

rare, close to 0%. From 200 blind samples, this assay gives 100% sensitivity and >99.9% specificity, as extremely rare alleles mentioned above can still be amplified. According to our samples, we didn't found those extremely rare alleles, positive predictive value and negative predictive value are 100%. Therefore, this SSP assay with one set of primer pairs can be used with high specificity in our Thai population.

5. Conclusion

This PCR-SSP system can be used to define *HLA-B*5801*. The benefit of these tests would help patients to avoid any life-threatening adverse consequences from allopurinol with less cost.

6. Acknowledgement

This work is supported by the Lupus Research Unit and the Thailand Research Fund (Senior Research Scholar Grant – RTA5280002).

7. References

- Altman D. G. and Bland J. M. 1994. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* **308**, 1552.
- Bunce M., O'Neill C. M., Barnardo M. C., Krausa P., Browning M. J., Morris P. J. and Welsh K. I. 1995. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46**, 355-67.
- Chung W. H., Hung S. I. and Chen Y. T. 2007. Human leukocyte antigens and drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **7**, 317-23.
- Chung W. H., Hung S. I., Hong H. S., Hsieh M. S., Yang L. C., Ho H. C., Wu J. Y. and Chen Y. T. 2004. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* **428**, 486.
- Hung S. I., Chung W. H., Liou L. B., Chu C. C., Lin M., Huang H. P., Lin Y. L., Lan J. L., Yang L. C., Hong H. S., Chen M. J., Lai P. C., Wu M. S., Chu C. Y., Wang K. H., Chen C. H., Fann C. S., Wu J. Y. and Chen Y. T. 2005. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4134-9.
- Ingelman-Sundberg M. 2008. Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. *N Engl J Med* **358**, 637-9.
- Itoh Y., Mizuki N., Shimada T., Azuma F., Itakura M., Kashiwase K., Kikkawa E., Kulski J. K., Satake M. and Inoko H. 2005. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* **57**, 717-29.
- Martin A. M., Nolan D. and Mallal S. 2005. HLA-B*5701 typing by sequence-specific amplification: validation and comparison with sequence-based typing. *Tissue Antigens* **65**, 571-4.
- Mockenhaupt M. 2009. Severe drug-induced skin reactions: clinical pattern, diagnostics and

therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 7, 142-60;

quiz 161-2.

Wolf C. R., Smith G. and Smith R. L. 2000.

Science, medicine, and the future:

Pharmacogenetics. *BMJ* 320, 987-90.

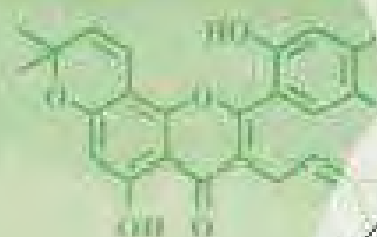
PERCH-CIC

CONGRESS VII

Theme: Chemistry, Environment and Society

การประชุมวิชาการ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ครั้งที่ 7



Jomtien Palm Beach Hotel & Resort Pattaya, Chonburi



PERCH-CIC
PERDO

Center of Excellence for Innovation in Chemistry



www.perch-cic.org

Poster Presentations

Session S1 - Analytical Technology

Coordinators: Prapin Wilairat / Pinyot Thienrungsakul / Sornrat Mangkote / Sornrat Laksamitapattana / Wiroj Yontasa / Apinya Nantathan / Rattana Chantana / Kanchana Uthairat
Pichaya Mangkornasakul / Chongdee Thammakhet / Watsaree Lamsat / Apin Nantathan

S1-P1	Fabrication of a Home-made Spectrophotometric Detector for Flow Injection System	อภิเดช ทองเอน	Apidech Thongoen
S1-P2	A Compact Flow Injection Colorimetric Detection for Determination of Ethanol in Distilled Liquor	วิบูลย์ ภาณุพันธ์	Wanpen Khongn
S1-P3	Determination of Salinity in Seawater with a Reagent-free Flow Injection System	พิชญะ ชิน	Pijon Chai
S1-P4	A Simple Flow Injection Analysis Spectrophotometric Method for Determination of Trace Nitrite in Water Samples	ปวีณา ปะนาญญ์	Pawelada Panthoornai
S1-P5	Determination of Ammonia by Reverse Flow Injection Analysis	นพพร คุ้ม	Nopphawin Thairathan
S1-P6	Comparison of the Efficiency of Gas Collection Units for Determination of Nitrogen Dioxide by Flow Injection Analysis	นพพร เกล็น	Nopphawin Manay
S1-P7	Application of CdS Quantum Dots as Luminescent Probes for Arsenic Determination by Gas-Diffusion Flow Injection Analysis	ณัฐพร ภูมวดี	Nattaya Ruangsang
S1-P8	Development of a Flow Injection-capillary Electrophoresis System	ณัฐพร ภูมวดี	Thararat Maun
S1-P9	Sequential Injection Spectrophotometric Determination of Aluminum(III) Using Quercetin	พณีย์ พันธ์	Pancharee Nofin
S1-P10	Spectrophotometric Sequential Injection Analysis for Determination of Phenol in Water	นพพร เกล็น	Thasakorn Hongklong
S1-P11	Determination of Orthophosphate by Cross Injection Analysis	ศศิธร ชวน	Saisan Jany
S1-P12	Feasibility Study of Continuous-Flow Sequential Extraction and Determination of Phosphorus in Soil	ศศิธร ชวน	Sirarat Precha
S1-P13	Microfluidic-based Immobolized Enzyme Micro reactor for Determination of Organophosphorus Pesticides	ณัฐพร ภูมวดี	Pansee Ratanak
S1-P14	Monolithic Materials for a Microfluidic System	ณัฐพร ภูมวดี	Vijitha Chantakorn
S1-P15	Rapid Fabrication of PMMA Chips Using mini-CNC Machine Modified with Laser Diode	ณัฐพร ภูมวดี	Nattaya Ruangsang
S1-P16	Low Cost Lithography and Sputtering Process for Electrochemical-based Microfluidic Device Fabrication	ณัฐพร ภูมวดี	Chongee Kiatwan
S1-P17	Surface Plasmon Resonance Immunosensor Based on Immobilized Antibody on Electropolymerized Poly(phenylmethanamine)	ณัฐพร ภูมวดี	Sapana Yodhan
S1-P18	Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Melanin Detection	ณัฐพร ภูมวดี	Sapana Yodhan
S1-P19	Detection of Total Bacteria Using Surface Plasmon Resonance Affinity Biosensor	ณัฐพร ภูมวดี	Jongki Jant
S1-P20	Capacitive DNA Sensor Using Immobilized PNA	ณัฐพร ภูมวดี	Sapana Yodhan
S1-P21	Capacitive Immunosensor Using poly(4-vinylpyridine) Modified Electrode for HSA Detection	ณัฐพร ภูมวดี	Orsorn Thipmanee
S1-P22	Multilayer Modified Electrode for Label-free Impedimetric Immunosensing of Small Molecule	ณัฐพร ภูมวดี	Kochaporn Chulak
S1-P23	Preparation of Magnetic Iron Oxide Particles by Coprecipitation	ณัฐพร ภูมวดี	Charan Sathan
S1-P24	Dilution of Metal Oxide Semiconductors as Sensor for Determination of Ethanol	ณัฐพร ภูมวดี	Anurut Ruangsang
S1-P25	Simple and Direct Determination of Ethanol in Gasol by Raman Spectroscopy	ณัฐพร ภูมวดี	Phonthawee Saman
S1-P26	Sensitivity Enhancement of Glucose Fluorescence Sensor Based on Alkalin-Benzoic Acid Complex in Aqueous Micelle	ณัฐพร ภูมวดี	Rattana Ngatdee
S1-P27	Development of Oxygen Biosensor Based on Enzyming of Laccase on the Nanocomposite Film of Carbon Nanotubes-Chitosan	ณัฐพร ภูมวดี	Yasakorn Suan

Capacitive DNA Sensor Using Immobilized PNA

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

^aTrace Analysis and Biosensors Research Centre, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

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

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

^dDepartment of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

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

^fDepartment of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Introduction and Objective

Peptide nucleic acid (PNA) is a DNA mimic that has the ability to form extremely stable complexes with the complementary DNA oligomers. This work reports the development of a flow-injection capacitive DNA sensor with immobilized lipoic acid modified PNA (Lip-PNA) probe for the direct detection of DNA using a capacitive system.

Methods

Lip-PNA was directly immobilized on cleaned gold electrode by chemical adsorption. The modification of the modified electrode was investigated by cyclic voltammetry. The modified electrode was used as the working electrode (WE) in a flow injection system to detect the hybridization between DNA target and Lip-PNA probe by measuring the change in capacitance.

Results

The electrochemical characterization of the electrode surface studied using cyclic voltammetry confirmed that Lip-PNA probe was immobilized on the cleaned gold electrode. The affinity hybridization between DNA target and PNA probe causes the decrease of the measured capacitance. Under the optimum conditions, the linear dynamic range was 1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-8} M with a detection limit of 1.0×10^{-11} M.

Conclusion

The capacitive DNA sensor with Lip-PNA probe is suitable for the direct detection of affinity hybridization.

Keywords: affinity biosensor, DNA sensor, PNA, capacitive biosensor

Selected References:

1. Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Hoven, V.P.; Su, X. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, *25*, 1064-1069.
2. Limbut, W.; Thavarungkul, P.; Kanatharana, P.; Wongkittisuksa, B.; Asawatreratanakul, P.; Limsakul, C. *Electrochim. Acta*, **2010**, *55*, 3268-3274.



Supanee Sankoh (สุพานี สังกะ) **Ph.D. Student**

b 1985 in Satun, Thailand

Prince of Songkla University, Thailand, Chemistry, B.Sc. 2008

Research field: sensors

PERCH-CIC

CONGRESS VII

Theme: Chemistry, Environment and Society

การประชุมวิชาการ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ครั้งที่ 7



4-7 May 2011

Jomtien Palm Beach Hotel & Resort Pattaya, Chonburi



PERCH-CIC
PERDO

Center of Excellence for Innovation in Chemistry



www.perch-cic.org

S2A-O12

Synthesis and Nucleic Acid Binding Properties of Novel Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Carrying 3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic Acid Spacer

Nisanath Reenabthue,^a Tirayut Vilaivan^b and Chaturong Suparpprom^a

^aDepartment of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Introduction and Objective

Peptide nucleic acid (PNA) is a DNA mimic which deoxyribose phosphate is replaced by peptide backbone. From our previous study, a new conformationally rigid PNA base on a pyrrolidinyl backbone bearing a (1*S*,2*S*)-2-amino-1-cyclopentanecarboxylic acid (*acpc*) spacer showed excellent binding with DNA. In this research, novel pyrrolidinyl PNA bearing a 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (*aza-acpc*) spacer was synthesized and investigated its DNA binding properties for improve the solubility of this PNA and provide a handle for internal modification.

Methods

The *trans*-(3*R*,4*S*)- and (3*S*,4*R*)-isomers of *aza-acpc* were synthesized following the known route. The synthetic protocol starting by diastereoselective reductive amination of the keto-ester intermediate, obtained via a Dieckmann cyclization of Boc-glycine ethyl ester, with (*S*)- and (*R*)- α -methylbenzylamine followed by protecting group exchange gave the (3*R*,4*S*)- and (3*S*,4*R*)-isomers of the protected spacers. These spacers have been successfully incorporated into model PNA sequences by Fmoc solid phase peptide synthesis. Successful incorporation of the new spacers was confirmed by MALDI-TOF MS and purified by HPLC.

Results

The *trans*-(3*R*,4*S*)- and (3*S*,4*R*)-isomers of *aza-acpc* were synthesized in 6.5% and 4.9% overall yield, respectively. The results of T_m data showed that (3*R*,4*S*)-*aza-acpc* PNA and singly modified in the middle of the strand which possess the same absolute configuration as (1*S*,2*S*)-*acpc* could bind with complementary DNA in high T_m (55.5 and 71.1 °C) with T_m only slightly lower than unmodified *acpc*PNA. The UV-titration data showed interesting manner of singly modified PNA with (3*R*,4*S*)-*aza-acpc* spacer formed complexes with 1:1 stoichiometry and fully modified formed PNA 2:DNA 1 ratio while (3*S*,4*R*)-*aza-acpc* PNA not show any equivalent point. CD spectroscopy also clearly demonstrates the formation of stable hybrids between the singly modified (3*R*,4*S*)-*aza-acpc* PNA with dA₉. These results confirm the ability of (3*R*,4*S*)-*aza-acpc* to mimic the (1*S*,2*S*)-*acpc* in PNA.

Conclusion

New pyrrolidinyl PNA carrying *trans*-(3*R*,4*S*)-*aza-acpc* spacer have been successfully synthesized. UV titration, T_m and CD experiments clearly revealed that this PNA can bind with DNA without compromising the ability of original (1*S*,2*S*)-*acpc* PNA.

Keywords: *aza-acpc*PNA, *acpc*PNA, DNA, β -amino acid

Selected References:

1. Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 2833-2837.
2. Lee, H. S.; LePlae, P. R.; Porter, E. A.; Gellman, S. H. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 3597-3599.



Nisanath Reenabthue (นันทนา เรณบุต) M.Sc. Student
Naresuan University, Thailand, Chemistry, B.Sc. 1994
Research field: synthesis of peptide nucleic acid (PNA)

A NEW STRATEGY FOR ON-SOLID-SUPPORT LABELING OF PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACID BY REDUCTIVE ALKYLATION AND CLICK CHEMISTRY

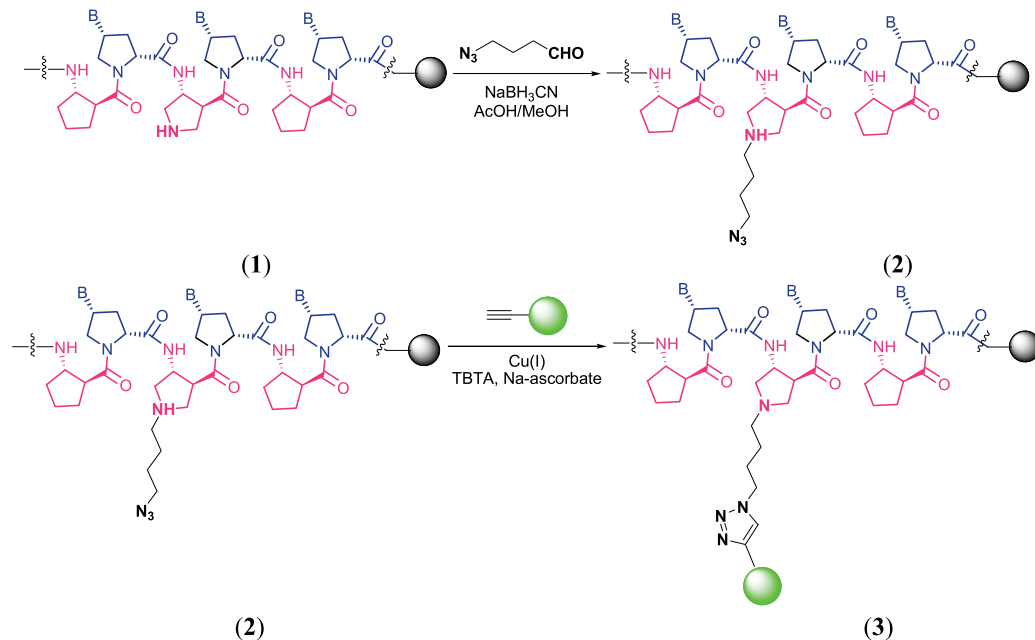
Boonsong Ditmangklo,¹ Chaturong Suparpprom,¹ Tirayut Vilaivan^{2,*}

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Ta-Po District, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

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

Abstract: A new strategy for site-specific modification of pyrrolidinyl peptide nucleic acid consisting of an alternating sequence of nucleobase-modified D-proline/(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpcPNA) has been developed. The reductive *N*-alkylation of the acpcPNA, previously modified with a (3*R*,4*S*)-3-amino pyrrolidine-4-carboxylic acid (azaACPC) spacer, was carried out on solid support by first reacting the azaACPC-modified acpcPNA(1) with 4-azidobutanal in the presence of NaBH₃CN under mildly acidic conditions. The azide-modified acpcPNA (2) was further labeled with 1-ethynylpyrene, a representative alkyne-functionalized fluorophore, using Cu(I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne cycloaddition (click chemistry). The two-step reaction sequence proceeded in quantitative yield without side reactions as verified by MALDI-TOF mass spectrometry after cleavage of the acpcPNA from the solid support. This strategy offers a convenient and effective way for the development of internally-labeled fluorescent acpcPNA probes.



Acknowledgements: This work was supported by Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the Thailand Research Fund (RTA5280002).

Keywords: fluorescence, PNA probe, reductive alkylation, click chemistry, molecular beacon

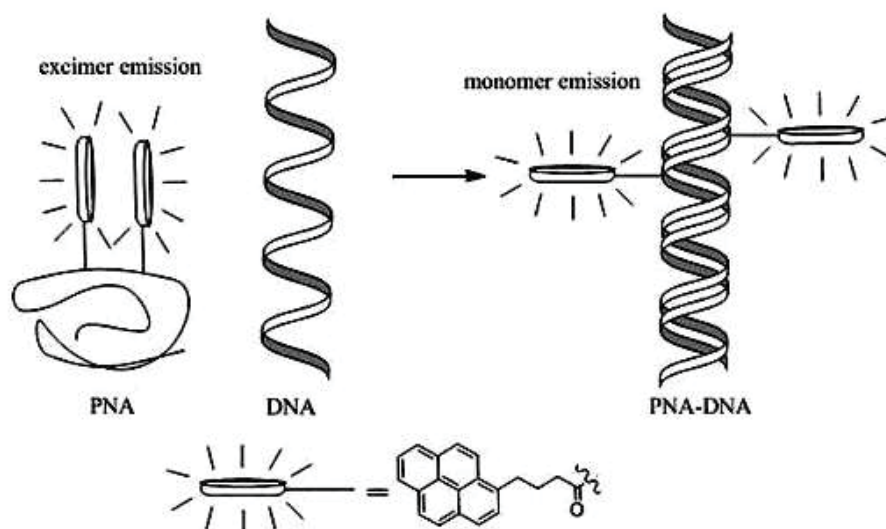
DUAL-PYRENE-LABELED PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACID PROBES

Nattapon Maneelun, Chalothorn Boonlua, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: In this study, dual-pyrene-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) probes have been rationally designed by site-specifically attaching two pyrene chromophores onto the backbone of the same acpcPNA strand. The fluorescence spectra of the single stranded acpcPNA showed mainly the excimer emission at 470 nm, indicating that the two pyrene chromophores were in close proximity. Upon hybridization with the complementary DNA target, the two chromophores were separated, resulting in the enhancement of the pyrene monomer emission at 380 nm. The ratios of monomer to excimer emissions of the modified acpcPNA were between 0.27 to 0.43 in the single stranded form, and between 0.48 to 1.19 after hybridization, depending on the distance between the two pyrene chromophores. These dual-labeled acpcPNA should be useful as probes for detecting sequences of DNA. The advantage of this design over conventional molecular beacons is that not only intensity, but also the emission wavelength, change significantly upon hybridization with the DNA target.



Acknowledgements: This work was supported by the Thailand Research Fund (RTA5280002) and the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST).

Keywords: pyrene, fluorescence, PNA probe, excimer, molecular beacon

PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACID TERMINALLY-LABELED WITH THIAZOLE ORANGE AS A FLUORESCENT DNA PROBE

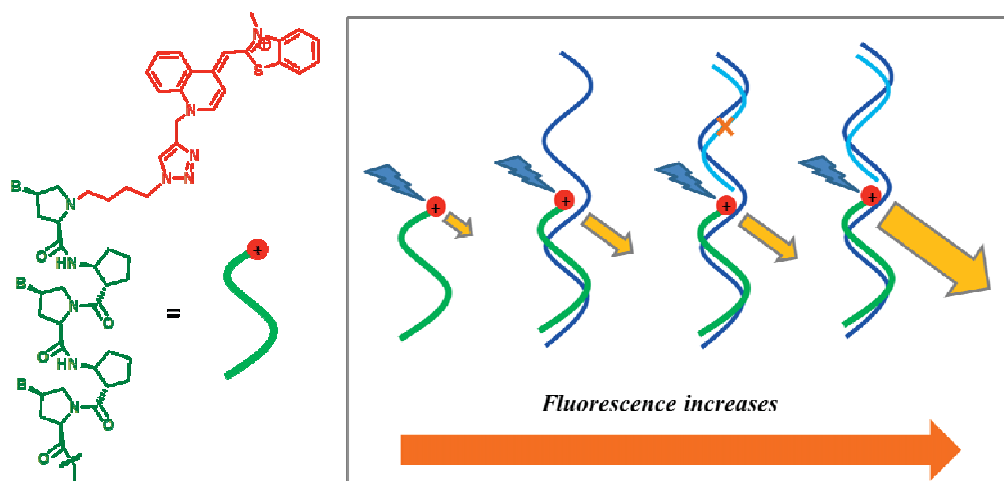
Chaiwat Maneethamwong,¹ Boonsong Ditmangklo,² Chaturong Suparpprom,² Tirayut Vilaivan^{1,*}

¹Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Ta-Po District, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand

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

Abstract: The unsymmetrical cyanine dye thiazole orange (TO) was attached at the *N*-terminus of pyrrolidinyl PNA with D-proline/(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) with the aim to be used as a fluorescent probe for DNA sequence determination. The *N*-terminus of the acpcPNA was first functionalized with azidobutyl group by reductive alkylation with 4-azidobutanol. The TO label, previously functionalized with an alkyne group at the *N*-atom of the quinoline ring, was next attached to the azidobutyl acpcPNA *via* Click chemistry on solid-support. Fluorescence properties of the terminally TO-labeled mix-base 10mer acpcPNA in the absence and presence of complementary DNA targets were next studied. The single stranded TO-labeled acpcPNA showed very weak fluorescence, which did not increase significantly upon hybridization to the complementary DNA target having exactly the same length. On the other hand, hybridization of the TO-labeled acpcPNA with a 21-base DNA consisting of a 10-base region complementary to the labeled acpcPNA resulted in a 12-fold fluorescence increase. Addition of another short DNA sequence complementary to the overhanging single stranded region resulted in a dramatic increase of fluorescence (up to 89-fold) while addition of non-complementary DNA did not give the same fluorescence increase. The results are explained by the interaction between the TO label and the DNA duplex. The large fluorescence increase suggests that the terminally-labeled acpcPNA may be used for developing a probe for specific DNA sequence determination.



Acknowledgements: This work was supported by the Thailand Research Fund (RTA5280002).

Keywords: PNA, Thiazole Orange, fluorescence, click chemistry, molecular beacon

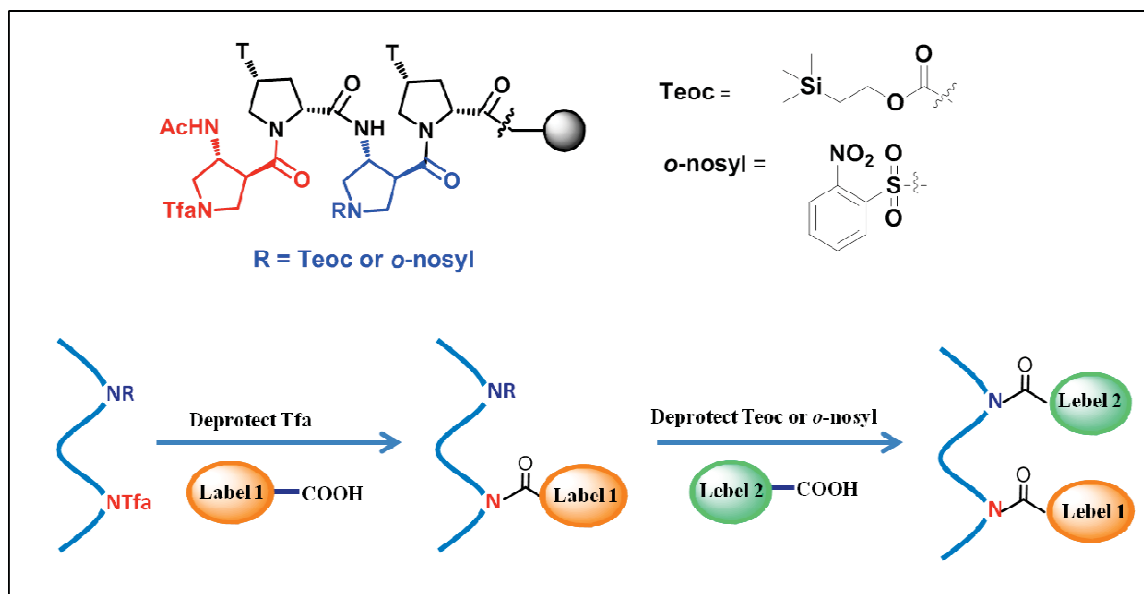
ORTHOGONALLY-PROTECTED 3-AMINOPYRROLIDINE-4-CARBOXYLIC ACIDS FOR SYNTHESIS OF DOUBLY-LABELED PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS

Nattawut Yotapan, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: Pyrrolidinyl peptide nucleic acids (acpcPNA) labeled at the backbone with a suitable Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) pair are potentially useful as fluorescence probes that can change their fluorescence intensity and/or emission wavelength upon hybridization to correct DNA targets. While single labeling of acpcPNA at the backbone has previously been achieved through replacement of the usual 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) monomer in acpcPNA with *N*-Tfa-protected 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) monomer, synthesis of doubly-labeled PNA requires an additional APC protecting group that must be compatible with the Fmoc chemistry (removable by non-aqueous base) used for the synthesis of the acpcPNA and with the Tfa group (removable by aqueous base) used for protection of the first APC residue. In this work, we had synthesized *N*-(*o*-nosyl)- (removable by thiolate) and *N*-Teoc-protected (removable by fluoride) APC derivatives and evaluated their potential to be used in combination with the *N*-Tfa-protected APC monomer for the synthesis of doubly-modified acpcPNA. While the *N*-Tfa group could be selectively removed in the presence of either *N*-Teoc or *N*-(*o*-nosyl) groups, only removal of the latter could be selectively achieved in the presence of *N*-Tfa group. The combination of *N*-(*o*-nosyl)- and *N*-Tfa-protected APC monomers provided excellent level of orthogonality in the synthesis of model doubly-modified acpcPNAs as demonstrated by MALDI-TOF mass spectrometry.



Acknowledgements: This work was supported by the Thailand Research Fund (RTA5280002).

Keywords: PNA, fluorescence, FRET, orthogonal protection, molecular beacon

HIGHLY SPECIFIC DNA SEQUENCE DETERMINATION BY PYRENE-LABELED PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACID PROBES IN COMBINATION WITH ENZYMATIC DIGESTION

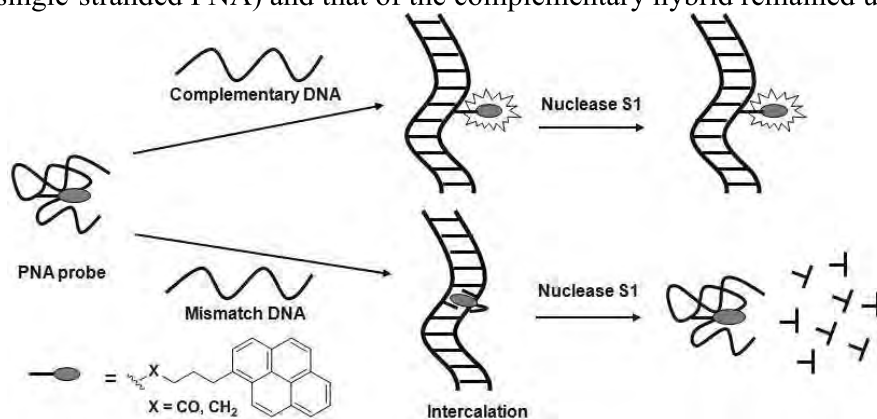
Chalothorn Boonlua,¹ Boonsong Ditmangklo,² Chaturong Suparpprom,² Chotima Vilaivan,¹ Tirayut Vilaivan^{1,*}

¹Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand

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

Abstract: Oligonucleotide probes labeled with environment-sensitive fluorophores are powerful tools for studies of molecular diagnostics, and biotechnology. In this work, we have synthesized a hybridization-responsive pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) probe. The acpcPNA probe was covalently modified at the backbone with a pyrene chromophore through a flexible linker *via* acylation or reductive alkylation of 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC)-modified acpcPNA. The fluorescence of the pyrene-labeled acpcPNA is quenched by the nucleobases (especially T and C) in the single-stranded state. Hybridization of the pyrene-labeled acpcPNA to its complementary DNA target resulted in a large increase in fluorescence signal (up to 14-fold). Hybridization to mismatched DNA gave variable results (unchanged, decreased or increased fluorescence relative to the single-stranded PNA), depending on the position and type of the mismatch pairs. Fluorescence analysis showed that the complementary PNA·DNA hybrid was much more resistant to digestion by nuclease S1, an enzyme that specifically hydrolyzes single-stranded DNA, than mismatched hybrids. Accordingly, perfect discrimination between complementary and mismatched DNA targets had been achieved after 10-min digestion of the hybrids by the enzyme, whereby the fluorescence of the mismatched hybrids returned to baseline (i.e. similar to single-stranded PNA) and that of the complementary hybrid remained unchanged.



References:

1. Reenabthue N, Boonlua C, Vilaivan C, Vilaivan T, Suparpprom C. Bioorg Med Chem Lett 2011;21:6465-6569.
2. Komiyama M, Ye S, Liang X, Yamamoto Y, Tomita T, Zhou J-M, Aburatani H. J Am Chem Soc 2003;125:3758-3762.

Acknowledgements: The Thailand Research Fund (RTA5280002) and the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST).

Keywords: peptide nucleic acid, nuclease S1, fluorescence, molecular beacon

ภาคผนวก 3

เอกสารรวมคัดย่องานประชุมประจำปีกลุ่มวิจัย

(เนื่องจากเอกสารมีความหนาแน่นมาก จึงไม่ได้เย็บรวมในเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์)

ผู้สนใจโปรดดูรายละเอียดในแผ่น CD)



สัญญาเลขที่ RTA5280002

รายงานการประชุมประจำปีครั้งที่ 1
ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย ปี 2552

วันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2554 เวลา 08:30 – 15:00
ห้องประชุม ศ.ดร.แถบ นีละนิธิ (ห้อง 1119) ชั้น 11 อาคารมหามกุฏ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**โครงการ การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์
นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด**

**Synthesis, Properties and Applications of Conformationally Constrained
 β -Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids**

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

คำนำ

โครงการ “การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้ไบโอดีเซลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด” นี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ตามเงื่อนไขในสัญญารับทุนจาก สกว. . หัวหน้าโครงการจะต้องจัดการประชุมวิชาการประจำปี ประกอบกับขณะนี้งานได้ดำเนินการมาเป็นระยะเวลา 18 เดือนแล้ว จึงเห็นควรที่จะจัดงานประชุมนี้ขึ้น เพื่อให้ผู้ร่วมโครงการได้มีโอกาสนำเสนอความก้าวหน้าของโครงการวิจัย ร่วมกัน และแลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างกลุ่มวิจัย- สาขา และรับฟังข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิ อันจะทำให้เกิดการพัฒนางานวิจัยไปในทิศทางที่ดีขึ้น

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสถาบันต้นสังกัดของหัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการทุกท่าน รวมทั้งแหล่งทุนอื่นที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยแม้จะ ไม่ใช่ทางตรงตลอดจนผู้ช่วยวิจัย และนักศึกษา ที่ทำให้โครงการดำเนินไปได้ด้วยดี มีผลงานที่มีคุณภาพสูงตามที่ตั้งเป้าหมายไว้

อนึ่ง งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ข้อมูลทั้งหมดนี้เป็นเพียงผลการศึกษาเบื้องต้นที่ยังไม่ได้ผ่านการประเมินอย่างเป็นทางการจากผู้เชี่ยวชาญ โปรดอย่านำไปเผยแพร่หรืออ้างอิงจนกว่าผลงานจะได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการแล้ว

รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
หัวหน้าโครงการ

กำหนดการประชุมทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ครั้งที่ 1

โครงการ “การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

ที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด” (รหัสโครงการ: RTA5280002)

วันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2554 เวลา 08:30 – 15:00

ห้องประชุม ศ.ดร.แถบ นีละนิธิ (ห้อง 1119) ชั้น 11 อาคารมหามกุฏ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

08:30-08:50	ลงทะเบียน
08:50-09:00	กล่าวเปิดงานโดยคณบดีคณะวิทยาศาสตร์
09:00-09:30	สรุปภาพรวมของโครงการโดยหัวหน้าโครงการ (รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์)
09:30-10:00	3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic acid: A versatile handle for internal labeling of pyrrolidiny PNA (ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
10:00-10:30	Dendritic fluorophores and polydiacetylenes for DNA sensors (รศ.ดร.มงคล สุขวัฒนาสินธิ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
10:30-11:00	Detection of DNA following “Dot Blot” format employing filter paper functionalized with quaternized polymer brushes and peptide nucleic acid probe (รศ.ดร.วรวิทย์ โฮเว่น ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) (อาหารว่างในห้องประชุม)
11:00-11:30	Surface-functionalized magnetic nanoparticles for immobilization of PNA and DNA (รศ.ดร.เมธา รัตนกรพิทักษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
11:30-12:00	Capacitive biosensor based on immobilized PNA probe through <i>ortho</i> -phenylenediamine (o-PD) (รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
12:00-13:00	รับประทานอาหารกลางวันและชมโปสเตอร์
13:00-13:30	Point of care detection of oseltamivir resistant mutation in novel 2009 human influenza A virus (H1N1) based on β -pyrrolidiny peptide nucleic acid hybridization (ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ช่อมพฤษ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
13:30-14:00	Using PNA probe as a rapid detection of LAMP and PCR product for drug hypersensitivity prediction (รศ.ดร.พญ.ณัฐธิยา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
14:00-15:00	ประชุมโต๊ะกลม (เฉพาะหัวหน้าโครงการย่อยและผู้ทรงคุณวุฒิ) และอาหารว่าง
15:00-16:00	ชมโปสเตอร์

	โครงการย่อย	ผู้ร่วมโครงการ	ตำแหน่ง
1	Conformationally restricted PNA : synthesis and binding properties	1. รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ 2. ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม 3. ดร.ชอลิตดา ศรีสุวรรณเกศ 4. ดร.วรลักษณ์ มั่นสวัสดิ์ 5. นางโชติมา วิไลวัลย์ 6. น.ส. ชโลธร บุญเหลือ 7. น.ส. นิธินาถ รีนับถือ 8. น.ส. บุญส่ง ดิษมังคลอ 9. นายณัฐพล มณีลุน	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัย นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท
2	Dendritic fluorophores for detection of DNA/PNA hybridization	1. รศ.ดร.มงคล สุขวัฒนาสินธิ์ 2. ผศ.ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาคร 3. น.ส. วราทิพย์ ศิริพรรณพคุณ 4. น.ส. กรรณิการ์ วงศ์นาม 5. นายนคร เนียมนนท์ 6. น.ส. วรณนภา ย่วนบุญหลิม 7. น.ส. ณัฐพร กิมพิทักษ์	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท
3	Development of positively charged polymeric support for high throughput DNA sequence analysis using PNA probes	1. รศ.ดร.วรวิทย์ โอเว่น 2. น.ส. นัตตา บุรณบุญญิตติ 3. น.ส. จิตติมา มีปิงพราว 4. น.ส. แพทอง ศรีแก่นจันทร์	หัวหน้าโครงการ นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาเอก
4	Surface functionalized magnetic nanoparticles for immobilization of PNA and DNA	1. รศ.ดร.เมธา รัตนการพิทักษ์ 2. ดร.บุญจิรา รัตนการพิทักษ์ 3. ดร.อุทัย วิชัย 4. นายฐานันท์ เทพฤกษ์ 5. น.ส. ยິงรัก พรายอินทร์ 6. นายกฤษดา ตันกันยา	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักวิจัย นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท
5	Development of label-free electrochemical DNA biosensor based on immobilized PNA probes	1. รศ.ดร.ปณต ถาวรวงศ์ 2. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา 3. ดร.วรากร ลิ้มบุตร 4. ดร.อาภรณ์ นุ่มนวม 5. น.ส. อรวรรณ ทิพย์มณี 6. น.ส. สาธิตา สมานหมาน 7. น.ส. สุพรรณิ สันเกาะ	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักวิจัย นักวิจัย นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท
6.1	Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural science	1. ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ 2. น.ส. อลิษา โล้วณิชัยพัฒน์	หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยนักวิจัย
6.2	Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural sciences	1. รศ.พญ.ดร.ณัฐริยา หิรัญกาญจน์ 2. นพ.ดร.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ 3. นายจิรวุฒิ นาคนันท 4. น.ส. ศิธา วีรกุล	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักศึกษาปริญญาเอก ผู้ช่วยนักวิจัย

3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic acid: A versatile handle for internal labeling of pyrrolidinyl PNA

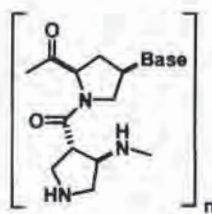
Nisanath Reenabthue^a, Chotima Vilaivan^b, Tirayut Vilaivan^b, Chaturong Suparpprom^{a,*}

^aDepartment of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Pahonyothin Road, Ta-Po District, Muang, Phitsanulok, 65000

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

*E-mail: chaturongs@nu.ac.th

Abstract: In this research, the cyclic beta-amino acid 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (aza-acpc) was synthesized and used as a spacer in the pyrrolidinyl PNA. The (3*R*,4*S*)- and (3*S*,4*R*)-aza-acpc spacers which are structural analogues of (1*S*,2*S*)- and (1*R*,2*R*)-acpc spacers, respectively, were prepared according to the literature and were introduced into a few model PNA sequences by standard Fmoc-solid-phase peptide synthesis. The DNA-binding studies results revealed that incorporation of the (3*R*,4*S*)-aza-acpc spacer into the PNA only slightly decreased the stability of the hybrids (71.1°C compared with 76.7°C) as confirmed by T_m , UV-titration and CD spectroscopy. Furthermore, the nitrogen atom of the aza-acpc spacer was successfully labeled by pyrene-1-carboxylic acid to give an internally-labeled fluorescence PNA probe. Fluorexcence experiments showed that this new PNA probe can discriminate between single-stranded PNA and PNA-DNA hybrid based on the fluorescence enhancement (1-3 fold, depending on sequences).



aza-acpcPNA

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Feb 2011

Dendritic fluorophores and polydiacetylenes for DNA sensors

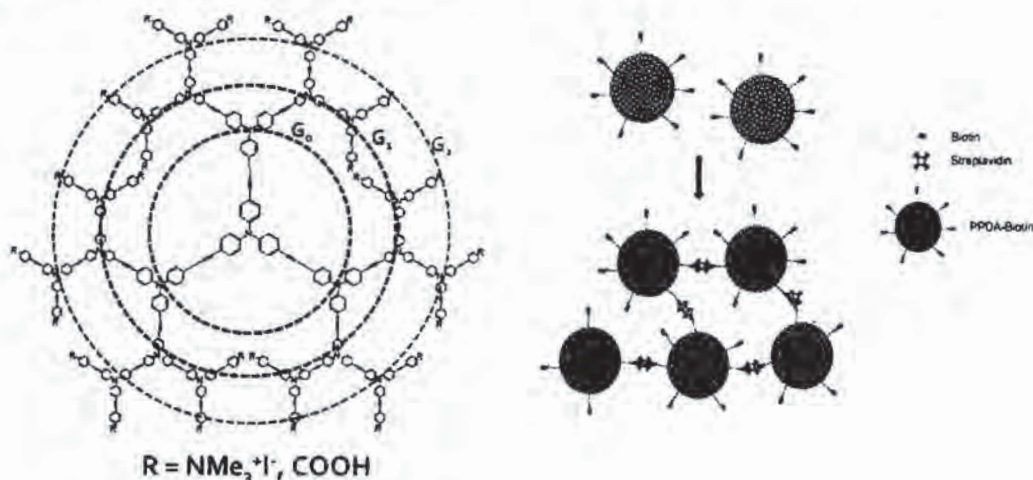
Mongkol Sukwattanasinitt,^{1,*} Paitoon Rashatasakhon,¹ Tirayut Vilaivan,¹ Nakorn Niamnont,¹ Warathip Siripornnoppakhun,¹ Kunnigar Vongnam²

¹ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

² Program of Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

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

Abstract: Two classes of pi-conjugated systems *i.e.* 1) dendritic phenylacetylene fluorophores and 2) polydiacetylene vesicles are currently investigated in our laboratory for the applications in detection and analysis of biological agents such as proteins and DNA. A series of water soluble dendritic fluorophores, composed of phenylacetylene repeating units and ionic charged peripheral groups, are synthesized. The charge variation on the dendritic structures is proven to be valuable for constituting a sensing array for protein discrimination. The polycationic fluorophores exhibit distinct fluorescence enhancement by DNA, which is potentially useful for DNA detection and sequencing applications. Biotin functionalized polydiacetylene vesicles are synthesized and investigated for selective colorimetric response to Neutravidin and Streptavidin for future applications in DNA sequencing.



Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: March 2011

Detection of DNA following “Dot Blot” format employing filter paper functionalized with quaternized polymer brushes and peptide nucleic acid probe

Paethong Srikaenjan^{1,2}, Tirayut Vilaivan³, Voravee P. Hoven^{3,*}

¹Program in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

²Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

³Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: As inspired by the “Dot blot” technique, a well known method in molecular biology and genetics for detecting biomolecules, a new PNA-based colorimetric detection of DNA sequence has been developed. The filter paper was modified to be positively charged with grafted polymer brushes of quaternized poly(dimethylamino)ethyl methacrylate (QPDMAEMA) to be used for DNA detection. It was prepared by surface-initiated polymerization of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate from filter paper via ARGET ATRP followed by quaternization with methyl iodide. Following the “Dot Blot” format, a DNA target was first captured via ionic interactions between the positive charges of the QPDMAEMA brushes and negative charges of the phosphate backbone of DNA. Upon hybridization with biotinylated peptide nucleic acid probe (b-PNA), the immobilized DNA can be detected by naked eye observation of the yellow product generated by the enzymatic amplification employing HRP-labeled streptavidin. In this particular study, a synthetic PNA bearing a conformationally rigid D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) was used as a probe to detect a region of human *IL-10* promoter gene. It has been demonstrated that this newly developed assay was capable of discriminating a single base mismatched from fully complementary DNA targets at 1 pmol level. In addition, the QPDMAEMA grafted filter paper exhibited a superior performance to commercial membranes including nylon-66 and nitrocellulose.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: March 2011

Surface-functionalized magnetic nanoparticles for immobilization of PNA and DNA

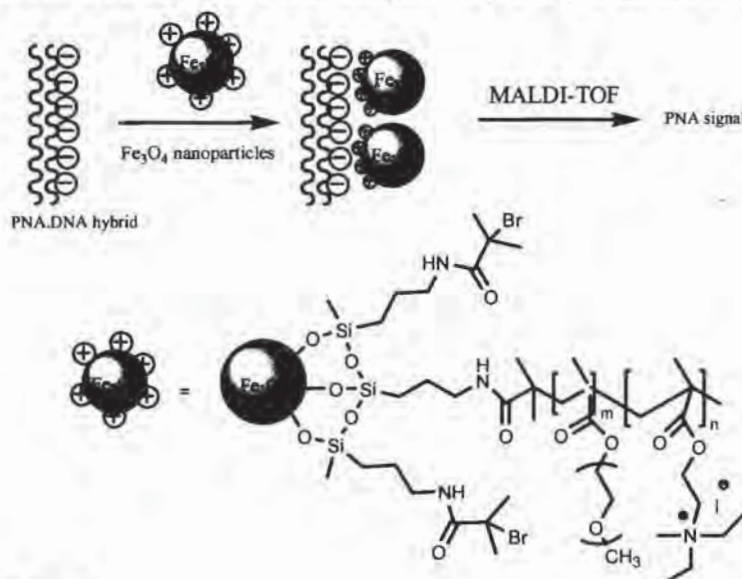
Thapanapong Theppaleak¹, Boonjira Rutnakornpituk¹, Uthai Wichai¹,
Metha Rutnakornpituk^{1,*}, Tirayut Vilaivan²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: methar@nu.ac.th

Abstract: We here report the synthesis of surface-functionalized magnetite nanoparticle with the copolymer of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA) and diethylamino ethyl methacrylate (DEAEMA) *via* atom transfer radical polymerization (ATRP). The polymer grafted on the particles was subsequently quarternized to obtain the particles with positively charged surface for adsorption with PNA-DNA hybrid by ionic interaction. Molar ratio of the (co)polymer was systematically varied (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, respectively) to tune the degree of positive charge on their surface and also obtain well dispersible particles in aqueous media. Kinetic studies of the copolymerization indicated that PEGMA showed a slightly higher reactivity than that of DEAEMA. Polydispersity of the copolymers, determined *via* gel permeation chromatography (GPC), was in the range of 1.3-1.7, indicating the living/controlled radical mechanism of ATRP. Photon correlation spectroscopy (PCS) disclosed that zeta potential of the particles ranged between +22 to +32 mV and consistently increased as increasing DEAEMA contents in the copolymer. Transmission electron microscopy (TEM) revealed that the particles with about 6 nm in diameter have an improved dispersibility in water after quarternization. From the preliminary results, MALDI-TOF mass spectrometry indicated that negatively charged PNA-DNA hybrid can ionically adsorb onto the positively charged surface of the particle.



Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: April 2011.

Capacitive biosensor based on immobilized PNA probe through *ortho*-phenylenediamine (*o*-PD)

Orawan Thipmanee^{1,2}, Saluma Samanman^{1,2}, Supanee Sankoh^{1,2}, Warakorn Limbut^{1,3},
Apon Numnuam^{1,2}, Proespichaya Kanatharana^{1,2}, Tirayut Vilaivan⁴, Panote Thavarungkul^{1,5,*}

¹Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

³Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

⁴Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

⁵Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

*E-mail: panote.t@psu.ac.th

Abstract: The immobilization of PNA probe on the gold electrode surface was obtained via a layer of electropolymerized *ortho*-phenylenediamine (*o*-PD) film. 11-mercaptoundecanol was used as the spacer molecule for the PNA probes making it easier to hybridize with the target DNA. The binding between DNA target and immobilized PNA probe was directly detected by measuring the change of capacitance in a flow system. The proposed capacitive detection provided a wide linear dynamic range between 1.0×10^{-11} M and 1.0×10^{-7} M with the detection limit of 1.0×10^{-11} M. It also exhibited high discrimination against a single-base and double-base mismatch DNA. The immobilized PNA probe on *o*-PD modified electrode was stable and good reproducibility of the residual activity ($96.1 \pm 3.1\%$) could be obtained up to 56 times with a relative standard deviation of 3.2 %.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: July 2011

Note: The content of this work will be combined with the work based on self-assembled monolayer for the publication.

Point of care detection of oseltamivir resistant mutation in novel 2009 human influenza A virus (H1N1) based on β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid hybridization

Piyasak Chaumpluk,^{1,*} Tirayut Vilaivan,² Sanong Ekgasit,² Wasun Chantratita,³ Yong Poovorawan⁴

¹ Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

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

³ Unit of Virology and Molecular Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

⁴ Center of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

*E-mail: piyasakcha@yahoo.com

Abstract: The rapid widespread of the novel 2009 H1N1 human influenza A virus, transmissible from human to human has raised concerns with respect to the control and the prevention of ongoing transmission. Although the most effective antiviral agent, oseltamivir (OTV), is recommended by The World Health Organization (WHO), recently it has been informed by health authorities in Denmark, Japan and the Special Administrative Region of Hong Kong, China of the appearance of novel 2009 H1N1 viruses which are resistant to the antiviral drug OTV based on laboratory testing. Those oseltamivir resistant mutations in neuraminidase gene (N1), were detected at position H274Y. Therefore, rapid detection of mutation at this position allowing a prompt action taken for next pandemic of potential higher resistance oseltamivir resistant H1N1 strains' preparedness is required. We have developed two genotypic identification methods, both involving a reverse transcription isothermal DNA amplification specific to N1 followed either by rapid liquid phase competitive hybridization using 6-carboxyfluorescein labeled β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid and its corresponding oligonucleotide quencher designed across residue H274Y which are associated strongly with oseltamivir resistance or 6-carboxyfluorescein labeled beta-pyrrolidinyl peptide nucleic acid with blue silver nanoparticles. In the first method, hybridization of probe to target DNAs allowed DNA signals to be detected visually within 1 min. Hybridization of the probe to wild type virus induced fluorescence signals upon UV illumination, whereas no such an induction was observed to those mutants. In the second, hybridization of probe to target DNAs allowed DNA signals to be detected visually within 20 min. Hybridization of the probe to wild type virus did not induced aggregation of blue silver nanoparticles whereas an induction was observed to those mutants resulting in translucent color of blue silver nanoparticles. Demonstration of the test for the presence of mutants via both methods revealed the consistency of the test compared with standard sequencing method. These methods provides a rapid genotypic identification of the oseltamivir resistant viruses by confirmation test for the presence of mutation domain via rapid Southern hybridization's principle.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Mar 2011

* Part of the content was presented at PACCON 2010

Donratan et al., 2010. Rapid detection of Oseltamivir Resistant Mutation at Amino Acid Residue 274 of Novel 2009 Human Influenza A Virus (H1N1) based on blue silver nanoparticles. Pure and Applied Chemistry International Conference 2010. 21-23 Jan 2010. Sunee Grand Hotel, Ubon Rachathani. 228.

Using PNA probe as a rapid detection of LAMP and PCR product for drug hypersensitivity prediction

Sita Virakul¹, Tirayut Vilaivan², Piyasak Chaumpluk², Nattiya Hirankarn^{3,*}

¹ Interdisciplinary program, Medical Microbiology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

² Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³ Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*E-mail: nattiya@gmail.com

Abstract: The nested SSP-PCR (sequence-specific primer-polymerase chain reaction) of HLA-B*15:02 and HLA-B*58:01 were developed as the conventional methods for anti-seizure (carbamazepine) and anti-hyperuricemic (allopurinol) drug hypersensitivity prediction, respectively. This new simpler and more cost effective assay could achieve 100% sensitivity and specificity comparing to the commercial SSP-PCR. Alternatively, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), an isothermal amplification technique, was successfully amplified HLA-B*58:01 with 95.24% sensitivity and 83.78% specificity. This assay significantly reduced the assay time from 3 hours of SSP-PCR to 40 minutes of LAMP reaction. In order to increase the specificity of this assay, pyrrolidinyI peptide nucleic acid (PNA), a DNA analog, was used due to the high specific and high affinity binding to DNA. In this study, PNA-DNA strand displacement probe was used as a LAMP product detection tool. Purified and heating LAMP product to facilitate PNA probe binding failed to give fluorescent signal. This might be explained by the PNA probes' sequence and length. Moreover, a simple SSP-PCR reaction for HLA-B*15:02 was developed to couple with the PNA probe for sequence-specific detection in a dot blot platform in order to reduce number of assay reaction and the risk of PCR product contamination from nested PCR.

Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: Mar 2011

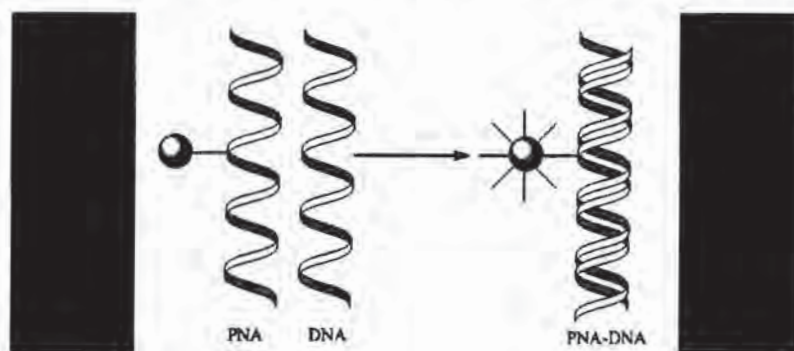
5-(Pyren-1-yl)uracil as a base-discriminating fluorophore in pyrrolidinyl peptide nucleic acids

Chalothorn Boonlua, Chotima Vilaivan, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: A pyrene-labeled uridine (pyU) pyrrolidinyl peptide nucleic acid (PNA) monomer was synthesized and incorporated into the PNA. The pyU base in PNA could specifically recognize the base A in its complementary DNA strand as determined by thermal denaturation (T_m) experiments. The fluorescence of the pyU-containing single-stranded PNA was very weak in aqueous buffer. In the presence of a complementary DNA target, the fluorescence was enhanced significantly (4–40 fold, depending on sequences). Experiments with mismatched DNA targets revealed that the fluorescence enhancement was specific to the pairing between pyU and A. As a result, the pyrene-modified pyrrolidinyl PNA is potentially useful as a hybridization responsive fluorescence probe for DNA sequence determination.



Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: Feb 2011

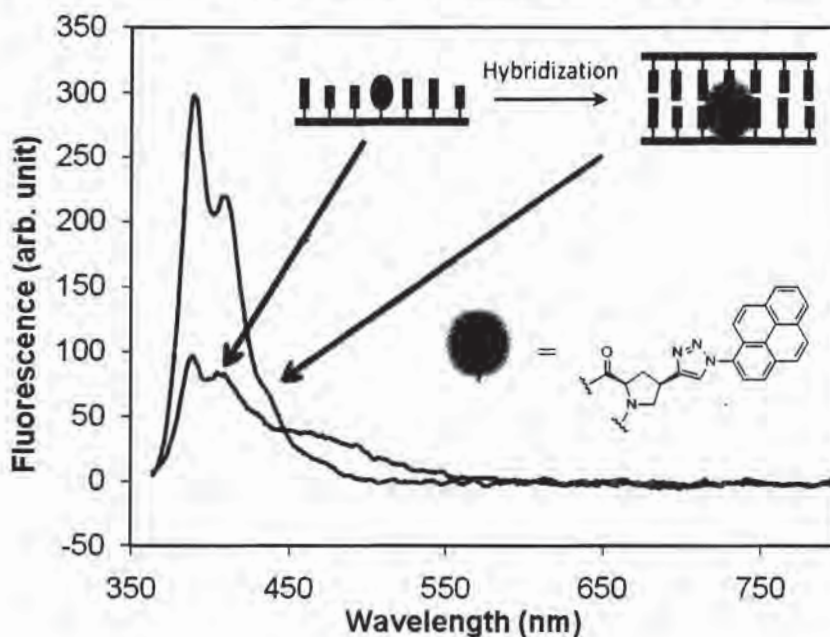
Polycyclic aromatic hydrocarbons as fluorescent universal bases in pyrrolidinyI peptide nucleic acids

Woraluk Mansawat, Chalothorn Boonlua, Chotima Vilaivan, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: A pyrene-labeled pyrrolidinyI peptide nucleic acid (PNA) monomer was synthesized by Cu-catalyzed click chemistry. The monomer was incorporated into the PNA with the aim to investigate the ability of the pyrene to behave as a nucleobase surrogate. Thermal denaturation studies between a mixed sequence PNA probe containing the triazole-linked pyrene at the middle position and a complementary DNA strand containing one of the four natural nucleobases (*i.e.*, adenine, cytosine, guanine, and thymine) facing the pyrene label indicated that the pyrene can behave as a universal base, with little discrimination between the four natural DNA bases. Importantly, the fluorescence of the pyrene-labeled single stranded PNA and its hybrid with DNA are quite different. The former showed a weak pyrene emission at 380 nm as well as a broad shoulder around 460 nm, suggesting the formation of an exciplex. The exciplex emission disappeared upon hybridization, with a concomitant increase of the pyrene monomer emission at 380 nm (up to a factor of 3).



Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: Oct 2011

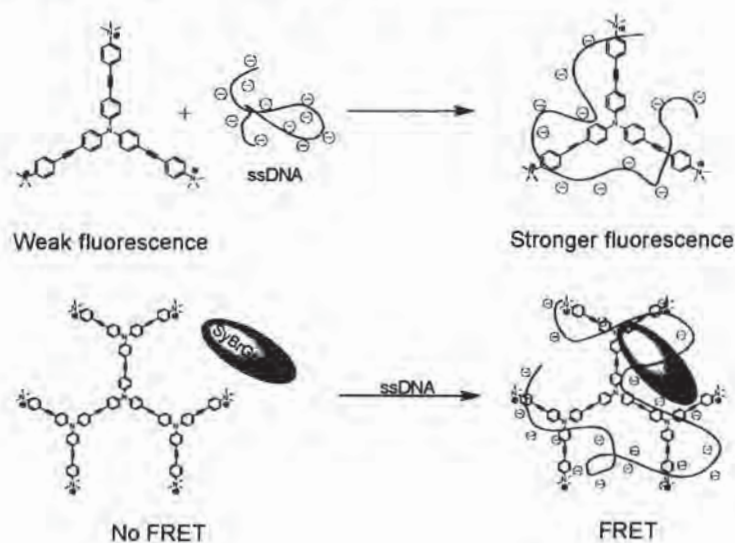
Polycationic fluorophores containing phenyleneethynylene building block for detection of oligonucleotides

Warathip Siripomnoppakhun, Paitoon Rachtasakhon, Tirayut Vilaivan, Mongkol Sukwattanasinitt*

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

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

Abstract: Zeroth and first generation dendritic polycationic fluorophores containing phenyleneethynylene branches and quarternary ammonium peripheral groups are synthesized. Zeroth generation fluorophore showed emission enhancement in the presence of oligonucleotides (ODNs) while its signal reduction is observed in the presence of a synthetic polyanionic polymer, poly(vinyl) sulfate (PVS). At the same negative charge (or nucleotide base) concentration, the fluorogenic response is greater for the longer ODNs suggesting that the longer ODNs interact more strongly than the shorter chains to the zeroth generation fluorophore. The ODNs however do not change the emission signal of the first generation fluorophore. The binding between the ODNs and the first generation fluorophore is recognized from the FRET signal to a known DNA binding dye, SyBrGreen II. The interaction between the ODNs and these dendritic polycationic fluorophores can be applied for detection of ODN.



Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Feb 2011

A cationic dendritic polycationic fluorophore as a FRET donor for the detection of DNA-PNA hybridization

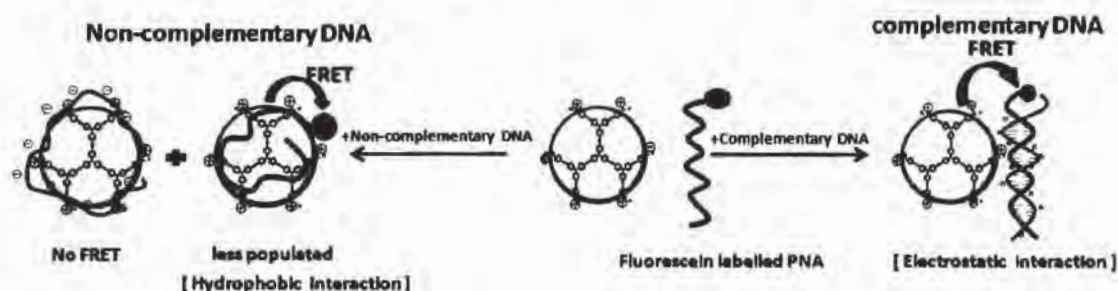
Kunnigar Vongnam¹, Tirayut Vilaivan², Paitoon Rashatasakhon² and Mongkol Sukwattanasinitt^{2,*}

¹ Program of Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

² Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

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

Abstract: The use of a conjugated dendritic polycationic fluorophore as a donors in the Förster resonance energy transfer (FRET) process to a fluorescein-labeled peptide nucleic acid is investigated in a context of DNA sensor development. The non-specific FRET signal which may have caused by the hydrophobic interaction between PNA backbone and dendrimer inner structure can be weakened by the addition of formamide or *N*-methyl-2-pyrrolidinone. The FRET ratio greater than one is obtained for the case of complementary target DNA. The sequence specificity is also evaluated by using a single-mismatched DNA and DNAs with extra 10-20 base pairs.



Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: Feb 2011

Determination of K-ras DNA using peptide nucleic acid probe in combination with chitosan particles by MALDI-TOF mass spectrometry

Jittima Meebungpraw^{1,2}, Tirayut Vilaivan³, Suda Kiatkamjornwong⁴, Voravee P. Hoven^{3,*}

¹Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

²Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

³Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

⁴Department of Imaging and Printing Technology, Faculty of Science Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: The ability to accurately determine the base sequence of DNA has a range of important biotechnology-related applications including medical, forensic, agriculture and food sciences. The concept of using a new conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acid (*acpcPNA*) in combination with Q-sepharose as an anion exchanger and MALDI-TOF mass spectrometry has been recently proven as a simple and effective way for DNA sequence analysis. This research has introduced chitosan and quaternized chitosan particles as a new anion-exchanger that may be applicable for the same purpose. The particles were prepared by ionic crosslinking of chitosan followed by quaternization via reductive alkylation/methylation. The success of particle formation was verified by TEM, FT-IR and ¹H NMR analyses. The applicability of the particles in DNA sequence determination was demonstrated using two 14mer PNA probes having the sequences corresponding to wild-type and mutant K-ras genes.

Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: February 2011

Quaternized chitosan particles prepared by self assembly of amphiphilic chitosan

Nadda Booranabunyat^{1,2}, Tirayut Vilaivan³, Voravee P. Hoven^{3,*}

¹Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

²Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

³Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: Quaternized chitosan particles were prepared from amphiphilic chitosan containing phthaloyl groups (Ph), hexanoyl groups (He) or dodecyl groups (Do) as hydrophobic entities and poly(ethylene glycol) (PEG) or *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)]propyl (HTAP) as hydrophilic entities. The two types of modifiers were grafted onto the chitosan via chemical reactions of amino and hydroxyl groups, respectively. Degree of substitution (%DS) of each functional group was determined by ¹H NMR. Formation of particles was then induced by self assembly of the resulting amphiphilic chitosan derivatives upon dialysis in water. Unlike the chitosan particles having HTAP moieties, a subsequent heterogeneous methylation was necessary to introduce positively charged quaternary ammonium groups to the chitosan particles having PEG moieties. The effects of type and mole ratio of hydrophilic groups and hydrophobic groups as well as relative %DS of hydrophobic/hydrophilic groups on the particle size/morphology were studied. According to SEM analysis, the mean particle size was not significantly affected by %DS variation. The particles have spherical morphology and a size range of 100–200 nm. Only the particles obtained from the amphiphilic chitosan grafted with HTAP exhibited positive charges as determined by Photon Correlation Spectroscopy (PCS).

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: October 2011

Synthesis of poly(4-vinylpyridine) *via* atom transfer radical polymerization (ATRP) from surface of magnetite nanoparticle

Metha Rutnakornpituk^{1,*}, Teerawat Inpotha¹, Boonjira Rutnakornpituk¹, Uthai Wichai¹, Tirayut Vilaivan²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: methar@nu.ac.th

Abstract: Surface modification of magnetite nanoparticle (MNP) with a covalently bonded poly(4-vinylpyridine) (P4VP) shell *via* surface initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) is presented herein. The MNPs were prepared by thermal decomposition of Fe(acac)₃ in benzyl alcohol. An ATRP initiating site, BTPAm (2-bromo-2-methyl-N-(3-(triethoxysilyl)propyl)propanamide), was then covalently attached onto the surface of the particles through a combination of a ligand exchange reaction and condensation of triethoxysilane. An ATRP of 4-vinylpyridine mediated by copper bromide catalyst and PMDETA (1,1,4,7,7-pentamethyldiethylenetriamine) ligand was carried out in dioxane for 24 h. The presence of P4VP coating on the particles was verified by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Transmission electron microscopy (TEM) disclosed that the average particle size was about 8 nm in diameter. These hybrid nanoparticles were well dispersible in acidic solutions especially at the range of pH 1-3. Effect of the solution pH on their surface charge and hydrodynamic diameter was investigated *via* photocorrelation spectrophotometry (PCS). As decreasing the solution pH from 2.5 to 0.5, its hydrodynamic diameter gradually decreased from 220 to 52 nm, while its zeta potential continuously increased from 38 to 55 mV. This was attributed to the presence of positively charged repulsion of protonated surface of the P4VP-coated MNP. Their magnetic properties were determined via vibrating sample magnetometry (VSM). Percentage of P4VP and MNP in the complexes were revealed using thermogravimetric analysis (TGA). It was observed that, as increasing the ATRP reaction time, percentage of P4VP in the complexes increased due to the high content of polymeric P4VP coated on the MNP core.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: December 2011

Picomolar detection of DNA-PNA binding based on capacitance measurement

Apon Numnuam^{1,2}, Proespichaya Kanatharana^{1,2}, Warakorn Limbut^{1,3}, Orawan Thipmanee^{1,2}, Saluma Samanman^{1,2}, Supanee Sankoh^{1,2}, Tirayut Vilaivan⁴, Panote Thavarungkul^{1,5,*}

¹Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand³

³Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

⁴Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

⁵Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

*E-mail: panote.t@psu.ac.th

Abstract: The lysine modified PNA probes (Lys-PNA) were immobilized on a gold electrode on a self-assembled monolayer (SAM) of 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA). The SAM of 11-MUA was activated with EDC/NHS for the immobilization of Lys-PNA followed by immersing the electrode in 1-dodecanethiol to block the remaining pinholes on the gold electrode surface. Hybridization between the target DNA and the immobilized PNA was determined by capacitance measurement. The capacitive system could detect the target DNA with a very wide linear range, between 1.0×10^{-11} and 1.0×10^{-5} M, and provided a very low detection limit of 4.0×10^{-12} M. The system was highly selective to the complementary DNA target, providing very good discrimination against single- and double-base mismatch DNA. The modified Lys-PNA probe provided good reproducibility of residual activity ($97.4 \pm 1.7\%$) and could be reused up to 47 times for one electrode preparation with a relative standard deviation (RSD) of 1.7% that helps to reduce the analysis costs.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: July 2011

Note: The content of this work will be combined with the work based on polymer for the publication.

Multi-detection of shrimp viral diseases using fluorescence peptide nucleic acid probes

Piyasak Chaumpluk,¹* Tirayut Vilaivan²

¹ Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

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

*E-mail: piyasakcha@yahoo.com

Abstract: Emerging disease epizootics frequently cause substantial losses among populations of shrimp, resulting in large economic losses in commercial aquaculture and threats to valuable stocks of wild shrimps. The extent of disease spread and impacts are often exacerbated by a problem of a delay in developing tools for the confirmatory diagnosis of disease or identification of the causative agent that allows infected animals to go undetected. So far, at least four major viruses affecting penaeid shrimp production in Thailand, including yellow-head virus (YHV), white spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) were reported. Although several PCR methods were developed for detection of shrimp viruses, these methods had a limitation on retention time for the test, depending on devices, their expenses, their specificities only on single viral infection per test, and therefore not fit for field application. A simple and rapid point of care method to detect the presence of four major viruses was developed through the pathogenic viral genes. Detection method was based isothermal nucleic acid amplification both reverse transcription loop mediated isothermal amplification and normal loop mediated isothermal amplification using each of four set of primers specific to 6 area of viral virulent genes. Detection of the amplified nucleic acid products was based on competitive hybridization of DNA products with beta-pyrrolidinyl peptide nucleic acid probes specific to each of four major viruses with their appropriated oligonucleotide quenchers. The method was able to detect 20 copies of viral nucleic acid at limit of detection with high specificity and detect the presence of virus(es) in specimen within 60 min including nucleic acid preparation without relying on laboratory facilities. Confirmation of the test was measured through fluorescence signals upon PNA hybridization and UV illumination. This provides an alternative for screening and point of care control of the viruses in long run.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Apr 2011

A simple and rapid colorimetric detection of pineapple mealy bug wilt-associated viruses (PMWaVs) based on gold nanoparticles

Piyasak Chaumpluk,^{1,*} Najwa Yanya,¹ Tirayut Vilaivan²

¹ Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

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

*E-mail: piyasakcha@yahoo.com

Abstract: Pineapple mealybug wilt disease is a devastating disease found in most areas where pineapples are grown commercially. Strong correlations between disease symptoms and Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV1 and 2) have been addressed. Since pineapple is vegetatively propagated, therefore a rapid screening of virus in propagules from one generation to the next is needed. We had developed a rapid colorimetric PMWaV detection method with high degree of accuracy based on gold nanoparticle's plasmon property. Detection processes were based on the specific cDNA amplification of common element in viral gene of both PMWaV-1 and -2. at 65°C using isothermal temperature platform. DNA signals were then measured visually through a colorimetric change of gold particle (20 nm) after probe hybridized to the target gene products. The method could detected both viruses and had a limit of detection at 10 copies of cloned viral DNA. No cross-reactivity was observed from samples contaminated with other viruses. Detection could be completed within 40 min of operation without the need of thermo cycler. This method constitutes a basis for a rapid yet simple and accurate detection of pathogenic virus suitable for field application.

Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date: Apr 2011



สัญญาเลขที่ RTA5280002

รายงานการประชุมประจำปีครั้งที่ 2
ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย ปี 2552

วันศุกร์ที่ 9 ธันวาคม 2554 เวลา 08:30 – 16:00
ห้อง SC4-209 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**โครงการ การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดีนิลเพปไทด์
นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด**

**Synthesis, Properties and Applications of Conformationally Constrained
 β -PyrrolidinyI Peptide Nucleic Acids**

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

คำนำ

โครงการ “การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้ไบโอฟิลิโคนเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด” นี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ตามเงื่อนไขในสัญญารับทุนจาก สกว. หัวหน้าโครงการจะต้องจัดการประชุมวิชาการประจำปี ประกอบกับขณะนี้งานได้ดำเนินการมาเป็นระยะเวลา 28 เดือนแล้ว จึงเห็นควรที่จะจัดงานประชุมนี้ขึ้นเพื่อให้ผู้ร่วมโครงการได้มีโอกาสนำเสนอความก้าวหน้าของโครงการวิจัยร่วมกัน และแลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างกลุ่มวิจัย-สาขา และรับฟังข้อเสนอแนะจาก อันจะทำให้เกิดการพัฒนางานวิจัยไปในทิศทางที่ดีขึ้น

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสถาบันต้นสังกัดของหัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการทุกท่าน รวมทั้งแหล่งทุนอื่นที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยแม้จะไม่ใช่วางตรงตลอดจนผู้ช่วยวิจัย และนักศึกษา ที่ทำให้โครงการดำเนินไปได้ด้วยดี มีผลงานที่มีคุณภาพสูงตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ นอกจากนี้ยังต้องขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่จัดการประชุมและอำนวยความสะดวกอื่นๆ

อนึ่ง งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ข้อมูลทั้งหมดนี้เป็นเพียงผลการศึกษาเบื้องต้นที่ยังไม่ได้ผ่านการประเมินอย่างเป็นทางการจากผู้เชี่ยวชาญ โปรดอย่านำไปเผยแพร่หรืออ้างอิงจนกว่าผลงานจะได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการแล้ว

รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
หัวหน้าโครงการ

กำหนดการประชุมทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ครั้งที่ 2

โครงการ “การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

ที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด” (รหัสโครงการ: RTA5280002)

วันศุกร์ที่ 9 ธันวาคม 2554 เวลา 08:30 – 16:00

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

08:30-08:50	ลงทะเบียน
08:50-09:00	กล่าวรายงานโดย รองศาสตราจารย์ ดร.ชยันต์ บุญยรักษ์ คณบดี คณะวิทยาศาสตร์ และ เปิดงานโดย ศาสตราจารย์ ดร.สุจินต์ จินายน อธิการบดีมหาวิทยาลัยนเรศวร
09:00-09:30	สรุปภาพรวมของโครงการโดยหัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (นักวิจัยดีเด่น แห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ปี 2554)
09:30-10:00	Internally-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acids as a quencher-free molecular beacon (รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย)
10:00-10:30	FRET Detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationic phenyleneethynylene dendrimer with DNA/PNA hybrid (ผศ.ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
10:30-11:00	Development of signal amplification method assisted by polymerization for DNA detection (น.ส.แพทอง เหลาภา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย)
11:00-11:30	อาหารว่าง
11:30-12:00	Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA (ดร.บุญจิรา รัตนกรพิทักษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
12:00-13:00	รับประทานอาหารกลางวันและชมโปสเตอร์
13:00-13:30	Effect of the length and terminating head group of blocking thiols on the label-free capacitive detection of DNA using immobilized pyrrolidinyl acpcPNA probe (น.ส. อรรพรรณ ทิพย์มณี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
13:30-14:00	Monitoring interactions of acpcPNA with DNA duplexes by gel electrophoresis (น.ส. ศิดา วีรกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
14:00-15:00	ประชุมโต๊ะกลม (เฉพาะหัวหน้าโครงการย่อยและผู้ทรงคุณวุฒิ) และอาหารว่าง
15:00-16:00	ชมโปสเตอร์

O001: <i>Internally-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acids as a quencher-free molecular beacon</i>	1
Chalothorn Boonlua, Chotima Vilaivan, Nisanath Reenabthue, Boonsong Ditmangklo, Chaturong Suparpprom, <u>Tirayut Vilaivan</u> (sub-project 1)	
O002: <i>FRET Detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationic phenyleneethynylene dendrimer with DNA/PNA hybrid</i>	2
Kunnigar Vongnam, Warathip Siripornnoppakhun, Tirayut Vilaivan, <u>Paitoon Rashatasakhon</u> , Mongkol Sukwattanasinitt (sub-project 2)	
O003: <i>Development of signal amplification method assisted by polymerization for DNA detection</i>	3
<u>Praethong Laopa</u> , Tirayut Vilaivan, Voravee P. Hoven (sub-project 3)	
O004: <i>Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA</i>	4
Thapanapong Theppaleak, <u>Boonjira Rutnakornpituk</u> , Uthai Wichai, Tirayut Vilaivan, Metha Rutnakornpituk (sub-project 4)	
O005: <i>Effect of the length and terminating head group of blocking thiols on the label-free capacitive detection of DNA using immobilized pyrrolidinyl acpcPNA probe</i>	5
<u>Orawan Thipmanee</u> , Saluma Samanman, Supanee Sankoh, Apon Numnuam, Warakorn Limbut, Proespichaya Kanatharana, Tirayut Vilaivan, Panote Thavarungkul (sub-project 5)	
O006: <i>Monitoring interactions of acpcPNA with DNA duplexes by gel electrophoresis</i>	6
<u>Sita Virakul</u> , Paethong S. Laopa, Tirayut Vilaivan, Nattiya Hirankarn (sub-project 6b)	

บทความนำเสนอแบบโปสเตอร์	หน้า
P001: <i>Pyrrolidinyl peptide nucleic acid homologues</i> <u>Woraluk Mansawat</u> , Chotima Vilaivan, David Aitken, Tirayut Vilaivan (sub-project 1)	7
P002: <i>Dual-pyrene-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid probes</i> <u>Nattapon Maneelun</u> , Chalothorn Boonlua, Tirayut Vilaivan (sub-project 1)	8
P003: <i>Cyclodextrins discrimination by tricationic phenylene-ethynylene fluorophore</i> <u>Warathip Siripornnoppakhun</u> , Paitoon Rashatasakhon, Tirayut Vilaivan, Mongkol Sukwattanasinitt (sub-project 2)	9
P004: <i>Fluorescent-labeled quaternized chitosan particles prepared by self-assembly of amphiphilic chitosan</i> <u>Kanya Taboonpong</u> , Tirayut Vilaivan, Voravee P. Hoven (sub-project 2)	10
P005: <i>Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle</i> Boonjira Rutnakornpituk, Uthai Wichai, Tirayut Vilaivan, <u>Metha Rutnakornpituk</u> (sub-project 4)	11
P006: <i>Label-free capacitive DNA sensor based on tyramine modified pyrrolidinyl PNA probe</i> <u>Supanee Sankoh</u> , Saluma Samanman, Orawan Thipmanee, Apon Numnuam, Warakorn Limbut, Proespichaya Kanatharana, Tirayut Vilaivan, Panote Thavarungkul (sub-project 5)	12
P007: <i>Multiple detection of shrimp's white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus using multiplex loop mediated isothermal DNA amplification and colorimetric signals detection via gold nanoparticles</i> <u>Piyasak Chaumpluk</u> , Tirayut Vilaivan (sub-project 6a)	13
P008: <i>Establishment of hemoglobin E lateral flow strip test by peptide nucleic acid: A preliminary study</i> <u>Theeradet Khomwan</u> , Nattiya Hirankan, Tirayut Vilaivan, Amornpun Sereemasapun (sub-project 6c)	14

Internally-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acids as a quencher-free molecular beacon

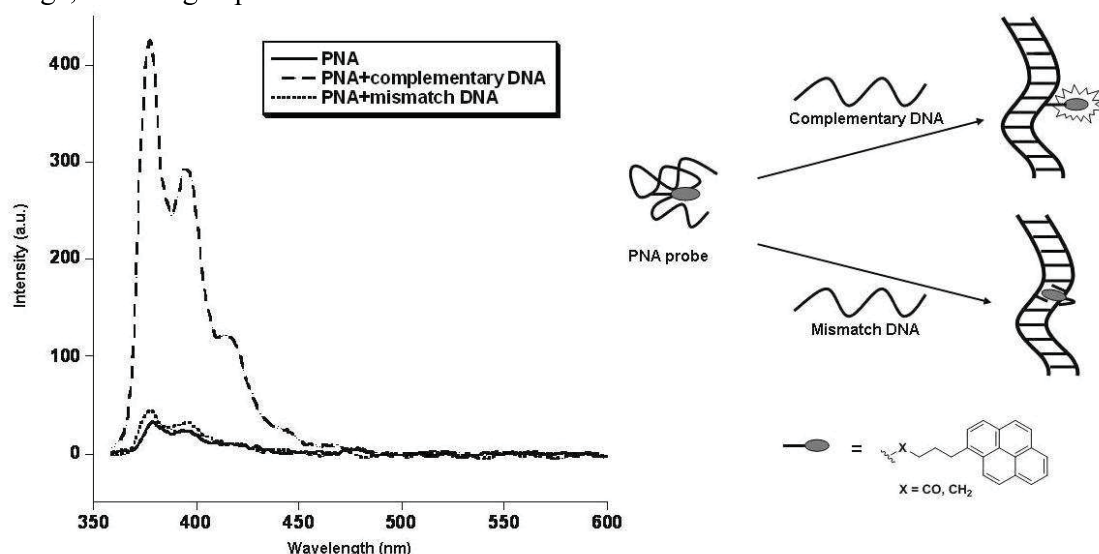
Chalothorn Boonlua,¹ Chotima Vilaivan,¹ Nisanath Reenabthue,² Boonsong Ditmangklo,² Chaturong Suparpprom,² Tirayut Vilaivan^{1,*}

¹Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

²Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Ta-Po District, Muang, Phitsanulok, 65000

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

Abstract: DNA or PNA probes labeled with one or more environment-sensitive chromophores are potentially useful as diagnostic tools. In this study, we had developed a reliable method for site-specific internal labeling of pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) *via* acylation or reductive alkylation of 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (apc)-modified acpcPNA. When pyrene was used as the label through a flexible linker, the fluorescence of the pyrene-labeled single stranded acpcPNA was very low due to the effective quenching of pyrene by pyrimidine bases. The fluorescence increases up to 14-fold upon hybridization of the acpcPNA to the complementary DNA. No fluorescence increase was observed in the presence of single base mismatch DNA targets, provided that the mismatch base located in close proximity to the site of label attachment. As a result, the pyrene-labeled acpcPNA can behave as an effective quencher-free molecular beacon. The scope and limitation of this new PNA beacon, as well as the mechanism of fluorescence change, are being explored.



Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Dec 2011

FRET Detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationic phenyleneethynylene dendrimer with DNA/PNA hybrid

Kunnigar Vongnam¹, Warathip Siripornnoppakhun², Tirayut Vilaivan², Paitoon Rashatasakhon² and Mongkol Sukwattanasinitt²

¹ Program of Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

² Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

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

Abstract: Interaction between a polycationic compound and DNA is a useful phenomenon for development of a new DNA sensing system. In this work, dendritic polycationic phenyleneethynylene fluorophores are investigated as a Förster resonance energy transfer (FRET) donor for the detection of DNA hybridization in conjunction with a fluorescein-labeled pyrrolidinyI peptide nucleic acid (Fl-acpcPNA) probe. The first generation dendrimer is an efficient energy donor for the fluorescein acceptor but also shows non-specific FRET signal with Fl-acpcPNA. The addition of *N*-methyl 2-pyrrolidone can virtually completely remove the non-specific interaction between Fl-acpcPNA and the dendrimer. Under the optimal condition, the complementary DNA gives a distinctively high FRET ratio (1.42) comparing with those of the non-complementary (0.26) and singly mismatched (0.51) DNAs. The FRET ratio responses linearly with the DNA concentration with the detection limit lower than 1 nM. The FRET ratio is even higher for the complementary target DNAs with extra hanging nucleotide sequences, which is a more frequently encountered scenario in real applications.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: under revision (Talanta)

Development of signal amplification method assisted by polymerization for DNA detection

Praethong Laopa^{1,2}, Tirayut Vilaivan³, Voravee P. Hoven^{3,*}

¹Program in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

²Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

³Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: Signal amplification by polymerization has been recently emerged as a simple, rapid, sensitive, and inexpensive way to detect DNA binding. In principle, hundreds to millions of times of signals can be amplified through the chain propagation of the designated monomer from the initiator immobilized on biosensor surface under appropriate condition. The resulting polymer would thus change the optical property of the sensing spot, which later becomes visually distinguishable from the background. Here in this research, two monomers were used for investigation: poly(ethylene glycol)methacrylate (PEGMA) and rhodamine B-functionalized 2-hydroxyethylmethacrylate (RhB-HEMA). These two monomers yielded colored copolymer that can be visualized by naked eye without the equipment requirement and are water-soluble, the characteristic mandatorily required to assure that the copolymer unbound to the biosensor surface can be removed by aqueous washing. According to our preliminary investigation, the desired copolymer appearing in red can grow from the initiator grafted on paper with minimal background from non-specific adsorption of unbound copolymer. The employment of a purge-free controlled polymerization based on activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical polymerization (ARGET ATRP) truly add simplicity to the detection process. It is our on-going investigation to determine the ability of a peptide nucleic acid probe bearing a conformationally rigid D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) end-capped with ARGET ATRP initiator in amplifying the signal upon hybridization with target DNA that was immobilized on paper-based biosensor.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: October 2012

Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA

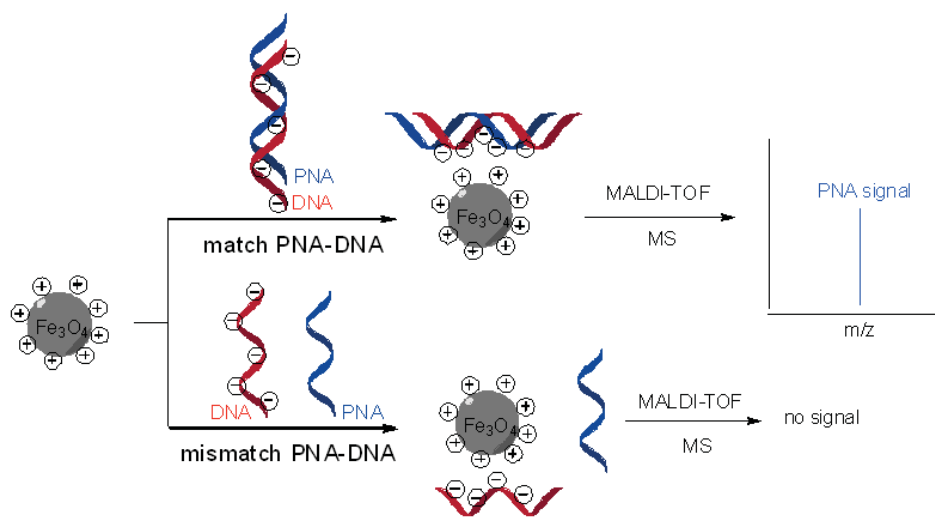
Thapanapong Theppaleak¹, Boonjira Rutnakornpituk¹, Uthai Wichai¹, Tirayut Vilaivan² and Metha Rutnakornpituk^{1*}

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: methar@nu.ac.th

Abstract: We here report the surface modification of magnetite nanoparticle (MNP) with the copolymer of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA) and diethylamino ethyl methacrylate (DEAEMA) *via* atom transfer radical polymerization (ATRP) for use as a cationic nanosolid capture for detection of DNA sequence using PNA probe. Molar ratio of the PEGMA:DEAEMA copolymer was systematically varied to obtain 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, respectively, to tune the positive charges on the particle surface after quaternization. Kinetic studies of the (co)polymerizations were also investigated *via* ¹H NMR to disclose the relative reactivity of the polymers in the grafting reaction. Zeta potential of the (co)polymer-coated MNP was analyzed by photo correlation spectroscopy (PCS). Transmission electron microscopy (TEM) and PCS indicated an improvement in the particle dispersibility in water upon quaternization of the DEAEMA entities grafted on the particle surface. From the preliminary results, these copolymer-grafted MNP can be used as a solid support to differentiate between full match and single-base mismatch DNA sequences using PNA probe. These novel cationic nanocaptures might be applicable for use as a magnetic guidable tool for detection of DNA sequences.



Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: January 2012

Effect of the length and terminating head group of blocking thiols on the label-free capacitive detection of DNA using immobilized pyrrolidiny acpcPNA probe

Orawan Thipmanee^{1,2,3}, Saluma Samanman^{1,2,3}, Supanee Sankoh^{1,2,3}, Apon Numnuam^{1,2,3}, Warakorn Limbut^{1,2,4}, Proespichaya Kanatharana^{1,2,3}, Tirayut Vilaivan⁵ and Panote Thavarungkul^{1, 2,6,*}

¹ Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

² Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁴ Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁵ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

⁶ Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

*E-mail: panote.t@psu.ac.th

Abstract: The influence of the length and the terminating head group of blocking thiols on the sensitivity and specificity of a label-free capacitive DNA detection system using immobilized pyrrolidiny peptide nucleic acid (acpcPNA) probes was studied. A C-terminal lysine-modified acpcPNA was immobilized through four different alkanethiol self-assembled monolayers (SAMs), i.e., 3-mercaptopropionic acid (MPA), thioctic acid (TA), thiourea (TU) and mercaptosuccinic acid (MSA). The hybridization between the acpcPNA probes and the target DNA was directly measured using the capacitive system. Five blocking thiols of various length (C=3, 6, 8, 9 and 11), with the -OH terminating head group, i.e., 3-mercapto-1-propanol (3-MPL), 6-mercapto-1-hexanol (6-MHL), 8-mercapto-1-octanol (8-MOL), 9-mercapto-1-nonanol (9-MNL), 11-mercapto-1-undecanol (11-MUL) and another blocking thiol (C=11) with a -CH₃ terminating head group, 1-dodecanethiol (1-DDT) were investigated. The blocking thiol with the same length as the total spacer of the immobilized acpcPNA gave the highest sensitivity and specificity with the -OH terminating head group providing a slightly better signal than the -CH₃ group. Under the optimized conditions, the immobilized acpcPNA probes provided a wide linear range for DNA detection (1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-8} M) with a very low detection limit in the picomolar range. The modified acpcPNA electrode could be reused through at least 58 cycles. The high sensitivity and very low detection limits are potentially useful for the analysis of ultra-trace levels of DNA in samples.

Publication status

[] Published

Citation information:

[X] To be published

Submitted 27 October 2011

Monitoring interactions of acpcPNA with DNA duplexes by gel electrophoresis

Sita Virakul,¹ Paethong S. Laopa,² Tirayut Vilaivan,² Nattiya Hirankarn^{1,*}

¹ Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok

² Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok,

*E-mail: nattiyap@gmail.com

Abstract: The knowledge of using certain HLA allele for drug hypersensitivity prediction is one of the major breakthroughs to drastically prevent patients from suffering with a lethal Stevens - Johnson syndrome in recent years. Currently, HLA gene detection systems are developed mostly on traditional molecular techniques for transplantation which is too informative to find one allele for drug hypersensitivity prediction. Fluorescein-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (FAM-labeled acpcPNA) is introduced to further increase the specificity of conventional PCR and LAMP-based detection. However, the results obtained so far had not been successful despite the ability of the PNA probe to bind to single stranded synthetic deoxyoligonucleotide was confirmed by thermal denaturation experiments. The aim of this study is to understand the nature of interaction of acpcPNA with double-stranded DNA derived from PCR amplification using gel electrophoresis. A FAM-labeled acpcPNA was designed to detect interferon gamma gene (IFN- γ). The successful hybrid formation with single stranded synthetic deoxyoligonucleotide target was confirmed by agarose gel electrophoresis under non-denaturing conditions as shown by a new fluorescent band that migrates into the gel as opposed to the baseline band of the unhybridized FAM-labeled acpcPNA. No new band was observed with non-specific target, suggesting that the interaction is specific. The amount of 10 pmol PNA was found to be the minimum quantity that allows convenient direct visualization. When the FAM-labeled acpcPNA was hybridized with heat-denatured PCR products containing the target sequence, only partial binding was observed as evidenced by the presence of both excess PCR product and PNA, as well as a new band corresponding to the PNA-PCR product complex. The temperature and hybridization time were varied, and it was observed that the longer the hybridization time lead to less efficient binding of PNA. This might be due to the fact that PNA is much smaller than the complementary PCR product strand, hence the short PNA-DNA duplex initially formed is not stable enough compared to the longer DNA-DNA duplex. As a result, the DNA-DNA duplex reformed after prolonged hybridization time, leading to expelling of the PNA strand. Addition of the second pseudocomplementary PNA strand appears to improve the stability of the PNA-PCR product complex, although the invasion was still incomplete. The results suggest a rather complex interaction between acpcPNA and real DNA samples, which requires careful optimization to enable applications of this PNA in real sample analysis.

Publication status

☐ Published

Citation information:

☒ To be published

Proposed submission date:

Pyrrolidinyl peptide nucleic acid homologues

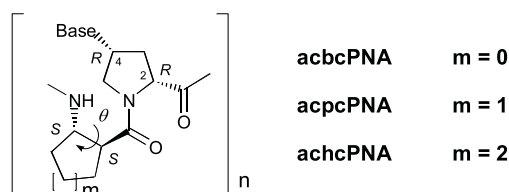
Woraluk Mansawat,¹ Chotima Vilaivan,¹ David Aitken,² Tirayut Vilaivan^{1,*}

¹ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

² Laboratoire de Synthèse Organique et Méthodologie, ICMMO - Bât 420 - 3ème étage, Université Paris-Sud XI, 15, rue Georges Clemenceau, 91405 Orsay cedex, France

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

Abstract: The original pyrrolidinyl PNA bearing the alternate sequence of nucleobase-modified proline/2-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpcPNA) has been a subject of intensive investigation by our group during the past decade. While the effect stereochemistry of the proline and the ACPC spacer on the DNA/RNA binding properties of the pyrrolidinyl PNA is well understood, no information is available about the effect of changing the ring size. This work aims to investigate the effect of changing the ring size of the spacer part, which would result in a change in both the rigidity (increased rigidity is expected in six- and four-membered relative to five-membered rings) and the conformation of the PNA backbone (due to the change in the torsional angle (θ) of the NH-C2-C1-CO which is an integral part of the backbone). The replacement of (1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) with (1*S*,2*S*)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (ACBC) resulted in a new pyrrolidinyl PNA (acbcPNA) with general binding properties similar to acpcPNA, but with an increase of T_m with both complementary DNA and RNA hybrids by 0.7–1.5 °C per modification without compromising the specificity. In contrast, the replacement of ACPC with (1*S*,2*S*)-2-aminocyclohexanecarboxylic acid (ACHC) resulted in total loss of binding to both DNA and RNA. The results are explained by a more favourable conformational pre-organization of the ACBC residue.



Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Dec 2011

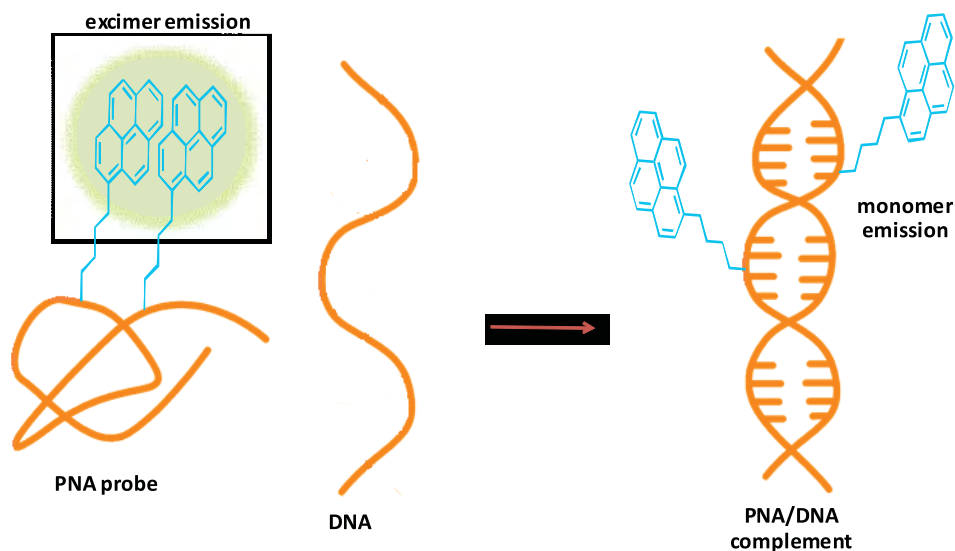
Dual-pyrene-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid probes

Nattapon Maneelun, Chalothorn Boonlua, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: Dual-pyrene-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) probes have been rationally designed by site-specifically attaching two pyrene chromophores onto the same strand of acpcPNA. Single-stranded acpcPNA with two pyrenebutyryl labels showed a strong fluorescence emission at 470 nm (pyrene excimer) and a weaker emission at 380 nm (pyrene monomer), indicating that the two pyrene chromophores were in close proximity. Hybrid formation with the complementary DNA target resulted in an enhancement of the monomer emission with concomitant decrease of the excimer emission due to the disruption of the excimer. Separation between the two pyrenebutyryl labels by 3 nucleotide units resulted in a larger change in the ratios of monomer to excimer emissions (0.43 in ss, 1.19 in ds) than 2 (0.27 in ss, 0.62 in ds) and 1 nucleotide (0.43 in ss, 0.48 in ds) units. Replacement of the pyrene label from pyrenebutyryl ($\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$) to pyrenebutyl ($\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) resulted in a more dramatic change in excimer/monomer emissions ratio at 3 nucleotides separation (0.65 in ss, 2.53 in ds). The ratios of monomer to excimer emission changed very little if the DNA target carried a single mismatched base, indicating a high specificity. These dual-pyrene-labeled acpcPNA should be useful as probes for detecting sequences of DNA. The advantage of this design over conventional molecular beacons is that not only intensity, but also the emission wavelength, change significantly upon hybridization with the DNA target.



Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: July 2012

Cyclodextrins discrimination by tricationic phenylene-ethynylene fluorophore

Warathip Siripornnoppakhun, Paitoon Rashatasakhon, Tirayut Vilaivan, Mongkol Sukwattanasinitt*

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

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

Abstract: The cyclodextrins (CyDs) containing six (α), seven (β) and eight (γ) glucosyl-membered cyclic structure are widely use in controlled release system, separation and molecular recognition due to their complexation ability and low cytotoxicity. Size selective inclusion complexation with CyDs and detection of this phenomenon are thus important for development toward these applications. In this contribution, the complexation of trimethylphenyl quaternary ammonium groups with γ -CyD is readily observed by fluorescence enhancement and ^1H NMR signals shifts of tricationic phenylene-ethynylene fluorophore. Benesi-Hilderbrand plot and the NMR data revealed a 1:1 complexation between the fluorophore and γ -CyD. The data also indicate no inclusion interaction between the fluorophore and other CyDs (α and β). This tricationic fluorophore should be useful for identify γ -CyD from the other sizes CyDs and probing its inclusion interaction.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: Jan 2012

Fluorescent-labeled quaternized chitosan particles prepared by self-assembly of amphiphilic chitosan

Kanya Taboonpong^{1,2}, Tirayut Vilaivan³ and Voravee P. Hoven^{3,*}

¹Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

³Organic Synthesis Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: Upon self-assembly of amphiphilic chitosan having *N*-[(2-hydroxy-1-3-trimethylammonium)]propyl (HTAP) as hydrophilic entities and ethynylpyrene (fluorescent dye) as hydrophobic entities, fluorescent-labeled quaternized chitosan (Pyr-CS-HTAP) particles can be formed. The functionality of the quaternized chitosan particles were verified by FT-IR and NMR spectroscopy. According to SEM analysis, the particles had a size range of 1-2 μm with blackberry-like morphology. And the particles exhibited positive charges with a zeta-potential of +40 mV as determined by PCS. The particles had bright green fluorescence and were stable in a broad pH and temperature range.

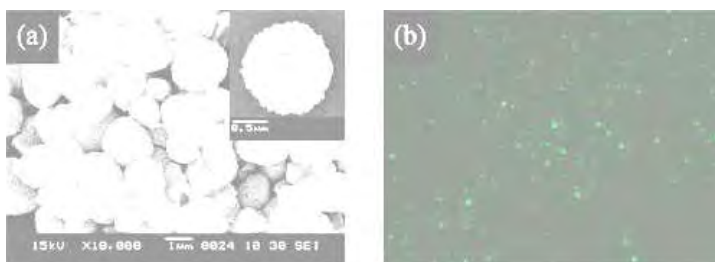


Figure 1. SEM (a) and fluorescence (b) micrographs of Pyr-CS-HTAP particles

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: June 2012

Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle

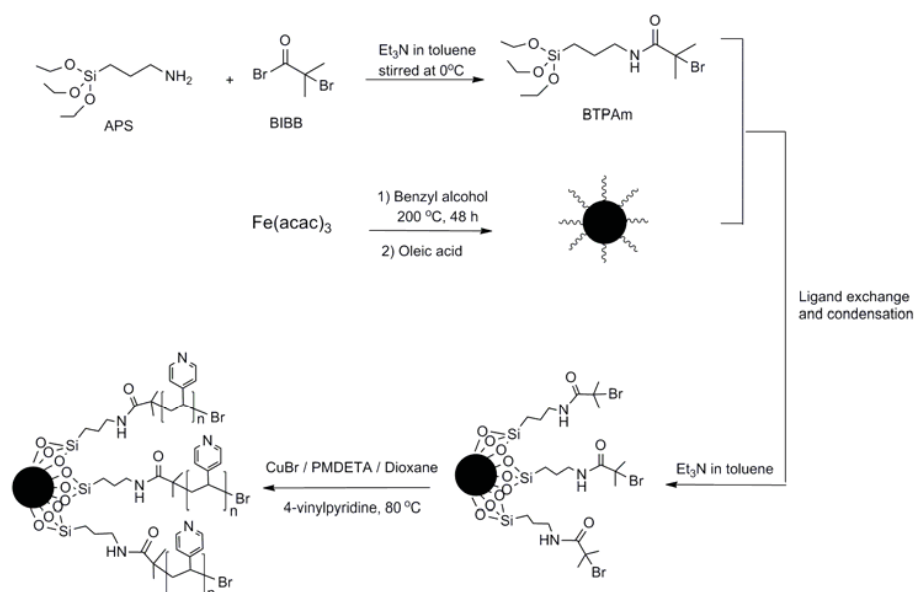
Boonjira Rutnakornpituk¹, Uthai Wichai¹, Tirayut Vilaivan² and Metha Rutnakornpituk^{1,*}

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: methar@nu.ac.th

Abstract: Surface modification of magnetite nanoparticles (MNP) with a covalently bonded poly(4-vinylpyridine) (P4VP) by surface initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) is reported herein. MNP was first prepared *via* thermal decomposition of $\text{Fe}(\text{acac})_3$ and grafted with an ATRP initiator on its surface. ATRP of 4-vinylpyridine was then initiated from the MNP surface in the presence of $\text{CuBr}/\text{PMDETA}$ (1,1,4,7,7-pentamethyldiethylenetriamine) catalytic complex in dioxane. FTIR in combination with photocorrelation spectroscopy (PCS), thermogravimetric analysis (TGA) and vibrating sample magnetometry (VSM) techniques indicated the growth of P4VP on the particle surface with increasing the ATRP reaction time. Transmission electron microscopy (TEM) disclosed that the average particle size was 8 nm in diameter with some nanoaggregation observed. From PCS results, decreasing the solution pH enhanced the particle dispersibility due to the positive charge repulsion of the protonated P4VP on the particle surface. TGA was also performed to elucidate the composition of P4VP shell and magnetite core in the hybrid material.



Publication status

[x] Published

Citation information: B. Rutnakornpituk, U. Wichai, T. Vilaivan and M. Rutnakornpituk, Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle, *Journal of Nanoparticle Research*, In Press (2011). (Impact factor (2010) = 3.25) DOI 10.1007/s11051-011-0592-8

[] To be published: Proposed submission date:

Label-free capacitive DNA sensor based on tyramine modified pyrrolidinyl PNA probe

Supanee Sankoh^{1,2,3}, Saluma Samanman^{1,2,3}, Orawan Thipmanee^{1,2,3}, Apon Numnuam^{1,2,3}, Warakorn Limbut^{1,2,4}, Proespichaya Kanatharana^{1,2,3}, Tirayut Vilaivan⁵ and Panote Thavarungkul^{1,2,6*}

¹ Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

² Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁴ Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁵ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

⁶ Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

*E-mail: panote.t@psu.ac.th

Abstract: Pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) is a new PNA that offers many advantages for target hybridization. In this work, the acpcPNA probes were immobilized on a gold electrode through a layer of polytyramine film, modified on a gold electrode surface by electropolymerization process. The functional groups of the polymer were activated with glutaraldehyde for acpcPNA probes immobilization. The final step was to immerse the electrode in a 11-mercapto-1-undecanol (11-MUL) solution to block any pinholes on the gold electrode surface. The hybridization between the target DNA and the immobilized acpcPNA probe was detected by capacitance measurement. The capacitive system could detect the target DNA with a wide linear range (1.0×10^{-12} and 1.0×10^{-8} M) and a very low detection limit (0.8 pM). The system provided very good discrimination against single and double base mismatched DNAs. The modified acpcPNA probe provided good reproducibility of residual activity (97.9 ± 1.5 %) and one preparation of the modified electrode could be reused up to 77 times with a relative standard deviation (RSD) of 1.5% and this helps to reduce the analysis costs.

Publication status

[] Published

Citation information: Submitted

[X] To be published

Proposed submission date: March 2012

Multiple detection of shrimp's white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus using multiplex loop mediated isothermal DNA amplification and colorimetric signals detection via gold nanoparticles

Piyasak Chaumpluk,^{1,*} Tirayut Vilaivan²

¹ Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

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

*E-mail: piyasakcha@yahoo.com

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) and Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) are two DNA viral pathogens of major economic importance in shrimp aquaculture through out the world. A highly specific and sensitive diagnostic system for detection of WSSV and IHHNV was designed based on the multiplex LAMP method and the colorimetric signals detection using gold nanoparticles. Multiple sets of primers specific to 12 area of target transmembrane signal peptide and NS-1 gene of both viruses were used in 60 min reaction at 63°C. DNA signals were then measured visually through a colorimetric change of gold particles (20nm) after each of PNA probes specific to each genes hybridized to the target gene products. The method could detect either of these viruses or both and had same limit of detection to each viruses at 50 copies of cloned viral DNA. No cross reactivity was observed from samples contaminated with other viruses. This provides an alternative for simple screening and point of care control of the viruses in long run.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed to integrate data to the previous Singleplex LAMP data and plan to complete a manuscript in the first quarter of year 2012.

Establishment of hemoglobin E lateral flow strip test by peptide nucleic acid: A preliminary study

Theeradet Khomwan¹, Nattiya Hirankan², Tirayut Vilaivan³, Amornpun Sereemaspun^{1,*}

¹ Nanobiomedicine Laboratory, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Pratumwan District, Bangkok 10330

² Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Pratumwan District, Bangkok 10330

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Pratumwan District, Bangkok 10330

*E-mail: amornpun.s@chula.ac.th

Abstract: Hemoglobin E disease is the most common β -structural hemoglobin variant that is constituted for 13 % of Thai population. Interestingly, around 50-60 % of β -Thalassemia/Hb E was found in the northeast of Thailand. To date, the screening test for β -Thalassemia/Hb E is the detection of hemoglobin precipitation, but this assay is time-consuming and requires skilled person to interpret results. In addition, the temperature may affect the test that has very fragile erythrocyte and may lead to the false-positive results. The objective of this study is to develop a screening test that uses nanotechnology and PNA probe by sandwich hybridization. The results from this technique are shown in red band on test strips that are easily visible by naked eyes, less time-consuming, easy to carry and high-specificity. Preliminary results with synthetic DNA that have been made as a placebo to the genomic DNA of the patients show that PNA probes have high-specificity and is capable to get results within 30 minutes. These findings suggest a new promising method for clinical applications in the near future.

Publication status

[] Published

Citation information:

[x] To be published

Proposed submission date: N/A

ภาคผนวก 1: รายนามผู้เข้าร่วมประชุม

	โครงการย่อย	ผู้ร่วมประชุม	ตำแหน่ง
1	Conformationally restricted PNA : synthesis and binding properties	1. รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ 2. ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม 3. ดร. วรลักษณ์ มั่นสวัสดิ์ 4. น.ส. ชโลธร บุญเหลือ 5. น.ส. บุญส่ง ดิษมังคลอ 6. นายณัฐพล มณีสุน 7. นางโชติมา วิไลวัลย์	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัย นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท เจ้าหน้าที่โครงการ
2	Dendritic fluorophores for detection of DNA/PNA hybridization	1. น.ส. วราทิพย์ ศิริพรนพคุณ 2. น.ส. กรรณิการ์ วงษ์นาม	นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท
3	Development of positively charged polymeric support for high throughput DNA sequence analysis using PNA probes	1. รศ.ดร.วรวิทย์ ไฮเว่น 2. น.ส. แพรทอง เหลาภา 3. น.ส. กัญญา ตะบุญพงศ์	หัวหน้าโครงการ นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท
4	Surface functionalized magnetic nanoparticles for immobilization of PNA and DNA	1. รศ.ดร.เมธา รัตนกรพิทักษ์ 2. ดร.บุญจิรา รัตนกรพิทักษ์ 3. ดร.อุทัย วิชัย 4. นายฐานพัฒน์ เทพฤกษ์ 5. น.ส. ยี่รัก พรายอินทร์ 6. นายกฤษดา ตันกันยา 6. นส ศิรประภา มีรอด 7. นส นันทรักษ์ รอดเกตุ 8. นส. ภาวิณี เทียมดี 9. นายบัณฑิต ทองอ่อน 10. นายรณนัท จันแก้ว 11. นายกฤษฎา ตันกันยา	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักวิจัย นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาเอก นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท
5	Development of label-free electrochemical DNA biosensor based on immobilized PNA probes	1. รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร 2. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา 3. ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม 4. น.ส. อรวรรณ ทิพย์มณี 5. น.ส. สาธิตา สมานหมาน 6. น.ส. สุพรรณิ สันเกาะ	หัวหน้าโครงการ นักวิจัย นักวิจัย นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท นักศึกษาปริญญาโท
6.1	Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural science	1. น.ส. อัจจิมา เมืองชื่น	ผู้ช่วยนักวิจัย
6.2	Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural sciences	1. น.ส. ศิดา วีรกุล	ผู้ช่วยนักวิจัย
6.3	Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural sciences	1. นายธีระเดช ขมหวาน	ผู้ช่วยนักวิจัย

ภาคผนวก 2: Output จากโครงการที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Taechalertrpaisarn, J.; Sriwarom, P.; Boonlua, C.; Yotapan, N.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T. "DNA-, RNA- and self-pairing properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids with (2'R,4'S)-prolyl-(1S,2S)-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone" *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5822–5826. (IF2010 = 2.618) (เป็น output จากโครงการย่อย 1)
2. Ananthanawat, C.; Hoven, V. P.; Vilaivan, T.; Su, X. D. "Surface Plasmon Resonance Study of PNA Interactions with Double Stranded DNA" *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 1918–1923. (IF2010 = 5.361) (เป็น output จากโครงการย่อย 1)
3. Ngamwiriyawong, P.; Vilaivan, T. "Synthesis and nucleic acids binding properties of diastereomeric aminoethylprolyl peptide nucleic acids (aepPNA)" *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* **2011**, 30, 97–112. (IF2010 = 1.132) (เป็น output จากโครงการย่อย 1)
4. Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β -peptide backbone: A conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties" *Artificial DNA: PNA and XNA* **2011**, 2, 50–59. (IF2010 = ยังไม่มี เนื่องจากเป็นวารสารใหม่) (เป็น output จากโครงการย่อย 1)
5. Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. "5-Pyren-1-yl uracil as a base discriminating fluorophore in pyrrolidinyl peptide nucleic acids" *Chem. Asian J.* **2011**, in press (DOI: 10.1002/asia.201100490). (IF2010 = 4.188) (เป็น output จากโครงการย่อย 1)
6. Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. "3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic acid as versatile handle for internal labeling of pyrrolidinyl PNA" *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 6465–6469. (IF2010 = 2.661) (เป็น output จากโครงการย่อย 1 ร่วมกับผลงานจากทุนวิจัยหลังปริญญาเอกของ ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม)
7. Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M. "Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle" *J. Nanoparticle Research*, in press (DOI: 10.1007/s11051-011-0592-8). (IF2010 = 3.253) (เป็น output จากโครงการย่อย 4)
8. Rashatasakhon, P.; Vongnam, K.; Siripornnoppakhun, W.; Vilaivan, T.; Sukwattanasinitt, M. "FRET Detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationic phenylene-ethynylene dendrimer with DNA/PNA hybrid" *Talanta*, in press (DOI: 10.1016/j.talanta.2011.11.041). (IF2010 = 3.772) (เป็น output จากโครงการย่อย 2)



สัญญาเลขที่ RTA5280002

รายงานการประชุมประจำปีครั้งที่ 3
ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย ปี 2552

วันศุกร์ที่ 11 มกราคม 2556 เวลา 08:30 – 16:00
ณ ห้องสัมมนา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**โครงการ การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์
นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด**

**Synthesis, Properties and Applications of Conformationally Constrained
 β -PyrrolidinyI Peptide Nucleic Acids**

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

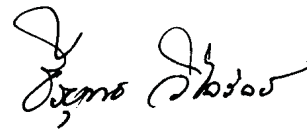
สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

คำนำ

โครงการ “การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้ไบโอฟิลิไดนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด” นี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ตามเงื่อนไขในสัญญาวิทยาทานจาก สกว. หัวหน้าโครงการจะต้องจัดการประชุมวิชาการประจำปี ประกอบกับขณะนี้งานได้ดำเนินการมาจนถึงสิ้นสุดโครงการแล้ว จึงเห็นควรที่จะจัดงานประชุมนี้ขึ้นเพื่อให้ผู้ร่วมโครงการได้มีโอกาสนำเสนอความก้าวหน้าของโครงการวิจัยร่วมกัน และแลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างกลุ่มวิจัย-สาขา และรับฟังข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิ อันจะทำให้เกิดการพัฒนางานวิจัยไปในทิศทางที่ดีขึ้น

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสถาบันต้นสังกัดของหัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการทุกท่าน รวมทั้งแหล่งทุนอื่นที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยแม้จะไม่ใช้ทางตรง ตลอดจนผู้ช่วยวิจัย และนักศึกษา ที่ทำให้โครงการดำเนินไปได้ด้วยดี มีผลงานที่มีคุณภาพสูงตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ นอกจากนี้ยังต้องขอขอบคุณคณะทำงานจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่จัดการประชุมและอำนวยความสะดวกอื่นๆ

อนึ่ง งานวิจัยนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ข้อมูลทั้งหมดนี้เป็นเพียงผลการศึกษาเบื้องต้นที่ยังไม่ได้ผ่านการประเมินอย่างเป็นทางการจากผู้เชี่ยวชาญ โปรดอย่านำไปเผยแพร่หรืออ้างอิงจนกว่าผลงานจะได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการแล้ว



รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

หัวหน้าโครงการ

กำหนดการประชุมทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) ครั้งที่ 3

โครงการ “การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

ที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด” (รหัสโครงการ: RTA5280002)

วันศุกร์ที่ 11 มกราคม 2556 เวลา 08:30 – 16:00

ณ ห้องสัมมนา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

08:30-09:00	ลงทะเบียน
09:00-09:15	กล่าวเปิดงานโดยคณบดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
09:15-09:45	สรุปภาพรวมของโครงการโดยหัวหน้าโครงการ (รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์)
09:45-10:15	O001: A sequential reductive alkylation-Click chemistry for site-specific labeling of PNA (อ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
10:15-11:00	อาหารว่างและ poster session
11:00-11:30	O002: Establishment of hemoglobin E lateral flow strip test by peptide nucleic acid: A preliminary study with human genomic DNA (อ.ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
11:30-12:00	O003: Paper-based lab-on-chip for optical detection of novel 2009 human influenza A virus (H1N1) based on β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid hybridization in colloidal of blue silver nanoplates (ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ช่อมพฤษ ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
12:00-13:00	รับประทานอาหารกลางวัน
13:00-13:30	O004: Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA (ผศ.ดร.บุญจิรา รัตนกรพิทักษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)
13:30-14:00	O005: Positively charged polymeric support for DNA sequence analysis using PNA probes: Success, failure, and opportunity (รศ.ดร. วรวิทย์ โฮვნ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
14:00-14:30	O006: Effect of DNA target length on a label-free capacitive DNA sensor based on poly-para-phenylenediamine modified pyrrolidinyl PNA probe (น.ส.อรรณพ ทิพย์มณี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
14:30-15:30	อาหารว่างและ poster session
15:30-16:30	ประชุมโต๊ะกลม (เฉพาะหัวหน้าโครงการย่อยและผู้ทรงคุณวุฒิ) และอาหารว่าง

O001: A sequential reductive alkylation-Click chemistry for site-specific labeling of PNA Boonsong Ditmangklo, <u>Chaturong Suparpprom</u> , Tirayut Vilaivan	1
O002: Establishment of hemoglobin E lateral flow strip test by peptide nucleic acid: A preliminary study with human genomic DNA <u>Amornpun Sereemasapun</u> , Teeradet Khomvarn	2
O003: Paper-based lab-on-chip for optical detection of novel 2009 human influenza A virus (H1N1) based on β -pyrrolidinyI peptide nucleic acid hybridization in colloidal of blue silver nanoplates <u>Piyasak Chaumpluk</u> , Tirayut Vilaivan, Sanong Ekgasit, Yong Poovorawan	3
O004: Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA Thapanapong Theppaleak, <u>Boonjira Rutnakornpituk</u> , Uthai Wichai, Tirayut Vilaivan, Metha Rutnakornpituk	4
O005: Positively charged polymeric support for DNA sequence analysis using PNA probes: Success, failure, and opportunity Jittima Meebungpraw, Nadda Booranabunyat, Kanya Taboonpong, Praethong S. Laopa, Tirayut Vilaivan, <u>Voravee P.Hoven</u>	5
O006: Effect of DNA target length on a label-free capacitive DNA sensor based on poly-para-phenylenediamine modified pyrrolidinyI PNA probe <u>Orawan Thipmanee</u> , Saluma Samanman, Supanee Sankoh, Apon Numnuam, Warakorn Limbut, Proespichaya Kanatharana, Tirayut Vilaivan, Panote Thavarungkul	6

บทความนำเสนอแบบโปสเตอร์	หน้า
P001: <i>Electrochemically active peptide nucleic acid probes</i> <u>Jutatip Kongpeth</u> , Sakda Jumpasa, Orawon Chailapakul, Tirayut Vilaivan (sub-project 1)	7
P002: <i>Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying 1-pyrenylethynyladenine (A^{PyE}) base</i> <u>Duangrat Nim-anussornkul</u> , Tirayut Vilaivan (sub-project 1)	8
P003: <i>Poly(ethylene glycol)-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid</i> <u>Thanesuan Nuanyai</u> , Tirayut Vilaivan (sub-project 1)	9
P004: <i>Synthesis and optical properties of Nile blueBlue- and Nile Red-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acids</i> <u>Chayan Charoenpakdee</u> , Pawinee Wathanathavorn, Nattawut Yotapan, Tirayut Vilaivan (sub-project 1)	10
P005: <i>Cytocompatibility and cellular uptake of blackberry-like particles assembled from fluorescent-labeled quaternized chitosan</i> <u>Kanya Taboonpong</u> , Naunpun Sangphech, Tanapat Palaga, Tirayut Vilaivan, Voravee P. Hoven (sub-project 3)	11
P006: <i>Functional polymer-stabilized gold nanoparticles: Preparation and peptide nucleic acid immobilization</i> <u>Pornpen Sae-ung</u> , Gamolwan Tumcharern, Tirayut Vilaivan, Voravee P. Hoven (sub-project 3)	12
P007: <i>Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle</i> <u>Boonjira Rutnakornpituk</u> , Uthai Wichai, Tirayut Vilaivan and Metha Rutnakornpituk (sub-project 4)	13
P008: <i>A comparative study of a label-free capacitive DNA sensor based on non-conducting polymers modified pyrrolidinyl PNA probe</i> <u>Supanee Sankoh</u> , Saluma Samanman, Orawan Thipmanee, Apon Numnuam, Warakorn Limbut, Proespichaya Kanatharana, Tirayut Vilaivan, Panote Thavarungkul (sub-project 5)	14
P009: <i>Postharvest non-destructive determination of fruits: A model on fruit maturity assay via biosensor based on colorimetric change of gold nanoparticles</i> <u>Piyasak Chaumpluk</u> , Peerasak Chaiprasart, Tirayut Vilaivan (sub-project 6)	15

O001: A sequential reductive alkylation-Click chemistry for site-specific labeling of PNA

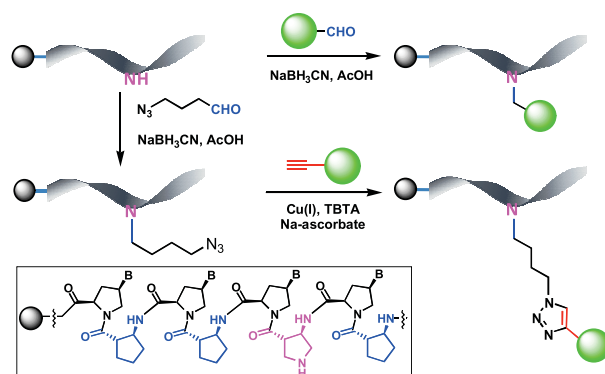
Boonsong Ditmangklo,¹ Chaturong Suparpprom,¹ Tirayut Vilaivan^{2,*}

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

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

Abstract: A general strategy for site-specific labeling of pyrrolidinyl PNA with D-prolyl/2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) was developed. The acpcPNA was first modified by replacement of the (1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpc) linker with *N*-trifluoroacetyl (Tfa)-protected (3*R*,4*S*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (apc) linker. After selective deprotection of the *N*-Tfa group, various labels including those containing reactive functional groups like protected amino, alkynes and azides could be post-synthetically introduced *via* reductive alkylation. Subsequent secondary modification by Click reaction with azide- or alkyne-containing labels allowed efficient incorporation of various dyes including pyrene and thiazole orange to the acpcPNA backbone. The internally-labeled acpcPNA are useful as probes that can yield fluorescence change upon binding to specific DNA targets.



Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: Nov 2012 (under review)

O002: Establishment of hemoglobin E lateral flow strip test by peptide nucleic acid: A preliminary study with human genomic DNA

Amornpun Sereemaspun* and Teeradet Khomvarn

Nanobiomedicine Laboratory, Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Patumwan District, Bangkok 10330

*E-mail: amornpun.s@chula.ac.th

Abstract: Hemoglobin E disease is the most common β -structural hemoglobin variant that is constituted for 13 % of Thai population. Interestingly, around 50-60 % of β -Thalassemia/Hb E was found in the northeast of Thailand. To date, the screening test for β -Thalassemia/Hb E is the detection of hemoglobin precipitation, but this assay is time-consuming and requires skilled person to interpret results. In addition, the temperature may affect the test that has very fragile erythrocyte and may lead to the false-positive results. The objective of this study is to develop a nucleic acid lateral flow strip test that uses peptide nucleic acid (PNA) probes for sandwich hybridization. Preliminary results with synthetic DNA that have been made as a placebo to the genomic DNA of the patients show that PNA probes have high-specificity and is capable to get results within 30 minutes. For further clinical applications in the near future, interesting data of PNA-based nucleic lateral flow strip test with human genomic DNA would be presented. In vitro alternative assay for enhancing the sensitivity and specificity of this test strip would be discussed.

Publication status

[] Published

[x] To be published

Proposed submission date: N/A

O003: Paper-based lab-on-chip for optical detection of novel 2009 human influenza A virus (H1N1) based on β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid hybridization in colloidal of blue silver nanoplates

Piyasak Chaumpluk,^{1*} Tirayut Vilaivan,² Sanong Ekgasit,² Yong Poovorawan³

¹Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

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

³Center of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

*E-mail: piyasakcha@yahoo.com

Abstract: A novel, low cost, and highly sensitive paper-based lab-on-chip optical sensor for the detection of a target DNA via nucleic acid hybridization probe using blue colloidal silver nanoplates (AgNPLs) as the colorimetric indicator was developed. The single unit chip was fabricated on Whatman filter paper using plastic lamination. It has 2.5x3 cm² dimension and divided into 2 parts, one for nucleic acid amplification and the other for signal detection. Novel human influenza virus H1N1 assay was by viral specific HA gene amplification in an amplification part via isothermal reverse transcription loop mediated DNA amplification platform using primer set specific to 6 areas of the gene. Further DNA signals detection, at signal detection part, was based on AgNPLs exhibiting blue-colored surface plasmon resonance and turning colorless upon aggregation. This related with target nucleic acid hybridization but not non target one with β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid forming no color changes. Assay had a limit of detection at 10 copies of target HA gene with high specificity against other types of infectious viruses. It spent only one hour to complete all detection processes and could be visually observed with naked eye.

Publication status

[] Published

[x] To be published

Proposed submission date: Dec 2012

O004: Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA

Thapanapong Theppaleak¹, Boonjira Rutnakornpituk¹, Uthai Wichai¹, Tirayut Vilaivan² and Metha Rutnakornpituk^{1,*}

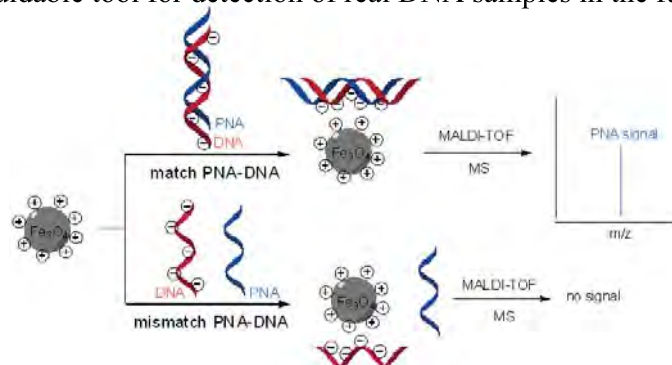
¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: methar@nu.ac.th

Abstract: We here report the surface modification of magnetite nanoparticle (MNP) with the copolymer of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA) and diethylamino ethyl methacrylate (DEAEMA) *via* atom transfer radical polymerization (ATRP) for use as a cationic nanosolid capture for detection of DNA sequence using PNA probe. Molar ratio of the PEGMA:DEAEMA copolymer was systematically varied to obtain 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, respectively, to tune the positive charges on the particle surface after quaternization. Photo correlation spectroscopy (PCS) indicated an increase in degrees of positive charge of the particles after quaternization. Transmission electron microscopy (TEM) and PCS indicated an improvement in the particle dispersibility in water upon quaternization of the DEAEMA entities grafted on the particle surface.

Application of the (co)polymer-grafted MNP as a cationic support for detection of DNA sequences with the use of acpc-PNA as a probe was investigated using ion exchange capture strategy. The particles coated with 50:50 and 100:0 molar ratio of PEGMA:DEAEMA copolymers were used in this study to represent those with different degrees of surface charges (27 and 33 mV, respectively). Fluorescence spectroscopy revealed that the binding capability of the particles to DNA tagged with fluorescein at 5'-position (FAM-dA₉) was 88 and 171 nmole nucleotide/g MNP, respectively. PNA signals of PNA-DNA hybrids adsorbed on the cationic MNP were examined by the matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. It was found that minimum detectable quantity of PNA-DNA hybrids adsorbed on the particle was 70 pmole in both samples. Two DNA sequences including the sequence stimulating to C-methylation cancer cells and Kirsten Rat Sarcoma (*K-ras*) gene were used in this study. The samples can differentiate between full match and single-base mismatch targeting DNA sequences using both single and double PNA probes. This polymer-grafted MNP might be applicable for use as a magnetically guidable tool for detection of real DNA samples in the future.



Publication status

[] Published - Citation information:

[×] To be published

Proposed submission date: Submitted to Journal of Biomedical Nanotechnology

O005: Positively charged polymeric support for DNA sequence analysis using PNA probes: Success, failure, and opportunity

Jittima Meebungpraw¹, Nadda Booranabunyat¹, Kanya Taboonpong¹, Praethong S. Laopa², Tirayut Vilaivan³, Voravee P.Hoven^{3,*}

¹ Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

² Program in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

³ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: Taking advantage of the charge difference between peptide nucleic acid (PNA), a DNA analog, having an uncharged peptide-like backbone and DNA having negatively charged sugar-phosphate backbone, this research aimed to develop positively charged polymeric platforms that are capable of capturing PNA which acts as a probe only when it is hybridized with its complementary DNA. DNA sequence in the duplex captured by the positively charged polymeric platforms was then identified by non-labeling techniques. The first platform is based on quaternized chitosan particles obtained by ionic crosslinking of chitosan followed by heterogeneous methylation. Using the conformationally rigid pyrrolidinyI PNA derived from D-prolyl-2-aminocyclopentane-carboxylic acid (acpc) backbones (acpcPNA) as a probe, a synthetic 14-mer, mixed base DNA of which sequence mimics mutant *K-ras* DNA, a mutated region associated with cancer, can be detected at 10 pmol level by MALDI-TOF mass spectrometry employing the quaternized chitosan particles as anion exchange captures. Quaternized chitosan particles can also be prepared by an alternative method based on self-assembly of amphiphilic chitosan. The self-assembled particles, however, failed to serve as effective anion exchange captures for DNA analysis. Nonetheless, it has been later discovered that one of the synthesized amphiphilic chitosan having pyrene as hydrophobic entity yielded fluorescent-labeled particles with unique blackberry-like morphology which are quite stable in broad pH and temperature ranges and exhibit a number of desirable characteristics that may be applicable for bioimaging. The second platform, on the other hand, was developed from filter paper functionalized with quaternized poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (QPDMAEMA) brushes. It showed superior performance to commercially available membranes, Nylon 66 and nitrocellulose, for DNA sequence detection following a Dot blot format employing biotinylated acpcPNA probe and the 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. It is our ongoing effort to determine the possibility of improving detection limit by using electrochemical detection based on the same capturing strategy.

Publication status

[] Published

[] To be published

Proposed submission date: N/A

O006: Effect of DNA target length on a label-free capacitive DNA sensor based on poly-*para*-phenylenediamine modified pyrrolidinyl PNA probe

Orawan Thipmanee^{1,2,3}, Saluma Samanman^{1,2,3}, Supanee Sankoh^{1,2,3}, Apon Numnuam^{1,2,3}, Warakorn Limbut^{1,2,4}, Proespichaya Kanatharana^{1,2,3}, Tirayut Vilaivan⁵ and Panote Thavarungkul^{1,2,6,*}

¹ Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

² Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁴ Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁵ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

⁶ Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

*E-mail address: panote.t@psu.ac.th

Abstract: The influence of the DNA target length on the sensitivity of a label-free capacitive DNA sensor using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) probe with 11 mixed bases was studied. A C-terminal lysine-modified acpcPNA probe was immobilized through a thin film of a non-conducting polymer, poly-*para*-phenylenediamine (PpPD). The hybridization between the acpcPNA probes and the target DNAs was directly measured using the capacitive system. Four DNA targets with different length (11, 41, 61 and 65 bases) were investigated. The DNA target with the longest overhang on the electrode surface gave the highest sensitivity. Under the optimized conditions, the immobilized acpcPNA probes provided a wide linear range for DNA detection (1.0×10^{-12} to 1.0×10^{-8} M) with a very low detection limit in the picomolar range. The modified acpcPNA electrode could be reused through at least 85 cycles. The high sensitivity and very low detection limits are potentially useful for the analysis of ultra-trace levels of DNA in the samples.

Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: N/A

P001: Electrochemically active peptide nucleic acid probes

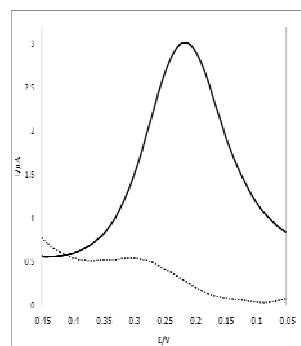
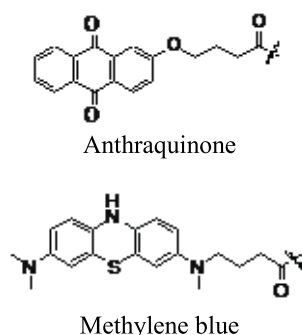
Jutatip Kongpeth,¹ Sakda Jumpasa,² Orawon Chailapakul,² Tirayut Vilaivan^{1,*}

¹ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

² Electrochemical Analysis Research Unit, Department of Petrochemical and polymer science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

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

Abstract: Electrochemical detection offers a rapid, sensitive and inexpensive mean for DNA sensing applications. This work aims to develop electrochemically active pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) probes for electrochemical detection of DNA sequence. To enable electrochemical detection, the acpcPNA was first labeled with a redox active label such as methylene blue (MB) or anthraquinone (2-AQ) at the *N*-termini via acylation with the carboxyl-containing label. The 2-AQ- and MB-labeled acpcPNA with a T₉ sequence when hybridized with complementary DNA (dA₉) shows an increased in melting temperature (*T*_m) by 4.3–5.6 °C compared to unlabeled acpcPNA. The results can be explained by π - π interaction between the redox active unit and the terminal base pairs. Hybridization with single mismatched DNA decreases the *T*_m by 26–28 °C, suggesting the high specificity of the DNA hybridization. The labeled acpcPNAs were next studied by square-wave voltammetric (SWV) method, which yield the signals at –0.70 (2-AQ) and –0.24 (MB) V respectively. The signals decreased dramatically (to less than 10% of the original values) after adding complementary DNA, thus validating the concept of using redox active PNA as a probe for electrochemical detection of DNA sequence.



CVs of MB labeled acpcPNA before (black curve) and after (gray curve) hybridized with complementary DNA in phosphate buffer pH 7.4

Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: More studies are required before publication.

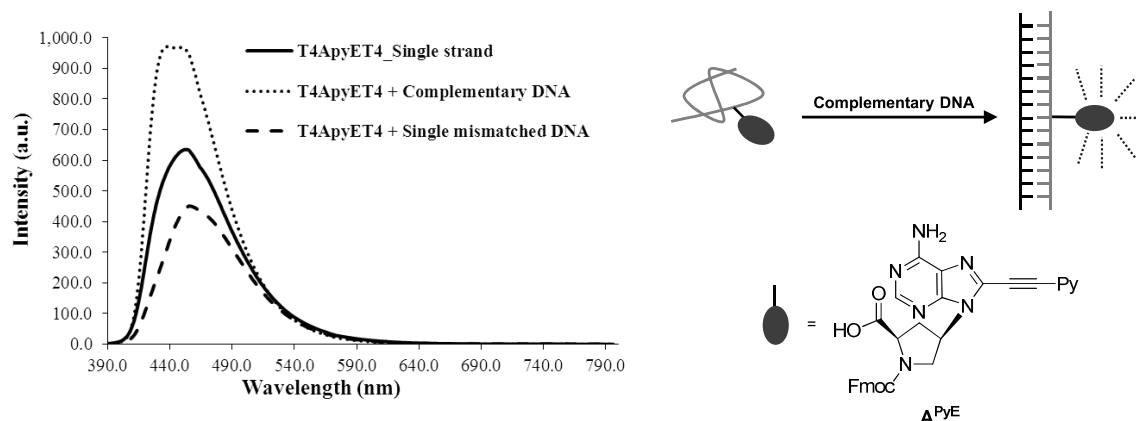
P002: Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying 1-pyrenylethynyladenine (A^{PyE}) base

Duangrat Nim-anussornkul, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: Pyrene-modified DNA and its analogues are useful hybridization-responsive fluorescence probes for DNA or RNA sequence determinations. DNA probes carrying pyrenylethynyl-labeled adenine (A^{PyE}) possess interesting optical properties, although their base-pairing do not strictly follow Watson-Crick base pairing rules. In this work, the A^{PyE} base was incorporated into pyrrolidinyl peptide nucleic acid bearing proline/2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA). The A^{PyE} acpcPNA monomer was synthesized *via* Sonogashira coupling reaction between the corresponding 8-bromo-adenine acpcPNA monomer and 1-ethynylpyrene. A model acpcPNA carrying the A^{PyE} base, $T^4A^{PyE}T^4$, showed the specific recognition between the base A^{PyE} in acpcPNA and the base T in DNA according to UV melting analyses. Most importantly, the fluorescence of A^{PyE} was increased by 1.6 folds upon pairing with complementary DNA. On the other hand, the fluorescence signal was decreased by 0.7–0.9 fold in the presence of single-base mismatched DNA. These results showed that the acpcPNA containing A^{PyE} is potentially useful as a fluorescent DNA probe.



Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: More studies are required before publication.

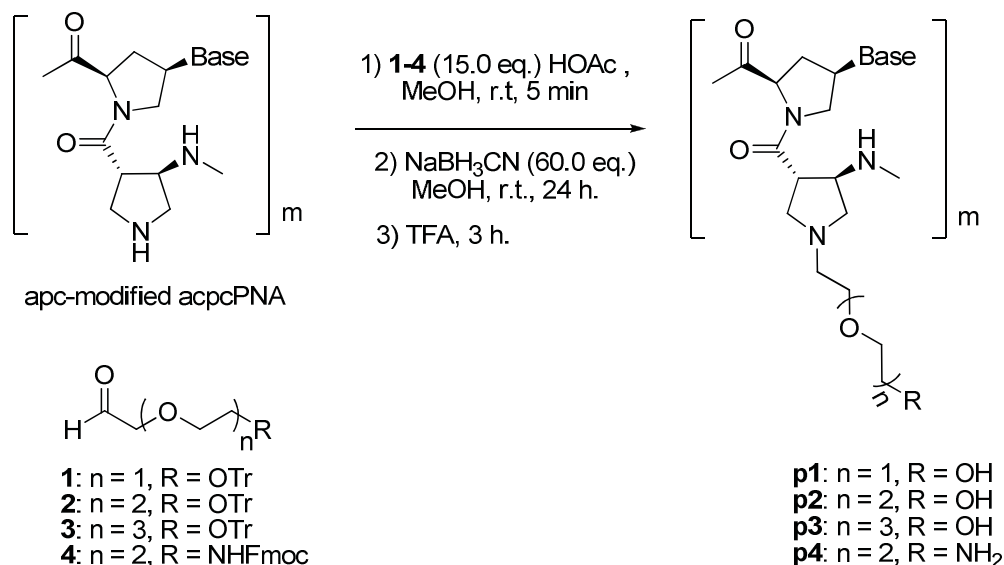
P003: Poly(ethylene glycol)-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid

Thanesuan Nuanyai, Tirayut Vilaivan*

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

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

Abstract: One of the problems associated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid (apcPNA) system previously developed by our group was hydrophobicity. Thus, apcPNA has limited aqueous solubility and showed significant non-specific interactions with non-polar molecule such as pyrene and other non-polar dyes. To overcome the problem, the apcPNA backbone was modified by poly(ethylene glycol) derivatives with different numbers of repeating unit (1–3) and end groups (OH, NH₂). *N*-Fmoc-amino poly(ethylene glycol) and *O*-trityl-poly(ethylene glycol) were prepared from di-, tri- and tetra-ethylene glycol by selective modification of one end of the molecules. IBX oxidation of the mono-alcohols afforded aldehyde derivatives of poly(ethylene glycol). Reductive alkylation of apcPNA with these aldehydes gave poly(ethylene glycol)-modified apcPNA. The modified apcPNA with hydroxy substitution gave slightly lowered *T_m* with complementary DNA when compared with unmodified apcPNA. On the other hand, an increase in *T_m* was observed with modified apcPNA carrying amino-substitution. This can be explained by the electrostatic interaction between the amino-modifier and the negatively-charged DNA backbone.



Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: More studies are required before publication.

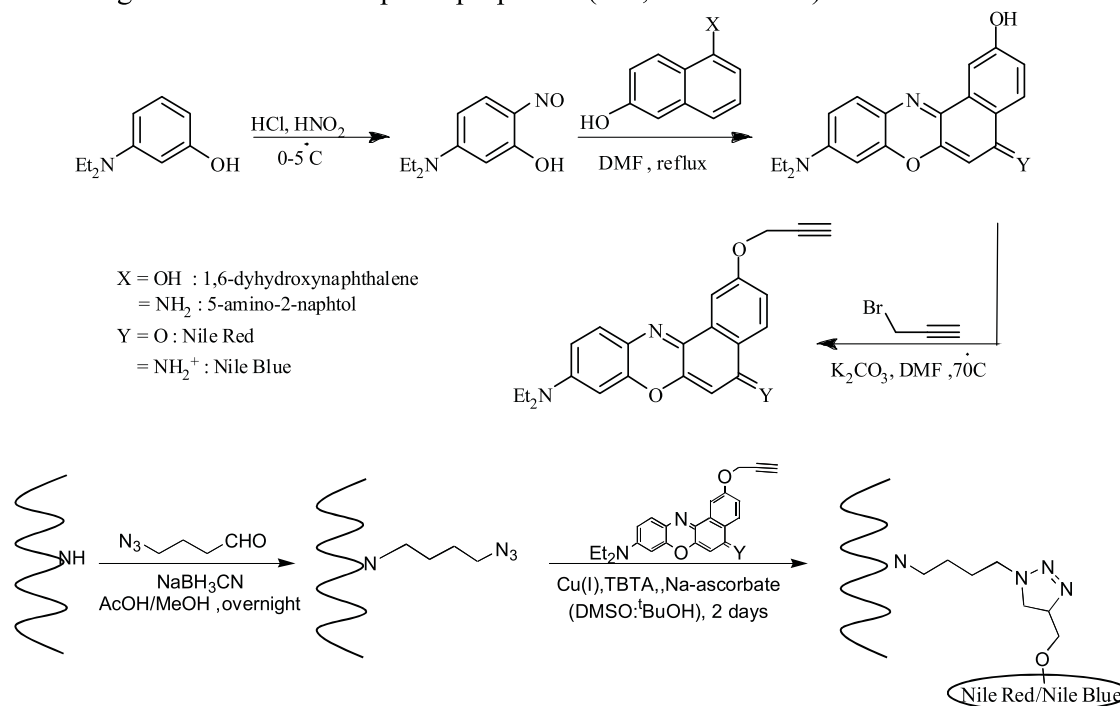
P004: Synthesis and optical properties of Nile blue- and Nile red-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acids

Chayan Charoenpakdee, Pawinee Wathanathavorn, Nattawut Yotapan, Tirayut Vilaivan

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

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

Abstract: Nile Blue and Nile Red are members of phenoxazine dyes. Their emission wavelengths and intensities are known to be sensitive to environments such as solvent polarity. In this study, we propose to modify pyrrolidinyl peptide nucleic acid with propyl/2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) with Nile Blue and Nile Red, with the aim to develop fluorescence acpcPNA probes whose fluorescence properties are responsive to the presence or absence of the correct DNA target. To achieve this goal, we synthesized two new propargylated Nile Blue and Nile Red derivatives, and demonstrated their successful attachment *via* Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) (also known as Click chemistry) onto the backbone of acpcPNA previously modified with azidobutyl functional group. Successful introduction of the dyes onto the acpcPNA backbone was confirmed by MALDI-TOF MS. The ability of the labeled acpcPNAs to recognize their DNA targets as well as their optical properties (UV, fluorescence) will be next studied.



Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: More studies are required before publication

P005: Cytocompatibility and cellular uptake of blackberry-like particles assembled from fluorescent-labeled quaternized chitosan

Kanya Taboonpong^{1,2}, Naunpun Sangphech³, Tanapat Palaga³, Tirayut Vilaivan⁴, Voravee P. Hoven^{4,*}

¹Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

²Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

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

⁴Organic Synthesis Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: Upon self-assembly of amphiphilic chitosan having N-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)]propyl (HTAP) as hydrophilic entities and ethynylpyrene (fluorescent dye) as hydrophobic entities, fluorescent-labeled quaternized chitosan (Pyr-CS-HTAP) particles can be formed. The functionality of the quaternized chitosan particles were verified by FT-IR and NMR spectroscopy. According to SEM analysis, the particles had a size range of 1-2 μm with blackberry-like morphology. And the particles exhibited positive charges with a zeta-potential of +40 mV as determined by PCS. The particles had bright green fluorescence and were stable in a broad pH and temperature range. The cytotoxicity test revealed that the particles were biocompatible with Macrophage cells (RAW 264.7 cells). Moreover, cellular uptake of the particles by the cells can be determined by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and flow cytometry techniques. The results showed that approximately 42% of cellular uptake was observed after 1 h incubation. It has also been found that the aggregation of the particles has a strong impact on the extent of cellular uptake. These fluorescent-labeled quaternized chitosan particles possess a number of desirable features that may be used for bioimaging application.

Publication status

[] Published

[x] To be published

Proposed submission date: March 2013

P006: Functional polymer-stabilized gold nanoparticles: Preparation and peptide nucleic acid immobilization

Pornpen Sae-ung¹, Gamolwan Tumcharern², Tirayut Vilaivan³, Voravee P. Hoven^{3*}

¹Program in Macromolecular Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

²National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

³Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

*E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

Abstract: Poly(methacrylic acid)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMAMPC) which can provide binding site and protein-repellent property was prepared via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) polymerization and grafted onto citrate-stabilized gold nanoparticles (citrate-AuNPs) to obtain functionalizable AuNPs having anti-fouling characteristic. Optical property, size, and morphology of PMAMPC-stabilized AuNPs (PMAMPC-AuNPs) were evaluated by UV-vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) technique and transmission electron microscopy (TEM). The presence of PMAMPC around the AuNPs was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). PMAMPC-AuNPs were highly stable because of both electrostatic and steric stabilizations of the polymeric shell. Then, fluorescein-labeled peptide nucleic acid (PNA-flu) was immobilized to carboxyl groups of PMAMPC on PMAMPC-AuNPs via EDC/NHS coupling chemistry. Effects of PMAMPC molecular weight, surfactant (Tween-80) concentration on PNA-flu immobilization was determined. The amount of immobilized PNA-flu as evaluated by fluorescence spectroscopy after KCN digestion was found to be 2.72×10^{13} probe/cm². This value is two times higher than that (1.28×10^{13} probe/cm²) obtained via a direct PNA immobilization by self-assembly monolayer (SAM) formation of PNA-terminated thiol compound. This discovery strongly suggests that the 3-D structure of the polymeric shell can provide greater probe binding capacity than the 2-D SAM system. It is anticipated that this new polymer-stabilized AuNPs can potentially be developed into effective PNA-based DNA biosensor.

Publication status

[] Published

[×] To be published

Proposed submission date: September 2013

P007: Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle

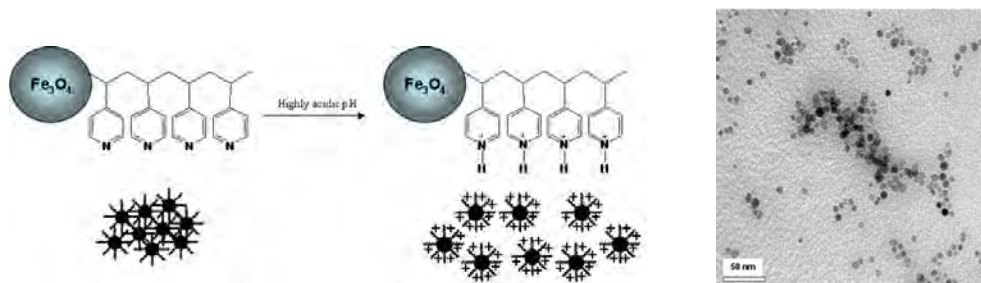
Boonjira Rutnakornpituk¹, Uthai Wichai¹, Tirayut Vilaivan² and Metha Rutnakornpituk^{1*}

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

²Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330

*E-mail: methar@nu.ac.th

Abstract: Surface modification of magnetite nanoparticles (MNP) with a covalently bonded poly(4-vinylpyridine) (P4VP) by surface initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) is reported herein. MNP was first prepared *via* thermal decomposition of Fe(acac)₃ and grafted with an ATRP initiator on its surface. ATRP of 4-vinylpyridine was then initiated from the MNP surface in the presence of CuBr/PMDETA (1,1,4,7,7-pentamethyldiethylenetriamine) catalytic complex in dioxane. FTIR in combination with photocalibration spectroscopy (PCS), thermogravimetric analysis (TGA) and vibrating sample magnetometry (VSM) techniques indicated the growth of P4VP on the particle surface with increasing the ATRP reaction time. Transmission electron microscopy (TEM) disclosed that the average particle size was 8 nm in diameter with some nanoaggregation observed. From PCS results, decreasing the solution pH enhanced the particle dispersibility due to the positive charge repulsion of the protonated P4VP on the particle surface. TGA was also performed to elucidate the composition of P4VP shell and magnetite core in the hybrid material.



A proposed mechanism for nanoparticle stabilization and a TEM image of the particles

Publication status

[×] Published

Citation information: B. Rutnakornpituk, U. Wichai, T. Vilaivan and M.

Rutnakornpituk, Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle, *Journal of Nanoparticle Research* **2011**, 13, 6847-6857. (Impact factor (2010) = 3.25). DOI 10.1007/s11051-011-0592-8

[] To be published

P008: A comparative study of a label-free capacitive DNA sensor based on non-conducting polymers modified pyrrolidiny PNA probe

Supanee Sankoh^{1,2,3}, Saluma Samanman^{1,2,3}, Orawan Thipmanee^{1,2,3}, Apon Numnuam^{1,2,3}, Warakorn Limbut^{1,2,4}, Proespichaya Kanatharana^{1,2,3}, Tirayut Vilaivan⁵ and Panote Thavarungkul^{1,2,6,*}

¹ Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

² Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁴ Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁵ Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

⁶ Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

*E-mail: panote.t@psu.ac.th

Abstract: This work reported a comparative study on the performances of a label-free capacitive DNA sensor using pyrrolidiny peptide nucleic acid with D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) immobilized on three non-conducting polymers. Two phenylenediamine (PD) isomers (ortho- and para-) and one tyramine monomer were electropolymerized to form polymer films. The hybridization between the target DNA and the immobilized acpcPNA probe was detected by capacitance measurement. Under the optimal electropolymerized conditions, the highest sensitivity of $20.9 \pm 0.6 \text{ nF cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ was obtained from poly-*para*-PD (PpPD) with the lowest detection limit of 0.2 pM. A wide linear range, 1.0×10^{-12} – 1.0×10^{-8} M, was obtained for both the PpPD and polytyramine (Pty). A narrower linear range of 1.0×10^{-11} – 1.0×10^{-8} M was obtained from poly-*ortho*-PD (PoPD). The surface morphology of polymer film 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, indicating its high specificity. The electrodes can be reused for at least 68 analytical cycles and this helps to reduce the analysis costs.

Publication status

[×] Published

Citation information: Sankoh, S.; Samanman, S.; Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. A "A comparative study of a label-free DNA capacitive sensor using a pyrrolidiny peptide nucleic acid probe immobilized through polyphenylenediamine and polytyramine non-conducting polymers" *Sens. Actuators B: Chem.* **2013**, 177, 543–554.

[] To be published:

P009: Postharvest non-destructive determination of fruits: A model on fruit maturity assay via biosensor based on colorimetric change of gold nanoparticles

Piyasak Chaumpluk,^{1*} Peerasak Chaiprasart,^{2*} Tirayut Vilaivan³

¹ Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² Postharvest Innovation Center, Faculty of Agriculture, Natural Resource and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand

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

*E-mail: piyasakcha@yahoo.com

Abstract: New approach for non-destructive fruit maturity determination using pineapple as a model had been established. The assay was based on expression patterns of the putative sucrose transporter (*AcSUT1*) in crown leaves during the course of physiological maturity that could be employed as an index marker for fruit maturity. Determination of *AcSUT1* cDNA was initially designed using isothermal cDNA amplification and the DNA signal detection via biosensor based on colorimetric platform with gold colloid nanoparticles, 20 nm in diameter. In the immature fruit, the *AcSUT1* gene was expressed allowing target DNA amplification to occur. DNA signals detection in later step was based on plasmon phenomena of gold nanoparticles. Presence of target DNA affected gold colloid nanoparticles in term of non aggregation with no colour change (still ruby red). However, in the mature fruit, the expression of the *AcSUT1* gene was terminated resulting in no target cDNA product amplification. When this was tested with gold colloid nanoparticles, it induced aggregation of particles which in turn resulted in a plasmonic change of colloid solution from ruby red to dark purple, visible by naked eye. All processes from RNA extraction to cDNA signal detection could be completed within 80 min without the need for a thermocycler as normally employed during RT-PCR. The developed assay demonstrated the integration of the novel DNA biosensor approach for a non-destructive determination of fruit quality.

Publication status

[x] Published

Citation information: *Acta Horticulturae* 945:205–211.*

[] To be published

* indexed in AgBiotech News and Information; AGRICOLA; CAB Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Forestry Abstracts; SCOPUS.

ภาคผนวก 1: ผลงานตีพิมพ์ของโครงการ (ข้อมูลถึง 8 มกราคม 2556)

1. Taechalertpaisarn, J.; Sriwarom, P.; Boonlua, C.; Yotapan, N.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T. "DNA-, RNA- and self-pairing properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids with (2'*R*,4'*S*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone" *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5822–5826.
2. Ananthanawat, C.; Hoven, V. P.; Vilaivan, T.; Su, X. D. "Surface Plasmon Resonance Study of PNA Interactions with Double Stranded DNA" *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 1918–1923.
3. Ngamwiriawong, P.; Vilaivan, T. "Synthesis and nucleic acids binding properties of diastomeric aminoethylprolyl peptide nucleic acids (aepPNA)" *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* **2011**, 30, 97–112.
4. Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β -peptide backbone: A conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties" *Artificial DNA: PNA and XNA* **2011**, 2, 50–59.
5. Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. "5-Pyren-1-yl uracil as a base discriminating fluorophore in pyrrolidinyl peptide nucleic acids" *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 3251–3259.
6. Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. "3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic acid as versatile handle for internal labeling of pyrrolidinyl PNA" *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 6465–6469.
7. Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M. "Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly(4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle" *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 6847–6857.
8. Rashatasakhon, P.; Vongnam, K.; Siripornnoppakhun, W.; Vilaivan, T.; Sukwattanasinitt, M. "FRET Detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationic phenylene-ethynylene dendrimer with DNA/PNA hybrid" *Talanta*, **2012**, 88, 593–598.
9. Yuanboonlim, W.; Siripornnoppakhun, W.; Rashatasakhon, P.; Vilaivan, T.; Sukwattanasinitt, M. "Phenylene-ethynylene trication as an efficient fluorescent signal transducer in an aptasensor for potassium ion" *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 12, 17–22.
10. Virakul, S.; Kupatawintu, P.; Nakkuntod, J.; Kangwanshiratada, O.; Vilaivan, T.; Hirankarn, N. "A Nested Sequence Specific Primer-Polymerase Chain Reaction for the detection of HLA-B*15:02" *Tissue Antigens* **2012**, 79, 295–301.

11. Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, A.; Aitken, D.; Vilaivan, T. "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid homologues: Effect of ring size on hybridization properties" *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440–1443.
12. Mansawat, W.; Boonlua, C.; Siri Wong, K.; Vilaivan, T. "Clicked polycyclic aromatic hydrocarbon as a hybridization-responsive fluorescent artificial nucleobase in pyrrolidinyl peptide nucleic acids" *Tetrahedron*. **2012**, *68*, 3988–3995.
13. Thipmanee, O.; Samanman, S.; Sankoh, S.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. "Label-free capacitive DNA sensor using immobilized PNA probe: Effect of the length and terminated head group of blocking thiols" *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 430–435.
14. Sezi, S.; Varghese, R.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. "Conformational control of dual emission by pyrrolidinyl PNA–DNA hybrids" *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 173–176.
15. Siripornnoppakhun, W.; Niamnont, N.; Krumsri, A.; Tumcharern, G.; Vilaivan, T.; Rashatasakhon, P.; Thayumanavan, S.; Sukwattanasinitt, M. "Inclusion complexes between amphiphilic phenyleneethynylene fluorophores and cyclodextrins in aqueous media" *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12268–12274.
16. Laopa, P.S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. "Positively charged polymer brushes-functionalized filter paper for DNA sequence determination following Dot Blot hybridization employing pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe" *Analyst* **2013**, *138*, 269–277.
17. Janrungroatsakul, W.; Vilaivan, T.; Vilaivan, C.; Watchasit, S.; Suksai, C.; Ngeontae, W.; Aeungmaitrepirom, W.; Tuntulani, T. "New calix[4]arene derivatives as ionophores in polymeric membrane electrodes for Ag(I): Comparative selectivity studies and detection of DNA hybridization" *Talanta* **2013**, *105*, 1–7.
18. Sankoh, S.; Samanman, S.; Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. "Ultra trace label-free DNA sensor using immobilized pyrrolidinyl PNA on non-conducting polymer based on capacitive system" *Sens. Actuator B*. **2013**, *177*, 543–554.

ภาคผนวก 2: รายนามของนักวิจัยผู้ร่วมโครงการ

1. รศ.ดร.ธีรยุทธ วิลาลัย (Assoc. Prof. Dr. Tirayut Vilaivan) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022187627 ext 101 E-mail vtirayut@chula.ac.th	หัวหน้าโครงการ
2. อ.ดร.จตุรงค์ สุภาพร้อม (Dr. Chaturong Suparpprom) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055963462 E-mail chaturongs@nu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 1
3. อ.ดร.ชอลัดดา ศรีสุวรรณเกศ (Dr. Choladda Srisuwannaket) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี โทรศัพท์ 024709556 E-mail choladda.sri@kmutt.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 1
4. รศ.ดร.มงคล สุขวัฒนสินธุ์ (Assoc. Prof. Dr. Mongkol Sukwattanasitt) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022187620 E-mail smongkol@chula.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 2
5. รศ.ดร.วรวิทย์ โยเวน (Assoc. Prof. Dr. Voravee Hoven) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022187627 ext 102 E-mail vipavee.p@chula.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 3
6. รศ.ดร.เมธา รัตนกรพิทักษ์ (Assoc. Prof. Dr. Metha Rutnakompituk) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055963464 E-mail methar@nu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 4
7. อ.ดร.บุญจิรา บุญทา (Dr. Boonjira Boontha) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055963466 E-mail b_boonjira@hotmail.com	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 4
8. อ.ดร.อุทัย วิชัย (Dr. Uthai Wichai) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055963466 E-mail uthaiw@nu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 4
9. รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร (Assoc. Prof. Dr. Panote Thavarungkul) สังกัด ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทรศัพท์ 074288753 E-mail panote.t@psu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 5
10. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา (Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทรศัพท์ 074288420 E-mail proespichaya.k@psu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 5
11. อ.ดร.วารากร ลิ้มบุตร (Dr. Warakorn Limbut) สังกัด ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทรศัพท์ 074288563 E-mail warakorn.l@psu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 5
12. อ.ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม (Dr. Apon Numnuam) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทรศัพท์ 074288457 E-mail apon.n@psu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 5
13. ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชะอุ่มพฤกษ์ (Assist. Prof. Dr. Piyasak Chaumpluk) สังกัด ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022185494 E-mail piyasakcha@gmail.com	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 6
14. รศ.พญ.ดร.ณัฐริยา หิรัญกาญจน์ (Assoc. Prof. Dr. Nattiya Hirankarn) สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022564132 E-mail fmednpt@md.chula.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 6
15. อ.นพ.ดร.อมรพันธ์ เสรีมาศพันธ์ (Dr. Amornpun Sereemasapun) สังกัด ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022564281 E-mail amornpun.s@chula.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 6
16. ผศ.ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาคร (Assist. Prof. Dr. Paitoon Rashtaskon) สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 022187620 E-mail paitoon.r@chula.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 2

ภาคผนวก 4

รายละเอียดทางวิชาการของโครงการย่อย 1-6

(เนื่องจากเอกสารมีความหนาแน่นมาก จึงไม่ได้ยัดรวมในเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์)

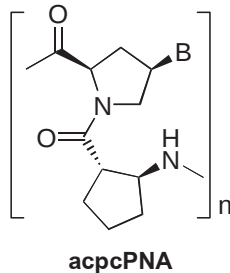
ผู้สนใจโปรดดูรายละเอียดในแผ่น CD)

Project 1: Conformationally restricted PNA: Synthesis and binding properties

หัวหน้าโครงการ ธีรยุทธ วิไลวัลย์

รายงานในช่วง 1 สิงหาคม 2552-31 กรกฎาคม 2556

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์หลักประการหนึ่งคือเพื่อศึกษาสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอระบบ (2*R*,4*R*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-ACPC-PNA (acpcPNA) (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่ได้จากการบุกเบิกของคณะผู้วิจัยเองโดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่อง พีเอ็นเอระบบดังกล่าวมีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ดีเทียบเท่ากับพีเอ็นเอของ Nielsen ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่มีการใช้งานอย่างกว้างขวางในงานวิจัยและการประยุกต์ใช้ด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเป็นส่วนประกอบของระบบหรืออุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม โดยสมบัติของ acpcPNA ที่ทราบอยู่แล้วอย่างละเอียดจะเป็นความแข็งแรง ความจำเพาะเจาะจง และทิศทางของการจับยึดกับดีเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ และมีผลการทดลองเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าพีเอ็นเอระบบนี้นอกจากจะจับกับดีเอ็นเอได้ดีแล้วยังแสดงสมบัติบางประการที่ไม่มีในพีเอ็นเอระบบอื่น เช่น การเลือกจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าอาร์เอ็นเอ และการที่มันไม่สามารถจับคู่กันเอง [Vilaivan and Srisuwannaket, 2006] แต่งานวิจัยที่ผ่านมายังทดลองในขอบเขตที่จำกัดเพียงไม่กี่ลำดับเบสเท่านั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้เพิ่มจำนวนพีเอ็นเอที่นำมาทดสอบให้มากขึ้น และศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของพีเอ็นเอ P1 ที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันในแง่ของการจับยึดกับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และกับตัวของมันเอง และศึกษาปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดที่เป็นลักษณะเฉพาะของพีเอ็นเอดังกล่าว



รูปที่ 1 โครงสร้างของพีเอ็นเอที่เป็นระบบที่ใช้ศึกษาหลักในงานวิจัยนี้

วัตถุประสงค์อีกประการหนึ่งของโครงการวิจัยนี้คือการศึกษาระบบพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัดระบบอื่นๆ ที่นอกเหนือจาก acpcPNA ที่ได้ศึกษาไปค่อนข้างมากแล้ว โดยงานวิจัยจะแบ่งออกเป็น การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA ที่มี modified base หรือ unnatural base และการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของพีเอ็นเอที่มี modified backbone ที่มาจากกรดเบต้าอะมิโนชนิดอื่น เช่น 3-, 4- หรือ 6-membered ring cyclic beta-amino acids โดยคาดหวังว่าจะพบพีเอ็นเอระบบอื่นเพิ่มเติมที่อาจแสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่แตกต่างจาก acpcPNA ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ประโยชน์ในวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน

1. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดของ acpcPNA ซึ่งเป็นระบบพีเอ็นเอดั้งเดิมที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาเป็นระยะเวลาหนึ่งตั้งก่อนรับทุนวิจัยนี้แล้ว โดยงานส่วนที่เพิ่มเติมคือการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีลำดับเบสที่หลากหลายมากขึ้น โดยให้มีความยาวเท่ากันคือ 10 เบส แต่มีสัดส่วนของเบส AT และ CG แตกต่างกัน (10mer1, 10mer2, 10mer3) เพื่อศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับอาร์เอ็นเอ เพื่อยืนยันผลการทดลองเบื้องต้นที่พบว่าพีเอ็นเอชนิดนี้มีความเลือกจำเพาะในการจับกับดีเอ็นเอมากกว่าอาร์เอ็นเอว่าจะยังคงเป็นจริงในลำดับเบสอื่นๆ อีกหรือไม่ นอกจากนี้ยังได้ออกแบบสายพีเอ็นเอให้มีลำดับ

เบสเป็นคู่สมกันทั้งในแบบแอนติพาราเรล (10mer1 vs 10mer4, 10mer2 vs 10mer6, 10mer3 vs 10mer8) และพาราเรล (10mer1 vs 10mer5, 10mer2 vs 10mer7, 10mer3 vs 10mer9) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการจับกันเองระหว่างพีเอ็นเอกับพีเอ็นเออีกด้วย ลำดับเบสและ m/z ของ acpcPNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Sequences and characterization data of PNA used in this study.

SequenceID	PNA sequence	m/z (calcd for $M \cdot H^+$)	m/z (found)
10mer1	GTAGATCACT	3556.7	3555.9
10mer2	GCTACGTCGC	3533.7	3533.9
10mer3	TATGTACTAT	3546.7	3546.9
10mer4	AGTGATCTAC	3556.7	3556.0
10mer5	CATCTAGTGA	3556.7	3556.5
10mer6	GCGACGTAGC	3582.7	3582.6
10mer7	CGATGCAGCG	3582.7	3582.6
10mer8	ATAGTACATA	3564.7	3564.6
10mer9	ATACATGATA	3564.7	3564.5

ตารางที่ 2 Orientation of binding between mixed base PNA and DNA

entry	PNA	T_m (antiparallel DNA) ($^{\circ}\text{C}$)		T_m (parallel DNA) ($^{\circ}\text{C}$)	
		0 mM NaCl	100 mM NaCl	0 mM NaCl	100 mM NaCl
1	10mer1	57.0	53.3	< 20	< 20
2	10mer2	60.4	54.5	< 20	< 20
3	10mer3	59.6	54.2	< 20	< 20
4	10mer4	57.2	52.8	< 20	< 20
5	10mer5	60.6	56.1	< 20	< 20
6	10mer6	65.2	60.8	< 20	< 20
7	10mer7	65.1	59.1	< 20	< 20
8	10mer8	65.5	61.0	< 20	< 20
9	10mer9	65.3	59.8	< 20	< 20

Conditions: 1 μM PNA, 1 μM DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 0 or 100 mM NaCl, heating rate 1.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. T_m values are accurate within $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

ในเบื้องต้นได้ศึกษาสมบัติการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอทุกลำดับเบสที่สังเคราะห์ขึ้นกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ทั้งในทิศทางแอนติพาราเรล และพาราเรล โดยใช้เทคนิค UV melting โดยตัวแปรที่จะนำมาเปรียบเทียบกันคือค่า T_m (melting temperature) ซึ่งวัดที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 1 μM เนื่องจากความแข็งแรงของการจับยึดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือบ้าง แม้จะไม่มากเท่ากับการจับยึดกันระหว่าง

ดีเอ็นเอกับดีเอ็นเออีกตาม ในการทดลองจึงทำที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน 2 ความเข้มข้นคือ 0 และ 100 mM NaCl ผลการทดลองที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 2

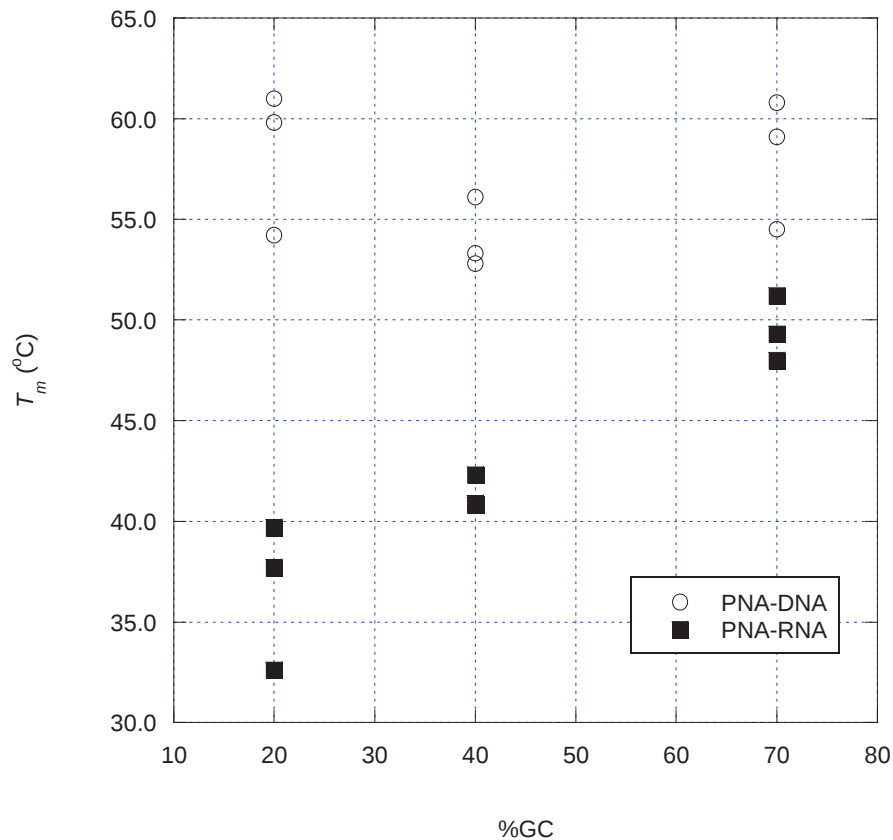
ตารางที่ 3 T_m of PNA-RNA hybrids

entry	PNA	%G·C content	T_m (antiparallel RNA) (°C)	T_m (parallel RNA) (°C)
1	10mer1	40	42.3	< 20
2	10mer2	70	48.0	32.9
3	10mer3	20	32.6	< 20
4	10mer4	40	40.8	N.D
5	10mer5	40	40.9	N.D
6	10mer6	70	49.3 (150)	30.2
7	10mer7	70	51.2 (150)	28.5
8	10mer8	20	39.7	N.D
9	10mer9	20	37.7	N.D

Conditions: 1 μ M PNA, 1 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, heating rate 1.0 °C/min. T_m values are accurate within ± 0.5 °C.

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าพีเอ็นเอทุกลำดับเบสที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้เฉพาะในทิศทางแอนติพาราเรลเท่านั้น โดยมีค่า T_m อยู่ในช่วง 57.0–65.3 °C ที่ 0 mM NaCl และ 52.8–61.0 °C ที่ 100 mM NaCl ส่วนในทิศทางการจับแบบพาราเรลไม่พบว่าการจับยึดกันระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (ไม่เกิดการ melt ซึ่งแสดงว่า T_m < 20 °C ในทุกกรณี) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าระบบ acpcPNA มีการเลือกจำเพาะต่อทิศทางการจับกับดีเอ็นเอในแบบแอนติพาราเรลที่สูงมากในทุกๆ ลำดับเบสที่นำมาทดสอบ

ในการทดลองต่อมาได้ศึกษาความสามารถในการจับยึดกับอาร์เอ็นเอ ทั้งในรูปแบบแอนติพาราเรล และพาราเรล (ตารางที่ 3) พบว่า การจับยึดระหว่างพีเอ็นเอกับอาร์เอ็นเอในรูปแบบแอนติพาราเรลมีค่า T_m อยู่ในช่วง 32.6–49.3 °C ซึ่งต่ำกว่าการจับกันระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบแอนติพาราเรลที่ภาวะเดียวกันในทุกกรณี (ช่วง T_m 52.8–61.0 °C) นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอ็นเอที่มี %GC content ค่อนข้างสูงสามารถจับกับอาร์เอ็นเอในทิศทางแบบพาราเรลได้ แม้จะได้โมเลกุลลูกผสมที่มีความเสถียรน้อยกว่าแบบแอนติพาราเรลก็ตาม (ดู entry 2, 6 และ 7)



รูปที่ 2 A plot showing relationship between G-C content and stability of PNA-DNA and PNA-RNA hybrids. Conditions: 1 μ M PNA, 1 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, heating rate 1.0 $^{\circ}$ C/min. T_m values are accurate within ± 0.5 $^{\circ}$ C.

เมื่อเปรียบเทียบค่า T_m ของโมเลกุลลูกผสมแบบแอนติพาราลระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอกับอาร์เอ็นเอ ที่สัดส่วนของ GC เบสแตกต่างกันจะพบแนวโน้มที่น่าสนใจดังแสดงในรูปที่ 2 กล่าวคือ ในกรณีของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ ค่า T_m จะค่อนข้างคงที่ โดยไม่ขึ้นกับสัดส่วนของ GC เบส ในขณะที่ค่า T_m ของพีเอ็นเอกับอาร์เอ็นเอจะมีค่าขึ้นกับสัดส่วนของ GC เบส ในลักษณะเดียวกับที่พบในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอธรรมชาติ นั่นคือถ้ายิ่งสัดส่วนของคู่เบส GC มีมากก็จะมีค่า T_m ที่สูงขึ้น (รูปที่ 1) ดังนั้น ความแตกต่างของ T_m ระหว่างโมเลกุลลูกผสมพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ กับพีเอ็นเอ-อาร์เอ็นเอ จะขึ้นกับลำดับเบส โดยที่ความแตกต่างจะมากเมื่อพีเอ็นเอมีสัดส่วนของเบส AT มาก และความแตกต่างนี้จะน้อยลงเมื่อพีเอ็นเอมีสัดส่วนของเบส GC มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ในทุกกรณี ความเสถียรของ โมเลกุลลูกผสมพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอจะมากกว่าพีเอ็นเอ-อาร์เอ็นเอเสมอ

ผลการทดลองทั้งหมดยืนยันสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของ acpcPNA 2 ประการที่ไม่เคยมีการรายงานในพีเอ็นเอ หรือแอนาล็อกของดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ มาก่อนคือ 1. ความสามารถในการเลือกจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าอาร์เอ็นเอ และ 2. ความเสถียรของโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่ไม่ขึ้นกับสัดส่วนของเบสที่เป็นองค์ประกอบ สมบัติประการแรกเป็นการบ่งชี้ข้อจำกัดของ acpcPNA ว่าน่าจะเหมาะกับงานที่เกี่ยวข้องกับเป้าหมายของการจับยึดที่เป็นดีเอ็นเอมากกว่าอาร์เอ็นเอ เช่นงานทางด้าน DNA-based diagnostics และ antigene therapeutics ส่วนสมบัติประการที่สองน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นโพรบสำหรับตรวจวินิจฉัยแบบ high throughput เช่นในการทำไมโครแอเรย์ เนื่องจากสามารถออกแบบพีเอ็นเอโพรบหลายๆ ชนิดเพื่อให้

จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลาย ๆ ตำแหน่งพร้อมกัน โดยที่โมเลกุลลูกผสมที่เกิดขึ้นมีความเสถียรใกล้เคียงกัน และไม่ขึ้นกับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย โดยทางกลุ่มวิจัยได้เคยนำสมบัตินี้ของ acpcPNA ไปใช้ในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอในรูปแบบ multiplex เป็นผลสำเร็จมาแล้ว [Boontha et al., 2008]

ตารางที่ 4. Evidences for the lack of self-hybridization between two complementary PNA sequences

entry	PNA pairs	%G:C content	T_m (°C)	Note
1	10mer1·10mer4	40	<20	antiparallel
2	10mer1·10mer5	40	24.2	parallel
3	10mer2·10mer6	70	<20	antiparallel
4	10mer2·10mer7	70	35.1	parallel
5	10mer3·10mer8	20	<20	antiparallel
6	10mer3·10mer9	20	<20	parallel

Conditions: 1 μ M PNA, 1 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, heating rate 1.0 °C/min. T_m values are accurate within ± 0.5 °C.

นอกจากการศึกษาการจับยึดกันระหว่าง acpcPNA กับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอแล้ว ยังได้มีการศึกษาความสามารถในการจับยึดกันเองระหว่าง acpcPNA สองสายที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ทั้งในแบบแอนติพาราเรลและพาราเรล โดยผลการทดลองเป็นดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า acpcPNA ไม่สามารถเกิดโมเลกุลลูกผสมกับตัวมันเองในทิศทางแอนติพาราเรล (entries 1, 3, 5) แต่ในกรณีที่มีสัดส่วนของ GC เบสสูง (entries 2,4) อาจเกิดโมเลกุลลูกผสมกับตัวเองในทิศทางพาราเรลได้ อย่างไรก็ตาม โมเลกุลลูกผสมที่เกิดขึ้นถือว่ามีความเสถียรต่ำมากเมื่อเทียบกับการเกิดโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ หรือแม้แตดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ การที่ acpcPNA ไม่เกิดโมเลกุลลูกผสมกับตัวเองในทิศทางแอนติพาราเรลนับเป็นสมบัติเฉพาะที่เป็นเอกลักษณ์ของพีเอ็นเอชนิดนี้อีกประการหนึ่งที่น่านำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในการออกแบบพีเอ็นเอสองสายเพื่อให้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นโมเลกุลแบบเกลียวคู่โดยการเกิด double duplex invasion ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบเกลียวคู่ ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาที่ทำโดยกลุ่มวิจัยอื่นยังพบว่ามีข้อจำกัดอยู่มากทั้งในแง่ของประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย [Lohse et al., 1999] ซึ่งการประยุกต์ใช้งาน acpcPNA ในลักษณะนี้จะได้มีการศึกษาต่อไปในอนาคต งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ acpcPNA ในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสาร Artificial DNA: PNA&XNA [Vilaivan et al., 2011]

ในขณะนี้ยังไม่สามารถอธิบายปัจจัยทางโครงสร้างที่มีอิทธิพลต่อสมบัติการจับยึดที่เป็นลักษณะเฉพาะของ acpcPNA เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลโครงสร้าง 3 มิติระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ และกับพีเอ็นเอด้วยกันเอง โดยกำลังอยู่ระหว่างดำเนินการศึกษาโครงสร้างดังกล่าวทั้งทางทฤษฎีโดยใช้การคำนวณแบบ Molecular Dynamics (ร่วมกับกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุพจน์ หารหนองบัว และ ผศ.ดร.คัชรินทร์ ศิริวงศ์) และการใช้เทคนิคทาง X-ray crystallography (ร่วมกับกลุ่มวิจัยของ รศ.ดร.พลังพล คงเสรี)

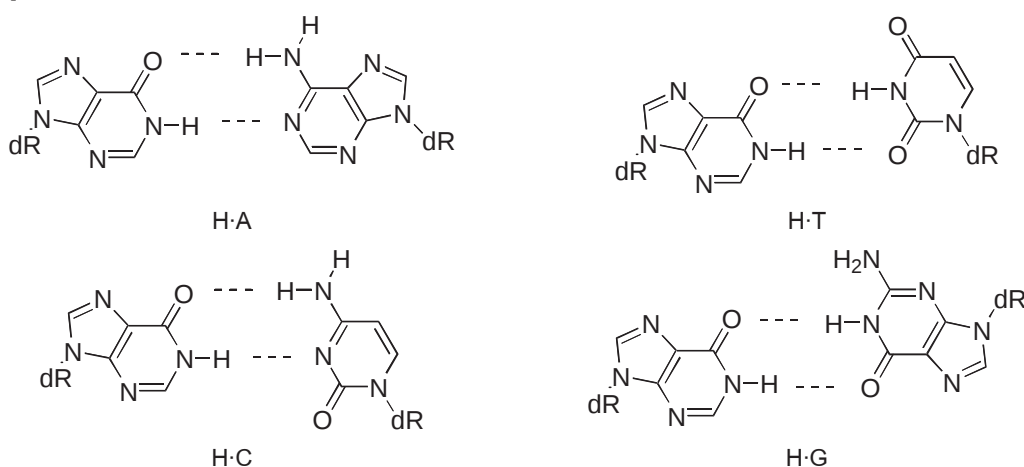
2. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA ที่มี modified base

เพื่อเป็นการขยายขอบเขตการใช้งานของพีเอ็นเอชนิด acpcPNA ให้กว้างขวางขึ้นได้มีแนวคิดการแทนที่เบสธรรมชาติ (A, T, C, G) ในหน่วยของพีเอ็นเอโมโนเมอร์ด้วยเบสอื่นๆ ที่ไม่ใช่เบสธรรมชาติ โดยเบสที่ไม่ใช่เบสธรรมชาติกลุ่มที่สนใจมีอยู่ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือเบสที่สามารถจับยึดกับเบสธรรมชาติทั้งสี่ชนิด (A, T, C, G) ได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเรียกว่ายูนิเวอร์แซลเบส พีเอ็นเอโพรบที่มียูนิเวอร์แซลเบสจะมีประโยชน์ในการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายมีความผันแปรของลำดับเบสในบางตำแหน่ง (ที่ไม่ใช่ตำแหน่งที่สนใจจะศึกษา) สูง โดยสมบัติของยูนิเวอร์แซลเบสที่พึงประสงค์จะต้องสามารถจับยึดกับเบสธรรมชาติทั้งสี่ชนิดได้ดีใกล้เคียงกันโดยไม่ขึ้นกับชนิดของเบสที่เข้ามาเข้าคู่กัน และเบสที่อยู่ข้างเคียง

เบสที่ไม่ใช่เบสธรรมชาติกลุ่มที่สองที่สนใจศึกษาคือกลุ่มอนุพันธ์ของยูเรซิล (U) ที่มีการแทนที่บนตำแหน่งที่ 5 ของหมู่เบสด้วยหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแสดงสัญญาณเช่นฉลากเรืองแสง ข้อดีของโมเลกุลเหล่านี้คือสามารถใส่ฉลากเรืองแสงเข้าไปในตำแหน่งอื่นที่นอกเหนือจากส่วนปลายของโมเลกุล ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการเป็นโพรบสำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยแนวคิดใหม่ๆ เช่น quencher-free molecular beacon [Englund and Appella, 2005] เป็นต้น

2.1 Hypoxanthine as a modified base

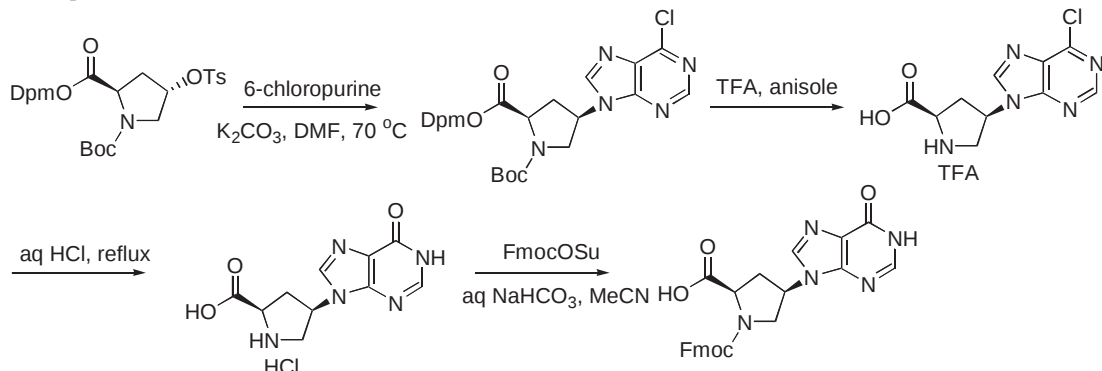
ยูนิเวอร์แซลเบสตัวแรกที่ได้ศึกษาคือไฮโปแซนทีน (hypoxanthine, H) (รูปที่ 3) ซึ่งมีการศึกษากันมากในระบบของดีเอ็นเอ [Sun and Lee, 2010; Case-Green and Southern, 1994] และพีเอ็นเอต้นแบบของ Nielsen โดยในระบบพีเอ็นเอของ Nielsen พบว่าเบสชนิดนี้แสดงสมบัติของยูนิเวอร์แซลเบสที่ไม่ดีนัก กล่าวคือเมื่อมี A เป็นเบสข้างเคียง H จะแสดงสมบัติการจับยึดที่ดีเป็นพิเศษกับเบส C (คล้ายเบส G) แต่เมื่อมี T เป็นเบสข้างเคียง H กลับแสดงสมบัติการจับยึดที่จำเพาะเจาะจงกับเบส A (คล้ายเบส T) โดยในกรณีหลังนี้เชื่อว่าเกิดจาก Hoogsteen base pairing ส่วนในกรณีแรกจะคล้ายกับ Watson-Crick base pairing อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของ T_m ในกรณีที่เกิดการจับยึดได้ดีที่สุด กับกรณีที่แย่ที่สุดมีค่าไม่มากนัก (อยู่ในช่วง 6.5–14 °C) [Timár et al. 1999]



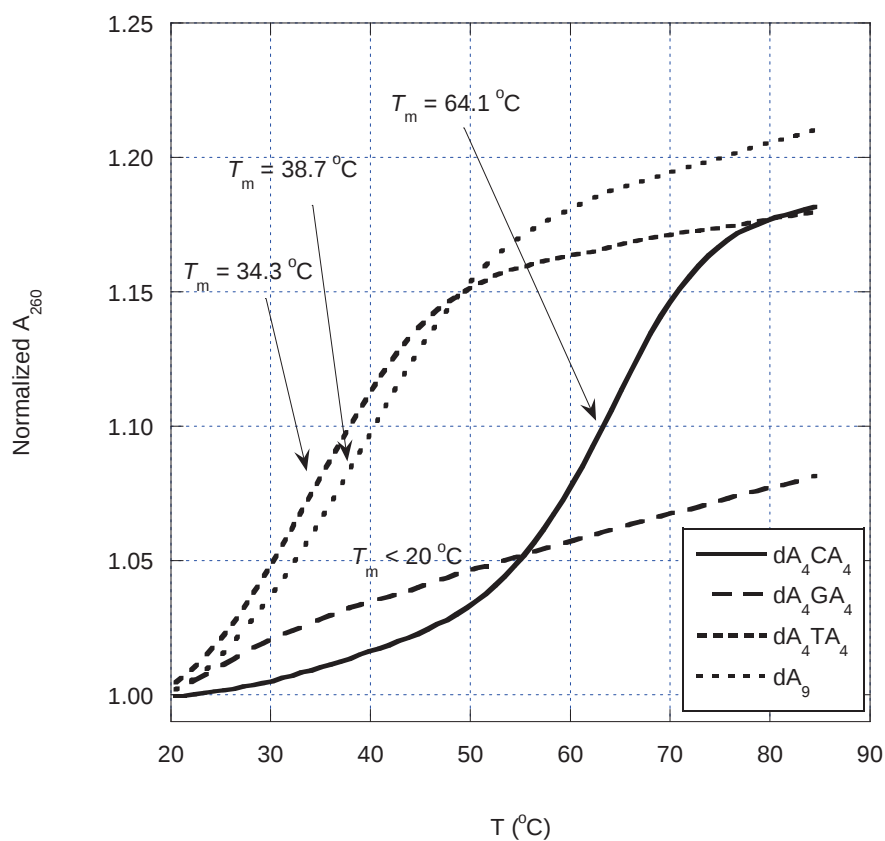
รูปที่ 3 แสดงการเกิดคู่เบสระหว่าง H กับ natural nucleobases

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองประเมินความสามารถในการเป็นยูนิเวอร์แซลเบสของ H ใน acpcPNA ซึ่งอาจให้ผลต่างจากพีเอ็นเอระบบของ Nielsen โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ H โมโนเมอร์ที่ถูกปกป้องด้วยหมู่ Fmoc ความพยายามสังเคราะห์ไฮโปแซนทีนโมโนเมอร์จากการแทนที่หมู่โทซิลเลตใน *trans*-4-tosyloxy-D-proline ที่มีหมู่ปกป้องอะมิโนเป็น Boc และหมู่ปกป้องคาร์บอกซิลเป็น diphenylmethyl ester ด้วยเบสไฮโปแซนทีนโดยตรงไม่

ประสบความสำเร็จ แต่สามารถสังเคราะห์โมโนเมอร์ดังกล่าวจากสารตั้งต้นตัวเดียวกันได้โดยผ่าน 6-chloropurine monomer ตามด้วยการทำไฮโดรลิซิสเพื่อเปลี่ยนหมู่คลอไรด์ให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล [Baker and Tanna, 1965] ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของไฮโปแซนทีนเบส (H)



รูปที่ 5 แสดง melting curve ของไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอ T_4HT_4 และดีเอ็นเอ dA_4YA_4 เมื่อ H คือไฮโปแซนทีน และ Y คือ A, T, C หรือ G

ในเบื้องต้นได้ทดลองประเมินความสามารถของไฮโปแซนทีนในการเป็นยูนิเวอร์แซลเบสสำหรับ acpcPNA โดยการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น T_4HT_4 โดยใช้วิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอโดยวิธี Fmoc-SPPS โดยอาศัย Fmoc/Pfp monomer ตามที่ได้เคยรายงานไปแล้ว [Vilaivan and Srisuwannaket, 2006] เว้น

แต่ในขั้นที่ใส่เบส H จะใช้โมโนเมอร์ในรูปแบบที่เป็นกรดคาร์บอกซิลิก ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย HATU/DIEA แทนการใช้ Fmoc/Pfp โมโนเมอร์ พีเอ็นเอที่ได้สามารถทำให้บริสุทธิ์โดย HPLC ตามวิธีการมาตรฐาน (m/z calcd: 3189.43 found: 3190.87) ผลการหาค่า T_m ของโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอดังกล่าวกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น A_4YA_4 เมื่อ $Y = A, T, C$ และ G เป็นดังสรุปในรูปที่ 5

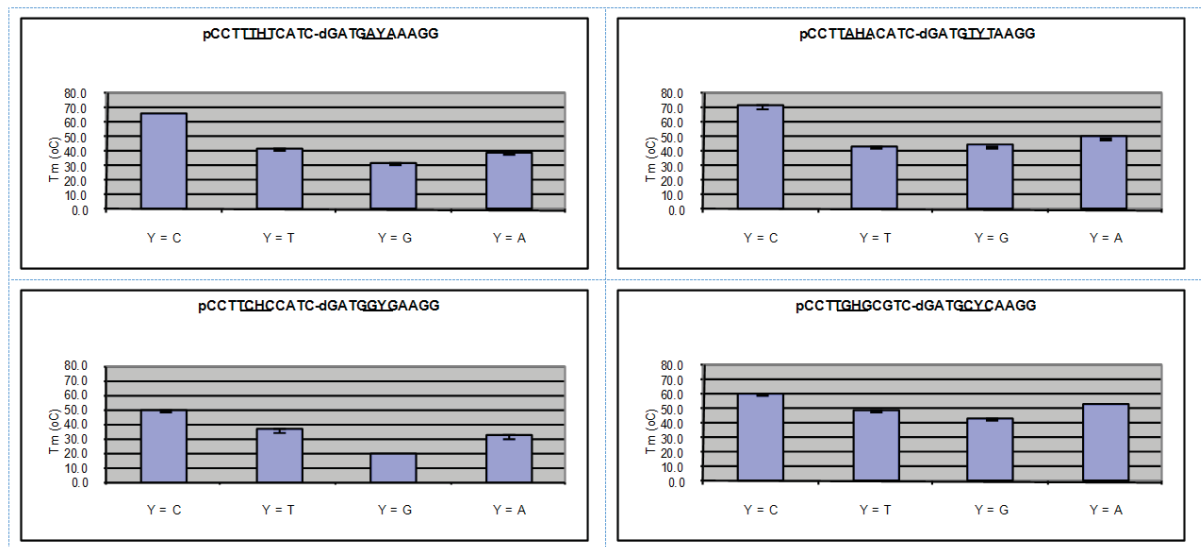
ข้อมูลในรูปที่ 5 แสดงว่าเบสไฮโปแซนทีนไม่มีสมบัติเป็นยูนิเวอร์แซลเบสใน acpcPNA แต่กลับแสดงสมบัติคล้ายกับเบส G แม้จะมีเบสข้างเคียงเป็น T ก็ตาม กล่าวคือสามารถเกิดโมเลกุลลูกผสมที่ค่อนข้างเสถียรกับดีเอ็นเอในกรณีที่เบสที่อยู่ตรงข้ามเป็น C ($T_m = 64.1^\circ\text{C}$) ซึ่งใกล้เคียงกับในกรณีของโมเลกุลลูกผสมที่เกิดจากพีเอ็นเอ T_4GT_4 และดีเอ็นเอ dA_4CA_4 ($T_m = 64.2^\circ\text{C}$) แต่เมื่อเบสที่อยู่ตรงข้ามเป็น A, T หรือ G จะมีค่า T_m ลดต่ำลงมาก่อนข้างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเบสตรงข้ามเป็น G ซึ่งมีความเกาะกะสูง โดยค่า T_m ที่ลดต่ำลงมาอยู่ในเกณฑ์ใกล้เคียงกับในกรณีที่เป็ single base mismatch ตามปกติคือ $\Delta T_m \sim 25\text{--}30^\circ\text{C}$ ซึ่งสมบัตินี้แตกต่างจากพีเอ็นเอต้นแบบของ Nielsen อย่างชัดเจน

แม้ผลการทดลองจะไม่เป็นตามที่ได้คาดไว้ แต่การที่เบส H สามารถแสดงสมบัติเสมือนกับเป็นเบส G ก็เปิดโอกาสให้สามารถใช้แทนเบส H แทนเบส G ใน acpcPNA ได้ ซึ่งข้อดีของเบส H คือโมโนเมอร์สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายกว่าโมโนเมอร์ของเบส G มาก เนื่องจาก regioselectivity ของการแทนที่ค่อนข้างสูง และไม่จำเป็นต้องมีหมู่ปกป้อง อีกทั้งในการสังเคราะห์พีเอ็นเอยังสามารถแทรกโมโนเมอร์ที่มีเบส H เข้าไปได้โดยมีประสิทธิภาพมากกว่าโมโนเมอร์ของเบส G อย่างไรก็ดี เพื่อเป็นการยืนยันว่าเบส I สามารถแทนที่เบส G ได้ในกรณีที่ลำดับเบสเปลี่ยนไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีเบสข้างเคียงเป็นตัวอื่นที่ไม่ใช่ T จึงได้สังเคราะห์ acpcPNA อีก 4 ชนิดที่มีเบส H แทรกอยู่ระหว่างคู่เบสต่าง ๆ กัน โดยลำดับเบสที่สังเคราะห์จะเป็นลำดับเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ในระบบพีเอ็นเอของ Nielsen นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์ acpcPNA อีก 2 ชนิดที่มีเบส G แทนที่ตำแหน่งของเบส H เพื่อเปรียบเทียบการจับยึดกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สมกันด้วย โดยได้ยืนยันโครงสร้างของพีเอ็นเอทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ข้อมูลลำดับเบสและ m/z ของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้

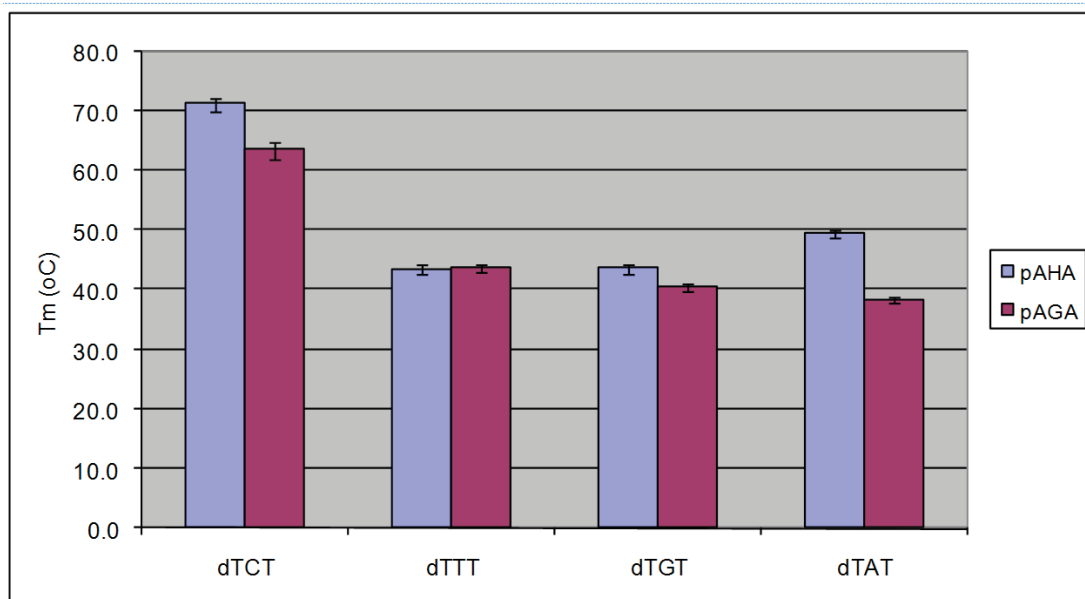
sequence	m/z (calcd)	m/z (found)
Ac-CCTTTITCATC-LysNH ₂	3803.11	3801.05
Ac-CCTTAIACATC-LysNH ₂	3821.14	3820.08
Ac-CCTTCICCATC-LysNH ₂	3773.09	3772.52
Ac-CCTTGIGCATC-LysNH ₂	3853.14	3853.91
Ac-CCTTTGTCATC-LysNH ₂	3818.13	3816.70
Ac-CCTTAGACATC-LysNH ₂	3836.16	3836.96

ผลการตรวจวัดค่า T_m กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม และไม่เป็นคู่สมกันโดยเปลี่ยนแปลงเฉพาะตำแหน่งของเบสที่จับคู่กับเบส H หรือ G ที่ตรงกลางสายเป็นดังแสดงในรูปที่ 6



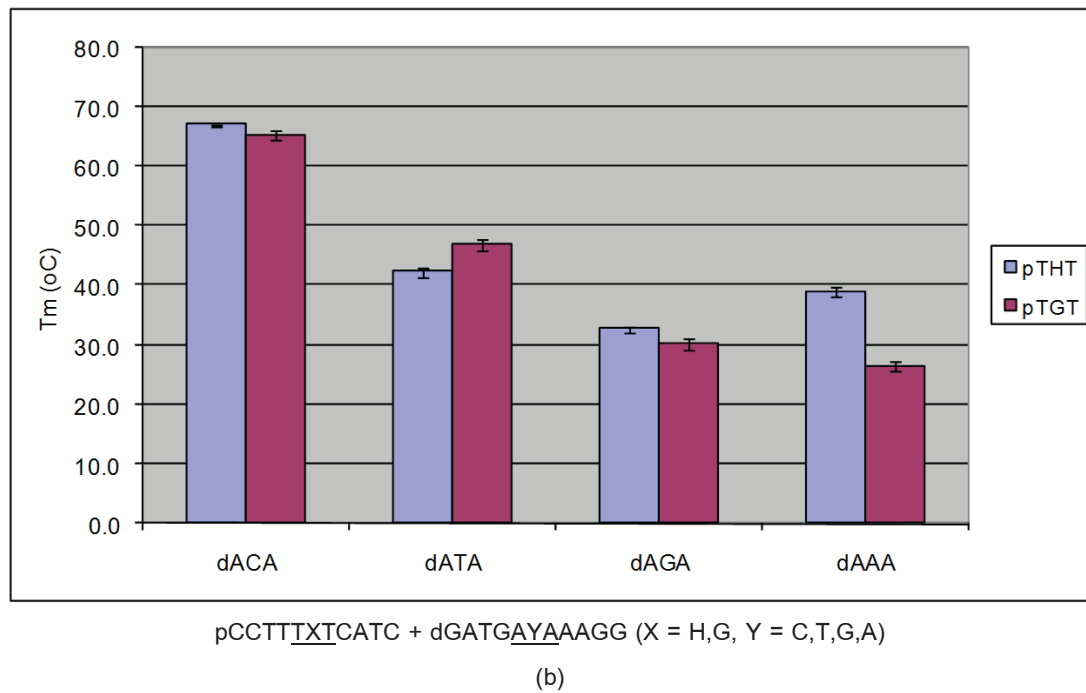
รูปที่ 6 เปรียบเทียบค่า T_m ของ PNA-DNA duplex ที่มีเบส I เป็นองค์ประกอบ; T_m measured at 1.0 μ M duplex concentration, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, heating rate 1 $^{\circ}$ C/min

ผลการทดลองในรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่าเบส H ที่อยู่บนพีเอ็นเอสามารถจับคู่กับเบส C บนดีเอ็นเอได้ดีกว่าเบสตัวอื่น (G, C และ A) ไม่ว่าจะจับคู่กับเบส H เป็นอะไรก็ตาม โดยเมื่อเบสข้างเคียงเป็น A หรือ T จะมีความแตกต่างของ T_m ระหว่างคู่เบส H-C กับคู่เบสอื่นมากกว่าเมื่อเบสข้างเคียงเป็น C หรือ G และเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมือนกัน เว้นแต่เปลี่ยนจาก H เป็น G จะเห็นว่าเบส H ในพีเอ็นเอมีความจำเพาะเจาะจงต่อ C เช่นเดียวกับเบส G ทุกประการ (รูปที่ 7) และเมื่อเปรียบเทียบกับระบบพีเอ็นเอของ Nielsen ที่มีลำดับเบสเดียวกันพบว่า T_m ของ acpcPNA ที่มีเบส H อยู่ตรงกลางสายจะมีค่าสูงกว่า และแสดงความจำเพาะเจาะจงต่อเบส C ที่ชัดเจนกว่ามาก (ค่า ΔT_m ในทุกกรณี > 20 $^{\circ}$ C เมื่อเทียบกับระบบพีเอ็นเอของ Nielsen ที่มี ΔT_m สูงสุดเพียง 10.8 $^{\circ}$ C) (ตารางที่ 6)



pCCTTAXACATC + dGATGTYTAAGG (X = H,G; Y = C,T,G,A)

(a)



รูปที่ 7 เปรียบเทียบค่า T_m ของ PNA-DNA duplex ที่มีเบส H เป็นองค์ประกอบ กับที่มีเบส G เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีเบสข้างเคียง H เป็น A (a) และเมื่อมีเบสข้างเคียง H เป็น T (b); T_m measured at 1.0 μ M duplex concentration, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, heating rate $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่า T_m ของ PNA-DNA duplex ที่มีเบส H เป็นองค์ประกอบในพีเอ็นเอสสองชนิดคือ acpcPNA ของกลุ่มผู้วิจัย และ aegPNA ของ Nielsen

PNA (N→C)	DNA	T_m (acpcPNA) ^a (ΔT_m , $^{\circ}\text{C}$) ^c	T_m (aegPNA) ^b (ΔT_m , $^{\circ}\text{C}$) ^c
CCTTA <u>H</u> ACATC	..TCT..	71.2 (0)	45.3 (0)
	..TTT..	43.5 (27.7)	34.5 (10.8)
	..TGT..	43.6 (27.6)	38.0 (7.3)
	..TAT..	49.4 (21.8)	36.9 (8.4)
CCTTT <u>H</u> TCATC	..ACA..	67.1 (0)	45.7 (0)
	..ATA..	42.4 (24.7)	38.2 (7.5)
	..AGA..	32.7 (34.4)	41.0 (4.7)
	..AAA..	38.9 (28.2)	52.2 (-6.5)

^a T_m measured at 1.0 μ M duplex concentration, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl

^b T_m data from [Timár et al. 1999] measured under the same conditions

^c $\Delta T_m = T_m (\text{H}\cdot\text{C}) - T_m (\text{H}\cdot\text{X})$, when X is the base under consideration

เป็นที่น่าประหลาดใจว่าแม้คู่เบส G·C จะมีถึง 3 พันธะไฮโดรเจน ในขณะที่คู่เบส H·C สร้างได้เพียง 2 พันธะไฮโดรเจนแต่ความแข็งแรงของคู่เบส H·C ใน acpcPNA กลับค่อนข้างใกล้เคียง หรือสูงกว่าคู่เบส G·C อยู่เล็กน้อยเมื่อพิจารณาจากค่า T_m เปรียบเทียบกันในแต่ละกรณี ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่แตกต่างจากทั้งดีเอ็นเอและพีเอ็นเอของ Nielsen เป็นที่น่าสังเกตว่าคู่เบส G·C ใน acpcPNA มีความเสถียรน้อยกว่าคู่เบส A·T เช่นกัน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในระบบ acpcPNA คู่เบส G·C ไม่ได้อยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมที่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ครบทั้งสามพันธะ จึงทำให้ความเสถียรของคู่เบส G·C ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น การค้นพบว่าคู่เบส H·C แสดงความเสถียรใกล้เคียงกับคู่เบส G·C นั้นสอดคล้องกับสมมติฐานข้างต้น อย่างไรก็ตาม การอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวในระดับโมเลกุลจำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติมที่จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ เช่น NMR หรือ X-ray crystallography หรือการใช้แบบจำลองโมเลกุลประกอบการคำนวณทางทฤษฎี แต่อย่างน้อยที่สุด การค้นพบนี้ได้เสนอแนะว่าสามารถแทนที่เบส G ใน acpcPNA ด้วยเบส H ได้โดยไม่มีผลกระทบต่อ specificity ในการจดจำเบส C และยังช่วยเพิ่มความเสถียรของ PNA·DNA duplex แทนที่จะลดความเสถียรดังที่พบในกรณีของ DNA·DNA duplex ซึ่งถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำ acpcPNA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ด้วยเหตุผลที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าโมโนเมอร์ของเบส H สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายกว่าโมโนเมอร์ของ G และสามารถแทรกเข้าไปในสายของพีเอ็นเอได้ง่ายกว่ามากโดยวิธีสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง นอกจากนี้ ด้วยการใช้ G เป็นเบสที่มี oxidation potential ต่ำกว่าเบสตัวอื่นๆ มันจึงสามารถรีดิวซ์อิเล็กตรอนได้ดี [Kawai et al., 2002] ทำให้มันมักจะถูกใช้ในการ assay ที่ใช้พีเอ็นเอเป็นโพรบในบางเทคนิค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง fluorescence เนื่องจาก G สามารถทำให้เกิดการ quench ของฟลูออโรฟอร์เป็นจำนวนมากผ่านกลไก photoexcited oxidative charge transfer [Mayer et al., 2004] นอกจากนี้ การแทนที่ G ด้วย I ยังได้ใช้ในการทำ electrochemical detection ของ DNA hybridization โดยอาศัยการดูจาก oxidation signal ของ guanine ซึ่งมีข้อจำกัดคือโพรบที่ใช้จะต้องไม่มี G เป็นองค์ประกอบเนื่องจากจะทำให้สัญญาณรบกวนการตรวจวัด [Wang et al, 1995] แต่สามารถหลีกเลี่ยงได้ด้วยการแทนที่ G ในโพรบด้วย H [Wang et al, 1998] โดยยังคงสามารถรักษา specificity ไว้ได้เหมือนเดิม

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่า T_m ของ PNA·DNA duplex ที่มีเบส H และ G เป็นองค์ประกอบ (ลำดับเบสของพีเอ็นเอคือ N-AATTTXCATCA-C และลำดับเบสของดีเอ็นเอคือ 5'-TGATGYAAATT-3')

Y in DNA	T_m (X=G) ^a (ΔT_m , °C) ^b	T_m (X=I) ^a (ΔT_m , °C) ^b
C	71.7 (0)	74.9 (0)
T	55.6 (16.1)	53.0 (21.9)
G	46.8 (24.9)	49.1 (25.8)
A	41.1 (30.6)	49.9 (25.0)

^a T_m measured at 1.0 μ M duplex concentration, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl

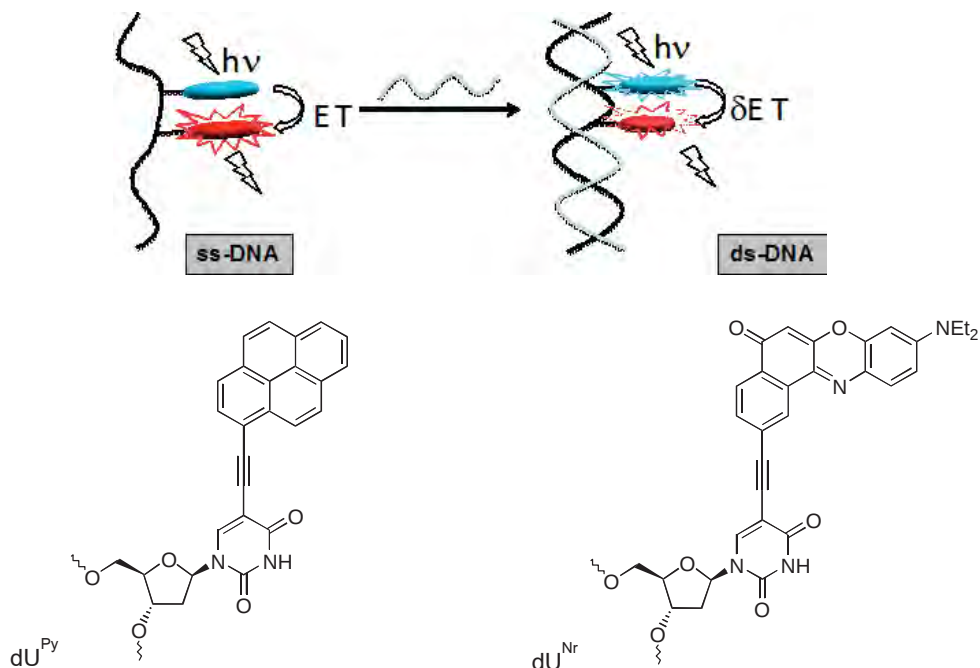
^b $\Delta T_m = T_m (I·C) - T_m (I·X)$, when X is the base under consideration

สุดท้ายเพื่อเป็นการยืนยันเพิ่มเติมว่าการแทนที่เบส G ด้วย H ในระบบ acpcPNA จะสามารถใช้ได้ทั่วไป โดยไม่จำกัดอยู่เฉพาะแต่ในกรณีทดสอบข้างต้น จึงได้ทดลองสังเคราะห์ acpcPNA ความยาว 11 เบส ที่มีเบส

G และ H ที่ตำแหน่งเดียวกันอีกคู่หนึ่ง ซึ่งเป็น biologically relevance sequence ผลการตรวจวัดค่า T_m ดังแสดงในตารางที่ 7 สามารถยืนยันการค้นพบในข้างต้น กล่าวคือการแทนที่ G ด้วย H ทำให้ได้พีเอ็นเอที่สามารถเกิดไฮบริดที่เสถียรขึ้นกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และยังคงมี specificity ต่อเบส C เหนือกว่าเบสอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบในกรณีที่ mismatch เบสเป็น T ซึ่งมักจะเกิด wobble pair กับเบส G ได้ค่อนข้างดี ทำให้ G-T mismatch มีค่า T_m ลดต่ำกว่า G-C perfect match น้อยกว่าคู่เบสอื่น แต่เมื่อแทนที่ด้วยเบส H พบว่า H-T mismatch มีความเสถียรลดลงกว่า G-T mismatch ประกอบกับความเสถียรที่เพิ่มขึ้นของ H-C perfect match ทำให้ค่า T_m ที่เปลี่ยนแปลงไปเห็นได้ชัดเจนมากขึ้น นั่นคือการแทนที่เบส G ด้วยเบส H จะทำให้สามารถบอกความแตกต่างของเบส T กับเบส C ได้ดียิ่งขึ้น งานส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

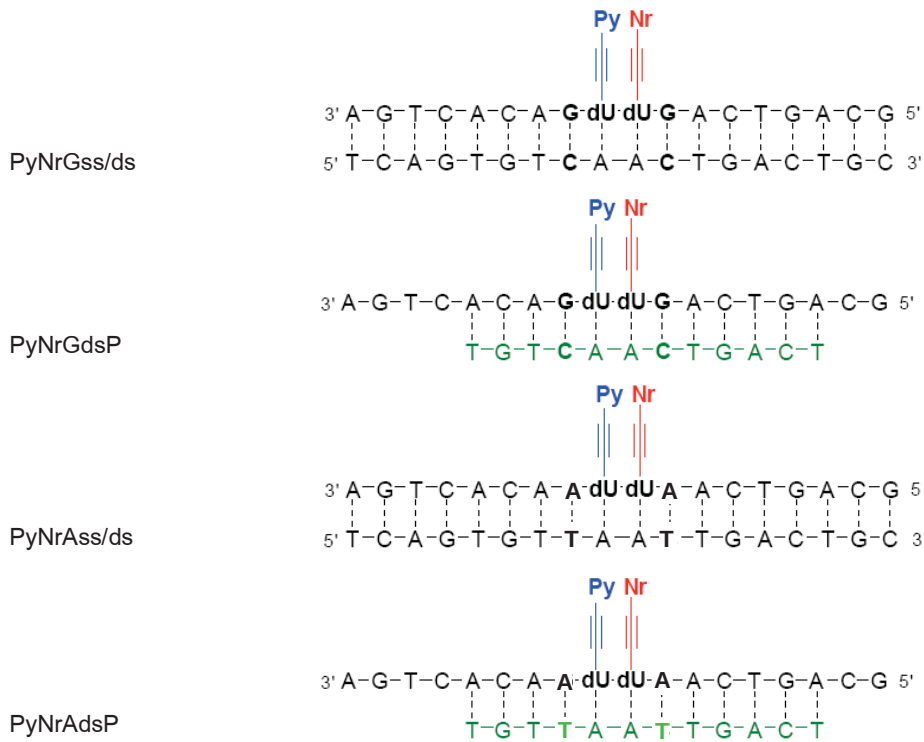
2.2 Hybridization of PNA with fluorescent-modified DNA

กลุ่มวิจัยของ Prof. Hans-Achim Wagenknecht (University of Regensburg, Germany) ได้พัฒนาดีเอ็นเอเรืองแสงสีขาว (White light emitting DNA, WED) ที่มีฟลูออโรฟอร์สองชนิดได้แก่ ethynylpyrene และ ethynyl Nile red ต่อกับหน่วยของยูริดีนที่อยู่ติดกันในลำดับเบสของดีเอ็นเอ (รูปที่ 8) และได้แสดงให้เห็นว่าการเกิด energy transfer ของฟลูออโรฟอร์ทั้งสองจะเปลี่ยนแปลงไปตามสถานะการไฮบริดของดีเอ็นเอ [Varghese and Wagenknecht, 2009] กล่าวคือในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว จะเกิด energy transfer จาก pyrene ไปยัง Nile red ทำให้เมื่อ excite ที่ λ_{max} ของ pyrene (~380 nm) จะเห็นเฉพาะการเรืองแสงของ Nile red (λ_{em} ~665 nm) สารละลายของ ssDNA จึงเรืองแสงเป็นสีแดง แต่เมื่อดีเอ็นเออยู่ในสภาพที่เป็น double helix ฟลูออโรฟอร์ทั้งสองจะถูกบังคับให้เบียดออกจากกันเนื่องจากถูกบังคับด้วยโครงสร้างที่ค่อนข้าง rigid ของ DNA double helix การเกิด energy transfer จึงไม่ดีเท่าในสภาพสายเดี่ยว ดังนั้นการ excite ที่ λ_{max} ของ pyrene (~380 nm) จะทำให้เห็นการเรืองแสงทั้งของ pyrene (λ_{em} ~440 nm) และ Nile red (λ_{em} ~665 nm) จึงเห็นเป็นการเรืองแสงสีขาว

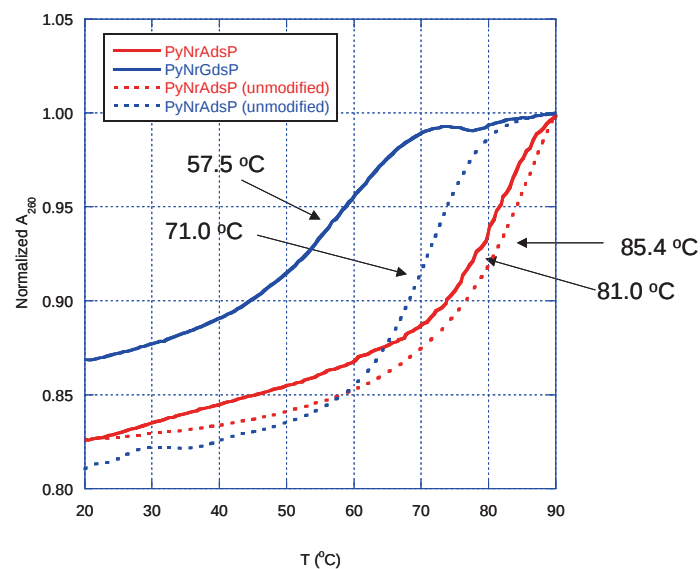


รูปที่ 8 หลักการทำงานของ White light emitting DNA (WED) และโครงสร้างของ ethynylpyrene modified dU และ ethynyl Nile red modified dU

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถในการไฮบริดระหว่าง WED DNA กับ acpcPNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน และศึกษาสมบัติเชิงแสงของ PNA-DNA hybrid ที่เกิดขึ้น โดยลำดับเบสของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอที่ใช้เป็นดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งจะเป็นชุดเดียวกับที่ได้มีข้อมูลการศึกษาสมบัติเชิงแสงมาก่อนหน้านี้แล้ว โดยเป็นงานวิจัยที่ทำภายใต้ความร่วมมือกับ Prof. Wagenknecht



รูปที่ 9 ลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 10 T_m curves ของ PNA-DNA hybrid (modified vs unmodified); T_m measured at 2.5 μ M duplex concentration, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 250 mM NaCl, heating rate 0.7 $^{\circ}$ C /min

ในเบื้องต้นได้ทดสอบความสามารถในการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปลงด้วยฟลูออโรฟอร์โดยเทคนิค UV melting ซึ่งพบว่าพีเอ็นเอสามารถเกิดไฮบริดที่เสถียรกับดีเอ็นเอได้แม้ว่าจะใช้พีเอ็นเอที่มีความยาวเพียง 12 เบส เท่านั้น โดยพบว่า T_m ของ PNA·DNA hybrid ที่ผ่านการดัดแปลงด้วยฟลูออโรฟอร์จะต่ำกว่าของ PNA·DNA hybrid ที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปลงอยู่พอสมควร (รูปที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างค่า T_m ของ PNA·DNA hybrid ด้วยกันเองจะเห็นว่าไฮบริดที่มีคู่เบส A·T อยู่ขนานข้างฟลูออโรฟอร์ทั้งสองจะเสถียรมากกว่าไฮบริดที่มีคู่เบส G·C ในอยู่ตำแหน่งเดียวกัน จากนั้นจึงได้วัดการเกิดฟลูออเรสเซนส์ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและ PNA·DNA hybrid เปรียบเทียบกับ DNA·DNA hybrid ข้อมูลที่ได้แสดงอยู่ในรูปของ FRET ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่าง emission ที่ λ_{max} ของ Nile red (I_{665}) ต่อ pyrene (I_{440}) โดยตัวเลขมากจะแสดงถึงการเกิด energy transfer ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าตัวเลขที่มีค่าน้อย (ตารางที่ 8 และรูปที่ 8)

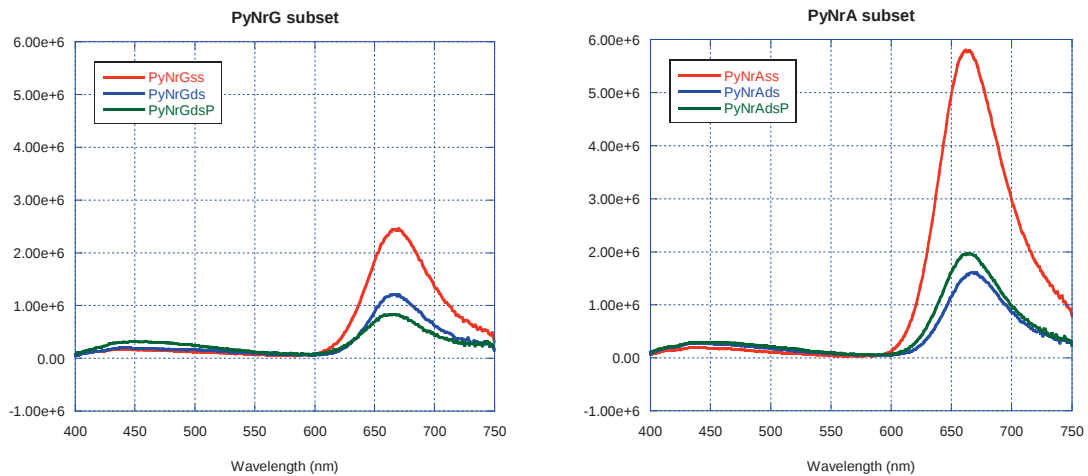
ข้อมูลในตารางที่ 8 แสดงว่าในกรณีที่เป็น single strand DNA จะเกิด energy transfer ระหว่าง pyrene และ Nile red ได้ดี โดยพิจารณาได้จากอัตราส่วน I_{665}/I_{440} ที่มีค่าสูง (14.2–30.4) แต่เมื่อเกิดเป็น DNA·DNA hybrid ตัวเลขนี้จะลดลงอย่างมากเหลือเพียง 5.8–6.0 ส่วนในกรณีของ PNA·DNA hybrid ก็พบการลดลงของ I_{665}/I_{440} ในทำนองเดียวกัน แต่ความแตกต่างของอัตราส่วนนี้มีช่วงที่กว้างกว่าในกรณีของดีเอ็นเอ (2.7–6.6) ซึ่งนำไปสู่สมมติฐานว่าน่าจะเกิดจากการที่คู่เบส G·C ทำให้เกิดการบิด (twist angle) มากกว่าคู่เบส A·T และสามารถนำไปสู่คำอธิบายว่าทำไมคู่เบส G·C ในพีเอ็นเอ **P1** จึงมีความเสถียรน้อยกว่าคู่เบส A·T อย่างไรก็ตามสมมติฐานนี้ยังรอการพิสูจน์จากการศึกษาโครงสร้างในสามมิติของ PNA·DNA hybrid ต่อไป ผลงานในส่วนนี้ร่วมกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาโดยละเอียดร่วมกับ Ms. Sabrina Sezi นักศึกษาปริญญาเอกจาก Karlsruhe Institute of Technology ประเทศเยอรมันได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์แล้วในวารสาร ChemistryOpen [Sezi, 2012]

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่า T_m และการเกิด energy transfer ในดีเอ็นเอสายเดี่ยวและไฮบริดของมัน

Sample	T_m^a	$I_{665}/I_{440}^{a,b}$
PyNrGss	-	14.2
PyNrGds	62.1	6.0
PyNrGds (PNA)	57.5	2.7
PyNrAss	-	30.4
PyNrAds	58.3	5.8
PyNrAds (PNA)	81.0	6.6

^a All measurements were carried out at 2.5 μ M modified DNA and 3.0 μ M DNA/PNA in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 250 mM NaCl

^b λ_{ex} 380 nm, 20 °C

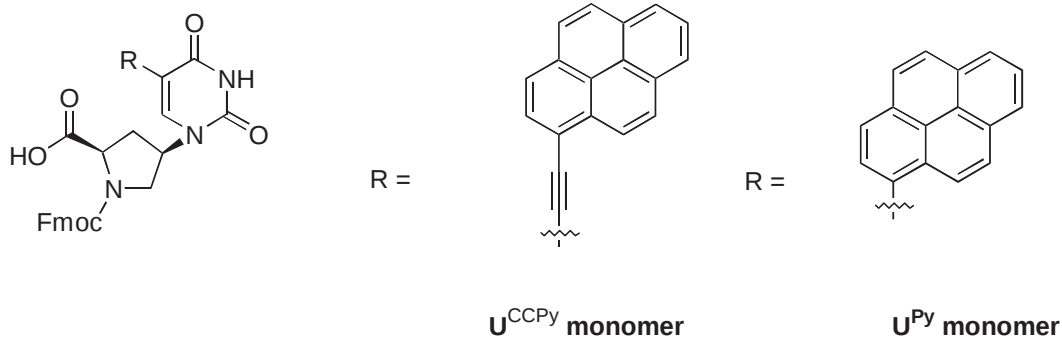


รูปที่ 10 Fluorescence spectra ของ pyrene/Nile red modified DNA (left: PyNrG, right PyNrA) และไฮบริดของมันกับ DNA และ PNA; measured at 2.5 μ M duplex concentration, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 250 mM NaCl, λ_{ex} 380 nm, 20 $^{\circ}$ C

2.3 Synthesis and Hybridization of PNA containing fluorescent-modified uracil base

แม้ว่าการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงจะได้ทำมานานแล้วในกลุ่มของผู้วิจัย แต่การติดฉลากที่เคยศึกษามาทั้งหมดจะกระทำผ่านการเกิดพันธะเอไมด์ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของโมเลกุล ดังนั้นฟลูออโรฟอร์จึงอยู่ห่างไกลจากบริเวณที่เกิดพันธะไฮโดรเจนหรือการ stack ของคู่เบส ฟลูออโรฟอร์ที่ติดอยู่ในลักษณะดังกล่าวจึงมีประโยชน์เพียงแค่เป็น reporter ที่ไม่ sensitive กับการเกิดไฮบริดเซชัน ซึ่งหากจะนำไปใช้ในการตรวจวัดการเกิดการไฮบริดกับดีเอ็นเอเป้าหมายจะต้องมีการแยกพีเอ็นเอที่เกิดการไฮบริดออกจากที่ไม่เกิดการไฮบริดก่อน เช่น โดยอาศัย ion exchange capture [Korkaew and Vilaivan, 2008] จึงจะสามารถตรวจวัดได้ หรือมีฉะนั้นจะต้องอาศัยเทคนิคพิเศษอื่น เช่น molecular beacon ที่จะทำการเรืองแสงของฟลูออโรฟอร์แตกต่างกันในสภาพก่อนและหลังการเกิดไฮบริด [Marras, 2008]

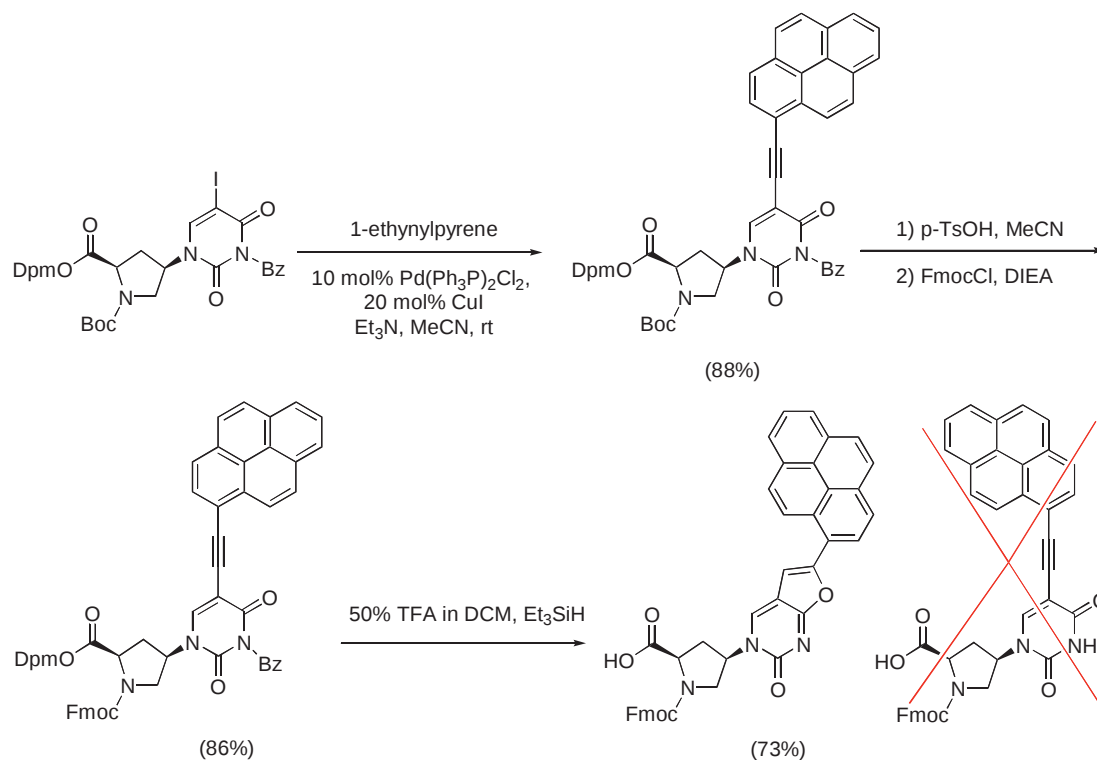
จากข้อจำกัดข้างต้น งานวิจัยในส่วนนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีเบสที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์ โดยมีสมมติฐานว่าการที่ฟลูออโรฟอร์อยู่ติดกับคู่เบสจะทำให้ได้พีเอ็นเอเรืองแสงที่สามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติการเรืองแสง (ความเข้ม, ความยาวคลื่น, fluorescence life time) ตามสภาวะของการเกิดไฮบริดเซชัน ซึ่งอาจเป็นในรูปแบบของฟลูออโรฟอร์ชนิดเดียว หรือมากกว่าหนึ่งชนิดภายใต้แนวคิดคล้ายคลึงกับ WED ที่ได้นำเสนอในหัวข้อ 2.2 โดยในเบื้องต้นได้เลือกเบสคือยูเรซิล และฟลูออโรฟอร์คือ pyrene ซึ่งมีวิธีการสังเคราะห์ซับซ้อนน้อยที่สุด และมีการศึกษากันมาค่อนข้างดีแล้วในระบบของดีเอ็นเอ [Mayer et al., 2004; Wanninger-Weiss, 2008] เป็นระบบสำหรับทดสอบ โมเลกุลของโมโนเมอร์ที่เป็นเป้าหมายเป็นดังแสดงในรูปที่



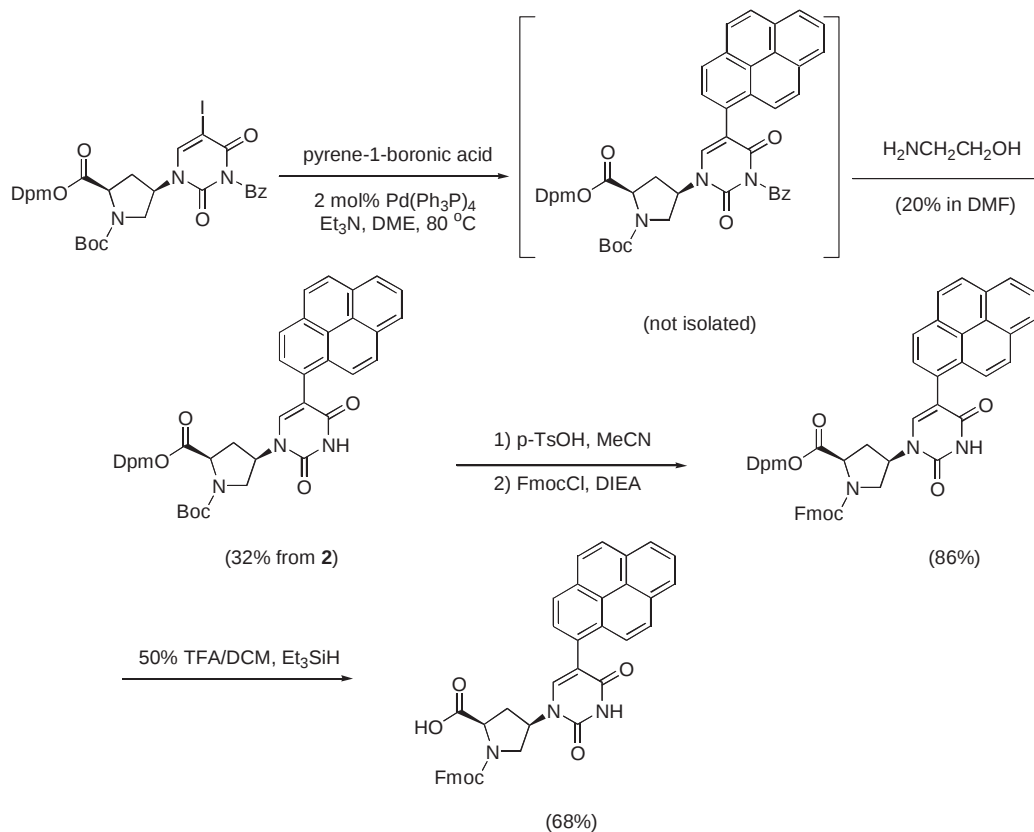
รูปที่ 11 โครงสร้างของ pyrene-modified acpcPNA โมโนเมอร์

ในเบื้องต้นได้พยายามสังเคราะห์โมโนเมอร์ **U^{CCPy}** ทำตามวิธีการเดียวกับที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโมโนเมอร์ [Mayer et al., 2004] โดยเริ่มต้นจาก protected iodouracil PNA monomer ทำปฏิกิริยา Sonogashira coupling กับ 2-ethynylpyrene ภายใต้ภาวะมาตรฐาน สามารถแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมาได้ในปริมาณผลผลิต 88% และสามารถเปลี่ยนหมู่ปกป้องอะมิโนจาก Boc เป็น Fmoc ได้โดยใช้วิธีการเดียวกับโมโนเมอร์อื่นๆ ที่เคยศึกษามาแล้ว แต่ปัญหาที่พบคือในขั้นตอนสุดท้ายที่จะต้องกำจัดหมู่ปกป้องคาร์บอกซิล (ไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์) ออกภายใต้ภาวะกรด พบว่าภายใต้ภาวะมาตรฐานที่ใช้กรดไตรฟลูออโรอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่ว่าจะจะมี carbocation scavenger (ในที่นี้ใช้ triethylsilane) อยู่ด้วยหรือไม่ก็ตามจะทำให้เกิดการปิดวงได้เป็น อนุพันธ์ของ furanopyrimidine ที่มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 12 โครงสร้างดังกล่าวได้จากการศึกษาโดยเทคนิค ¹H และ ¹³C NMR โดยคาดว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเกิดจากการที่วงแหวน pyrene ช่วย stabilize vinyl cation ที่เกิดจากการโปรตอนเนตหมู่แอลไคน์ระหว่างการทำ acidolysis ซึ่ง vinyl cation นี้จะทำปฏิกิริยาต่อกับ O⁴ ของยูเรซิล จึงเกิดการปิดวงพร้อมกับการสูญเสียหมู่เบนโซอิลไป ปัจจุบันยังไม่สามารถแก้ปัญหานี้ได้ จึงยังไม่สามารถสังเคราะห์ ethynylpyrene โมโนเมอร์ **U^{CCPy}** ได้สำเร็จตามต้องการ แต่อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้คือ furopyrimidine นั้นก็มีความน่าสนใจเนื่องจากมันสามารถเรืองแสงได้ และมีรายงานว่า furanopyrimidine สามารถเกิดคู่เบสกับ G ได้แม้จะไม่ค่อยเสถียรนักก็ตาม [Lahoud et al. 2008; Woo et al 1996]

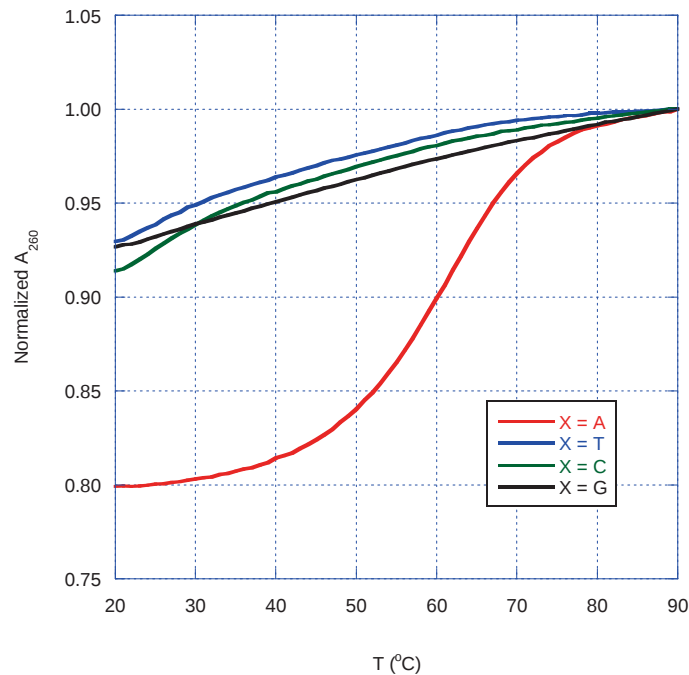
สำหรับการสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ **U^{Py}** ที่มีวงแหวนไพรีนต่อตรงกับตำแหน่ง 5 ของยูเรซิลสามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา Suzuki-Miyura cross coupling ระหว่าง iodouracil monomer กับ pyrene 1-boronic acid เดียวกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโมโนเมอร์ [Amann and Wagenknecht, 2002] ดังแสดงในรูปที่ 13 จากนั้นจึงได้ทดลองสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T₄U^{Py}T₄ (**PNA1**) โดยวิธีการมาตรฐานเช่นเดียวกับพีเอ็นเอโมโนเมอร์ปกติ พีเอ็นเอที่ได้แสดงค่า *m/z* (MALDI-TOF) ซึ่งสอดคล้องกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (M·H⁺ calcd. *m/z* 3365.6, found 3366.8) ผลการทดสอบการไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น dA₄XA₄ เป็นดังแสดงในรูปที่ 14 เมื่อพิจารณาค่า T_m ในกรณีที่ X = A (complementary) แสดงให้เห็นว่าการ modify ตำแหน่งที่ 5 ของยูเรซิลด้วย pyrene จะทำให้ความแข็งแรงของคู่เบส U^{Py}·A น้อยกว่าคู่เบส T·A ปกติ (T_m pT₉·dA₉ ~ 73 °C ภายใต้ภาวะเดียวกัน) เนื่องมาจากอิทธิพลของ steric effect ของหมู่ pyrene จึงรบกวนกับการเกิด PNA·DNA duplex อย่างไรก็ดี เป็นที่น่ายินดีว่าหน่วยเบส PyU ในพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปลงด้วย U^{Py} โมโนเมอร์ยังแสดงสมบัติการเลือกจับจำเพาะกับเบส A เช่นเดียวกับเบส T หรือ U ตามปกติ อันจะเห็นได้จาก sigmoidal melting transition ที่มี T_m ~ 60 °C เฉพาะในกรณีที่ X = A แต่เมื่อ X เป็นเบสอื่นจะไม่เห็นการเกิด melting แสดงว่าไม่เกิดการไฮบริดเมื่อเบสไม่เป็นคู่สมกัน งานที่จะทำต่อไปคือการศึกษาสมบัติการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปลงด้วยเบส U^{Py} ทั้งในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว และเมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สมกัน



รูปที่ 12 แผนการสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ **U^{CCPy}**



รูปที่ 13 การสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ **U^{Py}**



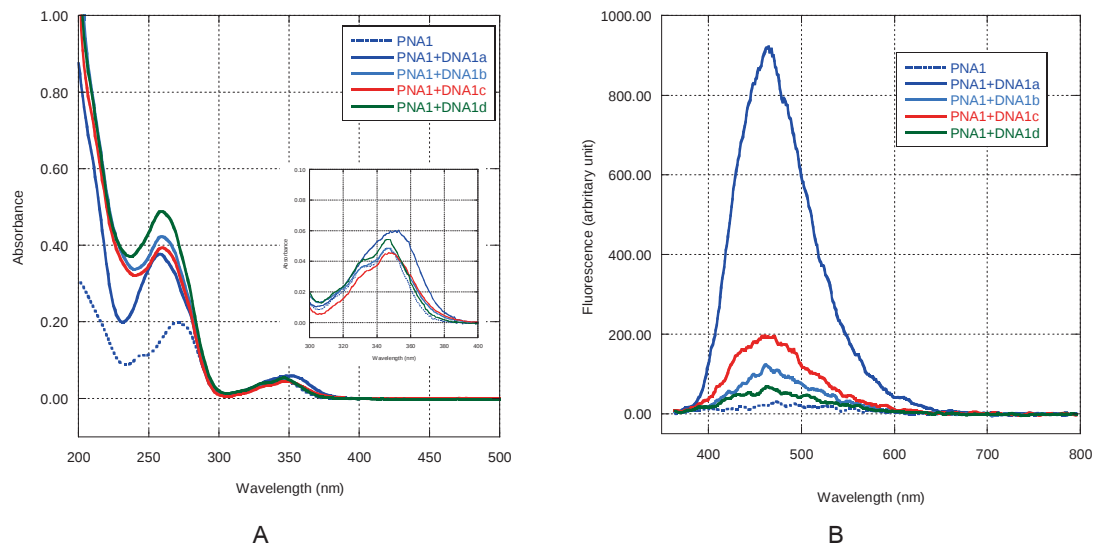
รูปที่ 14 T_m curves ของ PNA-DNA hybrid (pT_4PyUT_4 vs dA_4XA_4 ; $X = A, T, C, G$); T_m measured at 2.5 μM duplex concentration, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 250 mM NaCl, heating rate 0.7 $^{\circ}C/min$.

งานที่ได้ทำต่อมาคือการศึกษาลักษณะสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ และสมบัติการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปลงด้วยเบส U^{Py} ที่มีลำดับเบสที่หลากหลายมากขึ้นทั้งในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว และเมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สมกัน U^{Py} -modified acpcPNA และดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดมีลำดับเบสดังสรุปในรูปที่ 15 โครงสร้างของพีเอ็นเอทุกตัวที่สังเคราะห์ได้รับการพิสูจน์ทราบโดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry ผลการทดสอบการไฮบริดไธระหว่าง **PNA1** ซึ่งมีลำดับเบสเป็น $T_4U^{Py}T_4$ กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น dA_4XA_4 แสดงให้เห็นว่าเบส U^{Py} ใน acpcPNA สามารถจดจำเบส A ในดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง แต่ความแข็งแรงของกลุ่มเบส $U^{Py} \cdot A$ จะน้อยกว่าคู่เบส T-A ปกติ (T_m $pT_9 \cdot dA_9 \sim 73$ $^{\circ}C$ เทียบกับ T_m **PNA1**· $dA_9 \sim 66$ $^{\circ}C$ ภายใต้ภาวะเดียวกัน ดูตารางที่ 1) คาดว่าเนื่องจากอิทธิพลของ steric effect ของหมู่ pyrene เมื่อพิจารณาที่ absorption spectrum ของ **PNA1** (รูปที่ 16A) จะพบสัญญาณของหน่วยไพรีนที่มีลักษณะ broad และมี λ_{max} อยู่บริเวณ 345 nm ซึ่งสอดคล้องกับ absorption spectra ของดีเอ็นเอที่มี U^{Py} เบสซึ่งเคยมีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ [Wanninger-Weiss and Wagenknecht, 2008] เมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ เฉพาะ **DNA1** ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของ absorption spectrum ในส่วนของไพรีนอย่างชัดเจน กล่าวคือสเปกตรัมจะมีลักษณะ broad มากขึ้น shoulder ที่บริเวณ 340 nm หายไป และเกิด bathochromic shift ของ λ_{max} ไปที่บริเวณ 345 nm พร้อมกับเกิด hyperchromism ลักษณะของสเปกตรัมที่เปลี่ยนไปนี้บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ electronic transition ใน U^{Py} โครโมฟอร์หลังการเกิดไฮบริด ที่อุณหภูมิสูงกว่าค่า T_m สเปกตรัมนี้จะกลับคืนมาเหมือนของ **PNA1** ที่เป็นสายเดี่ยว และเมื่อทำให้เย็นลงอีกครั้งก็จะได้สเปกตรัมของไฮบริดกลับคืนมา แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสเปกตรัมนี้สามารถผันกลับได้ เมื่อพิจารณา fluorescence spectrum ของ **PNA1** (รูปที่ 16B) พบว่าในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวมีการเรืองแสงที่ต่ำมากเมื่อ excited ที่ 350 nm โดยมีค่า quantum yield (Φ_F) เพียง 0.006 แต่เมื่อเกิดไฮบริดกับ dA_9 การเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยมี maximum emission

อยู่ที่ 465 nm ค่าการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นเมื่อ **PNA1** เปลี่ยนจากสภาพที่เป็นสายเดี่ยวเป็นไฮบริดสูงถึง 42 เท่า (วัดที่ 465 nm) และค่า quantum yield (Φ_F) จะเพิ่มสูงขึ้นถึง 0.130 (ตารางที่ 1) ส่วนในกรณีอื่นที่ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม (มี single mismatched base ในตำแหน่งที่ตรงกับเบส U^{Py}) นอกจากจะไม่สามารถวัดค่า T_m ได้ (เนื่องจากไม่เกิดไฮบริด หรือเกิดไฮบริดที่มีความเสถียรต่ำมาก) แล้ว การเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงก็เกิดขึ้นในระดับที่ต่ำกว่ากรณีที่เป็นดีเอ็นเอคู่สมมาก (3.0–8.7 เท่า) คิดเป็นอัตราส่วนของการเรืองแสงระหว่างกรณีที่เป็นดีเอ็นเอคู่สมเทียบกับเมื่อเป็น single mismatched อยู่ที่ระหว่าง 4.8–13 เท่า โดยการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงนี้สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจนภายใต้แสง UV (black light) (รูปที่ 17)

(N) T-T-T-X- U^{Py} -X-T-T-T (C)	PNA1: X = T; PNA2: X = A; PNA3: X = G; PNA4: X = C
(3') A-A-A-Y- Z -Y-A-A-A (5')	DNA1a: Y = A; Z = A; DNA1b: Y = A; Z = T DNA1c: Y = A; Z = C; DNA1d: Y = A; Z = G DNA2: Y = T; Z = A; DNA3: Y = C; Z = A DNA4: Y = G; Z = A
(N) T-T-T-T-T-C- U^{Py} -C-T-T-T-T (C)	PNA5
(3') A-A-A-A-A-G- T -G-A-A-A-A (5')	DNA5
(N) A-G-T-T-A- U^{Py} -C-C-C-T-G-C (C)	PNA6
(3') T-C-A-A-T- X - Y -G-G-A-C-G (5')	DNA6a: X = A; Y = G (complementary) DNA6b: X = C; Y = G (C mismatch) DNA6c: X = G; Y = G (G mismatch) DNA6d: X = T; Y = G (T mismatch) DNA6e: X = A; Y = A (indirect mismatched) DNA6f: X = G; Z = A (double mismatched)
(N) C-T-A-A-X- U^{Py} -T-C-A-G-A (C)	PNA7: X = A; PNA8: X = T
(3') G-A-T-T-Y- A - A -G-T-C-T (5')	DNA7: Y = T; DNA8: Y = A
(N) U^{Py} -T-T-T-T-T-T-T-T (C)	PNA9
(3') A -A-A-A-A-A-A-A (5')	DNA9

รูปที่ 15 ลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 16 Absorption (A) และ fluorescence spectra (B) ของ **PNA1** และไฮบริดของมันกับ **DNA1a–1d**
conditions: 2.5 μM PNA, 3.0 μM DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, $\lambda_{\text{excit}} = 350 \text{ nm}$.

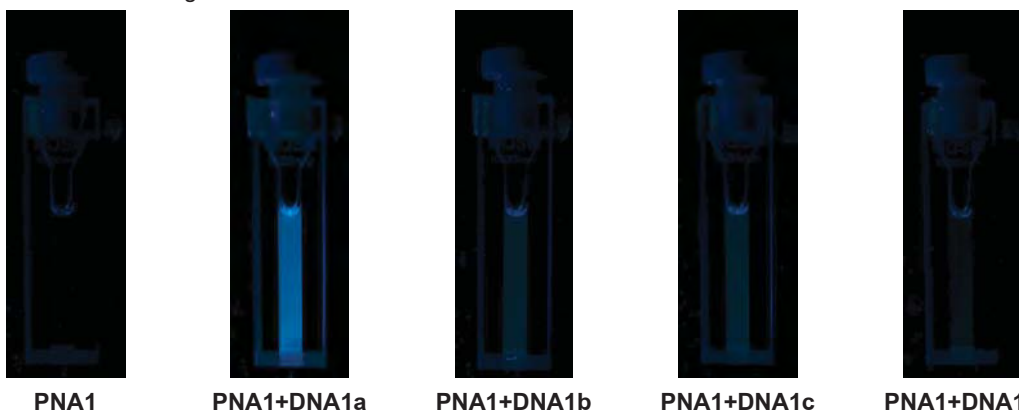
ตารางที่ 9 สรุปค่า T_m และสมบัติเชิงแสงของ **PNA1** และไฮบริดของมันกับดีเอ็นเอ

Entry	System	T_m ($^{\circ}\text{C}$) ^a	Φ_F ^b	$I_{465}(\text{ds})/I_{465}(\text{ss})$ ^c	Note
1	PNA1	-	0.006	-	ss, TU^{PyT}
2	PNA1+DNA1a	65.8	0.131	41.9	ds, complementary
3	PNA1+DNA1b	< 20	0.022	5.3	ds, mismatched
4	PNA1+DNA1c	< 20	0.039	8.7	ds, mismatched
5	PNA1+DNA1d	< 20	0.013	3.0	ds, mismatched

^a conditions: 2.5 μM PNA, 3.0 μM DNA, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0

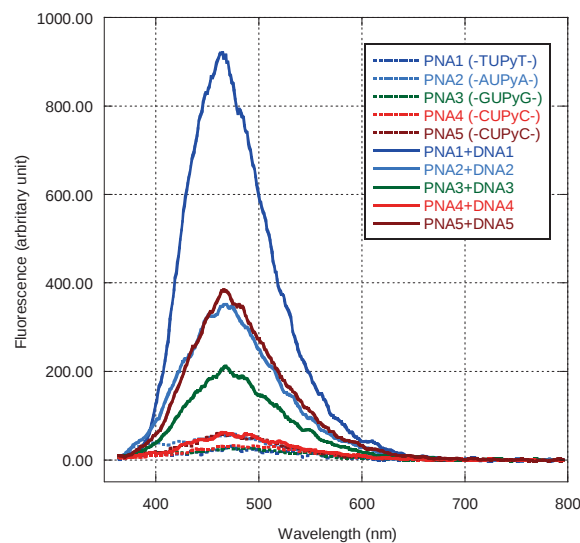
^b measured using quinine sulfate ($\Phi_F = 0.546$) as standard, $\lambda_{\text{excit}} = 350 \text{ nm}$

^c non-two-state melting curve



รูปที่ 17 ภาพถ่ายภายใต้ UV light เพื่อเปรียบเทียบการเรืองแสงของ **PNA1** และไฮบริดของมันกับ **DNA1a–1d**
conditions: 2.5 μM PNA, 3.0 μM DNA, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0.

การศึกษาค่า T_m แสดงให้เห็นว่า **PNA4** ที่มีเบสข้างเคียงหมู่ U^{Py} เป็น C/C นั้นไม่เกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม แสดงว่าการเรืองแสงที่ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนนี้จะเกิดจากการที่พีเอ็นเอไม่สามารถเกิดไฮบริด ไม่ใช่ไฮบริดที่เกิดขึ้นไม่เรืองแสง ซึ่งไม่เป็นที่น่าประหลาดใจเท่าใดนักเนื่องจากผลการศึกษาในระบบ acpcPNA ได้พบมาก่อนหน้านี้แล้วว่าเมื่อพีเอ็นเอชนิดนี้มีเบส TC หรือ C/T ในตำแหน่งที่ติดกันความเสถียรของไฮบริดที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอคู่สมจะต่ำกว่าปกติ โดยในกรณีของพีเอ็นเอ T_4CT_4 ที่ไม่ได้มีการดัดแปลงใดๆ จะมี T_m ของไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สม (A_4GA_4) อยู่ที่ $53.5^\circ C$ เทียบกับพีเอ็นเอ T_9 ซึ่งมี T_m ของไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมสูงถึง $76.8^\circ C$ ($1 \mu M$ PNA, 0 mM NaCl in 10 mM sodium phosphate buffer) [Srisuwannaket and Vilaivan, 2006] การเพิ่มหมู่ไพรีนเข้าไปยังทำให้ความเสถียรของไฮบริดที่เกิดขึ้นลดลงไปอีก เพื่อแก้ปัญหาข้างต้นจึงต้องเพิ่ม T เข้าไปที่ปลายทั้งสองด้านของ **PNA4** ให้เป็น **PNA5** ที่มีความยาว 13 เบส พบว่าในกรณีของ **PNA5** นี้สามารถเกิดไฮบริดที่เสถียรกับดีเอ็นเอคู่สมได้ และไฮบริดที่เกิดขึ้นมีการการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นจากเมื่อเป็นสายเดี่ยวอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเรืองแสงของไฮบริดจะอยู่ที่ $T/T >> C/C \sim A/A > G/G$ ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับ redox potential ของเบสข้างเคียง (T – most easily reduced, G – most easily oxidized) [Manoharan et al, 1995] แม้การเรืองแสงของ U^{Py} ฟลูออโรฟอร์ในพีเอ็นเอทั้งในสภาพสายเดี่ยวและไฮบริด รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงจะขึ้นอยู่กับเบสข้างเคียง แต่ผลที่ได้ก็แสดงให้เห็นว่าในทุกกรณีจะมีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงในทิศทางเดียวกันคือการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดไฮบริด (fluorescence turn-on) ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พบเสมอไปในดีเอ็นเอที่มีเบสเรืองแสงชนิดอื่นๆ



รูปที่ 18 Fluorescence spectra ของ **PNA2–5** และไฮบริดของมันกับ **DNA2–5** conditions: $2.5 \mu M$ PNA, $3.0 \mu M$ DNA, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, $\lambda_{excit} = 350 \text{ nm}$.

แม้ผลการศึกษาเกี่ยวกับ **PNA1** จะเป็นที่น่าสนใจ แต่ในการใช้งานจริงพีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องจะมีลำดับเบสที่ซับซ้อนกว่านี้มาก การทดลองต่อไปจึงได้ศึกษากับพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสม **PNA6** ที่มีเบส U^{Py} อยู่ตรงกลางสาย (ระหว่างเบส A และ C) พบว่าเมื่อเกิดการไฮบริดไคซ์กับ **DNA6a** ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกันจะมีการเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึง 6.5 เท่า เมื่อเทียบกับ **PNA6** ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว ในขณะที่การไฮบริดไคซ์กับ single mismatched DNA targets **DNA6b–6d** ที่มี mismatched base ตรงกับตำแหน่งของ U^{Py} พอดีจะไม่ทำให้การเรืองแสงเปลี่ยนแปลงไปมากนัก โดย G-mismatched จะทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเทียบกับ

mismatched base อื่นๆ คือ 1.6 เท่าเมื่อเทียบกับ **PNA6** สายเดี่ยว แต่ก็ยังมีความแตกต่างจาก complementary target อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเบส U^{Py} ใน acpcPNA แสดงความเป็น base discriminating fluorophore (BDF) กล่าวคือสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างเบส A ซึ่งเป็นเบสคู่สมของมัน กับเบสอื่นในดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยไม่ขึ้นกับเบสข้างเคียง

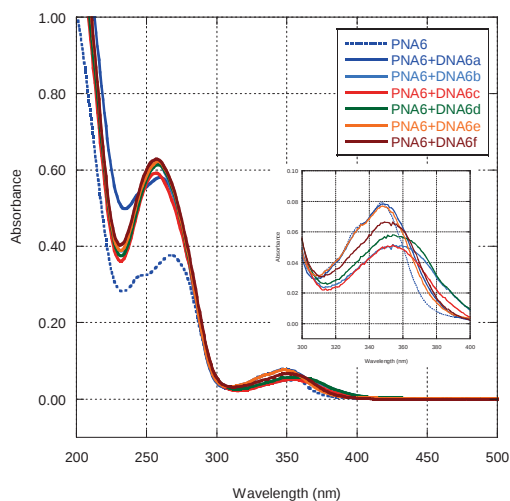
ตารางที่ 10 T_m และสมบัติเชิงแสงของ **PNA2–5** และไฮบริดของมันกับดีเอ็นเอ

Entry	System	T_m (°C) ^a	Φ_F ^b	$I_{465}(ds)/I_{465}(ss)$ ^c	Note
1	PNA2	-	0.011	-	ss, AU ^{Py} A
2	PNA2+DNA2	60.2	0.051	6.2	ds, complementary
3	PNA3	-	0.006	-	ss, GU ^{Py} G
4	PNA3+DNA3	54.1	0.032	8.3	ds, complementary
5	PNA4	-	0.006	-	ss, CU ^{Py} C
6	PNA4+DNA4	< 20	0.010	2.0	ds, complementary
7	PNA5	-	0.009	-	ss, CU ^{Py} C (extended)
8	PNA5+DNA5	72.7	0.048	6.8	ds, complementary

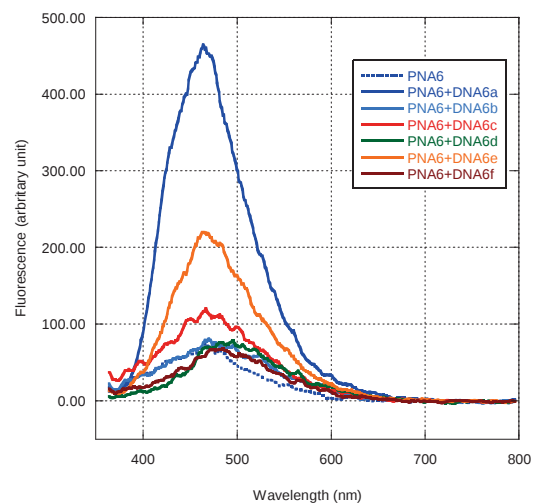
^a conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0

^b measured using quinine sulfate ($\Phi_F = 0.546$) as standard, $\lambda_{excit} = 350$ nm

^c non-two-state melting curve



(A)



(B)

รูปที่ 19 Absorption (A) และ fluorescence spectra (B) ของ **PNA6** และไฮบริดของกับ **DNA6a–6f** conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, $\lambda_{excit} = 350$ nm.