ขั้นการแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) 94-96°C เป็นเวลา 2-20 วินาที

ขั้นการจับของไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) 50-55°C เป็นเวลา 2-4 นาที

ขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) 70-72°C เป็นเวลา 1-4 นาที

25 และ ขั้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) ที่ 72°C เป็นเวลา 7-10 นาที

ค. วิเคราะห์ผลโดยนำผลิตภัณฑ์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมในน้ำหรือในทริสบัฟเฟอร์ 7.5 ไมโครลิตร และสีย้อม 0.5 ไมโครลิตรให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อม 4QL²⁺ เท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์และอ่านผลด้วยตาเปล่าทันที โดยสีม่วงแสดงผลทดสอบลบ สีน้ำเงินแสดงผลทดสอบบวกหมายถึงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ

30 2. กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ 4-(4-(N,N- ไดเอทิลลามีน)-2-(4-(ไตรเมทิลแอมโมเนียม)บิวทอกซี)เอทิล)-1-เมทิลควิโนลิเนียม (4QL²⁺) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า

ก. การสังเคราะห์ 1,4-ไดเมทิลควิโนลิเนียม ไอโอไดด์ โดยผสม 4-เมทิลควิโนลีน (0.66 มิลลิลิตร, 5 มิลลิโมล) และไอโอโดเมทาอิน (0.62 มิลลิลิตร, 10 มิลลิโมล) ในหลอดทดลองฝาเกลียว ให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองเก็บของแข็งที่เหลือที่ได้ด้วยวิธีกรองสุญญากาศ ล้างของแข็งที่ได้ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ 1,4-ไดเมทิลควิโนลิเนียม ไอโอไดด์ 1.4188 กรัม

5 ข. การสังเคราะห์ 4-(N,N-ไดเอทิลลามิโน)-2-(4-(ไตรเมทิลลามิเนียม)บิวทอกซีเบนซาลดีไฮด์) โดยผสม 4-(ไดเอทิลลามิโน)-2-ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ (0.4831 กรัม, 2.5 มิลลิโมล), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (0.691 กรัม, 5 มิลลิโมล) และ 1,4-ไดโบรโมบิวเทน (0.36 มิลลิลิตร, 3 มิลลิโมล) ในแอนไฮดรัส DMF (3 มิลลิลิตร) คนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำของผสมที่ได้มาเจือจางด้วยไดคลอโรมีเทนและสกัดด้วยน้ำเพื่อกำจัด DMF จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ และทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาละลายในเทระไฮโดรฟิวแรน (5 มิลลิลิตร) เติมไตรเมทิลามีน (1 มิลลิลิตร) คนที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ ล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ จะได้ผลิตภัณฑ์ 0.5750 กรัม

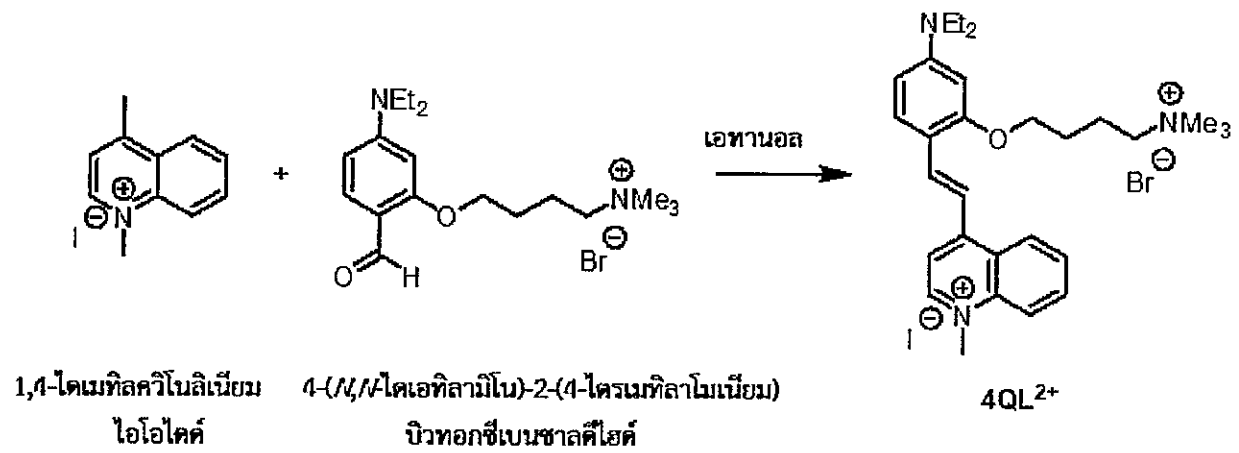
ค. การสังเคราะห์ 4-(4-(N,N- ไดเอทิลลามิโน)-2-(4-(ไตรเมทิลลามิเนียม)บิวทอกซี)เอทิลนิล)-1- เมทิลควิโนลิเนียม (4QL2+) โดยละลาย 1,4-ไดเมทิลควิโนลิเนียม ไอโอไดด์ (0.2850 กรัม, 1 มิลลิโมล) และ 4-(N,N-ไดเอทิลลามิโน)-2-(4-(ไตรเมทิลลามิเนียม)บิวทอกซีเบนซาลดีไฮด์) (0.3870 กรัม, 1 มิลลิโมล) ใน เอทานอล (5 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนโดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองเก็บของแข็งที่น้ำเงินม่วงที่ได้ ด้วยวิธีกรองสุญญากาศ ล้างของแข็งที่ได้ด้วยน้ำและเอทานอลตามลำดับ และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ 4QL²⁺ 0.1310 g (20% โดยน้ำหนัก) m.p. = 216-217 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.96-6.26 (m, 11H, aromatic region), 4.43 (s, 3H, N⁺-CH₃), 4.23 (s, 2H, (CH₃)₃N⁺-CH₂-), 3.50 (s, 6H, -N-(CH₂CH₃)₂), 3.09 (s, 9H, -N⁺-(CH₃)₃), 1.95 (s, 4H, -N-(CH₂CH₃)₂), 1.19 (s, 6H, -O-CH₂CH₂-).

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

- กรรมวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอสายคู่ ตามการประดิษฐ์นี้ เป็นพัฒนากรรมวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม ด้วยเทคนิคลูปเมดิเอเตดไอโซเทอมอลแอมพลิฟิเคชัน (หรือปฏิกิริยา
- 5 ลูกโซ่พอลิเมอร์) เปลี่ยนสีของสีย้อมดีเอ็นเอ 4QL²⁺ ที่ผสมลงในผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาแลมป์และพีซีอาร์ในอัตราส่วนจำเพาะ โดยวิธีการตรวจในระดับดีเอ็นเอนี้มีความไวต่อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์และ *S. aureus* สายพันธุ์ที่มีสารพิษ (เนื่องจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่มีสารพิษสามารถพบได้ทั่วไป) วิธีการตรวจสอบรวดเร็ว ง่ายต่อผู้ใช้งาน ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากซับซ้อน และประหยัดค่าใช้จ่าย

หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า



รูปที่ 1

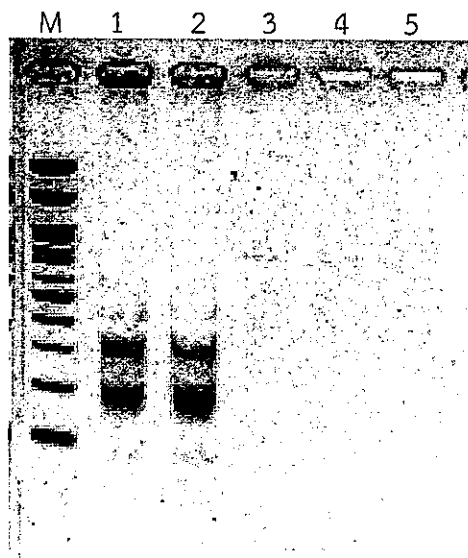


รูปที่ 2

หน้า 2 ของจำนวน 3 หน้า

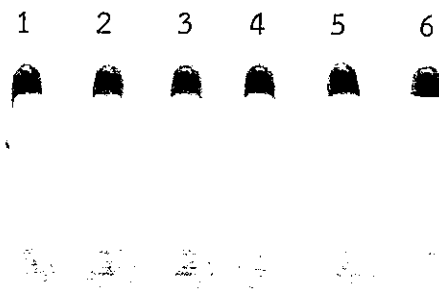


รูปที่ 3ก.

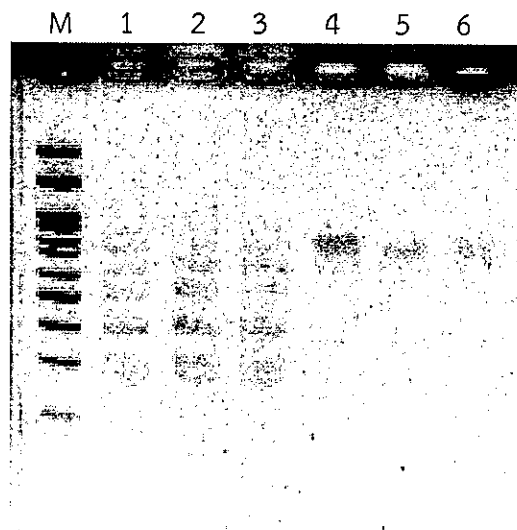


รูปที่ 3ข.

หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า



รูปที่ 4ก.



รูปที่ 4ข.

ภาคผนวก 3

การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ/ระดับชาติ



Oral Programme

Tuesday, 18 June 2019

15:00-18:00 Conference registration

18:00-19:00 Welcome Reception

Wednesday, 19 June 2019

08:30-09:00 Conference registration

08:30-08:40 Symposium welcome

08:40-10:20 *Session chair to be announced*

08:40-9:30 [INV01] Selective Catalytic Functionalization Reactions

John Hartwig, Berkeley College of Chemistry, USA

9:30-10:20 [INV02] Training Native Electrophiles

Yimon Aye, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland

10:20-10:50 Refreshment break

10:50-12:30 *Session chair to be announced*

10:50-11:40 [INV03] Control of Chemistry and Biology in Four Dimensions

Karl Gademann, University of Zurich, Switzerland

11:40-12:30 [INV04] Nature's Medicine Chest: Opportunities for Synthesis

Margaret Brimble, The University of Auckland, New Zealand

12:30-13:30 Lunch

13:30-15:10 *Session chair to be announced*

13:30-14:20 [INV05] Title to be announced

Lee Cronin, The University of Glasgow, UK

14:20-15:10 [INV06] Innovation at MSD for the Synthesis of Complex Active Pharmaceutical Ingredients

Rebecca Ruck, MSD, Process Research & Development, USA

15:10-15:40 Refreshment break

15:40-16:55 *Session chair to be announced*

15:40-16:05 [O.01] Contributed oral presentation

16:05-16:30 [O.02] Contributed oral presentation

16:30-16:55 [O.03] Contributed oral presentation

16:55-18:30 Refreshment break and Poster Session 1

Thursday, 20 June 2019

08:30-10:20 *Session chair to be announced*

8:30-9:20 [INV07] Title to be announced

Angela Russell, *University of Oxford, UK*

09:20-10:10 [INV08] PyrrolidinyI Peptide Nucleic Acids: Synthesis, properties and applications

Tirayut Vilaivan, *Chulalongkorn University, Thailand*

10:10-10:20 Exhibitors announcements

10:20-10:50 Refreshment break

10:50-12:30 *Session chair to be announced*

10:50-11:40 [INV09] Reprogramming the Reactivity of Iron in Cancer

Raphael Rodriguez, *CNRS - INSTITUT CURIE, France*

11:40-12:30 [INV10] Chemical Synthesis of Secondary Metabolites

Ryan Shenvi, *The Scripps Research Institute, USA*

12:30-13:30 Lunch

13:30-16:00 *Session chair to be announced*

13:30-14:20 [INV11] Modifications of Nucleic Acids: Identification and Functional Studies

Xiang Zhou, *Wuhan University, China*

14:20-14:45 [O.04] Contributed oral presentation

14:45-15:10 [O.05] Contributed oral presentation

15:10-15:35 [O.06] Contributed oral presentation

15:35-16:00 Workshop (Reaxys)

16:00-17:30 Refreshment break and poster session 2

18:45-21:45 Conference dinner

Friday, 21 June 2019

08:30-10:10 *Session chair to be announced*

08:30-09:20 [INV12] Title to be announced

Richard Payne, *The University of Sydney, Australia*

09:20-10:10 [INV13] The RaPID Way to Devise Biologically Active Peptides and Biologics

Hiroaki Suga, *The University of Tokyo, Japan*

10:10-10:40 Refreshment break

10:40-12:20 *Session chair to be announced*

10:40-11:30 [INV14] Title to be announced

Noah Burns, *Stanford University, USA*

11:30-12:20 [INV15] Turns and Twists Along the Path of Reactivity-Driven Method Development

Hosea Nelson, *University of California, Berkeley, USA*

12:20-12:30 Closing remarks

GRC ATTENDEES HAVE RECEIVED CALLS AND EMAILS FROM INDIVIDUALS OR BUSINESSES CLAIMING TO BE AFFILIATED WITH HOTELS IN THE AREA OF GRC CONFERENCE VENUES. SOME CLAIM TO BE AUTHORIZED BY GRC. THESE CALLERS AND BUSINESSES ARE NOT AUTHORIZED BY GRC. DETAILS ARE AVAILABLE BY [» clicking here \(/resources/common/userfiles/file/Alerts/Alert_Housing_2019_1.pdf\)](#).



Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides
Gordon Research Conference

Small Molecules and Oligomers for Biomedical Research and Clinical Applications

June 23 - 28, 2019

Chair

Bruce A. Armitage

Vice Chairs

Katherine L. Seley-Radtke and Muthiah Manoharan

Salve Regina University

100 Ochre Point Avenue
Newport, RI, US

Venue

Office Manager: Zach Moniz
Office Manager Email: SalveRegina_SM@grc.org
Office Phone: 401-341-4855

Application Information

The application deadline for this meeting was **May 26, 2019**. You may still submit an application, which may be considered by the conference chair if there is still room available.

Conference Description

The Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides (NNO) Gordon Research Conference is dedicated to understanding the fundamental chemistry and biology of its title compounds and developing technology for the diagnosis and treatment of human disease. Nucleosides and nucleotides are important chemical probes, pharmaceutical lead compounds and clinically approved drugs for the treatment of a variety of metabolic, infectious and genetic diseases. Separately, they are also essential precursors to many classes of oligonucleotides, which are widely used in molecular and chemical biology and, increasingly, in the clinic as diagnostics and therapeutics. Emerging areas like gene editing and mRNA therapeutics are being built on the knowledge and experience utilizing the monomers and methods developed for NNOs.

The 2019 edition will be the 20th offering of the NNO GRC and will reflect the evolution of the field and the current explosive growth of NNO based therapeutics, from its original focus on purine chemistry and biology to the much broader current scope. The conference will bring together academic, industrial and government scientists to present and discuss the latest research concerning the design, synthesis and characterization of both small molecules and oligomers. Notably, industrial representation at the meeting is typically three times the GRC average, providing collaboration opportunities for established scientists and giving students networking opportunities that could prove beneficial in future job searches. The scientific program will begin with a keynote lecture on therapeutic oligonucleotides and the eight subsequent sessions will cover topics that include the discovery and development of anticancer and antiviral drugs, small molecule recognition of DNA and RNA, nucleic acids chemical biology, backbone-modified oligonucleotides and DNA modification and repair. In addition, several poster presentations will be selected for short talks based on the abstracts submitted. Finally, the NNO GRC is further enhanced by a vibrant social environment, a GRC Power Hour to discuss issues faced by women in science, and an affiliated Gordon Research Seminar (GRS) to promote discussion and networking by students and postdocs.

Related Meeting



This GRC will be held in conjunction with the "Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides (GRS)" Gordon Research Seminar (GRS). Those interested in attending both meetings must submit an application for the GRS in addition to an application for the GRC. Refer to the [associated GRS program page](#) for more information.

Conference Program

Sunday	
2:00 pm - 9:00 pm	Arrival and Check-in
6:00 pm - 7:00 pm	Dinner
7:30 pm - 7:40 pm	Introductory Comments by GRC Site Staff / Welcome from the GRC Chair
7:40 pm - 9:30 pm	Keynote Session: mRNA Therapeutics Discussion Leader: Anastasia Khvorova (University of Massachusetts Medical School, USA)
7:40 pm - 7:45 pm	Opening Remarks



Appendix 3: International Presentation No. 6.1.2.2

7:45 pm - 8:35 pm	Melissa Moore (Moderna Therapeutics, USA) "mRNA as Medicine"
8:35 pm - 9:00 pm	Discussion
9:00 pm - 9:05 pm	Discussion
9:05 pm - 9:15 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
9:15 pm - 9:20 pm	Discussion
9:20 pm - 9:30 pm	General Discussion
Monday	
7:30 am - 8:30 am	Breakfast
9:00 am - 12:30 pm	Small Molecule Recognition of DNA and RNA Discussion Leader: Jennifer Heemstra (Emory University, USA)
9:00 am - 9:25 am	Amanda Hargrove (Duke University, USA) "Deciphering Patterns in Selective Small Molecule:RNA Interactions"
9:25 am - 9:35 am	Discussion
9:35 am - 10:00 am	Steven Zimmerman (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) "Targeting DNA and RNA Repeats that Cause Disease with Small and Not So Small Molecules"
10:00 am - 10:10 am	Discussion
10:10 am - 10:20 am	Short Talk Selected from Poster Abstracts
10:20 am - 10:25 am	Discussion
10:25 am - 10:55 am	Coffee Break
10:55 am - 11:20 am	Jay Schneekloth (National Cancer Institute, NIH, USA) "Insights into Targeting Nucleic Acid Tertiary Structure with Small Molecules"
11:20 am - 11:30 am	Discussion
11:30 am - 11:55 am	W. David Wilson (Georgia State University, USA) "Base Pair Sequence and Minor Groove Shape in the Design of New Types of Cell-Permeable, DNA-Binding Agents"
11:55 am - 12:05 pm	Discussion
12:05 pm - 12:15 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
12:15 pm - 12:20 pm	Discussion
12:20 pm - 12:30 pm	General Discussion
12:30 pm - 1:30 pm	Lunch
1:30 pm - 4:00 pm	Free Time
3:00 pm - 4:00 pm	The GRC Power Hour™ <i>The GRC Power Hour™ is designed to address challenges women face in science and issues of diversity and inclusion. The program supports the professional growth of all members of our communities by providing an open forum for discussion and mentoring.</i> Organizer: Katherine Seley-Radtke (University of Maryland, Baltimore County, USA)
4:00 pm - 6:00 pm	Poster Session
6:00 pm - 7:00 pm	Dinner
7:30 pm - 9:30 pm	Synthesis and Applications of Modified Oligonucleotides Discussion Leader: Subha Das (Carnegie Mellon University, USA)
7:30 pm - 7:55 pm	Daniel Appella (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, USA) "Cyclopentane Locked Peptide Nucleic Acids"
7:55 pm - 8:05 pm	Discussion
8:05 pm - 8:30 pm	Eriks Rozners (Binghamton University, SUNY, USA) "Amide-Modified RNA Synthesis, Structure and RNA Interference Activity"
8:30 pm - 8:40 pm	Discussion



Appendix 3: International Presentation No. 6.1.2.2

8:40 pm - 9:05 pm	Ichiro Hirao (Institute of Bioengineering and Nanotechnology, A*STAR, Singapore) "Genetic Alphabet Expansion for Xenobiology"
9:05 pm - 9:15 pm	Discussion
9:15 pm - 9:25 pm	GRC ATTENDEES HAVE RECEIVED CALLS AND EMAILS FROM INDIVIDUALS OR BUSINESSES CLAIMING TO BE AFFILIATED WITH HOTELS IN THE AREA OF GRC CONFERENCE VENUES. SOME CLAIM TO BE AUTHORIZED BY GRC. THESE CALLERS AND BUSINESSES ARE NOT AUTHORIZED BY GRC. DETAILS AVAILABLE FROM Post-Arriving here (/resources/common/userfiles/file/Alerts/Alert_Housing_2019_1.pdf) .
9:25 pm - 9:30 pm	Discussion
Tuesday	
7:30 am - 8:30 am	Breakfast
8:30 am - 9:00 am	Group Photo
9:00 am - 12:30 pm	Nucleoside/Nucleotide Drug Development Discussion Leader: Katherine Seley-Radtke (University of Maryland, Baltimore County, USA)
9:00 am - 9:25 am	Steven Almo (Albert Einstein College of Medicine, USA) "The Many Faces of SAM"
9:25 am - 9:35 am	Discussion
9:35 am - 10:00 am	Izzat Raheem (Merck, USA) "HIV Nucleoside Reverse Transcriptase Translocation Inhibitors to Enable Extended Duration Dosing"
10:00 am - 10:10 am	Discussion
10:10 am - 10:20 am	Short Talk Selected from Poster Abstracts
10:20 am - 10:25 am	Discussion
10:25 am - 10:55 am	Coffee Break
10:55 am - 11:20 am	Suzanne Peyrottes (CNRS / University of Montpellier , France) "New Series of Acyclic Nucleoside Phosphonates as Potent Antimalarials"
11:20 am - 11:30 am	Discussion
11:30 am - 11:55 am	Piet Herdewijn (KU Leuven, Belgium) "Phosphonate Nucleosides and Oligonucleotides"
11:55 am - 12:05 pm	Discussion
12:05 pm - 12:15 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
12:15 pm - 12:20 pm	Discussion
12:20 pm - 12:30 pm	General Discussion
12:30 pm - 1:30 pm	Lunch
1:30 pm - 4:00 pm	Free Time
4:00 pm - 6:00 pm	Poster Session
6:00 pm - 7:00 pm	Dinner
7:30 pm - 9:30 pm	Synthetic Oligonucleotide Therapeutics Discussion Leader: Muthiah Manoharan (Alnylam Pharmaceuticals, USA)
7:30 pm - 7:55 pm	Phil Baran (The Scripps Research Institute, USA) "Aiming for Ideality in the Synthesis of Oligonucleotides"
7:55 pm - 8:05 pm	Discussion
8:05 pm - 8:30 pm	Anastasia Khvorova (University of Massachusetts Medical School, USA) "RNAi-Based Modulation of Gene Expression in CNS"
8:30 pm - 8:40 pm	Discussion
8:40 pm - 9:05 pm	Peter Glazer (Yale University, USA) "Gene Editing by PNA Nanoparticles"
9:05 pm - 9:15 pm	Discussion
9:15 pm - 9:25 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
9:25 pm - 9:30 pm	Discussion
Wednesday	



Appendix 3: International Presentation No. 6.1.2.2

7:30 am - 8:30 am	Breakfast
9:00 am - 12:30 pm	Fluorescence Imaging Agents Discussion Leader: Byron Purse (San Diego State University, USA) GRC ATTENDEES HAVE RECEIVED CALLS AND EMAILS FROM INDIVIDUALS OR BUSINESSES CLAIMING TO BE AFFILIATED WITH HOTELS IN THE AREA OF GRC CONFERENCE VENUES. SOME CLAIM TO BE AUTHORIZED BY GRC. THESE CALLERS AND BUSINESSES ARE NOT AUTHORIZED BY GRC. DETENTION: Steven Magennis (University of York, UK) » clicking here (/resources/common/userfiles/file/Alerts/Alert_Housing_2019_1.pdf) . "Stacking-Induced Fluorescence Increase as a Versatile Probe of DNA Structure and Dynamics"
9:25 am - 9:35 am	Discussion
9:35 am - 10:00 am	Tirayut Vilaivan (Chulalongkorn University, Thailand) "Cationic Styryl Dyes for Dual-Mode Colorimetric and Fluorescence Sensing of DNA"
10:00 am - 10:10 am	Discussion
10:10 am - 10:20 am	Short Talk Selected from Poster Abstracts
10:20 am - 10:25 am	Discussion
10:25 am - 10:55 am	Coffee Break
10:55 am - 11:20 am	Yitzhak Tor (University of California, San Diego, USA) "Isomorphous Fluorescent Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides"
11:20 am - 11:30 am	Discussion
11:30 am - 11:55 am	Marit Nilsen-Hamilton (Iowa State University, USA) "Employing the Functions of Aptamers Inside Cells"
11:55 am - 12:05 pm	Discussion
12:05 pm - 12:15 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
12:15 pm - 12:20 pm	Discussion
12:20 pm - 12:30 pm	General Discussion
12:30 pm - 1:30 pm	Lunch
1:30 pm - 4:00 pm	Free Time
4:00 pm - 6:00 pm	Poster Session
6:00 pm - 7:00 pm	Dinner
7:00 pm - 7:30 pm	Business Meeting <i>Nominations for the Next Vice Chair; Fill in Conference Evaluation Forms; Discuss Future Site and Scheduling Preferences; Election of the Next Vice Chair</i>
7:30 pm - 9:30 pm	Nucleic Acid Structure Discussion Leader: Danzhou Yang (Purdue University, USA)
7:30 pm - 7:55 pm	Millie Georgiadis (Indiana University School of Medicine, USA) "Structural and Functional Properties of Artificial Nucleic Acids"
7:55 pm - 8:05 pm	Discussion
8:05 pm - 8:30 pm	Janez Plavec (National Institute of Chemistry, Slovenia) "Exciting Tetrahelical Structures of G-Rich DNA Repeats Beyond G-Quadruplexes"
8:30 pm - 8:40 pm	Discussion
8:40 pm - 9:05 pm	Deborah Wuttke (University of Colorado Boulder, USA) "Tying up the Ends: The Role of Affinity and Specificity in the Maintenance of Telomeres"
9:05 pm - 9:15 pm	Discussion
9:15 pm - 9:25 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
9:25 pm - 9:30 pm	Discussion
Thursday	
7:30 am - 8:30 am	Breakfast
9:00 am - 12:30 pm	Nucleic Acids Chemical Biology Discussion Leader: Webster Santos (Virginia Tech, USA)
9:00 am - 9:25 am	Tracy Brooks (Binghamton University, SUNY, USA) "Biology and Therapeutic Potential of the MYC and KRAS Promoter G-Quadruplexes"



9:25 am - 9:35 am	Discussion
9:35 am - 10:00 am	David Corey (University of Texas at Dallas, USA) GRC ATTENDEES HAVE RECEIVED CALLS AND EMAILS FROM INDIVIDUALS OR BUSINESSES CLAIMING TO BE AFFILIATED WITH HOTELS IN THE AREA OF GRC CONFERENCE VENUES. SOME CLAIM TO BE AUTHORIZED BY GRC. THESE CALLERS AND BUSINESSES ARE NOT AUTHORIZED BY GRC. DETAILS ARE AVAILABLE BY » clicking here (/resources/common/userfiles/file/Alerts/Alert_Housing_2019_1.pdf) .
10:00 am - 10:10 am	Discussion
10:10 am - 10:20 am	Short Talk Selected from Poster Abstracts
10:20 am - 10:25 am	Discussion
10:25 am - 10:55 am	Coffee Break
10:55 am - 11:20 am	Naoki Sugimoto (FIBER, Konan University, Japan) "The Watson-Crick World Is Not Enough"
11:20 am - 11:30 am	Discussion
11:30 am - 11:55 am	Danith Ly (Carnegie Mellon University, USA) "Design of Bivalent Nucleobases for Targeting Double-Stranded DNA and RNA"
11:55 am - 12:05 pm	Discussion
12:05 pm - 12:15 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
12:15 pm - 12:20 pm	Discussion
12:20 pm - 12:30 pm	General Discussion
12:30 pm - 1:30 pm	Lunch
1:30 pm - 4:00 pm	Free Time
4:00 pm - 6:00 pm	Poster Session
6:00 pm - 7:00 pm	Dinner
7:30 pm - 9:30 pm	DNA Modification and Repair Discussion Leader: Natalia Tretyakova (University of Minnesota, USA)
7:30 pm - 7:55 pm	Sarah Delaney (Brown University, USA) "DNA Repair in Nucleosomes"
7:55 pm - 8:05 pm	Discussion
8:05 pm - 8:30 pm	Patricia Opresko (University of Pittsburgh, USA) "The Impact of Oxidative DNA Base Damage on Telomere Maintenance"
8:30 pm - 8:40 pm	Discussion
8:40 pm - 9:05 pm	Cynthia Burrows (University of Utah, USA) "Base Modifications at the Intersection of DNA Repair and Gene Expression"
9:05 pm - 9:15 pm	Discussion
9:15 pm - 9:25 pm	Short Talk Selected from Poster Abstracts
9:25 pm - 9:30 pm	Discussion
Friday	
7:30 am - 8:30 am	Breakfast
9:00 am	Departure

Contributors

Research reported in this publication was supported by the National Center For Advancing Translational Sciences of the National Institutes of Health under Award Number R13TR002767. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.



Symposium on Nucleic Acid Chemistry

November 07 (Thu) – November 09 (Sat), 2019

Venue

Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea

Organizer

Prof. Byeang Hyeon Kim

Department of Chemistry, Division of Advanced Materials Science

Organized by

**Laboratory for Modified Nucleic Acid Systems,
Department of Chemistry, POSTECH**

&

Supported by

Basic Science Research Institute (BSRI)

Division of Advanced Materials Science (BK21⁺), POSTECH

Symposium on Nucleic Acid Chemistry

Programme

November 07 (Thu) - November 09 (Sat), 2019

Venue

Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea

Organizer

Prof. Byeang Hyeon Kim

Department of Chemistry, Division of Advanced Materials Science

Organized by

Laboratory for Modified Nucleic Acid Systems,

Department of Chemistry, POSTECH

&

Supported by

Basic Science Research Institute (BSRI)

Division of Advanced Materials Science (BK21⁺), POSTECH

SYMPOSIUM ON NUCLEIC ACID CHEMISTRY

PROGRAMME

Nov. 7th THU	Nov. 8th FRI	Nov. 9th SAT
19:30 Welcome Dinner	09:00 - 09:10 Opening Ceremony	09:30 - 20:00 Networking Day (Individual Discussion and Excursion)
	Session I Chairperson: Kyeong Kyu Kim	
	09:10 - 09:40 Naoki Sugimoto 09:40 - 10:10 Dong-Eun Kim 10:10 - 10:40 Xiaogang Qu	
	10:40 - 11:10 Coffee Break	
	Session II Chairperson: Naoki Sugimoto	
	11:10 - 11:40 Tirayut Vilaivan 11:40 - 12:10 Seung Soo Oh	
	12:10 - 14:00 Lunch	
	Session III Chairperson: Dong-Eun Kim	
	14:00 - 14:30 Zhen Xi 14:30 - 15:00 Kazuhiko Nakatani 15:00 - 15:30 Young Jun Seo	
	15:30 - 16:00 Coffee Break	
	Session IV Chairperson: Zhen Xi	
	16:00 - 16:30 Kyeong Kyu Kim 16:30 - 17:00 Xiang Zhou 17:00 - 17:30 Takashi Morii	
	18:00 - Banquet	

Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids: From Design to Applications

Tirayut Vilaivan

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand.

vtirayut@chula.ac.th

Peptide nucleic acid (PNA) is a class of nucleic acid mimic whereby the (deoxy)ribose phosphate backbone is completely replaced by a peptide-like structure. Despite such a drastic structural change, PNA can still form remarkably stable and specific Watson-Crick base pairing with natural nucleic acids, yet it shows several unique properties due to the absence of negative charge on the backbone systems. The simplicity of the PNA structure allows facile modification to further improve binding properties or incorporate additional functions into the PNA molecule. While many of such modifications did not meet the expectations, the conformationally constrained pyrrolidinyl PNA bearing a nucleobase-modified proline/cyclic β -amino acid dipeptide backbone developed by our group is an outstanding example of a new generation of PNA that shows superior base-pairing behavior compared to the original PNA as well as several other unique properties. This presentation will summarize the accounts on the development of such conformationally constrained PNA system in our laboratory during the past two decades, starting from the design, synthesis, structure-properties relationship and ending with diagnostic and biological applications.

References:

1. Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5533–5536.
2. Vilaivan, T.; Lowe, G. J. *Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9326–9327.
3. Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Org. Lett.* **2006**, 8, 1897–1900.
4. Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. *Artificial DNA: PNA & XNA* **2011**, 2, 50–59.
5. Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D.; Vilaivan, T. *Org. Lett.* **2012**, 14, 1440–1443.
6. Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24, 614–625.
7. Jampasa, S.; Wonsawat, W.; Rodthongkum, N.; Siangproh, W.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 54, 428–434.
8. Bohländer, P. R.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 9223–9230.
9. Vilaivan, T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1645–1656.
10. Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O.; Henry, C.S. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 5428–5435.
11. Kangkamano, T.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 102, 217–225.

Acknowledgements: This work was supported by the research grants from the Thailand Research Fund (RSA/04/2545, RMU4880030, RTA5280002 and DPG5780002).

Prof. Tirayut Vilaivan received his D.Phil. from Oxford in 1996 under the supervision of the late Professor Gordon Lowe, FRS. He started his career at Department of Chemistry, Chulalongkorn University in Bangkok since 1996. He is currently a professor of chemistry at Chulalongkorn University. He published 140 peer-reviewed original and review articles and received several prestigious awards including the Alexander von Humboldt Research Fellowship, TRF Distinguished Research Professor and Thailand Outstanding Scientist Award.



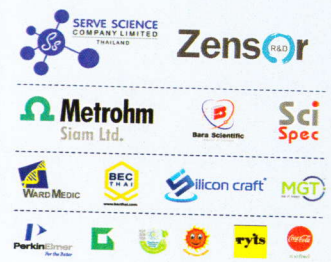
Research Interests:

- 1) Development of synthetic methodology
- 2) Synthesis and applications of **conformationally constrained peptide nucleic acids**.
- 3) Antimalarial drug development


"Emerging
Challenges
and
Opportunities"

Trace Analysis and Biosensor International Symposium I

10-11 FEBRUARY **2020**



**"Emerging
Challenges
and
Opportunities"**

10-11 FEBRUARY
2020

Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid for Paper-Based DNA Biosensors

Tirayut Vilaivan*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road,
 Patumwan, Bangkok 10330, Thailand
 E-mail: vtirayut@chula.ac.th

Abstract: Pyrrolidinyl peptide nucleic acid (pyrrolidinyl PNA) is a class of DNA mimics carrying an alternating proline and cyclic beta-amino acid backbone instead of the usual deoxyribose phosphate of DNA. Its conformationally constrained structure with an uncharged backbone contributes to several unique DNA binding characteristics especially the very strong binding affinity with excellent mismatch discrimination ability, which is not only better than natural DNA but also outperforms other types of PNA reported to date. Properties and applications of pyrrolidinyl PNA as a probe in combination with electrochemical, colorimetric and fluorescence detection for sensitive and specific detection of various DNA targets of interest in a paper-based format that can be performed under non-stringent conditions.

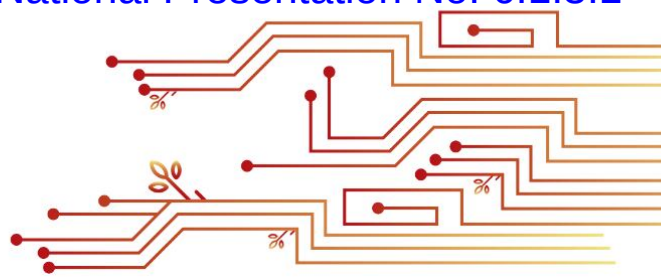
Keywords: PNA; DNA; Biosensor; Paper-based Device

Mimicking Peroxidase-like Activity of Nitrogen Doped Carbon Dots (N-CDs) Coupled with Microfluidic Paper-based Analytical Device (μ PAD) for Smart Sensing of Cholesterol from Whole Blood

Purim Jarujamrus^{1,2*}, Nattasa Kitchawengkul^{1,2}, Akarapong Prakobkij^{1,2},
 Wipark Anutrasakda³, Suticha Chunta⁴

¹*Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand.*
²*Nanomaterials Science, Sensors & Catalysis for Problem-Based Projects, Faculty of Science Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand.*
³*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand.*
⁴*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.*
 *E-mail: purim.j@ubc.ac.th

Abstract: This work, a simple hydrothermal synthesis of nitrogen doped carbon dots (N-CDs) as peroxidase enzyme mimic for colorimetric determination of cholesterol by using a microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) was developed. The obtained N-CDs were characterized by various techniques such as transmission electron microscopy (TEM), Scanning electron microscopy tandem energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and X-ray powder diffraction (XRD). These techniques can clearly confirm the formation of nitrogen doped on carbon dots surface. N-CDs could break H_2O_2 , leading to the formation hydroxyl radicals ($\text{OH}^\bullet$). After that, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-diammonium salt (ABTS) is converted to $\text{ABTS}^{+\bullet}$, thereby enabling the colorimetric detection of a colored product due to the ABTS is oxidized by $\text{OH}^\bullet$. This approach provides a high affinity between the N-CDs and the ABTS substrate (with the Michaelis-Menten constant (KM) of 0.018 mM). Herein, the analysis of cholesterol via $\text{OH}^\bullet$ was performed by monitoring the color change on μ PAD based on the Red, Green, Blue (RGB) color system by using a smartphone installed with the developed application as a colorimetric analyzer under controlled lighting system. The detection zone of μ PAD was fabricated as circular shape (7 mm in diameter) by using a simple wax printing technique. The analysis using



The 45th

Congress on

Science and Technology of Thailand

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 (วทท45)

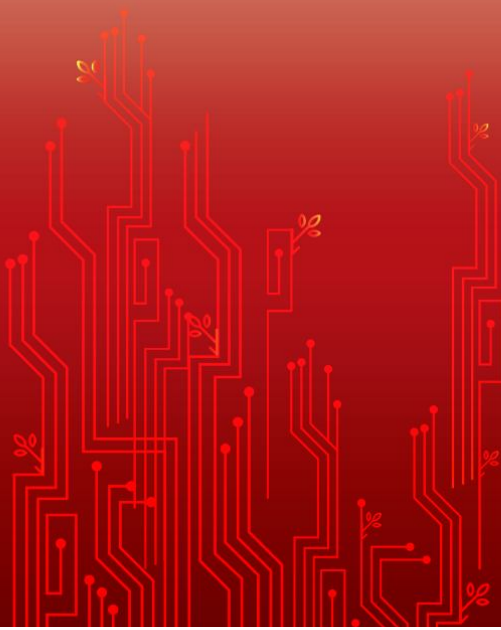
ABSTRACT BOOK

**“Seedling Innovation
For Sustainable Development”**

“ต้นกล้านวัตกรรมสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน”

7 – 9 October 2019

**Mae Fah Luang University, Chiang Rai
THAILAND**



C3_013_OA: DESIGN, SYNTHESIS AND STRUCTURE-PROPERTIES STUDIES OF CATIONIC STYRYL DYES FOR DNA SENSING APPLICATIONS

Kotchakorn Supabowornsathit, Tirayut Vilaivan*

Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

*e-mail: vtirayut@chula.ac.th

Abstract: Fluorescence dyes that can selectively bind and light up in the presence of DNA have found widespread applications as visualization tools in molecular biology. However, the choices of commercially available dyes are limited, and there are issues such as high cost, toxicity and poor selectivity among different types of DNA structures and sequences. Styryl dyes, conjugated organic molecules which consist of an electron-rich aromatic ring system connecting to an electron-deficient heteroaromatic ring system via one or more conjugated double bonds, have recently emerged as an attractive candidate as biological staining agents due to their superior and tunable optical properties as well as low toxicity compared to conventional intercalating dyes. In this study, novel cationic styryl dyes were designed with the aim to improve the binding efficiency with DNA targets which contain negatively-charged phosphate backbone. Optical properties of the newly synthesized dyes, both in the absence and presence of various sequence and structural types of DNA targets, were investigated to determine structural-properties relationships. The preliminary data revealed that core structures of the dyes play a significant role in determining the fluorescence properties and responsiveness of the dyes towards different DNA sequences and structures. For example, preferential fluorescence enhancement for AT-rich over CG-rich DNA duplexes was achieved for dyes with alkoxy as the electron donating substituent, whereas much less selectivity was observed with dialkylamino substituent. In addition, significant bathochromic shift in the UV absorption in addition to the fluorescence enhancement of some dyes were observed in the presence of DNA targets. These changes in optical properties are selective for DNA over other biological molecules such as bovine serum albumin (BSA) protein. A preliminary investigation of the mechanism of the absorption and fluorescence change will also be discussed. Hence, the novel cationic styryl dyes could serve as new tools for dual-mode DNA sensing with excellent tunable characteristics, selective for DNA detection and could be utilized for various biomedical applications.

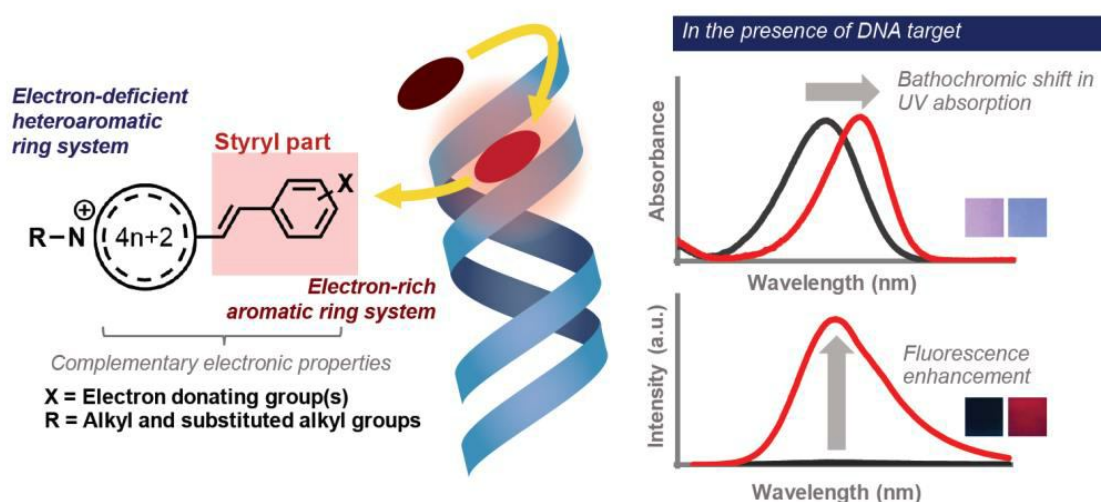


Figure 1. General structure of styryl dyes and their DNA sensing approaches



THE 44th CONGRESS ON SCIENCE AND TECHNOLOGY OF THAILAND

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 44 (วทท44)

“Science and Technology in the Disruptive Era”
“วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในยุคพลิกผัน”

29-31 October 2018
Bangkok International Trade & Exhibition Center (BITEC)
Thailand

C3_INV001

**Tirayut Vilaivan**

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand
e-mail: vtirayut@chula.ac.th

QUINOLINE-BASED STYRYL DYES FOR DUAL-MODE COLORIMETRIC AND FLUORESCENCE SENSING OF DNA

Styryl dyes consist of two aromatic ring systems with complementary electronic properties linked together via a conjugated π -system, usually a double bond. They have been extensively used as histological staining dyes. Applications of styryl dyes, either alone or in combination with DNA probes for fluorescence sensing of nucleic acids is known, although only limited examples are available. Most importantly, most of previously reports focused on fluorescence sensing. With the aim for developing a simple to use assay for DNA, a series of cationic styryl dyes have been synthesized and their optical properties studied in the absence and presence of single- and double-stranded DNA. It was serendipitously discovered that in addition to over 100-fold fluorescence enhancement, binding of certain quinoline-based styryl dyes resulted in a significant shift of absorption spectra yielding a clear color change visible by naked eyes. The absence of fluorescence and color change in the presence of random proteins such as BSA suggests that the change in optical properties of the styryl dye is specific to DNA binding. This immediately suggests the possibility of using these dyes for DNA sensing purposes. Applications of these dyes, either on their own or in combination with an external probe such as peptide nucleic acid (PNA) to allow sequence-specific detection of DNA with single mismatch resolution will be demonstrated.

Tirayut Vilaivan obtained his D.Phil. in Organic Chemistry from Oxford in 1996. He is currently a Professor of Chemistry at Department of Chemistry, Chulalongkorn University. His research interests include organic synthesis and its applications as tools to explore the unnatural world. One of his well-known discovery is a new DNA mimic called pyrrolidinyl peptide nucleic acid. He also received several awards, including the prestigious Thailand Outstanding Scientist Award 2014 and TRF Distinguished Research Professor 2014.