

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 6 การประยุกต์โมเลกุล PNA สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ เกษตร และอาหาร

ส่วนที่ 1 บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เป็นหัวใจสำคัญการตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีที่ประยุกต์ใช้ตอบโจทย์ทางการแพทย์ การแพทย์ทางเกษตรและอาหาร และเป็นที่ยอมรับในทางนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากการตรวจสอบพันธุกรรมให้ข้อมูลที่จำเพาะของลำดับทางพันธุกรรมทั้งในรูปโมเลกุลดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ในอดีตการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมดำเนินการโดยอาศัยความจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างคู่ไพรเมอร์และสารพันธุกรรมเป้าหมายผ่านเทคนิค PCR หรือการเชื่อมโยงบกับเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) ที่จับตัวแบบจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจดจำ หรือ การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ nucleic acid hybridization หรือ microsequencing เทคนิคเหล่านี้แม้ให้ผลที่มีความจำเพาะและแม่นยำแต่การดำเนินการมีกระบวนการที่ซับซ้อน ใช้เวลา และที่สำคัญต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการและความชำนาญการ ทำให้เกิดข้อจำกัดในกรณีที่ต้องตอบโจทย์การวิเคราะห์ในรูปแบบ point of care test

เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (peptide nucleic acid, PNA) แสดงสมบัติจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ ไม่ต่างจากดีเอ็นเอทั่วไปแต่กลับมีแรงยึดจับ (affinity) สูงกว่า ให้ความจำเพาะมากกว่า และเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะแม้ที่อุณหภูมิห้อง เปิดโอกาสให้เกิดการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ทำได้ด้วยความเร็ว แม่นยำ ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากและการพึ่งพาห้องปฏิบัติการลง

โครงการย่อยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ โดยเชื่อมโยงเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิเดียวในการเพิ่มสัญญาณทางพันธุกรรม และพัฒนาระบบการตรวจสัญญาณสารพันธุกรรมโดยใช้เบต้าโรติตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นโพรบและตรวจสัญญาณผ่านการเรืองแสง (fluorescence) หรือการเปลี่ยนสีทางแสง (colorimetry) อาศัยข้อได้เปรียบทางเทคนิค LAMP สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายในเวลาน้อยกว่า 40 นาที ที่อุณหภูมิคงที่ โดยให้ความจำเพาะสูงเนื่องจากอาศัยชุดของไพรเมอร์ที่จับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากถึง 6 บริเวณและการยืนยันผลโดยเบต้าโรติตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นโพรบ เข้าทำปฏิกิริยา hybridization ที่อุณหภูมิห้อง

ในระบบการตรวจแบบเรืองแสง การจับตัวของโพรบและการแสดงผลดำเนินการโดยการติดฉลากบริเวณ N' ของเพปไทด์นิวคลีอิก ด้วยฟลูออโรฟอร์ชนิด FAM ร่วมกับโมเลกุลแข่งขันที่ได้จากการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ขนาด 5-6 นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากบริเวณ 3' ด้วยฟลูออโรฟอร์ชนิด BHQ เนื่องจากโครงสร้างของ PNA ไม่มีประจุ โพรบเมื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วจึงไม่เกิดแรงผลัก ทำให้ปรากฏการณ์ hybridization เกิดขึ้นด้วยความจำเพาะสูง การจับตัวเริ่มจากการนำโมเลกุลควอนเซอร์ไปจับกับโพรบก่อน ยังผลให้ไม่เกิดการเรืองแสง และเมื่อใดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย จะเกิดการจับตัวของโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีเสถียรภาพมากกว่า ส่งผลให้โพรบแยกออกจากควอนเซอร์ จึงทำให้ FAM group ที่ใช้เป็นฟลูออโรฟอร์หลุดออกเป็นอิสระ ไม่เกิดปรากฏการณ์ fluorescence resonance energy transfer (FRET) ขึ้น จึงเกิดการเรืองแสงที่ชัดเจนและช่วยให้การตรวจ ทำได้นอกห้องปฏิบัติการ

สำหรับระบบการเปลี่ยนสีทางแสงของสารละลายอนุภาคนาโนของโลหะ การจับตัวของโพรบบนอนุภาค กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอนุภาค ทำให้อนุภาคเข้าใกล้ชิดกันมากขึ้นเนื่องจากโพรบทำหน้าที่เป็น coagulant เกิดการเปลี่ยนแปลงคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของแสง ทำให้เกิดการหักเหด้วยแฉะและมีความยาวคลื่นที่เปลี่ยนแปลงไป แต่ในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ดีเอ็นเอเป้าหมายจะจับตัวกับโพรบส่งผลให้เกิด hybridization complex ที่เป็น double strand helix จึงทำให้เกิดการปกป้องอนุภาคไม่ให้มาเกาะตัวกันในยามที่มีเกลือเป็นตัวกระตุ้นจึงทำให้อนุภาคไม่เกิดการเปลี่ยนสี ในกรณีอนุภาคนาโนทองคำตัวอย่างที่แสดงผลบวกให้สีแดงขณะที่ตัวอย่างให้ผลลบให้สีม่วง

ด้วยระบบดังกล่าวได้พัฒนาองค์ความรู้สำหรับการตรวจตรวจยีน neuraminidase ของ 2009 H1N1 human influenza A virus คือยา oseltamivir และ ระบบการตรวจไวรัสซิกุนกุนยาสำหรับการประยุกต์ทางการแพทย์และการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัสกึ่ง white spot syndrome virus (WSSV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ระบบการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัส pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaV) สายพันธุ์ 1 และ 2 และการตรวจการสุกแก่ทางสรีระวิทยาผ่านการแสดงออกของยีน AcSUT1 สำหรับการประยุกต์ทางเกษตร ให้สามารถดำเนินการได้ในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ด้วยความแม่นยำ และลดระดับการพึ่งพาห้องปฏิบัติการลง

ส่วนที่ 2 เนื้อหากิจกรรมที่ได้ดำเนินการ

กิจกรรมเป้าหมายตามแผนงาน	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ	ผลสัมฤทธิ์
1. การศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และยีนที่ใช้ในการจำแนกเป้าหมายเพื่อการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ เกษตร และอาหาร โดยการวิเคราะห์ผ่านโปรแกรมการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยคอมพิวเตอร์	ได้ดำเนินการศึกษายีนที่คาดว่าจะใช้เป็นเป้าหมายเปรียบเทียบและค้นหา domain ของยีนที่ต้องการ *** ได้ออกแบบ และคัดเลือกและตรวจสอบไพรเมอร์สำหรับตรวจจีโนมและสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ***	เป็นไปตามแผน โดยได้ระบบที่ต้องการพัฒนา 5 ระบบ หากเทียบเป็นผลสัมฤทธิ์ให้ผลลัพธ์ที่มากกว่าที่เสนอในแผนงาน
2. การโคลนยีนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์	ได้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และโคลนยีนสำหรับการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	เป็นไปตามแผน
3. การเก็บตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม	ได้ดำเนินการเก็บรวบรวมตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรมที่สอดคล้องกับระบบ	เป็นไปตามแผน
4. การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม บนหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิเดียว	ได้ดำเนินการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	เป็นไปตามแผน
5. การพัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิง	ได้ดำเนินการเพิ่มปริมาณโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิง***	เป็นไปตามแผน
6. การออกแบบ PNA โพรบและการพัฒนาระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ	ได้ออกแบบ DNA/PNA โพรบสำหรับการตรวจและได้พัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณผ่านการเรืองแสงของ PNA และการเปลี่ยนสีของตะกอนอนุภาคนาโนของโลหะผ่านการเชื่อมโยงระบบและทดสอบปฏิกิริยา nucleic acid hybridization***	เป็นไปตามแผน โดยได้ระบบที่ต้องการพัฒนา 5 ระบบ หากเทียบเป็นผลสัมฤทธิ์ให้ผลลัพธ์ที่มากกว่าที่เสนอในแผนงาน
7. การเชื่อมโยงและประเมินระบบการตรวจผ่านการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการตรวจสัญญาณสารพันธุกรรม	ได้ระบบที่เป็นพื้นฐานในการต่อยอดเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป***	เป็นไปตามแผน
8. การทดสอบปฏิกิริยาและการทดสอบการใช้งาน	ได้ดำเนินการตรวจสอบการใช้งานจากตัวอย่างจริง	เป็นไปตามแผน

หมายเหตุ * สำหรับการประยุกต์ทางการแพทย์ใช้ระบบการตรวจยีน neuraminidase ของ 2009 H1N1 human influenza A virus คือยา oseltamivir และ ระบบการตรวจไวรัสซิกุนกุนยา

** สำหรับการประยุกต์ทางการเกษตรใช้ระบบการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัสกึ่ง white spot syndrome virus (WSSV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ระบบการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัส pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaV) สายพันธุ์ 1 และ 2 และการตรวจการสุกแก่ทางสรีรวิทยาผ่านการแสดงออกของยีน AcSUT1

ส่วนที่ 3 รายงานผลการดำเนินงาน

1. บทนำ

การตรวจสอบพันธุกรรมเป็นกุญแจสำคัญในเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ที่ประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และการเกษตร เนื่องจากการตรวจสอบพันธุกรรมให้ข้อมูลที่จำเพาะไปยังลำดับทางพันธุกรรมทั้งในรูปโมเลกุลดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ที่เชื่อมโยงกับประเด็นปัญหาไม่ว่าจะเป็นโรคหรือเรื่องการเปลี่ยนแปลงทางปัจจัยพันธุกรรม

นับตั้งแต่การค้นพบโครงสร้างดีเอ็นเอเกลียวคู่โดย Watson และ Click ในปี 1953 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเริ่มจากการพัฒนาเทคนิค PCR ที่อาศัยความจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างคู่ไพรเมอร์และสารพันธุกรรมเป้าหมาย ไปจนถึงการเชื่อมโยงกับเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) ที่การจับตัวเป็นแบบจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำ หรือการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ nucleic acid hybridization เหล่านี้ทำให้การตรวจความจำเพาะ หรือแม้กระทั่งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการทำ micro sequencing โดยตรง เทคนิคเหล่านี้แม้ให้ผลที่มีความจำเพาะและแม่นยำแต่อย่างไรก็ดี การดำเนินการมีกระบวนการที่ซับซ้อน ใช้เวลา

การค้นพบดีเอ็นเอสังเคราะห์ (DNA analog) ในรูปเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (peptide nucleic acid, PNA) ที่มีคุณสมบัติการจับตัวล้อตามการจับตัวแบบคู่สมของสารพันธุกรรม โดยทั่วไปแต่กลับมีแรงยึดจับ (affinity) สูงกว่า ให้ความจำเพาะมากกว่า ทำให้เปิดโอกาสให้การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ทำได้ด้วยความแม่นยำ จำเพาะสูง และลดขั้นตอนที่ยุ่งยากลง

โครงการย่อยที่ 6a เน้นการนำเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด ในรูปแบบตัวพอลิไดนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โดยเชื่อมโยงกับหลักการทางไบโอเซ็นเซอร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำหลักการมาประยุกต์เพื่อตอบปัญหาการตรวจในระบบที่ง่ายและรวดเร็ว

อาศัยความจำเพาะในการจับตัวระหว่าง PNA และสารพันธุกรรมเป้าหมาย บนหลักการ nucleic acid hybridization technology ที่ PNA มีความโดดเด่นกว่าในแง่ความแน่นในการจับตัว และความจำเพาะในระดับยิ่งยวด ในภาวะการทดสอบที่ควบคุมได้ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม แม้ในการศึกษาจะครอบคลุมการศึกษาหลายระดับตั้งแต่การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ และปัญหาในภาคการเกษตรและอาหาร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อโคลนยีนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ สัญญาณดีเอ็นเอ การเก็บตัวอย่าง เพื่อการทดสอบ การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอ การพัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อใช้อ้างอิง การพัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอในรูปแบบต่างๆ การเชื่อมโยงระบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเข้ากับระบบการตรวจสอบสัญญาณ และการปรับปรุงปฏิกิริยาและการประเมินการใช้งาน แต่เนื่องจากการพัฒนาองค์ความรู้สำหรับการตรวจ

วิเคราะห์ อยู่บนพื้นฐานของการตอบโจทย์ปัญหาประยุกต์ ทั้งในด้านการแพทย์ และการเกษตร และอาหาร ดังนั้น ในรายงานจึงได้สรุปเนื้อหา เป็น 3 ส่วน โดยนำทั้งหมดมารายงานรวมกันในแต่ละระบบได้แก่

- 1) การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอุณหภูมิระนาบเดียว ในส่วนนี้ ครอบคลุมการสืบค้นข้อมูลเพื่อตอบโจทย์ปัญหา การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การโคลนยีนเพื่อใช้เป็นโมเลกุลอ้างอิง การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่สนองตอบโจทย์ปัญหาทางการแพทย์และการเกษตร
- 2) การพัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ เน้นการแสดงในรูปการเรืองแสง บนพื้นฐาน fluorescence resonance energy transfer (FRET) หรือการเปลี่ยนแปลงสีทางแสง colorimetric measurement ของอนุภาคนาโนของโลหะ
- 3) การเชื่อมโยงระบบ ข้อ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน และการทดสอบประเมินผลปฏิกิริยา

โดยรายงานทั้งสามส่วนพร้อมกันเป็นแต่ละกรณีตามประเด็นปัญหาวิจัยที่ปรากฏ

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ โดยการออกแบบระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างง่ายและรวดเร็ว และระบบการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยการใช้ไพรเมอร์ในรูปอนุาลอกดีเอ็นเอที่เป็นเบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด เพื่อตอบสนองการตรวจแบบ point of care สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์และด้านอาหารและการเกษตร

3. วิธีการทดลอง

3.1 รวบรวมข้อมูล

สำรวจประเด็นปัญหาทางการแพทย์รวบรวมข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากธนาคารข้อมูลนิวคลีโอไทด์ GenBank และเปรียบเทียบด้วยการทำ alignment ด้วย Clustal และ Blastn

3.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบและการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูบด้วยอุณหภูมิเดียว

เงื่อนไขวิธีการดำเนินการทดลองออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแบบลูบด้วยอุณหภูมิเดียวเพื่อให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายโดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากธนาคารข้อมูลนิวคลีโอไทด์ GenBank เพื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์โดยโปรแกรม Explorer V4 (Fujitsu, Japan) ประกอบปฏิกิริยาด้วยปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์คู่ใน 5-10 พิโคโมล, ไพร์เมอร์คู่นอก 40-80 พิโคโมล, เอนไซม์ *Bst* DNA

polymerase 6-12 ยูนิต, $MgSO_4$ 2-8 มิลลิโมล, betaine 0.8-1.2 โมล, dNTP 1-1.4 มิลลิโมล และดีเอ็นเอต้นแบบ ในช่วง 50 – 100 นาโนกรัม หรือร่วมกับ AMV reverse transcriptase 40-200 ยูนิต จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และนำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบผลโดยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.3 การตรวจสอบยืนยันเปรียบเทียบด้วยวิธี PCR

สำหรับการเปรียบเทียบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อ้างอิงจากรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้า ควบคู่กับผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนำดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาตรวจสอบผลโดยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.4 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อสร้างโมเลกุลอ้างอิง

โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณในข้อ 3.3 ได้ด้วยวิธี TA cloning ตามวิธีที่รายงานในเอกสารประกอบชุดตรวจสำเร็จรูป pGEM[®]-T Easy vector system I โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) และนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลว LB broth เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ได้มาเกลี่ยในอาหารแบคทีเรียแข็งที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบคัดเลือกโคลนที่ได้โดยการทำ colony direction PCR (Grunenwald, 2001) ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี large scale plasmid preparation ตามที่รายงานใน Sambrook *et al.* (1989) นำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pen m 2* ในคริสต์เชียน

3.5 การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว โดยใช้ชุดไพรเมอร์เป้าหมายที่ออกแบบไว้ข้างต้น ดำเนินการโดยปฏิกิริยาและ ขั้นตอนเป็นข้อ 3.2 แล้วจึงประเมินศักยภาพของวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวยุติเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่มีผู้รายงานไว้

- การตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยาเมื่อใช้ตัวอย่างเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอชุดทดสอบ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้แล้วนำไปเปรียบเทียบผลกับผลที่ได้จากวิธีมาตรฐานที่ใช้ PCR

- การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากพลาสมิดที่ใช้ในข้อ 3.4 โดยแปรผันพลาสมิดที่ทราบจำนวนชุดของดีเอ็นเอจากมากไปหาน้อย (10^6 - 1 ชุด) ตามลำดับ (Anthony, 2000) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และเปรียบเทียบผลกับผลที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

3.6 การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยวัดการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงด้วยการตรวจสอบการเรืองแสง

ในการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเพิ่มปริมาณสัญญาณด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว จะใช้ดีเอ็นเอเอนาลอกโพรบชนิดเบต้าฟิโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดจากวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายของแต่ละระบบ โพรบสังเคราะห์โดยวิธีการสังเคราะห์แบบ Fmoc solid-phase peptide synthesis (Suparpprom *et al.*, 2005, Vilaivan and Srisuwannaket, 2006) และติดฉลากโพรบด้วยฟลูออโรฟอร์ FAM โมเลกุลควอนเซอร์ได้จากการสังเคราะห์โดยบริษัท (Biobasic, Canada) หลักการของการแสดงผลการเรืองแสงของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลควอนเซอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนพื้นฐานหลักการ FRET (fluorescence resonance energy transferred) ดีเอ็นเอเป้าหมาย จะถูกตรวจจับสัญญาณได้จากปฏิกิริยาการเรืองแสง โดยชนิด ปริมาตรและความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยา ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอนาลอกโพรบ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ควอนเซอร์ 3 ไมโครโมลาร์ ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว 1 ไมโครลิตร ละลายในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตการณ์เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

3.7 การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยวัดการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงด้วยอนุภาคทองคำนาโน

การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเออยู่บนพื้นฐานของการทำ nucleic acid hybridization ระหว่าง DNA-DNA analog probe complex ชนิดเบต้าฟิโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดโดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย อนุภาคทองคำนาโน ขนาด 30 นาโนเมตร ความเข้มข้น 1,200 ppm 5-10 ไมโครลิตร Pienpinijtham *et al.* (2010) ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคลูปอุณหภูมิเดียวในข้อ 3.2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอนาลอกโพรบ 1 ไมโครลิตร ภายใต้การควบคุมปริมาณเกลือความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนภายใน 5 นาที พร้อมทั้งดำเนินการหาความจำเพาะของปฏิกิริยา ความไวของปฏิกิริยา และ การตรวจหาเป้าหมายโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 3.2

4. ผลการวิจัย

4.1 การประยุกต์ใช้เบต้าโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดในทางการแพทย์

ในปัจจุบัน ปัญหาของโรคอุบัติใหม่ และโรคอุบัติซ้ำ กลายเป็นปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและความมั่นคงทางสุขภาพของประชากรโลก โดยเฉพาะการเกิดขึ้นของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 การระบาดของเชื้อ human influenza A virus 2009 อย่างรวดเร็วและในบางรายที่พบการติดเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (WHO, 2009a) ส่งผลให้เกิดการระบาดรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ การกลับมาระบาดของอีกครั้งของโรคชิคุนกุนยา (chikungunya) การระบาดของเชื้อ enterovirus ในหลายประเทศ การกลายพันธุ์ของไวรัสหวัดนกไปสู่สายพันธุ์ที่รุนแรงและระบาดไปทั่ว การกลับมาของการระบาดของกลุ่มเชื้อวัณโรค เหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงความจำเป็นในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อให้ได้อย่างรวดเร็ว

ในปัจจุบัน การดำเนินการทางการแพทย์ต่อการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อมักเน้นการตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยเทคนิค PCR โดยเฉพาะด้วยเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องพึ่งพาเครื่องมือและความชำนาญทางเทคนิค และเป็นเทคนิคที่การใช้งานจำกัดอยู่เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเท่านั้น (Centers for Disease Control and Prevention, 2009) การตรวจสอบสายพันธุ์จำเพาะด้วยแนวคิดใหม่ที่ลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการและการพึ่งพาเครื่องมือและความชำนาญทางเทคนิคจึงมีความสำคัญ

การตรวจสอบพันธุกรรมบนพื้นฐานโมเลกุลในทางปฏิบัติจะประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้อตัวอย่าง การเพิ่มปริมาณสัญญาณของกรดนิวคลีอิกผ่านการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย และการตรวจสอบสัญญาณของกรดนิวคลีอิกเพื่อแสดงผล การสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้อตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ได้รับการพัฒนาไปมาก วิธีการสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ซับซ้อนอ้างอิงตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้รายงานไว้ในแหล่งข้อมูลต่างๆ เช่น CDC หรือตามที่ปรากฏในวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานตามเอกสารแนะนำของแต่ละประเทศ ส่วนใหญ่มักจะพบว่าสามารถนำหลักการและวิธีมาปรับแต่งให้มีความสะดวก เหมาะสม ง่าย และมีประสิทธิภาพ สอดคล้องไปกับตัวอย่างที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ได้ไม่ยากนัก หากมีความรู้ความเข้าใจก็จะสามารถปรับแต่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อตัวอย่างแต่ละชนิดได้ ดังนั้นการพัฒนาการตรวจจึงเน้นไปที่การเพิ่มปริมาณสัญญาณของกรดนิวคลีอิกผ่านการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย และการตรวจสอบสัญญาณของกรดนิวคลีอิกเพื่อแสดงผลแทน

การเพิ่มปริมาณสัญญาณของกรดนิวคลีอิก ผ่านการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมายให้มีจำนวนมาก (amplification) นั้นในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสหรือ PCR (Polymerase Chain Reaction) มาใช้ ตัวเทคนิคมีบทบาทอย่างมากในงานวิจัยสาขาต่างๆ ช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายใดๆ ที่นักวิทยาศาสตร์สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพอย่างไม่เคยมีมาก่อน

โดยหลักการ เทคนิค PCR นี้เลียนแบบการจำลองดีเอ็นเอในธรรมชาติ โดยอาศัย เอนไซม์ DNA polymerase ทนร้อน กลไกเริ่มจากการคลายเกลียวของดีเอ็นเอแม่แบบด้วยความร้อนทดแทนการทำหน้าที่ของเอนไซม์ helicase และ topoisomerase จนได้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นสายเดี่ยว ssDNA จากนั้นอาศัยความจำเพาะของดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่เป็น oligonucleotide primer แทนการสังเคราะห์ RNA primer ในธรรมชาติโดยเอนไซม์ primase ช่วยให้เกิดการจับตัวระหว่าง oligonucleotide primer กับดีเอ็นเอแม่แบบภายหลังการลดอุณหภูมิลง เมื่อไพรเมอร์มาจับตัวกับดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นสายเดี่ยวที่ได้จากขั้นตอนแรก บริเวณปลาย 3' ของ primer จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวออกไปด้วยปฏิกิริยา polymerization โดยพอลิเมอร์เรสทนร้อนที่เรียกว่า thermophilic DNA polymerase โดยใช้ dNTP เป็นวัตถุดิบ ทั้ง 3 ขั้นตอนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน การคลายเกลียวที่เรียกว่า denaturation จะดำเนินการที่ 50-53 °C การชักนำให้ไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอแม่แบบเรียกว่า annealing จะดำเนินการที่ 50-55 °C และท้ายสุดการต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นเรียกว่า extension จะดำเนินการที่อุณหภูมิ 70-73 °C ในหนึ่งรอบดีเอ็นเอจะเพิ่มจาก 1 เป็น 2 และเมื่อครบ 30 รอบ จะเพิ่มดีเอ็นเอได้ในระดับ 1030 ล้านโมเลกุล ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ต้องขึ้นกับระบบการควบคุมอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับให้แม่นยำอยู่ตลอดเวลา การควบคุมอุณหภูมิอยู่นี้ดำเนินการในรูปอุปกรณ์เฉพาะที่รู้จักในนาม thermo cycler (Saiki, 1988)

การที่ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้องผูกติดกับระบบควบคุมอุณหภูมิ ทำให้การดำเนินการต้องลงทุนด้านเครื่องมือ ซึ่งปัจจุบันมีราคาไม่น้อยกว่า 3-4 แสนบาทสำหรับตัวมาตรฐาน และต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่อาจนานถึง 3-4 ชั่วโมง ต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะความชำนาญ และต้องเสริมด้วยเทคนิคบางเทคนิคในการวิเคราะห์ วินิจฉัยและสรุปผล เหล่านี้ทำให้ไม่สามารถตอบสนองหลักการ point of care ที่เน้นการตรวจวิเคราะห์ที่ดำเนินการได้ในทุกที่ แม้ในคลินิกเล็กๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม ในสถานที่เกิดเหตุ หรือในไร่นา เป็นต้น

แม้ในปัจจุบัน เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อหลายชนิดในทางการแพทย์ ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าใช้งานได้เป็นอย่างดี (Lockley and Bardsley, 2000) แต่ด้วยข้อจำกัดในการนำไปใช้ข้างต้น ทำให้จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจรูปแบบใหม่ๆ เพื่อเป็นทางเลือก

นวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันส่งผลให้วิธีการตรวจมีความหลากหลายมากขึ้น ตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequence-based amplification) (Compton, 1991) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเอง (self-sustained replication) (Guatelli *et al.*, 1990) การเพิ่มปริมาณโดยใช้ปฏิกิริยาแทนที่สายดีเอ็นเอ (strand displacement amplification) และการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิระนาบเดียว (Walker *et al.*, 1992) โดยการชักนำในระบบห่วง (Loop mediated isothermal amplification) (Notomi, 2000) นอกเหนือจากนี้ยังพบว่ามีผู้คิดค้นวิธีการเพิ่มปริมาณสัญญาณที่เป็นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ได้แก่

branched DNA amplification (bDNA) invader และ rolling circle amplification (Lyamichev *et al.*, 1999 และ Lizardi *et al.*, 1998) ซึ่งเทคนิคในกลุ่มหลังจัดเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณเป้าหมาย

จากการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียทางเทคนิคพบว่า นอกจากเทคนิค PCR แล้ว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำในระบบห่วง (LAMP) มีข้อเด่นกว่าเทคนิคอื่นโดยเฉพาะการใช้อุณหภูมิระนาบเดียว (Notomi, 2000) โดยที่ไม่มีกระบวนการทางความร้อนต่างระดับอุณหภูมิ มาคลายสายดีเอ็นเอจากเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวมาเกี่ยวข้อง จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ปฏิกริยา LAMP อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่มีกิจกรรมแทนที่สายดีเอ็นเอในตัว โดยการผลักสายดีเอ็นเอเดิมให้หลุดออกและแทนที่ด้วยการสังเคราะห์สายใหม่ การใช้ไพรเมอร์ 2-3 คู่ ทำให้ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาสูงมาก มากกว่าเทคนิค PCR ที่เคยทำได้ถึง 1000 เท่าในเวลาน้อยกว่า นำให้เทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากตัวอย่างทางการแพทย์ หรือแม้กระทั่งตัวอย่างอาหารหลากหลายวัตถุดิบที่มีดีเอ็นเอหลากหลายชนิดปนกัน การที่อุณหภูมิเป็นระนาบเดียวที่ 63-65°C จึงทำให้การตรวจสอบไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติที่ใช้สำหรับ PCR ซึ่งมีข้อจำกัด จึงเหมาะอย่างยิ่งในการนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบระบบตรวจสอบให้สามารถดำเนินการได้ แม้ในสถานที่ที่ขาดความพร้อมของเครื่องมือ

การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคโดยการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ที่ใช้งานง่ายและมีประสิทธิภาพโดยพื้นฐานการวิเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ เพื่อเชื่อมโยงกับเทคนิคการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอที่ประยุกต์ใช้เบต้าฟิโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นโพรบ โดยบูรณาการเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวที่เรียกว่า LAMP พร้อมทั้งพัฒนาดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบในรูปโคลนดีเอ็นเอ เน้นการตอบโจทย์ทางการแพทย์ที่สำคัญดังนี้

4.1.1 พัฒนาการตรวจสอบไข้หวัดชนิด 2009 human influenza A virus สายพันธุ์ตื้อยา Oseltamivir

การตรวจสอบเอกสารเบื้องต้นพบว่าไข้หวัดชนิด 2009 human influenza A virus มีแนวโน้มจะกลายพันธุ์ในยีน Neuraminidase ทำให้เกิดการดื้อต่อยา oseltamivir ได้ และเมื่อ WHO ได้รายงานการพบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่ดื้อต่อยา oseltamivir ในฮ่องกง เคนมาร์ก และญี่ปุ่น ทำให้ทั่วโลกตระหนักถึงความสำคัญ และมุ่งเน้นศึกษารูปแบบการกลายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสพันธุ์กลายเหล่านี้ (WHO, 2009b)

การกลายของเชื้อไข้หวัดที่ยีน Neuraminidase (N) ของไวรัสในกลุ่ม 1 จะพบเป็น H275Y/ N294S และในกลุ่ม 2 (N2) เป็น R292K ส่งผลต่อการดื้อยา 80 เท่าและ 700-1700 เท่า ตามลำดับ (Collin *et al.*, 2008)

การศึกษาโดย Rungrotmongkol *et al.*, (2009) ได้ทำนายทิศทางการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพของไวรัสผ่านการสร้างโมเดลทำนายค่า ΔG binding หรือ free energy พบว่าการกลายที่ตำแหน่ง N294S H275Y และ R292K เป็นตำแหน่งที่ทำให้เกิดความสามารถในการต้านทานยา oseltamivir ได้ดีตามลำดับ

การพัฒนาการตรวจสอบสายพันธุ์กลายเน้นการพัฒนาเทคนิคที่มีความแตกต่างในเรื่องประสิทธิภาพและการใช้งานไปจาก real time PCR ที่ใช้ในปัจจุบัน เริ่มจากได้ดำเนินการสำรวจข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ 2009 human influenza A virus จากหลายแหล่งเทียบกับสายพันธุ์กลายจาก ฮองกงและเคนมาร์ก สหรัฐอเมริกา(WHO, 2009b)

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน neuraminidase ของสายพันธุ์ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ (H1N1) ทั้งหมดจากจำนวนตัวอย่างตัวแทนที่รายงานในธนาคารข้อมูล CDC 25 ชนิดจาก 120 ชนิด พบว่า สายพันธุ์ 2009 H1N1 human influenza A virus เป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ มียีน neuraminidase ต่างไปจาก H1N1 human influenza A virus เล็กน้อย แต่ภายในกลุ่ม 2009 H1N1 human influenza A virus มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกัน (similarity) ในระดับสูงถึง 99-100 % similarity (ภาพที่ 1.) ความคล้ายกันของสารพันธุกรรม จัดอยู่ในระดับเรียกได้ว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมด ความแตกต่างในระดับ 1% เป็นเพียงความแตกต่างเพียง 1-2 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นเพียงการกลายในรูปแบบ transition ที่มักพบโดยทั่วไปกับยีนของไวรัส

SeqA Name	Lenght(nt)	SeqB Name	Lenght(nt)	Score (% similarity)
1 CY039988	1410	2 GQ179931	1382	99
1 CY039988	1410	3 GQ179932	1382	100
1 CY039988	1410	4 GQ150343	1438	99
1 CY039988	1410	5 GQ169381	1410	99
1 CY039988	1410	6 A/Hong	1410	99
2 GQ179931	1382	3 GQ179932	1382	99
2 GQ179931	1382	4 GQ150343	1438	99
2 GQ179931	1382	5 GQ169381	1410	99
2 GQ179931	1382	6 A/Hong	1410	99
3 GQ179932	1382	4 GQ150343	1438	99
3 GQ179932	1382	5 GQ169381	1410	99
3 GQ179932	1382	6 A/Hong	1410	99
4 GQ150343	1438	5 GQ169381	1410	100
4 GQ150343	1438	6 A/Hong	1410	99
5 GQ169381	1410	6 A/Hong	1410	99

ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน neuraminidase ระหว่างสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 โดยไวรัสตัวแทนแต่ละสายพันธุ์ระบุด้วยหมายเลข accession number ในส่วนสายพันธุ์กลาย (ฮองกง) ที่ต้านทาน oseltamivir ระบุเป็น A/Hong

อย่างไรก็ดีหากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับไวรัสสายพันธุ์ที่ต้านทานยา oseltamivir พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่มีความคล้ายกัน ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ที่ตำแหน่ง 825 (ภาพที่ 2.)

GQ179931	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT	720
GQ179932	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT	720
CY039988	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT	720
GQ150343	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT	720
GQ169381	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT	720
A/Hong	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT	720

GQ179931	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAAG	780
GQ179932	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAAG	780
CY039988	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAAG	780
GQ150343	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAAG	780
GQ169381	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAAG	780
A/Hong	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAAG	780

275 mutation		
GQ179931	GGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
GQ179932	GGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
CY039988	GGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
GQ150343	GGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
GQ169381	GGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
A/Hong	GGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840

GQ179931	TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
GQ179932	TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
CY039988	TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
GQ150343	TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
GQ169381	TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
A/Hong	TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900

GQ179931	CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAAGATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG	960
GQ179932	CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAAGATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG	960
CY039988	CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAAGATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG	960
GQ150343	CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAAGATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG	960
GQ169381	CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAAGATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG	960
A/Hong	CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAAGATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG	960

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน neuraminidase ระหว่างสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ระหว่างสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 กับสายพันธุ์กลาย (ฮ่องกง) ที่ต้านทาน oseltamivir โดยไวรัสตัวแทนแต่ละสายพันธุ์ระบุด้วยหมายเลข accession number ในส่วนสายพันธุ์กลาย (ฮ่องกง ระบุเป็น A/Hong และ ตำแหน่งการกลายที่ 275 ระบุด้วยตัวเลข

ผลดังกล่าวจะสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 275 จาก H เป็น Y ในตำแหน่งที่เทียบเคียงได้กับการเปลี่ยนแปลงที่ต้านทานยา oseltamivir ในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ปกติ H1N1 ที่พบในแถบทวีปยุโรป และแคนาดาในหลายปีที่ผ่านมา (Meijer, *et al.*, 2009)

ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Neuraminidase ในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 และความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้สามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์ โครงการได้ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์โดยการกลายเน้นการเพิ่มสัญญาณดีเอ็นเอ (cDNA) ผ่านการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิเดียว เน้นการออกแบบที่ครอบคลุมบริเวณที่เกิดการกลาย เพื่อจะได้ใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วม

ไปกับระบบตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมที่เป็นตัวตรวจจับที่เป็นเบต้าฟิโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดในภายหลัง

การออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer Ver 4.0 (Fujitsu, Japan) และคัดเลือกผ่านเงื่อนไขเสถียรภาพทางอุณหภูมิตำแหน่งการจับตัว และโอกาสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะ ทำให้ได้ไพรเมอร์ 4 ชนิดครอบคลุม 6 บริเวณของยีน neuraminidase ดังตารางที่ 1. โดยแต่ละไพรเมอร์ มีตำแหน่งสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน neuraminidase ตำแหน่ง 718-731 752-818 904-929 และ 930-953 ตามลำดับ

ตารางที่ 1. ชุดของไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ยีน neuraminidase และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้อง

Primer name	Corresponding sequence (5'-3')	Position
09NeuraF3	ACTGTAATGACCGATGGA	718-731
09NeuraF2	TACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGG	756-781
09Neura F1c	TTAGGGGCATTTCATTCGACT	797-818
09Neura B1c	TTCTAGTGAAATCAGATGTGTGT	852-875
09NeuraB2	GTTGAAAGACACCCACGG	904-921
09NeuraB3	CATATGTATCCTATCTGATATTCCA	930-953

การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงโดยการทำ Basic Local Alignment Search พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีทั้ง 6 บริเวณ จำเพาะต่อ N1 ยีน โดยมีความสัมพันธ์ชนิด 100% กับเฉพาะ 2009 H1N1 human influenza A virus มีค่า E value 0.0002-0.10

ความสัมพันธ์ของไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นดังภาพที่ 3.

GQ179931	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACT	720
GQ179932	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACT	720
CY039988	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACT	720
GQ150343	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACT	720
GQ169381	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACT	720
A/Hong	AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACT	720

	F3	F2
GQ179931	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG	780
GQ179932	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG	780
CY039988	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG	780
GQ150343	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG	780
GQ169381	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG	780
A/Hong	GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG	780

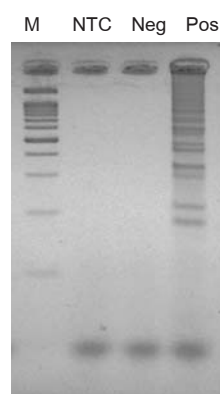
	F1c	275 mutation
GQ179931	GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
GQ179932	GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
CY039988	GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
GQ150343	GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
GQ169381	GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840
A/Hong	GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC	840

	B1c	
GQ179931	TGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCAGATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
GQ179932	TGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCAGATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900
CY039988	TGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCAGATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT	900

```
GQ150343      TGTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT  900
GQ169381      TGTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT  900
A/Hong         TGTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTATGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT  900
                *****
                B2                      B3
GQ179931      CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG  960
GQ179932      CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG  960
CY039988      CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG  960
GQ150343      CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG  960
GQ169381      CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG  960
A/Hong         CGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGG  960
                *****
```

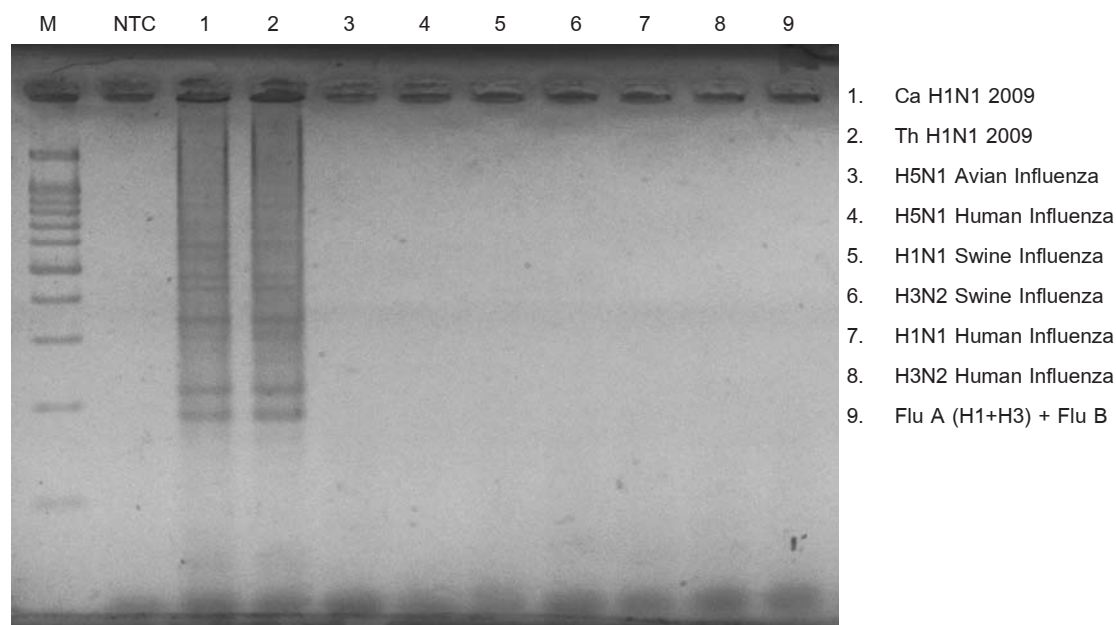
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ทุกตำแหน่งที่ออกแบบได้และบริเวณปลายของอะมีโนตำแหน่ง 275 (ตำแหน่ง 825 บนนิวคลีโอไทด์)

การทดสอบการเพิ่มจำนวนเบื้องต้นด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาที่ 63 °C 20mM Tris-HCl (pH 8.8) 10 mM KCl 10mM (NH₄)₂SO₄ 0.1% Triton X-100 ไพรเมอร์ F3 B3 ความเข้มข้น 5 pmol /ปฏิกิริยา ไพรเมอร์ FIP และ BIP ความเข้มข้น 40 pmol /ปฏิกิริยา พบว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน neuraminidase ได้โดยจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด เทียบเท่าผลคูณของ ช่วงคู่ไพรเมอร์ 180 nt (ภาพที่ 4.)



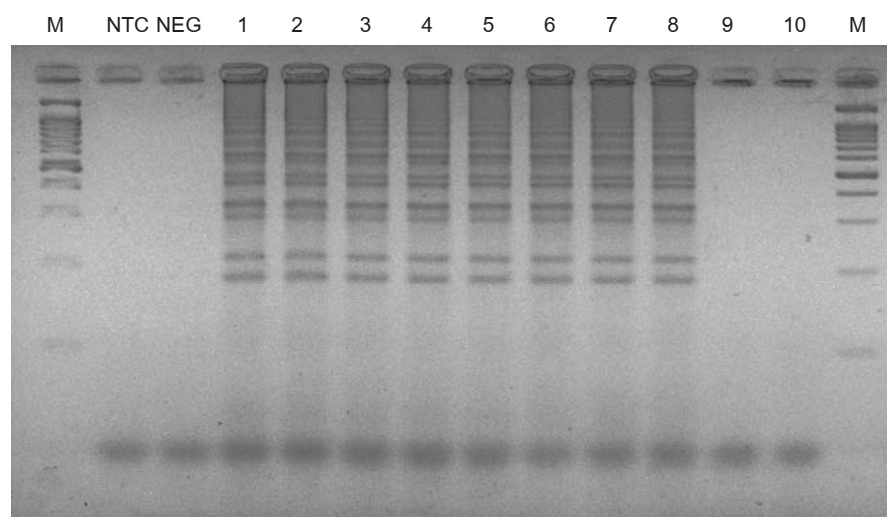
ภาพที่ 4 รูปแบบของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน neuraminidase ด้วยชุดไพรเมอร์ เลน M , มาร์กเกอร์ ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน NTC non template control เลน Neg เป็นชุดควบคุม (ยีนอื่น) และ Pos เป็นชุดควบคุมบวก (ยีน neuraminidase ของไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่)

การตรวจสอบความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของไวรัส 9 ชนิด รวมทั้งไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 2 ชนิด และไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์อื่น เช่น H1N1 H3N2 และไข้หวัดนก H5N1 ด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาเดิม พบว่าชุดไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อยีน neuraminidase ของหวัดสายพันธุ์ใหม่เท่านั้น (ภาพที่ 5.)



ภาพที่ 5 ความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ต่อเชื้อไวรัสต่างชนิด เลน M มาร์กเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน NTC non template control เลน 1-9 ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ Ca H1N1 2009 Thailand H1N1 2009 H5N1 Avian influenza H5N1 Human Influenza H1N1 Swine Influenza H3N2 Swine Influenza H1N1 Human Influenza H3N2 Human Influenza และ Flu A (H1+H3) + Flu B ตามลำดับ

การทดสอบความไวของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ต่อจำนวนความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุด(กอปปี)เจือจางลงระดับละ 10 พบว่าชุดไพรเมอร์มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอในระดับ 10^{-7} เทียบเท่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 20 ชุด/ปฏิกิริยา (ภาพที่ 6.)



ภาพที่ 6 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ เมื่อลดระดับปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบลงทีละ 10 เท่าจาก เลน 1 10000000 ชุด เลนที่ 2 1000000 ชุด เลนที่ 3 100000 เลนที่ 4 10000ชุด เลนที่ 5 1000 ชุด เลนที่ 6 500 ชุด เลนที่ 7 100 ชุด เลนที่ 8 20 ชุด เลนที่ 9 10 ชุด และเลนที่ 10 0 ชุด

จากผลการทดลองที่ได้ดำเนินการพบว่าระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน neuraminidase มีประสิทธิภาพ และสามารถเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอคร่อมบริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 825 ได้เป็นอย่างดี

การพัฒนาการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอต่อยอด ได้นำหลักการ FRET (fluorescence Resonance Energy Transfer) ระหว่าง donor กับ acceptor ในรูป PNA ที่เป็นเบด้าฟิโรลิดินิล เพปไทด์นิวคลีโอติกแอซิด

การออกแบบ Probe ที่สามารถเปลี่ยนแปลงสัญญาณการเรืองแสงขณะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมาย การเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูป การปลดปล่อยแสง emission wavelength ในขณะที่จับตัวในรูปแบบ hybridization กับดีเอ็นเอเป้าหมายภายหลังการเกิด excitation ในที่นี้เลือกใช้ปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลที่เป็น reporter และ quencher ในรูปโอลิโกเมอร์ของ PNA และ DNA ที่ติดฉลากด้วย fluorophore ในกรณีที่การจับตัวประสบความสำเร็จ quencher จะเป็นอิสระและไม่สามารถรบกวนการเรืองแสงของ reporter ได้ และหากการจับตัวไม่ประสบความสำเร็จ quencher ที่เกาะอยู่กับ reporter จะรับพลังงานของ reporter ไว้ทำให้ไม่สามารถปลดปล่อยแสงออกมาได้

การทำงานของโพรบจะได้รับการออกแบบให้จับตัวที่ตำแหน่ง 825 ซึ่งครอบคลุมบริเวณสำคัญ รอบตำแหน่งรหัสดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็น H275Y การออกแบบโพรบ PNA ได้โพรบ PNA 2 ชนิด และ quencher 2 ชนิด ดังภาพที่ 7.

```
GQ179931 AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
GQ179932 AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
CY039988 AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
GQ150343 AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
GQ169381 AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
A/Hong AACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
*****
```

```
GQ179931 GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
GQ179932 GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
CY039988 GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
GQ150343 GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
GQ169381 GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
A/Hong GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
*****
```

```
GQ179931 GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
GQ179932 GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
CY039988 GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
GQ150343 GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
GQ169381 GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
A/Hong GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
*****
```

275th mutation

5' - TTATCACTATGA - 3' ← 275
3' - AATAGTG - 5'

Internal control quencher and probe

→ 3' - GACAATA - 5'
5' - CTGTTATCCTGA - 3'

```
GQ179931 TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
GQ179932 TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
CY039988 TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
GQ150343 TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
GQ169381 TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
A/Hong TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
*****
```

Quencher and probe

ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง PNA โพรบและ quencher และปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน neuraminidase ของทั้ง 2 ระบบ

โพรบ PNA และquencher ชนิดแรกใช้สำหรับการตรวจสอบไปที่ยีน neuraminidase ของตัวอย่าง โดยโพรบได้รับการออกแบบให้จับตัวกับยีน neuraminidase และมี FAM fluorophore ที่ตำแหน่ง 5' ขณะที่ quencherได้รับการออกแบบให้จับตัวกับโพรบและมี BHQ เป็นโมเลกุลรับพลังงาน โดยทุกตัวอย่างที่เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่จะให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่จับได้กับโพรบ PNA และทุกครั้งที่การจับตัวประสบความสำเร็จ quencher ของโพรบดังกล่าวจะหลุดเป็นอิสระ ไม่สามารถรับพลังงานจากโพรบได้อีกต่อไป ส่งผลให้เกิดการเรืองแสง เรียกโพรบ PNA และquencher ชนิดแรกว่า internal control probe and quencher

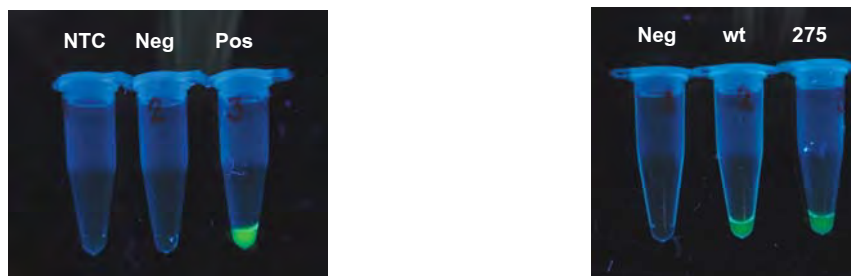
โพรบ PNA และquencher ชนิดที่สองใช้สำหรับการตรวจสอบไปที่ตำแหน่งการกลายของยีน neuraminidase ของตัวอย่างที่ตำแหน่ง 275 โดยโพรบได้รับการออกแบบให้จับตัวกับบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 818-830 และมี FAM fluorophore ที่ตำแหน่ง 5' ขณะที่ quencherได้รับการออกแบบให้จับตัวกับโพรบและมี BHQ เป็นโมเลกุลรับพลังงานเช่นเดียวกัน

รายละเอียดของโพรบและ quencher เป็นดังตารางที่ 2. การจับตัวกันของ quencher # 1 กับ internal control probe จะทำให้ไม่เกิดการเรืองแสง ทำนองเดียวกัน การจับตัวของ quencher#2 กับ target 275 mutation ไม่ทำให้เกิดการเรืองแสง และเมื่อ internal control probe จับตัวกับ target internal DNA การจับตัวจะทำให้ quencher หลุดออกเป็นอิสระ จึงทำให้ internal probe เรืองแสงได้มากที่สุด

ตารางที่ 2. PNA โพรบ และ quencher สำหรับการตรวจสอบยีน neuraminidase และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้อง

Element	detail sequence	binding position
PNA internal control	Flu-O-CTGTTATCCTG-LysNH ₂	839-851
Quencher # 1 internal control	5'-ATAACAG-3'-BHQ	839-846
PNA 275 mutation	Flu-O-TTATCACTATGA-LysNH ₂	818-830
Quencher# 2 275 mutation	5'-GTGATAA-3'-BHQ	818-825

ในการทดลองได้ทดสอบการเรืองแสงโดยจับตัวระหว่าง probe ที่เป็น internal โดยทำปฏิกิริยาระหว่าง probe ความเข้มข้น 10 μ M ปริมาตร 3 μ l จับ DNA products ที่เพิ่มปริมาณได้ โดยให้ความร้อนกับดีเอ็นเอที่ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที และปล่อยให้จับตัวที่ 50 °C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาทดสอบโดยการส่องดูด้วยแสง UV ความยาวคลื่น ● 312 nm พบว่าเฉพาะหลอดที่ให้ดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้นที่พบการเรืองแสง (ภาพที่ 8. ซ้าย) และเมื่อนำ probe และ quencher เดียวกันมาทดสอบกับตัวอย่างทั้งตัวอย่างปกติ (wild type) และตัวอย่างที่กลายพันธุ์คือออสeltaมิล (mutant) ซึ่งทั้ง ดีเอ็นเอจากทั้ง 2 ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ probe จึงทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ดังภาพที่ 8. ขวา



ภาพที่ 8 แสดงผลการจับตัวของ PNA โพรบ ชนิด internal control การตรวจในชุดควบคุม และดีเอ็นเอเป้าหมายโดยภาพซ้าย ; แสดงการจับตัวกับชุดควบคุมบวก (Pos)และลบ (Neg) และภาพขวา; แสดงการจับตัวของโพรบกับตัวอย่างยีนโดยทุกตัวอย่างแสดงการจับตัวชัดเจนและเรืองแสง

เนื่องจากบริเวณที่ใช้เป็น internal control ไม่พบการกลายพันธุ์ใดๆ ดังนั้น จากภาพชุดโพรบและquencher ที่ใช้สำหรับ internal control จึงให้ผลการเรืองแสงกับตัวอย่างที่มีเอนไซม์ neuraminidase

การทดสอบกับ probe ที่จำเพาะต่อตำแหน่งกลาย 275 ด้วยหลักการเดียวกัน พบว่าเฉพาะสายพันธุ์ที่เป็น 275 wild type ที่ไม่เกิดการกลายเท่านั้นที่ probe จับได้และจะสามารถตรวจสอบการเรืองแสงได้ชัดเจน และหากดีเอ็นเอของบริเวณตำแหน่งกลาย 275 เกิดการกลายพันธุ์หรือเป็น mutant จะพบว่าการเรืองที่เกิดขึ้นจะไม่เกิดขึ้นอีกต่อไป (ภาพที่.9.)



ภาพที่ 9 แสดงผลการจับตัวของ PNA โพรบชนิดตรวจการกลายกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ภายซ้าย แสดงการจับตัวได้ของโพรบในชุดควบคุมบวก (Pos) ที่เรืองแสง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลบ (Neg) และภาพขวา แสดงการตรวจตัวอย่างจริงโดย wt แสดงสายพันธุ์ไวรัสปกติและ 275 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอกลายพันธุ์ ทำให้โพรบไม่จับตัว จึงไม่เกิดการเรืองแสง

จากผลการทดลองทั้งหมด ทำให้ได้ระบบการตรวจสอบไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ที่กลายพันธุ์ในตำแหน่ง 275-275 ได้ภายในเวลา 60 นาที โดยระบบไม่พึ่งพาเครื่องมือราคาแพงสามารถปรับประยุกต์ไปใช้ในภาคสนามได้ และที่สำคัญไม่ต้องอาศัยความชำนาญการของผู้ปฏิบัติงานเหมือนเทคนิค real-time PCR ที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบัน

นอกจากนี้ยังได้เพิ่มเติมผลการพัฒนาระบบการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของไวรัส โดยนำอนุภาคนาโนเงินชนิดสีน้ำเงิน (blue silver nanoparticle) มาต่อยอด ซึ่งเป็นการพัฒนาระบบการตรวจที่อาศัยการประยุกต์ใช้ silver nanoparticles สีน้ำเงินเป็นครั้งแรก

ในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ nanoparticles เริ่มเป็นระบบขึ้นจากการเริ่มค้นคว้าของ Mirkin *et al.*, 1996 โดยนำปรากฏการณ์จับตัว (conjugate) ระหว่างอนุภาคนาโนกับดีเอ็นเอเป็นหลักในการพัฒนารูปแบบการตรวจ และต่อมา Li and Rothberg, (2004) ได้พัฒนาระบบ unmodified nanoparticles ขึ้นบนพื้นฐานการตอบสนองของอนุภาคในภาวะ ionic strength ที่ต่างกัน ในภาวะที่มี single strand DNA (ssDNA) หรือ double strand DNA (dsDNA) ซึ่งให้ผลการตอบสนองของอนุภาค nanoparticles ต่างกันอย่างสิ้นเชิง

โดยปกติในภาวะที่มีความเข้มข้นของ DNA ไม่สูงมาก ทั้ง ssDNA จะป้องกันไม่ให้ อนุภาคทองตกตะกอนในภาวะที่มีเกลือต่ำ ขณะที่ dsDNA จะกระตุ้นให้เกิดการตกตะกอน

คุณสมบัติที่ต่างกันนี้เกิดจากความต่างกันของ ssDNA และ dsDNA ในด้าน hydrophobicity โดย ssDNA มี hydrophobicity สูงกว่า การเปลี่ยนไปของสมบัติ hydrophobicity หลังทำปฏิกิริยามีผลต่อผลกระทบต่อคุณสมบัติ electrostatic ของอนุภาคที่มีอิทธิพลเหนือกว่า ทำให้นำไปสู่การตกตะกอนของอนุภาค

ที่ผ่านมาผู้ใช้อนุภาคทองคำในการพัฒนาระบบค่อนข้างมาก แต่สำหรับการพัฒนาระบบโดยใช้อนุภาคเงิน กลับมีน้อยกว่า ทั้งๆ ที่เงินมีคุณสมบัติในเรื่อง molar extinction coefficient ที่ดีกว่าทอง ผลดังกล่าวทำให้เพิ่มความไวของปฏิกิริยา ส่งผลต่อการสังเกตผลที่เห็นได้ชัด และอนุภาคเงินผงกระตุ้นให้เกิด Raman scattering ได้ดีกว่าอนุภาคทองคำ

Thomson *et al.*, (2008) ได้สาธิตแนวคิดการนำ sandwich assay ในการใช้อนุภาคนาโน ที่เชื่อมโยงกับโพรบที่เป็นโอลิโกดีเอ็นเอในการเชื่อมโดยให้ เกิดการจับตัวยามีดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคเงินนาโนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีชมพู เนื่องจากการเลื่อนไปของสเปกตรัมแสง เป็นสีแดง (518 nm เป็น 523 nm) ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดจากการ hybridization ของดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงอยู่กับอนุภาค การเปลี่ยนไปของสีของอนุภาค สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือตรวจวัดโดยใช้ UV-Vis spectroscopy

อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นชมพู ของคอลลอยด์เงิน ในระบบ colorimetric เป็นการเปลี่ยนสีจากสีจางไปเป็นสีจาง ทำให้การสังเกตผลด้วยตาเปล่าอาจไม่ชัดเจน ดังนั้นในโครงการวิจัยที่ดำเนินการนี้ จึงได้นำเอาอนุภาคเงินนาโนสีน้ำเงิน (blue silver nano) ซึ่งให้สีเข้มกว่ามาประยุกต์ใช้

อนุภาคเงินนาโนที่ใช้ในครั้งนี้ เกิดจากการสังเคราะห์โดยวิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม อนุภาคเป็นผลึก lattice ขนาด 200 นาโนเมตร อนุภาคเงินนาโนสีน้ำเงินดังกล่าวเมื่อกระตุ้นให้เกิดการจับตัวและตกตะกอน จะได้ผลึกเงินขนาดเล็กที่ resonance แสงที่มีความยาวคลื่น near infrared ซึ่งที่ความยาวคลื่นนี้ อยู่ในช่วงคลื่นที่มองไม่เห็น จึงทำให้เห็นสารละลายเงินเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี

ในการทดลองได้ใช้โพรบในรูป β -pyrrolidinyI peptide nucleic acid ที่ จำเพาะต่อ บริเวณของยีนในจุดกลายพันธุ์ 2 ตัวได้แก่ PNA internal control Flu-O-CTGTTATCCTG-LysNH₂ และ PNA 275 mutation Flu-O-TTATCACTATGA-LysNH₂ เช่นเดียวกัน

ในทางทฤษฎี การออกแบบโพรบบริเวณตำแหน่ง 275 กลายพันธุ์ คือต่อยา oseltamivir ทำให้การจับตัวเกิดความจำเพาะ ด้วยคุณสมบัติสำคัญของ β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid ที่จับตัวกับบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายเฉพาะในกรณีที่โพรบจับอย่างจำเพาะ 100% กับ target sequence เท่านั้น โพรบที่ออกแบบขึ้นในครั้งนี้จะจับตัวกับบริเวณของยีนเป้าหมาย โดยโพรบจะจับเฉพาะกับไวรัสสายพันธุ์ 2009 ที่เป็น wild type (ไม่คือยา oseltamivir) แต่จะไม่จับกับ mutant ที่เป็นสายพันธุ์ คือยา oseltamivir ในชุดควบคุมอาศัยโพรบอีกหนึ่งชนิดได้แก่ internal control probe ซึ่งจะจับตัวกับบริเวณของยีนเป้าหมายได้ไม่ว่าเป้าหมายนั้นจะเป็นไวรัสสายพันธุ์ คือยา oseltamivir หรือ ไม่คือยา oseltamivir ก็ตาม (ภาพที่ 10.)

ในการทดลอง ได้นำระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน NA ที่ได้ดำเนินการในช่วงเดือนที่ 1-6 มาประยุกต์ใช้โดยนำโพรบที่ออกแบบได้ มาทำปฏิกิริยากับอนุภาคเงิน โดยใช้ความเข้มข้นโพรบที่ 100 μ M ในสารละลาย 10mM PBS pH 7.6

อย่างไรก็ดี จากการทดลองพบว่าดีเอ็นเอเป้าหมายสามารถเป็นได้ทั้งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน หรือ ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิระนาบเดียวที่ได้กล่าวไว้ การจับตัวเป็นไปตามหลักการ Southern hybridization และใช้เวลาเพียง 10 นาที

```
GQ179931      AACAAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
GQ179932      AACAAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
CY039988      AACAAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
GQ150343      AACAAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
GQ169381      AACAAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACT 720
A/Hong        *****
```

```
GQ179931      GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
GQ179932      GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
CY039988      GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
GQ150343      GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
GQ169381      GTAATGACCGATGGACCAAGTGATGAACAGGCCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAG 780
A/Hong        *****
```

```
GQ179931      GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
GQ179932      GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
CY039988      GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
GQ150343      GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
GQ169381      GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCC 840
A/Hong        *****
```

275th mutation

5' - TTATCACTATGA - 3'
← 275

Internal probe



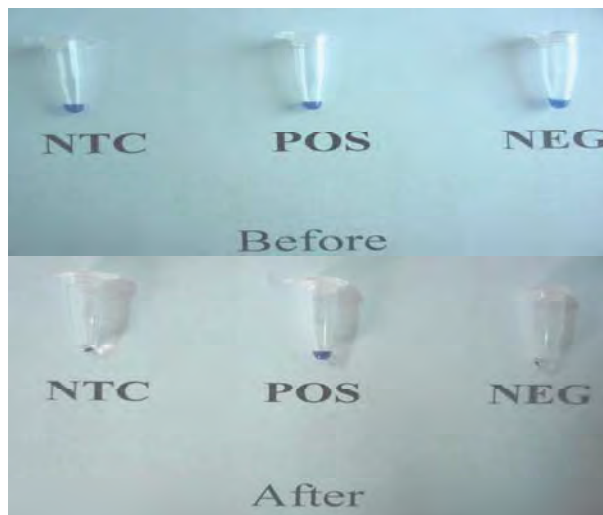
5' - CTGTTATCTGA - 3'

Target probe

```
GQ179931      TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
GQ179932      TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
CY039988      TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
GQ150343      TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
GQ169381      TGTTCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAAT 900
A/Hong        *****
```

ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่าง PNA โพรบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน neuraminidase ที่ได้จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ 2009 สายพันธุ์ย่อยต่างๆ ตามหมายเลข accession number ที่ปรากฏ เทียบกับสายพันธุ์คือยา oseltamivir (A/Hong)

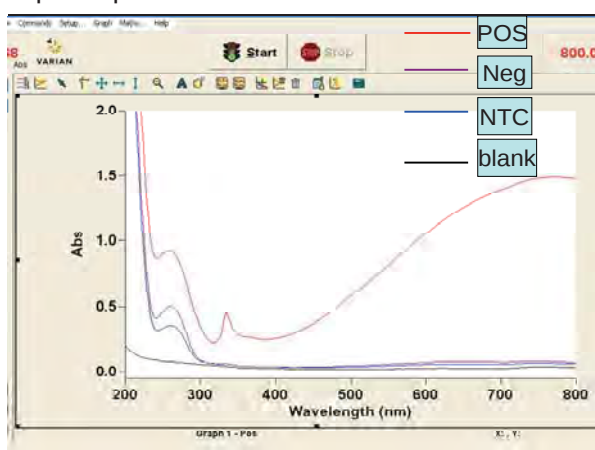
ผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อใช้อนุภาคนาโนเป็นระบบตรวจสัญญาณ พบการจับตัวของอนุภาคทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นสารละลายใสไม่มีสี มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในตัวอย่างที่เป็นลบ และตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย ขณะที่ในตัวอย่างที่เป็นบวกจะไม่ตกตะกอน (ภาพที่ 11.)



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนสีของตะกอนอนุภาคนาโน ก่อน (before) และหลัง (after) ปฏิกริยา พบการตกตะกอนในชุดควบคุมลบ และในชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ขณะที่อนุภาคนาโนไม่ตกตะกอนในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะทำให้คุณสมบัติพลาสมอนของอนุภาคนาโนเงินเปลี่ยนไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางแสงไปสู่ความยาวคลื่น near infrared ซึ่งที่ความยาวคลื่นนี้ อยู่ในช่วงคลื่นที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า จึงทำให้เห็นสารละลายเงินเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี

ในการทดลองสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงที่วัดด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ได้ดังภาพที่ 12.



ภาพที่ 12 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีทางแสงในระหว่างการตรวจสอบเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างชุดควบคุมลบ (เส้นกราฟสีม่วง) และในชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (เส้นกราฟน้ำเงิน) ซึ่งพบการตกตะกอนจนสารละลายเงินเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี ขณะที่อนุภาคนาโนไม่ตกตะกอนในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (เส้นกราฟแดง) และ cuvette ที่ใช้เป็น blank ไม่เปลี่ยนแปลง (เส้นกราฟสีดำ)

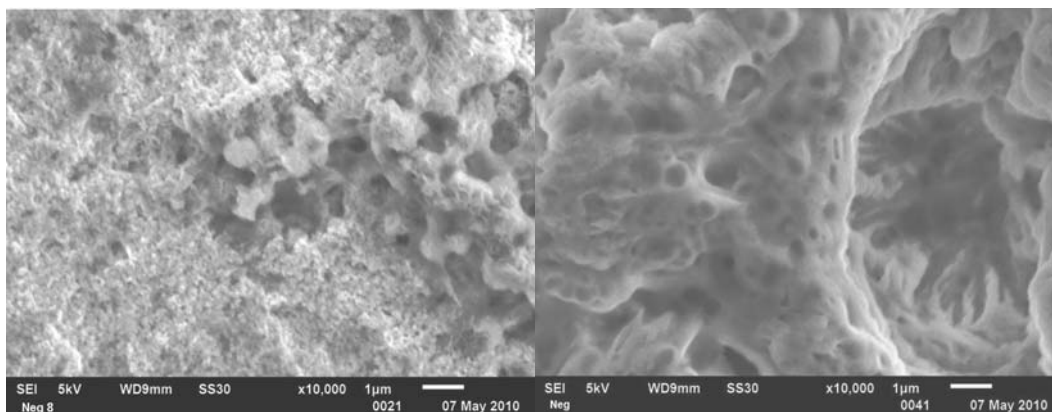
ในตัวอย่างที่เป็นบวก (เส้นกราฟสีแดง) จะพบว่า resonance ทางแสงที่วัดได้มีความยาวคลื่นในช่วง 550-800 nm ซึ่งเป็นช่วงสีน้ำเงิน-น้ำเงิน-ม่วง ขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือตัวอย่างที่เป็นลบ (มีดีเอ็นเออื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย) จะตกตะกอนทิ้งไว้แต่เพียง peak ของความยาวคลื่น ประมาณ 270 nm ไว้และไม่พบช่วงแสงความยาวคลื่นในช่วง 550-800 nm ซึ่งเป็นช่วงสีน้ำเงิน-น้ำเงิน-ม่วงแต่อย่างใด

การเปลี่ยนสีของสารละลายปฏิกิริยาเกิดการจับตัวตกตะกอนของอนุภาค ไม่ได้เกิดจากการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของอนุภาค เนื่องจากการตรวจสอบด้วย sodium borohydride ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารละลายเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 13.)

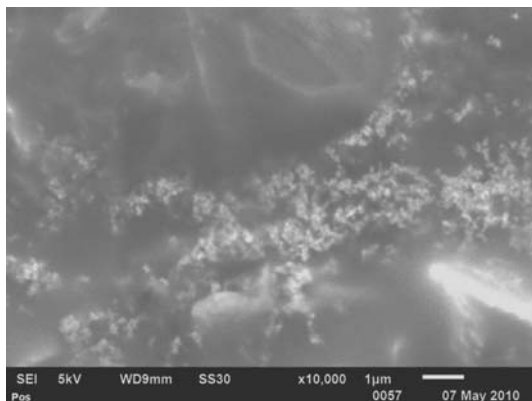


ภาพที่ 13 ผลการทดสอบตัวอย่างที่พบการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโนด้วย sodium borohydride ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารละลายเป็นสีเหลือง

นอกจากนี้การตกตะกอนเกิดจากการจับตัวของอนุภาค ทั้งนี้โดยเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ที่กำลังขยาย 10000 เท่า จะพบว่าเฉพาะตัวอย่างที่ตกตะกอนจะพบปฏิกิริยาของอนุภาคเงินที่จับตัวกันอยู่ (ภาพที่ 14. และ 15.)



ภาพที่ 14 การจับตัวของอนุภาคเป็นตะกอนเล็กจากส่วนตะกอน (ซ้าย) ในตัวอย่างที่เป็นลบ (มีดีเอ็นเอแต่ไม่ใช่เป้าหมาย) หรือไม่มีดีเอ็นเอ และส่วนใสที่ได้ซึ่งไม่พบตะกอนของอนุภาค



ภาพที่ 15 อนุภาคนาโนเงินที่แขวนลอยและไม่ตกตะกอนในตัวอย่างที่เป็นบวก

จากผลการทดลองที่ได้ดำเนินการพบว่าระบบการตรวจที่อาศัย β -pyrrolidiny peptide nucleic acid สามารถเปลี่ยนแปลงสัญญาณ ในรูปแบบการเปลี่ยนของฟลูออโรโฟร์ โดยในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพรบจะจับตัวบนผิวอนุภาคโดยอาศัยด้าน hydrophobic ไปที่ผิวอนุภาค กลไกในระบบจะกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาค แต่ในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพรบจะกีดกันดีเอ็นเอเป้าหมาย ช่วยให้อนุภาคกระจายตัวไม่เกาะกัน จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปการตกตะกอน

การแสดงผลในรูปการตกตะกอนดังกล่าวล้าไปกับการตรวจการเรืองแสงตามวิธีที่ใช้ β -pyrrolidiny peptide nucleic acid ที่ติดโมเลกุล fluorophore ไปที่ตำแหน่ง 5' ที่ได้ดำเนินการในช่วง 6 เดือนแรก

โดยสรุป การดำเนินการทำให้ได้ระบบการตรวจด้วยอนุภาคนาโนเงิน ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ระบบดังกล่าวใช้งานง่ายและมีต้นทุนต่ำ

4.1.2 พัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสชิคุนกุนยา

ได้พัฒนาเทคนิคตรวจโรคอุบัติซ้ำเพิ่มเติมจากโรคอุบัติใหม่ โดยการดำเนินงานเน้นการใช้รูปแบบตรวจสัญญาณดีเอ็นเอจากการเปลี่ยนแปลงของสีทางแสงของสารละลายเงินนาโนสีน้ำเงิน โดยใช้ peptide nucleic acid (PNA) ในรูป β -pyrrolidiny peptide nucleic acid เป็นโพรบ ในรูปแบบ nucleic acid hybridization โดยระบบการตรวจโรคอุบัติซ้ำที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ เน้นการตรวจโรคชิคุนกุนยา (Chikungunya)

โรคชิคุนกุนยาเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา(CKK) เดิมไวรัสดังกล่าวเริ่มแพร่ระบาดครั้งแรกในทวีปแอฟริกา สำหรับในประเทศไทย โรคดังกล่าวตรวจพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 พร้อมๆ กันกับการระบาดประเทศในเอเชียอื่น

การแพร่ระบาดมีทั้งด้วยวงจร primate cycle ได้แก่จาก ลิง ยุง สุนัข โดยมีลิง barboon เป็นเจ้าเรือน และมียุงลาย *Aedes aegypti* เป็นพาหะ และด้วยวงจรที่สอง urban cycle จากคน ยุง สุนัข โดยเฉพาะเมื่อยุงลายไปกัดและดูดเลือดผู้ป่วยในขณะไขสูง ซึ่งเป็นระยะ

ที่พบเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือดสูง เชื้อจะเข้าสู่กระเพาะของยุง เพิ่มจำนวน และเคลื่อนเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุงและเมื่อยุงไปกัดคนอื่นต่อก็จะแพร่เชื้อต่อไปได้ (Chevillon *et al.*, 2008)

อาการของโรคที่แสดงได้แก่ ภาวะไข้สูงเฉียบพลัน มีผื่นแดงตามตัว พบตาแดง ในผู้ใหญ่อาการเด่นชัดคือ ปวดตามข้อเนื่องจากข้ออักเสบ (Power *et al.*, 2000) ในประเทศไทย โรคดังกล่าวกลับมาระบาดซ้ำตั้งแต่ปี 2552 เริ่มที่จังหวัดยะลาและขยายต่อไปสู่จังหวัดอื่นๆในภาคใต้ของประเทศไทย (Rianthavorn *et al.*, 2010)

ลักษณะทางอนุชีววิทยา พบว่าไวรัสอยู่ในจีโนม Alphavirus มีจีโนมเป็น ssRNA ขนาด 12000 นิวคลีโอไทด์ ที่มีปลาย 5' เป็น 7-methylated guanosine และปลาย 3' เป็น Poly A (Khan *et al.*, 2003)

การวินิจฉัยโรคโดยการแยกเชื้อแม้จะเป็นวิธีที่แม่นยำแต่อาจต้องใช้เวลาถึง 2 สัปดาห์ และต้องใช้ห้องปฏิบัติการระดับ P3 จึงทำให้การตรวจมีข้อจำกัด การตรวจด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลจึงเป็นที่นิยมมากกว่า ในปัจจุบันเทคนิคชีวโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เทคนิคเทคนิคเซิร์มวิทยา ในรูปแบบ ELISA และเทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้เป็นหลักและเป็นที่นิยมมากกว่าเทคนิคอื่นๆ (Carletti *et al.*, 2007, WHO, 2008) เทคนิค ELISA ตรวจโดยใช้เซิร์มจากคนไข้อาศัยกลไกการจับตัวกับ Ig M ที่เรียกว่า Immunoglobulin M Antibody Capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA) อย่างไรก็ดี เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องใช้เวลาตรวจ 2-3 วันและมีโอกาส cross กับ o'nyong o'nyong virus จึงเป็นข้อจำกัดทำให้การใช้งานจำกัดอยู่เฉพาะในห้องปฏิบัติการ สำหรับอีกเทคนิคหนึ่งได้แก่ RT-PCR ซึ่งอาศัยการเพิ่มจำนวนยีนซึ่งในปัจจุบันมีทั้งยีนเป้าหมายในรูป structural gene capsid protein gene และ envelope E1 และ E2 โดยเทคนิค Nested RT-PCR (Pfeffer *et al.*, 2002)

แม้ว่าการตรวจจะได้รับการพัฒนาให้สามารถตรวจไวรัสชนิดนี้ได้ตั้งแต่การตรวจในรูปแบบ Nested RT-PCR ดังกล่าวยังคงติดกับเงื่อนไขในการใช้ห้องปฏิบัติการและใช้เวลาในการตรวจนานอย่างน้อย 1 วัน และแม้ว่าในปัจจุบันจะมีผู้พัฒนาเทคนิค real-time RT-PCR (Smith *et al.*, 2007) แต่ตัวเทคนิคฯ ยังคงพึ่งพาเครื่องมือและน้ำยาราคาแพงและต้องใช้ผู้ชำนาญการเฉพาะทาง

การพัฒนาการตรวจสอบไวรัสของโครงการในครั้งนี้ ได้นำหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบอุณหภูมิเดียวมาใช้ร่วมกับการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอแบบเรืองแสงที่ใช้ peptide nucleic acid (PNA) ในรูป β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid เป็นโพรบร่วมกับ quencher ในรูปแบบ competitive hybridization

การดำเนินการเริ่มจากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา ซึ่งเป็นส่วนของenvelop protein ซึ่งแสดงคุณสมบัติความรุนแรงของโรคของไวรัส เนื่องจากใน E1 มีผลต่อการสร้างโปรตีนในการห่อหุ้มอนุภาคภายนอก

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน E1 สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ของไวรัสทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ เอเชีย อเมริกาและแอฟริกา มีส่วนของยีน E1 ที่คล้ายกัน (ภาพที่ 16.)

AM397086	TGCTCTGGCAGCACCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AM397085	TGCTCTTGGCAGCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AM397087	TGCTCTTGGCAGCACCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AM397089	TGCTCTTGGCAGCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF394211	TGCTCTTGGCAGCACCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF394210	TGCTCTTGGCAGCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
EU192143	TGCTCTTGGCAGCACCGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
DQ528746	TGCTCTTGGCAGCATGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
DQ528748	TGCTCTTGGCAGCGTAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
DQ528749	TGCTCTTGGCAGCATGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF192989	TGCTCTTGGCAGCACGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF192990	TGCTCTTGGCAGCATGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF192987	TGCTCTTGGCAGCACGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF192985	TGCTCTTGGCAGCATGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
AF192894	TGCTCTTGGCAGCATGAAAAATACGCCAATTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ457636	CCCTCTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ882922	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ576460	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ576339	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ576338	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ576337	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ549581	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
FJ549582	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60
EF051584	TGCTCTTGGCAGCGCTGAAATACCGCAGTTGAGCGAAGCAGCATGTGGAGAAGTCCGAATCA	60

AM397096	TGCGAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCCATACCGCGATCCGCATCAGCTAAAGCT	126
AM397095	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	127
AM397097	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCCATACCGCGATCCGCATCAGCTAAAGCT	128
AM397099	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	129
AM397098	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	130
AF394211	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	131
AF394210	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	132
EU192143	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	133
DQ520746	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	134
DQ520748	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	135
DQ520754	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	136
AF192899	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	137
AF192898	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	138
AF192897	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	139
AF192895	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	140
AF192894	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTATACCGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	141
FJ457636	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTATACCGCATTCGATCAGCTAAAGCT	142
FJ882922	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTATACCGCATTCGATCAGCTAAAGCT	143
FJ457640	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTATACCGCATTCGATCAGCTAAAGCT	144
FJ457639	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTATACCGCATTCGATCAGCTAAAGCT	145
FJ457638	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTATACCGCATTCGATCAGCTAAAGCT	146
FJ457637	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTATACCGCATTCGATCAGCTAAAGCT	147
AY549581	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGGCACAGAGGCTATACAGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	148
AY549582	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGGCACAGAGGCTATACAGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	149
EY051584	TGCAAAACAGAAATTTGCATCAGCATACAGGGCTAATACAGCATCCGCATCAGCTAAAGCT	150

AM397096	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	198
AM397095	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	199
AM397097	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	200
AM397089	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	201
AM397088	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	202
AF394211	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	203
AF394210	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	204
EU192143	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATCACTGATAGCTGCTTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	205
DQ528746	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	206
DQ528748	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	207
DQ528754	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	208
AF192899	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	209
AF192900	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	210
AF192898	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	211
AF192895	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	212
AF192894	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATGTTTACTGATGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	213
FJ457636	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	214
FJ882922	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	215
FJ457640	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	216
FJ457639	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	217
FJ457638	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	218
FJ457637	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	219
AY549581	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	220
AY549582	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	221
EY051584	CGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGATAGCTGCTTATGCAAAACGGGACCAATGCG	222

AM397696	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AM397697	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	249
AM397697	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AM397699	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AM397698	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF394211	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF394210	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
EJ192143	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
DQ528746	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
DQ528748	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
DQ528754	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF192899	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF192908	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF192897	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF192898	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AF192894	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
FJ457636	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
FJ882922	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
FJ457640	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
FJ457639	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
FJ457638	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
FJ457637	GTACAGTTAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AY549581	GTACAGTCAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
AY549582	GTACAGTCAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248
EF051584	GTACAGTCAAGGACGCCAAATTCATAGTGGGGCCAAATGCTTCACGCTGGACACCTTC	248

ภาพที่ 16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสคนกนยาสายพันธุ์ต่างๆตามที่ถูกด้วย accession number

อย่างไรก็ดีมีรายงานจากการสัมภาษณ์ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ พบบางตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบาดในขณะนี้อาจต่างจากสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยอยู่แล้ว จึงได้ดำเนินการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมโดยดำเนินการโคลนชิ้นส่วนของยีน E1 จากตัวอย่างที่ได้มา และเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ระบาดในประเทศไทยกับเชื้ออื่น การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ พบการกลายพันธุ์ในบางตำแหน่ง อย่างไรก็ตามก็ยังมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากพอ ที่จะใช้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของจีโนมของไวรัสบนหลักการของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อุณหภูมิระนาบเดียว (ภาพที่ 17.)

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

FJ457640      -----TGCTTCTG  8
AF192894      -----GGCGCTACTGCTTCTG  17
thCKK      GGTACTTATATAGGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCGCGCCATGGCGGCCG  69
              **  *  *

FJ457640      CGACGCTGAAAAATACGCAAGTGGAGGAGCAGATGTGGAGAGTCCGAATCATGCAAAAC  68
AF192894      CGACACTGAAAAATACGCAATTGAGCGAAGCAGATGTGGAGAGTCCGAATCATGCAAAAC  77
thCKK      CGGGAATTGATTACGCAATTGAGCGAAGCAGATGTGGAGAGTCCGAATCATGCAAAAC  129
              **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

FJ457640      AGAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCT  128
AF192894      AGAATTTGCATCAGCATACAGGGCCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCT  137
thCKK      AGAATTTGCATCAGCGTACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCT  189
              *****

FJ457640      TTACCAAGGAAATAACATCACTGTAACTGCCTATGCAACGGCGACCATGCCGTCACAGT  188
AF192894      TTACCAAGGAAATAATGTCACTGTATCTGCTTATGCAACGGCGACCATGCCGTCACAGT  197
CKK      TTACCAAGGAAATAATATCACTGTAACTGCCTATGCAACGGCGACCATGCCGTCACAGT  249
              *****

FJ457640      TAAGGACGCCAAATTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAAGCTGGACACCTTTGCAACAAC  248
AF192894      TAAGGACGCTAAATTCATAGTGGGGCCAATGTCTTCAAGCTGGACACCTTTGCAACAAC  257
thCKK      TAAGGACGCCAAATTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAAG-----  278
              *****

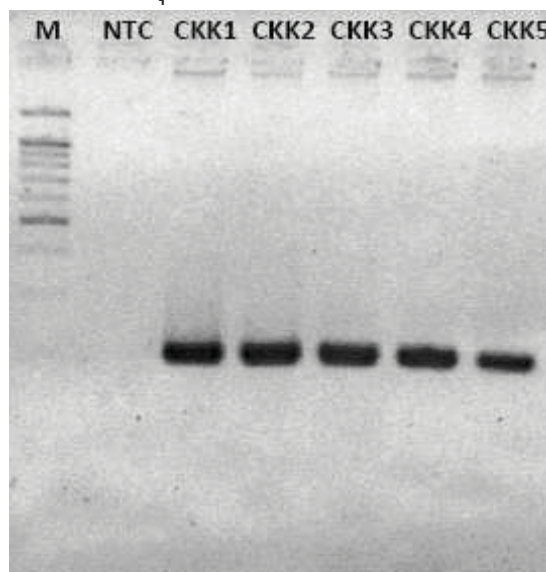
FJ457640      AATTGTGGTGTACAAAGG  266
AF192894      AATCGTGG-----  265
thCKK      -----
    
```

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทนไวรัสทั้ง 3 กลุ่มได้แก่ เอเชีย FJ457640 แอฟริกา AF192894 และสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย(thCKK)

การออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer Ver 4 (Fujitsu, Japan) ได้ไพรเมอร์ตัวแทน 1 ชุด ที่มีความจำเพาะต่อยีน E1 ทั้ง 6 บริเวณ และเมื่อนำไปตรวจสอบความจำเพาะโดยการทำ Blastn พบว่ามีความจำเพาะกับ ยีน E1 ของ ไวรัสดังกล่าวไม่ทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของไวรัสอื่น

ในการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัส เริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสและทดสอบการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ดำเนินการสกัด RNA จาก Serum ตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัส (CKK) 5 ตัวอย่าง และเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR 2 ขั้นตอน เริ่มจากทำปฏิกิริยา reverse transcription ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 50mM Tris HCl(pH. 8.3) 8mM MgCl₂ 10mM DTT 100pM 3' primer (5'-GAAGACATTGGCCCCAC-3') 20U AMV reverse transcriptase บ่มปฏิกิริยาที่ 42⁰C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นที่สองประกอบด้วย 10mM Tris.HCl (pH. 8.3) 1.5mM MgCl₂ 50mM KCl 1mM DTT 0.5% Tween 0.5% Nonidet P-40 2.5mM dNTP each และ 10pM primer each บ่มปฏิกิริยาที่ 93⁰C 40 วินาที 55⁰C 1 นาที และ 73⁰C 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ ภายหลังบ่มปฏิกิริยา cDNA ที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกใน

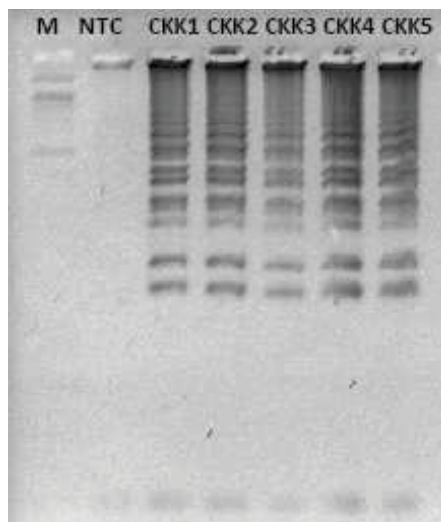
สนามไฟฟ้า พบว่า cDNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 220 นิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับขนาดคาดหวังทางทฤษฎี เมื่อคำนวณขนาดจากไพรเมอร์(ภาพที่ 18.) cDNAที่ได้จะนำมาโคลนเข้าสู่พาหะ pGEM เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวกต่อไป



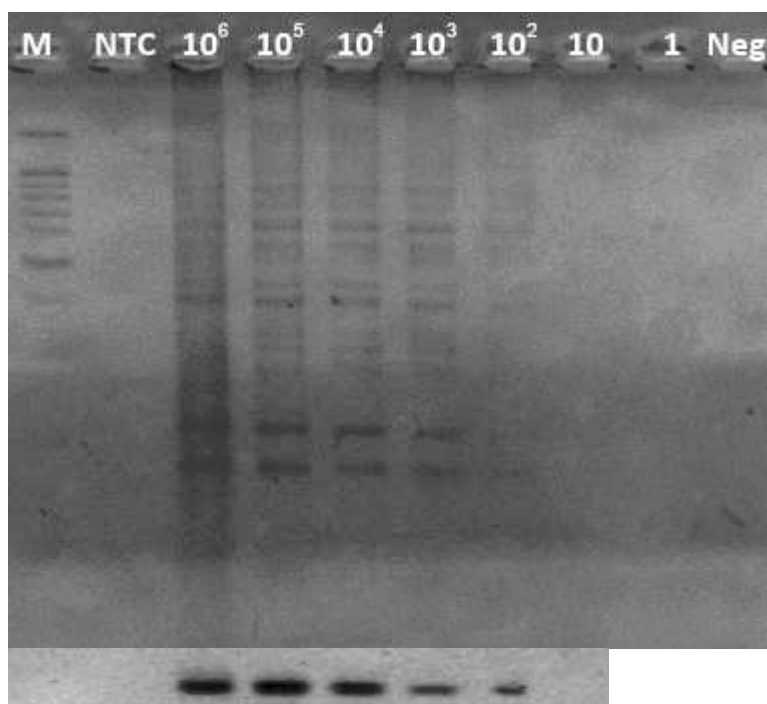
ภาพที่ 18 ผลิตรหัสดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน E1 ด้วยเทคนิค RT-PCR เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน NTC ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบและ เลน CKK1-5 ตัวอย่างไวรัสที่ผ่านการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA แล้ว แถบดีเอ็นเอดังกล่าวใช้เป็นแม่แบบในการโคลนยีนเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวกต่อไป

การทดสอบการเพิ่มปริมาณRNA ด้วยเทคนิค การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อุนทภูมิเดียว ด้วย เทคนิค RT-LAMPในสารละลายของปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM MgSO₄ 20 mM (NH₄)₂SO₄ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ตามที่ระบุไว้โดย Notomi *et al.*, (2000) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ผสม ที่ประกอบด้วย 10 pmole each ของ F3B3 และ 40 pmole ของ FIP และ BIP การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาโดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ได้ผลิตรหัสดีเอ็นเอจาก cDNA โดยเมื่อบ่มปฏิกิริยาในอุณหภูมิ 63 °C 40 นาที พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค LAMP ทำให้ได้ผลิตรหัสดีเอ็นเอรูปขั้นบันได (ladder) ในทั้ง 5 ตัวอย่างที่ดำเนินการ ผลิตรหัสดีเอ็นเอขนาดเท่ากับผลคูณของขนาดดีเอ็นเอ 175 นิวคลีโอไทด์ ในทุกตัวอย่างแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ(ภาพที่ 19.)

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากพลาสมิดที่ทราบจำนวนชุดของดีเอ็นเอ จาก 10⁺⁶-1 copy และใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณด้วย RT-LAMP พบว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สามารถเพิ่มปริมาณยีน E1 ได้แม้จะมีระดับความเข้มข้นของแม่แบบต่ำเพียง 100 copies หรือสรุปได้ว่า ไพรเมอร์มีมากกว่า ใช้ Limit of detection (LOD) ที่ 100 copies (ภาพที่ 20.)

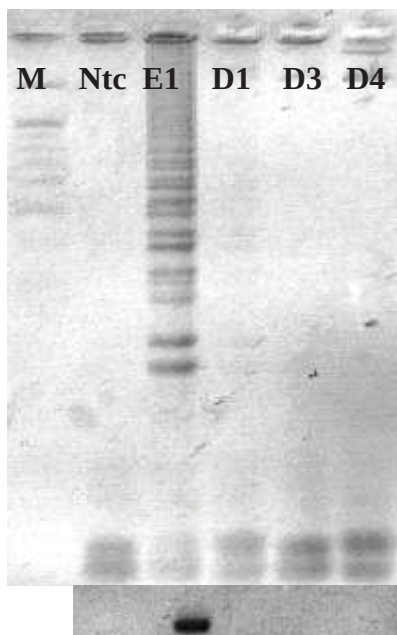


ภาพที่ 19 ผลผลิตกันท์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน E1 ด้วยเทคนิค RT-LAMP เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน NTC ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบและ เลน CKK1-5 ตัวอย่างไวรัสที่ผ่านการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA แล้ว



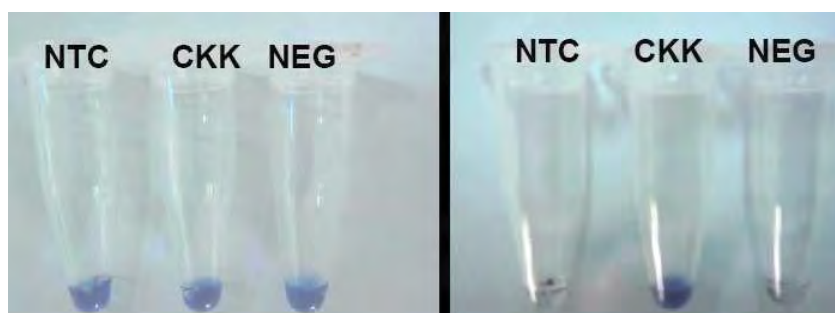
ภาพที่ 20 ผลผลิตกันท์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน E1 กับแม่แบบดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณในรูปแบบจำนวนชุดหรือ ก้อนปฏี จาก 10^6 -1 ก้อนปฏี ด้วยเทคนิค RT-LAMP เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน NTC ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบและ เลน ตัวอย่างยีน E1 ของไวรัสที่ทราบจำนวน และเลน Neg เมื่อใช้แม่แบบเป็นอาร์เอ็นเอจาก influenza virus ด้านล่างเป็นผลเปรียบเทียบ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR

การตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา เมื่อใช้ไวรัสแดงกี่ ชนิดต่างๆ เป็นตัวทดสอบ พบว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะตัวไวรัสซิกุนกุนยา แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับอาร์เอ็นเอของไวรัสแดงกี่ แต่อย่างใด (ภาพที่ 21.)



ภาพที่ 21 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาเมื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน E1 ด้วยเทคนิค RT-LAMP เปรียบเทียบกับเมื่อทดสอบกับไวรัสเดนที่ สายพันธุ์ 1 3 และ 4 เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน Ntc ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ เลน E1 ซิคุนกุญยาไวรัส และ เลน D1-4 ตัวอย่างเดนที่ไวรัส สายพันธุ์ D1 3 และ 5 ด้านล่างเป็นผลเปรียบเทียบเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR

โครงการยังได้พัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธี colorimetric โดยการทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนเงิน สีน้ำเงินโดยใช้เงื่อนไขเช่นเดียวกับที่ได้รายงานผลในรอบ 1 ปี ผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อใช้อนุภาคนาโนเป็นระบบตรวจสอบสัญญาณ พบการจับตัวของอนุภาคทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นสารละลายใสไม่มีสี มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในตัวอย่างที่เป็นลบ และตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย ขณะที่ในตัวอย่างที่เป็นบวกจะไม่ตกตะกอน (ภาพที่ 22.)



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนสีของตะกอนอนุภาคนาโน ก่อน(ซ้าย) และหลัง(ขวา) ปฏิกิริยา พบการตกตะกอนในชุดควบคุมลบ (NEG) และในชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (NTC) ขณะที่อนุภาคนาโนไม่ตกตะกอนในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (CKK)

จากผลการทดลองที่ได้ดำเนินการพบว่าระบบการตรวจที่อาศัย β -pyrrolidiny peptide nucleic acid สามารถเปลี่ยนแปลงสัญญาณ ในรูปแบบการเปลี่ยนของพลาสมอนทางแสง โดยในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพลจะจับตัวบนผิวอนุภาคโดยอาศัยด้าน hydrophobic ไปที่ผิวอนุภาค กลือในระบบจะกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาค แต่ในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพลจะจับดีเอ็นเอเป้าหมาย ช่วยให้อนุภาคกระจายตัวไม่เกาะกัน จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปการตกตะกอน โดยสรุป การดำเนินการทำให้ได้ระบบการตรวจวินิจฉัย ไวรัสด้วยอนุภาคเงินนาโนสีน้ำเงิน ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ระบบดังกล่าวใช้งานง่ายและมีต้นทุนต่ำ

4.2 การประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดในทางการเกษตรและอาหาร

สำหรับการประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดในทางการเกษตรนั้น ได้นำหลักการเดียวกันกับที่ประสบความสำเร็จกับยีน neuraminidase ข้างต้น มาปรับใช้สำหรับการตรวจสอบโรคในกุ้งที่ผลิตเพื่อการส่งออก โดยนำระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ทางห้องปฏิบัติการได้พัฒนาขึ้นมาพัฒนาต่อยอด (ณัฐพร อุดมพงษ์ และปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ, 2551) นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเทคนิคการตรวจเพื่อตอบโจทย์การตรวจสอบไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในสับปะรด และ การตรวจสอบการสุกแก่ทางสรีรวิทยาแบบไม่ทำลายผลในสับปะรด

4.2.1 พัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง

สำหรับประเทศไทยแล้ว อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่ เกี่ยวข้องกับเกษตรกรหลายแสนราย และเกี่ยวกับโรงงานแปรรูปต่อเนื่องที่มีคนงานเป็นจำนวนมากจึงมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจมาก ส่วนหนึ่งเป็นเพราะประเทศไทยส่งกุ้งแช่แข็งเป็นอันดับต้นๆของโลก โดยแต่ละปีประเทศไทยส่งออกกุ้งคิดเป็นมูลค่าสูงถึง 53,000 ล้านบาท ความสามารถในการรักษาสภาพในการแข่งขันนี้ ขึ้นกับความสามารถในการจัดการทางด้านคุณภาพในการผลิต

ในการผลิตกุ้งเชิงพาณิชย์มีโรคสำคัญได้แก่โรคไวรัส โรคดังกล่าวส่งผลกระทบต่อตรงในระหว่างการผลิต การติดเชื้อไวรัสในกุ้งส่งผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการตายของกุ้งในบ่อ โดยปกติในการผลิตกุ้ง ปัญหาโรคกุ้งมีความสำคัญยิ่ง โดยปกติกุ้งที่เลี้ยงมักพบปัญหาโรคติดเชื้อจากไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง white spot syndrome virus (WSSV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)

การตรวจหาเชื้อจึงมีความสำคัญยิ่งสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง โดยที่ผ่านมามีเทคนิคการตรวจทางอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาท เช่น การตรวจโดยเทคนิค dot blot hybridization และเทคนิคบนพื้นฐานของหลักการ PCR ทั้ง PCR มาตรฐาน RT-PCR RT-

nested PCR multiplex RT-PCR และ real-time PCR (Lightner, 1996, Flegel et al., 1995) การตรวจเชื้อไวรัส WSSV ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเป็นพิเศษให้เฉพาะเจาะจงกับส่วนยีน Transmembrane signal peptide ของไวรัส WSSV ขณะที่การตรวจเชื้อไวรัส IHNV ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเป็นพิเศษให้เฉพาะเจาะจงกับส่วนยีน NS-1 ของไวรัส IHNV

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาและการทดสอบความไวของปฏิกิริยาได้ดำเนินการและรายงานมาก่อนหน้าแล้ว (ณัฐพร อุดมพงษ์ และปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ, 2551)

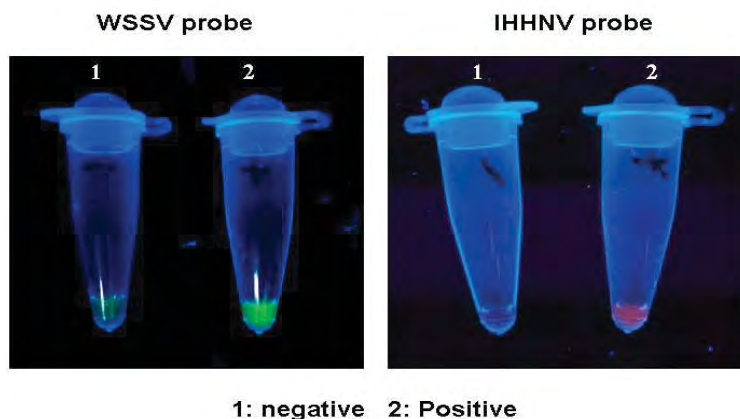
การพัฒนากระบวนการตรวจสอบในครั้งนี้ได้ออกแบบ PNA โพรบและquencher ได้โพรบ PNA 2 ชนิด และquencher 2 ชนิดแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อยีน Transmembrane signal peptide ของไวรัส WSSV และยีน NS-1 ของไวรัส IHNV ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. PNA โพรบ และ quencher สำหรับการตรวจสอบไวรัส wssv และ IHNV และนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้อง

Element	detail sequence	binding position
PNA WSSV	Flu-O-ctaaattcaga-LysNH ₂	258835-258845
Quencher # 1	5'-aatttag-3'-BHQ	258835-258841
PNA IHNV	TMR-O-gaaccaacaga-LysNH ₂	281-291
Quencher# 2	5'-ttgggttc-3'-BHQ	281-287

กลไกการจับตัวระหว่าง PNA โพรบและquencher ยังคงเป็นไปตามหลักการเดียวกันกับที่ใช้ตรวจไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 neuraminidase ยีน ยกเว้นในการตรวจไวรัส WSSV ใช้ FAM fluorophore ติดที่ตำแหน่ง 5' ของPNAโพรบและในการตรวจไวรัส IHNV ใช้ TAMRA fluorophore ติดที่ตำแหน่ง 5' ของPNAโพรบ(ดูตารางที่ 3 ประกอบ) ในทางทฤษฎีการจับตัวของPNAโพรบกับกรดนิวคลีอิกของไวรัสที่ประสบความสำเร็จจะทำให้เกิดการเรืองแสงที่ต่างกัน โดยผลการตรวจ WSSV เรืองแสงสีเขียวและผลการตรวจ IHNV เรืองแสงสีชมพู

ผลการทดสอบการเรืองแสงโดยจับตัวระหว่าง probe ทั้งที่จำเพาะต่อ WSSV และต่อ IHNV โดยทำปฏิกิริยาระหว่าง probe ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 3 µl จับ DNA products ที่เพิ่มปริมาณได้ โดยให้ความร้อนกับดีเอ็นเอที่ 80 ° C เป็นเวลา 5 นาที และปล่อยให้จับตัวที่ 50° C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาทดสอบโดยการส่องดูด้วยแสง UV ความยาวคลื่น ● 312 nm พบว่า เฉพาะหลอดที่ให้ดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้นที่พบการเรืองแสง (ภาพที่ 23.)



ภาพที่ 23 แสดงผลการจับตัวของ PNA โพรบต่อเป้าหมายกรดนิวคลีอิกของไวรัส WSSV (ซ้าย) และ IHNV (ขวา) โดยตัวอย่างที่เป็นลบ (Negative) แสดงด้วยหมายเลข (1) และตัวอย่างที่เป็นบวกแสดงด้วยหมายเลข 2

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบการทดสอบปฏิกิริยา hybridization ด้วยเบต้าฟิโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์โรคไวรัสที่เกิดขึ้นกับกุ้งได้พร้อมๆ กัน (แยกหลอด)

นอกจากนี้ได้พัฒนาระบบการตรวจต่อยอดให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสภายในหลอดเดียวกันที่เรียกว่า multiplex LAMP ทั้งนี้จากการศึกษาเบื้องต้น ไวรัสทั้ง 2 ชนิดเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ และไวรัสทั้งสองชนิดเป็นไวรัส คนละวงศ์กัน จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง ดังนั้นจึงได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบในรูปแบบ multiplex LAMP ขึ้น ซึ่งที่ผ่านมาไม่เคยมีรายงานการพัฒนาเทคนิค LAMP ในรูปแบบ multiplex มาก่อน เนื่องจากในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เกี่ยวพันกับไพรเมอร์หลายคู่ และจำเพาะต่อหลายบริเวณของยีนเป้าหมาย

การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจึงเริ่มต้นจาก การตรวจแต่ละปฏิกิริยาไม่ให้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกัน ซึ่งดำเนินการโดยการโปรแกรม Blastn (Altschul, *et al.*, 1990) สำหรับ WSSV ได้ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ยีน transmembrane signal peptide ของไวรัส wssv และสำหรับ IHNV ใช้ยีน NS-1

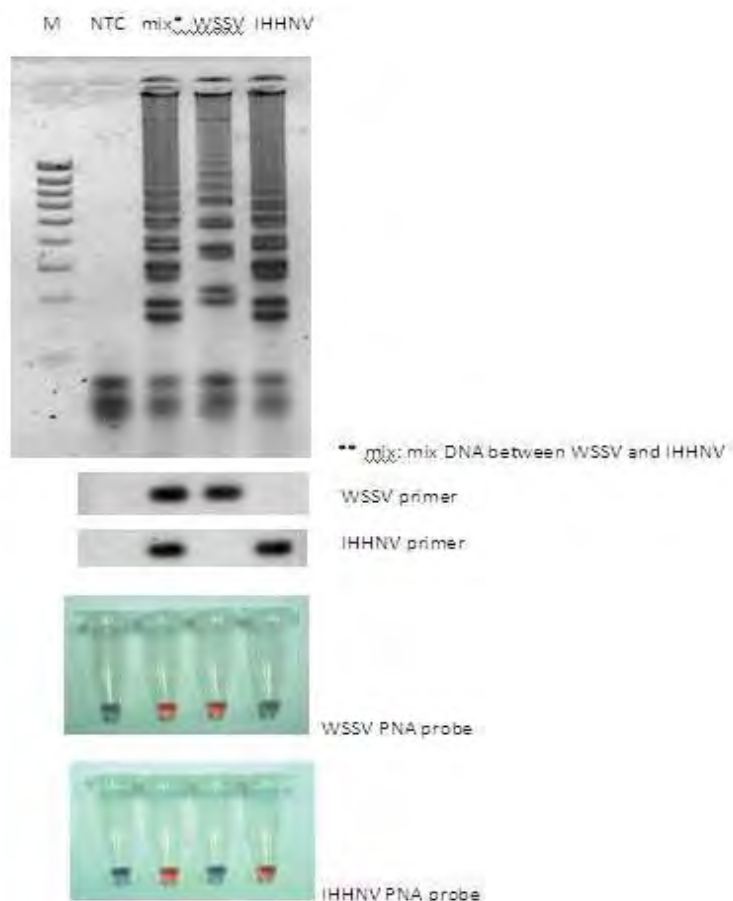
ไพรเมอร์ที่ได้จะนำมาปรับให้เป็นสัดส่วนของไพรเมอร์ F3 B3 ต่อสัดส่วนของไพรเมอร์ที่เหลือ (F1cF2) (B1c B2) เป็น 1:8 และใช้ชุดของไพรเมอร์สำหรับ WSSV และชุดไพรเมอร์สำหรับ IHNV ในสัดส่วน 1:1 ในการทำปฏิกิริยาแบบ multiplex LAMP สำหรับการตรวจโรคไวรัสทั้ง 2 ชนิดในครั้งนี้ได้ปรับตัวปฏิกิริยารวมของไพรเมอร์ให้อยู่ในระดับไม่เกิน 40 pmole ของ F3B3 และ 5 pmole ของชุดไพรเมอร์ที่เหลือและชุดเชยปฏิกิริยาในเฉพาะส่วนของสารเคมีมากกว่าปกติได้แก่ dNTP ชุดเชย 1.5 เท่า $MgSO_4$ เพิ่มขึ้น 2 เท่าของปกติ Betain เพิ่มขึ้น 1.25 เท่าของปกติ และเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase เพิ่มขึ้น 1.2 เท่าของปกติ

multiplex ของปฏิกิริยามาตรฐานของไวรัสโรคกุ้งสามารถดำเนินการได้ในหลอดเดียว และให้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบขึ้นบันได ที่เป็นลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP โดยเป็นผลคูณของขนาดดีเอ็นเอ 180/210 นิวคลีโอไทด์สำหรับ WSSV และ 160/180

นิวคลีโอไทด์สำหรับ IHNV และในกรณีที่เป็น mix virus จะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ ผลคูณของขนาดดีเอ็นเอที่ 160/180 นิวคลีโอไทด์ โดยผลการตรวจสอบสอดคล้องกับวิธีการตรวจสอบปกติที่ดำเนินการด้วยเทคนิค PCR (Kono et al, 2004, Sun et al, 2006) (ภาพที่ 24.)

สำหรับการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอดำเนินการโดยระบบตรวจการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงอันเป็นผลจาก plasmon resonance ของอนุภาคนาโนของทองคำตามหลักการที่อธิบายไว้ (Kanchanawarut et al, 2009) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยทองคำขนาด 20 nm 5000 ppm 10 μ l ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP 1 μ l PNA probe ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด 1 μ M และ 1 μ l เกลือในรูปสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ (100mM PBS) โดยปฏิกิริยา hybridization เกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง ผลการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนั้นจะเกิดขึ้นในเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที โดย PNA probe จะแสดงพฤติกรรมเป็น coagulant โดย PNA probe จะจับตัวอยู่ที่ผิวของอนุภาคทองคำการจับตัวนี้เกิดได้จากส่วนของ nitrogen/oxygen ในเบสและจากโครงสร้างของ PNA เองที่เป็น hydrophobic neutral structure โดยในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ในภาวะที่มีเกลือเข้มข้นต่ำ PNA จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาคทำให้เกิดการตกตะกอนเปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคทองคำจากสีแดงอมชมพูไปเป็นสีม่วงเข้ม ขณะที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย การจับตัวระหว่าง PNA probe กับ ดีเอ็นเอเป้าหมายจะก่อให้เกิด hybridization complex ซึ่งเป็นโครงสร้างที่คล้ายกับ double stand DNA ทำหน้าที่ป้องกันการจับตัวของอนุภาคทองคำ จึงทำให้เกิดการตกตะกอนและไม่เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคทองคำ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นการตะกอนหรือการเปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคทองคำเป็นสีม่วงเข้มในหลอดที่เป็นผลลบ ขณะที่ในหลอดที่เป็นผลบวกจะไม่ตกตะกอนจึงยังคงเห็นสีของสารละลายอนุภาคทองคำเป็นสีแดงอมชมพูเหมือนเดิม (ภาพที่ 24 ล่าง)



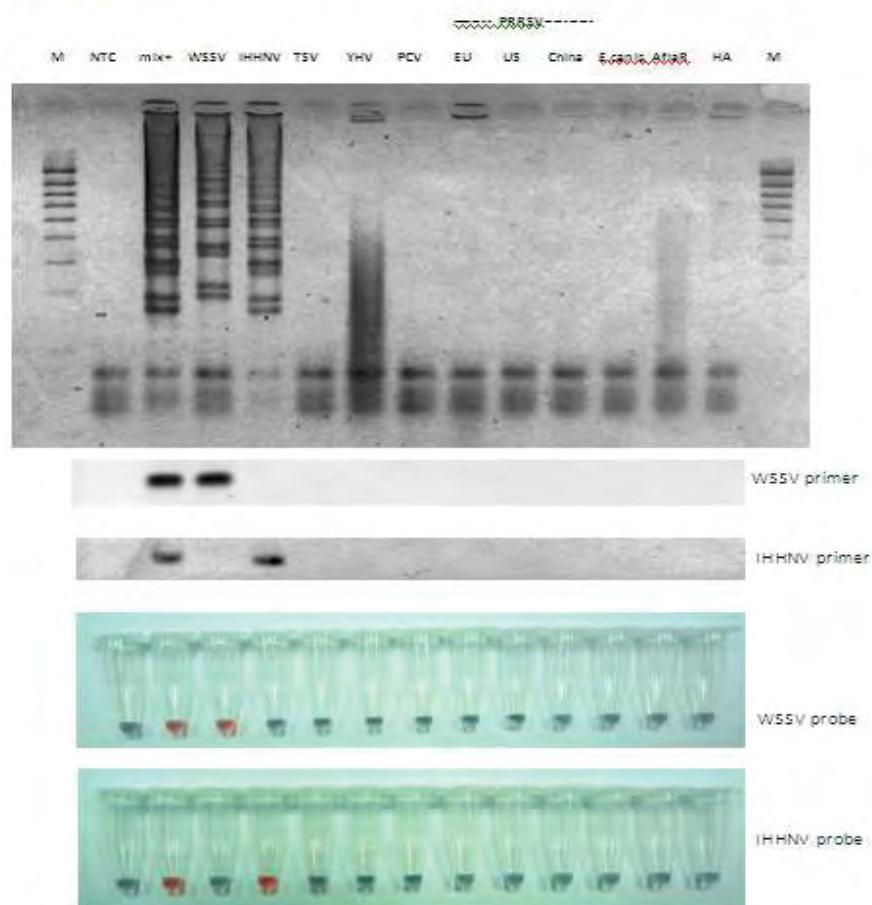
ภาพที่ 24 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัส WSSV และ IHNV ด้วยปฏิกิริยา multiplex LAMP เมื่อตรวจจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า(บน) เปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัส WSSV และ IHNV ด้วยปฏิกิริยา PCR (กลาง) และผลการตรวจด้วยวิธี colorimetric detection บนพื้นฐานของการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนตามหลักการไบโอเซ็นเซอร์ เมื่อใช้โพรบ PNA ที่จำเพาะต่างกัน (ล่าง) เลน M 100 nucleotide ladder เลน ntc nontemplate control เลน mix ดีเอ็นเอผสมจาก WSSV IHNV เลน WSSV ดีเอ็นเอจาก WSSV เลน IHNV ดีเอ็นเอจาก IHNV WSSV primer หมายถึงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ด้วย WSSV primer และ IHNV primer หมายถึงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ด้วย IHNV primer

การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุดในรูปแบบ multiplex กับไวรัสเป้าหมายทั้งสองชนิดร่วมกับไวรัส TSV (Tauro syndrome virus) YHV (Yellow head virus) ซึ่งทั้งสองเป็น อาร์เอ็นเอไวรัสที่ติดเชื่อในกุ่ม รวมถึงไวรัสที่พบในสัตว์ในฟาร์มเช่น PCV (Porcine circo virus) PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) ทั้งสายพันธุ์ US En และ China รวมถึงกับสารปนธูกรรมจากเชื้ออื่นเช่น *Escherichia canis* *Aspergillus flavus* และเชื้อ Swine virus (HA)

พบว่าชุดไพรเมอร์ multiplex ยังคงมีความจำเพาะต่อไวรัสทั้งสองชนิด และไม่ทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของไวรัสและของเชื้อของสัตว์ในฟาร์มแต่อย่างใด ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของภาพรวมชุดไพรเมอร์ทั้ง 2 ในการตรวจสอบชนิดของไวรัสโรคกุ้ง (ภาพที่ 25.) นอกจากนี้ผลการตรวจด้วย PNA ร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำยังสอดคล้องกับผลการตรวจสอบโดยการแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (ภาพที่ 25 ล่าง) และผลดังกล่าวสอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธี PCR

ทำนองเดียวกัน การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพบว่าการใช้ชุดไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด ผสมเป็น multiplex ยังคงให้ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดีและสามารถตรวจสอบแม่แบบที่เป็นดีเอ็นเอของยีน transmembrane signal peptide และ NS-1 ได้ในระดับ 10 copies ซึ่งอยู่ในระดับเดียวกับการตรวจด้วยวิธี PCR ที่สำคัญสามารถดำเนินการได้ในหลอดเดียว ซึ่งถือว่าเป็นข้อได้เปรียบอย่างมาก (ภาพที่ 26A. และ 26B.) การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดย PNA probe ร่วมกับสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ ต่างก็ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธี PCR

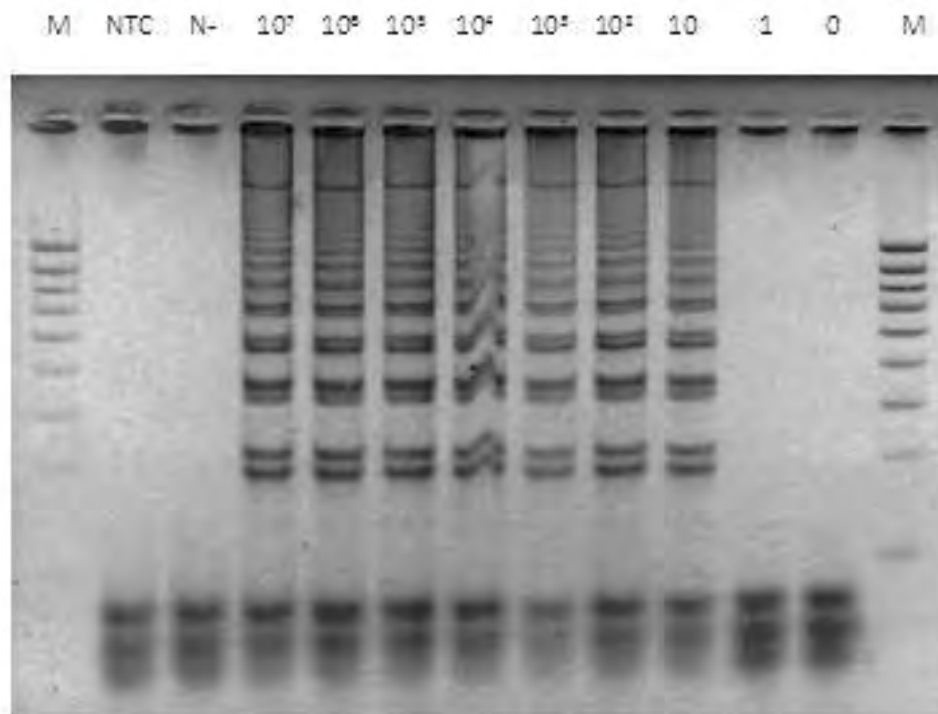
Specificity



ภาพที่ 25 ความจำเพาะของปฏิกิริยาสำหรับการตรวจไวรัสทั้งสองชนิด เมื่อตรวจจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา LAMP ที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า(บน) จากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า (กลาง) และผลการตรวจด้วยวิธี colorimetric detection บนพื้นฐานของการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนตามหลักการไบโอเซ็นเซอร์ เมื่อใช้โพลี PNA ที่จำเพาะต่างกัน (ล่าง) เลน M 100 nucleotide ladder เลน ntc non template control เลน mix เป็นดีเอ็นเอผสมของ WSSV IHNV เลน WSSV ดีเอ็นเอจาก WSSV เลน IHNV ดีเอ็นเอจาก IHNV WSSV primer หมายถึงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ด้วย WSSV primer และ IHNV primer หมายถึงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ด้วย IHNV primer

Sensitivity by using mix primer

WSSV DNA



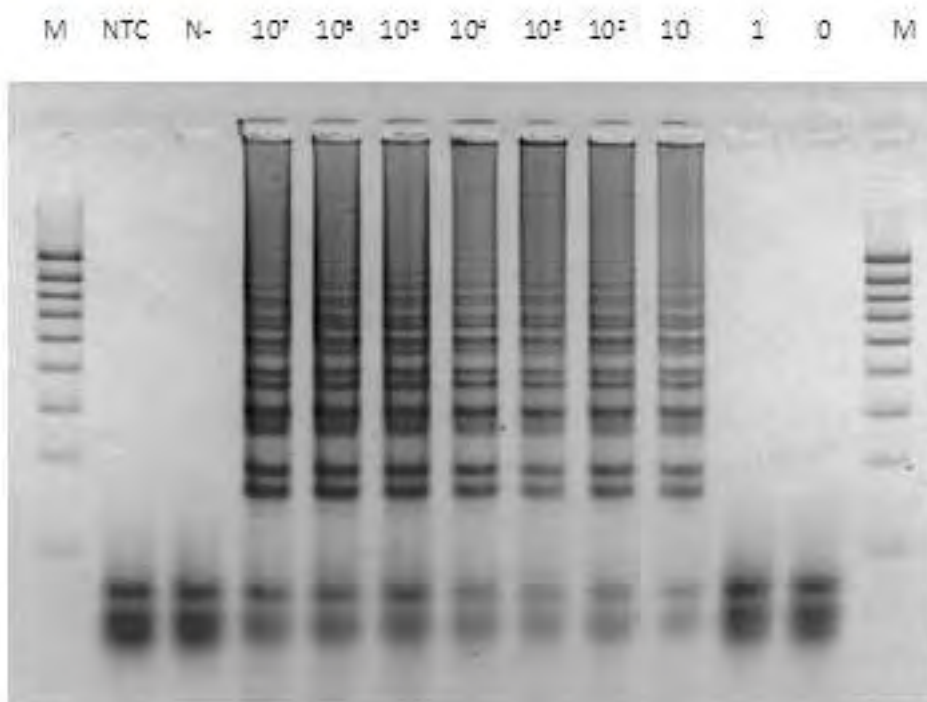
WSSV PCR



WSSV probe

ภาพที่ 26A ความไวของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไวรัส WSSV เมื่อตรวจจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา LAMP ที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า(บน) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า (กลาง) และผลการตรวจด้วยวิธี colorimetric detection บนพื้นฐานของการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนตามหลักการไบโอเซ็นเซอร์ เมื่อใช้โพลี PNA ที่จำเพาะ (ล่าง) เลน M 100 nucleotide ladder เลน ntc non template control เลน N- ตัวอย่างควบคุมลบ PCV เลน 10^7 ถึง 10^2 1 แสดงจำนวนก๊อปปี้ของดีเอ็นเอแม่แบบจากไวรัส WSSV

IHHNV DNA



IHHNV PCR



IHHNV probe

ภาพที่ 26B ความไวของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไวรัส IHHNV เมื่อตรวจจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา LAMP ที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า(บน) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากการแยกด้วยสนามไฟฟ้า (กลาง) และผลการตรวจด้วยวิธี colorimetric detection บนพื้นฐานของการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนตามหลักการไบโอเซ็นเซอร์ เมื่อใช้โพลีบ PNA ที่จำเพาะ (ล่าง) เลน M 100 nucleotide ladder เลน ntc non template control เลน N- ตัวอย่างควบคุมลบ PCV เลน 10^7 ถึง 10^2 1 แสดงจำนวนก๊อปปี้ของดีเอ็นเอแม่แบบจากไวรัส IHHNV

การพัฒนาปฏิกิริยาในรูปแบบ multiplex LAMP เพื่อการตรวจไวรัสทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน ดังกล่าวนี้นี้ร่วมกับการพัฒนาระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอโดยใช้ PNA probe ร่วมกับการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโน สะท้อนให้เห็นถึงความจำเพาะของ probe แต่ละชนิดในการแสดงผลการจำแนกชนิดของไวรัส ซึ่งเป็นหัวใจของความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจซึ่งจะใช้เป็นรากฐานสำหรับการต่อยอดไปสู่การควบคุมป้องกันและจัดการโรคให้กับอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศในระยะยาวต่อไป

เนื่องจากระบบ multiplex เป็นระบบที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้การนำปฏิกิริยา LAMP มาใช้ร่วมกับการตรวจโดย PNA และอนุภาคทองคำนาโนยังเป็นของใหม่ ผลการดำเนินการในครั้งนี้จึงช่วยให้สามารถช่วงชิงความเป็นผู้นำในการพัฒนาวิธีการตรวจที่รวดเร็วในระดับโลกได้ต่อไป

4.2.2 พัฒนาการตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรด

อุตสาหกรรมแปรรูปสับปะรดกระป๋อง จัดเป็นอุตสาหกรรมสินค้าเกษตรที่สามารถทำรายได้เข้าประเทศจำนวนมาก ดังนั้นจึงถือได้ว่าสับปะรดเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ได้รับคามนิยมปลูกและการส่งเสริมให้ปลูกกันมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเพาะปลูกสับปะรดพันธุ์ดังกล่าวรวมถึงพันธุ์อื่น ๆ ที่ปลูกในประเทศไทย มักประสบปัญหาสำคัญโดยเฉพาะปัญหาของโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple Mealy Bug Wilt: PMW) ซึ่งมีสาเหตุจากไวรัสพืช *pineapple mealybug wilt-associated viruses* (PMWaVs) โรคไวรัสนี้มีการระบาดรุนแรงและทำให้เกิดความเสียหายแก่พื้นที่ปลูกเป็นจำนวนมาก เนื่องจากโรคเหี่ยวของสับปะรดมีการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ คือ เพลี้ยแป้ง (*Pseudococcus brevipes* หรือชนิด *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)) และมีมดหัวโต (*Solenopsis geminata* และ *Pheidole megacephala*) เป็นตัวนำพาเพลี้ยแป้ง (ชานาญ และคณะ, 2542; Beardsley, 1993) ทำให้โรคเหี่ยวของสับปะรดแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว และมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นในทุกพื้นที่ปลูก นอกจากนี้การปลูกสับปะรดโดยทั่วไปและในประเทศไทยนิยมใช้หน่อ ตะเกียง และจุกเป็นส่วนขยายพันธุ์ ซึ่งไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างกว้างขวางและรวดเร็วมากในปัจจุบัน

ดังนั้นการตรวจสอบและการวินิจฉัยโรคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดอย่างมีประสิทธิภาพด้วยวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ ทั้งการตรวจสอบลักษณะอาการของโรคในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรหรือแปลงปลูกเพื่ออุตสาหกรรมในระยะแรกเริ่มของการปลูก การตรวจสอบชิ้นส่วนของพืชที่จะนำไปขยายพันธุ์เพื่อการเพาะปลูก ตลอดจนการวางแผนงานเพื่อบริหารจัดการโรค การควบคุมโรคและการแพร่ระบาดของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ จึงจะทำให้สามารถควบคุมโรคและสามารถลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นต่ออาชีพของเกษตรกรและอุตสาหกรรมสับปะรดของประเทศ

ที่ผ่านมาการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคเหี่ยวสับประดามีวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

- 1) ตรวจสอบด้วยวิธี Tissue blot immunoassays (TBIA) Hu *et al.*, (1997)ทดลองใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่จำเพาะต่อ PMWaVs แต่ละชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 35-6-5 มีความจำเพาะต่อ PMWaV-1 และ 63-2-2 มีความจำเพาะต่อ PMWaV-2 และอีก 5 ปีถัดมา Sether and Hu (2002a, 2002b) ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสทั้งสองชนิดมาใช้ในการตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวของสับประด ด้วยวิธี Tissue blot immunoassays (TBIA) เช่นเดียวกัน และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 35-6-5 มีความจำเพาะต่อ PMWaV-1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 63-2-2 มีความจำเพาะต่อ PMWaV-2
- 2) การตรวจอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนร่วมกับการตกแต่งอนุภาคด้วยแอนติซีรัม (Immuosorbent electron microscope: ISEM) วิธีการนี้ตรวจอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากการพบอนุภาคไวรัสโรคเหี่ยวของสับประด อนุภาคไวรัสมีรูปร่างท่อนยาว ขนาด 1,200-1,500 นาโนเมตร มักพบอยู่ต่อลำเลียงอาหาร (phloem) ของสับประดที่แสดงอาการโรคเหี่ยว และพบว่า PiWV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับแอนติซีรัม จากประเทศออสเตรเลีย ที่ความเข้มข้นเจือจางของซีรัมของโรคเหี่ยวของสับประด PiWV อัตรา 1:100
- 3) วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ตรวจสอบไวรัสในห้องปฏิบัติการโดยวิธี รีเวิร์สทรานสคริปชันและโพลีเมอเรสเชนรีเอคชัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน HSP 70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 คู่ไพรเมอร์สำหรับ PMWaV-1HSP70

ในทั้ง 3 วิธี RT-PCR เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวเป็นที่ยอมรับแต่การตรวจจำเป็นต้องพึ่งห้องปฏิบัติการ ต้องใช้ความชำนาญทางเทคนิค เนื่องจากเป็นงาน RNA และใช้เวลาตรวจนานในระดับ 2-5 วัน ทำให้มีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการตรวจทางเลือก นอกจากนี้ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา การตรวจไวรัสทั้ง 2 ทำโดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ PMWaV-1 และ PMWaV-2 (Sether and Hu, 2002 a,b) ยังไม่มีรายงานการตรวจในรูปการตรวจที่เกิดขึ้นในหลอดเดียว (single tube) มาก่อน การพัฒนารูปแบบการตรวจให้เกิดขึ้นในหลอดเดียวจึงเป็นสิ่งท้าทาย

การตรวจสอบข้อมูลเบื้องต้น พบว่าเนื่องจากไวรัสทั้ง 2 ชนิด แม้มีชื่อเดียวกันแต่ในความเป็นจริงแล้ว ไวรัสทั้ง 2 เป็นไวรัสคนละชนิด แม้ว่าจะอยู่ในจีนัส Ampero virus เดียวกันก็ตาม แต่ PMWaV-1 มีความใกล้เคียงกับ GLRaV (grapevine leafroll associated virus) 4 และ 5 มากกว่า PMWaV-2 ขณะที่ PMWaV-2 สัมพันธ์หรือใกล้เคียงกับไวรัส LChV-2 (Little Cherry Virus 2) (Melzer *et al.*, 2001) (ภาพที่ 27.)

A phylogenetic tree illustrating the relationships between various grapevine viruses. The tree is rooted at the bottom and branches upwards. The viruses are grouped into three main categories, each enclosed in a colored oval:

- Closterovirus (Green Oval):** Includes GLRaV-2, BYSV, BYV, and CTV. The bootstrap value for the CTV branch is 100.
- Crinivirus (Purple Oval):** Includes LIYV, SPCSV, and CYSDV. The bootstrap values for the Crinivirus group are 100 and 100.
- Ampelovirus (White Oval):** Includes MVBaV, PMWaV-2, GLRaV-3, GLRaV-1, LChV-2, PMWaV-3, PMWaV-1, GLRaV-6 (p), GLRaV-9 (p), GLRaV-5 (p), GLRaV-4 (p), and PBNSPaV (p). The bootstrap values for the Ampelovirus group are 100 and 100.

The tree also shows several other viruses and their relationships, including GLYav, LCTW-1, and LChV-2. The bootstrap values for the main branches are 100, 100, and 100.

ภาพที่ 27 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัสในวงศ์ Closteroviridae และความใกล้เคียงของสมาชิกในจีนัส ampelovirus วงกลมแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง PMWaV-1 3 และ GLRaV และ PMWaV-2 และ LChV-2

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

EU769114.11virus      -----ATGGCT--GATTGAGCAAAACA 21
FJ209048.13virus      -----ATGAGTACGATTCAGTAC-CAC 22
EU769116.12virus      CCTAAACGATTTAGAGTGCGACGCTGATGTGGGGAATATTACGATAGTAGCAAAATAC 120
                        *      *      *      *      *

EU769114.11virus      AAACAACC--TGAACAT-GCTGACTCTGG-----GCCTAAGACAGCGGAC-- 63
FJ209048.13virus      CTCCTCCC--TCTGCACCATCGACTCCGGTACAACCGCAGCTGCCCAAAGCTGATGAG-- 78
EU769116.12virus      CGCTCTGTAAACGGGCTAGCTACAGCCGAGAGGGAT-CGGTTACCAAGCGATAGAGGAAC 179
                        *      *      *      *      *

EU769114.11virus      -GACCAAGTCAAGGAAATACTGAACCTGCTGTGCCGGGAGGTAGGACTACTGTGTCGAC 122
FJ209048.13virus      -GAACAATTACAGGAGATTGAAATCTGCCTTACCTGGAGGTAGGACTACAGTGAACAC 137
EU769116.12virus      TGAACATTGGCAACAATCCCAACGGAAGCTTCACAGATAAGGGTGTATTCTCTGAGAC 239
                        ** * * *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      GTTTGAAGATTTGAT--AGCAGCTGAAAATGCTATAATTGATTTCCACAAAGTTGATGTA 180
FJ209048.13virus      TTTCAGTCTGCTGAT--ATCGTCGAATAACGCGGATTGGATTTCACTAAAGTGAAGTA 195
EU769116.12virus      TGTTACGAGGTCGAGTAATAAACCGAATAAGTAGATGATGATCAACGTTGCTGTTAAA 299
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      CCAC-GCATGATTAACGTTCCGATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGG 239
FJ209048.13virus      CCGC-GGATGATCAACATCACCATACCTGGGATAGTGGCGAAGAAAGCATCGAGTGAAGG 254
EU769116.12virus      TCCTAGAAAGAACGTTGTACTAATAATTGGATCGGTTAAACCGTGCCCAAAGGTAGTTAA 359
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      --ATCCAAA---GCTCTGTGGGAGTTGGGTAA--ATCGAAGGATATATCAGAATCGGC- 290
FJ209048.13virus      --AGCCAAA---GCATTATGGGAACTAGGTAA--ATCTAAGGAATCTCTGAAAGTGA- 305
EU769116.12virus      TCAGCCGGGTTTGATATCCCGGAGATTGCTATCCGTATAGGGAGGCTCTGAAGGAACA 419
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      ---GAAACACAT---GATCCAATTTCTGATGCAATCTT---TCCAAGATATGTGCACCT 340
FJ209048.13virus      ---CAACACAT---GATACAGTTTCTGATGCAAGATT---TCCAAGTTTCTGCTCCTC 355
EU769116.12virus      TTGCAACAAGTATGCGGTTGCGATAGTAGTACTGACTAGCTACATACTTTATACATTT 479
                        ***** *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      TTTCTACATCACC-GAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACC---ACAGCTAAG--- 393
FJ209048.13virus      ATTCGACATCACC-TAAGGTTTCAGGTGCATCGAACCGTACAATA---ACTGCTAAG--- 408
EU769116.12virus      GATTCAACTCGCTATTACGTTTCTACATCCAAAATAGCGAATACAAGAGTTTGACTA 539
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      TATGATGGTAAAGATGTTAACG----TCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAA 449
FJ209048.13virus      TAGGACAACAAGATGTTCCGG----TGCTCATGAAGAGTTAAAGACTACTTTAGATAAA 464
EU769116.12virus      TATAGAAACAGAGACGCAAAAGAAATATACATCAAGGACGTGAGTGAGGTGGTTGAGAG 599
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      CTCACATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGGTTTATCTTC 509
FJ209048.13virus      TTCCTAGCCAGTTACGGCTATGAAATTACCATGAGACAATTTGGGAGGCGATTACAAAC 524
EU769116.12virus      AGCGGCGATGAATTCGGGGTACGAAACCCGTTTAGGCAATATATGCGTTATTTACAAG 659
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      CACAA---TTGTTCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTAACACTAGGATATGTAC 566
FJ209048.13virus      TGCAA---TAGTTCAAGGTTTAAAGTTCGGGTAAAATGGAGGTAATCTCGAATTTGCTC 581
EU769116.12virus      CTCGAGTATAACACTAACTTTAAAT---GGTAAATAACACCTAACGAGAGAACTATGGC 716
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      TAAGAACGGGATACCGAGGAATTATTACTCGTTCTATCCAGATTGCTTACAGCTGGAAGC 626
FJ209048.13virus      TTCTACGGTATACCTCCTAACTACTATCCCTACTCTCCAGACTGCTTACATGTAGAGCG 641
EU769116.12virus      TCATCACGGGATACCCAAGCAGTTCTTTGCGTATACTTACGATTTATTGACCCCGACTA 776
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      CAGAGTACACGGTGATGATGACGCGTTGGTAAAGTGAAGTACGAGAAATGGTAGCCGTA 686
FJ209048.13virus      ACGCATACAAGGATATGATGCCGCTTTAGCAACGAGTTAGGGAAGATGGTAGCACTCAA 701
EU769116.12virus      TAGCCTCATGAACCATTCGGCGATTAAATGCTTACAACCTTAGCGAGGATTCAAGCATTTAA 836
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      CAGAGCAAACTCGAGTGGTTCTGGCGAACACAACGCTTTTGAGAAGACGGCTGTGTCGCC 746
FJ209048.13virus      CAAAAACGCTGGAGGTAAGCGTACGCAACATAACTTGTGTTGAGGAGACTGACATATCTCC 761
EU769116.12virus      GAATAAGAT---AGCTTCAGTGAACAATACTATGCATAACACATACCAGCTG-AACCAAG 891
                        *      *      *      *      *      *      *      *

EU769114.11virus      GCACATCTTTATGGGTGGACGCAATAA 774
FJ209048.13virus      TCAAAATTTTACAGGTAATCGCAGATGA 789
EU769116.12virus      GGAGCTGTTTCAAGGAGT----- 909
                        *      *      *      *
    
```

ภาพที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเปรียบเทียบกับระหว่าง PMWaV-1 และ PMWaV-2 และความคล้ายกันในระดับที่ต่ำ

ผลดังกล่าวทำให้ชุดของไพรเมอร์ ที่ออกแบบใหม่เหมาะสมกับไวรัส PMWaV ชนิดที่ 1 และชุดของไพรเมอร์ที่ออกแบบให้เหมาะสมกับไวรัส PMWaV ชนิดที่ 2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันอย่างสิ้นเชิงและผลการตรวจสอบความน่าจะเป็นของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายด้วยการ Blast (Altschul *et. al.*, 1990) พบว่า มีความต่างกันให้ค่า E value มากกว่า 1000 เท่า การพัฒนาวิธีตรวจสอบไวรัสทั้ง 2 จึงออกแบบให้อยู่ในรูป Multiplex LAMP

นับจนถึงปัจจุบันแม้ Notomi *et. al.*, (2000) จะได้รายงานการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบใหม่ แต่ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีรายงานการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ LAMP มากกว่า 1 ชุด ในรูป Multiplex แต่อย่างใด ที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากในแต่ละระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ LAMP มีไพรเมอร์เกี่ยวข้องกับบริเวณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็น

เอถึง 6 บริเวณหรือต้องมี 4 ไพร์เมอร์เป็นอย่างน้อย เมื่อนำมาคิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้อง จะพบว่ากินบริเวณมากถึง 120 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็นความน่าจะเป็นได้ถึง $(1/4)^{120}$ ซึ่งสูงกว่า PCR ที่เกี่ยวข้องกับไพร์เมอร์เพียงคู่เดียว ความน่าจะเป็น $(1/4)^{40}$ มากถึง $(1/4)^{80}$ หรือ 1.461×10^{48} เท่า

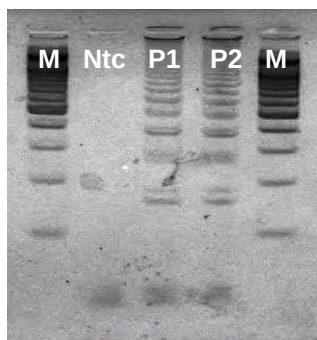
ดังนั้นในระบบ Multiplex LAMP 2 ยีนใดๆ ซึ่งมีไพร์เมอร์เกี่ยวข้องกับบริเวณ 12 บริเวณ (8 ไพร์เมอร์) และหากระบบยีนเป็นระบบที่ใกล้เคียงหรือมีความสัมพันธ์กัน โอกาสที่จะเกิดการผิดพลาดและเพิ่มจำนวนแบบ primer dimmer กับไพร์เมอร์ด้วยกันจะสูงมาก

อย่างไรก็ตามเนื่องจากระบบการตรวจไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรดในครั้งนี้ แม้จะมีเป้าหมายในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่เหมือนกัน แต่ตัวยีนเป้าหมายเป็นไวรัสคนละชนิด ดังนั้น จึงได้ทดลองทำ Multiplex LAMP ขึ้นเป็นครั้งแรก การทดลองปรับสภาวะของปฏิกิริยาทำให้พบว่า การเพิ่มปริมาณในระบบ Multiplex จะประสบความสำเร็จ เมื่อมีการปรับสัดส่วนโมลของไพร์เมอร์เป็น โมลของไพร์เมอร์ F3 B3 FIP และ BIP ของคู่แรก ต่อ คู่ที่สอง เป็น 1:1 โดยปรับตัวปฏิกิริยารวมของไพร์เมอร์ไม่เกิน 40 pmol F3 B3 และ 5 pmol FIP BIP ของทั้ง 2 ชุดไพร์เมอร์และในปฏิกิริยาจะต้องขาดเซตสารเคมีมากกว่าปฏิกิริยาปกติที่รายงานโดย Notomi *et. al.*, (2000) เป็น dNTP เพิ่ม 1.5 เท่าของ dNTP ปกติ $MgSO_4$ เพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่าของปกติ และเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์เป็น 1.2 เท่าของปกติ

Multiplex ของปฏิกิริยามาตรฐานของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดสามารถดำเนินการได้ในหลอดเดียวและให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในรูปแบบชั้นบันได ที่เป็นลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP นอกจากนี้เมื่อดำเนินการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยระบบเรืองแสงโดยใช้เบต้าฟลูออรีนิวเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลเรืองแสงทำปฏิกิริยา competitive hybridization เป็นโพลบทำปฏิกิริยา hybridization ในภาวะอุณหภูมิห้องโดยใช้ PNA โพลบ 5 μM quencher 4 μM LAMP products 1 μL ใน 10 mM PBS ให้ผลการเรืองแสงเป็นดังภาพที่ 29.

การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพร์เมอร์ในรูปแบบ Multiplex กับไวรัสเป้าหมายทั้งสองชนิด PMWaV-1 และ 2 และไวรัสอื่นที่พบในประเทศไทย พบว่าชุดไพร์เมอร์ Multiplex ยังคงมีความจำเพาะต่อไวรัสทั้ง 2 ชนิด และไม่ทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของไวรัสพืชหลักชนิดอื่นที่พบในประเทศแต่อย่างใด ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของภาพรวมชุดไพร์เมอร์ทั้งสองในการตรวจสอบชนิดของไวรัส โรคเหี่ยว (ภาพที่ 30.)

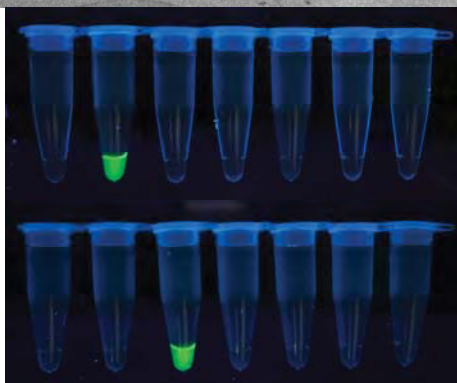
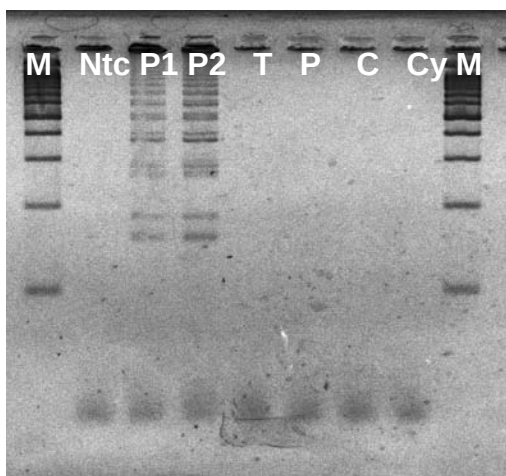
ทำนองเดียวกันการทดสอบ ความไวของปฏิกิริยา พบว่าการใช้คู่ไพร์เมอร์ผสมที่เป็น Multiplex ยังคงให้ผลการเพิ่มปริมาณชั้นบันไดโปรตีนเปลือกหุ้มได้เป็นอย่างดี สามารถตรวจสอบแม่แบบที่เป็นดีเอ็นเอของยีนเปลือกหุ้มได้ในระดับ 100 ชุด (ก๊อปปี้) ของยีน แม้จะต่างจากการแยกตรวจ 10 เท่าแต่สามารถดำเนินการได้ในหลอดเดียวซึ่งเป็นข้อได้เปรียบอย่างมาก (ภาพที่ 31.)



Probe to PMWaV-1

Probe to PMWaV-2

ภาพที่ 29 ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จาก multiplex RT-LAMP ของไพรมอร์ผสม(บน)และการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอโดยใช้ PNA probe จำเพาะต่อ PMWaV-1 และ 2 บนพื้นฐานการทำ competitive hybridization (ล่าง) เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน NTC ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบและ เลนตัวอย่าง PMWaV-1 และ 2 ตามลำดับ

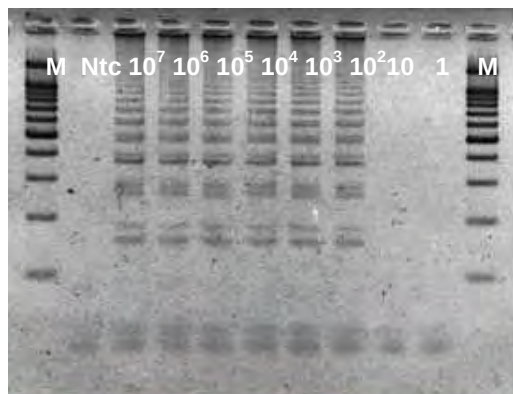


Probe to PMWaV-1

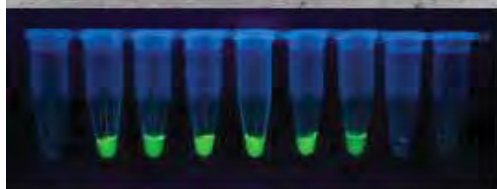
Probe to PMWaV-2

ภาพที่ 30 ความจำเพาะของปฏิกิริยาตรวจสอบจากผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จาก multiplex RT-LAMP ของไพรมอร์ผสม(บน)และการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอโดยใช้ PNA probe จำเพาะต่อ PMWaV-1 และ 2 บนพื้นฐานการทำ competitive hybridization (ล่าง) เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน NTC ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

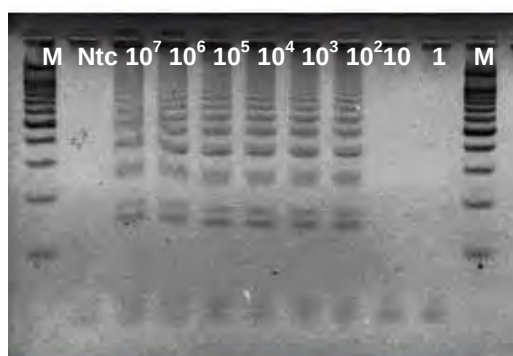
เอแม่แบบและ เลนตัวอย่าง P1 PMWaV-1 และ P2 PMWaV-2 เลน T Tobacco mosaic virus เลน P Papaya ringspot virus เลน C cucumber mosaic virus และ เลน Cy Cymbidium mosaic virus ตามลำดับ



PMWaV-1



Probe to PMWaV-1



PMWaV-2



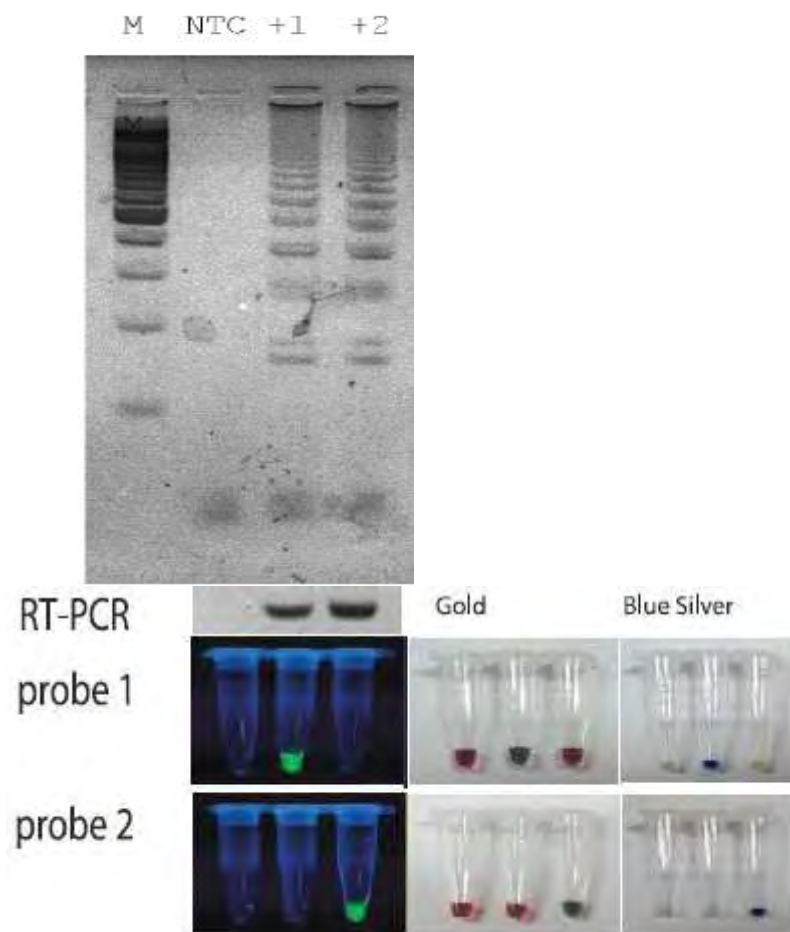
Probe to PMWaV-2

ภาพที่ 31 ความไวของปฏิกิริยาตรวจสอบจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก multiplex RT-LAMP ของ ไพรเมอร์ผสม และการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยใช้ PNA probe จำเพาะต่อ PMWaV-1 และ 2 บน พื้นฐานการทำ competitive hybridization เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์เกอร์ เลน NTC ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบและ เลนตัวอย่าง PMWaV ที่ทราบจำนวนชุดของดีเอ็นเอหรือ ก็อปปี จาก 10^7 -1 ก็อปปี ตามลำดับ ภาพชุดบนแสดงผลความไวของปฏิกิริยาต่อ PMWaV-1 และภาพชุดล่างแสดงผล ความไวของปฏิกิริยาต่อ PMWaV-2 ตามลำดับ

ผลการพัฒนาปฏิกิริยาเพื่อตรวจไวรัสสายพันธุ์ทั้งสองพร้อมกันดังกล่าวนี้ ร่วมกับการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอโดยอาศัยโพลีเมอเรสที่ทำจากเบต้าฟิโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด สะท้อนให้เห็นความสำเร็จในการพัฒนาปฏิกิริยาสำหรับการตรวจ ซึ่งจะใช้เป็นฐานสำหรับการต่อยอดไปสู่การควบคุมและป้องกันโรคไวรัสเหี่ยวในสับปะรดในระยะยาวต่อไป

เนื่องจากระบบดังกล่าวไม่เคยมีรายงานมาก่อน แม้แต่กลุ่มนักวิจัยนำที่เป็นห้องปฏิบัติการระดับโลกอย่างเช่น Dr. John Hu แห่ง University of Hawaii ที่ศึกษาไวรัสในระดับต้นๆ และการทำ multiplex LAMP ยังเป็นครั้งแรกนับตั้งแต่ Notomi *et al.*, 2000 ได้คิดค้นเทคนิคขึ้น ดังนั้นผลการดำเนินการในครั้งนี้จะช่วยให้สามารถช่วงชิงความเป็นผู้นำในการพัฒนาวิธีการตรวจที่รวดเร็วในต่อไป

นอกจากการตรวจสัญญาณจากการเรืองแสงแล้ว โครงการย่อย ยังได้นำระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอด้วยการเปลี่ยนสีทางแสงในรูปแบบเดียวกันกับที่รายงานใน ข้อ 4.2.1 โดยใช้อนุภาคนาโนทองคำและนาโนเงินสีน้ำเงิน โดยใช้เงื่อนไขปฏิกิริยาที่ในปฏิกิริยาประกอบด้วยทองคำขนาด 20 nm 5000 ppm 10 μ l หรือเงิน 200 nm 5 μ l ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP 1 μ l PNA probe ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด 1 μ M และ 1 μ l เกลือในรูปแบบสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ (100mM PBS) โดยปฏิกิริยา hybridization เกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง ผลการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนั้นจะเกิดขึ้นในเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที และผลการตกตะกอนของอนุภาคนาโนเงินสีน้ำเงินจะเกิดขึ้นในเวลา 15 นาที ดังภาพที่ 32.



ภาพที่ 32 ผลการทดสอบการเปลี่ยนสีผ่านรูปแบบการตรวจสอบสัญญาณบนพื้นฐานการเปลี่ยนสีทางแสงของอนุภาคนาโนทองคำ (Gold) และนาโนเงินสีน้ำเงิน (Blue silver) เปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยการเรืองแสงและ PCR +1 ตัวอย่างให้ผลบวกของ PMWaV-1 +2 ตัวอย่างให้ผลบวกของ PMWaV-2 ตามลำดับ

การพัฒนากระบวนการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยใช้ PNA probe ร่วมกับการตกตะกอนของอนุภาคทองคำนาโน สะท้อนให้เห็นถึงความจำเพาะของ probe แต่ละชนิดในการแสดงผลการจำแนกชนิดของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ออกจากกันโดยทำการทดลองเพิ่มปริมาณในหลอดเดียว ซึ่งเป็นหัวใจของความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจซึ่งจะใช้เป็นรากฐานสำหรับการต่อยอดไปสู่การตรวจติดตามตามหลัก point of care การควบคุมป้องกันและจัดการโรคให้กับภาคอุตสาหกรรมของประเทศในระยะยาวต่อไป

4.2.3 พัฒนาวิธีการตรวจสอบการสุกแก่ทางสรีรวิทยาแบบไม่ทำลายผลในสับปะรด

การสุกแก่ทางสรีรวิทยาของผลไม้มีผลต่อคุณภาพของผล ในผลไม้บางชนิดการเก็บเกี่ยวในภาวะที่ยังไม่สุกนำไปสู่การด้อยคุณภาพ ทั้งในแง่รสชาติ สี กลิ่น และการเปลี่ยนแปลง

ทางสรีรวิทยาในทิศทางที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งโดยรวมจะมีผลต่ออายุการเก็บรักษา และคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวได้ (Kader, 1999)

โดยทั่วไป คุณภาพของผลไม้จะสูงสุดเมื่อปล่อยให้สุกแก่เต็มที่คาต้น แต่ในทางปฏิบัติเกษตรกรไม่สามารถรอจนถึงภาวะดังกล่าวแล้วค่อยเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ การทำนายการสุกแก่ได้อย่างแม่นยำก่อนหน้าจะช่วยให้เกษตรกรสามารถกำหนดระยะเวลาการเก็บและกำกับดูแลคุณภาพของผลผลิตได้ดียิ่งขึ้น

ในอดีต ดัชนีชี้วัดการสุกของผลไม้ที่นิยมใช้มีทั้งลักษณะภายนอกเช่น การเปลี่ยนแปลงทางสีของผล ความแน่นเนื้อ ต่อมาเริ่มมีการตรวจสอบไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในผล ซึ่งมีหลายดัชนีที่เกี่ยวข้อง เช่น total soluble solid titratable acidity ฯลฯ แต่การวัดการสุกแก่ยังคงมีความคลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้ ในทุกครั้งที่วัดค่าดัชนีนี้ยังมีความเสี่ยงในการทำลายผลให้เกิดความเสียหาย (Pattee, 1985)

โดยปกติ การสุกแก่ของผลเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (phenotype) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงระดับและชนิดของการแสดงออกของยีนภายในผลไม้

ในการทดลองได้ใช้สับปะรดเป็นโมเดลในการศึกษาเนื่องจากเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ สับปะรดเป็น non-climacteric fruit หากเก็บเกี่ยวพัฒนาการของผลหลังการเก็บเกี่ยวจะไม่เด่นชัด ผลจะผลิตก๊าซเอทิลีนน้อยมากและไม่ตอบสนองต่อก๊าซนี้ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของผลภายหลังการสุกจึงไม่เกี่ยวข้องกับก๊าซเอทิลีน เจกเช่นกับที่พบใน climacteric fruit

การศึกษาการแสดงออกของยีนหลังผลสุก พบว่า ภายหลังการเก็บเกี่ยว ในผลจะพบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม chitinase แต่การแสดงออกของยีนในกลุ่มดังกล่าว ไม่มีสอดคล้องกับระยะการสุกแก่ นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของยีน ribosomal RNA L10 และ ยีนสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องในกลุ่มเดียวกัน มีการแสดงออกสอดคล้องกับการสุกและการเปลี่ยนสีของผล แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละระยะจึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นมาร์คเกอร์ ในการทำนายการสุกของผลได้ (Taira *et al.*, 2005, Moyle *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ดี ในระหว่างการสุก พบว่า มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในการแสดงออกของยีนในกลุ่มการกระจายและเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตภายในผล โดยเฉพาะยีน *AcSUT 1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสภายในผลจากแหล่งผลิตน้ำตาล (source) จากลำต้นไปยังภายในผล (sink) เป็นอีกยีนหนึ่งที่มีการแสดงออกและหยุดการแสดงออกเด่นชัดในแต่ละระยะ ระหว่างที่ผลมีพัฒนาการการสุกแก่ทางสรีรวิทยา โดยพบว่า ขณะที่ผลสุกเต็มที่หยุดการเคลื่อนย้ายน้ำตาลทำให้การแสดงออกของยีนจะหยุดลง และไม่เกิดการเคลื่อนย้ายน้ำตาลชนิดดังกล่าวไปยังผลอีก ดังนั้นจึงได้นำการแสดงออกของยีนนี้มาใช้เป็นดัชนีในการทำนายการสุกแก่

การวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบการสุกแก่ของผลสับปะรด โดยการสร้างระบบการตรวจผ่าน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการแสดงออกของยีน *AcSUT 1* เพื่อตรวจสอบการแสดงออกบน พื้นฐานทางเทคนิค RT-LAMP และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณดีเอ็นเอที่ได้ควบคู่ไปกับการสุกแก่ที่เกิดขึ้น และตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอผ่านการเปลี่ยนแปลงทางสีของสารละลาย อนุภาคนาโนทองคำที่สกัดได้จากใบย่อยของจุกสับปะรดเป็นตัวอย่างในการทดสอบ

การทดลองเริ่มจากการออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer Ver 4.0 (Fujitsu, Japan) และคัดเลือกผ่านเงื่อนไขเสถียรภาพทางอุณหภูมิตำแหน่งการจับตัว และโอกาสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะ ทำให้ได้ไพรเมอร์ 4 ชนิดครอบคลุม 6 บริเวณของยีน

การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงโดยการทำ Basic Local Alignment Search พบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีทั้ง 6 บริเวณ จำเพาะต่อยีน *AcSUT 1* โดยมีความสัมพันธ์ชนิด 100% และมีค่า E value 0.00005

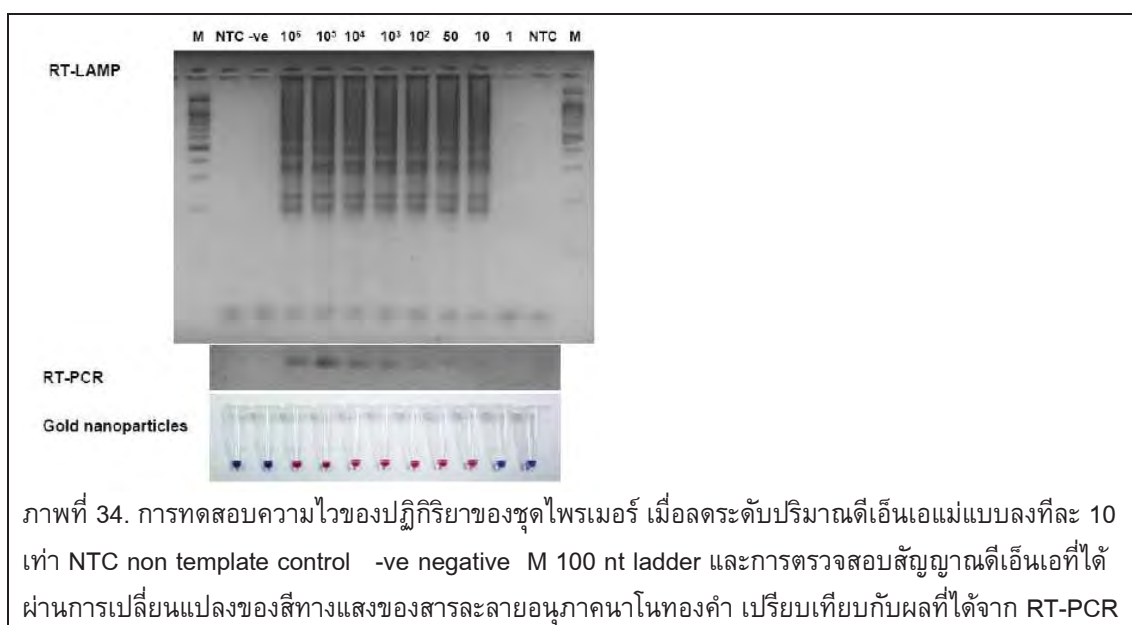
การทดสอบการเพิ่มจำนวนเบื้องต้นด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาที่ 63 °C 20mM Tris-HCl (pH 8.8) 10 mM KCl 10mM (NH₄)₂SO₄ 0.1% Triton X-100 ไพรเมอร์ F3 B3 ความเข้มข้น 5 pmol /ปฏิกิริยา ไพรเมอร์ FIP และ BIP ความเข้มข้น 40 pmol /ปฏิกิริยา พบว่าชุดไพรเมอร์ ที่ออกแบบได้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *AcSUT 1* ได้โดยจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด เทียบเท่าผลคูณของ ช่วงคู่ไพรเมอร์ 180/210 nt (ภาพที่ 33.) สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย เทคนิค RT-PCR ที่นิยมใช้

สำหรับระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ ดำเนินการด้วยการเปลี่ยนสีทางแสงในรูปแบบ เดียวกันกับที่รายงานใน ข้อ 4.2.1 โดยใช้อนุภาคนาโนทองคำ โดยใช้เงื่อนไขปฏิกิริยาที่ใน ปฏิกิริยาประกอบด้วยทองคำขนาด 20 nm 5000 ppm 10 µl หรือเงิน 200 nm 5 µl ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP 1 µl PNA probe ที่จำเพาะต่อยีน *AcSUT 1* 1 µM และ 1 µl เกลือในรูปสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ (100mM PBS) โดยปฏิกิริยา hybridization เกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง ผลการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำนั้นจะเกิดขึ้นในเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที



ภาพที่ 33. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AcSut 1* จากใบจุกของสับปะรด โดยเทคนิค RT-LAMP กับ ชุดของไพรเมอร์ที่ออกแบบและการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอที่ได้ผ่านการเปลี่ยนแปลงของสีทางแสงของ สารละลายอนุภาคนาโนทองคำ

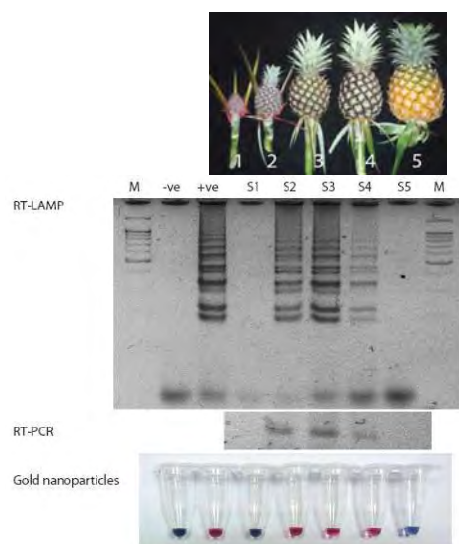
การทดสอบความไวของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ต่อจำนวนความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุด(กอปปี)เจือจางลงระดับละ 10 พบว่าชุดไพรเมอร์มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอในระดับ 10^{-7} เทียบเท่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 10 ชุด/ปฏิกิริยา (ภาพที่ 34.)



ภาพที่ 34. การทดสอบความไวของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ เมื่อลดระดับปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบลงทีละ 10 เท่า NTC non template control -ve negative M 100 nt ladder และการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอที่ได้ผ่านการเปลี่ยนแปลงของสีทางแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ เปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก RT-PCR และเมื่อนำวิธีการตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปตรวจสอบการสุกแก่ของผลสับปะรด พบว่าในผลที่ยังไม่สุกแก่ยีน *AcSUT1* ยังคงแสดงออกอย่างต่อเนื่อง ทำให้สามารถเพิ่มระดับปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-LAMP และตรวจสอบการตกตะกอนและการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนทองคำโดยใช้โพรบ พบว่าการจับตัวของโพรบกับดีเอ็นเอทำให้ไม่เกิดการตกตะกอนและการ

เปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนทองคำ อย่างไรก็ดีในผลที่สุกแก่ทางสรีรวิทยา การแสดงออกของยีน *AcSUT1* ที่หยุดลง มีผลทำให้ไม่สามารถเพิ่มระดับปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-LAMP จึงทำให้ผลการตรวจอนุภาคนาโนทองคำเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสีจากแดงเป็นม่วงได้

วิธีการดังกล่าวทำให้ สามารถตรวจสอบการสุกแก่ทางสรีรวิทยาของผลโดยไม่เป็นการทำลายผลให้เกิดความเสียหายแต่อย่างใด



ภาพที่ 35. การตรวจสอบการสุกแก่ของผลสับปะรดในแต่ละระยะในการพัฒนาการของผล จาก Stage1(S1) anthesis (2 months after flowering treatment), Stage2 (S2) late anthesis stage (2.5 months after stage1), Stage3 (S3) small fruit stage (3.5 months after flowering treatment), Stage 4 (S4) medium fruit stage (4-4.5months after flowering treatment), and Stage 5 (S5) mature fruit (5 months after flowering treatment) NTC non template control -ve negative M 100 nt ladder และการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอที่ได้ผ่านการเปลี่ยนแปลงของสีทางแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ เปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก RT-PCR

5. อภิปรายผล

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้ อาศัยการนำข้อดีทางเทคนิคของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิต่ำมาเชื่อมโยงกับการทำ nucleic acid hybridization โดย PNA ข้อได้เปรียบที่สำคัญได้แก่ 1. การที่เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิต่ำทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำที่ 60-65 °C ทำให้ลดความจำเป็นที่ต้องพึ่งพาเครื่อง thermocycler ลง 2. การทำปฏิกิริยาที่ไม่เป็นรอบ ทำให้อัตราการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสูงกว่าของ PCR 3-8 ออเดอร์ (1000-1000000000 เท่า) จึงมีปริมาณสัญญาณสูงกว่าแม้ที่ near limit of detection 3. รูปแบบปฏิกิริยาที่ใช้ไพรเมอร์ จำเพาะต่อ 6 บริเวณทำให้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิต่ำโดดเด่นเหนือกว่า PCR ในด้านความจำเพาะ

(Notomi *et al.*, 2000) ด้วยเหตุดังกล่าวทำให้รายงานส่วนใหญ่เน้นการแสดงผลด้วยตัวเทคนิค โดยไม่เชื่อมโยงกับเทคนิค nucleic acid hybridization มากนัก

อย่างไรก็ดีหากการพัฒนาเทคนิคยังต้องเน้นการตอบโจทย์ point of care เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิตีเดียเป็นเทคนิคเดียวที่เหนือกว่า เทคนิคการเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequence-based amplification) (Compton, 1991) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเอง (self-sustained replication) (Guatelli *et al.*, 1990) การเพิ่มปริมาณโดยการใช้ปฏิกิริยาแทนที่สายดีเอ็นเอ (strand displacement amplification) และการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิตีเดีย (Walker *et al.*, 1992) การเพิ่มปริมาณสัญญาณที่เป็นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ branched DNA amplification (bDNA) invader และ rolling circle amplification (Lyamichev *et al.*, 1999 และ Lizardi *et al.*, 1998) ซึ่งเทคนิคในกลุ่มหลังส่วนใหญ่ ไม่เป็น isothermal จริง หรือไม่ได้สารพันธุกรรมเป้าหมายแต่เป็นการเพิ่มสัญญาณจากโพรบแทน หรือให้ความจำเพาะที่ไม่เทียบเท่า ดังนั้นในทุกโมเดลที่ได้พัฒนาขึ้นจึงอยู่บนพื้นฐานทางเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิตีเดียทั้งสิ้น

อย่างไรก็ดี เพื่อให้เห็นศักยภาพในการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอจึงได้วางระบบให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิตีเดียให้ดีเอ็นเอมากกว่า 1 เป้าหมาย โดยการทำ multiplex LAMP การทดลอง multiplex LAMP เช่นนี้ไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยหลักการจะใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อบริเวณของยีนต่างกัน 2 ยีน 8 บริเวณ และเนื่องจากการปรับปรุงปฏิกิริยาให้ดำเนินการได้ในหลอดเดียว จึงทำให้ต้องปรับเงื่อนไขของปฏิกิริยาซึ่งต่างไปจากปกติ

ในที่นี้ ได้ดำเนินการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิตีเดียสำหรับการตรวจไวรัสโรคกึ่งต่างชนิดซึ่งได้แก่ WSSV และ IHNV ได้พร้อมกัน และพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิตีเดีย สำหรับการตรวจไวรัสโรคใบเหี่ยวในสับปะรดทั้งชนิดที่ 1 และ 2 ได้พร้อมกัน รูปแบบการตรวจดังกล่าวจึงเป็นนวัตกรรม

สำหรับการเทคนิคการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอในครั้งนี้อาศัยการจับตัวของโพรบกับสารพันธุกรรมเป้าหมายในรูปแบบ nucleic acid hybridization เน้นการแสดงผลเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่การเชื่อมโยง nucleic acid hybridization กับการเรืองแสงโดยโมเลกุลฟลูออโรฟอร์และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสีทางแสงของอนุภาคนาโนของโลหะ เน้นคุณลักษณะของโพรบ PNA ที่ใช้ ได้แก่ ความจำเพาะในระดับ single nucleotide การจับตัวด้วย affinity ที่สูงกว่าและความสามารถในการทำหน้าที่ที่อุณหภูมิห้อง (Vilaivan and Srisuwannaket, 2006)

การแสดงผลระบบแรกอาศัยโพรบและquencher โพรบจะได้รับการออกแบบให้ทำหน้าที่จับตัวกับยีนเป้าหมาย โดยต้องมีการติดฉลาก ในที่นี้ได้แก่ FAM fluorophore ที่ตำแหน่ง 5' ขณะที่ quencher ได้รับการออกแบบให้จับตัวกับโพรบและมีโมเลกุลที่เป็นคู่รับพลังงาน ในที่นี้ได้แก่ BHQ เป็นโมเลกุลรับพลังงาน ในขั้นต้นต้องนำโพรบและquencher มาจับตัวกันก่อนเพื่อให้แสงจาก fluorophore ที่ตำแหน่ง 5' ดับลง จากนั้นหากในทุกตัวอย่างที่มียีนเป้าหมาย ตัวอย่างเหล่านั้นก็จะให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณอย่างแม่นยำ ดีเอ็นเอที่ได้จะจับ

ได้กับโพรบ PNA และทุกครั้งที่การจับตัวประสบความสำเร็จ quencher ของโพรบดังกล่าวจะหลุดเป็นอิสระ ไม่สามารถรับพลังงานจากโพรบได้อีกต่อไป ส่งผลให้เกิดการเรืองแสง

การแสดงผลในส่วนที่สอง อาศัยคุณลักษณะของ PNA ทั้งในแง่ที่ไม่มีประจุ ในแง่การจับตัวด้วย affinity ที่สูงกว่า DNA และจำเพาะมากกว่าแม้เพียง single mismatch ก็ไม่จับตัว และความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิห้อง โดย PNA probe จะแสดงพฤติกรรมเป็น coagulant โดย PNA probe จะจับตัวอยู่ที่ผิวของอนุภาคทองคำการจับตัวนี้เกิดได้จากส่วนของ nitrogen/oxygen ในเบสและจากโครงสร้างของ PNA เองที่เป็น hydrophobic neutral structure โดยในขณะที่ในตัวอย่างไม่มียีนเป้าหมาย ในภาวะที่มีเกลือเข้มข้นต่ำ PNA จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาคทำให้เกิดการตกตะกอน เปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคทองคำจากสีแดงอมชมพูไปเป็นสีม่วงเข้ม แต่ในขณะที่ตัวอย่างมียีนเป้าหมาย การจับตัวระหว่าง PNA probe กับ ดีเอ็นเอเป้าหมายจะก่อให้เกิด hybridization complex ซึ่งเป็นโครงสร้างที่คล้ายกับ double stand DNA ทำหน้าที่ป้องกันการจับตัวของอนุภาคทองคำ จึงทำให้เกิดการตกตะกอน และไม่เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคทองคำ (Kanjawarut and Xu, 2009)

โมเดลที่ดำเนินการประกอบไปด้วย การตรวจตรวจยีน neuraminidase ของ 2009 H1N1 human influenza A virus คือยา oseltamivir และ ระบบการตรวจไวรัสชิคุนกุนยา สำหรับการประยุกต์ทางการแพทย์ และการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัสกุ่ม WSSV และ IHNV ระบบการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัส PMWaV สายพันธุ์ 1 และ 2 และการตรวจการสุกแก่ทางสรีระวิทยาผ่านการแสดงออกของยีน *AcSUT1* สำหรับการประยุกต์ทางการเกษตร โดยแต่ละระบบ ได้นำการตรวจสัญญาณในแต่ละระบบมาใช้ ขั้นตอนการพัฒนาได้รวมการสืบค้นข้อมูลเพื่อตอบโจทย์ปัญหา การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การโคลนยีนเพื่อใช้เป็นโมเลกุลอ้างอิง การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การพัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ การเชื่อมโยงระบบเข้าด้วยกัน และการทดสอบประเมินผลปฏิกิริยา โดยแต่ละโมเดลที่ได้ดำเนินการสามารถตรวจสอบทางพันธุกรรมเสร็จสิ้นได้ในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ด้วยความแม่นยำโดยดูจากปฏิกิริยาที่เฉพาะตัว ความไวของปฏิกิริยาที่อยู่ในระดับ มากกว่า 100 ก๊อปปี้ของยีนแม่แบบที่ปรากฏในตัวอย่าง และที่สำคัญลดระดับการพึ่งพาห้องปฏิบัติการเนื่องจากตลอดขั้นตอนใช้เพียง heat block incubator หรือ water bath เท่านั้น

ความสามารถลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการนี้เป็นเพราะการเลือกรูปแบบการเพิ่มปริมาณแบบ isothermal platform และการตรวจสัญญาณโดย PNA ที่ทั้งสองช่วยให้การดำเนินการได้ที่อุณหภูมิห้อง ทำนองเดียวกันการเลือกรูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะถึง 6 บริเวณ ทำให้เกิดความโดดเด่นในการสร้างความจำเพาะของปฏิกิริยาอย่างน้อย 4^{-100} (จากความต่างกันของไพรเมอร์รวมในระบบ 160-180 nt เมื่อเทียบกับของ PCR ที่มีเพียง 50-60 nt) platform นี้เป็น platform เดียวที่ให้ความจำเพาะสูงกว่า platform ใดๆ และจากความจำเพาะของ PNA ที่โดดเด่นในเรื่อง error prone hybridization

ในระบบเรืองแสงเมื่อทำปฏิกิริยา การแข่งขันระหว่างเป้าหมายจะทำให้ quencher หลุดออก จึงทำให้คู่ โพรบ/quencher ที่ติดกลับส่งสัญญาณขึ้น ทำให้เห็นกลไกการจับตัวได้โดยตรง อย่างไรก็ตามระบบการตรวจสัญญาณดังกล่าวใช้ความเข้มข้นของโพรบสูง ใช้โพรบมาก ซึ่งการสังเคราะห์โพรบมีต้นทุนเชิงพาณิชย์ 50-100 ng ประมาณ 25000-30000 บาท (รวมติดฉลาก FAM) ทำให้มีต้นทุนในการดำเนินการสูงตามไปด้วย นอกจากนี้ระบบการตรวจการเรืองแสงจำเป็นต้องใช้ แหล่งกำเนิดแสง UV ความยาวคลื่น 312-350 nm ซึ่งเกี่ยวข้องกับความยาวคลื่นที่อาจก่อให้เกิดอันตรายขณะใช้งานได้ ขณะที่ในระบบการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงผ่านการจับตัวแบบ hybridization ที่เชื่อมโยงกับการตกตะกอนของอนุภาคนาโนของโลหะ มีข้อดีที่เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องมีอุปกรณ์เสริมอื่น และมีต้นทุนต่ำกว่า เนื่องจากระบบการตรวจสัญญาณดังกล่าวใช้ความเข้มข้นของโพรบต่ำกว่า 10-20 เท่า ขณะที่ต้นทุนของสารละลายทองคำนาโน/ปฏิกิริยา ไม่เกิน 1 บาท/ปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามการตรวจสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางสีทางแสงของอนุภาคนาโน ยังมีข้อจำกัดในแง่ของอายุการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนที่ใช้ที่จะเสื่อมลงเนื่องจากการตกตะกอนในเวลา 1 เดือนสำหรับทองคำ และ 6 เดือนสำหรับเงินสีน้ำเงิน

เทคนิคที่ได้ดำเนินการในครั้งนี้อาจตอบโจทย์เฉพาะการตรวจเชิงคุณภาพ สำหรับการตรวจสอบสัญญาณเชิงปริมาณ จำเป็นต้องพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณที่สอดคล้องกับปริมาณสารพันธุกรรมแม่แบบ และการตรวจวัดสัญญาณอย่างง่ายที่ตอบโจทย์การวัดระดับสัญญาณตามปริมาณจริง ซึ่งสามารถดำเนินการได้ผ่านการปรับวิธีการทางเทคนิคต่อไป

อย่างไรก็ดี หากพิจารณาภาพรวมพบว่าการพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์โดยเชื่อมโยงเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบลูบอุณหภูมิตีเดียว ในการเพิ่มสัญญาณทางพันธุกรรม และพัฒนาระบบการตรวจสัญญาณสารพันธุกรรมโดยใช้เบต้าไพโรลิติลิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นโพรบและตรวจสัญญาณผ่านการเรืองแสง (fluorescence) หรือการเปลี่ยนสีทางแสง (colorimetry) ในภาพรวม สรุปได้ว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีข้อได้เปรียบเหนือกว่าเทคนิคที่มีรายงานในปัจจุบัน ช่วยให้การตรวจสารพันธุกรรมทำได้ภายในเวลาน้อยกว่า 60 นาที ที่อุณหภูมิคงที่ โดยลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ และให้ความจำเพาะสูงเนื่องจากอาศัยทั้งชุดของไพรเมอร์ที่จับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายและการยืนยันผลโดยเบต้าไพโรลิติลิลเพปไทด์นิวคลีอิกโพรบ โดยกระบวนการโดยรวมสามารถปรับประยุกต์ให้อยู่ในรูปแบบชุดตรวจสำเร็จได้ง่าย

6. ผลลัพธ์ของโครงการ

ได้องค์ความรู้ที่สามารถพัฒนาต่อยอด ไปสู่การสร้างชุดตรวจสำเร็จสำหรับการตรวจยืนยัน neuraminidase ของ 2009 H1N1 human influenza A virus ดี้อย่า oseltamivir และ ระบบการตรวจไวรัสซิกนุญยาสำหรับการประยุกต์ทางการแพทย์และการตรวจยืนยันจำเพาะต่อไวรัสกุง

white spot syndrome virus (WSSV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ระบบการตรวจยีนจำเพาะต่อไวรัส pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaV) สายพันธุ์ 1 และ 2 และการตรวจการสุกแก่ทางสรีระวิทยาผ่านการแสดงออกของยีน *AcSUT1* สำหรับการประยุกต์ทางการเกษตร ทั้งหมด 5 องค์ความรู้

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

Nussara Donraman. 2012. Genosensor Based on Colorimetric Detection Using Silver Nanoparticles for Chikungunya Disease Assay. Master Thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

นุสรา ดลระมาน. จีโนเซนเซอร์ด้วยการตรวจสอบสีของอนุภาคเงินนาโนเพื่อใช้ในการสอบวิเคราะห์โรคชิคุนกุนยา

Najwa Yanya. 2012. Simple and Rapid Technique for Detection of Virus Causing Pineapple Wilt-Disease. Master Thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

นัจวา ยานยา. เทคนิคอย่างง่ายและรวดเร็วในการตรวจหาไวรัสที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในสับปะรด

Proceeding

Chaumpluk, P. Chaiprasart, P. Vilaivan, T. 2012. Postharvest Non-destructive Determination of Fruits: a Model on Fruit Maturity Assay via Biosensor Based on Colorimetric Change of Gold Nanoparticles. Acta Horticulture 945:205-211.

เอกสารยื่นขอสิทธิบัตร 2 รายการ

อานาล็อกดีเอ็นเอสังเคราะห์และโพลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์เพื่อการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคเหี่ยว สับปะรดชนิด พีเอ็มดับเบิลยูเอวี (PMWaV) 1 และ 2 และวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรม

โพลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์และอานาล็อกดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสโรคกุ้งชนิด ดับเบิลยูเอสเอสวี (WSSV) และ ไอเอสเอสเอ็นวี และวิธีตรวจสอบสารพันธุกรรม (กำลังเตรียมตราฟ)

7. เอกสารอ้างอิง

- ชำนาญ พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ และ อรุณ กองกาญจนะ. 2542. การป้องกันและกำจัดมดในไร้สับปรด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่น ๆ กองกัญและสัตววิทยา. 3 น กรุงเทพฯ.
- ณัฐพร อุดมพงษ์ และปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ, 2551. การตรวจวิเคราะห์เชื้อตัวแดงดวงขาวในกุ้งใน 45 นาที. การประชุมวิชาการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยนเรศวร 5-14 กันยายน 2551.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Anthony, P. F. T. 2000. Biosensors-Sense and Sensitivity. Biochemistry 290:1315-1317.
- Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. Acta Horticulture 334: 383-386.
- Carletti F, Bordi L, Chiappini R, Ippolito G, Sciarrone MR, Capobianchi MR, Di Caro A, Castilletti C. 2007. Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay. Am J Trop Med Hyg. 77:521-4.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009. Swine influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 58, 400-402.
- Chevillon C., Briant L., Renaud F., Devaux C. 2008. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. Trends in Microbiology 16: 80-88.
- Collins, P. J.; Haire, L. F.; Lin, Y. P.; Liu, J.; Russell, R. J.; Walker, P. A.; Skehel, J. J. , Martin, S. R.; Hay, A. J.; Gamblin, S. J. 2008. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. Nature 453:1258-1261.
- Compton, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350:91-92.
- Flegel, T.W., Sriurairatana, S., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S. and Withyachumnarnkul, B. 1995. Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. Pp. 76-83 In: C.L. Browdy and J.S. Hopkins, editors. Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Grunenwald, H. 2009. Direct PCR from a Single Bacterial Colony Without DNA

- Extraction Using the FailSafe™ PCR System. [Online]. Available from: http://www.epibio.com/newsletter/8_3fail_safe.pdf [2010, May 15]
- Guatelli, J.C., Whitefield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. and Gingeras, T.R. 1990. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retro viral replication. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 87:392-396.
- Hu, J.S., D.M. Sether, X.P. Liu and M. Wang. 1997. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple Closterovirus in Hawaii. *Plant Disease*. 81: 1150-1154.
- Kader, A.A. 1999. Fruit maturity, ripening and quality relationships. *Acta Hort* 485:203-208.
- Kanjanawarut, R., and Su, X. D. 2009. Colorimetric detection of DNA using unmodified metallic nanoparticles and peptide nucleic acid probes. *Anal. Chem.* 81:6122–6129.
- Khan A.H., Marita K., Parquet M.C., Hasebe F., Mathenge E.G.M., Igarashi A. 2002. Complete nucleotide Sequence of chikungunya virus and evidence for an internal poly adenylation site. *J. Gen. Virol.* 83:3075-3084.
- Kono, T., Savan, R., Sakai, M., and Itami, T. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. of Virol Methods* 115:59-65.
- Lightner, D.V., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Tang, K.F.J., Redman, R.M, Andrade, T.P.D., Bonami, J.R., 2004. Infectious Myonecrosis: New Disease in Pacific White Shrimp. *The Advocate*. Global Aquaculture Alliance. October 2004.
- Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. and Ward, D.C. 1998. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification *Nature Genetics* 19:225-232.
- Lockley, A.K. and Bardsley, R.G., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Sci. and Technol.* 11: 6777-9.
- Lyamichev, V., Mast, A.L., Hall, J.G., Prudent, J.R., Kaiser, M.W., Takova, T., Kwiatkowski, R.W., Sander, T. J., de Arruda, M., Arco, D.A., Neri, B.P. and Brow, M.A. 1999. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nature Biotech.* 17:929-926.

- Meijer, A., Lackenby, A., Hungnes, O., Lina, B., van der Werf, S., Schweiger, B., Opp, M., Paget, J., van de Kassteele, J., Hay, A., Zambon, M. 2009. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis* DOI: 10.3201/eid1504.081280.
- Melzer, M.J., A.V. Karasev, D.M. Sether and J.S. Hu. 2001. Nucleocapsid sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt associate virus-2. *J. Gen. Viro.* 82:1-7.
- Mirkin, C. A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C., Storhoff, J.J. 1996. DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382: 607–609.
- Moyle, R., Fairbairn, D.J., Ripi, J., Crowe, M. and Botella, J.R. 2005. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *J. Experimental Botany* 56:101-112.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28:e63.
- Pattee, H.E.(ed.).1985. Evaluation of quality of Fruits and vegetables. AVI Publishing Co. Inc. Westport, CT.p. 410.
- Pienpinijtham, P., Thammacharoen, C., and Ekgasit S. 2010. Enhancement of reducing efficiency of soluble starch for green synthesis of gold nanoparticles. *Pure and Applied Chemistry International Conference* 21-23 January 2010 Sunee Grand Hotel Ubon Ratchathani, Thailand. p. 366.
- Pfeffer M, Linssen B, Park M.D., Kinney R.M. 2002. Specific detection of chikungunya virus using RT-PCR/nested.PCR combination. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49:49-54.
- Powers A.M., Bravlt, A.C., Tesh R.B., Weaver S.C. 2000, Reemerged of Chikungunya and onyong-nyong virus: evidence for distinct geographical lineage and distance evolutionary relationship *J. Gen V.*101 81: 417-479.
- Rianthavorn P, Prianantathavorn K, Wuttirattanakowit N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2010. An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation.. *Int J Infect Dis.* 2010 Sep;14 Suppl 3:e161-5.

- Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Nunthaboot, N.,• Sompornpisut, P., Hannongbua, S. 2009. Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach. *Amino Acids* DOI 10.1007/s00726-009-0452-3.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, J. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sether, D.M., and J.S. Hu. 2002a. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* 92: 928-935.
- Sether, D.M., and J.S. Hu. 2002b. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt associated virus-2 and Mealybug Wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Dis.* 86: 867-874.
- Smith D. R., Lee J. S, Development of Field-based real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for detection of chikungunya and o'nyung o'nyung viruses in mosquitoes. *Am J. Trop Med. Hyg.* 81:679-684.
- Sun, Z.F., Hu, C.Q., Ren, C.H., and Shen, Q. 2006. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *J. of Virol. Methods* 131:41-46.
- Suparpprom, C., Srisuwannaket, C., Sangvanich, P., Vilaivan, T. 2005. Synthesis and oligodeoxynucleotide binding properties of pyrrolidiny peptide nucleic acids bearing prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones. *Tetrahedron Lett.* 46: 2833-2837.
- Taira, T., Toma, N., Ichi, M., Takeuchi, M., and Ishihara, M. 2005. Tissue distribution, synthesis stage and ethylene induction of pineapple (*Ananus comosus*) chitinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:852-854.
- Thomson, D.G., Enright, A., Faulds, K., Smith, W.E. and Graham, D. 2008. Ultrasensitive DNA detection using oligonucleotide silver nanoparticle conjugates. *Analytical Chemistry* 80: 2805-2810.
- Vilaivan, T., Srisuwannaket, C. 2006. Hybridization of pyrrolidiny peptide nucleic acids and DNA: Selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. *Org. Lett.* 8:1897-1900.

Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.C. and Shank, D.D. 1992. Strand displacement amplification- isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Research 20:1691-1696.

WHO. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Fevers.

http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section2246_12902.htm. (Retrieved 2008-07-11.)

WHO, 2009a. Pandemic H1N1 2009—Update 58 Laboratory-confirmed cases of pandemic (H1N1) 2009 as officially reported to WHO by States Parties to the International Health Regulations (2005) available online on 6 July 2009 at http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html

WHO, 2009b. Pandemic (H1N1) 2009 news brief: no. 1 Viruses resistant to oseltamivir (Tamiflu) identified. available online on 8 July 2009 at http://www.who.int/csr/disease/swineflu/newsbriefs/h1n1_antiviral_resistance_20090708/en/index.html

Project 6a: Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural sciences

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. ปิยะศักดิ์ ชุ่มพุกษ์

กิจกรรมที่ได้ทำเพิ่มเติมในช่วงขยายระยะเวลาโครงการ (1 สิงหาคม 2555 - 31 มกราคม 2556)

โครงการย่อยที่ 6a เน้นการนำเบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนารูปแบบการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โดยเชื่อมโยงกับความสำเร็จในการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอกับการพัฒนาชิปในระบบกระดาษที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการอยู่แล้ว เน้นการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

การดำเนินการอาศัยความจำเพาะในการจับตัวระหว่าง PNA กับสารพันธุกรรม เป้าหมาย บนหลักการ nucleic acid hybridization ที่ PNA มีความโดดเด่นกว่าในแง่ความแน่นในการจับตัว ความจำเพาะในระดับยิ่งยวด และการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยวัดการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงด้วยเงินนาโนเพลทสีฟ้าน้ำเงิน

วัตถุประสงค์

พัฒนาระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอโดยการนำเบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด มาประยุกต์ใช้เป็นโพรบบนชิปที่ทำด้วยกระดาษเซลลูโลส

วิธีการทดลอง

การดำเนินการอาศัยการทำปฏิกิริยา nucleic acid hybridization ระหว่างดีเอ็นเอ เป้าหมาย โพรบ ในสารละลายของนาโนเงินสีฟ้า ในปฏิกิริยาประกอบด้วย เงินนาโนเพลท ขนาด 120 นาโนเมตร ความเข้มข้น 1,200 ppm 10 ไมโครลิตร (Pakdeenard *et al.*, 2010) ดีเอ็นเอตัวอย่างได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน ฮีแมกกลูตินิน (HA) ด้วยเทคนิคลูป อูณหภูมิเดียวตามที่เคยรายงานมาก่อนหน้า โดยใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 8.8) 10 mM KCl 10mM (NH₄)₂SO₄ 0.1% Triton X-100 ไพรเมอร์ F3 B3 ความเข้มข้น 5 pmol /ปฏิกิริยา ไพรเมอร์ FIP และ BIP ความเข้มข้น 40 pmol/ปฏิกิริยา ดีเอ็นเอขนาดโพรบประมาณ 1 นาโนโมล โดยรายละเอียดของไพรเมอร์และดีเอ็นเอ ขนาดโพรบที่เป็นเบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด เป็นดังรายงานที่ได้ดำเนินการมาก่อนหน้านี้ ในการควบคุมการตกตะกอนของนาโนเงิน ดำเนินการโดยใช้เกลือ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของการตกตะกอนของเงินนาโนเพลทหลังทำปฏิกิริยา 15 นาที

การนำสารในปฏิกิริยาทั้งหมดมาปรับใช้กับชิปที่ทำด้วยกระดาษเซลลูโลส ใช้ชิปส่วนแสดงผลที่ผ่านการขึ้นรูปชิปจากกระดาษกรอง Whatman No. 1 และลวดเสตนเลส SUS 304 เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 mm โดยกระบวนการ plastic lamination ที่อุณหภูมิ 130 °C ด้วย

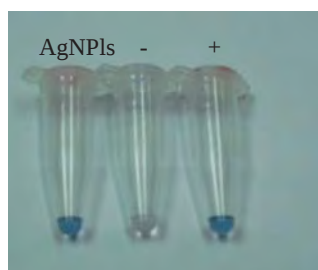
pouch film ขนาด 125 mm และ pouch laminator (LMR-220) (Lamirel, France) การแสดงผล ทำด้วยกระดาษรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (square pad) ขนาด 2x2 mm โดยประมาณ ที่ได้ดูดซับ สารละลายเกลือ 20 นาโนโมล (detection pad) บริเวณโพรบทำจาก Polystyrene พลาสติก ขนาด 1x2 มิลลิเมตรโดยประมาณ (probe pad) ที่มีโพรบแห้งตัวเกาะอยู่

ตัวชิปเต็มมีขนาด 2.5x3 ตารางเซนติเมตร ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกสำหรับการ ทำปฏิกิริยาในการเพิ่มสัญญาณดีเอ็นเอซึ่งไม่เกี่ยวกับการทดลองในครั้งนี้ ส่วนที่สองเกี่ยวข้อง กับการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ ทั้งสองส่วนเชื่อมด้วยโครงสร้างที่เกิดจากการเคลือบพลาสติกกับ ลวดสเตนเลส SUS 304 ให้เป็นรูป W shape การเคลื่อนตัวของสารละลายดำเนินการโดยใช้ แรงดันจากมือในการบีบตัวชิปเป็นหลัก

การตรวจสัญญาณในชิป สังเกตจากการเคลื่อนตัวของสารละลายในปฏิกิริยา nucleic acid hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย ไปผสมกับสารละลายของนาโนเงินสีฟ้า โพรบ (probe pad) และแสดงผลบนแผ่นกระดาษ (detection pad) ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า

ผลการทดลอง

การดำเนินการอาศัยการทำปฏิกิริยา nucleic acid hybridization ระหว่างดีเอ็นเอ เป้าหมาย โพรบ ในสารละลายของเงินนาโนเพลทสีฟ้าในสภาพหลอดทดลองพบว่า ในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย สารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าจะตกตะกอนได้เป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน- ใส เมื่อเทียบกับสีของสารละลายเดิม อย่างไรก็ตามในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายสารละลายเงินนา โนเพลทสีฟ้าจะไม่ตกตะกอน ทำให้ยังคงเห็นสีของสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าเช่นเดิม ผล การทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid โพรบ และทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ช่วยให้สามารถบ่งบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้ (ภาพที่ 1) การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวอยู่บนพื้นฐานของการทำ ปฏิกิริยา nucleic acid hybridization โดยใช้ PNA (Kanjawarut and Su, 2009)

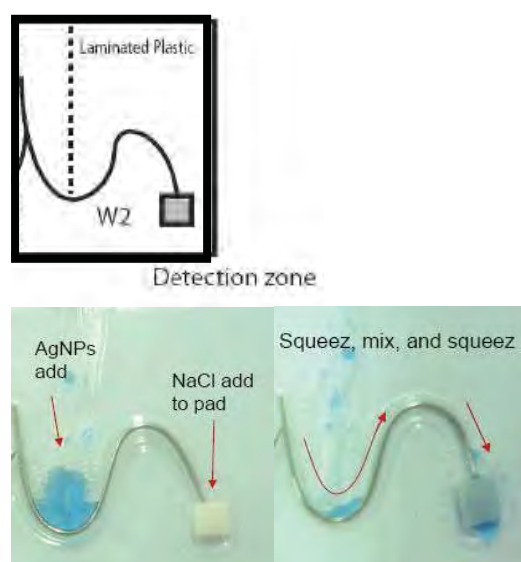


ภาพที่ 1 ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา nucleic acid hybridization ในสารละลายของเงินนาโนเพลทสี ฟ้าเมื่อใช้ β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid เป็นโพรบ เมื่อตัวอย่างเป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย + ดีเอ็นเออื่น - เปรียบเทียบกับสารละลายของเงินนาโนเพลทสีฟ้า AgNPls

การตรวจที่อาศัย β -pyrrolidiny peptide nucleic acid เป็นโพรบ สามารถเปลี่ยนแปลงสัญญาณในรูปแบบการเปลี่ยนของพลาสมอนทางแสง โดยในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพรบจะจับตัวบนผิวอนุภาคโดยอาศัยด้าน hydrophobic ไปที่ผิวอนุภาค เคลื่อนในระบบจะกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาค แต่ในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพรบจะจับดีเอ็นเอเป้าหมาย ช่วยให้อนุภาคกระจายตัวไม่เกาะกัน จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปการตกตะกอน

อย่างไรก็ดี การตรวจในสภาพหลอดทดลอง จำเป็นต้องเคลื่อนย้ายสารละลายจากหลอดหนึ่งไปยังอีกหลอดหนึ่ง ซึ่งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของโมเลกุลในลักษณะแคโรเวอร์ได้ นอกจากนี้การตรวจในสภาพหลอดทดลองยังเกี่ยวข้องกับปริมาตรของสารละลายที่มาก ไม่สะดวกในการเก็บรักษา ดังนั้นการปรับปรุงชุดตัวเทคนิคการตรวจสอบจึงเน้นการเชื่อมโยงกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบห้องปฏิบัติการบนชิป

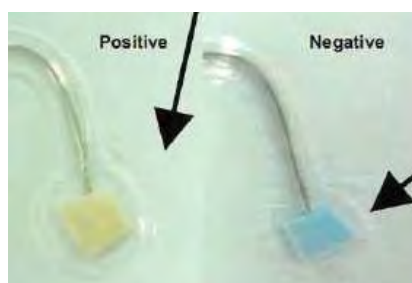
การทดสอบระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอบนชิป ในขั้นต้นอยู่บนพื้นฐานหลักการที่ Li and Rothberg, (2004) ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้ unmodified gold nanoparticles ผลการตรวจอยู่บนพื้นฐานการตอบสนองของอนุภาคในภาวะ ionic strength ที่ต่างกัน ในภาวะที่มี single strand DNA (ssDNA) หรือ double strand DNA (dsDNA) ซึ่งให้ผลการตอบสนองของอนุภาคนanoparticles ต่างกัน การทดลองในครั้งนี้เริ่มจากการทดสอบหลักการเดียวกันร่วมกับสารละลายเงินนาโนเพลทิสฟิ พบว่าในชิปที่ขึ้นรูปด้วยโครงสร้างอย่างง่ายที่ประกอบด้วยส่วนของ detection pad ที่มีเกลือในปริมาณเหมาะสมและทำให้แห้งอยู่ เชื่อมโยงอยู่กับท่อส่งที่เกิดจากวัสดุเคลือบพลาสติกและลวดสเตนเลส SUS 304 เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 mm (ภาพที่ 2บน) เมื่อนำดีเอ็นเอตัวอย่างมาผสมร่วมกับสารละลายเงินนาโนเพลทิสฟิ แล้วบังคับให้เกิดการเคลื่อนตัวในลักษณะบีบ ผสมและบีบดันสารละลายไปยัง detection pad (ภาพที่ 2 ล่าง)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของชิปประกอบไปด้วยท่อส่งที่เกิดจากวัสดุเคลือบพลาสติกและลวดสเตนเลส เชื่อมโยงไปสู่บริเวณที่เป็น detection pad (บน) และรูปแบบการใช้งานผ่านการบังคับให้เกิดการเคลื่อนตัวของสารละลายในลักษณะบีบ ผสมและบีบดันสารละลายไปยัง detection pad เพื่อการแสดงผล

ในกรณีที่มียีนเป้าหมาย ปฏิกริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เป็น double strand DNA ส่งผลให้เมื่อทำปฏิกริยากับสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าบน detection pad ที่มีเกลือในปริมาณเหมาะสมจะกระตุ้นให้เกิดการตกตะกอนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน-ใส มีความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสีของสารละลายเดิม และเมื่อสังเกตบน detection pad จะเห็นสีของ detection pad เป็นสีขาวขาวหม่น (ภาพที่ 3)

ในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ปฏิกริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะจะไม่เกิดขึ้น ทำให้ไม่มีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เป็น double strand DNA คงเหลือแต่ไพรเมอร์ในรูป single strand DNA (ssDNA) เมื่อทำปฏิกริยากับสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าบน detection pad ที่มีเกลือในปริมาณเหมาะสมจะไม่กระตุ้นให้เกิดการตกตะกอน ดังนั้นเมื่อสังเกตบน detection pad จะเห็นสีของ detection pad ยังคงเป็นสีฟ้าของสารละลายเงินนาโนเพลทชัดเจน



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกรณีมีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive) กับกรณีที่ไม่มีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative) ให้ผลของสีบนกระดาษในส่วนของการ detection pad ต่างกัน (ศรีชัย)

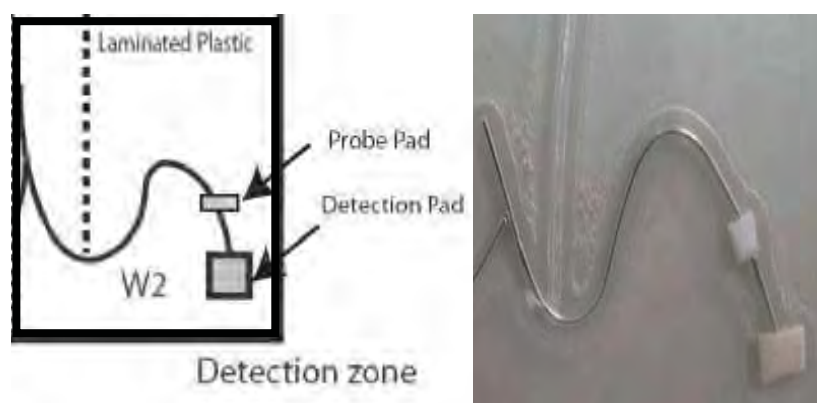
แม้ว่าการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอบนพื้นฐานหลักการที่ Li and Rothberg, (2004) จะไม่ใช้การตรวจดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยา nucleic acid hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย กับโพรบ ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่ได้มาตรฐาน อย่างไรก็ตามความรู้ที่ได้จากการนำหลักการของ Li and Rothberg, (2004) มาใช้ร่วมกับการตรวจบนชิป ทำให้เห็นได้ว่าการนำสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้ามาใช้กับรูปแบบของชิปที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ สามารถแสดงสัญญาณของดีเอ็นเอได้ และรูปแบบของชิปที่พัฒนาขึ้นยังสอดคล้องกับรูปแบบและขั้นตอนการทำปฏิกริยาในขณะตรวจดีเอ็นเออีกด้วย

เพื่อเป็นการพัฒนาต่อยอดให้การตรวจสัญญาณดีเอ็นเอเป็นไปตามหลักการ nucleic acid hybridization ขณะที่ยังคงใช้ประโยชน์จากปรากฏการณ์ plasmon resonance ของนาโนของโลหะ จึงได้ประยุกต์ผลการทดลองที่รายงานในภาพที่ 1 มาต่อยอด

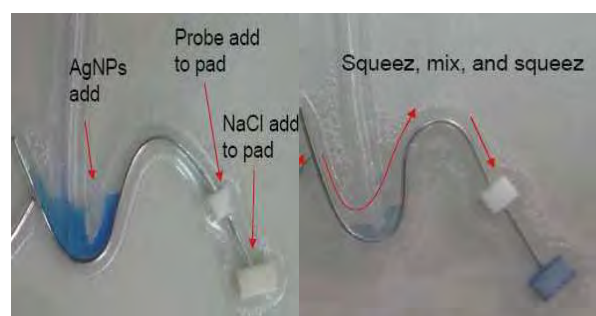
ผลการทดลองที่รายงานในภาพที่ 1 ใช้ β -pyrrolidiny peptide nucleic acid เป็นโพรบ ทำปฏิกริยากับดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ในสภาพแวดล้อมที่มีสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้า โพรบจะจับตัวบนผิวอนุภาค โดยปกติ peptide nucleic acid โพรบจะแสดงพฤติกรรมเป็น co-agglutator พร้อมจะกระตุ้นให้เงินนาโนเพลทสีฟ้าตกตะกอนเมื่อมีระดับของเกลือเหมาะสม ในยามที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย การจับตัวของดีเอ็นเอเป้าหมายจะทำให้ peptide nucleic acid ที่จับ

บนผิวของแผ่นเงินนาโนเพลทสีฟ้าลดปริมาณลง ส่งผลต่อพฤติกรรมเป็น co-agglutator ให้เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้แผ่นเงินนาโนเพลทสีฟ้าไม่ตกตะกอน การต่อยอระบบตรวจจึงทำโดยการเพิ่ม probe pad ก่อนการทำปฏิกิริยากับเกลือ และเพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียของโพลบอันเนื่องจากการจับตัวกับเนื้อกระดาษเซลลูโลส จึงได้เลือกใช้วัสดุ PS พลาสติกทำเป็น probe pad แทนเนื้อกระดาษเซลลูโลส

โครงสร้างของส่วนตรวจสัญญาณดีเอ็นเอบนชิปที่พัฒนาขึ้นและชิปที่สร้างขึ้นเป็นดังภาพที่ 4 ส่วนของ probe pad ที่วางอยู่หน้า detection pad ช่วยให้การตรวจดีเอ็นเอเป็นไปตามปฏิกิริยา nucleic acid hybridization



ภาพที่ 4 โครงสร้างของชิปที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วยท่อส่งที่เกิดจากวัสดุเคลือบพลาสติกและลวดเสตนเลส เชื่อมโยงจากบริเวณ probe pad สู่บริเวณที่เป็น detection pad



ภาพที่ 5 รูปแบบการใช้งานบนชิปทำโดยการบังคับให้เกิดการเคลื่อนตัวของสารละลายในลักษณะบีบ ผสม และบีบ ดันสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าและดีเอ็นเอให้เคลื่อนตัวไปยัง probe pad และสิ้นสุดลงที่ detection pad เพื่อตรวจสอบผล

รูปแบบการใช้งานบนชิปยังคงรูปแบบเช่นเดิม โดยการบังคับการเคลื่อนตัวของสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้า ทำผ่านการบีบ ผสมและบีบ ดันสารละลายไปยัง probe pad และ สิ้นสุดลงที่detection pad เพื่อการแสดงผล (ภาพที่ 5)

ผลการตรวจบนชิปในกรณีที่ใช้ β -pyrrolidinyl peptide nucleic acid เป็นโพรบ จะต่างไปจากผลการตรวจตามหลักการของ Li and Rothberg, (2004) โดยการตกตะกอนจะพบใน

กรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายหรือไม่มีดีเอ็นเอ ทำให้โพรบแสดงสถานะเป็น co-agglutator ขณะที่เงินนาโนเพลทสีฟ้ายังคงกระจายตัวไม่ต่างไปจากสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าปกติ เฉพาะในกรณีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย จึงส่งผลให้สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายและไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจากสีของกระดาษบริเวณ detection pad ที่เป็นไปตามหลัก nucleic acid hybridization และสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลการตรวจพบชิปแสดงการตกตะกอนของสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้าเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน-ใสบนกระดาษในส่วน detection pad ในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (ซ้าย) เปรียบเทียบกับการไม่ตกตะกอนและคงสีฟ้าในกรณีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขวา)

การตรวจตามหลักการ nucleic acid hybridization ร่วมกับ β -pyrrolidiny peptide nucleic acid และสารละลายเงินนาโนเพลทสีฟ้า จะช่วยลดความผิดพลาดของการตรวจอันเกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างไม่จำเพาะ (non target specific) หรือการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นซึ่งมักพบในกรณีที่การตรวจพึ่งระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียว

การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธี (validation) โดยการสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอ (blind test) ที่จำนวนตัวอย่างเป็น 29 (N=29) แสดงเบื้องต้นว่าการตรวจด้วยชิปเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ให้ผลความไวของปฏิกิริยาเป็น 100% และความจำเพาะเป็น 92.3% (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามก็ตีผลการตรวจยังคงพบ false positive 1 ตัวอย่าง ซึ่งอาจสื่อให้เห็นถึงคุณภาพในการประกอบชิปที่ใช้มือประกอบที่ยังต้องปรับปรุง

ตารางที่ 1 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจด้วยชิปเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR

Specimens	RT-PCR	RT-LAMP with AgNPIs Chip
positive	16	16
negative	13	12
False positive	0	1
False negative	0	0
Sensitivity ^a		100
Specificity ^b		92.3

a = true positive/(true positive + false negative)

b = true negative/(true positive + false negative)

ผลการดำเนินการข้างต้นชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการนำ β -pyrrolidinyI peptide nucleic acid ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับสารละลายเงินนาโนเพลทิสไฟฟ้าเพื่อเอื้ออำนวยให้การตรวจดีเอ็นเอมีความสะดวกมากยิ่งขึ้น เข้าใกล้อุดมคติของการตรวจในรูปแบบ point of care มากขึ้นอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Kanjanawarut, R. and Su, X. 2009. Colorimetric detection of DNA using unmodified metallic nanoparticles and peptide nucleic acid probes. Anal. Chem. 81:6122-6129.

Pakdeenard, S., Thammacharoen, C., and Ekgasith, S. 2010. PACCON, 21-23, January 2010, Sunee Grand Hotel Convention Center, Ubon Ratchathani. pp. 362.

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 3 ปี

โครงการ การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าไพโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด

โครงการ 6: Applications of PNA based diagnostics in medical, food and agricultural sciences

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยย่อย

รศ.พญ.ดร.ณัฐริยา หิรัญกาญจน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อนักวิจัย

น.ส.ศิตา วีรกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เนื่องจากการรายงานความสัมพันธ์ระหว่างยีนเอสแอลเอบี 1502 กับการแพ้ยาคาร์บามาซีนฟีน ยีนเอสแอลเอบี 5701 กับยาอะบาคาเวีย และเอสแอลเอบี 5801 กับยาอัลโลพูรินอลอย่างรุนแรง ซึ่งพบอัตราการเสียชีวิตสูงถึงประมาณ 30% จึงมีความสำคัญในการตรวจหาชนิดของเอสแอลเอบีได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำก่อนการจ่ายยา เพื่อไม่ให้คนไข้ได้รับผลข้างเคียงจากยา จึงนำมาสู่การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเอสแอลเอบีที่มีความหลากหลายมากเพื่อหาบริเวณที่จำเพาะต่อยีนเอสแอลเอบี 1502 เอสแอลเอบี 5701 และ 5801 และใช้เป็นบริเวณในการสร้างไพรเมอร์ โดยการเพิ่มจำนวนยีนเอสแอลเอบีสามารถทำได้ด้วยวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ (SSP-PCR: sequence-specific primer PCR) ที่เป็นวิธีมาตรฐานในการหาชนิดของเอสแอลเอบี โดยได้เคยมีการรายงานไพรเมอร์ของเอสแอลเอบี 1502 ซึ่งจะต้องอาศัยไพรเมอร์อย่างน้อย 6 คู่ ส่วนเอสแอลเอบี 5801 นั้นจะต้องอาศัยไพรเมอร์อย่างน้อย 2 คู่ ในการวิจัยครั้งนี้จะทำการพัฒนาวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ให้มีการใช้ไพรเมอร์ลดลงเพื่อลดจำนวนปฏิกิริยาและค่าใช้จ่ายลง

เนื่องจากวิธีพีซีอาร์เป็นวิธีที่ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงได้พัฒนาวิธีทางเลือกคือ แลมป์ (LAMP: Loop-mediated isothermal amplification) ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียวที่ใช้เวลาวิเคราะห์ที่สั้นกว่าและมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลง เนื่องจากไม่ต้องอาศัยเครื่องพีซีอาร์ที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามวิธีแลมป์นั้นเป็นวิธีที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ไม่จำเพาะเท่าวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ จึงต้องอาศัยการใช้ไพรเมอร์ร่วมกับการตรวจผลของแลมป์เพื่อเพิ่มความจำเพาะด้วย เนื่องจากพีเอ็นเอมีความสามารถในการจับดีเอ็นเออย่างแน่นและมีความจำเพาะสูง

การนำพีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับพีซีอาร์และแลมป์นั้นสามารถทำได้หลายวิธีตามการติดฉลากสาร เช่น การติดสารเรืองแสง จะอาศัยหลักการการแทนที่สายดีเอ็นเอสายสั้นที่ติดสารติดฉลาก (Quencher) ด้วยดีเอ็นเอที่เป็นผลจากการเพิ่มจำนวน (Strand displacement probe) ดังนั้นเมื่อสายพีเอ็นเอไปจับกับดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวน จะเห็นการเรืองแสงภายใต้แสงยูวี อีกวิธีคือการติดไบโอติน เป็นสารที่ถูกลงกว่าสารเรืองแสง และสามารถดูผลได้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยรังสียูวี โดยเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบปฏิกิริยา ได้แก่ การทำ dot blot ด้วย Streptavidine ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์แล้วดูการเปลี่ยนสีแทน

อย่างไรก็ตามการใช้พีเอ็นเอในการจับแลมป์เพื่อแปลผลด้วยการใช้เป็น strand displacement probe และใช้พีเอ็นเอจับพีซีอาร์เพื่อแปลผลด้วยวิธี dot blot ยังคงไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากไม่พบสัญญาณหรือมีความไวต่ำมาก จึงมีความสำคัญที่จะต้องศึกษาพฤติกรรมของพีเอ็นเอในการเข้าจับดีเอ็นเอสายคู่เพื่อหาคำอธิบายถึงสาเหตุที่เกิดขึ้น โดยการศึกษาจะใช้วิธี gel electrophoresis เพื่อดูประสิทธิภาพและความจำเพาะของพีเอ็นเอในการเข้าจับดีเอ็นเอสายคู่ โดยจะอาศัยคุณสมบัติของพีเอ็นเอที่ไม่มีประจุซึ่งจะไม่เดินทางในเจลเมื่อให้กระแสไฟฟ้าและคงอยู่บริเวณต้นทาง ดังนั้นเมื่อให้กระแสไฟฟ้า พีเอ็นเอที่เข้าจับกับดีเอ็นเอได้จะสามารถเดินทางผ่านเจลไปได้ ในทางกลับกันหากพีเอ็นเอไม่สามารถเข้าจับดีเอ็นเอสายคู่ได้ก็จะยังคงอยู่ในบริเวณต้นทาง เมื่อทำการศึกษาดังกล่าวแล้วพบว่าพีเอ็นเอสามารถเข้าจับดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็นผลจากการทำพีซีอาร์ได้ แต่เนื่องจากพีเอ็นเอมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอสายคู่ จึงได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าพีเอ็นเอจะถูกผลักออกจากการเข้าคู่ของดีเอ็นเอสายคู่ เนื่องจากดีเอ็นเอสายคู่สามารถจับกันเองได้เสถียรกว่าดีเอ็นเอกับพีเอ็นเอ ดังนั้นจึงได้พัฒนาการทำพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร (Asymmetric PCR) เพื่อให้เกิดผลผลิตจากพีซีอาร์เป็นดีเอ็นเอสายหนึ่งมากกว่าอีกสายหนึ่ง ซึ่งทำได้โดยการใส่ไพรเมอร์ฝั่งที่ต้องการใช้สร้างเป็นดีเอ็นเอสายคู่สมกับพีเอ็นเอมากกว่าไพรเมอร์อีกฝั่งหนึ่ง เพื่อให้เกิดสายดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single-stranded DNA) สำหรับพีเอ็นเอให้เข้าจับได้อย่างเสถียร

นอกจากการนำพีเอ็นเอมาใช้เพื่อแปลผลชนิดของดีเอ็นเอแล้ว ยังมีอีกวิธีหนึ่งที่อาศัยความจำเพาะของพีเอ็นเอเพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับพีซีอาร์ วิธีนี้เรียกว่า พีซีอาร์แคลมป์ (PCR clamp) หลักการในการเกิดพีซีอาร์แคลมป์คือ ในการทำพีซีอาร์ตามปกตินั้น หลังจากขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอต้นฉบับสายคู่ที่ 95 องศาเซลเซียส (Denaturing step) จะเพิ่มขั้นตอนให้สายพีเอ็นเอเข้าจับอย่างจำเพาะ (PNA annealing step) แล้วจึงจะตามมาด้วยขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์อย่างจำเพาะ (Primer annealing step) ดังนั้นเมื่อถึงขั้นตอนการต่อสายไพรเมอร์ (Extension step) สายดีเอ็นเอที่ถูกพีเอ็นเอจับได้ จะไม่สามารถถูกเพิ่มจำนวนได้ จึงจะไม่มีผลผลิตจากพีซีอาร์เกิดขึ้น วิธีดังกล่าวจะสามารถช่วยให้สามารถทำพีซีอาร์สำหรับเฮกแอลเอได้อย่างจำเพาะมากยิ่งขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยการใช้ไพรเมอร์จำนวนมากหรือการทำพีซีอาร์หลายๆปฏิกิริยาเพื่อให้สามารถแปลผลได้อย่างถูกต้อง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2552 ถึงวันที่ 31 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2555

การดำเนินงาน

ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

- กิจกรรมที่วางแผนไว้

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรมการดำเนินงาน	เดือน					
	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36
ช่วงที่ 1						
1. เลือกบริเวณที่เหมาะสมเพื่อใช้สร้างไพรเมอร์ในการหาลำดับยีนของแบคทีเรีย 1502 และ 5801 โดยอาศัยลำดับเบสจากฐานข้อมูล						
2. รวบรวมเลือดของผู้บริจาคโลหิตจากสถานพยาบาลไทยเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ						
3. สร้างไพรเมอร์ในการหาลำดับยีนของแบคทีเรีย 5801 สำหรับวิธีแลมพ์						
4. สร้างพีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจผลแลมพ์						
5. ทดสอบพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ขึ้น						
6. หาสมการที่เหมาะสมในการใช้พีเอ็นเอกับพีซีอาร์และแลมพ์						
7. หาสมการที่เหมาะสมกับการทำพีซีอาร์แบบไม่สมมาตรและทดสอบการจับกับพีเอ็นเอ						

8. หาสภาวะที่เหมาะสมกับการทำ พีซีอาร์แคลมป์						
--	--	--	--	--	--	--

- กิจกรรมที่ทำได้จริง

1. ได้ส่งวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ของ น.ส.ศิตา วีรกุล ในชื่อเรื่อง การพัฒนาวิธีการตรวจหาเอชแอลเอบี 1502 และ 5801 ด้วยวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ และแลมป์โดยใช้พีเอนเอ ในภาคการศึกษาตอนปลาย ปีการศึกษา 2552
2. ได้นำเสนอผลงานเป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ในหัวข้อ วิธีการตรวจหาเอชแอลเอบี 5801 ด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี ในงานประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11 มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2553
3. ได้รับรางวัล Travel Grantให้นำเสนอผลงานในหัวข้อ A Simple Nested Sequence Specific Primer-Polymerase Chain Reaction for HLA-B*1502 ในงาน The 14th International Congress of Immunology ณ เมืองโกเบ ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 22 – 27 สิงหาคม 2553
4. ได้รับการตอบรับตีพิมพ์บทความเรื่อง A Nested Sequence Specific Primer-Polymerase Chain Reaction for the detection of HLA-B*15:02 เมื่อวันที่ 4 มกราคม 2555 ในวารสาร Tissue Antigens
5. หาสภาวะของพีเอนเอที่เหมาะสมในการดูผลด้วย gel electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เข้าคู่กันและจำนวนเบสเท่ากันในการทดลอง (Single-stranded synthetic DNA)
6. ศึกษาการเข้าจับของพีเอนเอกับดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากการทำพีซีอาร์ยีนอินเทอเฟียร์รอนแกมมา (IFN-g) และหาสภาวะที่เหมาะสมให้เกิดการเข้าจับระหว่างพีเอนเอและดีเอ็นเอ และดูผลด้วย gel electrophoresis
7. ได้นำเสนอผลงานในหัวข้อ Loop-mediated isothermal amplification as a screening test for HLA-B*57:01 and 58:01 in drug hypersensitivity prediction ในงาน The Joint 16th International HLA and Immunogenetics Conference / 26th European Immunogenetics

and Histocompatibility Conference / 23rd British Society of Histocompatibility and Immunogenetics Conference ณ เมืองลิเวอร์พูล ประเทศอังกฤษ ระหว่างวันที่ 31 พฤษภาคม ถึง 3 มิถุนายน 2555

8. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร (Asymmetric PCR) และทดสอบการจับกับพีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis ในยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา และเอชแอลเอบี 1502
9. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์แคลมป์ (PCR clamp) ในยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา และเอชแอลเอบี 1502

วิธีการทดลอง

การทำเอสเอสพีพีซีอาร์กับดีเอ็นเอจากอวัยวะ

1. ทำการรวบรวมเลือดจากอาสาสมัครที่เป็นผู้บริจาคเลือดจากสภากาชาดไทยประมาณ 3 ml.
2. ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ
3. ทำการหาชนิดของเอชแอลเอบีด้วยวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ต่อยีนเอชแอลเอบี 1502 และ 5801
4. คำนวณหาค่าความไวและความจำเพาะของวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ต่อยีนเอชแอลเอบี 1502 และ 5801 โดยเทียบผลที่ได้จากวิธีมาตรฐานกับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่ทั้งเมื่อทำการเพิ่มจำนวนจากดีเอ็นเอและเลือดโดยตรง

การหาไพรเมอร์สำหรับเอชแอลเอบี 5801

1. นำข้อมูลลำดับเบสของเอชแอลเอบี 5801 จากฐานข้อมูลเอชแอลเอ (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>) มาหาบริเวณที่จำเพาะเพื่อสร้างไพรเมอร์สำหรับการทำแลมป์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer 4 (<http://primerexplorer.jp/e/>)
2. หาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ต่อเอชแอลเอบี 5801 ในการทำแลมป์โดยหาอุณหภูมิและปริมาณ $MgSO_4$ ที่เหมาะสม

3. ทำการทดสอบความจำเพาะในเฮลแอลบีหลายชนิด

การหาบริเวณที่จำเพาะต่อการสร้างพีเอนเอ 2 เส้น

1. การแยกเฮลแอลบี 1502 จากเฮลแอลบี 1513 (HLA-B*1502 probe)

ทำการเทียบลำดับเบส (Alignment) ของเฮลแอลบี 1502 และ 1513 ในช่วงไพรเมอร์ของปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วหาบริเวณที่จำเพาะต่อเฮลแอลบี 1502 เพื่อใช้ในการสร้างพีเอนเอ

2. การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Internal control probe)

เนื่องยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา (IFN- α) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นยีนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงจะเลือกบริเวณที่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในการสร้างพีเอนเอ เพื่อให้พีเอนเอดังกล่าวสามารถจับผลจากการเกิดพีซีอาร์ได้ในทุกคน

การหาสถานะที่เหมาะสมในการใช้พีเอนเอตรวจผลจากพีซีอาร์ด้วยวิธี Dot blot

1. การหา Membrane ที่ใช้ทำ Dot blot

2. การหา Denaturing solution เพื่อแยกสายคู่ของพีซีอาร์

3. การหา Blocking solution เพื่อลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะที่รบกวนการแปลผล (Background)

การเตรียมพีซีอาร์และแลมป์สำหรับการจับพีเอนเอด้วยวิธีต่างๆ

1. เตรียมพีซีอาร์ของระบบเฮลแอลบี 1502 แยกหลอดการเกิดพีซีอาร์ระหว่างยีนเฮลแอลเอ และยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา โดยเริ่มทดสอบพีเอนเอต่อยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟาที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ เพื่อลดการรบกวนการจับของพีเอนเอกับผลจากพีซีอาร์ด้วยวิธี Dot blot บน membrane ที่มีประจุบวกที่พัฒนาขึ้น

2. เตรียมพีซีอาร์และแลมป์ของเฮลแอลบี 5801 โดยเริ่มทดสอบพีเอนเอต่อพีซีอาร์และทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ เนื่องจากผลของพีซีอาร์มีความซับซ้อนของดีเอ็นเอน้อยกว่าแลมป์ และการทำให้บริสุทธิ์จะช่วยลดการรบกวนการจับของพีเอนเอ จากนั้นจึงนำไปทดสอบด้วยวิธี Capacitive biosensor

การหาปริมาณความเข้มข้นพีเอ็นเอที่เหมาะสมในการดูผลจาก gel electrophoresis

ใช้พีเอ็นเอความเข้มข้น 100, 50, 20, 10 และ 1 pmol กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวความเข้มข้น 100 pmol เพื่อหาความเข้มข้นพีเอ็นเอที่เหมาะสมในการดูผลบน 2% agarose gel เมื่อให้กระแสไฟฟ้า 100 V เวลา 30 นาทีแล้วจึงดูผลด้วย UV จากนั้นจะย้อมเจลด้วย ethidium bromide เพื่อดูดีเอ็นเอคงเหลือ จากนั้นจึงใช้ค่าความเข้มข้นพีเอ็นเอที่เหมาะสมไปทดสอบกับพีซีอาร์ในสภาวะต่างๆต่อไป

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการเข้าคู่ของพีเอ็นเอกับพีซีอาร์

1. การใช้พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับพีซีอาร์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์

เปรียบเทียบการเข้าจับของพีเอ็นเอเมื่อใช้พีซีอาร์ที่ผ่านและไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อน ด้วยวิธี column-based purification

2. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่

เปรียบเทียบการเข้าจับของพีเอ็นเอเมื่อให้ความร้อน 95°C, 99°C และไม่ให้ความร้อนก่อน และหลังใส่พีเอ็นเอ

3. ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

เมื่อทำการแยกดีเอ็นเอสายคู่แล้วรอให้เย็นแล้วจึงใส่พีเอ็นเอและทิ้งไว้เป็นเวลา 1, 10, 35, 60 นาทีก่อนทำ gel electrophoresis

4. การใช้พีเอ็นเอ 2 สายที่ไม่เข้าคู่กัน (pseudocomplementary PNA)

เนื่องจากพีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติพิเศษคือ ไม่จับกันเองแม้มีลำดับเบสที่เข้าคู่กัน จึงสามารถนำมาใช้ช่วยในการแยกดีเอ็นเอหลังจากการให้ความร้อนแยกดีเอ็นเอสายคู่

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร (Asymmetric PCR)

ทำการหาอัตราส่วนของไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวฝั่งที่ต้องการมากกว่าอีกสายหนึ่งแล้วทำการดูผลจากพีซีอาร์ด้วย Gel electrophoresis ว่ามีผลผลิตเพียงพอต่อการดูผลด้วยพีเอ็นเอที่ติดสารเรืองแสงไว้ด้วย Gel electrophoresis เช่นกัน โดยเริ่มทำในยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา (IFN- α)

ก่อนทำกับยีนเฮลแอลบี 1502 เพื่อลดการทำปฏิกิริยาจาก Nested SSP-PCR

การหาความจำเพาะของพีเอ็นเอเมื่อนำไปทดสอบกับพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร (Asymmetric PCR)

ในการทำพีซีอาร์เพียงปฏิกิริยาเดียวในยีนเฮลแอลบี 1502 เพื่อให้มีผลผลิตจากพีซีอาร์มากพอต่อการทดสอบการจับด้วยพีเอ็นเอ จะมีเฮลแอลบี 1301 1513 1525 และ 4402 ขึ้นเป็นผลบวกปลอม ดังนั้นเพื่อจำกัดความจำเพาะของพีเอ็นเอเพื่อใช้ในการช่วยในการแปลผล พีเอ็นเอจะต้องจับเพียงเฮลแอลบี 1502 และ 1525 ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับพีเอ็นเอเท่านั้น

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์แคลมป์ (PCR clamp)

ทำการหาปริมาณและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่พีเอ็นเอสามารถขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ โดยจะเริ่มต้นจากการใช้สภาวะพีซีอาร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างสมบูรณ์แล้วเปรียบเทียบเมื่อใส่พีเอ็นเอเข้าไปในปฏิกิริยา

ผลการทดลอง

การทำเอสเอสพีซีอาร์กับดีเอ็นเอและเลือดจากอาสาสมัคร

ทำการรวบรวมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจหาเฮลแอลบี 1502 ได้ทั้งหมด 200 ราย พบว่าวิธีเอสเอสพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่สามารถให้ค่าความไวและความจำเพาะเท่าเทียมกับวิธีมาตรฐาน 100% ทั้งเมื่อทำพีซีอาร์จากดีเอ็นเอที่ได้สกัดแล้วและจากการเพิ่มจำนวนโดยตรงจากเลือด

		Commercial SSP-PCR		
		Positive	Negative	
In-house SSP-PCR HLA-B*1502	Positive	24	0	PPV = 24/24 = 100.0%
	Negative	0	80	NPV = 80/80 = 100.0%
		Sensitivity = 24/24 = 100.0%	Specificity = 80/80 = 100.0%	

สำหรับการตรวจหาเอชแอลเอบี 5801 ได้ทั้งหมด 95 ราย พบว่าวิธีเอสเอสพีพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่สามารถให้ค่าความไวและความจำเพาะเท่าเทียมกับวิธีมาตรฐาน 100% เมื่อทำพีซีอาร์กับดีเอ็นเอที่สกัดแล้ว แต่หากทำพีซีอาร์จากเลือดโดยตรงจะพบว่า เอชแอลเอบี 5701 นั้นจะเป็นผลบวกปลอมด้วย

		Commercial SSP-PCR		
		Positive	Negative	
In-house SSP-PCR HLA-B*5801	Positive	13	0	PPV = 13/13 = 100.0%
	Negative	0	82	NPV = 82/82 = 100.0%
		Sensitivity = 13/13 = 100.0%	Specificity = 82/82 = 100.0%	

การทำแลมพ์กับดีเอ็นเอจากอาสาสมัคร

เอสแอลเอบี 5710 และ 5801 สามารถถูกเพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์จากวิธีแลมป์ ทำให้สามารถใช้วิธีแลมป์นี้ทำนายการแพ้ยาได้สองชนิดคือ เอสแอลเอบี 5701 กับยาด้านไวรัสเอชไอวี (อะบาคาเวีย) และเอสแอลเอบี 5801 กับยารักษาโรคเกาต์ (อัลโลพูรินอล) โดยจากผลการทดลองจะเห็นว่า จะมีเพียงเอสแอลเอบี 1517 เป็นผลบวกปลอมเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เนื่องจากเป็นยีนที่มีความถี่ที่ต่ำมากในประเทศไทย (0.7%) จึงไม่เป็นปัญหาในการทำนายการแพ้ยา

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนทดสอบกับดีเอ็นเอจากอาสาสมัครทั้งหมด 99 ราย พบว่ามีความไว 100 % และความจำเพาะ 98.99 % โดยมี 4 รายเป็น HLA-B*57:01 12 รายเป็น 58:01 และอีก 82 รายเป็นเอสแอลเอชชนิดอื่นๆ โดยจะมี 1 รายเป็นผลบวกปลอม

		Commercial SSP-PCR		
		Positive	Negative	
In-house LAMP HLA-B*5701 and 5801	Positive	16	1	PPV = 16/17 = 94.12%
	Negative	0	82	NPV = 82/82 = 100.0%
		Sensitivity = 16/16 = 100.0%	Specificity = 82/83 = 98.8%	

การหาบริเวณที่จำเพาะต่อการสร้างพีเอ็นเอ 2 เส้น

พบว่าได้บริเวณที่จำเพาะในการสร้างพีเอ็นเอต่อทั้งยีนเอสแอลเอบี 1502 และอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา และเมื่อนำไปทดสอบกับดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าสามารถจับกับดีเอ็นเอคู่สมได้อย่างจำเพาะด้วยวิธี Dot blot จึงนำไปทดสอบกับผลจากพีซีอาร์ต่อไป

การหาสถานะที่เหมาะสมในการใช้พีเอ็นเอตรวจผลจากพีซีอาร์ด้วยวิธี Dot blot

1. การหา Membrane ที่ใช้ทำ Dot blot

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของ Membrane ที่มีการใช้แพร่หลาย พบว่าพีเอ็นเอจะจับกับ Nylon membrane จะทำให้เห็นเป็นผลบวกปลอม จึงเลือกทดสอบระหว่าง membrane ที่มีประจุบวกที่พัฒนาขึ้น Nitrocellulose membrane และ PVDF membrane พบว่าทั้งดีเอ็นเอและพีเอ็นเอไม่สามารถซึมลงบน PVDF membrane ได้ ส่วน Nitrocellulose membrane จะเห็นผลบวกรบกวน (Background) มากกว่า membrane ที่มีประจุบวกที่พัฒนาขึ้น จึงเลือกใช้ membrane นี้ในการใช้จริง

2. การหา Denaturing solution เพื่อแยกสายคู่ของพีซีอาร์

พบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี NaOH และ EDTA จะให้ผลดีในดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สังเคราะห์ขึ้น และเป็นสารเคมีที่ไม่รบกวนการจับของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ แต่เมื่อทดสอบกับผลของพีซีอาร์พบว่า ไม่สามารถเห็นผลได้ จึงต้องใช้การให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการใช้บัฟเฟอร์ด้วย เพื่อช่วยการเข้าจับของพีเอ็นเอแบบ Duplex invasion

3. การหา Blocking solution เพื่อลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะที่รบกวนการแปลผล (Background)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้ BSA และ Skim milk พบว่า Skim milk สามารถใช้ได้ดีเท่าเทียมกับ BSA จึงเลือกใช้ Skim milk ซึ่งมีราคาถูกกว่า

การทดสอบพีเอ็นเอต่อผลของพีซีอาร์จากยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา

สามารถเห็นสัญญาณจาก Dot blot บน membrane ที่มีประจุบวกที่พัฒนาขึ้นได้เมื่อทำการแยกสายพีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่ด้วยการให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการใช้บัฟเฟอร์เพื่อช่วยการเข้าจับของพีเอ็นเอแบบ Duplex invasion

การทดสอบพีเอ็นเอต่อผลของพีซีอาร์จากยีนเฮซแอลเอบี 5801

สามารถเห็นสัญญาณจาก Capacitive biosensor ได้เมื่อทำการแยกสายพีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่ด้วยการให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำเข้าทดสอบในระบบ อีกทั้งยังเห็นค่าความต่าง

ที่ชัดเจนระหว่างพีเอ็นเอที่จับกับบเอสแอลเอบี 5801 และ 5701

การหาปริมาณความเข้มข้นพีเอ็นเอที่เหมาะสมในการดูผลจาก gel electrophoresis

พีเอ็นเอความเข้มข้น 10 pmol เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถเห็นการเรืองแสงได้ชัดเจนบนเจล และพีเอ็นเอสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ 100% เมื่อความเข้มข้นพีเอ็นเอต่อดีเอ็นเอเป็น 1:1

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการเข้าคู่ของพีเอ็นเอกับพีซีอาร์

1. การใช้พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับพีซีอาร์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์

พบว่าพีซีอาร์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์พบสัญญาณการเข้าคู่ของพีเอ็นเอมากกว่าพีซีอาร์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

2. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่

พบว่าที่อุณหภูมิ 99°C 10 นาที สามารถช่วยแยกดีเอ็นเอสายคู่ได้ดีกว่าที่ 95°C 10 นาที และเมื่อไม่ใช้ความร้อนช่วยแม้ทั้งเวลาให้เกิดปฏิกิริยาข้ามขึ้น

3. ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

พบว่าเมื่อปล่อยเวลาให้ผ่านไป สัญญาณการเข้าคู่ของพีเอ็นเอกับพีซีอาร์จะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากการกลับเข้าคู่ของดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความเสถียรมากกว่า ดีเอ็นเอสายยาวจึงดันพีเอ็นเอซึ่งเป็นสายสั้นๆออก

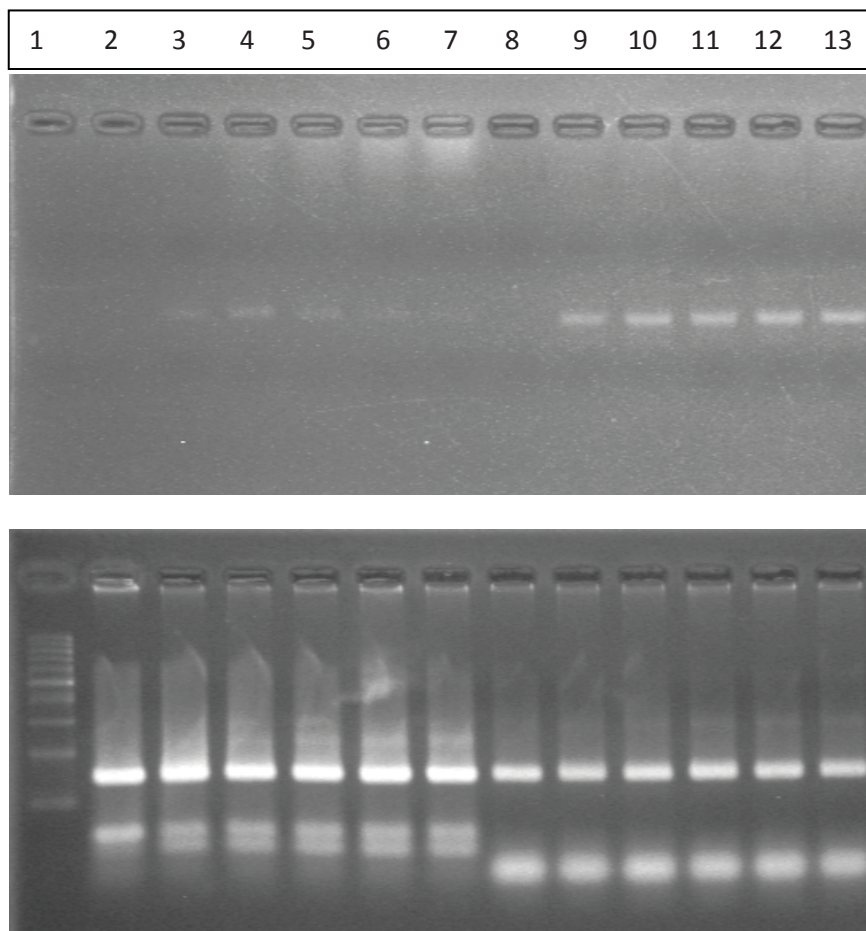
4. การใช้พีเอ็นเอ 2 สายที่ไม่เข้าคู่กัน (pseudocomplementary PNA)

พบว่าการใช้พีเอ็นเอ 2 สายจะช่วยให้การจับของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอสายคู่มีความเสถียรมากขึ้น เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง แต่ไม่ทำให้พีเอ็นเอเข้าจับดีเอ็นเอสายคู่ได้มากขึ้น

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร (Asymmetric PCR)

เมื่อทำการทดสอบหลักการของพีซีอาร์แบบไม่สมมาตรในยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟาพบว่าพีเอ็นเอสามารถเข้าจับได้หมดอย่างสมบูรณ์ และจับได้อย่างเสถียรแม้เวลาผ่านไปถึง 2 ชั่วโมง โดยดูได้จากบริเวณเริ่มต้นของเจลว่าไม่มีพีเอ็นเอเหลืออยู่เมื่อเปรียบเทียบกับพีซีอาร์สภาวะปกติที่ยังพบการเรืองแสง

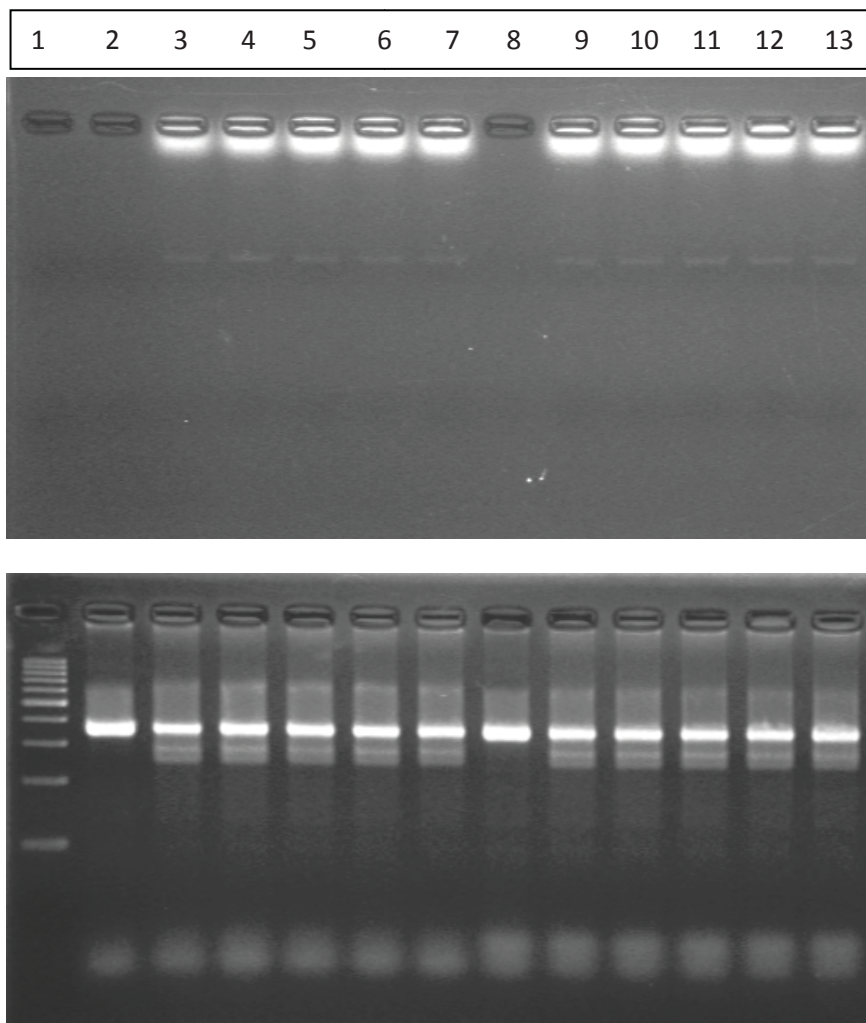
ของพีเอ็นเออยู่และมีอยู่มากที่สุดที่เวลา 2 ชั่วโมง



หมายเหตุ หลุมที่ 1 ดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อบอกขนาด (DNA ladder) พีซีอาร์ในสภาวะปกติ หลุมที่ 2 – 7 (ไม่มีพีเอ็นเอ, ที่เวลา 1 นาที, ที่เวลา 10 นาที, ที่เวลา 30 นาที, ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ ที่เวลา 2 ชั่วโมง) และพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร หลุมที่ 8 - 13 (ไม่มีพีเอ็นเอ, ที่เวลา 1 นาที, ที่เวลา 10 นาที, ที่เวลา 30 นาที, ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ ที่เวลา 2 ชั่วโมง)

จากนั้นจึงได้ทดสอบการทำพีซีอาร์แบบไม่สมมาตรกับเฮกแซลเอบี 1502 พบว่าพีเอ็นเอไม่สามารถเข้าจับได้อย่างสมบูรณ์เหมือนกับยีนอินเตอร์เฟียร์รอนแอลฟา และไม่เห็นความแตกต่างระหว่างพีซีอาร์ในสภาวะปกติและในสภาวะที่ไม่สมมาตร ทั้งนี้ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าเฮกแซลเอบีมีผลผลิตจากพีซีอาร์ที่ขนาดใหญ่กว่า ทำให้การแยกดีเอ็นเอสายคู่อาจทำได้ไม่สมบูรณ์เท่า และอาจจะเป็นเพราะพีเอ็นเอนี้เองไม่สามารถจับดีเอ็นเอได้อย่างเสถียร ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของพีเอ็นเอแต่ละเส้นที่ความลำดับเบสต่างกันทำให้ไม่สามารถนำสภาวะของการจับของคอนละยีนมาปรับใช้ได้ อีกทั้งเมื่อได้เพิ่มปริมาณพีเอ็นเอจนถึง 100 pmol ก็ยังไม่สามารถหยุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ จึงสรุปได้ว่า ปริมาณพีเอ็นเอที่มากขึ้นไม่สามารถช่วยขัดขวางการ

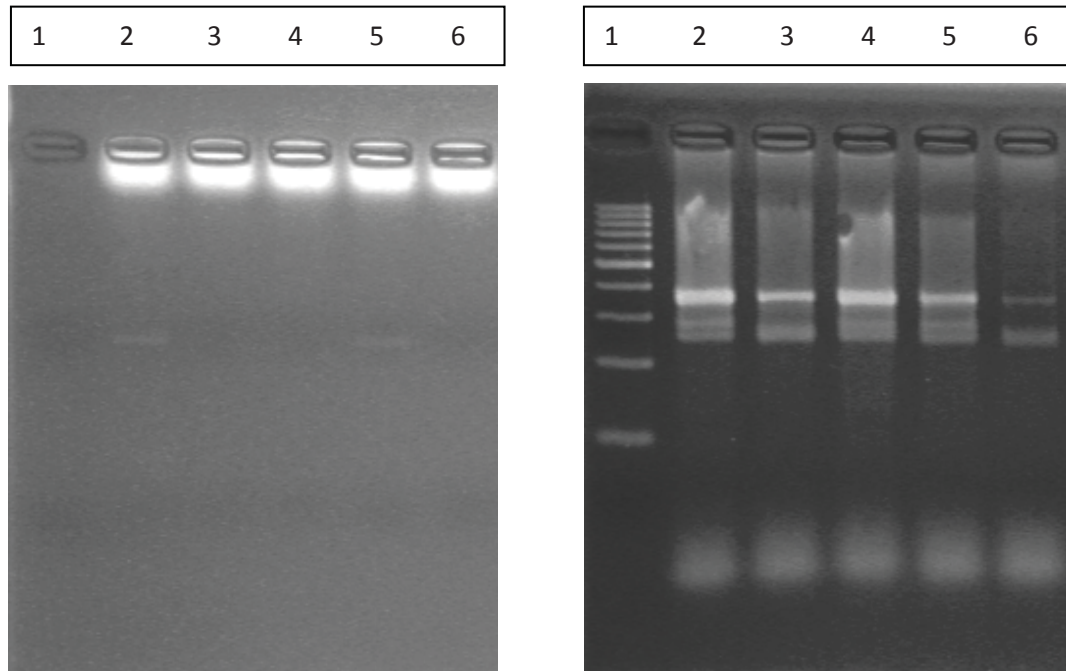
เกิดพีซีอาร์ได้มากขึ้นตามไปด้วย



หมายเหตุ หลุมที่ 1 ดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อบอกขนาด (DNA ladder) พีซีอาร์ในสภาวะปกติ หลุมที่ 2 – 7 (ไม่มีพีเอ็นเอ, ที่เวลา 1 นาที, ที่เวลา 10 นาที, ที่เวลา 30 นาที, ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ ที่เวลา 2 ชั่วโมง) และพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร หลุมที่ 8 - 13 (ไม่มีพีเอ็นเอ, ที่เวลา 1 นาที, ที่เวลา 10 นาที, ที่เวลา 30 นาที, ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ ที่เวลา 2 ชั่วโมง)

การหาความจำเพาะของพีเอ็นเอเมื่อนำไปทดสอบกับพีซีอาร์แบบไม่สมมาตร (Asymmetric PCR)

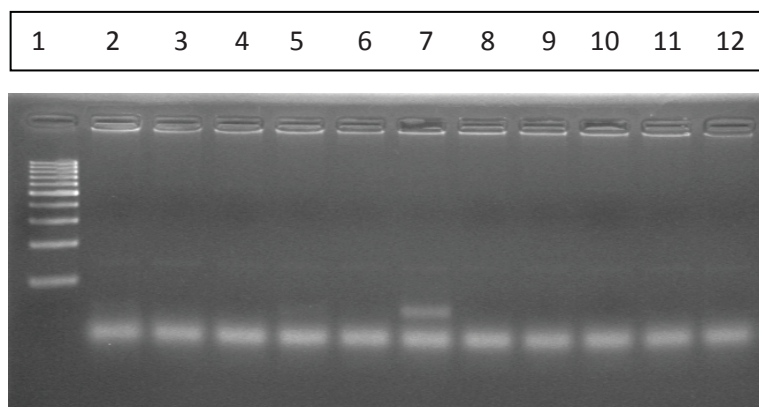
แม้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อเฮกแซเมอปี 1502 จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอให้มากพอที่พีเอ็นเอจะจับและแสดงสัญญาณได้ จึงได้ทำการลดความจำเพาะของปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากพอเพื่อจะทดสอบความจำเพาะของพีเอ็นเอ จากการทดสอบพบว่า พีเอ็นเอสามารถจับดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ โดยจะจับเฉพาะเฮกแซเมอปี 1502 และ 1525 เท่านั้น



หมายเหตุ หลุมที่ 1 ดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อบอกขนาด (DNA ladder) หลุมที่ 2 เชซแอลเอบี 1502 หลุมที่ 3 เชซแอลเอบี 1301 หลุมที่ 4 เชซแอลเอบี 1513 หลุมที่ 5 เชซแอลเอบี 1525 หลุมที่ 6 เชซแอลเอบี 4402

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์แคลมป์ (PCR clamp)

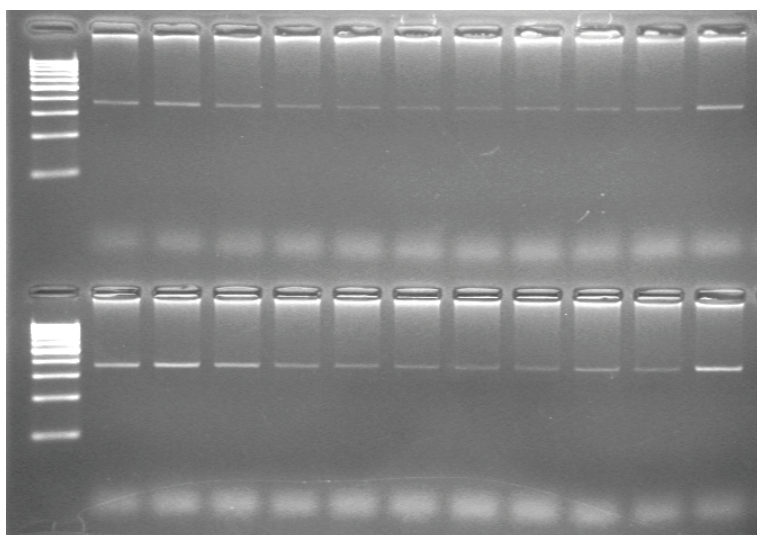
เมื่อทำการทดสอบพีซีอาร์แคลมป์กับยีนอินเตอร์เฟียร์อนแอลฟาพบว่าพีเอ็นเอสามารถขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มากในทุกอุณหภูมิ แต่ยังคงเห็นผลผลิตจากพีซีอาร์อยู่ จึงได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าปริมาณของพีเอ็นเอไม่เพียงพอต่อการขัดขวางปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณพีเอ็นเอจนถึง 100 pmol ก็ยังไม่สามารถขัดขวางปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้อย่างสมบูรณ์ จึงต้องทำการศึกษาต่อไปว่ามีปัจจัยใดที่ส่งผลให้เกิดพีซีอาร์แคลมป์เป็นไปได้อย่างสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น



หมายเหตุ หลุมที่ 1 ดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อบอกขนาด (DNA ladder) หลุมที่ 2 – 12 60.0, 60.4, 61.6, 63.4, 65.6, 68.2, 70.9, 73.6, 76.0, 78.1, และ 79.6 องศาเซลเซียส

จากนั้นจึงทำการทดสอบพีซีอาร์แคลมป์กับเอชแอลเอบี 1502 โดยใช้พีเอ็นเอสองสายที่มีลำดับเบสคู่สมกันมาเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดพีซีอาร์แคลมป์พบว่า แม้พีเอ็นเอทั้งสองสายจะจับดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันแต่คนละเส้นดีเอ็นเอก็ไม่สามารถขัดขวางปฏิกิริยาการเกิดพีซีอาร์ได้เท่ากัน โดยจะเห็นได้ว่าพีเอ็นเอสายฝั่งตรงข้ามกับดีเอ็นเอ (รูปแบบ) สามารถขัดขวางปฏิกิริยาได้ดีกว่าพีเอ็นเอฝั่งเดียวกับดีเอ็นเอ จึงสรุปได้ว่าการเกิดพีซีอาร์แคลมป์ได้มีประสิทธิภาพหรือไม่ขึ้นกับลำดับเบสของพีเอ็นเอนั้นๆ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----



หมายเหตุ รูปแบบแสดงการเกิดพีซีอาร์แคลมป์กับพีเอ็นเอสายฝั่งตรงข้ามกับดีเอ็นเอ ส่วนรูปล่างแสดงการเกิดพีซีอาร์แคลมป์กับพีเอ็นเอสายฝั่งเดียวกับดีเอ็นเอ โดยหลุมที่ 1 ดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อบอกขนาด (DNA ladder) หลุมที่ 2 – 12 60.0, 60.4, 61.6, 63.4, 65.6, 68.2, 70.9, 73.6, 76.0, 78.1, และ 79.6 องศาเซลเซียส

สรุปผลการดำเนินงานของโครงการ

จากการดำเนินงานเป็นเวลา 3 ปี สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาเอชแอลเออย่างจำเพาะและมีราคาถูกลงได้ทั้งวิธีพีซีอาร์และแลมป์เพื่อให้บริการแก่คนไข้ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ อีกทั้งการนำพีเอ็นเอ

มาช่วยเพื่อการแปลผลให้จำเพาะมากขึ้นและหยุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือการทำพีซีอาร์แคลมพ์ก็ได้หลักการในการที่จะต่อยอดพัฒนาวิธีดังกล่าวต่อไป

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

ในส่วนของการนำพีเอนเอมาช่วยเพื่อการแปลผลให้จำเพาะมากขึ้นนั้นจะยังคงต้องพัฒนาวิธีพีซีอาร์ให้เหลือเพียงเอสแอลเอที่สามารถแยกด้วยพีเอนเอได้ และมีปริมาณพีซีอาร์ที่มากพอที่จะเห็นผลการจับของพีเอนเอได้ อีกทั้งจะยังศึกษาการใช้สารเรืองแสงใหม่ ๆ มาติดพีเอนเอเพื่อช่วยในการแปลผลพีซีอาร์ได้โดยตรงจากสารละลายโดยไม่ต้องทำ Gel electrophoresis นอกจากนี้การใช้พีเอนเอเพื่อหยุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือการทำพีซีอาร์แคลมพ์ก็มีการศึกษาหาปัจจัยที่มีผลต่อการชะงักปฏิกิริยาต่อไปเพื่อใช้แปลผลการหาเอสแอลเอโดยไม่ต้องอาศัยสารเรืองแสงที่มีราคาแพง

หัวข้อการวิจัย

พิสูจน์ประสิทธิภาพของชุดตรวจกรอง Hemoglobin E ที่ใช้เทคนิคทางนาโนเทคโนโลยีมาใช้ร่วมกับตัวตรวจจับที่เป็น PNA ในชุดตรวจวินิจฉัยโรค

มูลเหตุจูงใจ

โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกตินั้นเป็นโรคทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ และพบได้บ่อยในประเทศไทย ซึ่งมีผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ประมาณ 6 แสนคน และผู้ที่เป็นพาหะของโรคนี้มากกว่า 20 ล้านคน ในปัจจุบันทารกเกิดใหม่ในทุกๆ 1000 คนจะเป็นโรคนี้ประมาณ 12 คน[1] โดยผู้ที่มียีนผิดปกติของธาลัสซีเมียมีทั้งผู้ที่เป็นโรคและเป็นพาหะซึ่งจะมีอาการโลหิตจาง อาจมีความรุนแรงแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของยีนที่ผิดปกติ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีอาการหนักจะมีความทุกข์ทรมานมากจากการมีโลหิตจางเรื้อรัง ความผิดปกติในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ความพิการ ความป่วย ความเจ็บ ทั้งสุขภาพกาย สุขภาพใจ ทั้งของตนเองและครอบครัว รวมทั้งเป็นภาระหนักทางการแพทย์ สังคมและมีผลต่อเนื่องกับสภาวะเศรษฐกิจของประเทศ

สาเหตุของโรคนี้เกี่ยวกับความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินชนิดที่สำคัญคือ Hb A (hemoglobin A) ซึ่งประกอบไปด้วยสายโกลบินชนิดแอลฟา(α -globin chain) 2 สาย อยู่บนโครโมโซมที่ 16 และสายโกลบินชนิดบีต้า (β -globin chain) 2 สาย อยู่บนโครโมโซมที่ 11 การสร้างสายโกลบินดังกล่าวควบคุมโดยยีนโกลบินแอลฟา (α -globin chain) และยีนโกลบินบีต้า (β -globin chain) ยีนธาลัสซีเมียแบ่งตามมิวเตชันของยีนโกลบินที่เป็นชนิดต่างๆได้ดังนี้ 1 ยีนกลุ่ม α -thalassemia ได้แก่ α -thalassemia 1 , α -thalassemia 2 และ Hb Constant Spring (Hb CS) 2 ยีนกลุ่ม β -thalassemia ได้แก่ β -thalassemia และ Hb E ทำให้มีปริมาณน้อยหรือไม่สร้างเลย เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนโกลบินที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินนั้นๆ ความไม่สมดุลของปริมาณสายโกลบิน และเกิดความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและความผิดปกติต่างๆตามมา[2] ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบอุบัติการณ์สูงและมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยมีคนที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียประมาณ 30-40 %[2] ซึ่งนับได้ว่าเป็นภาวะที่พบบ่อยและควรตระหนักอย่างยิ่ง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพและถูกต้องแม่นยำจึงเป็นผลดีต่อการป้องกันโรคที่จะถ่ายทอดต่อไปในลูกหลาน

การตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย มีการตรวจได้หลายระดับ เริ่มตั้งแต่ระบบการตรวจกรองหาบุคคลที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรค (Screening Test) ปัจจุบันสามารถตรวจกรองได้ด้วย 3 วิธีหลักคือ

1. MCV (Mean Corpuscular Volume) เป็นการวัดขนาดของเม็ดเลือดแดง
2. OF (Osmotic Fragility) เป็นการตรวจความเปราะของเม็ดเลือดแดง
3. DCIP (Dichlorophenol Indophenol Precipitation) เป็นการตรวจการตกตะกอนของ

Hemoglobin ที่ไม่อยู่ตัว คือ Hb E ,Hb Bart's , Hb H

เมื่อตรวจพบบุคคลที่มีความเสี่ยงของโรคนี้ จะทำการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธีการหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน Hemoglobin-typing (Hb-typing) โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือพิเศษ คือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือวิธี Capillary Electrophoresis (CE) รวมทั้งการตรวจดีเอ็นเอเพื่อเป็นการยืนยันการวินิจฉัย (Confirm Test) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) [3]

ความผิดปกติในกลุ่มปีต้า-ธาลัสซีเมีย ชนิด ฮีโมโกลบิน อี เป็นภาวะที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 13 ของประชากรไทย โดยในจำนวนนี้พบว่าประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความผิดปกติแบบ Hemoglobin E มากที่สุด เช่น ในจังหวัดสุรินทร์ สกลนครพบได้ถึงร้อยละ 50-60 ของประชากร และจากการตรวจหาถึงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลศิริราชพบพาหะชนิดฮีโมโกลบิน อี ร้อยละ 25 [4]

การตรวจกรอง Hemoglobin E ในปัจจุบันจึงมีเพียงการตรวจ DCIP เป็นส่วนใหญ่ แต่เนื่องจาก การตรวจกรอง DCIP ยังมีปัญหาถึงความชัดเจนของผลที่ได้ ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ของผู้ปฏิบัติการ คือต้องใช้ ผู้ที่มีประสบการณ์ ความชำนาญในการทำสูงและทำตามขั้นตอนของกระบวนการวิเคราะห์อย่างเคร่งครัด จึงได้ผลที่แม่นยำและมีความถูกต้อง หากเกิดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา และอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป เพียงเล็กน้อย อาจส่งผลให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงซึ่งส่วนใหญ่ผู้ที่เป็โรคนี้ก็มีความเปราะบางของเม็ด เลือดอยู่แล้ว จนในที่สุดทำให้เกิดปัญหาผลบวกปลอม (False Positive) ซึ่งมักเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นบ่อย ใน กรณีที่ผู้ป่วยซีดมากอาจทำให้เกิดผลลบลงได้ (False Negative) อีกทั้งการทำการจะต้องทำควบคู่กับ ตัวอย่างควบคุมผลบวกและผลลบเสมอ[5] นอกจากนี้ขั้นตอนในการตรวจที่ค่อนข้างยุ่งยาก เวลาที่ใช้ในการ ตรวจประมาณ 20 นาที อีกทั้งค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นหากมีวิธีการตรวจใหม่ที่ที่สามารถเข้ามาแก้ไข ปัญหาต่างๆ เหล่านี้ได้ก็จะส่งผลประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวินิจฉัย และเพื่อเป็นประโยชน์สูงสุดแก่คนไข้เอง

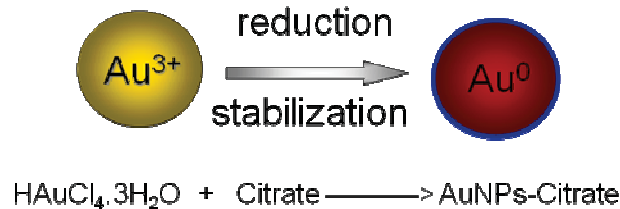
นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) เป็นเทคโนโลยีประยุกต์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการ การสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร และการจัดเรียงอะตอม/โมเลกุลในตำแหน่งที่ต้องการได้ อย่างถูกต้องแม่นยำ[6] รวมถึงการออกแบบหรือการใช้เครื่องมือสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมาก ทำให้ได้วัสดุ นาโน (ท่อนาโน เส้นใยนาโน และอนุภาคนาโน) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมีและ ชีวภาพ ต่างไปจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการนำวัสดุนาโนมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ใน หลายสาขาวงการ เช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพ และทางการแพทย์ เป็นต้น

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนา โนเมตรที่มีความเสถียรสูงสุดชนิดหนึ่ง[7] ซึ่งถูกสังเคราะห์ได้เป็นคอลลอยด์ การสังเคราะห์ AuNPs ในน้ำ นั้นสามารถทำได้โดยอาศัยสารช่วยทำให้เสถียร (nanoparticle stabilizer) ซึ่งสารช่วยทำให้เสถียรที่นิยมใช้ กันมากก็คือ sodium citrate ข้อดีประการหนึ่งคือ sodium citrate จะทำหน้าที่เป็นได้ทั้งสารช่วยทำให้

เสถียร และเป็นตัวรีดิวซ์ไปด้วย[8] เมื่อมีสารช่วยให้เสถียรเข้ามาล้อมรอบ จะทำให้ AuNPs ไม่รวมตัวกันหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน เพราะสารช่วยให้เสถียรจะเกาะที่ผิวของ AuNPs และทำให้ผิวของ AuNPs แต่ละอนุภาคไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้

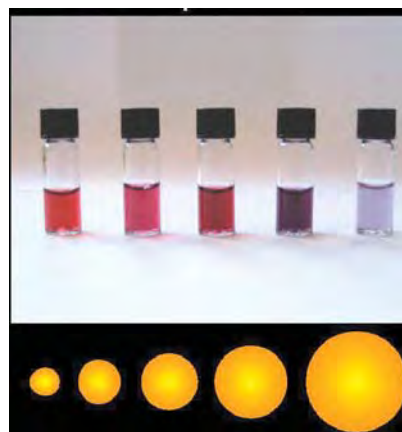
รูปที่ 1 การสังเคราะห์ gold nanoparticles จากสารตั้งต้น [สารละลายทองคำและสารช่วยให้เสถียร (nanoparticle stabilizer)] โดยอาศัยปฏิกิริยา reduction และอุณหภูมิที่เหมาะสม



ที่มา: Pal T. (2002) [7]

อย่างไรก็ตามสามารถที่จะปรับปรุงพื้นผิวของ AuNPs ให้มีโมเลกุลที่ต้องการมาเคลือบผิวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาปรับปรุงพื้นผิวให้เกาะยึดกับสารชีวโมเลกุลเป้าหมาย เช่น DNA[9] หรือ โปรตีน[10]หรือสายคาร์โบไฮเดรต [11] หรือยา สี Fluorescent[12] ด้วยเหตุนี้เองจึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารทางชีวภาพ (biosensor) ที่มีความจำเพาะเจาะจงได้อย่างหลากหลาย[13] โดยการปรับปรุงจากพื้นผิวของ AuNPs ด้วยสารที่มีความสามารถในการจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ตรวจหาโดยคอลลอยด์ของ AuNPs สามารถเปลี่ยนสีได้ง่ายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงร่ายนอก จึงเปรียบได้ว่า AuNPs ทำหน้าที่เป็นหน่วยรายงานผล(reporter)สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดระดับโมเลกุล

รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของสี เมื่อขนาดของ AuNPs เปลี่ยนแปลงไป



ที่มา: Liu J, and Lu Y. (2003) [13]

พีเอ็นเอ เทคโนโลยี (PNA Technology)

เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (peptide nucleic acid) หรือพีเอ็นเอเป็นโมเลกุลสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างเลียนแบบดีเอ็นเอโดยแทนที่ส่วนของดีออกซีไรโบสฟอสเฟตในดีเอ็นเอด้วยเพปไทด์หรือพอลิเอไมด์ ในปี ค.ศ. 1991 การสังเคราะห์และสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอของพีเอ็นเอได้ถูกรายงานเป็นครั้งแรก โดย Nielsen และคณะ [14] จากรายงานการวิจัยพบว่าพีเอ็นเอของ Nielsen สามารถจับยึดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (A เป็นเบสคู่สมกับ T และ C เป็นเบสคู่สมกับ G) เกิดเป็นไฮบริดเช่นเดียวกันกับดีเอ็นเอ โดยไฮบริดที่ได้มีเสถียรภาพสูงกว่าไฮบริดที่เกิดระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเอง และการจับยึดของพีเอ็นเอยังมีการเลือกจำเพาะที่ดีกว่าดีเอ็นเอโดยสามารถบอกความแตกต่างของการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ไม่เข้าคู่กันอย่างสมบูรณ์ได้ชัดเจนกว่าดีเอ็นเอ [15] จากข้อดีของพีเอ็นเอนี้ทำให้มีการพัฒนาและสังเคราะห์พีเอ็นเอระบบใหม่ๆ ขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง [16-20] นอกจากนี้พีเอ็นเอยังเริ่มเข้ามามีบทบาทในด้านเทคโนโลยีทางชีวภาพมากขึ้นโดยการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ เป็นต้น โดยมีการนำพีเอ็นเอโพรบมาใช้ในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอแทนที่ ดีเอ็นเอโพรบมากขึ้น โดยงานวิจัยที่มีรายงานแล้วส่วนใหญ่ยังคงใช้พีเอ็นเอของ Nielsen [21]

ระบบพีเอ็นเอชนิดใหม่ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Vilaivan และคณะที่เรียกว่า ไพร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ (pyrrolidinyl PNA) แสดงสมบัติในการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าดีเอ็นเอและพีเอ็นเอของ Nielsen ทั้งในด้านของความแข็งแรงของการจับยึด (affinity) และการเลือกจำเพาะทั้งลำดับเบสและทิศทางของการจับยึด [17]

จึงได้เล็งเห็นถึงศักยภาพของการพัฒนาไพร์โรลิดินิลพีเอ็นเอดังกล่าวเป็นอุปกรณ์ตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้อย่างสะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาไพร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเรืองแสงเพื่อใช้เป็นโพรบในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคทางสเปกโทรฟลูออริเมตรี โดยอาศัยหลักการ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ซึ่งเกี่ยวข้องกับถ่ายทอดพลังงานระหว่างโมเลกุลทำให้มีความจำเพาะ (selectivity) และมีความแม่นยำสูง (sensitivity)

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดตรวจโดยการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในการทำชุดตรวจกรอง Hemoglobin E โดยใช้ synthetic DNA ในการศึกษาการพัฒนาชุดตรวจนี้ขึ้น

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 1 g/ml

สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากปฏิกิริยา reduction ของสารละลาย (O₂H₄.3uClH) hydrogen tetratetrihydrate(III) acholoaurate โดยใช้สารละลาย trisodium citrate (O₂H₇.2O₅H₆C₃Na) dihydrate ขึ้นแรกปิเปตสารละลาย 1% (O₂H₄.3uClH) hydrogen tetratetrihydrate(III) acholoaurate ปริมาณ 0.5mL ใส่ใน flask ที่มี DI water อยู่ 24.5 mL นำไปต้ม บน stirrer hot plate โดยมี magnetic bar กวนสารจนมีอุณหภูมิถึง 100° C จึงเติมสารละลาย 38.8 mM (O₂H₇.2O₅H₆C₃Na) trisodium citrate dihydrate ลงไป 0.94 mL สีของสารละลายจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อน เป็นสีเทา สีม่วงและสีแดงตามลำดับ จากนั้นต้มต่อที่อุณหภูมิ 100° C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ได้ในที่มีดและเย็น

2. Characterization ของ AuNPs

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV-visible absorption

3. จัดเตรียม PNA Probe และ DNA Probe สำหรับ Hemoglobin E

PNA Probe ได้รับความร่วมมือจาก รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 PNA Probe ที่ตรึงบริเวณ Test Line

PNA Probe (A) 5' TGGTAAGGCC-Lys(biotins) 3'

PNA Probe (G) 5' TGGTGAGGCC-Lys(biotins) 3'

ส่วน DNA Probe ทำการสั่งซื้อจากบริษัทเอกชนในการสังเคราะห์ตามลำดับดังนี้

1 DNA Probe(1) ที่ตรึงบริเวณ Control Line

DNA (1) 5'-biotin-CTTCATCCACGTTACCTTG-3'

2 DNA Probe(2) For Conjugate AuNPs ใช้ใน Conjugate pad

DNA (2) 5'-Thiol-CAAGGTGAACG-3'

3.Synthetic Target A 5' CAACCTGCCCAGGGCCTTACCACCACCTTC

ATCCACGTTACCTTGCCCCACAGGGCAGT 3'

Synthetic Target G 5' CAACCTGCCCAGGGCCTCACCACCACCTTC

ATCCACGTTACCTTGCCCCACAGGGCAGT 3'

4. การติด DNA Probe(2) For Conjugate ลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (AuNPs)

การติด DNA probe ลงบนผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ทำได้โดยนำ DNA probe(2) ที่ต่อกับหมู่ thiol (1.0 OD) ปริมาณ 98 uL มาผสมกับ triethylamine ปริมาณ 2 uL และ เติม DDT ปริมาณ 7.7 mg วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างด้วย ethylacetate ปริมาณ 400uL 4 ครั้ง หลังจากนั้นเติม DNA probe(2) ลงใน AuNPs 1 mL นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 40C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เติม NaCl โดยให้สารละลาย AuNPs มี NaCl เข้มข้นสุดท้ายเป็น 150mM แช่ที่อุณหภูมิ 40C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำไปcentrifuge ที่ 12,000 rpm 12 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้งและละลายตะกอนด้วยสารละลาย eluent buffer (20 mM Na₃PO₄, 5% BSA, 0.25% Tween และ 10% sucrose) ปริมาณ 1 mL

5. การเตรียม PNA Probe (A),(G) และ DNA Probe (1) สำหรับตรึงอยู่บน Lateral flow strip

ทำการเติม 1 mM ของ PNA Probe (A),(G) และ DNA Probe (1) ซึ่งต่อกับ biotin ทำเป็น 3 ชุด แยกกัน ปริมาณอย่างละ 60uL และ PBS 140 uL ลงใน 1.67mg/ml ของสารละลาย streptavidin ปริมาณ 30 uL ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. การเตรียม Simple pad

นำ glass fiber (4 mm x 17 mm) ไปจุ่มในสารละลาย buffer (ประกอบด้วย 0.25% Triton X 100, 0.05 M Tris-HCl, และ 0.15M NaCl) ตากให้แห้งและเก็บไว้ใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง

7. การเตรียม Conjugate pad

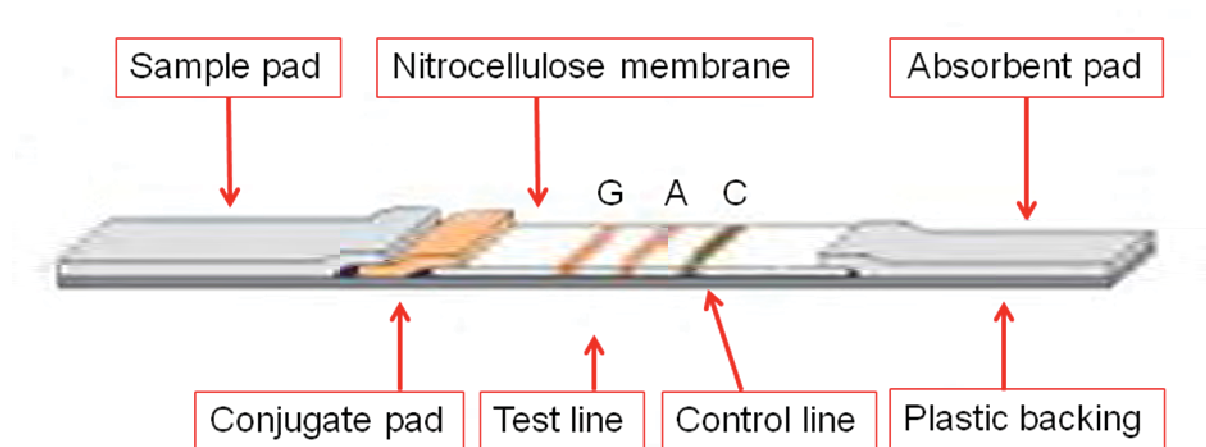
นำ glass fiber (4 mm x 8 mm) มาจุ่มในสารละลาย AuNPs ที่ต่อกับ DNA probe จากนั้นนำมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ใน desiccator ที่อุณหภูมิ 40C

8. การเตรียม Nitrocellulose membrane

นำ Probe PNA และ DNA Probe มาหยดลงบนกระดาษ Nitrocellulose membrane (4 mm x 25 mm) .ให้มีความกว้างขนาด 2mmโดย หยดบริเวณที่เป็น test zone ส่วน control หยดบริเวณที่เป็น control zone จากนั้นตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 10C

9. การประกอบชุด Lateral flow strip

นำส่วนของ Simple pad Conjugate pad Nitrocellulose membrane และ Absorption pad มาประกอบบนแผ่นพลาสติก (Backing) ขนาด 4 mm x 60 mm โดยแต่ละส่วนจะมีบริเวณที่วางซ้อนทับกันยาว 2mm แล้วเก็บไว้ที่แห้งและมีดเพื่อเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป

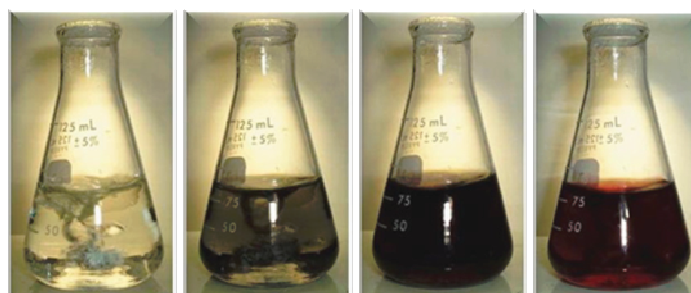
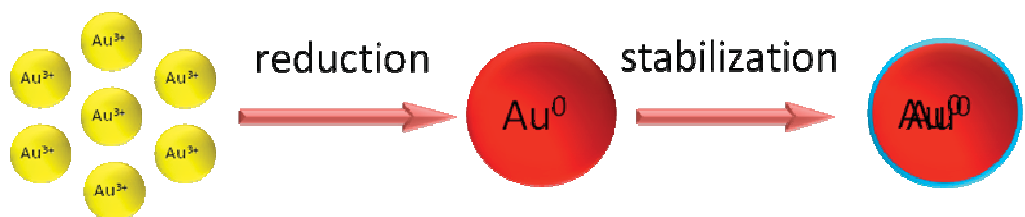


รูปที่ 3 Model แสดงส่วนประกอบของ Lateral flow Hb E strip test

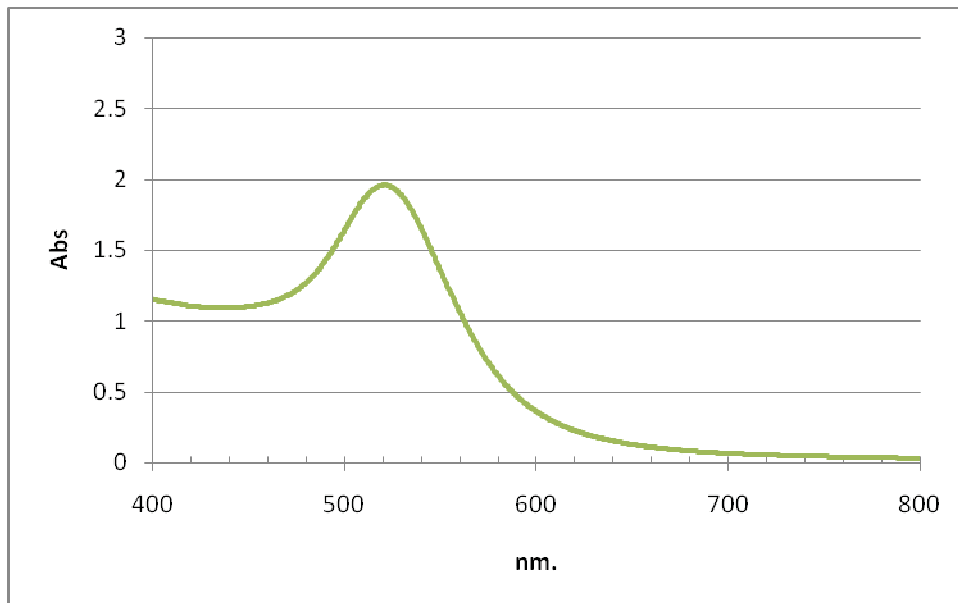
ผลการวิจัย

ผลจากการสังเคราะห์ Gold Nanopartical

รูปที่ 4 ผลที่ได้จากการสังเคราะห์ Gold Nanopartical



สีของGold nanoparticle ที่ได้จะมีลักษณะสีแดง จากนั้นนำอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV-visible absorption

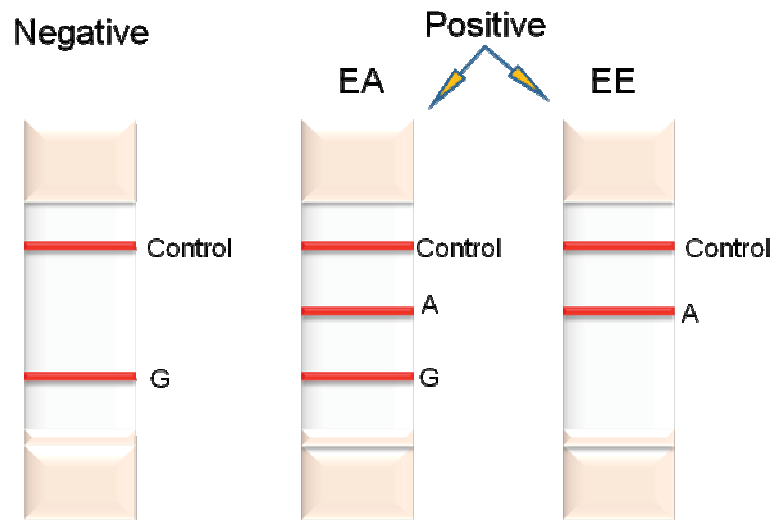


รูปที่ 5 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่ความยาวคลื่น 520 nm

การแปลผล

Hemoglobin E เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีต้าอี ที่ตำแหน่งโครโมโซมคู่ที่ 11 โดยเกิดการแทนที่(Point Mutation)ของนิวคลีโอไทด์เบส (single nucleotide base substitution) ที่ตำแหน่งที่ 26 ในสาย บีต้า จากระหัส GAG เปลี่ยนเป็น AAG ดังนั้น Hb E Strip นี้จึงเป็นการตรวจกรองในระดับพันธุกรรม โดยใช้หลักการของ PNA Probe ที่สามารถจับกับลำดับ DNA ในตัวอย่างเลือดได้ในตำแหน่งที่เกิดการแทนที่(Point Mutation)ดังกล่าว จึงสามารถรายงานผลได้ใน 3 ลักษณะ ดังนี้หากผลเป็น Positive จะเห็นแถบสีเกิดขึ้นมี 2 กรณีคือ กรณีแรกหากเป็นความผิดปกติชนิด EA จะขึ้นในตำแหน่ง G,A,Control ส่วนกรณีที่สองเกิดความผิดปกติชนิด EE จะขึ้นแถบสีในตำแหน่ง A , Control ตามลำดับ ส่วนในกรณีที่สามเทียบกับ Negative Control จะเห็นแถบสีเกิดขึ้นในตำแหน่ง G , Control ดังแสดงได้ในรูป 6

รูปที่ 6 แสดงตัวอย่างการแปลผล Lateral flow Hb E strip test



ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้จะเป็นผลที่ได้จากการอ่านได้ด้วยสายตาในการเกิดแถบสีในตำแหน่งที่ได้ทำสัญลักษณ์เอาไว้ โดยใช้หลักการแปลผลในลักษณะต่างๆดังที่ได้กล่าวมาในด้านต้นหลังจากนั้นจะทำการบันทึกผล โดยการถ่ายภาพ

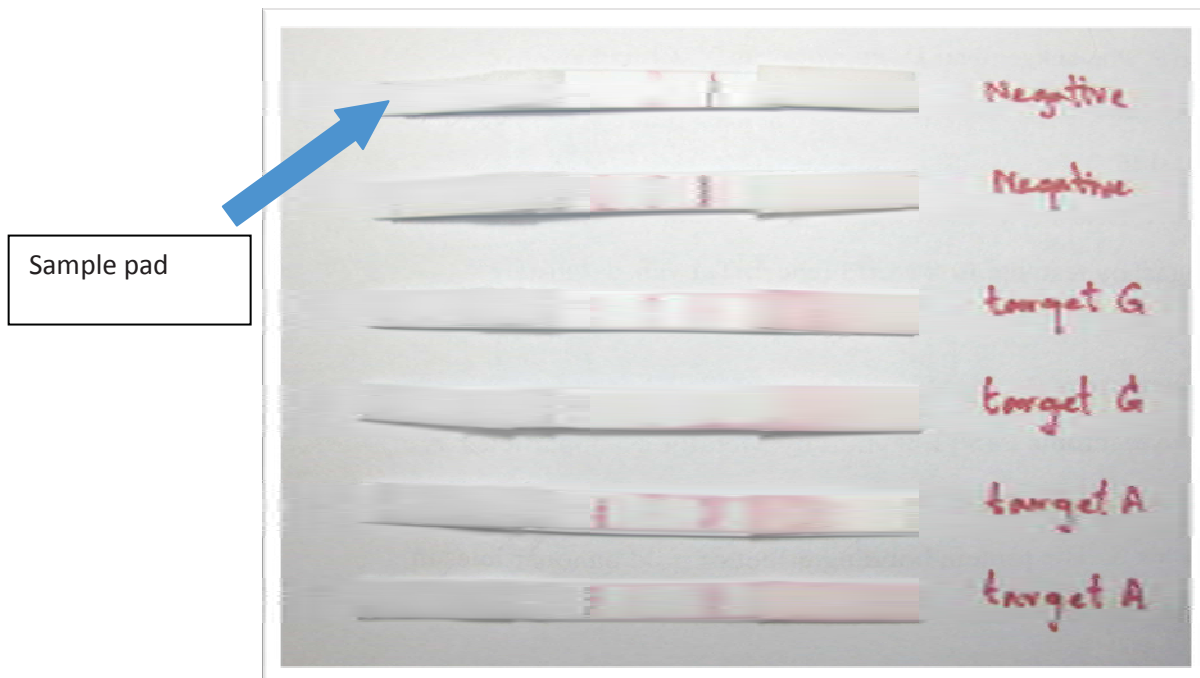
ผลจากการทดลองจริงโดยใช้ DNA Target ที่ออกแบบมาเฉพาะในการทดลองได้ผลดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 100 μ M
• Target	• Synthetic target (100 fM) type A,G
• Buffer	• PBS

ผลของการทดลอง

G A C

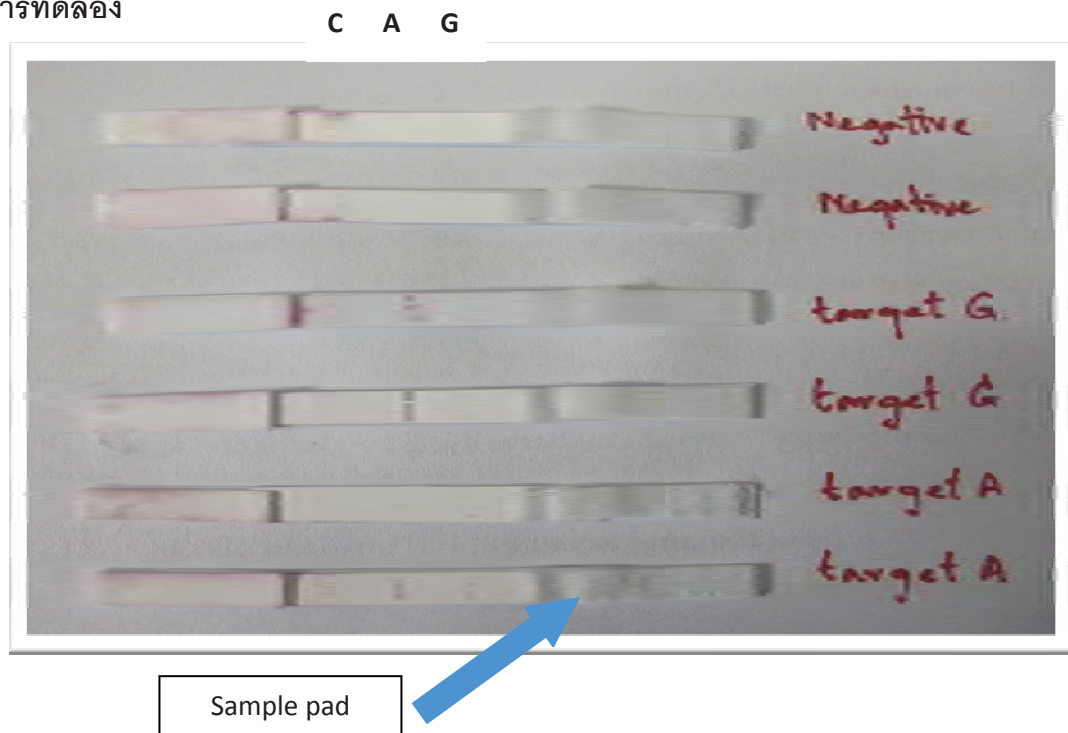


จากการทดลองครั้งที่ 1 ใช้ PBS เป็นตัว run ผลคือจะพบการขึ้นของทั้งสามแถบของ test line และ control line ซึ่งไม่น่าเป็นไปได้ เพราะว่าเราใช้ synthetic target ที่ออกแบบมาให้เหมือนกับ Hb E ที่เบสเป็น CTC ซึ่งน่าจะขึ้นแถบได้เฉพาะที่ test line ที่เบสคู่สมกับตัวตรวจจับ PNA ที่เป็น 5' TGGTGAGGCC 3' จะขึ้นแถบที่ test line ที่เป็นแถบ G ได้เท่านั้นแต่กับขึ้นได้หมดแสดงว่าไม่มีความจำเพาะเจาะจง และใช้ synthetic target ที่ออกแบบมาให้เหมือนกับ Hb E ที่เบสเป็น CTT ที่เบสคู่สมกับตัวตรวจจับ PNA ที่เป็น 5' TGGTAAGGCC 3' จะต้องขึ้นแถบที่ test line ที่เป็นแถบ A ก็ให้ผลการทดลองที่คล้ายกันกับแถบ G พบการขึ้นของแถบทุกแถบ ซึ่งไม่น่าเป็นไปได้ จึงจะทำการทดลองต่อไปโดยจะใช้ dH₂O แทน PBS และดูการขึ้นของแถบแบบ

การทดลองที่ 2

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 100 μ M
• Target	• Synthetic target (100 fM) type G,A
• Buffer	• dH ₂ O

ผลของการทดลอง



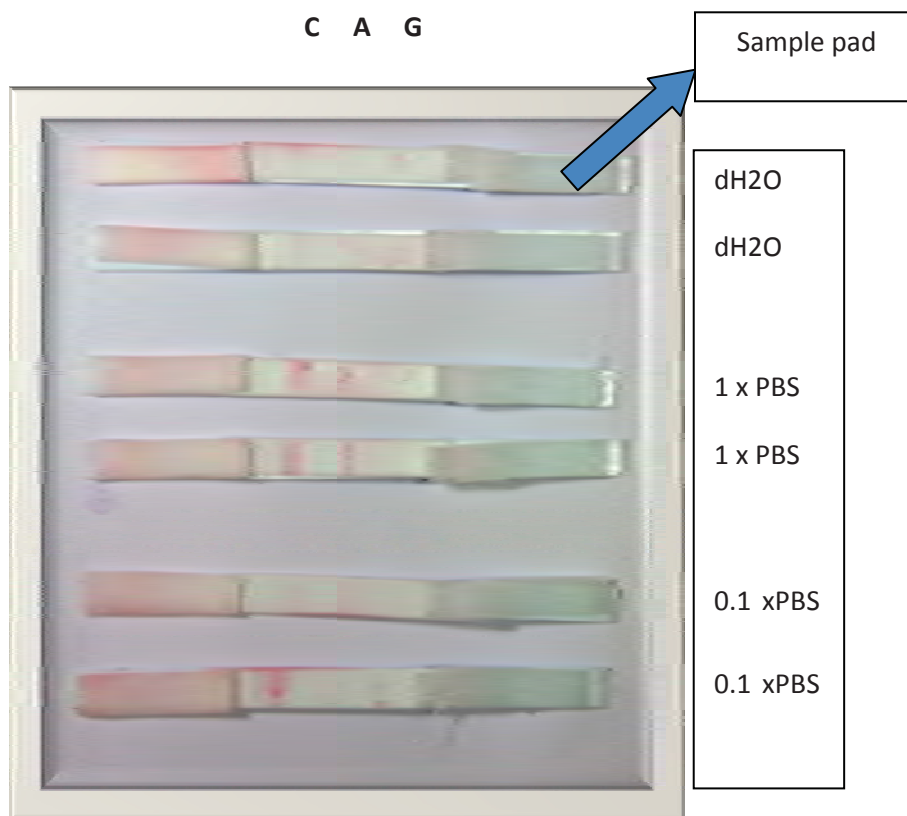
ส่วนการทดลองที่ 2 พบปัญหาการขึ้นของแบนทั้งสามแถบ และขึ้นแถบ control line บางๆ ในครั้งที่สอง โดยครั้งนี้ใช้ dH₂O เป็นตัว run แต่ signal ของแต่ละแถบไม่ดีนัก

จากการทดลองข้างต้นที่ผ่านจึงตั้งข้อสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดมาจากการที่ความเข้มข้นของเกลือที่มากเกินไปซึ่งอาจทำให้เกิดผลดังกล่าวขึ้น และจะทำการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 100 μ M
• Target	• Synthetic target (100 fM) Type G
• Buffer	• dH ₂ O, 1x PBS, 0.1x PBS

ผลของการทดลอง

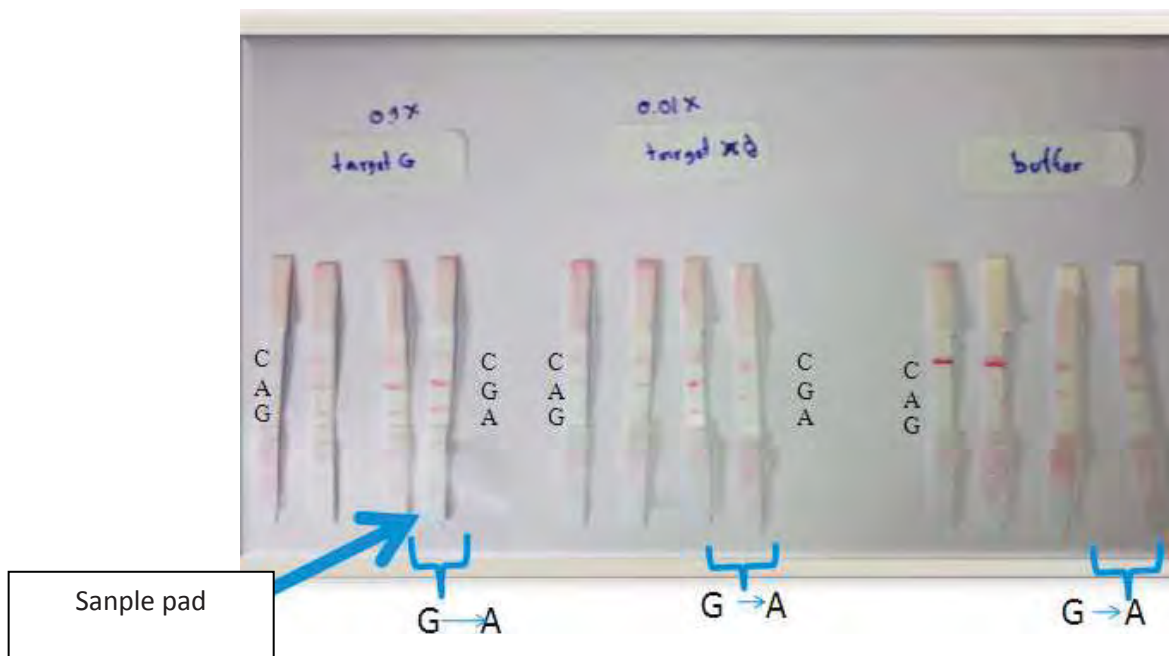


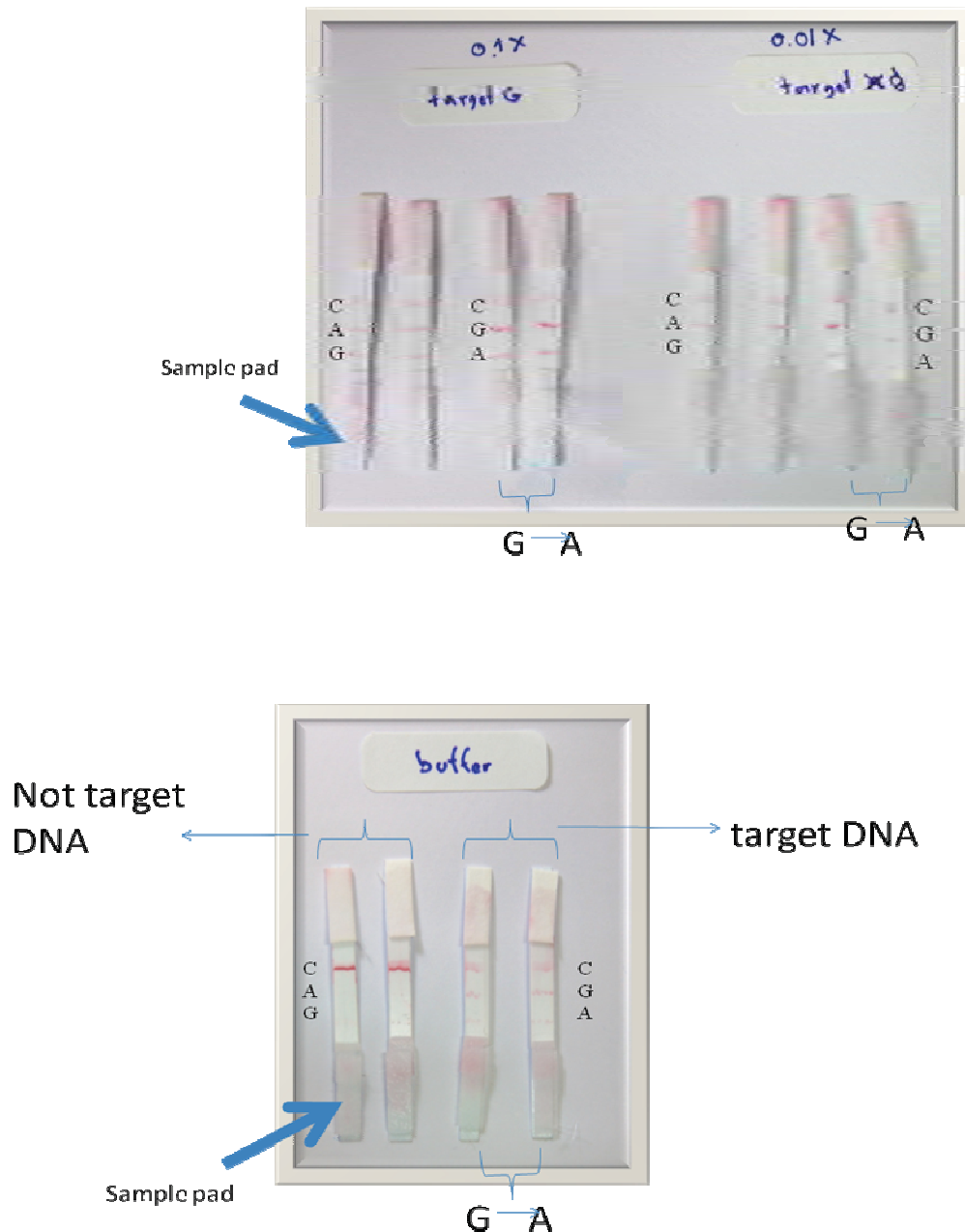
จากข้อสันนิษฐานจากการทดลองครั้งก่อนจึงทำให้การทดลองครั้งนี้จะออกแบบให้ปริมาณความเข้มข้นของปริมาณเกลื่อน้อยลงโดยการเจือจางลงเป็น 1 ใน 10 เท่าจากความเข้มข้นเดิม และเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดิม แต่ผลที่ออกมาก็คือ แถบที่ใช้ความเข้มข้นของเกลื่อนที่ถูกเจือจางไป 10 เท่า นั้นให้ผล signal ค่อนข้างแยกว่าแถบที่ใช้ PBS ซึ่งเป็นไปตามข้อสันนิษฐานของเรา แต่ผลของการขึ้นของทดสอบ synthetic target นั้นยังค่อนข้างไม่แน่นอนและยังขึ้นแถบที่ไม่จำเพาะเจาะจงอยู่

การทดลองที่ 4

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 100 μM
• Target	• Synthetic target (100 fM) type G
• Buffer	• 10mM phosphate buffer + 2M NaCl • Dilute 0.1x ,0.01x ,0.001x

ผลของการทดลอง



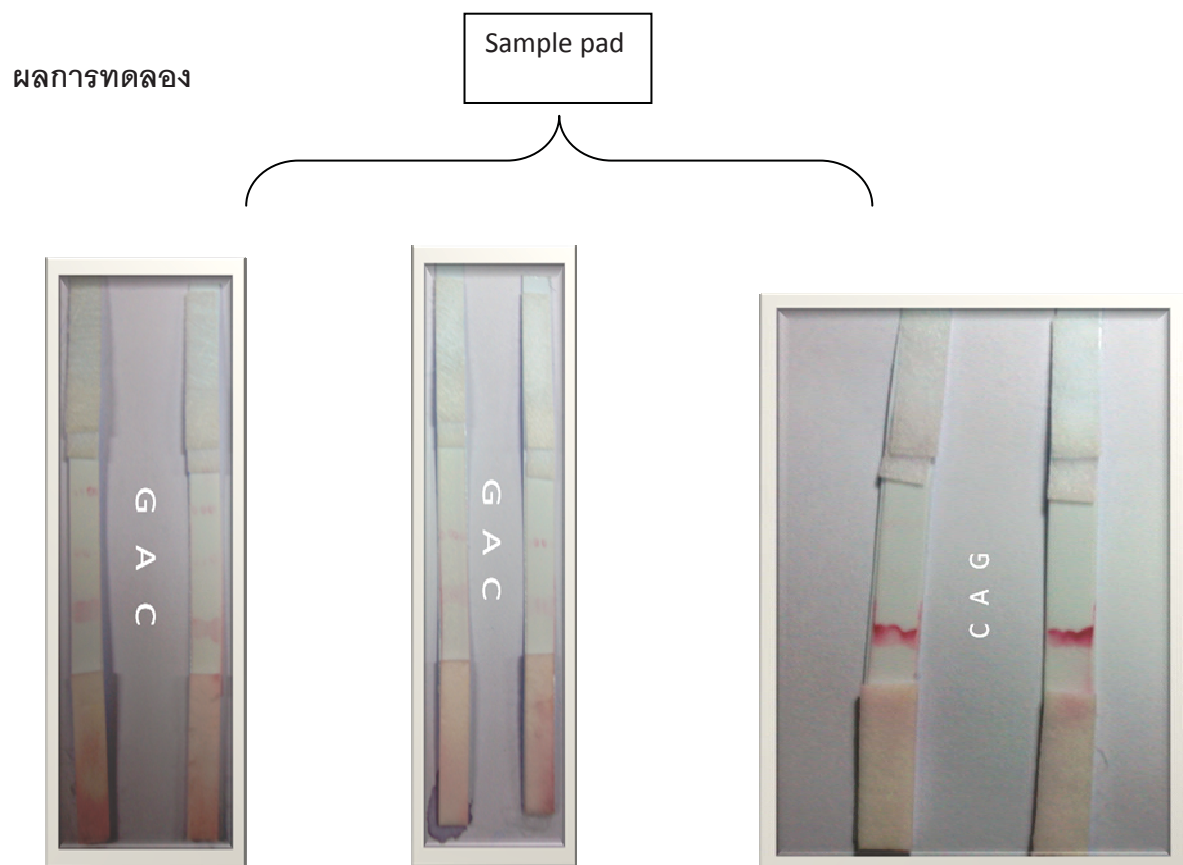


ผลจากการทดลอง

การทดลองนี้ที่จะใช้ในการตรวจสอบ DNA ของคนที่ต้องการตรวจสอบว่าเป็นโรคธาลัสซีเมียหรือไม่ โดยการใช้วิธีตรวจแบบ strip test ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากการทดลองโดยใช้ Synthetic target แล้วลองทดสอบใน strip test ยังให้ผลไม่แน่นอนและไม่ได้มาตรฐาน แต่มีข้อสันนิษฐานหนึ่งเชื่อว่าการขึ้นของแถบอย่างไม่แน่นอนอาจเกิดมาจากการที่ความเข้มข้นของ probe ที่ test line และ control line มีความเข้มข้นมากเกินไปจึงจะทำการทดลองต่อไปในการลองเจือจางความเข้มข้นของ probe ให้ลดลง

การทดลองที่ 5

Streptavidin-biotin	- PNA : test line - Probe DNA : control line
Concentration probe	100 μM
Target	Synthetic target (100 fM) type G
Buffer	10mM phosphate buffer + 2M NaCl - Dilute 0.1 x



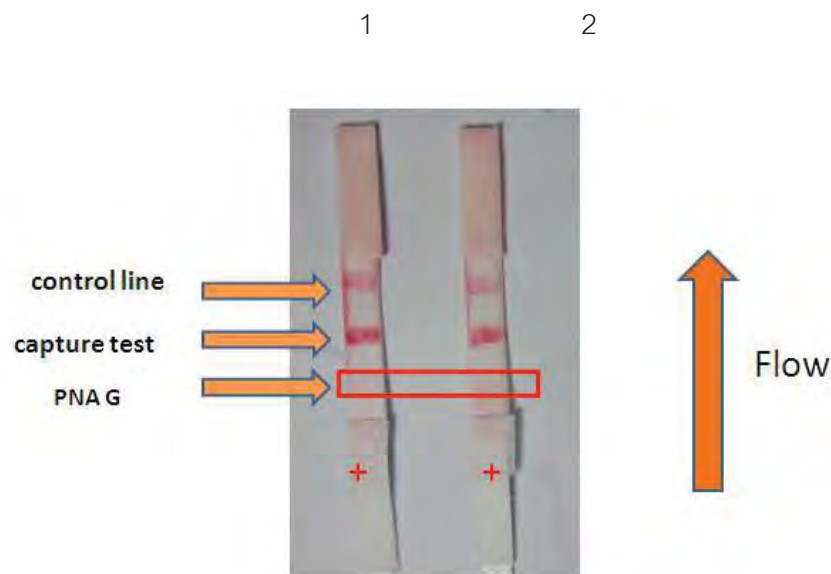
จากการทดลองที่ทำการเจือจางความเข้มข้นของ probe ให้ลดลง ผลที่ได้คือแถบที่เกิดขึ้นยังคงขึ้นอย่างไม่น่าเชื่อถือ เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ใส่ Synthetic target จึงทำการสรุปว่าการทดลองทำชุดตรวจกรอง Hemoglobin E ที่ใช้ตัวตรวจจับเป็น PNA ยังให้ผลไม่น่าเชื่อถือและยังคงไม่จำเพาะเจาะจงแล้ว ความที่ไม่จำเพาะเจาะจงน่าจะเกิดมาจากที่ PNA จับกับ Synthetic target

ผลการทดลองเพื่อลดความเกิดการจับกันของ PNA กับ พื้นที่ผิวรอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้โปรตีน BSA ตามความเข้มข้นต่างๆ

การทดลองที่ 6

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+5% BSA
• Target	• No target
• Buffer	• 4x ssc 10 % SDS

ผลของการทดลอง

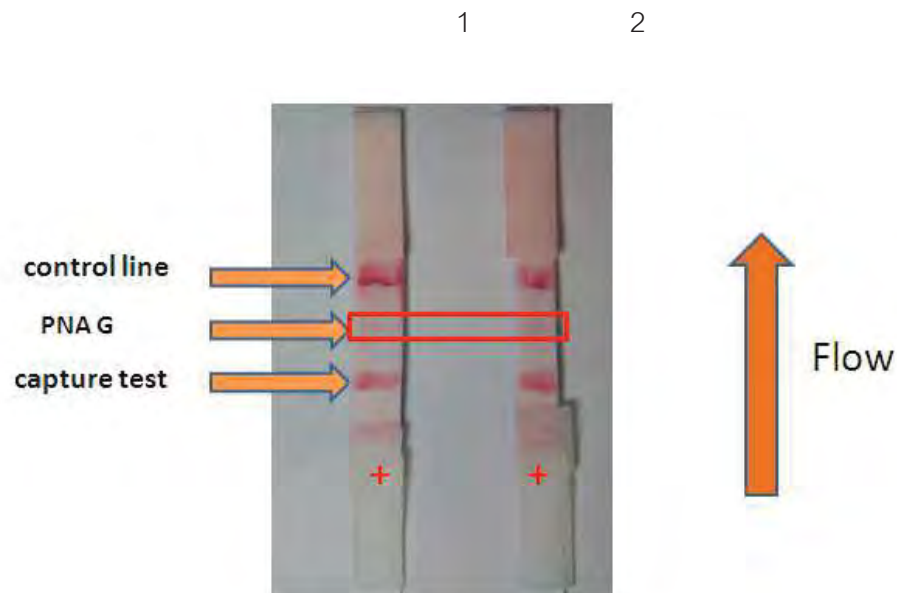


จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการเกิดขึ้นของแถบแบนเกิดการจับกันของ PNA ชนิด G กับ พื้นที่ผิวรอบอนุภาคทองคำ ทำให้เกิดแถบแบนที่ผิดปกติขึ้น เพราะเนื่องมาจากยังทำการล้อมโปรตีน BSA กับ พื้นที่ผิวรอบอนุภาคทองคำ ไม่ได้สัดส่วนที่พอเหมาะหรือหมายความว่ายังล้อมไม่หมดทำให้เกิดการจับขึ้น เพื่อสนับสนุนเหตุผลดังกล่าวจึงจะลองสลับตำแหน่งของ probe PNA ชนิด G และสังเกตแถบแบนที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 7

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+5% BSA
• Target	• No target
• Buffer	• 4x ssc 10 % SDS

ผลของการทดลอง

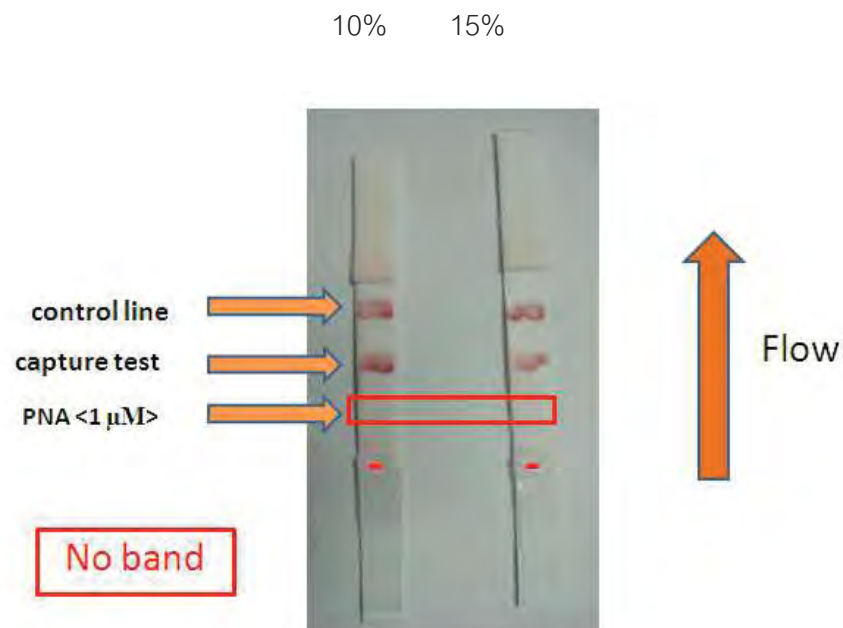


จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าเป็นไปตามเหตุผลที่คิดไว้ พบการเกิดแถบแบนเกิดการจับกันของ PNA ชนิด G กับ พื้นที่ผิวรอบอนุภาคทองคำ ถึงแม้จะทำการสลับตำแหน่งดังกล่าวแล้ว จากผลที่ได้เรายังล้อมไม่ได้สัดส่วนที่พอเหมาะ จะทำการเพิ่มปริมาณของโปรตีน BSA ให้มากขึ้น และระยะทางในการเคลื่อนของสารไม่มีผลต่อการเกิดแถบแบนดังกล่าว

การทดลองที่ 8

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA, 15% BSA
• Target	• No target
• Buffer	• 4x ssc

ผลของการทดลอง



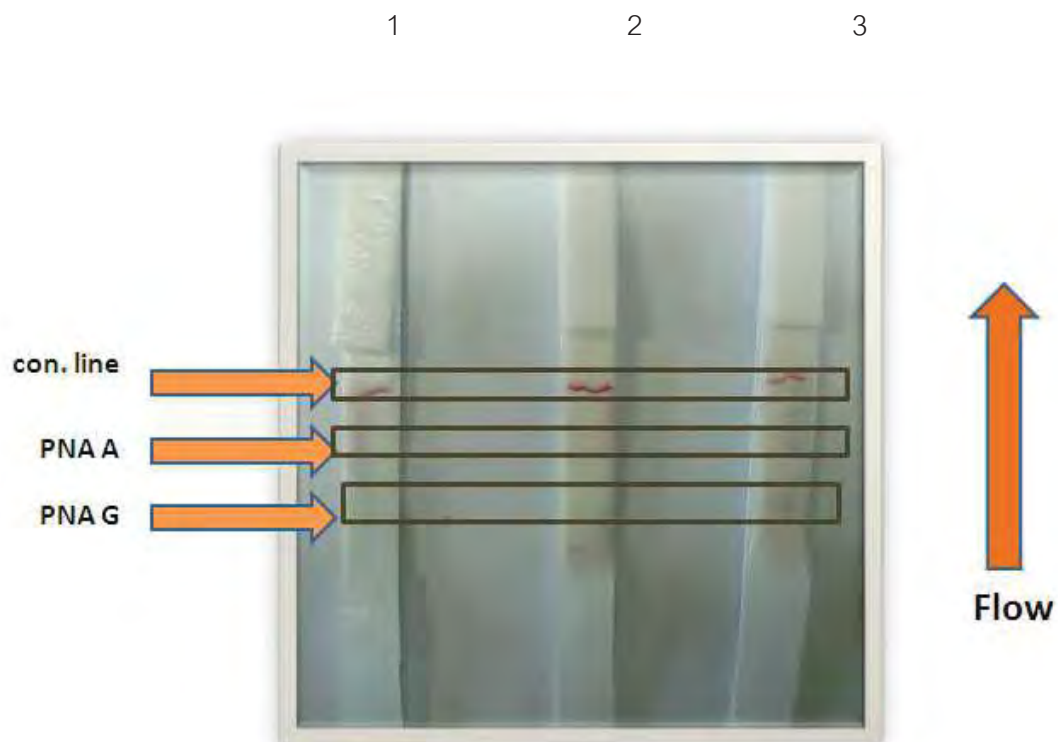
จากการทดลองโดยการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน BSA จาก 5 % เป็น 10 % และ 15% เพื่อทำการล่อพื้นที่ผิวรอบอนุภาคทองคำไม่ให้จับกับ PNA ผลที่ได้ ปริมาณของ BSA 10 % และ 15% ให้ผลเหมือนกันคือขึ้นแถบแบนจางๆของPNA ถือว่าให้ผลดีมาก และเราเลือกความเข้มข้นที่ 10% เพราะว่าที่ความเข้มข้นที่ 15% ก็ให้ผลเหมือนกัน จะทำการทดลองต่อไปโดยใช้ปริมาณของ BSA ที่ 10%

การทดลองที่ 9

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• No target
• Buffer	• 4x ssc

ผลของการทดลอง

ทำการทดลองนำ PNA ชนิด G และ PNA ชนิด A มาลองทำกับ strip test ที่มี conjugate probe ที่ถูกเชื่อมด้วยโปรตีน BSA 10% และไม่ได้ใส่ target DNA ได้ผลดังนี้



จากการทดลองได้ผลคือ ไม่พบแถบแบนของการจับกันของ PNA กับ พื้นที่ผิวรอบอนุภาคทองคำ โดยทำการทั้งหมด 3 ซ้ำ และได้ผลเหมือนกัน การทดลองต่อไปในอนาคตจะทำการทดลองใช้ target DNA

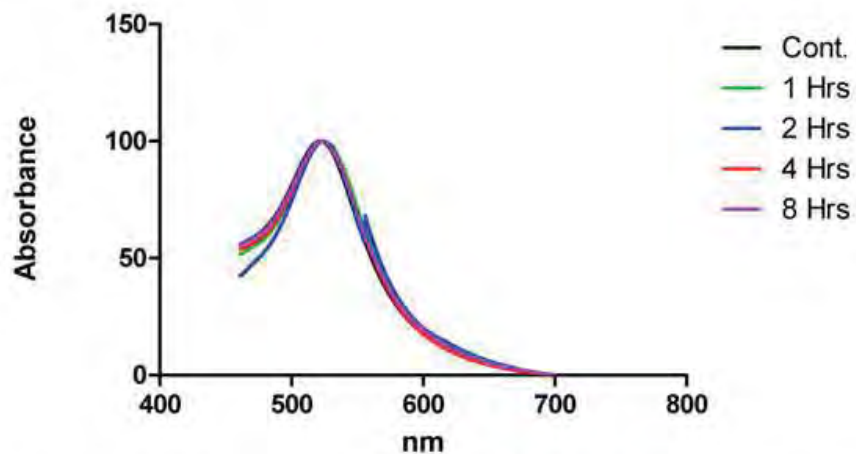
ต่อไปในการทดลองข้างหน้า และทำการทดลองสนับสนุนผลว่าโปรตีน BSA ไม่ได้ทำให้ AuNPs เกิดการจับกันขึ้น

การทดลองที่ 10

• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Time	• 0,1,2,4,8 Hrs.
• UV-visible absorption	• 520 nm

ทำการทดลองเพื่อดูผลของโปรตีน BSA ว่าสามารถทำให้ AuNPs เกิดการจับกันได้หรือไม่ โดยได้ผสม AuNPs และ โปรตีน BSA เข้าไว้ด้วยกัน โดยทำการศึกษาตามเวลาดังนี้ 0,1,2,4,8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-visible absorption โดยที่ AuNPs ปกติจะดูดกลืนที่ 520 nm ถ้าหากเกิดการจับกันเกิดขึ้นจะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 520 nm

ผลของการทดลอง



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่ม BSA กับ AuNPs โดยทำการเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

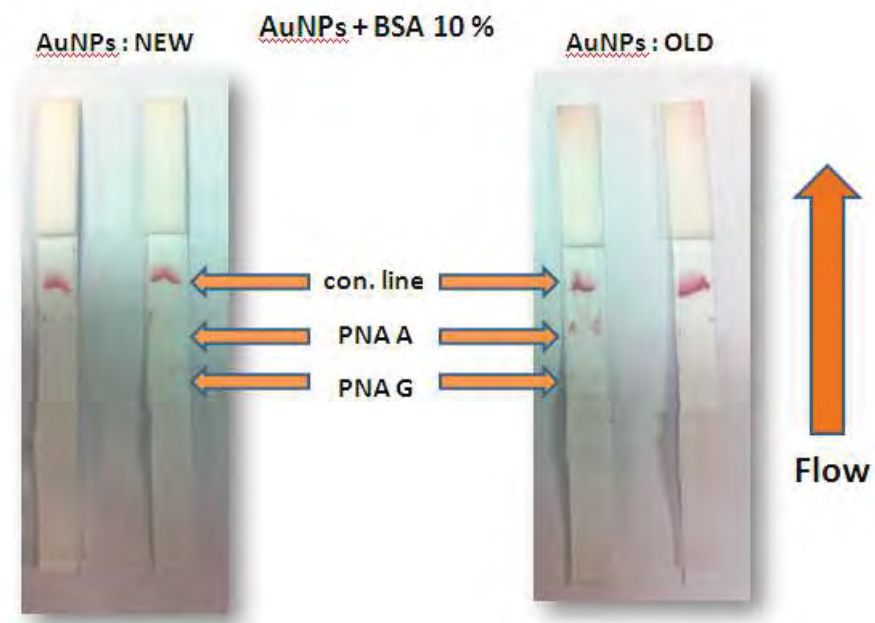
ผลที่ได้คือ โปรตีน BSA ไม่ได้ทำให้ AuNPs เกิดการจับตัวกันขึ้นโดยดูผลได้จากกราฟข้างต้น ซึ่งสังเกตเห็นได้ว่า ยิ่งเพิ่มชั่วโมงไปในการผสมของ AuNPs และโปรตีน BSA ก็ไม่ให้เกิดการจับกันของ AuNPs เพราะค่าการดูดกลืนแสงขึ้นที่ 520 nm ซึ่งแสดงว่า AuNPs ยังแสดงความเป็นอนุภาคนาโนเมตรอยู่ และไม่เกิดการจับกัน

การทดลองที่ 11

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs(New)+10% BSA, AuNPs(Old)+10% BSA
• Target	• No target
• Buffer	• 2x ssc

เนื่องจากได้ AuNPs มาใหม่จึงทำการทดลองเทียบกับ AuNPs อันเดิมว่าอันไหนก่อให้เกิด non specific น้อยกว่ากัน

ผลของการทดลอง



ผลการทดลองที่ได้ AuNPs อันใหม่จะก่อให้เกิด non specific น้อยกว่า AuNPs อันเดิม เพราะ อาจเกิดจากการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันของ AuNPs ซึ่งอันใหม่จะค่อนข้างมีการกระจายตัวของ AuNPs ที่ ขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าของอันเดิมจึงทำให้โปรตีน BSA ล้อมได้ดีกว่า และเกิด non specific น้อยกว่า จากศึกาและทดลองต่อไปจะใช้ AuNPs อันนี้

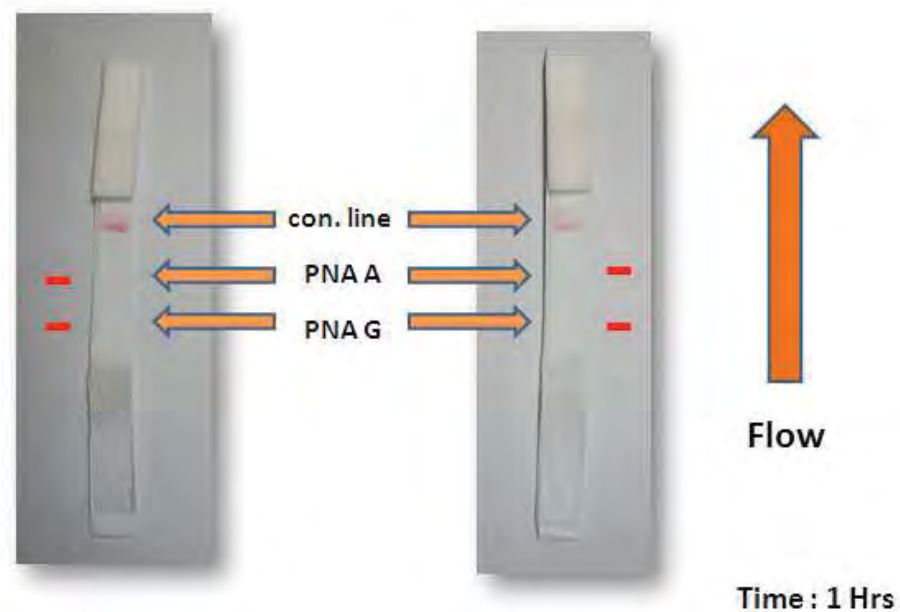
การทดลองที่ 12

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• Synthetic G,A
• Buffer	• 2x ssc

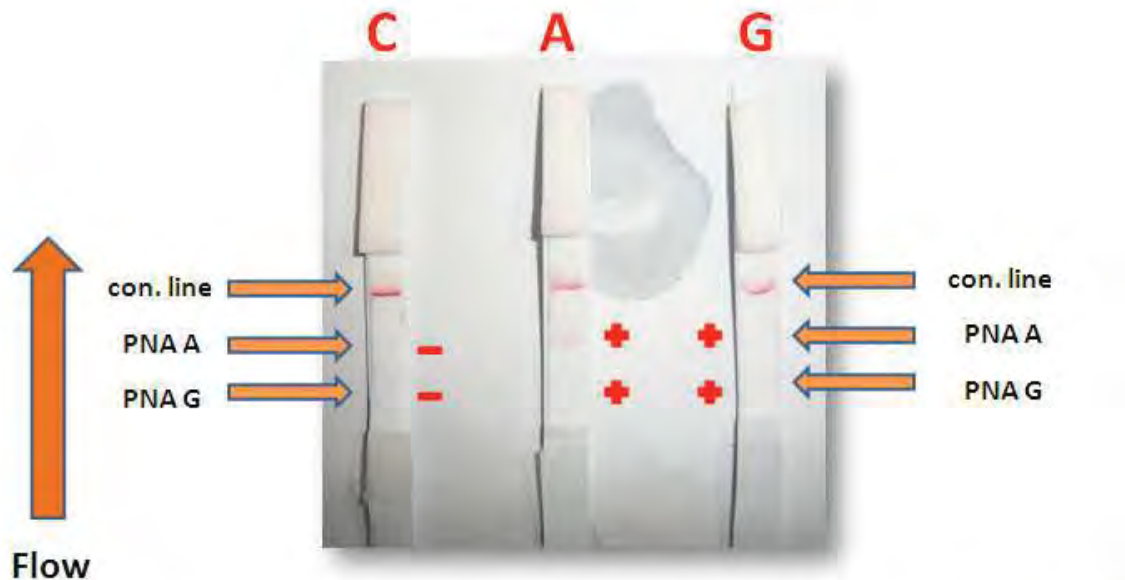
ทำการทดลองโดยใช้ synthetic DNA และดูผลการทดลองที่เกิดขึ้น

ผลของการทดลอง

ตัวควบคุมการทดลองที่ไม่ได้ใส่ synthetic DNA



ตัวการทดลองที่ใช้ synthetic DNA



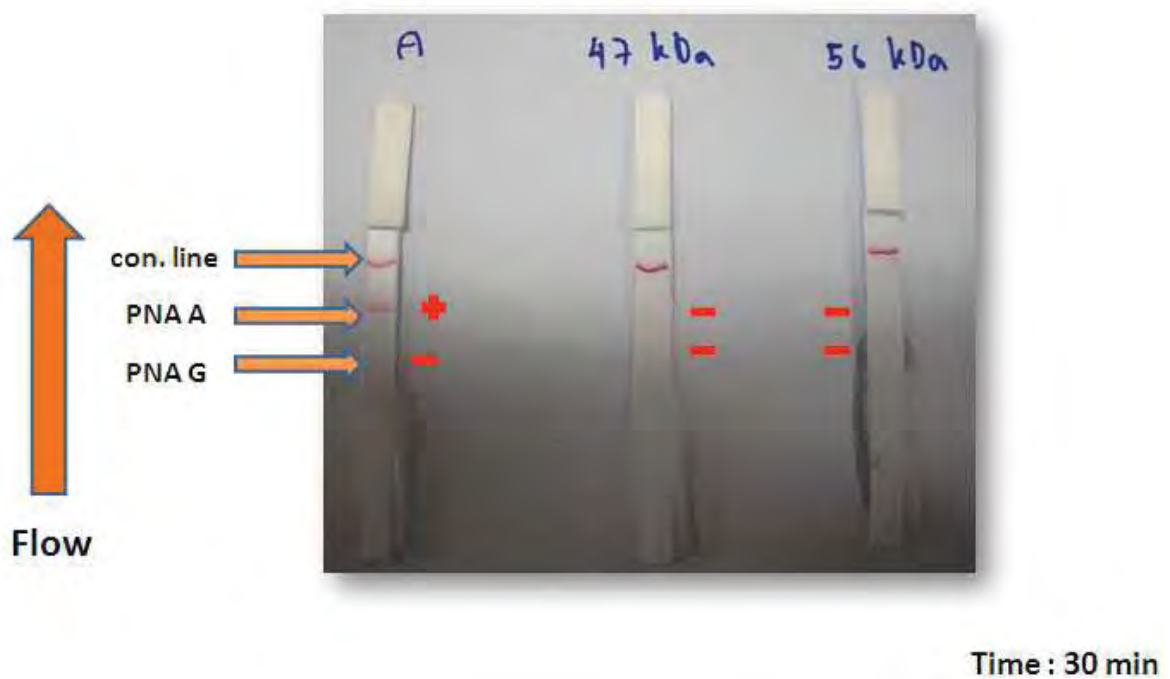
ทำการทดลองเปรียบเทียบใน strip test ที่ทำการใส่กับไม่ใส่ synthetic DNA ผลปรากฏว่าไม่ใส่ synthetic DNA ไม่ขึ้นแถบแบบ non specific แสดงว่าระบบที่เราทำมาสามารถทำงานได้ ต่อมา strip test ที่ทำการใส่ synthetic DNA กับขึ้นแถบแบบ non specific ทั้ง Synthetic G , A ที่เวลา 1 ชั่วโมง แสดงว่า PNA Probe ทั้งสองตัวไม่มีความจำเพาะเจาะจง แต่ยังไม่แน่ใจแต่ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง โดยจะใช้ synthetic DNA ตัวอื่น ที่ไม่เกี่ยวกับงานในการศึกษาผล

การทดลองที่ 13

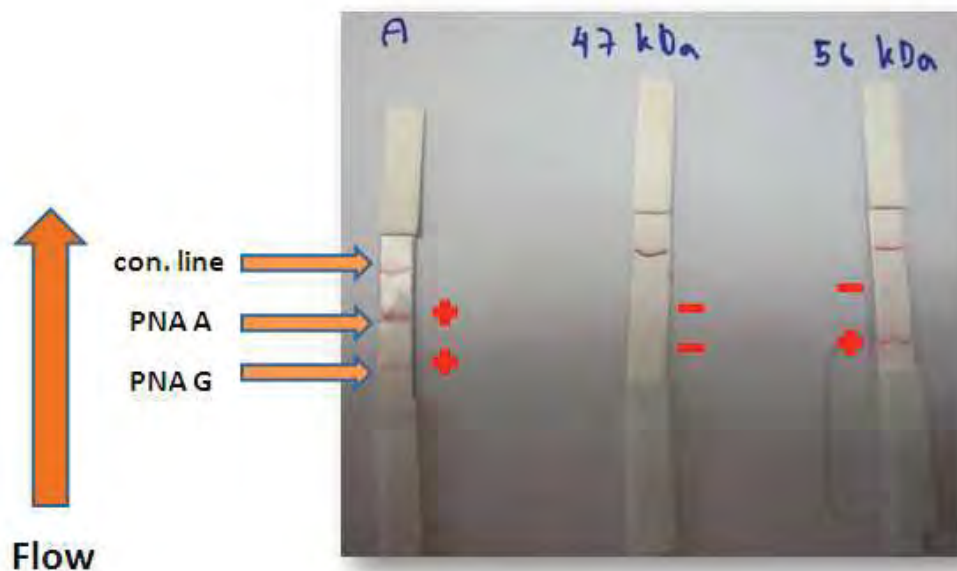
• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• Synthetic A , 47 kDa , 56 kDa
• Buffer	• 2x ssc

ศึกษาผลความไม่จำเพาะเจาะจงของ probe PNA โดยใช้ synthetic DNA ที่ไม่เกี่ยวข้องกับงานในการศึกษาและทำการวิเคราะห์ผล โดยเลือกใช้ synthetic DNA ของ bacteria

ผลของการทดลอง



เมื่อเวลาผ่าน 30 นาที หลังจากใส่ synthetic DNA



Time : 1 Hrs

เมื่อเวลาผ่าน 60 นาที หลังจากใส่ synthetic DNA

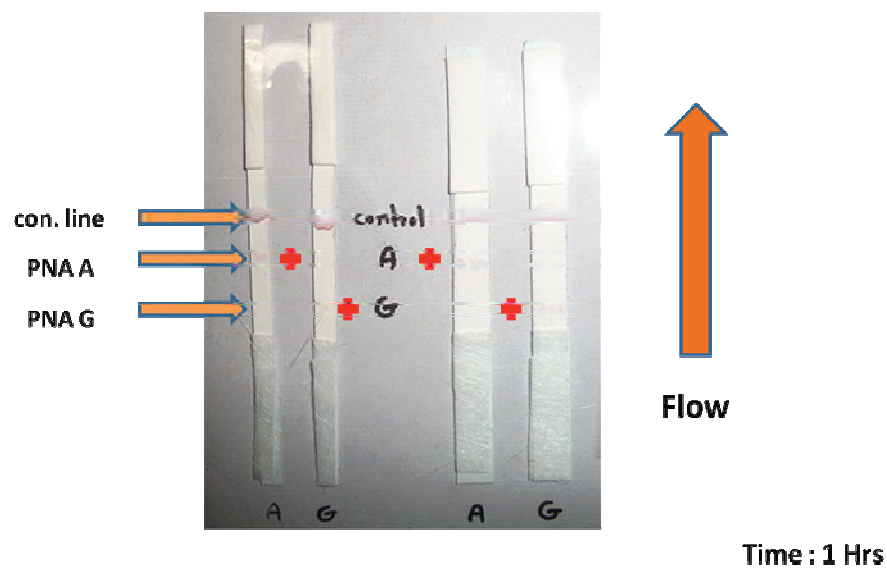
ผลการศึกษาที่ได้ เมื่อนำ synthetic DNA ของ bacteria ใสลงไปใน strip test ผลปรากฏว่าที่เวลา 30 นาที ยังไม่พบการขึ้นของแถบแบบ non specific แต่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที กลับพบว่ามีการขึ้นที่ synthetic DNA 56kDa

การทดลองที่ 14

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• Synthetic A, G
• Buffer	• 2x ssc + 10% fermamide + 0.05%SDS

ศึกษาผลของความจำเพาะเจาะจงของ probe PNA โดยใช้ synthetic DNA โดยใช้ 2x ssc + 10 % fermamide + 0.05% sds เป็น Buffer ที่ใช้ในการศึกษา

ผลของการทดลอง



เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากใส่ synthetic DNA ประมาณ 60 นาที

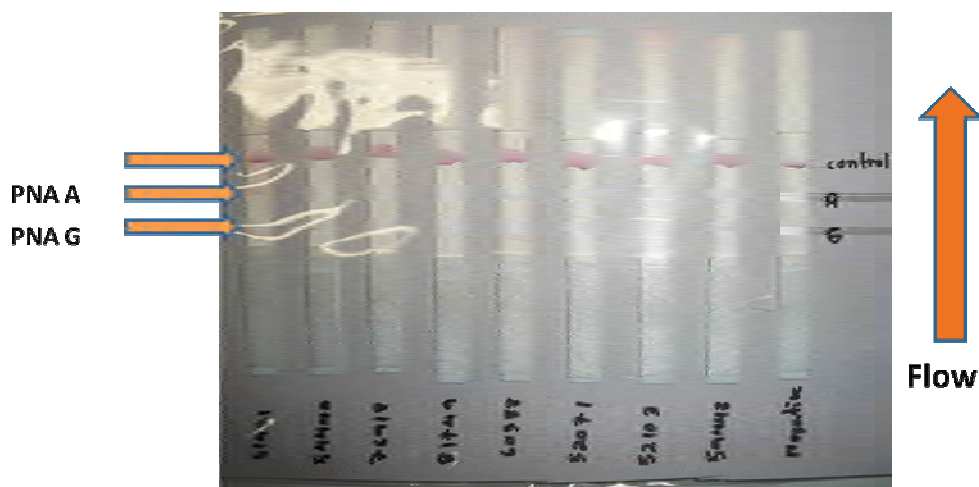
ผลที่ได้ปรากฏว่าหลังจากใส่ synthetic DNA ไป พบการขึ้นของแถบบนที่ test line และ control line โดยที่ test line พบว่าการขึ้นของแถบนั้นตรงกับ synthetic ที่ใส่ลงไป อย่างจำเพาะเจาะจง ผลที่ได้ น่าจะเกิดจากการที่ fermamide เข้าไปทำให้เกิด non specific ระหว่าง ผิวนาโน AuNPs และ PNA ลดลง จะทำการทดลองใน sample ผู้ป่วยต่อไป

การทดลองที่ 15

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• sample
• Buffer	• 2x ssc + 10% fermamide + 0.05%SDS

ศึกษาผลของความจำเพาะเจาะจงของ probe PNA โดยใช้ sample ผู้ป่วย โดยใช้ 2x ssc + 10 % fermamide + 0.05% sds เป็น Buffer ที่ใช้ในการศึกษา ทำการทดลองใน sample ผู้ป่วย

ผลของการทดลอง



Time : 1 Hrs

เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากใส่ sample ผู้ป่วย ประมาณ 60 นาที

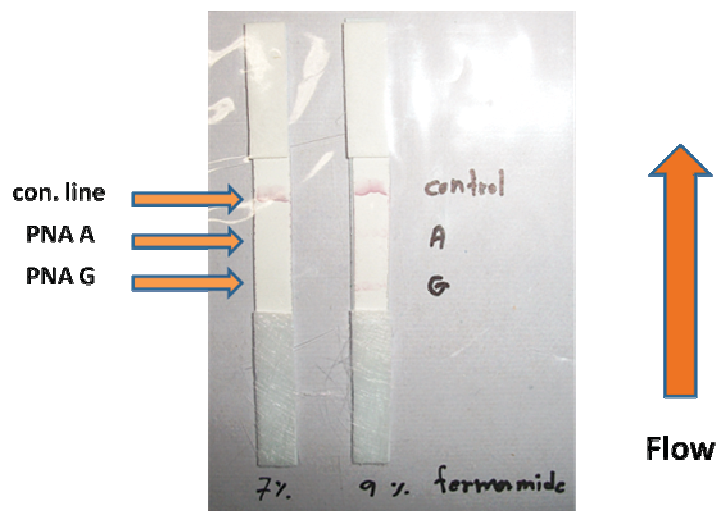
ผลที่ได้จากการทดลอง พบว่าใน sample ผู้ป่วยบาง sample ขึ้นแถบแบบที่จำเพาะเจาะจง และในบาง sample พบการขึ้นของแถบแบบจางมาก ผลที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดมาจากการที่ปริมาณของ fermamide มากเกินไป จนทำให้ไปรบกวนการจับกันของ sample กับ Probe pna จะทำการแก้ไขโดยการลดปริมาณของ fermamide ลง

การทดลองที่ 16

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• sample
• Buffer	• 2x ssc + 9% formamide, 7% formamide + 0.05% SDS

ศึกษาผลของความจำเพาะเจาะจงของ probe PNA โดยใช้ sample ผู้ป่วย โดยการลดปริมาณของเปอร์เซ็นต์ formamide ลง เป็น 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สังเกตผลที่ได้จากการทดลอง

ผลของการทดลอง



Time : 1 Hrs

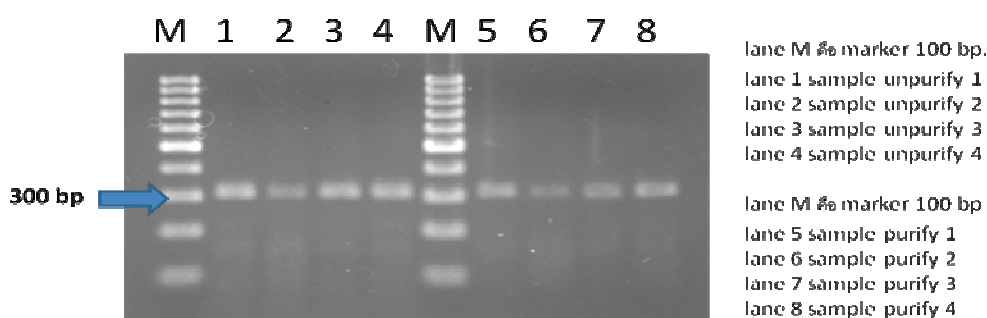
ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าที่ 9 เปอร์เซ็นต์ พบการขึ้นของแถบแบบที่จำเพาะเจาะจง แต่ที่ 7 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการขึ้นของแถบแบบที่ต้องการ น่าจะเกิดจากปริมาณของ formamide มีผลต่อการทดลองที่เกิดขึ้น ความมากหรือน้อยไปก็อาจจะมีผลต่อการจับกันของแถบแบบที่เกิดขึ้น และปริมาณที่พอเหมาะคือ 7 % formamide

การทดลองที่ 17

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• sample(purify PCR)
• Buffer	• 2x ssc +9 % formamide + 0.05%SDS

ศึกษาผลของปริมาณเกลือ $MgCl_2$ ในชุดน้ำยา PCR ที่อาจจะมีผลต่อการจับกันของ sample และ probe PNA โดยการผ่านชุด purify pcr kit และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำ strip test ต่อไป

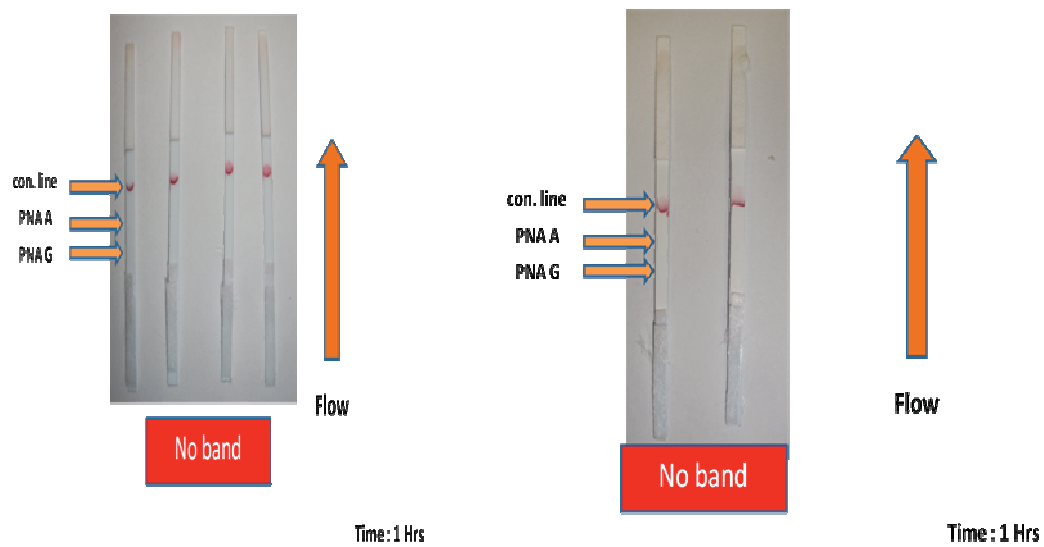
ผลของการทดลอง



รูปภาพแสดงการทำ Gel electrophoresis ระหว่างตัวอย่างที่ purify PCR กับที่ไม่ได้ purify PCR มีการขึ้นของชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ 312 bp.

ผลที่ได้จากการทดลองในการ purify pcr โดยทำการ run gel electrophoresis เทียบกันระหว่าง sample ก่อนถูก purify กับหลังจากที่ทำการ purify แล้วพบว่าการสูญหายไปของผลิตภัณฑ์ pcr น้อยมากประมาณ 5 – 10 % มี marker 100 bp. เป็นตัวใช้ในการดูแถบแบนที่เกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้การนำไปลงใน strip test ต่อไป เพื่อดูผลของ $MgCl_2$ ต่อการจับกันของ sample และ probe PNA

ผลของการทดลอง



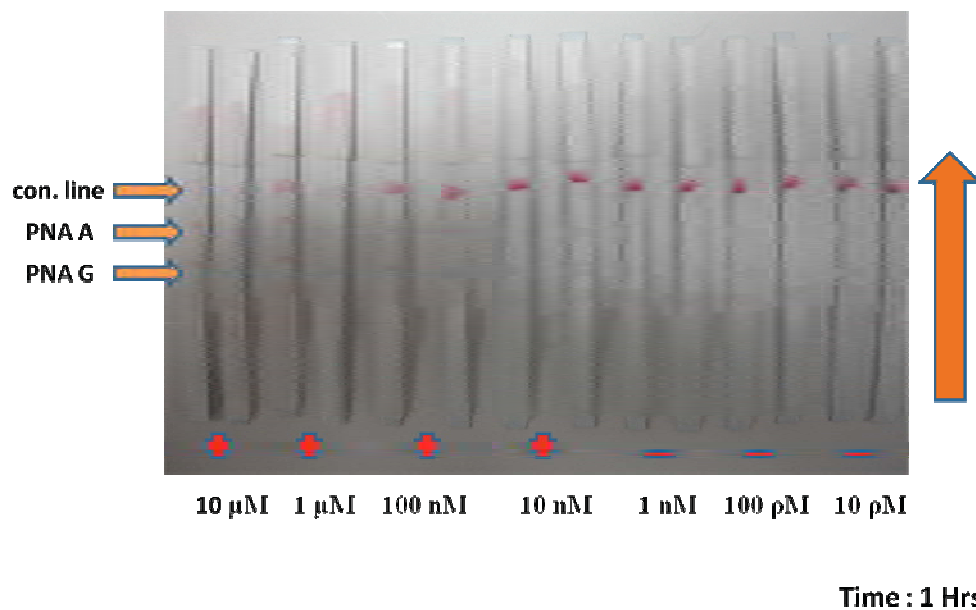
ผลที่ได้จากการทดลองโดยทำการสุ่ม sample ที่ทำการ purify มา 3 sample ผลที่พบปรากฏว่าไม่พบการขึ้นของแถบแบนที่ต้องการในทุก sample ใช้เวลาในการทดลอง 1 ชั่วโมง

การทดลองที่ 18

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• Synthetic A, G
• Buffer	• 2x ssc + 7 % formamide + 0.05%SDS

ศึกษาผลของ strip test ที่ได้ โดยทำการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ strip test สามารถทำได้ เพื่อบอกถึงขอบเขตจำกัดที่สุดที่ strip test มีความสามารถตรวจสอบได้

ผลของการทดลอง



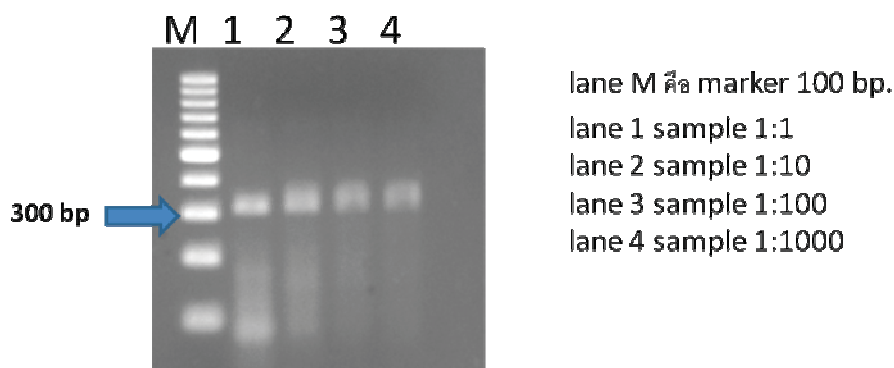
ผลที่ได้จากการทดลองพบว่า ความสามารถในการตรวจสอบที่ต่ำที่สุดที่ strip test ทำได้ คือ 10 nM ถ้าน้อยไปกว่านั้นไม่สามารถตรวจสอบได้ ซึ่งการทดลองนี้นั้นทำการทดลองใน synthetic dna และจะนำไปใช้อ้างอิงในการทดลองใน sample ผู้ป่วยต่อไป

การทดลองที่ 19

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• Sample (Asymmetric PCR)
• Buffer	• 2x ssc +7% formamide + 0.05%SDS

ศึกษาผลของ probe PNA กับการจับกับ sample โดยใช้หลักการของ Asymmetric PCR ในการทดลอง เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็น single strand เพื่อลดปัญหาในการที่ไม่เกิดการจับกันของ sample กับ probe PNA ที่เกิดขึ้น

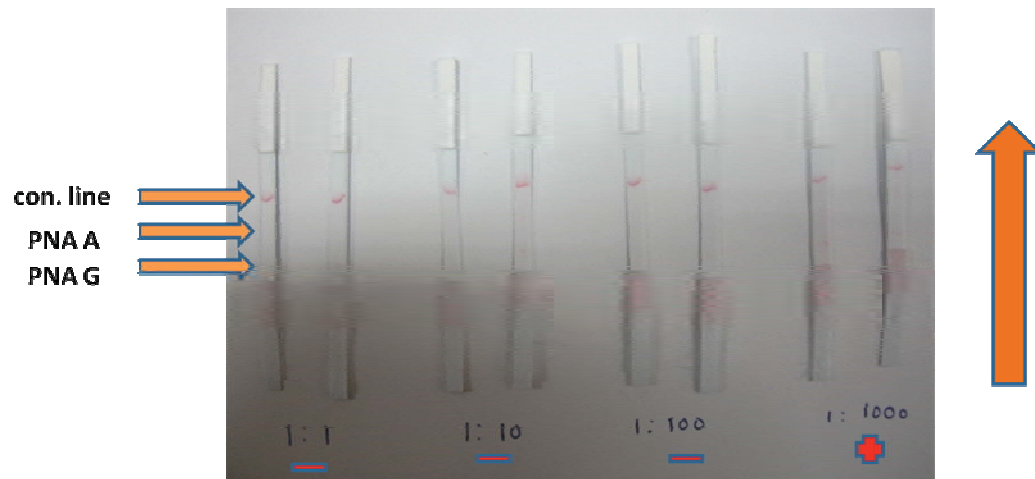
ผลของการทดลอง



รูปภาพแสดงการทำ Gel electrophoresis โดยใช้เทคนิค asymmetric PCR พบว่ามีการขึ้นของชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ 312 bp.

ผลที่ได้จากการทดลอง พบว่าเมื่อทำการเจือจางปริมาณของไพรเมอร์ PCR ให้แตกต่างกันเป็น 1:1 1:10 1:100 1:1000 หลังจากนั้นนำไป PCR พบการเลื่อนขึ้นของแถบแบนยิ่งเจือจางยิ่งเลื่อนขึ้นสูง น่าจะเกิดมาจากรูปร่างของผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนแปลงไปในรูป single strand มากขึ้นทำให้พบการเลื่อนขึ้นของแถบแบนใน gel electrophoresis และจะนำทั้งหมดไปทดลองต่อใน strip test ต่อไป

ผลของการทดลอง



Time : 1 Hrs

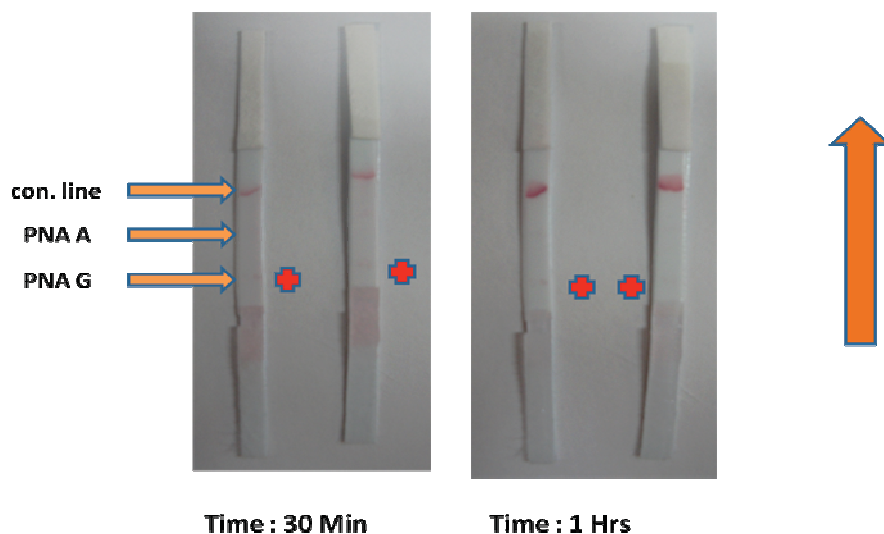
ผลที่ได้จากการทดลอง พบว่าชุดของ strip test ที่ทำการเจือจาง 1: 1000 ให้ผลของแถบแบบที่ต้องการ แต่ในทางกลับกันชุด strip test ที่ทำการเจือจางที่น้อยกว่ากลับไม่ให้ผลของแถบแบบที่ต้องการ สาเหตุน่าจะมาจาก ผลของ single strand ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำ Asymmetric PCR โดยการเจือจางที่ 1:1000 น่าจะเกิด single strand มากกว่าการเจือจางแบบอื่น จึงจะนำความเจือจาง 1 :1000 ไปใช้ในการ ทำ PCR กับ sample จริงต่อไป

การทดลองที่ 20

• Streptavidin-biotin	• PNA : test line • Probe DNA : control line
• Concentration probe	• 1 μ M
• Conjugate probe	• AuNPs+10% BSA
• Target	• Sample (Asymmetric PCR) 1 : 1000
• Buffer	• 2x ssc +7 % formamide + 0.05%SDS

ศึกษาผลของ strip test ที่ใช้ probe PNA ในการตรวจจับ sample ผู้ป่วย Hemoglobin E โดยการนำเทคนิค Asymmetric PCR มาช่วยในการศึกษา ใช้อัตราส่วนของการเจือจางไพรเมอร์ 1:1000

ผลของการทดลอง



ผลที่ได้จากการทดลองกับ sample จริง พบว่าที่ 30 นาทีหลังจากใส่ sample ลงไป พบการขึ้นของแถบแบนที่ test line แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 1 ชั่วโมง พบว่าแถบแบนที่ test line เริ่มจางลง ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด จะต้องรอทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

จากการทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำโดยใช้ tristetrasodium ci เป็นตัว stabilizer แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV spectrum ผลที่ได้นั้นพบว่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 520 nm ของอนุภาคทองคำโดยสังเกตได้จากกราฟที่ 5 แต่เรายังพบการจับกันของ AuNPs กับ probe PNA ทำให้เกิดแถบแบนที่ไม่จำเพาะเจาะจงขึ้น เราจึงนำโปรตีน BSA มาทำการล้อมรอบพื้นที่ผิวของ AuNPs โดยใช้เวลาในการล้อมประมาณ 1 ชั่วโมง เพราะถ้ามากกว่านี้ก็ไม่มีผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือถ้าน้อยไปโปรตีน BSA อาจจะไม่ล้อมไม่ดี และปริมาณที่ใช้คือ 10 % BSA หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนตัว AuNPs เป็นตัวใหม่ ผลที่ได้พบว่าแถบแบนที่ไม่จำเพาะเจาะจงลดลง แต่ยังไม่ดีนัก การลดการเกิดแถบแบนที่ไม่จำเพาะเจาะจงอีกอย่างที่เราทำคือ การนำสาร fermamide เข้ามาช่วยในการทดลอง ผลที่ได้ปริมาณ 7% fermamide เหมาะสมที่สุดที่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อลดแถบแบนที่ไม่จำเพาะเจาะจงที่เกิดขึ้น เราทำการทดสอบความไวของตัว strip test โดยใช้ synthetic DNA พบว่ามีค่าเท่ากับ 10 nM ที่ strip test สามารถทำได้

การทำความสะอาดตัวผลิตภัณฑ์จาก PCR หรือการทำ purify PCR products และพร้อมทั้งนำไปทำ Asymmetric PCR ที่ทำการเจือจางไพรเมอร์ให้มีความเข้มข้นลดลง ผลที่ได้การเจือจางที่ 1: 1000 ให้ผลในการทำการทดลองกับตัว sample จริง ดีที่สุดขึ้นตรงตามแถบแบนที่เราสนใจ แต่การนำไปทดลองกับ sample จริงนั้นพบว่าที่เวลา 30 นาที ตัว strip test ขึ้นแถบแบนที่ชัดเจนพอสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แต่พอที่เวลา 1 ชั่วโมงพบว่าแถบแบนมีการจางลงจนสังเกตผลได้แต่ลางๆ ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดนัก จะต้องรอการศึกษาต่อไปในอนาคต

การตรวจคัดกรองโรค Hemoglobin E ในปัจจุบัน ยังมีปัญหาอยู่มากมายในการวิเคราะห์ผลรวมถึงขาดผู้เชี่ยวชาญ งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจโดยการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในการทำชุดตรวจกรอง Hemoglobin E โดยใช้ตัว pyrrolidinyI PNA มาเป็นตัวตรวจจับความผิดปกติที่เกิดขึ้น จากการทดลองทั้งหมดผลที่ได้คือเราสามารถพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโรค Hemoglobin E ได้ สามารถตรวจจับกับ sample ได้ อีกทั้งยังมีความไว 10 nM รวมถึงยังมีการนำเทคนิค Asymmetric PCR มาใช้ควบคู่ในการทดลองอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามต้องรอการพัฒนาชุดตรวจให้มีความสมบูรณ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. วิชัย เหล่าสมบัติ . ธาลัสซีเมีย(Thalassemia) กรุงเทพฯ: โอเอส พรินติ้งเฮ้าส์; 2541
2. จินตนา ศิรินาวินชล. พรพิมล เรื่องวุฒิเลิศ, เสถียร สุขพนิชนันท์, วันชัย วนะชีวะนาวัน, วรวรรณ ตันไพจิตร. ความรู้พื้นฐานธาลัสซีเมีย เพื่อการป้องกันและควบคุมโรค. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน; 2547
3. สุทัศน์ พุเจริญ. ธาลัสซีเมีย การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR: โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหิดล.; 2541
4. วรวรรณ ตันไพจิตร. พาหะของธาลัสซีเมียโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย: โครงการพัฒนาระบบสุขภาพสำหรับธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล .2546
5. รัตนา สันธุกต์. คู่มือการตรวจคัดกรองเลือดธาลัสซีเมียเบื้องต้น ภาวะพร่องเอนไซม์ 6พีดี การให้ความรู้และให้คำปรึกษา สำหรับเจ้าหน้าที่อนามัย: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546
6. Roco MC. Nanotechnology: Convergence with Modern Biology and Medicine. Current Opinion in Biotechnology 2003; 14: 337-346
7. Pal T. Nucleophile-Induced Dissolution of Gold and Silver in Micelle. Cur. Sci. 2002; 83 (5): 627-628.
8. Zhong X, Yuan R, Chai Y, Lui Y, Dai J, Tang D. Glucose Biosensor Based on Self-Assembled Gold Nanoparticles and Double-Layer 2D-Network (3-Mercaptopropyl) -Trimethoxysilane Polymer onto Gold Substrate. Sensors and Actuators B 2005; 104: 191-198.
9. Ackerson CJ, Sykes MT, Kornberg RD. Defined DNA/Nanoparticle Conjugates. PNAS 2005; 102(38): 13383-13385.
10. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. J. Am. Chem. Soc. 1998; 120: 1959-1964.
11. Reynolds AJ, Haines AH, Russell DA. Gold Glyconanoparticles for Mimics and Measurement of Metal Ion-Mediated Carbohydrate-Carbohydrate Interactions. Langmuir 2006; 22: 1156-1163.

12. Salata OV. Applications of Nanoparticles in Biology and Medicine. Journal of Nanobiotechnology 2004 March; 2.
13. Liu J, Lu Y. A Colorimetric Lead Biosensor using DNAzyme—Directed Assembly of Gold Nanoparticles. J. Am. Chem. Soc. 2003; 125: 6642-6643.
14. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. Oxford: Blackwell Scientific Publication 1981:296
15. ธาลัสซีเมีย.สถานการณ์ปัจจุบันและกลวิธีในการป้องกันและควบคุมโรคเลือดในประเทศไทย(พศ. 2532-2533). กรุงเทพฯ: นวัตกรรมการพิมพ์ 2533:1-43
16. ลักษณะการก่อเกิดและคณะ. การสร้างไฮบริดมาหฺนุที่สามารถหลังโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายเบต้าอีโกลบินเพื่อใช้คัดกรองฮีโมโกลบินอี. เชียงใหม่เวชสาร 2549;45(1):1-10.)
17. บุญบา เตชาชัยวันร์. การตรวจกรองฮีโมโกลบินอีด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KCU-DCIP-Clear โดยใช้ Heating block, คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547
18. Catherine JM, Anand MG, John WS, Patrick NS, Alaaldin MA, Edie CG et al. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. Acc. Chem. Res 2008; 41 (12):1721-1730
19. Li, Q., et al., Gold Nanoparticle-Based Immunochromatographic Assay for The Detection of 7-Aminoclonazepam in Urine. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2009. 89(4): p. 261-268.
20. Kalogianni, D.P., et al., Dry-reagent Disposable Dipstick Test for Visual Screening of Seven Leukemia-Related Chromosomal Translocations. Nucleic Acids Research, 2007. 35(4): p. 1-12.
21. Litos, I.K., et al., Multianalyte, Dipstick-type, Nanoparticle-Based DNA Biosensor for Visual Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms. Biosensors and Bioelectronics, 2009. 24(10): p. 3135-3139.