

การผลิตชุดตรวจคัดกรองโรคพร้าเตอร์-วิลลีโดยอนุภาคทองคำนาโนเมตร

นายวีรวัฒน์ ก่อเกียรติสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ESTABLISHMENT OF GOLD NANOPARTICLE-BASED LATERAL FLOW STRIP TEST  
FOR PRADER-WILLI SYNDROME.

Mr. Veerawat Korkiatsakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตชุดตรวจคัดกรองโรคพร่าเตอร์-วิลลีโดย
	อนุภาคทองคำนาโนเมตร
โดย	นายวีรวัฒน์ ก่อเกียรติสกุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ นายแพทย์ ดร.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ นายแพทย์ ดร.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.กัญญา ศุภปิติพร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

วีรวัฒน์ ก่อเกียรติสกุล : การผลิตชุดตรวจคัดกรองโรคพราดอร์-วิลลีโดยอนุภาคทองคำนาโนเมตร. (Establishment of Gold Nanoparticle-based Lateral Flow Strip Test for Prader-Willi Syndrome) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ. นพ. ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, 57 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ มุ่งศึกษาและสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลี โดยอาศัยคุณสมบัติเชิงแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรและความสามารถในการแยกสารของโครมาโทกราฟี ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าได้โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะ

ในการศึกษานี้ จะทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร แล้วตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrometry และ Transmission Electron Microscope (TEM) จากนั้น ติด Thiol-DNA probe ลงบน AuNPs และเตรียม Streptavidin-biotin DNA probe ประกอบชุด Lateral flow strip test แล้วทำการทดสอบชุดตรวจ โดยใช้ DNA target จาก synthetic DNA ของยีน SNRPN และ DNA ของ ผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลี

ผลการศึกษา พบว่า ในสภาวะที่เหมาะสม lateral flow strip test สามารถวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Methylation และ Unmethylation ที่ 0.6 fmol และ 8 fmol ตามลำดับ สามารถตรวจพบ Methylation และ Unmethylation target ได้อย่างจำเพาะ และสามารถตรวจวิเคราะห์ DNA ของคนไข้ โรคพราดอร์-วิลลี ได้

ชุดตรวจวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง methylation และ unmethylation ของ Synthetic DNA target และ MSP product การศึกษานี้ ทำให้ได้ต้นแบบสำหรับตรวจ Epigenetic change และนำไปสู่การประยุกต์ใช้

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....

ปีการศึกษา.....2554.....

ลายมือชื่อผู้ผลิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

# # 5174833130 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : Prader-Willi syndrome / Lateral Flow / Gold Nanoparticles / DNA methylation

Veerawat Korkiatsakul : Establishment of Gold Nanoparticle-based Lateral Flow Strip Test for Prader-Willi Syndrome. Advisor : Amornpun Sereemasapun, M.D., Ph.D., 57 pp.

This study aims to generate and optimize DNA lateral flow strip test for Prader-Willi syndrome (PWS) screening. The test strip interpretation is based on the unique optical properties of gold nanoparticles (AuNP) and the efficiency of chromatographic separation. This system enables visual detection of results without specialized equipment.

AuNPs were synthesized by citrate reduction method. The AuNPs was characterized with UV-vis spectroscopy and transmission electron microscope. A thiolated oligonucleotide was used for conjugation on AuNPs. The lateral flow strip test was prepared, assembled and optimized.

The results showed that detection limit of 0.6 fmol synthetic target DNA methylation and 8 fmol synthetic target DNA unmethylation were obtained under optimal experimental conditions. Lateral flow strip test could detect Methylation/Unmethylation synthetic target and DNA methylation from PWS

DNA lateral flow strip test for PWS diagnosis could be used to discriminate between unmethylation and methylation from DNA target and MSP product. This study provides a new model for detection of epigenetic change and could be applied in further translation research.

Field of Study : Medical Science..... Student's Signature.....

Academic Year : 2011..... Advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของอาจารย์ นพ.ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้แนวทาง คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ถ่ายทอดประสบการณ์ในการทำวิจัยและการทำงาน ตลอดจนการดูแลเอาใจใส่ ปรับปรุงแก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ.พญ.ดร.กัญญา ศุภปีติพร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ผู้เป็นทั้งอาจารย์และหัวหน้างานของผู้วิจัย ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาต่อและให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวอรุณา กำเนิดสินธุ์ นางสาวนารีธร อุดมทองสุข นายมงคล พงษ์สุชาติ นางสาวชุลีปราง แดนลาดแก้ว และ นายธีระเดช ขมหวาน ที่คอยให้กำลังใจ ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณนางสาวกนกพร กันทา ที่อยู่เคียงข้าง เป็นกำลังใจในการเรียนและการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ตั้งแต่เริ่มต้นจนวันสุดท้ายที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว “ก่อเกียรติสกุล” โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณพ่อ ประเสริฐ คุณแม่พรพิมล บุพการีที่เลี้ยงดู ให้โอกาส ให้คำแนะนำ สนับสนุน และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	7
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	7
คำสำคัญ.....	7
รูปแบบการวิจัย.....	8
ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
Genomic Imprinting in Chromosome 15q11-q13.....	9
Paternal Deletion.....	10
Maternal Uniparental disomy.....	11
Imprinting Defect.....	11
นาโนเทคโนโลยี.....	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ug/mL.....	16
Characterization ของ AuNPs.....	16
การติด DNA probe ลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	16
การเตรียม DNA probe สำหรับตรึงอยู่บน Lateral flow strip.....	18
การเตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip.....	18

การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จาก synthetic DNA....	19
การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จากตัวอย่าง DNA.....	20
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	21
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	22
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ug/mL.....	22
การติด DNA probe ลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	23
ผลการทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จาก synthetic DNA	24
การหาชนิดของ Nitrocellulose membrane ที่เหมาะสมในการทำชุด Lateral flow strip test.....	24
การหาความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่เหมาะสมในการทำชุด Lateral flow strip test.....	25
การหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation.....	26
การหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation.....	26
การหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation.....	27
การหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation.....	28
การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation.....	28
การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation.....	29
การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation.....	30
การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation.....	31
การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ได้.....	32
การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation สามารถวิเคราะห์ได้.....	33



การหาความจำเพาะของชุด Duplex lateral flow strip test.....	34
การทำ DNA methylation ของโรคพร่าเตอร์-วิลลี ด้วยวิธี Methylation-Specific PCR.....	35
การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จาก Bisulfite treatment DNA.....	36
การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จากตัวอย่าง DNA จาก PCR product.....	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	39
อภิปรายผลการวิจัย.....	39
สรุปผลการวิจัย.....	43
ข้อเสนอแนะ.....	43
รายการอ้างอิง.....	44
ภาคผนวก.....	48
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	57

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความถี่และอัตราความเสี่ยงของการเกิดซ้ำของโรคพราเดอร์-วิลลีจาก กลไกต่างๆ.....	2
2	แสดงการทดสอบเพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี.....	3
3	แสดงถึงวัสดุนาโน (Nanomaterial) ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์.....	12
4	แสดงลำดับ sequence ของ probe ที่จำเพาะต่อลำดับ sequence ของ unmethylation (U) และ methylation (M) ที่ exon 1 ของยีน SNRPN.....	17
5	แสดง primer ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีด้วยวิธี Methylation specific PCR.....	55
6	แสดง Condition ของการทำ Methylation specific PCR.....	56

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl <sub>4</sub> .....	4
2	แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และภาพสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	5
3	แสดงการนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและทางการแพทย์.....	6
4	แสดงกลไกการเกิด genomic imprinting, การเติมหมู่ methyl ที่ cytosine และการเติมหมู่ methyl ที่ CG dinucleotide ในสาย DNA.....	9
5	แสดงบริเวณรอยขาดโครโมโซมที่ตำแหน่ง 15q11-q13.....	10
6	แสดงหลักการของ colorimetric DNA detection ของ AuNPs probe.....	13
7	แสดง colorimetric DNA detection โดยใช้ unmodified AuNPs.....	14
8	แสดงส่วนประกอบและการแปลผลของ Lateral flow strip test.....	15
9	แสดงส่วนประกอบของ Lateral flow strip test.....	18
10	แสดงการตรวจสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ug/mL....	22
11	แสดงการต่อ DNA probe กับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	23
12	แสดงการหาความเหมาะสมของ Nitrocellulose membrane.....	24
13	แสดงการหาความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่เหมาะสม ในการตรึงบน Test line และ Control line ของชุด Lateral flow strip test.....	25
14	แสดงการหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation.....	26
15	แสดงการหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation.....	27
16	แสดงการหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic target ชนิดต่างๆ.....	27
17	แสดงการหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic target ชนิดต่างๆ.....	28
18	แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation.....	29

ภาพที่		หน้า
19	แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation...	30
20	แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation.....	31
21	แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation...	32
22	แสดงการหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ได้.....	33
23	แสดงการหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation.....	34
24	แสดงการหาความจำเพาะของชุด Duplex lateral flow strip test.....	35
25	แสดงการทำ DNA methylation ของโรคพราเดอร์-วิลลี ด้วยวิธี Methylation-Specific PCR.....	36
26	การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จาก Bisulfite treatment DNA..	37
27	การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จากตัวอย่าง DNA จาก PCR product.....	38

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ**

AuNPs	=	Gold nanoparticles
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
MSP	=	Methylaton-specific PCR
PWS	=	Prader-Willi syndrome
SPR	=	Surface plasmon resonance
TEM	=	Transmission electron microscope

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

โรคพราดาเดอร์-วิลลี (Prader-Willi syndrome, PWS) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยโรคหนึ่ง ซึ่งอุบัติการณ์ของโรค พบ 1 ใน 10,000-15,000 ของประชากร โดยโรคนี้ประกอบด้วยกลุ่มอาการที่มีลักษณะสำคัญ ได้แก่ ช่วงที่อยู่ในครรภ์ อาจมีประวัติว่าดื่มนมน้อย น้ำหนักเมื่อแรกคลอดมักปกติ เป็นเด็กที่ไม่ค่อยร้อง ดูคนมลำบาก (feeding difficulties) นอนนิ่งๆ การเจริญเติบโตต่ำกว่าเกณฑ์ปกติ (failure to thrive) กล้ามเนื้ออ่อนปวกเปียก (hypotonia) มีพัฒนาการช้าและระดับสติปัญญาอ่อนเล็กน้อยถึงปานกลาง มีความผิดปกติในการสร้างฮอร์โมนเพศ เนื่องจากรังไข่และอัณฑะไม่สามารถสร้างฮอร์โมนเพศได้ตามปกติ ทำให้ลักษณะทางเพศไม่สมบูรณ์ ช่วงอายุ 1-6 ปีขึ้นไป จะเริ่มกินเก่งและอ้วน [1-3]

สาเหตุของโรคพราดาเดอร์-วิลลี เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม 15 โดยสามารถแบ่งออกได้ 4 กลไก [4] คือ

กลไกแบบที่ 1 มีการขาดหายของชิ้นส่วนแขนข้างยาวของโครโมโซม 15 ตำแหน่ง 15q11-13 ที่ได้รับมาจากพ่อ เรียกว่า Paternal deletion ซึ่งเกิดขึ้นโดยบังเอิญเฉพาะในอสุจิตัวนี้เท่านั้น แต่ในร่างกายของพ่อและอสุจิตัวอื่นๆไม่มีความผิดปกติ ความผิดปกตินี้ พบได้กว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วย โอกาสที่พ่อแม่คู่นี้จะมีลูกเป็นโรคพราดาเดอร์-วิลลีอีก จะต่ำกว่าร้อยละ 1 ดังตารางที่ 1

กลไกแบบที่ 2 ได้รับโครโมโซม 15 ทั้งสองแท่งมาจากฝ่ายแม่ โดยไม่มีโครโมโซม 15 มาจากฝ่ายพ่อเลย เรียกว่า Maternal uniparental disomy เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ พบได้ร้อยละ 25 ของผู้ป่วย โดยมีโอกาสที่พ่อแม่คู่นี้จะมีลูกเป็นโรคพราดาเดอร์-วิลลีอีก ต่ำกว่าร้อยละ 1

กลไกแบบที่ 3 พบความผิดปกติของยีนบางยีนบน Imprinting center เรียกว่า Imprinting defect พบได้น้อยไม่ถึงร้อยละ 1 ของผู้ป่วย โดยมีโอกาสจะมีลูกเป็นโรคพราดาเดอร์-วิลลีอีกจะสูงถึงร้อยละ 50

กลไกแบบที่ 4 มีการย้ายหรือสลับที่ของโครโมโซม 15 ที่ตำแหน่ง q11-q13 กับโครโมโซมแท่งอื่น พบได้น้อยมากไม่ถึงร้อยละ 1 ของผู้ป่วย และโอกาสที่จะมีลูกเป็นโรคพราเดอร์-วิลลีอีก น้อยกว่าร้อยละ 1

	<b>Deletion 15q11-q13 (<i>de novo</i>)</b>	<b>Maternal uniparental disomy 15</b>	<b>Imprinting defect</b>	<b>Balanced translocations</b>
<b>Frequency</b>	70%	25%	~1%	<0.1%
<b>Recurrence risk</b>	<1%	<1%	0-50%	Unknown

ตารางที่ 1 แสดงความถี่และอัตราความเสี่ยงของการเกิดซ้ำของโรคพราเดอร์-วิลลีจากกลไกต่างๆ [5]

การตรวจเลือดเพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี สามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีความไวในการตรวจต่างกัน ดังตารางที่ 2 การตรวจ DNA methylation เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี เนื่องจากมีความไวสูงถึงร้อยละ 99 ซึ่งความผิดปกติแบบ deletion, uniparental disomy หรือ imprinting defects ก็สามารดยืนยันได้โดยวิธีนี้ และถ้าผลการยืนยันพบว่าเป็นโรคจริง จึงควรส่งตรวจโครโมโซมและ *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) เพื่อตรวจว่ามีการ deletion ที่โครโมโซม 15 หรือไม่ ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการให้คำแนะนำและคำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ต่อไป [4]

การทดสอบ	สามารถตรวจพบ	ไม่สามารถตรวจพบ	ความไว
High resolution chromosomal analysis	deletion ขนาดใหญ่ และความผิดปกติอื่นๆ ของโครโมโซม	deletion ขนาดเล็กๆ, uniparental disomy และ imprinting defects	70%
<i>Fluorescence in situ hybridization (FISH)</i>	Deletion	UPD, imprinting defects (deletion อาจมีสาเหตุมาจากโรคพราเดอร์-วิลลีหรือโรคแองเจิลแมน)	70%
DNA methylation test	Imprinting ที่ตำแหน่ง 15q11-q13	ไม่สามารถจำแนกว่าเป็น deletion, uniparental disomy หรือ imprinting defects	99%
DNA polymorphism studies	ถ่ายทอดโครโมโซมมาจากพ่อหรือแม่	deletion และ imprinting defects	25%

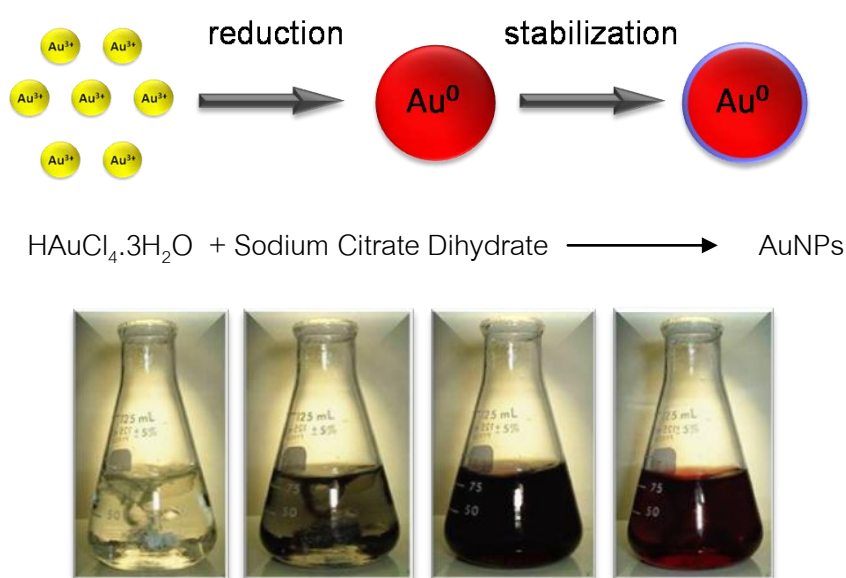
ตารางที่ 2 แสดงการทดสอบเพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี (ดัดแปลงจาก [6-7])

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้างการวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมหรือโมเลกุล [8] รวมถึงการออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้างหรือวิเคราะห์วัสดุในระดับที่เล็กมากๆ เช่น วัสดุนาโน (ท่อนาโน เส้นใยนาโน และอนุภาคนาโน) ซึ่งมีโครงสร้างของวัสดุที่มีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพ ต่างไปจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้น ในปัจจุบัน จึงมีการนำ



นาโนเทคโนโลยี มาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพและทางการแพทย์ เป็นต้น

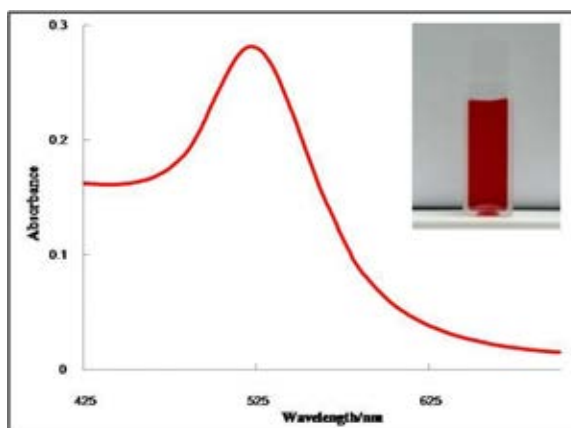
อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโนที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง [8] ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์สีแดง ในการสังเคราะห์ AuNPs นั้นสามารถทำได้โดยการนำสารละลายของ  $\text{HAuCl}_4$  ที่มีทองคำประจุ  $3^+$  ( $\text{Au}^{3+}$ ) ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ได้ AuNPs ที่มีทองคำประจุเป็น 0 ( $\text{Au}^0$ ) ซึ่งยังไม่มีความเสถียร จึงต้องเติมสารช่วยทำให้เสถียร (Stabilizer) โดยสารนี้จะมาล้อมรอบบนอนุภาค ป้องกันการรวมตัวหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน ทำให้ AuNPs นั้นสามารถคงขนาดและรูปร่างอยู่ในระดับนาโนได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์และช่วยทำให้อนุภาคทองคำเกิดความเสถียร ได้แก่ sodium citrate [9] ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์และทำให้ AuNPs มีความเสถียรในคราวเดียวกัน ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม [10]

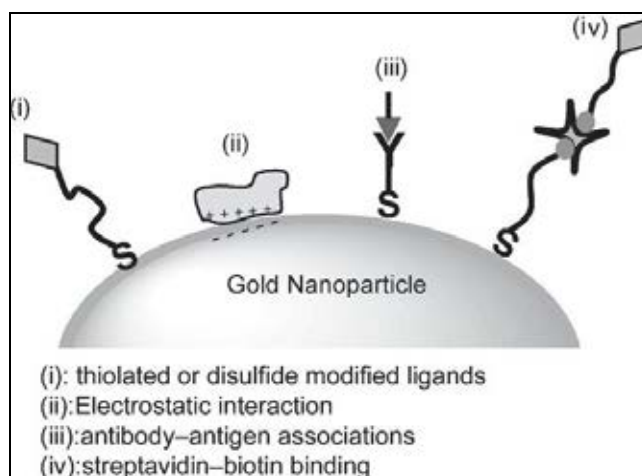
AuNPs มีคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว ซึ่งต่างจากทองคำแบบก้อนทั่วไป เมื่อขนาดอนุภาคทองคำเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมากๆ จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance, SPR) ซึ่ง

เป็นคลื่นความหนาแน่นของประจุ ที่เกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระ ที่มีลักษณะการสั่นพร้อมเพรียงกัน เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยผิวต่อของ AuNPs กับสารไดเล็กทริก ทำให้ AuNPs สามารถดูดกลืนแสงสีเขียว ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งจะส่งผลให้ AuNPs มีสีแดงทับทิม (ruby red) [11] ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และภาพสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (ภาพเล็ก)

บนพื้นผิวของ AuNPs สามารถปรับปรุงให้มีโมเลกุลต่างๆที่ต้องการมาเคลือบอยู่บนผิวของอนุภาค และนำ AuNPs ที่ปรับปรุงพื้นผิวแล้ว มาใช้เป็นตัวติดตามหรือตัวตรวจจับสารชีวโมเลกุลเป้าหมายได้ เช่น DNA [12], โปรตีน [13], คาร์โบไฮเดรต [14], ยา [15] หรือสี fluorescent [12] ดังภาพที่ 3 ด้วยเหตุนี้ จึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างอุปกรณ์ตรวจจับสารทางชีวภาพ (Biosensor) [16] ที่มีความจำเพาะหลากหลาย โดยการปรับปรุงพื้นผิวของ AuNPs ด้วยสารที่มีความสามารถในการเลือกจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ โดยคอลลอยด์ของ AuNPs จะเปลี่ยนสีเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก จึงเปรียบได้ว่า AuNPs ทำหน้าที่เป็นตัวรายงานผล (reporter) สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ



ภาพที่ 3 แสดงการนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและการแพทย์ โดยการนำสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปติดบนพื้นผิวของ AuNPs [17]

ถึงแม้ว่า การยืนยันการวินิจฉัยโรคพร่าเดอร์-วิลลีด้วยการตรวจ DNA methylation เป็นวิธีการตรวจมาตรฐานที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยังคงต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ซึ่งต้องใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิพิเศษและน้ำยาที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของ DNA อื่น อาจส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จได้ อีกทั้งจำเป็นต้องพึ่งห้องปฏิบัติการและบุคลากรเฉพาะทาง

จากปัญหาในการวินิจฉัยโรคพร่าเดอร์-วิลลี ที่มีอยู่ในปัจจุบัน การศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคพร่าเดอร์-วิลลีโดยการประยุกต์ใช้ gold nanoparticles probe มาเป็นเครื่องมือตรวจวินิจฉัยโดยอาศัยหลักการของ immunochromatographic test ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องอาศัยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งเป็นการลดต้นทุนของน้ำยา อีกทั้งเป็นการย่นระยะเวลาและลดขั้นตอนในการเตรียมการตรวจวิเคราะห์ โดยเป็นชุดตรวจที่ใช้ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ ไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์ในการแปลผล ซึ่งเป็นการตอบสนองของหลักการ Point of care detection ในการตรวจวินิจฉัยโรคพร่าเดอร์-วิลลี

### คำถามของการวิจัย (Research Question)

1. Gold nanoparticles สามารถนำมาใช้เป็น reporter ในชุดตรวจวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีหรือไม่
2. Gold nanoparticle สามารถใช้ตรวจหาความผิดปกติแบบ DNA methylation ในโรคพราดอร์-วิลลีได้หรือไม่
3. ชุดตรวจ Lateral flow strip test มีความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยโรค พราดอร์-วิลลีได้เทียบเท่ากับวิธี Methylation specific PCR หรือไม่

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

1. เพื่อทำการศึกษาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลี ในรูปของ Lateral flow strip test โดยมี gold nanoparticles เป็นตัวรายงาน
2. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถชุดตรวจวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีในรูปของ Lateral flow strip test กับเทคนิค Methylation specific PCR

### คำสำคัญ (Key Word)

Prader-Willi syndrome

Lateral Flow

Gold Nanoparticles

DNA methylation

## รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการวิจัยชุดตรวจวินิจฉัย (Diagnostic test)

## ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected Benefits and Application)

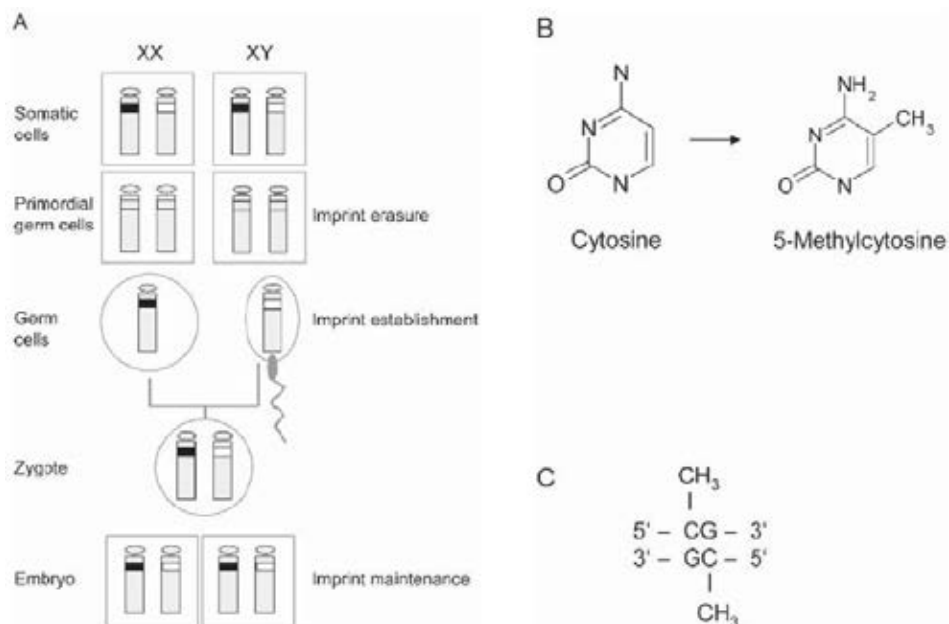
1. ได้รับความรู้จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับโรคพร้าเดอ์-วิลลี วิธีการตรวจหลักการ lateral flow assay และ gold nano technology
2. สามารถพัฒนาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคพร้าเดอ์-วิลลี ในรูปของ Lateral flow strip test โดยใช้ AuNPs probe
3. สามารถนำชุดตรวจวินิจฉัยมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกและมีราคาถูกลง
4. เสนอผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
5. นำความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยกับโรคอื่นๆ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### Genomic Imprinting in Chromosome 15q11-q13

โครโมโซม 15 ที่ตำแหน่ง 15q11-q13 ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่ถูกกำหนดให้แสดงออกได้เฉพาะบนโครโมโซมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อหรือแม่เท่านั้น ซึ่งเป็นผลมาจาก genomic imprinting ของกระบวนการ epigenetic ในขั้นตอนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อและแม่ โดยจะมีเครื่องหมายกำหนดไปบนบางยีนที่จะมีการแสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งยีนจะถูกกำหนดตั้งแต่เริ่มต้นว่า ต้องมีต้นกำเนิดมาจากพ่อหรือแม่เท่านั้นจึงจะแสดงออกได้ โดย specific DNA methylation เป็นกลไกสำคัญในการกำหนดการแสดงออกยีนของเหล่านี้ DNA methylation เป็นการเติมหมู่เมทิล (-CH<sub>3</sub>) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine เกิดเป็น methylcytosine ดังภาพที่ 4 พบในบริเวณที่มีลักษณะเป็น CpG dinucleotide การเติมหมู่เมทิลให้กับ cytosine นั้นจะต้องอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferases 3A และ 3B (DNMT3A และ DNMT3B) เมื่อเกิดการจำลองตัวเองของ DNA แล้ว DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ จะถูกเติมหมู่เมทิลโดยเอนไซม์ maintenance DNA methyltransferases 1 (DNMT 1) [5]



ภาพที่ 4 แสดงกลไกการเกิด genomic imprinting (A), การเติมหมู่ methyl ที่ cytosine (B) และการเติมหมู่ methyl ที่ CG dinucleotide ในสาย DNA (C) [5]



## Maternal Uniparental Disomy, UPD

เกิดจากการได้รับโครโมโซม 15 ทั้ง 2 แห่งจากฝ่ายแม่โดยไม่มีโครโมโซมมาจากฝ่ายพ่อเลย เรียกว่า Maternal Uniparental Disomy, UPD พบได้ร้อยละ 25 ของผู้ป่วยทั้งหมด สาเหตุของ UPD นั้น มาจากความผิดพลาดของการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์ไข่ โดยเกิด nondisjunction ของ homologous chromosome 15 ในระยะ Meiosis I หรือ เกิด nondisjunction ของ sister chromatid ของโครโมโซม 15 ในระยะ Meiosis II ส่งผลให้ไข่ใบหนึ่งมีโครโมโซม 15 ทั้ง 2 แห่ง และไข่อีกใบ ไม่มีโครโมโซม 15 เลย เมื่อไข่ที่มีโครโมโซม 15 ทั้ง 2 แห่ง ได้รับการปฏิสนธิกับ sperm ที่มีโครโมโซม 15 อยู่แห่งเดียวแล้ว เกิดเป็น zygote ที่มีโครโมโซม 15 ถึง 3 แห่ง ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาอย่างปกติของ zygote จึงมีกลไกในการขับโครโมโซม 15 ออกไป 1 แห่ง ซึ่งมีโอกาสที่จะขับเอาโครโมโซม 15 ที่ได้รับจากแม่ออกไป 1 แห่ง ทำให้ zygote นั้น มีโครโมโซมที่ปกติ แต่ถ้าขับเอาโครโมโซม 15 ที่ได้รับมาจากพ่อออกไป จึงมีโครโมโซม 15 ที่ได้รับมาจากแม่ 2 แห่ง [5]

## Imprinting Defect

ในผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลี บางราย พบว่ามีโครโมโซม 15 ที่ได้รับการถ่ายทอดจากพ่อและแม่อย่างเป็นปกติ แต่โครโมโซม 15 ที่ได้รับถ่ายทอดจากพ่อนั้น ถูกกดการแสดงออกเหมือนกับโครโมโซม 15 ที่ได้รับจากแม่ ส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของยีนในบริเวณ 15q11-q13 เหมือนกับในกรณีความผิดปกติแบบ UPD ซึ่ง imprinting defect นี้พบได้ไม่ถึงร้อยละ 1 ของผู้ป่วยทั้งหมด ประมาณ 15% ของผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลีที่มีสาเหตุมาจาก imprinting Defect นั้น เป็นผลมาจากการเกิด microdeletion ที่ส่งผลต่อ imprinting center (IC) โดยที่ imprinting center ซ้อนกับยีน *SNURF-SNRPN* และควบคุมใน cis DNA methylation การแสดงออกของยีนและโครงสร้างโครมาตินของ whole imprinted domain ผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลีด้วยสาเหตุของ imprinting defect ส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 85) ไม่มีการ deletion ที่ imprinting center หรือ point mutation ที่ PWS-SRO ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ genomic imprinting โดยได้รับการถ่ายทอดความผิดปกติมาจากพ่อของย่า [5]



นาโนเทคโนโลยี เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้างการวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมหรือโมเลกุล [7] เมื่อนำความรู้ของนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ จึงเกิดวิทยาการใหม่ขึ้นมา เรียกว่า นาโนเวชศาสตร์ (Nanomedicine) เป็นนำเอาวัสดุนาโนมาใช้ทางการแพทย์ เช่น ช่วยในการนำส่งยา บำบัดวินิจฉัย พยากรณ์โรค เป็นต้น [18] ในปัจจุบันพบว่ามีงานวิจัยหลายชิ้นที่นำเอาวัสดุนาโนมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ดังตารางที่ 3

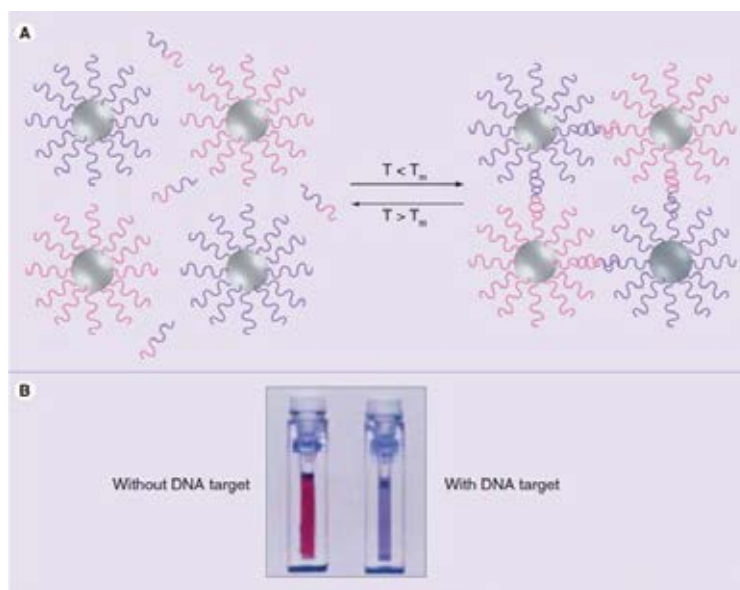
Nanoparticle	Example	Medical application	References
Metal nanoparticles	Quantum dots Gold nanoparticles Gold nanorods Gold nanoshells Gold nanocages	Diagnostics Biosensor Molecular imaging Drug delivery	Chen et al 2005; Loo et al 2005; Yeh et al 2005; Huang et al 2006; Baron et al 2007; Maysinger 2007; Oyelere et al 2007; Skrabalak et al 2007; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Nanotubes and nanowires	Carbon-nanotubes	Biomolecular sensing Delivery of vaccines or proteins	Baron et al 2007; Maysinger 2007; Cho et al 2008
Dendrimers	Poly(amido) amine PAMAMs	Drug carriers Imaging agents Gene delivery	Rawat et al 2006; Maysinger 2007; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Liposomes	(PEG)ylated immunoliposomes	Drug delivery Gene encoding	Rawat et al 2006; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Polymeric micelles	[PEG-PAsp (DOX)] Doxorubicin conjugated to poly(ethylene glycol)-poly( $\alpha$ , $\beta$ -aspartic acid)	Drug delivery of water-insoluble drugs	Sahoo and Labhasetwar 2003; Cho et al 2008
Ceramic nanoparticles	Silica-based nanoparticle entrapping photosensitizing anticancer drug, 2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl) pyropheophorbide	Drug delivery	Sahoo and Labhasetwar 2003
Polymeric nanoparticles	PLGA (Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid)) PLA-PGA (Poly-L-glutamic acid)	Drug delivery Protein delivery Gene expression vector	Rawat et al 2006; Sahoo et al 2007; Villalonga et al 2007; Cho et al 2008
Polysaccharide nanoparticles	Cellulose nanocrystals	Targeted delivery Bioimaging	Dong and Roman 2007; Villalonga et al 2007
Magnetic nanoparticles	Superparamagnetic iron oxide	Magnetic Resonance Imaging contrast agents	Baron et al 2007; Lu et al 2007
Bionanoparticles (BNPs) – Protein-based nanosystems	Ferritin Viruses and virus-like particles Heat shock protein cages	Gene delivery Bioimaging Drug delivery Vaccine development	Lee and Wang 2006

ตารางที่ 3 แสดงถึงวัสดุนาโน (Nanomaterial) ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ [18]

ปัจจุบันมีวัสดุนาโนหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ แต่มีวัสดุนาโนชนิดหนึ่งที่นิยมมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ อนุภาคทองคำระดับนาโน (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี

สามารถเร่งปฏิกิริยาและไม่มีพิษต่อร่างกาย จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงนำเอา AuNPs มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น การนำมาใช้เป็นตัวเซ็นเซอร์ โดยติดฉลากบนอนุภาคด้วย antibody หรือ DNA/RNA เพื่อใช้เป็นตัวตรวจหาสารชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ การตรวจหา antigen [19] หรือ DNA/RNA [20] ใช้เป็นตัวพายาหรือยีนเข้าเซลล์ เพื่อใช้ในการรักษาโรค [21] photothermal therapy [21]

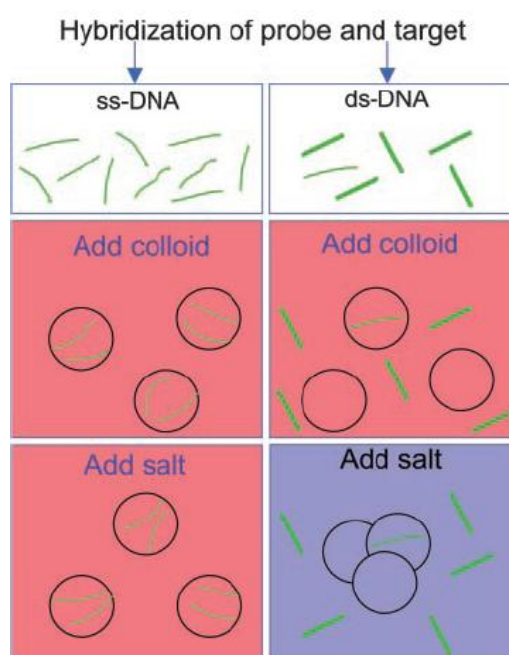
ในปี 1996 Mirkin และคณะ เป็นกลุ่มวิจัยแรกที่พัฒนา colorimetric gold nanoparticle assays เพื่อตรวจหา DNA เป้าหมาย [13, 22-23] โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ AuNPs เมื่อเกิดการรวมกลุ่มกัน โดยติดฉลากอนุภาคด้วย oligonucleotide ซึ่งสามารถเข้าจับกับ DNA เป้าหมายได้อย่างจำเพาะ การจับกันของ gold nanoparticles probe กับ DNA เป้าหมายเหนี่ยวนำให้ AuNPs อยู่ใกล้กันมากจนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีจากแดงเป็นม่วง [24] ดังภาพที่ 6 จากหลักการนี้จึงมีคณะผู้วิจัยอื่น นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหา DNA/RNA และโปรตีน ของเชื้อหรือโรคต่างๆ



ภาพที่ 6 แสดงหลักการของ colorimetric DNA detection ของ AuNPs probe ในการตรวจจับ DNA เป้าหมาย(A) และสีของ AuNPs เมื่อไม่มีหรือมี DNA เป้าหมาย (B) [24]

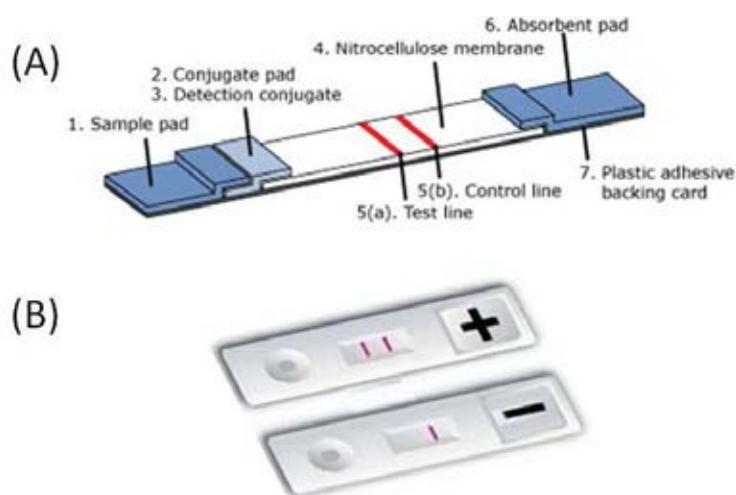
ต่อมา ในปี 2004 Rothberg และคณะ ค้นพบว่า ssDNA และ dsDNA มีสมบัติในการดูดซับบนผิว AuNPs แตกต่างกัน [25-27] ซึ่ง ssDNA สายสั้นๆ มีความสามารถในการดูด

ชั้นบนผิว AuNPs ส่งผลให้เพิ่มความเสถียรและสามารถป้องกันการรวมตัวของอนุภาคได้ จึงพัฒนาชุด colorimetric DNA detection โดยใช้ unmodified gold nanoparticles ซึ่งใช้ probe (ssDNA) จะจับกับ DNA เป้าหมายที่มีเบสคู่สมกัน เมื่อเติม AuNPs และสารละลายเกลือ จะทำ AuNPs เปลี่ยนสีจากแดงเป็นม่วง แต่ถ้า probe ไม่จับกับ DNA เป้าหมาย probe จะมาดูดซับบนผิว AuNPs แทน เมื่อเติมสารละลายเกลือ AuNPs ยังคงมีสีแดงอยู่ ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดง colorimetric DNA detection โดยใช้ unmodified AuNPs [26]

นอกจากนี้ AuNPs ยังถูกนำมาใช้เป็นตัวรายงาน (reporter) ใน Lateral flow strip test [28] ซึ่งเป็นชุดตรวจคัดกรองโรคที่ใช้ทั่วไป โดยอาศัยหลักการ immunochromatography สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากแถบสีชมพูของ AuNPs ที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งควบคุม (control line) และตำแหน่งทดสอบ (test line) โดยถ้าแถบสีชมพูเกิดขึ้นที่ตำแหน่งทดสอบและตำแหน่งควบคุมเท่ากับผลเป็นบวก แต่หากมีแถบสีชมพูเกิดขึ้นที่ตำแหน่งควบคุมเพียงตำแหน่งเดียว เท่ากับผลเป็นลบ ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงส่วนประกอบ (A) และการแปลผล (B) ของ Lateral flow strip test [29-30]

Kalogianni และคณะ [31] ได้คิดค้นชุดตรวจวินิจฉัยอย่างง่ายชนิดจุ่ม ซึ่งใช้ในการคัดกรองการเกิดการ translocation ของโครโมโซม ที่เกี่ยวข้องกับ acute และ chronic leukemia โดยการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ที่ติดฉลากด้วย biotin มา hybridize กับ dA tailed probe และหยดบนชุดตรวจซึ่งมี oligo-dT probe ต่ออยู่กับ gold nanoparticles เมื่อจุ่มชุดตรวจลงใน buffer จะทำให้สารละลายเคลื่อนที่พร้อมนำเอา DNA ที่ติดฉลากด้วย biotin ที่ hybridize กับ gold nanoprobe แล้ว มาจับกับ streptavidin ที่ test line ซึ่งชุดตรวจนี้สามารถตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมแบบ  $t(9;22)(q34;q11)$ ,  $t(15;17)(q22;q21)$ ,  $t(11;17)(q23;q21)$ ,  $t(5;17)(q32;q21)$ ,  $t(11;17)(q13;q21)$ ,  $t(8,21)(q22;q22)$  และ  $inv(16)(p13;q22)$  ได้

Mao และคณะ [32] ได้คิดค้นชุดตรวจวินิจฉัยอย่างง่ายโดยใช้ gold nanoparticle probe และหลักการของ Lateral flow strip ซึ่งสามารถใช้ตรวจจับ genomic DNA โดยตรง ซึ่งไม่ต้องเพิ่มปริมาณ DNA ก่อน โดยนำมา genomic DNA มา hybridize ลงบนชุดตรวจวินิจฉัย ด้วยวิธี sandwich hybridization ลงบนบริเวณทดสอบ (test zone) และ บริเวณควบคุม (control zone) เกิดเป็นแถบสีชมพู ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งชุดตรวจนี้สามารถตรวจจับ genomic DNA ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุด  $2.5 \mu\text{L/mL}$  ( $1.25 \text{ fM}$ ) ภายในเวลา 15 นาที

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ug/mL

สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากปฏิกิริยา reduction ของสารละลาย hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) โดยใช้สารละลาย trisodium citrate dihydrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ขึ้นแรกล้างเครื่องแก้วทุกชิ้นและ magnetic bar ด้วย aqua regia ( $\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$ ) หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำ DI และทำให้แห้ง ปิดเตา สารละลาย 1% hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) ปริมาตร 0.5 mL ใส่ใน flask ที่มี DI water ปริมาตร 24.5 mL นำไปต้ม บน stirrer hot plate โดยมี magnetic bar กวนสารจนมีอุณหภูมิถึง  $100^\circ \text{C}$  จึงเติมสารละลาย 38.8 mM trisodium citrate dihydrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ลงไปปริมาตร 0.94 mL สีของสารละลายจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อน เป็น สีเทา สีม่วงและสีแดงตามลำดับ จากนั้น ต้มต่อที่อุณหภูมิ  $100^\circ \text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที จึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้ในที่มีดและเย็น

##### Characterization ของ AuNPs

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV-visible absorption และนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างโดยใช้กล้อง Transmission Electron Microscope (TEM)

##### การติด DNA probe ลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การติด DNA probe ของ SNRPN U 1 หรือ SNRPN M 1 ซึ่งเป็น probe ที่จำเพาะต่อลำดับ sequence ของ unmethylation และ methylation ที่ exon 1 ของยีน SNRPN [3, 33] ดังตารางที่ 4 ลงบนผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร นำ 100 uM DNA probe ที่ต่อกับหมู่ thiol (1.0 O.D.) ปริมาตร 20 uL มาผสมกับ 10 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) ปริมาณ 0.4 uL ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้น นำ 100

ppm AuNPs มาทำให้เข้มข้นขึ้นเป็น 500 ppm จากนั้น เติม DNA probe ลงใน 500 ppm AuNPs ปริมาตร 250 uL เขย่าเบาๆ และ orbital shake ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 16 ชั่วโมง เติม phosphate adjustment buffer (100 mM phosphate buffer (pH 7.0)) ปริมาตร 52 uL พร้อมเขย่าเบาๆ เติม 10 % SDS ปริมาตร 6 uL พร้อมเขย่าเบาๆ orbital shake ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติม salting buffer (10 mM phosphate buffer + 2 M NaCl (pH 7.0)) ปริมาตร 14.3 uL ทุกๆ 3 ชั่วโมง จำนวน 6 ครั้ง โดย orbital shake ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน microtube ขนาด 1.5 mL (ถูก treat ด้วย 12 M NaOH) นำไป centrifuge 13,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนของเหลวสีทิ้งและละลายตะกอนด้วย washing buffer (10 mM phosphate buffer + 150 mM NaCl (pH = 7.4)) ปริมาตร 490 uL เขย่าเบาๆ นำไป centrifuge 13,000 rpm 12 นาที ดูดส่วนของเหลวสีทิ้งและละลายตะกอนด้วย Eluent buffer (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5% BSA, 0.25% Tween และ 10 % sucrose) ปริมาตร 490 uL เขย่าเบาๆ ห่อ microtube ด้วยฟอยล์ เก็บไว้ที่ 2-4 °C

Probe	Sequence
SNRPN (U)	1. 5'-thiol-TT TTT TTT TTC TTA CCC ACT CCA TCA CAT CAC TAA CCA-3' 2. 5'-CAT CAA ACA TCT CCA ACA ACC ACT CCA C-TEG-3'
SNRPN (M)	1. 5'-thiol-TT TTT TTT TTC GCT CCA TCG CGT CAC TAA CCG-3' 2. 5'-CGT CAA ACA TCT CCG ACG ACC GC-TEG-3'
Control (U) (M)	1. 5'-biotin-TEG-TGG TTA GTG ATG TGA TGG AGT GGG TAA G-3' 2. 5'-biotin-TEG-CGG TTA GTG ACG CGA TGG AGC G-3'

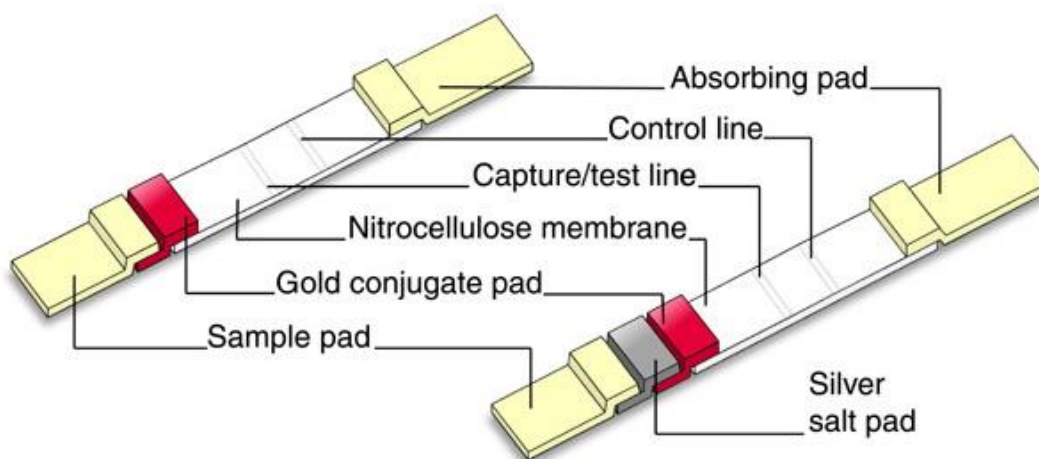
**ตารางที่ 4** แสดงลำดับ sequence ของ probe ที่จำเพาะต่อลำดับ sequence ของ unmethylation (U) และ methylation (M) ที่ exon 1 ของยีน SNRPN ซึ่งใช้ในการต่อบน AuNPs และ Nitrocellulose membrane [3, 33]

### การเตรียม DNA probe สำหรับตรึงอยู่บน Lateral flow strip

เติม 100  $\mu\text{M}$  ของ DNA probe (*SNRPN* U 2 หรือ *SNRPN* M 2 หรือ control) ดังตารางที่ 5 ซึ่งปลาย probe ต่อกับ biotin ปริมาตร 60  $\mu\text{L}$  ลงใน 1.67 mg/mL ของสารละลาย streptavidin ปริมาณ 30  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง คัดนำสารละลายทั้งหมดมาใส่ใน centrifugal filter พร้อม centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที สุดท้ายจะเหลือสารละลายอยู่ใน centrifugal filter ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  กลับ centrifugal filter บั๊นที่ 6000 rpm 20 นาที ห่อ microtube ด้วยฟอยล์ เก็บไว้ที่ 2-4  $^{\circ}\text{C}$

### การเตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip

องค์ประกอบของ Lateral flow strip มีอยู่ทั้งหมด 4 ส่วน ประกอบด้วย Simple pad Conjugate pad Nitrocellulose membrane และ Absorption pad ดังภาพที่ 9 ซึ่งเตรียมได้ดังนี้



ภาพที่ 9 แสดงส่วนประกอบของ Lateral flow strip test [10]

### 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 0.15 M NaCl) ตากให้แห้งและเก็บไว้ใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง

### การเตรียม Conjugate pad

นำ glass fiber (4 mm x 8 mm) มาจุ่มในสารละลาย AuNPs ที่ต่อกับ DNA probe แล้วจากนั้น นำมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ใน desiccator ที่อุณหภูมิ 4 °C

### การเตรียม Nitrocellulose membrane

นำ DNA probe มาหยดลงบนกระดาษ Nitrocellulose membrane (4 mm x 25 mm) .ให้มีความกว้างขนาด 2 mm โดย probe *SNRPN* U 2 หรือ *SNRPN* M 2 หยดบริเวณที่เป็น test zone ส่วน probe control หยดบริเวณที่เป็น control zone จากนั้นตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

### การประกอบชุด Lateral flow strip

นำส่วนของ Simple pad, Conjugate pad, Nitrocellulose membrane และ Absorption pad มาประกอบบนแผ่นพลาสติก (Backing) ขนาด 4 mm x 60 mm โดยแต่ละส่วน จะมีบริเวณที่วางซ้อนทับกันยาว 2 mm

### การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จาก synthetic DNA

นำ 0.1 uM ของ DNA target ที่ละลายอยู่ในสารละลาย SSC ปริมาตร 130 uL มาหยดลงบน Simple pad ที่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้น เติมสารละลาย SSC ปริมาตร 50 uL ลงบน Simple pad อีกครั้ง จากนั้น จึงวัดความเข้มของแถบของ AuNPs-probe ที่ test line และ control line ด้วยโปรแกรม ImageJ



## การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จากตัวอย่าง DNA

### Bisulfite treatment

ละลาย 1-2 ug ของ DNA ใน Deionized distilled water ปริมาตร 50 uL เติม 2 M NaOH ปริมาตร 5.5 uL Mix และ spin down นำไป Incubate ที่ 37 °C ใน water bath 10 นาที เติม 10 mM Hydroquinone ปริมาตร 30 uL Mix และเติมสารละลาย Bisulfide ปริมาตร 520 uL Mix นำไป Incubate ที่ 50 °C ใน water bath 16-20 ชั่วโมง เติม Wizard® Minipreps DNA Purification Resin 1 mL ลงใน tube Mix ด้วย autopipette เตรียมเครื่อง pump ต่อ column บน vacuum manifold พร้อมสวม syringe และเปิด pump จนของเหลวหมด ปิดเครื่อง ปิดเปิดสารใส่ลงใน syringe ปิดลูกบิด ล้างด้วย 80% Isopropanal (cold) เมื่อสารไหลหมด เปิดลูกบิด แล้วเริ่มจับเวลา 30 วินาที แล้วปิด valve นำ eppendorf สวม column centrifuge ที่ 10,000 g 2 นาที เปลี่ยน eppendorf ใหม่ เติม 95 °C Deionized distilled water 50 uL centrifuge ที่ 10,000 g 20 วินาที DNA จะ elude ลงมาใน eppendorf เติม 3 M NaOH ปริมาตร 5.5 uL ลงใน eppendorf Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม glycogen 20 ng/uL ปริมาตร 1 uL เติม 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc 23 uL และ 100% EtOH (cold) 240 uL Mix เก็บที่ -20 °C 2 ชั่วโมง centrifuge ที่ 14,000 rpm 15 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างด้วย 70% EtOH (cold) 200 uL centrifuge ที่ 14,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำให้แห้ง เติม Deionized distilled water 20 uL เพื่อละลาย DNA Incubate 37 °C (ประมาณ 20 นาที) เก็บที่ 4 °C

### ทำการทดสอบชุด Lateral flow strip

นำเอา DNA ที่ผ่านการทำ bisulfite treatment แล้วไป incubate ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เติม hybridization buffer (6XSSC, 1% dextran sulphate, 50% formamide ) 120 uL ผสมให้เข้ากัน ดูดมาหยดบน Sample pad จากนั้น จึงวัดความเข้มของแถบของ AuNPs-probe ที่ test line และ control line ด้วยโปรแกรม ImageJ

### การวิเคราะห์ข้อมูล

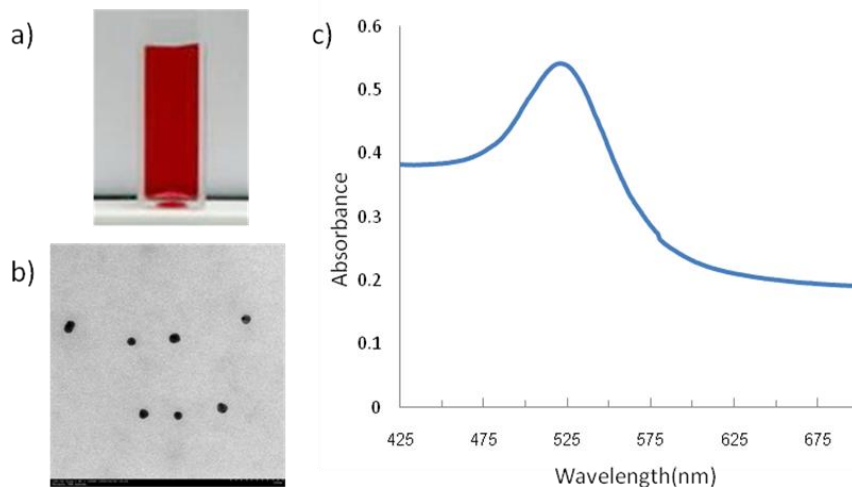
วิเคราะห์ข้อมูลในรูปของ sensitivity และ specificity เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอ์-วิลลีในรูปของ Lateral flow strip test กับ Methylation specific PCR

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ug/mL

การสังเคราะห์ AuNPs ที่มีความเข้มข้น 100 ug/mL เพื่อใช้ในการศึกษานี้ พบว่าเมื่อมองด้วยตาเปล่า AuNPs มีลักษณะเป็นของเหลวที่มีแดง จากการตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM) และ UV-Vis Spectrophotometer พบว่า AuNPs มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลม แต่ละอนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคอยู่ที่ประมาณ 20 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของAuNPs ที่ความยาวคลื่นต่างๆ พบว่า AuNPs ที่สังเคราะห์ได้มีค่า maximum absorption peak อยู่ที่ 520 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ จะสัมพันธ์กับสีของ AuNPsที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ดังแสดงในภาพที่ 10

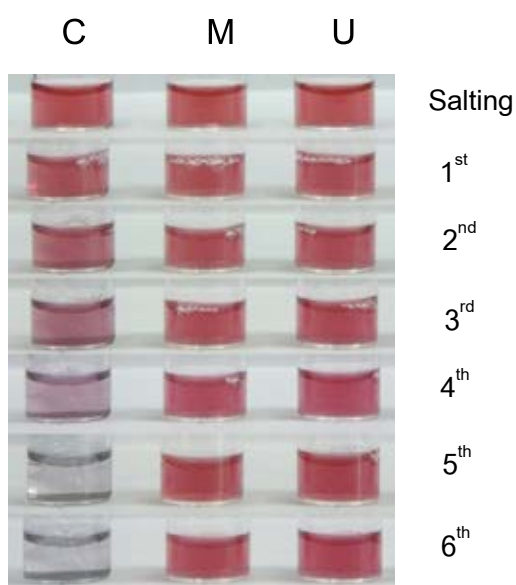


ภาพที่ 10 แสดงการตรวจสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ug/mL

- อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มองเห็นด้วยตาเปล่า
- อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากเครื่อง Transmission Electron Microscopy
- ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง และ UV-Vis Spectrophotometer

### การติด DNA probe ลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การนำ DNA probe มาติดลงบน AuNPs นั้น DNA probe ที่ใช้เป็นสาย synthetic DNA ที่มีความยาวของลำดับเบสจำนวน 32 และ 38 เบส ดังตารางที่ 5 ซึ่งจำเพาะกับลำดับเบสของ unmethylation และ methylation ที่ exon 1 ของยีน *SNRPN* บนโครโมโซมแท่งที่ 15 โดยที่ปลาย 5' ของ DNA probe จะถูกต่อด้วยหมู่ thiol (S=S) โหหลังจากนำ DNA probe มาติดลงบน AuNPs พบว่า หลอด Control (C) ซึ่งเป็นหลอดที่ใช้น้ำ deionized แทน DNA probe นำมาผสมกับ 10 mM TCEP แล้วเติมลงใน 500 ppm AuNPs พบว่า สีของ AuNPs ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเติม salting buffer ซึ่งส่วนประกอบของ NaCl สีของ AuNPs จะค่อยๆเริ่มเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นม่วงและตกตะกอนในที่สุด ส่วนหลอดที่มีการเติม DNA probe ชนิด Methylation (M) และ Unmethylation (U) เมื่อเติม salting buffer จนถึงครั้งที่ 6 สีของอนุภาค AuNPs ยังคงมีสีแดงเหมือนเดิม ดังภาพที่ 11

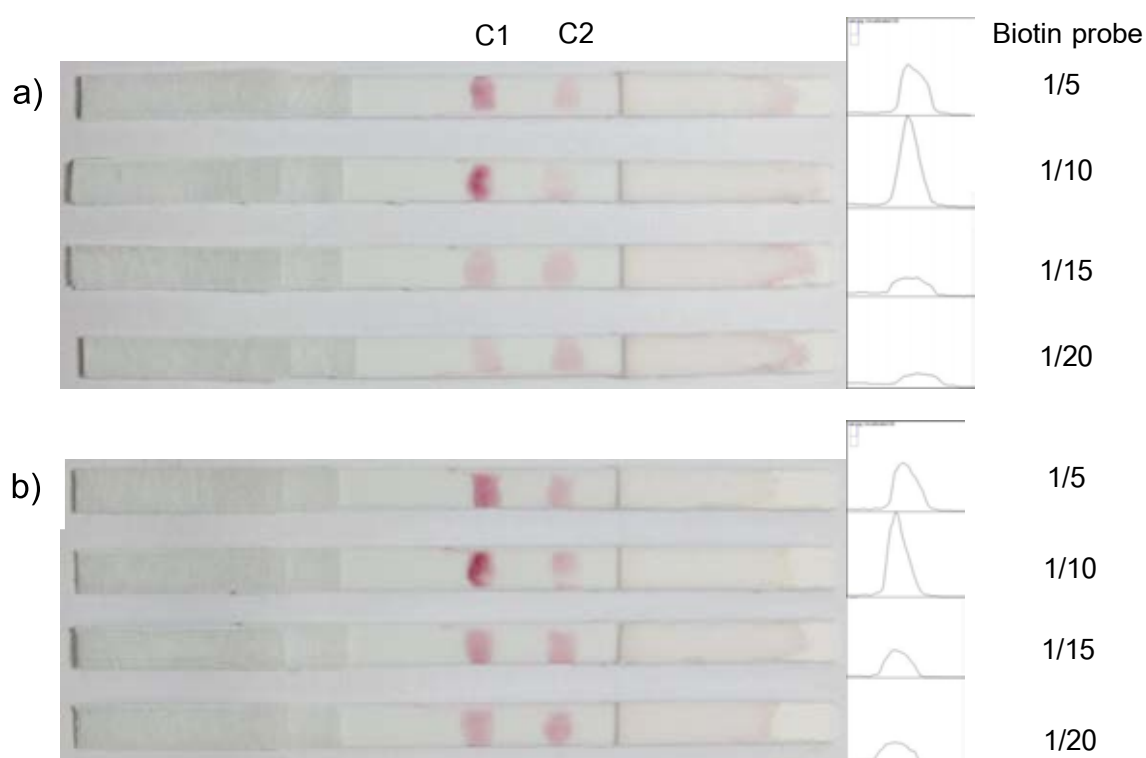


ภาพที่ 11 แสดงการต่อ DNA probe กับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร; control (C), methylation probe (M) และ unmethylation probe (U)

## ผลการทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ DNA target จาก synthetic DNA

### การหาชนิดของ Nitrocellulose membrane ที่เหมาะสมในการทำชุด Lateral flow strip test

ในการหาชนิดของ Nitrocellulose membrane ที่เหมาะสมในการทำชุด Lateral flow strip นั้น ได้เลือกใช้ Nitrocellulose membrane 2 แบบ คือ HF180 และ HF240 โดยใช้ 4XSSC (1% BSA, 0.2% tween 20 และ 0.01% SDS) เป็น Hybridization buffer ใช้ Streptavidin-Biotin probe ความเข้มข้น 1/5, 1/10, 1/15 และ 1/20 ปริมาตร 0.6 ul ที่ Control line ที่ 1 ใช้ Streptavidin-Biotin probe ความเข้มข้น 1/15 ปริมาตร 0.6 ul ที่ Control line ที่ 2 และ ใช้ 1X AuNPs-probe 10 ul พบว่า Nitrocellulose membrane ชนิด HF240 ให้ความเข้มของแถบของ AuNPs-probe ที่ปรากฏบน control line ซึ่งใช้ Biotin probe ความเข้มข้นต่างๆ มากกว่า Nitrocellulose membrane ชนิด HF180 ดังภาพที่ 12 ดังนั้น Nitrocellulose membrane แบบ HF240 เหมาะสมที่สุดในการทำชุด Lateral flow strip test



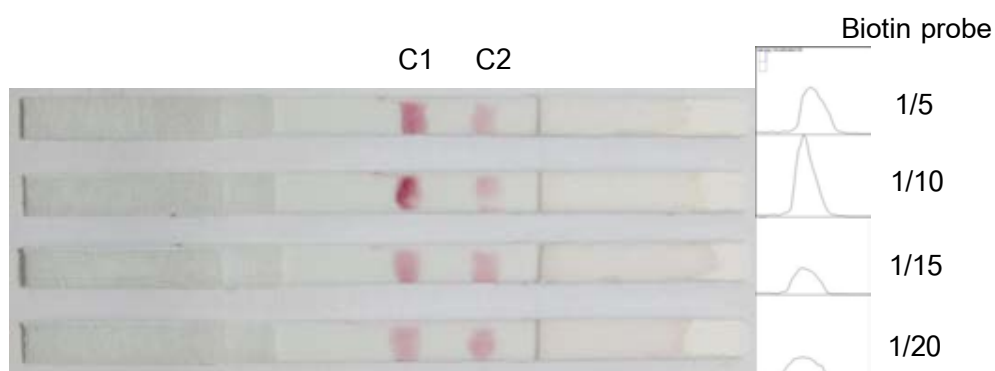
ภาพที่ 12 แสดงการหาความเหมาะสมของ Nitrocellulose membrane

a) Hi-Flow Plus Membranes HF180

b) Hi-Flow Plus Membranes HF240

### การหาความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่เหมาะสมในการทำชุด Lateral flow strip test

การหาความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่เหมาะสมในการตรึงบน Test line และ Control line ของชุด Lateral flow strip test โดยการทดลองนี้ จะใช้ความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ของ Control line ที่ 1 ตั้งแต่ 1/5, 1/10, 1/15 และ 1/20 และ Control line ที่ 2 ใช้ความเข้มข้น 1/15 ตรึงลงบน Nitrocellulose membrane ชนิด HF240 ปริมาตร 0.6 ul และ ใช้ 1X AuNPs-probe 10 uL ดังภาพที่ 13 พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่ 1/10 มีความเข้มของแถบสีเข้มที่สุด แต่ลักษณะการติดแถบสี ไม่เสมอกันทั้งแถบ ดังนั้น ความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่เหมาะสม คือ 1/15

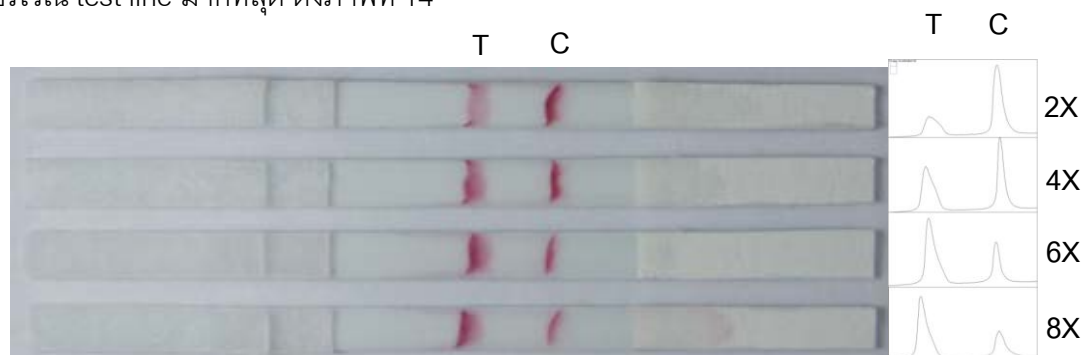


ภาพที่ 13 แสดงการหาความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่เหมาะสม ในการตรึงบน Test line และ Control line ของชุด Lateral flow strip test

### การหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation

การหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation นั้น การทดลองนี้ ใช้ความเข้มข้นของ SSC buffer ที่ 2X, 4X, 6X และ 8X ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS) โดยใช้ Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe ของ Methylation ปริมาตร 10 uL, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 uL และ 0.1 uM Synthetic target แบบ Methylation ปริมาตร 0.5 uL จากการทดลอง พบว่า ใน Lateral

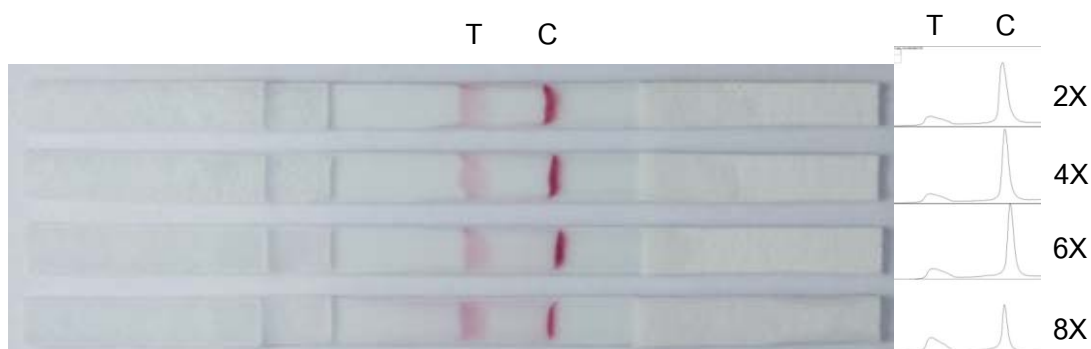
flow strip test ของ Methylation ที่ใช้ความเข้มข้นของ SSC ที่ 6X มีความเข้มของแถบสีเข้มบริเวณ test line มากที่สุด ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงการหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation

การหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation

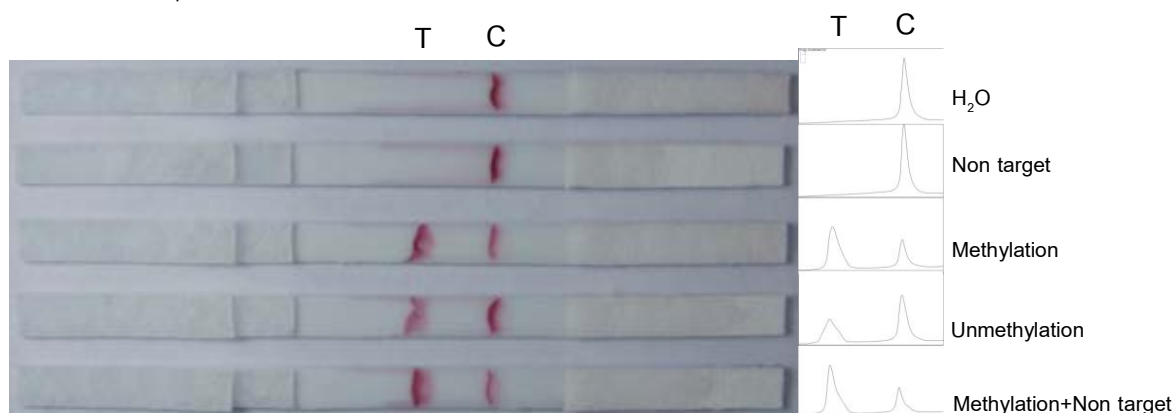
การหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation นั้น การทดลองนี้ ใช้ความเข้มข้นของ SSC buffer ที่ 2X, 4X, 6X และ 8X ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS) โดยใช้ Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ปริมาตร 10 uL, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Unmethylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 uL และ 0.1 uM Synthetic target แบบ Unmethylation ปริมาตร 0.5 uL จากการทดลอง พบว่า ใน Lateral flow strip test แบบ Unmethylation ที่ใช้ความเข้มข้นของ SSC ที่ 6X มีความเข้มของแถบสีเข้มบริเวณ test line มากที่สุด ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 แสดงการหาความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation

#### การหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation

การหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation นั้น การทดลองนี้ จะใช้ Synthetic target ชนิด Non target, Methylation, Unmethylation และ Methylation+ Non target ความเข้มข้น 0.1 uM ปริมาตร 0.5 uL ในแต่ละ Lateral flow strip test โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS), Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe ของ Methylation ปริมาตร 10 uL, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 uL พบว่า ใน Lateral flow strip test ที่ใช้ Synthetic target ชนิด Unmethylation เกิดแถบสีที่ test line ซึ่งเป็น non specific ดังภาพที่ 16

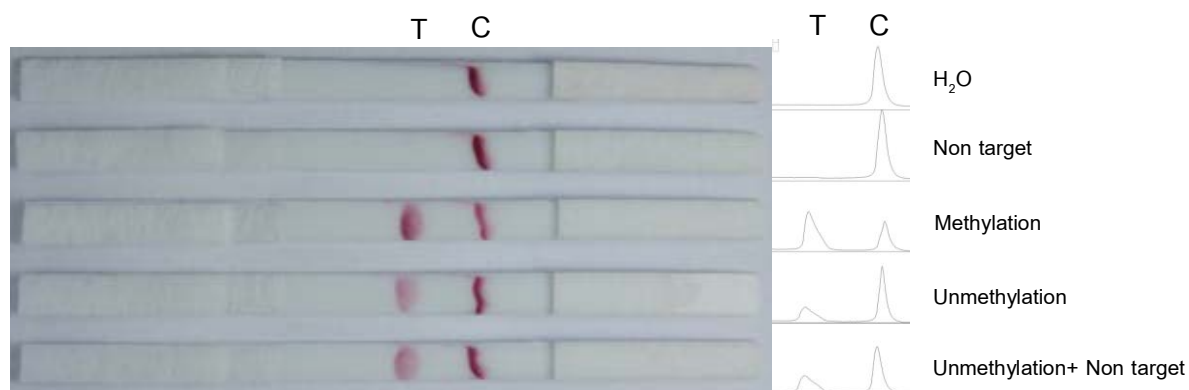


ภาพที่ 16 แสดงการหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic target ชนิดต่างๆ



### การหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation

การหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation นั้น การทดลองนี้ จะใช้ Synthetic target ชนิด Non target, Methylation, Unmethylation และ Unmethylation+ Non target ความเข้มข้น 0.1 uM ปริมาตร 0.5 ul ในแต่ละ Lateral flow strip test โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS), Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ปริมาตร 10 uL, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Unmethylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 uL พบว่า ใน Lateral flow strip test ที่ใช้ Synthetic target ชนิด Methylation เกิดแถบสีที่ test line ซึ่งเป็น non specific ดังภาพที่ 17

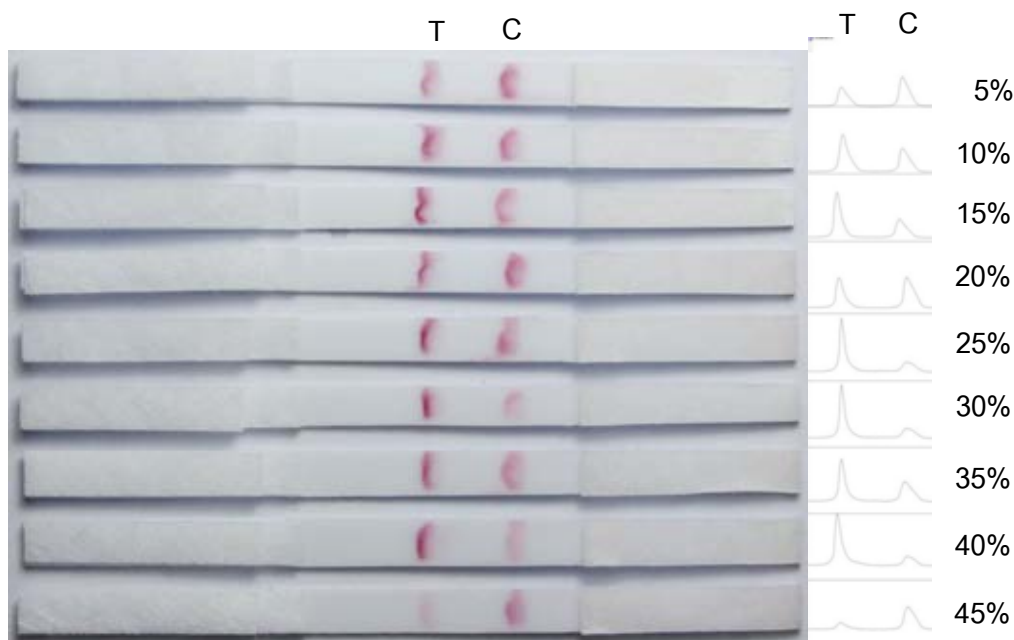


ภาพที่ 17 แสดงการหาความจำเพาะของชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic target ชนิดต่างๆ

### การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation

การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation นั้น จากการทดลองนี้ ในแต่ละ Lateral flow strip test จะใช้ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% และ 45% โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS), Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Methylation ปริมาตร 10 ul, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6

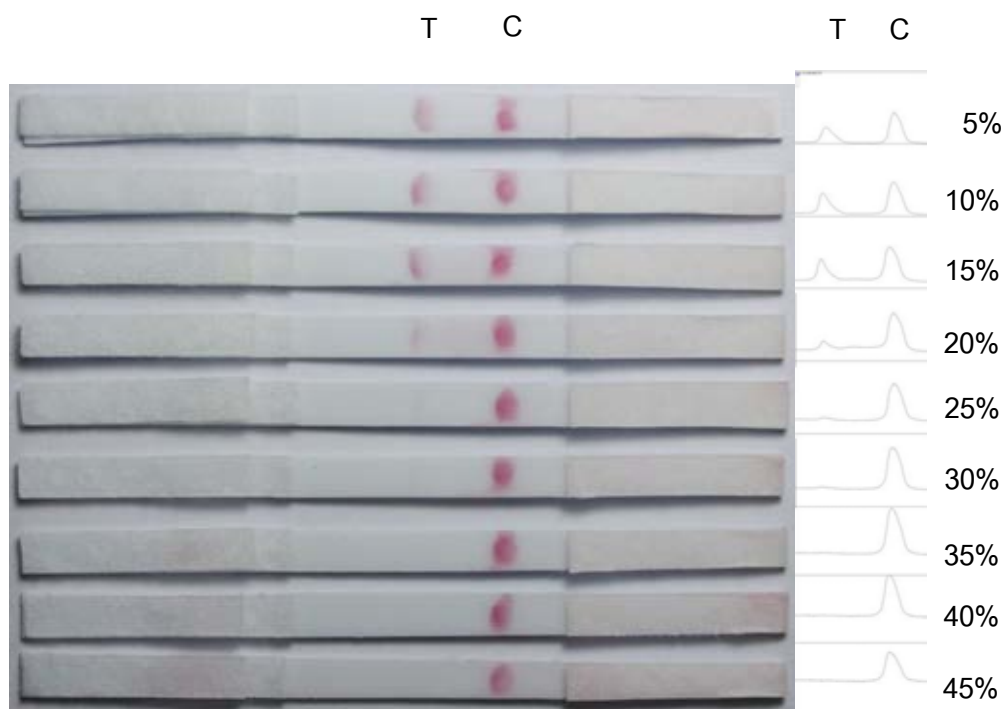
uL และ Synthetic target แบบ Methylation ความเข้มข้น 0.1 uM ปริมาตร 2 uL พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 40% จะให้ความเข้มของแถบสีที่ test line มากที่สุดและความเข้มของแถบสีที่ test line จะจางลงที่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 45% ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation

#### การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation

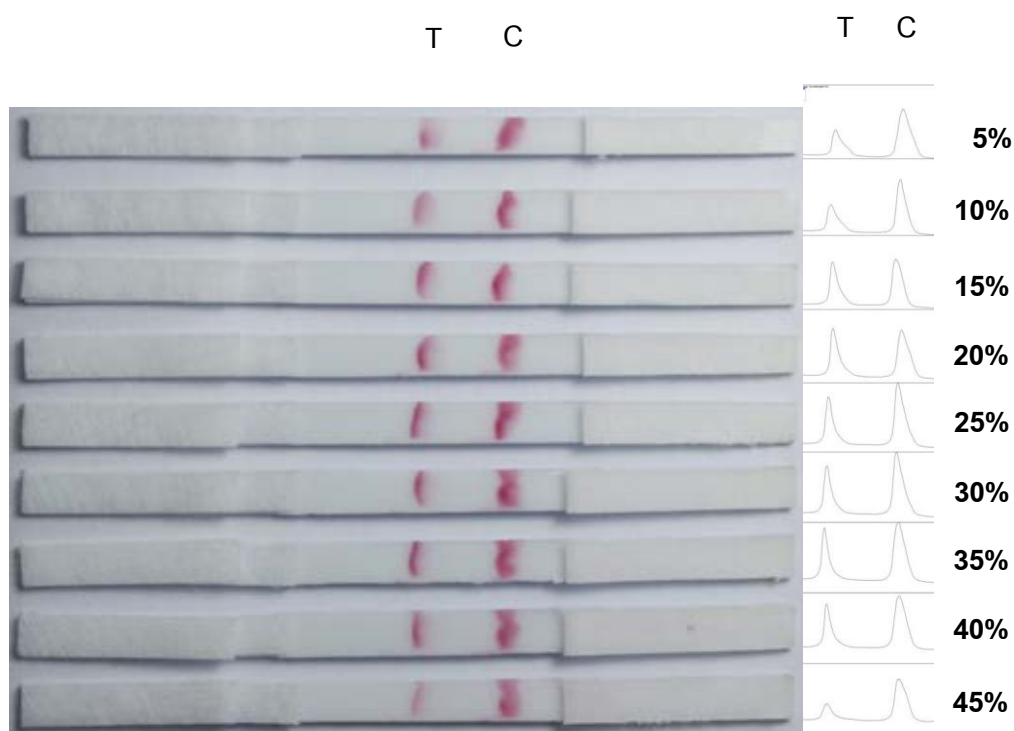
การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation นั้น จากการทดลองนี้ ในแต่ละ Lateral flow strip test จะใช้ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% และ 45% โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS), Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Methylation ปริมาตร 10 ul, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 ul และ Synthetic target แบบ Unmethylation ความเข้มข้น 0.1 uM ปริมาตร 2 ul พบว่า ตั้งแต่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 15-25% จะให้ความเข้มของแถบสีที่ test line จางลงและความเข้มของแถบสีที่ test line จะจางหายไปตั้งแต่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 40% ดังภาพที่ 19



**ภาพที่ 19** แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation

### การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation

การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation นั้น จากการทดลองนี้ในแต่ละ Lateral flow strip test จะใช้ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% และ 45% โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS), Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ปริมาตร 10 uL, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Unmethylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 uL และ Synthetic target แบบ Methylation ความเข้มข้น 0.1 uM ปริมาตร 2 uL พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 40% จะให้ความเข้มของแถบสีที่ test line มากที่สุดและความเข้มของแถบสีที่ test line จะจางลงที่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 45% ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Unmethylation

### การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation

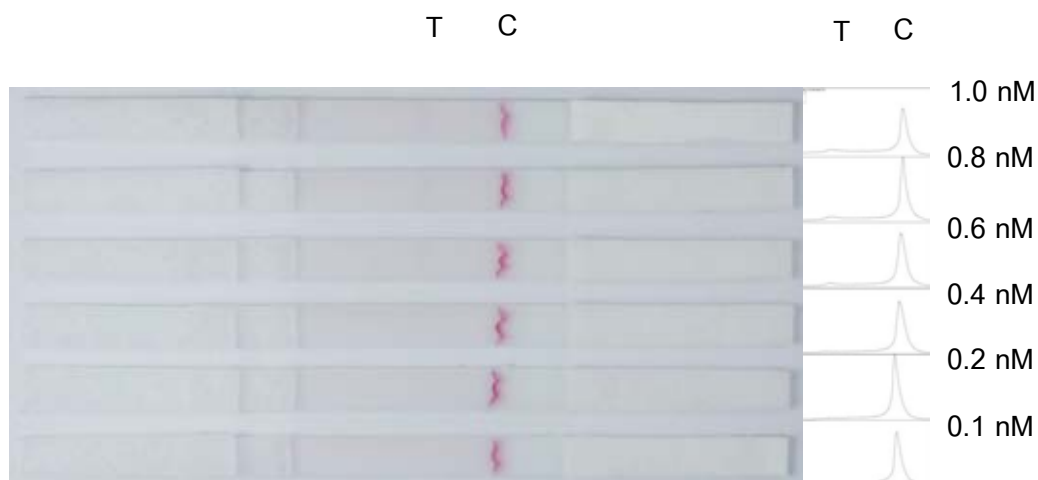
การหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation นั้น จากการทดลองนี้ ในแต่ละ Lateral flow strip test จะใช้ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% และ 45% โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS), Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Methylation ปริมาตร 10 ul, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Unmethylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 ul และ Synthetic target แบบ Methylation ความเข้มข้น 0.1 uM ปริมาตร 2 ul พบว่า ตั้งแต่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 5-20% จะให้ความเข้มของแถบสีที่ test line จางลงและความเข้มของแถบสีที่ test line จะจางหายไปตั้งแต่ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 25% เป็นต้นไป ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 แสดงการหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation โดยใช้ Synthetic Target แบบ Methylation

### การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ได้

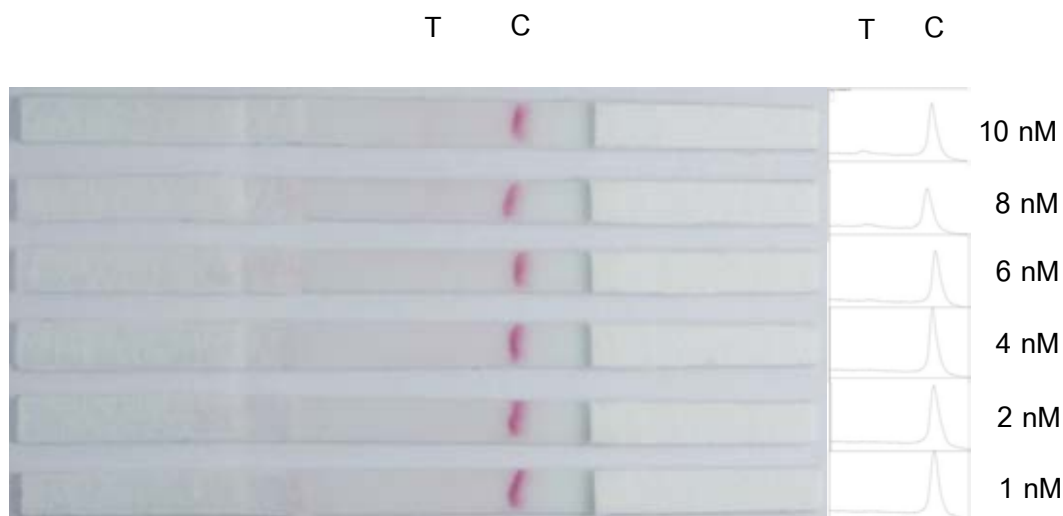
การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ได้ จากการทดลองนี้ ใน Synthetic target แบบ methylation ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 nM ปริมาตร 1 ul โดยใช้ Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Methylation ปริมาตร 10 ul, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 ul และ Hybridization buffer (6X SSC, 40% Formamide, 1%BSA, 0.2% tween 20, 0.1% SDS) พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Methylation ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ได้ คือ ความเข้มข้น 0.6 nM ปริมาตร 1 ul ซึ่งสามารถคิดเป็นปริมาณ 0.6 fmol ดังภาพที่



ภาพที่ 22 แสดงการหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ได้

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation สามารถวิเคราะห์ได้

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation สามารถวิเคราะห์ได้ จากการทดลองนี้ ใน Synthetic target แบบ Unmethylation ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 nM ปริมาตร 1 ul โดยใช้ Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ปริมาตร 10 ul, 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Unmethylation (test line/control line) ปริมาตร 0.6 ul และ Hybridization buffer (6X SSC, 40% Formamide, 1%BSA, 0.2% tween 20, 0.1% SDS) พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Unmethylation ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation สามารถวิเคราะห์ได้ คือ ความเข้มข้น 8 nM ปริมาตร 1 ul ซึ่งสามารถคิดเป็นปริมาณ 8 fmol ดังภาพที่ 23

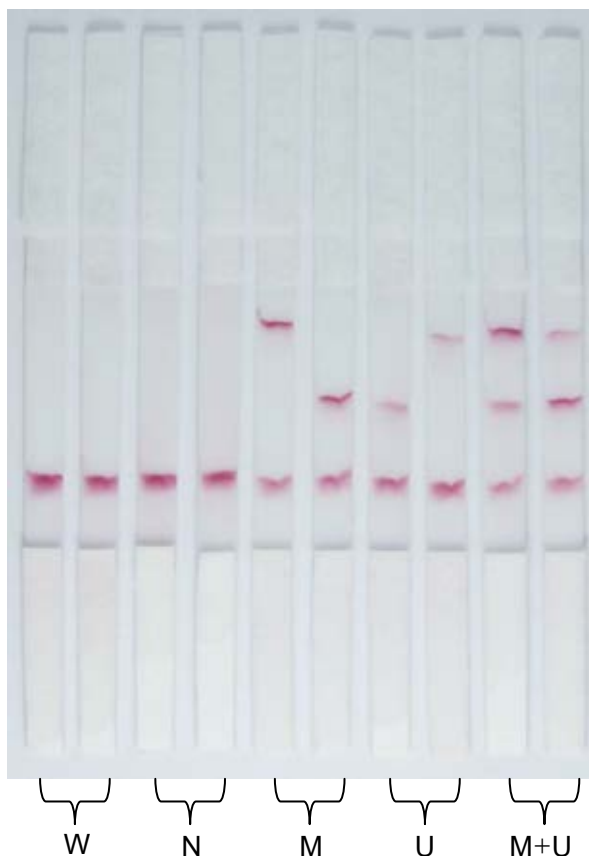


**ภาพที่ 23** แสดงการหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA target ที่ ชุด Lateral flow strip test แบบ Unmethylation

#### การหาความจำเพาะของชุด Duplex lateral flow strip test

การหาความจำเพาะของชุด Duplex lateral flow strip test จากการทดลองนี้ ทำการสลับตำแหน่งของ test line ที่มี 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation และ Unmethylation พร้อมใช้ Synthetic target แบบ Non target, Methylation, Unmethylation, Methylation+Unmethylation และ น้ำ (Negative control) เป็นตัวทดสอบความจำเพาะ โดยใช้ Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ที่ผสมกับแบบ Methylation ปริมาตร 10 ul และ Hybridization buffer (6X SSC, 40% Formamide, 1%BSA, 0.2% tween 20, 0.1% SDS) พบว่า Duplex lateral flow strip test ทั้งที่ใช้ น้ำและ Synthetic target แบบ Non target มีแถบสีชมพูของ AuNPs-probe เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณ control line เท่านั้น ส่วน Duplex lateral flow strip test ที่ใช้ Synthetic target แบบ Methylation, Unmethylation, Methylation+Unmethylation พบว่า เกิดแถบสีชมพูของ AuNPs-probe ที่บริเวณ Test line ตรงตามชนิดของ Synthetic target และชนิดของ Streptavidin-Biotin probe บน Test line ดังภาพที่ 24

M	U	M	U	M	U	M	U	M	U	} Test line
U	M	U	M	U	M	U	M	U	M	
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	



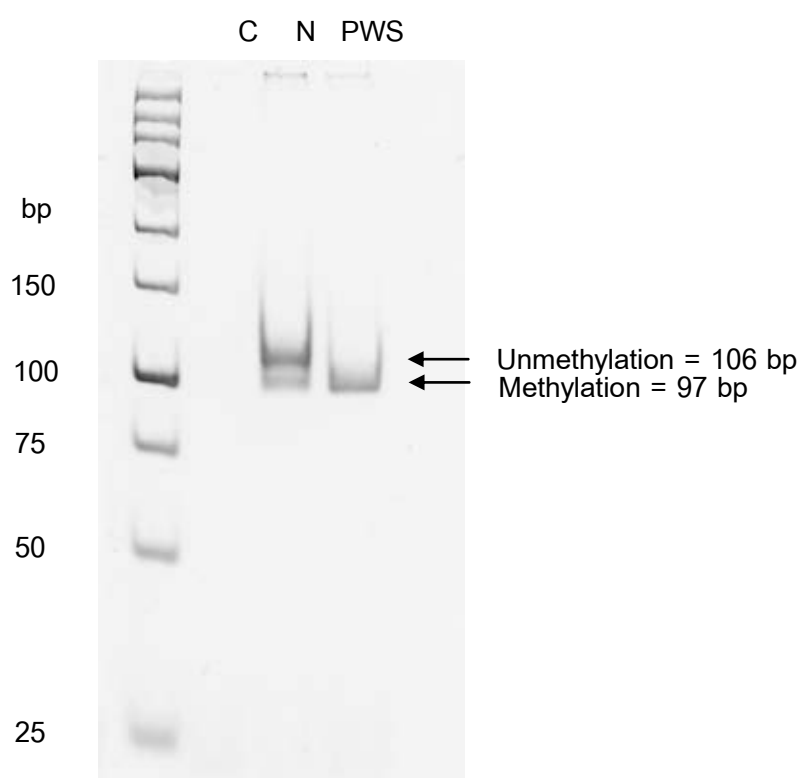
ภาพที่ 24 แสดงการหาความจำเพาะของชุด Duplex lateral flow strip test โดยใช้ น้ำ (W), Non target (N), Methylation target (M) และ Unmethylation target (U)

#### การทำ DNA methylation ของโรคพราเดอร์-วิลลี ด้วยวิธี Methylation-Specific PCR

การตรวจวิเคราะห์ DNA methylation ของโรคพราเดอร์-วิลลี ด้วยวิธี Methylation-Specific PCR นั้น สามารถทำได้โดยเริ่มจากนำ DNA มาทำ Bisulfite treatment เพื่อเปลี่ยนเบสไซโตซีน (cytosine) ที่ไม่ได้เติมหมู่เมทิล ให้เปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล (Uracil) ส่วนในเบสไซโตซีนที่มีการเติมหมู่เมทิล ภายหลังจากทำ Bisulfite treatment จะยังคงเป็นเบสไซโตซีนอยู่เหมือนเดิม ซึ่งจะทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง DNA ที่ถูกเติมและไม่ได้ถูกเติมหมู่เมทิลออกจากกันได้ จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ DNA methylation และ Unmethylation ของโรคพราเดอร์-วิลลีและทำการแยกขนาดของ PCR product



ที่ได้ด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis จะพบว่า ในคนปกติจะพบแถบบน Polyacrylamide gel 2 แถบ ประกอบด้วย แถบที่มี DNA ขนาด 97 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ DNA methylation และแถบที่มี DNA ขนาด 106 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ DNA unmethylation ส่วนในคนที่ป่วยเป็นโรคพราดอร์-วิลลี จะพบเฉพาะแถบของ DNA ประมาณ 97 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ DNA methylation เท่านั้น ดังภาพที่ 25

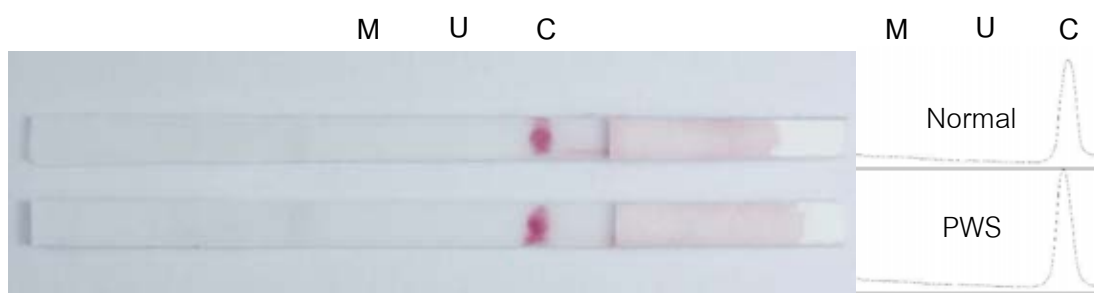


**ภาพที่ 25** แสดงการทำ DNA methylation ของโรคพราดอร์-วิลลี ด้วยวิธี Methylation-Specific PCR: Control (C), Normal (N), Prader-Willi syndrome (PWS)

#### การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จาก Bisulfite treatment DNA

การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test โดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่ผ่านการทำ bisulfite treatment DNA ในการทดลองนี้ ใช้ 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation และ Unmethylation ตามลำดับ ปริมาตร 0.6 ul Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ที่ผสมกับ แบบ Methylation แล้ว ปริมาตร 10

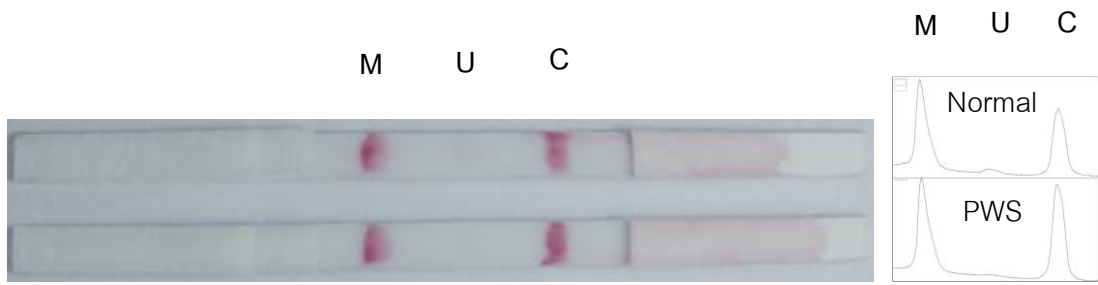
uL, Hybridization buffer (6X SSC, 40% Formamide, 1%BSA, 0.2%tween 20, 0.1% SDS) โดยใช้ DNA ของคนปกติและผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี ที่ผ่านการทำ Bisulfite treatment 20 uL denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น หยดลงบน sample pad ตามด้วย Hybridization buffer ที่ทิ้งไว้ 15 นาที พบว่า Duplex lateral flow strip test ทั้งที่ใช้ DNA ของคนปกติและผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี พบแถบสีชมพูเฉพาะที่ Control line เท่านั้น ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จาก Bisulfite treatment DNA

#### การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จากตัวอย่าง DNA จาก PCR product

การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จากตัวอย่าง DNA จาก PCR product หลังจากการทำ MSP ในการทดลองนี้ ใช้ 1/15 Streptavidin-Biotin probe แบบ Methylation และ Unmethylation ตามลำดับ ปริมาตร 0.6 ul Nitrocellulose membrane ชนิด HF240, 1X AuNPs-probe แบบ Unmethylation ที่ผสมกับ แบบ Methylation แล้ว ปริมาตร 10 uL, Hybridization buffer (6X SSC, 40% Formamide, 1%BSA, 0.2%tween 20, 0.1% SDS) โดยใช้ DNA ของคนปกติและผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี ที่ผ่านการทำ Bisulfite treatment 20 uL denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น หยดลงบน sample pad ตามด้วย Hybridization buffer ที่ทิ้งไว้ 15 นาที พบว่า Duplex lateral flow strip test ทั้งที่ใช้ DNA ของคนปกติเกิดแถบขึ้นที่ Test Line ของ Methylation และ Unmethylation โดยที่ Test Line ของ Unmethylation เกิดแถบขึ้นเล็กน้อย ส่วนผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี พบแถบสีชมพูเฉพาะที่ Test Line ของ Methylation เท่านั้น ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 การทดสอบชุด Duplex lateral flow strip test จากตัวอย่าง DNA จาก PCR product

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผลการวิจัย

จากการสังเคราะห์ AuNPs ได้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรซึ่งเป็นของเหลวสีแดง เกิดจากการทำปฏิกิริยา reduction ระหว่างสารละลาย hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) และสารละลาย trisodium citrate dihydrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) โดย สารละลาย trisodium citrate dihydrate จะเป็นตัว reduce ไอออนของ Au ที่มีประจุ  $3+$  ให้กลายเป็น อนุภาค Au ที่มีประจุ 0 แต่ยังคงเป็นอนุภาคที่ไม่เสถียร ตัว trisodium citrate dihydrate นี้เอง นอกจากจะทำหน้าที่เป็นตัว reduce แล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัว stabilizer ไปพร้อมๆกัน โดยจะ ไอออนของ citrate จะล้อมรอบอนุภาคทองคำ เพื่อให้อนุภาคคงสภาพในระดับนาโนเมตร จากการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของ AuNPs โดยการใช้ Transmission Electron Microscopy (TEM) พบว่า AuNPs มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ประมาณ 20 nm เมื่อทดสอบ AuNPs ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer พบว่าให้ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 520 nm

ในการ ติด DNA probe ลงบนผิว ของ AuNPs โดย DNA probe ที่ใช้ปลาย 5' ของ DNA probe จะถูกต่อดัวยหมู่ thiol ( $\text{S}=\text{S}$ ) เมื่อเติม 10 mM TCEP ลงใน DNA probe พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ thiol จะถูก TCEP ทำลายพันธะและ หมู่ thiol จะไปสร้างพันธะกับไอออนลบของซีเตรทไอออน ที่อยู่บนผิวของ AuNPs โดยใช้ไอเล็กตรอนร่วมกันเป็นพันธะโควาเลนต์ การที่มีหมู่ thiol มาล้อมรอบผิวอนุภาค เป็นการช่วยคงสภาพของอนุภาคให้ยังมีขนาดและคุณสมบัติของ AuNPs จากนั้น จึงเติมสารละลาย salting buffer เพื่อค่อยๆปรับประจุรอบๆ AuNPs ซึ่งจะเห็นได้ว่า หลอดที่มีการเติม DNA probe ทั้งชนิด Methylation (M) และ Unmethylation (U) อนุภาค AuNPs ยังคงมีสีแดงเหมือนเดิม เมื่อเทียบกับหลอด Control (C) ซึ่งไม่มี DNA probe หลังจากเติม salting buffer สีของ AuNPs จะค่อยๆเริ่มเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นม่วงและตกตะกอนตามลำดับ เป็นผลมาจากประจุบวกของเกลือใน salting buffer ทำให้แรงผลักของประจุลบของซีเตรทไอออนที่ล้อมรอบบนผิวของ AuNPs ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัว Stabilize มีค่าลดลง

ปฏิกิริยาการ hybridization แบบ sandwich ในชุด Lateral flow strip test นั้น ระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาการ hybridization จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเคลื่อนที่ของ buffer ใน Nitrocellulose membrane ในการเลือกชนิดของ Nitrocellulose membrane ที่เหมาะสมนั้น

จากการทดลองนี้ ได้เลือกใช้ Nitrocellulose membrane 2 ชนิด คือ HF180 และ HF240 พบว่า Nitrocellulose membrane ชนิด HF240 มีความเข้มข้นของ AuNPs-probe ที่ปรากฏบน control line ซึ่งใช้ Biotin probe ความเข้มข้นต่างๆ มากกว่า ความเข้มข้นของ AuNPs-probe ที่ปรากฏบน control line ใน Nitrocellulose membrane ชนิด HF180 ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ X. Mao และคณะ [32] ที่รายงานว่า Nitrocellulose membrane ชนิด HF240 ให้ความเข้มข้นของแถบ AuNPs-probe มากกว่า Nitrocellulose membrane ชนิด HF180 ประมาณ 4 เท่า โดยพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของ buffer ใน Nitrocellulose membrane ชนิด HF180 และ HF240 คือ 3 และ 4 นาทีตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า buffer ที่เคลื่อนที่ใน Nitrocellulose membrane ได้ช้า จะให้ sensitivity ของ Lateral flow strip test เพิ่มขึ้น

Streptavidin-biotin probe ซึ่งถูกตรึงที่บริเวณ test line และ control line บน Nitrocellulose membrane ของ Lateral flow strip test นั้น การใช้ความเข้มข้นของ Streptavidin-biotin probe เหมาะสม จะทำ buffer สามารถให้การเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นและเกิดการ hybridization กับ DNA target อย่างมีประสิทธิภาพ การที่ใช้ Streptavidin-Biotin probe ที่มีความเข้มข้นที่มากเกินไป Streptavidin-biotin จะทำให้ buffer เคลื่อนที่ได้ไม่สะดวกเหมือนการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของ Streptavidin-Biotin probe ที่ 1/10 มีความเข้มข้นของแถบสีเข้มที่สุด แต่ลักษณะการติดแถบสี ไม่เสมอกันทั้งแถบ

ในปฏิกิริยาการ hybridization ความเข้มข้นของ Saline-sodium citrate (SSC) buffer ที่เหมาะสมใน Hybridization buffer จะมีผลต่อประสิทธิภาพของ Lateral flow strip test เนื่องจากจะมีผลต่อ sensitivity และ specificity ของผลการทดสอบ จากการทดลอง ได้ใช้ความเข้มข้นของ SSC buffer ที่ 2X, 4X, 6X และ 8X ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS) ใน Lateral flow strip test แบบ Methylation และ Unmethylation โดยใช้ synthetic target ที่จำเพาะกับ Lateral flow strip test นั้นๆ พบว่า 6X SSC ใน Hybridization buffer เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการ hybridization ทั้งใน Lateral flow strip test แบบ Methylation และ Unmethylation ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ความเข้มข้นของแถบ AuNPs-probe ที่ test line มากที่สุด จากนั้นจึงใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer มาทดสอบ specificity ของ Lateral flow strip test ทั้งสองแบบ โดยใช้ Synthetic target ชนิด Non target, Methylation, Unmethylation, Methylation/Unmethylation+Non target และน้ำ พบว่า Lateral flow strip test ทั้งสองแบบ เกิดแถบของ AuNPs-probe ที่ test line ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดการ

Hybridization แบบ non specific โดยใน Lateral flow strip test แบบ Methylation เกิดแถบของ AuNPs-probe ที่ test line เมื่อทดสอบด้วย Unmethylation target และ Lateral flow strip test แบบ Unmethylation จะเกิดแถบของ AuNPs-probe ที่ test line เมื่อทดสอบด้วย Methylation target ซึ่งการเกิด non specific ในลักษณะนี้สามารถเกิดขึ้นได้ เพราะลำดับเบสของ probe ที่ใช้ติดที่ผิว AuNPs หรือ probe ที่ใช้ตรึงลงบน Nitrocellulose membrane ทั้งแบบ Methylation และ Unmethylation โดย probe ทั้งหมดจะมี  $T_m = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  และมี mismatch ของเบสใน probe แต่ละแบบจำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับบริเวณ CG dinucleotide

เพื่อที่จะลด non specific binding และลด  $T_m$  ของ probe จึงต้องหาความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมกับ Lateral flow strip test แบบ Methylation และ Unmethylation โดยใช้ความเข้มข้นของ Formamide ที่ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% และ 45% โดยใช้ 6X SSC ใน Hybridization buffer (1%BSA, 0.2% tween 20, 0.01% SDS) พบว่า Lateral flow strip test แบบ Methylation ความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมคือ 40% ซึ่งสามารถลด non specific binding ของ Unmethylation target ที่ test line อย่างสมบูรณ์ โดยความเข้มข้นของ Methylation target ที่ test line ยังคงเดิม ส่วน Lateral flow strip test แบบ Unmethylation ความเข้มข้นของ Formamide ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถลด non specific binding ของ Methylation target ที่ test line อย่างสมบูรณ์ โดยความเข้มข้นของ Umethylation target ที่ test line ยังคงเดิม คือ 25% ทั้งนี้ formamide จะมีคุณสมบัติเป็นตัว helix destabiliser สามารถลด  $T_m$  ของ probe ได้

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target ที่ ชุด Lateral flow strip test สามารถวิเคราะห์ได้ พบว่า Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Methylation target คิดเป็นปริมาณ  $0.6\text{ fmol}$  ( $3.61 \times 10^8$  copies) และ Lateral flow strip test แบบ Unmethylation สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Unmethylation target คิดเป็นปริมาณ  $8\text{ fmol}$  ( $4.82 \times 10^9$  copies) ซึ่งมีค่าต่ำกว่างานวิจัยของ X. Mao และคณะ [32] ที่ใช้ Lateral flow strip test ตรวจจับ gDNA ของมนุษย์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target  $65\text{ fmol}$  ( $3.91 \times 10^{10}$  copies)

เมื่อนำเอา probe ที่ใช้ใน Lateral flow strip test แบบ Methylation และ Unmethylation มารวมกันเป็น Lateral flow strip test เดียวกัน โดยมีการสลับลำดับของตำแหน่ง Test line ของ Methylation และ Unmethylation biotin-probe ใช้ภาวะต่างๆที่ได้ปรับมาอย่าง

เหมาะสมในการทดลองก่อนหน้านี้อีก พร้อมใช้ Synthetic target แบบ Non target, Methylation, Unmethylation, Methylation+Unmethylation และ น้ำ (control) เป็นตัวทดสอบความจำเพาะ พบว่า Duplex lateral flow strip test มีความจำเพาะต่อ Synthetic target แต่ละแบบโดยที่ Duplex lateral flow strip test ที่ใช้น้ำ และ Synthetic target แบบ Non target จะพบว่าไม่ปรากฏแถบของ AuNPs บริเวณ Test line เลย จะแถบที่ Control line เท่านั้น ส่วน Synthetic target แบบ Methylation, Unmethylation, Methylation+Unmethylation จะพบว่า เกิดแถบสีชมพูของ AuNPs-probe ที่บริเวณ Test line ตรงตามชนิดของ Synthetic target และชนิดของ Streptavidin-Biotin probe บน Test line นั้นทุก strip

ในการทดลองใช้ Duplex lateral flow strip test จากตัวอย่าง DNA จาก Bisulfite treatment DNA ของคนปกติและผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี พบ Duplex lateral flow strip test ทั้งที่ใช้ DNA ของคนและผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี พบแถบสีชมพูเฉพาะที่ Control line เท่านั้น ซึ่งมีสาเหตุมาจาก Sensitivity ของ Duplex lateral flow strip test ไม่พอที่จะสามารถตรวจจับ DNA ที่ได้จากการทำ Bisulfite treatment ได้ โดยในการทำ Bisulfite treatment จะใช้ DNA เริ่มต้นที่ 1 ug ( $2.9 \times 10^5$  copies) โดย Lateral flow strip test แบบ Methylation สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Methylation target คิดเป็นปริมาณ 0.6 fmol ( $3.61 \times 10^8$ ) และ Lateral flow strip test แบบ Unmethylation สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของ Synthetic target แบบ Unmethylation target คิดเป็นปริมาณ 8 fmol ( $4.82 \times 10^9$  copies) เท่านั้น ทั้งนี้ ในการทำ Bisulfite treatment พบว่า จะเกิดการ Degrade ของ DNA ประมาณ 84-96% ของ DNA ที่นำมาทำ Bisulfite treatment [33]

ในการทดลองใช้ Duplex lateral flow strip test จากตัวอย่าง DNA จาก PCR product หลังจากการทำ MSP พบ สามารถวิเคราะห์ DNA methylation ของคนปกติและผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีได้ โดยของคนปกติเกิดแถบขึ้นที่ Test Line ของ Methylation และ Unmethylation โดยที่ Test Line ของ Unmethylation เกิดแถบขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอาจจะต้องมีปรับสภาวะของการทำ MSP เสียก่อน

โดยส่วนใหญ่แล้วในการตรวจวิเคราะห์ DNA โดยในหลักการของ Lateral flow strip test นั้น มักจะมีการเพิ่มปริมาณ DNA ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ เช่น ในงานวิจัยของ Loannis [34] และคณะที่ใช้เทคนิค Primer extension ในการเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ SNP genotyping หรือ Dimitra และคณะ ที่ตรวจ SNP genotyping ที่สนใจ Lateral flow strip test วิเคราะห์ DNA ligation product [35]

## สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคพร่าเตอร์-วิลลี่ ในรูปของ Lateral flow strip test โดยมี gold nanoparticles เป็นตัวรายงาน พบว่าสามารถตรวจจับ Synthetic target ได้ปริมาณต่ำสุดของ Methylation ที่ 0.6 fmol และ Unmethylation ที่ 8 fmol เมื่อทดสอบความจำเพาะของ Lateral flow strip test ที่รวม probe ของ Methylation และ Unmethylation อยู่ใน strip เดียวกัน พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Synthetic target ของ Methylation และ Unmethylation ได้อย่างชัดเจน ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคพร่าเตอร์-วิลลี่ Lateral flow strip test ยังคงต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณ Target DNA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DNA methylation ซึ่งยังจำเป็นต้องปรับสภาวะของการเพิ่มปริมาณ Target DNA เสียก่อน ซึ่งงานวิจัยและองค์ความรู้ดังกล่าว สามารถนำไปเป็นต้นแบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโรคชนิดอื่นต่อไป

## ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าการศึกษาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคพร่าเตอร์-วิลลี่ ในรูปของ Lateral flow strip test โดยมี gold nanoparticles เป็นตัวรายงาน สามารถตรวจจับตัวอย่าง DNA ได้และยังมีสิ่งที่น่าสนใจที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา ที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต ดังต่อไปนี้

1. การปรับสภาวะของการเพิ่มปริมาณ DNA target ให้เหมาะสม ก่อนที่จะนำมาใช้กับชุดตรวจวินิจฉัยโรค พร่าเตอร์-วิลลี่
2. เพิ่มสัญญาณที่ผิวของ AuNPs-probe เพื่อเพิ่ม sensitivity ของชุดตรวจ



## รายการอ้างอิง

- [1] Cassidy, S.B. Prader-Willi and Angelman syndromes: Disorders of genomic imprinting. Medicine 77, 2 (1998) : 140-51.
- [2] Glenn, C.C., Driscoll, D.J., Yang, T.P., and Nicholls, R.D. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. Molecular Human Reproduction 3, 4 (1997) : 321-32.
- [3] Zeschnick, M., and other. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Human Molecular Genetics 6, 3 (1997) : 387-95.
- [4] ดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล. สาเหตุของการเกิดโรคพราดอร์-วิลลี. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: <http://gotoknow.org/blog/pws/144187> [11 กรกฎาคม 2552]
- [5] McCandless, S.E., and Cassidy, S.B. Molecular genetic findings in Prader-Willi syndrome. In M.G. Butler (ed.), Management of Prader-Willi Syndrome, pp.58-73. New York : Springer Science+Business Media, 2006.
- [6] McCandless, S.E., and Cassidy, S.B. Diagnostic criteria for Prader-Willi syndrome. In S.E. McCandless, and S.B. Cassidy (ed.), Management of Prader-Willi Syndrome, pp.49-57. New York: Springer Science+Business Media, 2006.
- [7] Butler, M.G. The genetics of Prader-Willi syndrome: An explanation for the rest of us Prader-Willi syndrome association (USA). [Online]. 2009. Available from : <http://www.pwsausa.org/> [2009,Jun 26]
- [8] Ramsden, J.J. What is nanotechnology. Nanotechnology perception 1 (2005) : 3-15.
- [9] Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., and David, A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. Journal of Colloid and Interface Science 331 (2009) : 251-62.
- [10] Baptista, P., Pereira, E., and Eaton, P. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. Analytical and bioanalytical chemistry 391, 3 ( 2007) : 943-50.

- [11] Nanoprobe. Colloidal Gold and Nanogold® in Immunochromatographic Assay Devices. [Online]. 2007. Available from : [www.nanoprobes.com/Vol8\\_Iss5.html](http://www.nanoprobes.com/Vol8_Iss5.html) [2009,Jun 26]
- [12] SATO, K., HOSOKAWA, K., and MAEDA, M. Colorimetric biosensors based on DNA nanoparticle conjugates. The Japan Society for Analytical Chemistry 23 (2007) : 17-20
- [13] Ackerson, C.J., Sykes, M.T., and Kornberg, R.D. Defined DNA/nanoparticle conjugates. PNAS 102, 38 ( 2005) : 13383-5.
- [14] Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., and Letsinger, R.L. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. Journal of the American Chemical Society 120 (1998) : 1959-64.
- [15] Reynolds, A.J., Haines, A.H., and Russell, D.A. Gold glyconanoparticles for mimics and measurement of metal ion-Mediated carbohydrate-carbohydrate interactions. Langmuir 22 (2006) : 1156-63.
- [16] Condon, A. Designed DNA molecules : principles and applications of molecular nanotechnology. Nature Reviews Genetics 7 (2006) : 565-75.
- [17] Pingarro', J.M., Ya´nẽez-Sedenõ, P., and Iez-Corte´s, A.G. Gold nanoparticle based electrochemical biosensors. Electrochimica Acta 53 (2008) : 5848–66.
- [18] Chen, P.C., Mwakwari, S.C., and Oyelere, A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. Nanotechnology, Science and Applications 1 (2008) : 45–66.
- [19] Yeh, C.H., Hung, C.Y., Chang, T.C., Lin, H.P., and Lin, Y.C. An immunoassay using antibody-gold nanoparticle conjugate, silver enhancement and flatbed scanner. Microfluid Nanofluid 6 (2009) : 85-91.
- [20] Thaxton, C.S., Georganopoulou, D.G., and Mirkin, C.A. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. Clinica Chimica Acta 363 (2006) :120-6.
- [21] Oyelere, A.K., Chen, P.C., and Huang, X. Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. Bioconjug Chem 18 (2007) : 1490-7.

- [22] Reynolds, R.A., Mirkin, C.A., and Letsinger, R.L. A gold nanoparticle/latex microsphere-based colorimetric oligonucleotide detection method. Pure and Applied Chemistry 72 (2000) : 229–35.
- [23] Lazarides, A.A., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., and Schatz, G.C. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? Journal of the American Chemical Society 122, 19 (2000) : 4640-50.
- [24] White, K.A., and Rosi, N.I. Gold nanoparticle-based assays for the detection of biologically relevant molecules. Nanomedicine 3, 4 (2008) : 543-53.
- [25] Li, H., Nelson, E., Pentland, A., Buskirk, J.V., and Rothberg, L. Assays based on differential adsorption of single-stranded and double-stranded DNA on unfunctionalized gold nanoparticles in a colloidal suspension. Plasmonics 2 (2007) : 165–71.
- [26] Li, H., and Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. PNAS 101, 39 (2004) : 14036–9.
- [27] Li, H., and Rothberg, L.J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. Journal of the American Chemical Society 126, 35 (2004) : 10958-61.
- [28] Li, Q., Liu, L., Chen, W., Peng, C., Wang, L., and Xu, C. Gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for the detection of 7-aminoclonazepam in urine. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 89, 4(2009) : 261-8.
- [29] RDT Info. Lateral-flow: test components [Online]. 2009. Available from : <http://www.rapid-diagnostics.org/tech-lateral-components.htm> [2009,Jun 26]
- [30] Heron Diagnostics. Your Source for Rapid Diagnostic Technology [Online]. 2009. Available from : [www.herondiag.com](http://www.herondiag.com) [2009,Jun 26]
- [31] Kalogianni, D.P., Bravou, V., Christopoulos, T.K., Ioannou, P.C., and Zoumbos, N.C. Dry-reagent disposable dipstick test for visual screening of seven leukemia related chromosomal translocations. Nucleic Acids Research 35, 4 (2007) : 1-12.

- [32] Mao, X., Ma, Y., Zhang, A., Zhang, L., Zeng, L., and Liu, G. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. Analytical Chemistry 81 (2009) : 1660–8.
- [33] Grunau, C., Clark S.J., and Rosenthal, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Research 29, 13 (2001) : 1-7.
- [34] Dimitra, K., Toubanaki, T.K., Christopoulos, P.C., Ioannou, and Christodoulos, S.F. Identification of Single-Nucleotide Polymorphisms by the Oligonucleotide Ligation Reaction: A DNA Biosensor for Simultaneous Visual Detection of Both Alleles. Analytical Chemistry 81, 1 (2009) : 218-224
- [35] Ioannis, K.L., Penelope, C.I., Theodore, K.C., Joanne, T.S., and, Emmanuel K. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by Primer Extension Reaction in a Dry-Reagent Dipstick Format. Analytical Chemistry 2, 79 (2007) : 395-402.

ภาคผนวก

### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Auto pipette (Transferpette<sup>®</sup>S:Brand)
2. Balance (DENVER INSTRUMENT:SI-234)
3. Gel Document (Gel Doc<sup>™</sup>:Bio-Rad)
4. Hot air oven (Contherm:Model 8050)
5. Hot plate stirrer (IKA<sup>®</sup>:C-MAG HS7)
6. Microcentrifuge (Hettich:MICRO 120)
7. Mixer (VORTEX-GENIE<sup>®</sup>2)
8. Nanodrop (Thermo scientific)
9. PCR cabinet
10. pH/mV meter (DENVER INSTRUMENT:UB-10)
11. Power supply (Cleaver:MP250V)
12. Rocking shaker (Heidolph:Duomax 1030)
13. Thermal cyclor (ABI)
14. UV-vis spectroscopy (BECKMAN COULTER:DU 800)
15. Vaccum pump
16. Vertical Electrophoresis Equipment (Cleaver:omniPAGE mini)
17. Water Bath (Memmert)

### วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Absorbent pad 319 18 cm x 30 cm (Ahlstrom)
2. Backing card (G&L)
3. Centrifuge Tube 15 mL (Corning Incorporated)
4. Centrifuge Tube 50 mL (Corning Incorporated)
5. DNA Clean-Up System (Wizard<sup>®</sup>Promega)
6. Glass fiber 8964 18 cm x 30 cm (Ahlstrom)
7. Hi-Flow Plus Membranes HF180 (Millipore)
8. Hi-Flow Plus Membranes HF240 (Millipore)

9. Microcentrifuge Tube (costar<sup>®</sup>)
10. Microcon YM-30 (Millipore)
11. Nano-cap tip 0.1-20 ul (Brand)
12. PCR tube 0.2 ml Flat cap (Axygen)
13. T300 Pipet Tips Series 0.5-10 ul (Axygen)
14. TF100RS Filter Tip Series 1-100 ul (Axygen)
15. TF200RS Filter Tip Series 200 ul (Axygen)
16. TF420RS Filter Tip 0.5-20 ul (Axygen)
17. Universal Fit pipette Tips 1-100 uL (Corning Incorporated)
18. Universal Fit pipette Tips 100-1000 uL (Corning Incorporated)

#### **สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการวิจัย**

1. 40% Acrylamide:bis (19:1) (AMRESCO)
2. Ammonium per sulfate (Pro<sup>®</sup>Pure<sup>™</sup>)
3. Boric acid (SIGMA-ALDRICH)
4. Bovine Serum Albumin (SIGMA-ALDRICH)
5. Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (SIGMA-ALDRICH)
6. dNTP Mix, PCR Grade (200  $\mu\text{l}$ ) (QIAGEN)
7. Ethyl alcohol (Merck)
8. Ethylenediaminetetraacetic acid (SIGMA-ALDRICH)
9. Formamide, deionized Ultra Pure (BIO BASIC INC)
10. GelRED<sup>™</sup> (Biotium)
11. HotStarTaq DNA Polymerase (250 U) (QIAGEN)
12. Hydrochloric acid (HCl) (Merck)
13. Hydrogen tetracholoaurate (III) trihydrate (SIGMA-ALDRICH)
14. Hydroquinone (SIGMA-ALDRICH)
15. Isopropyl alcohol (BIO BASIC INC)
16. Low Range DNA Ladder, 25-700 bp (Fermentas)
17. Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) (J.T.Baker)

18. QIAamp dna blood mini kit (QIAGEN)
19. Sodium bisulfite (SIGMA-ALDRICH)
20. Sodium Chloride (SIGMA-ALDRICH)
21. Sodium dodecyl sulfate (Merck)
22. Sodium hydroxide (Merck)
23. Sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (SIGMA-ALDRICH)
24. Streptavidin (SIGMA-ALDRICH)
25. Sucrose (SIGMA-ALDRICH)
26. Tetramethylethylenediamine (TEMED) (SIGMA-ALDRICH)
27. Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (SIGMA-ALDRICH)
28. Trisodium citrate dihydrate (SIGMA-ALDRICH)
29. Tween 20 (SIGMA-ALDRICH)

### การเตรียมสารเคมี

1. Aqua regia ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$ )
  - 1.1 ตวง HCl ปริมาตร 30 mL เทใส่ขวด
  - 1.2 ตวง  $\text{HNO}_3$  ปริมาตร 10 mL เทใส่ขวดในข้อ 1.1 แล้วผสมให้เข้ากัน
2. 1% hydrogen tetracholoaurate (III) trihydrate ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
  - 2.1 ล้างขวดด้วย aqua regia ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$ )
  - 2.2 ล้างขวดด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water)
  - 2.3 ละลาย 1 g hydrogen tetracholoaurate (III) trihydrate ในน้ำ Deionized ปริมาตร 100 mL
3. 38.8 mM trisodium citrate dihydrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
  - 3.1 ชั่ง  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (M.W. = 294.10) 1.14 g
  - 3.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 100 mL



4. 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), (M.W. = 286.65)
  - 4.1 ชั่ง TCEP 14.3 mg
  - 4.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 0.5 mL
  - 4.3 ดูดสารละลายข้อ 4.2 ปริมาตร 100  $\mu$ L มาเจือจางด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 900  $\mu$ L
  
5. Phosphate adjustment buffer (100 mM phosphate buffer (pH 7.0))
  - 5.1 ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (M.W. = 141.96) 0.562 g และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (M.W. = 120) 0.125 g
  - 5.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 40 mL
  - 5.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วเติมน้ำ Deionized จนได้ปริมาตร 50 mL
  
6. 20X Saline-sodium citrate (SSC) buffer (3 M NaCl และ 0.3 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pH 7))
  - 6.1 ชั่ง NaCl (M.W. = 58.44) 87.65 g และ  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (M.W. = 294.1) 44.1 g
  - 6.2 ละลายในน้ำ Deionized ปริมาตร 400 mL
  - 6.3 ปรับ pH ให้ได้ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 mL
  
7. 10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)
  - 7.1 ชั่ง SDS (M.W. = 288.38) 1 g
  - 7.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 10 mL
  
8. Salting buffer (10 mM phosphate buffer + 2 M NaCl (pH 7.0))
  - 7.1 ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (M.W. = 141.96) 56.2 mg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (M.W. = 120) 12.5 mg และ NaCl (M.W. = 58.44) 5.844 g
  - 7.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 40 mL
  - 7.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วเติมน้ำ Deionized จนได้ปริมาตร 50 mL
  
9. Washing buffer (10 mM phosphate buffer + 150 mM NaCl (pH = 7.4))
  - 9.1 ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (M.W. = 141.96) 56.2 mg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (M.W. = 120) 12.5 mg และ

NaCl (M.W. = 58.44) 438.3 mg

9.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 40 mL

9.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วเติมน้ำ Deionized จนได้ปริมาตร 50 mL

10. 12 M NaOH

10.1 ชั่ง NaOH (M.W. = 40) 24 g

10.2 ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 mL

11. Eluent buffer (20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 5% BSA, 0.25% Tween 20 และ 10 % sucrose)

11.1 ชั่ง  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (M.W. = 163.94) 81.97 g, BSA 1.25 g และ sucrose 2.5 g

11.2 ละลายด้วยน้ำ Deionized ปริมาตร 25 mL

11.3 เติม Tween 20 ปริมาตร 62.5  $\mu\text{L}$

12. Phosphate buffer saline (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), และ 0.14 M sodium chloride (NaCl), pH 7.4)

12.1 ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (M.W. = 141.982) 1.42 g และ NaCl (M.W. = 58.44) 8.18 g

12.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL

12.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 mL

13. 10X TBE

13.1 ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (M.W. = 121.14) 108 g, boric acid (M.W. = 61.83) 55 g และ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (M.W. = 292.24) 2.92 g

13.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 mL

14. 8% Non denaturing polyacrylamide gel

14.1 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 7 mL ลงในปึกเกอร์

14.2 เติม 10X TBE ปริมาตร 1 mL

14.3 เติม 40% Acrylamide:bis (19:1) ปริมาตร 2 mL

14.4 เติม 10% Ammonium per sulfate ปริมาตร 100 uL

14.5 Tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 10uL ผสมให้เข้ากัน

15. 3X GelRed™

15.1 เจือจาง GelRed™ 10,000X stock ปริมาตร 15 uL ในน้ำ Deionized ปริมาตร 45 mL

15.2 เติม 1 M NaCl ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากัน

ลำดับเบสของ Small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N (SNRPN) gene

```

1 TCTAGAGGCC CCCTCTCATT GCAACAGTGC TGTGGGGCCC TAGGGGTCCA GTAGCCCCCT
61 CCCCCAGGT CATTCCGGTG AGGAGGGAG CTGGGACCCC TGCACTGCCG CAAACAAGCA
121 CGCCTGCCCG GCCGCAGAGG CAGGCTGGCG CGCATGCTCA GGCGGGGATG TGTGCCAAGC
181 CTGCCGCTGC TGCAGCGAGT CTGGCGCAGA GTGGAGCGGC CGCCCGAGAT GCCTGACGCA
241 TCTGTCTGAG GAGCGGTCAG TGACCGCGATG GAGCGGGCAA GGTCAGCTGT GCCGGTGGCT

```

**Exon 1**

การออกแบบ probe ที่ใช้ในการทำชุด Lateral flow strip test

```

Biotin-Probe Urmet 3'-CACCTCACCA ACAACCTCTA CAAACTAC-5'
Urmet181 TTGTTGTTGT TGTAGTGAGT TTGGTTAGA GTGGAGTGGT TGTGGAGAT GTTGTGTA

```

Biotin-Probe Met 3'-GCCA GCAGCCTCTA CAAACTGC-5'

```

Met181 TTGTTGTTGT TGTAGCGAGT TTGGCGTAGA GTGGAGCGGT CGTCCGAGAT GTTGTGCGTA
241 TCTGTCTGAG GAGCGGTCAG TGACCGCGATG GAGCGGGCAA GGTCAGCTGT GCCGGTGGCT

```

3'-ACCAATC ACTACACTAC CTCACCCATT C-5' AuNPs-Probe Urmet

```

Urmet241 TTTGTTTGTAG GAGTGGTTAG TGATGTGATG GAGTGGTAA GGTTAGTTGT GTTGGTGGTT

```

3'-GCCAATC ACTGCGCTAC CTCGC-5' AuNPs-Probe Met

```

Met241 TTTGTTTGTAG GAGCGGTTAG TGACCGCGATG GAGCGGGTAA GGTTAGTTGT GTCCGTGGTT

```

## การตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีด้วยวิธี Methylation specific PCR (MSP)

### 1. ขั้นตอนการทำ

- 1.1 แช่ Bisulfite treatment DNA ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 1.2 เตรียม Master mix และ primer ดังตารางที่ 5
- 1.3 เติม Bisulfite treatment DNA ปริมาตร 5 uL
- 1.4 นำ tube ที่มี PCR mix ไปใส่เครื่อง Thermal cycler โดยตั้ง condition ดังตารางที่ 6
- 1.5 นำ PCR product ที่ได้ มาแยกบน 8% Non denaturing polyacrylamide gel ใน 1X TBE โดยใช้ความต่างศักย์ 110 V เป็นเวลา 70 นาที
- 1.6 แช่เจลใน 3X GelRed™ โดยวางอยู่บน Rocking shaker เป็นเวลา 30-40 นาที
- 1.7 อ่านผลและถ่ายภาพเจลโดยใช้ Gel Doc™

Primer	Type	Sequences	bp	Tm	Product
Methylation	Forward	5'-CGTTGTTGTAGCGAGTTTGGC-3'	21	61	97 bp
	Reverse	5'-CTTACCCGC-TCCATCGCG-3'	18	61	
Unmethylation	Forward	5'-TTGTTGTTGTTGTAGTGAGTTTGGT-3'	25	61	106 bp
	Reverse	5'-CTAACCTTACCCACTCCATCACA-3'	23	63	

ตารางที่ 5 แสดง primer ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีด้วยวิธี Methylation specific PCR

### 2. การเตรียม Master mix ต่อ 1 ตัวอย่างใน microtube 0.2 mL

dNTP Mix	0.4	uL
25 mM MgCl	1.2	uL
HotStarTaq DNA Polymerase	0.1	uL
20 mM Forward Unmethylation	0.5	uL
20 mM Reverse Unmethylation	0.5	uL
20 mM Forward Methylation	0.5	uL
20 mM Reverse Methylation	0.5	uL
RNase-Free Water	9.9	uL
10X PCR buffer	2.0	uL

อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	
95	15	
95	1	35 รอบ
63	1	
72	1	
72	10	
4	∞	

ตารางที่ 6 แสดง Condition ของการทำ Methylation specific PCR

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวีรวัฒน์ ก่อเกียรติสกุล เกิดเมื่อวันที่ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2523 ณ จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ปัจจุบันเป็นพนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ สังกัด หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล