

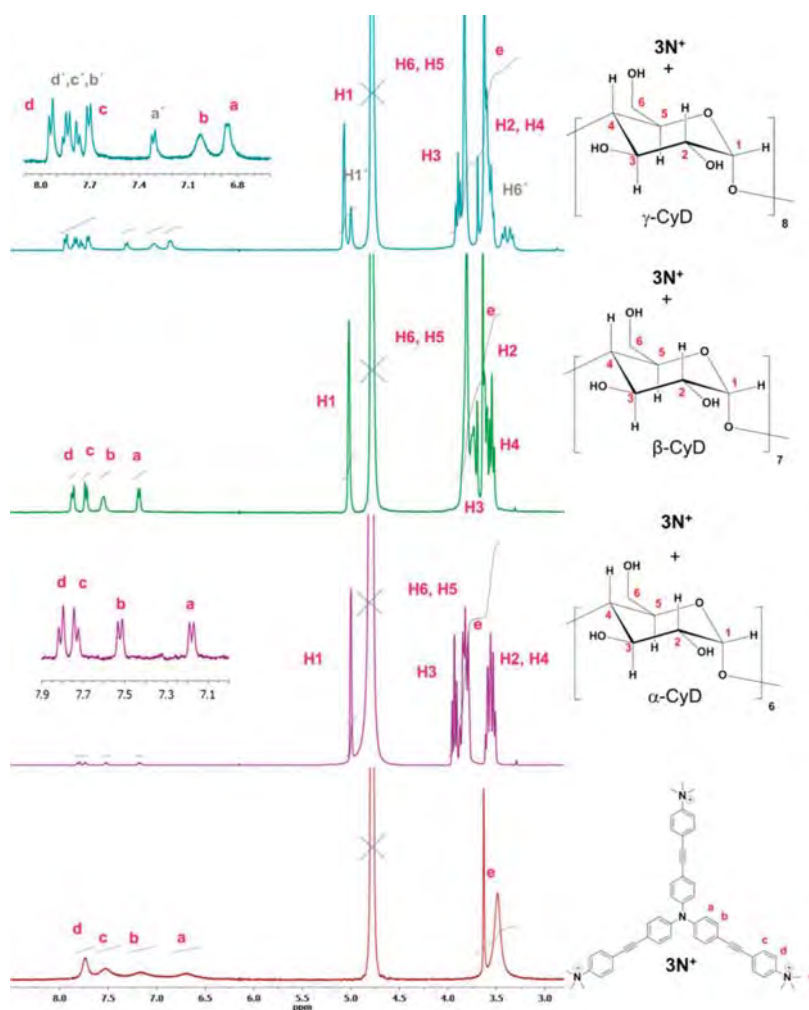


Figure 2. ^1H NMR spectra of 3N^+ in D_2O (bottom) and in the presence of α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, or γ -cyclodextrin (top).

NMR of pure CyD's, see Figure S1a, Supporting Information) noted specifically for the anomeric protons (H1) at 5.07 ppm. Near this signal, another peak was also observed at a slightly more upfield chemical shift (5.00 ppm), which could be reasonably assigned to the corresponding proton ($\text{H1}'$) of γ -CyD complexing with 3N^+ . The integration ratio between $\text{H1}'$ and a' (or b' , c' , or d') was found to be 4:1. This value agrees well with the 1:1 complex of $3\text{N}^+/\gamma$ -CyD in which γ -CyD contains eight $\text{H1}'$ atoms and 3N^+ contains two a' protons.

The 1:1 complex was also confirmed by Job's plot of the fluorescence intensity, which peaked at a 0.5 mole ratio of 3N^+ (Figure S2, Supporting Information). In summary, the NMR data described here clearly support that the fluorescence enhancement of 3N^+ is involved in the formation of a stable inclusion complex with γ -CyD but a fast-exchange complex with β -CyD.^{2d,4p}

In the CD spectroscopy study, 3N^+ , as an achiral compound, did not give any CD peaks in the range of 200–500 nm (Figure 3). In the presence of α - and β -CyD's, the CD spectra of the mixtures remained structureless. However, γ -CyD gave a strong induced CD signal of 3N^+ with at least four CD peaks. The CD peaks in the range of 300–400 nm correspond to the π – π^* absorption of the phenyleneethynylene conjugated system

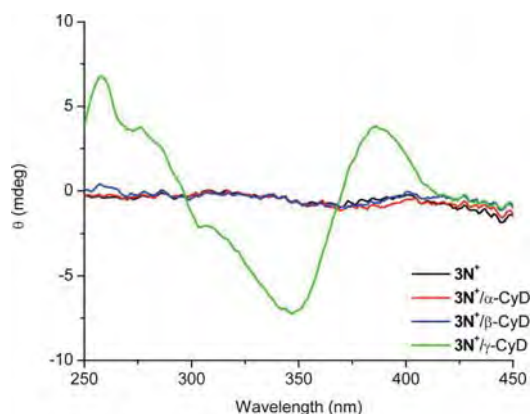


Figure 3. CD spectra of 3N^+ (10 μM) in the presence of α -, β -, and γ -cyclodextrins (10 μM) in sodium phosphate buffer (pH 7, 10 mM) and NaCl (100 mM) at 20 $^\circ\text{C}$.

(Figure 1b). The Cotton effect of the CD signal in this range is strong evidence for the tight interaction between the fluorophore and chiral γ -CyD cavity.

The binding constant (K_b) between $3N^+$ and CyD was determined by using Benesi–Hilderbrand's double reciprocal plot for a 1:1 complex according to the following equation:

$$\frac{1}{I - I_0} = \frac{1}{I - I_0} + \frac{1}{(I_1 - I_0)K_b} \frac{1}{[CyD]}$$

where I_0 , I , and I_1 are the fluorescence intensities of the free $3N^+$, $3N^+$ /CyD mixture, and $3N^+$ /CyD complex, respectively.¹⁵ The plot of $1/(I - I_0)$ against the reciprocal molar concentration of CyD provides the y-intercept as $1/(I_1 - I_0)$ and the gradient as $1/(I_1 - I_0)K_b$. Thus, K_b was obtained from the y-intercept/gradient ratio, which were 1.53×10^4 and 3.00×10^4 for β - and γ -CyD, respectively (Figure S3, Supporting Information). It is important to point out here that the binding constant of $3N^+$ is one of the highest for 1:1 complexation with γ -CyD.¹⁶ To our surprise, the binding constant for $3N^+$ / β -CyD was also relatively high despite it showing only moderate fluorescence enhancement and no clear CD signal change. This relatively high K_b with little effect on fluorescence and CD signals may result from several weak interaction sites with the fast-exchange process as observed by 1H NMR. In fact, we even believe that the $3N^+$ / β -CyD complex may not be an inclusion mode of interaction. The NOESY NMR spectra also did not show any correlations between aromatic protons of $3N^+$ and β -CyD protons (Figure S1b, Supporting Information), but several correlations were clearly observed in the case of γ -CyD (Figure S1c).

From the size of the ammonium headgroup of $3N^+$ (4.4 Å) and the minimum internal diameter of CyD's (α , 4.4 Å; β , 5.8 Å; γ , 7.4 Å),^{2d} the headgroup should be able to insert into β - and γ -CyD's (Figure 4). However, all the spectroscopic results

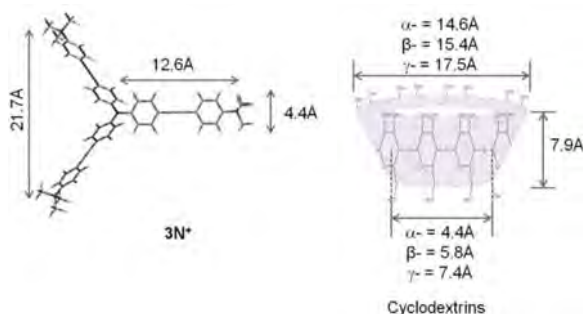


Figure 4. Structural parameters of $3N^+$ and CyD's.

described above gave only evidence for the inclusion complex of $3N^+$ / γ -CyD. There thus remain intriguing questions of whether other structural traits besides the hydrophobicity and size of the cavity can contribute to the inclusion process.

Three more fluorophores ($3C^-$, N^+ , and $2N^+$) were synthesized and studied for the fluorescence responses to CyD's in aqueous solution. Tricarboxylate anion $3C^-$ did not show a significant signal change upon the addition of each CyD (Figure S4, Supporting Information), suggesting no interaction between this fluorophore and CyD's. The results are not totally surprising as the hydroxyl rims of CyD's possess a negative potential.¹ In the case of electrostatically positive fluorophores (N^+ and $2N^+$), each CyD induced different fluorescence changes (Figure 5). The responses of $2N^+$ were similar to those of $3N^+$, the signals of which were strongly enhanced by γ -CyD, moderately enhanced by β -CyD, and not enhanced by α -CyD.

The results can again be rationalized as the formation of an inclusion complex of $2N^+$ with only γ -CyD. Surprisingly, N^+ , which also contains a positively charged ammonium group, did not show any fluorescence responses to γ -CyD. It however still gave a small fluorescence enhancement with the addition of β -CyD. Also, only $2N^+$ showed an induced CD signal in the presence of γ -CyD (Figure S5, Supporting Information). All the results described above strongly suggested that the inclusion complex was formed only in the case of the $2N^+$ / γ -CyD pair. The observations also clearly revealed the role of the positive potential on the guest molecule in stabilizing the complex probably via favorable attraction with the negative potential on the CyD rim.

1H NMR spectra of $2N^+$ and CyD mixtures in D_2O were acquired, and we found that only γ -CyD induced significant signal shifts (Figure 6; for α - and β -CyD's, see Figure S6, Supporting Information). There was again a new peak at 5.00 ppm ($H1'$) corresponding to the anomeric $H1$ protons of the complexing γ -CyD. These results are quite similar to those observed for $3N^+$, indicating the inclusion complex between $2N^+$ and γ -CyD. However, there was only one set of 1H NMR signals for protons a–f in the case of $2N^+$, while there were two sets (a–d and a'–d') observed in the case of $3N^+$. The single set of 1H NMR indicates that two phenyleneethynylene branches are in the same environment, which is only possible with the inclusion of γ -CyD at the iodophenyl branch. In addition, there were significant downfield shifts of aromatic protons on the iodobenzene ring (e and f) and upfield shifts along with some broadening of inner aromatic protons on the phenylacetylene branches (a and b). The spectral shifts indicated that the inclusion restrained the C–N bond rotation, causing opposite effects on the electron density of the iodophenyl ring and that of the inner benzene rings of the phenylacetylene branches. The signal broadening also supported the restriction of C–N bond rotation. This part of the 1H NMR observation suggested that the whole iodophenyl ring of $2N^+$ must be deeply inserted into the γ -CyD cavity to affect C–N bond rotation and the dipole–dipole interaction between the two electropositive branches and the electronegative γ -CyD rim should be one of the main driving forces. The insertion of the iodophenyl group of $2N^+$, instead of one of its two ammonium branches, into the γ -CyD cavity was initially quite surprising. It however later served as an interesting finding in this work that the two electropositive branches preferred the interaction from the outside with the electronegative γ -CyD wider rim rather than penetrating through the γ -CyD cavity to interact with its narrower rim. The MM2 geometrical optimization also revealed that the γ -CyD cavity was capable of engulfing the entire triphenylamine core, placing its hydrophilic wider rim in close proximity with the strongly polarized trimethylanilinium rings (Figure S7, Supporting Information). At this point, we strongly believed that two electropositive groups on the fluorophores provide strong dipole–dipole interaction with the CyD wider rim in collaboration with the hydrophobic interaction, inside the cavity, for the formation of inclusion complexes with γ -CyD.

To reassure that two ammonium groups are necessary for inclusion complexation with γ -CyD, a linear monocationic phenyleneethynylene fluorophore (N^0N^+) was tested as a guest molecule. As expected, there was no fluorescence change of this compound in the presence of γ -CyD (or β -CyD), confirming the absence of inclusion complex formation. To our surprise, the fluorescence signal was however considerably

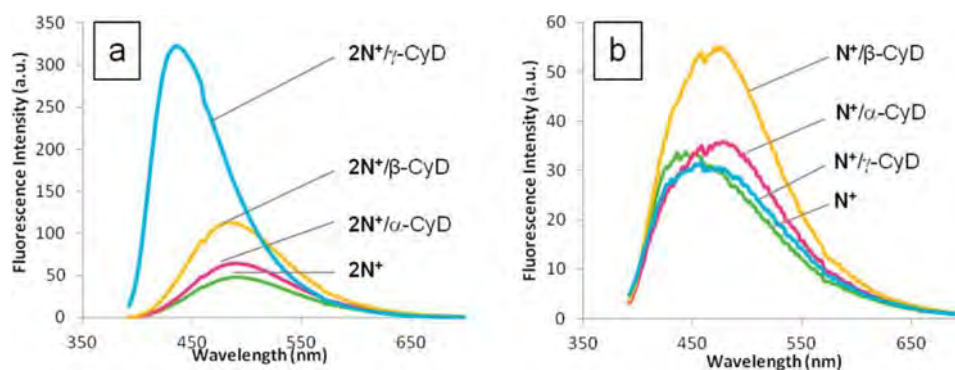


Figure 5. Fluorescence spectra of $2N^+$ ($5\ \mu\text{M}$) and N^+ ($5\ \mu\text{M}$) in the presence of α -, β -, and γ -CyD's ($20\ \mu\text{M}$) in sodium phosphate buffer (pH 7, 10 mM) and NaCl (100 mM), excited at 368 nm.

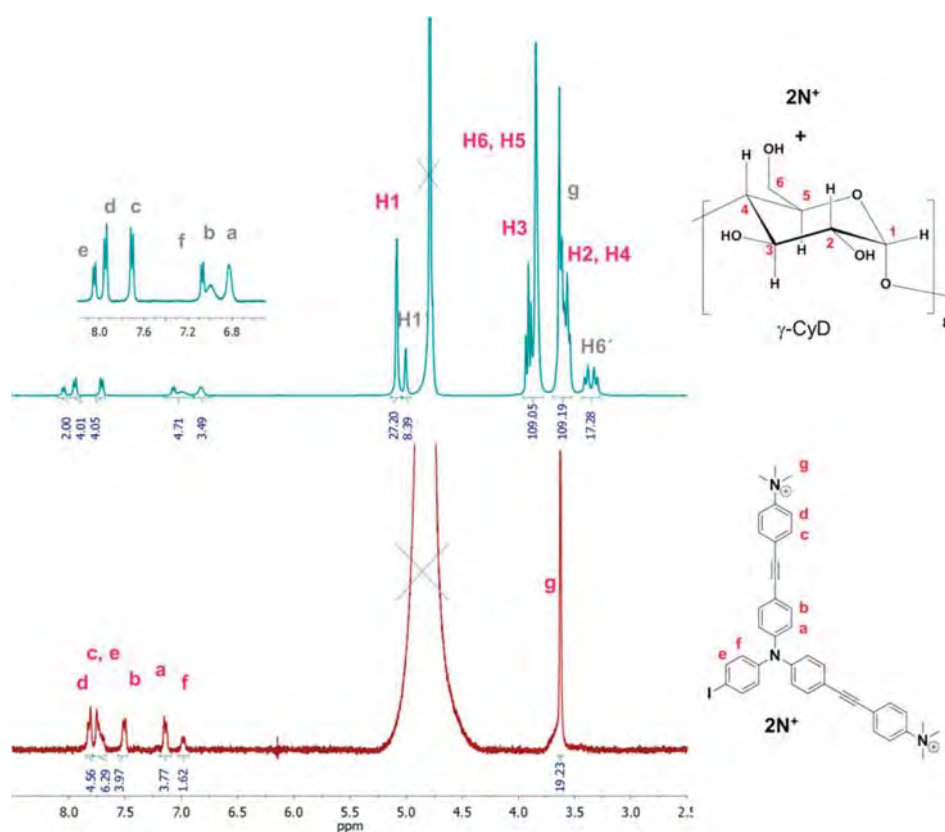


Figure 6. ^1H NMR spectra of $2N^+$ in D_2O only (bottom) and in the presence of γ -cyclodextrin (top).

enhanced in the presence of α -CyD (Figure 7). The results suggested that only α -CyD strongly interacted with N^0N^+ , possibly via the inclusion complex. The ^1H NMR spectrum of the N^0N^+/α -CyD mixture showed some shifts of the signals of aromatic protons and only one peak of α -CyD anomeric protons around 5.02 ppm (Figure S8, Supporting Information). This ^1H NMR observation did not support the formation of a stable inclusion complex but was more consistent with the fast-exchange complexation. The CD spectra of N^0N^+ and its mixture with α -CyD were essentially identical (Figure S10, Supporting Information), which also did not support the formation of an inclusion complex. We therefore believe that

the strong fluorescence enhancement and ^1H NMR signal shift are caused by fast-exchange complexation rather than inclusion complexation.

The ESI-MS spectra of a 1:4 mixture of each fluorophore/CyD pair in water showed ion peaks at m/z corresponding to both the fluorophore and its 1:1 CyD complex (Figures S11–S14, Supporting Information) that confirmed the formation of a 1:1 complex. The intensity ratios between the complex and fluorophore peaks in the cases of N^{3+}/γ -CyD and N^{2+}/γ -CyD pairs were considerably higher than those observed for other fluorophore/CyD pairs (Table 1), which also indicated the stronger host/guest binding within these two complexes.

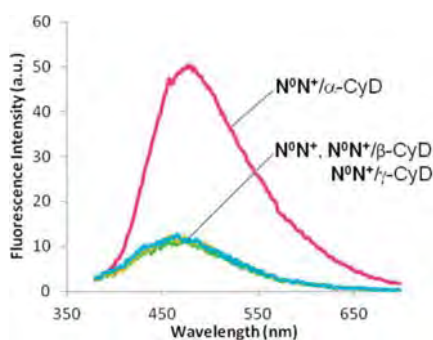


Figure 7. Fluorescence spectra of N^0N^+ ($5 \mu\text{M}$) in the presence of α -, β -, and γ -CyD's ($20 \mu\text{M}$) in sodium phosphate buffer (pH 7, 10 mM) and NaCl (100 mM), excited at 328 nm.

Table 1. Abundance of Ions Corresponding to m/z of the Fluorophore (I_{Flu}^{n+}) and Its 1:1 CyD Complex (I_{Cpx}^{n+}) Obtained from ESI-MS Spectra of an Aqueous Solution of Fluorophore/CyD (1:4) Mixtures

fluorophore	cyclodextrin	I_{Flu}^{n+}	I_{Cpx}^{n+}	$I_{\text{Flu}}^{n+}/I_{\text{Cpx}}^{n+} \times 10^3$
$3N^+$	α -CyD	1.15×10^7	3.18×10^4	2.8
	β -CyD	9.04×10^6	1.58×10^4	1.8
	γ -CyD	2.00×10^5	8.97×10^4	450
$2N^+$	α -CyD	5.21×10^6	2.68×10^4	5.1
	β -CyD	6.10×10^6	7.91×10^3	1.3
	γ -CyD	2.35×10^5	8.73×10^3	37
N^0N^+	α -CyD	3.26×10^5	442	1.4
	β -CyD	1.57×10^6	ND ^a	0
	γ -CyD	3.08×10^6	354	0.1

^aND = not detected.

The fluorescence responses of all fluorophores to CyD's are summarized as a histogram plot in Figure 8a. The fluorescence signals of $3N^+$ and $2N^+$ were enhanced strongly ($F/F_0 > 4$) by γ -CyD and moderately enhanced by β -CyD ($F/F_0 \approx 2$), while the signals of N^+ and N^0N^+ were enhanced exclusively by β -CyD and α -CyD, respectively. These differentiable fluorescence responses should be useful for simple identification of CyD's. As demonstrated in Figure 8b, the fluorescence responses of three selected fluorophores (N^0N^+ , N^+ , and $3N^+$) showed easily distinguishable patterns for α -, β -, and γ -CyD's.

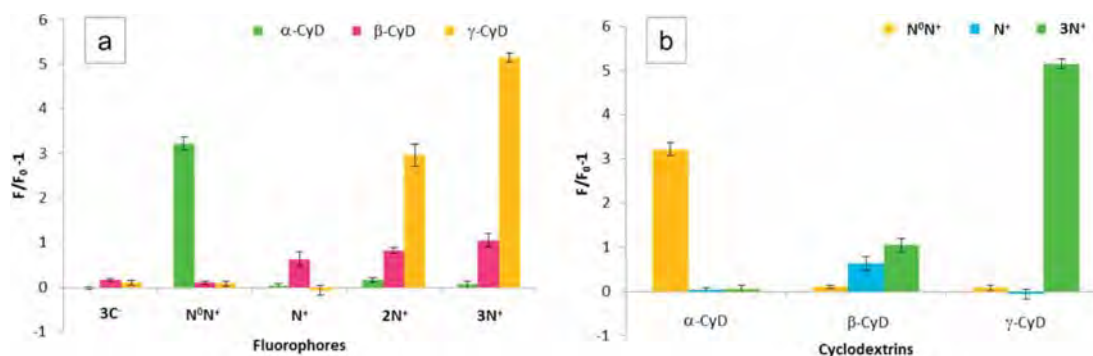


Figure 8. (a) Bar chart representing fluorescence responses of the fluorophores to CyD's ($10 \mu\text{M}$) in sodium phosphate buffer (pH 7, 10 mM) and NaCl (100 mM) using excitation wavelengths of 378, 328, 368, and 370 nm, respectively, and (b) bar chart representing different fluorescence response patterns, based on three selected fluorophores, created by α -, β -, and γ -CyD's.

CONCLUSIONS

The series of cationic phenyleneethynylene fluorophores are useful as molecular probes for spectroscopic studies of the interaction modes with CyD's. We found that the stable inclusion complexes were formed only between γ -CyD and the tri- and dicationic fluorophores. The finding suggests that cooperative bindings via hydrophobic and dipole–dipole forces are important for inclusion complexation. No clear evidence of an inclusion complex between β -CyD and the cationic fluorophores was observed. The fluorescence signal of 4-((4-(dimethylamino)phenyl)ethynyl)- N,N,N -trimethylanilinium (N^0N^+) was strongly enhanced by α -CyD, with no other evidence supporting the formation of an inclusion complex. The spectroscopic data in this work are useful references for host–guest chemistry study of CyD's. The structure of the tri- and dicationic fluorophores should also be helpful in designing guest molecules for sensor applications and CyD-based controlled release systems.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Spectroscopic data and synthesis procedures of the compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: smongkol@chula.ac.th.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Nanotechnology Center (NANOTEC) (NSTDA code NN-B-22-FN9-10-52-06), The Thailand Research Fund (TRF codes RTA5280002 and PHD/0050/2549), the National Research University of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (Grant AM1006A), and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund for financial support and student scholarships. This work is also part of the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture supported by Thai government stimulus package 2 (Grant TKK2555, SP2).

REFERENCES

- (1) (a) Maeztu, R.; Tardajos, G.; Gonzalez-Gaitano, G. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2798–2806. (b) Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045–2076. (c) Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941–7980. (d) Horvath, G.; Premkumar, T.; Boztas, A.; Lee, E.; Jon, S.; Geckeler, K. E. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 358–361. (e) Xu, D.; Wang, X.; Ding, L. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1257–1262. (f) Hedges, A. R. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035–2044. (g) Chaturvedi, K.; Ganguly, K.; Kulkarni, A. R.; Kulkarni, V. H.; Nadagouda, M. N.; Rudzinski, W. E.; Aminabhavi, T. M. *Expert Opin. Drug Delivery* **2011**, *8*, 1455–1468. (h) Moya-Ortega, M. D.; Alvarez-Lorenzo, C.; Sigurdsson, H. H.; Concheiro, T. L. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 2344–2351.
- (2) (a) Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2006. (b) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1753. (c) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325–1357. (d) Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782–817.
- (3) (a) Douhal, A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1955–1976. (b) Sahu, K.; Kumar Mondal, S.; Ghosh, S.; Bhattacharyya, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, *80*, 1033–1043. (c) Das, P.; Chakrabarty, A.; Haldar, B.; Mallick, A.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7401–7408. (d) Rao, V. G.; Ghatak, C.; Pramanik, R.; Sarkar, S.; Sarkar, N. J. *Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10500–10508. (e) Champaiboon, T.; Tumcharern, G.; Potisatityuenyong, A.; Wacharasindhu, S.; Sukwattanasinitt, M. *Sens. Actuators, B* **2009**, *139*, 532–537.
- (4) (a) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755–1785. (b) Chen, M.; Diao, G.; Zhang, E. *Chemosphere* **2006**, *63*, 522–529. (c) Sompornpisut, P.; Deechalao, N.; Vongsivut, J. *Sci. Asia* **2002**, *28*, 263–270. (d) Kato, K.; Sasakawa, H.; Kamiya, Y.; Utsumi, M.; Nakano, M.; Takahashi, N.; Yamaguchi, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 619–625. (e) Onnainty, R.; Longhi, M. R.; Granero, G. E. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1037–1046. (f) Garg, A.; Gupta, B.; Prakash, R.; Singh, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1313–1319. (g) Danel, C.; Azaroual, N.; Foulon, C.; Goossens, J.-F.; Vermeersch, G.; Bonte, J.-P.; Vaccher, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 975–983. (h) Bendeby, B.; Kenne, L.; Sandström, C. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2004**, *50*, 173–181. (i) Acuna-Rougier, C.; Mera-Adasme, R.; Jullian, C.; Olea-Azar, C. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2010**, *68*, 339–346. (j) Sadlej-sosnowska, N.; Kozerski, L.; Bednarek, E.; Sitkowski, J. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 383–394. (k) Zheng, W.; Tarr, M. A. *Spectrochim. Acta, A* **2006**, *65*, 1098–1103. (l) Ma, H. L.; Wu, J. J.; Liang, W. J.; Chao, J. B. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *58*, 221–226. (m) Terekhova, I.; Kozbial, M.; Kumeev, R.; Gierycz, P. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *514*, 341–346. (n) Jover, A.; Budal, R. M.; Meijide, F.; Hugo Soto, V.; Vazquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18850–18859. (p) Herrmann, W.; Keller, B.; Wenz, G. *Macromolecules* **1997**, *30*, 4966–4972.
- (5) (a) Cong, X.; Czerwieniec, G.; McJimpsey, E.; Ahn, S.; Troy, F. A.; Lebrilla, C. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 442–454. (b) Kwon, S.; Lee, W.; Shin, H.-J.; Yoon, S.; Kim, Y.; Kim, Y.-J.; Lee, K.; Lee, S. *J. Mol. Struct.* **2009**, *938*, 192–197.
- (6) Verlayen, K.; Sabah, S.; Scriba, G.; Chen, A.; Sandra, P. *J. Chromatogr., A* **1998**, *824*, 91–97.
- (7) Hbaieb, S.; Kalfat, R.; Chevalier, Y.; Amdouni, N.; Parrot-Lopez, H. *Mater. Sci. Eng., C* **2008**, *28*, 697–704.
- (8) (a) Wang, L.; Bian, G.; Wang, L.; Dong, L.; Chen, H.; Xia, T. *Spectrochim. Acta, A* **2005**, *61*, 1201–1205. (b) Al-Hassan, K. A.; Saleh, N.; Abu-Abdoun, I. I.; Yousef, Y. A. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2008**, *61*, 361–365. (c) Zhang, H.-X.; Huang, X.; Zhang, M. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 753–760. (d) Chakraborty, A.; Guchhait, N. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2008**, *62*, 91–97. (e) Vijayan Enoch, M.; Rajamohan, R.; Swanimathan, M. *Spectrochim. Acta, A* **2010**, *77*, 473–477.
- (9) Mori, T.; Ho, K. Y.; Kim, K.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3232–3247. (b) Allenmark, S. *Chirality* **2003**, *15*, 409–422.
- (10) (a) Anibarro, M.; Gabler, K.; Uson, I.; Sheldrick, G. M.; Saenger, W. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 251–256. (b) Enju, W.; Guangying, C.; Changri, H. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 617–622. (c) Ding, J.; Steiner, T.; Zebel, V.; Hingerty, B. E.; Mason, S. A.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8081–8089. (d) Steiner, T.; Mason, S. A.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5676–5687. (11) Lipkowitz, K. B. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1829–1873. (12) Martin Del Valle, E. M. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046. Chernykh, E. V.; Brichkin, S. B. *High Energy Chem.* **2010**, *44*, 83–100. (13) (a) Niamnont, N.; Siripornnoppakhun, W.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2768–2771. (b) Niamnont, N.; Mungkarndee, R.; Techakriengkrai, I.; Rashatasakhon, P.; Sukwattanasinitt, M. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 863–867. (c) Davis, B. W.; Niamnont, N.; Dillon, R.; Bardeen, C. J.; Sukwattanasinitt, M.; Cheng, Q. *Langmuir* **2011**, *27*, 6401–6408. (c) Yuanboonlim, W.; Siripornnoppakhun, W.; Niamnont, N.; Rashatasakhon, P.; Vilaivan, T.; Sukwattanasinitt, M. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *33*, 17–22. (d) Rashatasakhon, P.; Vongnam, K.; Siripornnoppakhun, W.; Vilaivan, T.; Sukwattanasinitt, M. *Talanta* **2012**, *88*, 593–598. (14) Sen, T.; Kanta Haldar, K.; Patra, A. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *114*, 11409–11413. (15) (a) Kuntz, I. D.; Gasparro, F. P.; Johnston, M. D.; Taylor, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *90*, 4778–4781. (b) Almansa López, E.; Bosque-Sendra, J. M.; Cuadros Rodríguez, L.; García Campana, A. M.; Aaron, J. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 414–423. (16) (a) Kumar Mandal, A.; Kumar Das, D.; Kumar Das, A.; Sen Mojumdar, S.; Bhattachayya, K. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10456–10461. (b) Das, P.; Mallick, A.; Sarkar, D.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 9600–9603. (c) Tanhuanpaa, K.; Hon Cheng, K.; Anttonen, K.; Virtanen, J. A.; Somerharju, P. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1501–1510. (d) Pumera, M.; Matalova, R.; Jalinek, I.; Jindrich, J.; Juza, J. *Molecules* **2001**, *6*, 221–229. (e) Funasaki, N.; Ishikawa, S.; Neya, S. *Langmuir* **2002**, *18*, 1786–1790. (f) Dodziuk, H.; Demchuk, O. M.; Bielejewska, A.; Komiski, W.; Dolgonos, G. *Supramol. Chem.* **2004**, *16*, 287–292. (g) Smith, V. J.; Rougier, N. M.; de Rossi, R. H.; Caira, M. R.; Bujan, E. I.; Fernandez, M. A.; Bourne, S. A. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2388–2393. (h) Green, T. K.; Denoroy, L.; Parrot, S. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4048–4055. (i) He, Y.; Fu, P.; Shen, X.; Gao, H. *Micron* **2008**, *39*, 495–516. (j) Wu, A.; Shen, X.; He, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *302*, 87–94. (k) Farcas, A.; Ghosh, I.; Jarroux, N.; Harabagiu, V.; Guegan, P.; Nau, W. M. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *465*, 96–101. (l) Wu, A.; Shen, X.; He, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *297*, 525–533. (m) Srinivasan, K.; Kayalvizhi, K.; Sivakumar, K.; Stalin, T. *Spectrochim. Acta, A* **2011**, *79*, 169–178. (n) Krois, D.; Brinker, U. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11627–11632. (17) Umezawa, H.; Okada, S.; Oikawa, H.; Matsuda, H.; Nakanishi, H. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 468–472.

Positively charged polymer brush-functionalized filter paper for DNA sequence determination following Dot blot hybridization employing a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe†

Cite this: *Analyst*, 2013, 138, 269

Praethong S. Laopa,^{ab} Tirayut Vilaivan^c and Voravee P. Hoven^{*c}

As inspired by the Dot blot analysis, a well known technique in molecular biology and genetics for detecting biomolecules, a new paper-based platform for colorimetric detection of specific DNA sequences employing peptide nucleic acid (PNA) as a probe has been developed. In this particular study, a pyrrolidinyl PNA bearing a conformationally rigid D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) was used as a probe. The filter paper was modified to be positively charged with grafted polymer brushes of quaternized poly(dimethylamino)ethyl methacrylate (QPDMAEMA) prepared by surface-initiated polymerization of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate from the filter paper via ARGET ATRP followed by quaternization with methyl iodide. Following the Dot blot format, a DNA target was first immobilized via electrostatic interactions between the positive charges of the QPDMAEMA brushes and negative charges of the phosphate backbone of DNA. Upon hybridization with the biotinylated pyrrolidinyl peptide nucleic acid (b-PNA) probe, the immobilized DNA can be detected by naked eye observation of the yellow product generated by the enzymatic reaction employing HRP-labeled streptavidin. It has been demonstrated that this newly developed assay was capable of discriminating between complementary and single base mismatch targets at a detection limit of at least 10 fmol. In addition, the QPDMAEMA-grafted filter paper exhibited a superior performance to the commercial membranes, namely Nylon 66 and nitrocellulose.

Received 15th August 2012
Accepted 16th October 2012

DOI: 10.1039/c2an36133g

www.rsc.org/analyst

Introduction

DNA sequence determination plays an important role in many biotechnology-related applications ranging from medical,^{1,2} forensic,^{3,4} agriculture and food sciences.⁵ Several methodologies have been continuously developed in order to attain practical and reliable techniques that should be simple, rapid, inexpensive, highly specific and sensitive. In addition, the ability to be implemented in a high-throughput fashion is a highly desirable feature from the economical perspective. Conventional detection mostly relies on the specific hybridization between the designed nucleic acid probe and the

complementary sequence which is a part of the DNA analyte. The recognition event can then be transformed into a physically measurable variable which can be determined either by the techniques requiring labels/tags or by label-free techniques based on electrochemical,^{6–11} optical,^{12–14} and piezoelectric methods.^{5,15}

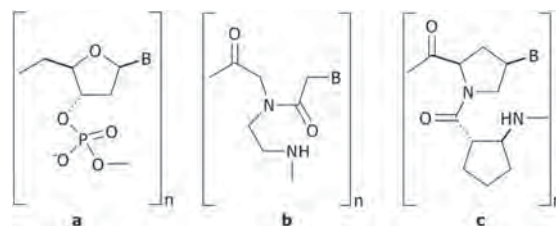
Since 1991, the Nielsen group has introduced a unique DNA analogue called peptide nucleic acid (PNA).^{16,17} In PNA, the negatively charged sugar-phosphate backbone of DNA is totally replaced by an uncharged peptide-like backbone (Scheme 1b). The reduced electrostatic repulsion between PNA and DNA

^aProgram in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

^bCenter for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

^cOrganic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: vipavee.p@chula.ac.th; Fax: +66-2218-7598; Tel: +66-2218-7627 ext. 102

† Electronic supplementary information (ESI) available: PNA and DNA sequences, GPC traces, water contact angles, SEM images, FTIR spectra, XPS spectra and atomic composition of the surface-modified filter papers, and additional test results. See DOI: 10.1039/c2an36133g



Scheme 1 Structures of (a) DNA, (b) Nielsen's aegPNA, and (c) Vilaivan's acpcPNA.

backbones resulted in superior hybridization characteristics, e.g., higher thermal stability, stronger affinity with less dependence on the salt concentration, greater sequence specificity, and higher capability of strand invasion to double-stranded DNA. The high specificity of PNA makes it an excellent probe for DNA sequence determination. Despite these advantages, there are many attempts to improve the original PNA further during the past 20 years. Among several variants of PNA developed to date, the conformationally rigid pyrrolidinyl PNA derived from *D*-prolyl-2-aminocyclopentane carboxylic acid (acpc) backbones (acpcPNA),^{18,19} introduced by Vilaivan and co-workers (Scheme 1c), shows great promise because it can form a PNA·DNA duplex with even higher affinity and specificity than the original Nielsen's aegPNA. The potential of acpcPNA as a probe to detect the DNA base sequence has been recently demonstrated by employing various techniques including quartz crystal microbalance (QCM),²⁰ surface plasmon resonance (SPR)^{21–23} and MALDI-TOF mass spectrometry.²⁴ However, these techniques require advanced instruments that are suitable for only well-equipped laboratories and hence cannot be used on-site in remote or rural areas having limited clinical experts and medical facilities.

Dot blot hybridization is a technique widely used in molecular biology and genetics for detecting biomolecules. The sample containing the biological target (mostly proteins or DNA) to be detected is spotted directly on a membrane (such as nitrocellulose, Nylon 66 and poly(vinylidene fluoride) (PVDF)) without prior separation. The presence or absence of a specific target can be detected by binding with a probe that can report the binding event by radioactivity,²⁵ fluorescence,²⁶ chemiluminescence,^{27–29} or enzyme-based colorimetric assays.^{26,30–35} Dot blot hybridization can analyze multiple samples inexpensively with high accuracy and in a high-throughput fashion.

In order to develop an assay based on the concept of Dot blot hybridization, three major components must be considered including the membrane, the probe and the detection method. Commercial membranes designed for DNA blotting including nitrocellulose,^{26,33} PVDF,³⁶ and Nylon 66³⁷ are generally hydrophobic, which may cause undesirable non-specific adsorption that complicates the analysis. This unwanted characteristic becomes a serious problem particularly with hydrophobic probes such as PNA. To suppress such non-specific interactions, a strong buffer solution containing metal ion (MgCl_2),³² organic solvent (acetonitrile, formamide),^{24,32,33,37} anionic detergent (sodium dodecyl sulfate)^{24,32,33,37} or combinations thereof must be employed, which may negatively affect the PNA·DNA hybridization. Previously, we have succeeded in using Q-sepharose as an anion-exchanger for capturing the acpcPNA·DNA hybrid in combination with mass spectrometry as a platform for multiplex SNP detection in DNA samples.²⁴ Based on a similar principle, this research aims to develop a hydrophilic and positively charged membrane for DNA sequence analysis in Dot blot format using acpcPNA probes. It is anticipated that the positive charges on the membrane not only provide a platform for selective capturing of PNA·DNA hybrids, but should also help preventing non-specific adsorption of other non-DNA components in the samples as well as the PNA probe itself.

Due to its availability and inexpensiveness, filter paper-based platforms for analytical applications have received considerable attention in recent years.^{38,39} In this research, a hydrophilic and positively charged membrane is developed from filter paper functionalized with quaternized poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (QPDMAEMA) brushes.^{40–42} Although the formation of the surface-grafted polymer brushes of QPDMAEMA on a cellulosic membrane has been previously described,⁴⁰ to the best of our knowledge, their specific application in DNA sequence determination has never been reported. In principle, the QPDMAEMA-grafted filter paper should readily capture the negatively charged DNA, but not the neutral acpcPNA, by electrostatic interaction. Only when the sequences of the DNA and the biotinylated acpcPNA probe (b-PNA) are complementary, the probe will be immobilized through hybridization with the surface-bound DNA. The non-complementary as well as the excess PNA probes may be removed by simple washing. The presence of the b-PNA·DNA hybrid on the membrane can then be visualized by an enzyme-based colorimetric assay employing horseradish peroxidase streptavidin (SA-HRP) conjugate and a chromogenic substrate such as *o*-phenylenediamine (OPD)^{26,30–35} (Fig. 1).

Experimental section

Materials

Whatman no. 1 filter paper was used as the membrane. 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) (Aldrich, 98%) was passed through a column filled with basic alumina to remove the inhibitor. The ligand, tris[2-(dimethylamino)ethyl] amine (Me_6TREN), was synthesized according to the published procedure⁴³ from tris(2-aminoethyl)amine (98%, Aldrich). Ethyl 2-bromoisobutyrate (EBiB) (Fluka, >97%), 2-bromoisobutryl bromide (Aldrich, 98%), copper(II) bromide (Fluka, 99%), tin(II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{EH})_2$) (Aldrich, 95%), L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, >99%), 4-*N,N*-dimethylaminopyridine (DMAP)

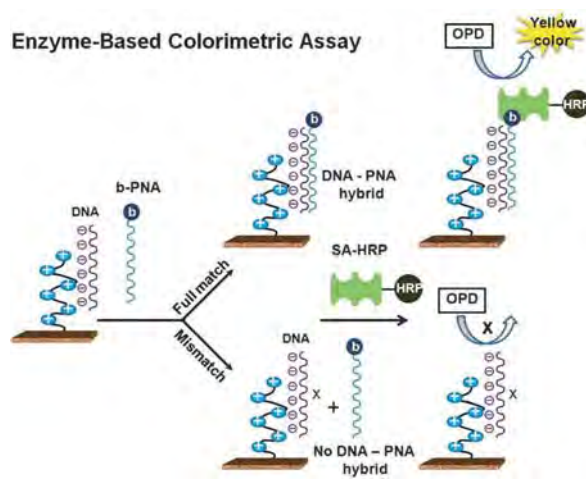


Fig. 1 Schematic representation of enzymatic amplified colorimetric detection of DNA following dot blot hybridization using filter paper functionalized with positively charged polymer brushes and the peptide nucleic acid probe.

(Fluka, 95%), methyl iodide (Aldrich, >99%), streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SA-HRP) (Sigma-Aldrich, $\geq 80\%$ protein content, 80–150 units per mg protein), bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, >96%), *o*-phenylenediamine (OPD) (Aldrich, 98%), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), urea-hydrogen peroxide (urea- H_2O_2) substrate kit (Merck, for analysis 35%), blotting-Nylon 66 membranes, type B, positive (Fluka, 0.45 μm pore size), Hybond ECL nitrocellulose membrane or Amersham Hybond™ ECL™ (GE Healthcare Life Sciences, 0.45 μm pore size) were used as received. All solvents used were of reagent grade. Oligonucleotides were purchased from Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency (Thailand). Ultrapure distilled water was obtained after purification using a Millipore Milli-Q system (USA) that involves reverse osmosis, ion exchange, and filtration steps.

Instrumentation

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in a solution of CDCl_3 or DMSO-d_6 on a Varian Mercury-400 nuclear magnetic resonance spectrometer operating at 400 MHz. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS). Infrared spectra of materials scraped from the surface-modified filter paper and prepared as KBr pellets were collected on a Nicolet Impact 6700 FT-IR spectrometer with 32 scans at a resolution of 4 cm^{-1} in a frequency range of 400–4000 cm^{-1} . The molecular weight and polydispersity index of the free poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (PDMAEMA) formed in solution were measured using a Waters GPC system (USA), performed at $35\text{ }^\circ\text{C}$ using THF (1.0 mL min^{-1}) as the mobile phase and a Waters E600 column connected to the RI detector. Narrow polystyrene standards were used for generating a calibration curve. The water contact angles were measured in air at ambient temperature using a contact angle goniometer, model 200-F1, equipped with a Gilmont syringe and a 24-gauge flat-tipped needle (Ramé-Hart, USA). The data for each sample were taken from five different areas of the substrate and analyzed by DROPimage standard 2.0, after which they were expressed as the arithmetic mean value $\pm$ standard deviation (SD). The surface morphology of the filter paper before and after stepwise modification was observed by SEM on a JEOL (JSM-6480LV, Japan) instrument. Surface composition of the surface-modified filter paper was characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) on a Physical Electronics Quantum 2000, using monochromatic Al $k\text{-}\alpha$ X-rays, and standard dual ion-electron neutralization.

The mass spectra of acpcPNA were recorded on a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). The sample ($1\text{ }\mu\text{L}$) was mixed with $10\text{ }\mu\text{L}$ of the matrix solution consisting of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) in 0.1% TFA in acetonitrile–water (1 : 1) solution. This mixture ($1\text{ }\mu\text{L}$) was deposited onto the target, allowed to dry, and analyzed in positive ion linear time-of-flight mode with an accelerating voltage of +20 kV. All spectra were recorded by averaging between 20 and 30 individual laser shots.

The scanned images of the tested results on filter papers were recorded on a XEROX Workcentre 3119 scanner in 24 bit RGB mode. The brightness/contrast/resolution was set to 128/128/300. The images were saved as TIFF-files. The intensity of each spot was determined using Scion Image software by first converting to gray scale at 300 dpi. Intensity measurements were carried out using the Line tool to select an area for analysis to obtain profile images.

Preparation of QPDMAEMA-grafted filter paper

The initiator immobilized filter paper was prepared according to the published procedure by Lee and co-workers.⁴⁰ The filter paper ($3.5 \times 8\text{ cm}^2$) was first cleaned by sonicating in dichloromethane (CH_2Cl_2) for 2 min prior to immersion in a solution of triethylamine (2.4 mL, 17 mmol) and a catalytic amount of DMAP (39 mg, 0.3 mmol) in 25 mL of CH_2Cl_2 under stirring for 10 min. Then, 2-bromoisobutyl bromide (0.6 mL, 1.9 mmol) was slowly added to this solution. After the reaction proceeded for 16 h at ambient temperature ($27\text{--}33\text{ }^\circ\text{C}$) with gentle agitation, the filter paper was thoroughly rinsed with CH_2Cl_2 followed by methanol and then air-dried.

The initiator immobilized filter paper was placed in a 32 mL scintillation vial containing DMAEMA (16.8 mL, 100 mmol), CuBr_2 (1.2 mg, 0.005 mmol), Me_6TREN (57.0 mg (0.25 mmol), and EBiB (74 μL , 0.5 mmol) dissolved in 4.5 mL acetone. After stirring for 10 min, a solution of $\text{Sn}(\text{EH})_2$ (490 mg, 1.2 mmol) in 3 mL acetone was then added into the mixture. The vial was then sealed with a rubber septum. The volume of free space above the solution was 7.7 mL. The reaction was left stirring for a specified reaction time (24 h) at ambient temperature ($27\text{--}33\text{ }^\circ\text{C}$). The filter paper was removed from the vial, successively washed with THF and MeOH to remove the residual monomer and catalysts, and was finally air-dried to yield PDMAEMA-grafted filter paper.

The PDMAEMA-grafted filter paper was placed in 25 mL DMF containing an excess amount of methyl iodide (100 μL). After stirring for 20 h, the filter paper was removed from the solution and washed three times with MeOH followed by THF under sonication and then air-dried. The filter paper was immersed in 100 mL of 0.1 M NaCl solution for 24 h, soaked in 500 mL of deionized water for 48 h and was finally air-dried to obtain QPDMAEMA-grafted filter paper.

Preparation of the biotinylated acpcPNA probe

Three acpcPNA probes, two 13 mer sequences (SLE1 and SLE2) corresponding to two different SNPs at the position –1082 of human *IL-10* promoter gene and one 12 mer random sequence (TG), were used in the study (Table 1). We chose PNA probes with length between 12 and 13 bases which should give a good balance between sensitivity and specificity. The practicality of such 13-base long probes for detection of real human DNA samples has previously been demonstrated.²⁴ The biotinylated acpcPNA probes (b-PNA) were synthesized according to literature procedures.^{18–24} The biotin was attached at the N-termini of acpcPNA while still on the solid support *via* two successive aminoethoxyethoxyacetyl (egl) linkers employing biotin

Table 1 Mass characteristic and T_m of biotinylated acpcPNA probes

Name	PNA sequence	m/z (calculated)	m/z (observed)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
b-PNA (SLE1)	<i>N</i> -Biotin-(egl) ₂ -TTCCCCCTCCCAA-LysNH ₂ -C	4880.36	4879.92	59.3
b-PNA (SLE2)	<i>N</i> -Biotin-(egl) ₂ -TTCCCCCTCCCAA-LysNH ₂ -C	4895.37	4898.64	65.4
b-PNA (TG)	<i>N</i> -Biotin-(egl) ₂ -TGATGCTATGAC-LysNH ₂ -C	4722.12	4724.46	not measured

pentafluorophenyl ester in the presence of HOAt/DIPEA. After nucleobase side-chain deprotection and cleavage from the solid support, the crude b-PNA was purified by reversed-phase HPLC with UV detection at 260 nm. A Varian Polaris C18 analytical HPLC column (3 μm particle size 4.6×50 mm) was used and eluted with a gradient of 0.1% TFA in MeOH and 0.1% TFA in water. After purification, the solution of PNA was lyophilized and the identity of the acpcPNA oligomers was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry and by thermal denaturation experiments (after hybridization with complementary DNA sequences) (Table 1).

General protocol for DNA sequence determination

The QPDMAEMA-grafted filter paper was cut into 1.0×7.0 cm² pieces and the spot positions were marked with a pencil. The designated DNA and b-PNA sequences from the list in Table S1 (ESI[†]) were spotted on the filter paper following a sequence indicated in Table S2 (ESI[†]). Two microliters of the DNA sample (1 μM in the solution of 0.4 M NaOH containing 10 mM EDTA) was spotted on the filter paper using a micropipette. The filter paper was air-dried and 2 μL of the b-PNA probe (1 μM solution in 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.4) was subsequently introduced. The filter paper was rinsed immediately three times with phosphate buffer solution and Milli-Q water followed by incubation in a blocking solution (1% BSA, w/v) at ambient temperature for 30 min. Two microliters of SA-HRP (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was then spotted onto the filter paper at the position where the DNA sample was immobilized. The filter paper was then rinsed three times with PBS, Milli-Q water, and citrate buffer (CTB, 0.1 M, pH 5). Two concentrations of the PBS solutions (0.1 M or 50 mM) with or without added 0.1 M NaCl used in the step of washing and blocking were tested in order to find the optimal condition that yields the most efficient detection. Without drying, the filter paper was immersed in a solution consisting of 250 μL of 1.6 mg mL^{-1} OPD substrate (freshly prepared prior to use) and 250 μL of 1.6 mg mL^{-1} urea-H₂O₂ for 1 min and was finally washed with deionized water.

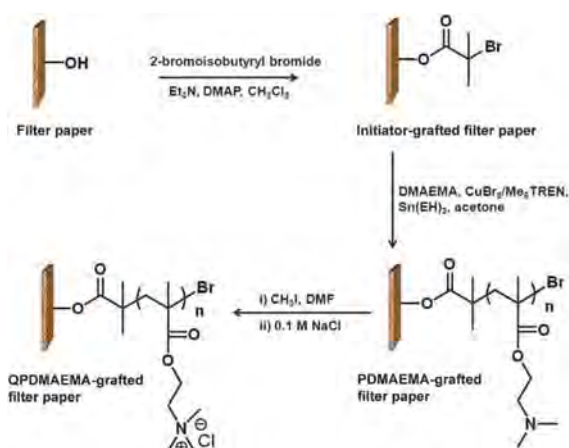
Results and discussion

Preparation and characterization of QPDMAEMA-grafted filter paper

The QPDMAEMA-grafted filter paper was prepared by surface-initiated polymerization (SIP) of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) on the filter paper followed by quaternization with methyl iodide (Scheme 2). The initiator immobilized filter paper was prepared by acylation of the hydroxyl groups on the filter paper with 2-bromoisobutyryl

bromide in the presence of triethylamine/DMAP. The surface of the filter paper became hydrophobic with a water contact angle of $125.5 \pm 1.0^{\circ}$ (image of the water droplet is shown in Fig. S1a, ESI[†]), as opposed to the completely wettable virgin filter paper (water contact angle $\sim 0^{\circ}$) suggesting that the immobilization of the 2-bromoisobutyrate moieties on the filter paper was successful. This water contact is much greater than that observed on a gold-coated glass slide grafted onto a monolayer of 2-bromoisobutyrate groups (72°).⁴⁴ It is suspected that the additional hydrophobicity may come from the intrinsic roughness of the filter paper causing the water drop to be pinned while performing contact angle measurement. It should be emphasized that this unexpected high contact angle was only observed when at least 16 h of reaction time was used. In the presence of a catalytic amount of DMAP, it is believed that acylation should be more effective and thus yielded a greater graft density of 2-bromoisobutyrate groups on the filter paper than that of the work reported previously by Carlmark and Malmstrom⁴⁵ of which the acylation was conducted in the absence of a catalyst. Intuitively, the wetting behavior of the filter paper that may be less covered by 2-bromoisobutyrate groups should be largely governed by the extremely hydrophilic nature of the origin filter paper. This may be the reason why the contact angle of their 2-bromoisobutyrate-modified filter paper was not measurable.

The 2-bromoisobutyrate-functionalized filter paper was then subjected to SIP of the DMAEMA monomer *via* a recently developed living radical polymerization process, activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical

**Scheme 2** A synthetic pathway for the preparation of QPDMAEMA-grafted filter paper.

polymerization (ARGET ATRP).^{46–48} This mode of polymerization has been chosen as a method for fabricating the positively charged membrane in this particular case due to the fact that the polymerization is living so the molecular weight or graft density of the attached polymer chains can be well controlled. More importantly, the reaction can be performed in a limited amount of air using a ppm level of a catalyst in the presence of a reducing agent without a need for rigorous deoxygenation. This simple handling strategy really opens up an opportunity to produce this paper-based membrane at a larger scale for future DNA sensor applications.

In this research, the ARGET ATRP of DMAEMA was conducted using the CuBr₂–Me₆TREN complex and Sn(EH)₂ as a catalytic system and reducing agent, respectively. To monitor the molecular weight of the PDMAEMA formed in solution, the sacrificial initiator, EBiB, was added. For the target degree of polymerization (DP) at 200 ([DMAEMA]₀/[EBiB]₀ = 200 : 1), it was found that the [Sn(EH)₂]₀/[CuBr₂]₀ of 400 was the optimal ratio that gave the polymer with well-controlled characteristic (*M_n* (exp) = 28 495 being close to a *M_n* (theo) of 28 260 and PDI = 1.28) (Table S3, ESI[†] entry 3). Increasing the ratio to 667 did not provide a positive impact on the polymerization process (Table S3, ESI[†] entry 4). On the other hand, the PDI tended to be high at a ratio of 200. It should be emphasized that acetone is a better solvent for polymerization of DMAEMA using this catalytic system than anisole (Table S3, ESI[†] entry 1), the solvent used for the synthesis of PDMAEMA *via* ARGET ATRP using the CuCl₂–tris[(2-pyridyl)methyl]amine (TPMA) complex as the catalyst, previously reported by others.⁴⁶ This is quite desirable given that acetone is a non-toxic organic solvent having a low boiling point so it can be easily removed from the filter paper after the SIP process by air drying without the need for heat treatment.

The ability to control the molecular weight of PDMAEMA is demonstrated in Table 2. Apparently, the molecular weight of PDMAEMA correspondingly increases as a function of [DMAEMA]₀/[EBiB]₀ from 100 : 1 to 200 : 1 and 400 : 1 or a target DP of 100, 200, and 400, respectively. The PDI values approaching 1.0 suggest that the polymerization can be well controlled and gave PDMAEMA with narrow molecular weight distribution. GPC traces of the synthesized PDMAEMA having different target DP are displayed in Fig. S2, ESI[†].

Quaternization of PDMAEMA-grafted filter paper was accomplished by methylation of the amino groups of

PDMAEMA on filter paper with methyl iodide at ambient temperature as shown in Scheme 2. The iodide counter ion must be exchanged for chloride by treatment with 0.1 M NaCl. This step is mandatory because it was found that iodide ion can be oxidized into iodine which makes the paper turn slightly yellowish upon storage. After it was air-dried, the QPDMAEMA-grafted filter paper having chloride as the counter ion was obtained. The filter paper became extremely hydrophilic after being grafted with PDMAEMA. Although a contact angle of ~50° can be roughly estimated from the drop image promptly captured at the initial contact using the Adobe Photoshop CS2, the water drop was rapidly absorbed into the PDMAEMA-grafted filter paper and disappeared within a second after the contact. This is much more hydrophilic than that has been observed for PDMAEMA-grafted on relatively flat surfaces (~50°).^{49,50} This wetting behavior remained unaltered after quaternization. Images of water droplets during water contact angle measurements of both samples are shown in Fig. S1b and c (ESI[†]).

As examined by SEM (Fig. S3, ESI[†]), there was no visible changes of surface morphology of the filter paper particularly after being grafted with PDMAEMA having a target DP of 200 (both before and after quaternization) implying that the layer of the coated polymer is relatively thin. This observation coincides with the fact that the physical strength and resistance to bending of the filter paper were not affected by polymer grafting. On the other hand, the filter paper became tougher and plastic-like upon grafting with PDMAEMA having a higher target DP of 400 (SEM micrograph not shown) suggesting that a thicker polymer layer was deposited on the filter paper.

The functional group identity of each surface-modified filter paper was determined by FT-IR as shown in Fig. S4 (ESI[†]). The FTIR spectra of the initiator immobilized filter paper (Fig. S4b, ESI[†]) show a band at ~1728 cm⁻¹ (C=O stretching of 2-bromoisobutyrate ester) which is not present in the virgin filter paper (Fig. S4a, ESI[†]). After being grafted with PDMAEMA, the absorption peak for the carbonyl group appears at the same position with greater intensity (Fig. S4c, ESI[†]), which is a characteristic of the C=O stretching of PDMAEMA.^{40,41} No significant change in the IR bands was observed after quaternization (Fig. S2d, ESI[†]).

The elemental compositions of all surface-modified filter papers were evaluated by XPS and the corresponding spectra are shown in Fig. S5–S9 (ESI[†]). From the XPS atomic composition data illustrated in Table S4 (ESI[†]), the detection of 0.8% bromine on the initiator immobilized filter paper suggests that there are bromoester groups available for initiating polymerization from the surface of filter paper. A trace amount of bromine (~0.2%) detected on the PDMAEMA- and QPDMAEMA-grafted filter papers indicated that there were still living polymer chain ends in the form of dormant bromoester species. The presence of an atomic signal of nitrogen on the PDMAEMA- and QPDMAEMA-grafted filter papers clearly confirms the successful polymer attachment *via* the SIP process. The C/N ratio of 8.1 (Table S4, ESI[†]) corresponds quite well with the theoretical value of PDMAEMA (8.0). An increase in C/N ratio to 11.9 together with the emergence of the N_{1s} peak at 402.0 eV on the QPDMAEMA-grafted filter paper (Fig. 2) strongly indicates that

Table 2 Characteristic of PDMAEMA synthesized by ARGET ATRP having varied target DP

Entry	Target DP ^a	% Conv ^b	<i>M_n</i> (theo) ^c	<i>M_n</i> (exp) ^d	PDI ^d
1	100	85	13 345	21 010	1.24
2	200	90	28 260	28 495	1.28
3	400	69	43 332	42 650	1.18

^a EBiB/CuBr₂/Me₆TREN = 1 : 0.006 : 0.25. The polymerization was conducted in a scintillation vial with volume of free space = 7.7 mL.

^b Determined by ¹H NMR in CDCl₃. ^c *M_n* (theo) = ([DMAEMA]₀/[EBiB]₀) × conversion. ^d Determined by GPC in THF, based on polystyrene standards.

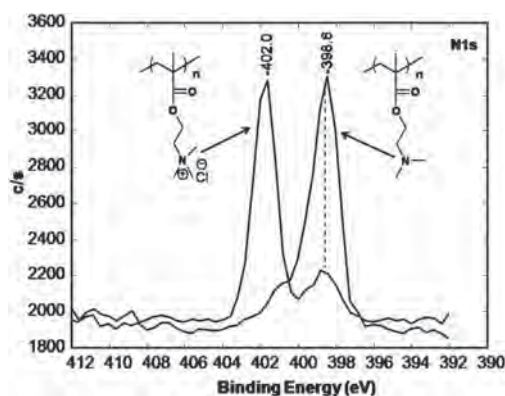


Fig. 2 N_{1s} XPS spectra of PDMAEMA- (right) and QPDMAEMA- (left) grafted filter papers.

additional carbon atoms have been introduced upon quaternization and that most nitrogen atoms existed in the less electronegative form of quaternary ammonium groups.⁴² The extent of surface quaternization estimated from the relative ratio between the area of the N_{1s} from the quaternary ammonium entities and that of the regular, non-quaternized one appearing at 398.6 eV was about 80% (Fig. 2). This figure is relatively high suggesting that the QPDMAEMA-grafted filter paper should be positively charged irrespective of pH and readily available to electrostatically adsorb DNA. To test such adsorption ability, a synthetic 13 mer DNA corresponding to a partial sequence of human *IL-10* promoter gene (DNA SLE2) was used as a model. A 1 μ L of 10 μ M DNA in 0.4 M NaOH containing 10 mM EDTA was spotted on the QPDMAEMA-grafted filter paper. XPS analysis of the paper after extensive washing to remove the unbound DNA (Table S4, ESI[†]) revealed a characteristic signal of the phosphate group, with a phosphorus content of 1.2%, implying that the DNA molecules were successfully adsorbed on the QPDMAEMA-grafted filter paper.

DNA detection following Dot blot hybridization

It should be emphasized that most of the tests were performed on the QPDMAEMA-grafted filter paper prepared using a target DP of 200. The results are displayed in two formats: scanned images (column A) and profile images as analyzed by Scion Image (column B). The profile image should provide the semi-quantitative intensity of the colorimetric readout and therefore reflecting the testing efficiency and facilitating the background and signal differentiation. A preliminary optimization was first carried out with 1 pmol of b-DNA SLE2 as a positive control by varying the enzyme, substrate, concentration and reaction time. The results shown in Fig. S10 (ESI[†]) suggest that SA-HRP was superior to avidin-HRP, and the optimal amount was 20 ng per spot since this condition provided a high signal and a minimal background due to non-specific adsorptions (Fig. S10d, ESI[†]). According to Fig. S11 (ESI[†]), the optimum concentration of the substrate mixture is 250 μ L of 1.6 mg mL⁻¹ OPD and 250 μ L of 1.6 mg mL⁻¹ urea-H₂O₂ and the optimum activation time is 1 min because this condition gave a high signal to background

ratio (Fig. S11c, ESI[†]). Increasing the concentration of substrate mixtures and/or reaction time gave a stronger signal, but so as the non-specific adsorption (background). When TMB^{34,35} was used as a substrate in place of OPD, a stronger color was obtained, but also with higher background (Fig. S11a, ESI[†]). In addition, the blue color disappeared after storage at room temperature suggesting that the complex formed was not stable and that TMB was not the appropriate substrate. The use of a blocking solution (especially 1% BSA) has been found to be essential in preventing the non-specific interaction between the SA-HRP and QPDMAEMA-grafted filter paper as demonstrated in Fig. S12a (ESI[†]). As seen in Fig. S12b, ESI[†] signals from both expected specific hybridization and unwanted non-specific adsorption were largely suppressed after blocking with 1% skim milk, a common blocking reagent for various bioassays, suggesting that it is not a suitable blocking reagent.

To test the ability of QPDMAEMA-grafted filter paper as a membrane for DNA sequence determination by Dot blot hybridization, two closely related synthetic 13 mer oligodeoxynucleotides (DNA SLE1 and DNA SLE2) differing by just one base were spotted onto the membrane and the sequences were detected by the b-PNA SLE2 probe. Details of DNA and PNA sequences and the description of samples/probes applied in each spot (1–6) are displayed in Tables S1 and S2 (ESI[†]), respectively. A biotinylated DNA (b-DNA SLE2) was included as a positive control to show the maximum signal that can be generated by the enzymatic reaction. The effects of washing and blocking solutions were examined using the optimal conditions mentioned above (see results in Fig. S10d, S11c, and S12a, ESI[†]). Only the positions with b-DNA SLE2 [(+1)] and DNA SLE2/b-PNA SLE2 [(+4)] (Table S1, ESI[†]) show yellow spots visible to the naked eyes (Fig. 3). Lowering the PBS concentration down from 0.1 M to 50 mM in the absence of 0.1 M NaCl (Fig. 3d) gave inferior detection efficiency, with slight yellowish tints observed

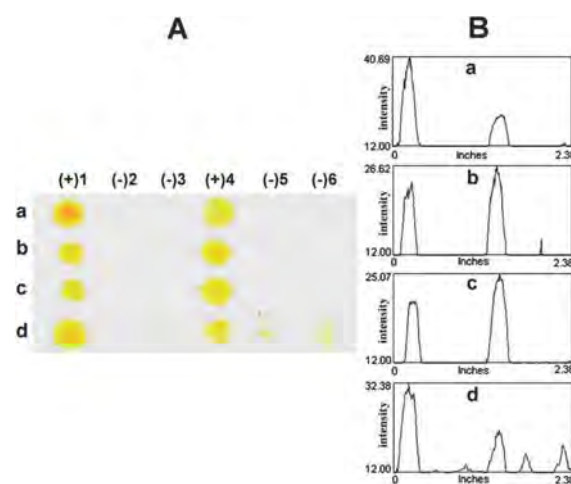


Fig. 3 Representative images (column A: scanned image and column B: profile image) of the test results demonstrating the effect of PBS concentration and salt addition in washing and blocking solutions: (a) 0.1 M PBS w/ 0.1 M NaCl, (b) 0.1 M PBS w/o 0.1 M NaCl, (c) 50 mM PBS w/ 0.1 M NaCl, and (d) 50 mM PBS w/o 0.1 M NaCl.

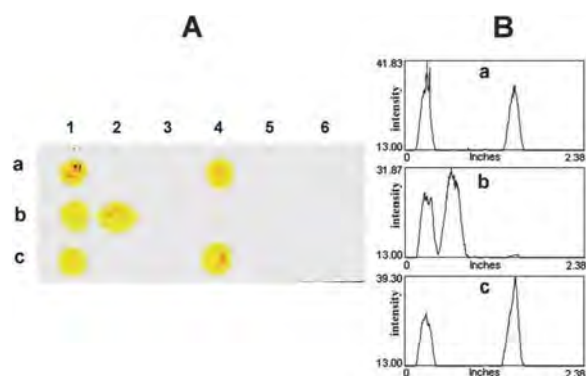


Fig. 4 Representative images (column A: scanned image and column B: profile image) of the test results demonstrating the specificity and efficiency of (a) b-PNA SLE2, (b) b-PNA SLE1 to distinguish complementary and single mismatched DNA (SLE2 and SLE1) targets or (c) complementary DNA (AC) and non-complementary DNA (AG) using b-PNA (TG). The positive results are shown by the yellow spots at position 4 for the tests in entries a and b, and 2 for entry c.

on the two negative controls [(-)5 and (-)6]. Such non-specific adsorption disappeared and a good detection result was obtained (comparable to the result shown in Fig. 3b) upon addition of 0.1 M NaCl (Fig. 3c). For this reason, 0.1 M PBS without salt addition (Fig. 3b) was chosen as washing and blocking buffers for all subsequent experiments.

Three acpcPNA probes, b-PNA SLE2 and b-PNA SLE1, which differ by only one base, and an unrelated b-PNA (TG) were chosen for specificity determination. Details of DNA and PNA sequences and the description of samples/probes applied in each spot (1–6) are illustrated in Tables S1 and S5 (ESI[†]), respectively. The data presented in Fig. 4a and b reveal that the Dot blot hybridization using the QPDMAEMA-grafted filter paper and acpcPNA probes offers an excellent specificity to distinguish single base mismatches in the DNA target

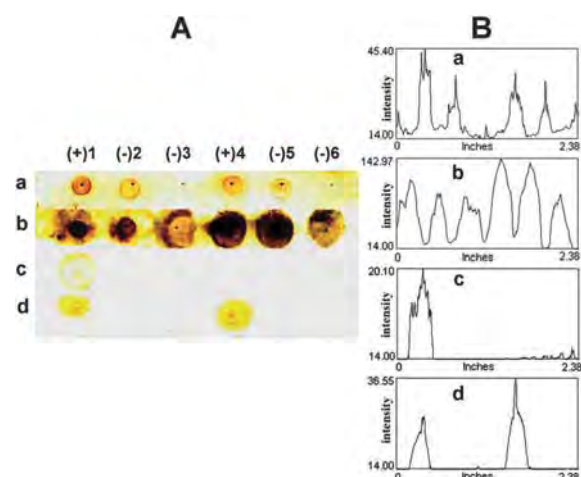


Fig. 5 Representative images (column A: scanned image and column B: profile image) of the test results demonstrating the performance of the QPDMAEMA-grafted filter paper in comparison with commercial membranes: (a) nitrocellulose, (b) Nylon 66, (c) PDMAEMA-, and (d) QPDMAEMA-grafted filter paper.

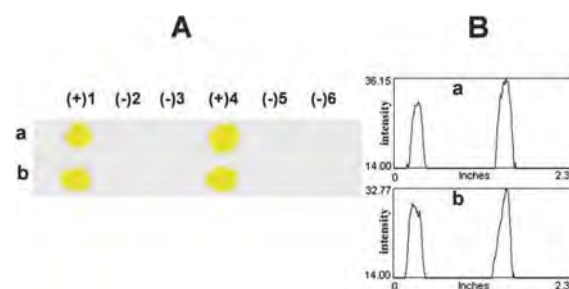


Fig. 6 Representative images (column A: scanned image and column B: profile image) of the test results demonstrating sequence determination of the DNA SLE2 sample using the b-PNA SLE2 probe on the QPDMAEMA-grafted filter paper: (a) freshly prepared and (b) stored at room temperature (27–33 °C) for 1 month.

consisting a partial sequence of human *IL-10* promoter gene (SLE1 and SLE2) by showing only the signal of b-PNA that was hybridized with the complementary DNA target. In addition to these two sequences, the same technique employing b-PNA (TG) as a probe can also successfully distinguish between the complementary and non-complementary DNA targets since the yellow spot was only observed at the position of the complementary DNA target (AC) (Fig. 4c). This illustrates the general applicability of the membrane for detection of various DNA sequences.

For the results shown in Fig. 5–7, details of DNA and PNA sequences and the description of samples/probes applied in each spot (1–6) are displayed in Tables S1 and S2 (ESI[†]), respectively. To compare the performance of the modified filter paper described in this work with commercial membranes, the detection of DNA SLE2 with b-PNA SLE2 was selected for the

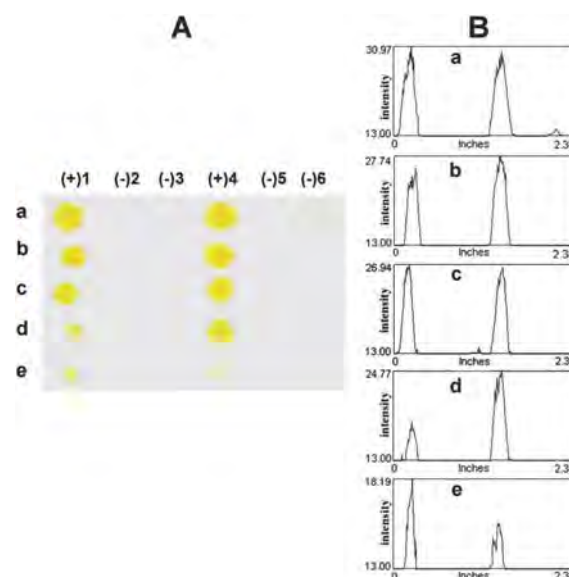


Fig. 7 Representative images (column A: scanned image and column B: profile image) of the test results demonstrating the detection limit of complementary DNA SLE2 and single mismatched DNA SLE1 using 2 µL of 1 µM b-PNA SLE2 as the probe: (a) 2 pmol (2 µL of 1 µM), (b) 1 pmol (1 µL of 1 µM), (c) 100 fmol (1 µL of 100 nM), (d) 50 fmol (0.5 µL of 100 nM), and (e) 10 fmol (1 µL of 10 nM).

investigation. The results presented in Fig. 5 showed that only the QPDMAEMA-grafted filter paper (Fig. 5d) provided a clear-cut discrimination between the complementary [(+)4] and single mismatched DNA [(−)2]. On the other hand, the unquaternized PDMAEMA-grafted filter paper (Fig. 5c) gave low signals even with the positive control [(+)1], indicating that the quaternary ammonium groups of QPDMAEMA are essential for the efficient capture of DNA. The commercial nitrocellulose (Fig. 5a) and Nylon 66 (Fig. 5b) membranes showed substantial non-specific interactions as shown by the presence of dark spots in places where negative results should be observed. In the case of nitrocellulose (Fig. 5a), the appearance of signals whenever the b-PNA was applied, even in the absence of the correct DNA target [(−)2 and (−)5], suggested that there were non-specific interactions between the surface of the membrane and the b-PNA probe. With Nylon 66 (Fig. 5b), the colored spots were observed in all six positions implying that there were non-specific interactions between the membrane surface and SA-HRP as well.

To test the stability of the QPDMAEMA-functionalized filter paper upon storage, the Dot blot experiments were carried out using a membrane that has been stored at room temperature (27–33 °C) for 1 month in comparison with the freshly prepared membranes. The results shown in Fig. 6 demonstrate that both membranes provided comparable results in distinguishing complementary and mismatched DNA targets suggesting that the modified filter paper is stable and the detection efficiency is not affected upon storage for at least one month. This outcome is quite desirable from the practical perspective.

The lowest amount of DNA that can still allow a clear discrimination between fully complementary (DNA SLE2) and single-mismatched DNA (DNA SLE1) was evaluated by spotting different quantities of the DNA targets (2 pmol to 10 fmol) followed by the detection using 2 pmol of the b-PNA SLE2 probe. The results in Fig. 7 show that unambiguous discrimination, which can be quoted as the detection limit of this colorimetric method, is at least down to 10 fmol (equivalent to 1 µL of 10 nM DNA). Although this detection limit is somewhat higher than some other reports,^{32,34,35} our main objective to develop a positively charged filter paper-based membrane for simple naked eye detection of DNA using a PNA probe and rapid analysis of multiple DNA samples with a short reaction time (less than 1 hour from DNA spotting to color readout) has been fulfilled. We have previously demonstrated that this level of sensitivity is more than sufficient to detect DNA samples from standard PCR products²⁴ and, if necessary, it should be possible to improve the detection limit further using polybiotin tags^{35,51,52} or polymeric enzymes.³⁵

The limitation of this present technique is similar to all blotting techniques that use non-specific interaction to immobilize DNA. If the DNA target to be detected is contaminated by other DNA sequences, there will be a competition between different DNA targets in binding to the membrane and the desired sequence may not be detectable. In such a scenario, a sandwich assay in which two acpcPNA probes that bind to different regions of the DNA target – one probe is immobilized on the surface for capturing the DNA target and

the other is labeled with enzyme for detection – should solve the problem.³⁵

Conclusions

QPDMAEMA was successfully grafted onto the filter paper by surface-initiated polymerization of DMAEMA *via* ARGET ATRP followed by quaternization with methyl iodide. The molecular weight and polydispersity index of the polymer can be controlled by adjusting the ratio of the Sn(EH)₂/initiator and reaction time. The QPDMAEMA-grafted filter paper showed better performance than Nylon 66 and nitrocellulose to be used as a membrane for DNA sequence detection following a Dot blot format employing a biotinylated acpcPNA probe and an enzyme-mediated colorimetric assay. The low non-specific interaction of the modified filter paper, together with the high specificity of the PNA probe, allows single mismatch discrimination down to 10 fmol of DNA targets under non-stringent conditions.

Acknowledgements

The financial support for this project was provided by Research Team Consolidation Grant, the Thailand Research Fund (RTA 5280002), the National Research University Project of Commission of Higher Education (CHE) and the Ratchadapiseksomphot Endowment Fund (Project Code AM1006A), and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture. The authors are indebted to Dr Jack Hirsch of Polymer Science and Engineering Department, University of Massachusetts, Amherst, for assistance with XPS analysis. PSL acknowledges Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus and the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST) for a PhD scholarship.

References

- 1 C.-P. Chak, J. M. Y. Lai, K. W. Y. Sham, C. H. K. Cheng and K. C.-F. Leung, *RSC Adv.*, 2011, **1**, 1342.
- 2 J. Baur, C. Gondran, M. Holzinger, E. Defrancq, H. Perrot and S. Cosnier, *Anal. Chem.*, 2009, **82**, 1066.
- 3 A. Akane, S. Seki, H. Shiono, H. Nakamura, M. Hasegawa, M. Kagawa, K. Matsubara, Y. Nakahori, S. Nagafuchi and Y. Nakagome, *Forensic Sci. Int.*, 1992, **52**, 143.
- 4 H. Pfützinger, B. Ludes and P. Mangin, *Int. J. Leg. Med.*, 1993, **105**, 213.
- 5 M. Passamano and M. Pighini, *Sens. Actuators, B*, 2006, **118**, 177.
- 6 B. Kannan, D. E. Williams, M. A. Booth and J. Trivas-Sejdic, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 3415.
- 7 H. Yin, Y. Zhou, C. Chen, L. Zhu and S. Ai, *Analyst*, 2012, **137**, 1389–1395.
- 8 K.-H. Lee, J. O. Lee, S. Choi, J.-B. Yoon and G.-H. Cho, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **31**, 343.

- 9 S. Hason, H. Pivonkova, V. Vetterl and M. Fojta, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2391.
- 10 X. Tang, H. Liu, B. Zou, D. Tian and H. Huang, *Analyst*, 2012, **137**, 309.
- 11 Z. Gao, *Analyst*, 2012, **137**, 1674.
- 12 D. Berdat, A. Marin, F. Herrera and M. A. M. Gijs, *Sens. Actuators, B*, 2006, **118**, 53.
- 13 M. Kaatz, H. Schulze, I. Ciani, F. Lisdat, A. R. Mount and T. T. Bachmann, *Analyst*, 2012, **137**, 59.
- 14 M. Liu, X. Lou, J. Du, M. Guan, J. Wang, X. Ding and J. Zhao, *Analyst*, 2012, **137**, 70.
- 15 X. Mao, L. Yang, X.-L. Su and Y. Li, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1178.
- 16 M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden and P. E. Nielsen, *Nature*, 1993, **365**, 566.
- 17 P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, 1991, **254**, 1497.
- 18 C. Suparpprom, C. Srisuwannaket, P. Sangvanich and T. Vilaivan, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 2833.
- 19 T. Vilaivan and C. Srisuwannaket, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1897.
- 20 C. Ananthanawat, T. Vilaivan and V. P. Hoven, *Sens. Actuators, B*, 2009, **137**, 215.
- 21 C. Ananthanawat, V. P. Hoven, T. Vilaivan and X. Su, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 1918.
- 22 C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V. P. Hoven and X. D. Su, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 1064.
- 23 C. Ananthanawat, T. Vilaivan, W. Mekboonsonglarp and V. P. Hoven, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 3544.
- 24 B. Boontha, J. Nakkuntod, N. Hirankarn, P. Chaumpluk and T. Vilaivan, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8178.
- 25 M. A. Cook, A. M. Osborn, J. Bettendorff and P. A. Sobecky, *Microbiology*, 2001, **147**, 2089.
- 26 M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne and T. Horn, *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, 4937.
- 27 E. Heinicke, U. Kumar and D. G. Munoz, *J. Immunol. Methods*, 1992, **152**, 227.
- 28 M. Musiani, M. Zerbini, D. Gibellini, G. Gentilomi, S. Venturoli, G. Gallinella, E. Ferri and S. Girotti, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 2047.
- 29 M. Schäferling and S. Nagl, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 500.
- 30 N. Graf, S. Kassube and R. Krämer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 4786.
- 31 N. Graf and R. Krämer, *Chem. Commun.*, 2006, 4375.
- 32 J. J. Leary, D. J. Brigati and D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1983, **80**, 4045.
- 33 M. Renz and C. Kurz, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 3435.
- 34 X. Su, H. F. Teh, X. H. Lieu and Z. Q. Gao, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 7192.
- 35 N. Zhang and D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8424.
- 36 C. Kemper, K. Berggren, Z. Diwu and W. F. Patton, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 881.
- 37 K. C. Reed and D. A. Mann, *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**, 7207.
- 38 C.-M. Cheng, A. W. Martinez, J. Gong, C. R. Mace, S. T. Phillips, E. Carrilho, K. A. Mirica and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 4771.
- 39 A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3.
- 40 S. B. Lee, R. R. Koepsel, S. W. Morley, K. Matyjaszewski, Y. J. Sun and A. J. Russell, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 877.
- 41 D. Roy, J. S. Knapp, J. T. Guthrie and S. Perrier, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 91.
- 42 F. Zhou, Z. Zheng, B. Yu, W. Liu and W. T. S. Huck, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16253.
- 43 M. Ciampolini and N. Nardi, *Inorg. Chem.*, 1966, **5**, 41.
- 44 P. Akkahat and V. P. Hoven, *Colloids Surf., B*, 2011, **86**, 198.
- 45 A. Carlmark and E. Malmstrom, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 900.
- 46 H. Dong and K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2008, **41**, 6868.
- 47 K. Matyjaszewski, H. C. Dong, W. Jakubowski, J. Pietrasik and A. Kusumo, *Langmuir*, 2007, **23**, 4528.
- 48 K. Matyjaszewski, W. Jakubowski, K. Min, W. Tang, J. Y. Huang, W. A. Braunecker and N. V. Tsarevsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 15309.
- 49 S. Gupta, M. Agrawal, M. Conrad, N. A. Hutter, P. Olk, F. Simon, L. M. Eng, M. Stamm and R. Jordan, *Adv. Funct. Mater.*, 2010, **20**, 1756.
- 50 J.-K. Chen and B.-J. Bai, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 21341.
- 51 A. Emileh, E. Vasheghani-Farahani and M. Imani, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 1986.
- 52 A. H. Al-Hakim and R. Hull, *Biochem. J.*, 1988, **251**, 935.



New calix[4]arene derivatives as ionophores in polymeric membrane electrodes for Ag(I): Comparative selectivity studies and detection of DNA hybridization

Wanwisa Janrungratsakul^a, Tirayut Vilaivan^a, Chotima Vilaivan^a, Sarayut Watchasit^a, Chomchai Suksai^b, Wittaya Ngeontae^c, Wanlapa Aeungmaitrepirom^a, Thawatchai Tuntulani^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2012

Received in revised form

19 November 2012

Accepted 21 November 2012

Available online 27 November 2012

Keywords:

Silver ion selective electrode

Peptide nucleic acid

Silver nanoparticles

DNA hybridization

ABSTRACT

Four calix[4]arene derivatives containing various donor atoms and different topology (**L1**–**L4**) have been synthesized and used as neutral ionophores to fabricate silver ion selective electrodes (Ag-ISEs) which were characterized in terms of their potentiometric selectivities and complex formation constants. The ionophore **L2** having two nitrogen and two sulfur donors showed stronger interactions with Ag⁺ and the highest selectivity coefficient towards Ag⁺. The best membrane electrode was prepared from **L2** and used to fabricate silver ion selective microelectrodes (Ag-IS μ Es) which could detect silver ions in 1000 μ L samples with detection limit around 1 μ M using sodium ion microelectrodes as a pseudo reference electrode. Such potentiometric measurement was then applied to detect DNA hybridization on a gold substrate, employing immobilized lipoic acid-modified pyrrolidinyl PNA (Lip-acpcPNA) as a probe. The hybridization between the neutral Lip-acpcPNA probe and DNA target led to a negatively charged surface that could bind positively charged silver nanoparticles (AgNPs⁺) via electrostatic interactions. The hybridization signal was observed by dissolution of the electrostatically adsorbed AgNPs⁺ with hydrogen peroxide. Excellent discrimination of complementary from single mismatched and non-complementary DNA targets was achieved under non-stringent conditions. The detection limit of DNA was 0.2 μ M in 1000 μ L samples.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Potentiometry based on ion selective electrodes (ISEs) has been widely used for determining the activity of metal ions for several decades [1]. Since ISEs offer several advantages, especially low cost, simplicity and obvious compatibility with miniaturization, they are an excellent tool in analytical applications such as clinical measurements, industrial process control and environmental monitoring. Recently, there has been an increasing interest in using miniaturized ISEs for monitoring protein immunoassays [2] or DNA hybridization [3–5] using Ag, CdS-nanocrystal labels, enzyme tags or liposomes.

Peptide nucleic acid (PNA) is a DNA analog containing nucleobase-modified *N*-(2-aminoethyl)glycine subunits linked together by amide bonds. PNA can form duplexes with complementary DNA with high

thermal stability owing to the absence of electrostatic repulsion between PNA and DNA strands. PNA also discriminates single-base mismatched DNA with high specificity [6]. Employing the unique uncharged properties of PNA backbone, two research groups [7,8] reported the use of PNA as a probe to detect non-labeled oligonucleotides specifically through electrostatic interactions between positively charged metallic nanoparticles and negatively charged backbone of DNA hybridized with the neutral PNA probe.

We aim to fabricate a polymer membrane silver ion selective microelectrode (Ag-IS μ E) that can detect DNA hybridization with the neutral PNA probe using positively charged silver nanoparticles (AgNPs⁺) as a potentiometric marker. A variety of ionophores containing π -electrons [9–11] or heteroatoms [12–17] as coordinate sites have been successfully used to construct Ag-ISEs for monitoring and determining silver ions. Nevertheless, Szigeti and co-workers showed that selectivity coefficients of membranes containing π -coordinating calix[4]arene ionophores were worse than those containing calix[4]arene incorporating sulfur donors, resulting in less discrimination of Ag⁺ from other cations [18].

* Corresponding author. Tel.: +66 2 2187643; fax: +66 2 2187598.

E-mail address: tthawatc@chula.ac.th (T. Tuntulani).

Therefore, we designed and synthesized four calix[4]arene derivatives **L1**–**L4** containing various donor atoms and different topology, which were used as neutral ionophores to fabricate Ag-ISEs. The characteristics such as selectivity, lower detection limit and formation constant of the four ionophores synthesized towards Ag^+ in polymeric membranes were compared in order to choose the best ionophore from which to fabricate a microelectrode to be used in combination with PNA for monitoring DNA hybridization.

The principle of our potentiometric sensors for detection of DNA hybridization is illustrated in Fig. 1. PyrrolidinyI PNA with a D-propyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) [19–21] which shows excellent specificity for DNA recognition is used as a probe in this work. The acpcPNA is modified at the N-terminus with lipoic acid and the so-obtained Lip-acpcPNA is covalently immobilized on the surface of a gold substrate. The target DNA is hybridized with the electrostatically neutral Lip-acpcPNA resulting in a negatively charged surface due to the phosphate backbone of the target DNA. Addition of AgNPs^+ [22,23] results in adsorption of the AgNPs^+ on the gold substrate through electrostatic interactions. The adsorbed AgNPs^+ on the gold surface is then oxidized by H_2O_2 to release silver ions, which can be detected with our fabricated Ag-ISE.

2. Experimental

2.1. Materials

p-tert-Butylcalix[4]arene-tetraacetic acid tetraethyl ester (Na(X)), potassium tetrakis[4-chlorophenyl]borate (KTPClPB), bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS), *o*-nitrophenyl octyl ether (*o*-NPOE), high molecular weight poly(vinyl chloride) (PVC), and tetrahydrofuran (THF) were purchased in selectophore[®] or puriss quality from Fluka. Nitrate salts of cations were of analytical grade obtained from Merck, Fluka, Sigma–Aldrich, Reidel and Carlo Erba. 30% (v/v) Hydrogen peroxide (H_2O_2) was purchased from Fisher Scientific. All solutions were prepared with deionized water with the specific resistivity of 18.2 MΩ cm (Milli-Q water purification system; Bedford, MA, USA).

Chemicals for synthesis of AgNPs^+ , i.e., silver nitrate (AgNO_3), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium borohydride (NaBH_4) were purchased from Merck.

All oligonucleotides were purchased from Biogenomed Co., Ltd. The sequences of complementary, single base mismatched and non-complementary DNA targets were 5'-GTCATAGCATCA-3', 5'-GTCATCGCATCA-3' and 5'-AAGGCCTATGTC-3', respectively.

2.2. Preparation of membrane electrodes

The membrane contained 1 wt% ionophore, KTPClPB (75 mol% relative to ionophore), 33 wt% PVC and 66 wt% *o*-NPOE. All components (220 mg in total) were dissolved in 2.5 mL of THF or $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{THF}$ (1:2:10 v/v) and poured into a glass ring (30 mm i.d.) fixed on a glass plate. Then, the solvent was allowed to evaporate at room temperature overnight. A transparent membrane of about 200 μm in thickness was obtained. The membrane was punched into circular films (7.5 mm i.d.) and glued with a PVC/THF slurry on the top of a PVC tube and connected to a micropipette tip as an electrode body. An internal filling solution containing 10 mM AgNO_3 was put into this PVC tube which connected to a micropipette tip and a AgCl-coated silver wire was placed into it. The prepared membrane electrode was conditioned in 10 mM AgNO_3 solution for overnight prior to use.

2.3. Selectivity measurements

The potentiometric selectivity coefficients were determined by the separate solution method (SSM) [24]. The membranes were conditioned overnight in the solution of interfering metal ions (nitrate salt). The response of the electrode was first measured against the interfering metal ions (10^{-7} – 10^{-2} M) by using 10 mM of the same interfering cations (chloride salt) as an inner filling solution. The electrode was then used to measure the response of silver nitrate solutions. Selectivity coefficients of each metal were performed in triplicate (using a new membrane for each replicate). The interfering ions in this study were Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} . To determine the selectivity coefficients of Hg^{2+} and Pb^{2+} , the pH of solution was

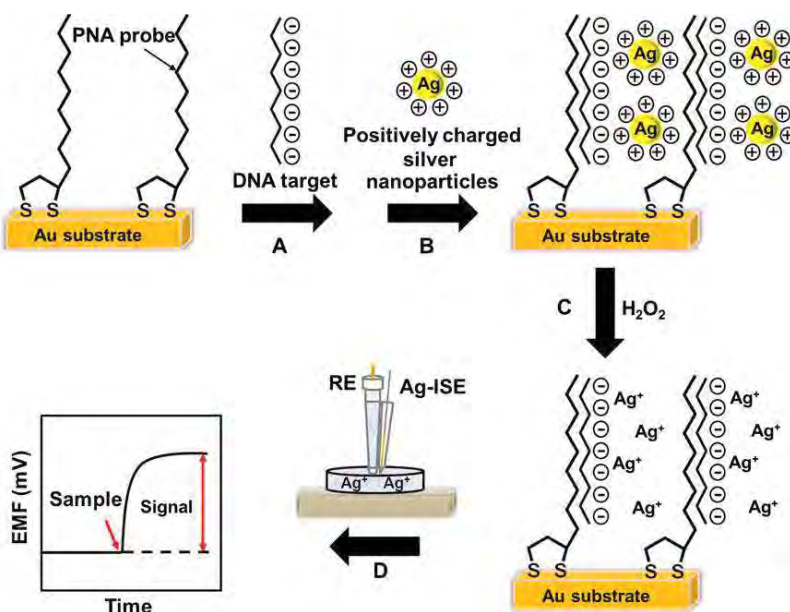


Fig. 1. Representation of AgNPs^+ -based label-free potentiometric DNA detection.

adjusted to 2 and 4, respectively with HNO₃. The selectivity coefficients were calculated from the mean value of triplicate experiments with the standard deviation.

2.4. Preparation of sandwich membranes

In order to determine ion–ionophore complex formation constants in the solvent polymeric membrane, it requires membrane potential measurements on two-layer sandwich membranes [25–27], where only one side contains the ionophore. The membrane compositions and the formation constant are shown in Table 1.

The conventional standard size membranes, with and without ionophore, were conditioned in 5 mM AgNO₃ overnight. The sandwich membrane was prepared by attaching two individual membranes together and visibly checked for air bubbles before placing in the electrode body. The membrane with the ionophore was contacted with sample solution (5 mM AgNO₃) that is the same solution as the conditioning and inner filling solutions. All potentiometric measurements were carried out at ambient temperature in unstirred salt solution versus a Ag/AgCl reference electrode with 1 M LiOAc as a salt bridge electrolyte. The range of time required from attaching the membrane until the membrane potential measurement was less than 1 min. The potential value was continuously recorded for several hours.

Membrane potential values, E_M , were determined by subtracting the cell potential for membrane without ionophore from that of the sandwich membrane. The formation constants were calculated using Eq. (1).

$$\log \beta_{ILn} = \left(\frac{E_M z_1 F}{2.303 RT} \right) - n \log \left(L_T - \frac{n R_T}{z_1} \right) \quad (1)$$

L_T is the total concentration of the ionophore. R_T is the concentration of lipophilic ion exchanger. R , T , F , n and z_1 are the gas constant, the absolute temperature, the Faraday constant, the complex stoichiometry and the charge of the tested ion, respectively.

2.5. Preparation of Lip-acpcPNA

The 12-mer acpcPNA probe with a sequence of TGATGCTATGAC-Lys (Mtt) was synthesized from the respective *N*-Fmoc-protected monomers on a solid support (Tentagel, Rink amide linker) according to a previously published protocol [19–21]. After *N*-Fmoc and nucleobase side-chain deprotections, it was further modified at the *N*-terminus with an aminoethoxyethoxyacetyl (O) linker followed by DL-lipoic acid (HATU/DIEA activation). The Lip-acpcPNA was then cleaved from the solid support using trifluoroacetic acid (TFA) and

purified by reverse phase HPLC. The sequence was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Lip-O-TGATGCTATGAC-LysNH₂, Calcd.: m/z =4540.0, Found: m/z =4539.7) and by hybridization with its complementary DNA (d 5'-GTCATAGCATCA-3') (T_m =76.7 °C at 1.0 μM PNA, 1.0 μM DNA in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 containing 100 mM NaCl).

2.6. Preparation of fabricated Ag-ISμE and EMF measurements for DNA biosensor

The membrane for the Ag-ISμE was prepared as reported previously [28]. The cocktail membrane containing **L2** (0.74 wt%, 10.31 mmol kg^{−1}), KTpCIPB (0.25 wt%, 5.03 mmol kg^{−1}), PVC (32.99 wt%) and *o*-NOPE (66.02 wt%) was prepared in an appropriate volume of THF after stirring 1 h. The Ag-ISμE was fabricated from the tip of 1000 μL micropipette (0.5 mm i.d.) dipped into membrane cocktail for 3 s. It was left to stand in vertical position to allow the solvent to evaporate. The membrane thickness is around 0.5 mm. The resulting microelectrodes were conditioned in 10 mM AgNO₃ solution for overnight prior to use. An internal filling solution containing 10 mM AgNO₃ was put into a micropipette tip and a AgCl-coated silver wire was placed into the solution.

Sodium ion selective microelectrode (Na-ISμE) prepared from Na(X) (0.99 wt%, 10.00 mmol kg^{−1}), KTpCIPB (0.25 wt%, 5.03 mmol kg^{−1}), PVC (32.85 wt%) and DOS (65.91 wt%) was used as a reference electrode. The components were dissolved in THF. The inner filling solution was 10 mM NaCl, and the conditioning solution was 10 mM NaNO₃.

Potentiometric measurements were performed in 1000 μL samples with a Na-ISμE as pseudo reference electrode in unstirred solutions with a 16-channel electrode monitor (Lawson Labs Inc., Malvern, PA 19355, USA) at room temperature. The activity coefficients of silver ions in sample solutions were calculated according to the Debye–Hückel approximation [29].

2.7. Preparation of AgNPs⁺

The preparation of CTAB-coated silver nanoparticles was carried out using the previous published procedure with modifications [22,23]. The solution of CTAB (2 mL, 1 mM) in ethanol was added in aqueous solution of AgNO₃ (25 mL, 5 mM) and stirred for 10 min. Then, 1% v/v freshly prepared aqueous NaBH₄ was added under vigorous stirring. The mixture immediately turned yellow-green and left stirring for 1 h.

Fig. 2 shows the UV–vis spectrum of the synthesized CTAB-coated AgNPs with a strong surface plasmon band at 397 nm.

Table 1

Membrane compositions, response properties based on ionophores **L1–L4** and experimental membranes potentials and corresponding ionophore complex formation constants determined with segmented sandwich membranes for ionophores **L1–L4** in PVC membrane assuming 1:1 stoichiometry of their complexes with Ag⁺.

Ionophore	Membrane composition (wt%)				Slope (mV/decade)	Linear range (M)	Detection limit (M)	Membrane potential E_M (mV)	Formation constant $\log \beta_{ILn}$
	Ionophore, L_T (mmol kg ^{−1})	KTpCIPB, R_T (mmol kg ^{−1})	PVC	Plasticizer					
L1	0.59 (10.27)	0.37 (7.47)	32.91	<i>o</i> -NPOE, 66.13	43.1 ± 0.6	10 ^{−5} to 10 ^{−2}	3.9 × 10 ^{−6}	126 ± 6	4.66 ± 0.10
L2	0.73 (10.10)	0.37 (7.49)	32.93	<i>o</i> -NPOE, 65.97	58.8 ± 0.6	10 ^{−6} to 10 ^{−2}	4.8 × 10 ^{−7}	162 ± 3	5.25 ± 0.05
L3	0.88 (9.96)	0.37 (7.40)	33.00	<i>o</i> -NPOE, 65.75	56.3 ± 0.8	10 ^{−6} to 10 ^{−2}	1.0 × 10 ^{−6}	162 ± 5	5.31 ± 0.08
L4	1.15 (10.24)	0.37 (7.40)	32.78	<i>o</i> -NPOE, 65.70	51.0 ± 0.9	10 ^{−6} to 10 ^{−2}	5.0 × 10 ^{−6}	134 ± 9	4.80 ± 0.16
<i>o</i> -NPOE	–	0.37 (7.46)	33.11	<i>o</i> -NPOE, 66.52	44.3 ± 1.5	10 ^{−5} to 10 ^{−2}	4.9 × 10 ^{−6}	–	–

Transmission electron microscopy (TEM) has been used to characterize shape and size of the AgNPs⁺. A TEM image in Fig. 3 clearly indicates that AgNPs⁺ are spherical and have an average particle size of 20 nm. The particles have been found to be colloiddally stable for at least two months.

2.8. Preparation of immobilized Lip-acpcPNA on gold substrate and DNA hybridization

The gold substrates obtained from Sigma–Aldrich were cut to $10 \times 5 \text{ mm}^2$ pieces with uniform thickness (0.25 mm) by a shearing machine. They were cleaned with piranha solution (3:1 H_2SO_4 : 30% (v/v) H_2O_2), thoroughly rinsed with Milli-Q water, absolute ethanol and dried under pure nitrogen gas. The Lip-acpcPNA solution (10 μM in 10 mM NaNO_3 , 100 μL) was dropped on the gold substrate and the substrate was incubated at 4 °C for 40 h, followed by washing with Milli-Q water.

The immobilized Lip-acpcPNA on the gold substrate was treated with a target DNA solution in 10 mM NaNO_3 (0, 2, 5, 10, 15, 20, 40 and 80 μM , 100 μL) at room temperature for 3 h. The washing procedure was performed in three times to remove any unbound DNA. Then, a solution of AgNPs⁺ (250 ppm, 50 μL) was

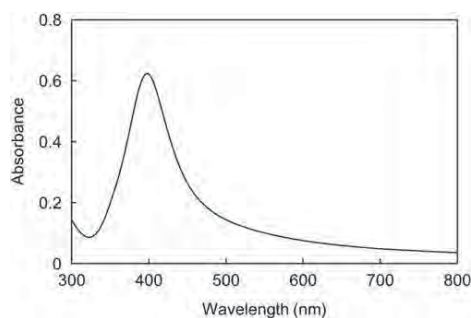


Fig. 2. The plasmon absorption band of diluted AgNPs⁺ ($\lambda_{\text{max}} = 397 \text{ nm}$).

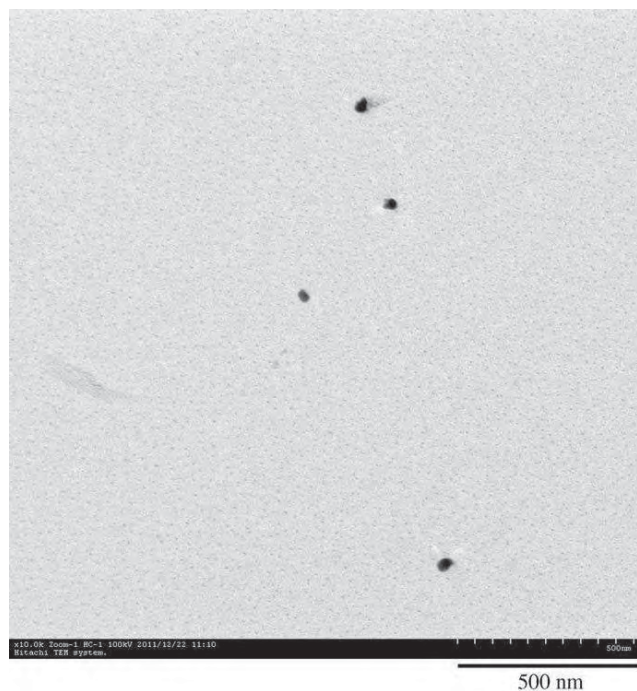


Fig. 3. TEM image of the synthesized AgNPs⁺.

deposited onto the gold substrate. After 2 h at room temperature, the gold substrate was washed three times with Milli-Q water.

Hydrogen peroxide was used for dissolution of the AgNPs⁺ to silver ions. A 0.2 M solution of H_2O_2 (100 μL) was added on the gold substrate and left for 45 min. The solution on the gold substrate was then transferred to an eppendorf tube and the volume adjusted to 1000 μL with 10 mM NaNO_3 . The solution was stirred to decompose the remaining H_2O_2 . The detection of silver ions in the sample was performed in the 1000 μL eppendorf tube by using a Na-ISE as a reference electrode.

3. Results and discussion

3.1. Design and synthesis of ionophores

Calix[4]arene derivatives were designed and synthesized by attaching different functional groups to obtain different topology with various donor atoms for binding Ag^+ . Each compound was modified at one or two opposite phenolic groups of calix[4]arene by benzothiazole and dipicolylamine derivatives yielding calix[4]arene derivatives, **L1**–**L4** (Fig. 4). **L1** and **L2** [28] contained soft nitrogen and sulfur as donor atoms and **L3** and **L4** [30] contained soft nitrogen and hard oxygen donor atoms. In preliminary studies, all synthesized ionophores incorporated in polymeric membranes response to Ag^+ . Ionophore **L4** showed high selectivity towards Ag^+ as investigated by fluorescence, absorption, and ^1H NMR spectroscopy [30]. Generally, Hg^{2+} was a major interference for Ag-ISEs because soft metal ions, Ag^+ , Hg^{2+} and Pb^{2+} preferred to coordinate to soft donor atoms such as sulfur and nitrogen according to Pearson [31].

3.2. Complex formation constants of **L1**–**L4** with Ag^+

The complex formation constants between Ag^+ and ionophores **L1**–**L4** were determined with segmented sandwich membranes, assuming a 1:1 ion–ionophore stoichiometry, and the results are shown in Table 1. The results showed that **L2** and **L3** possessed higher complex formation constants than **L1** and **L4**.

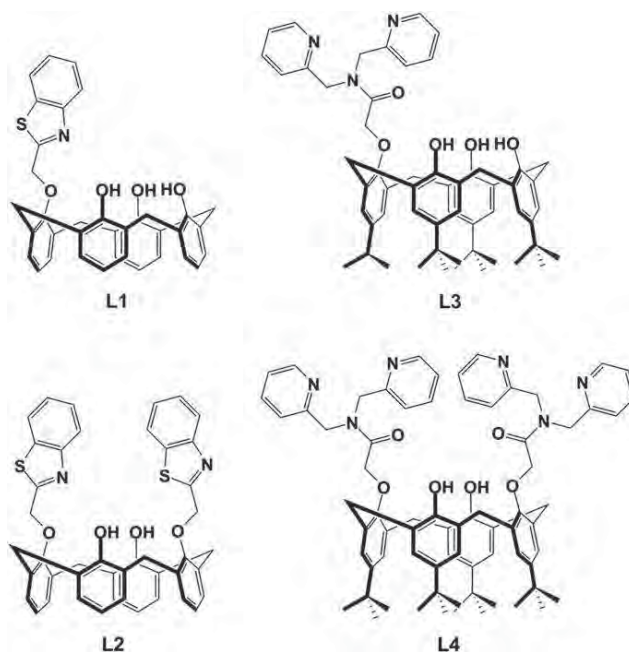


Fig. 4. Structures of four synthesized ionophores **L1**–**L4**.

Ionophores **L2** and **L3** formed strong and stable complexes with Ag^+ in the same order with logarithmic complex formation constants of 5.25 ± 0.05 and 5.31 ± 0.08 for **L2** and **L3**, respectively. The higher formation constant could result in a better selectivity towards the analyte ions due to the superior ability of the ionophore to discriminate between primary ions and interfering ions.

3.3. Effect of functional groups and the number of substituents on the selectivity

The ion selectivity of electrodes based on calix[4]arene singly modified with benzothiazole (**L1**) and dipicolylamine (**L3**) were investigated (Fig. 5). These ionophores possessed soft nitrogen donors capable of forming complexes with Ag^+ . The ionophore **L3** containing three nitrogen and one oxygen donors from dipicolylamine and carbonyl, respectively exhibited more interference from Hg^{2+} . The introduction of heteroatoms of one sulfur and one nitrogen donors from benzothiazole **L1** resulted in better selectivity towards Ag^+ than **L3** as well as decreased interference from Hg^{2+} .

Two substituents on the opposite phenolic groups of calix[4]arene with two benzothiazole **L2** and two dipicolylamine **L4** were synthesized in order to investigate the effect of increasing number of donor groups on ion selectivity compared to the singly-substituted calix[4]arene ionophores **L1** and **L3**. The ionophores having two substituted phenolic groups consistently gave higher selectivity coefficients to $\text{Ag}^+/\text{Hg}^{2+}$: **L2** > **L1** and **L4** > **L3**. This suggested that more donor atoms of the disubstituted calix[4]arene could coordinate with Ag^+ more effectively. Furthermore, the increased lipophilicity of two substituted phenolic groups can prevent leaching of the ionophore from the membranes. Therefore, **L2** gave the best ion selectivity towards Ag^+ compared to other ionophores and exhibited a good discrimination with $> 10^4$ times higher than all tested cations except Hg^{2+} . The best selectivity towards Ag^+ of **L2** corresponded to its high complex formation value. This characteristic may be attributed to the two symmetrical benzothiazole groups on the calix[4]arene bearing two nitrogen and two sulfur donors which could rearrange in a suitable geometry for complexing Ag^+ better than other interfering ions. The results from complex formation and selectivity studies suggested that **L2** was the most appropriate ionophore to fabricate Ag-ISEs.

3.4. Fabrication of Ag-ISE

Our fabricated Ag-ISE has been successfully employed in speciation analysis of the AgNPs solution [28] and in glucose biosensor by using AgNPs as cation maker [32]. In addition, the fabricated Ag-ISE can be used in a wide range of solution pH from pH 2 to 8 with no significant change in the EMF value [28]. In this work, a Ag-ISE is developed for monitoring of DNA hybridization. The calibration curve of Ag^+ -microelectrode was performed in 1000 μL and used 10 mM NaNO_3 (pH 6.0) as background by using a Na^+ -microelectrode as pseudo reference electrode as shown in Fig. 6. Na^+ -microelectrode was chosen as a reference electrode and Na^+ was selected as the background electrolyte since this Ag^+ -microelectrode showed a distinctive discrimination of the logarithmic selectivity coefficient as compared to Na^+ with $\log K_{\text{Ag,Na}}^{\text{pot}} = -6.70$ [28]. The Ag-ISE showed a low detection limit of $9.12 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($\sim 1 \mu\text{M}$) in 1000 μL solution with near the theoretical Nernstian slope of 58.7 mV per decade (inset, Fig. 6).

3.5. Detection of DNA hybridization

Molecules carrying a thiol or a disulfide group can be immobilized by chemisorption onto a gold surface to form self-assembled monolayer (SAM). Covalent immobilization of lipoic

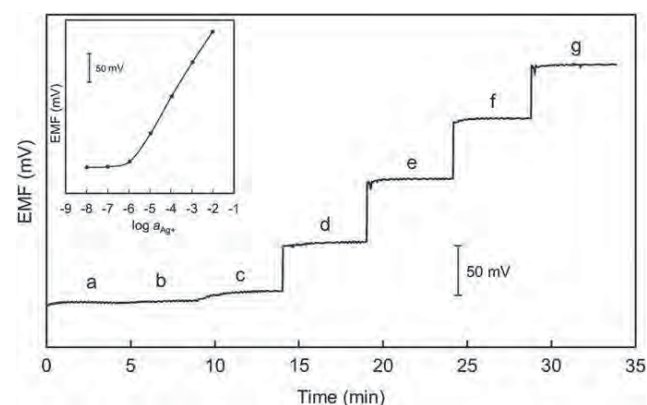


Fig. 6. Time trace line response of the Ag-ISE to increasing level of Ag^+ : (a) 10^{-8} ; (b) 10^{-7} ; (c) 10^{-6} ; (d) 10^{-5} ; (e) 10^{-4} ; (f) 10^{-3} ; (g) 10^{-2} M in 1000 μL of solution with 10 mM NaNO_3 as background with Na -ISE as the pseudo reference electrode. Inset displays the corresponding calibration plot.

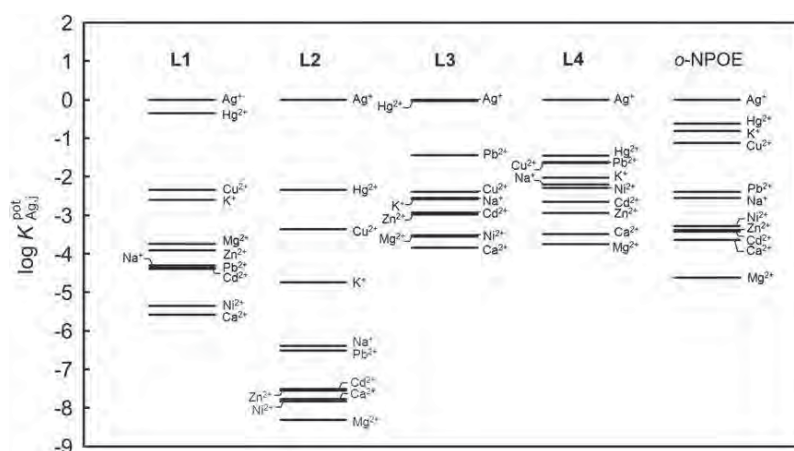


Fig. 5. Comparison of selectivity coefficients ($\log K_{\text{Ag,J}}^{\text{pot}}$) of electrodes based on **L1**–**L4** and the blank membrane (without ionophores). The membrane compositions are 10 mmol kg^{-1} ionophore and 7.5 mmol kg^{-1} KTpClPB in PVC plasticized with o-NPOE.

acid derivatives on gold surface provided a more stable SAM than that of the simple thiol via two S–Au bonds [33]. The disulfide group of Lip-acpcPNA was attached on the gold substrate by immersing in PNA solutions of various concentrations (1, 5 and 10 μM) to investigate the suitable concentration of the PNA probe that allows efficient detection of DNA and discrimination of complementary and mismatched DNA. The potentials of solutions containing Ag^+ obtained from a bare gold substrate, the substrate after Lip-acpcPNA immobilization, and after hybridization with the target DNA on gold substrate were compared after treatment with AgNPs^+ followed by H_2O_2 oxidation (Fig. 7). The hybridization signals with complementary DNA were obtained when the gold surface was treated with 10 μM of Lip-acpcPNA. Initially, non-specific adsorption between AgNPs^+ and the bare gold substrate was observed as shown by the non-zero ΔEMF values. The signals were lowered after immobilization with Lip-acpcPNA (at 10 μM), indicating that the probe can self-assemble onto gold substrate and that AgNPs^+ could not effectively bind to the electrostatically neutral PNA. After hybridization with DNA, the signal was increased compared to without DNA, suggesting that the electrostatic interactions between the negatively charged of DNA backbone and AgNPs^+ had taken place. At lower concentrations of Lip-acpcPNA, i.e. 1 and 5 μM , no difference in EMF values were observed before and after hybridization with target DNA. This suggests that there was not enough immobilized PNA to hybridize effectively with the target DNA. Therefore, 10 μM of Lip-acpcPNA was selected for further experiments.

To determine the specificity of the DNA detection, the Lip-acpcPNA immobilized on gold substrate was hybridized with fully complementary, single base mismatched and non-complementary DNA under the same hybridization condition (10 mM NaNO_3 , pH 6.0). The results illustrated in Fig. 8 showed that the hybridization with fully complementary DNA produced the highest signal, 144 ± 3 mV. Hybridization with single base mismatched and non-complementary DNA gave very low signals which were indistinguishable from the control signal, indicating that there were no hybridization between single base mismatched and non-complementary DNA to Lip-acpcPNA immobilized on the gold substrate. The time trace lines in Fig. 8 clearly showed that this Lip-acpcPNA probe could discriminate fully complementary DNA from non-complementary DNA and single base mismatched DNA under non-stringent conditions.

The Lip-acpcPNA immobilized on gold substrate (at 10 μM concentration) was next hybridized with complementary DNA at different concentrations (2, 5, 10, 15, 20, 40 and 80 μM). Fig. 9 showed that EMF values of hybridization depended on the increasing in concentration of the target DNA. Higher concentrations of the target DNA resulted in more negative charges from phosphate backbone of DNA and gave larger detectable signals of Ag^+ . The lower detection limit was 0.2 μM of the target DNA in

1000 μL sample with a linear range from 0.2 to 2.0 μM target DNA correlating with concentration of Ag^+ in micromolars (μM) was obtained as shown in Fig. 9.

The results indicate that the proposed system can detect DNA hybridization by following signals of Ag^+ which obtained from dissolution of positively charged CTAB-coated AgNPs interacting with negatively charged DNA. In addition, this detection system is inexpensive and requires fewer steps for detecting the hybridization between Lip-acpcPNA probe and the DNA target as compared to other systems using electrostatic interactions between positively charged nanoparticles and negatively charged backbone of DNA hybridized with the neutral PNA probe [7,8].

4. Conclusion

The potentiometric studies of electrodes from compounds **L1**–**L4** showed that they could be used as ionophores in Ag-ISEs. The ionophore **L2** containing two nitrogen and two sulfur donor atoms showed optimum selectivity towards Ag^+ compared to other ionophores. The complex formation constant of **L2** was relatively high corresponding to its best selectivity towards Ag^+ . Furthermore, we have demonstrated that the simple potentiometric method based on Ag-ISE using **L2** as an ionophore in combination with pyrrolidiny peptide nucleic acid probe could be used to detect DNA hybridization from the signal of silver ions, which derived from the electrostatic interactions between the

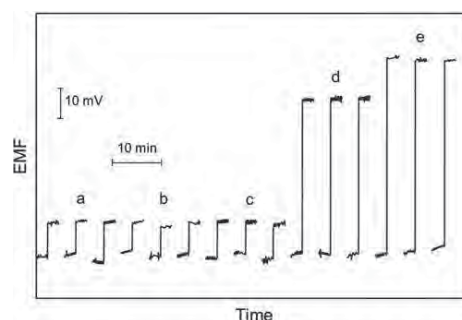


Fig. 8. Potentiometric hybridization response: (a) control solution (10 mM NaNO_3 , zero target), (b) 40 μM non-complementary DNA, (c) 40 μM single base mismatched DNA, (d) 20 μM target DNA, and (e) 40 μM target DNA (as complementary targets) after DNA hybridization. Potentiometric measurements were performed in 1000 μL samples with Na-ISE as the pseudo reference electrode and 10 mM NaNO_3 as a background solution.

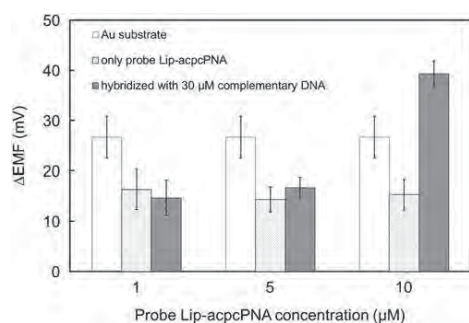


Fig. 7. Effect of concentration of probe Lip-acpcPNA on the response (ΔEMF values obtained from the subtraction from the background solution).

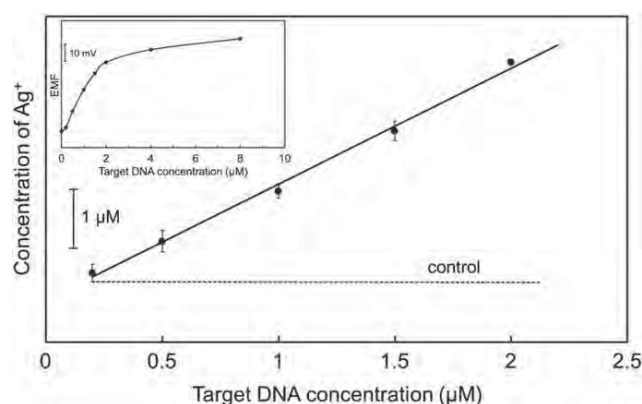


Fig. 9. Calibration plot for the potentiometric monitoring of AgNPs^+ -based label-free DNA hybridization in 1000 μL eppendorf tube (error bars: SD, $N=3$). The dashed line corresponds to control signal (no target DNA).

AgNPs⁺ and the negatively charged target DNA hybridized to the neutral Lip-acpcPNA probe immobilized on the gold substrate.

Acknowledgments

WJ would like to thank the Commission on Higher Education, Thailand for supporting by grant fund under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Join Ph.D. Program Thai Doctoral degree for this research. Additionally, the authors gratefully acknowledge financial support from the Thailand Research Fund (RTA5380003 to TT and RTA5280002 to TV).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.046>.

References

- [1] J. Wang, Analytical Electrochemistry, 3rd ed., Wiley, New York, 2006.
- [2] K.Y. Chumbimuni-Torres, Z. Dai, N. Rubinova, Y. Xiang, E. Pretsch, J. Wang, E. Bakker, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 13676–13677.
- [3] A. Numnuam, K.Y. Chumbimuni-Torres, Y. Xiang, R. Bash, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, E. Pretsch, J. Wang, E. Bakker, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 410–411.
- [4] J. Wu, K.Y. Chumbimuni-Torres, M. Galik, C. Thammakhet, D.A. Haake, J. Wang, Anal. Chem. 81 (2009) 10007–10012.
- [5] K.Y. Chumbimuni-Torres, J. Wu, C. Clawson, M. Galik, A. Walter, G. - U. Flechsig, E. Bakker, L. Zhang, J. Wang, Analyst 135 (2010) 1618–1623.
- [6] J. Wang, E. Palecek, P.E. Nielson, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P.A.M. Farias, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 7667–7670.
- [7] L. Fabris, M. Dante, G. Braun, S.J. Lee, N.O. Reich, M. Moskovits, T.-Q. Nguyen, G.C. Bazan, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 6086–6087.
- [8] S.K. Kim, H. Cho, J. Jeong, J.N. Kwon, Y. Jung, B.H. Chung, Chem. Commun. 46 (2010) 3315–3317.
- [9] K. Kimura, S. Yajima, K. Tatsumi, M. Yokoyama, M. Oue, Anal. Chem. 72 (2000) 5290–5294.
- [10] S. Yajima, N. Yoshioka, M. Tanaka, K. Kimura, Electroanalysis 15 (2003) 1319–1326.
- [11] J. Bobacka, T. Lahtinen, H. Koskinen, K. Rissanen, A. Lewenstam, A. Ivaska, Electroanalysis 14 (2002) 1353–1357.
- [12] D. Siswanta, K. Nagatsuka, H. Yamada, K. Kumakura, H. Hisamoto, Y. Shichi, K. Toshima, K. Suzuki, Anal. Chem. 68 (1996) 4166–4172.
- [13] Z. Yan, Y. Lu, X. Li, Sens. Actuators B 122 (2007) 174–181.
- [14] A. Demirel, A. Doğan, G. Akkuş, M. Yilmaz, E. Kiliç, Electroanalysis 18 (2006) 1019–1027.
- [15] X. Zeng, L. Weng, L. Chen, X. Leng, Z. Zhang, X. He, Tetrahedron Lett. 41 (2000) 4917–4921.
- [16] L. Chen, H. Ju, X. Zeng, X. He, Z. Zhang, Anal. Chim. Acta 437 (2001) 191–197.
- [17] X. Zeng, L. Weng, L. Chen, F. Xu, Q. Li, X. Leng, X. He, Z.-Z. Zhang, Tetrahedron 58 (2002) 2647–2658.
- [18] Z. Szigeti, A. Malon, T. Vigassy, V. Csokai, A. Grün, K. Wygladacz, N. Ye, C. Xu, V.J. Chebny, I. Bitter, R. Rathore, E. Bakker, E. Pretsch, Anal. Chim. Acta 572 (2006) 1–10.
- [19] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, Org. Lett. 8 (2006) 1897–1900.
- [20] C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, Artif. DNA: PNA & XNA 2 (2011) 50–59.
- [21] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V.P. Hoven, X. Su, Biosens. Bioelectron. 25 (2010) 1064–1069.
- [22] V. Patil, R.B. Malvankar, M. Sastry, Langmuir 15 (1999) 8197–8206.
- [23] G. Wei, L. Wang, H. Zhou, Z. Liu, Y. Song, Z. Li, Appl. Surf. Sci. 252 (2005) 1189–1196.
- [24] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, Chem. Rev. 97 (1997) 3083–3132.
- [25] Y. Mi, E. Bakker, Anal. Chem. 71 (1999) 5279–5287.
- [26] E. Bakker, M. Willer, M. Lerchi, K. Seiler, E. Pretsch, Anal. Chem. 66 (1994) 516–521.
- [27] Y. Qin, Y. Mi, E. Bakker, Anal. Chim. Acta 421 (2000) 207–220.
- [28] W. Ngeontae, W. Janrungratsakul, N. Morakot, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, Sens. Actuators B 134 (2008) 377–385.
- [29] P.C. Meier, Anal. Chim. Acta 136 (1982) 363–368.
- [30] R. Joseph, B. Ramanujam, A. Acharya, C.P. Rao, J. Org. Chem. 74 (2009) 8181–8190.
- [31] R.G. Pearson, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 3533–3539.
- [32] W. Ngeontae, W. Janrungratsakul, P. Maneewattanapinyo, S. Ekgasit, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, Sens. Actuators B 137 (2009) 320–326.
- [33] T.M. Willey, A.L. Vance, C. Bostedt, T. van Buuren, R.W. Meulenberg, L.J. Terminello, C.S. Fadley, Langmuir 20 (2004) 4939–4944.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb

A comparative study of a label-free DNA capacitive sensor using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized through polyphenylenediamine and polytyramine non-conducting polymers

Supanee Sankoh^{a,b,c}, Saluma Samanman^{a,b,c}, Orawan Thipmanee^{a,b,c}, Apon Numnuam^{a,b,c}, Warakorn Limbut^{a,b,d}, Proespichaya Kanatharana^{a,b,c}, Tirayut Vilaivan^e, Panote Thavarungkul^{a,b,f,*}

^a Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^d Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^e Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^f Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2012

Received in revised form

19 November 2012

Accepted 21 November 2012

Available online 30 November 2012

Keywords:

Non-conducting polymer

Polyphenylenediamine

Polytyramine

acpcPNA

Capacitive system

Sensor

ABSTRACT

This work has, for the first time, reported a comparative study on the performances of a label-free capacitive DNA sensor based on an immobilized pyrrolidinyl peptide nucleic acid with a D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) attached to three easy to prepare non-conducting polymers. Two phenylenediamine (PD) isomers (*ortho*- and *para*-) and one tyramine monomer were electropolymerized to form polymer films. The hybridization between the acpcPNA probes, immobilized on the polymer layer, and the target DNA was detected directly by measuring the capacitance change. Using the optimal electropolymerized conditions, the highest sensitivity of $20.9 \pm 0.6\text{-nF cm}^{-2} (\log M)^{-1}$ was obtained from poly-*para*-PD (PpPD) with a lowest detection limit of 0.2 pM. A wide linear range, 1.0×10^{-12} to 1.0×10^{-8} M, was obtained for both the PpPD and polytyramine (Pty). A narrower linear range of 1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-8} M was obtained from the poly-*ortho*-PD (PoPD). The surface morphology was observed using scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The polymer with the better surface morphology, i.e., smoother, denser and more homogeneous was the one with more immobilized probes and a better overall performance. All modified polymers gave a high % signal suppression (%SS) for both the single and double mismatched target DNAs, and indicated its high specificity. The electrodes can be reused for at least 68 analytical cycles. The effects of the target length and probe concentrations were also investigated. Under the operating conditions of this work the system would be very useful for the cost-effective analysis of ultra-trace levels of DNA in samples.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Label-free DNA sensors are now being widely investigated due to their low cost, simplicity of operation and fast response times. In recent years, there has been an increase in the use of synthetic peptide nucleic acid (PNA) probes instead of DNA probes because of their higher stability [1]. They also provide a higher specificity with faster hybridization kinetics [2,3]. Many transducers have been successfully employed for label-free DNA detection such as mass sensitive [4,5], optical [6,7] and electrochemical transducers [8,9].

One of the systems that has attracted recent interest due to its high sensitivity, simplicity of operation and is relatively inexpensive is the potential step capacitive technique [10–13].

The principle of the potential step capacitive system is based on measuring changes in dielectric properties when a target binds with the sensing element on the electrode surface. One of the important factors to facilitate detection of the change is the insulating property of the immobilized surface. This is to prevent possible interference from electroactive species in the electrolyte solution and reduces the Faradaic current [14,15]. The insulating layer is generally based on the use of a self-assembled monolayer (SAM) of thiol compounds [9,10,12,14–16] for the immobilization of the sensing elements. However, the self-assembly process requires a relatively long preparation time (12–24 h) and a very smooth surface of the gold electrode is a necessity [16,17]. To overcome these problems electropolymerization of a non-conducting

* Corresponding author at: Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand. Tel.: +66 74 288753; fax: +66 74 558849.

E-mail address: panote.t@psu.ac.th (P. Thavarungkul).

polymer on the working electrode is an attractive alternative. It can be produced much more quickly (8 min) and the roughness of the gold electrode is not such a critical factor for the formation of the polymer [18]. Furthermore, these insulator layers [19,20] can be prepared as an ultra-thin film (10–100 nm) [21–24] and provides a large number of surface amine group reactive sites for the immobilization of sensing molecules [19]. Poly-*ortho*-phenylenediamine (PoPD) [17,25], poly-*para*-phenylenediamine (PpPD) [24], and polytyramine (Pty) [16,26] are non-conducting polymers that have been successfully employed as immobilization films for various recognition elements. However, there has not been any report on a DNA sensor based on an immobilized PNA probe prepared on such polymers.

The objective of this work was to compare the performances of a label-free capacitive DNA sensor using an acpcPNA probe immobilized on each of three electropolymerized non-conducting polymers of PoPD, PpPD and Pty. This is the first time such a comparative study has been attempted. The optimal electropolymerized conditions, i.e., the monomer concentration and number of scans, were first investigated together for each polymer. This is also the first time the performances were compared under optimal conditions for each polymer. The sensing element was acpcPNA, a conformationally constrained peptide nucleic acid derived from a D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbone. This is a relatively new PNA system developed by our group [27,28]. This PNA provides a stronger binding affinity and better sequence specificity toward DNA compared to DNA itself [29,30] and aminoethylglycyl PNA (aegPNA) [4,28,31]. The surface morphology of the polymer films was observed using scanning electron microscopy and images obtained from an atomic force microscope. These together with the amount of the immobilized acpcPNA probes were correlated to the performances.

2. Experimental

2.1. Materials

The 9-mer lysine-modified acpcPNA (Ac-TTTTTTTT-LysNH₂) denoted as 'acpcPNA-T9 probe' and the 12-mer mixed base lysine-modified acpcPNA (Bz-TGTCAACTGACT-LysNH₂) denoted as 'acpcPNA-M12 probe', were synthesized by Mrs. Chotima Vilaivan at Chulalongkorn University, Thailand according to the published protocol [27,28]. The acpcPNA probes were purified by reverse phase HPLC (to >90% purity) and their identities were verified by MALDI-TOF mass spectrometry (acpcPNA-T9: *m/z* calcd. 3179.4 found 3179.4; acpcPNA-M12: *m/z* calcd. 4270.6 found 4271.6).

Oligonucleotides (DNAs), complementary, single mismatched, double mismatched and non-complementary target DNAs were from Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency and BioDesign Co., Ltd., Thailand. The DNA sequences are shown as follows (non-complementary regions are indicated by italicized letters):

For the acpcPNA-T9 probe

Complementary DNA

D6comp: 5'-AAAAAA-3'

D9comp: 5'-AAAAAAA-3'

D12comp: 5'-AAAAAAAAA-3'

D27comp: 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

D27compM18a: 5'-TTTTTTTTTAAAAAAAAATTTTTTTT-3'

D27compM18b: 5'-TGCTCAGCTAAAAAAAAATGCTCAGCT-3'

Single mismatched DNA

D9M1G: 5'-AAAAGAAAA-3'

D9M1C: 5'-AAAACAAAA-3'

D9M1T: 5'-AAAATAAAA-3'

Double mismatched DNA

D9M2G: 5'-AAAGAGAAA-3'

D9M2C: 5'-AAACAAAA-3'

D9M2T: 5'-AAATATAAA-3'

Non-complementary DNA

D9non-compa: 5'-TTTTTTTTT-3'

D9non-compb: 5'-TATTATTAT-3'

For the acpcPNA-M12 probe

Complementary DNA

D9comp: 5'-CAGTTGACA-3'

D12comp: 5'-AGTCAGTTGACA-3'

D15compM3: 5'-GCTAGTCAGTTGACA-3'

D30compM18: 5'-GACTGCACCACTGAGTCAGTTGACATGTTGCGAC-3'

Single mismatched DNA

D12M1T: 5'-AGTCAATTGACA-3'

D12M1C: 5'-AGTCACTTGACA-3'

D12M1A: 5'-AGTCAATTGACA-3'

Double mismatched DNA

D12M2T: 5'-AGTTATTGACA-3'

D12M2CG: 5'-AGTCAGTTGACA-3'

D12M2A: 5'-AGTAAATTGACA-3'

Non-complementary DNA

D12non-comp: 5'-TCACTCAACTGT-3'

The three non-conducting monomers, *ortho*-phenylenediamine (*o*-PD), *para*-phenylenediamine (*p*-PD) and tyramine were obtained from BDH (Poole, England), laboratory UNILAB reagent (Sydney–Melbourne, Australia) and Aldrich (Steinheim, Germany), respectively. Glutaraldehyde and 11-mercapto-1-undecanol (11-MUL) were obtained from Sigma-Aldrich® (Steinheim, Germany). All buffers were prepared with deionized water treated with a reverse osmosis-deionizing system (Pentair, Inc., USA). Before use, buffers were filtered through a nylon membrane filter (Vertical®, Albet, Spain, pore size 0.2 μm) with subsequent degassing. Other chemicals were of analytical grade and were used as received.

2.2. Gold electrode preparation

Gold rod electrodes (99.99% purity) with a diameter of 3.0 mm were polished by hand using alumina slurries with particle diameters of 5, 1 and 0.3 μm, respectively and subsequently cleaned by rinsing with distilled water. The electrodes were then placed in a plasma cleaner (Model PDC-32G, Harrick, New York, USA) for 15 min to remove any organic materials adsorbed onto the surface electrode.

2.3. acpcPNA probe immobilization

The acpcPNA-T9 probe possessing a T9 sequence was chosen for the initial optimization of the model because it is the simplest probe that can form a sufficiently stable hybrid with a complementary DNA target at room temperature (*T_m* ~ 73 °C) and this probe forms only a duplex (not a triplex) with its complementary DNA (dA₉) [28]. Because of its short length and simple composition, this PNA can be synthesized with high efficiency. Furthermore the homo-T sequence contains no exocyclic amino groups that could complicate the immobilization and it also has no electroactive G base that may complicate the interpretation of the results [27,28].

Monomers of *o*-PD and *p*-PD were prepared in 10 mM sodium acetate buffer pH 5.18 [17] and the tyramine monomer was prepared in a solution containing 2.0 mM phosphate buffer pH 7.00 and ethanol (volume ratio of 3:1) [16]. For the immobilization of acpcPNA-T9, the monomer concentration and the number of scans for electropolymerization were optimized at the same time. From the literature 5 mM of *o*-PD [21,32,33], 5 mM of *p*-PD [21,32], and 50 mM of tyramine [16,26] have been used. Therefore, monomer concentrations close to these values were used. For *o*-PD and *p*-PD, 1, 5, 10 and 20 mM of monomer was electropolymerized by cyclic voltammetry at 5, 10, 15 and 20 scans using the potential range from 0.0 to 0.8 V vs. Ag/AgCl with a scan rate of 50 mV s⁻¹. Electropolymerization of tyramine was performed using the same conditions but at concentrations of 5, 15, 35, 50 and 60 mM. The

polymer-coated electrodes were cleaned by rinsing with distilled water and treated with 5% (v/v) glutaraldehyde in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00 at room temperature for 20 min to activate the aldehyde group. Next, 20 μL of a 5.0 μM aqueous solution of acpcPNA-T9 was placed on the polymer coated electrode and the coupling reaction was allowed to proceed overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ [9]. The electrodes were then treated with 1.0 mM ethanolamine pH 8.00 for 7 min to deactivate all the remaining aldehyde groups not coupled to the immobilized acpcPNA-T9 probe. Finally the modified electrodes were immersed in 1.0 mM of 11-MUL blocking solution for 1 h at room temperature to block any remaining pinholes on the electrode surface.

The acpcPNA-M12 probe was also immobilized under the optimal electropolymerized conditions obtained from the above experiments. This is to demonstrate the applicability in a more realistic situation, i.e., to show that the presence of G bases and exocyclic amino groups do not negatively affect the fabrication and performance of the sensor. Different sequences and lengths of DNA targets were also tested to demonstrate the applicability in a more realistic scenario for analyses of real DNA samples where the length of the DNA target is unlikely to be the same as that of the probe.

The electrochemical behavior of each immobilization step was studied by cyclic voltammetry. Electrochemical measurements were carried out using a potentiostat (Metrohm Autolab B.V., The Netherlands) coupled to an electrochemical cell containing the modified working electrode, an Ag/AgCl reference electrode as reference and a platinum wire as an auxiliary electrode.

2.4. Amount of the immobilized acpcPNA probe on the modified electrode surface

The absorbance of the acpcPNA-T9 probe in water was measured at 260 nm using a spectrophotometer (AvaSpec-2048-USB2-UA, Avantes Technical Support, The Netherlands) combined with a SpectroPipetter (Spectropipetter-SPT-2, World Precision Instruments, USA). The A_{260} was used to calculate the concentration from the equation $A = \epsilon bc$, where A is the absorbance, ϵ is the molar extinction coefficient ($79.2 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) of acpcPNA-T9 at 260 nm [34], b is the path length of the SpectroPipetter (1.0 mm) and c is the concentration ($\mu\text{mol mL}^{-1}$). The amount of the acpcPNA probe was then calculated from the concentration of the probe and the volume (20 μL) used for the immobilization. The amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe on the modified electrode prepared under the optimal electropolymerized conditions was determined as the difference between the amount of the probe in

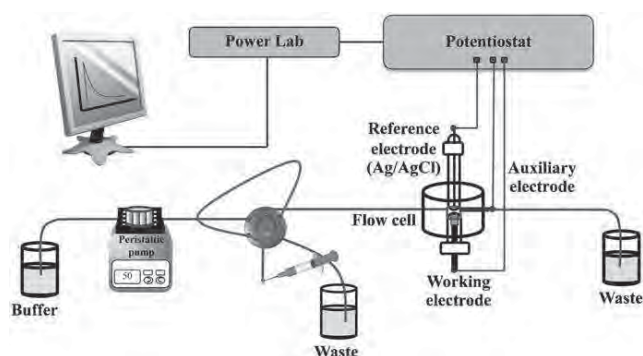


Fig. 1. Schematic diagram showing the flow injection capacitive DNA sensor system.

the solution prepared before the immobilization and the solution collected from the electrode surface after the immobilization.

2.5. Surface morphology characterization

The surface morphology of the polymer coated electrodes was observed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Polymer surfaces were imaged with a JSM 5800 SEM from JEOL, Japan, operated at an accelerating voltage of 20 kV. AFM imaging was performed in a tapping mode with a Nanosurf easyScan 2 from NANOSURF AG, Switzerland.

2.6. Capacitance measurement

The experimental set-up of the flow injection capacitive DNA sensor system is shown in Fig. 1. The modified gold electrode (working electrode), a stainless steel tube (auxiliary electrode) and a custom made Ag/AgCl (reference electrode) were placed in a custom-made measuring flow cell (10 μL) and they were connected to a potentiostat (Model EA161, EDAQ, New South Wales, Australia).

The capacitance was determined from the obtained current response when a potential step of 50 mV (pulse width 6.4 ms) was applied to the working electrode. The system can be represented by a simple RC circuit model and the current-time response can be expressed by Eq. (1) [14]

$$i(t) = \frac{u}{R_s} \exp\left(\frac{-t}{R_s C_{\text{total}}}\right) \quad (1)$$

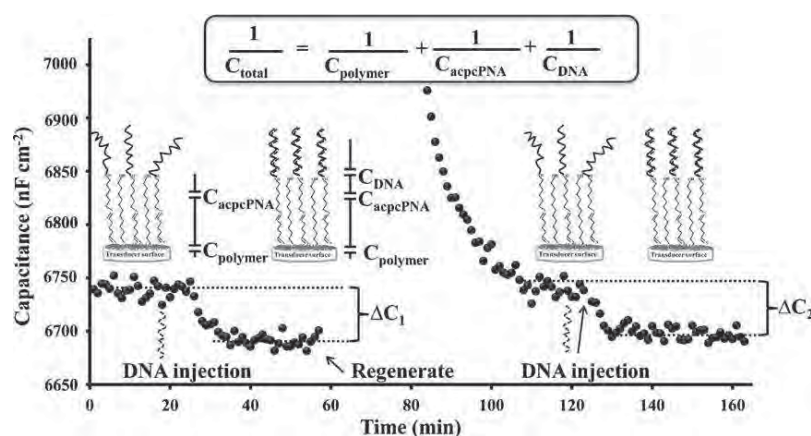


Fig. 2. Capacitance response of the immobilized acpcPNA-T9 modified electrode. The baseline signal of the carrier buffer was first recorded. After the injection of DNA, the hybridization between the DNA and the immobilized acpcPNA-T9 probe caused the capacitance to decrease (ΔC). The regeneration solution was then injected to remove the DNA from the immobilized acpcPNA-T9. When the signal baseline was recovered a new analysis cycle was applied.

where $i(t)$ is the current in the circuit as a function of time, u is the applied pulse potential, R_s is the dynamic resistance of the recognition layer, t is the time elapsed after the potential step is applied, and C_{total} is the total capacitance measured at the working electrode/solution interface. Eq. (2) is obtained by taking the logarithm of Eq. (1)

$$\ln i(t) = \ln \frac{u}{R_s} - \frac{t}{R_s C_{total}} \quad (2)$$

From the linear least-square fitting of $\ln i(t)$ versus t , the R_s and C_{total} were calculated from the intercept and slope of the linear regression equation, respectively. During the continuous flow of the running buffer, a baseline capacitance was obtained. When the target DNA was injected into the flow system it hybridized to the immobilized acpcPNA on the working electrode and the C_{total} decreased (Fig. 2) as described by Eq. (3)

$$\frac{1}{C_{total}} = \frac{1}{C_{polymer}} + \frac{1}{C_{acpcPNA}} + \frac{1}{C_{DNA}} \quad (3)$$

where C_{total} is the total double layer capacitance measured at the working electrode/solution interface, $C_{polymer}$ is the capacitance of the polymer modified layer, $C_{acpcPNA}$ is the capacitance of the acpcPNA layer, and C_{DNA} is the capacitance of the DNA layer. C_{total} was measured every minute and the results were later plotted as a function of time. The capacitance change (ΔC) could be determined (Fig. 2) as

$$\Delta C = C_{before \text{ hybridizing with DNA}} - C_{after \text{ hybridizing with DNA}} \quad (4)$$

The regeneration solution, 300 μ L of 50 mM NaOH [6], was then applied to break the binding between the acpcPNA probe and the target DNA after hybridization. The capacitance then returned to its original baseline, ready for a new analytical cycle (Fig. 2).

2.7. Specificity determination

The specificity of the proposed DNA sensor was studied by comparing the signal of the complementary DNA and the single base and double base mismatched DNA, the % signal suppression (%SS) was calculated according to Eq. (5). A higher %SS reflexes a better specificity.

$$\%SS = \frac{\Delta C_{complementary \text{ DNA}} - \Delta C_{mismatched \text{ DNA}}}{\Delta C_{complementary \text{ DNA}}} \times 100 \quad (5)$$

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the immobilization steps

Fig. 3 shows the cyclic voltammograms of the three monomers at the concentration that provided the highest capacitance response (see Section 3.2), i.e. 5 mM for *o*-PD (Fig. 3(a)) and *p*-PD (Fig. 3(b)), and 50 mM for tyramine (Fig. 3(c)). After the first scan the peak current continuously decreased with each further scan indicating that more and more of the non-conducting polymer was formed and covered the electrode surface.

The degree of insulation of the modified gold electrode after each immobilization step was examined by cyclic voltammetry (Eco Chemie μ -autolab B.V., Utrecht, Netherlands) with 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 0.1 M KCl between -0.3 and 0.7 V at a scan rate of 0.1 V/s vs. a Ag/AgCl electrode. An example of a cyclic voltammogram recorded from a PoPD modified electrode with the immobilized acpcPNA-T9 probe is shown in Fig. 4. The cleaned gold surface showed a voltammogram with large oxidation and reduction peaks (Fig. 4(a) inset). Both peaks decreased substantially when the polymer was coated onto the gold surface (Fig. 4(b)). The insulating property of the electrode surface was further

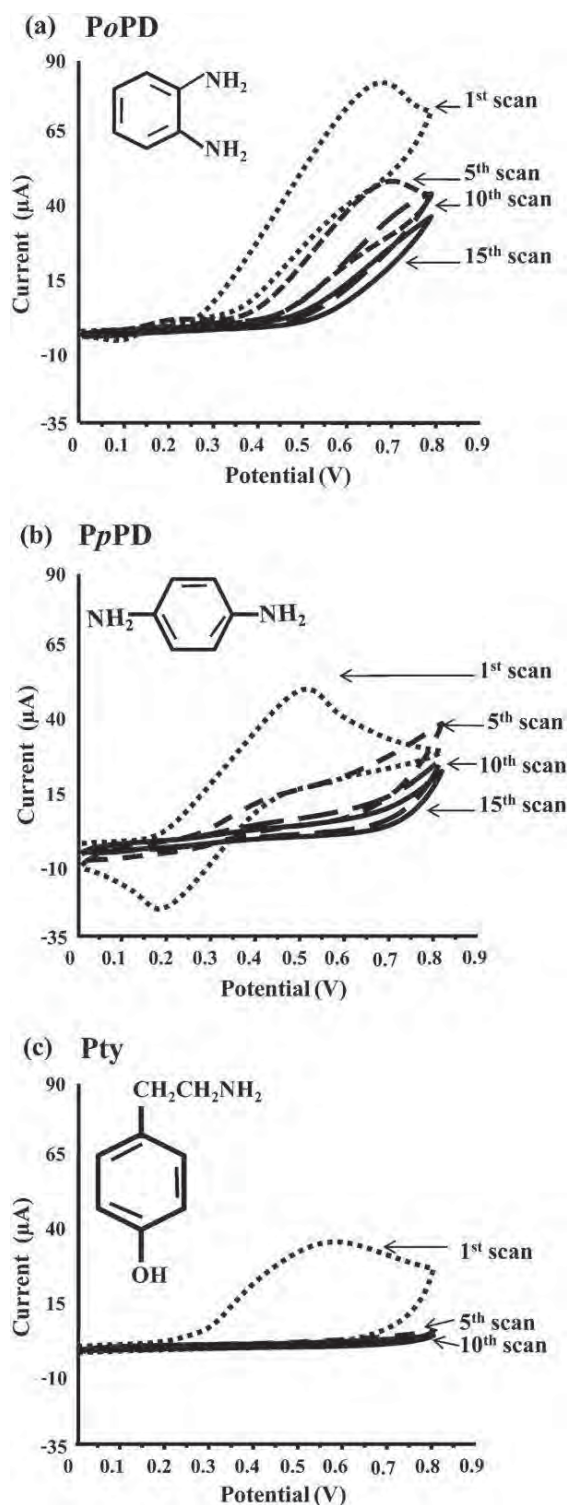


Fig. 3. Cyclic voltammograms of the electropolymerization of the three polymers (a) PoPD, (b) PpPD and (c) Pty in their monomer solution.

increased when the acpcPNA-T9 was immobilized (Fig. 4(c)). This indicated that the acpcPNA-T9 had been successfully immobilized onto the modified gold electrode. The modified surface was then reacted with ethanolamine pH 8.50; this step was to occupy all the remaining aldehyde groups that had not been coupled to the immobilized acpcPNA-T9. After the treatment with 11-MUL

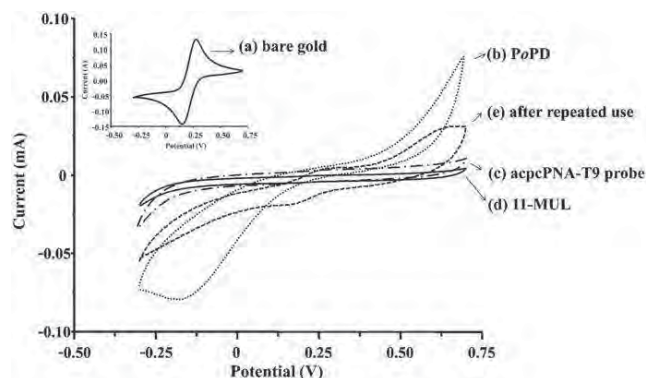


Fig. 4. An example of a cyclic voltammograms obtained from a PoPD immobilized acpcPNA-T9 probe (a) bare gold, (b) PoPD, (c) acpcPNA-T9 probe, (d) 11-MUL before use and (e) after repeated use.

the electrode surface was completely insulated as shown by the disappearance of the redox peaks (Fig. 4(d)). This insulation property is a necessary condition for the non-Faradaic detection of the employed capacitive system [35].

3.2. Effect of monomer concentration and number of scans

The monomer concentration and the number of scans for the electropolymerization that may affect the immobilization, and hence the system performance, were optimized together. The optimal conditions were chosen from the conditions that provided the highest capacitance change using the same concentration of the DNA target at 1.0×10^{-10} M. The measurements were carried out using the following operating conditions: regeneration solution 300 μ L of 50 mM NaOH [6], 10 mM phosphate buffer pH 7.00 as the running buffer, sample volume 300 μ L and flow rate 50 μ L min⁻¹. Fig. 5 shows the capacitance change vs. the concentration of the monomers. At every monomer concentration both PoPD (Fig. 5(a)) and PpPD (Fig. 5(b)) showed an increase of the capacitance change with the number of electropolymerization scan up to 15 scans and then decreased. The optimal concentration was 5 mM and the number of scans was 15 for both PoPD and PpPD. For the Pty modified electrode (Fig. 5(c)) for an increase between 5 and 35 mM, the capacitance change increased with the number of electropolymerization scans whereby the capacitance change decreased with the number of scans at 60 mM. For 50 mM, the capacitance change increased with the number of scans up to 10 scans before the signal decreased. Hence the optimal concentration of Pty was 50 mM and the number of scans was 10. This could be explained from the surface morphology of the polymer coated film and the amount of immobilized acpcPNA which will be discussed in the following sections.

3.3. Surface morphology

3.3.1. Scanning electron microscopy

Fig. 6 shows the SEM images of the three polymer coated surfaces. They are distinctly different from the bare gold electrode surface (Fig. 6a inset). At the optimal concentration and number of scans, 5 mM and 15 scans for PoPD and PpPD, 50 mM and 10 scans for Pty, the surfaces were relatively smooth and the polymer film fully covered the gold electrode surface (Fig. 6(c), (g) and (j)). Some free spaces (dark areas) were observed for the surfaces with a lower number of scans (Fig. 6(a), (b), (e), (f) and (i)). The higher number of scans showed a closely packed lumpy morphology caused by the overlay of the polymer layer (Fig. 6(d), (h), (k) and (l)).

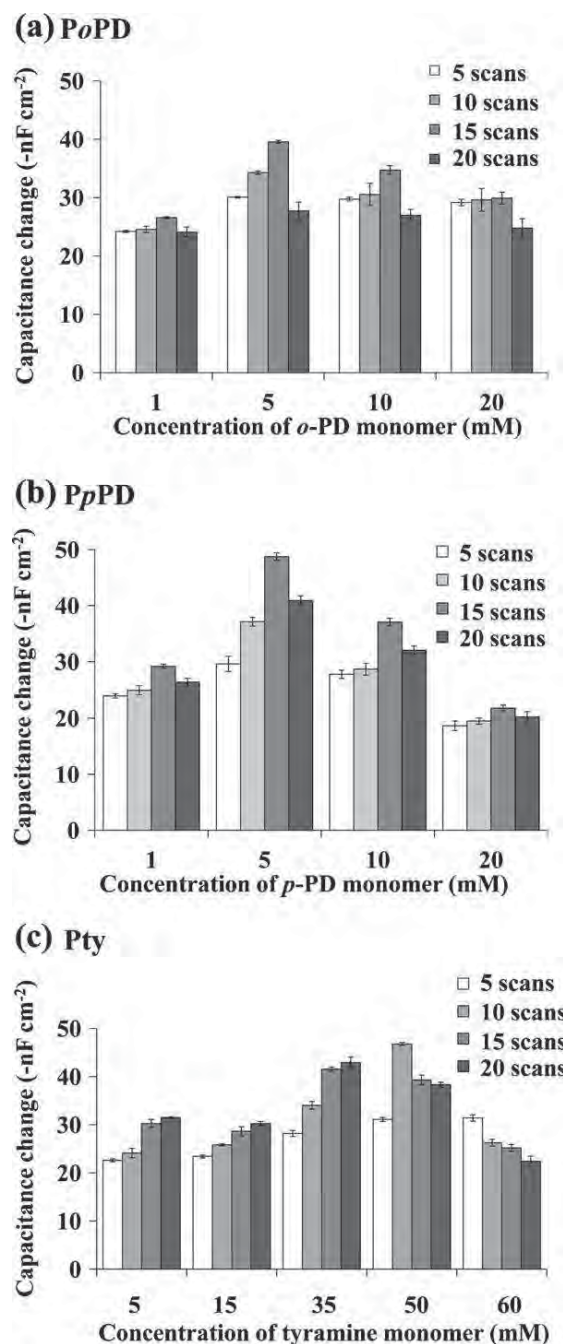


Fig. 5. Effect of monomer concentrations (1, 5, 10 and 20 mM for o-PD and p-PD, and 5, 15, 35, 50 and 60 mM for tyramine) and number of scans (5, 10, 15 and 20 scans) on the electropolymerization of the three non-conducting polymers, (a) PoPD, (b) PpPD and (c) Pty.

3.3.2. Atomic force microscope

Additional information on the film morphology was obtained from the AFM, employed in a tapping mode. An example of the AFM images of the bare gold electrode, the PpPD modified electrode with the lowest number of scans (5 scans), the optimal number of scans (15 scans) and the highest number of scans (20 scans) are presented in Fig. 7. Topographic AFM images of the bare gold electrode showed a relatively rough surface (Fig. 7a1 and a2). The average peak height from several line scans ($n = 10$ lines, 256 points per line) is shown in Fig. 7(a3). The AFM-tip deflections were larger

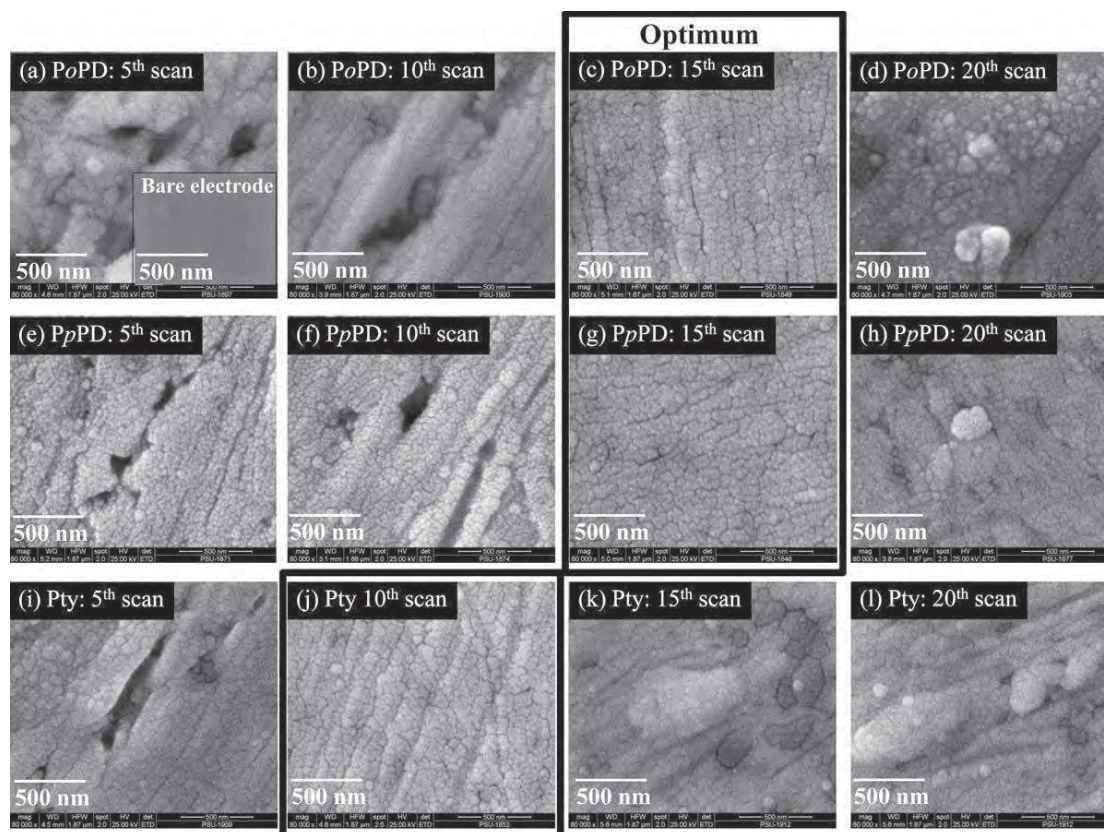


Fig. 6. SEM images of bare gold electrode surfaces electropolymerized with 5 mM of *o*-PD at different numbers of scans (a)–(d), with 5 mM *p*-PD at different numbers of scans (e)–(h), and with 50 mM tyramine monomer concentration at different numbers of scans (i)–(l) from 5 to 20 scans. The images at the optimal number of scan are indicated by the solid frame. Inset (a) is the SEM image of a bare gold electrode.

than 5 nm with a root mean square roughness (RMS) of 10 ± 1 nm. For the PpPD surface with 5 scans, there were some dark spots of an uncoated surface (Fig. 7(b1)) with a lot of jagged peaks (Fig. 7(b2)) observed. This is possibly due to the different height of the coated and uncoated areas. The RMS value was 7.6 ± 0.1 nm, lower than the bare gold surface to indicate that the polymer coated surface was smoother. A lower RMS value of 4.4 ± 0.3 nm, was obtained from the 15 scans, that indicated a more uniform, smoother surface (Fig. 7(c1) and (c2)) with more deposited polymer than for the 5 scans. For 20 scans, the RMS value was 7.9 ± 0.2 nm that is higher than for the 15 scans. This is possibly because of its inhomogeneous surface (Fig. 7(d1) and (d2)). A larger peak height difference was clearly evident in the profile (Fig. 7(d3)). The results from the AFM images corresponded well with those obtained from the SEM images.

Fig. 8 shows the AFM images of the surfaces coated with the three polymers at their optimal concentration and number of scans. For the PoPD modified electrode, the RMS value was 6.8 ± 0.8 nm and the AFM images presented a relatively rough surface (Fig. 8(a1) and (a2)). This is clearly evident in the profile (Fig. 8(a3)). The topography of the PpPD modified electrode (Fig. 8(b1) and (b2)) provided a smoother, denser and more homogeneous surface than the PoPD modified electrode. It also provided a better profile (Fig. 8(b3)) and a lower RMS of 4.4 ± 0.3 nm. For the Pty modified electrode, the RMS value of 5.9 ± 0.5 nm was higher than the PpPD modified electrode, to indicate that it had a rougher surface (Fig. 8(c1) and (c2)). Compared to the PpPD modified electrode, the profile was also more rugged (Fig. 8(c3)).

From the surface morphologies obtained from both the SEM and AFM images it is reasonable to say that there exists an optimal

concentration and number of scans of the polymer that provides a smooth coated electrode surface. For a particular concentration when the number of scans was too few the surfaces were not fully coated. However, too many scans made the coated layer too thick and lumpy. This is part of the reasons behind the different responses shown in Fig. 5. At a lower number of scans (5 and 10 scans for PoPD and PpPD, 5 scans for Pty) a lower signal was obtained because less polymer was coated onto the electrode surface hence a lower amount of the acpPNA-T9 probe could be immobilized (see Section 3.4). At a higher number of scans (20 scans for PoPD and PpPD or 15 and 20 scans for Pty) the layer of the polymer was too thick and this reduced the total capacitance of the modified layer after the final blocking steps (C_{mod}) ($C \propto 1/\text{thickness}$) and resulted in a lower signal. This can be explained as follows.

Let C_{mod} be the total capacitance of all the modified layers and C_{DNA} the capacitance of the bound target DNA, the total capacitance C_{total} according to Eq. (3) is

$$\frac{1}{C_{total}} = \frac{1}{C_{mod}} + \frac{1}{C_{DNA}} \quad (6)$$

If the C_{mod} is low it will dominate the total capacitance and the capacitance change caused by the target DNA was less detectable. Therefore, it is important to have a surface with the highest possible capacitance [14]. For all the modified surfaces at the optimal number of scans the C_{mod} values after the final blocking steps were found to be the highest. That is, the C_{mod} for the PoPD modified electrode at 15 scans was $(7.03 \pm 0.02) \times 10^3$ compared to $(4.230 \pm 0.004) \times 10^3 \text{ nF cm}^{-2}$ at 20 scans and $(12.38 \pm 0.01) \times 10^3$ compared to $(11.88 \pm 0.02) \times 10^3 \text{ nF cm}^{-2}$ for PpPD. For the Pty modified electrode the C_{mod} was $(9.52 \pm 0.02) \times 10^3$,

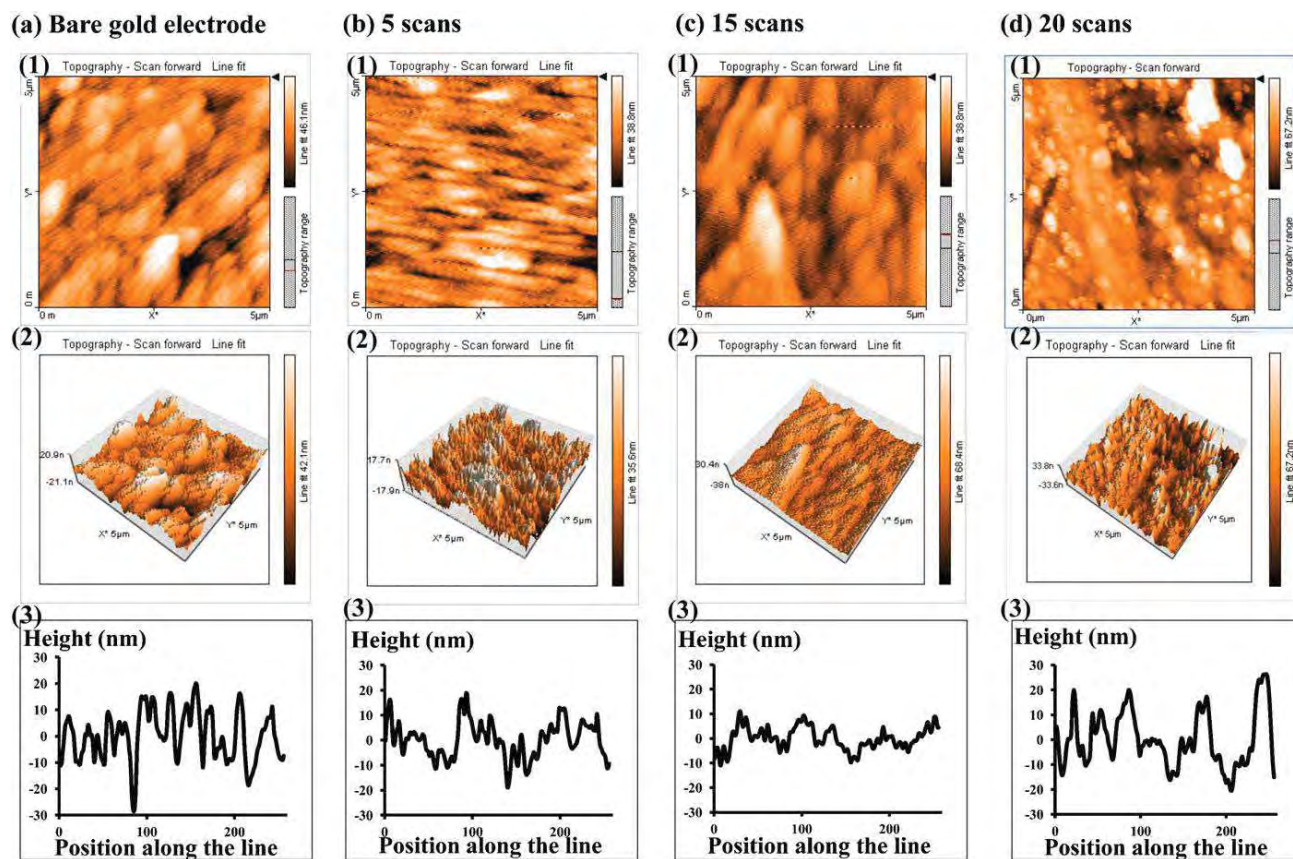


Fig. 7. AFM images of a bare gold electrode from $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ (a), with a 5 mM PpPD modified electrode surfaces and different numbers of scans (b) 5 scans, (c) 15 scans and (d) 20 scans. (1) and (2) are the 2D and 3D topographic images, (3) the AFM image profile showing tip deflections along the line ($n = 10$ lines, 256 points per line).

$(5.38 \pm 0.01) \times 10^3$ and $(5.08 \pm 0.01) \times 10^3\ \text{nF cm}^{-2}$ for 10, 15 and 20 scans, respectively. From the results it is clear that the optimal number of scans for each polymer produced the highest C_{mod} value, hence the highest capacitance change (ΔC) was obtained. Another reason for a lower signal at a higher number of scans was probably because the surface was lumpy due to the overlying layers of polymer. This may reduce the active sites, resulting in a lower amount of the acpcPNA-T9 probes being immobilized (see Section 3.4).

Comparing the three polymers under the optimal electropolymerization conditions, the PpPD modified electrode provided a slightly higher capacitance change than the Pty modified electrode, but it was much higher than the PoPD modified electrode. This is because it provided the best surface morphology – smooth, dense and homogenous – that resulted in the higher C_{mod} value. The surface with the best morphology also provided the highest amount of immobilized acpcPNA probe and this generally leads to a large signal (see Section 3.4).

3.4. Effect of the probe concentration and the amount of the immobilized acpcPNA probe

The amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe on the electrodes coated with the three non-conducting polymers was tested by 3 replications per electrode. The electrode electropolymerized under the optimal conditions (5 mM oPD and pPD with 15 scans, and 50 mM tyramine with 10 scans) provided the highest amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe (Table 1). This agreed well with the capacitance change as presented in Section 3.2.

To further test whether the best sensitivity was due to the different modified polymers, the probe concentration or both, three concentrations of the acpcPNA-T9 probe (3.0, 5.0 and 7.0 μM), were prepared and tested for immobilization. Fig. 9 shows the obtained sensitivity, i.e., the slope of the calibration plot of the capacitance change against the logarithm of the DNA target concentration of between 1.0×10^{-11} and $1.0 \times 10^{-8}\ \text{M}$. A low probe concentration (3.0 μM) showed a low sensitivity because of the lower amount of

Table 1

Effect of the number of scans used for electropolymerization with an optimal concentration of each monomer on the amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe (5.0 μM) on the modified electrode surface ($n = 3$ per electrode).

The number of scans (scans)	Amount of the immobilized 5.0 μM acpcPNA-T9 probe on the modified electrode surface under the optimal monomer concentration of each polymer		
	PoPD (5 mM) ($\times 10^2\ \text{pmol cm}^{-2}$)	PpPD (5 mM) ($\times 10^2\ \text{pmol cm}^{-2}$)	Pty (50 mM) ($\times 10^2\ \text{pmol cm}^{-2}$)
5	2.8 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.9 ± 0.1
10	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.2	7.77 ± 0.04
15	5.4 ± 0.1	7.9 ± 0.2	5.8 ± 0.2
20	2.8 ± 0.2	5.3 ± 0.2	5.0 ± 0.2

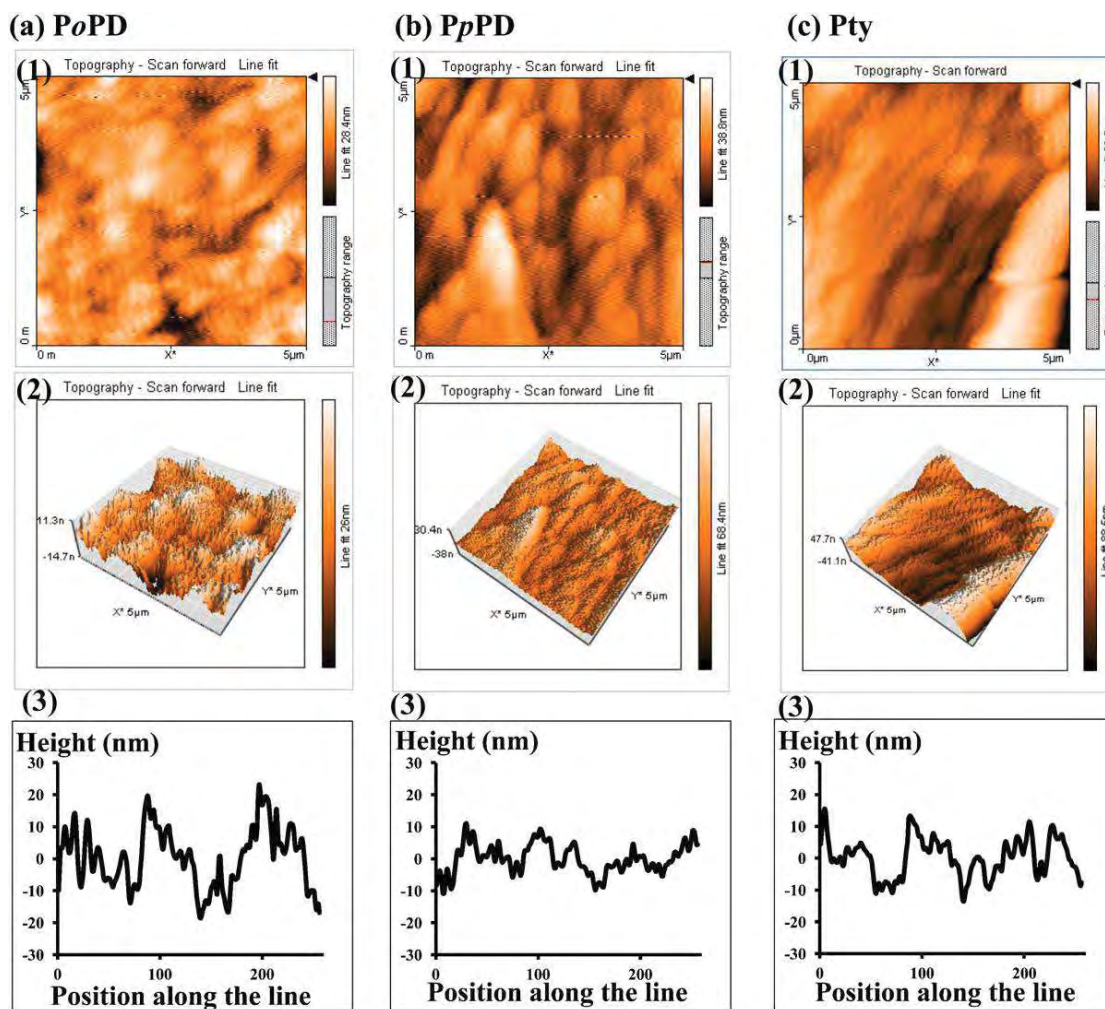


Fig. 8. AFM images of each polymer under optimal conditions obtained from $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ (a) (PoPD), (b) PpPD and (c) a Pty modified electrode surface. (1) and (2) are the 2D and 3D topographic images, (3) the AFM image profile showing large tip deflections along the line ($n = 10$ lines, 256 points per line).

the immobilized acpcPNA-T9 probe. For the probe concentrations of 5.0 and 7.0 μM the sensitivities were about the same. This is probably because the surfaces had the same amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe.

The amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe using three different concentrations of acpcPNA-T9 (3.0, 5.0 and 7.0 μM) are

shown in Table 2. The amount of the immobilized acpcPNA probes reflects the results of Fig. 9. That is, the maximal immobilized probe was achieved at 5.0 μM . It is clear that the different capacitance signals also depended on the probe concentration. But at the same probe concentration the response depended on the modified polymer surface.

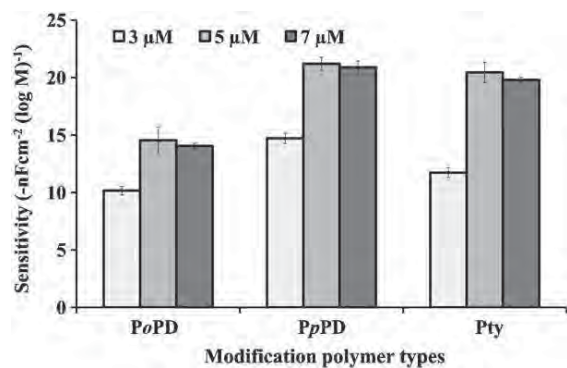


Fig. 9. Effect of the probe concentration (3.0, 5.0 and 7.0 μM) of acpcPNA-T9 probe on the sensitivity under the optimal concentration and the number of electropolymerization scans for each polymer, PoPD, PpPD and Pty.

3.5. Linear range and detection limit

The capacitive responses of various concentrations of the target DNA was studied from 1.0×10^{-14} to 1.0×10^{-7} M under the conditions; a sample volume of 300 μL , carrier buffer 10 mM phosphate, pH 7.00, and a flow rate of 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ with a regeneration step using 300 μL of 50 mM NaOH [6]. The relationship between the capacitance change and the logarithm of the target DNA concentration using the three polymers is shown in Fig. 10. Since the calibration curve has an s-shape, the limit of detection (LOD) was determined by following IUPAC recommendation 1994 where it is taken as the concentration of an analyte at the point of intersection of the extrapolated linear range and the final lowest concentration level segment of the calibration plot [36]. As expected, the best performances were from PpPD. It provided the highest sensitivity ($20.9 \pm 0.6\text{-nF cm}^{-2} (\log \text{M})^{-1}$), lowest LOD (0.2 pM) and had a very wide linear range between 1.0×10^{-12} and 1.0×10^{-8} M. The

Table 2

Effect of the probe concentration (3.0, 5.0 and 7.0 μM) of the acpcPNA-T9 probe using the optimal conditions for electropolymerization on the amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe on the modified electrode ($n = 3$ per electrode).

Modification polymer types	Amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe of each polymer on the different concentrations of the acpcPNA-T9 probe		
	3.0 μM ($\times 10^2$ pmol cm^{-2})	5.0 μM ($\times 10^2$ pmol cm^{-2})	7.0 μM ($\times 10^2$ pmol cm^{-2})
PoPD (5 mM, 15 scans)	4.6 ± 0.1	5.7 ± 0.2	5.6 ± 0.1
PpPD (5 mM, 15 scans)	5.6 ± 0.1	7.9 ± 0.2	7.8 ± 0.2
Pty (50 mM, 10 scans)	5.0 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.7 ± 0.1

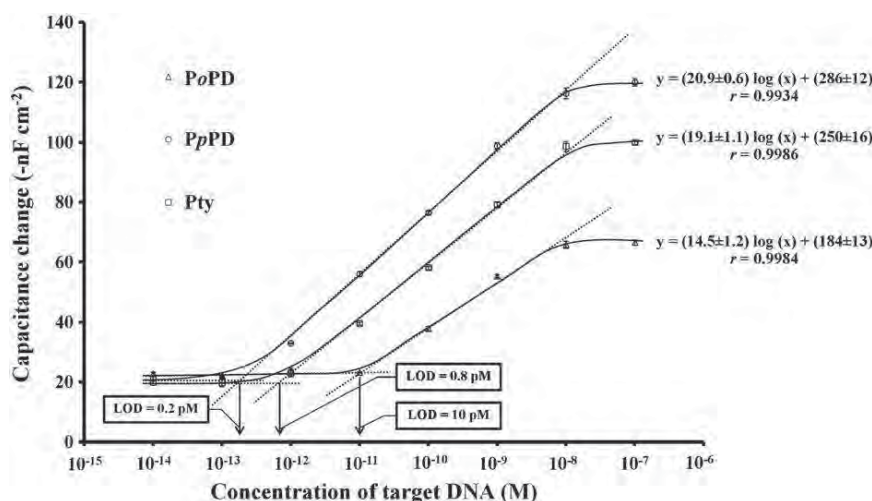


Fig. 10. The relationship between capacitance change and the logarithm of the DNA concentration with the immobilized acpcPNA probe under optimal electropolymerized conditions for each polymer (Δ) PoPD, ($\circ$) PpPD and ($\square$) Pty showing the linear equation and the limit of detection (LOD).

Pty modified electrode performances were slightly inferior to the PpPD that provided the same linear range but with a lower sensitivity (19.1 ± 1.1 nF cm⁻² (log M)⁻¹) and LOD (0.8 pM). The one with the PoPD coated polymer had the worst performance with the lowest sensitivity (14.5 ± 1.2 nF cm⁻² (log M)⁻¹), the most narrow linear range (1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-8} M) and the largest value of LOD (10 pM).

The maximum concentration of the linear range of all polymers was 1.0×10^{-8} M, the question is whether the amount of the probe is the limiting factor. The amount of the DNA target was then calculated for this concentration, to be 3.0 pmol using the sample volume of 300 μL . Considering the results from Table 2 where the amount of the immobilized acpcPNA-T9 probe was $(7.9 \pm 0.2) \times 10^2$ and $(7.8 \pm 0.1) \times 10^2$ pmol cm⁻² for the PpPD and Pty modified electrode, respectively thus the acpcPNA probe was more than enough to bind with the analyte. However, the highest amount of the target DNA, at the highest concentration, was only 3.0 pmol which is 20 times lower than the amount of the immobilized probe. This is because the detection was operated in a flow system where the binding of the target DNA and the immobilized acpcPNA probe also depended on the flow rate and sample volume. A longer residence time for the sample in the flow cell would allow more target DNA to be transported to the sensor surface. Therefore, decreasing the flow rate or increasing the sample volume could help improve the analytical performances.

Under the operating conditions used in this work the system is sufficient for the analysis of ultra-trace levels of DNA in samples. The proposed capacitive DNA sensor based on an electrode covered with a non-conducting polymer film provided a much better detection limit than other methods such as QCM (detection limit of 5 μM) and SPR (detection limit of 0.2 μM) studied by Ananthanawat et al. [4,6], using similar acpcPNA-T9 probes. Comparing the performance of the best polymer modified surface, PpPD to the best of

a SAM modified electrode – 3-mercaptopropionic acid (MPA) – in our previous work using the same acpcPNA-T9 probe [9], the PpPD modified electrode provided a wider linear range – 1.0×10^{-12} to 1.0×10^{-8} M compared to 1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-8} M of the MPA modified electrode. The PpPD also gave a lower detection limit, 0.2 pM compared to 6 pM for the MPA. This is possibly because the polymer has a three-dimensional structure, enabling more active groups to interact with the acpcPNA probes and resulting in more acpcPNA probes being immobilized, $(7.9 \pm 0.2) \times 10^2$ pmol cm⁻² compared to $(5.0 \pm 0.2) \times 10^2$ pmol cm⁻² on the MPA modified electrode (unpublished data). Hence, this allows for more target DNA to be hybridized.

3.6. Reusability

The reusability of the immobilized acpcPNA electrode was investigated by repeating the injections of the complementary DNA at the same concentration 1.0×10^{-10} M following a regeneration step after each measurement. The reusability was evaluated in terms of the percentage of residual activity determined from the capacitance change when the immobilized acpcPNA probe hybridized to the target DNA for the first time (ΔC_1) and after each regeneration (ΔC_2) (Fig. 2) using Eq. (7).

$$\text{Residual activity (\%)} = \frac{\Delta C_2}{\Delta C_1} \times 100 \quad (7)$$

The electrodes modified with the three polymers, PoPD, PpPD and Pty could be reused 68, 74 and 77 times, respectively with an average residual activity of $\geq 98\%$. After that the residual activity decreased rapidly. The electrode was then tested by cyclic voltammetry. An example of the voltammogram of the PoPD modified electrode surface after repeated use is shown in Fig. 4(e). As can be seen the redox peaks after use are higher than the redox peaks

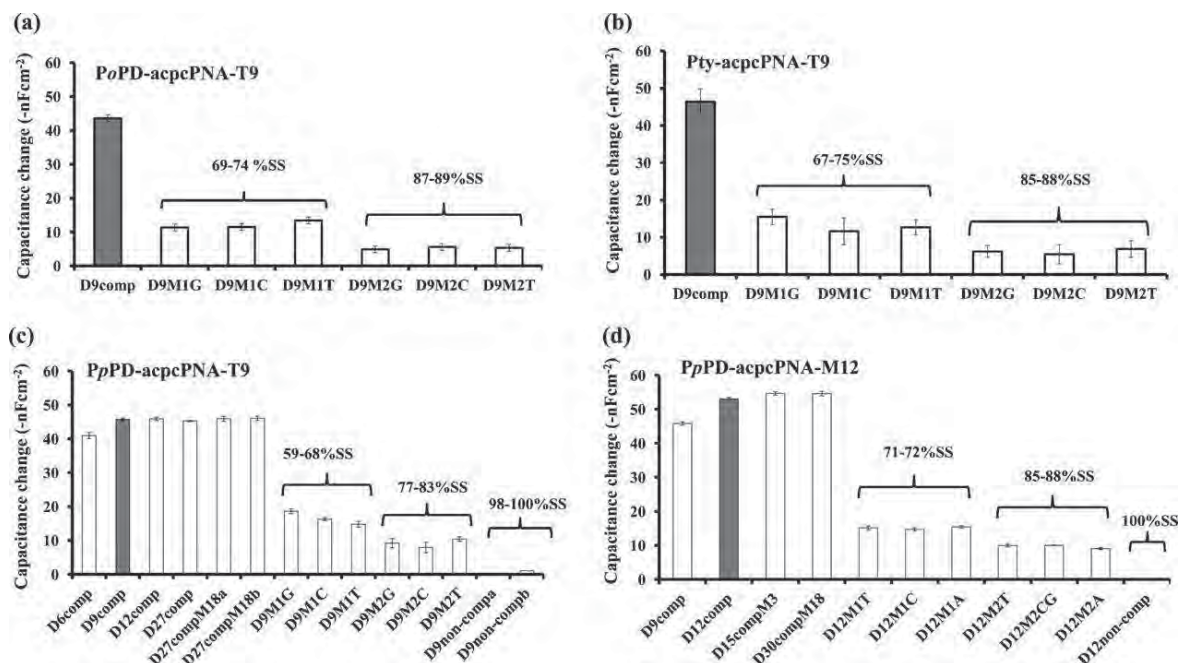


Fig. 11. The measured capacitance change ($n = 3$) of the complementary and mismatched DNAs using immobilized acpcPNA probes on the three types of non-conducting polymer modified electrode (a) PoPD, (b) Pty and (c) PpPD with the immobilized acpcPNA-T9 probes, and (d) PpPD with the immobilized acpcPNA-M12 probes, tested at 1.0×10^{-10} M DNAs showing the % signal suppression (%SS).

when the surface was modified with the acpcPNA (Fig. 4(c)). That is, the decrease of responses is most likely caused by the loss of the attached acpcPNA-T9 from the polymer layer on the gold electrode.

3.7. Reproducibility

The reproducibility of the responses of the acpcPNA-T9 electrodes from two different preparations of the three polymers were tested by comparing their sensitivities. The sensitivities of the two electrodes were 14.5 ± 1.2 and 14.6 ± 1.3 nF cm⁻² (log M)⁻¹ for PoPD, 20.9 ± 0.6 and 21.1 ± 1.1 nF cm⁻² (log M)⁻¹ for PpPD, and 19.1 ± 1.1 and 19.0 ± 1.2 nF cm⁻² (log M)⁻¹ for Pty. The sensitivities did not differ between each preparation. This means that good reproducibility was obtained from the different preparations.

3.8. Specificity

To investigate the specificity, the hybridization of the immobilized acpcPNA-T9 probes with the complementary target DNA, single, double mismatched DNAs and non-complementary target DNAs (see Section 2.1) at 1.0×10^{-10} M were monitored (Fig. 11(a)–(c)). A much higher capacitance change was obtained from the complementary DNA (D9comp) compared to the single and double mismatched DNA target. As expected, the %SS for the double mismatched target was higher than for the single mismatched. Two different non-complementary DNAs were also tested (Fig. 11(c)) and gave the highest %SS.

An acpcPNA-M12 immobilized under optimal conditions for electropolymerization obtained for the acpcPNA-T9 probe on PpPD was also investigated (Fig. 11(d)). In agreement with the results obtained with the acpcPNA-T9 probe, it had good specificity, and a very high %SS for the single and double mismatched DNA and a complete signal suppression for the non-complementary DNA.

3.9. Effect of target length

Different target lengths of the complementary DNAs were tested, a shorter target length (D6comp for acpcPNA-T9 and D9comp for acpcPNA-M12) gave a lower capacitance response than the fully complementary DNAs (D9comp for acpcPNA-T9 and D12comp for acpcPNA-M12) (Fig. 11(c) cf. 11(d)). This is most likely because a longer duplex can push water and electrolyte molecules further away from the electrode surface. This behavior gives rise to a greater capacitance change [14]. Comparing the capacitance response between a longer target DNA and the DNA with the same range as the probe a similar capacitance response was obtained. It is possible that the overhanging unhybridized part of the DNA target is more flexible than the duplex, thus, does not directly affect the measured capacitance change as explained above. The results are in line with the study made by Thipmanee et al. on a SAM modified electrode [9]. Further investigations on this aspect would be useful.

4. Conclusions

In this research, a comparative study of three electropolymerized non-conducting polymers was used to immobilize a target acpcPNA probe for detecting DNA. The performance of the label-free DNA sensor was studied using the highly sensitive capacitive system. The modified electrode under optimal concentrations and numbers of electropolymerization scans provided the highest capacitance signal and this was related to the best surface morphology and the highest amount of the immobilized acpcPNA probe. The response was also related to the concentration of the immobilized probe. The electrode modified with PpPD provided a slightly higher sensitivity than the Pty modified electrode with the same linear range, and it had a much better sensitivity than obtained with a PoPD modified electrode. The detection limit of the three polymers was in the picomolar range. All modified polymers gave a high %SS

for both the single and double mismatched target DNAs, and indicated a high specificity. The electrodes can be reused for at least 68 cycles. The system could easily determine the target DNA analyte at ultra trace levels. The capacitance response also depended on the length of the formed duplex where a longer target length gave a larger signal. It was a surprise to show that the overhanging unhybridized part of the target DNA did not seem to affect the response. This effect should be further studied with a longer target length.

Acknowledgements

The authors are grateful to grants from the Thailand Research Fund (TRF, RTA5280002); the Royal Golden Jubilee Ph.D-program (RGJ) supported by The Thailand Research Fund (3.C.PS/50/B.1 and 3.C.PS/51/B.1); the Office of the Higher Education Commission (CHE-SSR-Ph.D-THA); the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Office of the Higher Education Commission; the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission; the Trace Analysis and Biosensor Research Center (TAB-RC), and Graduate School, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand. The authors also thank Dr. Brian Hodgson, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand for assistance with the English.

References

- [1] J.P. Vernille, L.C. Kovell, J.W. Schneider, Peptide nucleic acid (PNA) amphiphiles: synthesis, self-assembly, and duplex stability, *Bioconjugate Chemistry* 15 (2004) 1314–1321.
- [2] P.E. Nielsen, Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology, *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2001) 16–20.
- [3] P.E. Nielsen, M. Egholm, An introduction to peptide nucleic acid, *Current Issues in Molecular Biology* 1 (1999) 89–104.
- [4] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V.P. Hoven, Synthesis and immobilization of thiolated pyrrolidinyl peptide nucleic acids on gold-coated piezoelectric quartz crystals for the detection of DNA hybridization, *Sensors and Actuators B* 137 (2009) 215–221.
- [5] M. Duman, R. Saber, E. Pişkin, DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: a piezoelectric approach, *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 1355–1363.
- [6] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, W. Mekboonsonglarp, V.P. Hoven, Thiolated pyrrolidinyl peptide nucleic acids for the detection of DNA hybridization using surface plasmon resonance, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3544–3549.
- [7] A.I.K. Lao, X. Su, K.M.M. Aung, SPR study of DNA hybridization with DNA and PNA probes under stringent conditions, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 1717–1722.
- [8] T.H. Degefa, J. Kwak, Electrochemical impedance sensing of DNA at PNA self assembled monolayer, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 612 (2008) 37–41.
- [9] O. Thipmanee, S. Samanman, S. Sankoh, A. Numnuam, W. Limbut, P. Kanatharana, T. Vilaivan, P. Thavarungkul, Label-free capacitive DNA sensor using immobilized pyrrolidinyl PNA probe: effect of the length and terminating head group of the blocking thiols, *Biosensors and Bioelectronics* 38 (2012) 430–435.
- [10] W. Limbut, P. Kanatharana, B. Mattiasson, P. Asawatreratanakul, P. Thavarungkul, A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2006) 233–240.
- [11] S. Loyprasert, P. Thavarungkul, P. Asawatreratanakul, B. Wongkittisuksa, C. Limsakul, P. Kanatharana, Label-free capacitive immunosensor for microcystin-LR using self-assembled thiourea monolayer incorporated with Ag nanoparticles on gold electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 78–86.
- [12] S. Samanman, P. Kanatharana, W. Chotigeat, P. Deachamag, P. Thavarungkul, Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water, *Journal of Virological Methods* 173 (2011) 75–84.
- [13] R. Wannapob, P. Kanatharana, W. Limbut, A. Numnuam, P. Asawatreratanakul, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, Affinity sensor using 3-aminophenylboronic acid for bacteria detection, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 357–364.
- [14] C. Berggren, B. Bjarnason, G. Johansson, Capacitive biosensors, *Electroanalysis* 13 (2001) 173–180.
- [15] C. Berggren, G. Johansson, Capacitance measurements of antibody–antigen interactions in a flow system, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 3651–3657.
- [16] S. Loyprasert, M. Hedström, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, B. Mattiasson, Sub-attomolar detection of cholera toxin using a label-free capacitive immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 1977–1983.
- [17] K. Teeparuksapun, P. Kanatharana, W. Limbut, C. Thammakhet, P. Asawatreratanakul, B. Mattiasson, B. Wongkittisuksa, C. Limsakul, P. Thavarungkul, Disposable electrodes for capacitive immunosensor, *Electroanalysis* 21 (2009) 1066–1074.
- [18] M. Ujvári, G. Láng, G. Inzelt, The problem of the low-frequency dispersion in the case of polymer film electrodes – an experimental impedance study on Au/poly(o-phenylenediamine) electrodes, *Electrochemistry Communications* 2 (2000) 497–502.
- [19] L.D. Tran, B. Piro, M.C. Pham, T. Ledoan, C. Angiari, L.H. Dao, F. Teston, A polytyramine film for covalent immobilization of oligonucleotides and hybridization, *Synthetic Metals* 139 (2003) 251–262.
- [20] D. Zane, A. Raffaele, A. Curulli, G.B. Appetecchi, S. Passerini, Electrosynthesis of poly(o-phenylenediamine) in a room temperature ionic liquid, *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 2037–2040.
- [21] Y.-Q. Dai, D.-M. Zhou, K.-K. Shiu, Permeability and permselectivity of polyphenylenediamine films synthesized at a palladium disk electrode, *Electrochimica Acta* 52 (2006) 297–303.
- [22] M. Yuqing, C. Jianrong, W. Xiaohua, Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors, *Trends in Biotechnology* 22 (2004) 227–231.
- [23] Z. Zhang, H. Liu, J. Deng, A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film on platinized glassy carbon electrode, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 1632–1638.
- [24] D.-M. Zhou, Y.-Q. Dai, K.-K. Shiu, Poly(phenylenediamine) film for the construction of glucose biosensors based on platinized glassy carbon electrode, *Journal of Applied Electrochemistry* 40 (2010) 1997–2003.
- [25] Z. Cheng, E. Wang, X. Yang, Capacitive detection of glucose using molecularly imprinted polymers, *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 179–185.
- [26] S. Samanman, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul, P. Thavarungkul, Characterization and application of self-assembled layer by layer gold nanoparticles for highly sensitive label-free capacitive immunosensing, *Electrochimica Acta* 80 (2012) 202–212.
- [27] C. Suparpprom, C. Srisuwannaket, P. Sangvanich, T. Vilaivan, Synthesis and oligodeoxynucleotide binding properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids bearing prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones, *Tetrahedron Letters* 46 (2005) 2833–2837.
- [28] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding, *Organic Letters* 8 (2006) 1897–1900.
- [29] H. Arlinghaus, M. Ostrop, O. Friedrichs, J. Feldner, Genome diagnostics with TOF-SIMS, *Applied Surface Science* 203 (2003) 689–692.
- [30] H. Arlinghaus, M. Schröder, J. Feldner, O. Brandt, J. Hoheisel, D. Lipinsky, Development of PNA microarrays for gene diagnostics with TOF-SIMS, *Applied Surface Science* 231 (2004) 392–396.
- [31] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V.P. Hoven, X. Su, Comparison of DNA, aminoethylglycyl PNA and pyrrolidinyl PNA as probes for detection of DNA hybridization using surface plasmon resonance technique, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 1064–1069.
- [32] S.J. Killoran, R.D. O'Neill, Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt–Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 7303–7312.
- [33] S. Myler, S. Eaton, S.P.J. Higson, Poly(o-phenylenediamine) ultra-thin polymer-film composite membranes for enzyme electrodes, *Analytica Chimica Acta* 357 (1997) 55–61.
- [34] E. van Pelt-Verkuil, A. Van Belkum, J.P. Hays, Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer Verlag, New York, 2008.
- [35] B. Wongkittisuksa, C. Limsakul, P. Kanatharana, W. Limbut, P. Asawatreratanakul, S. Dawan, S. Loyprasert, P. Thavarungkul, Development and application of a real-time capacitive sensor, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 2466–2472.
- [36] R.P. Buck, E. Lindner, Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes, *Pure and Applied Chemistry* 66 (1994) 2527–2536.

Biographies

Supanee Sankoh is a Ph.D. candidate in Chemistry at Prince of Songkla University, Thailand. Her research covers chemical sensors and biosensors.

Saluma Samanman is a Ph.D. candidate in Chemistry at Prince of Songkla University, Thailand. Her research covers chemical sensors and biosensors.

Orawan Thipmanee is a Ph.D. candidate in Chemistry at Prince of Songkla University, Thailand. Her research covers affinity biosensors.

Apon Numnuam has a Ph.D. in Chemistry obtained in 2008 at Prince of Songkla University, Thailand. He is a faculty member of the Department of Chemistry, Prince of Songkla University, Thailand. He is also a member of the Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University. His research interests include electrochemistry, biosensors and chemical sensors.

Warakorn Limbut has a Ph.D. in Chemistry obtained in 2007 at Prince of Songkla University, Thailand. He is a faculty member of the Department of Applied Science, Prince of Songkla University, Thailand. He is also a member of the Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University. His research interests include biosensors, chemical sensors and electroanalytical chemistry.

Proespichaya Kanatharana has a Ph.D. in Analytical Chemistry obtained in 1982 at Villanova University, USA. She is an Associate Professor at the Department of Chemistry, Prince of Songkla University, Thailand. She is also the Director of the Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University. Her research interests include trace analysis, chemical sensors, biosensors, synthesis and development of nanomaterials and techniques, analytical methods development, application and techniques for flux measurement (greenhouse gases) from ecosystem.

Tirayut Vilaivan has a D. Phil. in Organic Chemistry obtained in 1996 at Oxford University, England. He is an Associate Professor at the Department of Chemistry,

Chulalongkorn University, Thailand. His research interests include the synthesis of new peptide nucleic acid systems and their applications in diagnostics and synthetic methodology developments.

Panote Thavarungkul has a D. Phil. in Biophysics obtained in 1985 at University of Waikato, New Zealand. She is an Associate Professor at the Department of Physics, Prince of Songkla University, Thailand. She is also a member of the Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University. Her research interests include biosensors and chemical sensors for medical, environmental and industrial applications.



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

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

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 4 ส.ค. 2555

เลขที่คำขอ

วันยื่นคำขอ 14 ส.ค. 2555

1201004109

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1 ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์

อานาล็อกดีเอ็นเอสังเคราะห์และโพลิโนนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์เพื่อการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคเหี่ยวสับประตชนิด
 พีเอ็มดับเบิลยูเอวี (PMWaV) 1 และ 2 และวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรม

2 คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
 ในจำนวน 1 คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3 ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

นายปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์ ที่อยู่เลขที่ 511/715 จรลสนิทวงศ์ 37 แขวงบางขุนศรี เขต
 บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 ประเทศไทย และ
 นายธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่อยู่เลขที่ 186 ครอก/ซอย นาคนิวาส 21 แขวง ลาดพร้าว
 เขต ลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 02-218-5494 02-412 9571

3.3 โทรสาร 02-218-5494

3.4 อีเมล piyasakcha@gmail.com

4 สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☒ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☐ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5 ตัวแทน (ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)

5.1 ตัวแทนเลขที่

5.2 โทรศัพท์

5.3 โทรสาร

5.4 อีเมล

6 ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

นายปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์ ที่อยู่เลขที่ 511/715 จรลสนิทวงศ์ 37 แขวงบางขุนศรี เขต บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 ประเทศไทย และ
 นายธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่อยู่เลขที่ 186 ครอก/ซอย นาคนิวาส 21 แขวง ลาดพร้าว เขต ลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

7 คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่ _____ วันยื่น _____ เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม้อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้ โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด
 เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

กรมทรัพย์สินทางปัญญา

กระทรวงพาณิชย์

ถนนบพบุรี 1 จังหวัดนนทบุรี 11000

เลขที่คำขอ 120100410๖

ได้รับเงินจาก 1. นายปิยะศักดิ์ อุ่มมฤตย์ 2. นายธีรยุทธ วิไลวัลย์

ค่าธรรมเนียม สิทธิบัตร



ใบเสร็จรับเงิน

ปีงบประมาณ 2086 2086 076
เล่มที่ 2086 076
เลขที่

วันที่ 14 สิงหาคม 2555

รายการ	จำนวนเงิน
ค่าขอจดทะเบียนใหม่ สิทธิบัตรการประดิษฐ์	500.00
	500.00

ตัวอักษร (

เลขที่ใบเสร็จรับเงิน 201208140010040105
เลขที่คำร้อง 201208140097

ผู้รับมอบหมาย

) ใช้เป็นการถูกต้องแล้ว

ลงชื่อ () ผู้รับเงิน
ตำแหน่ง (นายวิชาญ งามบ่อปักษ์)

(ใบเสร็จรับเงินใบนี้ใช้เป็นหลักฐานแสดงต่อเจ้าหน้าที่เมื่อมาติดต่อ)



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรที่
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร
พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่2)
พ.ศ.2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่3) พ.ศ.2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ

เลขที่คำขอ

วันขึ้นค่ำขอ

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1.ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์

อานาล็อกดีเอ็นเอสังเคราะห์และโพลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์เพื่อการตรวจสอบพันธุกรรมของไวรัสโรคหัดด้วยเทคนิคพีเอ็มดับเบิลยูเอวี (PMWaV) 1 และ 2 และวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรม

2. คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เป็นคำขอสำหรับแบบประดิษฐ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่

ในจำนวน 1 คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

3.1 สัญชาติ ไทย

นายปิยะศักดิ์ ชุ่มพุกฤษ์ ที่อยู่เลขที่ 511/715 จรัสสินทวงศ์ 37 แขวงบางขุนศรี เขต
บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 ประเทศไทย และ

3.2 โทรศัพท	02-218-5494	02-412 9571
-------------	-------------	-------------

นายธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่อยู่เลขที่ 186 ตรอก/ซอย นาคินวาส 21 แขวง ตลาดพร้าว
เขต ตลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.3 โทรสาร 02-218-5494

3.4 อีเมล piyasakcha@gmail.com

4.สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☒ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☐ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5.ตัวแทน (ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)

5.1 ตัวแทนเลขที่

5.2 โทรศัพท์

5.3 โทรสาร

5.4 อีเมตล์

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

นายปิยะศักดิ์ ชอัมพลชัย ที่อยู่เลขที่ 511/715 จรัสสินีทวงศ์ 37 แขวงบางขุนศรี เขต บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 ประเทศไทย และ

นายธีรยุทธ วิไลวัธย์ ที่อยู่เลขที่ 186 ตรอก/ซอย นาคนิवास 21 แขวง ตลาดพร้าว เขต ตลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่ _____ วันขึ้น _____ เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนสิทธิบัตรนี้แตกต่างหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ _____

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถกคัดค้านเนื่องจากข้อไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่ว่าจะระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้ โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8.การยื่นคำขออนุญาตราชอาณาจักร				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์เจ้าเนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรก โดย ☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9.การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด				
10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ		
11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันที่ยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร นี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอเป็นภาษา ☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่น ๆ				
12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุ สิทธิบัตรนี้หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ. ☒ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข 1 ในการประกาศโฆษณา				
13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย			14.เอกสารประกอบด้วย	
ก.แบบพิมพ์คำขอ 2 หน้า			☒ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ข.รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 8 หน้า			☒ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบ ผลิตภัณฑ์	
ค.ข้อถ้อยสิทธิ 1 หน้า			☐ หนังสือมอบอำนาจ	
ง.รูปเขียน 1 รูป 1 หน้า			☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ	
จ.ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์			☐ เอกสารการขอรับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่น คำขอในประเทศไทย	
☐ รูปเขียน รูป - หน้า			☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ	
☐ ภาพถ่าย รูป - หน้า			☐ เอกสารอื่น ๆ	
ฉ.บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า				
15.ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน ☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....				
16.ลายมือชื่อ (☒ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร; ☐ ตัวแทน)				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่
เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

- 5 อานาล็อกดีเอ็นเอสังเคราะห์และโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์เพื่อการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคหัดสับประรดชนิด พีเอ็มดับเบิลยูเอวี (PMWaV) 1 และ 2 และวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรม

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- 10 การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับ อานาล็อกดีเอ็นเอและชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมีให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อบริเวณของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคหัดสับประรดชนิดพีเอ็มดับเบิลยูเอวี 1 และ 2 และวิธีการนำเอาชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์และอานาล็อกดีเอ็นเอ ที่ออกแบบ และสังเคราะห์ขึ้นนี้ไปใช้งานร่วมกับ
- 15 1. เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส ได้แก่ แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส พีเอฟยูดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส ทีทีเอสดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส เคโอดีพอลิเมอร์เลส ดีปเอนทีดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส พีดับบลิวพอลิเมอร์เลส บีเอสทีพอลิเมอร์เลส ทีแอลโอพอลิเมอร์เลส ลำพังหรือร่วมกับเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส
 2. การใช้งานบนพื้นฐานการไฮบริดเซชันของกรดนิวคลีอิก ด้วยโพรบที่เป็นอานาล็อกดีเอ็นเอหรือเปปไทด์นิวคลีอิก ในรูปสารละลายหรือบนสื่อจำพวกเมมเบรนหรือกระดาษ
 - 20 3. การใช้งานโดยการติดฉลากที่บริเวณ 5' และ 3' ของอานาล็อกดีเอ็นเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นร่วมโมเลกุลที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ อะเล็กซา 488 (ALEXA-488) แฟม (FAM) โจ (JOE) แทมรา (TAMRA) ไชทรี (CY3) ไชไฟว์ (CY5) บีเอสคิว (BHQ) เฮก (HEX) หรือร็อก (ROX)
 4. การใช้งานร่วมกับดีเอ็นเอไบนด์เดอร์ และแคลซิน (calcein) เพื่อก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า หรือทาง แสง
 - 25 5. การใช้งานร่วมกับคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนของโลหะ เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (physic)
- ทั้งนี้เพื่อบ่งบอกภาวะการตรวจสอบสารพันธุกรรมบริเวณยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคหัดสับประรด พีเอ็มดับเบิลยูเอวี 1 และ 2
- ในอีกลักษณะหนึ่งการประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคหัดสับประรด พีเอ็มดับเบิลยูเอวี ทั้งชนิดที่ 1 และ 2 ในทางวิทยาศาสตร์อย่างเฉพาะเจาะจง

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 ตัวองค์ความรู้นี้ จัดอยู่ในสาขาที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบ สังเคราะห์และใช้โพลิโนมิวคัลไฮโดรหรืออานาล็อกดิเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะและสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี เพื่อการใช้งานในการตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วยกระบวนการทางเคมีโดยเอนไซม์ สำหรับการประยุกต์ทางเคมี ชีวโมเลกุล แพทย์ศาสตร์และพันธุศาสตร์

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- 10 ปัจจุบันความต้องการในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของไวรัสที่ก่อโรคในพืชมีความสำคัญต่อระบบการผลิตทางการเกษตรทั้งนี้เนื่องจากเพื่อให้ได้ข้อมูลในการวางแผนป้องกันควบคุม และจัดการโรคอย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับประเทศไทย การผลิตสับปะรดเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญ คิดเป็นรายได้หมุนเวียนประเทศในปี พ.ศ. 2547 สูงถึง 17951.08 ล้านบาท และมีมูลค่าส่งออกสูงถึง 51 ล้านบาท อย่างไรก็ตามการผลิตที่ประสบปัญหาด้านคุณภาพและการให้ผลผลิตที่ไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากปัญหาการระบาดของโรคเหี่ยวที่เกิดจาก
- 15 ไวรัส ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพในการส่งวัตถุดิบเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรมอย่างรุนแรง

- โรคเหี่ยวสับปะรดเกิดจากไวรัสพีเอ็มดับเบิลยูเอวี (Pineapple mealybug with associated virus; PMWaV) ทั้งชนิด 1 และ 2 เมื่อติดเชื้อต้นสับปะรดจะแสดงอาการ เริ่มจากการหยุดการเจริญเติบโตของราก รากเน่า จากนั้นจึงสังเกตพบอาการที่ใบ โดยใบล่างจะเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลืองอมชมพู ในกรณีรุนแรงใบจะแห้งและม้วนตัวเข้าและแสดงอาการเหี่ยวชัดเจน อย่างไรก็ตามหากสับปะรดมีการเจริญเติบโตที่ดีในช่วงหน้าฝนจะพบว่าบางครั้งอาการของโรคจะไม่ชัดเจน การติดเชื้อมีผลต่อการหยุดการเจริญเติบโต และทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้
- 20

- ประเทศไทย นิยมปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ซึ่งอ่อนแอต่อไวรัสทั้ง 2 ชนิด และเนื่องจากการขยายพันธุ์สับปะรดเพื่อปลูกในพื้นที่ใหม่ๆ นิยมใช้หน่อ ตะเกียง และจุกเป็นท่อนพันธุ์ หากท่อนพันธุ์เหล่านั้นติดเชื้อ จะส่งผลต่อการแพร่ระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์พันธุกรรมและวินิจฉัยไวรัสสาเหตุของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ จึงส่งผลต่อการควบคุม และลดความเสี่ยงจากโรคได้
- 25

- การตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างสับปะรด จะพบสารพันธุกรรมเริ่มต้นในปริมาณที่น้อยมาก การใช้ชุดของโพลิโนมิวคัลไฮโดรที่สังเคราะห์ขึ้น จะมีความจำเพาะต่อปริมาณของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส การศึกษาสายพันธุ์ไวรัสพบว่าไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรดมีพันธุ์ต่างกัน 3 พันธุ์ ได้แก่ ชนิดที่ 1 2 และ 3 (PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3) การศึกษาเบื้องต้น พบว่าในประเทศไทยพบการระบาดของเฉพาะชนิดที่ 1 และ 2 เท่านั้น โดยทั้ง 2 ชนิด มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสลาย ขนาด 13071 และ 13250-13400 นิวคลีโอไทด์ โดยยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสชนิดที่ 1 และ 2 โดยเฉพาะบริเวณยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมีความคล้ายคลึงกันต่ำกว่า 42% การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสทั้ง 2 จึงต้องแยกดำเนินการอย่างอิสระ แม้ที่ผ่านมาจะมีผู้พัฒนา
- 30

เทคนิคการตรวจสอบสารพันธุกรรมแต่การตรวจไม่ได้อยู่บนพื้นฐานของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (Sethan and Hen, 2002) นอกจากนี้การตรวจยังอยู่บนพื้นฐานของไวรัสสายพันธุ์ที่พบในฮาวาย ซึ่งแตกต่างไปจากสายพันธุ์ไทย

- 5 สำหรับการตรวจทางพันธุกรรม ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวของปฏิกิริยาในการตรวจวิเคราะห์ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์และอานาล็อกดีเอ็นเอที่ใช้เป็นไพรบที่สังเคราะห์ขึ้น เนื่องจากจะเกี่ยวข้องกับการจับตัวที่สมบูรณ์ ตามหลักคู่สม (complementary) ช่วยให้ระยะระหว่างโมเลกุล ไกลกัน และอยู่ในระดับที่มีความเหมาะสมจนเกิดปฏิกิริยาทางเคมีในภาวะจำลอง (In vitro) ดังนั้นหัวใจสำคัญในการตรวจวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับ การคัดเลือกและออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์และ
- 10 อานาล็อกดีเอ็นเอไพรบที่เหมาะสมนี้

- การประดิษฐ์ในครั้งนี้ ได้จากการโคลนยีนและศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของสายพันธุ์ไวรัสที่ติดเชื่อในสับปะรดในประเทศ ในระหว่างปี พ.ศ. 2552-2554 และเปรียบเทียบกับไวรัสในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงกัน เพื่อหาบริเวณเฉพาะพิเศษที่เป็นบริเวณอ้างอิง และนำองค์ความรู้มาออกแบบเป็นชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเฉพาะ และอานาล็อกดีเอ็นเอคู่สมกับยีน
- 15 เป้าหมาย และสังเคราะห์ชุดนิวคลีโอไทด์และอานาล็อกดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วยกระบวนการทางเคมี โดยเมื่อนำชุดนิวคลีโอไทด์และอานาล็อกดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะมาใช้งานร่วมกับเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลจะช่วยให้สามารถตรวจสอบและแยกวิเคราะห์ความแตกต่างของสารพันธุกรรมของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดทั้งชนิดที่ 1 และ 2 ออกจากกัน หรือออกจากไวรัสชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

- 20 ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- การประดิษฐ์นี้มุ่งถึงชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์และอานาล็อกดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะต่อยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดทั้งชนิดที่ 1 และ 2 ที่ได้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี เพื่อการนำไปใช้ร่วมกับเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล ทำให้การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดทั้งชนิดที่ 1 และ 2 ออกจากกัน และแยกออกจากสารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม
- 25 เดียวกันหรือต่างกลุ่ม ให้ทำได้โดยเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพ

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับ การออกแบบชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์และอานาล็อกดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่
- 30 ดำเนินการออกแบบตามหลักคู่สม และสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี ให้มีความจำเพาะกับบริเวณของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดทั้งชนิดที่ 1 และ 2 และการนำชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์และอานาล็อกดีเอ็นเอไปใช้งานร่วมกับ
1. เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส ได้แก่ แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส พีเอฟยูดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส ทีทีเอซีดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส เคไอดีพอลิเมอร์เลส ดีป เวนทีดีเอ็นเอพอลิเมอร์เลส พี
- 35 ดับบลิวพอลิเมอร์เลส

บีเอสทีพอลิเมอร์เลส ทีแอลไอพอลิเมอร์เลส ลำพังหรือร่วมกับเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส

2. การใช้งานบนพื้นฐานของการไฮบริไดเซชันของกรดนิวคลีอิก ด้วยโพรบที่เป็นอานาล็อกดีเอ็นเอหรือเปปไทด์นิวคลีอิก ในรูปสารละลายหรือบนสื่อจำพวกเมมเบรนหรือกระดาษ
3. การใช้งานโดยการติดฉลากที่บริเวณ 5' และ 3' ของอานาล็อกดีเอ็นเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นร่วมโมเลกุลที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ อะเล็กซา 488 (ALEXA-488) แฟม (FAM) โจ (JOE) แทมรา (TAMRA) ซิทรีย (CY3) ซิไฟว์ (CY5) บีเอสคิว (BHQ) เฮก (HEX) หรือร็อก (ROX)
4. การใช้งานร่วมกับดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์ และแคลซีน (calcein) เพื่อก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า หรือทางแสง
5. การใช้งานร่วมกับคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนของโลหะ เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (physic)

เพื่อการตรวจสอบสารพันธุกรรมบริเวณยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคเหี่ยวลำต้นปัดทั้งชนิดที่ 1

และ 2 ออกจากกัน และออกจากสารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่นอย่างเฉพาะเจาะจง

ชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมี มีการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นดังแสดงตามรูปที่ 1

ไวรัสโรคเหี่ยวลำต้นปัด เป็นไวรัสที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคเหี่ยวในลำปัดอย่างรุนแรง การติดเชื้อมีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของลำปัด โดยเฉพาะกับสายพันธุ์ปัตตาเวียที่อ่อนแอต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิด

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม โดยการเก็บตัวอย่างไวรัสจากต้นลำปัดที่เป็นโรค มาสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีสกัดด้วยสารละลายฟีนอล จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนโปรตีนเปลือกหุ้มโดยชุดไพรเมอร์หมายเลข 1 และ 2 ที่จำเพาะต่อบริเวณ โอเพนรีดิง (open reading) และบริเวณรหัสหยุด (stop codon) ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสทั้ง 2 ชนิด และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบระหว่างไวรัสหวัดที่พบระบาดอยู่ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่พบระบาดอยู่ในต่างประเทศ พบว่าสารพันธุกรรมของไวรัสนี้มีความแตกต่างระหว่างกัน 75-80% และต่างจากไวรัสชนิดอื่น เช่น จีแอลอาร์เอวี ซีและห้า GLRaV-4, GLRaV-5, (grapevine leafroll associated virus) แอลซีเอชวี สอง LChV-2 (Little Cherry Virus-2) มากกว่า 80 % ความแตกต่างของลำดับพันธุกรรมเหล่านี้ ช่วยให้การจำแนกสายพันธุ์บนพื้นฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถทำได้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ปรากฏในธนาคารข้อมูลยีน (GenBank) หมายเลข AF414119, NC_010178, EU769114, JN995531, JN995532, EU 769144, FJ 209048 EU769116 DQ225114 และกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากสายพันธุ์ในประเทศ

ผลวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์รวมหรือโอไลน์เมนต์ (alignment) ด้วยโปรแกรมคลัสตล ดับเบิลยู (Clustal W) เพื่อหาบริเวณที่เหมือนและต่างกันของไวรัสเน้นการวิเคราะห์บนชิ้นส่วนของยีน โปรตีนเปลือกหุ้ม

หน้าที่ 5 ของจำนวน 8 หน้า

ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนที่มีวณภาคซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติทั้งในแง่การก่อโรค ความรุนแรง ความสามารถในการแพร่กระจายด้วยพาหะ และสมบัติในการจำแนกชนิด และซับไทป์ของไวรัสด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา

5 ผลการค้นหา คัดเลือกบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ให้ความจำเพาะสูงสุด และเหมาะสมที่จะนำมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ โดยการเปรียบเทียบค่า ทีเอ็ม (Tm) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อเลือกสรรอีกครั้ง จะสามารถคำนวณค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม ความยาวและขนาดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ลงตัวในการนำไปสังเคราะห์ และสามารถนำไปใช้ตรวจสอบได้ หรือใช้เพื่อเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อที่ได้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ ที่เมื่อสังเคราะห์ขึ้นจะนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวได้โดยตรง

10 ในการตรวจสอบ สามารถใช้โครงสร้าง

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 1 คู่กับ สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 3 – 6

โอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 2 คู่กับ สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 4 – 6

โอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 3 คู่กับสายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 5 – 6

หรือ

15 สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 4 คู่กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 1-2

สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 5 คู่กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 1-3

สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 6 คู่กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 1-4

โอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 7 คู่กับ สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 9-12

20 โอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 8 คู่กับ สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 10-12

โอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 9 คู่กับ สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 11-12

หรือ

สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 10 คู่กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 7-8

สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 11 คู่กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 7-10

25 สายคู่สมของโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 12 คู่กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 7-11

การจับคู่ดังกล่าวใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรด การนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์มาใช้เป็นไพรเมอร์ ใช้ได้กับปฏิกิริยาการจำลองตัวของดีเอ็นเอแบบลูกโซ่พอลิเมอไรส ใน การเพิ่มปริมาณ DNA หรือ cDNA โดยเอนไซม์ในกลุ่มโพลีเมอเรส (Pol I Type) หรือ อัลฟาไทป์ (α Type) ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 10mM Tris.HCl (pH: 8.3) 1.5mM MgCl₂ 50mM KCl 1mM DTT 0.5% Tween 0.5% Nonidet P-40 2.5mM dNTP each โดยใช้ปริมาณโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 5 พิโคโมลต่อปฏิกิริยาและปริมาณสารพันธุกรรม 50-100 นาโนกรัม บ่มปฏิกิริยาให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือ extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 40 รอบผลการดำเนินการจะเฉพาะเจาะจงกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม เฉพาะกับ

ตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรดชนิดที่ 1 และ 2 นั้นเท่านั้นจึงจะให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจนสามารถตรวจสอบโดยหลักทางฟิสิกส์ได้

- สำหรับโครงสร้างโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 13-14 และ 15-16 เป็นโครงสร้างสังเคราะห์ โครงสร้างเหล่านี้เกิดจากการงอออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขึ้นมาใหม่ให้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเกิดจาก 1 หรือ 2 บริเวณของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ มาร่วมเชื่อมกันให้อยู่ในรูปในโอลิโกนิวคลีโอไทด์เดียวกัน โดยจะออกแบบให้เมื่อใช้งานโอลิโกนิวคลีโอไทด์จะจับตัวกับบริเวณ 6 บริเวณ ภายในยีนโปรตีนเปลือกหุ้มพร้อมกัน และเกิดได้เฉพาะกับสายพันธุ์ไวรัสโรคเหี่ยว แต่จะไม่เกิดหรือไม่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสสายพันธุ์ย่อยชนิดอื่น การใช้โครงสร้างโอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 1 3 7 10 13 14 15 และ 16 หรือคู่สม ร่วมกัน หรือการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์หมายเลข 1 3 13 14 หรือคู่สม ร่วมกัน หรือ 7 10 15 16 หรือคู่สม ร่วมกัน แยกเป็นปฏิกิริยาอิสระ โดยใช้สารเคมี กับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว (isothermal DNA amplification) ด้วยเอนไซม์บีเอสทีโพลีเมอร์เลส ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 40mM MgSO₄ 20 mM (NH₄)₂SO₄ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 16 U. *Bst* DNA polymerase โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ร่วมกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 13-16 โดยปฏิกิริยาในอุณหภูมิ 63°C 40 นาที จะช่วยเพิ่มสัญญาณดีเอ็นเอจำเพาะของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสที่มีอยู่แม้เพียงน้อยนิดระดับ 100 copies ให้สามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนอยู่ในระดับตรวจวัดทางฟิสิกส์ได้

การวัดสัญญาณทำได้หลายรูปแบบ ตัวอย่างที่นิยมได้แก่

- 1) การทำปฏิกิริยาทางเคมีที่ตำแหน่ง 5' หรือ 3' ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุ กับโมเลกุลพิเศษ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางฟิสิกส์ เช่นการใช้การเรืองตามหลักการฟลูออเรสเซนซ์ รีโซแนนซ์ เอ็นเนจิทรานสเฟอร์ (fluorescence resonance energy transfer (FRET)) การเรืองตามหลักปกติเมื่อใช้ฟลูออโรฟอร์ เป็นตัวจับ ทั้งสองมีการวัดสัญญาณโดยการวัดแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะ การวัดการเรืองแสง หรือการใช้กัมมันตรังสีที่เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีการวัดสัญญาณโดยการวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องซินทิลเลชันเคาท์เตอร์ (scintillation counter) จากนั้นนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุไว้ข้างต้น ไปทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยระบบ ปฏิกิริยาการจำลองตัวของดีเอ็นเอแบบลูกโซ่พอลิเมอร์เลส หรือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว ปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเป้าหมายเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนมาก ระดับปริมาณดังกล่าวยิ่งมากก็จะเชื่อมโยงไปสู่ระดับปริมาณสัญญาณที่ตรวจวัดได้ทางฟิสิกส์มากตาม
- 2) การกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณอย่างจำเพาะด้วยโมเลกุลที่จับตัวกับดีเอ็นเอในรูปดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์

ดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์เป็นโมเลกุลที่เมื่อจับกับดีเอ็นเอหรือผลลัพธ์ของดีเอ็นเอที่เพิ่มในปฏิกิริยา จะส่งผลในรูปการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น กระตุ้นให้เกิดการเรืองแสง หรือการเปลี่ยนแปลงของค่าทางไฟฟ้า ขณะที่โมเลกุลแคลซิน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เมื่อจับกับ บายโพรดักท์ (by products) ได้แก่ไพโรฟอสเฟตที่พบในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น กระตุ้นให้เกิดการเรืองแสง โมเลกุลดีเอ็นเอไบอนด์เดอรัวอย่างนี้ นำมาปรับให้ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

- 5 1. ดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์ ในกลุ่มอินเตอร์คาลเลเตอร์ (intercalator) อาศัยหลักการแทรกตัว
ในระหว่างสายของดีเอ็นเอ ได้แก่ เมธิลีนบลู โปรปีเดียมไอโอไดด์ อะมิโนอะคริดีน อีลิปทรี
ซิน
- 10 2. ดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์ในกลุ่มไมเนอร์กรูฟ (minor groove binder) ซึ่งจะจับตัวกับ
โครงสร้างไมเนอร์กรูฟ ในโครงสร้างเกลียวคู่ (double helix) ในโมเลกุลดีเอ็นเอ ได้แก่
โฮกซ์ 33258 (Hoechst 33258) นิวเคลียร์เรดโลว์ เดฟวิน (DEF 1) เบอร์เรนิล ไชเบอร์
กรีน แดบปี (DAPI) พิโคกรีน และอีวากรีน
- 15 3. โมเลกุล DNA binder ที่อาศัยการติดฉลากที่ปลาย 5' หรือ 3' โดยอาจอยู่ในรูป ดีเอ็นเอหรือ
อาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเออานาล็อก โดยฉลากที่ติดที่ปลาย 5' หรือ 3'
ในรูป อะเล็กซ่า 488 (ALEXA-488) แฟม (FAM) โจ (JOE) แทมรา (TAMRA) ไชทรี
(CY3) ไชไฟว์ (CY5) บีเฮควิว (BHQ) เฮก (HEX) ร็อก (ROX) แดบซิล (DABCYL) เทท
(TET) บอดิฟิล เอฟแอล (BODIPY FL) ดีดีคิว (DDQ)
- 20 4. หรือโมเลกุลเรืองแสงสังเคราะห์ ความเข้มข้นใช้งานของโมเลกุลเมื่อติดฉลากลงบนดี
เอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ อยู่ในช่วง 10-100 pmole/ปฏิกิริยา
สำหรับการใช้สารเคมีแคลซินเพื่อทำปฏิกิริยาโดยตรงสามารถใช้โมเลกุลแคลซินความ
เข้มข้น 50µM ร่วมกับ 1mM MnCl₂ ร่วมไปกับปฏิกิริยาดังแต่ต้น โดยในขณะที่เริ่มต้นของ
ปฏิกิริยา โมเลกุล calcein จะจับตัวอยู่กับ Mn²⁺ และยังไม่เรืองแสง แต่เมื่อปฏิกิริยา
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสัมฤทธิ์ผล จะพบว่ามีการใช้ dNTP มากจนเกิดเป็น ไพโรฟอสเฟต
(PPi) ที่เป็นบายโปรดักต์ มากตาม PPi มีความสามารถที่จะไปแย่งจับ Mn²⁺ ทำให้
โมเลกุลแคลซินเป็นอิสระ เมื่อรับพลังงานจากรังสี UV ตั้งแต่ความยาวคลื่น 240-370 nm
จะกระตุ้นให้เกิดการคายพลังงาน โดยการเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่น 515 nm
- 25 การวัดผลสัมฤทธิ์ของปฏิกิริยาจากทั้ง ดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์ และจากโมเลกุล calcein ทำให้
โดยดูการเรืองแสง เมื่อส่องดูด้วย black light หรือ UV light
- 30 5. การใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุเป็นโมเลกุลตรวจจับ บนหลักการ ไฮบริดเซชัน หรือใช้
โอลิโกนิวคลีโอ ไทด์ที่ระบุเป็นกลไกในการจับตัวร่วมกับ กรดนิวคลีอิกอื่น ได้แก่ดีเอ็นเออานา
ลอล็อก หมายเลข 1 และ 2 อย่างใดอย่างหนึ่งแยกกัน ร่วมกับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์
หมายเลข 17 และ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 18 รวมถึงการใช้ดีเอ็นเออานาล็อก ที่
เป็นเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด หรือ เมต้าไพโรดิโนลเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด การตรวจจับด้วย
หลักการนี้อาศัยการจับตัวของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น
รวมถึง เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่เป็นดีเอ็นเออานาล็อก หมายเลข 1 และ 2 ร่วมกับลำดับ
นิวคลีโอไทด์เป้าหมายของยีนของไวรัสโรคเหี่ยวทั้งสองชนิด ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง
35 ทางสัญญาณที่ตรวจพบได้ทางฟิสิกส์ การเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณอาจ

กระตุ้นผ่านโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุ หรือลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นหรือเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด หรือร่วมกันก็ได้ การใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุนี้ ร่วมกับคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนของโลหะ ในลักษณะที่กระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาคนาโนของโลหะ บนโมเลกุลของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุ หรือใช้โมเลกุลของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุเป็นสื่อให้เกิดการจับตัวของอนุภาคนาโนของโลหะ บนโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายของไวรัสโรคเหี่ยวส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณที่ตรวจสอบได้ทางฟิสิกส์ในรูป การเรืองแสง การเปลี่ยนคุณสมบัติทางแสง การเปลี่ยนสีทางแสง ที่เกิดจากปรากฏการณ์พลาสมอน (plasmon) การใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุสามารถใช้ร่วมกับระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และหรือระบบการแสดงผลสัญญาณผ่านปฏิกิริยาเคมีที่ตำแหน่ง 5' หรือ 3' ของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุ หรือระบบ ไฮบริไดเซชัน หรือทั้งหมด

โดยดำเนินการสามารถทำได้ในรูปสารละลาย สารละลายที่เป็นของเหลวสามารถไหลซึมผ่านไปบนสื่อได้แก่ ซิลิโคนสังเคราะห์ในรูปแบบชิปหรือ ซิลิกอนในรูปแบบชิปที่มีโครงสร้างเหมาะสม หรือบนเมมเบรน หรือบนกระดาษ การใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์และดีเอ็นเออาณาล็อกที่ระบุร่วมกับชิป หรือบนเมมเบรน หรือบนกระดาษนี้ช่วยให้การการนำเสนองผลการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ตรวจสอบได้ทางฟิสิกส์ ทำได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ โดยเมื่อมีการใช้งานร่วมดังกล่าว จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่เกิดโดยตรงหรือโดยอ้อมผ่านโพลิโกนิวคลีโอไทด์และหรือดีเอ็นเออาณาล็อกที่ระบุ ทำให้สัญญาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้น ตรวจสอบได้ทางฟิสิกส์ เช่นผ่านการเรืองแสง การเปลี่ยนคุณสมบัติทางแสง การเปลี่ยนสี การเปลี่ยนแปลงทางกัมมันตรังสี ระดับปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะผ่านการเพิ่มของปริมาณดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงทางสนามแม่เหล็ก

สัญญาณการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนำไปสู่รูปแบบการใช้งานโพลิโกนิวคลีโอไทด์และหรือ ดีเอ็นเออาณาล็อกที่ระบุที่ระบุเพื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในสัปดาห์แรก เพื่อการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการหรือกับตัวอย่างที่ได้จากในแปลงปลูก หรือเพื่อการตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสโดยเฉพาะเจาะจงได้

วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 1 5'-ACTCTGGGCCTAAGACAGT-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 2 5'-GGAAGACCAAGTCAAGGAA-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 3 5'-GGAGGTAGGACTACTGTGTGC-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 4 5'-ATGCACACAAGGTGATAGG-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 5 5'-GCATGATTAACGTTCCGATCC-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 6 5'-ACGTTTGAAGATTTGATAGCAGCCG-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 7 5'-ACTATATAGAAACAGAGACGC-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 8 5'-AATATACATCAAGGACGTGAGT-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 9 5'-GCGATGAATTCGGGGTACGAA-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 10 5'-AGAACTATGGCTCATCACG-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 11 5'-ATGGTAAAATAACACCTAACGAG-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 12 5'-ACCCGTTTAGGCAATATATGCG-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 13 5'-CGACACAGTAGTCCTACCTCCGGAAGACCAAGTCAAGGAA-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 14 5'-ACGTTTGAAGATTTGATAGCAGCCGATCGGAACGTTAATCATGC-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 15 5'-TCGTACCCCGAATTCATCGCAATATACATCAAGGACGTGAGT-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 16 5'-ACCCGTTTAGGCAATATATGCGCTCGTTAGGTGTTATTTACCAT-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 17 5'-AATCAATGGG-3'

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หมายเลข 18 5'-TTAGTGTGGG-3'

อานาล็อกดีเอ็นเอ หมายเลข 1 5'-TATAATTGATT-3'

อานาล็อกดีเอ็นเอ หมายเลข 2 5'-TATAACACTAA-3'

ข้อก๊อสิทอิ

1. ชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ และดีเอ็นเออานาล็อก ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นในรูปโอลิโกนิวคลีโอไทด์ อานาล็อกดีเอ็นเอรูปแบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด ที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์หรือส่วนหนึ่งส่วนใดรวมทั้งสายคู่สมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงตามรูปที่ 1 ชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ระบุมีความจำเพาะเจาะจงต่อการ
- 5 เพิ่มสัญญาณของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคเหี่ยว ทำให้การตรวจสอบพันธุกรรมของไวรัสนี้โดยเฉพาะเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีผลต่อการเพิ่มสัญญาณไวรัสสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ไวรัสโรคเหี่ยว ที่เอดัมบริวเอวี ชนิดที่ 1 และ 2 ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบการพันธุกรรมของเชื้อ และการตรวจคัดกรองการพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการหรือในสภาวะจำลอง(in vitro)
2. การใช้งานชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ตามข้อก๊อสิทอิ 1 ในการเพิ่มปริมาณสัญญาณกรดนิวคลีอิก ด้วยเอมไซม์โพลิเมอร์เลส ได้แก่ แทคโพลิเมอร์เลส พียูโพลิเมอร์เลส ที่ทีเอชโพลิเมอร์เลส เคโอดีโพลิเมอร์เลส ดีป
- 10 ไนมิโพลิเมอร์เลส พีดับบลิวโพลิเมอร์เลส บีเอสทีโพลิเมอร์เลส ที่แอลโอโพลิเมอร์เลส ลำพังหรือร่วมกับเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส หรือด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พหุคูณด้วยเอมไซม์โพลิเมอร์เลส ได้แก่บีเอสทีโพลิเมอร์เลส
- 3.การใช้งานชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ตามข้อก๊อสิทอิ 1 เพื่อการใช้งาน บนชิป บนระบบปฏิบัติการวิเคราะห์ทาง
- 15 เคมีในหลอดทดลองหรือบนเมมเบรนหรือกระดาษ
- 4.การใช้งานชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ตามข้อก๊อสิทอิ 1 เพื่อการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization) ในรูปของโพรบที่เป็นกรดนิวคลีอิกสังเคราะห์ เป็นอานาล็อกดีเอ็นเอหรือเป็นเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่สังเคราะห์ขึ้นจากส่วนหนึ่งส่วนใดของแบบของชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกแบบขึ้นตามข้อ
- 20 ก๊อสิทอิ 1
- 5.การใช้งานชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ และดีเอ็นเออานาล็อก ตามข้อก๊อสิทอิ 1 โดยการติดฉลากที่บริเวณ 5' และ 3' ของชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น ด้วยโมเลกุลอะเล็กซา 488 (ALEXA-488) แฟม (FAM) โจ (JOE) แทมรา (TAMRA) ไซทรี (CY3) ไซไฟว์ (CY5) บีเอสคิว (BHQ) เฮก (HEX) ร็อก (ROX) แดบซิล (DABCYL) เทท (TET) บอดิฟิล เอฟแอล (BODIPY FL) ดีดีคิว (DDQ) เพื่อให้เรืองแสง
6. การใช้งานชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ตามข้อก๊อสิทอิ 1 ร่วมกับโมเลกุลดีเอ็นเอไบนด์เตอร์ โฮอร์ช 33258 (Hoechst
- 25 33258) นิวเคลียร์เรดโลว์ เดฟวัน (DEF 1) เบอร์เรนีส ไชเบอร์กรีน แดบปี (DAPI) พิคกรีน และอีวากรีน และแคลซิน ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า และหรือ การเปลี่ยนแปลงทางแสง
7. การใช้งานชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ตามข้อก๊อสิทอิ 1 ร่วมกับคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนของโลหะ เงิน ทองคำ พลาตินัม เพื่อการตรวจการเปลี่ยนแปลงทางฟลูออเรสเซนซ์

บทสรุปการประดิษฐ์

- การประดิษฐ์นี้เกี่ยวกับชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะที่เกิดจากการออกแบบ และสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี และรูปแบบการใช้งานชุดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์เฉพาะ ร่วมกับระบบการสกัดสารพันธุกรรม (นิวคลีอิกแอซิด) ของไวรัสจากตัวอย่างผ่านระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
- 5 ของไวรัสด้วยยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่เฉพาะเจาะจงกับไวรัสโรคหิวของสับปะรด ด้วยเอนไซม์พอลิเมอร์เลสใดๆ ในระบบจำลอง(in vitro) หรือร่วมกับระบบการตรวจวิเคราะห์บนชิปหรือระบบการตรวจในหลอดทดลองหรือบน
- เมมเบรนหรือบนกระดาษ หรือร่วมกับระบบการแสดงผลในรูปของการเรืองแสงด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอไบอนด์เดอร์
- หรือร่วมกับ ระบบ hybridization ด้วยกรดนิวคลีอิกอื่นหรือเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด(PNA) หรือร่วมกับนาโน
- 10 คอลลอยด์ของโลหะ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในรูปสัญญาณดีเอ็นเอ ทำให้การตรวจวิเคราะห์สาร
- พันธุกรรมของไวรัส ทำได้ง่าย รวดเร็วและแม่นยำ โดยระบบที่ประดิษฐ์ขึ้นช่วยให้การตรวจไวรัสโรคหิวของ
- สับปะรดทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลต่อการเตรียมการในการป้องกันการแพร่ระบาดและการขยายตัวของ
- โรค

ภาคผนวก 2

บทคัดย่องานประชุม

(เนื่องจากเอกสารมีความหนาแน่นมาก จึงไม่ได้ย่อบรรณในเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์
ผู้สนใจโปรดดูรายละเอียดในแผ่น CD)