



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

พิธีโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด:
หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

โดย ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ

เดือน-ปี ที่เสร็จโครงการ กันยายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ พิธีโรลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด:
หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 3. ผศ.ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 4. ดร.ธนศวรร นวลใย | คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ |
| 5. ดร.ธนัชฐ์ ปราณีนรารัตน์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 6. ดร.นำพล อินสิน | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 7. ดร.แพรทอง เหลลาภา | หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร |
| 8. ดร. คริสโตเฟอร์ สมิต | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(ย้ายที่ทำงานไปมหาวิทยาลัยมหิดลตั้งแต่ตุลาคม 2558) |
| 9. รศ.ดร.วรวิทย์ โฮვნัน | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 10. รศ.ดร.ปณิต ดาวรังกูร | ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 11. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คุณาธารณา | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 12. ผศ.ดร.วรากร ลิ้มบุตร | ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 13. ผศ.ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 14. ผศ.ดร. ชิตนันท บุนนชัย | ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 15. ผศ.ดร. จงดี ธรรมเขต | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 16. รศ.ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 17. ผศ.ดร.บุญจิรา บุญทา | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 18. ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 19. ดร.อุทัย วิชัย | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 20. ผศ.ดร.ศัชรินทร์ ศิริวงศ์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 21. อ.ดร.วรรณชณี สิทธิวงษ์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องพีโรไลดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้ ได้ดำเนินการไปจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของหลายฝ่าย กระผมในฐานะหัวหน้าโครงการขอขอบคุณ แหล่งเงินทุนสนับสนุน ได้แก่ ทุนศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2557 (DPG5780002) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และแหล่งทุนอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้อง รวมทั้ง ทุนวิจัยของผู้ร่วมโครงการ และทุนอื่นๆ ที่ให้แก่บัณฑิต-นักศึกษา ได้แก่ทุนปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ทุนโครงการพัฒนาอัจฉริยภาพทางวิทยาศาสตร์สำหรับเด็กและเยาวชน (JSTP) ขอขอบคุณสถาบันต้นสังกัดของหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ ระบบสาธารณูปโภค และการสนับสนุนอื่นๆ ที่จำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร ที่ได้รับเป็นเจ้าภาพดูแลเรื่องสถานที่ในการจัดประชุมวิชาการประจำปีของกลุ่มวิจัยครั้งที่ 2 และ 3 สุดท้ายต้องขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่าน ทั้งอาจารย์ผู้ร่วมโครงการ และนิสิตนักศึกษา และผู้ช่วยวิจัยที่อยู่ในโครงการรวมกว่า 30 รวมทั้งผู้ร่วมวิจัยที่ไม่ได้อยู่ในโครงการอีกจำนวนมากที่ไม่สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมด หากปราศจากท่านเหล่านี้แล้วงานคงจะดำเนินไปไม่ได้ สุดท้ายขอขอบคุณคุณโชติมา วิไลวัลย์ เจ้าหน้าที่โครงการที่ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกในโครงการ ตั้งแต่การจัดซื้อ ทำบัญชี งานเอกสาร ดูแลห้องปฏิบัติการ รวมถึงการส่งเคราะห์พีเอ็นเอให้กับผู้ร่วมโครงการและผู้อื่นที่ต้องการใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอนี้

ล.ป.

เลขหมู่จด ๑๐ ๐๑๔๔๙๖ ๒๑๕๐ ส.๑

เลขทะเบียน ๐๑๔๔๙๖

วัน, เดือน, ปี ๒๒ พ.ย. ๖๐

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DPG5780002

ชื่อโครงการ: พิโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้
ชื่อนักวิจัย: อีรยุทธ วิไลวัลย์และคณะ

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

ระยะเวลาของโครงการ: 3 ปี (17 มีนาคม 2559 ถึงวันที่ 16 มีนาคม 2560 ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560)

เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดหรือพีเอ็นเอเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบดีเอ็นเอที่มีโครงหลักคล้ายเพปไทด์ซึ่งมีความเป็นกลางทางไฟฟ้า และสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก จากความสำเร็จที่ผ่านมาในการพัฒนาเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัดโดยมีโครงหลักเป็นแอลฟาและเบต้าอะมิโนแอซิดเรียงสลับกันที่ได้มาจากโพรลีนและกรดเบต้าอะมิโนที่เป็นวงแหวน เช่น acpcPNA, acbcPNA และ epi-acpcPNA งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การขยายขอบเขตของสมบัติหน้าที่และการประยุกต์ใช้งานของพีเอ็นเอระบบใหม่ในกลุ่มนี้ออกไปอีก โดยได้มีการออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของพิโรลิดินิลพีเอ็นเอระบบใหม่ มีการเพิ่มเติมหน้าที่และสมบัติใหม่เข้าไปในพิโรลิดินิลพีเอ็นเอโดยการตัดแปรเชิงเคมีด้วยเบสที่ไม่พบในธรรมชาติ สีย้อมเรืองแสงฉลากที่ตอบสนองกับเคมีไฟฟ้า และหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา และนำพิโรลิดินิลพีเอ็นเอเหล่านี้ไปพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเชิงแสงหรือเคมีไฟฟ้า ร่วมกับการขยายสัญญาณทั้งแบบที่ใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์เช่น ปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยดีเอ็นเอเทมเพลต การใช้พอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ และวัสดุนาโน ในรูปแบบที่ใช้งานได้ง่าย ตลอดจนการนำไปประยุกต์ใช้ในวัตถุประสงค์ทางการแพทย์ อาหาร และการเกษตร นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาระบบทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้พิโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ตรึงบนอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโน รวมถึงการศึกษาปัจจัยเชิงโครงสร้างที่ส่งผลต่อการจับยึดที่เป็นลักษณะเฉพาะของพิโรลิดินิลพีเอ็นเอโดยใช้การคำนวณทางทฤษฎีประกอบกับผลการทดลอง งานวิจัยนี้อาศัยพิโรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วมในการดั่งนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญจากหลายสาขาได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ เคมีวิเคราะห์ เคมีพอลิเมอร์ นาโนเทคโนโลยี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีคำนวณ และการเชื่อมโยงระหว่างเคมีกับชีววิทยาการทำงานร่วมกัน ผลผลิตที่ได้คือผลงานตีพิมพ์มากกว่า 20 เรื่องในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพสูง โดยบางวารสารจัดอยู่ในระดับแนวหน้า นอกจากนี้ยังได้มีส่วนในการสร้างบุคลากรด้านวิจัยซึ่งรวมถึงนักวิจัย 20 คนและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกอย่างน้อย 20 คน จาก 7 สถาบัน และเครือข่ายงานวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

คำสำคัญ: DNA; PNA; fluorescence; genotyping; diagnostic; functional probes

Abstract

Project Code : DPG5780002

Project Title : Conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acids: New functions and applications

Investigators : Tirayut Vilaivan and co-workers

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

Project Period : 3 years (17 March 2014 - 16 March 2017 extended to 16 September 2017)

Peptide nucleic acid or PNA is a type of DNA mimic with electrostatically neutral peptide-like backbone that can bind strongly and specifically to DNA and RNA targets following Watson-Crick base pairing rules. Based on our previous success in developing a new class of conformationally-constrained peptide nucleic acid bearing alternating α/β -peptide backbone derived from proline and cyclic β -amino acids such as acpcPNA, acbcPNA and *epi*-acpcPNA, this research aims to expand this capability and applications of these new PNA systems further. New pyrrolidinyl PNA with have been designed, synthesized and evaluated for base pairing properties. New functions and properties have been incorporated into pyrrolidinyl PNA by chemical modification with unnatural bases, fluorescence dyes, electroactive labels and chemically reactive groups. New optical and electrochemical methods for DNA/RNA sequence determination using pyrrolidinyl PNA as the sensing element in combination with enzyme- and non-enzyme-based signal amplification technologies such as DNA-templated reactions, hydrophilic polymers, and nanomaterials in a simple-to-use platforms have been investigated together with their applications in medical and/or food/agricultural sciences. A DNA purification system based on pyrrolidinyl PNA probes immobilized onto magnetic nanoparticles has also be developed. In addition, structural basis of many unusual properties of pyrrolidinyl PNA was be investigated using combined experimental and theoretical approaches. The research, with our unique pyrrolidinyl PNA as a common focal point, has put together expertises from several research areas including organic synthesis, analytical chemistry, polymer chemistry, nanotechnology, computational chemistry as well as the interface between chemistry and biology. This resulted in more than 20 publications in high quality international journals, some of which are among the top tier ranks. In addition, high quality research personnel including 20 researchers and at least 20 graduate students from 7 institutions and a long-lasting research network at national and international levels.

Keywords: DNA; PNA; fluorescence; genotyping; diagnostic; functional probes

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)
ทุนศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น (DPG5780002)

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย พิริโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์มเมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

ภาษาอังกฤษ Conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acids:
New functions and applications

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: 022187627 ต่อ 101

โทรศัพท์เคลื่อนที่: 0839868772

โทรสาร: 022187598

อีเมล: vtirayut@chula.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย เคมี

4. งบประมาณทั้งโครงการ 8,994,000.- (แปดล้านเก้าแสนเก้าหมื่นสี่พันบาทถ้วน)

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

เสนอต่อ _____

ชื่อโครงการที่เสนอ _____

กำหนดทราบผล(หรือสถานภาพเท่าที่ทราบ) _____

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

การเข้าคู่กันตามกฎของวัตสัน-คริกระหว่างนิวคลีโอเบสคู่สมในกรดนิวคลีอิกเป็นรากฐานสำคัญของการเก็บรักษาและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลกนี้ มันยังนำไปสู่การประยุกต์ใช้กรดนิวคลีอิกและสารเลียนแบบที่ได้จากการสังเคราะห์ในด้านต่างๆ เช่น การรักษา การตรวจ

วินิจฉัย และการพัฒนาวัสดุชนิดใหม่ โครงสร้างตามธรรมชาติของกรดนิวคลีอิกอาจไม่เหมาะสมสำหรับ วัตถุประสงค์เหล่านี้เนื่องจากความเสถียรทางเคมีและชีวภาพที่จำกัด นอกจากนี้ สมบัติและหน้าที่ของ กรดนิวคลีอิกที่จะนำไปใช้งานดังกล่าวอาจจำเป็นต้องมีการดัดแปลง เช่น การเพิ่มหมู่ที่ทำหน้าที่รายงาน ผล หรือหมู่ที่ทำหน้าที่อื่นเข้าไป แม้ว่าการดัดแปลงดังกล่าวจะทำให้ได้ง่ายด้วยเทคโนโลยีการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในปัจจุบัน การปรับเปลี่ยนสมบัติพื้นฐานอื่นของกรดนิวคลีอิก เช่น ความแข็งแรง ของการจับยึด ความจำเพาะเจาะจง และการเลือกจับกับกรดนิวคลีอิกต่างชนิดกันจะเป็นไปได้ยาก อย่างไรก็ตาม กฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริกสามารถใช้กับสารเลียนแบบสารพันธุกรรมอื่นๆ ที่ได้จาก การปรับเปลี่ยนส่วนของโครงสร้างหลักของกรดนิวคลีอิก เช่น น้ำตาล (เช่น แอลเอ็นเอ) ฟอสเฟต (เช่น ฟอสโฟโรไทโอเอต) หรือแม้แต่การแทนที่โครงสร้างหลักทั้งหมด (เช่น มอร์โฟลิโน และเพปไทด์นิวคลีอิก แอซิด (พีเอ็นเอ)) ในบรรดาสารเลียนแบบสารพันธุกรรมเหล่านี้ พีเอ็นเอมีความโดดเด่นเนื่องจากในแง่ ของโครงสร้างทางเคมี สิ่งเดียวที่พีเอ็นเอมีเหมือนกับกรดนิวคลีอิกธรรมชาติได้แก่นิวคลีโอเบส A, T, C และ G ดังนั้นจึงไม่เป็นที่น่าประหลาดใจหากพีเอ็นเอจะแสดงสมบัติเฉพาะตัวที่ไม่พบในสารเลียนแบบกรด นิวคลีอิกชนิดอื่น เช่น การที่พีเอ็นเอปราศจากประจุ และความเสถียรต่อการถูกย่อยด้วยนิวคลีโอเอส อยากรู้ก็ตาม สิ่งสำคัญคือพีเอ็นเอนอกจากจะสามารถจับคู่กับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และตัวมันเองตามกฎ ของวัตสัน-คริกแล้ว การเข้าคู่นั้นยังแข็งแรงและมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าที่พบในสารพันธุกรรมใน ธรรมชาติและสารสังเคราะห์เลียนแบบสารพันธุกรรมอื่นๆ ส่วนใหญ่ สมบัติเหล่านี้ทำให้พีเอ็นเอเป็น โมเลกุลที่น่าสนใจทั้งในด้านการวิจัยพื้นฐานและการนำไปใช้ประโยชน์ ในด้านต่างๆ เช่นเดียวกับดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ ด้วยสมบัติบางประการที่แตกต่างออกไปทำให้อาจนำพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้ใน ด้านอื่นๆ ที่ไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแทนได้

ด้วยการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 (ทุน พัฒนานักวิจัย 2 ทุน และทุนเมธีวิจัยอาวุโส 1 ทุน) คณะผู้วิจัยได้สร้างสมรรถนะความรู้เกี่ยวกับพีเอ็นเอที่มี คอนฟอร์มเมชันที่ถูกจำกัดระบบใหม่ที่เรียกว่า พิริโรลิดินิลพีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยหน่วยโดเพปไทด์ที่เกิด จากดี-โพรลีน และเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน พิริโรลิดินิลพีเอ็นเอหลายชนิดได้ถูก ออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และการจับตัวกันเอง โดยพบว่า การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเพียงเล็กน้อย เช่น การหดหรือขยายขนาดของวงแหวน การปรับเปลี่ยนส เตอริโอเคมี มีผลกระทบต่อสมบัติของพิริโรลิดินิลพีเอ็นเออย่างมาก ซึ่งทำให้ทราบถึงกฎเกณฑ์ ข้อจำกัด และโอกาสในการออกแบบพีเอ็นเอชนิดใหม่ๆ ที่สามารถควบคุมสมบัติให้เหมาะสมต่อหน้าที่การใช้งาน ตัวอย่างของระบบพิริโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางที่สุดคือ acpcPNA ซึ่งประกอบด้วย หน่วยย่อยของ D-prolyl-(1S,2S)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid ซึ่งแสดงความสามารถใน การจับยึดกับดีเอ็นเอที่แข็งแรงกว่าพีเอ็นเอระบบดั้งเดิม (aegPNA) และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า ทั้ง ในเรื่องของการแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม และทิศทาง ของการจับยึด โดยคณะผู้วิจัยได้นำ acpcPNA เพื่อไปใช้เป็นโพรบสำหรับตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ ที่ให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น surface plasmon resonance, แมสสเปกโทรเมตรี, ฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตเมตรี และวิธีทางเคมีไฟฟ้า เป็นต้น

จากความสำเร็จของ acpcPNA ทำให้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ขึ้น โดยมีเป้าหมายหลักคือ 1) การออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มการละลายและลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยยังคงรักษาหรือมีสมบัติการจับยึดที่ดีขึ้น 2) การเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น การทำให้พีเอ็นเอมีสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมี เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยมีการขยายสัญญาณ 3) การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็นโพรบ ร่วมกับเทคนิคใหม่ เช่น DNA-templated or DNA-catalyzed reaction และ/หรือวัสดุสมัยใหม่ เช่น พอลิเมอร์ และวัสดุนาโน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การแพทย์ อาหาร และการเกษตร 4) การทำความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอ โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี เพื่อให้บรรลุเป้าหมายหลักทั้ง 4 ประการนี้ จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยอื่นที่มีความเชี่ยวชาญที่หลากหลาย ทำให้เกิดการสร้างเครือข่ายวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติโดยใช้ระบบพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วม ผลงานที่ได้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงแล้ว ยังอาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ และการผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์/เคมีวิเคราะห์/เคมีวัสดุ ทั้งในระดับปริญญาโท ปริญญาเอก และหลังปริญญาเอก รวมกันไม่น้อยกว่า 30 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนา งานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

8. วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด
2. เพื่อเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้วโดยวิธีการทางเคมี
3. เพื่อพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอเป็นโพรบและนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ อาหาร และการเกษตร
4. เพื่อทำความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี
5. เพื่อผลิตผลงานตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงและผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยด้านนี้
6. เพื่อสร้างเครือข่ายวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติโดยใช้ระบบพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วม

9. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็นหกโครงการย่อย ซึ่งครอบคลุมงานวิจัยเกี่ยวกับการออกแบบ การสังเคราะห์ และการศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกและการจับตัวกันเองของพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัด การเพิ่มหน้าที่ใหม่ของพีเอ็นเอโดยวิธีการทางเคมี การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการ

ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมและการทำสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยอาศัยพีเอ็นเอ และการคำนวณทางทฤษฎีเพื่ออธิบายสมบัติของพีเอ็นเอ

โครงการย่อยที่ 1: Conformationally restricted PNA with new structures and functions

โครงการนี้เกี่ยวข้องเนื่องกับการออกแบบพีโรลิดินิลพีเอ็นเอระบบใหม่ หรือพีโรลิดินิลพีเอ็นเอที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วแต่มีการดัดแปรทางเคมีเพื่อเพิ่มหน้าที่ใหม่ ซึ่งครอบคลุมถึง 1) การสังเคราะห์และประเมินสมบัติการจับยึดกรดนิวคลีอิกของพีโรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยโพลีรีนและเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีโครงสร้างเป็นไซคลิกอีเทอร์ 2) การสังเคราะห์ การประเมินสมบัติการจับยึดกรดนิวคลีอิก การละลาย และการลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง และความสามารถในการผ่านเข้าเซลล์ของพีโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ดัดแปรโครงสร้างด้วยหมู่ควินิดินหรือหมู่อะมิโน 3) การสังเคราะห์พีโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากสารเรืองแสงหนึ่งถึงสองชนิด และศึกษาสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ 4) การสังเคราะห์พีโรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีเบสที่ไม่เป็นมาตรฐานอย่างน้อย 2 ชนิด และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ และ 5) การสังเคราะห์พีโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารที่เรืองไวทางเคมีไฟฟ้าเพื่อนำไปเป็นโพรบสำหรับระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง

โครงการย่อยที่ 2: New approaches to improve the sensitivity of PNA-based DNA sequence detection

โครงการนี้เกี่ยวข้องเนื่องกับการพัฒนาระบบการขยายสัญญาณเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยพีเอ็นเอ และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม โดยแบ่งออกเป็นแนวทางต่างๆ คือ 1) การออกแบบและสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เร่งปฏิกิริยาได้และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณ 2) การพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีสมบัติในการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอเมื่อถูกกระตุ้นโดยวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอ 3) การพัฒนาปฏิกิริยาของพีเอ็นเอโพรบที่อาศัยดีเอ็นเอเทมเพลต 4) การพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement probe 5) การพัฒนาระบบการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอฐานกระดาษ และ 6) การพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอโพรบร่วมกับวัสดุนาโนแบบใหม่ที่อาศัยการเลือกเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอ

โครงการย่อยที่ 3: PNA-conjugated polymer brushes as platforms for DNA sequence determination

โครงการนี้เป็นการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์บริชที่ติดอยู่บนพื้นผิวของวัสดุต่างๆ เช่น แผ่นทอง อนุภาคนาโนของทอง หรือขั้วไฟฟ้าเคลือบทอง และตรึงพีเอ็นเอเข้ากับพื้นผิวเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยเทคนิค surface plasmon resonance เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า หรือเทคนิคการวัดดุกกลืนแสงหรือฟลูออเรสเซนส์

โครงการย่อยที่ 4: Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาไบโอเซ็นเซอร์ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงของการตรวจวัดที่สูงและสามารถตรวจวัดได้แบบ โดยอาศัยฟิสิกส์โรลิตินิลฟิเอ็นเอเป็นโพรบ โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อยคือ ๑) การใช้กราฟีนหรือวัสดุคอมโพสิตระหว่างกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยฟิเอ็นเอโพรบ และ ๒) การพัฒนาฟิเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสงร่วมกับดีเอ็นเอแอฟตาเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายโดยอาศัยหลักการของ FRET โดยทั้งสองส่วนจะเริ่มจากการออกแบบระบบ ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ศึกษาประสิทธิภาพของระบบ แล้วจึงนำไปประยุกต์ใช้งาน

โครงการย่อยที่ 5: Bioconjugation of anionic magnetic nanoparticle with PNA for DNA purification

โครงการนี้จะมุ่งเน้นการพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนที่ตรึงด้วยฟิโรลิตินิลฟิเอ็นเอโดยผ่านชั้นของพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ เพื่อนำไปใช้ในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็ก การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุลบเช่นพอลิอะคริลิกแอซิด การตรึงฟิเอ็นเอกับหมู่คาร์บอกซิเลตโดยตรง หรือผ่านอันตรกิริยาระหว่างไบโอดีน-สเตเรปตาวิดิน และนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการจับดีเอ็นเอจากสารละลายและความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

โครงการย่อยที่ 6: A theoretical study of structural and energetic properties of peptide nucleic acid

โครงการนี้เป็นการสร้างแบบจำลองของฟิโรลิตินิลฟิเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค Molecular Dynamics Simulation และการคำนวณทางเคมีควอนตัม เพื่อนำไปใช้ในการทำนายโครงสร้างและคำนวณพลังงานของระบบ เพื่อนำไปใช้อธิบายสมบัติบางประการของฟิโรลิตินิลฟิเอ็นเอ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง acpcPNA และ C4'-อีพีเมอร์ของมันคือ epi-acpcPNA เช่น ความเสถียรที่แตกต่างกันของไฮบริดระหว่าง PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA และการเกิด charge transfer ใน PNA duplex เปรียบเทียบกับ DNA duplex

10. ผลการดำเนินงาน

ผลการดำเนินการในภาพรวมตัวงานเสร็จสมบูรณ์ตามข้อเสนอโครงการ และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในเชิงขององค์ความรู้ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ 1) การออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (ฟิเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มการละลายและลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยยังคงรักษาหรือมีสมบัติการจับยึดที่ดีขึ้น 2) การเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบฟิเอ็นเอที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น ฟิเอ็นเอมีสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ฟิเอ็นเอโพรบที่ตอบสนองทางเคมีไฟฟ้า หรือฟิเอ็นเอโพรบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับดีเอ็นเอหลังการกระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง 3) วิธีการใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็นโพรบ ร่วมกับเทคนิคใหม่ เช่น DNA-templated or DNA-catalyzed reaction และ/หรือวัสดุสมัยใหม่ เช่น พอลิเมอร์ และวัสดุนาโน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น

การแพทย์ อาหาร และการเกษตร 4) ความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี

ผลลัพธ์เชิงประจักษ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือผลงานตีพิมพ์จำนวนกว่า 20 เรื่องในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพสูง นับถึงวันที่รายงานมีผลงานที่ตีพิมพ์และได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ถึงวันที่รายงานจำนวนรวม 22 บทความ และอยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาและเตรียมต้นฉบับบทความอีกไม่น้อยกว่า 8 บทความ ในเชิงปริมาณ ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์หรือตอบรับแล้วเป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1 จำนวน 14 บทความ โครงการย่อยที่ 2 จำนวน 3 บทความ โครงการย่อยที่ 3 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 4 จำนวน 1 บทความ โครงการย่อยที่ 5 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 6 ยังไม่มีผลงานตีพิมพ์ ในเชิงคุณภาพ มีบทความที่ได้ลงตีพิมพ์ในวารสารที่มี IF2016 มากกว่าหรือเท่ากับ 10 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 6.00-9.99 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 4.00-5.99 จำนวน 6 บทความ, อยู่ระหว่าง 2.00-3.99 จำนวน 10 บทความ, ต่ำกว่า 2.00 จำนวน 2 บทความโดยหนึ่งในนี้เป็นวารสารใหม่ จึงยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล ISI ข้อมูลสรุป output ในด้านอื่นๆ เป็นดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 องค์ความรู้ที่ได้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงแล้ว ยังมีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ โดยคณะผู้วิจัยได้พยายามต่อยอดโดยการสร้างความร่วมมือกับทั้งนักวิจัยและภาคเอกชนเพื่อพัฒนาสู่การนำไปประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยได้มีบริษัทต่างประเทศที่ให้ความสนใจเทคโนโลยีนี้แล้ว 2 บริษัท และกำลังอยู่ระหว่างการทดสอบการใช้งานที่เอ็นเอ

ในด้านของการสร้างคน โครงการวิจัยนี้อาศัยพีโรลิตินิลที่เอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วมในการดึงนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญจากหลายสาขาได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ เคมีวิเคราะห์ เคมีพอลิเมอร์ นาโนเทคโนโลยี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีคำนวณ และการเชื่อมโยงระหว่างเคมีกับชีววิทยามาทำงานร่วมกัน นอกจากนี้ยังได้มีส่วนในการสร้างบุคลากรด้านวิจัยซึ่งรวมถึงนักวิจัย 20 คนและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกอย่างน้อย 20 คน จาก 7 สถาบัน และเกิดเครือข่ายงานวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติ และการผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์/เคมีวิเคราะห์/เคมีวัสดุ ทั้งในระดับปริญญาโท ปริญญาเอก และหลังปริญญาเอก รวมกันไม่น้อยกว่า 30 คน ซึ่งจะเพื่อกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 1 สรุปผลงานที่ได้ตลอดโครงการเชิงปริมาณ (ตัวเลขในวงเล็บคือเป้าหมายที่ตั้งไว้ในข้อเสนอโครงการ)

ผลผลิต	รวม
1 จำนวนนักวิจัยที่สร้างจากโครงการ	
1.1 สถาบันเดียวกัน	6
1.2 ต่างสถาบัน	15
1.3 นักศึกษาระดับปริญญาเอก ¹	11
1.4 นักศึกษาระดับปริญญาโท ²	7
1.5 ผู้ช่วยวิจัย	2
2. จำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ³	22 (23)
3. จำนวนผลงานการจดสิทธิบัตรในประเทศ ⁴	1 (1)

¹ นับเฉพาะผู้ที่รับทุนผู้ช่วยวิจัยจากโครงการ หากนับนักศึกษาที่ทำงานเป็นส่วนหนึ่งของโครงการแต่รับทุนจากแหล่งอื่นจะมีจำนวนมากกว่านี้อย่างน้อย 1 เท่าตัว

² นับเฉพาะผู้ที่รับทุนผู้ช่วยวิจัยจากโครงการ หากนับนักศึกษาที่ทำงานเป็นส่วนหนึ่งของโครงการแต่รับทุนจากแหล่งอื่นจะมีจำนวนมากกว่านี้

³ เฉพาะที่ตีพิมพ์หรือได้รับตอบรับให้ตีพิมพ์แล้ว ยังมีที่อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาและเตรียมบทความอีก 8 เรื่อง

⁴ อนุสิทธิบัตร

ตารางที่ 2 สรุปผลงานที่ได้ตลอดโครงการเชิงคุณภาพ (แยกตามโครงการย่อย)

โครงการย่อย	จำนวนบทความที่มี impact factor 2016 ในช่วงที่ระบุ					Total
	<2.00	2.00-3.99	4.00-5.99	6.00-9.99	≥10.00	
1	-	7	5	-	2	14
2	1	1	-	1	-	3
3	-	1	1	-	-	2
4	-	-	-	1	-	1
5	1	1	-	-	-	2
6	-	-	-	-	-	0
Total	2	10	6	2	2	22

สัญญาเลขที่ DPG5780002

โครงการ พิโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์มเมชันถูกจำกัด:

หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นายธีรยุทธ วิไลวัลย์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2559 ถึงวันที่ 16 มีนาคม 2560 ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560

1. เนื้อหางานวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็นหกโครงการย่อย ซึ่งครอบคลุมงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาพิโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์มเมชันถูกจำกัดที่มีสมบัติและหน้าที่ใหม่ นอกเหนือจากการจับยึดกับดีเอ็นเอดังที่เคยได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอและการใช้งานด้านอื่นๆ เช่นการสกัดแยกดีเอ็นเอ รายละเอียดการดำเนินงานของแต่ละโครงการสามารถสรุปได้ดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 : Conformationally restricted PNA with new structures and functions

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการออกแบบพิโรลิดินิลพีเอ็นเอระบบใหม่ รวมทั้งพิโรลิดินิลพีเอ็นเอที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วแต่มีการดัดแปรทางเคมีเพื่อเพิ่มหน้าที่ใหม่ ซึ่งประกอบด้วยโครงการย่อยดังนี้

1.1) พิโรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยโพรลีนและเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีโครงสร้างเป็นไซคลิกอีเทอร์: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของพีเอ็นเอระบบใหม่ที่มีการดัดแปรอะมิโนชนิด (2S,3S)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (ATFC) และ (2S,3S)-3-amino-oxetane-2-carboxylic acid (AOC) เป็นตัวเชื่อม โดยมีสมมติฐานว่าการเพิ่มอะตอมของออกซิเจนเข้าไปในโครงสร้างหลักจะทำให้ได้พิโรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นอันจะเป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและลดการเกิดแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ โดยไม่ทำให้ความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป โดยได้สามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอระบบใหม่ทั้งสองชนิด ได้แก่ atfcPNA และ aocPNA ได้เป็นผลสำเร็จ และได้ศึกษาผลการจับยึดกับดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ ซึ่งพบว่า atfcPNA มีสมบัติใกล้เคียงกับ acpcPNA แต่ aocPNA จับยึดได้ไม่แข็งแรงเท่า acpcPNA ซึ่งอธิบายได้ด้วยแบบจำลองโมเลกุล รวมทั้งยังได้ศึกษาผลการละลายและการลดแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงของ atfcPNA ซึ่งพบว่ามีผลใกล้เคียงกับ acpcPNA แต่มีแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่ลดลง

1.2) พิโรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีโครงสร้างหลักเป็นประจวบวง: งานวิจัยในส่วนนี้จะเน้นการดัดแปร backbone ของ acpcPNA ด้วย modifier ที่มีสมบัติชอบน้ำ และ/หรือมีประจวบวง ได้แก่ หมูไฮดรอกซิล หมูอะมิโน และหมูกำนิตินอ โดยผ่านตัวเชื่อมที่เป็นสายโซ่คาร์บอนหรือพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) สำหรับการติดไปบนโครงสร้างหลักของ acpcPNA โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้พีเอ็นเอที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและอาจจับยึดกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงขึ้นเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างประจวบวงบนสายของพีเอ็นเอกับประจวบวงของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ประจวบวงและสายพอลิเอทิลีนไกลคอลอาจช่วยให้พีเอ็นเอสามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ดีขึ้น ในงานวิจัยได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์พิโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วย modifier ที่เป็น hydroxyalkyl, aminoalkyl และ guanidinoalkyl และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ โดยพบว่าพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรยังคงความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ดีและมีความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดที่สูง และมีการละลายน้ำที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรและติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซินเพื่อนำไปศึกษา

การเข้าสู่เซลล์โดยเทคนิค flow cytometry และ fluorescence microscopy โดยพบว่าพีเอ็นเอที่ผ่านการตัดแปรด้วย guanidine $(-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2)$ สามารถเข้าสู่เซลล์ของมนุษย์ (HEK293T) ได้ดีกว่าพีเอ็นเอที่ไม่ได้ผ่านการตัดแปร จึงเป็นการปูทางไปสู่การใช้พีริโรลิดีนพีเอ็นเอกับงานวิจัยในเซลล์ต่อไปในอนาคต

1.3) การสังเคราะห์พีริโรลิดีนพีเอ็นเอที่ติดฉลากสารเรืองแสง และการศึกษาสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ: งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการพัฒนาพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนา doubly-end-labeled acpcPNA beacon โดยอาศัยการติดฉลากเรืองแสงร่วมกับตัวดับแสงที่มีความสามารถในการเกิด end-stacking ที่ตำแหน่งปลายสายของ acpcPNA ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจนและมีความจำเพาะเจาะจงเมื่อจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายเนื่องจากการเกิด end stacking ของ quencher ที่คู่เบสตรงปลายของ PNA-DNA duplex นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามพัฒนาพีเอ็นเอโพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอจาก acpcPNA ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ Nile red, 3,6-diaminocarbazole (DAC) และ styryl dyes โดยพบว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย DAC แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจน (>10 เท่า) และสามารถแยกแยะความแตกต่างของ single mismatch DNA จาก complementary DNA ได้ดี ในขณะที่ Nile red และ styryl dye เมื่อมี single base mismatch หรือ insertion/abasic site ในสายของดีเอ็นเอจะให้สัญญาณที่สูงกว่าในกรณีที่เป็น complementary ซึ่งล้วนแต่เป็นองค์ความรู้ที่ใหม่และนำไปใช้ประโยชน์ได้

1.4) การสังเคราะห์พีริโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีเบสที่ไม่ใช่เบสมาตรฐาน และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ: งานวิจัยนี้งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกตัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์และการศึกษาสมบัติเชิงแสงของมัน โดยแบ่งเป็นสองแนวทางคือ การสังเคราะห์ผ่าน acpcPNA monomer ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกตัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์ (ในที่นี้คือ 8-pyrenylethynyl adenine (A^{PyE})) และการทำปฏิกิริยา post synthetic modification ของพีเอ็นเอที่มีเบส iodouridine (U^{I}) โดยปฏิกิริยา Pd-catalyzed cross coupling โดยงานในส่วนแรกสามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีเบส A^{PyE} ได้สำเร็จ และยืนยันได้ว่าเบส A^{PyE} ในพีเอ็นเอแสดงการตอบสนองต่อการเข้าคู่เบสระหว่าง A^{PyE} บนสายพีเอ็นเอกับ dT บนสายดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจง โดยทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้น และเมื่อมี mismatch base การเรืองแสงจะใกล้เคียงกับเดิมหรือลดลง เนื่องจากการเกิด π - π stacking ระหว่างไพรีนใน A^{PyE} กับคู่เบสใน PNA-DNA duplex งานในส่วนหลังได้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการดังกล่าวในการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มี modified base ได้อย่างหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูงโดยไม่ต้องสังเคราะห์โมโนเมอร์แยกต่างหาก โดยตัวอย่างของหมู่ฟังก์ชันที่สามารถติดได้สำเร็จได้แก่หมู่ไทโอพีน เบนโซไทโอพีน เบนโซพิวแรน และ ไพรีนอลิธายน์ พร้อมทั้งยังได้ศึกษาสมบัติเชิงแสงเบื้องต้นของระบบพีเอ็นเอเหล่านี้ โดยพบว่าพีเอ็นเอที่มีหมู่ ไพรีนอลิธายน์ ต่อกับ U ให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงแบบเพิ่มขึ้น (signal on) ประมาณ 5 เท่าเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ

1.5) การสังเคราะห์พีริโรลิดีนพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารที่ไวต่อแสงเคมีไฟฟ้าเพื่อนำไปเป็นโพรบสำหรับระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง: งานวิจัยในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนา acpcPNA ที่ติดฉลากด้วย anthraquinone เพื่อเป็น redox-active probe สำหรับตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยสามารถใช้ redox-active probe ดังกล่าวร่วมกับขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode (SPCE) ที่ตัดแปรด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสโรคกุ้ง (WSSV) ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP โดยมีช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 0.35-50 nM โดยมีค่า LOD ($3\text{SD}_{\text{blank}}/\text{Slope}$) เป็น 0.1 nM (S/N = 10) ตัวเลขนี้แม้จะไม่ต่ำมากนัก แต่ก็อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับเทคนิคการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอเชิงไฟฟ้าที่ไม่ได้อาศัย

การขยายสัญญาณอื่นๆ และเนื่องจากข้อจำกัดที่ใช้นิวคลีโอไทด์ขนาดเล็ก เทคนิคนี้จึงใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยมาก เทียบเท่ากับ <math><10\text{ fmol}</math> หรือ <math><1\text{ ng}</math> สำหรับ ssDNA ที่มีความยาว 300 เบส ซึ่งน่าจะว่องไวพอที่จะนำไปใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาแล้ว และที่สำคัญคือเทคนิคนี้แสดงการเลือกจำเพาะที่สูงมาก นอกจากนี้ยังได้นำพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย redox-active label ไปเป็นโพรบสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเออื่นเช่น HPV, miRNA เป็นต้น โดยเป็นงานวิจัยร่วมกับกลุ่มวิจัยอื่น เช่น กับโครงการย่อยที่ 4 และกับ ศ.ดร. อรวรรณ ชัยลาภกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการย่อยนี้ทั้งหมดที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วมี 14 เรื่อง ได้แก่ ผลงานลำดับที่ 2.1.1.1, 2.1.1.2, 2.1.1.4, 2.1.1.6, 2.1.1.7, 2.1.1.8, 2.1.1.9, 2.1.1.10, 2.1.1.15, 2.1.1.17, 2.1.1.18, 2.1.1.19, 2.1.1.20, 2.1.1.22 โดยผลงานลำดับที่ 2.1.1.6 ที่เป็นบทความรีวิวที่เกี่ยวข้องกับผลงานของทุกโครงการและผลงานที่มีมาก่อนหน้านี้ และได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตร 1 เรื่อง (2.1.3.1) นอกจากนี้ยังมีผลงานที่อยู่ระหว่างการพิจารณาอีก 2 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.b, 2.1.1.e อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความอีก 1 เรื่องคือ 2.1.1.f และกำลังรวบรวมข้อมูลเพื่อจัดเตรียมต้นฉบับอีกอย่างน้อย 1 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 2 : New approaches to improve the sensitivity of PNA-based DNA sequence detection

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่มีความว่องไวและจำเพาะเจาะจงสูงโดยอาศัยพีโรลิดีนิลพีเอ็นเอโพรบที่ทำหน้าที่พิเศษ โดยแบ่งออกเป็นโครงการย่อยคือ

2.1) การออกแบบและสังเคราะห์พีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่เร่งปฏิกิริยาได้และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาโพรบที่มีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงและแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาโดยการตัดแปดพีเอ็นเอ(หรือดีเอ็นเอ)ให้มี catalytic function โพรบดังกล่าวอาจนำไปใช้ในการตรวจวัดลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณได้ โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ จากรายงานครั้งก่อนหน้านี้นี้ได้รายงานถึงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ Pt (PtNP) ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยดีเอ็นเอ (PtNP-DNA)1 และได้ศึกษาเบื้องต้นถึงการเร่งปฏิกิริยาเกิดสีที่คล้ายกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แต่ยังไม่ได้นำมาดำเนินงานในส่วนนี้เพิ่มเติมเนื่องจากประสบปัญหาในการสังเคราะห์ PtNP-DNA ที่มี well-defined sequence ในปริมาณมากพอ

2.2) การพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีสมบัติในการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอเมื่อถูกกระตุ้นโดยวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอ: ในงานวิจัยได้พัฒนา functional acpcPNA probe ที่ถูก modify ด้วย 3-(2-furyl)propionic acid โดยการเกิด crosslink กับดีเอ็นเอคู่สมเมื่อผ่านการกระตุ้นด้วย N-bromosuccinimide (NBS) โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มความแข็งแรงในการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ งานที่ได้ดำเนินการไปคือการศึกษาการเกิด crosslink ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปดด้วยฟิวแรนที่ตำแหน่งกลางสายกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันโดยเทคนิค HPLC, gel electrophoresis และ mass spectrometry ซึ่งไม่พบว่าเกิดการ crosslink แต่เมื่อย้ายตำแหน่งของฟิวแรนมาติดที่ปลายสายของพีเอ็นเอพบว่าสามารถเกิดการ crosslink ได้จากการศึกษาโดย HPLC, T_m และ gel electrophoresis และจะศึกษาชนิดและตำแหน่งของเบสที่มีผลต่อการเกิด crosslink โดยพบว่าเบส C จะเกิด crosslink ได้ดีที่สุดในลำดับเบส A, G และเบส T ไม่เกิดการ crosslink นอกจากนี้ยังมีความพยายามทำให้เกิด crosslink กับ DNA duplex แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตาม พีเอ็นเอที่เกิดการ crosslink ได้นี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอต่อไป

2.3) การพัฒนาปฏิกิริยาของพีเอ็นเอโพรบที่อาศัยดีเอ็นเอเทมเพลต: งานวิจัยนี้พยายามจะพัฒนาระบบที่จะเร่งการทำปฏิกิริยาระหว่างพีเอ็นเอสองสาย ซึ่งติดฉลากด้วยหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาไวที่ปลายคนละด้าน โดยอาศัย DNA template ซึ่งจะนำพีเอ็นเอทั้งสองสายมาอยู่ใกล้กัน จึงเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น โดยได้พยายามพัฒนาระบบ DNA-catalyzed reaction ระบบใหม่ จากหลายๆ คู่ปฏิกิริยา แต่ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry ในทุกกรณียังถือว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณน้อยมาก และการมีหรือไม่มี DNA template ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากปัญหาดังกล่าว ประกอบกับ impact ของงานที่อาจจะไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับงานที่ใช้ DNA ที่มีผู้ศึกษากันมาก่อนข้างมากแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้หยุดดำเนินการโครงการย่อยนี้และไปเพิ่มเนื้องานในส่วนอื่นแทน

2.4) การพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement probe: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา self-reporting fluorescence PNA probe สำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement ซึ่งตัวโพรบจะประกอบด้วยสองส่วนคือ sensor strand ซึ่งเป็นพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง กับ quencher strand ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ติดด้วยตัวดับแสง โดยโพรบนี้จะออกแบบให้เข้าคู่กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะปกติ เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกับ PNA ที่เป็น sensor strand อยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะเข้าไปแทนที่ quencher strand เกิดเป็นไฮบริดคู่ใหม่ การแทนที่ของ quencher strand นี้จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น โดยต้องออกแบบให้ displacement probe มีความเสถียรน้อยกว่า hybrid ที่เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งทำได้โดยใช้ quencher strand สายสั้น หรือที่มี base mismatch อยู่ด้วย ผลการศึกษาพบว่า strand displacement probe ที่ได้จากระบบ acpcPNA จะเกิดการแทนที่ด้วยดีเอ็นเอคู่สม พร้อมกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้นจากโพรบเมื่อเริ่มต้น 8.3-14.6 เท่า ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม รวมทั้งที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งจะให้การคืนสัญญาณที่น้อยกว่ามาก โดยอยู่ในช่วง 1.0-2.4

2.5) การพัฒนาระบบการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอฐานกระตาด: งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอจากกระตาดเซลล์ลูโลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนากระบวนการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระตาดเซลล์ลูโลส และการตรวจวัดการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง และกับดีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลาก ร่วมกับการย้อมด้วยสี Azure A ซึ่งจะจับได้กับเฉพาะดีเอ็นเอ ทำให้เกิดสีน้ำเงินขึ้นบริเวณที่มีดีเอ็นเออยู่บนกระตาด ทำให้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยได้ตีพิมพ์ผลการทดลองเบื้องต้นซึ่งเป็นการพิสูจน์หลักการไปแล้วว่าสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอสังเคราะห์ได้อย่างเลือกจำเพาะ แต่มีปัญหาคือความไวของการตรวจวัดยังไม่เพียงพอต่อการใช้งานกับตัวอย่างจริง จึงได้มีการพัฒนาระบบตรวจวัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ ซึ่งเป็นงานวิจัยร่วมกับกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุทัศน์ ฟูเจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยการตรึงพีเอ็นเอโพรบสองชนิดสำหรับแยกแยะดีเอ็นเอ HbE (G->A mutation ที่ตำแหน่ง codon 26) จากดีเอ็นเอปกติบนกระตาดเซลล์ลูโลส จากนั้นจึงนำไปไฮบริดซ์กับ biotinylated oligodeoxynucleotide target และทำปฏิกิริยาสร้างสีด้วย ALP-streptavidin โดยสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอปกติกับ HbE ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็น PCR product ที่ความยาว 279 และ 600 คู่เบสได้อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไม่สามารถทำได้ด้วยดีเอ็นเอโพรบ นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามขยายขอบเขตของงานต่อไปโดยการสังเคราะห์และตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ออกแบบมาสำหรับการตรวจวัดการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับ thalassemia ชนิดอื่นๆ ที่พบบ่อยในประเทศไทยอีก 3 ตำแหน่ง (4 base pair deletion, Codon17 และ IVS54 (654)) บนอุปกรณ์ตรวจวัดชิ้นเดียวกันเพื่อการตรวจสอบรูปแบบของโรค thalassemia ชนิดต่างๆ ได้ในครั้งเดียว ผลการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าการใช้โพรบ

ทั้งสี่คู่ร่วมกันยังไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอได้ไม่เป็นที่น่าพอใจนัก จึงยังต้องมีการปรับภาวะของการไฮบริดซ์และการทำให้เกิดสัญญาณเพิ่มเติมเพื่อให้แยกแยะความแตกต่างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2.6) การพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอโพรบร่วมกับวัสดุนาโน: งานวิจัยภายใต้หัวข้อนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้วัสดุนาโนร่วมกับพีเอ็นเอโพรบ ซึ่งทั้งหมดจะอาศัยหลักการเดียวกันคือการเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่แตกต่างกันระหว่างวัสดุนาโนที่มีประจุลบกับพีเอ็นเอที่มีประจุบวก และกับพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดซึ่งมีประจุลบ ซึ่งเป็นการใช้สมบัติที่โดดเด่นของพีเอ็นเอที่ไม่สามารถทำได้กับดีเอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบอื่นๆที่มีประจุลบ โดยได้ศึกษากับวัสดุนาโน 4 ชนิด ได้แก่ กราฟีนออกไซด์ (GO) โอลิโกดีออกซีควัวโนซีน (dG_n) อนุภาคนาโนของทองคำ (AuNP) และควอนตัมดอท

งานวิจัยในส่วนของ GO พบว่า GO สามารถระงับการเรืองแสงของ fluorescein-labeled acpcPNA ได้ และเมื่อเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมการเรืองแสงกลับเพิ่มขึ้นไปจนเกือบเท่ากับเมื่อก่อนเติม GO ส่วนเมื่อมีดีเอ็นเออื่นการเรืองแสงจะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงที่ดีของการตรวจวัด และมี detection limit อยู่ที่ 4.4 ± 0.3 nM และเมื่อใช้พีเอ็นเอโพรบที่มีประจุบวกเพิ่มขึ้น (Flu-PNA-Lys5) จะทำให้การระงับแสงโดย GO มีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต ซึ่งส่งผลให้ detection limit ที่ต่ำลงถึง 0.11 ± 0.3 nM นอกจากนี้ยังได้ค้นพบโดยบังเอิญว่า dG_n มีความสามารถในการระงับการเรืองแสงของ fluorescein-labeled acpcPNA โดยที่การระงับแสงนี้จะเจาะจงเฉพาะกับพีเอ็นเอที่มีประจุบวกสูงเท่านั้น (Flu-PNA-Lys5) และประสิทธิภาพในการระงับแสงจะลดลงที่ความเข้มข้นของเกลือสูงกว่า 50 mM ซึ่งแสดงว่าการระงับแสงเกิดจากอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะเจาะจง และเมื่อเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมลงไปจะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กลับคืนมา ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมจะเกิดการคืนสัญญาณน้อยกว่ามาก ผลการทดลองเหล่านี้เสนอแนะว่าอาจใช้ oligo(dG) เป็นตัวระงับแสงในลักษณะเดียวกับ graphene oxide หรือวัสดุนาโนอื่นๆ เพื่อใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสงสำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ งานอีกส่วนหนึ่งคือการใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงร่วมกับอนุภาคทองคำขนาดนาโน (AuNP) หรืออนุภาคเงินขนาดนาโน (AgNP) ซึ่งสามารถพิสูจน์ในหลักการได้ว่าสามารถใช้ AuNP/AgNP เพื่อระงับสัญญาณของ Flu-PNA-Lys5 ได้เช่นเดียวกับ GO และ dG_n และสามารถคืนสัญญาณได้เมื่อมีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม แต่มีความพิเศษกว่าคือนอกจากการตรวจวัดการเรืองแสงแล้วยังสามารถตรวจวัดได้ในโหมดการตกตะกอนได้ด้วย กล่าวคือ AuNP/AgNP จะเกิดการรวมกลุ่มเมื่อมีพีเอ็นเอที่มีประจุบวกอยู่ด้วย แต่เมื่อพีเอ็นเอเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมจะสูญเสียความสามารถในการตกตะกอนของอนุภาคโลหะนาโนไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนและนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ โดยในกรณีของอนุภาค AgNP ได้นำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาษซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้ว (เป็นงานวิจัยร่วมกับ ศ.ดร.อรรณพ ชัยลภากุล เมธีวิจัยอาวุโส)

งานอีกส่วนหนึ่งเป็นการนำ quantum dots (QD) มาใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการถ่ายโอนพลังงานแบบ Fluorescence resonance energy transfer (FRET) หรือกลไกการดับสัญญาณ (quenching) โดยได้สังเคราะห์ ZnO QDs ที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PMETAC และนำไปใช้ร่วมกับ TAMRA-labeled acpcPNA probe เพื่อใช้ในการตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอ แต่ปัญหาที่พบคือการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงระหว่าง PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ TAMRA-PNA จึงได้เปลี่ยนวิธีการตัดแปรพื้นผิวของ ZnO QDs เป็นการใช้โคพอลิเมอร์ของ METAC กับ polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PMTAC-co-PPEGMA) ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ MTAC และ PEGMA ต่างๆ กันแทน โดยพบว่า ZnO QD ที่เตรียมได้แสดงการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm และแสดงการกระจายตัวในน้ำที่ดี โดยการมีส่วนของ PEGMA

เพิ่มในโคพอลิเมอร์ส่งผลทำให้การเรืองแสงและความเสถียร ของ ZnO QDs เพิ่มขึ้น แต่ก็ยังพบว่ามี non-specific interaction กับ TAMRA-labeled PNA อยู่ จึงหยุดงานในส่วนของพีเอ็นเอไปก่อน และหันมาศึกษาอันตรกิริยาของ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO กับดีเอ็นเอแทน โดยพบว่าการใช้ QD ร่วมกับ DNA ที่ติดฉลากสามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมที่มีลำดับเบสผิดไปจากโพรบตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไปได้ ซึ่งน่าจะได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อศึกษาข้อจำกัดและกลไกการเกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงนี้ นอกจากนี้ยังได้ค้นพบโดยบังเอิญว่าระบบ ZnO QD ที่เคลือบผิวประจุบวกชนิด P(METAC-PEOMEMA) แสดงความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ Fe^{2+} โดยเมื่อมี Fe^{2+} อยู่ด้วยจะเกิดการดับสัญญาณการเรืองแสงของ ZnO QDs ลง โดยที่ metal ion ชนิดอื่นๆ ไม่ทำให้การเรืองแสงของ ZnO QDs เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของ Fe^{2+} และ Fe^{3+} ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยมี limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ $0.34 \mu M$ และ $0.51 \mu M$ ตามลำดับ

งานวิจัยในภาพรวมมีความก้าวหน้าช้ากว่าแผนงานเนื่องจากปัญหาในการพัฒนาระบบเร่งปฏิกิริยาและ DNA-templated reaction ที่มีประสิทธิภาพดีพอดังที่กล่าวไว้ข้างต้น อย่างไรก็ตาม โครงการนี้สามารถพัฒนาระบบตรวจวัดดีเอ็นเอใหม่ได้บรรลุวัตถุประสงค์ถึงขั้นมีผลงานตีพิมพ์แล้ว 3 เรื่องคือ strand displacement probe (2.1.1.16) และการพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษที่อาศัยความแตกต่างของประจุของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (2.1.1.3, 2.1.1.21) นอกจากนี้ยังมีงานในส่วนของการพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอ และการพัฒนาระบบการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอแบบใหม่ที่อาศัยการเลือกเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอ โดยอาศัยวัสดุนาโน เช่น graphene oxide, gold nanoparticles และ dG_n เป็นต้น ที่กำลังอยู่ระหว่างรวบรวมข้อมูลให้สมบูรณ์ ซึ่งน่าจะได้ผลงานตีพิมพ์อีกอย่างน้อย 3 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 3: PNA-conjugated polymer brushes as platforms for DNA sequence determination

โครงการนี้เป็นการพัฒนาการดัดแปรพื้นผิวของวัสดุต่างๆ เช่น อนุภาคนาโนของทอง หรือกระดาษเซลลูโลส ด้วยพอลิเมอร์รัซที่เข้ากันได้ทางชีวภาพ และตรึงพีเอ็นเอเข้ากับพื้นผิวเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอหรือนำส่งเข้าสู่เซลล์ โดยงานวิจัยแบ่งเป็น 4 หัวข้อย่อย ดังต่อไปนี้

3.1) การพัฒนาโคพอลิเมอร์ที่สามารถติดพีเอ็นเอโพรบด้วยปฏิกิริยาคลิกและการตรวจวัดดีเอ็นเอ: งานวิจัยนี้มีความสนใจในการพัฒนาแพลตฟอร์มที่สามารถใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยพอลิเมอร์รัซของ poly(propagyl methacrylate) (PPgMA) ร่วมกับ poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์การจับยึดกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) งานในส่วนนี้เสร็จสมบูรณ์และได้รับการตีพิมพ์แล้ว

3.2) การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอโพรบผ่านโคพอลิเมอร์รัซ: งานวิจัยนี้จะพัฒนาการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษเซลลูโลสที่ดัดแปรพื้นผิวกระดาษด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด poly[glycidyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methacrylate] เพื่อนำไปใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโดยผ่านปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีโนของพีเอ็นเอกับหมู่อีพอกไซด์ และนำไปใช้ในการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ sandwich hybridization assay โดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบอีกตัวหนึ่งที่ติดฉลากด้วยไบโอดีนเพื่อใช้ร่วมกับ streptavidin-HRP ในการขยายสัญญาณ ผลที่ได้สามารถพิสูจน์หลักการได้ว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายได้จริง โดยสามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สม

และดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม รวมทั้งที่มีลำดับเบสผิดไปตำแหน่งเดียวได้ ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

3.3) การพัฒนาแท่งทองขนาดนาโน (AuNRs) ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วย (poly[(methacrylic acid)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)]; PMAMPC) เพื่อเพิ่มความเสถียรและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรึงสารออกฤทธิ์เช่นพีเอ็นเอ หรือสีย้อมเรืองแสง เพื่อการประยุกต์ใช้ในการนำส่งสารออกฤทธิ์เข้าสู่เซลล์ โดยงานวิจัยในส่วนของตรึงและนำส่งพีเอ็นเอด้วย AuNRs ผ่าน cleavable peptide linker (-GFLG-) พิสูจน์หลักการว่าสามารถตรึงได้ และปลดปล่อยพีเอ็นเอออกมาได้จริง แต่พบว่าประสิทธิภาพของการปลดปล่อยพีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ cathepsin B ยังไม่สูงนักและยังใช้เวลาค่อนข้างนาน ส่วนการติดตามการเรืองแสง พบว่าสามารถติดตามสีย้อมในกลุ่ม styryl dye (โครงการย่อยที่ 1) ไปบน AuNRs ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์บรัชและ cysteamine (Cys-PMAMPC) ได้โดยผ่านปฏิกิริยา thiol-ene โดยอนุภาคที่ตัดแปรดังกล่าวแสดงความเป็นพิษต่ำและสามารถนำส่งเข้าเซลล์ HepG2 ได้ดี และสามารถติดตามได้โดยเทคนิค fluorescence microscopy โดยพบว่าจะเกิดการสะสมของอนุภาค AuNRs ใน cytoplasm เป็นหลัก

3.4) การสังเคราะห์พอลิเอทิลีนไกลคอลที่เชื่อมต่อปลายทั้งสองข้างเข้ากับพีริโรลิดีนิลพีเอ็นเอชนิด *epi-acpcPNA* ที่สามารถเกิด self-duplex จึงสามารถเกิดการ crosslink ที่ตอบสนองกับสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ตัวทำละลาย พีเอช และ acpcPNA ที่ไม่สามารถเกิด self-duplex แต่สามารถชักนำให้เกิดการ crosslink โดยการเติม DNA ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุฉลาดหรือระบบนำส่งดีเอ็นเอ งานในส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างการพิสูจน์หลักการ ซึ่งพบว่าสามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอลได้จริง และยืนยันการเกิดไฮบริดกับตัวเอง (กรณีของ *epi-acpcPNA*) และกับดีเอ็นเอ (กรณีของ acpcPNA) ได้

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วมีทั้งสิ้น 2 เรื่อง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วย quaternized chitosan ร่วมกับเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry และการพัฒนาแพลตฟอร์มที่สามารถใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยพอลิเมอร์บรัชของ poly(propargyl methacrylate) (PPgMA) ร่วมกับ poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SPR (2.1.1.5, 2.1.1.11) และกำลังอยู่ระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับอีก 1 เรื่อง เกี่ยวกับการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัช (2.1.1.e) ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ AuNRs น่าจะสามารถทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อรวบรวมข้อมูลให้ตีพิมพ์ได้อีก 1 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 4: Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่มีความไววิเคราะห์และความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสูงโดยอาศัยพีริโรลิดีนิลพีเอ็นเอเป็นโพรบ โดยแบ่งออกเป็นสามส่วนย่อยคือ

4.1) การพัฒนาอิเล็กโทรดที่ตัดแปรด้วยกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะสำหรับการตรวจวัดการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอโดยอาศัยสัญญาณจากรีดอกซ์อินดิเคเตอร์: งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) แบบติดตามโดยการตรึง acpcPNA-AQ probe ที่มีแอนทราควิโนน (anthraquinone, AQ) ติดตรงตำแหน่งปลายโพรบ บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีน (screen printed carbon electrode, SPCE) ที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุคอมโพสิตพอลิเมอร์ชนิดนำไฟฟ้าพอลิอะนิลีน (polyaniline, PANI) PANI ร่วมกับกราฟีน (graphene, Gr) และอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles, AgNPs) เมื่อเกิดไฮบริดระหว่าง acpcPNA-AQ probe กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ทำให้ส่วน

ของ AQ ที่ติดไว้ปลายโพรบอยู่ห่างจากผิวขั้วไฟฟ้าทอง การส่งผ่านอิเล็กตรอนของ AQ มายังผิวอิเล็กโทรด จึงเกิดได้ยากขึ้น สัญญาณการตรวจวัดจึงมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA โดยศึกษาตัวแปรต่างๆ ได้แก่เช่น ความเข้มข้น ของ Ag ความเข้มข้นของ โพรบ PNA และ เวลาในการไฮบริดเคชัน ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมนี้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 10^{-11} – 10^{-5} M และ ศึกษาประสิทธิภาพของระบบ เช่น ความจำเพาะเจาะจง ขีดจำกัดของการตรวจวัดต่ำสุด 10^{-11} M และความสามารถ ในการใช้งานซ้ำได้ถึง 37 ครั้ง และความสามารถในการทำซ้ำได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของจำนวนเบสและ บริเวณที่จับยึดกับโพรบที่ต่างกัน ใน target DNA ที่มีผลต่อสัญญาณการตรวจวัด โดยได้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ และกำลังอยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

4.2) การพัฒนาเซนเซอร์เพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบร่วมกับวัสดุ คอมโพสิตระหว่างกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะ งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนา DNA biosensor แบบไม่ติดฉลาก โดยการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วยเงินที่มีโครงสร้างเป็นนาโนโฟม (silver nanofoam, AgNF) ด้วยวิธีเกาะติดทาง ไฟฟ้า (electrodeposition) ร่วมกับการใช้พอลิเมอร์นำไฟฟ้าคือพอลิไพร์โรล (polypyrrole, PPy) งานที่ได้ รายงานไปในรอบรายงานครั้งก่อนคือการศึกษาการปรับปรุงผิวหน้าขั้วด้วยชั้นของ AgNF และ PPy สำหรับ ตรวจ PNA probes เพื่อใช้ในการตรวจวัด DNA โดยได้ยืนยันการเกิดขึ้นของ AgNF และ PPy เทคนิค SEM แล้วจึงนำขั้วไฟฟ้า PPy/AgNF/Au ที่เตรียมได้มาตรวจพีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลาก และได้ศึกษาพฤติกรรมทางไฟฟ้า ของขั้ว PPy/AgNF/Au ด้วยเทคนิค electrochemical impedance spectroscopy (EIS) โดยพิจารณาค่า ความต้านทานในการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer resistance, R_{et}) จากนั้นจึงได้นำขั้วไฟฟ้าที่ตรวจ ด้วยพีเอ็นเอไปทดสอบการตรวจวัดสัญญาณของ DNA ที่เลียนแบบ miRNA-21 ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเม ตรี (cyclic voltammetry) พบว่าค่ากระแสไฟฟ้าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA ที่เพิ่มขึ้น และ ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดสามารถตรวจวัด target DNA ที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 2.0×10^{-16} (0.20 fM) ถึง 1.0×10^{-9} M (1.0 nM) และให้ค่า LOD เท่ากับ 2.0×10^{-16} (0.20 fM) โดยให้ความจำเพาะเจาะจงที่ดีเยี่ยม ตลอดช่วงความเข้มข้น 1 fM 0.1 pM และ 0.01 nM และได้นำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด miRNA จาก ตัวอย่างจริง ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

4.3) การพัฒนาเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการตรวจวัด DNA โดยอาศัย PNA แบบมีการขยายสัญญาณ: งานวิจัย นี้มีเป้าหมายที่จะออกแบบระบบตรวจวัดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์ร่วมกับการขยายสัญญาณโดย วิธีที่เหมาะสมเช่น hybridization chain reaction (HCR) หรือ catalyzed hairpin assembly (CHA) เพื่อใช้เพิ่มความไวในการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายที่เป็นดีเอ็นเอ หรือ small molecules (อาศัยดีเอ็นเอแอฟ ตาเมอร์) โดยในช่วงแรกได้ออกแบบระบบ HCR และ CHA สำหรับตรวจสอบยีน *BRCA1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับมะเร็ง เต้านม โดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ผู้วิจัยได้ออกแบบระบบ CHA ใหม่สำหรับ ตรวจวัด cysteine ซึ่งเป็น biomarker ที่สำคัญหนึ่งสำหรับการบ่งชี้ปัญหาด้านสุขภาพ โดยได้เริ่มต้นจากการ ทดสอบหลักการกับระบบ catalyst ที่เป็น DNA ล้วนก่อน และ เปรียบเทียบกับการใช้ PNA catalyst เป็น ตัวกระตุ้นให้เกิด CHA โดยเบื้องต้นพบว่าการเติม DNA หรือ PNA จะทำให้เกิดปฏิกิริยา CHA ได้จริงจากการ เพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ แต่ต้องใช้ปริมาณ PNA มากกว่า DNA จึงจะทำให้เริ่มสังเกตผลได้ การ ต่อมาจึงเน้นที่ระบบที่ใช้ DNA เป็น catalyst ก่อน จากนั้นจึงได้ผนวกกรรมส่วน target binding และ signal amplification เข้าด้วยกัน ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าระบบแสดงการตอบสนองต่อ cyteine จริงแต่ยังอยู่ ในช่วงความเข้มข้นที่สูง ($600 \mu\text{M}$) จึงยังต้องปรับภาวะต่อไปเพื่อเพิ่มความไวให้สูงขึ้นก่อนการนำไปทดสอบ การใช้งานจริง

โครงการนี้ได้ผลิตผลงานตีพิมพ์ไปแล้ว 1 เรื่องจากการใช้พีเอ็นเอโพรบที่ตรึงผ่านชั้นของ poly(*p*-phenylenediamine) ในการตรวจลำดับเบสของ HLA-B*5801 และ HLA-B*5701 จากตัวอย่างจริงโดยเทคนิค capacitance (2.1.1.12) อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง (2.1.1.d) และกำลังรวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียมต้นฉบับอีก 1-2 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 5: Bioconjugation of anionic magnetic nanoparticle with PNA for DNA purification

โครงการนี้จะมุ่งเน้นการพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโน (MNP) ที่ตรึงด้วยพีโรลิดีนพีเอ็นเอโดยผ่านชั้นของพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ เพื่อนำไปใช้ในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็ก การตัดแปรพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุลบเช่นพอลิอะคริลิกแอซิด หรือพอลิอะโคริลอิลไกลซีน การตรึงพีเอ็นเอกับหมู่คาร์บอกซิเลตโดยตรง หรือผ่านอันตรกิริยาระหว่างไบโอติน-สเตรปตาวิดิน และนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการจับดีเอ็นเอจากสารละลายและความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

งานที่ได้ดำเนินการไปตลอดโครงการแบ่งออกเป็นสองแนวทาง ในแนวทางแรกเป็นการตัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ด้วย PNAG เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA โดยการใช้อันตรกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอโนอะโคริลอิลไกลซีน (poly (*N*-acryloyl-glycine, PNAG) และการนำอนุภาคนาโนไปใช้ในการตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวของอนุภาค ยืนยันการตรึงสเตรปตาวิดินบนอนุภาคด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy และการเพิ่มขึ้นของขนาดไฮโดรไดนามิก (D_h) ด้วยเทคนิค PCS จากนั้นจึงนำไปตรึงด้วย acpcPNA ที่มีหมู่ปลายเป็น biotin จากการติดตามการตรึงได้โดยเทคนิค UV-vis spectrophotometry พบว่าสามารถตรึง PNA ได้อยู่ที่ 126 pmol/mg ของ MNP และได้จึงนำอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ตัดแปรด้วย PNAG มาตรึงด้วย biotinylated acpcPNA โดยผ่านอันตรกิริยาระหว่าง biotin-streptavidin แล้วนำมาดูดจับ DNA โดยได้เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ 3 ชนิดที่ติดฉลากเรืองแสง (คู่สม, มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง, และไม่เป็นคู่สม) พบว่าอนุภาคที่ตรึงพีเอ็นเอจะดูดซับเฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับพีเอ็นเอเท่านั้นโดยสามารถพิสูจน์ได้โดยเทคนิค fluorescence และ gel electrophoresis จากนั้นจึงได้นำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ตรึงด้วย pyrrolidiny PNA-Biotin ซึ่งมีลำดับเบสที่สอดคล้องยีนสร้างโปรตีน zein ในข้าวโพด เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นอนุภาคในการทำ DNA บริสุทธิ์ โดยสามารถใช้อุณหภูมิสูงในการแยกตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวโพด และสามารถพิสูจน์ได้โดยการชะดีเอ็นเอที่ถูกดูดซับออกมาทำ PCR แล้วตามด้วยการตรวจสอบโดยเทคนิค gel electrophoresis ซึ่งอาจนำอนุภาคนาโนไปประยุกต์ใช้ในการทำ enrich ดีเอ็นเอที่สนใจแต่มีอยู่ในตัวอย่างเป็นปริมาณน้อยได้ อันจะเป็นประโยชน์มากในการตรวจสอบการปนเปื้อนของอาหาร เช่น องค์ประกอบที่ก่อภูมิแพ้เช่นข้าวโพด ถั่วลิสง หรือ GMO เป็นต้น

อีกแนวทางหนึ่งจะอาศัยการตัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุลบอีกชนิดหนึ่งคือ polyacrylic acid (PAA) เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) โดยเริ่มจากการทำพอลิเมอร์อะคริลิกแอซิดบนอนุภาคที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยอะคริลาไมด์ และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ PCS ซึ่งสามารถยืนยันการติดของพอลิเมอร์และความเป็นประจุลบของอนุภาคได้ จากนั้นจึงนำอนุภาคมาใช้ในการตรึงพีเอ็นเอแบบนอนโคเวเลนต์ โดยอาศัยแรงกระทำระหว่างประจุ ซึ่งทำได้ง่ายกว่าวิธีแรก เพียงการนำพีเอ็นเอที่ตัดแปรด้วยไลซีนซึ่งมีประจุบวกมาผสมกับอนุภาคเท่านั้น โดยสามารถยืนยันความสำเร็จของการตรึงพีเอ็นเอได้โดยเทคนิคต่างๆ ข้างต้น และพบว่าอนุภาคที่ตรึงพีเอ็นเอแล้วยังกระจายตัวได้ดีในน้ำ และสามารถชักนำให้ตกตะกอนได้โดยใช้แม่เหล็กเช่นเดียวกับ

อนุภาคก่อนตรึง จากการติดตามการตรึงได้โดยเทคนิค UV-vis spectrophotometry พบว่าสามารถตรึง PNA ได้อยู่ที่ 180 pmol/mg ของ MNP และสามารถนำอนุภาคที่ตรึงพีเอ็นเอดังกล่าวไปใช้ในการดูดซับดีเอ็นเอจากสารละลาย ซึ่งพบว่าสามารถดูดซับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับพีเอ็นเอที่ตรึงได้อย่างเลือกจำเพาะ และได้ศึกษาเบื้องต้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอจริงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เช่นเดียวกับแนวทางแรก

งานวิจัยนี้มีผลสำเร็จเป็นไปตามวัตถุประสงค์ โดยได้ผลงานตีพิมพ์แล้ว 2 เรื่องได้แก่ผลงานลำดับที่ 2.1.1.13, 2.1.1.14 อยู่ระหว่างพิจารณาอีก 1 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.a และยังอยู่ระหว่างการเตรียมบทความอีก 1 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.f

โครงการย่อยที่ 6: A theoretical study of structural and energetic properties of peptide nucleic acid

โครงการย่อยนี้มีวัตถุประสงค์คือเพื่อการสร้างแบบจำลองของพีโรลิดีนาลพีเอ็นเอระบบ (2'R,4'R)-prolyl-(1S,2S)-ACPC-PNA (acpcPNA) และ (2'R,4'S)-prolyl-(1S,2S)-ACPC-PNA (*epi*-acpcPNA) โดยอาศัยเทคนิคการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics (MD) simulation) และการศึกษาทางเคมีควอนตัม เพื่อนำไปใช้ในการทำนายโครงสร้างและคำนวณพลังงานของระบบ และนำไปใช้อธิบายสมบัติบางประการของพีโรลิดีนาลพีเอ็นเอ เช่น ความเสถียรที่แตกต่างกันของไฮบริดระหว่าง PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA เป็นต้น

ในงานวิจัยได้การสร้างแบบจำลองเพื่ออธิบายความเสถียรของ PNA-PNA และ PNA-DNA duplexes ชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยการสร้างพารามิเตอร์ (force field) โดยวิธีกลศาสตร์ควอนตัม การจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล และการวิเคราะห์สมบัติทางโครงสร้างและคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับของโมเลกุลสายคู่จากการคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับ (binding free energy, $\Delta G_{\text{binding}}$) ความเสถียรของ antiparallel hybrids ของ aegPNA·aegPNA > *epi*-acpcPNA·*epi*-acpcPNA > acpcPNA·acpcPNA และ acpcPNA·DNA > *epi*-acpcPNA·DNA ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง และนอกจากนี้ยังพบว่า backbone ที่แตกต่างกันของ DNA, aegPNA และ acpcPNA ไม่มีผลต่อระยะห่างและมุมของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่เบส แต่มีผลต่อความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจน โดย acpcPNA·DNA ให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนมากกว่า *epi*-acpcPNA·DNA ในขณะที่แกนหลักที่เป็น DNA และ aegPNA มีความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำ

ต่อมาจึงได้จำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลของ ทั้ง antiparallel และ parallel hybrids ของ acpcPNA·acpcPNA, *epi*-acpcPNA·*epi*-acpcPNA และ aegPNA·aegPNA จากนั้นจึงได้วิเคราะห์แบบจำลองของ acpcPNA และ *epi*-acpcPNA duplexes แบบต่างๆ อย่างละเอียด โดยได้คำนวณพลังงานและวิเคราะห์ความกว้างของ minor groove ของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ทุกระบบ เพื่อใช้อธิบายถึงอันตรกิริยาระหว่าง PNA ทั้งสองสาย พบว่าการคำนวณให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองอย่างดี กล่าวคือระบบที่มี T_m สูงก็จะให้ค่า $\Delta E_{\text{binding}}$ ต่ำกว่าระบบที่มี T_m ต่ำกว่า โดยพบว่าทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ antiparallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่ลึกและแกนหลักทั้งสองสายหันเข้าด้านในโมเลกุลสายคู่ ในขณะที่ทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ parallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่แบนออกนอกโมเลกุลสายคู่ สาเหตุที่ acpcPNA ไม่สามารถเข้าคู่กันเกิดเป็น PNA-PNA ในทิศทาง antiparallel เนื่องจากลักษณะทางสเตอริโอเคมีของนิวคลีโอเบสที่ต่อกับแกนหลักบังคับว่าหากต้องการให้เบสเข้าคู่กันได้ดีที่สุดในที่สุดจะทำให้แกนหลักคู่เข้าหากันและอยู่ใกล้กันมาก (ห่างกันประมาณ 3.5 Å) ดังนั้นเมื่อทำการจำลองแบบจึงทำให้แกนหลักผลึกกันมากส่งผลให้เบสเข้าคู่กันได้ไม่ดีและการวางตัวของแกนหลักไม่เหมาะสม แต่ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่เกิดกับ PNA ชนิด *epi*-

acpcPNA ซึ่งมีสเตอริโอเคมีที่ต่างกันทำให้ *epi*-acpcPNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ในทิศทางแบบ antiparallel ได้

งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งคือการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA โดยใช้การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ทั้งสองในระดับโมเลกุล ซึ่งประกอบด้วย การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-RNA ที่มีลำดับเบสต่างกับ 2 ระบบ ได้แก่ ระบบที่มี %(G+C) เท่ากับ 40 และ 70 รวมทั้งโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกันเพื่อเปรียบเทียบ จากนั้นจึงนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบมาวิเคราะห์ลักษณะการเข้าคู่ของเบส วิเคราะห์ความกว้างของ minor groove จำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ที่ระยะห่างต่างๆ และจำนวนโมเลกุลของน้ำใน minor groove และคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับ ($\Delta G_{\text{binding}}$) ระหว่างสาย PNA กับสาย RNA และสาย PNA กับสาย DNA (ด้วยวิธี MM/GBSA) และคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ระหว่างสาย PNA กับสาย RNA และสาย PNA กับสาย DNA (ด้วยวิธี B3LYP/6-31G(d)) และคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ของ 1 คู่เบสของระบบ acpcPNA-RNA และ acpcPNA-DNA (ด้วยวิธี B3LYP/6-31G(d,p)) ข้อสรุปที่ได้คือ acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ได้ดีกว่า RNA ยืนยันได้จากค่า $\Delta G_{\text{binding}}$ ของ acpcPNA-DNA ที่มีค่าเป็นลบมากกว่า acpcPNA-RNA ซึ่งสอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลอง จากการคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ระหว่าง PNA กับ RNA และ PNA กับ DNA ในสภาวะแก้สพบความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การคำนวณจำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบแสดงให้เห็นว่า acpcPNA-RNA ถูก solvate ได้มากกว่า acpcPNA-DNA เนื่องจากโครงสร้างของ acpcPNA-RNA มีขนาดของ minor groove กว้างกว่า acpcPNA-DNA ส่งผลให้โอกาสที่น้ำจะเข้าไปอยู่ในบริเวณของ minor groove ของโมเลกุลมีมากกว่า acpcPNA-DNA ซึ่งสอดคล้องกับค่า $\Delta G_{\text{solvation}}$ ที่คำนวณได้ ดังนั้น solvation จึงน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความเสถียรของ acpcPNA-RNA กับ acpcPNA-DNA แตกต่างกัน

งานวิจัยนี้นำไปสู่ความเข้าใจของปัจจัยเชิงโครงสร้างที่ส่งผลกระทบต่อสมบัติการจับยึดของ acpcPNA และ *epi*-acpcPNA ทั้งในแง่ของการจับกันเอง การจับกับ DNA และ RNA ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในแง่ของการอธิบายผลการทดลองและการเปิดมุมมองใหม่ในการออกแบบระบบพีเอ็นเอที่มีสมบัติที่ดีขึ้น เช่น การออกแบบระบบพีเอ็นเอใหม่ที่เมื่อจับกับ DNA หรือ RNA แล้วจะมีความกว้างของ minor groove ลงซึ่งน่าจะเพิ่มความเสถียรของการจับยึดได้อีกจากการลดลงของ solvation เป็นต้น ขณะนี้ได้ส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ไปแล้ว 1 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.c และกำลังอยู่ระหว่างรวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียมต้นฉบับอีก 2 เรื่อง

2. ผลงาน

2.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ/หนังสือ/สิทธิบัตร

2.1.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Published/Accepted

รอบรายงาน 6 เดือน

2.1.1.1 Stubinitzky, C.; Vilavain, T.*; Wagenknecht, H.-A.* The base discriminating potential of pyrrolidiny PNA demonstrated by magnetic Fe₃O₄ particles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3586–3589. (IF 2016 = 3.564) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.2 Yotapan, N.; Charoenpakdee, C.; Wathanathavorn, P.; Ditmangklo, B.; Wagenknecht, H.-A.*; Vilavain, T.* Synthesis and optical properties of pyrrolidiny peptide nucleic acid carrying a clicked Nile red label. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2166–2174. (IF 2014 = 2.337) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

รอบรายงาน 12 เดือน

2.1.1.3 Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilavain, T.; Praneenarat, T.* Pyrrolidiny peptide nucleic acids immobilised on cellulose paper as a DNA sensor. *RSC Advances* **2015**, *5*, 24110–24114. (IF 2016 = 3.108) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 2)

รอบรายงาน 18 เดือน

2.1.1.4 Arayachukiat, S.; Seemork, J.; Pan-In, P.; Amornwachirabodee, K.; Sangphech, N.; Sansureerungsikul, T.; Sathornsantikun, K.; Vilavain, C.; Shigyou, K.; Pienpinijtham, P.; Vilavain, T.; Palaga, T.; Banlunara, W.; Hamada, T.; Wanichwecharunguang, S. Bringing macromolecules into cells and evading endosomes by oxidized carbon nanoparticles. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 3370–3376. (IF 2016 = 12.712) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1 ร่วมกับ รศ.ดร. ศุภสร วณิชเวหารุ่งเรือง)

2.1.1.5 Meebungpraw, J.; Wiarachai, O.; Vilavain, T.; Kiatkamjornwong, S.; Hoven, V. P.* Quaternized chitosan particles for DNA absorption and applications as ion exchange supports for label-free DNA detection using PNA probe and MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *131*, 80–89. (IF 2016 = 4.811) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 3)

2.1.1.6 Vilavain, T.* Pyrrolidiny PNA with α/β -dipeptide backbone: From development to applications. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656. (IF 2016 = 20.268) (เป็นบทความปริทรรศน์ รวบรวมผลงานจากทุกโครงการย่อย และโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ไว้ด้วยกัน)

2.1.1.7 Sriwarom, P.; Padungros, P.; Vilavain, T.* Synthesis and DNA/RNA binding properties of conformationally constrained pyrrolidiny PNA with a tetrahydrofuran backbone deriving from deoxyribose. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058–7065. (IF 2016 = 4.849) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.8 Bohländer, P.R., Vilavain, T.*; Wagenknecht, H.-A.* Strand displacement and duplex invasion into double-stranded DNA by pyrrolidiny peptide nucleic acids. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9223–9230. (IF 2016 = 3.564) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.9 Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T.* Immobilization-free electrochemical DNA detection with anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe. *Talanta* 2016, 146, 318–325. (IF 2016 = 4.162) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

รอบรายงาน 24 เดือน

2.1.1.10 Bates, R. W.; Vilaivan, T.; Apparao, S. P.; Tu, H. T. Synthesis of a tetrahydrofuranlyl β -amino acid for PNA construction. *Synlett* 2016, 27, 93–95. (IF 2016 = 2.151) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.11 Wiarachai, O.; Vilaivan, T.; Iwasaki, Y.; Hoven, V. P.* Clickable and anti-fouling copolymer platform of poly[(propargyl methacrylate)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] for biosensing applications. *Langmuir* 2016, 32, 1181–1194. (IF 2016 = 3.833) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 3)

รอบรายงาน 30 เดือน

2.1.1.12 Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Hirankarn, N.; Thavarngkul, P.* Screening test for the detection of HLA-B*5801 and HLA-B*5701 by a highly sensitive label-free capacitive DNA sensor based on pyrrolidinyl acpcPNA probe. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 82, 99–104. (IF 2016 = 7.780) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 4)

2.1.1.13 Rutnakornpituk, B.*; Theppaleak, T.; Rutnakornpituk, M.; Vilaivan, T. Recyclable magnetite nanoparticle coated with cationic polymers for adsorption of DNA. *J. Biomat. Sci-Polym. E.* 2016; 27, 1200–1210. (IF 2016 = 1.900) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.14 Khadsai, S.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Vilaivan, T.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M.* Anionic magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for DNA base discrimination. *J. Nanopart. Res.* 2016, 18, 263. (IF 2015 = 2.020) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.15 Dangsopon, A.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C.* Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid. *RSC Adv.* 2016, 6, 74314–74322. (IF 2016 = 3.108) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

2.1.1.16 Boonlua, C.; Charoenpakdee, C.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T.* Preparation and performance evaluation of a pyrrolidinyl peptide nucleic-acid-based displacement probe as a DNA sensor. *ChemistrySelect* 2016, 1, 5691–5697. (IF 2016 = N/A) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 2)

2.1.1.17 Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.* Pyrrolidinyl peptide nucleic acid terminally labeled with fluorophore and end-stacking quencher as a probe for highly specific DNA sequence discrimination. *Tetrahedron* 2016, 72, 7992–7999. (IF 2016 = 2.651) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.18 Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Henry, C. S.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O.* Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human

papillomavirus. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *952*, 32–40. (IF 2016 = 4.950) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.19 Seankongsuk, P.; Vchirawongkwin, V.; Bates, R. W.; Padungros, P.; Vilaivan, T.* Stereoselective synthesis of (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin and its incorporation into conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with an oxetane backbone. *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 551–560. (IF 2016 = 2.788) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.20 Kanokudom, S.; Vilaivan, T.; Wikan, N.; Thepparit, C.; Smith, D.R.; Assavalapsakul, W. miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells. *Antivir. Res.* **2017**, *142*, 169–177. (IF 2016 = 4.271) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.21 Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O.; Henry, C.S. Multiplex paper-based colorimetric DNA sensor using pyrrolidinyl peptide nucleic acid-induced AgNPs aggregation for detecting MERS-CoV, MTB, and HPV oligonucleotides. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5428–5435. (IF 2016 = 6.320) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 2)

2.1.1.22 Pansuwan, H.; Ditmangklo, B.; Vilaivan, C.; Jiangchareon, B.; Pan-In, P.; Wanichwecharunguang, S.; Palaga, T.; Nuanyai, T.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. Hydrophilic and cell-penetrable pyrrolidinyl peptide nucleic acid via post-synthetic modification with hydrophilic side chains. *Bioconjugate Chem.* **2017**, accepted. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308. (IF 2016 = 4.818) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

Submitted

2.1.1.a Seeja, N.; Rutnakornpituk, M.; Vilaivan, T.; Nakkuntod, M.; Rutanakornpituk, B. Poly(acrylic acid)-grafted magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for specific adsorption with real DNA. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.b Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.* Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid bearing a base discriminating fluorescence nucleobase 8-(pyrene-1-yl)-ethynyladenine. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.c Poomsuk, N.; Remsungnen, T.; Vilaivan, T.; Hunt, A. J.; Siriwong, K.* Conformational and energetic properties of pyrrolidinyl PNA-DNA duplexes: a molecular dynamics simulation. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 6)

2.1.1.d Jampasa, S.; Siangproh, W.; Laocharoensuk, R.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. Influence of the DNA sensor design on the performance of the multiplex detection of HPV type 16 and 18 DNA (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

In preparation

2.1.1.e Kangkamano, T.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, T. Pyrrolidinyl PNA polypyrrole/silver nanofoam electrode as a novel label-free electrochemical miRNA-21 biosensor. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 4)

2.1.1.f Leekrajang, M.; Sae-Ung, P.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P.* Epoxidized paper for activation-free peptide nucleic acid conjugation and its application for colorimetric DNA detection. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 3)

2.1.1.g Khadsai, S.; Rutnakornpituk, B.; Vilaivan, T.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M.* Poly(N-acryloyl glycine)-grafted magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidiny peptide nucleic acid for pre-concentration of real deoxyribonucleic acid. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.h Park, Y.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.; Morii, T.; Kim, B. H. Facile conversion of RNA ATP aptamer to quencher-free molecular aptamer beacon. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.2 หนังสือ

2.1.3 สิทธิบัตร

2.1.3.1 นราพร สมบูรณ์นะ, อธิรุทธ วิไลวัลย์, ไอศดา ชูภารา, บุญส่ง ดิษมังคล้อ, วรณสิภา เกียรติปฐมชัย, จิราภรณ์ ธนียวัน "กรรมวิธีการตรวจหาเอ็นเอของโรคหอกชินชนิดเอของ *Staphylococcus aureus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษในเชิงปริมาณด้วยเทคนิคคลูเปติเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันร่วมกับสีย้อมเรืองแสง" เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1703000138

2.2 ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย

ได้สร้างทีมนักวิจัยระดับปริญญาเอกที่เป็นอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษาจำนวน 20 คนที่มีความสนใจร่วมกันในการพัฒนาและใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอ โดยหัวหน้าโครงการได้พบปะเพื่อสอบถามความก้าวหน้าของโครงการวิจัยและปัญหา-อุปสรรคอย่างสม่ำเสมอ ทั้งในรูปแบบตัวต่อตัวและการใช้อีเมล รายนามของนักวิจัยผู้ร่วมโครงการมีดังนี้

1. ศ.ดร.อธิรุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร: 022187627 ext 101 E-mail: vtirayut@chula.ac.th	หัวหน้าโครงการ
2. ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทร: 055963462 E-mail: chaturongs@nu.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 1
3. ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร: 022187582 E-mail: panuwat.p@chula.ac.th	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 1
4. ดร.ธเนศวร นวลไย คณะศิลปศาสตร มหาวิทาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกล กังวล อ. หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ โทร: 0814449908 E-mail: thanesuan_nuan@hotmail.com	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 1
5. ดร.ธนินทร์ ปรามินทร์รัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ร่วมวิจัย โครงการย่อยที่ 2

โทร: 022187638 E-mail: thanit.p@chula.ac.th

6. ดร.นำพล อินสิน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร: 022187581 E-mail: numpon.i@chula.ac.th

7. อ.ดร.แพรทอง เหลลาภา

หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร

โทร: 042725000 ext 3511 E-mail: paethong@hotmail.com

8. Dr. Christopher Smith

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ย้ายที่ทำงานไปมหาวิทยาลัยมหิดลตั้งแต่ตุลาคม 2558)

โทร: 0806129497 E-mail: christopher.s@chula.ac.th

9. รศ.ดร.วรวิทย์ โยเว้น

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร: 022187627 ext 102 E-mail: vipavee.p@chula.ac.th

10. รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร: 074288753 E-mail: panote.t@psu.ac.th

11. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร: 074288420 E-mail: proespichaya.k@psu.ac.th

12. ผศ.ดร.วรากร ลิ่มบุตร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร: 074288563 E-mail: warakorn.l@psu.ac.th

13. ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร: 074288457 E-mail: apon.n@psu.ac.th

14. ผศ.ดร. ชิตนนท์ บูรณชัย

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร: 074288728 E-mail: chittanon.b@psu.ac.th

15. ผศ.ดร. จงดี ธรรมเขต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร: 074288429 E-mail: chongdee.t@psu.ac.th

16. รศ.ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร: 055963464 E-mail: methar@nu.ac.th

17. ผศ.ดร.บุญจิรา รัตนากรพิทักษ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 2

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 2

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 2

หัวหน้าโครงการย่อย

โครงการย่อยที่ 3

หัวหน้าโครงการย่อย

โครงการย่อยที่ 4

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 4

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 4

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 4

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 4

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 4

หัวหน้าโครงการย่อย

โครงการย่อยที่ 5

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 5

โทร: 0865893736 E-mail: boonjirab@nu.ac.th

18. ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร: 0882808717 E-mail: lotharmali@yahoo.com

19. ดร.อุทัย วิชัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร: 0817553772 E-mail: uthaiw@nu.ac.th

20. ผศ.ดร.คัชรินทร์ ศิริวงศ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทร: 0850007543 E-mail: skhatcha@kku.ac.th

21. อ.ดร.วรรณทณี สิทธิวงษ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

โทร: 0945531395 E-mail: wantanee.sit@gmail.com

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 5

ผู้ร่วมวิจัย

โครงการย่อยที่ 5

หัวหน้าโครงการย่อย

โครงการย่อยที่ 6

ผู้ร่วมโครงการย่อย

โครงการย่อยที่ 1

2.3 การนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

2.3.1 บริษัท ISIS Innovations (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น Oxford University Innovation Ltd.) ซึ่งเป็นตัวแทนจัดการทรัพย์สินทางปัญญาของ Oxford University ซึ่งได้รับมอบอำนาจจาก สกว. และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้ดำเนินการจดและใช้ประโยชน์จากสิทธิบัตร Lowe, G.; Vilaivan, T. "Homologous peptide nucleic acids" United States Patent US7098321 (August 29, 2006) ที่มีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีของ pyrrolidinyl PNA ซึ่งได้รับการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องจาก สกว. ตั้งแต่ทุนรุ่นกลาง ได้ license เทคโนโลยีนี้ให้แก่บริษัท AdvanDx (USA) ซึ่งเป็นผู้วิจัยทางด้านพีเอ็นเอโพรบเพื่อการตรวจวินิจฉัยรายใหญ่ของสหรัฐอเมริกา และได้มีส่วนแบ่งสิทธิประโยชน์ (royalty) โดยได้สร้างผลตอบแทนจากการถ่ายทอดเทคโนโลยีโดยบริษัท ISIS Innovations เป็นมูลค่าในส่วนของประเทศไทยได้รับทั้งสิ้น 535,458.24 บาท ซึ่งได้จัดสรรกลับคืนไปให้กับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สกว. ผ่านสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญามารวม 3 งวด จำนวน 77,941.75, 34,695.82 และ 36,342.42 บาท คิดเป็นมูลค่ารวมทั้งสิ้น 148,979.99 บาท ซึ่งถือว่าเป็นการแสดงศักยภาพของเทคโนโลยีนี้ แต่เนื่องจากบริษัทประสบปัญหาในการระดมทุนจึงได้ยุติการ license ไปตั้งแต่เดือนธันวาคม 2558 และเป็นที่น่าเสียดายว่า ISIS Innovations ได้ตัดสินใจยุติการต่ออายุสิทธิบัตรของโครงการเดียวกันที่จดไว้ที่ยุโรป (Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids, EP1513871B1) เนื่องจากไม่สามารถหา potential licensee ได้ โดยได้ออนสิทธิ์กลับมาที่ผู้วิจัย ซึ่งได้ประสานไปที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แต่เมื่อสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ประเมินความเป็นไปได้ของการได้ทุนคืนเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายในการรักษาสิทธิบัตรแล้วตัดสินใจที่จะไม่รับโอนสิทธิ์ ดังนั้นสิทธิบัตรของเทคโนโลยีพีเอ็นเอที่ยุโรปจึงหมดอายุไปตั้งแต่วันที่ 31 สิงหาคม 2560 ณ ปัจจุบัน ISIS Innovations ถือสิทธิบัตรสหรัฐอเมริกาไว้เพียงสิทธิบัตรเดียว และยังคงอยู่ระหว่างดำเนินการหา potential licensee ต่อไป โดยได้มีการติดต่อประสานงานกับหัวหน้าโครงการเป็นระยะ

2.3.2 ผู้วิจัยได้มีการเข้าไปพบปะพูดคุยเพื่อสร้างความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มในประเทศไทยที่มีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้าน diagnostic และ therapeutic applications โดยบางกลุ่มได้มีความร่วมมือกันและได้ผลงานตีพิมพ์แล้ว เช่น ศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล (จุฬาฯ), ศ.ดร.ศุภครวณิขเวหารุ่งเรือง (จุฬาฯ), รศ.ดร.วันชัย อัครลาภสกุล (จุฬาฯ), ศ.พญ.ณัฐริยา ธีรญาญจน์ (จุฬาฯ) บางกลุ่มก็

กำลังอยู่ระหว่างทำวิจัยและขอทุนวิจัยร่วมกันได้แก่กลุ่มวิจัยของ ศ.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ (มหิดล) และกลุ่มวิจัยอื่นอีกหลายกลุ่มที่กำลังอยู่ระหว่างการเจรจาและการประเมินผลการใช้งานเบื้องต้น ได้แก่ ศ.ดร.เพทาย เย็นจิต โสมนัส (มหิดล), ดร.วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย (BIOTEC), ดร.สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล (BIOTEC), ดร.นราพร สมบูรณ์นะ (จุฬาฯ) เป็นต้น โดยมีรายละเอียดตามหัวข้อ 3.3

2.3.3 ผู้วิจัยได้มีการสร้างร่วมมือกับกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มในต่างประเทศตามรายละเอียดในหัวข้อ 3.3 รวมถึงมีบริษัทเอกชนจากต่างประเทศสองแห่งหนึ่งมาขอทดลองใช้พีเอ็นเอเทคโนโลยีเพื่อการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ บริษัทแรกคือ Depixus จากประเทศฝรั่งเศส ซึ่งได้มีการให้ตัวอย่างพีเอ็นเอไปสองครั้ง แต่เมื่อทดสอบเบื้องต้นแล้วไม่ตอบใจต่อการใช้งานของบริษัท จึงไม่ได้ดำเนินการต่อ อีกบริษัทหนึ่งคือ Access Sensor Technologies จากประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งสนใจทดลองใช้พีเอ็นเอในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอแบบใหม่ ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการตกลงเรื่องรายละเอียดในการส่งตัวอย่างทดสอบและค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องรวมทั้งการทำสัญญา Materials Transfer Agreement ผ่านการดำเนินการของสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีกำหนดส่งมอบตัวอย่างพีเอ็นเอเพื่อทดลองใช้ภายในเดือนตุลาคม 2560

3. กิจกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

3.1 ผลงานอื่นๆ เช่นการไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร การได้รับรางวัล

3.1.1 การได้รับเชิญเป็นวิทยากร

รอบรายงาน 6 เดือน

3.1.1.1 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Peptide nucleic acid (PNA): Development and applications งานสัมมนาวิชาการเรื่องโมเลกุลที่มีความสามารถในการจดจำ (Target Recognition Molecules) เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดแบบรวดเร็วและเพื่อการรักษา จัดโดยสวทช.และสวทน. จามจุรีสแควร์ (25 สิงหาคม 2557)

3.1.1.2 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β -peptide backbone: Synthesis, properties and applications ในสัมมนาบัณฑิตศึกษา (Topic of Current Interest in Chemical Biology) ของสถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬารักษ์ (16 กันยายน 2557)

รอบรายงาน 12 เดือน

3.1.1.3 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายนำในกลุ่ม Chemical Science งานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 14 เรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β -peptide backbone: New structures and functions"

3.1.1.4 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายพิเศษเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid: A new DNA analogue with unusual properties" งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 40 (วทท 40) โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น

รอบรายงาน 18 เดือน

3.1.1.5 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid: A new DNA analogue with unusual properties" The opening ceremony and the premier contest of The Hitachi Trophy 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 24 เมษายน 2558

3.1.1.6 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acids: Development and Applications" งานประชุม XVI RGJ Congress 2015, 11th-13th June 2015 โรงแรมจอมเทียนปาล์มบีช รีสอร์ท

3.1.1.7 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Synthetic organic chemistry as a tool for exploring the unnatural world" ในงาน 9th Asian Science Camp (ASC 2015), 2nd-8th Aug 2015, Sirindhorn Science Home, NSTDA, Pathum Thani, Thailand

รอบรายงาน 24 เดือน

-

รอบรายงาน 30 เดือน

-

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

3.1.1.8 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with α/β -peptide backbone: Synthesis, properties and applications" Department

of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, University of Nagoya. (13 พฤศจิกายน 2560)

3.1.2 การเสนอผลงานระดับนานาชาติ

รอบรายงาน 6 เดือน

3.1.2.1 Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β -peptide backbone: Synthesis, properties and applications. Telluride Workshop on Nucleic Acid Chemistry 2014, 28th July-1st August 2014, The Telluride Intermediate School, Telluride, CO, USA. (oral, participation by invitation only) (โครงการย่อย 1)

3.1.2.2 Hoven, V. P. Surface-grafted polymer brushes: Tunable platform for biosensing applications. The 45th International Symposium on Macromolecules-IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014), July 6 - 11, 2014, Chiangmai, Thailand. (oral, invited presentation) (โครงการย่อย 3)

3.1.2.3 Leekrajang, M.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Filter paper grafted with PNA-containing copolymer brushes for colorimetric DNA sequence determination. The 45th International Symposium on Macromolecules-IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014), July 6 - 11, 2014, Chiangmai, Thailand. (Poster) (โครงการย่อย 3)

3.1.2.4 Wiarachai, O.; Vilaivan, T.; Iwasaki, Y.; Hoven, V. P. Clickable and anti-fouling copolymer platform of poly[(propargyl methacrylate)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] for biosensing applications. The 45th International Symposium on Macromolecules-IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014), July 6 - 11, 2014, Chiangmai, Thailand. (Poster) (โครงการย่อย 3)

รอบรายงาน 12 เดือน

3.1.2.5 Leekrajang, M.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Filter paper grafted with PNA-containing copolymer brushes for colorimetric DNA sequence determination. Pure and Applied Chemistry International Conference 2015, January 21st - 23rd, 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. (Poster) (โครงการย่อย 3)

3.1.2.6 Pansuwan, H.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. Synthesis of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying novel hydrophilic β -amino acid spacer. Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015), 21st-23rd January 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. (poster) (โครงการย่อย 1)

3.1.2.7 Dangsopon, A.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid. Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015), 21st-23rd January 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. (oral) (โครงการย่อย 1)

3.1.2.8 Yotapan, N.; Vilaivan, T. Doubly-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid as hybridization-responsive fluorescence probes. The 14th Junior International Conference on

Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (JICCEOCA-4), 28th-30th November 2014, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand. (poster) (โครงการย่อย 1)

รอบรายงาน 18 เดือน

3.1.2.9 Yotapan, N.; Vilaivan, T. DNA double duplex invasion by non-self pairing pyrrolidinyl peptide nucleic acids. The 45th World Chemistry Congress (IUPAC-2015), 09th-14th August 2015, BEXCO, Busan, Korea. (poster)

3.1.2.10 Khadsai, S.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M. Bioconjugation of Anionic Magnetite Nanoparticle (MNP) with Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid (PNA) for Molecular Biology Technique. International Polymer Conference of Thailand (PCT5), 18th-19th June 2015, Patumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand.

3.1.2.11 Seeja, N.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M.; Wichai, U.; Rutnakornpituk, B. PNA-conjugated Magnetic Nanoclusters for Purification of DNA. International Polymer Conference of Thailand (PCT5), 18th-19th June 2015, Patumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand.

รอบรายงาน 24 เดือน

3.1.2.12 Arayachukeat, S.; Seemork, J.; Pan-In, P.; Amornwachirabodee, K.; Sangphech, N.; Sansureerungsikul, T.; Sathornsantikun, K.; Vilaivan, C.; Shigyou, K.; Pienpinijtham, P.; Vilaivan, T.; Palaga, T.; Banlunara, W.; Hamada, T.; Wanichwecharungruang, S. Oxidized carbon nanoparticles as carrier to bring macromolecules across lipid bilayer membrane. Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th-11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (invited lecture by S. Wanichwecharungruang)

3.1.2.13 Charoenpakdee, C.; Unarunotai, S.; Vilaivan, T. Demonstration of strand invasion of DNA duplex by pyrrolidinyl peptide nucleic acid using graphene oxide. Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th-11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster, with best poster awards)

3.1.2.14 Jirakittiwut, N.; Supabowornsathit, K.; Faikhruea, K.; Praneenararat, T.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl PNA immobilized on cellulose membrane for DNA detection: A comparison of two different immobilization methods. Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th-11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster)

3.1.2.15 Ratthachag, T.; Vilaivan, T. Anomalous stereochemistry-dependent thermal stability of pyrimidine-rich pyrrolidinyl peptide nucleic acid-deoxyribonucleic acid hybrids. Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th-11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster)

3.1.2.16 Watcharobon, S.; Petthai, P.; Vilaivan, T.; Sittiwong, W. Synthetic investigation of cyclobutane-containing β -amino acids via [2+2] thermal cycloaddition. Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th-11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster)

3.1.2.17 Khadsai, S.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M. Bioconjugation of anionic magnetite nanoparticle with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for

deoxyribonucleic acid pre-concentration application. The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), 18th-22th October 2015, Yokohama, Japan. (oral)

รอบรายงาน 30 เดือน

3.1.2.18 Seeja, N.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M.; Rutnakornpituk, B. Poly(acrylic acid)-grafted magnetite nanocluster conjugated with pyrrolidiny peptide nucleic acid for DNA base discrimination. The 6th International Polymer Conference of Thailand (PCT6), June 30th-July 1st, 2016, Patumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand. (poster)

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

3.1.2.19 Rutnakornpituk, M.; Khadsai, S.; Rutnakornpituk, B.; Nakkuntod, M.; Vilaivan, T. PNA-conjugated magnetic nanocluster for real DNA pre-concentration. The 11th International Polymer Conference (IPC2016), Oral, 13-16 December 2016, Fukuoka, Japan. (oral)

3.1.2.20 Vilaivan, T. Pyrrolidiny peptide nucleic acids with α/β -peptide backbone: Synthesis, properties and applications. Beilstein Organic Chemistry Symposium 2016: Nucleic Acid Chemistry, Oct 5-7, 2016, Prien am Chiemsee, Germany. (oral, invited lecture).

3.1.2.21 Donthongkwa, R.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Synthesis and Hybridization Property of Peptide Nucleic Acid-Functionalized Monomer. PPC & Petromat Symposium 2017, May 23, 2017, Pathumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand, Poster.

3.1.2.22 Ditmangklo, B.; Chang, Z.; Boddaert, T.; Vilaivan, T.; Aitken, D. J. Synthesis of building blocks to improve water solubility and reduce non-specific aggregation of pyrrolidiny peptide nucleic acids. ICSN-UPSACLAY Natural Products Symposium (15^{ème} Symposium ICSN). June 29th-30th 2017, CNRS Campus Gif-sur-Yvette, France. (poster)

3.1.2.23 Vilaivan, T. Pyrrolidiny peptide nucleic acid: A conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties. The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2017), Nov 14-16, 2017, Tokyo, Japan. (oral, invited lecture)

3.1.3 การเสนอผลงานระดับชาติ

รอบรายงาน 6 เดือน

-

รอบรายงาน 12 เดือน

3.1.3.1 Nuanyai, T.; Vilaivan, T. Modification of pyrrolidiny peptide nucleic acid by poly(ethylene glycol) derivatives. The 40th Congress on Science and Technology (STT40), 2nd-4th Dec 2014, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen. (poster) (โครงการย่อย 1)

3.1.3.2 Yotapan, N.; Vilaivan, T. Doubly end-labeled pyrrolidiny peptide nucleic acid beacons. The 40th Congress on Science and Technology (STT40), 2nd-4th Dec 2014, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen. (poster) (โครงการย่อย 1)

3.1.3.3 Seankongsuk, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. Synthesis of oxetane-containing β -amino acid as a building block of novel pyrrolidiny peptide nucleic acid. The 40th Congress on

Science and Technology (STT40), 2nd-4th Dec 2014, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen. (poster) (โครงการย่อย 1)

รอบรายงาน 18 เดือน

-

รอบรายงาน 24 เดือน

3.1.3.4 Charoenpakdee, C.; Unarunotai, S.; Vilaivan, T. A rapid and specific DNA detection using pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe and graphene oxide. The 41st Congress on Science and Technology (STT41), 6th-8th Nov 2015, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. (oral)

3.1.3.5 Seankongsuk, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. AocPNA – A new pyrrolidinyl peptide nucleic acid with an oxetane-containing β -amino acid linker. The 41st Congress on Science and Technology (STT41), 6th-8th Nov 2015, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. (poster)

รอบรายงาน 30 เดือน

3.1.3.6 Kangkamano, T.; Kanatharana, P.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. Label-free electrochemical detection of DNA using PNA probe functionalized on conducting polypyrrole/silver nanofoam modified electrode. PERCH-CIC Congress IX 2016, 26-29 June 2016, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand. (poster)

3.1.3.7 Chuaynukool, C.; Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Thavarungkul, P.; Kanatharana, P. Electrochemical DNA biosensor using PNA probes immobilized on polyaniline-graphene-silver nanocomposite modified electrode. PERCH-CIC Congress IX 2016, 26-29 June 2016, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand. (poster)

3.1.3.8 Seeja, N.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M.; Wichai, U.; Rutnakornpituk, B. Magnetite nanoparticles grafted poly (acrylic acid) conjugated with peptide nucleic acid (PNA) for biomedical applications. The 8th National Science Research Conference, 30-31 May 2016, Payao University. (oral)

3.1.1.9 Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acids: Synthesis, properties and applications. The 5th Burapha University International Conference 2016, Jul 28-29, 2016, Dusit Thani Hotel, Pattaya, Thailand. (oral, invited lecture)

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

3.1.3.10 Chuaynukul, C.; Thavarungkul, P.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Vilaivan, T.; Kanatharana, P. Development of an electrochemical DNA biosensor based on screen-printed carbon electrode modified with polyaniline, graphene-silver nanocomposite. The 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII, The Empress International Invention Center, 8th - 11th December 2016, Chiang Mai, Thailand. (poster)

3.1.3.11 Kangkamano, T.; Kanatharana, P.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. A conducting polypyrrole/silver nanofoam modified electrode for a label-free electrochemical detection of DNA: Effect of PNA probe length. The 13th Asian Conference

on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII), The Empress International Invention Center, 8th - 11th December 2016 Chiang Mai, Thailand. (poster)

3.1.3.12 Faikhruea, K.; Vilaivan, T. Fluorescence and colorimetric detections of DNA by gold nanoparticles and pyrrolidiny peptide nucleic acid probes. The 43rd Congress on Science and Technology (STT43), 17th-19th Oct 2017, Chulalongkorn University, Bangkok. (poster)

3.1.3.13 Ditmangklo, B.; Boddaert, T.; Aitken, D. J.; Vilaivan, T. Synthetic studies of amino-modified cyclobutane amino acid as a building block for novel pyrrolidiny peptide nucleic acids. The 43rd Congress on Science and Technology (STT43), 17th-19th Oct 2017, Chulalongkorn University, Bangkok. (oral)

3.1.3.14 Muangkaew, P.; Vilaivan, T. Selective cross-linking between furan-modified PNA and DNA. The 43rd Congress on Science and Technology (STT43), 17th-19th Oct 2017, Chulalongkorn University, Bangkok. (poster)

3.1.4 การได้รับรางวัล

3.1.4.1 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับรางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2557 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ (สิงหาคม 2557)

3.1.4.2 ผู้ร่วมโครงการ (รศ.ดร.วรวิทย์ โยვნั่น) ได้รับรางวัลนักวิจัยที่มีผลงานได้รับการอ้างอิงสูงสุด ประจำปี 2560 สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพและคณิตศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.4.3 ผู้ร่วมโครงการ (รศ.ดร.วรวิทย์ โยვნั่น) ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีมาก ประเภทอาจารย์และนักวิจัย ประจำปี 2559 จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

3.3 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

3.3.1 Professor Dr. Hans-Achim Wagenknecht, Institute for Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Germany เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติทาง photophysics และ biological applications ของดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการสังเคราะห์และประยุกต์ใช้งานพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์ โดยได้มีนักศึกษาจากประเทศเยอรมนี (Ms. Peggy Bohländer) มาทำวิจัยที่ประเทศไทยภายใต้ความร่วมมือดังกล่าวในช่วงเดือนมกราคม - เมษายน 2557

3.3.2 ศ.นพ.สุทัศน์ พุฒเจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรคธาลัสซีเมียแบบครบวงจร มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปใช้เป็นโพรบในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค reversed dot blot ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2557 โดยผลการทดลองเบื้องต้นเป็นที่น่าพอใจและได้พัฒนาเป็นโครงการวิจัยใหม่ร่วมกันโดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ (พฤศจิกายน 2559-ตุลาคม 2561) เพื่อนำไปต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ในการคัดกรองโรคธาลัสซีเมีย

3.3.3 ศ.ดร.อรรพรรณ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Charles S. Henry, Department of Chemistry, Colorado State University ทั้งสองเป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านสารวิเคราะห์โดยเทคนิคเคมีไฟฟ้า และ paper-based devices มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปใช้เป็นโพรบในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HPV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูกโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

3.3.4 รศ.ดร.ศุภคร วนิชเวชรุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านวัสดุนาโนเพื่อนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อยได้ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำส่งพีเอ็นเอเข้าเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อประโยชน์ในการรักษาโรค

3.3.5 Professor Dr. Yasuhiko Iwasaki, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Japan มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการย่อยที่ 3 (รศ.ดร.วรวิทย์ โยวัฒน์) อย่างต่อเนื่องในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และประยุกต์ใช้ทางการตรวจวัดทางชีวภาพของโคพอลิเมอร์ที่มี methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) เป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันมีนิสิตปริญญาเอกที่มีงานวิจัยส่วนหนึ่งอยู่ภายใต้โครงการนี้คือ นางสาวอรรพรรณ เวียรชัย เดินทางไปทำวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่นเป็นเวลา 9 เดือน (สิงหาคม 2557 – มีนาคม 2558)

3.3.6 Associate Professor Dr. Roderick W. Bates, Division of Chemistry and Biological Chemistry, School of Physical and Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, Singapore เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการสังเคราะห์ไมโนเมอร์ของพีเอ็นเอและการพิสูจน์กลไกการเปิดวงของ aocPNA ภายใต้ภาวะกรด โดยได้ส่งนิสิตปริญญาโทคือนายภัทรเกียรติ แสนคงสุข ไปทำวิจัยระยะสั้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเปิดวงของ oxetane amino acid ที่ NTU ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2559

3.3.7 ดร.สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล ดร.วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย และ ดร.ดารินทร์ คงคาสุริยะฉาย ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มีความสนใจในการใช้เทคโนโลยีของดีเอ็นเอเพื่อการตรวจวินิจฉัย เช่น โรคกุง เชื้อมาลาเรีย เป็นต้น ได้มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัย

3.3.8 ศ.ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส หน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์ สถานส่งเสริมการวิจัย และผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มีความร่วมมือกันในการนำพีเอ็นเอไปทดสอบการยับยั้งไวรัส Dengue

3.3.9 Professor Byeang-Hyeon Kim, Department of Chemistry, Pohang Institute of Science and Technology (POSTECH) เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์และ biological applications ของดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) โดยได้มีนิสิตปริญญาเอกคือ น.ส.ดวงรัตน์ นิมอนุสรณ์กุล ไปทำวิจัยที่ POSTECH เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนติบอดีเรืองแสงเพื่อใช้ในการตรวจวัด ATP ในช่วงเดือนมกราคม - มิถุนายน 2559

3.3.10 Professor David Aitken จาก Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, Université Paris-Sud เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์ cyclobutane amino acids และ foldamers มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) โดยปัจจุบัน ดร.วรรณทณี สิทธิวงษ์ (ผู้ร่วมโครงการที่ 1) ไปทำวิจัยระยะสั้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ cyclobutane amino acid ในช่วงเดือนกรกฎาคม - กันยายน 2559 และได้ส่งนิสิตปริญญาเอกคือ น.ส.บุญส่ง ดิษมังคโล ไปทำวิจัยที่ Université Paris-Sud เกี่ยวกับการสังเคราะห์ functionalized cyclobutane amino acids ในช่วงเดือนมกราคม - มิถุนายน 2560

3.3.11 ศ.พญ.ณัฐธิดา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความร่วมมือด้านการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการแพ้ยาจากการทำ HLA genotyping โดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ

3.3.12 รศ.ดร.วันชัย อัครลาภสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความร่วมมือในการใช้พีเอ็นเอเพื่อควบคุมการทำงานของ miRNA และการศึกษากลไกการแพร่กระจายของไวรัสเด็งกี

3.3.14 ผศ.ดร.นพ.ประทีป วรรณิสสร สาขาวิชาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มีความร่วมมือกันในการใช้พีเอ็นเอโพรบสำหรับตรวจโรค Steven-Johnson โดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)

3.3.15 Professor Hiroyuki Asanuma จาก Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการออกแบบกรดนิวคลีอิกที่มีหน้าที่เฉพาะ มีความสนใจร่วมกันในการใช้พีเอ็นเอเป็นตัวช่วยให้เกิด invasion เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่โดยใช้โพรบเรืองแสงที่ทาง Prof. Asanuma ได้พัฒนาขึ้น

4. สรุปผลงานวิจัย

ผลการดำเนินการในภาพรวมตัวงานเสร็จสมบูรณ์ตามข้อเสนอโครงการ และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในเชิงขององค์ความรู้ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ 1) การออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มการละลายและลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยยังคงรักษาหรือมีสมบัติการจับยึดที่ดีขึ้น 2) การเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น พีเอ็นเอมีสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย พีเอ็นเอโพรบที่ตอบสนองทางเคมีไฟฟ้า หรือพีเอ็นเอโพรบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับดีเอ็นเอหลังการกระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง 3) วิธีการใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็นโพรบร่วมกับเทคนิคใหม่ เช่น DNA-templated or DNA-catalyzed reaction และ/หรือวัสดุสมัยใหม่ เช่น พอลิเมอร์ และวัสดุนาโน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การแพทย์ อาหาร และการเกษตร 4) ความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี

ผลลัพธ์เชิงประจักษ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือผลงานตีพิมพ์จำนวนกว่า 20 เรื่องในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพสูง นับถึงวันที่รายงานมีผลงานที่ตีพิมพ์และได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ถึงวันที่รายงานจำนวนรวม 22 บทความ และอยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาและเตรียมต้นฉบับบทความอีกไม่น้อยกว่า 8 บทความ โดยผู้วิจัยจะรับรายงานเพิ่มเติมเมื่อครบตามเป้าหมาย ในเชิงปริมาณ ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์หรือตอบรับแล้วเป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1 จำนวน 14 บทความ โครงการย่อยที่ 2 จำนวน 3 บทความ โครงการย่อยที่ 3 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 4 จำนวน 1 บทความ โครงการย่อยที่ 5 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 6 ยังไม่มีผลงานตีพิมพ์ ในเชิงคุณภาพ มีบทความที่ได้ลงตีพิมพ์ในวารสารที่มี IF2016 มากกว่าหรือเท่ากับ 10 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 6.00-9.99 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 4.00-5.99 จำนวน 6 บทความ, อยู่ระหว่าง 2.00-3.99 จำนวน 10 บทความ, ต่ำกว่า 2.00 จำนวน 2 บทความ โดยหนึ่งในนี้เป็นวารสารใหม่ จึงยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล ISI องค์ความรู้ที่ได้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงแล้ว ยังมีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ คณะผู้วิจัยได้พยายามต่อยอดโดยการสร้างความร่วมมือกับทั้งนักวิจัยและภาคเอกชนเพื่อพัฒนาสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยได้มีบริษัทต่างประเทศที่ให้ความสนใจเทคโนโลยีนี้แล้ว 2 บริษัท และกำลังอยู่ระหว่างการทดสอบใช้งานพีเอ็นเอ

ในด้านของการสร้างคน โครงการวิจัยนี้อาศัยพีโรลิตินิลพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วมในการดึงนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญจากหลายสาขาได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ เคมีวิเคราะห์ เคมีพอลิเมอร์ นาโนเทคโนโลยี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีคำนวณ และการเชื่อมโยงระหว่างเคมีกับชีววิทยามาทำงานร่วมกัน นอกจากนี้ยังได้มีส่วนในการสร้างบุคลากรด้านวิจัยซึ่งรวมถึงนักวิจัย 20 คนและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกอย่างน้อย 20 คน จาก 7 สถาบัน และเกิดเครือข่ายงานวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติ และการผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์/เคมีวิเคราะห์/เคมีวัสดุ ทั้งในระดับปริญญาโท ปริญญาเอก และหลังปริญญาเอก รวมกันไม่น้อยกว่า 30 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

5. เอกสารแนบ

5.1 reprint หรือ manuscript

5.1.1 reprint ของผลงานหมายเลข 2.1.1.1 – 2.1.1.22 (ภาคผนวก 2)

5.1.2 บทความย่อของงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (3.1.2.1 – 3.1.2.22) (ภาคผนวก 3, electronic version only)

5.1.3 บทความย่อของงานประชุมวิชาการระดับชาติ (3.1.2.1 – 3.1.3.11) (ภาคผนวก 3, electronic version only)

หมายเหตุ: เนื่องจากบางผลงาน ได้แก่ 3.1.2.23, 3.1.3.12–3.1.3.14 ยังไม่ถึงกำหนดจัดประชุม จึงยังไม่สามารถเผยแพร่บทความย่อได้ใน ณ เวลาที่ส่งรายงาน

5.2 ข้อมูลและประวัติย่อของผู้ได้รับทุนวิจัยระดับปริญญาโท/เอกจากโครงการ

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่ได้รับทุน
1	นางสาวจุฑาทิพย์ คงเพชร	ผู้ช่วยวิจัย	เคมี	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 มิ.ย. 2557
1	นางสาวพิช ชานันท์ ศรีวะ รัมย์	ผู้ช่วยวิจัย	เคมี	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	17 มิ.ย. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 พ.ย. 2557
1	นางสาวเพ็ญทิพ เมืองแก้ว	ผู้ช่วยวิจัย	เคมี	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ส.ค. 2557
1	นางสาวฤทัย ปัญสุวรรณ	ปริญญา โท	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 พ.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ค. 2558
1	นายอัศรพล แดง โสภณ	ปริญญา โท	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 ส.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ค. 2558
1	นายณัฐพล จิระ กิตติวุฒิ	ปริญญา โท	เคมี	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ค. 2559

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่ได้รับทุน
1	นางสาวตรีชฎา รัตนจักร์	ปริญญาโท	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
1	นางสาวบุญส่ง ดิษมังคล้อ	ปริญญาเอก (ไม่เต็มเวลา)	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
2	นายณัฐวุฒิ โยธาพันธ์	ปริญญาเอก	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ค. 2558
2	นางสาวดวงรัตน์ นิมอนุสรณ์กุล	ปริญญาเอก	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
3	นางสาวมาลินี ลีกระจ่าง	ปริญญาโท	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558
3	นางสาวพิมพ์ชนก เอี่ยมวิถีนิช	ปริญญาโท	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่ได้รับทุน
3	นางสาวพรเพ็ญ แซ่อึ้ง	ปริญญาเอก	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558
3	นางสาวอรพรรณ เวียรชัย	ปริญญาเอก	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558
3	นางสาวศศิธร รอดท่าไม้	ปริญญาเอก (ไม่เต็มเวลา)	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
3	นางสาวรัตติยากร ดอนธงขวา	ปริญญาโท	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
4	นายรสติโชติ วรรณพบ	ปริญญาเอก	เคมีวิเคราะห์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่ได้รับทุน
5	นางสาวสุดารัตน์ ขัดสาย	ปริญญา เอก	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559
5	นายบัณฑิต ทอง อ่อน	ปริญญา เอก	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
6	นางสาวอัมพวัน ไมตรีรัตน์	ปริญญา เอก	เคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
6	นางสาวณัฐวี ภูมิ สุข	ปริญญา เอก	เคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560

5.3 บทความย่อ หรือบทสรุปของบทความวิชาการ หรือเอกสารในลักษณะอื่นๆ ตลอดจนสื่อประเภทต่างๆ ที่โครงการได้จัดทำขึ้น

5.3.1 หนังสือรวมบทความย่องานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 1 วันพฤหัสบดีที่ 26 กุมภาพันธ์ 2558 ณ ห้องประชุม ศ.ดร.แถบ นีละนิธิ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวก 4, electronic version only)

5.3.2 หนังสือรวมบทความย่องานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 2 วันศุกร์ที่ 26 กุมภาพันธ์ 2559 ณ ห้องประชุมราชชมงคลชมศิลป์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ (ภาคผนวก 4, electronic version only)

5.3.3 หนังสือรวมบทความย่องานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 วันศุกร์ที่ 24 กุมภาพันธ์ 2560 ณ ห้องพรรณานิคม อาคาร 7 คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติสกลนคร จ. สกลนคร (ภาคผนวก 4, electronic version only)

5.4 ผลงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

5.4.1 รายละเอียดการดำเนินการของทั้ง 6 โครงการย่อย (ภาคผนวก 1)

5.4.2 เอกสารแสดงการรับผลประโยชน์จากการถ่ายทอดเทคโนโลยีที่เอ็นเอ (ภาคผนวก 5)

ลงนาม
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

พีริโวลิตินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์มเมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้ (DPG5780002)

ภาคผนวก 1

รายละเอียดทางวิชาการของแต่ละโครงการย่อย

ชื่อโครงการย่อย	Conformationally restricted PNA with new structures and functions
ระยะเวลาโครงการ	17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่	17 มีนาคม 2557 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย

ค.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร.ธเนศวร นวลโย คณะศิลปศาสตร มหาวิทาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
วิทยาเขตวังไกลกังวล

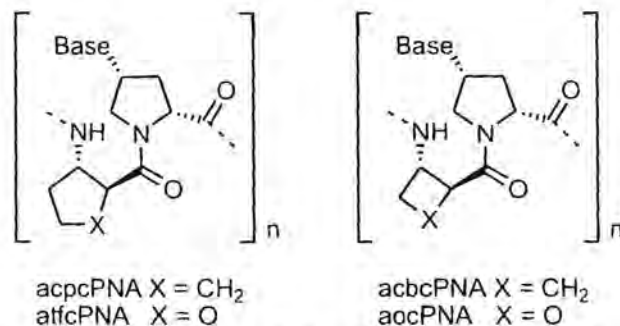
ดร.วรรณชนี สีอิธิวงษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

รายงานความก้าวหน้าของโครงการ

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาพีเอ็นเอที่มีโครงสร้างและสมบัติใหม่ ซึ่งสามารถสรุปความก้าวหน้าของงานวิจัยที่ได้ดำเนินการตลอดโครงการได้ดังนี้

1. Synthesis and DNA binding properties of pyrrolidinyI peptide nucleic acid carrying cyclic ether backbones

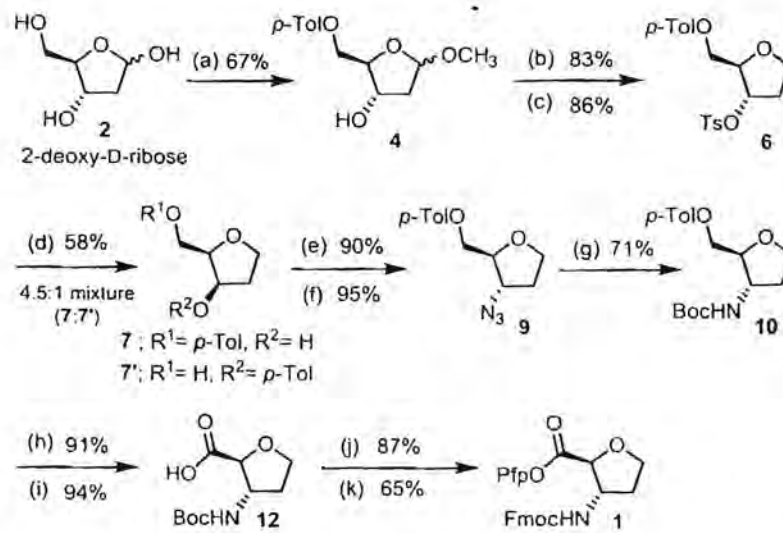
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีไซคลิกอีเทอร์แทนที่วงแหวนคาร์โบไซคลิกในโครงสร้างหลัก (รูปที่ 1) โดยคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการเพิ่มอะตอมของออกซิเจนเข้าไปในโครงสร้างหลักจะทำให้พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นนั้นจะเป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและลดการเกิดแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ โดยไม่ทำให้ความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป



รูปที่ 1 พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอต้นแบบและอนุพันธ์ที่มีหมู่ไซคลิกอีเทอร์ในโครงสร้างหลักที่เป็นเป้าหมายของการสังเคราะห์

งานที่ได้ทำไปตั้งแต่เริ่มต้นโครงการคือการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีตัวเชื่อมที่เป็นเบต้าอะมิโนแอซิดแบบไซคลิกอีเทอร์ชนิด 5 เหลี่ยมได้แก่ (2S,3S)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (atfcPNA) และชนิด 4 เหลี่ยมได้แก่ (2S,3S)-3-amino-oxetane-2-carboxylic acid (aocPNA) จากนั้นจึงนำไปสังเคราะห์เป็น PNA เพื่อศึกษาสมบัติการจับยึดกับ DNA และ RNA

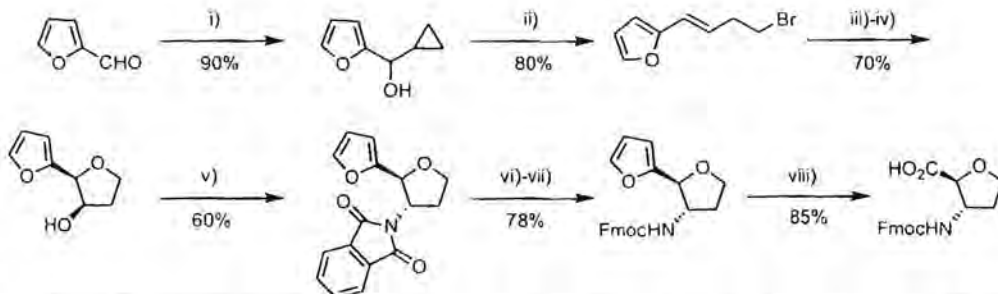
งานในส่วนของพีเอ็นเอที่มีตัวเชื่อมเป็นเบต้าอะมิโนแอซิดแบบไซคลิกอีเทอร์ชนิด 5 เหลี่ยม (atfcPNA) เริ่มต้นจากการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ตัวเชื่อมที่เป็น Fmoc-protected (2S,3S)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid ซึ่งในระยะแรกได้ใช้ 2-deoxy-D-ribose เป็นสารตั้งต้นผ่านปฏิกิริยา 13 ขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 2 โดยมีปริมาณผลผลิตรวม 6.7%



Reaction conditions: (a) i) methanesulfonic acid (cat), MeOH, rt, 30 min, ii) p -toluoyl chloride, pyridine, CH_2Cl_2 , 0 °C (b) p -TsCl, DMAP (cat), Et_3N , CH_2Cl_2 , 0 °C to rt (c) Et_3SiH , $BF_3 \cdot OEt_2$, 0 °C to rt (d) $NaNO_2$, DMSO, 120 °C (e) MsCl, DMAP (cat), Et_3N , CH_2Cl_2 , 0 °C (f) NaN_3 , DMSO, 90-100 °C (g) Pd/C, H_2 (1 atm), Boc₂O, MeOH (h) LiOH, THF:H₂O (1:1), rt (i) TEMPO (cat), BAIB, MeCN:H₂O (1:1), rt (j) i) TFA:CH₂Cl₂ (1:1) ii) FmocOSu, NaHCO₃, MeCN:H₂O (1:1), pH 8, rt (k) PfpOTf, DIEA, CH₂Cl₂

รูปที่ 2 การสังเคราะห์ Pfp-activated Fmoc-2-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (ATFC) จาก 2-deoxy-D-ribose.

นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ Fmoc-protected (2S,3S)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid ขึ้นใหม่ โดยเป็นงานวิจัยร่วมกับ Dr. Roderick W. Bates จาก Nanyang Technological University ประเทศสิงคโปร์ วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่เป็นดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาเพียง 8 ขั้นตอนจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูก และได้ปริมาณผลผลิตรวม 20%



รูปที่ 3 การสังเคราะห์ Fmoc-protected (2S,3S)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (ATFC) วิธีใหม่
Conditions: i) CyclopropylMgBr ii) Me_2SiCl , LiBr, 2,6-lutidine, tBu_4NBr iii) ADmix- β , $MeSO_2NH_2$ iv) NaOH, tBu_4NBr v) phthaimide, Ph_3P , DIAD vi) N_2H_4 , MeOH vii) FmocCl, NaHCO₃ viii) cat $RuCl_3$, NaIO₄

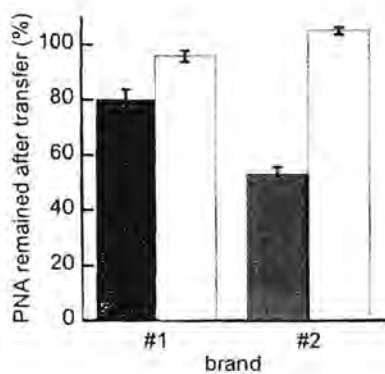
จากนั้นนำมาสังเคราะห์เป็น atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T9 (T9) และเบสผสม GTAGATCACT (M10), TATGTACTAT (M10AT) และ GCTACGTCGC (M10CG) พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้ตามต้องการ โดยมีปริมาณผลผลิต 44, 22, 21 และ 10% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry ให้ผลสอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ และแสดงค่า retention time (reverse phase HPLC) ที่ต่ำกว่า acpcPNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ซึ่งสอดคล้องกับสภาพขั้วที่เพิ่มมากขึ้นของ atfcPNA เมื่อเทียบกับ acpcPNA ต่อมาจึงได้ศึกษาผลการจับยึดกับดีเอ็นเอโดยการวัดค่า T_m ผลที่ได้เมื่อ

เปรียบเทียบกับ acpcPNA เป็นดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าไฮบริดของ atfcPNA กับ DNA และ RNA มี T_m ต่ำกว่า acpcPNA เล็กน้อย ยกเว้นในกรณีของ atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น M10CG ซึ่งจับยึดกับ RNA ได้แข็งแรงกว่า acpcPNA และที่สำคัญคือ atfcPNA ยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงกับการจับยึดกับ DNA และ RNA ที่สูง โดยในแทบทุกกรณีค่า T_m จะลดลงมากกว่า 20 °C เมื่อมีเบสที่ไม่เข้าคู่กันแม้เพียงตัวเดียว นอกจากนี้ atfcPNA ยังสามารถจดจำดีเอ็นเอได้เฉพาะในทิศทาง antiparallel เช่นเดียวกับ acpcPNA (ตารางที่ 1)

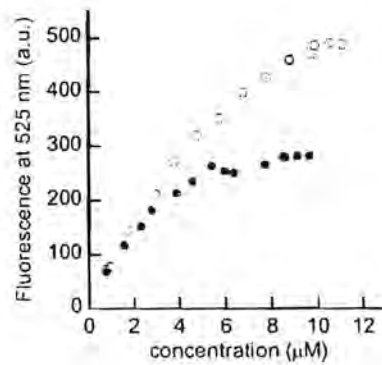
ตารางที่ 1 เสถียรภาพในการจับยึดระหว่าง aocPNA กับ DNA และ RNA

PNA (N→C)	DNA or RNA (5'→3')	T_m atfcPNA (ΔT_m) ^a	T_m acpcPNA (ΔT_m) ^{a,b}	Note
GTAGTCACT (M10)	dAGTGATCTAC	52.5	53.3	complementary DNA
	dAGTG <u>T</u> CTAC	23.4 (-29.1)	23.8 (-29.5)	mismatched DNA
	dAGTG <u>G</u> TCTAC	23.4 (-29.1)	23.9 (-29.4)	mismatched DNA
	dAGTG <u>I</u> TCTAC	25.4 (-27.1)	29.4 (-23.9)	mismatched DNA
	dCATCTAGTGA	<20	<20	parallel DNA
	rAGUGAUCUAC	36.0	42.3	complementary RNA
	rAGUG <u>C</u> UCUAC	<20	23.6 (-18.7)	mismatched RNA
	rAGUG <u>G</u> UCUAC	<20	24.8 (-17.5)	mismatched RNA
	rAGUG <u>U</u> UCUAC	<20	<20	mismatched RNA
	rCAUCUAGUGA	<20	<20	parallel RNA
TATGTA CTAT (M10AT)	dATAGTACATA	49.6	54.2	complementary DNA
	dATAG <u>A</u> ACATA	25.4 (-24.2)	23.4 (-30.8)	mismatched DNA
	dATAG <u>C</u> ACATA	30.2 (-19.4)	30.2 (-24.0)	mismatched DNA
	dATAG <u>G</u> ACATA	<20	24.4 (-29.8)	mismatched DNA
	dATACATGATA	<20	<20	parallel DNA
	rAUAGUACUA	29.2	32.6	complementary RNA
	rAUACUAGUA	<20	<20	parallel RNA
GCTACGTCGC (M10CG)	dGCGACGTAGC	56.4	54.5	complementary DNA
	dGCGA <u>A</u> GTAGC	23.4 (-33.0)	<20	mismatched DNA
	dGCGA <u>G</u> GTAGC	31.2 (-25.2)	30.2 (-24.3)	mismatched DNA
	dGCGA <u>I</u> GTAGC	36.0 (-20.4)	35.1 (-19.4)	mismatched DNA
	dCGATGCAGCG	<20	<20	parallel DNA
	rGCGACGUAGC	41.8	48.0	complementary RNA
	rCGAUGCAGCG	24.4 (-17.4)	39.2 (-8.8)	parallel RNA

a All T_m were measured at PNA = 1 μ M, 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, heating rate 1 °C/min; $\Delta T_m = T_m - T_m^{\text{complementary hybrid}}$ b The T_m data of acpcPNA are provided for comparison purposes. Except for the mismatched hybrids of M10AT and M10CG, T_m data of all acpcPNA hybrids were taken from Ref. Error! Bookmark not defined. d. Mismatch positions in DNA sequence are indicated by underline.



(a)

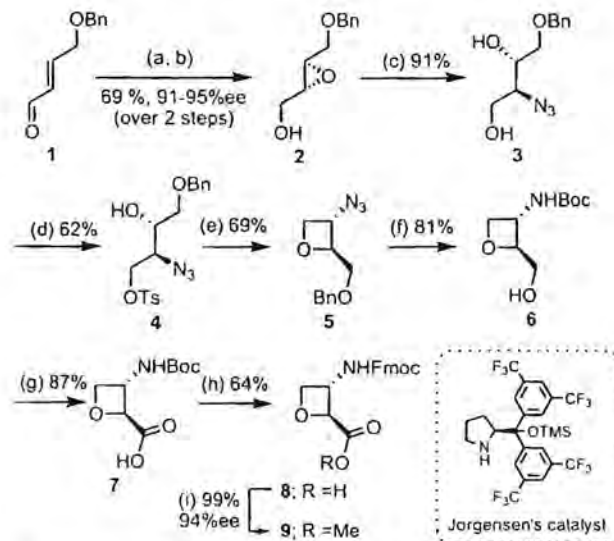


(b)

รูปที่ 4 การเกิด non-specific interaction ของ fluorescein-labeled atfcPNA (สีขาว) เปรียบเทียบกับ acpcPNA (สีเทา) (a) การดูดซับบนหลอดพลาสติก (b) การเกิด self-aggregation จากการติดตามโดย fluorescence spectrophotometry

ผลการทดสอบการละลายของ atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T9 พบว่าการละลายน้ำเพิ่มขึ้นจาก acpcPNA ที่มีลำดับเบสเดียวกันเพียงเล็กน้อย (1.4 mg/mL vs 1.1 mg/mL) จากนั้นได้ศึกษาการลดการเกิด non-specific interaction ของ atfcPNA โดยได้ติดฉลาก fluorescein ที่ปลายด้าน N ของ atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น M10 เพื่อใช้เป็นตัวติดตามโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ โดยในการทดลองได้วัดฟลูออเรสเซนส์ของสารละลายที่เอ็นเอทั้งสองชนิดในเซลล์ที่เป็นควอตซ์ และถ่ายเทไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เป็นพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน แล้วถ่ายกลับมายังควอตซ์เซลล์เพื่อวัดฟลูออเรสเซนส์ซ้ำ พบว่าหลังการถ่ายเทซ้ำหลายๆ ครั้ง ค่าฟลูออเรสเซนส์ของ acpcPNA ลดลงถึงเกือบ 50% ซึ่งแสดงถึงการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่ของ atfcPNA ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของ atfcPNA เปรียบกับ acpcPNA แสดงให้เห็นว่า atfcPNA เกิด self-aggregation ซึ่งนำไปสู่การดับของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าของ acpcPNA ประมาณสองเท่า (รูปที่ 4) แสดงว่าการเพิ่มออกซิเจนอะตอมในโครงสร้างของ acpcPNA ช่วยลดความไม่ชอบน้ำ และแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงลงได้ โดยไม่มีผลกระทบในทางลบต่อความแข็งแรงและความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งน่าจะช่วยส่งผลให้สามารถนำ atfcPNA ไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางมากขึ้น ผลงานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้วจำนวน 2 เรื่อง^{1,2}

เนื่องจากได้มีการค้นพบมาก่อนหน้านี้แล้วว่าการลดขนาดของวงแหวนจาก 5 คาร์บอนใน acpcPNA เป็น 4 คาร์บอนใน acbcPNA ทำให้ความแข็งแรงของการจับยึดกับทั้ง DNA และ RNA เพิ่มขึ้น³ งานอีกส่วนหนึ่งที่ได้ทำเพิ่มเติมคือการสังเคราะห์ four-membered analogue ของ atfcPNA ได้แก่ aocPNA (รูปที่ 5) ซึ่งคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าอาจทำให้ได้พีเอ็นเอที่มีความแข็งแรงในการจับยึดเช่นเดียวกับ acbcPNA แต่มีแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่ลดลง งานวิจัยเริ่มจากการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ (2S,3S) ไอโซเมอร์ของ Fmoc-protected *epi*-oxetin spacer (8) โดยเริ่มต้นจาก aldehyde 1 ขั้นตอนสำคัญในการกำหนดสเตอริโอเคมีของสารเป้าหมายอาศัยปฏิกิริยา Jorgensen's organocatalytic epoxidation ของ 1 เกิดเป็น epoxide ที่นำมา reduce ต่อเป็น alcohol 2 แทนที่โดยไม่มีการแยก intermediate epoxyaldehyde ให้บริสุทธิ์ก่อน ต่อมาเป็นขั้นตอนการเปิดวง epoxide แบบเลือกจำเพาะต่อตำแหน่งด้วย sodium azide/trimethyl borate ได้สาร 3 ตามด้วยปฏิกิริยา selective mono-tosylation ได้เป็นสาร 4 การปิดวง oxetane กระทำภายใต้สภาวะที่เป็นเบสเกิดเป็น oxetane intermediate 5 ซึ่งเปลี่ยนต่อไปเป็นโมเลกุลเป้าหมาย 8 โดยกระบวนการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและหมู่ปกป้อง โดยสามารถคำนวณ overall yield จากการสังเคราะห์ทั้งกระบวนการรวม 11 ขั้นตอนได้เป็น 6.7 % ดังสรุปในรูปที่ 5 ซึ่งจัดว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเท่าที่เคยมีรายงานมาในการทำ enantioselective synthesis ของ (2S,3S)-*epi*-oxetin

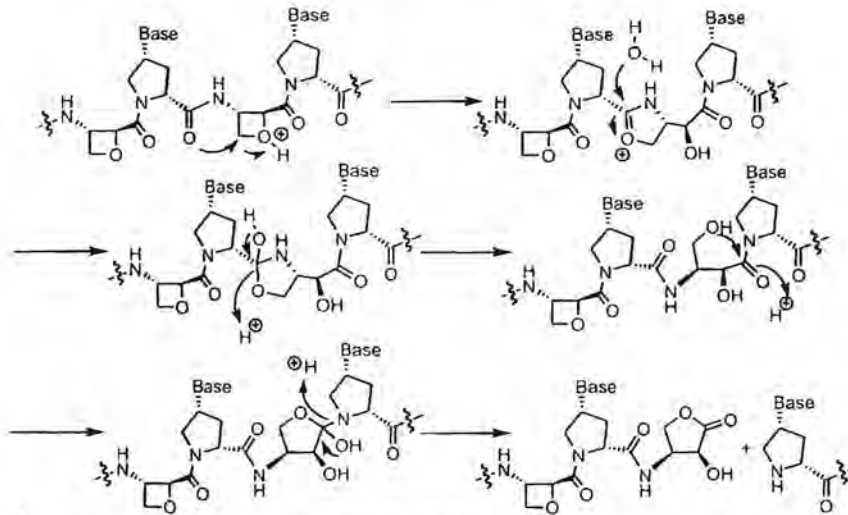


Reagents and conditions: (a) (S)-2-(bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)(trimethylsilyloxy)methyl) pyrrolidine (Jorgensen's catalyst, 10 mol%), 30% aq. H₂O₂, CH₂Cl₂, 10-20 °C, 4.5 h; (b) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 30 min; (c) NaN₃, B(OMe)₃, DMF, 50 °C, 5 h; (d) TsCl, DIEA, 2-aminoethyl diphenylborinate (2-ADP, 10 mol%), MeCN, rt, 5 d; (e) NaOH, TBAHS (cat), toluene, H₂O, rt, 20 min; (f) Pd(OH)₂/C (cat), H₂ (1 atm), MeOH, Boc₂O, 7 d; (g) DAIB, TEMPO (cat), MeCN, H₂O, rt, 24 h; (h) i. TFA, CH₂Cl₂, ii. FmocOSu, NaHCO₃, MeCN, H₂O, rt, 24 h; (i) CH₂N₂ (generated from Diazald and NaOH), EtOAc, rt, 30 min.

รูปที่ 5 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ Fmoc-protected (2S,3S)-oxetin

จากนั้นจึงได้นำสาร 8 มาใช้เป็นโมโนเมอร์สำหรับสังเคราะห์ oxetinPNA ที่มีลำดับเบสเป็น GTAGATCACT ด้วยวิธี Fmoc-SPSS สามารถหา overall coupling efficiency ได้เป็น 23 % จากการวัดปริมาณ dibenzofulvene-piperidine adduct ที่ปลดปล่อยออกมาในขั้นตอนการกำจัดหมู่ Fmoc ครั้งสุดท้าย หรือคิดเป็นประสิทธิภาพของการ coupling ต่อรอบ ประมาณ 93% ต่อมาจึงทำ side-chain deprotection และ cleavage สายของ PNA ออกจาก solid support ซึ่งประสบปัญหาในกระบวนการสังเคราะห์ คือ aocPNA ไม่เสถียรทั้งภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และเบส จากการวิเคราะห์รูปแบบการแตกตัวในแมสสเปกตรัมพบว่าเกิดการขาดออกของสายเพปไทด์ตรงพันธะเอไมด์ที่เชื่อมต่อระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ pyrrolidiny monomer กับหมู่เอมีนของ oxetin ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเปิดวงของ oxetin ก่อนได้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเกิดปฏิกิริยา intramolecular nucleophilic attack ต่อตั้งแสดงในรูปที่ 6

จากปัญหาเรื่องความเสถียรของ oxetinPNA นี้จึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการ deprotection และ cleavage ของ oxetinPNA ใหม่ โดยพบว่าสภาวะ 25% tert-butylamine, 25% MeOH ในน้ำ, 60 °C เป็นเวลา 2 h ให้ผลที่ดีกว่าการใช้ 1:1 aqueous ammonia:dioxane ที่ 60 °C overnight อย่างเห็นได้ชัด และภาวะที่ใช้ในการทำ cleavage ของ PNA ออกจาก Rink amide resin คือการใช้สารละลาย 50% TFA ใน CH₂Cl₂ โดยทำเป็นรอบๆละ 2 นาที เก็บแยกเป็น fraction ที่สามารถรวมเฉพาะ fraction ที่ไม่มีการสลายตัว หรือมีการสลายตัวเพียงเล็กน้อยมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค reverse phase HPLC ซึ่งโดยวิธีนี้จะได้อxetinPNA ที่บริสุทธิ์ โดยมี isolated yield เพียง 1.2-1.3% อย่างไรก็ตามปริมาณที่เอนเอที่แยกได้ถือว่าเพียงพอต่อการทดสอบการจับยึดเบื้องต้น ซึ่งแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 6 ข้อเสนอเพื่ออธิบายกลไกการสลายตัวของ aocPNA ภายใต้ภาวะกรด

ตารางที่ 2 เสถียรภาพในการจับยึดระหว่าง aocPNA กับ DNA และ RNA

Entry	DNA/RNA sequence ^a	T_m (°C) oxetinPN A ^b	ΔT_m (°C) oxetinPNA a,c	T_m (°C) acbcPNA ^d	ΔT_m (°C) acbcPNA ^d	comment
1	5'-AGT GAT CTA C-3'	46.3	-	66.1	-	Com. DNA
2	5'-AGT GAT CTA C-3'	46.1	-	-	-	Com. DNA
3	5'-AGU GAU CUA C-3'	31.3	-	58.2	-	Com. RNA
4	5'-AGU GAU CUA C-3'	30.3	-	-	-	Com. RNA
5	5'-AGT GCT CTA C-3'	< 20	>26.1	39.8	26.3	mmC DNA
6	5'-AGT GGT CTA C-3'	< 20	>26.1	36.4	29.7	mmG DNA
7	5'-AGT GIT CTA C-3'	28.1	18.0	46.6	19.5	mmT DNA

^aPNA sequence คือ H-GTAGATCACT-LysNH₂ (no N-terminal capping)

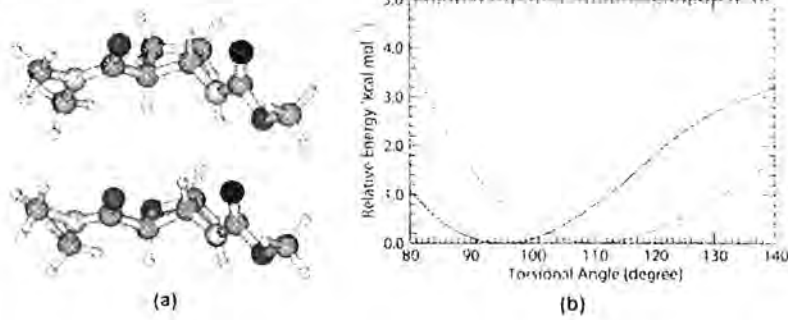
^bสภาวะในการศึกษา T_m : 1.0 μ mol PNA, 1.0 μ mol DNA/RNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl. Heating rate 1 °C/1 min.

^c T_m (complementary) - T_m (mismatch)

^dการทดลองนี้อ้างอิงจาก *Org. Lett.* 2012, 14, 1440–1443. ที่ทดลองกับ N-acetylated acbcPNA ในสภาวะเดียวกัน โดยได้มีการยืนยันแล้วว่า N-acetylation ของ oxetinPNA ไม่ส่งผลต่อค่า T_m อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า aocPNA มีความสามารถในการจับยึดกับ DNA และ RNA ที่ด้อยกว่า acbcPNA มาก โดยการจับยึดยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงที่สูงดังจะเห็นได้จากค่าผลต่าง T_m ที่ลดลงมากกว่า 18 °C สำหรับ mismatched DNA ซึ่งใกล้เคียงกับ acbcPNA เนื่องจากประสิทธิภาพของการจับยึดไม่ดี ประกอบกับปัญหาทางด้านเทคนิคในการสังเคราะห์ aocPNA ในปริมาณมาก จึงไม่ได้ศึกษาสมบัติด้านแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อไป นอกจากนี้ยังได้ร่วมมือกับ และ รศ.ดร.วิวัฒน์ วชิรวงศ์กวิน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อศึกษาแบบจำลองโมเลกุลของ (2S,3S)-3-amino-oxetane-2-carboxylic acid (AOC) เพื่อเสนอคำอธิบายว่าทำไมการเพิ่มออกซิเจนอะตอมเข้าไปในวงแหวนถึงได้ลดความเสถียรของ PNA-DNA duplex ลงค่อนข้างมาก โดยผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปจะทำให้วงแหวนของออกซิเจนมีลักษณะแบนราบกว่าไซโคลบิวเทน และส่งผลให้มุม torsional ของ NH/CO มีค่าเพิ่มขึ้นจากประมาณ 95 ° ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมใน PNA-DNA duplex³ กลายเป็น >100 ° โดยงาน

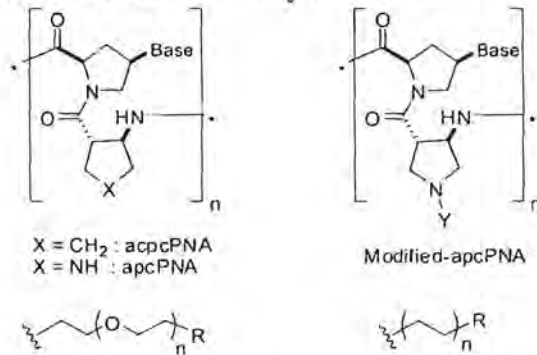
ในส่วนของ aocPNA ทั้งหมด ซึ่งเป็นผลงานร่วมกับโครงการพัฒนาอัจฉริยภาพทางวิทยาศาสตร์สำหรับเด็กและเยาวชนของ นายภัทรเกียรติ แสนคงสุข ได้รับการตีพิมพ์แล้ว⁴



รูปที่ 7 (a) แบบจำลองโมเลกุลของไซโคลฮีทเทน (บน) และออกซีเทน เบต้าอะมิโนแอซิด (ล่าง) และ (b) ผลการคำนวณพลังงานของไซโคลฮีทเทน (เส้นสีดำ) และออกซีเทน เบต้าอะมิโนแอซิด (เส้นสีแดง) ที่เป็นฟังก์ชันกับ torsional angle

2. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with positively charged backbone

งานวิจัยในส่วนนี้ซึ่งมีผู้รับผิดชอบคือ ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม และ ดร.ธนศร นวลโย มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ pyrrolidinyl PNA ที่มี hydrophilic modifier เป็นหมู่ไฮดรอกซิล อะมิโน หรือหมู่กวานิดีน ที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักของ acpcPNA ผ่านหมู่แอลคิลหรือ polyethylene glycol (PEG) โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันบนพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วย 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) spacer (apc/acpcPNA) โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้พีเอ็นเอที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและอาจจับยึดกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงขึ้นเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกบนสายของพีเอ็นเอกับประจุลบของดีเอ็นเอ อีกทั้งหมู่ที่มีประจุบวกยังอาจช่วยให้พีเอ็นเอสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย



- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1: A2EG ; n = 1, R = NH ₂ | 9: AE ; n = 1, R = NH ₂ |
| 2: A3EG ; n = 2, R = NH ₂ | 10: AB ; n = 2, R = NH ₂ |
| 3: A4EG ; n = 3, R = NH ₂ | 11: HE ; n = 1, R = OH |
| 4: H2EG ; n = 1, R = OH | 12: HB ; n = 2, R = OH |
| 5: H3EG ; n = 2, R = OH | 13: GB ; n = 2, R = Guanidine |
| 6: H4EG ; n = 3, R = OH | |
| 7: G2EG ; n = 1, R = Guanidine | |
| 8: G3EG ; n = 2, R = Guanidine | |

รูปที่ 8 โครงสร้างของ backbone-modified acpcPNA ที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

สรุปงานวิจัยที่ได้ทำมาทั้งหมดคือการสังเคราะห์ acpcPNA ที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่ hydrophilic modifier ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 8 จำนวนตั้งแต่ 1-3 หมู่ต่อสายพีเอ็นเอ และได้ศึกษาการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งพบว่าความสามารถในการจับยึดของ acpcPNA ที่ผ่านการดัดแปรด้วย hydroxy-terminated PEG จะใกล้เคียงหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้มีการดัดแปร แต่พีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรด้วย amino- และ guanidine-terminated PEG จะมีความเสถียรเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของ T_m จะเป็นไปตามจำนวนของหมู่ที่ดัดแปร และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ ซึ่ง

เสนอแนะว่าความเสถียรที่เพิ่มขึ้นเกิดจากแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิตของหมู่ NH₂ และหมู่ guanidinium ซึ่งมีประจุบวกภายใต้ภาวะของการทดลอง กับหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบ โดยในทุกกรณียังแสดงความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอที่สูง (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 เสถียรภาพในการจับยึดระหว่าง backbone-modified acpcPNA กับ DNA

PNA	Sequence (N → C)	Modifier (X)	t_r ^a (min) ^c	m/z (calcd) ^b	m/z (found) ^c	T_m ^{e,f} (°C)	ΔT_m ^g (°C)	T_m ^{e,f} (°C)	ΔT_m ^g (°C)
PNA1	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	none	36.2	3180.4	3180.3	77.7	-	71.9	-
PNA2	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	A2EG	34.6	3267.5	3268.3	79.7	+2.0	71.9	0.0
PNA3	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	A3EG	35.2	3311.5	3309.5	78.7	+1.0	72.9	+1.0
PNA4	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	A4EG	28.9	3355.5	3356.0	78.7	+1.0	70.9	-1.0
PNA5	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	AE	31.1	3224.4	3228.0	81.9	+4.2	73.8	+1.9
PNA6	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	AB	31.8	3251.5	3250.3	79.7	+2.0	71.9	0.0
PNA7	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	H2EG	34.8	3268.4	3266.4	71.9	-5.8	68.0	-3.9
PNA8	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	H3EG	30.7	3312.5	3314.5	70.9	-6.8	67.1	-4.8
PNA9	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	H4EG	36.5	3356.5	3355.5	70.9	-6.8	67.1	-4.8
PNA10	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	HE	32.9	3225.4	3228.5	71.5	-6.2	67.0	-4.9
PNA11	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	HB	31.9	3252.4	3253.5	71.9	-5.8	67.1	-4.8
PNA12	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	G2EG	29.8	3309.5	3313.4	79.7	+2.0	68.0	-3.9
PNA13	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	G3EG	28.6	3353.5	3351.6	79.7	+2.0	70.9	-1.0
PNA14	Ac-TTTT ^(NX) TTTT-LysNH ₂	GB	33.2	3293.5	3293.6	80.6	+2.9	72.9	+1.0
PNA15	Bz-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	none	29.9	3621.9	3619.5	57.4	-	51.5	-
PNA16	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	A3EG	29.2	3690.9	3691.3	63.2	+5.8	55.4	+3.9
PNA17	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	AE	29.6	3603.8	3604.7	65.4	+8.0	58.4	+6.9
PNA18	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	AB	25.2	3630.9	3628.1	66.1	+8.7	58.3	+6.8
PNA19	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	H3EG	29.4	3691.9	3690.8	56.4	-1.0	53.5	+2.0
PNA20	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	HE	29.8	3604.8	3605.4	58.7	+1.3	54.2	+2.7
PNA21	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	HB	29.1	3631.9	3629.9	59.3	+1.9	53.5	+2.0
PNA22	Ac-GTAGA ^(NX) TCACT-LysNH ₂	GB	29.7	3672.9	3671.0	67.1	+9.7	58.3	+6.8
PNA23	Bz-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	none	28.5	3623.9	3617.2	60.3	-	52.5	-
PNA24	Ac-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	A3EG	27.0	3954.7	3955.9	74.8	+14.5	63.2	+10.7
PNA25	Ac-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	AB	29.9	3775.2	3776.9	78.7	+18.4	65.1	+12.6
PNA26	Ac-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	H3EG	28.5	3958.0	3958.4	58.3	-2.0	53.5	+1.0
PNA27	Ac-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	HB	27.4	3778.0	3779.2	61.2	+0.9	54.4	+1.9
PNA28	Ac-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	GB	26.9	3901.1	3898.6	78.7	+18.4	66.8	+14.3
PNA29	Flu-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	H3EG	30.9	4274.3	4274.9	50.0	-10.3	46.7	-5.8
PNA30	Flu-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	A3EG	30.7	4271.3	4271.8	67.1	+6.8	56.4	+3.9
PNA31	Flu-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	HB	30.3	4094.2	4095.9	53.5	-6.8	48.6	-3.9
PNA32	Flu-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	AB	30.6	4091.3	4089.5	70.0	+9.7	57.4	+4.9
PNA33	Flu-GT ^(NX) AGA ^(NX) TCA ^(NX) CT-LysNH ₂	GB	29.6	4217.3	4217.3	68.0	+7.7	56.4	+3.9

^aHPLC conditions: C18 column, 4.6 × 150 mm, 3 μ, gradient 0.1% TFA in H₂O:MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm

^bAverage mass of !A + H⁺

^cMALDI-TOF

^dIsolated yield after HPLC purification, spectrophotometrically determined

^eWith complementary DNA (dA₉ for PNA1-PNA14; dAGTGATCTAC for PNA15-PNA33)

^fConditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00, 0 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

^g $\Delta T_m = T_m(\text{modified PNA}) - T_m(\text{unmodified PNA})$. Unmodified PNA refers to acp-modified acpcPNA (X = none).

^hConditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00, 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

ตารางที่ 4 specificity ของการจับยั้งระหว่าง backbone-modified acpcPNA กับ DNA ที่ความเข้มข้นเกลือต่ำและสูง

PNA ^a	Modifiers (X)	0 mM NaCl		100 mM NaCl	
		T _m (°C) ^b	ΔT _m (°C) ^c	T _m (°C) ^b	ΔT _m (°C) ^c
PNA21	HB	59.3		53.5	
PNA27	3×HB	61.2	+1.9	54.4	+0.9
PNA19	H3EG	56.4		53.5	
PNA26	3×H3EG	58.3	+1.9	53.5	0.0
PNA18	AB	66.1		58.3	
PNA25	3×AB	78.7	+12.6	65.1	+6.8
PNA16	A3EG	63.2		55.4	
PNA24	3×A3EG	74.8	+11.6	63.2	+7.8
PNA22	GB	67.1		58.3	
PNA28	3×GB	78.7	+11.6	66.8	+8.5

^aPNA sequence = Ac-GTAGA^(X) TCACT-LysNH₂ or Ac-GT^(NX) AGA^(PX) TCA^(NX) CT-LysNH₂

^bConditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00, 0 or 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

^cΔT_m = T_m(triply-modified PNA) – T_m(singly-modified PNA).

ตารางที่ 5 ความสามารถในการละลายของ backbone-modified acpcPNA เปรียบเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปลงโครงสร้าง

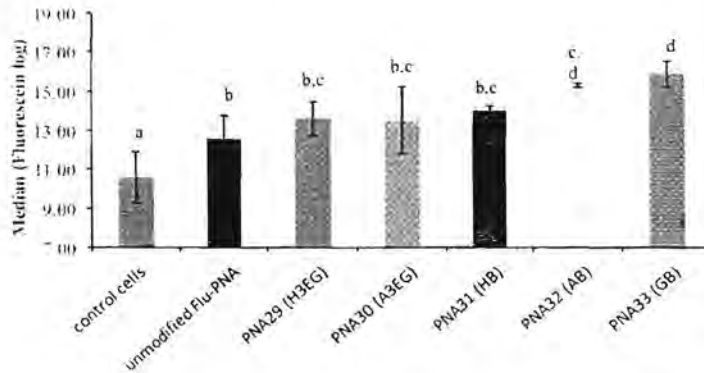
PNA	Modifier (X)	Saturated concentration (mM)	Saturated concentration (mg/mL)
Unmodified ^a	-	3.3±0.2	10.5±0.6
PNA3	A3EG	59.6±2.4	197.4±7.9
PNA6	AB	>120±0.2	>39.0±0.7
PNA8	H3EG	64.1±0.5	212.3±1.7
PNA11	HB	31.8±0.9	103.4±2.9
PNA14	GB	>13.3±0.4	>43.8±1.3

^aunmodified acpcPNA; Ac-TTTTTTTT-LysNH₂.

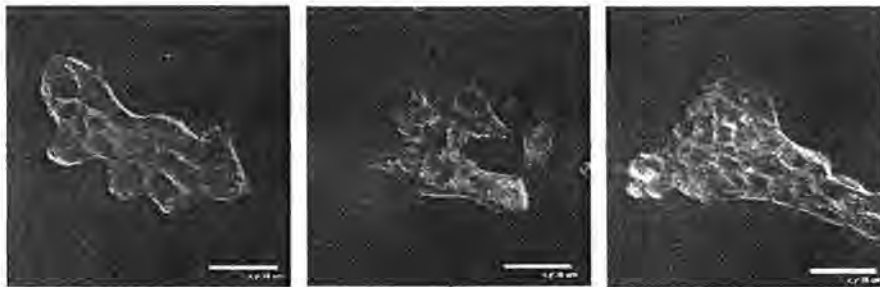
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการละลายของ PNA ที่มี hydrophilic modifier พบว่าการเพิ่มหมู่เหล่านี้แม้เพียงหมู่เดียวในโมเลกุลของพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น T₉ ก็ช่วยให้การละลายน้ำเพิ่มขึ้นถึงกว่า 10 เท่า (ตารางที่ 5) และยังได้ศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของ modified PNA (เป็นงานวิจัยร่วมกับ รศ.ดร.ศุภคร วณิชเวชารุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยได้เลือกตัวแทนที่นำไปศึกษาคือ acpcPNA ความยาว 10 เบสที่มีลำดับเบสผสม GTAGATCACT ที่ผ่านการ modify ด้วย R = -(CH₂)₄OH, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂OH, -(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH₂, -(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NHC(=NH)NH₂ และติดฉลากเรืองแสงฟลูออเรสซินที่ปลายด้าน N- ของโมเลกุล ผลการทดสอบเบื้องต้นโดยเทคนิค flow cytometry แสดงให้เห็นว่าพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรไม่ว่าจะด้วยหมู่ใดสามารถเข้าสู่เซลล์ของคน

(HEK293T) ได้ดีกว่าพีเอ็นเอที่ไม่ได้ผ่านการตัดแปร โดยเฉพาะอย่างยิ่งพีเอ็นเอที่ผ่านการตัดแปรด้วยหมู่กวินดิน ($-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$) และหมู่อะมิโน ($-(CH_2)_6NH_2$) ให้ผลการเข้าเซลล์ที่ดีที่สุด (รูปที่ 9)

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคการตัดแปรที่พัฒนาขึ้นในการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีโซ่ข้างแบบชอบน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพีเอ็นเอที่ได้แสดงสมบัติที่พึงประสงค์ ได้แก่ การจับยึดกับดีเอ็นเออย่างแข็งแรงและจำเพาะเจาะจง โดยเมื่อมีโซ่ข้างที่มีประจุบวกจะทำให้ความแข็งแรงของการจับยึดของพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปรกับดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น จากผลของแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต และพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปรด้วยโซ่ข้างที่เป็นกวินดินและอะมิโนสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ด้วยตัวเอง ซึ่งเป็นการปูพื้นฐานของการนำพีโรลิดีนพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้ในเซลล์ต่อไป โดยงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว⁵



(A)



(B)

รูปที่ 9 เปรียบเทียบการเข้าเซลล์ HEK293T ของพีโรลิดีนที่ผ่านการตัดแปรด้วยหมู่แทนที่แบบไฮโดรฟิลิกบนโครงสร้างหลัก 3 ตำแหน่ง โดยลำดับเบสของพีเอ็นเอที่ใช้คือ Flu-GT*AGA*TCA*CT-LysNH₂; * คือตำแหน่งที่ถูกตัดแปร (ดูความหมายของรหัสแสดงการตัดแปรในรูปที่ 8) โดยเทคนิค flow cytometry (A) และภาพถ่ายจาก confocal fluorescence microscope ของเซลล์ที่ผ่านการ incubate กับ PNA33 ที่ถูกตัดแปรด้วยหมู่ $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ (กลาง) เทียบกับพีเอ็นเอที่ไม่ได้ถูกตัดแปร (ขวา) และบัพเฟอร์ (ขวา)

3. Pyrrolidiny peptide nucleic acids with dye-modified backbone

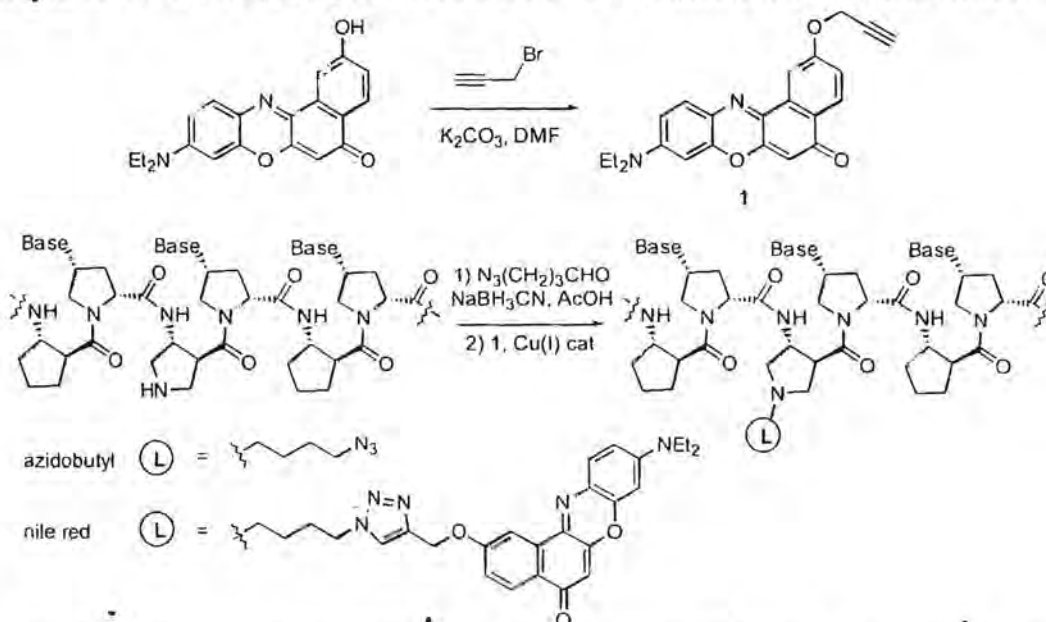
งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการพัฒนาพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ โดยแบ่งเป็น 4 ส่วนดังนี้

3.1 Pyrrolidiny peptide nucleic acids with Nile red label

ฉลากเรืองแสงตัวแรกที่ได้ออกมาคือ Nile red ซึ่งเป็นสีย้อมในกลุ่ม benzophenoxazine ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วของตัวทำละลาย (solvatochromic dye) ที่เป็นที่รู้จักกันดี⁶ มีผู้ศึกษาดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย Nile red และสีย้อมอื่นในกลุ่มเดียวกันเช่น Nile blue อยู่บ้าง⁷ โดยมีการติดฉลากในรูปแบบต่างๆ กัน เช่น ติดอยู่บนนิวคลีโอเบส ต่อแทนที่นิวคลีโอเบส หรือต่อกับโครงหลักของดีเอ็นเอ ทุกกรณีไม่พบการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเมื่อเป็นสายคู่ เว้นแต่จะใช้ร่วมกับฉลากเรืองแสงชนิดอื่นเป็น Energy transfer pair⁸ อย่างไรก็ตามพีเอ็นเอมีสภาพประจุ

และคอนฟอร์เมชันที่แตกต่างจากดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่พีเอ็นเอที่ติดฉลากดังกล่าวจะแสดงสมบัติเชิงแสงที่แตกต่างจากดีเอ็นเอ

งานวิจัยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ Nile red ที่ดัดแปลงโดยการเติมหมู่ propargyloxy ที่ตำแหน่ง 2 จากนั้นนำไปต่อเข้ากับโมเลกุลของ acpcPNA ที่ถูกดัดแปลงโดยการแทนที่ ACPC หน่วยหนึ่งด้วย APC ซึ่งจะทำให้มีตำแหน่งของไนโตรเจนอะตอมอยู่ในโครงสร้างหลัก โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชัน-คลิก ที่กลุ่มวิจัยได้พัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ ดังแสดงในรูปที่ 10 และได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลาก Nile red ที่ตรงกลางสายทั้งหมด 5 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 6



รูปที่ 10 การสังเคราะห์ propargyl Nile red (1) และการติดฉลาก Nile red บนพีเอ็นเอโดยวิธี sequential reductive alkylation-Click chemistry

ตารางที่ 6 ลำดับเบสและข้อมูลเฉพาะของพีเอ็นเอที่ติดฉลาก Nile red ที่สังเคราะห์ขึ้น

PNA	sequence (N to C) ^a	t_R (min) ^b	%yield ^c	m/z ^d (calcd)	m/z ^e (found)
10mer-Nr	GTAGA(Nr)TCACT	33.6	6.3	4157.5	4155.1
11merAA-Nr	CATAA(Nr)AATACG	34.2	18.5	4491.9	4491.1
11merCC-Nr	CATAC(Nr)CATACG	34.6	11.4	4443.9	4441.8
11merGG-Nr	CATAG(Nr)GATACG	32.8	15.2	4523.9	4523.2
11merTT-Nr	CATAT(Nr)TATACG	34.3	8.4	4473.9	4473.0

^aAll sequences were end-capped at N- and C-termini with N-acetyl-L-lysine and L-lysine, respectively.

^bHPLC conditions: C18 column 4.6X50 mm 3 μ , gradient 0.1% TFA in $H_2O:MeOH$ 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm

^cIsolated yield (determined spectrophotometrically) after HPLC purification

^dAverage mass of $[M-H]^+$

^eMALDI-TOF

พีเอ็นเอที่ติดฉลาก Nile red แสดงสมบัติ solvatochromic กล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของ λ_{max} ใน absorption และ fluorescence spectra ตัวอย่างเช่น พีเอ็นเอ 10mer-Nr ใน 10 mM sodium phosphate buffer แสดง λ_{abs} และ λ_{em} อยู่ที่ 575 และ 656 nm ตามลำดับ เมื่อลดขั้วของตัวทำละลายโดยการเติมอะซิโตนไนโตรล์ จะทำให้ทั้ง λ_{abs} และ λ_{em} เลื่อนไปในทิศทางที่มีความยาวคลื่นสั้นลง (blue shift) มากขึ้นตามลำดับ (20% MeCN: λ_{abs} 592 nm,

λ_{em} 654 nm; 50% MeCN: λ_{abs} 569 nm, λ_{em} 647 nm; 100% MeCN: λ_{abs} 544 nm, λ_{em} 634 nm) และเมื่อให้เข้าคู่กับดีเอ็นเอ พบว่า 10mer-Nr มีการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นจากในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวประมาณ 36 และ 72% สำหรับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมและมีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยในทั้งสองกรณีมีการเกิด blue shift ของ fluorescence spectra ประมาณ 10 nm สิ่งที่น่าสนใจคือเมื่อดีเอ็นเอมีเบสเกินมาทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า bulged duplex จะทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึงเกือบ 3 เท่า โดยไม่จำกัดว่าเบสที่เกินมาจะเป็นเบสอะไร การเรืองแสงของ Nile red ที่เพิ่มขึ้นมากนี้เสนอแนะว่าตัวฉลาก Nile red แทรกเข้าไปอยู่ในส่วนของ bulge ซึ่งทำให้เกิด hydrophobic environment¹⁰ ที่ทำให้ quantum yield ของฉลาก Nile red เพิ่มขึ้น และเกิด blue shift ของ fluorescence spectra ไปถึง 13 nm ส่วนในกรณีของไฮบริดกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม Nile red น่าจะแทรกตัวอยู่ในบริเวณ groove ของ PNA-DNA duplex อย่างไรก็ตาม การเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นในกรณีของ complementary และ bulged duplex นั้นขึ้นอยู่กับลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงด้วย (ตารางที่ 2) แต่การเปลี่ยนแปลงของ λ_{em} จะเป็นไปในทิศทางเดียวกันเสมอคือ bulged duplex จะเกิด blue shift มากกว่า complementary duplex ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสิ่งแวดล้อมของฉลาก Nile red ในทั้งสองกรณีนี้แตกต่างกัน ดังนั้นพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย solvatochromic dye เช่น Nile red จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นโพรบสำหรับศึกษาโครงสร้างของดีเอ็นเอได้ งานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว¹¹

ตารางที่ 7 ข้อมูล T_m และสมบัติเชิงแสงของ Nile red-labeled acpcPNA^a

PNA	DNA (5' to 3') ^b	T_m (°C) ^c	λ_{abs}	λ_{em} ^d	Φ_f ^e	F/F_0 ^f
10mer-Nr	none	-	575	656	0.11	-
	AGTGATCTAC	58.8 (56.9)	598	647	0.15	1.36
	AGTG <u>C</u> TCTAC	37.5 (36.7)	585	648	0.17	1.72
	AGTGACTCTAC	46.9 (52.0)	589	643	0.29	2.91
	AGT <u>C</u> GATCTAC	N.D. ^g	591	648	0.14	1.16
	AGTG <u>C</u> CCTCTAC	N.D. ^g	585	648	0.17	1.45
11merAA-Nr	none	-	598	657	0.15	-
	CGTATTTTATG	76.0	600	651	0.23	1.55
	CGTATTCCTATG	74.7	593	645	0.33	2.34
11merCC-Nr	none	-	594	656	0.08	-
	CGTATGGTATG	67.4	594	646	0.19	2.49
	CGTATGCGTATG	71.2	598	644	0.13	1.79
11merGG-Nr	none	-	599	660	0.04	-
	CGTATCCTATG	(62.3)	599	655	0.15	3.27
	CGTATCCCTATG	(62.3)	599	652	0.10	2.46
11merTT-Nr	none	-	588	655	0.09	-
	CGTATAATATG	76.6	602	654	0.19	2.05
	CGTATACATATG	76.0	590	646	0.29	3.44

^aAll measurements were carried out in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1.0 μ M; [DNA] = 1.2 μ M at 20 °C.

^bUnderlined and boldface letters in DNA sequences indicate the position of mismatch and base insertion, respectively.

^cDetermined by UV-vis (260 nm) and/or fluorescence spectrophotometry (643 nm, shown in parentheses)

^d λ_{ex} = 580 nm

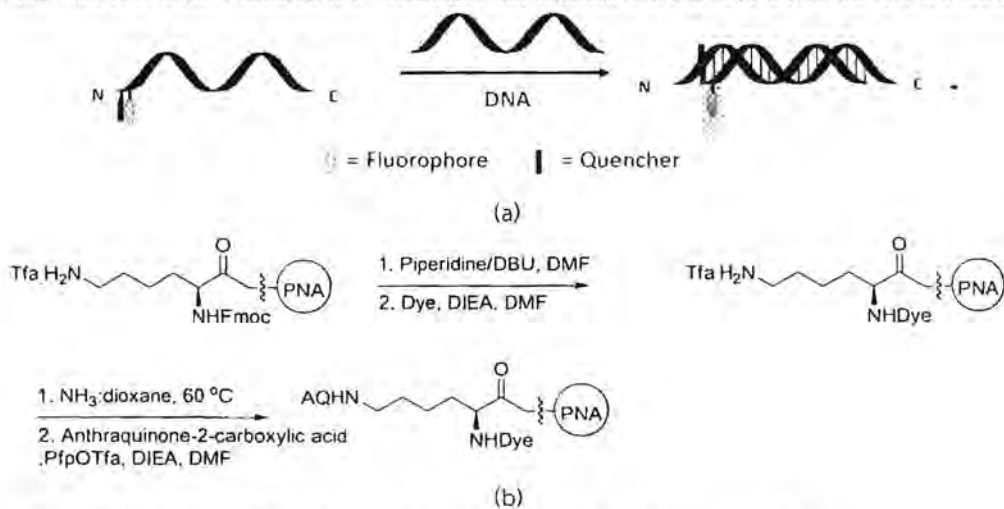
^eCresyl violet was used as a standard (Φ = 0.54 in MeOH).

^f F/F_0 was calculated from the ratio of fluorescence of duplex divided by the single stranded PNA at 643 nm.

Not determined

3.2 Doubly-end-labeled PNA beacon

งานในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนา end-labeled PNA beacon โดยอาศัยการติดฉลากเรืองแสงร่วมกับตัวดับแสงที่มีความสามารถในการเกิด end-stacking กับ terminal base pairs ของ PNA-DNA duplex ได้ โดยปกติ การออกแบบ molecular beacon probe แบบที่ติดฉลากสองชนิดจำเป็นต้องให้การจัดวางตัวของฉลากทั้งสองโนโพรบอิสระ และโพรบที่เกิดการไฮบริดซ์กับเป้าหมายแตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างฉลากทั้งสองเช่น contact quenching หรือ กระบวนการ FRET เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสง โดยในกรณีของดีเอ็นเอมักจะต้องการออกแบบโครงสร้างให้เป็นห่วงและก้านโดยฉลากทั้งสองจะติดอยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของโพรบตรงบริเวณที่เกิดเป็นส่วนก้าน¹² แต่ในกรณีของพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงโดยทั่วไปจะอยู่ในสภาพที่พับตัวเป็นโครงสร้างที่ทำให้เกิดการสัมผัสของฉลากได้ด้วยตัวเองอยู่แล้ว การออกแบบให้มีโครงสร้างเป็นห่วงและก้านจึงไม่จำเป็น¹³ แต่ยังคงจำเป็นต้องมีการติดฉลากสองตัวที่ปลายด้านตรงข้ามกันของโมเลกุลของพีเอ็นเอ ในงานนี้ได้มีแนวคิดในการติดฉลากสองชนิดที่ปลายด้านเดียวกันของพีเอ็นเอโพรบ แต่อาศัยการเลือกคู่ฉลากที่เหมาะสม กล่าวคือ ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว ฉลากทั้งสองจะอยู่ใกล้กันจึงสามารถเกิดอันตรกิริยาได้ โดยไม่ขึ้นกับคอนฟอร์เมชันหรือโครงสร้างทุติยภูมิของตัวโพรบ และถ้าเลือกฉลากตัวหนึ่งที่มีสมบัติในการเกิด end-stacking การเกิด duplex จะทำให้ฉลากทั้งสองแยกตัวออกจากกัน ซึ่งอันตรกิริยาที่เปลี่ยนแปลงไปก็จะส่งผลให้การเรืองแสงเปลี่ยนไปด้วย ดังแสดงในรูปที่ 11 หลักการนี้ได้เคยมีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้ในระบบของดีเอ็นเออยู่บ้าง โดยคู่ฉลากที่น่าสนใจคือ fluorescein/anthraquinone แต่ผลที่ได้ยังไม่ค่อยน่าพอใจนัก กล่าวคือการเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปยังค่อนข้างต่ำ (ไม่เกิน 4-5 เท่า) และความจำเพาะเจาะจงยังไม่ดี^{2,4} ผู้วิจัยจึงประยุกต์ใช้แนวคิดนี้มาใช้ในการพัฒนา end-labeled acpcPNA beacon โดยคาดหวังว่าจะให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจนและมีความจำเพาะเจาะจงที่ดีขึ้นกว่าโพรบที่เป็นดีเอ็นเอ



รูปที่ 11 หลักการทำงาน (a) และ วิธีการสังเคราะห์ doubly-end-labeled PNA beacon (b)

คู่ฉลากที่เลือกมาศึกษาคือ fluorescein (FAM) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฉลากเรืองแสง และ anthraquinone (AQ) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวดับแสง โดย anthraquinone มีความสามารถในการเกิด intercalation/end-stacking ที่ดี โดยจากการ optimize โครงสร้างพบว่าควรจะต้องติดฉลากทั้งสองจะติดผ่าน lysine ที่ปลายด้านอะมิโนของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น GTAGATCACT โดยให้ FAM อยู่ที่ตำแหน่ง N_α และ AQ อยู่ที่ตำแหน่ง N_ε หากผิดไปจากการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงจะลดลง พีเอ็นเอที่ติดฉลากแสดงการจับยึดกับ DNA ได้ตามปกติ โดยมีค่า T_m อยู่ที่ 57.5 °C ซึ่งใกล้เคียงกับพีเอ็นเอที่ไม่ได้ติดฉลาก ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว PNA probe จะมีการเรืองแสงที่ต่ำเนื่องจากเกิด quenching ของ FAM ด้วย AQ โดยการเปรียบเทียบระหว่าง FAM/AQ-PNA กับ FAM-PNA แสดงให้เห็นว่า AQ สามารถ quench การเรืองแสงของ FAM ได้ถึง 95% และเมื่อเติม complementary DNA สัญญาณ fluorescence จะเพิ่มขึ้นจาก 19 เป็น 365 a.u (18.8 เท่า) แต่เมื่อทำการเติม mismatched DNA ที่ตำแหน่งกลางสายและปลายสาย หรือ non-complementary DNA จะพบว่าสัญญาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (6.0, 7.0 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ) แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจง

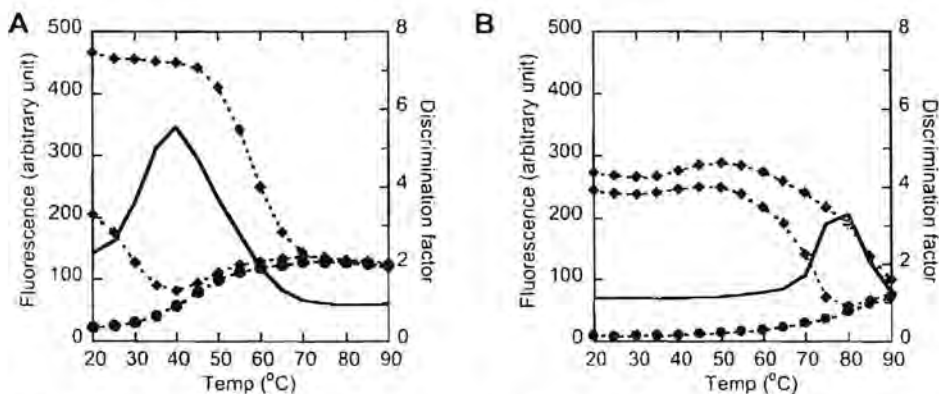
และเป็นไปตามหลักการออกแบบที่วางไว้ คือต้องมีการเข้าคู่เบสที่ปลายสายเท่านั้นจึงจะทำให้เกิด end-stacking ได้ดี เมื่อเปลี่ยนฉลากเรืองแสงจาก FAM เป็น tetramethylrhodamine (TAMRA) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน (ตารางที่ 8) แสดงว่าการออกแบบนี้สามารถใช้กับฉลากเรืองแสงได้หลายชนิดโดยไม่ต้องคำนึงถึง spectral overlap ระหว่างฉลากเรืองแสงและตัว quencher

ตารางที่ 8 ค่าการเรืองแสงของ doubly-end-labeled PNA beacon^a

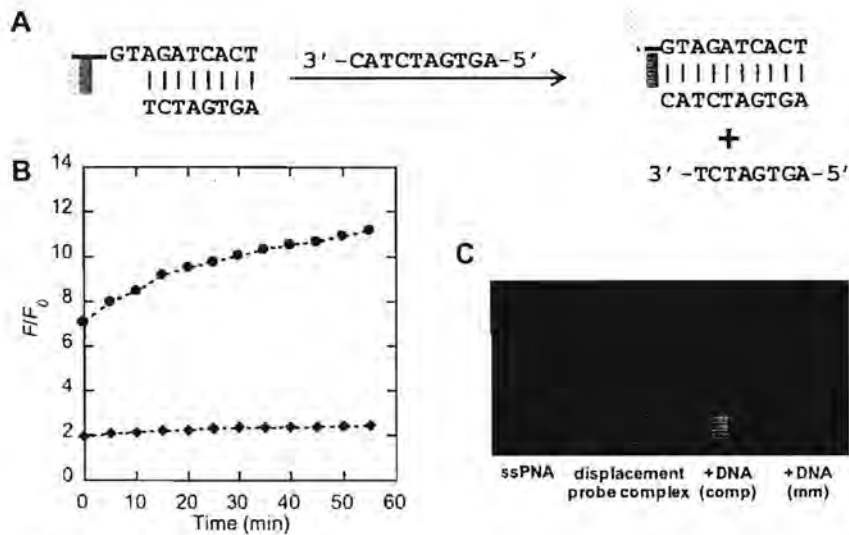
PNA	DNA sequence (5'→3')	F_{ss} (a.u)	F_{ds} (a.u)	F_{dy}/F_{ss}
(AQ/Flu)-GTAGATCACT	AGTGATCTAC (complementary)	19.4	365.9	18.8
	AGTGCTCTAC (internal mismatched)	19.0	114.3	6.0
	AGTGATCTAA (terminal mismatched)	18.5	129.8	7.0
	TCTGCATTTAG (noncomplementary)	19.0	20.5	1.1
(AQ/TMR)-GTAGATCACT	AGTGATCTAC (complementary)	17.0	307.2	18.1
	AGTGCTCTAC (internal mismatched)	17.4	84.7	4.9
	AGTGATCTAA (terminal mismatched)	17.6	52.3	3.0
	TCTGCATTTAG (noncomplementary)	18.0	5.0	0.3

^aFluorescence were measured in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1 μ M and [DNA] = 1.2 μ M, excitation wavelength = 490 nm, PMT voltage = medium.

อย่างไรก็ตาม แม้อิทธิพลของอุณหภูมิที่ได้จะแสดงการเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจนเมื่อเทียบระหว่าง complementary duplex กับที่เอ็นเอสสายเดี่ยว แต่ความแตกต่างระหว่าง complementary และ single mismatch ยังค่อนข้างต่ำ จึงได้พัฒนาวิธีการที่จะช่วยให้สามารถบอกความแตกต่างได้ดีขึ้นสองวิธี วิธีแรกคือการเพิ่มอุณหภูมิ ซึ่ง single mismatched PNA-DNA duplex จะถูกทำลายก่อน complementary PNA-DNA duplex สัญญาณจึงลดลงเร็วกว่า ซึ่งผลการทดลองเป็นดังสรุปได้ในรูปที่ 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary กับ single mismatched DNA ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นกับลำดับเบสของทีเอ็นเอสที่เกี่ยวข้อง



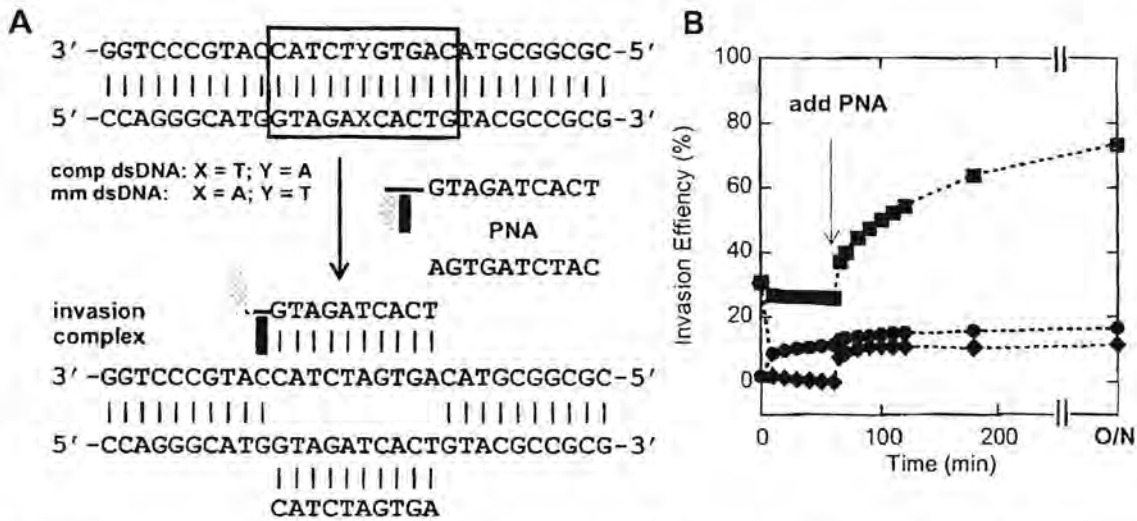
รูปที่ 12 การเพิ่ม specificity ของ doubly-end-labeled PNA beacon โดยอาศัยการเพิ่มอุณหภูมิ กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่หักลบ background ของ A) (AQ/Flu)-GTAGATCACT และ B) (AQ/Flu)-GAACAAGCTGGGAA-LysNH₂ สีน้ำเงิน: PNA probe; สีแดง: PNA probe + complementary DNA; สีเขียว: PNA probe + mismatched DNA; สีดำ: discrimination factor [$F_{ds(comp)}/F_{ds(mim)}$] (Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 0.1 μ M and [DNA] = 0.12 μ M, excitation wavelength = 490 nm, PMT voltage = high)



รูปที่ 13 A) การเพิ่ม specificity ของ doubly-end-labeled PNA beacon โดยอาศัยหลักการของ strand displacement B) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปเทียบกับเวลา (complementary สีน้ำเงิน, mismatched สีแดง). Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 0.1 μM and [DNA] = 0.12 μM , excitation wavelength 490 nm, PMT voltage = high และ C) ภาพถ่ายภายใต้แสง UV (365 nm)

ในอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่ม specificity จะอาศัยหลักการแทนที่ของดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่จับอยู่กับโพรบ ดังแสดงในรูปที่ 13 โดยดีเอ็นเอสายสั้นนี้ได้ออกแบบให้มีปลายด้าน 3' หดสั้นลง 2-3 เบส ทำให้ AQ ไม่สามารถเกิด end-stacking กับ duplex ที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบระหว่างโพรบและดีเอ็นเอสายสั้นนี้จะต่ำ แต่เมื่อเกิดการแทนที่ด้วยดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีสายยาวจะทำให้ AQ กลับมาเกิด end-stacking ได้อีกครั้ง โดยความสามารถในการแทนที่ที่ขึ้นกับความเสถียรของโพรบที่เกิดขึ้น ดังนั้น complementary DNA จึงสามารถแทนที่ดีเอ็นเอสายสั้นได้เร็วและสมบูรณ์กว่า single mismatched DNA สัญญาณจึงเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วกว่ามาก

จากข้อมูลทั้งหมดได้แสดงให้เห็นว่า doubly-end-labeled PNA beacon ที่ใช้ฉลากเรืองแสงตัวใดตัวหนึ่งเช่น FAM หรือ TAMRA ร่วมกับตัวดับแสงที่มีสมบัติ end-stacking เช่น AQ แสดงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่สูง (>10 เท่า) และจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยสามารถบอกความแตกต่างของ complementary และ single mismatched DNA ได้ และสามารถเพิ่มความจำเพาะให้ดียิ่งขึ้นโดยการเพิ่มอนุภาคหรือการใช้หลักการของ displacement probe อย่างไรก็ตาม ในการใช้งานจริงยังมีข้อจำกัดเนื่องจากดีเอ็นเอปกติจะอยู่ในรูปของสายคู่ (dsDNA) จึงได้พยายามพัฒนางานวิจัยนี้ต่อไปโดยการนำมาใช้ในการตรวจวัด dsDNA โดยตรง

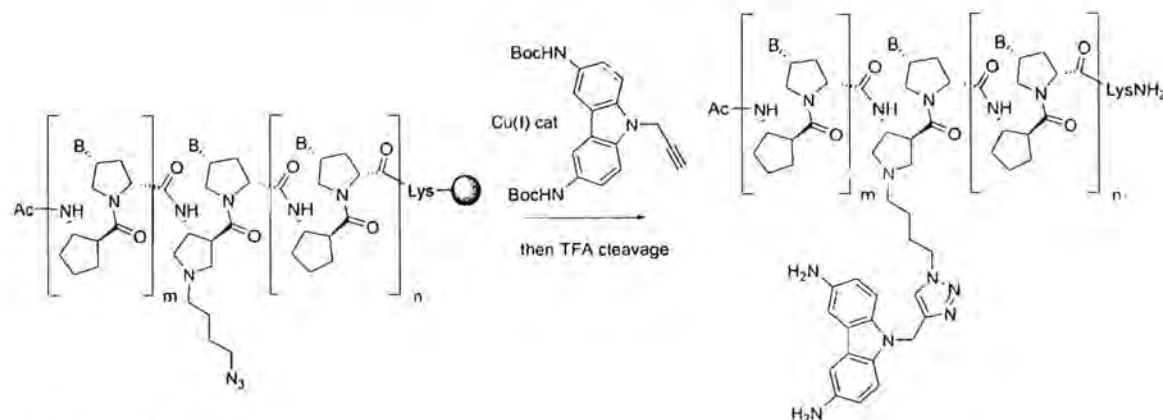


รูปที่ 14 A) การออกแบบการทดลอง DNA duplex invasion รวมทั้งลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง B) % invasion ที่ได้จากการคำนวณการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 520 nm สีน้ำเงิน: dsDNA+(AQ/Flu)-PNA(Lys1); สีแดง: dsDNA+(AQ/Flu)-PNA(Lys5); สีเขียว: mismatched dsDNA+(AQ/Flu)-PNA(Lys5) ก่อนและหลังเติม PNA ตัวที่สอง

ในการทดลองตรวจวัดดีเอ็นเอสายคู่ได้เลือกดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาว 30 เบส และมีลำดับเบสช่วงตรงกลาง 10 เบสตรงกับลำดับเบสของพีเอ็นเอโพรบดังแสดงในรูปที่ 14A ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า (AQ/Flu)-PNA อย่างเดียวไม่มีความสามารถในการแย่งจับกับดีเอ็นเอใน dsDNA ได้ จึงไม่เกิดการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสง แต่เมื่อใส่พีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลากซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับ DNA อีกเส้นหนึ่งในบริเวณเดียวกับที่พีเอ็นเอโพรบตัวแรกจับ พบว่าการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทั้งนี้บนพีเอ็นเอทั้งสองสายต้องมี Lysine จำนวน 5 ตัวเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของการจับยึดกับดีเอ็นเอ โดยการเรืองแสงจะเริ่มคงที่หลังเติมพีเอ็นเอตัวที่สองประมาณ 100 นาที ดังรูปที่ 14B ซึ่งการทดลองควบคุมโดยการผสมพีเอ็นเอทั้งสองสายไม่พบว่าเกิดการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้พีเอ็นเอสองตัวร่วมกันจะช่วยให้เกิดการ invade เข้าไปใน dsDNA ได้ดีขึ้น ซึ่งการใช้พีเอ็นเอสองสายร่วมกันในการทำ duplex invasion นั้นเป็นการใช้ประโยชน์จากจุดเด่นของ acpcPNA ที่ไม่สามารถเกิด self complementary duplex ได้ ทำให้ไม่ต้องมีการดัดแปรโมเลกุลของพีเอ็นเอซึ่งจำเป็นต้องทำกับพีเอ็นเอระบบอื่น¹⁴ งานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว¹⁵

3.3 Diaminocarbazole-labeled PNA

งานในส่วนนี้เป็นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติเชิงแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย 3,6-diaminocarbazole (DAC) โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาพีเอ็นเอโพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ Boc-protected DAC ที่มีหมู่แอลไคน์ (DAC-alkyne) และนำไปทำปฏิกิริยา Cu-catalyzed Click reaction เพื่อติด DAC ไปบน backbone ของ acpcPNA T9 (TTTTTTTT), M10AT (GTAGATCACT) และ M10CG (GTAGCGCACT) ที่ผ่านการดัดแปรด้วย 4-azidobutyl group ตรง apc spacer ที่ต่อระหว่างเบสคู่ที่ขีดเส้นใต้ไว้ ได้เป็น DAC-modified acpcPNA 3 ชนิดคือ T9^{DAC}, M10AT^{DAC} และ M10CG^{DAC} (รูปที่ 15 และ ตารางที่ 9)



รูปที่ 15 การเชื่อมต่อ DAC-alkyne กับ acpcPNA โดยอาศัย Click chemistry

จากนั้นจึงได้ศึกษาการจับยึดกับดีเอ็นเอโดย thermal denaturation และ fluorescence experiment ผลที่ได้เป็นดังสรุปในตารางที่ 5

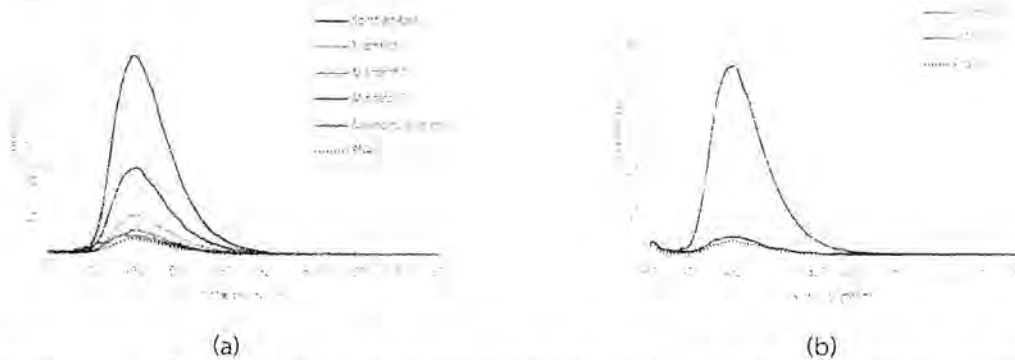
ตารางที่ 9 ค่า T_m และการเรืองแสงของ diaminocarbazole-modified acpcPNA³

PNA	DNA (5' → 3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	F/F_0 (25°C)	F/F_0 (45°C)	Note
T9 ^{DAC}	AAA AAA AAA	65.2	-	35.5	-	Comp.
T9 ^{DAC}	AAA ACA AAA	33.7	31.5	18.6	-	SM-C
T9 ^{DAC}	AAA AGA AAA	23.6	41.6	6.0	-	SM-G
T9 ^{DAC}	AAA ATA AAA	38.2	27.0	15.7	-	SM-T
T9 ^{DAC}	TTT TTT TTT	-	-	1.1	-	Non-comp.
M10AT ^{DAC}	AGT GAT CTA C	53.4	-	13.2	12.9	Comp.
M10AT ^{DAC}	AGT GCT CTA C	29.0	24.4	2.7	1.2	SM-C
M10AT ^{DAC}	AGT GGT CTA C	24.5	28.9	1.7	-	SM-G
M10AT ^{DAC}	AGT GIT CTA C	35.0	18.4	6.5	1.2	SM-T
M10AT ^{DAC}	GGG GGG GGG G	-	-	1.2	-	Non-comp.
M10CG ^{DAC}	AGT GCG CTA C	59.0	-	11.4	10.2 ^a	Comp.
M10CG ^{DAC}	AGT GAG CTA C	30.8	28.2	4.9	-	SM-A
M10CG ^{DAC}	AGT GGG CTA C	33.4	25.6	7.0	1.0 ^o	SM-G
M10CG ^{DAC}	AGT GIG CTA C	39.2	19.8	9.1	1.7 ^o	SM-T
M10CG ^{DAC}	GGG GGG GGG G	-	-	0.9	-	Non-comp.

³ Fluorescence were measured in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1 μM and [DNA] = 1.2 μM, excitation wavelength = 315 nm, PMT voltage = medium

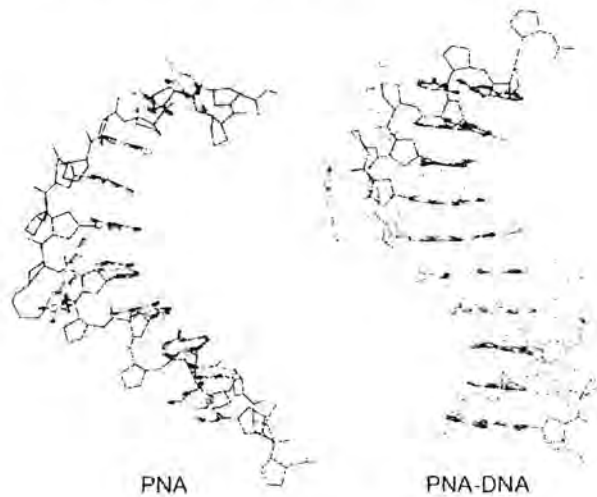
จากการศึกษาสมบัติการเรืองแสงของ DAC-labeled acpcPNA ทั้ง 3 sequence คือ T9^{DAC}, M10AT^{DAC} และ M10CG^{DAC} พบว่าเมื่อเกิดการเข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สม การเรืองแสงเพิ่มมากขึ้นถึง 35.5, 13.2 และ 11.4 เท่า ตามลำดับ แต่เมื่อเข้าคู่กันกับ single mismatch DNA ชนิดต่างๆ จะพบว่าค่าการเรืองแสงจะมีค่าลดลงแต่ยังไม่สามารถบอกความแตกต่างได้อย่างแน่ชัด แต่จากการเปรียบเทียบค่า T_m ของ complementary กับ mismatched PNA-DNA duplexes พบว่ามีค่า ΔT_m ที่มากกว่า 20 °C แสดงว่าพีเอ็นเอที่มีการติด DAC ลงไปมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นอย่างดี จึงได้ศึกษาการเพิ่มสัญญาณการเรืองแสงโดยการใช้อุณหภูมิเข้าช่วยพบว่าที่อุณหภูมิ 45-50 °C การเรืองแสงของ

single mismatch ของ M10AT^{DAC} และ M10CG^{DAC} ลดลงเหลือเพียง 1.0-1.7 เท่า ทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary และ single mismatch ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ DAC-modified acpcPNA M10AT^{DAC} ที่ (a) 20 °C และ (b) 45 °C ภาวะของการทดลอง: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1 μM and [DNA] = 1.2 μM, excitation wavelength = 315 nm, PMT voltage = medium

เพื่อเป็นการอธิบายผลการทดลองที่ได้ จึงได้ทำการคำนวณทางทฤษฎีที่จะทำนายการจัดวางตัวของ DAC ใน PNA-DNA duplexes ซึ่งงานในส่วนหลังสุดนี้เป็นความร่วมมือกับโครงการย่อยที่ 6 ของ ผศ.ดร. ศุภรินทร์ ศิริวงศ์ โดยผลการคำนวณโดยเทคนิค molecular dynamics simulations ช่วยยืนยันว่าในสภาวะที่เป็นพีเอ็นเอสายเดี่ยว DAC จะเกิดอันตรกิริยากับนิวคลีโอเบสของพีเอ็นเอได้ดี และอันตรกิริยานี้จะลดลงเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ โดยหมู่ DAC จะถูกผลักออกไปอยู่ข้างนอกโครงสร้างของ duplex (รูปที่ 17) ดังนั้นกลไกของการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ DAC-labeled PNA น่าจะใกล้เคียงกับของ pyrene-labeled PNA ที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว¹⁶ แต่จุดเด่นของ DAC-labeled PNA คือมีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่สูงกว่ามาก งานในส่วนนี้ ซึ่งอยู่ในความรับผิดชอบของผู้ร่วมโครงการคือ ผศ.ดร. จตุรงค์ สุภาพพร้อม ได้รับการตีพิมพ์แล้ว¹⁷

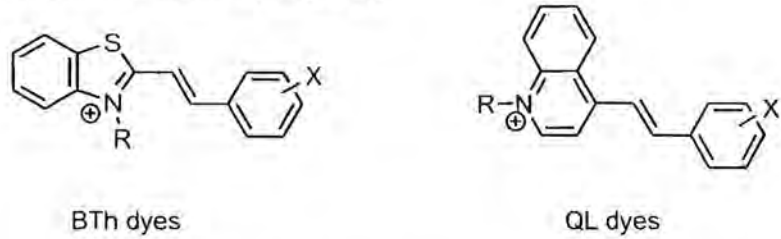


รูปที่ 17 ค่าเฉลี่ยของ MD structures ของ DAC-modified acpcPNA ในสภาวะที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อเข้าสู่กับดีเอ็นเอ

3.4 PNA labeled with styryl dyes

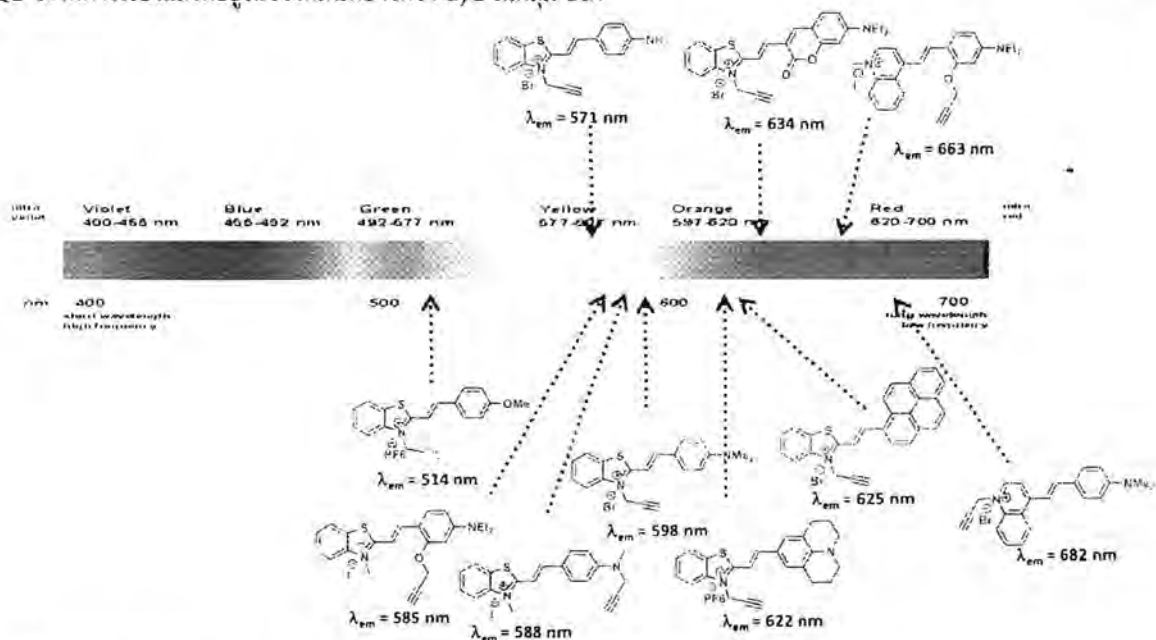
งานในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติเชิงแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย styryl dyes ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทั่วไปดังแสดงในรูปที่ 18 โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ clickable styryl dye ที่มีหมู่แอลไคโนต์อยู่ที่ตำแหน่งต่างๆ ของโมเลกุล แล้วนำไปต่อเข้ากับ azide-modified acpcPNA โดยผ่านปฏิกิริยา reductive alkylation/click reaction

จากนั้นจึงนำไปศึกษาสมบัติเชิงแสงในสภาพที่เป็นพรีเอินเอสายเดี่ยวเทียบกับเมื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยคาดว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเนื่องจากมีรายงานว่า styryl dye แสดงสมบัติ solvatochromic กล่าวคือสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติการเรืองแสงได้ตามสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป



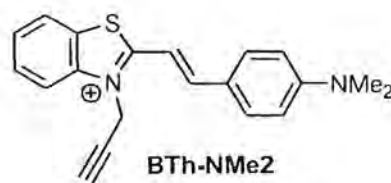
รูปที่ 18 โครงสร้างทั่วไปของ styryl dyes ที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ (R = Me, propargyl; X = OMe, NMe₂, NH₂ etc.)

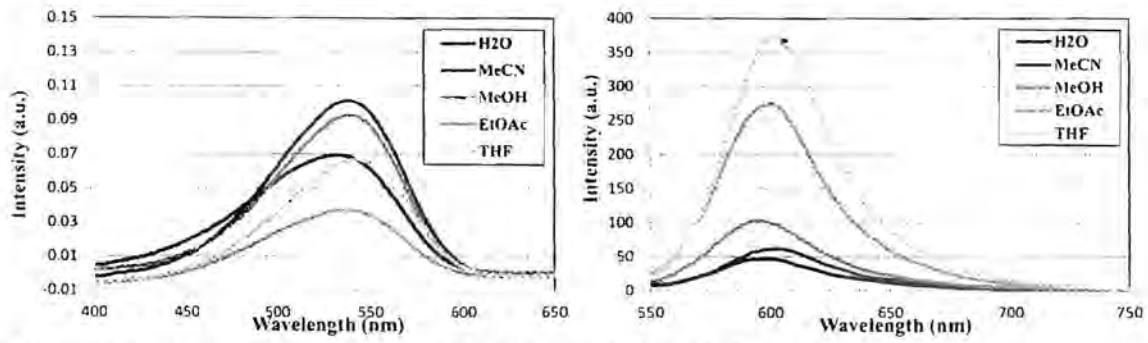
งานที่ได้ดำเนินการไปคือการสังเคราะห์ clickable styryl dye โดยให้ quaternized methylbenzothiazole (BTh) หรือ quaternized 4-methylquinoline (QL) ทำปฏิกิริยากับ electron-rich aromatic aldehyde ตัวอย่างของ dye ที่สังเคราะห์ได้ และ λ_{em} ของมันแสดงอยู่ในรูปที่ 19 ซึ่งพบว่า การเรืองแสงของ dye ในกลุ่มนี้ครอบคลุมสเปกตรัมในช่วง 500 ถึง 700 nm โดยความยาวคลื่นของการเรืองแสงจะขึ้นกับทั้งโครงสร้างของโมเลกุลทั้งสองฝั่ง โดย dye ในกลุ่ม QL จะให้การเรืองแสงที่อยู่ในช่วงคลื่นที่ยาวกว่า dye ในกลุ่ม Bth



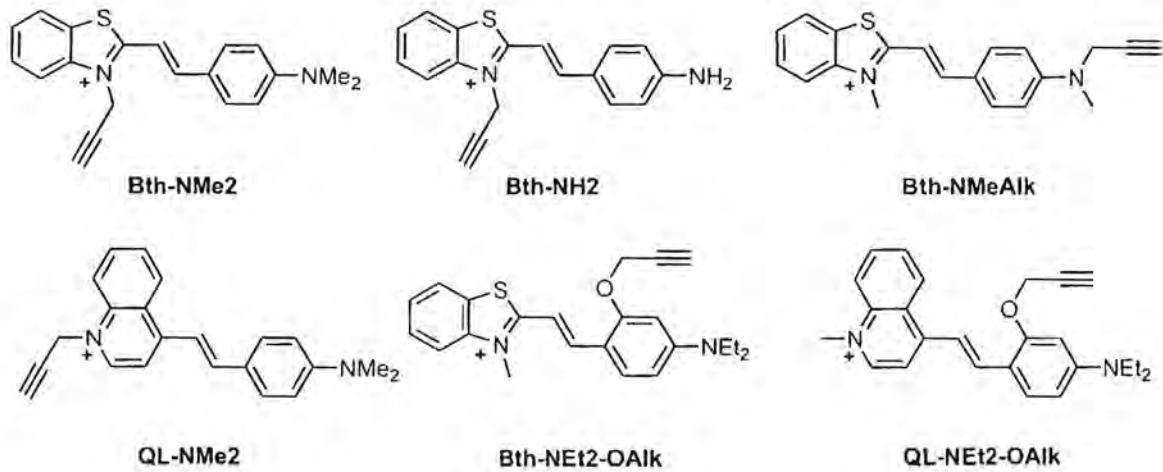
รูปที่ 19 โครงสร้างและ λ_{em} ของ styryl dye บางชนิดที่สังเคราะห์ได้ (วัดที่ความเข้มข้น 1 μ M ใน methanol)

จากนั้นจึงได้ศึกษาสมบัติ solvatochromic ของ styryl dye โดยใช้ dye BTh-NMe₂ เป็นตัวแทน พบว่าจะเกิด red shifting ของทั้ง UV และ fluorescence spectrum เมื่อสภาพขั้วของตัวทำละลายลดลง นอกจากนี้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงในรูปที่ 20





รูปที่ 20 UV and fluorescence spectra ของ dye BTh-NMe2 ที่ความเข้มข้น 1 μM และ $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$



รูปที่ 21 โครงสร้างของ styryl dyes ที่นำไปทดลองต่อกับพีเอ็นเอ

ข้อมูลประสิทธิภาพการเรืองแสงของ styryl dye ที่จะนำไปศึกษาโดยวัดจากค่า quantum yield (Φ) ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและ THF รวมทั้งความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อมี dsDNA อยู่ด้วยเป็นดังสรุปในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงสมบัติการเรืองแสงของ styryl dye ใน THF และในน้ำ และการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการเรืองแสงเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย

Dye	$\lambda_{\text{abs}} (\text{\AA})^{\text{a}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{b}}$	Φ_{THF}	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$	$\Phi_{\text{dsDNA}}^{\text{c}}$	$\Phi_{\text{dsDNA}}/\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$
Bth-NMe2	539 (4.9×10^4)	608	0.0177	0.0013	0.0316	24.5
QL-NMe2	575 (6.6×10^4)	702	N.D.	0.0006	0.0237	40.4
Bth-NH2	517 (4.8×10^4)	565	0.0164	0.0031	0.0356	11.3
Bth-NMeAlk	500 (5.3×10^4)	579	N.D.	0.0088	0.1418	16.1
Bth-NEt2-OAlk	533 (7.9×10^4)	584	N.D.	0.0030	0.1343	44.8
QL-NEt2-OAlk	568 (5.4×10^4)	668	0.0121	0.0012	0.1021	85.4

^a วัดใน MeOH ^b วัดใน H₂O ^c dsDNA = dCGCGGCGTACAGTGATCTACCATGCC TGG + dCCAGGGCATGGTAGACTACTGTACGCC.
Conditions; [alkSTR] = 2 μM [dsDNA] = 1 μM , Fluorescence were measured in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

จะเห็นได้ว่า styryl dye เมื่ออยู่ในน้ำจะมีประสิทธิภาพการเรืองแสงต่ำ แต่ประสิทธิภาพจะดีขึ้นเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย THF ซึ่งมีขั้วต่ำกว่า เมื่อเติมดีเอ็นเอลงไปจะทำให้ประสิทธิภาพการเรืองแสงในน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง QL-NMe2, QL-NET2-OAlk และ BTh-NET2-OAlk ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ dye กลุ่มนี้ในการนำไปใช้เป็นตัวตรวจวัดดีเอ็นเอ งานจะต่อไปคือการศึกษานิวคลีโอไทด์ของ QL-NET2-OAlk และ BTh-NET2-OAlk เพิ่มเติม รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นสีย้อมเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วย

นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น TTTTITTTT (T9) และ GTAGATCACT (M10) ที่เชื่อมต่อกับ styryl dye ตรงตำแหน่งระหว่างเบสคู่ที่ขีดเส้นใต้โดยอาศัยปฏิกิริยา reductive alkylation-click ที่เคยพัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้ พบว่าสามารถเชื่อมต่อกับ dye ได้เพียงบางชนิดเท่านั้นเนื่องจากในบางกรณีจะเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าคืออะไร แต่ทำให้ส่วนของ dye ถูกทำลายไป ข้อมูลของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้สำเร็จ รวมทั้งสมบัติเชิงแสงในสภาวะที่มีดีเอ็นเอคู่สมและดีเอ็นเอลำดับอื่นๆ ที่เป็น mismatch, base insertion และ abasic site ดังสรุปในตารางที่ 11 และ 12

ผลการศึกษาสมบัติเชิงแสงเบื้องต้นพบว่าเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วยกลับไม่พบการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญ และในหลายกรณีสัญญาณจะลดลงด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงพฤติกรรมของ styryl dye ที่แตกต่างจาก dye ในกลุ่ม thiazole orange อย่างชัดเจน สิ่งที่น่าสังเกตคือ styryl dye เมื่อเชื่อมต่อกับ PNA แล้วกลับมีค่า quantum yield ที่สูงกว่า styryl dye อิสระอยู่ถึงกว่า 10 เท่า ซึ่งอาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมของ dye ที่เปลี่ยนไป และเมื่อนำพีเอ็นเอโพรบนี้ไปตรวจวัดกับดีเอ็นเอที่เป็น mismatch จะให้สัญญาณการเรืองแสงที่มากกว่าในสภาวะที่มีดีเอ็นเอคู่สมและจะมีการเรืองแสงเพิ่มขึ้นมากเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็น base insertion และ abasic site ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของ styryl dye สามารถแทรกไปอยู่ในช่องว่างของเกลียวคู่พีเอ็นเอดีเอ็นเอ (PNA-DNA duplex) ตรงตำแหน่งที่เป็น base insertion (BL) หรือตรงตำแหน่งที่ไม่มีเบส (abasic) โดยคาดว่าโมเลกุลของ styryl dye จะเข้าไปแทรกตรงที่ว่าง ทำให้การเรืองแสงก็จะเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษาพีเอ็นเอโพรบทั้งหมดพบว่า M10-BTh-NH2 และ M10-BTh-NMe2 สามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอคู่สม mismatch, base insertion และ abasic site ได้ดีสุด โดยเมื่อเกิดไฮบริดกับ DNA ที่มี base insertion (D10BL(C)) ให้สัญญาณการเรืองแสงสูงถึง 11.9 และ 10.4 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 22) สัญญาณจาก CD สเปกตรัม (รูปที่ 23) ยืนยันว่าพีเอ็นเอสามารถเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมและกับดีเอ็นเอที่มี base insertion ได้จริง ดังเห็นได้จากสัญญาณที่เปลี่ยนไปจากผลรวมของสัญญาณจากพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยว และไฮบริดทั้งสองมีโครงสร้างต่างกัน โดยในกรณีของ base insertion จะเห็นสัญญาณที่เป็น positive ที่บริเวณ 280 nm ซึ่งไม่พบในกรณีของดีเอ็นเอคู่สม งานในส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลของ TTTTITTTT (T9) ที่ติดฉลากด้วย styryl dye ที่สังเคราะห์ได้ และสมบัติการเรืองแสงเมื่อมีและไม่มีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมอยู่ด้วย ที่ [PNA] = 1 μ M [DNA] = 1.2 μ M ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0

PNA	dye	m/z found (calcd)	Φ_{ssPNA}	DNA ^a	Φ_{ds} Φ_{ss}	E F ₀	T _m (°C)
T9	Bth-NMe2	3599.8 (3597.9)	0.0183	D9comp	0.7	0.7 (598 nm)	72.8
				D9smT	2.1	2.4	44.8
				D10BL(T)	3.2	3.7	50.8
				D10BL(A)	0.7	0.8	76.6
				D10BL(C)	5.6	5.6	50.3
				D10BL(G)	3.8	3.6	44.8
				D8abasic	6.8	5.8	49.0
T9	QL-NMe2	3594.6 (3591.8)	0.0058	D9comp	1.4	1.1 (682 nm)	72.9
				D9smC	2.9	2.4	45.4
				D10BL(C)	3.8	4.6	57.2
				D8abasic	4.8	3.2	48.0

PNA	dye	m/z found (calcd)	$\Phi_{(ssPNA)}$	DNA ^a	$\frac{\Phi_{(ds)}}{\Phi_{(ss)}}$	E F_0	T_m (°C)
T9	Bth-NH2	3571.0 (3570.0)	0.0267	D9comp	0.9	0.7 (571 nm)	73.4
				D9smC	6.2	5.2	46.1
				D10BL(C)	8.7	7.6	53.2
				D8abasic	8.6	6.5	49.8
T9	Bth-OMe	3587.1 (3584.8)	0.0065	D9comp	0.6	0.5 (514 nm)	70.7
				D9smC	1.0	0.9	44.5
				D10BL(C)	1.0	0.8	52.2
				D8abasic	0.9	0.9	49.9
T9	Bth-NET2- OAlk	3656.5 (3655.9)	0.0401	D9comp	0.8	0.7 (586 nm)	72.6
				D9smC	1.1	1.0	42.5
				D10BL(C)	1.4	1.1	55.6
				D8abasic	1.1	0.9	47.7
T9	QL-NET2- OAlk	3651.6 (3649.9)	0.0228	D9comp	0.7	0.6 (665 nm)	71.4
				D9smC	1.0	0.8	41.2
				D10BL(C)	0.8	0.7	45.1
				D8abasic	1.1	1.0	49.8

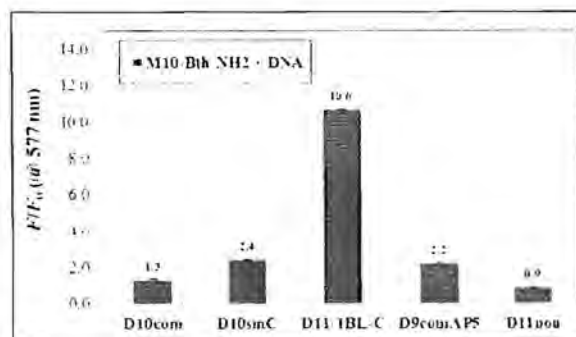
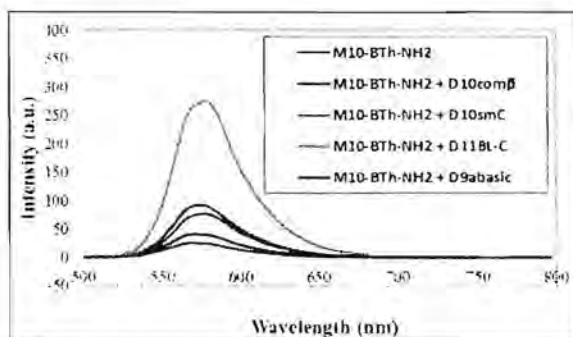
^aDNA sequence (5'→3'): D9comp = dAAAAAAAA, D9smT = dAAAAIAAAA, D9smC = dAAAACAAAA, D10BL(T): dAAAAIAAAA, D10BL(A): dAAAAIAAAA, D10BL(C): dAAAAIAAAA, D10BL(G): dAAAAGAAAA, D9abasic: dAAAA_AAAA.

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลของ GTAGATCACT (M10) ที่ติดฉลากด้วย styryl dye ที่สังเคราะห์ได้ และสมบัติการเรืองแสงเมื่อมีและไม่มีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมอยู่ด้วย ที่ [PNA] = 1 μ M [DNA] = 1.2 μ M ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0

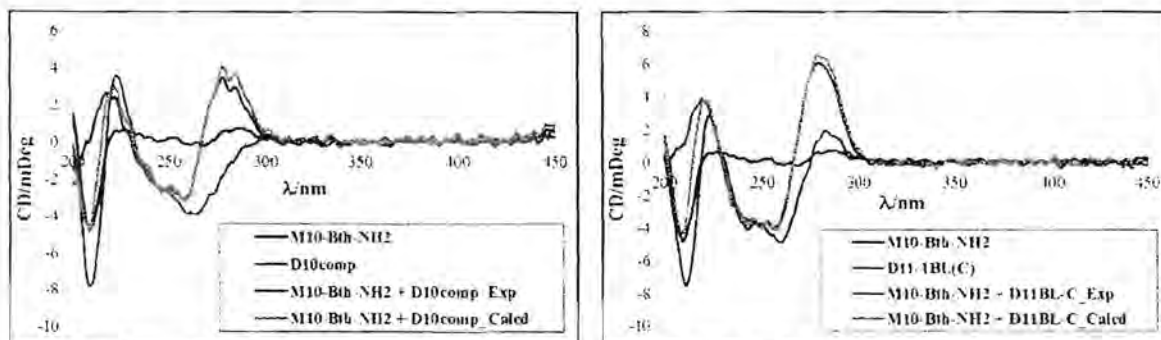
PNA	dye	m/z found (calcd)	$\Phi_{(ssPNA)}$	DNA ^a	$\frac{\Phi_{(ds)}}{\Phi_{(ss)}}$	E F_0	T_m (°C)
M10	Bth-NMe2	3980.7 (3977.3)	0.0186	D10comp	3.2	2.5 (603 nm)	52.1
				D10smC	4.1	3.8	35.0
				D11BL(C)	11.9	10.4	32.7
				D11BL(A)	7.2	6.6	40.0
				D11BL(T)	9.4	8.2	41.6
				D11BL(G)	7.3	7.4	35.2
				D9abasic	3.6	5.1	36.4
				D11non	1.2	1.1	<20
M10	QL-NMe2	3594.6 (3591.8)	0.0072	D10comp	1.6	1.3 (692 nm)	58.6
				D10smC	2.3	1.8	34.3
				D11BL(C)	3.6	2.9	44.8
				D9abasic	2.2	2.6	32.6
M10	Bth-NH2	3571.0 (3570.0)	0.0261	D10comp	1.8	1.5 (577 nm)	59.3
				D10smC	4.2	3.7	37.9
				D11BL(C)	14.5	11.9	53.5
				D9abasic	3.6	3.1	40.4

PNA	dye	m/z found (calcd)	$\Phi_{(ssPNA)}$	DNA ^a	$\Phi_{(ds)}$ $\Phi_{(ss)}$	E F_0	T_m (°C)
M10	Bth-OMe	3587.1 (3584.8)	0.0054	D10comp	1.2	0.9 (509 nm)	58.4
				D10smC	0.7	0.6	37.4
				D11BL(C)	1.1	0.8	51.0
				D9abasic	0.6	0.5	38.2
M10	Bth- NMeAlk	3980.7 (3977.3)	0.0650	D10comp	1.5	1.3 (588 nm)	57.4
				D10smC	2.4	2.1	39.8
				D11BL(C)	3.1	2.3	40.6
				D9abasic	3.3	2.3	38.4
				D11non	1.3	1.0	<20
M10	Bth-NEt2- OAlk	4034.7 (4035.4)	0.0486	D10comp	1.5	1.4 (592 nm)	59.2
				D10smC	2.9	2.4	34.9
				D11BL(C)	4.5	3.6	41.8
				D9abasic	3.3	2.6	39.7
				D11non	1.1	0.8	<20
M10	QL-NEt2- OAlk	4029.1 (4029.3)	0.0253	D10comp	1.6	1.4 (663 nm)	60.2
				D10smC	2.9	2.6	35.4
				D11BL(C)	2.0	2.0	49.1
				D9abasic	3.3	2.4	37.3
				D11non	0.9	0.9	<20

^aDNA sequence (5'→3'): D10comp = dAGTGATCTAC, D10smC = dAGTGCTCTAC, D11BL(C): dAGTGACTCTAC, D11BL(A): dAGTGAATCTAC, D11BL(T): dAGTGAITCTAC, D11BL(G): dAGTGAGTCTAC, D9abasic: dAGTG_TCTAC, D11non = dTCTGCATTAG



รูปที่ 22 สัญญาณการเรืองของ M10-Bth-NH2 ในสถานะที่มี DNA ต่างๆ ที่ [PNA] = 1 μ M [DNA] = 1.2 μ M (Left) และ [PNA] = 0.1 μ M [DNA] = 0.12 μ M (Right) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0 และ λ_{ex} = 487 nm

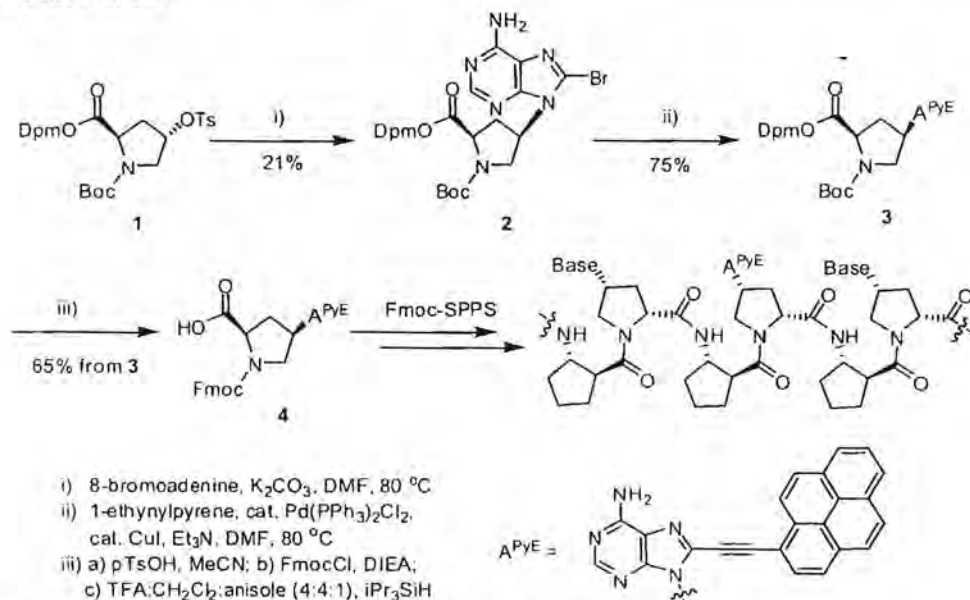


รูปที่ 23 CD spectra ของ M10-Bth-NH2 ในสภาวะที่มี D10comp (Left) และ D11BL(C) (Right) ที่ [PNA] = 2.5 μ M [DNA] = 3.0 μ M ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0

4. Pyrrolidiny peptide nucleic acids with non-canonical nucleobases

4.1 Pyrrolidiny peptide nucleic acids with 8-(pyren-1-yl)ethynyl adnine as a fluorescence nucleobase

งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์และการศึกษาสมบัติเชิงแสงของมัน โดยในช่วงแรกได้ใช้วิธีสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ที่มีเบสที่ถูกดัดแปร แล้วค่อยนำมาสังเคราะห์พีเอ็นเอต่อไป โดย modified base ที่สนใจคือ pyrenylethynyl adenine (A^{PyE}) ที่ประกอบด้วยฟลูออโรฟอร์คือไพรีน ต่อคอนจูเกตกับวงแหวนอะดีนีนที่ตำแหน่ง C8 ผ่านพันธะแอลไคน์ ซึ่งเป็นการผนวกสมบัติการเรืองแสงกับการจดจำนิวคลีโอเบสเข้าไว้เป็นเหตุการณ์เดียวกัน ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในดีเอ็นเอและแอลเอ็นเอพบว่าเบส A^{PyE} ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของเบสได้ดีนัก¹⁸ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่เบส A^{PyE} จัดตัวอยู่ใน *syn* คอนฟอร์เมชัน ทำให้ด้านที่เกิดพันธะไฮโดรเจนหันออกไปข้างนอก DNA helix ทำให้งานวิจัยส่วนใหญ่ใช้งาน A^{PyE} ในฐานะฉลากเรืองแสงโดยไม่ได้ใช้ประโยชน์จากสมบัติการเข้าคู่เบสของมันมากนัก งานวิจัยนี้มีสมมติฐานว่า A^{PyE} อาจแสดงพฤติกรรมที่เปลี่ยนไปเมื่ออยู่ในพีเอ็นเอซึ่งมีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าดีเอ็นเอจับกันเอง และอาจทำให้สามารถใช้ A^{PyE} เป็น base discriminating fluorescence nucleobase ได้ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์โมโนเมอร์ A^{PyE} (รูปที่ 24) แล้วค่อยนำมาสังเคราะห์พีเอ็นเอต่อไปโดยวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัฏภาคของแข็งตามปกติ



รูปที่ 24 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ A^{PyE} monomer ของ acpcPNA

โดยได้สังเคราะห์ acpcPNA ที่ผ่านการดัดแปรด้วย A^{PyE} monomer พร้อมทั้งผลการศึกษาสมบัติเชิงแสงเป็นดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ค่า T_m และสมบัติเชิงแสงของ A^{PyE}-modified acpcPNA probes และไฮบริดกับดีเอ็นเอ (condition: 1.0 μ M PNA, 1.2 μ M DNA, 10 mM phosphate buffer pH 7.0, λ_{ex} 376 nm).

Entry	PNA	DNA ^a (5' to 3')	T_m (°C)	F/F_0 ^b	$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ ^c (nm)	Φ_F ^d	Notes
1		-	-	-	416/455	0.1870	ss
2		CAG TAT ATG ACT	74.7	2.68	414/447	0.3742	ds, complementary
3	M12T(A ^{PyE})T AGT CAT A ^{PyE} TA	CAG TAA ATG ACT	48.6	1.17	420/453	0.3126	ds, mismatched A
4	CTG	CAG TAG ATG ACT	38.0	0.77	423/455	0.2206	ds, mismatched G
5		CAG TAC ATG ACT	40.0	1.02	425/455	0.2668	ds, mismatched C
6		-	-	-	417/457	0.1628	ss
7		CAG TTT TTG ACT	59.0	2.71	413/448	0.2643	ds, complementary
8	M12A(A ^{PyE})A AGT CAA A ^{PyE} AA	CAG TTA TTG ACT	47.3	1.25	423/454	0.2285	ds, mismatched A
9	CTG	CAG TTG TTG ACT	45.7	1.10	423/454	0.2201	ds, mismatched G
10		CAG TTC TTG ACT	47.7	1.11	423/455	0.2345	ds, mismatched C
11		-	-	-	419/498	0.0503	ss
12		CAG TCT CTG ACT	60.6	2.78	419/457	0.0770	ds, complementary
13	M12G(A ^{PyE})G AGT CAG A ^{PyE} TG	CAG TCA CTG ACT	38.8	1.27	423/482	0.0621	ds, mismatched A
14	CTG	CAG TCG CTG ACT	55.3	0.99	423/496	0.0534	ds, mismatched G
15		CAG TCC CTG ACT	59.4	1.25	421/495	0.0606	ds, mismatched C
16		-	-	-	414/455	0.0780	ss
17		CAG TGT GTG ACT	64.2	1.52	412/451	0.1130	ds, complementary
18	M12C(A ^{PyE})C AGT CAC A ^{PyE} CA	CAG TGA GTG ACT	59.0	0.35	425/455	0.0420	ds, mismatched A
19	CTG	CAG TGG GTG ACT	55.2	0.28	421/456	0.0332	ds, mismatched G
20		CAG TGC GTG ACT	61.2	0.42	426/457	0.0589	ds, mismatched C

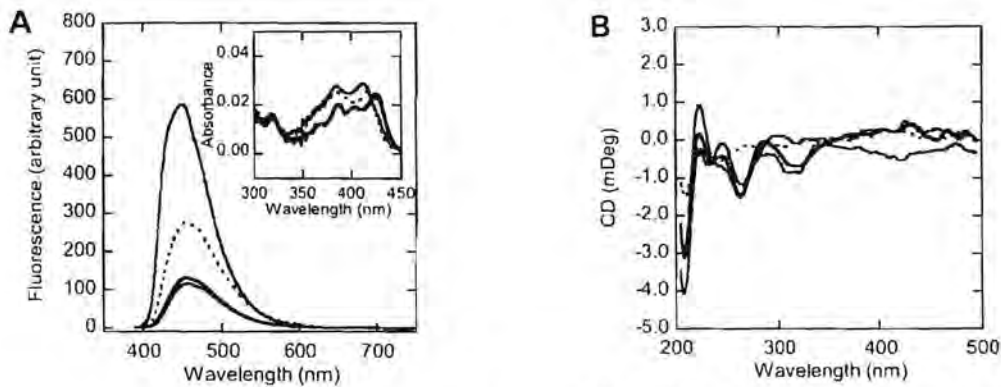
Entry	PNA	DNA ^a (5' to 3')	T _m (°C)	F/F ₀ ^b	λ _{abs} /λ _{em} ^c (nm)	Φ _F ^d	Notes
21		CAG TGT <u>GAG</u> ACT	58.2	1.01	412/450	0.0921	ds, indirect mismatch
22		CAG <u>AGT</u> GTG ACT	44.7	0.73	417/454	0.0674	ds, indirect mismatch
23		CAG TIT <u>ITG</u> ACT	33.1	0.62	417/456	0.0628	ds, double mismatched
24		-	-	-	416/455	0.2265	ss
25		AGT GTT CTA C	54.4	2.27	412/449	0.3887	ds, complementary
26	M10A(A ^{PyE})C GTA GAA ^{PyE} CAC T	AGT <u>GAT</u> CTA C	46.0	0.68	422/452	0.2106	ds, mismatched A
27		AGT <u>GGT</u> CTA C	42.8	0.57	421/455	0.1391	ds, mismatched G
28		AGT <u>GCT</u> CTA C	48.8	0.40	425/455	0.1452	ds, mismatched C
29		AGT G <u>Φ</u> T CTA C	48.6	0.44	424/455	0.1674	ds, direct abasic site
30		-	-	-	416/457	0.0936	ss
31	M10G(A ^{PyE})T GTA GA ^{PyE} T CAC T	AGT GAT CTA C	49.6	5.18	415/449	0.3040	ds, complementary
32		AGT <u>GAA</u> CTA C	37.8	1.37	419/455	0.1608	ds, mismatched A
33		AGT <u>GAG</u> CTA C	36.2	1.33	419/454	0.1640	ds, mismatched G
34		AGT <u>GAC</u> CTA C	39.0	1.83	422/455	0.2022	ds, mismatched C

^aMismatched bases in the DNA sequence are indicated by underlining.

^bM12T(A^{PyE})T, λ_{em} = 447 nm, M12A(A^{PyE})A, λ_{em} = 448 nm, M12G(A^{PyE})G, λ_{em} = 455 nm, M12C(A^{PyE})C, λ_{em} = 451 nm, M10A(A^{PyE})C, λ_{em} = 449 nm, M10G(A^{PyE})T, λ_{em} = 449 nm, A^{PyE}M12, λ_{em} = 476 nm

^cOnly the longest wavelength was shown for λ_{abs}. For complete list of absorption peaks, see Table S1.

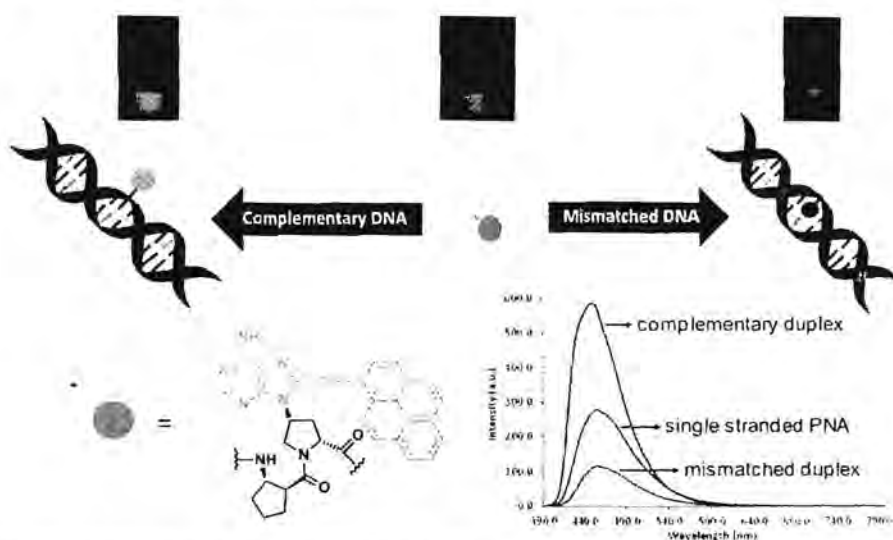
^dQuantum yields were measured by using quinine sulfate as a standard (Φ_F = 0.546).¹⁹



รูปที่ 25 Fluorescence และ UV absorption spectra ของ M10A(A^{PyE})C (เส้นประสีแดง) และไฮบริดกับดีเอ็นเอต่างๆ: สีแดง = dAGTGTCTAC (comp.); สีเขียว = dAGTGCTCTAC (mismatched); สีดำ = AGTGΦTCTAC (abasic); ภาวะ: [PNA] = 1.0 μM และ [DNA] = 1.2 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0, λ_{ex} = 376 nm.

จากข้อมูลในตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่า A^{PyE} เบสที่อยู่ในพีเอ็นเอสายเดียวจะมีประสิทธิภาพในการเรืองแสงค่อนข้างสูง และขึ้นกับเบสข้างเคียง โดยเบสข้างเคียงที่เป็น G และ C จะทำให้ประสิทธิภาพของการเรืองแสงลดลง และเมื่อเกิดการ

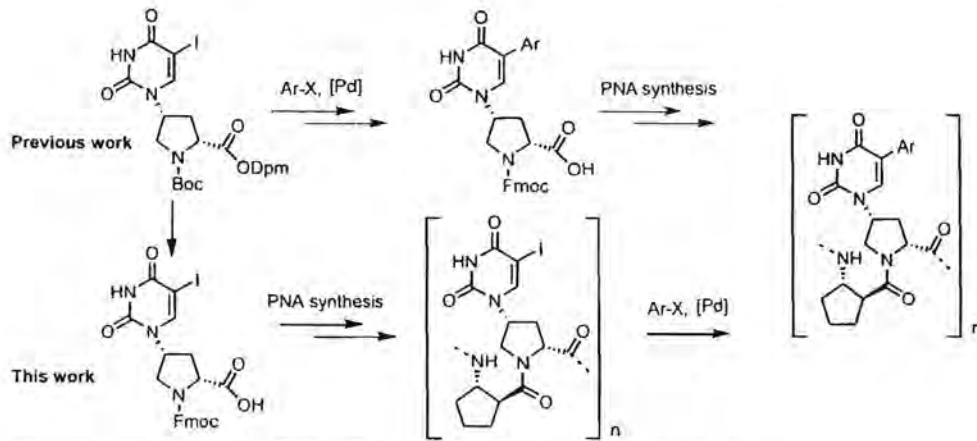
เข้าคู่กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม การเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นในทุกกรณี แม้ว่าจะไม่มากนัก แสดงว่าการเข้าคู่ระหว่าง A^{PyE} บน PNA กับ dT บน DNA ทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้น จากนั้นจึงได้ศึกษาต่อกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งตรงบริเวณที่ตรงกับเบส A^{PyE} ซึ่งพบว่ามีการเรืองแสงจะต่ำกว่าในกรณีที่เป็นคู่สม นอกจากนี้ยังพบการเลื่อนของ λ_{max} ใน absorption และ fluorescence spectra ไปทางช่วงคลื่นที่ยาวขึ้น (red shift) ดังแสดงในรูปที่ 25 ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่เมื่อเบสไม่เข้าคู่กัน เบส A^{PyE} จะหันเอาส่วนของไพรีนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปใน PNA-DNA duplex ทำให้เกิด π - π stacking ขึ้น จึงส่งผลให้สัญญาณการเรืองแสงลดลงและเกิด red shift ดังกล่าว ซึ่งปรากฏการณ์นี้สามารถยืนยันได้โดย CD spectra ดังรูปที่ 25B โดยพบว่าเมื่อในสายของดีเอ็นเอเป็นตำแหน่ง abasic คือไม่มีเบสอยู่ตรงข้ามก็จะได้ผลเช่นเดียวกันกับกรณีที่เป็น mismatch base ดังนั้น A^{PyE} ใน modified acpcPNA จึงสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary กับ single mismatched DNA ได้อย่างชัดเจนซึ่งเป็นสมบัติที่แตกต่างจากดีเอ็นเอ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรบในการตรวจวัดดีเอ็นเอ ซึ่งนอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการเรืองแสงแล้วยังเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวเป็นฟ้าได้อีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 26 งานในส่วนนี้ค่อนข้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว กำลังอยู่ระหว่างเตรียมบทความเพื่อตีพิมพ์



รูปที่ 26 สรุปการทำงานของ APyE-modified acpcPNA probe

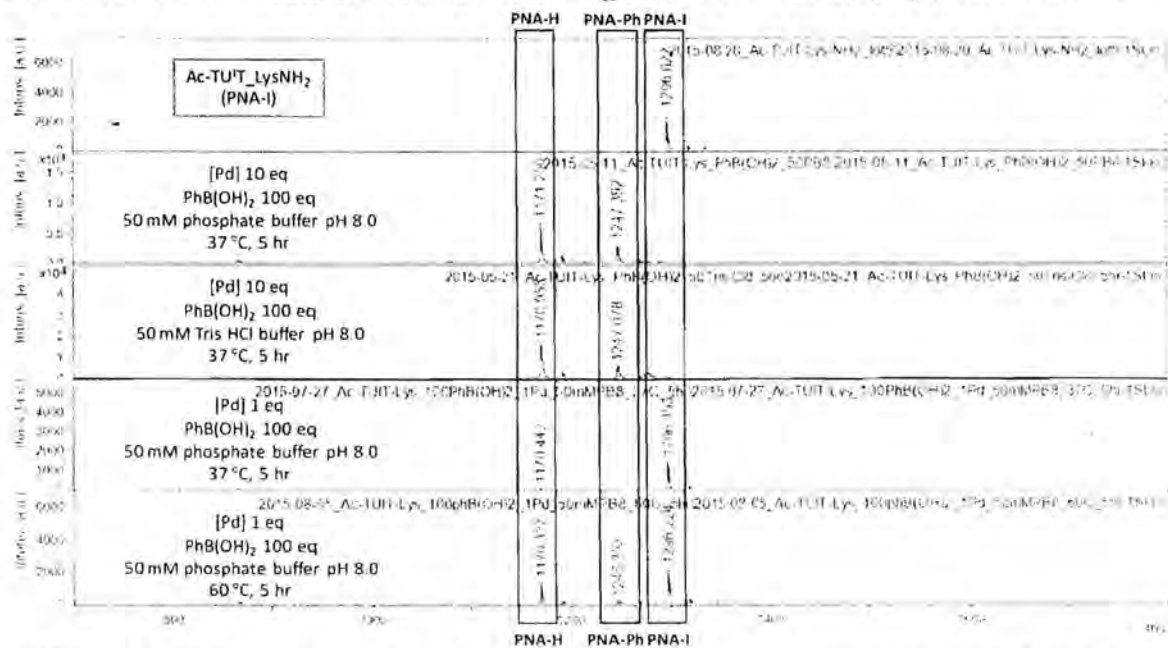
4.2 Pyrrolidiny peptide nucleic acids with fluorescence 5-modified uracil via post-synthetic modification

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้²⁰ เสนอแนะว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์เช่นไพรีนบนนิวคลีโอเบสสามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์พีเอ็นเอดังกล่าวยังมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน กล่าวคือต้องเริ่มต้นจากการติดฉลากที่พีเอ็นเอโมโนเมอร์ก่อน จากนั้นจึงนำโมโนเมอร์ที่ได้ไปสังเคราะห์พีเอ็นเอต่อไป วิธีนี้ทำให้การเปลี่ยนชนิดของฉลากทำได้ยากเนื่องจากต้องเริ่มสังเคราะห์พีเอ็นเอใหม่ ส่วนแนวคิดใหม่ (รูปที่ 27) คือการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสที่มีหมู่เฮไลเจนเช่น 5-iodouracil อยู่ที่ตำแหน่งที่ต้องการจะติดฉลากก่อน จากนั้นจึงใช้ปฏิกิริยา palladium catalyzed cross coupling ในการติดฉลากแบบ post synthetic modification ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้สามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมือนกัน มีการติดฉลากที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่เปลี่ยนชนิดของฉลากเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฉลากหลายๆ ชนิดได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องเริ่มต้นสังเคราะห์ตัวโมโนเมอร์และพีเอ็นเอใหม่ ถ้าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาที่ใช้ในการติดฉลากดีพอ ซึ่งแนวคิดนี้ได้รับการพิสูจน์มาเมื่อไม่นานมานี้ในเรื่องของดีเอ็นเอ²¹

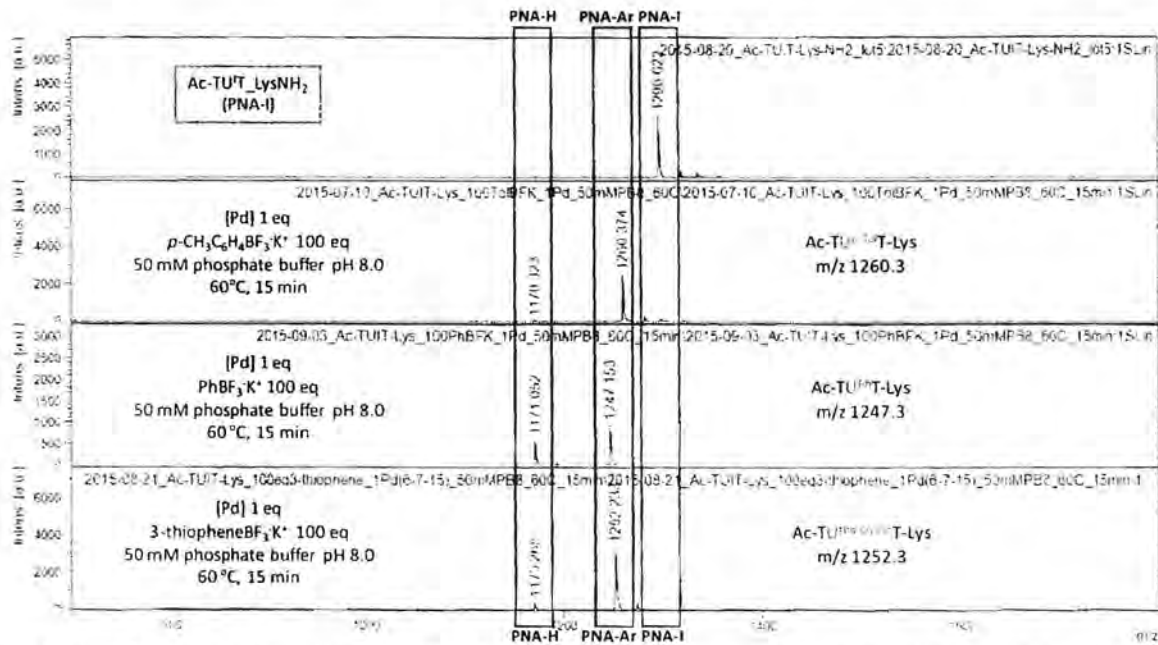


รูปที่ 27 เปรียบเทียบวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกตัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์

ในช่วงเริ่มต้นเป็นการพิสูจน์หลักการ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสง่าย ๆ คือ Ac-TUT-LysNH₂ (PNA-I; *m/z* = 1297.3) และนำไปทำปฏิกิริยา Suzuki cross coupling กับฟีนอลโบโรนิกแอซิด [PhB(OH)₂] โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Pd(OAc)₂ ร่วมกับลิแกนด์ 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine (ADHP) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกันในดีเอ็นเอในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ²¹ อย่างไรก็ตาม ระบบตัวเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ค่อยมีประสิทธิภาพมากนักเมื่อนำมาใช้กับพีเอ็นเอ กล่าวคือจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่าสารตั้งต้นทำปฏิกิริยาไปหมด แต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการกำจัดไอโอดีนคือ Ac-TUT-LysNH₂ (PNA-H; *m/z* = 1170.3) เป็นส่วนใหญ่ มีผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ Ac-TU^{Ph}-LysNH₂ (PNA-Ph; *m/z* = 1247.3) เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยการเพิ่มปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา สับสเตรต อุณหภูมิ และการเปลี่ยนชนิดและพีเอชของตัวทำละลายไม่สามารถลดการเกิด PNA-H ให้อยู่ในระดับที่น่าพอใจได้ (รูปที่ 28) แต่อย่างน้อยการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นค่อนข้างจะสะอาดเนื่องจากไม่พบผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่น และการที่ PNA-H ขึ้นได้ก็แสดงว่ามีการเกิด oxidative insertion ของแพลเลเดียมเกิดเป็น palladated PNA intermediate จริง เพียงแต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็น cross coupling product ที่ต้องการได้

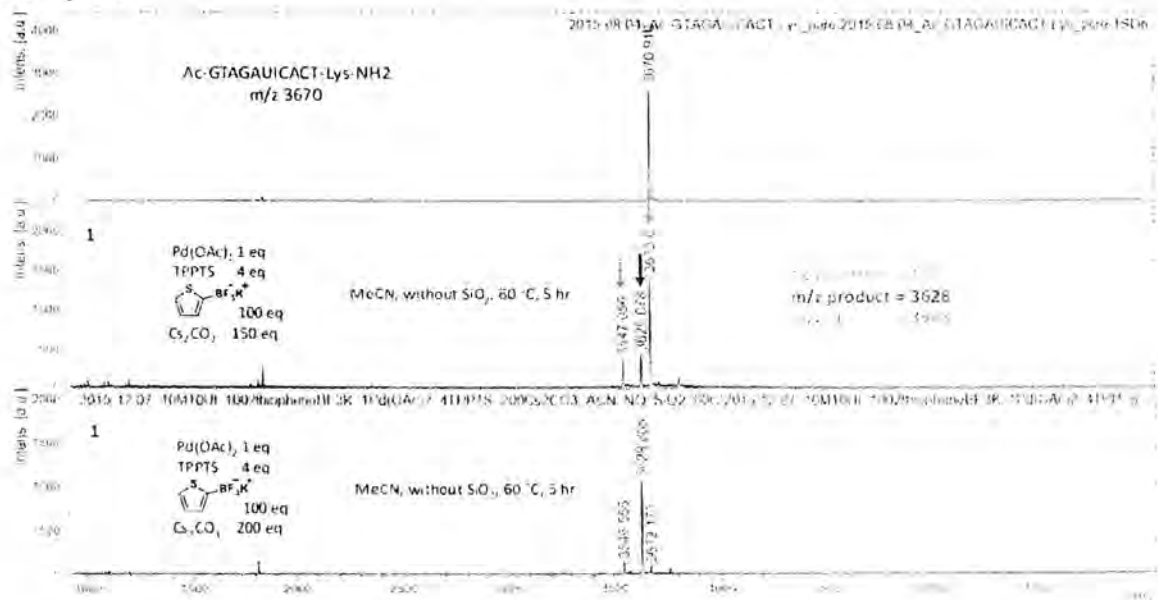


รูปที่ 28 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง acpcPNA Ac-TUT-Lys กับ PhB(OH)₂ บน solid support ที่ภาวะต่างๆ



รูปที่ 29 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง PNA Ac-TU-T-Lys กับ ArBF_3K บน solid support

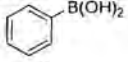
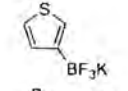
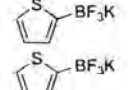
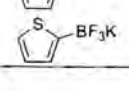
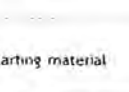
ในขั้นตอนต่อมาจึงมีแนวคิดที่จะเพิ่มความว่องไวของตัวนิวคลีโอไฟล์โดยการเปลี่ยนเป็นเอริลไทรฟลูออโรโบเรต [ArBF_3K] ซึ่งมีรายงานว่าปฏิกิริยานิวคลีโอไฟล์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเอริลโบโรนิกแอซิดแทน อย่างไรก็ตาม แม้ electron rich เอริลไทรฟลูออโรโบเรตเช่น $p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{BF}_3\text{K}$ และ 3-thiophene BF_3K จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ PNA-Ar เป็นหลัก แต่เมื่อใช้ PhBF_3K ก็ยังให้ผลที่ไม่ดีกว่า PhB(OH)_2 มากนัก กล่าวคือยังพบการเกิด PNA-H อยู่ค่อนข้างมาก (รูปที่ 29) แสดงว่าการเปลี่ยนนิวคลีโอไฟล์ยังไม่ใช่ว่าปัจจัยสำคัญเพียงประการเดียวที่ทำให้การทำ cross coupling ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้เมื่อใช้พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสยาวขึ้นหรือเมื่อใช้พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสมประสิทธิภาพจะยิ่งต่ำลงไปอีก จึงได้ทดลองเปลี่ยนตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของแพลเลเดียมชนิดอื่น โดยพบว่าการใช้ Pd(OAc)_2 (1 equiv) ร่วมกับ TPPTS (4 equiv) เป็นลิแกนด์ และ aryl trifluoroborate (100 equiv) เป็นนิวคลีโอไฟล์ โดยมี Cs_2CO_3 (200 equiv) และมี acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ค่อนข้างสมบูรณ์ โดยมี deiodination product เกิดขึ้นค่อนข้างน้อย (รูปที่ 30)

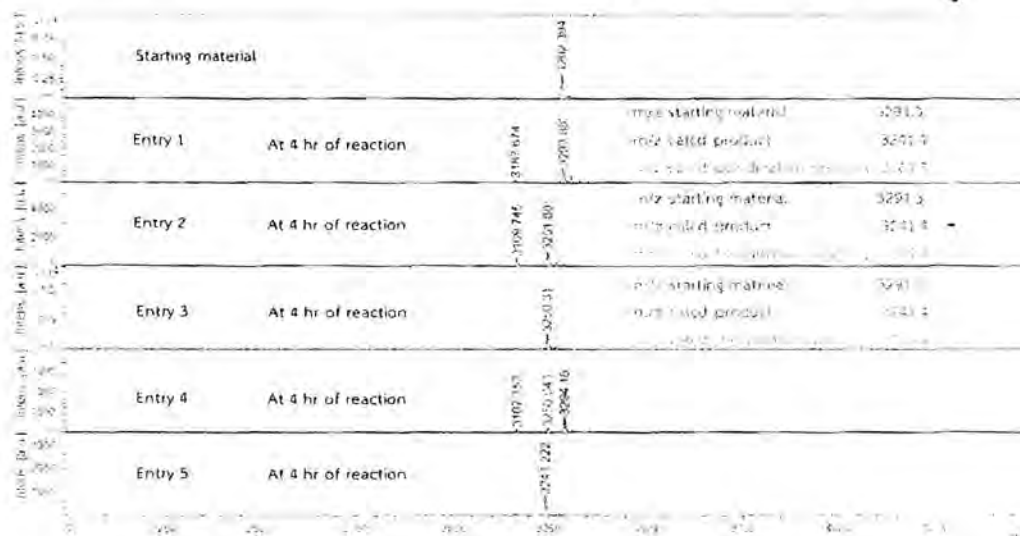


รูปที่ 30 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง mix base acpcPNA Ac-GTAGAU¹CACT-Lys กับ ArBF₃K

จากนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์พีเอ็นเอในระดับสเกลที่มากขึ้นสำหรับนำไปศึกษาสมบัติเชิงแสงและความเสถียรของพีเอ็นเอเมื่อเกิดการจับยึดกับดีเอ็นเอ จากการทดลองพบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คือ 500 μM ร่วมกับการใช้ aryl trifluoroborate (100 equiv) เป็นนิวคลีโอไฟล์ ร่วมกับการใช้ 2 equiv. Pd(OAc)₂ และ 4 equiv. TPPTS โดยมี Cs₂CO₃ (3 equiv) ใน H₂O:acetonitrile (2:1) เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใส่ซิลิกาเจลที่อุณหภูมิ 60 °C ซึ่งปฏิกิริยายังคงเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบ PNA-H น้อย โดยตารางที่ 14 และรูปที่ 31 แสดงการหาสภาวะการสังเคราะห์ปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ที่เหมาะสม

ตารางที่ 14 สภาวะของการทำปฏิกิริยา Suzuki cross coupling บน U¹ PNA บนวัฏภาคของแข็ง

Entry	scale (nmol)	Ar	Pd(OAc) ₂ (eq)	TPPTS (eq)	Condition
1	0.1		10	40	50 mM phosphate buffer pH 8.0, 60 °C
2	0.1		1	4	50 mM phosphate buffer pH 8.0, 60 °C
3	0.1		1	4	3 eq. Cs ₂ CO ₃ , H ₂ O:MeCN (1:2), SiO ₂ , 60 °C
4	0.1		1	4	3 eq. Cs ₂ CO ₃ , H ₂ O:MeCN (1:2), without SiO ₂ , 60 °C
5	250		1	4	3 eq. Cs ₂ CO ₃ , H ₂ O:MeCN (2:1), SiO ₂ , 60 °C



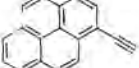
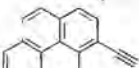


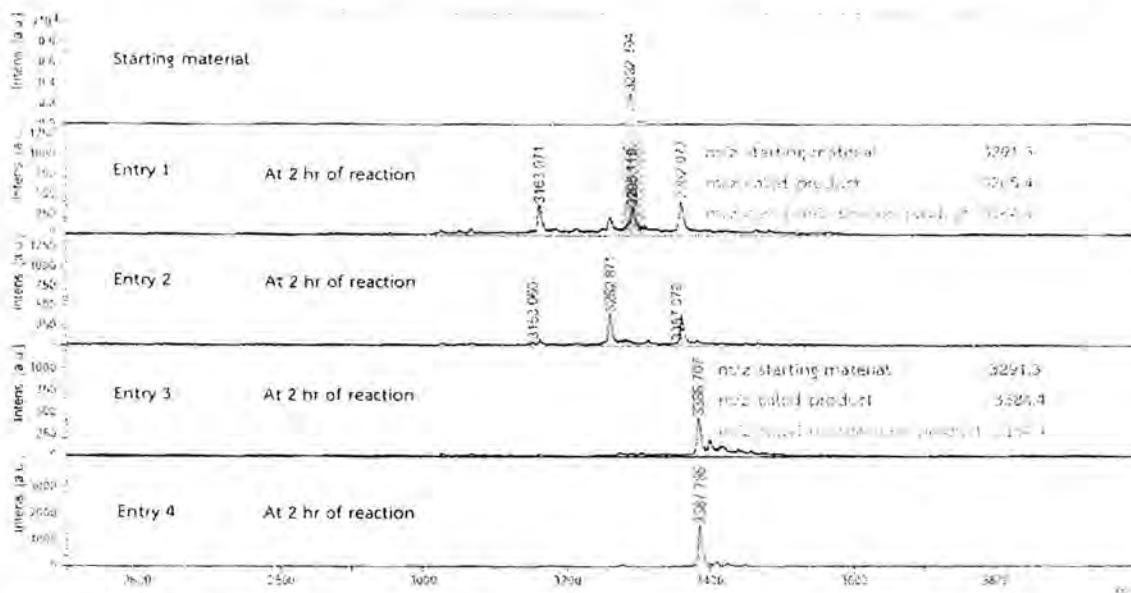
รูปที่ 31 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง PNA Ac-T4UT4-Lys กับ ArBF₃K

เมื่อได้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมคือตาม Entry ที่ 5 ในรูปที่ 31 จึงได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีติดฉลากด้วยหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ของไทโอพีนและฟิวแรนแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค reversed-phase HPLC

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาคัดฉลากพีเอ็นเอด้วยหมู่แทนที่ที่เป็นอะโรมาติกแอลคายนด้วยปฏิกิริยา Sonogashira cross coupling โดยทำการทดลองหาสภาวะการสังเคราะห์ที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 15 และใช้ MALDI-TOF MS ในการติดตามปฏิกิริยาดังรูปที่ 32 ในกรณีนี้จะทำปฏิกิริยาในภาวะสารละลายเนื่องจาก 5-arylalkynyluracil สามารถเกิด cyclization เป็น furanopyrimidine ได้ในภาวะกรดที่จำเป็นสำหรับการปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็ง

ตารางที่ 15 สภาวะในการสังเคราะห์ปฏิกิริยา Sonogashira cross coupling ระหว่าง PNA Ac-T4U/T4-Lys กับอะโรมาติกแอลคายนในสารละลาย

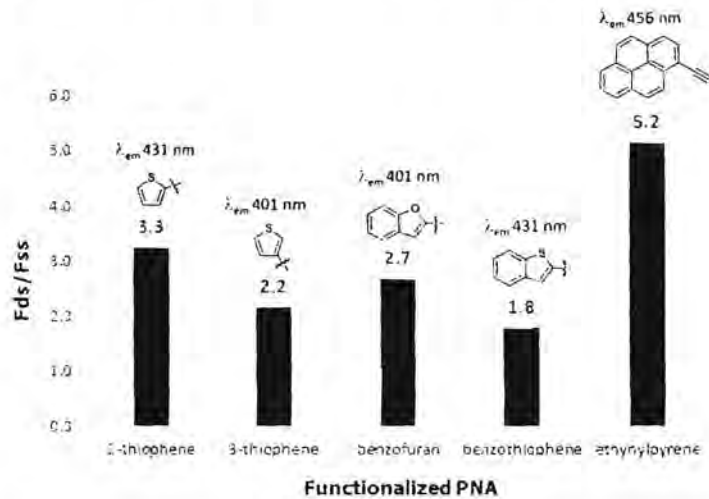
Entry	scale (nmol)	Ar	Condition
1	10	100 eq. 	2.5 eq. Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , 3 eq. Cul, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C
2	10	500 eq. 	2.5 eq. Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , 3 eq. Cul, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C
3	10	500 eq. 	2.5 eq. Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , 3 eq. Cul, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C
4	250	500 eq. 	2.5 eq. Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , 3 eq. Cul, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C



รูปที่ 32 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Sonogashira cross coupling ระหว่าง PNA Ac-T4U/T4-Lys กับ aromatic alkyne ในสภาวะสารละลาย

โดยสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์พีเอ็นเอเพื่อติดตามอะโรมาติกแอลคายนคือสภาวะการทดลองที่ 4 จากนั้นจึงนำพีเอ็นเอ T9 ที่ติดตามด้วย 1-ethynylpyrene โดยวิธี post-synthetic modification ไปศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมพบว่าให้ค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวที่ค่อนข้างสูง (T_m 65.0 °C) เมื่อเปรียบเทียบกับพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (mismatched A: 35.1 °C; mismatched G: <20.0 °C; mismatched C: 40.5 °C) แสดงว่าพีเอ็นเอโพรบดังกล่าวสามารถแยกแยะลำดับเบสของดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การเรืองแสงที่ 456 nm ของพีเอ็นเอเมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สมจะสูงกว่าพีเอ็นเอสายเดี่ยวถึง 5.2 เท่า ซึ่งเป็นการตอบสนองสูงกว่าพีเอ็นเอตัวอื่นที่ได้จากปฏิกิริยา Suzuki ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธี palladium-catalyzed cross coupling ในการทำ post-synthetic modification ของพีเอ็นเอได้ และพีเอ็นเอที่มีการติดตามด้วยหมู่ ethynylpyrene ที่ตำแหน่ง 5 ของยูริดีนให้การตอบสนองเชิงแสงต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับพีเอ็นเอที่ติดตามด้วยหมู่ไทโอฟีน เบนโซฟิวแรน และเบนโซไทโอ

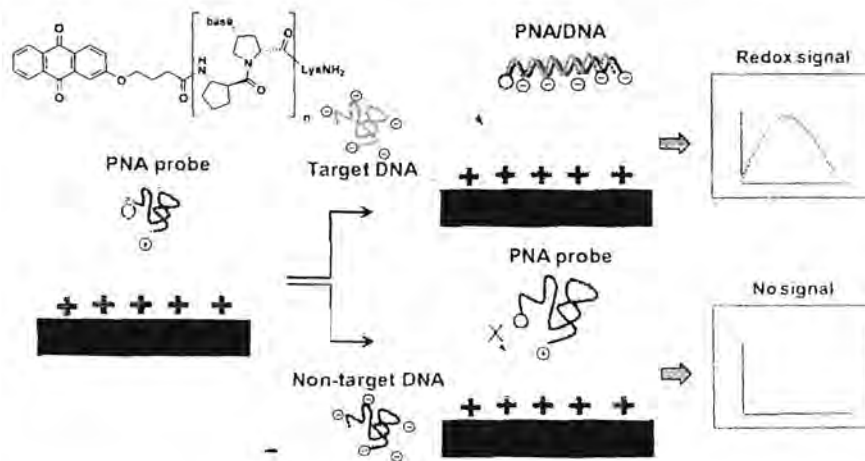
พิน (รูปที่ 33) งานที่จะทำต่อไปคือการศึกษา specificity และการศึกษากับ mix sequence PNA เพื่อให้ได้ข้อมูลสมบูรณ์พอที่จะนำไปตีพิมพ์ต่อไป



รูปที่ 33 อัตราส่วนของ Fluorescence (ที่ λ_{em}) ของ T9 PNA ที่ผ่านการตัดแปรด้วยหมู่ต่างๆ ที่ตำแหน่ง 5 ของยูริดีนที่อยู่กลางสาย ในสภาพที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สม (dA9) ต่อทีเอ็นเอสายเดี่ยว (condition: 1.0 μ M PNA, 1.2 μ M DNA, 10 mM phosphate buffer pH 7.0, λ_{ex} 376 nm).

5. Electrochemically active pyrrolidinyl peptide nucleic acids

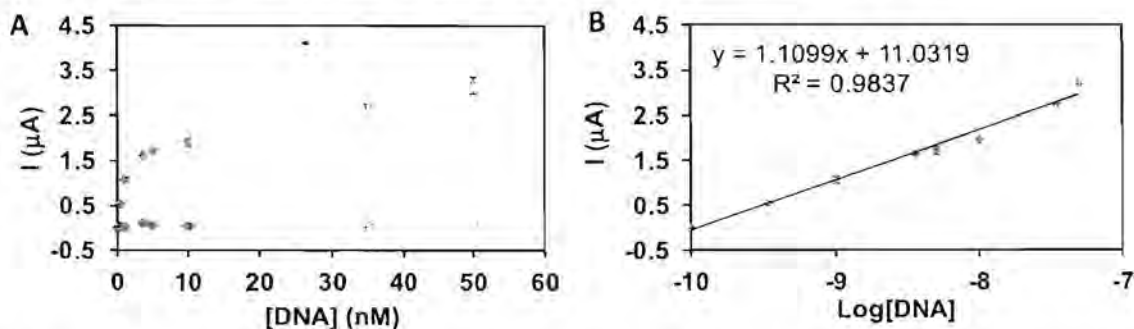
งานวิจัยในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนา apcpPNA ที่ติดฉลากด้วย anthraquinone เพื่อเป็น redox-active probe สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode (SPCE) ที่ตัดแปรด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสโรคกุ้ง (WSSV) ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP (เป็นงานวิจัยที่ทำร่วมกับ ศ.ดร.อรรพรรณ ชัยลาภกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ขุ่มพฤกษ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) งานวิจัยเริ่มจากการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลากที่สามารถให้สัญญาณรีดอกซ์ได้ คือ 4-(anthraquinone-2-yl)oxybutyryl ทางปลายด้าน N ของ apcpPNA ที่มีลำดับเบสเป็น 2AQ-CTAAATTCAGA-LysNH₂ (AQ-WSSV) และได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าแบบที่ไม่ต้องการตรึงโพรบลงบนขั้วไฟฟ้า²² โดยมีหลักการดังแสดงในรูปที่ 34



รูปที่ 34 หลักการของ immobilization-free electrochemical DNA biosensor ที่อาศัย anthraquinone-labeled acpcPNA เป็นโพรบ

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้เป็นขั้วชนิด screen printed carbon electrode (SPCE) ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกคือ poly-quaternized-(dimethylaminoethyl)methacrylate (PQDMAEMA) เมื่อนำไปตรวจวัด AQ-WSSV โดยเทคนิค square wave voltammetry (SWV) ในภาวะที่ไม่เติมเอ็นเอจะไม่เห็นสัญญาณเนื่องจากพีเอ็นเอมีประจุบวกเนื่องจากหมู่ไลซีนที่เติมเข้าไปช่วยการละลายจะเกิดการผลักทางไฟฟ้าสถิตกับขั้ว แต่เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (5'-TCTGAATTTAG -3') อยู่ด้วย จะทำให้เกิดพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดที่มีประจุสุทธิเป็นลบ ซึ่งจะเกิดแรงดึงดูดกับขั้วไฟฟ้า ทำให้ AQ-PNA เข้ามายู่ในระยะที่ทำให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนกับขั้วไฟฟ้าเกิดเป็นสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าขึ้น

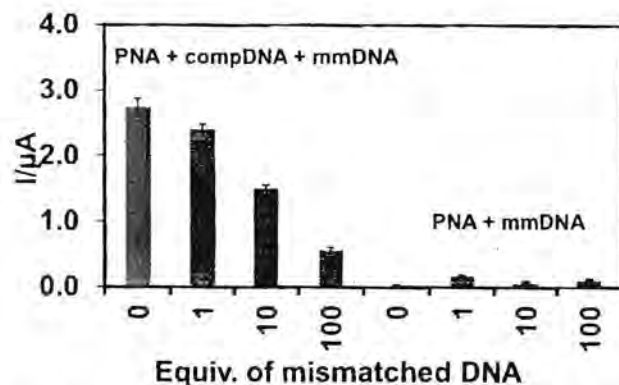
ในงานวิจัยได้มีการปรับปรุงภาวะของการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยเริ่มจากชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ และตัวแปรต่างๆ ในการทำ SWV เมื่อได้ภาวะที่ดีที่สุดแล้วจึงนำมาทำคาลิเบรชันกราฟเทียบกับดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่างๆ (ให้ความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบคงที่ที่ 50 nM) ได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 35 โดยมีช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 0.35-50 nM โดยมีค่า LOD ($3SD_{blank}/Slope$) เป็น 0.1 nM (S/N = 10) ตัวเลขนี้แม้จะไม่ต่ำมากนัก แต่ก็อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับเทคนิคการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอเชิงไฟฟ้าที่ไม่ได้อาศัยการขยายสัญญาณอื่นๆ และเนื่องจากขั้วที่ใช้มีขนาดเล็ก เทคนิคนี้จึงใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยมาก เทียบเท่ากับ 10^{-10} mol หรือ 1 ng สำหรับ ssDNA ที่มีความยาว 300 เบส ซึ่งน่าจะว่องไวพอที่จะนำไปใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาแล้ว และที่สำคัญคือเทคนิคนี้แสดงการเลือกจำเพาะที่สูงมาก ดังจะเห็นได้จากกราฟที่ single mismatched DNA (5'-TCTGACTTTAG -3') ไม่ให้สัญญาณ SWV เลยที่ทุกช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (รูปที่ 36) อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของ non-target DNA สูงๆ จะทำให้สัญญาณจากขั้วไฟฟ้าลดลง คาดว่าเนื่องจากการแข่งขันกับ target DNA-PNA hybrid ในการยึดเกาะกับขั้วไฟฟ้า แต่แม้ที่ความเข้มข้นของ non-target DNA สูงถึง 100 เท่าของดีเอ็นเอเป้าหมายก็ยังเห็นสัญญาณของพีเอ็นเอโพรบได้อย่างชัดเจน



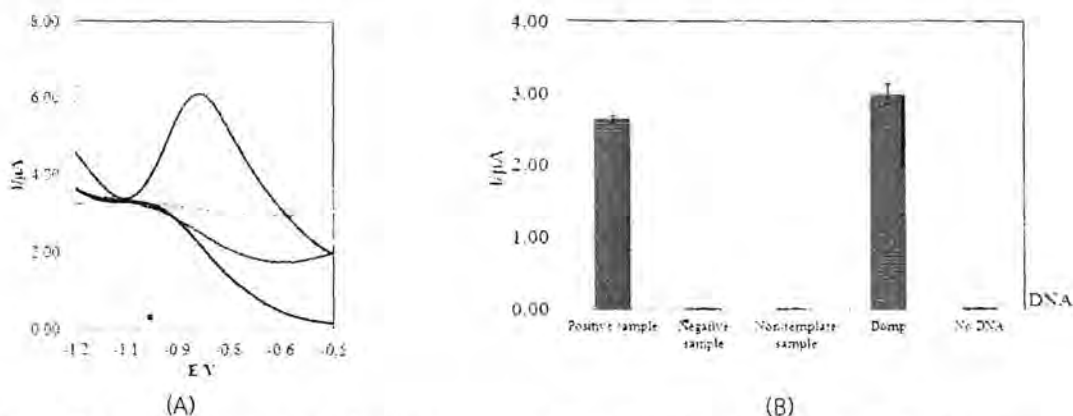
รูปที่ 35 การหาช่วงของการวัดที่ให้สัญญาณเป็นเส้นตรงของพีเอ็นเอโพรบ AQ-WSSV (50 nM) หลังเติม complementary DNA (สีน้ำเงิน) และ non-complementary DNA (สีแดง) ที่ 0.1, 0.35, 1, 3.5, 10, 35 และ 100 nM (ปริมาตรรวม 20 μL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0) บนขั้วไฟฟ้า PQDMAEMA-modified SPCE (มีพอลิเมอร์ 0.26 % ในหมึกคาร์บอนที่ใช้ในการสกรีนขั้วไฟฟ้า) ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุด (frequency 40 Hz, step potential 0.075 V, amplitude 0.100 V) กราฟ A แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสเกลปกติ กราฟ B แสดงในสเกล logarithmic

จากนั้นจึงได้นำเทคนิคดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับการตรวจหาดีเอ็นเอที่มาจากไวรัส WSSV ที่พบในกุ้ง โดยมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อนด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)²³ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มา denature โดยการให้ความร้อน ก่อนผสมกับพีเอ็นเอโพรบแล้วหยดลงไปในอิเล็กโทรด ก่อนจะนำไปตรวจวัดโดยเทคนิค SWV ซึ่งพบว่าสามารถตรวจวัด WSSV DNA ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (รูปที่ 37) โดยสามารถตรวจวัด DNA เริ่มต้นได้ต่ำถึง 10 copies ซึ่งดีกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดโดยเทคนิคอื่นที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ งานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว²⁴

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกันซึ่งได้อาศัย redox-active acpcPNA probe ที่ติดฉลากด้วยแอนทราควิโนน ที่พัฒนาขึ้นนี้ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าของ ศ.ดร.อรรณณ ชัยสภากุล เมธีวิจัยอาวุโส เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอของ HPV type 16 ที่เป็น marker ที่สำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูก²⁵



รูปที่ 36 อิทธิพลของ non-targetDNA ที่มีต่อสัญญาณของพีเอ็นเอโพรบ (50 nM) ที่ความเข้มข้นของ complementary DNA target (dTCTGAATTTAG) = 50 หรือ 0 nM และของ single mismatched DNA (d TCTGAC TTIAG) = 0, 50, 500 and 5,000 nM (0, 1, 10 and 100 equiv.) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) under optimized conditions



รูปที่ 37 เปรียบเทียบสัญญาณ SWV (ข้อมูลดิบในกราฟ A และแสดงในรูปกราฟแท่ง B) ที่ได้จากการตรวจวัด LAMP-amplified WSSV samples: มี (สีส้ม), ไม่มี (สีชมพู), ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ใส่เทมเพลตดีเอ็นเอ (สีเขียว), ดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่เป็นคู่สม (สีเขียว) และไม่มีดีเอ็นเอ (สีน้ำเงิน).

- ¹ Sriwarom, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058–7065.
- ² Bates, R. W.; Vilaivan, T.; Apparao, S. P.; Hoa, T. T. *Synlett* **2016**, *27*, 93–95.
- ³ Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D.; Vilaivan, T. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440–1443.
- ⁴ Seankongsuk, P.; Vchirawongkwin, V.; Bates, R.W.; Padungros, P.; Vilaivan, T. *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 551–560.
- ⁵ Pansuwan, H.; Ditmangklo, B.; Vilaivan, C.; Jiangchareon, B.; Pan-In, P.; Wanichwecharungruang, S.; Palaga, T.; Nuanyai, T.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
- ⁶ Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11021–11037.
- ⁷ a) Varghese, R.; Gajula, P. K.; Chakraborty, T. K.; Wagenknecht, H.-A. *Synlett* **2009**, *20*, 3252–3257.; b) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Fujiwara, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3592–3598.; c) Prokhorenko, I. A.; Dioubankova, N. N.; Korshun, V. A. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 509–520.; d) Wenge, U.; Ehrenschwender, T.; Wagenknecht, H.-A. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 301–304.
- ⁸ Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526–528.; Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 9307–9310.
- ⁹ Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614–625
- ¹⁰ Okamoto, A.; Ichiba, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8364–8365.

- ¹¹ Yotapan, N.; Charoenpakdee, C.; Wathanathavorn, P.; Ditmangklo, B.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2166–2174.
- ¹² Tyaki, S.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- ¹³ a) Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249–3252.; b) Kuhn, H.; Demidov, V. V.; Coull, J. M.; Fiandaca, M. J.; Gildea, B. D.; Frank-Kamenetskii, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097–1103.
- ¹⁴ Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11804–11808.
- ¹⁵ Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7992–7999.
- ¹⁶ Boonlua, C.; Ditmangklo, B.; Reenabthue, N.; Suparpprom, C.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8817–8827.
- ¹⁷ Dangsopon, A.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 74314–74322.
- ¹⁸ a) Kaura, M.; Kumar, P.; Hrdlicka, P. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6256–6268.; b) Mayer, E.; Valis, I.; Wagner, C.; Rist, M.; Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. *ChemBiochem* **2004**, *5*, 865–868.
- ¹⁹ Brouwer, A. M. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
- ²⁰ Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 3251–3259.
- ²¹ Lercher, L.; McGouran, J.F.; Kessler, B.M.; Schofield, C.J.; Davis, B.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10553–10558.
- ²² Luo, X.; Lee, T.H.; Hsing, I.M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7341–7346.
- ²³ Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63.
- ²⁴ Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T. *Talanta* **2016**, *146*, 318–325.
- ²⁵ Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Henry, C.S.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. *Anal. Chim. Acta.* **2017**, *952*, 32–40.

ชื่อโครงการย่อย New approaches to improve the sensitivity of PNA-based DNA sequence detection
 ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 - 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
 รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย

ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการ

ดร.ธนิษฐ์ ปราณีรัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร.นำพล อินสิน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร.แพรทอง เหลลาภา หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร

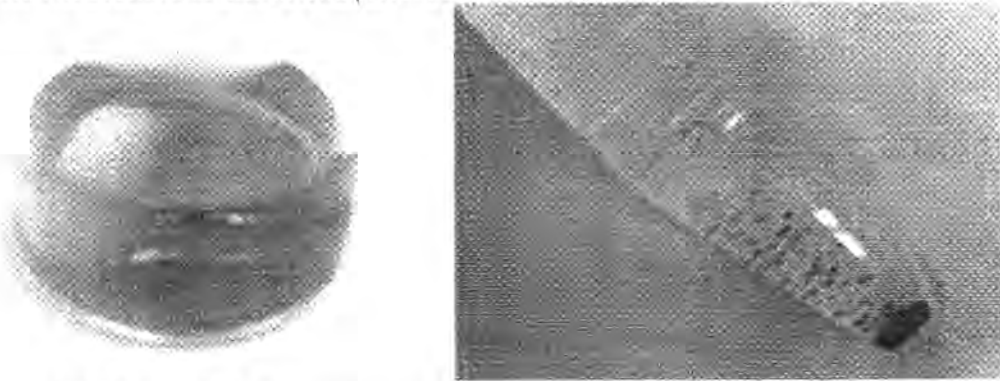
Dr. Christopher Smith ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 (ย้ายที่ทำงานไปมหาวิทยาลัยมหิดลตั้งแต่ตุลาคม 2558)

รายงานความก้าวหน้าของโครงการ

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีสมบัติเชิงหน้าที่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระบบตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยสมบัติที่โดดเด่นของพีเอ็นเอ เช่น ความสามารถในการยึดจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และการที่พีเอ็นเอปราศจากประจุลบ ซึ่งสามารถสรุปผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาตลอดโครงการได้ดังนี้

1. Catalytically active pyrrolidiny peptide nucleic acids

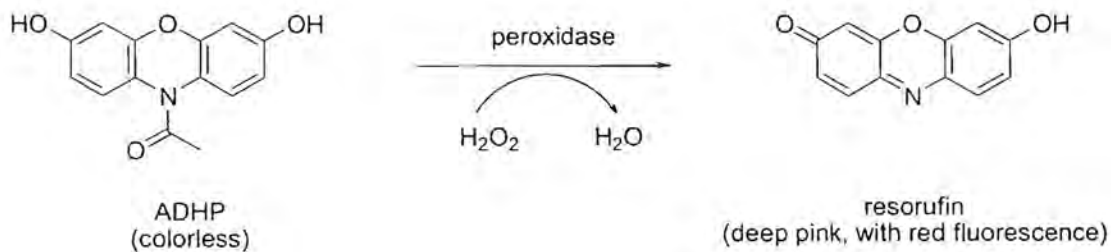
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาโพรบที่มีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง และแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา โดยการตัดแปรรูปพีเอ็นเอ(หรือดีเอ็นเอ)ให้มี catalytic function โพรบดังกล่าวจะนำไปใช้ในการตรวจวัดลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณได้ โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์



Before adding EtOH

After adding EtOH

รูปที่ 1 อนุภาค PtNP ที่ถูกทำให้เสถียรด้วย DNA ในสารละลายน้ำ และการตกตะกอนเมื่อเติม EtOH



Tube1 : ADHP + HRP + H ₂ O ₂	
Tube2 : ADHP + H ₂ O ₂	
Tube3 : ADHP + Pt-DNA + H ₂ O ₂	

รูปที่ 2 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปอร์ออกซิเดสสังเคราะห์ (ADHP) ด้วย horse radish peroxidase (HRP) กับด้วยอนุภาค PtNP-DNA ที่ถูกทำให้เสถียรด้วย DNA (บน: ภายใต้แสงขาว, ล่าง: ภายใต้แสงยูวี)

งานวิจัยนี้ได้มีความพยายามที่จะออกแบบระบบพีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่จะแสดงความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อนำมาใช้เป็นตัวขยายสัญญาณของการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นที่คาดว่าจะทำให้ได้สัญญาณที่เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ฉากเรืองแสง โดยตัวเร่งปฏิกิริยาหนึ่งที่น่าสนใจคืออนุภาคนาโนของ Pt (PtNP) ซึ่งเป็นที่ทราบกันมาก่อนหน้านี้ว่าสามารถแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาคัลลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส^{1,2,3} นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่าสามารถสังเคราะห์คอมเพล็กซ์ของ PtNP ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยดีเอ็นเอ (PtNP-DNA) ได้ และนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ เช่น ไฮโดรจีเนชัน⁴ แต่ยังไม่ได้ศึกษาว่าอนุภาค PtNP-DNA นี้ยังคงสมบัติสมบัตในการจับยึดกับดีเอ็นเออยู่หรือไม่ ในงานวิจัยได้ทดลองเบื้องต้นโดยการสังเคราะห์ โดยการรีดิวซ์ของผสมระหว่าง K₂PtCl₆ กับดีเอ็นเอ (5'-AACCTGCGGATCGCGCTCCGCTACTACAAC-3') ด้วย NaBH₄ ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง⁴ ซึ่งพบว่าสามารถเตรียมอนุภาค PtNP-DNA ดังกล่าวได้จริง และสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล และทำให้กระจายตัวกลับไปในสารละลายได้อย่างอิสระ (รูปที่ 1) ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าอนุภาคที่ได้แสดงสมบัติการเร่งปฏิกิริยาคัลลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส กล่าวคือ สามารถเร่งการเกิดการออกซิเดชันของ 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP, Amplex red) ซึ่งไม่มีสี ไปเป็น resorufin ซึ่งมีสีชมพูเข้ม และเรืองแสงสีส้มได้ภายใต้ UV light (รูปที่ 2) งานที่จะทำต่อไปคือศึกษาสมบัติการจับยึดของอนุภาค PtNP-DNA กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม ถ้ายังคงความสามารถในการจับยึดอยู่จะนำไปใช้เป็นตัวขยายสัญญาณร่วมกับพีเอ็นเอในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอต่อไป แต่ถ้าไม่ก็จะหาวิธีอื่นในการตรึงดีเอ็นเอหรือพีเอ็นเอลงไปในอนุภาค PtNP โดยวิธีอื่น เช่น การใช้หมู่ thiol ต่อไป ซึ่งวิธีหลังนี้มีขั้นตอนยุ่งยากกว่า แต่ได้มีการพิสูจน์มาแล้วว่าดีเอ็นเอที่ตรึงถูกตรึงโดยวิธีดังกล่าวยังคงความสามารถในการจับยึดและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ แต่ของพีเอ็นเอยังไม่มีผู้ศึกษา

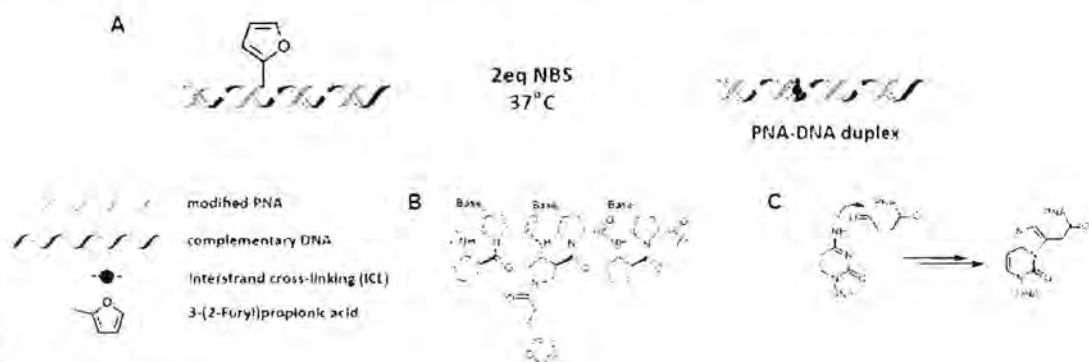
Tube1 : ADHP + HRP + H ₂ O ₂	HRP	control	Pt-avidin	HRP	control	Pt-avidin
Tube2 : ADHP + H ₂ O ₂						
Tube3 : ADHP + Pt-avidin + H ₂ O ₂						
-	0 min			1 hour		

รูปที่ 3 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปอร์ออกซิเดสสังเคราะห์ (ADHP) ด้วย horse radish peroxidase (HRP) กับด้วยอนุภาค PtNP-avidin

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สังเคราะห์คอมโพสิตของ PtNP ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยโปรตีน avidin (PtNP-avidin) และนำไปทดสอบใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเบื้องต้น โดยผลการทดสอบเบื้องต้น (รูปที่ 3) พบว่าอนุภาคได้แสดงสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคลายกับเอนไซม์เปอร็อกซิเดสเช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอข้างต่ำ จึงยังต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าอาจใช้อนุภาค PtNP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคลายเปอร็อกซิเดสเพื่อขยายสัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอได้

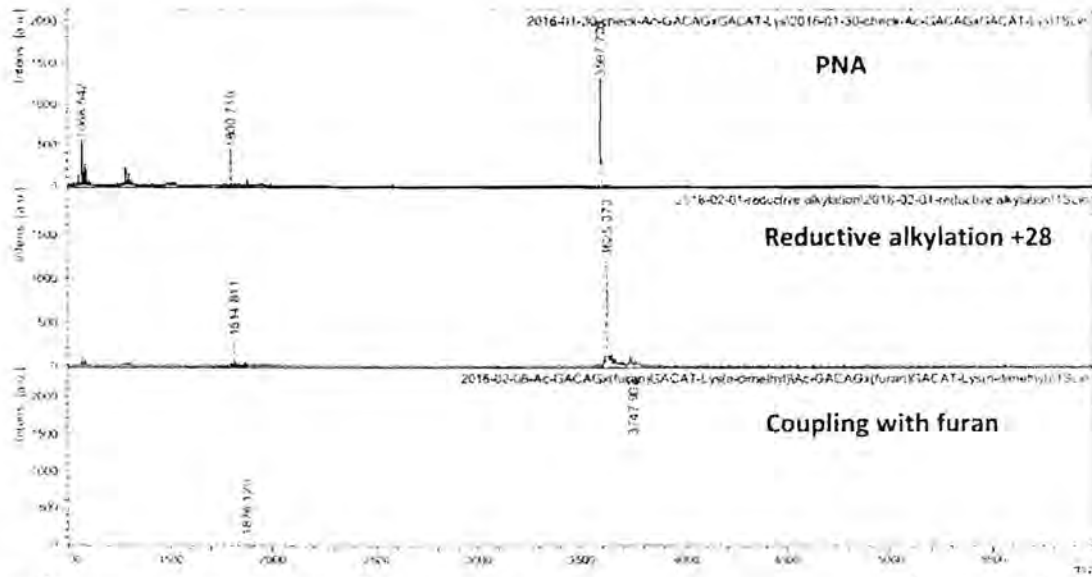
2. Pyrrolidinyl PNA probes with inducible cross-linking properties

งานอีกส่วนหนึ่งที่ได้ดำเนินการไปภายใต้หัวข้อวิจัยนี้คือการขยายขอบเขตของหัวข้อวิจัยไปสู่ functional PNA probe ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากการเป็น catalyst เช่น ฟังก์ชันนัลลิเอ็นเอโทรบที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอคู่สมเมื่อผ่านการกระตุ้นที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนา PNA probe ที่ติดฉลากด้วย furan ซึ่งมีรายงานมาก่อนหน้านี้ในระบบของ DNA ว่าเมื่อกระตุ้นด้วยตัวออกซิไดส์ที่เหมาะสม วง furan จะเปิดออก และจะทำปฏิกิริยา cross-link กับ DNA ได้^{5,6}

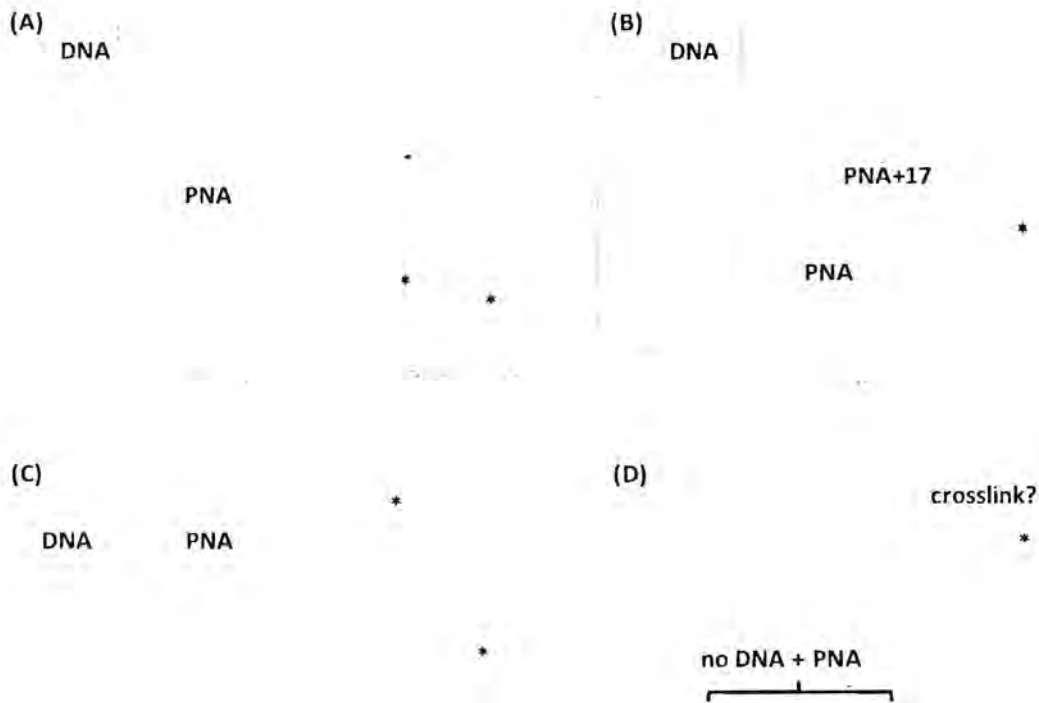


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ furan-modified acpcPNA (A,B) และการเกิด crosslink (C)

งานวิจัยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ acpcPNA ที่ติดฉลากด้วย furan ที่ตำแหน่งกลางสาย (รูปที่ 4) โดยการเปลี่ยน ACPC spacer ให้เป็น APC spacer จากนั้นจึงต่อ 3-(2-furyl)propionic acid เข้าไปโดยปฏิกิริยา amide coupling แต่พบปัญหาในขั้นตอนของการ cleavage ของ furan-modified PNA ออกจาก solid support กล่าวคือภายใต้ภาวะกรด วงแหวน furan จะถูกทำลาย ซึ่งยืนยันโดยการให้ 3-(2-furyl)propionic acid ทำปฏิกิริยากับ trifluoroacetic acid โดยพบว่าจะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว ความพยายามแก้ปัญหาโดยการลดความเข้มข้นของกรดลง หรือการเปลี่ยน linker จาก Rink amide เป็น Sieber amide linker ซึ่งสามารถ cleave ออกได้ภายใต้ภาวะกรดที่ไม่แรงมากนักไม่ประสบความสำเร็จ แต่ในที่สุดสามารถแก้ปัญหาโดยการเชื่อมต่อ 3-(2-furyl)propionic acid เข้าไปกับพีเอ็นเอในสถานะสารละลาย โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ APC-modified acpcPNA ตามปกติก่อน แต่เนื่องจากพีเอ็นเอเองจะต้องตัดแปรที่ปลายด้าน C ด้วย lysine เพื่อเพิ่มการละลาย จึงไม่สามารถนำมา coupling ในภาวะสารละลายได้โดยตรง เนื่องจากหมู่เอมีโนของ lysine ก็เป็นตำแหน่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ด้วย จึงต้องทำปฏิกิริยา reductive alkylation บน solid support เพื่อเปลี่ยน lysine นี้ให้กลายเป็น dimethyllysine³ ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา amide coupling ต่อไปได้ ในขณะที่ยังคงสามารถออกอินฮิบิเตอร์ประจุบวกเพื่อช่วยในการละลายของพีเอ็นเอได้เช่นเดียวกับ lysine จากนั้นจึงกำจัดหมู่ปกป้องของนิวคลีโอเบสและของ APC ออก แล้วจึง cleave พีเอ็นเอออกจาก solid support จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับ Pfp-activated 3-(2-furyl)propionic acid ในตัวทำละลาย DMF แล้ววัดตกของพีเอ็นเอด้วยอีเทอร์ โดยวิธีการดังกล่าวสามารถสังเคราะห์ furan-modified acpcPNA ได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งสามารถพิสูจน์ทราบโดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry (รูปที่ 1) พีเอ็นเอที่ผ่านการตัดแปรแสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอโดยแสดงค่า $T_m = 44 \text{ }^\circ\text{C}$ ซึ่งลดลงจากพีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดแปรค่อนข้างมาก

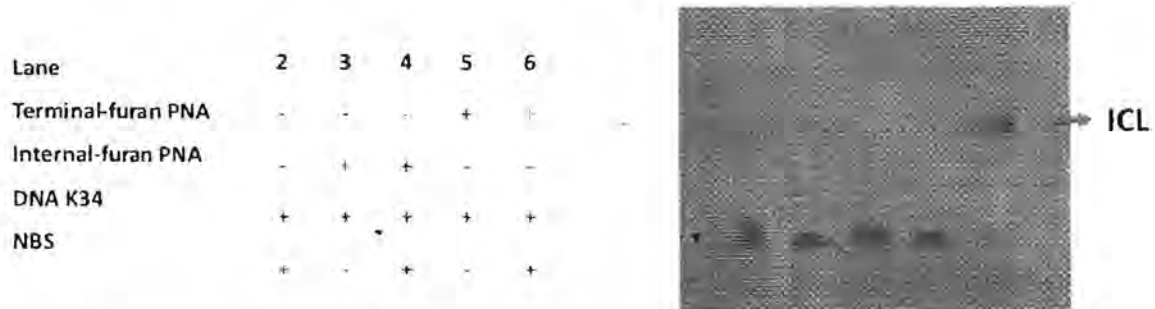


รูปที่ 5 การใช้ MALDI-TOF MS เพื่อติดตามการเกิด methylation ของ lysine และการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับ Pfp-activated 3-(2-furyl)propionic acid ในสถานะสารละลาย



รูปที่ 6 HPLC chromatogram แสดงการติดตามการเกิดปฏิกิริยา crosslink ระหว่าง furan-modified acpcPNA ที่ตำแหน่งกลางสาย (A: ก่อนเติม NBS; B: หลังเติม NBS) และตำแหน่งปลายสาย (C: ก่อนเติม NBS; D: หลังเติม NBS) ลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่ใช้ในการทดลอง A, B คือ Ac-GACAG^{furan}GACAT-Lys(NMe₂) และการทดลอง C, D คือ furan-O-GTAGATCACT-Lys(NMe₂) และ 5'-AGTGATCTACCCCC-3' พิกที่มีเครื่องหมาย * คือ impurity

ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยา crosslink กับดีเอ็นเอหลังการ activate ด้วย N-bromosuccinimide (NBS) ตามวิธีการที่เคยมีรายงานมาในกรณีของ DNA และติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค HPLC, T_m และ gel electrophoresis พบว่าแม้จะเกิดปฏิกิริยาการเปิดวงของ furan เป็น dialdehyde จากการเกิดพิกที่ $m/z = \text{PNA} + 17$ ขึ้น แต่ไม่พบว่าการเกิด crosslink แต่อย่างใด ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการที่คู่เบสระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอก่อนข้างเสถียร แต่เนื่องจากการเกิด crosslink จำเป็นต้องใช้หมู่อะมิโนของนิวคลีโอเบสมาทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ที่เกิดจากการเปิดวงแหวนของฟิวแรน ดังนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาได้ยากกว่าในกรณีของดีเอ็นเอ จากสมมติฐานนี้ผู้วิจัยจึงได้ย้ายตำแหน่งการติดหมู่ฟิวแรนมาไว้ที่ปลายสายด้าน N-terminus ของ acpcPNA แทน และให้ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่ยาวกว่าสายพีเอ็นเอ โดยคาดว่าดีเอ็นเอส่วนที่ยาวเกินกว่าสายพีเอ็นเอจะเกิดปฏิกิริยา crosslink ได้ง่ายกว่าเนื่องจากนิวคลีโอเบสที่อยู่ในสายดีเอ็นเอไม่ได้อยู่ในสภาพที่เข้าคู่เบส ซึ่งในที่นี้ได้กำหนดให้เบสส่วนเกินเป็น dC เนื่องจากมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเบส C และ A สามารถเกิดปฏิกิริยา crosslink ได้ดีกว่าเบสอื่น⁶ ซึ่งผลการทดสอบด้วยเทคนิค HPLC (รูปที่ 6) พบว่าสมมติฐานนี้จะถูกต้องกล่าวคือ พิกของ PNA และของ DNA หายไป และเกิดพิกใหม่ขึ้น ซึ่งเสนอแนะว่าน่าจะเกิดปฏิกิริยา crosslink ได้ และสามารถยืนยันผลได้โดยการทำ T_m ซึ่งพบว่าก่อนและหลังการ activate ด้วย NBS มีลักษณะของ T_m curve ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังได้ยืนยันการเกิด crosslink โดยเทคนิค gel electrophoresis (รูปที่ 7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฉพาะในกรณีที่ furan อยู่ตรงปลายสายเท่านั้นที่จะทำให้เกิดการ crosslink ได้



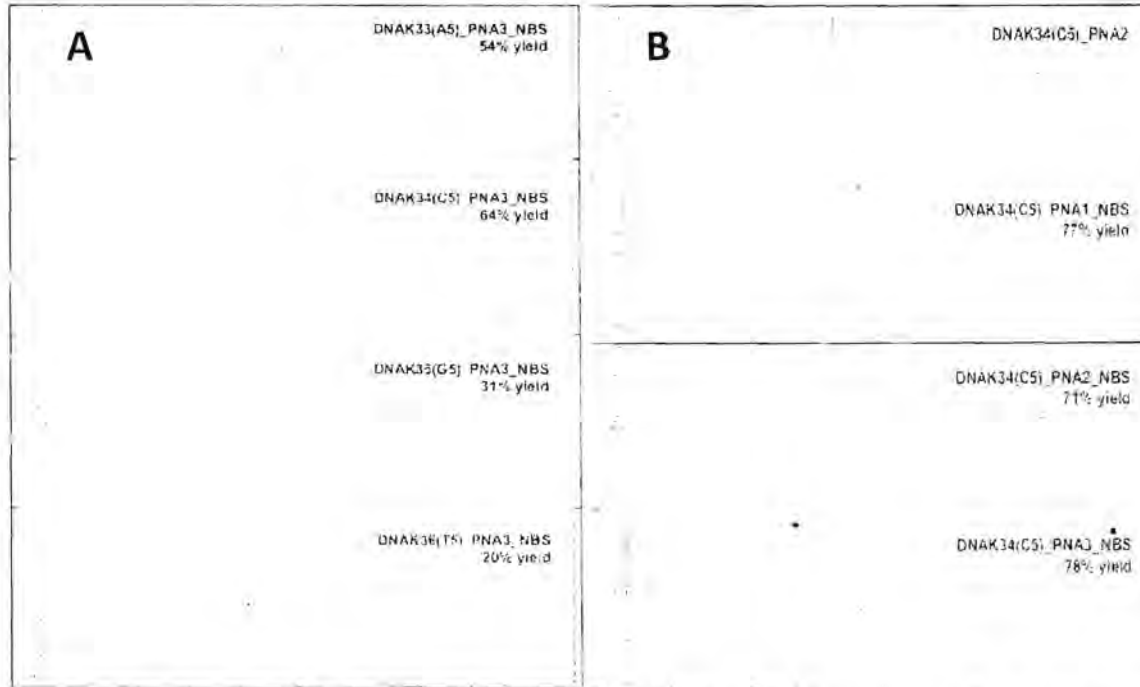
รูปที่ 7 Denaturing PAGE แสดงการเกิด crosslink ของ furan-modified PNA (กลางสายและปลายสาย) กับดีเอ็นเอคู่สม โดยใช้อัตราส่วนของ DNA = PNA เป็น 1 nmol, 5 μL ของ formamide , prerun 300v = 3h, run at 225v = 60 min, และลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่ใช้ในการทดลอง คือ furan-O-GTAGTCACT-Lys(NMe₂) สำหรับปลายสาย, Ac-GACAG^{furan}GACAT-Lys(NMe₂) สำหรับกลางสาย และดีเอ็นเอ 5'-AGTGATCTACCCCC-3'

จากนั้นจึงได้เปรียบเทียบความสามารถในการเกิด crosslink โดยใช้ดีเอ็นเอที่ปลายเป็นเบสต่างๆ กัน โดยใช้เทคนิค HPLC และใช้วิธีจำกัดปริมาณพีเอ็นเอ พบว่าความสามารถในการเกิด crosslink เรียงลำดับได้จาก C > A > G > T (รูปที่ 8) และได้ศึกษาอิทธิพลของ spacer ที่เชื่อมระหว่างฟิวแรนกับ PNA ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยในทุกกรณีจะเกิดการ crosslink ได้ใกล้เคียงกันหากเบนที่ปลายสายดีเอ็นเอเป็น C

นอกจากนี้ได้ศึกษาตำแหน่งของการเกิด crosslink กับ DNA ที่มีเบส T ซ้ำๆ กันตรงปลายสายซึ่งได้ยืนยันมาก่อนหน้านี้แล้วว่าไม่สามารถเกิดการ crosslink โดยอาศัยการแทนที่ด้วยเบส C ที่ละตำแหน่ง จากผลของ denaturing PAGE ในรูปที่ 9 พบว่าการแทนที่เบส C ในทุกตำแหน่งสามารถเกิด crosslink ได้ คาดว่าการติด furan ไว้ที่ปลายสายของ PNA ผ่าน linker ที่ค่อนข้างยืดหยุ่น ประกอบกับโครงสร้างของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ค่อนข้างยืดหยุ่นด้วย ทำให้สามารถเกิดการ crosslink ได้หลายตำแหน่ง จึงอาจต้องปรับโครงสร้างต่อไปหากต้องการให้เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง และสุดท้ายได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเกิด double duplex invasion พร้อมกับการเกิด crosslink ระหว่าง furan-modified acpcPNA กับ dsDNA โดยได้ทำการสังเคราะห์ furan-modified acpcPNA ตามวิธีการที่ได้กล่าวไปข้างต้นแต่มีการเพิ่มหมู่ไลซีนจาก 1 ตำแหน่งเป็น 5 ตัวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ invade ดังที่ได้ทราบมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้⁷ จากติดตามโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทั้งแบบปกติและแบบ denature พบว่าพีเอ็นเอระบบนี้สามารถเกิด invasion กับ dsDNA ได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 ซ้าย เลขที่ 7 และ 8 แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดการ crosslink ได้เนื่องจากไม่พบแบนด์ที่อยู่เหนือ dsDNA จาก denaturing PAGE ดังแสดงในรูปที่ 10 ขวา เลขที่ 8 ซึ่งอาจเกิดจากการที่ตำแหน่งของเบส C ที่เป็นเป้าหมาย

ของการเกิด crosslink บนสายของดีเอ็นเอ นั้นยังอยู่ในสภาพที่เข้ากับเบส G บนดีเอ็นเอสายตรงกันข้าม จึงไม่มีโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยา crosslink ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยหมู่อะมิโนของ C คาดว่าหากทำให้มีช่องว่างตรงตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยาโดยการเลื่อนการเข้าคู่กันของพีเอ็นเอ 4 กับดีเอ็นเอ N24 ไป 1-2 ลำดับเบส น่าจะทำให้เกิดการ crosslink ได้ โดยการเกิด duplex invasion ในดีเอ็นเอสายยาวพร้อมการเกิด crosslink ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน หากสามารถทำสำเร็จก็จะเป็นความก้าวหน้าอย่างมาก และเน้นให้เห็นสมบัติที่โดดเด่นของพีโรลิดีนสที่เอ็นเออย่างชัดเจน

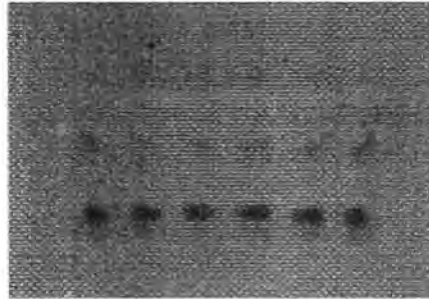
งานที่จะทำต่อไปคือการ characterize ผลิตภัณฑ์จากการ crosslink โดยเทคนิค mass spectrometry จากนั้นจึงจะนำพีเอ็นเอโพรบนี้ไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอต่อไป โดยจะเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับ non-crosslink probe ด้วย



รูปที่ 8 HPLC chromatogram แสดงการเกิด crosslink ของ PNA3 กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสปลายสายเป็น A5, C5, G5, T5 (A) และการเกิด crosslink ของดีเอ็นเอที่ปลายสายเป็น C5 กับพีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกัน (B) และลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ PNA1 = furan-nox-GTAGATCACT-K(NMe₂) PNA2 = furan-GTAGATCACT-K(NMe₂), PNA3 = furan-o-GTAGATCACT-K(NMe₂), DNA K33 = AGT GAT CTA CCA AAA, DNA K34 = AGT GAT CTA CCC CCC, DNA K35 = AGT GAT CTA CGG GGG, DNA K36 = AGT GAT CTA CTT TTT

Lane	1	2	3	4	5	6
PNA3	+	+	+	+	+	+
DNA K44	+	-	-	-	-	-
DNA K45	-	+	-	-	-	-
DNA K46	-	-	+	-	-	-
DNA K47	-	-	-	+	-	-
DNA K48	-	-	-	-	+	+
NBS	+	+	+	+	+	-

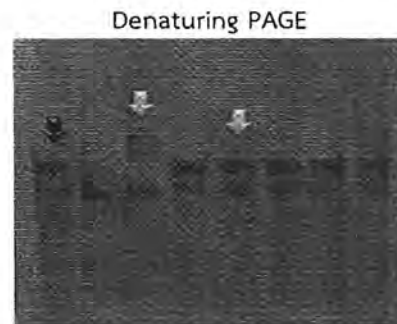
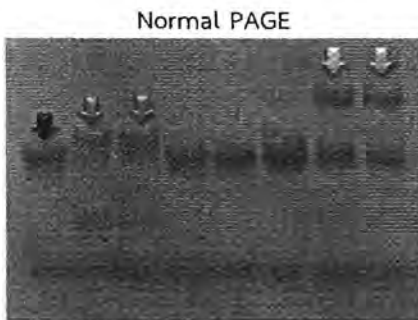
DNA K44 = AGT GAT CTA CCT TTT
 DNA K45 = AGT GAT CTA CTC TTT
 DNA K46 = AGT GAT CTA CTT GTT
 DNA K47 = AGT GAT CTA CTT TGT
 DNA K48 = AGT GAT CTA CTT TTC



รูปที่ 9 Denaturing PAGE แสดงผลการเกิด crosslink ของ PNA3 และดีเอ็นเอที่มีการแทนที่เบส T ด้วยเบส C บนปลายสายที่ตำแหน่งต่างกัน โดยใช้ DNA = PNA = 0.5 nmol, 5 uL ของ formamide, prerun 300v = 1h, run at 225v = 45 min, PNA3 = furan-o-GTAGATCACT-Lys(NMe₂).

PNA 4 : K₅-CA TCT AGT GA-Ac
 DNA N24 : CCA GGG CAT GGT AGA TCA CTG TAC GCC GCG
 DNA N25 : GGT CCC GTA CCA TCT AGT GAC ATG CGG CGC
 PNA 5 : furan-GT AGA TCA CT-K₅(NMe₂)

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
PNA 4	-	-	-	-	-	+	+	+
DNA N24	+	-	-	+	+	+	+	+
DNA N25	+	+	+	+	+	+	+	+
PNA 5	-	+	+	+	+	-	+	+
NBS	-	-	+	-	+	-	-	+

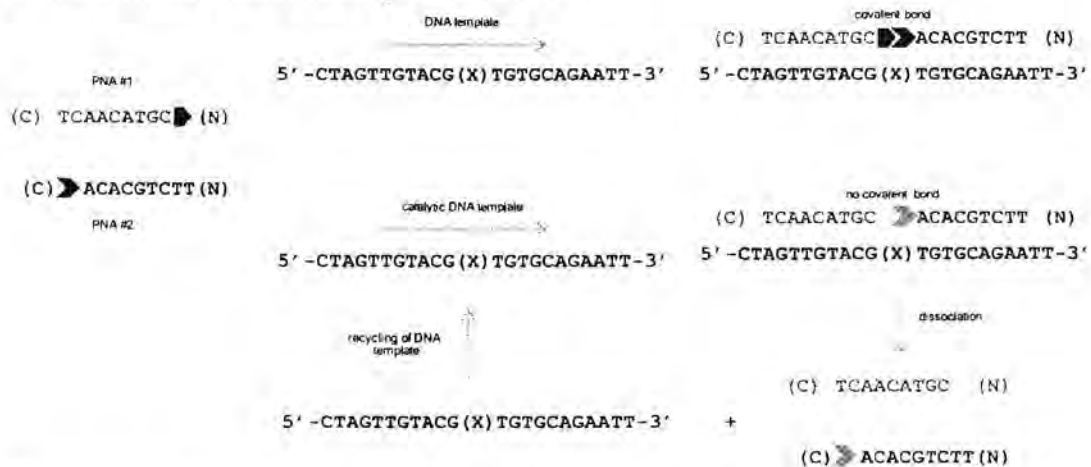


- ↓ duplex DNA:DNA
- ↓ duplex DNA:PNA/ICL
- ↓ invasion
- ↓ Invasion+ICL

รูปที่ 10 Denaturing PAGE แสดงผลการเกิด invasion และการเกิด crosslink ของ furan-modified acpcPNA กับ ดีเอ็นเอสายคู่ โดยใช้ DNA = 0.2 nmol และ PNA = 0.4 nmol, 5 uL ของ formamide, prerun 300v = 1h, run at 225v = 60 min สำหรับ denature 120 min สำหรับ PAGE ปกติ

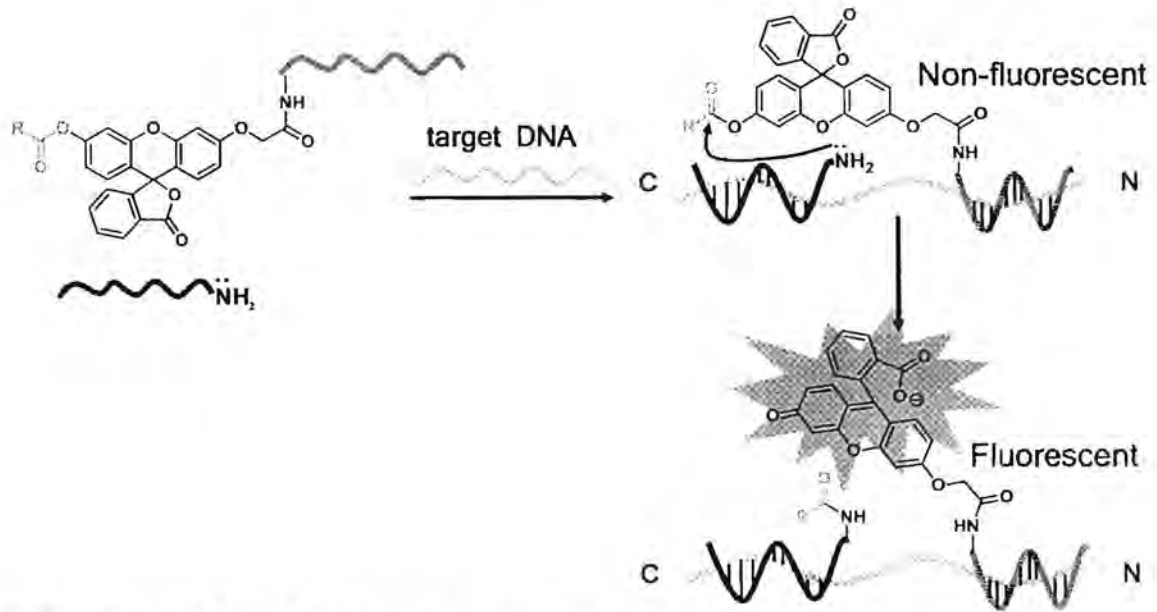
3. DNA-templated and DNA-catalyzed reactions of pyrrolidinyl peptide nucleic acids

งานวิจัยนี้พยายามจะพัฒนาระบบที่จะเร่งการทำปฏิกิริยาระหว่างพีเอ็นเอสองสาย ซึ่งติดฉลากด้วยหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาไว้ที่ปลายคนละด้าน โดยอาศัย DNA template ซึ่งจะนำพีเอ็นเอทั้งสองสายมาอยู่ใกล้กัน จึงทำให้หมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยามาอยู่ใกล้กันด้วย จึงเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น⁸ ซึ่งมีความเป็นไปได้อยู่สองรูปแบบดังแสดงในรูปที่ 11 กล่าวคือ DNA-templated reaction ที่ทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์เชื่อมต่อพีเอ็นเอทั้งสองสายเข้าด้วยกัน โดยทั่วไปรูปแบบนี้เมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้ว DNA template จะไม่สามารถทำงานต่อไปได้เนื่องจากเกิด product inhibition (พีเอ็นเอสายยาวจะจับกับพีเอ็นเอได้แน่นกว่าพีเอ็นเอสายสั้น) และอีกรูปแบบหนึ่งคือ DNA-catalyzed reaction ที่ไม่มีการเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างพีเอ็นเอทั้งสอง ทำให้ตัว DNA template เมื่อทำหน้าที่เสร็จแล้วสามารถกลับไปเร่งปฏิกิริยาในรอบต่อไปได้ ซึ่งน่าจะมีประสิทธิภาพกว่าแบบแรก ปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่นในการตรวจวัดดีเอ็นเอ การสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เป็นสายยาว หรือการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่คอนจูเกตกับดีเอ็นเอ เป็นต้น



รูปที่ 11 แสดงแนวคิดในการทำ DNA-templated/DNA-catalyzed reaction ของพีเอ็นเอสองสาย

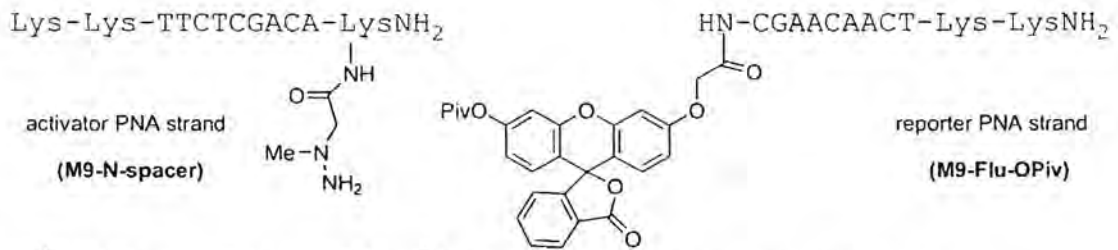
งานวิจัยนี้ต้องการที่จะออกแบบ DNA-catalyzed reaction ของพีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการถ่ายโอนหมู่เอซิลที่อยู่บน masked fluorophore จากพีเอ็นเอสายหนึ่งไปยังพีเอ็นเออีกสายหนึ่ง โดยปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก ซึ่งการถ่ายโอนนี้จะถูกเร่งด้วยดีเอ็นเอเทมเพลต (proximity effect) ข้อดีของการออกแบบนี้คือเมื่อปฏิกิริยาเกิดแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะไม่จับแน่นกับดีเอ็นเอเทมเพลตซึ่งจะทำให้เกิด product inhibition ได้ดังที่พบใน DNA-templated reaction ส่วนใหญ่ และผลิตภัณฑ์ยังสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนกับพีเอ็นเอที่ยังไม่เกิดปฏิกิริยา ทำให้ดีเอ็นเอเทมเพลต 1 ตัวสามารถทำงานได้หลายครั้ง โดยในการออกแบบนี้ได้เลือกติดฉลาก Fluorescein ที่มีออกซิเจนอะตอมหนึ่งถูกปกป้องด้วยหมู่เอซิล ให้กับพีเอ็นเอสายหนึ่ง (reporter PNA) และมีพีเอ็นเออีกสายหนึ่งที่มีหมู่ที่เป็นนิวคลีโอไฟล์อยู่ (activator PNA) ในตอนเริ่มต้น reporter ควรจะให้การเรืองแสงที่ต่ำ เนื่องจาก masked Fluorescein จะอยู่ในโครงสร้างที่เป็น spiropyran ที่ไม่เรืองแสง เมื่อออกแบบให้หมู่ที่จะเข้าทำปฏิกิริยากันมีระยะห่างที่เหมาะสม การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่าง reporter PNA, activator PNA และ DNA template เกิดเป็น ternary complex จะทำให้เกิดการถ่ายโอนหมู่เอซิลจาก reporter PNA ไปยัง activator PNA และทำให้เกิดการ unmasked ของ Fluorescein บน reporter PNA ซึ่งจะส่งผลให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 12



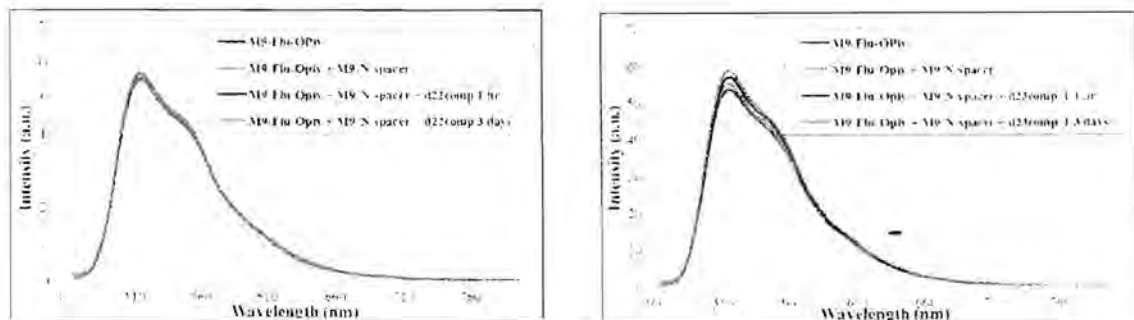
รูปที่ 12 แสดงแนวคิดในการทำ DNA-templated fluorogenic reaction ของ PNA

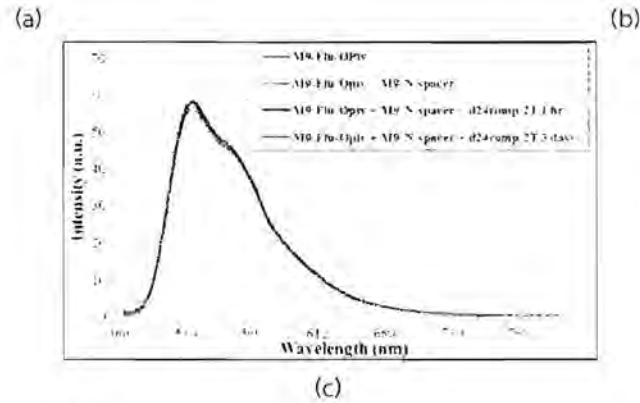
ในงานวิจัยได้เลือก O-pivaloyl Fluorescein เป็น masked fluorophore เนื่องจากความเสถียรที่ดี และเมื่อปลดหมู่ O-pivaloyl ออกภายใต้ภาวะเบสจะเห็นการเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึงกว่า 100 เท่า จากนั้นจึงได้ทดสอบปฏิกิริยาโดยการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีความยาว 9 เบสสองสาย สายหนึ่งคือ reporter strand (M9-FAM-OPiv) ถูกตัดแปรที่ปลายด้าน N ด้วย O-pivaloyl Fluorescein และอีกสายหนึ่งคือ activator strand (M9-N-spacer) จะถูกตัดแปรที่ปลายด้าน C ด้วย N-amino-N-methylglycine ผ่าน side chain ของ lysine และใช้เทมเพลตเป็นดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 13

d22comp: 5'-CTAGTTGTACGTGTGCAGAATT-3'
 d23compT: 5'-CTAGTTGTACGTTGTGCAGAATT-3'
 d24compTT: 5'-CTAGTTGTACGTTTGTGCAGAATT-3'



รูปที่ 13 ลำดับเบสของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา DNA-templated fluorogenic reaction

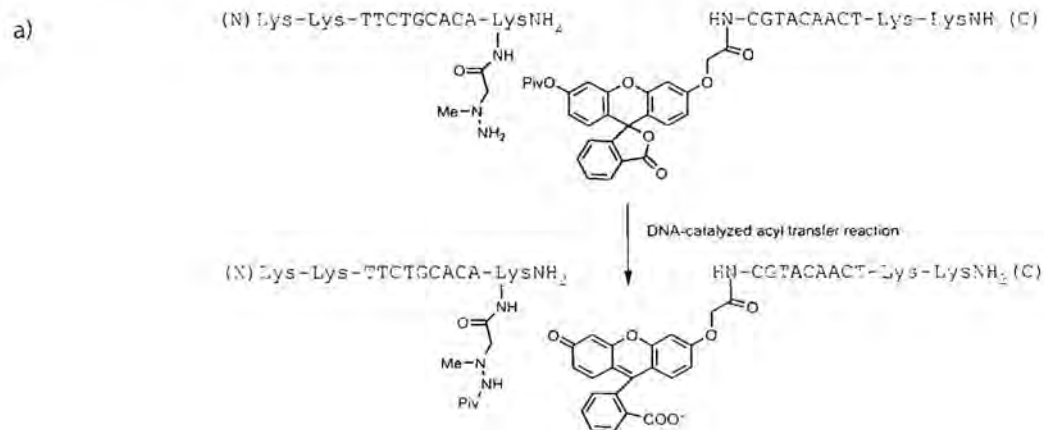


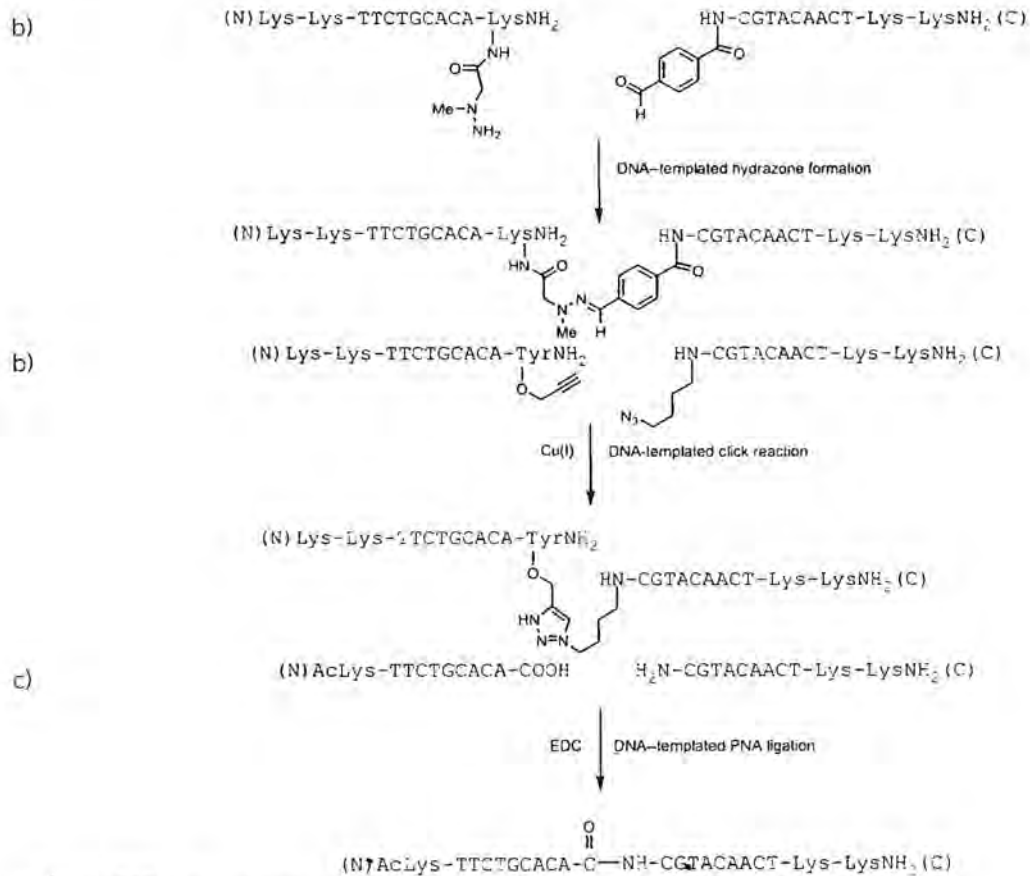


รูปที่ 14 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ M9-FAM-OPiv (1 μ M), M9-N-spacer (1 μ M) และ DNA template (1 μ M) $\lambda_{em} = 515$ nm, $\lambda_{ex} = 450$ nm, PMT voltage = medium) หลังจากทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง และ 3 วัน ใน 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

เป็นที่น่าเสียดายว่าในทุกกรณีไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ 450 nm (Fluorescein emission) อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14) ซึ่งได้ยืนยันด้วยวิธีอื่น ได้แก่ HPLC และ MALDI-TOF MS ซึ่งไม่พบปฏิกิริยา acyl transfer ระหว่างที่เอ็นเอทั้งสองสาย ซึ่งอาจเกิดจากระยะห่างระหว่าง reacting partner ทั้งสองยังไม่เหมาะสม หรือ O-pivaloyl group ที่เป็นหมู่ปกป้องอาจจะเสถียรเกินไปจนไม่สามารถหลุดออกได้ตามที่วางแผนไว้แม้จะมี DNA template อยู่ด้วย นอกจากนี้ก็พบปัญหาที่พบคือหมู่ pivaloyl เมื่อทิ้งไว้ในสารละลายเป็นระยะเวลานานจะมีการหลุดออกของหมู่ pivaloyl ได้ด้วยทำให้มี fluorescence background สูง ผลการทดลองเบื้องต้นถึงอิทธิพลของระยะห่าง โดยการปรับเปลี่ยน linker X ที่เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอสองส่วน จาก T0-T2 ไม่พบว่า มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปฏิกิริยา DNA-templated/DNA-catalyzed reaction อื่นๆ อีก ดังสรุปในรูปที่ 15 อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค MALDI-TOF MS พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเฉพาะในกรณีของ hydrazone formation (entry b; m/z ligation product = 6754) และ click reaction (entry c; m/z ligation product = 6728) แต่ในปฏิกิริยา click พบว่ามี background reaction ด้วย กล่าวคือแม้ไม่มี DNA template ก็ยังพบผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม ในทุกกรณียังถือว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณน้อยมาก จากปัญหาดังกล่าวทั้งหมด ประกอบกับ impact ของงานที่อาจจะไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับงานที่ใช้ DNA ที่มีผู้ศึกษากันมาค่อนข้างมากแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้หยุดดำเนินการโครงการย่อยนี้ และจะไปเพิ่มเนื้องานโดยการขยายขอบเขตของงานในหัวข้อย่อยอื่นต่อไป

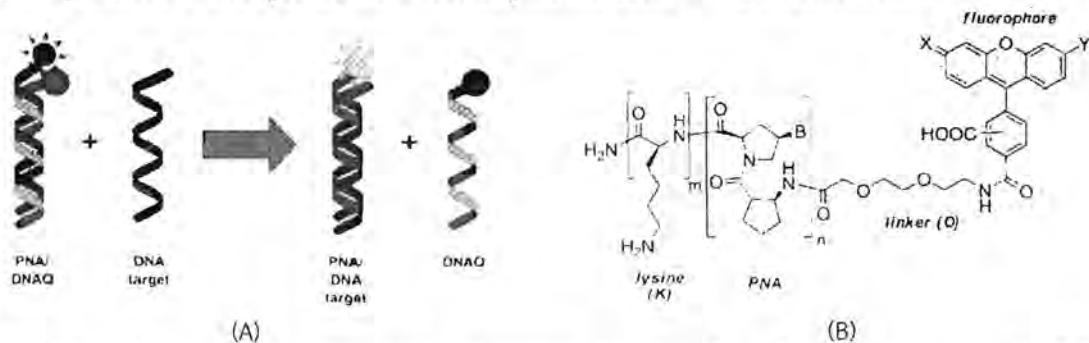




รูปที่ 15 ปฏิกริยา DNA-templated reaction ระหว่างพีเอ็นเอสองสายที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้

4. PNA-based strand displacement probes

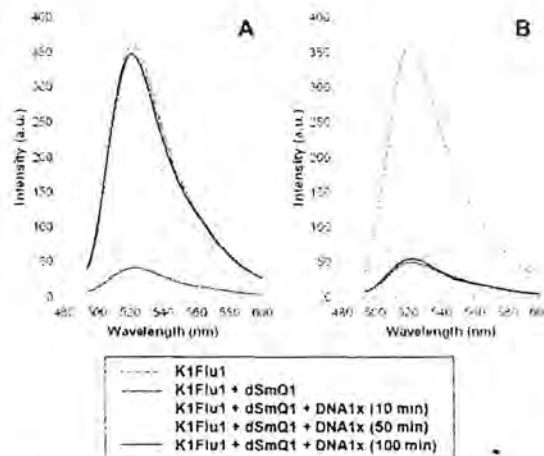
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา self-reporting fluorescence PNA probe สำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของ ดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement ซึ่งตัวโพรบจะประกอบด้วยสองส่วนคือ sensor strand ซึ่งเป็นพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง กับ quencher strand ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ติดด้วยตัวดับแสง โดยโพรบนี้จะออกแบบให้เข้าคู่กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะปกติ เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกับ PNA ที่เป็น sensor strand อยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะเข้าไปแทนที่ quencher strand เกิดเป็นไฮบริดคู่ใหม่ การแทนที่ของ quencher strand นี้จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 16) หลักการนี้เคยมีผู้ศึกษากับดีเอ็นเอ^{9,10,11} และพีเอ็นเอระบบดั้งเดิม^{12,13} มาบ้างแล้ว



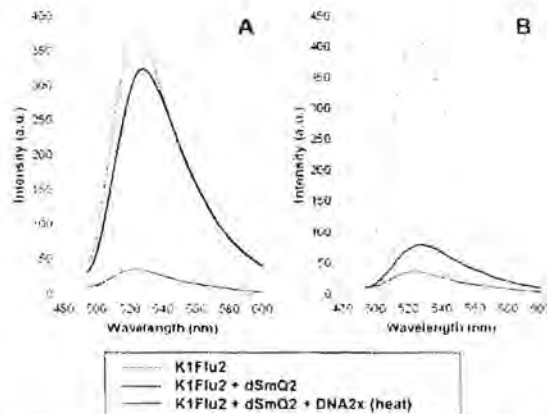
รูปที่ 16 หลักการทำงานของ PNA-based strand displacement probe และโครงสร้างของ labeled acpcPNA ที่ใช้เป็น sensor strand

การเกิดการแทนที่จะถูกกำหนดโดยความเสถียรของไฮบริดระหว่าง PNA sensor strand กับ DNA target เทียบกับความเสถียรของไฮบริดระหว่าง PNA sensor strand กับ DNA quencher strand เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าได้ โดย

หลักการจะต้องออกแบบให้ไฮบริดของ PNA sensor strand กับ DNA quencher strand ไม่เสถียรเกินไปจนไม่เกิดการแทนที่ แต่ก็ต้องเสถียรพอให้เกิดการจับสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้อง optimize DNA quencher และภาวะที่เหมาะสมของการแทนที่ก่อน โดยผลการทดลองพบว่าการใช้ FAM หรือ TAMRA-labeled PNA probe ร่วมกับ quencher DNA ที่มี single mismatch base หรือที่มีลำดับเบสสั้นกว่า sensor strand ในอัตราส่วนที่เท่ากันจะทำให้เกิดการจับแสงอย่างมาก (76-94%) และเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมจะเกิดการแทนที่ พร้อมกับเกิดการคืนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 17, 18) โดยให้ค่า F/F_0 อยู่ในช่วง 8.3-14.6 ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม รวมทั้งที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งจะให้การคืนสัญญาณที่น้อยกว่ามาก โดยให้ค่า F/F_0 อยู่ในช่วง 1.0-2.4 เมื่อ F_0 คือสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ displacement probe complex เมื่อเริ่มต้น และค่า discrimination factor ($((F/F_0)_{\text{comp}}/(F/F_0)_{\text{mismatch}})$) อยู่ในช่วง 3.6-13.3 (ตารางที่ 1) และสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นสายคู่ได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำ denaturation ก่อน



รูปที่ 17 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ displacement probe K1Flu1/dSmQ1 ในการแยกแยะความแตกต่างของ A) complementary DNA (DNA1x = 3'-AATTTAAGTCT-5') และ B) single mismatched DNA (DNA1x = 3'-AATTTACGTCT-5'). ลำดับเบสของ sensor probe K1Flu1 คือ FAM-O-CTAAATTCAGA-KNH₂ และลำดับเบสของ quencher probe dSmQ1 คือ Dabcyl-GATTTACGTCT-5'; [K1Flu1] = 0.05 μM , [dSmQ1] = [DNA1x] = 0.50 μM , excitation wavelength = 480 nm. การวัดทั้งหมดทำที่ 20 $^{\circ}\text{C}$.



รูปที่ 18 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ displacement probe K1Flu2/dSmQ2 ในการแยกแยะความแตกต่างของ A) complementary DNA (DNA2x = 3'-TCAATAGGGACG-5') และ B) single mismatched DNA (DNA2x = 3'-TCAATTGGGACG-5'). ลำดับเบสของ sensor probe K1Flu2 คือ FAM-O-AGTTATCCCTGC-KNH₂ และลำดับเบสของ quencher probe dSmQ2 คือ Dabcyl-TCAATAGGGACG-5'; [K1Flu2] = 0.05 μM , [dSmQ2] = [DNA2x] = 0.50 μM , excitation wavelength = 480 nm. การวัดทั้งหมดทำที่ 20 $^{\circ}\text{C}$.

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ PNA-based displacement probe^{a,b}

Probe1	F/F ₀ ^{c,d}					
	DNA1a	DNA1b	DNA1c	DNA1d	DNA1e	DNA1f
K1Flu1+dSmQ1	8.3	1.1 (7.5)	2.3 (3.6)	1.7 (4.9)	1.1 (7.5)	1.8 (4.6)
K4Flu1+dSmQ1	13.8	1.4 (9.9)	2.4 (5.8)	2.2 (6.3)	1.2 (11.5)	1.7 (8.1)
K4TMR1+dSmQ1	14.6	1.2 (12.2)	2.3 (6.3)	1.9 (7.7)	1.1 (13.3)	1.9 (7.7)
Probe2	DNA2a	DNA2b	DNA2c	DNA2d	DNA2e	DNA2f
K1Flu2+dSmQ2	8.9	2.2 (4.0)	1.2 (7.4)	1.4 (6.4)	1.0 (8.9)	2.1 (4.2)
K1Flu2+d9Q2	11.2	1.8 (6.2)	1.4 (8.0)	1.2 (9.3)	1.1 (10.2)	1.6 (7.0)

^a ลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง

Sensor probes

- K1Flu1: FAM-O-CTAAATTCAGA-KNH₂
 K4Flu1: FAM-O-CTAAATTCAGA-KKKKNH₂
 K4TMR1: TMR-O-CTAAATTCAGA-KKKKNH₂
 K1Flu2: FAM-O-AGTTATCCCTGC-KNH₂

Quencher probes

- dSmQ1: Dabcyl-GATTTACGTCT-5'
 dSmQ2: Dabcyl-TCAATGGGACG-5'
 d9Q2: Dabcyl-TCAATAGGG-5'

DNA targets

- DNA1a: 3'-AATTTAAGTCT-5'
 DNA1b: 3'-AATTTACGTCT-5'
 DNA1c: 3'-AATTTAAGACT-5'
 DNA1d: 3'-AATTTIAGTCT-5'
 DNA1e: 3'-AATTGAAGTCT-5'
 DNA1f: 3'-AACTTAAGTCT-5'
 DNA2a: 3'-TCAATAGGGACG-5'
 DNA2b : 3'-TCAATGGGACG-5'
 DNA2c: 3'-TCAATGGGACG-5'
 DNA2d : 3'-TCAATGGGACG-5'
 DNA2e: 3'-TCAAAGGGACG-5'
 DNA2f: 3'-TCAATAGCGACG-5'

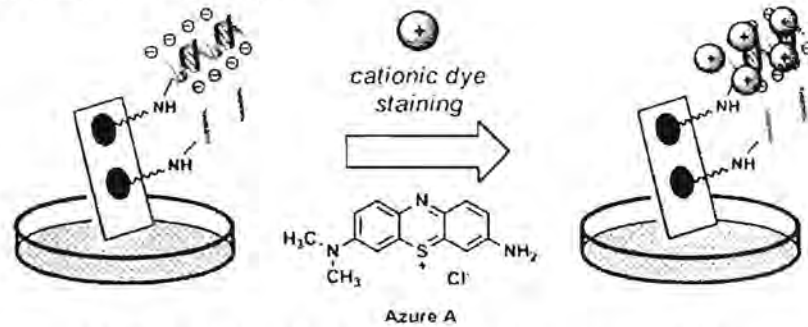
^c [sensor probe] = 0.05 μ M, [quencher probe] = [DNA target] = 0.50 μ M, excitation wavelength = 480 nm (FAM) or 550 nm (TAMRA). การวัดทั้งหมดทำที่ 20 °C

^d F₀ คือสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ displacement probe complex เมื่อเริ่มต้น

^e ตัวเลขในวงเล็บคือค่า discrimination factor ซึ่งนิยามว่าเป็น $[(F/F_0)_{\text{control}} / (F/F_0)_{\text{discrimin}}]$

ระบบนี้ยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้ปริมาณ quencher probe และ DNA เป้าหมายในปริมาณที่สูงจึงจะตรวจวัดได้ และ kinetics ของการแทนที่ยังค่อนข้างช้า ใช้เวลาในหลักชั่วโมงการแทนที่จึงจะถึงสมดุล ซึ่งสามารถเร่งได้ด้วยการให้ความร้อน อย่างไรก็ตามวิธีการให้ความร้อนนี้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัด in vivo ได้ จึงยังต้องมีการพัฒนาต่อไป อย่างไรก็ตามงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว¹⁴

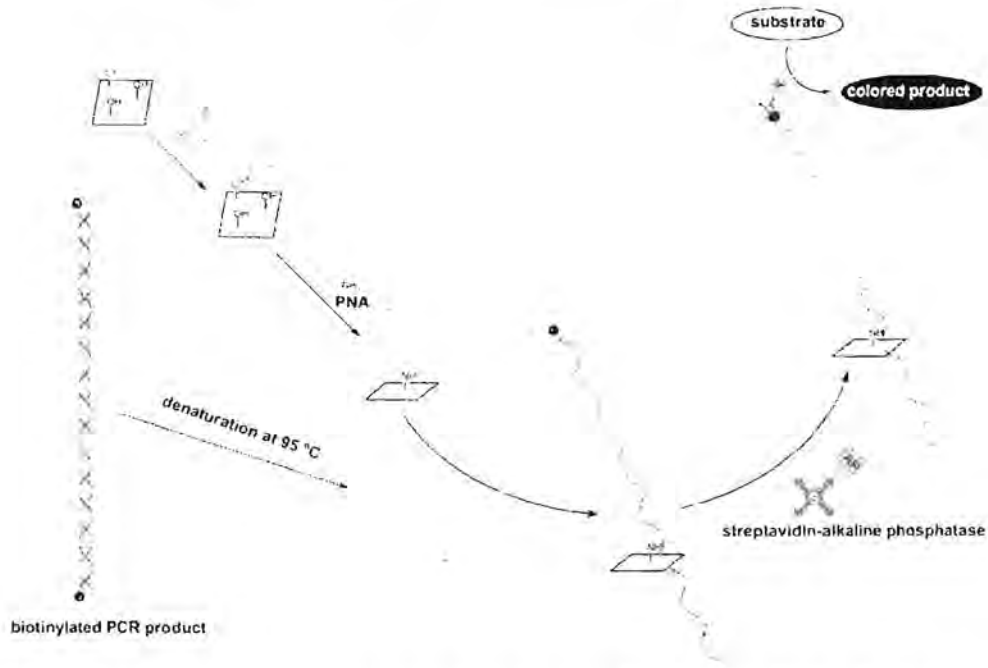
5. Paper-based device for DNA detection



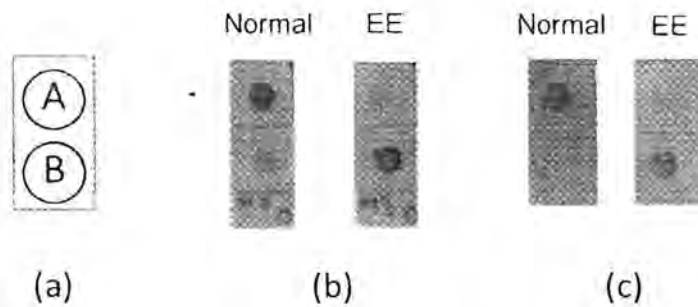
รูปที่ 19 หลักการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอที่ตรึงบนกระดาษเซลลูโลสร่วมกับการย้อมสีด้วย cationic dye ซึ่งจะเลือกจับเฉพาะบริเวณที่มีดีเอ็นเออยู่

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นพัฒนากระบวนการตรึงพีเอ็นเอบน solid support ที่เป็นกระดาษเซลลูโลสเพื่อนำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้งานได้ง่าย โดยในเบื้องต้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบน โดยผ่านกระบวนการเชื่อมขวางด้วย divinyl sulfone (DVS) หรือโดยผ่านกระบวนการ reductive amination ของ lysine-modified PNA กับกระดาษเซลลูโลสที่ผ่านกระบวนการออกซิไดส์ให้เป็นแอลดีไฮด์ และตรวจวัดการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง (Fluorescein) และดีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลากร่วมกับการย้อมด้วยสี Azure A ซึ่งมีประจุบวก และจะติดเฉพาะกับส่วนของดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเท่านั้น (รูปที่ 19) แต่พบปัญหาคือความไวของการตรวจวัดที่ยังไม่สูงนัก คืออยู่ที่ 40 ng ซึ่งเทียบเท่ากับ 3 pmol ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีความยาว 40nt แม้จะได้ตีพิมพ์ผลงานไปแล้วในลักษณะของ proof-of-concept paper¹⁵ (เป็นผลงานวิจัยร่วมกับโครงการ "การตรึงพีโรลิดีนาลเพปไทด์นิวคลีอิกออกซิเจนบนกระดาษเพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอ" ของ ดร.ธนัชรุ ปราณินรารัตน์ สัญญาเลขที่ DBG5580007) ซึ่งให้ specificity ที่เป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือสามารถบอกความแตกต่างของ mismatch แต่ sensitivity ยังไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้งานกับตัวอย่างดีเอ็นเอจริง

ต่อมาจึงได้พัฒนาระบบตรวจวัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ และการนำไปใช้กับตัวอย่างจริง ซึ่งเป็นงานวิจัยร่วมกับกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุทัศน์ ฟูเจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์ โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อพัฒนาระบบ reversed dot blot สำหรับการตรวจวัดรูปแบบของโรค thalassemia ชนิดต่างๆ จากดีเอ็นเอ โดยตัวอุปกรณ์ตรวจวัดยังคงสร้างขึ้นจากการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษเซลลูโลสเช่นเดิม แต่เปลี่ยนวิธีการตรวจวัดเป็นการใช้ biotinylated DNA target ร่วมกับปฏิกิริยาการสร้างสีด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่เชื่อมต่อกับ streptavidin ดังแสดงในรูปที่ 20 ซึ่งเป็นวิธีการที่กลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุทัศน์ ได้พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้แล้วโดยอาศัยดีเอ็นเอโพรบ¹⁶ แต่ระบบดังกล่าวมีข้อจำกัดที่สำคัญคือการควบคุมอุณหภูมิที่ต้องจำเพาะมาก มิฉะนั้นจะไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง single mismatched DNA targets ได้ การใช้พีเอ็นเอโพรบซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของ single mismatch ได้ดีกว่าน่าจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้



รูปที่ 20 หลักการทำงานของ paper-based device for DNA detection โดยการใช้การขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์

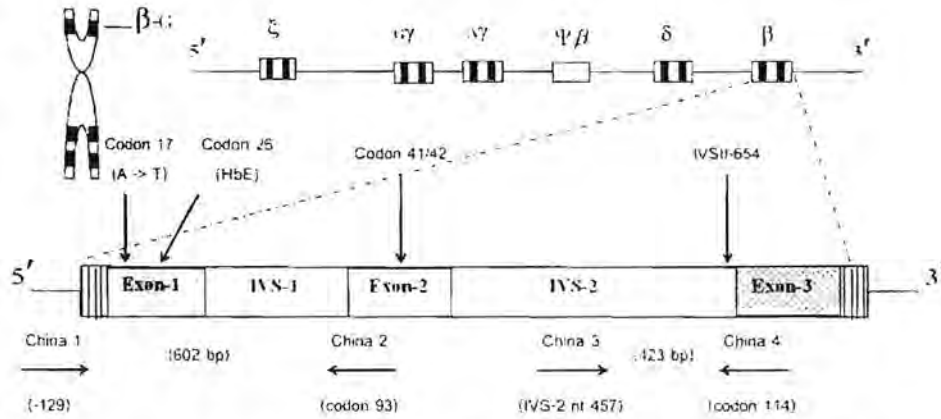


PNA probe A: R06 normal AcLys-GCCTCACCACCA-NH₂
 B: R06 mutant AcLys-GCCTTACCACCA-NH₂

รูปที่ 21 การจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอปกติ (normal) กับ HbE (EE) โดยใช้ paper-based device ที่พัฒนาขึ้น a) device layout b) detection of synthetic oligonucleotides c) detection of 279bp PCR products โดยทำที่อุณหภูมิห้อง

งานที่ได้ทำในเบื้องต้นเพื่อพิสูจน์หลักการคือการตรึงพีเอ็นเอโพรบสองชนิดสำหรับแยกแยะดีเอ็นเอ HbE (G->A mutation) ที่ตำแหน่ง codon 26) จากดีเอ็นเอปกติบนกระดาษเซลลูโลสผ่าน DVS จากนั้นจึงนำไปไฮบริดซ์กับ biotinylated oligodeoxynucleotide target และทำปฏิกิริยาสร้างสีด้วย ALP-streptavidin ซึ่งจะพบจุดสีในตำแหน่งที่คาดไว้จริง แต่พบปัญหาเกี่ยวกับตัวอย่างดีเอ็นเอจริงที่ได้จากกระบวนการ PCR กล่าวคือจะได้สภาพไวที่ไม่ดีนักเมื่อเทียบกับเมื่อใช้ดีเอ็นเอเป็นโพรบ และยังแยลงเมื่อตัวอย่างมีความยาวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเปลี่ยนชนิดของพีเอ็นเอโพรบจาก acpcPNA เป็น epi-acpcPNA ซึ่งแสดงความสามารถในการจับยึดกับ DNA ที่เป็น GC rich sequence ได้ดีกว่า พบว่าให้ผลที่ดีขึ้น กล่าวคือสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR ที่ความยาว 279 คู่เบสได้ โดยสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอปกติกับ HbE ได้อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไม่สามารถทำได้โดยดีเอ็นเอโพรบปกติ ดังแสดงในรูปที่ 21

จากผลเบื้องต้นนี้ได้ขยายขอบเขตของงานต่อไปโดยการสังเคราะห์และตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ออกแบบมาสำหรับการตรวจวัดการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ อีก 3 ตำแหน่ง (รูปที่ 22) บนอุปกรณ์ตรวจวัดขึ้นเดียวกันเพื่อการตรวจสอบรูปแบบของโรคธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ได้ในครั้งเดียว โดยได้ตรึงโพรบทั้งหมด 4 คู่



รูปที่ 22 บริเวณของ β -gene ที่สนใจจะศึกษา mutation ซึ่งประกอบด้วยสองส่วน (602bp และ 423bp)

อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธีเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 23) พบว่าการใช้โพรบทั้งสองคู่ร่วมกันยังไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอได้ไม่เป็นที่น่าพอใจนัก การทดลองที่จะทำต่อไปคือการปรับภาวะของการไฮบริไดซ์และการทำให้เกิดสัญญาณเพิ่มเติมเพื่อให้แยกแยะความแตกต่างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากนั้นจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงเทียบกับวิธีมาตรฐานต่อไป โดยงานในส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างการพัฒนาเพื่อต่อยอดงานวิจัยนี้ให้ออกไปสู่เป็นผลิตภัณฑ์ตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียที่ใช้งานได้จริงต่อไป โดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยเพิ่มเติมจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ (CEMB) ปีงบประมาณ 2560

	4bp	E	17	654
N	●	●	●	●
M				

expected result

(A)

obtained result

	4bp	E	17	654
N			●	●
M				

expected result

(B)

obtained result

รูปที่ 23 การจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอปกติและที่มีมิวเตชันที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียโดยใช้ paper-based device ที่พัฒนาขึ้น A) ตัวอย่างดีเอ็นเอชนิด normal/normal B) ตัวอย่างดีเอ็นเอชนิด $\beta E/\beta 4bp$ หมายเหตุ: เนื่องจากบริเวณที่จะศึกษาอยู่คนละช่วงกัน จึงต้องมีการแยกทำ PCR เป็นสองส่วน (600+400bps)

6. DNA detection using nanomaterials and PNA probes

งานวิจัยภายใต้หัวข้อนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้วัสดุนาโนร่วมกับพีเอ็นเอโพรบ ซึ่งทั้งหมดจะอาศัยหลักการเดียวกันคือการเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่แตกต่างกันระหว่างวัสดุนาโนที่มีประจุลบกับพีเอ็นเอที่มีประจุบวก และกับพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดซึ่งมีประจุลบ ซึ่งเป็นการใช้สมบัติที่โดดเด่นของพีเอ็นเอที่ไม่สามารถทำได้อีกกับดีเอ็นเอหรือโพลิเมอร์คลีโอไทด์โพรบอื่นๆซึ่งมีประจุลบ โดยจะแยกอภิปรายตามชนิดของวัสดุนาโนที่ใช้

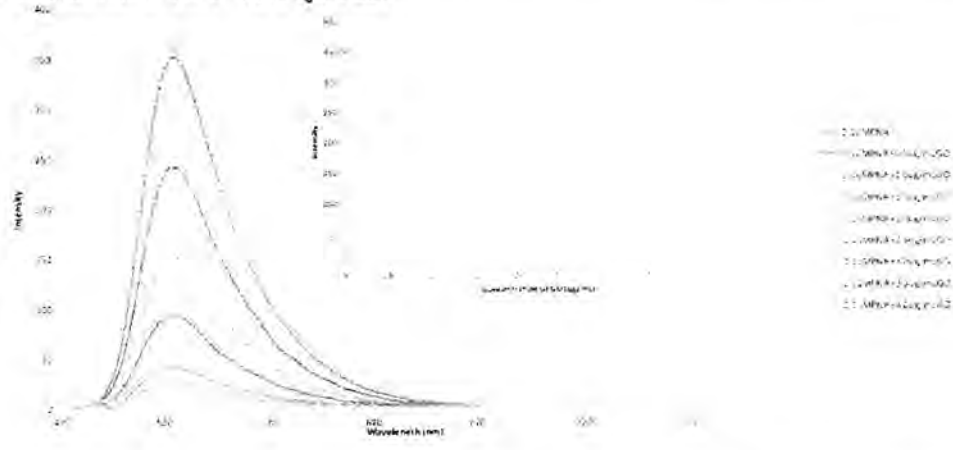
a) Graphene oxide (GO)

กราฟีนออกไซด์ (GO) เป็นวัสดุนาโนที่ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย สามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และมีสมบัติโดดเด่นหลายประการ เช่น ความสามารถในการดูดซับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ดีกว่าดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันเป็น duplex มาก นอกจากนี้ GO ยังแสดงสมบัติเป็นตัวควอนเซอร์ที่ดี ทำให้ดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงเมื่อถูกดูดซับบน GO จะมีการเรืองแสงที่ลดลง แต่เมื่อเติมดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมลงไปจะทำให้เกิด DNA duplex ซึ่งถูกดูดซับโดย GO ได้น้อยลง ดังนั้นการเรืองแสงก็จะเพิ่มมากขึ้น หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอ¹⁷ หรือพีเอ็นเอชนิดดั้งเดิม (aegPNA)¹⁸ ที่ติดฉลากเรืองแสงเป็นโพรบ อย่างไรก็ตามยังพบข้อจำกัดอยู่ในงานวิจัยนี้จะใช้ GO ร่วมกับ acpcPNA ที่ติดฉลากเรืองแสงเพื่อเป็นโพรบแทน DNA โดยคาดว่าจะให้ความจำเพาะเจาะจงที่ดีขึ้น โดยมีหลักการทำงานดังรูปที่ 24

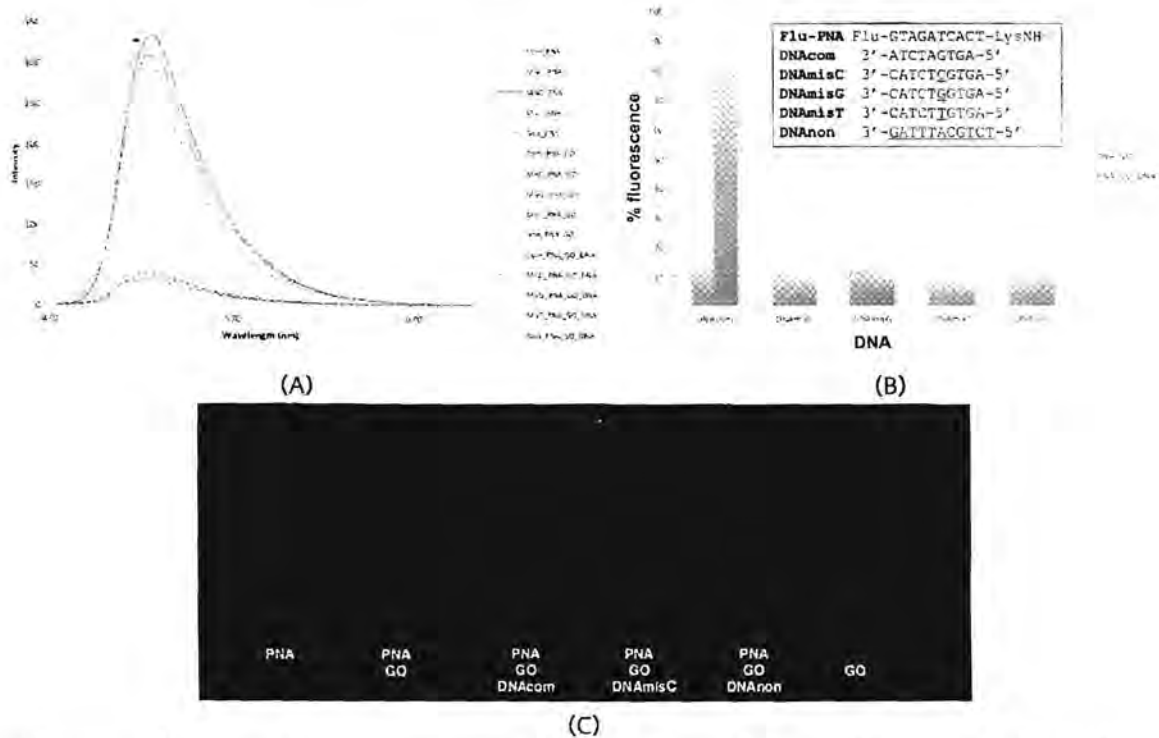


รูปที่ 24 หลักการทำงานของ GO-PNA DNA sensor ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

ในเบื้องต้นได้ทดลองเพื่อพิสูจน์หลักการโดยการไทเทรตสารละลายของพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง FAM-PNA (ดูลำดับเบสในรูปที่ 26B) ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ด้วย GO (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. สกฤษ สุข อุนอรุโณทัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และติดตามการเรืองแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการเรืองแสงของ FAM-PNA จะลดลงตามปริมาณของ GO ที่เติมเข้าไป เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานมาก่อนในกรณีของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากเรืองแสง โดยการเรืองแสงที่ลดลงจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของ GO ประมาณ 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยคิดเทียบเป็นการเรืองแสงที่ลดลงถึงกว่า 90% (รูปที่ 25)

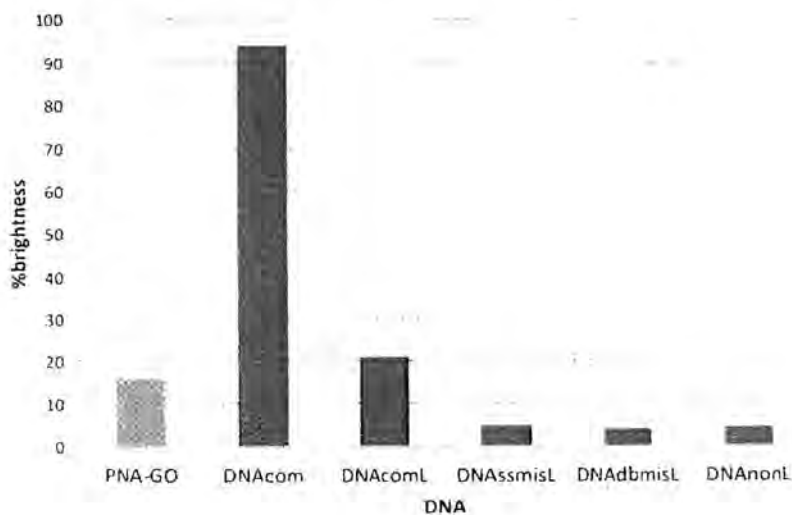


รูปที่ 25 การเรืองแสงของ FAM-PNA (ดูลำดับเบสในรูปที่ 8B) ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ด้วย GO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ใน 10 mM Tris-HCl pH 7.4, λ_{exc} 460 nm



รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ FAM-PNA เมื่อมี GO และ DNA ชนิดต่างๆ อยู่ด้วย (ดูลำดับเบสในรูปที่ 8B) รูป (A) และ (B) ทำที่ [PNA] = 0.1 μ M, [DNA] = 0.12 μ M; [GO] = 1.25 μ g/mL ใน 10 mM Tris-HCl pH 7.4, λ_{exc} 460 nm รูป (C) ทำที่ [PNA] = 20 μ M, [DNA] = 24 μ M; [GO] = 150 μ g/mL ใน 10- mM HEPES buffer pH 7.4, containing 25 mM NaCl, photographed under black light

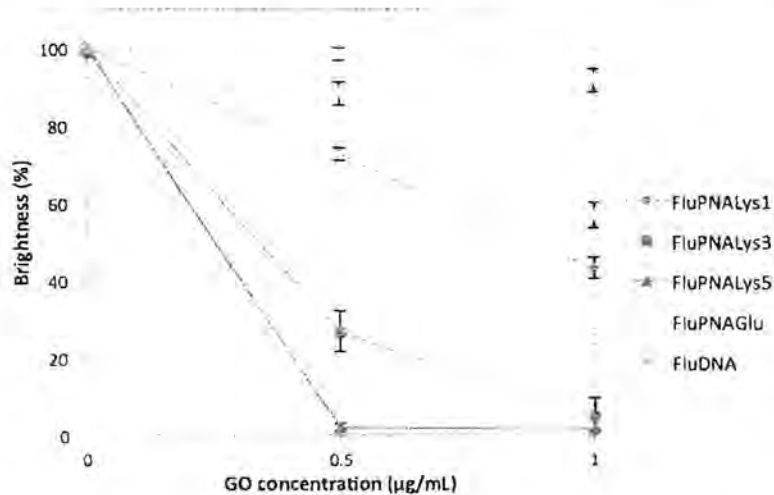
การทดลองต่อมาเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ PNA-GO เมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย โดยเปรียบเทียบทั้งดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (DNAcom) และเมื่อมีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (DNAmisC, DNAmisG และ DNAmisT) ผลที่ได้คือเฉพาะในกรณีที่มีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมเท่านั้นที่การเรืองแสงกลับเพิ่มขึ้นไปจนเกือบเท่ากับเมื่อก่อนเติม GO ส่วนในกรณีอื่นการเรืองแสงจะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก (รูปที่ 26A และ 26B) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ภายใต้แสงยูวีถ้าความเข้มข้นสูงพอ (รูปที่ 26C) โดยที่ kinetics ของการเกิดปฏิกิริยาเกิดอย่างรวดเร็ว ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของ acpcPNA ในการนำไปใช้ร่วมกับ GO เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเออย่างรวดเร็วและให้ความแม่นยำสูง



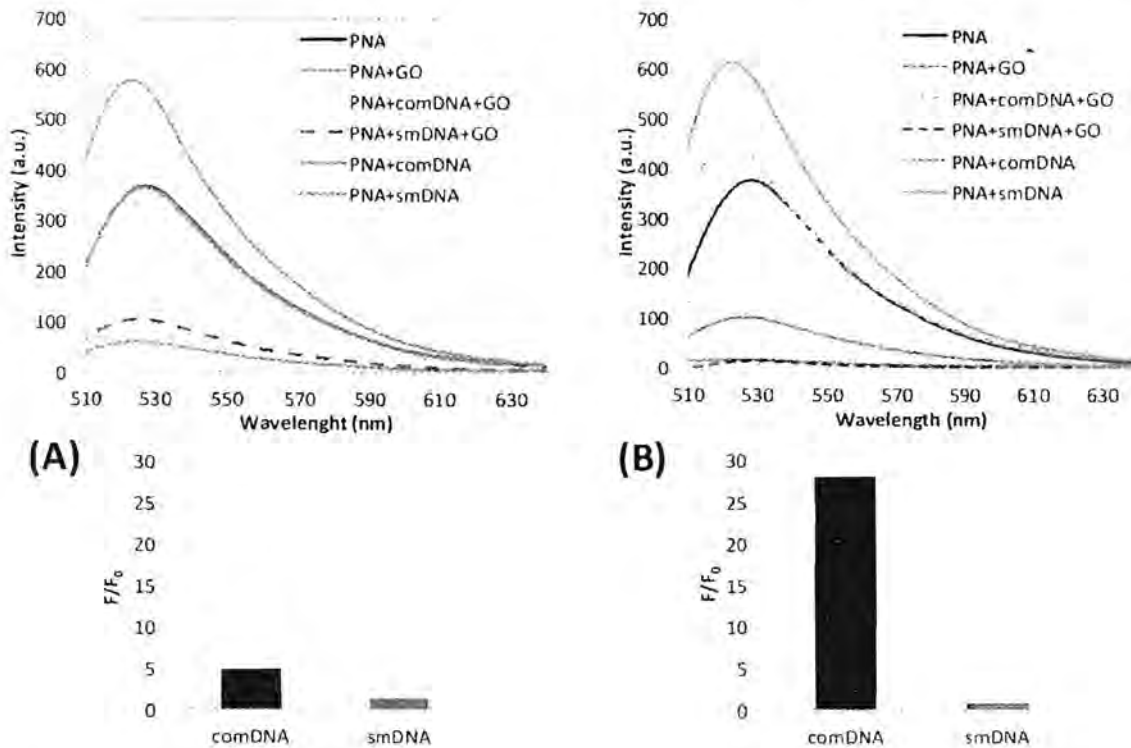
รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ PNA1+GO ก่อน และหลังการเติม DNA ชนิดต่างๆ ภาวะของการทดลองคือ [PNA] = 0.1 μ M, [DNA] = 0.12 μ M, [GO] = 1.5 μ g/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, λ_{ex} 460 nm ลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่เกี่ยวข้องเป็นดังนี้: PNA1: FAM-GTAGTCACT-LysNH₂; DNACom: 3'-CATCTAGTGACA-5'; DNAComL: 3'-GGTCCCGTACCATCTAGTGACATGCGGCGC-5'; DNAAssmL: 3'-GGTCCCGTACCATCTTGTGACATGCGGCGC-5'; DNAdbmL: 3'-GGTCCCGTACCATCGCGTGACATGCGGCGC-5'; DNAonL: 3'-GCGCCGCATGTCACTAGTGGTACGGGACC-5'

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการตรวจวัดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสยาวขึ้น (30 เบส) และการศึกษาการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น dsDNA ซึ่งจะสอดคล้องกับสถานการณ์ของการนำไปประยุกต์ใช้จริงมากกว่า ปัญหาที่พบเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ยาวขึ้นคือการเรืองแสงของ Fluorescein-labeled PNA probe ไม่กลับคืนสู่จุดเดิมเมื่อเติมดีเอ็นเอคู่สมลงไป แต่ยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงอยู่ (รูปที่ 27) คาดว่าเกิดจากการ quench ของฉลาก Fluorescein โดยนิวคลีโอเบสของ DNA คู่สม ส่วนที่เป็น extra hanging nucleotides ทางปลายด้าน 3' ที่จะอยู่ในระยะที่สามารถเกิด interaction กับ Fluorescein ที่อยู่ตรงปลายด้าน N ของพีเอ็นเอโพรบ แนวทางในการแก้ปัญหาคือการใช้ฉลากชนิดอื่นที่ไม่เปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อเกิดการเข้าคู่ระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดจากการที่ดีเอ็นเอส่วนที่เป็น overhang สายเดี่ยวสามารถถูกดูดซับบน GO ได้บ้าง

สิ่งที่ได้ค้นพบเพิ่มเติมต่อมาคืออิทธิพลของประจุบวกบนสายพีเอ็นเอ โดยได้พบว่าพีเอ็นเอโพรบที่มีประจุบวกเพิ่มขึ้น (FAM-PNA-Lys5) จะถูกระงับแสงโดย GO ได้ดีกว่าพีเอ็นเอโพรบปกติ (FAM-PNA-Lys1) โดยพบว่าใช้ GO เพียง 0.5 μ g/mL ก็ทำให้เกิดการ quench ของสัญญาณของ FAM-PNA-Lys5 อย่างสมบูรณ์เมื่อเทียบกับ FAM-PNA-Lys1 ซึ่งถูก quench ไปเพียง 60% ในทำนองเดียวกันพีเอ็นเอที่มีประจุเป็นลบ (FAM-PNA-Glu) และดีเอ็นเอโพรบ (FAM-DNA) จะถูก quench ได้น้อยกว่าพีเอ็นเอโพรบปกติ (FAM-PNA-Lys1) ดังแสดงในรูปที่ 28 ซึ่งสอดคล้องกับกลไกของการระงับแสงที่คาดว่าจะถูกควบคุมโดยแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิตร่วมกับอันตรกิริยาระหว่างนิวคลีโอเบสและพื้นผิวของ GO เป็นหลัก นอกจากนี้การแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับที่ผิดไปหนึ่งตำแหน่งโดย FAM-PNA-Lys5 probe จะดีกว่า FAM-PNA-Lys1 probe มาก ดังแสดงในรูปที่ 29 และยังมี detection limit ที่ต่ำลงกว่า 40 เท่า กล่าวคือ 0.11 \pm 0.3 nM ซึ่งถือว่าเป็นการพัฒนาที่สำคัญ และเป็นสิ่งที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อนในบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ PNA-GO ทั้งหมดที่ผ่านมา^{17,18}



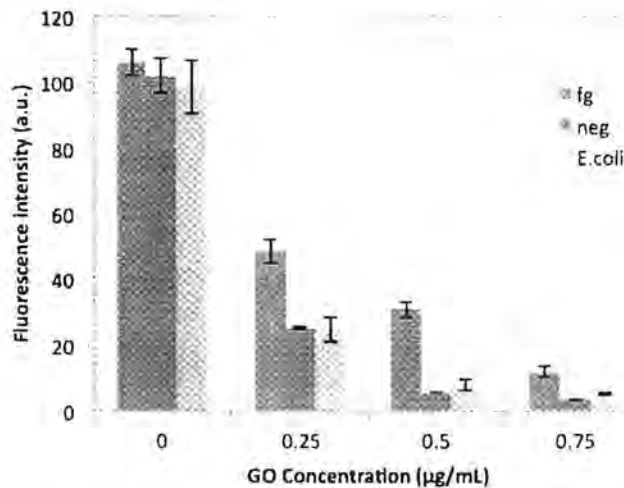
รูปที่ 28 กราฟแสดงการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอ FAM-PNA-Lys, FAM-PNA-Lys3, FAM-PNA-Lys5, FAM-PNA-Glu ซึ่งมีลำดับเบสเดียวกันคือ GTAGTCACT และ FAM-DNA โดย GO ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน; [PNA] = 0.1 μ M ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4



รูปที่ 29 เปรียบเทียบการแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (comDNA: 5'-AGTGATCTAC-3') กับที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (misDNA: 5'-AGTGCTCTAC-3') โดย FAM-PNA-Lys1 (A) และ FAM-PNA-Lys5 (B) ที่มีลำดับเบสเป็น GTAGATCACT ที่ความเข้มข้นของ GO = 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FAM-PNA-Lys1) หรือ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FAM-PNA-Lys5); [PNA] = 0.1 μM ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

การทดลองที่ได้ทำต่อมาคือการหา detection limit จาก $3SD(\text{blank})/\text{slope}$ ของ calibration curve ซึ่งพบว่า ขึ้นกับปริมาณของ GO ที่ใส่เข้าไป สำหรับ FAM-PNA-Lys1 การใช้ปริมาณ GO ที่ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จะให้ตัวเลขที่ดีที่สุดคือ 0.70 ± 0.02 nM ขณะที่ FAM-PNA-Lys5 นั้นใช้ปริมาณ GO เพียง 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และได้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำลงถึง 0.073 ± 0.009 nM

สำหรับการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ FAM-PNA-Lys5 probe ที่มีลำดับเบสเป็น GCTTTTACA ร่วมกับ GO เพื่อทดสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างจริงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของสัญญาณหลังจากเติม GO ระหว่างดีเอ็นเอคู่สม (fg) กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสม (neg และ *E. coli*) พบว่าการเรืองแสงของโพรบถูกระงับเกือบสมบูรณ์เมื่อใช้ปริมาณ GO เพียง 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และแม้ว่าการเรืองแสงจะให้สัญญาณที่ต่ำ แต่ก็เพียงพอต่อการแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสมดังรูปที่ 10 ซึ่งจากผลข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่าเราสามารถบ่งชี้ลำดับเบสของดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงได้ในระบบตรวจวัดที่ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังคาดว่าน่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดโดยการปรับภาวะเช่น ความเข้มข้นของเกลือ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือการเพิ่มอุณหภูมิ



รูปที่ 30 เปรียบเทียบความแตกต่างของการเรืองแสงของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (fg) กับที่มีลำดับเบสผสม (neg และ E. Coli) ใช้พีเอ็นเอโพรบมีลำดับเบสเป็น GCTTTTTTACA ที่ความเข้มข้นของ GO = 0.5 µg/mL; [PNA] = 0.1 µM ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้เบื้องต้นในการตรวจสอบลำดับเบสของ double stranded DNA target โดยตรง ซึ่งพบว่าจำเป็นต้องใช้พีเอ็นเอโพรบสองสาย ที่ออกแบบให้จับกับดีเอ็นเอในบริเวณเดียวกันแต่เป็นคนละสายตาม หลักการของ DNA double duplex invasion และพีเอ็นเอทั้งสองสายจะต้องมี lysine หลายๆ หน่วยเพื่อเพิ่มความแข็งแรง ในการจับยึดกับดีเอ็นเอ จึงจะทำให้สามารถสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นสายคู่ได้โดยตรง ซึ่งจะเห็นได้จากหลังเติม GO ไปแล้วจะยังเหลือค่า residual fluorescence ที่สูงถึง 79% ซึ่งใกล้เคียงกับกรณีของการตรวจวัด DNA สายเดี่ยวที่มีค่า % residual fluorescence 93% โดยตัวเลขนี้นิยามว่าเป็น (Fluorescence after adding GO/Fluorescence before adding GO) × 100 โดยค่าที่มากแสดงถึงว่ามี PNA probe อยู่ในสารละลายมาก (100% = complete restoration) ส่วนตัวเลขที่น้อยในกรณีของ unrelated DNA duplex และเมื่อมี PNA probe เพียงตัวเดียว แสดงว่า PNA probe ไม่ได้จับอยู่กับดีเอ็นเอ จึงถูกดูดซับโดย GO มาก (ตารางที่ 3) แต่ยังไม่พบปัญหาคือ การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงยังไม่ชัดเจนเท่ากับ กรณีของการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นสายเดี่ยวซึ่งอาจเกิดจากการเกิด invasion ที่ยังไม่สมบูรณ์ จึงยังต้องมีการพัฒนาต่อไป

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ก่อนและหลังเติม GO (แสดงในรูปของ residual fluorescence - นิยามใน footnote)

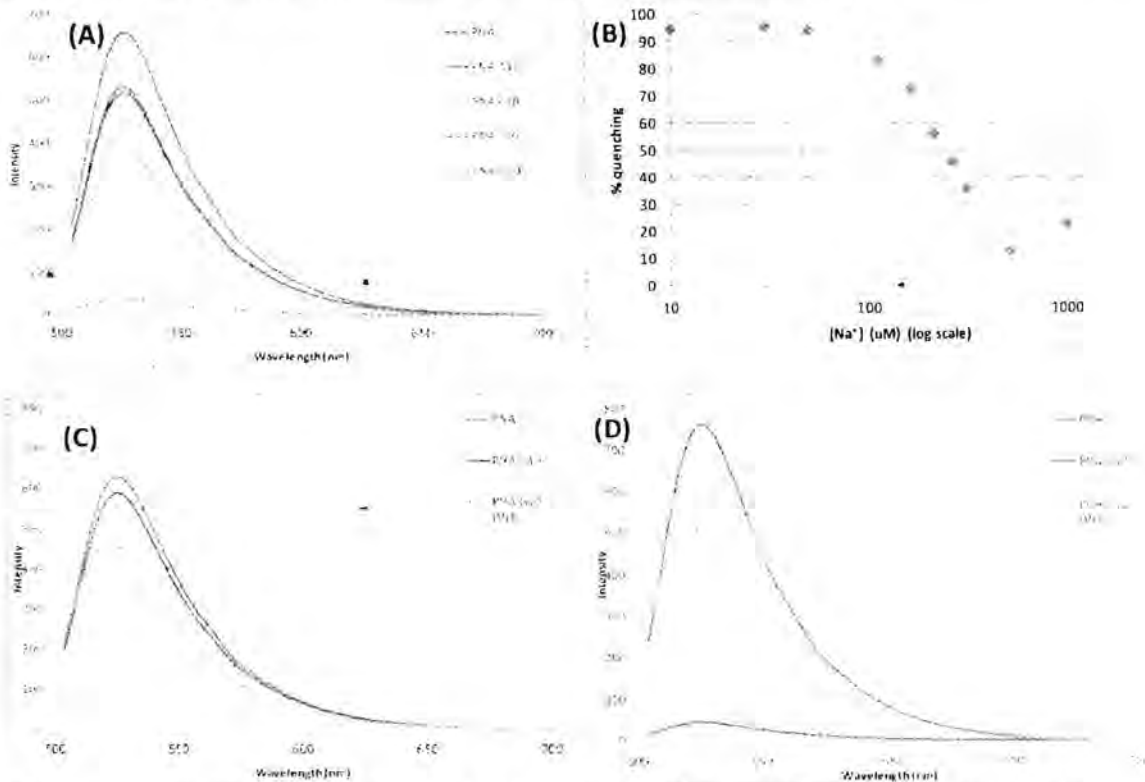
System ^a	Residual fluorescence (%) ^b	Remarks
PNA1+DNA1	93	complementary ssDNA
PNA1+(DNA1+DNA2)	10	complementary dsDNA, one PNA probe
PNA1+(DNA1+DNA2)+PNA2	79	complementary dsDNA, two PNA probes
PNA1+(DNA3+DNA4)+PNA2	11	unrelated dsDNA, two PNA probes

^aPNA1: FAM-GTAGATCACT-(Lys)₅NH₂; PNA2: Ac-AGTGATCTAC-(Lys)₅NH₂; DNA1: 3'-GGTCCCCTACCATCTAGTGA CATGCGGCCG-5'; DNA2: 5'-CCAGGGCATGGTATGATCAGTGTACGCCGCG-3'; DNA3: 3'-GGATGTTCCGGGCTGACAA CCGCGGCCCG-5'; DNA4: 5'-CCTACAAGCGCCGACTGTTGGCGCCGGGC-3'; conditions: [PNA] = 1 µM; [DNA] = 1.2 µM; [GO] = 5 µg/mL in 10 mM Tris-HCl pH 7.4

^b(Fluorescence after adding GO/Fluorescence before adding GO) × 100; 100% = complete restoration of fluorescence

b) Oligodeoxyguanosine

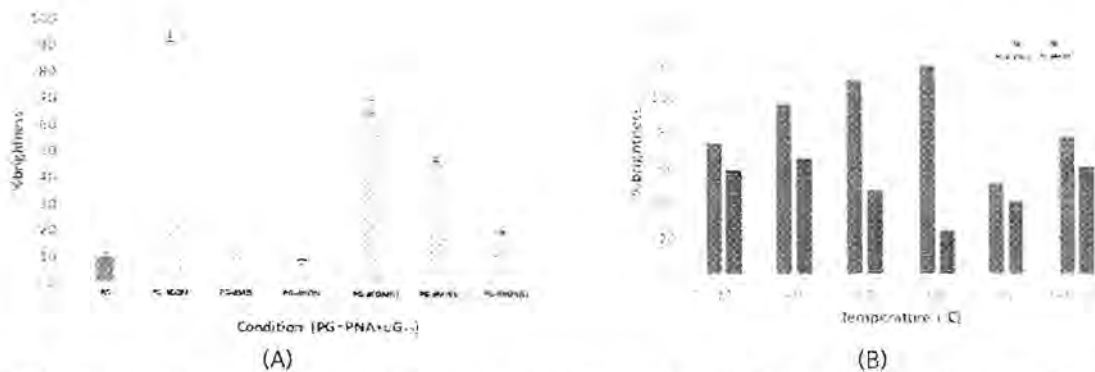
ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเรืองแสงของ FAM-PNA-Lys1 และ FAM-PNA-Lys5 มีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอที่เข้ามาคู่กัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อดีเอ็นเอมี extra hanging bases ที่ปลายด้าน 3' (ซึ่งจะอยู่ใกล้กับฉลาก FAM) ซึ่งคาดว่าเกิดจาก อันตรกิริยาระหว่างนิวคลีโอเบสกับฟลูออเรสซิน ซึ่งเป็นสิ่งที่ทราบกันดีอยู่แล้ว แต่ในบางกรณี แม้ว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอจะไม่เกี่ยวข้องกันเลยก็ยังมี การเกิดการระงับแสงของฉลากฟลูออเรสซินที่ติดอยู่กับพีเอ็นเอได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ FAM-PNA-Lys5 ซึ่งมีความหนาแน่นของประจุบวกมาก จึงนำไปสู่สมมติฐานว่าการระงับแสงนี้เกิดจากอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งส่งผลให้ฉลากเรืองแสงและนิวคลีโอเบสมาอยู่ใกล้กัน โดยเริ่มต้นจากการศึกษาผลของลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์กับการระงับการเรืองแสงของ FAM-PNA-Lys5 ซึ่งพบว่า oligo(dG) มีความสามารถในการระงับแสงได้ถึงกว่า 95% เมื่อเติมลงไปในส่วนโมลที่เท่ากับ FAM-PNA-Lys5 เปรียบเทียบกับ oligo(dC) ซึ่งระงับแสงได้ไม่มากนัก (ไม่ถึง 50%) และ oligo(dA) และ oligo(dT) ซึ่งแสดงการระงับแสงที่น้อยมาก (รูปที่ 6A) โดยที่การเกิดการระงับแสงนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ (รูปที่ 31B) กล่าวคือถ้าความเข้มข้นของเกลือสูงกว่า 50 mM ประสิทธิภาพในการระงับแสงจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ และความยาวของ oligo(dG) ที่มีผลต่อการระงับแสง กล่าวคือสายยาวจะมีประสิทธิภาพในการระงับแสงได้ดีกว่าสายสั้น และ dG เผลยๆ ไม่แสดงการระงับแสงของ FAM-PNA-Lys5 แม้จะใช้ที่ความเข้มข้นสูง



รูปที่ 31 (A) แสดงผลของ oligonucleotide (dN)₁₀ (N = A, T, C, G) ที่มีต่อการระงับแสงของ FAM-PNA-Lys5 (B) ผลของความเข้มข้นของ NaCl ที่มีต่อการระงับแสง (C) และ (D) การระงับและการคืนสัญญาณของ FAM-PNA-Lys (C) และ FAM-PNA-Lys5 (D) เมื่อเติม (dG)₁₀ และตามด้วยดีเอ็นเอคู่สม ตามลำดับ; ลำดับเบสของ PNA คือ GTAGATCACT และดีเอ็นเอคือ 5'-AGTGATCTAC-3'; sodium phosphate buffer pH 7.0; รูป A, C, D ใช้ [PNA] = 0.10 μM, [DNA] = [(dG)₁₀] = 0.12 μM; รูป B ใช้ [PNA] = 1.0 μM, [(dG)₁₀] = 1.2 μM; λ_{excit} = 490 nm

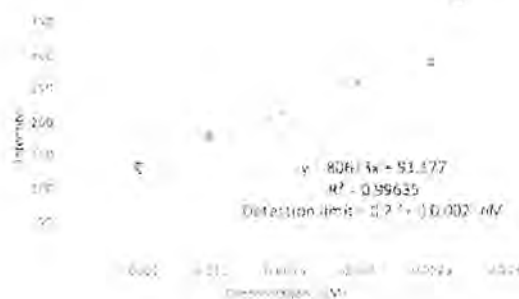
เมื่อเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมลงไปของผสมระหว่าง FAM-PNA-Lys5 กับ (dG)₁₀ พบว่าจะเกิดการคืนสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ขึ้น (รูปที่ 31D) ในขณะที่ FAM-PNA-Lys ไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนเติม DNA และ (dG)₁₀ (รูปที่ 6C) ผลการทดลองเบื้องต้นนี้น่าสนใจมาก และเสนอแนะว่าอาจใช้ oligo(dG)

เป็นตัวระงับแสงในลักษณะเดียวกับ graphene oxide หรือวัสดุอื่นๆ เพื่อใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง สำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ



รูปที่ 32 (A) แสดงผลของความเลือกจำเพาะของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีผลต่อการคืนสัญญาณของ FAM-PNA-Lys5 กับ oligonucleotide (dG)₁₀ (B) แสดงผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายสายยาว ลำดับเบสของ PNA คือ GTAGATCACT และลำดับเบสของดีเอ็นเอคือ dCOM: 5'-AGTGATCTAC-3'; dMIS: 5'-AGTGCTCTAC-3' (dMIS); dNON: 5'-TCTGAATTTAA-3'; dCOM(L): 5'-CGCGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG-3'; dMIS(L): 5'-CGCGCGTACAGTGTTCTACCATGCCCTGG-3'; dNON(L): 5'-CCAGGGCATGGTAGATCACTGTACGCCGCG-3'; sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 1.0 μ M, [(dG)₁₀] = 1.2 μ M; λ_{excit} = 490 nm

นอกจากนี้ได้นำการตรวจวัดชนิดนี้ไปตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย (รูปที่ 33) พบว่า ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเบสเท่ากับตัวตรวจวัด สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน โดยเมื่อเติมดีเอ็นเอคู่สมลงไปจะให้สว่างกลับคืนมาจากประมาณร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับความสว่างของพีเอ็นเอสายเดี่ยว ในทางกลับกันดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งเบสผิดไปหรือดีเอ็นเอลำดับเบสผสม ไม่สามารถคืนสัญญาณกลับคืนมาได้ แต่ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเบสมากกว่าตัวโพรบนั้นยังให้ผลการตรวจวัดที่ยังไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากเกิดการรบกวนของเบสที่เกินออกมา ในกรณีนี้สามารถแก้ไขได้ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้กับการตรวจวัด โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสามารถแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สมสายยาวออกจากดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งได้อย่างชัดเจน

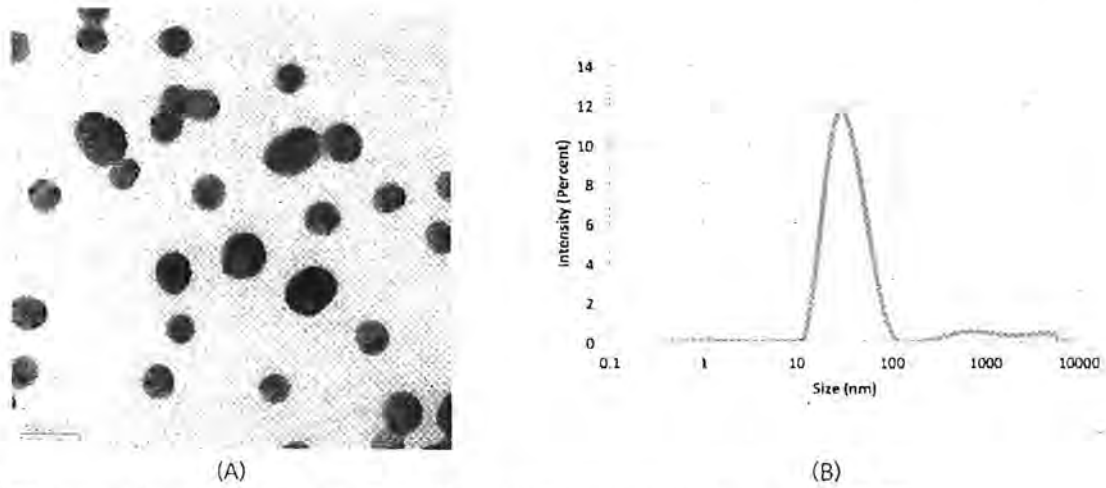


รูปที่ 34 แสดงขีดจำกัดของการตรวจวัดของ FAM-PNA-Lys5 กับ oligonucleotide (dG)₁₀ เพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอคู่ ลำดับเบสของ PNA คือ GTAGATCACT และดีเอ็นเอคือ 5'-AGTGATCTAC-3'; sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 0.05 μ M, [(dG)₁₀] = 0.5-2.5 nM; λ_{excit} = 490 nm

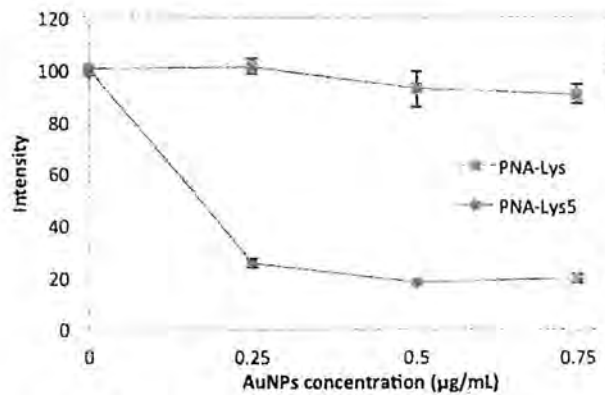
นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นความเข้มข้นของตัวโพรบเรืองแสง 0.05 μ M สามารถนำไปตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีความเข้มข้นต่ำได้ถึง 0.2 nM (รูปที่ 34) ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการศึกษาขอบเขตการใช้งาน/ข้อจำกัดของระบบใหม่นี้ รวมทั้งการศึกษากลไกของการระงับและการคืนสัญญาณของฉลากเรืองแสงต่อไป ซึ่งเมื่อเสร็จสมบูรณ์แล้วคาดว่าจะได้ผลงานตีพิมพ์อย่างน้อย 1 เรื่อง

c) Gold nanoparticles (AuNPs)

อนุภาคนาโนทองคำ (AuNPs) เป็นอีกหนึ่งวัสดุนาโนที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากวัสดุดังกล่าวมีคุณสมบัติเด่นพิเศษเฉพาะตัวในหลายๆด้านซึ่งขึ้นกับขนาดและรูปร่างของอนุภาค อีกทั้งยังสังเคราะห์ได้ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ในงานวิจัยเลือกวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำรูปทรงกลมด้วยวิธีของ Turkevich¹⁹ โดยใช้โซเดียมซิเตรตเป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรของอนุภาค สามารถยืนยันรูปร่างและขนาดของอนุภาคด้วย Transmission electron microscopy (TEM) ได้ขนาดโดยประมาณ 13 nm และ Dynamic light scattering (DLS) ได้ขนาดโดยประมาณ 28 nm (รูปที่ 35)



รูปที่ 35 อนุภาคนาโนทรงกลมของทองจาก TEM (A) และการกระจายขนาดของอนุภาคจาก DLS (B)

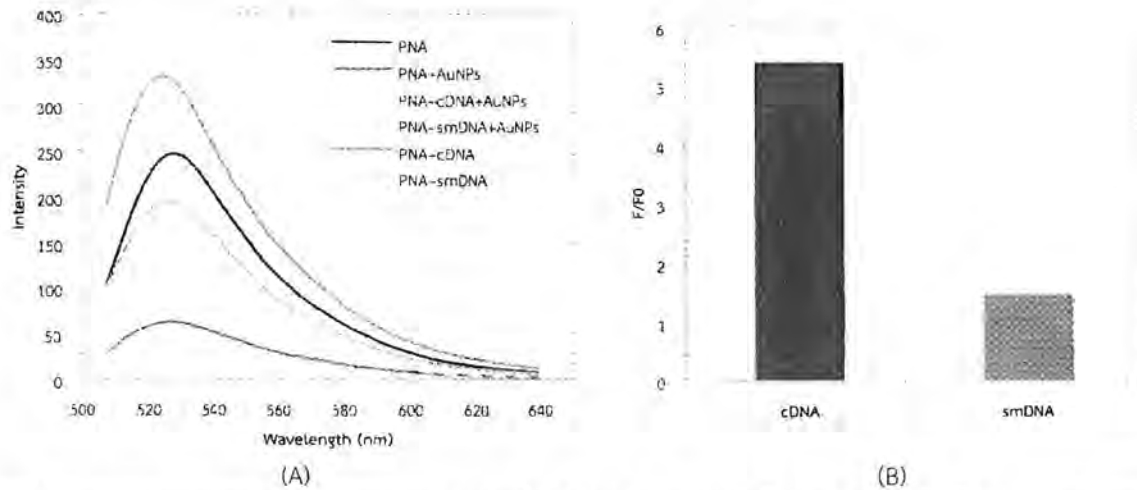


รูปที่ 36 การเรืองแสงของ FAM-PNA ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ด้วย AuNPs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-0.75 μg/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการประยุกต์ใช้วัสดุนาโนในงานเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ตรวจลำดับเบสของสารพันธุกรรมอย่างหลากหลาย ซึ่งคุณสมบัติพิเศษอย่างหนึ่งของอนุภาคนาโนทองคำที่สนใจนำมาศึกษาคือการดับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของโพรบ ทำให้ดีเอ็นเอโพรบติดฉลากเรืองแสงให้สัญญาณได้ลดลงและจะคืนกลับมาเมื่อเกิดการเข้าคู่กันระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายเช่นเดียวกับหลักการของ GO หลักการนี้มีผู้ศึกษามาแล้วพอสมควรในกรณีของดีเอ็นเอ แต่มีตัวอย่างค่อนข้างจำกัดในกรณีของพีเอ็นเอ เพื่อพิสูจน์หลักการดังกล่าว เบื้องต้นได้ทดลองไทเทรตเติมพีเอ็นเอโพรบลงไปบนอนุภาคนาโนทองคำที่ความเข้มข้นต่างๆ และติดตามสัญญาณการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดับสัญญาณระหว่างพีเอ็นเอที่มีประจุบวกต่างกัน ได้แก่ FAM-PNA-Lys1 กับ FAM-PNA-Lys5 ดังรูปที่ 36 พบว่าการเรืองแสงของโพรบจะลดลงเมื่อเติม AuNPs ลงไป โดยพีเอ็นเอ FAM-PNA-Lys5 ที่มีประจุบวก

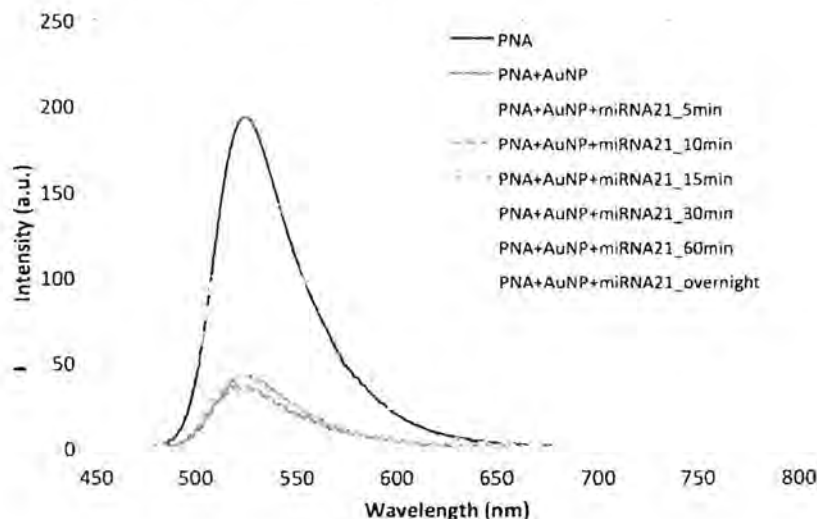
มากกว่าจะถูกดับสัญญาณได้ถึง 80% เมื่อใช้ AuNPs เพียง 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าบนผิวของ AuNPs ที่มีขั้วตรงต่ออันประจุลบกับประจุบวกบนพีเอ็นเอโพรบ

การทดลองต่อมาเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของโพรบเมื่อเติมดีเอ็นเอลงไป โดยเปรียบเทียบกับระหว่างดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (smDNA) ผลที่ได้คือเฉพาะกรณีที่เติมดีเอ็นเอคู่สมเท่านั้นที่จะสามารถทำให้การเรืองแสงของโพรบคืนกลับมา ขณะที่ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งจะให้การคืนสัญญาณที่น้อยกว่ามากภายในระยะเวลาอันสั้นดังรูปที่ 37 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ acpcPNA ที่ทำงานร่วมกับ AuNPs ได้อย่างรวดเร็วและมีความเลือกจำเพาะสูง



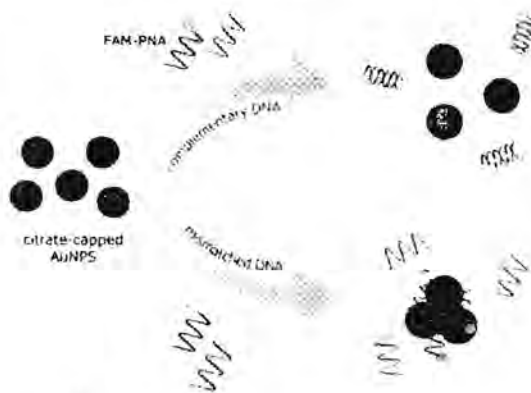
รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ FAM-PNA เมื่อมี AuNPs และ DNA ชนิดต่างๆ อยู่ด้วย โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส GTAGATCACT ที่ [PNA] = 0.1 μM , [AuNPs] = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ acpcPNA probe กับ AuNPs ในการทดสอบสารพันธุกรรมชนิดอื่นเพื่อขยายขีดจำกัดในการตรวจวัด โดยได้ทำการทดลองเติมอาร์เอ็นเอสายสั้น (microRNA21) ซึ่งเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพที่มีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็ง จากนั้นวัดการคืนสัญญาณการเรืองแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ สำหรับ FAM-PNA-Lys5 probe ที่ใช้มีลำดับเบส AGTCTGATAAGC พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ค่อยๆคืนกลับมาหลังจากเติมอาร์เอ็นเอลงไป แต่ปัญหาที่พบคืออัตราในการคืนสัญญาณช้ากว่าการเติมดีเอ็นเอมาก แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าวพอชี้ให้เห็นถึงการตอบสนองของการเรืองแสงของ PNA-AuNPs ต่ออาร์เอ็นเอดังรูปที่ 38 ซึ่งก็พอจะเป็นแนวทางในการพัฒนาประสิทธิภาพการตรวจวัดอาร์เอ็นเอในอนาคตโดยการเพิ่มอุณหภูมิหรือเติม additive ต่างๆ เช่น กลีโคโนเซียมคลอไรด์ หรือ Bovine serum albumin (BSA) เป็นต้น



รูปที่ 38 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ FAM-PNA เมื่อมี AuNPs และ microRNA21 อยู่ด้วย โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส AGTCTGATAAGC ที่ [PNA] = 0.1 μ M, [AuNPs] = 0.5 μ g/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4; miRNA21 = 5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'

อีกหนึ่งการทดลองคือการศึกษากการเปลี่ยนสีของ AuNPs ซึ่งอย่างที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าวัสดุนาโนนั้นมีคุณสมบัติพิเศษที่ต่างไปจากวัสดุชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ เป็นผลจากอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวและปริมาตรสูงขึ้น ทำให้วัสดุนาโนสามารถแสดงคุณสมบัติ Surface plasmon resonance (SPR) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของอนุภาค กล่าวคือเมื่อ AuNPs มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น จะสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างไปจากเดิม ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเฉพาะ ssPNA สามารถเหนี่ยวนำให้ AuNPs เกิดการจับตัวกัน (aggregation) ขณะที่ DNA-DNA, PNA-DNA duplex หรือ ssDNA ไม่มีผลต่อการจับตัวกันของ AuNPs²⁰ หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาพัฒนาร่วมกับ acpcPNA โดยคาดว่า จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดได้ดียิ่งขึ้นโดยมีหลักการดังรูปที่ 39



รูปที่ 39 หลักการทำงานของ PNA-AuNPs ในการตรวจดีเอ็นเอแบบ dual mode (fluorescence & aggregation)

เพื่อเป็นการพิสูจน์หลักการดังกล่าว เบื้องต้นได้ศึกษาผลของ PNA probe ต่อการจับตัวของ AuNPs โดยใช้พีเอ็นเอ ที่มีประจุบวกต่างกัน คือ FAM-PNA-Lys1 และ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบสเดียวกันคือ GTAGATCACT พบว่า ปริมาณเพียง 0.5 μ M ของพีเอ็นเอที่มีประจุบวกมากกว่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดการจับตัวที่ดีและรวดเร็วกว่าโดยซึ่งสังเกตได้จากสีของสารละลาย AuNPs ที่เปลี่ยนไปดังรูปที่ 40

[PNA] (μ M)	Blank	0.1	0.5	1.0
PNA-Lys				
PNA-Lys5				

รูปที่ 40 การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจากการจับตัวของ AuNPs หลังจากเติมพีเอ็นเอลงไป โดยทำที่ [AuNPs] = 1 mM

ต่อมาได้ศึกษาการจับตัวของ AuNPs เมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย โดยเปรียบเทียบกับระหว่างดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) กับ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสม (ncDNA) ผลที่ได้คือสภาวะที่มี ssPNA และ PNA+ncDNA จะเหนี่ยวนำให้ AuNPs จับตัวกันและเกิดการเปลี่ยนสี ขณะที่ ssDNA และ PNA+cDNA ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 41A) อย่างไรก็ตาม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกแยะการเปลี่ยนสี ผู้วิจัยได้ทดลองเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปเพื่อเร่งการเหนี่ยวนำการจับตัวของ AuNPs จากผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่มี ionic strength สูงขึ้น ความว่องไวของการจับตัวของ AuNPs เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีสามารถสังเกตได้ชัดเจนมากขึ้นด้วย (รูปที่ 41B) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า acpcPNA และ AuNPs สามารถใช้ทดสอบแยกแยะการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่าได้

	Blank	PNA	PNA+ cDNA	PNA+ ncDNA	DNA
(A) Without NaCl					
(B) With NaCl					

รูปที่ 41 การแยกแยะการเปลี่ยนแปลงสีของ AuNPs เมื่อมี PNA และ DNA ชนิดต่างๆ โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส GTAGATCACT; [PNA] = 0.5 μ M, [DNA] = 0.6 μ M; [AuNPs] = 0.1 mM ใน 1 mM sodium phosphate buffer (pH 7) และ [NaCl] = 50 mM

นอกจากการทดสอบดีเอ็นเอแล้ว ต่อมาได้ศึกษาการแยกแยะสีในระบบที่มีอาร์เอ็นเอสายสั้น (miRNA21) โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส AGTCTGATAAGC ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกแยะสีของ AuNPs ระหว่าง microRNA21 กับอาร์เอ็นเออื่นได้ดังรูปที่ 42

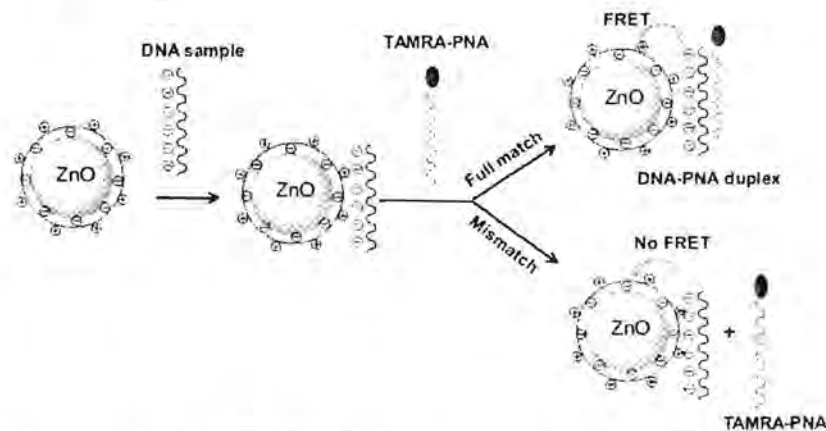
Blank	PNA+ miRNA21	PNA+ ncRNA	ncRNA

รูปที่ 42 การแยกแยะการเปลี่ยนสีของ AuNPs เมื่อมี PNA และ RNA ชนิดต่างๆ โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 AGTCTGATAAGC; [PNA] = 0.5 μ M, [DNA] = 0.6 μ M; [AuNPs] = 0.1 mM ใน 1 mM sodium phosphate buffer (pH 7) และ [NaCl] = 50 mM; ลำดับเบส miRNA21 = 5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'; ncRNA = AGUGCUUAC

d) Quantum dots

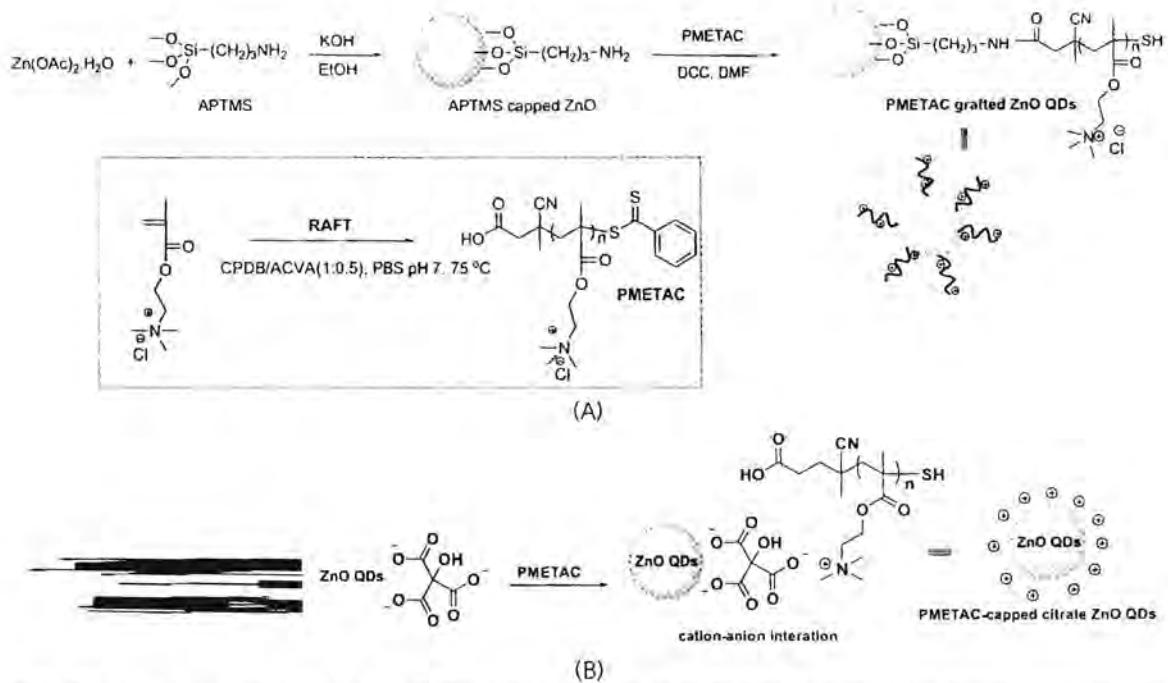
1. ZnO QDs

งานวิจัยในส่วนแรกอยู่ภายใต้ความรับผิดชอบของ ดร.แพรทอง เหลลาภา จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ สกลนคร ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนา ZnO quantum dot (ZnO QDs) ที่มีการตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเช่น poly(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (PMETAC) เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการถ่ายโอนพลังงานแบบ Fluorescence resonance energy transfer (FRET) หรือกลไกการดับสัญญาณ (quenching) ระหว่างพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงดังแสดงในรูปที่ 43 ซึ่งแม้จะเคยมีผู้พัฒนาวิธีการที่ใกล้เคียงกันในการวิเคราะห์ DNA โดยอาศัยดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง²¹ แต่ก็ยังไม่เคยมีผู้ศึกษากับพีเอ็นเอมาก่อน



รูปที่ 43 แสดงหลักการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยพีเอ็นเอพร้อมกับ PMETAC grafted ZnO QDs โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีอาศัยหลักการ FRET หรือกลไกการดับสัญญาณ (quenching)

งานวิจัยเริ่มจากการสังเคราะห์ ZnO QDs ที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PMETAC (รูปที่ 44) โดยวิธีแรก (รูปที่ 44A) สังเคราะห์ผ่าน aminopropyltriethoxy silane (APTMS)-capped ZnO QDs ด้วยวิธี co-precipitation ของ zinc acetate ในเมทานอลที่มี APTMS อยู่ด้วยและใช้เบส KOH เป็นตัวทำหน้าทำให้เกิด APTMS-capped ZnO QDs ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า APTMS capped ZnO QDs นี้มีขนาดอนุภาค 5.7 nm และมีความเสถียรสูง²² ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า APTMS capped ZnO QDs สามารถเก็บรักษาในลักษณะอนุภาคแห้งได้เป็นเวลานานโดยที่ไม่สูญเสียสมบัติการเรืองแสง หลังจากนั้นจึงสังเคราะห์พอลิเมอร์ poly(methacryloyloxy)-ethyl]trimethylammonium chloride (PMETAC) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) ซึ่งเมื่อนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR FT-IR และ ¹H NMR พิสูจน์ได้ว่าสามารถสังเคราะห์ PMETAC ได้ และพบว่า PMETAC มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5 kDa แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของ QPDMAEMA จำเป็นจะต้องนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GPC เพิ่มเติม ในขั้นตอนสุดท้ายนำ APTMS capped ZnO มาทำปฏิกิริยาที่หมู่ -NH₂ กับปลายคาร์บอกซิลิกของ PMETAC ซึ่งจะได้ PMETAC-grafted ZnO QDs ที่มีพอลิเมอร์ยึดติดที่ในลักษณะเป็นเส้นตรงออกจากผิวของอนุภาค

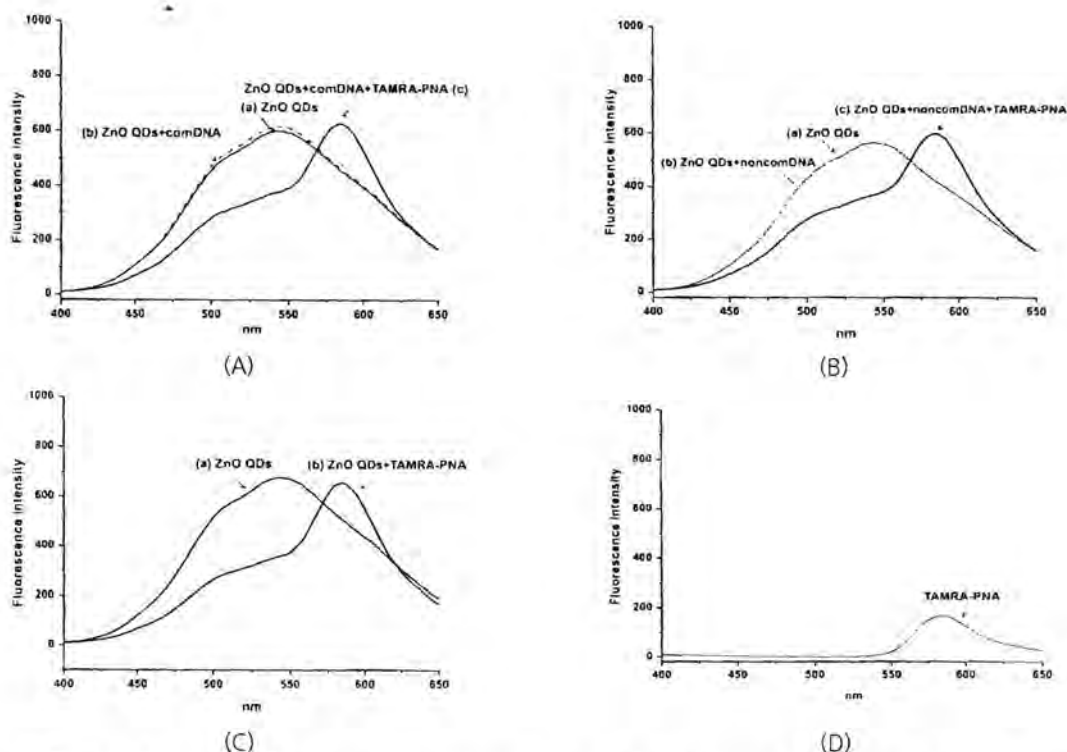


รูปที่ 44 การสังเคราะห์ ZnO QDs ที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PMETAC โดยวิธี graft onto APTMS-capped ZnO QDs (A) และโดยวิธี electrostatic interaction กับ citrate-stabilized ZnO QDs (B)

เมื่อนำอนุภาค ZnO QDs ที่สังเคราะห์ได้จากวิธีแรกไปทดสอบสมบัติการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ร่วมกับ TAMRA-PNA probe นั้น พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมหรือลำดับเบสผิดไปกับโพรบได้ โดยผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าเนื่องจากพอลิเมอร์ PMETAC ที่ตรึงบนผิวของ ZnO QDs มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้ระยะทางระหว่างแกนกลางของ ZnO QDs กับ TAMRA-PNA โพรบอยู่ห่างกันมากเกินไปจึงไม่สามารถถ่ายโอนพลังงานให้แก่กันได้ดังนั้นก็จึงไม่เกิดปรากฏการณ์ FRET หรือการดับสัญญาณ (quenching) เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยได้พยายามนำ PMETAC ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2-3 kDa มาใช้ โดยพบว่าเมื่อเติม DNA ตัวอย่างผสมกับ ZnO QDs จะเกิดการดับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ ZnO QDs ตามปริมาณของ DNA ตัวอย่างที่ใส่เข้าไป แต่เมื่อเติม TAMRA-PNA จะไม่เกิดการ FRET หรือ quench เพราะ DNA เข้าไปรบกวนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แล้วจึงไม่เหลือพลังงานที่จะไปกระตุ้น TAMRA-PNA

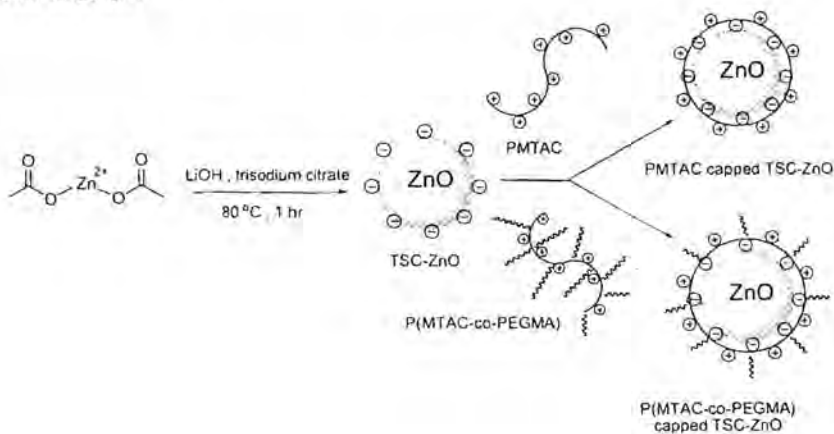
เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยยังได้สังเคราะห์ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกอีกระบบหนึ่งเพื่อลดระยะทางระหว่างแกนกลางของ ZnO QDs กับ TAMRA-PNA เพื่อให้เกิดกระบวนการถ่ายโอนพลังงานได้ โดยสังเคราะห์ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกชนิด PMETAC ซึ่งสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันกลไกแบบ RAFT เช่นเดียวกับ ZnO QDs ระบบแรก โดยระบบนี้จะอาศัย citrate ion เป็นตัวเคลือบผิวของ ZnO QDs แล้วหมู่คาร์บอกซิเลตที่เป็นอิสระจะเชื่อมประสานกับประจุบวกของพอลิเมอร์ (PMETAC) ได้โดยตรงผ่านแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต โดยวิธีการสังเคราะห์ที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการสังเคราะห์ของ Joshi, P. และคณะ²³ (รูปที่ 44B) คือ นำ zinc acetate ทำปฏิกิริยากับ LiOH ในเอทานอลซึ่งจะเกิดเป็น ZnO QDs ขึ้นจากนั้นเติม trisodium citrate เพื่อเคลือบผิว ZnO QDs ไว้จากนั้นนำไปเซนติฟิวจ์แล้วล้างด้วยน้ำ 3 รอบ นำตะกอนที่ได้มา disperse ในน้ำ แล้วจึงค่อยๆ เติม PMETAC (Mw~5 kDa) พร้อมกับการคนสารละลาย และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายมาเซนติฟิวจ์แล้วนำ dispersion ในน้ำอีกครั้ง

จากนั้นจึงนำ PMETAC-capped citrate ZnO QDs ที่ได้ไปศึกษาการเกิด FRET กับพีเอ็นเอ TAMRA-OCTAAATTCAGA-(Lys)₆NH₂ (TAMRA-PNA) เมื่อมีและไม่มีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย (รูปที่ 45A-C) ซึ่งพบว่าในทั้งทุกกรณีจะเกิดปรากฏการณ์ FRET ได้โดยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ ZnO QDs จะลดลงเมื่อ excite ที่ 340 nm และพบการเรืองแสงของ TAMRA-PNA เพิ่มขึ้น แต่ปัญหาที่พบคือมีการเกิด non-specific interaction ระหว่าง QD กับ TAMRA-PNA กล่าวคือแม้ไม่มีดีเอ็นเออยู่ด้วยเลยก็ยังพบการเกิด FRET (รูปที่ 3C) และเพื่อเป็นการยืนยันว่าสัญญาณของ TAMRA-PNA ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นโดยตรงที่ 340 nm จึงได้ทำการทดลองควบคุมดังรูปที่ 3D โดยไม่ใส่ ZnO QDs และ DNA ซึ่งพบว่าสัญญาณที่ได้ต่ำกว่าเมื่อมี ZnO QDs อยู่ด้วย



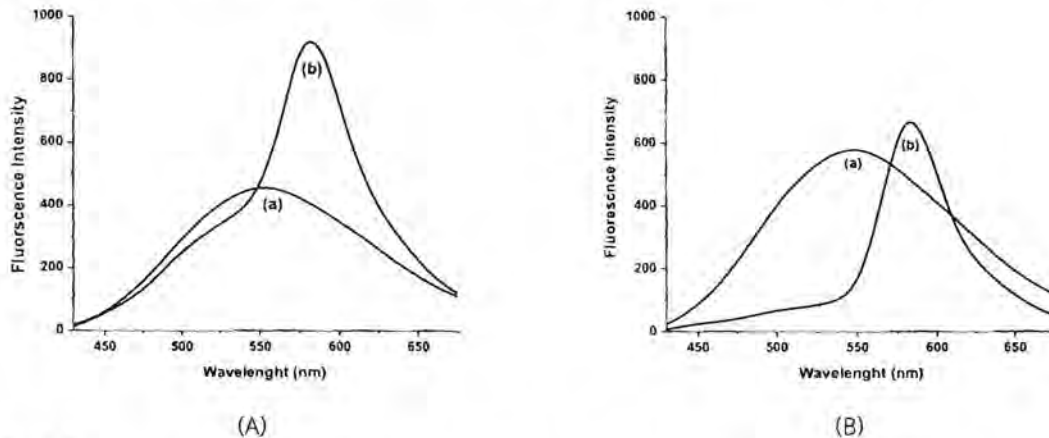
รูปที่ 45 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ 0.5 μ M TMR-PNA (TAMRA-O-CTAAATTCAGA-Lys₄NH₂) เมื่อมี (A) และไม่มี (B) ดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม (5'-TCTGAATTTAG-3') อยู่ด้วย (C) PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ 0.5 μ M TMR-PNA (D) 0.5 μ M TMR-PNA ในสารละลาย 10 mM tris-HCl pH 9 และ λ_{excit} ที่ 340 nm

งานวิจัยที่ได้ทำต่อมาคือการพยายามแก้ปัญหาการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงระหว่าง PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ TAMRA-PNA โดยการตัดแปรพื้นผิวของ ZnO QDs ด้วยโคพอลิเมอร์ของ METAC กับ polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติที่มีสมบัติชอบน้ำ จึงจะช่วยลดการดูดซับแบบไม่จำเพาะจงกับพีเอ็นเอลงได้ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ P(MTAC-co-PEGMA) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ RAFT ที่ DP เป้าหมายเท่ากับ 100 และศึกษาอัตราส่วนโคพอลิเมอร์ MTAC ต่อ PEGMA โดยควบคุมอัตราส่วนโมล ของมอนอเมอร์ MTAC และ PEGMA เท่ากับ 100:0, 80:20, 70:30, 60:40, 40:60, 30:70 และ 20:80 จากนั้นจึงนำพอลิเมอร์ที่ได้มาตรึงบน citrate-capped ZnO QD (รูปที่ 46) และได้พิสูจน์ว่าการตรึงประสบความสำเร็จโดยใช้เทคนิค ATR-IR ซึ่งแสดงฟังก์ของ C=O จากพอลิเมอร์ที่ 1720 cm^{-1}



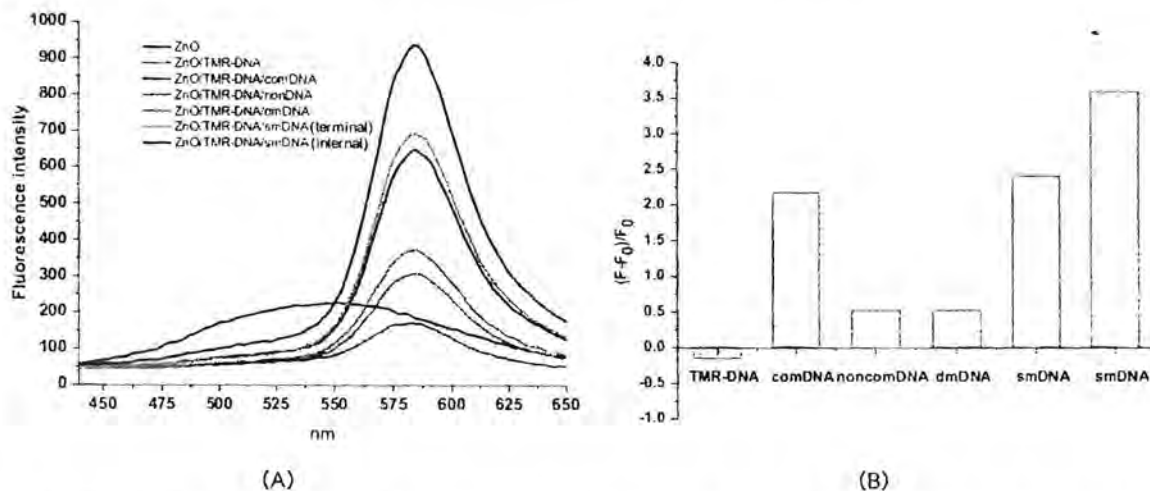
รูปที่ 46 แสดงการสังเคราะห์ ZnO ควอนตัมดอทที่เคลือบผิวด้วย PMTAC และ P(MTAC-co-PEGMA)

P(MTAC-co-PEGMA)-capped ZnO QD ที่เตรียมได้แสดงการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm และแสดงการกระจายตัวในน้ำที่ตี โดยการมีส่วนของ PEGMA เพิ่มในโคพอลิเมอร์ส่งผลทำให้การเรืองแสงและความเสถียร ของ ZnO QDs ในน้ำและใน Tris buffer เพิ่มขึ้น ผลการทดสอบเบื้องต้นกับ TAMRA-labeled DNA พบว่าสามารถเกิดการ FRET ได้อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบกับ TAMRA-labeled PNA ยังพบว่าไม่มี non-specific interaction อยู่ (รูปที่ 47)

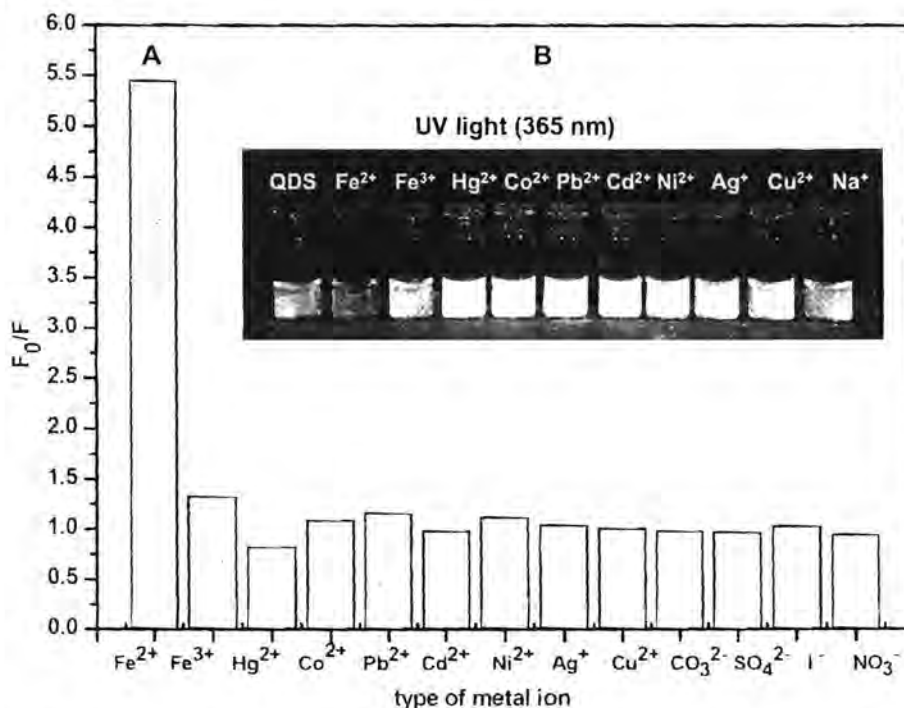


รูปที่ 47 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ P(MTAC-co-PEGMA) (20:80) capped citrate-ZnO QDs และ (a) 0.5 μ M TAMRA-labeled DNA (TAMRA-CTAAATTCAGA) (b) TAMRA-labeled PNA (TAMRA-O-CTAAATTCAGA-Lys₄NH₂) ในสารละลาย 100 mM tris-HCl pH 9 และ λ_{excit} ที่ 350 nm

ต่อมาจึงได้ศึกษา ZnO QDs ที่ถูกดัดแปรด้วย PMTAC-co-PPEGMA เพิ่มเติม โดยพบว่า ZnO ที่มีอัตราส่วนพอลิเมอร์ต่อ Zn เท่ากับ 10:1 เป็นอัตราส่วนที่ทำให้ ZnO มีค่า fluorescence intensity คงที่ได้ยาวนานมากกว่า 6 เดือน เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง TAMRA หรือ Flu โดยอาศัยหลักการ FRET พบว่า ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย PMTAC-co-PPEGMA ยังไม่มีประสิทธิภาพในการบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมและผิดไปหนึ่งตำแหน่งเท่าใดนัก จึงได้ชะลองานส่วนที่เกี่ยวข้องกับ PNA ไว้ก่อน และหันมาศึกษาอันตรกิริยาของ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO กับดีเอ็นเอแทน โดยผู้วิจัยได้ศึกษาอันตรกิริยาของ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO กับ short DNA oligonucleotide (11-mer) จากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 575 nm พบว่าในทั้งสองกรณีที่ศึกษา (ที่อัตราส่วนของ MTAC:PEGMA = 40:60 และ 60:40) การเติม DNA ลงไปจะทำให้สัญญาณลดลงเล็กน้อย โดยการลดลงของสัญญาณมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณของ DNA ที่เติมลงไป และ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO ที่อัตราส่วนของ MTAC:PEGMA = 60:40 จะเกิดการ quench น้อยกว่า จึงเลือกที่อัตราส่วนนี้ไปใช้ในการศึกษาการเกิด FRET กับ TAMRA-labeled DNA ต่อไป ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 48A และ 48B ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการถ่ายโอนพลังงานจาก QD ไปยัง TMR ดังจะเห็นได้จากสัญญาณของ QD ลดลงหรือหายไป และสัญญาณของ TMR ที่ 575 nm เพิ่มขึ้น โดยสัญญาณที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ โดย TAMRA-DNA สายเดียวจะสว่างน้อยที่สุด ใกล้เคียงกับการ excite ฉลาก TMR โดยตรง โดยที่ไม่มี QD อยู่ด้วย ส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมทั้งสาย และมีลำดับเบสผิดไปเพียง 1 ตำแหน่งทั้งที่ปลายสายและกลางสายจะให้สัญญาณของ TAMRA ที่สูงมาก แสดงถึงการถ่ายโอนพลังงานที่มีประสิทธิภาพ แต่เมื่อดีเอ็นเอมีลำดับเบสผิดไปตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไปสัญญาณจะกลับลดลงมาใกล้เคียงกับ TAMRA-DNA แสดงให้เห็นว่าการใช้ QD ร่วมกับ DNA ที่ติดฉลากสามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมที่มีลำดับเบสผิดไปจากโพรบตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไปได้ ซึ่งเป็นผลการทดลองเบื้องต้นที่น่าสนใจ และคาดว่าเกิดจากความแตกต่างของความสามารถในการจับกันระหว่าง ssDNA และ dsDNA กับ ZnO QD ซึ่งน่าจะได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อศึกษาข้อจำกัดและกลไกการเกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงนี้



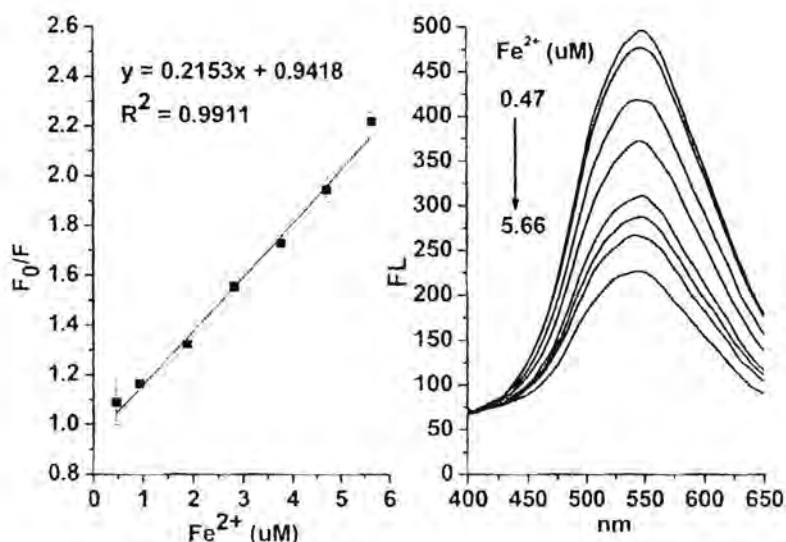
รูปที่ 48 (A) แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ 230 μM PMTAC-co-PPEGMA (60:40) capped TSC-ZnO และ 154 nM TMR-DNA (TAMRA-CTAAATTCAGA) เมื่อมีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม (comDNA: (5'-TCTGAATTTAG-3'), ลำดับเบสผิดไปทั้งสาย (nonDNA: 5'-ACATTTAAAAC-3'), ลำดับเบสผิดไป 2 เบส (dmDNA: 5'-TCTGTATTTAA-3') และมีลำดับเบสผิดไป 1 เบส ที่ปลายสาย (smDNA (terminal): 5'-TCTGAATTTAA-3') และกลางสาย (smDNA (internal): 5'-TCTAAATTTAA-3')) ในสารละลาย 100 mM tris-HCl pH 9 และ $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ (B) แสดงความแตกต่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ $(F_0 - F)/F_0$ จากรูป A (F_0 = fluorescence intensity of ZnO QD at 575 nm, F = fluorescence intensity of TAMRA-DNA+ZnO QD+DNA at 575 nm)



รูปที่ 49 สเปกตรัมฟลูออเรสเซนส์ของ ZnO ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) [อัตราส่วน METAC:PEOMEMA เท่ากับ 30:70] กับ 5.6 μM metal ion (B) เมื่อส่องได้แสง UV ความยาวคลื่น 365 nm

นอกจากนี้ยังได้นำ QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกชนิด PMETAC และ P(METAC-PEOMEMA) ที่สังเคราะห์ได้มาประยุกต์ใช้ในการนำมาตรวจวิเคราะห์ metal ion พบว่า ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก P(METAC-PEOMEMA) ที่อัตราส่วน METAC:PEOMEMA เท่ากับ 30:70 แสดงความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ Fe²⁺ โดยเมื่อมี Fe²⁺ อยู่ด้วยจะเกิดการดับสัญญาณการเรืองแสงของ ZnO QDs ลง โดยที่ metal ion ชนิดอื่นๆ ไม่ทำให้การเรือง

แสงของ ZnO QDs เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 49) นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของ Fe^{2+} และ Fe^{3+} ออกจากกันได้ อย่างชัดเจน โดยระบบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ Fe^{2+} กับ Fe^{3+} คือ 100 mM Tris.HCl pH9



รูปที่ 50 (A) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัม ของ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) (30:70) เมื่อมีปริมาณ Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.47, 0.94, 1.89, 2.83, 3.77, 4.62, และ 5.66 μM ตามลำดับ (B) กราฟเส้นตรงของ F_0/F กับความเข้มข้นของ Fe^{2+} โดยที่ F_0 คือ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) (30:70) ก่อน และ F คือหลังเติม Fe^{2+}

การดับสัญญาณการเรืองแสงของ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ Fe^{2+} เพิ่มขึ้น (รูปที่ 50) เมื่อคำนวณค่า F_0/F พล็อตกราฟระหว่าง F_0/F กับความเข้มข้นของ Fe^{2+} พบว่าให้กราฟเส้นตรงมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9912 โดยคำนวณจากสมการเส้นตรง $F_0/F = 0.2153 [Fe^{2+} \mu\text{M}] + 0.9418$ จะสามารถคำนวณค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.34 μM และ 0.51 μM ตามลำดับ เมื่อศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.89 μM จำนวน 5 ซ้ำ พบความคลาดเคลื่อนเพียง 4.1% ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Fe^{2+} ได้ อย่างเลือกจำเพาะ

2. CdS QDs

งานวิจัยในส่วนนี้อยู่ภายใต้ความรับผิดชอบของ ดร. นำพล อินสิน จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นการศึกษาระบบของ CdSe และ CdTe QD เพื่อใช้ร่วมกับพีเอ็นเอในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอควบคู่กันไปด้วย โดยได้เริ่มจากการสังเคราะห์ CdSe/ZnS core shell QD ที่มีประจุบวก ความท้าทายของการเตรียม QD ชนิดนี้คือการทำให้มันสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำโดยยังคงความเสถียรและความสามารถในการเรืองแสงอยู่ แนวคิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นคือการเคลือบผิวอนุภาค QD ที่เตรียมภายใต้ภาวะปราศจากน้ำ โดยใช้ surfactant ที่มีประจุบวกได้แก่ octanoic acid-modified polyethyleneimine (octPEI) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง octanoyl chloride และ PEI ขณะนี้สามารถสังเคราะห์ trioctylphosphine-stabilized CdSe/ZnS core shell QD ใน organic phase ได้แล้วโดยใช้วิธีการตามเอกสารอ้างอิง²⁶ โดย QD ดังกล่าวมีขนาดเฉลี่ย 3.2 nm และแสดงการเปล่งแสงอยู่ที่ช่วงคลื่น 569 nm โดยมีค่าประสิทธิภาพการเรืองแสงอยู่ที่ 3% จากนั้นจึงนำไปคอนจูเกตกับ octPEI²⁵ โดยพบว่าอัตราส่วนของควอนตัมดอต : mPEI ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1:7 และพีเอ็นเอที่เหมาะสมคือ 6 ขณะนี้สามารถสังเคราะห์อนุภาคควอนตัมดอตที่มีประจุบวกที่สามารถกระจายตัวในน้ำได้แล้ว กำลังอยู่ในกระบวนการหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาการใช้งานร่วมกับพีเอ็นเอและดีเอ็นเอต่อไป

¹ Chen, L.; Wang, N.; Wang, X.; Ai, S. *Microchim. Acta* 2013, 180, 1517–1522.

² Gao, Z.; Xu, M.; Hou, Li.; Chen, G.; Tang, D. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 776, 79–86.

- ³ Polsky, R.; Gill, R.; Kaganovsky, L.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2268–2271.
- ⁴ Wang, Y.; Ouyang, G.; Zhang, J.; Wang, Z. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7912–7914.
- ⁵ Stevens, K.; Claeys, D. D.; Catak, S.; Figaroli, S.; Hocek, M.; Tromp, J. M.; Schürch, S.; van Speybroeck, V.; Madder, A. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6940–6953.
- ⁶ Op de Beeck, M.; Madder, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796–807.
- ⁷ Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7992–7999.
- ⁸ Percivalle, C.; Bartolo, J.-F.; Ladame, S. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 16–26.
- ⁹ Li, Q. Q.; Luan, G. Y.; Guo, Q. P.; Liang, J. X. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e5.
- ¹⁰ Cheng, J. P.; Zhang, Y. Y.; Li, Q. G. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e61.
- ¹¹ Mo, Z. H.; Yang, X. C.; Guo, K. P.; Wen, Z. Y. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 493–497.
- ¹² Kushon, S. A.; Bradford, K.; Marin, V.; Suhrada, C.; Armitage, B. A.; McBranch, D.; Whitten, D. *Langmuir* **2003**, *19*, 6456–6464.
- ¹³ Habl, G.; Böhm, H.; Marmé, N.; Knemeyer, J. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, *85*, 613–623.
- ¹⁴ Boonlua, C.; Charoenpakdee, C.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 5691–5697.
- ¹⁵ Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T. *RSC Advances* **2015**, *5*, 24110–24114.
- ¹⁶ Winichagoon, P.; Saechan, V.; Sripanich, R.; Nopparatana, C.; Kanokpongsakdi, S.; Maggio, A.; Fucharoen, S. *Prenat. Diagn.* **1999**, *19*, 428–435.
- ¹⁷ a) Lu, C.-H.; Yang, H.-H.; Zhu, C.-L.; Chen, X.; Chenparing, G.-N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4785–4787. b) He, S.; Song, B.; Li, D.; Zhu, C.; Qi, W.; Wen, Y.; Wang, L.; Song, S.; Fang, H.; Fan, C. A. *Adv. Func. Mater.* **2010**, *10*, 453–459. c) Wu, M.; Kempaiah, R.; Huang, P.J.; Maheshwari, V.; Liu, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 2731–2738.
- ¹⁸ a) Guo, S.; Du, D.; Tang, L.; Ning, Y.; Yao, Q.; Zhang, G.J. *Analyst* **2013**, *138*, 3216–3220. b) Sabale, P.M.; George, J.T.; Srivatsan, S. G. *Nanoscale* **2014**, *6*, 10460–10469. c) Kotikam, V.; Fernandes, M.; Kumar, V.A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15003–15006.
- ¹⁹ Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- ²⁰ Su X.; Kanjanawarut S. *ACS Nano* **2009**, *3*, 27512–759.
- ²¹ Lee, J.; Choi, Y.; Kim, J.; Park, E.; Song, R. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 806–811.
- ²² Costenaro, D.; Carniato, F.; Gatti, G.; Marchese, L.; Bisio, C. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 2103–2109.
- ²³ Joshi, P.; Ansari, Z.A.; Singh, S.P.; Shanker V. *Adv. Sci. Lett.* **2009**, *2*, 360–363.
- ²⁴ Yang, P.; Zhou, G. *Materials Research Bulletin* **2011**, *46*, 2367–2372.
- ²⁵ Nann, T. *Chem. Commun.* **2005**, 1735–1736.

ชื่อโครงการย่อย PNA-conjugated polymer brushes as platforms for DNA sequence determination
 ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
 รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย

รศ.ดร.วรวิทย์ โอเว่น

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักการและเหตุผล

พอลิเมอร์เป็นวัสดุที่ได้รับความสนใจในการนำมาเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) และการประยุกต์ทางชีวการแพทย์ (biomedical applications) ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการที่พอลิเมอร์มีหน่วยซ้ำตามความยาวของโซ่พอลิเมอร์ หากหมู่ข้างของหน่วยซ้ำมีหมู่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีเป็นองค์ประกอบ ก็สามารถนำมาใช้ในการติดสารที่จะทำหน้าที่เป็นโพรบในการตรวจวัดทางชีวภาพได้เป็นจำนวนมากต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ที่มีการปกคลุมด้วยพอลิเมอร์นั้นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มหน้าที่ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจวัดให้กับพอลิเมอร์ เช่น การเพิ่มหน่วยซ้ำที่มีสมบัติชอบน้ำสูงเพื่อป้องกันการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดในกรณีที่มีสิ่งเจือปนในสารตัวอย่างที่สามารถเกิดอันตรกิริยาอย่างไม่จำเพาะเจาะจงได้ ในงานวิจัยนี้สนใจพัฒนาโคพอลิเมอร์ 2 ชนิดเพื่อใช้เป็นแพลตฟอร์มในการตรึง pyrrolidiny peptide nucleic acid bearing D-propyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones) หรือ acpcPNA เป็นโพรบ เพื่อใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ ดังมีรายละเอียดในรายงานตอนที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะพัฒนาพอลิเมอร์ที่ทำหลายหน้าที่ (multifunctional polymer) โดยเป็นทั้งสารทำให้ทองคำนาโนท่อน (gold nanorods; AuNRs) เสถียร เป็นสารที่ใช้ในการติดพีเอ็นเอ และสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อจะพัฒนาอนุภาคดังกล่าวเป็นพาหะในการนำส่งพีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่สามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สำหรับการประยุกต์ทาง antisense/antigene ต่อไปได้ในอนาคต ซึ่งแสดงรายละเอียดไว้ในรายงานตอนที่ 3 สำหรับรายงานตอนที่ 4 เป็นงานวิจัยใหม่ที่นำเสนอเพิ่มเติมจากในข้อเสนอโครงการคือ การพัฒนามอนอเมอร์ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ และการศึกษาสมบัติการเกิดไฮบริดเซชันกับตัวมันเองได้หรือดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมเกิดเป็นโครงสร้างที่มีสมบัติน่าสนใจในการพัฒนาไปใช้ทางชีวการแพทย์ต่อไปได้ในอนาคต

ตอนที่ 1 งานวิจัยเกี่ยวข้องกับการใช้โคพอลิเมอร์ชนิด poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PPgMAMPC) ที่สามารถควบคุมอัตราส่วนของมอนอเมอร์แต่ละชนิดได้ ตรึงบนสับสเตรทที่เป็นกระจกเคลือบทองด้วยวิธี "grafting to" ตามด้วยการตรึง และวิเคราะห์การจับยึดกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) ทั้งนี้แนวคิดดังกล่าวเกิดจากความสนใจในการพัฒนาแพลตฟอร์มที่สามารถใช้ในการตรึงโพรบพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาของหมู่แอลไคน์ในหน่วยซ้ำส่วน poly(propargyl methacrylate) (PPgMA) ของโคพอลิเมอร์กับพีเอ็นเอโพรบที่สังเคราะห์ให้มีหมู่ปลายเป็นเอไซด์ผ่านปฏิกิริยาคลิก (click reaction) แบบ Huisgen 1,3-dipolar azide – alkyne cycloaddition ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูง สามารถทำได้ ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้มีความคาดหวังว่าการมีพอลิเมทาคริลอิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน (poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine); PMPC) อยู่ในโคพอลิเมอร์น่าจะช่วยลดการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับดีเอ็นเอที่ไม่ได้เป้าหมายในการตรวจวัด

ตอนที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาวิธีการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด poly[glycidyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methacrylate] หรือ P(GMA-co-PEGMA) ซึ่งมีหมู่อีพอกไซด์ สามารถเกิดปฏิกิริยาการเปิดวงด้วยหมู่เอมีนของโพรบ acpcPNA ทั้งนี้จะตรวจวัดการจับยึดระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเกิดสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณในรูปแบบ sandwich hybridization โดยใช้โพรบ acpcPNA 2 ชนิด ทำหน้าที่เป็น capture probe ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย

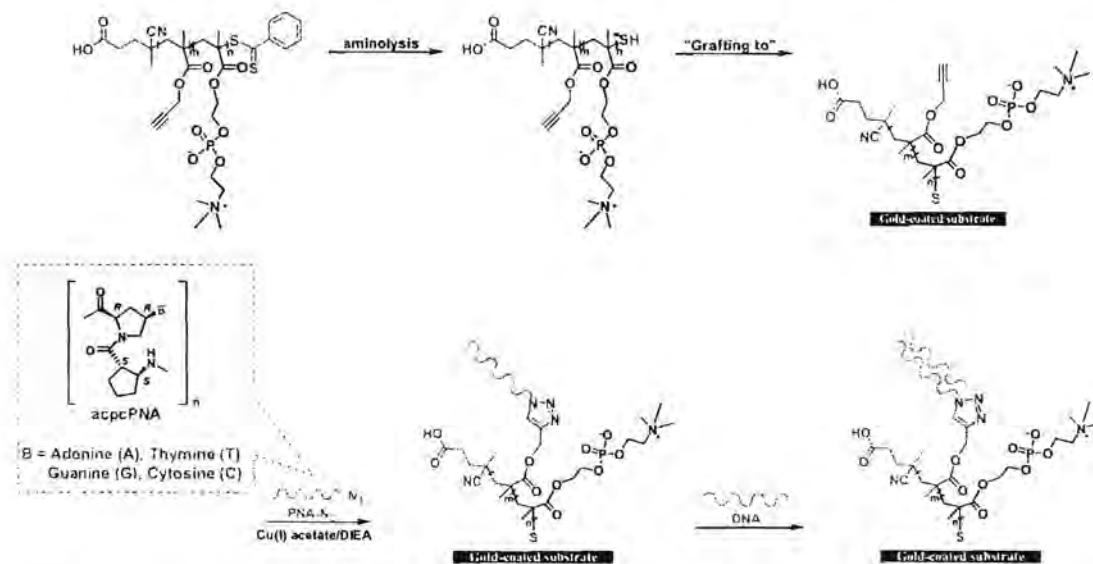
และ reporter probe ซึ่งใช้ในการขยายสัญญาณ แนวทางที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ และสามารถพัฒนาต่อยอดไปสู่การวิเคราะห์ในรูปแบบ high throughput analysis ได้ในอนาคต โดยในงานวิจัยนี้สนใจตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายคือ human leukocyte antigen (HLA) ชนิด HLA-B*1502 alleles

ตอนที่ 3 ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาแท่งนาโนทอง (gold nanorods; AuNRs) เป็นพาหะ (carrier) ในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยา กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid ; DNA) หรือเพปไทด์ นิวคลีอิกแอซิด (peptide nucleic acid; PNA) เข้าสู่เซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามในการสังเคราะห์ AuNRs จำเป็นต้องมีการใช้ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) เพื่อทำหน้าที่เป็น template ควบคุมให้อนุภาคมีรูปร่างตามต้องการ ดังนั้น AuNRs ที่สังเคราะห์ได้เริ่มต้นจะมี CTAB เป็นสารทำให้เสถียร (CTAB-AuNRs) ซึ่งจะส่งผลให้อนุภาคดังกล่าวมีความเป็นพิษ ไม่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะแทนที่ CTAB ด้วยพอลิเมอร์ที่มีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ เพื่อลดความเป็นพิษของอนุภาค ในที่นี้เลือกใช้โคพอลิเมอร์ของเมทาคริลิกแอซิดและ 2-เมทาคริลอิลออกซิเอทิลฟอสโฟสโพริลโคลีน (poly[(methacrylic acid)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)]; PMAMPC) เนื่องจากในโครงสร้างของ PMAMPC จะประกอบด้วย MA ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างสามารถใช้ในการตรึงสารที่ต้องการนำส่งและส่วนของ MPC ที่มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพสามารถลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ acpcPNA เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) ได้ โดยตรงที่เอ็นเอเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของพอลิเมอร์ด้วย tetrapeptide (-Gly-Phe-Leu-Gly-) ที่จะถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ cathepsin B ที่มีอยู่ในเซลล์ นอกจากนี้ยังอาศัยหมู่คาร์บอกซิลในการศึกษาการตรึงสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ทำให้สามารถติดตามการเข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย

ตอนที่ 4 เป็นการสังเคราะห์มอโนเมอร์ชนิดใหม่ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ โดยสนใจจะทำผ่าน 2 แนวทาง แนวทางแรกเป็นการสังเคราะห์มอโนเมอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของเอทิลีนออกไซด์ที่มีปลาย 2 ข้างเป็นพีเอ็นเอชนิด epiacpcPNA ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพีเอ็นเอระบบดังกล่าวที่มีสเตอริโอเคมีของหมู่แทนที่ในวงไพโรลิดินิลต่างจาก acpcPNA 1 ตำแหน่ง สามารถเกิดการเข้าคู่กันเองได้ ลักษณะดังกล่าวจะทำให้สามารถสร้างพันธะระหว่างมอโนเมอร์เกิดเป็นพอลิเมอร์ได้โดยอาศัยการเข้าคู่ระหว่างเบสที่เป็นคู่สมกันของพีเอ็นเอ ลักษณะดังกล่าวเรียกว่าการเกิดซูพราโมเลคิวลาร์พอลิเมอร์เซชัน (supramolecular polymerization) เนื่องจากพันธะที่เชื่อมต่่อมอโนเมอร์เข้าด้วยกันเกิดเป็นพอลิเมอร์เป็นพันธะไฮโดรเจน สมบัติของพอลิเมอร์ควรจะแปรเปลี่ยนแบบผันกลับได้ตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ตัวทำละลาย pH เป็นต้น นับเป็นการพัฒนา responsive polymer จากพีเอ็นเอ ซึ่งเป็นรูปแบบที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน แนวทางที่สองเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเอทิลีนออกไซด์ที่มีปลาย 2 ข้างเป็นพีเอ็นเอชนิด acpcPNA จะทำให้ได้พอลิเมอร์ชนิดใหม่ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ ที่สามารถเชื่อมขวางกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันเกิดเป็นพอลิเมอร์คอมเพล็กซ์ (polymer complex) ที่อาจจะพัฒนาไปเป็นระบบนำส่งดีเอ็นเอเพื่อประยุกต์ใช้ทางด้าน antisense/antigene ได้ในอนาคต

ตอนที่ 1 การพัฒนาโคพอลิเมอร์ที่สามารถติดดีเอ็นเอโพรบด้วยปฏิกิริยาคลิกและการตรวจวัดดีเอ็นเอ

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการนำโคพอลิเมอร์ของ PPgMAMPC ที่มีอัตราส่วนของโคพอลิเมอร์แตกต่างกันมาเตรียมให้อยู่ในรูปของโคพอลิเมอร์บรัช โดยตรงลงบนสับสเตรทกระจกเคลือบทองด้วยวิธี "grafting to" เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้เป็นแพลตฟอร์มสำหรับตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ปลายสายตัดแปรด้วยหมู่ไฮดรอกซิลสำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) ซึ่งแสดงขั้นตอนการตรึงและการจับยึดกับดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการตรึงโคพอลิเมอร์บริซของ PPgMAMPC บนสับสเตรทกระจกเคลือบทองเพื่อประยุกต์ใช้เป็นแพลตฟอร์มในการตรึงพีเอ็นเอโพรบสำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ

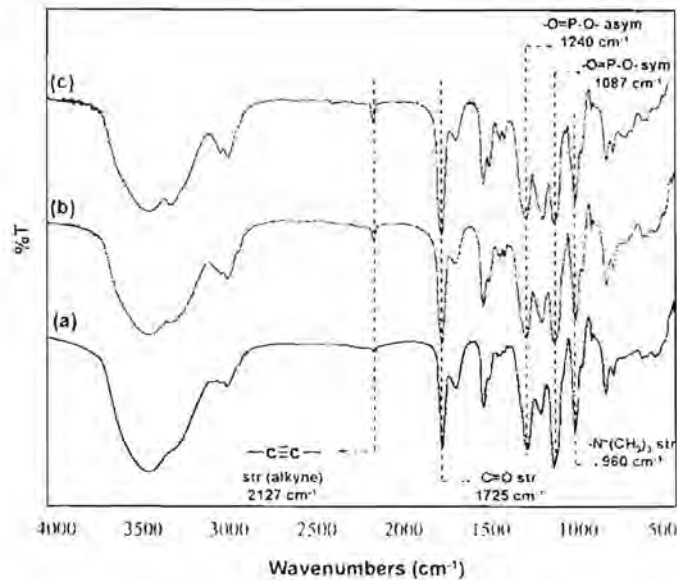
จากการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์แบบสุ่มของ PPgMAMPC ที่กำหนดให้มีอัตราส่วนระหว่างมอนอเมอร์ PgMA:MPC ที่ใส่เข้าไป (copolymer ratio in feed) 3 อัตราส่วนคือ 70:30, 50:50 และ 30:70 ซึ่งจะทำให้ได้โคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของโคพอลิเมอร์ในผลิตภัณฑ์ (copolymer ratio) เป็น PPgMA₆₅MPC₃₅, PPgMA₄₅MPC₅₅ และ PPgMA₃₈MPC₆₂ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹H NMR) ดังแสดงในตารางที่ 1.1 และทำการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ¹H NMR และ FT-IR จากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ปลายของ PPgMAMPC จากหมู่ dithioester ให้เป็นหมู่ thiol โดยผ่านการทำปฏิกิริยา aminolysis (ขั้นที่ 1 ในรูปที่ 1.1) ด้วยการทำปฏิกิริยากับ hydrazine ในสารละลายผสมระหว่างเอทานอลกับเททราไฮโดรพิวแรน (1:1 (v/v)) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันได้ด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ UV-visible spectroscopy

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของโคมอนอเมอร์และน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ (Target DP = 200)

Monomer composition in feed (mol%)		Monomer composition in copolymer (mol%) ^a		\overline{M}_n^a (kDa)	DP ^a	Copolymer abbreviation
PgMA	MPC	PgMA	MPC			
70	30	65	35	38.4	208	PPgMA ₆₅ MPC ₃₅
50	50	45	55	46.7	213	PPgMA ₄₅ MPC ₅₅
30	70	38	62	40.0	173	PPgMA ₃₈ MPC ₆₂

^a Calculated from ¹H NMR data

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ด้วย FTIR spectroscopy จากรูปที่ 1.2 สามารถสังเกตเห็นพีกที่เป็นลักษณะเฉพาะของหน่วยซ้ำ MPC คือ C=O (ester) stretching ที่ตำแหน่ง 1725 cm^{-1} , asymmetric O=P-O stretching ที่ตำแหน่ง 1240 cm^{-1} , symmetric O=P-O stretching, ที่ตำแหน่ง 1087 cm^{-1} และ $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ที่ตำแหน่ง 960 cm^{-1} ส่วนพีกที่เป็นลักษณะเฉพาะของ PgMA สังเกตได้จากการปรากฏของพีก $\text{-C}\equiv\text{C-}$ stretching ที่ตำแหน่ง 2127 cm^{-1} โดยความเข้มของพีกดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับองค์ประกอบ PgMA ที่เพิ่มขึ้นในโคพอลิเมอร์



รูปที่ 1.2 FTIR spectra ของ (a) PPgMA₃₈MPC₆₂ (40.0 kDa), (b) PPgMA₄₅MPC₅₅ (46.7 kDa) และ (c) PPgMA₆₅MPC₃₅ (38.4 kDa)

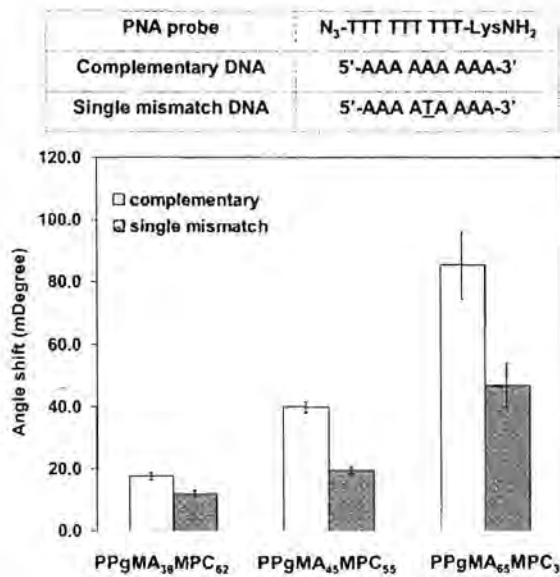
จากนั้นจึงนำโคพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ไปตรึงลงบนแผ่นสับสเตรทกระจกเคลือบทองด้วยวิธี "grafting to" ผ่านการเกิดพันธะระหว่างหมู่ไทออลที่ปลายโซ่ของโคพอลิเมอร์กับพื้นผิวทอง โดยทำการแช่แผ่นสับสเตรทที่เคลือบทองหลังการทำความสะอาดด้วยสารละลายผสมระหว่าง $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ ที่อัตราส่วน 7:3 และ air plasma ลงในสารละลายพอลิเมอร์เข้มข้น 0.2 mM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการติดตามความสำเร็จในการตรึงโคพอลิเมอร์ด้วยเทคนิคการวัดมุมสัมผัสของน้ำ (water contact angle; WCA) และเทคนิค SPR (ตารางที่ 1.2) จากผลการทดลองพบว่าการตรึงโคพอลิเมอร์ PPgMA₆₅MPC₃₅ ลงบนพื้นผิวของวัสดุ ทำให้สามารถตรวจวัดมุมสัมผัสของน้ำได้มากที่สุด ($87.9 \pm 4.2\text{ degree}$) แสดงให้เห็นถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิว เนื่องจากการตรึงโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของ PgMA ที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำในปริมาณมาก และเมื่อตรึงโพรบพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคือ $\text{N}_3\text{-TTT TTT TTT-LysNH}_2$ สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary DNA) คือ 5'-AAA AAA AAA-3' ลงบนพื้นผิวของวัสดุที่มีการตรึงโคพอลิเมอร์ PPgMA₆₅MPC₃₅ ผ่านปฏิกิริยาคลิค ระหว่างหมู่แอลไคโนของโคพอลิเมอร์และเอไซด์ของพีเอ็นเอ พบว่ามุมสัมผัสของน้ำมีค่าลดลง ($74.5 \pm 2.2\text{ degree}$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการตรึงพีเอ็นเอลงบนโคพอลิเมอร์แพลตฟอร์มได้ ในขณะที่สับสเตรทที่มีการตรึงด้วยโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ PgMA น้อยกว่า ได้แก่ PPgMA₃₈MPC₆₂ และ PPgMA₄₅MPC₅₅ นั้นพบว่ามีมุมสัมผัสของน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากทำการตรึงพีเอ็นเอ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นความสำเร็จทั้งในขั้นตอนการตรึงโคพอลิเมอร์ของ PPgMAMPC ลงบนสับสเตรทที่เคลือบทองและขั้นตอนการตรึงโพรบพีเอ็นเอลงบนโคพอลิเมอร์ด้วยปฏิกิริยาคลิคได้ นอกจากนี้ได้ทำการติดตาม

การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยเทคนิค SPR โดยจากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 1.2 พบว่าสามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้โดยวิเคราะห์จากค่ามุม SPR ที่เปลี่ยนไป (SPR angle shift) และจากข้อมูลดังกล่าวทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณของโคพอลิเมอร์และโพรบพีเอ็นเอที่ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของวัสดุได้

ตารางที่ 1.2 ค่ามุมสัมผัสของน้ำและค่า SPR angle shift ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการตรึงโคพอลิเมอร์ PPgMAMPC ที่มีอัตราส่วนแตกต่างกันลงบนสับสเตรทกระจกเคลือบทองตามด้วยการตรึงพีเอ็นเอโพรบ

Entry	Sample	Water contact angle (degree)	SPR data	
			Angle shift (mDegree)	Quantity ng/cm ²
1	Au	71.9 ± 1.3	-	-
2	Au-PPgMA ₃₈ MPC ₆₂	44.6 ± 0.9	1024.8 ± 81.8	854.0 ± 68.1
3	Au-PPgMA ₄₅ MPC ₅₅	46.6 ± 3.5	882.1 ± 166.6	735 ± 138.9
4	Au-PPgMA ₆₅ MPC ₃₅	87.9 ± 4.2	1323.1 ± 56.1	1102 ± 46.8
5	Au-PPgMA ₃₈ MPC ₆₂ -PNA	66.5 ± 2.8	102.0 ± 0.0	85 ± 0.0
6	Au-PPgMA ₄₅ MPC ₅₅ -PNA	60.6 ± 2.2	74.8 ± 5.9	62.3 ± 6.3
7	Au-PPgMA ₆₅ MPC ₃₅ -PNA	74.5 ± 2.2	132.6 ± 113.1	110.5 ± 0.1

หลังจากตรึงโพรบพีเอ็นเอ (N₃-TTT TTT TTT-LysNH₂) ลงบนโคพอลิเมอร์แล้วจึงนำไปการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ ทั้งแบบที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary DNA) และแบบที่ลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch DNA) ด้วยเทคนิค SPR เบื้องต้นได้ทำการตรวจวิเคราะห์กับดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 µM ในสารละลาย phosphate buffer saline (pH = 7.4) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 mM โดยจากผลการทดลองในรูปที่ 1.3 พบว่าแพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ PgMA ที่มีหมู่แอลไคโนซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาคlickกับไฮดรอกซิลของโพรบพีเอ็นเอปริมาณมากจะสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้ ในปริมาณที่มากตามไปด้วย โดยสับสเตรทที่ถูกตรึงด้วย PPgMA₆₅MPC₃₅ สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณมากที่สุด (85.5 ± 10.9 mDegree) รองลงมาคือ PPgMA₄₅MPC₅₅ (39.9 ± 1.8 mDegree) และ PPgMA₃₈MPC₆₂ (17.6 ± 1.1 mDegree) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ PgMA มาก ไม่เพียงแต่จะตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมได้ในปริมาณมากเท่านั้น แต่ยังตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้มากเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการที่แอลไคโนบนโคพอลิเมอร์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาคlickกับโพรบพีเอ็นเอได้ทั้งหมดดังนั้นจึงทำให้หมู่แอลไคโนที่เหลือนี้ไปเกิดดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific adsorption) กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้



รูปที่ 1.3 SPR angle shift ที่เปลี่ยนแปลงไปบนแพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ PPgMAMPC ที่มีอัตราส่วนระหว่างมอนอเมอร์แตกต่างกันเมื่อนำไปตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งที่เป็นคู่สมกัน (complementary DNA) และแบบที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch DNA)

ตารางที่ 1.3 ค่า %hybridization efficiency และค่า %mismatch discrimination ในการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยของแพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ PPgMAMPC และตรึงด้วยพีเอ็นเอไอโพรบ

Sample	%HE _{com}	%MD
Au-PPgMA ₃₈ MPC ₆₂ -PNA	20%	32%
Au-PPgMA ₄₅ MPC ₅₅ -PNA	61%	52%
Au-PPgMA ₆₅ MPC ₃₅ -PNA	71%	58%
Au-S-PNA	20%	54%
(Biosens. Bioelectron. 2009, 24, 3544-3549)		
Au-biotin-SA-biotin-PNA	58%	>90%
(Biosens. Bioelectron. 2010, 25, 1064-1069)		

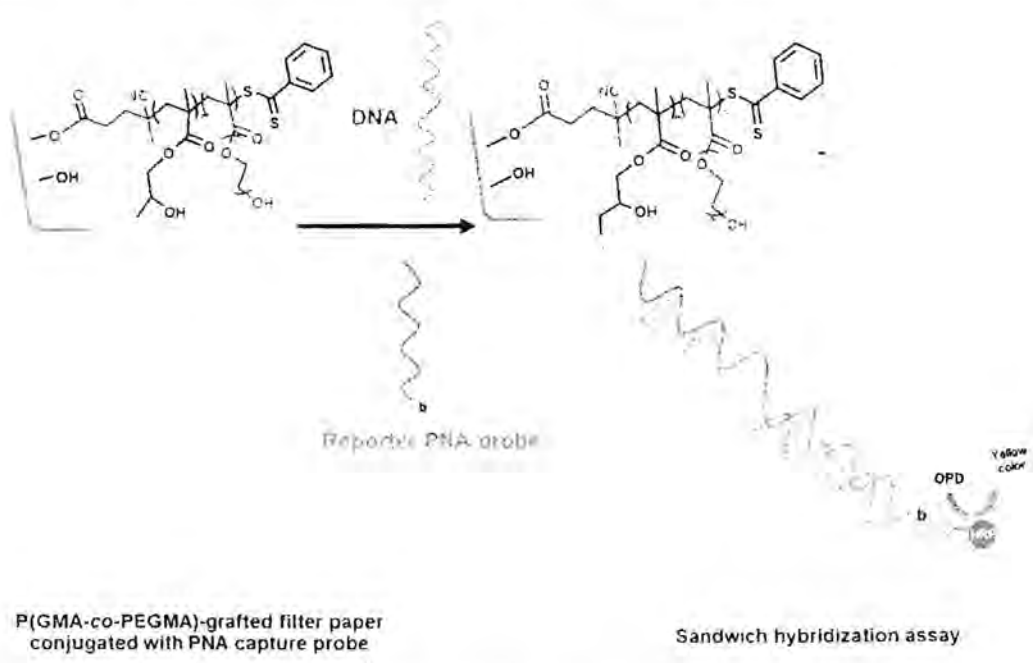
$$\%HE = \frac{\text{target density}}{\text{probe density}} \times 100$$

$$\%MD = \frac{\%HE \text{ of complementary DNA} - \%HE \text{ of mismatched DNA}}{\%HE \text{ of complementary DNA}} \times 100$$

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค SPR มาคำนวณค่าประสิทธิภาพในการจับยึดกับดีเอ็นเอ ในรูปของ %hybridization efficiency (%HE) และ %mismatch discrimination (%MD) (ตารางที่ 1.3) พบว่าการตรึงโพรบพีเอ็นเอลงบนแพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ PPgMA₆₅MPC₃₅ มีค่า %HE สูงที่สุด (71%) เมื่อเปรียบเทียบกับแพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์สัดส่วนอื่น และยังมีค่าสูงกว่าระบบที่ทำการตรึงโพรบพีเอ็นเอลงบนสับสเตรทที่เคลือบทองโดยตรงผ่านการเกิด self-assembly ระหว่างพีเอ็นเอที่มีหมู่ปลายเป็นหมู่ thiol กับพื้นผิวของทอง (Au-S-PNA) รวมถึงระบบที่มีการตรึงพีเอ็นเอผ่านไบโอติน (Au-biotin-PNA) แต่เมื่อพิจารณาค่า %MD พบว่ายังมีค่าต่ำกว่าระบบ Au-biotin-PNA ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากการที่แพลตฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ PPgMA₆₅MPC₃₅ นั้นสามารถเกิดการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้ตั้งเหตุผลที่กล่าวข้างต้นนั่นเอง

ส่วนที่ 2 การพัฒนากระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์รีซและพีเอ็นเอสำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณ

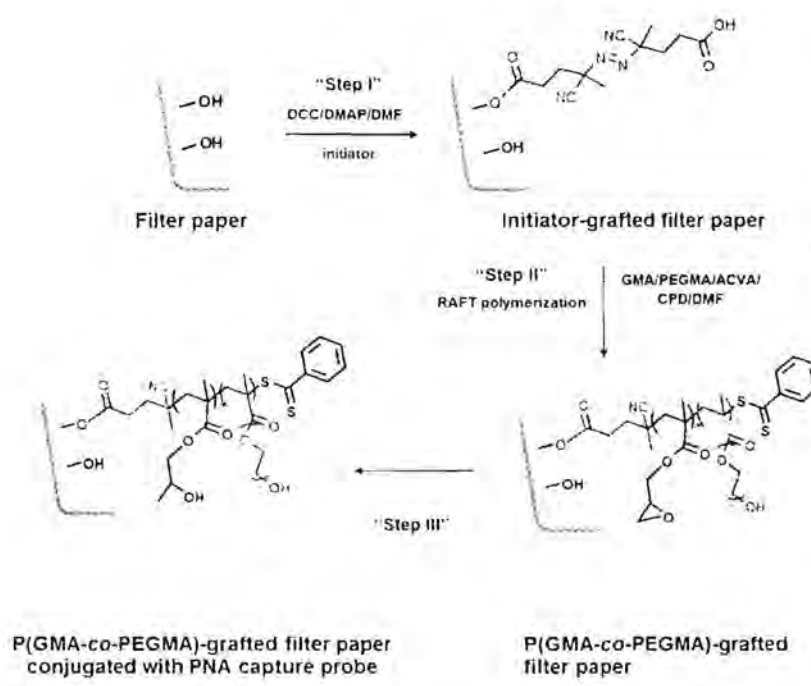
เป็นงานวิจัยที่สนใจจะพัฒนาวิธีการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด poly(glycidyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methacrylate) หรือ P(GMA-co-PEGMA) ซึ่งมีหมู่อีพ็อกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยาการเปิดวง (ring opening reaction) ด้วยหมู่เอมีโนของโพรบ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ acpcPNA เป็นโพรบ ทั้งนี้จะตรวจวัดการจับยึดระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเกิดสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยแนวทางที่ใช้ในการขยายสัญญาณเป็นการใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณในรูปแบบ sandwich hybridization โดยใช้โพรบ acpcPNA 2 ชนิด ชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็น capture probe ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และอีกชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็น reporter probe ซึ่งใช้ในการขยายสัญญาณ ตามรูปแบบที่แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สมการแสดงการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็น capture probe และ reporter probe ร่วมกับกระดาษที่ตรึงด้วย P(GMA-co-PEGMA) brushes และใช้การขยายสัญญาณ ในรูปแบบ sandwich hybridization

2.1 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของกระดาษกรองที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัช

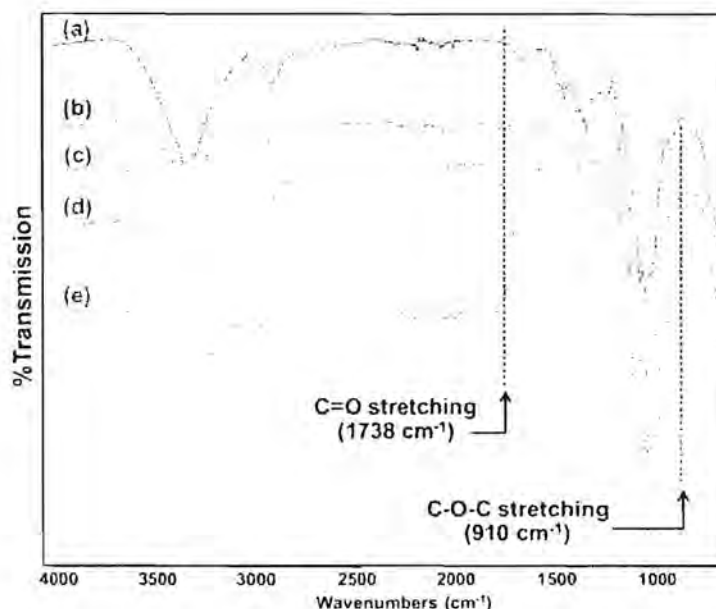
สามารถเตรียมกระดาษกรองที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัช หรือ P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper โดยเริ่มจากการตรึงหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมโรไลเซชันผ่านปฏิกิริยาระหว่าง 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลสบนพื้นผิวกระดาษกรอง โดยใช้ *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ และใช้ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่ติดหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาที่เตรียมได้ข้างต้นไปทำปฏิกิริยาพอลิเมโรไลเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ผ่านกลไกแบบ reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) โดยใช้ ACVA เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยา และ 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPD) เป็นสารถ่ายโอนโซ่ โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง GMA:PEGMA เป็น 70:30 และ 30:70 ทั้งนี้กำหนดให้ degree of polymerization (DP) มีค่าเท่ากับ 200 แสดงรายละเอียดของการเตรียมใน Step I-II รูปที่ 2.2 ในขั้นตอนการตรึง PNA capture probe ลงบน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปิดวงอีพอกไซด์ในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ในหน่วยซ้ำส่วนที่เป็น GMA (Step III รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 สมการแสดงการเตรียม P(GMA-co-PEGMA)-filter paper ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization (Step I-II) และการตรึง PNA capture probe โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปิดวงอีพอกไซด์

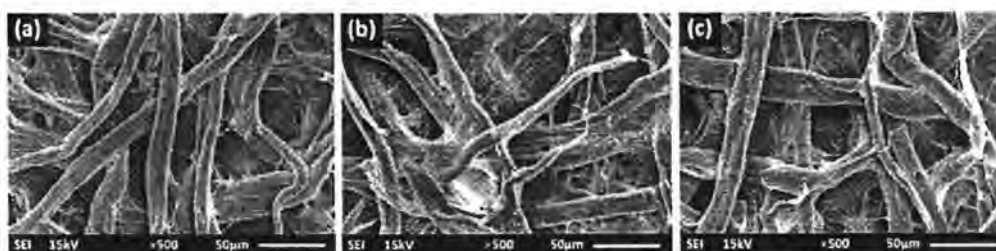
จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวกระดาษกรองด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy (รูปที่ 2.3) พบพีก C=O stretching ของหมู่เอสเทอร์ของตัวริเริ่มปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 1738 cm^{-1} ในสเปกตรัม 2.3b หลังจากการตัดแปรพื้นผิวกระดาษด้วยหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมโรไลเซชัน ซึ่งไม่พบพีกดังกล่าวบนกระดาษกรองที่ยังไม่ได้ตัดแปรพื้นผิว (2.3a) แสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาลงไปได้ และจากสเปกตรัม 2.3c จะพบพีกในตำแหน่งดังกล่าวที่มีความเข้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด พร้อมกับปรากฏพีก C-O-C stretching ของวงอีพอกไซด์ในโครงสร้างของ GMA ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงโคพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวกระดาษกรองได้ ทั้งนี้อัตราส่วนระหว่าง C-O-

C stretching ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} และ C=O stretching ที่ตำแหน่ง 1738 cm^{-1} จะแปรผันตามอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นของ GMA ในโคพอลิเมอร์จาก 30 เป็น 70% (2.3c เทียบกับ 2.3d) สามารถยืนยันการมีอยู่ของ PNA capture probe บนพื้นผิวของ P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper หลังจากคอนจูเกตกับพีเอ็นเอแล้ว โดยอาศัยการติดตามการลดลงของพีค C-O-C stretching ของวงอิพ็อกไซด์ ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} ในพีค 2.3e



รูปที่ 2.3 FT-IR สเปกตรัมของกระดาษกรอง: (a) ก่อนการตัดแปรรูป, (b) หลังจากการติดหมูรีเริ่ม, หลังจากกราฟต์ด้วย P(GMA-co-PEGMA) ที่มี GMA:PEGMA เท่ากับ (c) 30:70 and (d) 70:30, และ (e) หลังจากคอนจูเกตกับ PNA capture probe

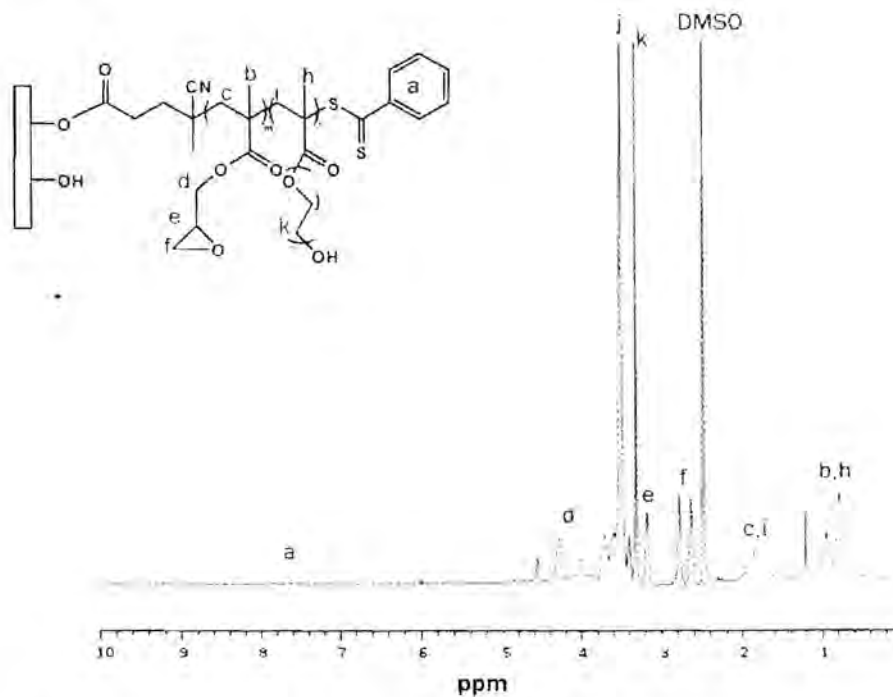
จากรูปที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของกระดาษในระดับไมโครเมตรหลังจากการตรึงหมูรีเริ่มและการกราฟต์ด้วยโคพอลิเมอร์ แสดงให้เห็นว่าชั้นโคพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่มีความบางมาก นอกจากนี้ยังพบว่ากระดาษที่กราฟต์ด้วยโคพอลิเมอร์มีความทนต่อการฉีกขาด (tear resistance) ได้ดีกว่ากระดาษเริ่มต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจากการสัมผัสกับสารละลายหลายชนิดระหว่างขั้นตอนการติดพีเอ็นเอและการตรวจวัดดีเอ็นเอนับเป็นข้อดีอีกอย่างหนึ่งของวัสดุที่พัฒนาขึ้น



รูปที่ 2.4 เอสอีเอ็มไมโครกราฟต์ของกระดาษกรอง (a) ก่อนการตัดแปรรูป, (b) หลังจากการตรึงหมูรีเริ่ม และ (c) หลังจากการกราฟต์ด้วย P(GMA-co-PEGMA) (GMA:PEGMA of 70:30)

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโคพอลิเมอร์ P(GMA-co-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย

จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ P(GMA-co-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้ในสารละลายด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (รูปที่ 2.5) พบว่า P(GMA-co-PEGMA) จะแสดงสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลีน (CH_2) ในโซ่หลัก (H_c และ H_j) ที่ตำแหน่ง 1.6-1.9 ppm สัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิล (CH_3) (H_b และ H_n) ที่ตำแหน่ง 0.8-1.0 ppm สัญญาณโปรตอนของเมทิลีนของวงอีพ็อกไซด์ (H_i) ที่ตำแหน่ง 2.6-2.8 ppm สัญญาณโปรตอน e, k, j และ d (H_e , H_k , H_j และ H_d) ที่ตำแหน่ง 3.2, 3.4, 3.6 และ 4.2 ppm ตามลำดับ ในขณะที่โปรตอนของหมู่ dithiobenzoate (H_s) จะปรากฏสัญญาณในช่วง 7.4-8.0 ppm และสามารถคำนวณหาอัตราส่วนโมเลกุลและสัดส่วนระหว่าง GMA:PEGMA ในโคพอลิเมอร์ได้ตามสมการที่ 1-6 โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีกในสเปกตรัมของ P(GMA-co-PEGMA) ทั้งนี้แสดงน้ำหนักโมเลกุล และอัตราส่วนโดยโมลของ GMA:PEGMA ใน P(GMA-co-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมายในตารางที่ 2.1 ซึ่งพบว่าค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าเป้าหมายแสดงให้เห็นว่าสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยา RAFT polymerization ได้ดี



รูปที่ 2.5 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ P(GMA-co-PEGMA) เมื่อใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} = \left\{ \frac{\text{intergral of the Hb และ Hh/6}}{\text{intergral of the Ha/5}} \right\} \times 2 \quad \text{สมการที่ 2.1}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA} = \left\{ \frac{\text{intergral of the Hf/2}}{\text{intergral of the Ha/5}} \right\} \quad \text{สมการที่ 2.2}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA} = \text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} - \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ PEGMA} \quad \text{สมการที่ 2.3}$$

$$M_n = [\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA} \times \text{MW ของ GMA (142 g/mol)} + \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ PEGMA} \times \text{MW ของ PEGMA (360 g/mol)}] \quad \text{สมการที่ 2.4}$$

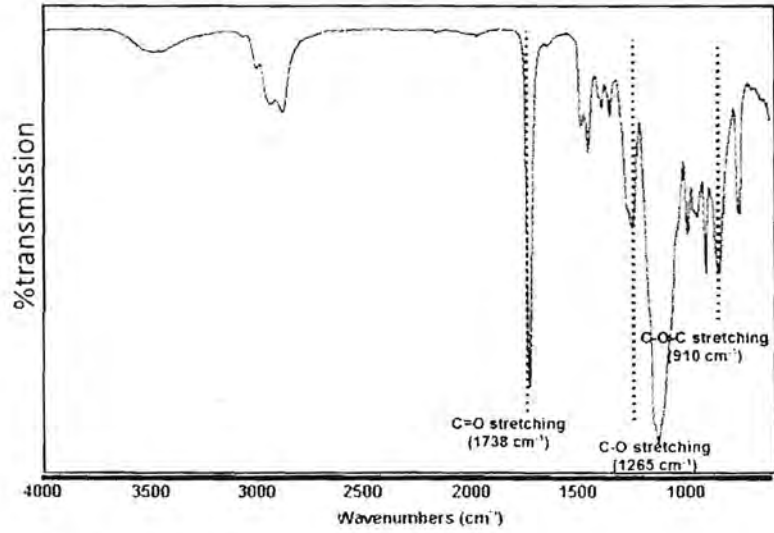
$$\text{สัดส่วนของ GMA ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \quad \text{สมการที่ 2.5}$$

$$\text{สัดส่วนของ PEGMA ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ PEGMA}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \quad \text{สมการที่ 2.6}$$

ตารางที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุล และอัตราส่วนโดยโมลของ GMA:PEGMA ใน P(GMA-co-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมาย

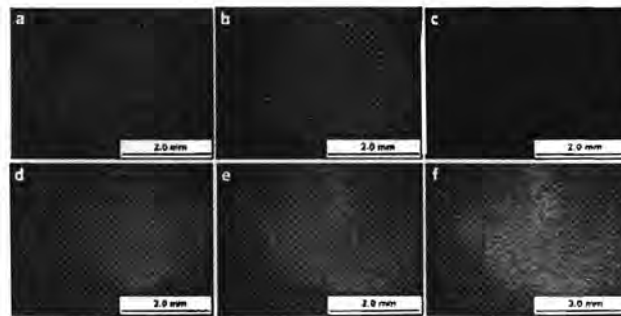
	ค่าเป้าหมาย	ค่าที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$
น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	41760	42171
สัดส่วน GMA:PEGMA ในโคพอลิเมอร์ (%)	70:30	56:44

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ P(GMA-co-PEGMA) ด้วยเทคนิค FT-IR (รูปที่ 2.6) จากสเปกตรัมจะพบพีกที่แสดงลักษณะเฉพาะดังนี้ C=O stretching ของเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 1738 cm^{-1} , C-O stretching ที่ตำแหน่ง 1265 cm^{-1} และพีก C-O-C stretching ของวงอีพอกไซด์ในโครงสร้างของ GMA ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ P(GMA-co-PEGMA) ได้

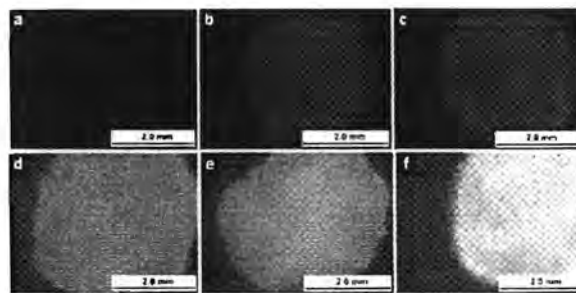


รูปที่ 2.6 FTIR spectrum ของ P(GMA-co-PEGMA)

2.3 การตรึง PNA capture probe



รูปที่ 2.7 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ของกระดาษกรองหลังจากคอนจูเกตกับ fluo-o-PNA(T9)-LysNH₂ ในสารละลาย 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA ความเข้มข้นต่างๆ: (a,d) 0.1, (b,e) 0.2, and (c,f) 0.3 μM : (a-c) กระดาษกรองก่อนการดัดแปร; (d-f) P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper (GMA:PEGMA ,70:30)



รูปที่ 2.8 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ของกระดาษกรองหลังจากคอนจูเกตกับ fluo-o-PNA(T9)-LysNH₂ ในสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.1 M NaCO₃-NaHCO₃ buffer ที่มี pH ต่างๆ: (a,d) 8.0, (b,e) 9.0, และ (c,f) 10.0: (a-c) กระดาษกรองก่อนการดัดแปร; (d-f) P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper (GMA:PEGMA ,70:30)

จากหลักการที่ว่าปฏิกิริยาเปิดวงอีพ็อกไซด์จะเกิดได้ดีในสารละลายเบส ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการปรับเปลี่ยนความเป็นเบสของสารละลายในขั้นการคอนจูเกตกับพีเอ็นเอ โดยการเติม triethylamine (TEA) ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.2 and 0.3 μM) หรือการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3$ buffer) ที่มี pH ในช่วง 8-10 ทั้งนี้ใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ คือ flu-o-PNA(T9)-LysNH₂ เป็นแบบจำลองในการศึกษานี้ เพื่อสามารถติดตามการคอนจูเกตได้ด้วย Fluorescence microscope จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 2.7-2.8 พบว่าปริมาณพีเอ็นเอที่คอนจูเกตบนกระดาษมีเพิ่มขึ้นตามความเป็นเบสของสารละลายที่เพิ่มขึ้น ทั้งโดยการเพิ่มความเข้มข้นของ TEA และการเพิ่ม pH ของสารละลายบัฟเฟอร์

2.4 การนำกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์รัชไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ

จากผลการทดลองข้างต้นผู้วิจัยได้เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณการตรึงพีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากน้อยไปมาก 3 สภาวะ ได้แก่ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA 0.1 และ 0.3 μM และ 0.1 M $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3$ buffer ที่มี pH 10 ไปใช้ในการคอนจูเกต PNA capture probe (PNA (Cap)) บน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอตามรูปแบบที่แสดงในรูปที่ 2.1 ต่อไป ทั้งนี้แสดงรายละเอียดของพีเอ็นเอทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลของพีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Name	sequence	m/z (target)	m/z (observed)	T _m (°C)
PNA (Cap)	N-Ac-GGAACCTGCGCG-LysNH ₂ -C	4259.55	4259.38	77.6
b-PNA (Ser)	N-biotin-(egl) ₂ -AACACACAG ACT- SerOH -C	4630.02	4630.99	62.2
b-PNA (Lys)	N-biotin-(egl) ₂ -AACACACAG ACT- LysNH ₂ -C	4670.12	4669.21	not measured
PNA (T9) ^a	N-flu-(egl)-TTTTTTTTT-LysNH ₂ -C	-	-	-

พีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการออกแบบให้มีลำดับเบสสัมพันธ์กับลำดับเบสของดีเอ็นเอใน human leukocyte antigen (HLA) alleles โดยจำเพาะเจาะจงไปที่ HLA-B*1502 alleles ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติรุนแรงของผิวหนังผู้ป่วยที่เป็นโรค Stevens-Johnson syndrome เมื่อได้รับยา carbamazepine ซึ่งเป็นยาที่ใช้บำบัดรักษาอาการชัก ทั้งนี้จะทำการตรึง PNA(Cap) บนพื้นผิวของ P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper เพื่อจะได้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นจึงใช้ b-PNA (Ser) ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเป็น reporter probe ที่จะทำให้เกิดการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase ที่คอนจูเกตกับสเตรปทาวิดิน (SA-HRP) ลำดับเบสของทั้งพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Code	Sequence	Description
PNA (Cap)	Ac-GGAACCTGCGCG-LysNH ₂	Capture probe
b-PNA (Lys)	b-o-o-AACACACAGACT-LysNH ₂	Positive control
b-PNA (Ser)	b-o-o-AACACACAGACT-SerOH	Reporter probe
b-DNA	d(5'-CGCGCAGGTTCC-b-3')	Positive control
DNA 1	d(5'-CGCGCAGGTTCCGCTAA GTCTGTGTGTT-3')	Complementary to PNA(Cap)
DNA 2	d(5'-CGCGCTGGTTCGCTAAGT CTGTGTGTT-3')	Single mismatch to PNA(Cap)
DNA 3	d(5'-TATATCAAGGTTGCTACAG TGAGAGAGG-3')	Non-complementary PNA(Cap)

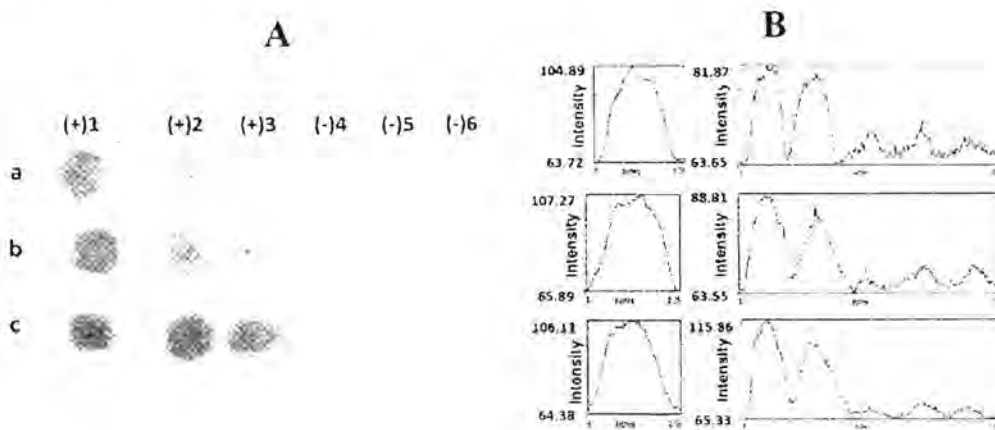
ส่วนรายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งแสดงไว้ในตารางที่ 2.3 มีการใช้ b-PNA(Lys) ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกับ b-PNA(Ser) ที่เป็น reporter probe หยดบนตำแหน่งที่ 1 เป็นตัวควบคุมผลทดสอบบวก (positive control) เพื่อแสดงการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ที่ให้ความเข้มมากที่สุด ส่วน b-DNA ใช้หยดบนตำแหน่งที่ 2 เพื่อแสดงให้เห็นว่าการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ผ่านการเกิดไฮบริดเซชันนั้นจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อดีเอ็นเอมีลำดับเบสคู่สมกับพีเอ็นเอเท่านั้น ทั้งนี้ผลการทดสอบจะแสดงใน 2 รูปแบบคือ (1) scanned images (column A) และ (2) profile images (column B).

ตารางที่ 2.3 รายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งสำหรับผลที่แสดงในรูปที่ 15-16

Spot position	DNA	PNA	Remark ^a
1	-	b-PNA(Lys)	(+)
2	b-DNA HLA-B*1502	-	(+)
3	DNA 1 HLA-B*1502	b-PNA (Ser)	(+)
4	DNA 3	b-PNA (Ser)	(-)
5	-	b-PNA (Ser)	(-)
6	-	-	(-)

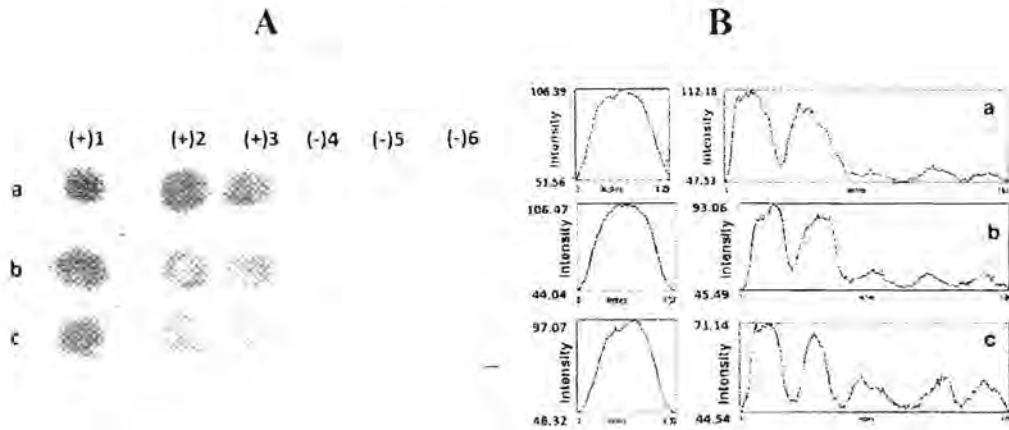
^a(+) = positive result, (-) = negative result

ประสิทธิภาพในการตรวจวัดพิจารณาได้จากการปรากฏสัญญาณเข้มที่ตำแหน่ง 3 ซึ่งมีการหยุด DNA1 [(+3)] ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับ b-PNA (Ser) แต่ไม่ปรากฏสัญญาณที่ตำแหน่ง 4 ที่มีการหยุด DNA3 [(-4)] ซึ่งมีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง และความสามารถในการป้องกันการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงในตำแหน่งที่ 5 และ 6 ของ b-PNA(Ser) [(-5)] และ SA-HRP [(-6)], ตามลำดับ การทดสอบแรกเป็นการศึกษาผลของ ionic strength ที่มีต่อการจับกับดีเอ็นเอ ทั้งนี้เลือกใช้ P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ที่คอนจูเกตกับ PNA(Cap) ใน 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA 0.1 μ M จากรูปที่ 2.9 จะเห็นได้ว่าสัญญาณที่ตำแหน่ง 1 และ 2 ซึ่งมีการหยุด b-PNA(Lys) เป็นตัวควบคุมสำหรับ reporter probe มีความเข้มมากแสดงให้เห็นว่าการขยายสัญญาณที่เกิดจาก biotin-SA-HRP conjugation มีประสิทธิภาพดี สัญญาณเข้มที่จุด 3 แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของการทดสอบ เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl จาก 10 เป็น 50 และ 100 mM ไม่เพียงแต่จะช่วยเพิ่มความเข้มของสัญญาณในตำแหน่งที่เป็นผลทดสอบบวกแล้ว ยังช่วยลดความเข้มที่เกิดจากการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงที่เกิดจาก non-complementary DNA sequence [(-4)], reporter probe [(-5)], and SA-HRP [(-6)] อีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการจับยึดกับดีเอ็นเอ เป็น 0.5 mM phosphate buffer pH 7.0 และมีการเติม 100 mM NaCl ไปใช้ในการทดสอบในลำดับต่อไป



รูปที่ 2.9 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) ในสารละลาย 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA 0.1 μ M, และทดสอบการจับกับดีเอ็นเอใน 0.5 mM phosphate buffer pH 7.0 ที่มีการเติม NaCl ความเข้มข้น (a) 10 mM, (b) 50 mM และ (c) 100 mM ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

จากผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 2.10 พบว่าประสิทธิภาพดังกล่าวจะแปรผกผันกับปริมาณพีเอ็นเอที่ตรงได้ กล่าวคือสภาวะที่ให้ปริมาณการตรึงพีเอ็นเอต่ำที่สุดคือใช้ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม 0.1 μ M TEA ให้ผลที่ดีกว่าสภาวะที่ให้ปริมาณการตรึงพีเอ็นเอสูงกว่าคือ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม 0.3 μ M TEA และ สารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.1 M NaCO₃-NaHCO₃ buffer ที่มี pH 10 ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม 0.1 μ M TEA เป็นสารละลายในการตรึง PNA(Cap) สำหรับการทดสอบในลำดับต่อไป



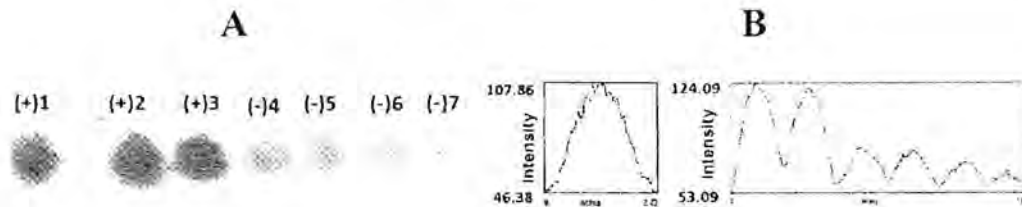
รูปที่ 2.10 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) โดยใช้สภาวะต่างๆ: 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA: (a) 0.1 and (b) 0.3 μ M, และ (c) ในสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.1 M NaCO₃-NaHCO₃ buffer ที่มี pH 10 ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

นอกจากนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ DNA2 ในการทดสอบเพื่อแสดงความสามารถในการบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ผิดไป 1 ตำแหน่งกับดีเอ็นเอที่เป็นเบสคู่สม (DNA1) รายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งแสดงไว้ในตารางที่ 2.4 จากผลการทดสอบที่แสดงในรูปที่ 2.11 พบว่าสัญญาณที่ปรากฏในจุดที่ 3 ซึ่งเป็นของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA1 [(+3)] กับ PNA(Cap) มีความเข้มเท่ากับสัญญาณของจุดที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นของตัวควบคุมผลทดสอบบวกของ PNA(Lys) [(+1)] และ b-DNA [(+2)] ตามลำดับ ในขณะที่สัญญาณ background ที่ปรากฏในจุดที่ 4 ซึ่งเป็นของ DNA2 [(-4)] ที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง มีความเข้มอยู่ในระดับเดียวกับสัญญาณที่ปรากฏในจุดที่ 5 ซึ่งเป็นของ DNA3 [(-5)] ที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของแพลตฟอร์มที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ผลในรูปที่ 2.12 ยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ยังสามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 100 fmol

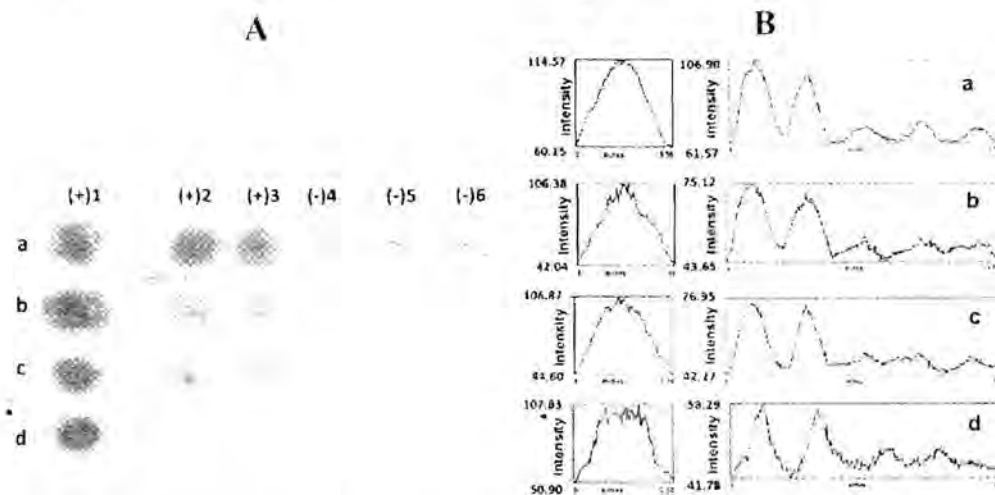
ตารางที่ 2.4 รายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งสำหรับผลการทดสอบที่แสดงในรูปที่ 2.11

Sequence	Spot position						
	1	2	3	4	5	6	7
DNA	-	b-DNA	DNA 1	DNA 2	DNA 3	-	-
PNA	b-PNA (Lys)	-	b-PNA (Ser)	b-PNA (Ser)	b-PNA (Ser)	b-PNA (Ser)	-
^a Remark	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

^a(+) = positive result, (-) = negative result



รูปที่ 2.11 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง และทุกตำแหน่ง โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

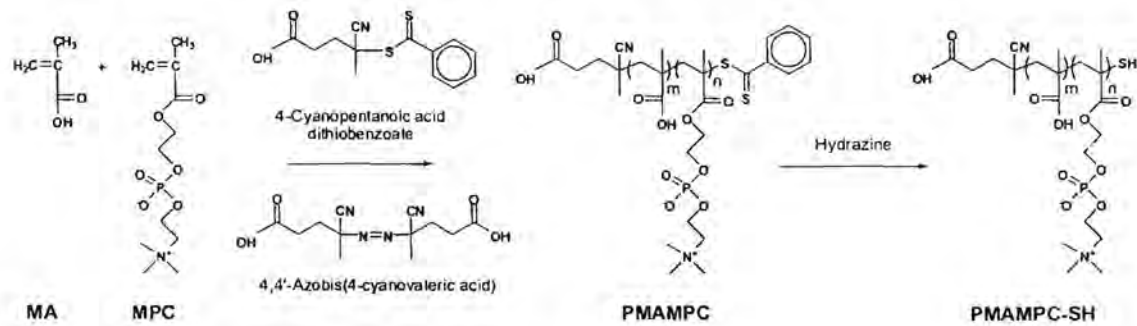


รูปที่ 2.12 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 2 pmol (2 μ L of 1 μ M), (b) 1 pmol (1 μ L of 1 μ M), (c) 100 fmol (1 μ L of 100 nM), and (d) 50 fmol (0.5 μ L of 100 nM) โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

ตอนที่ 3 การพัฒนาแท่งนาโนทองเป็นพาหะในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

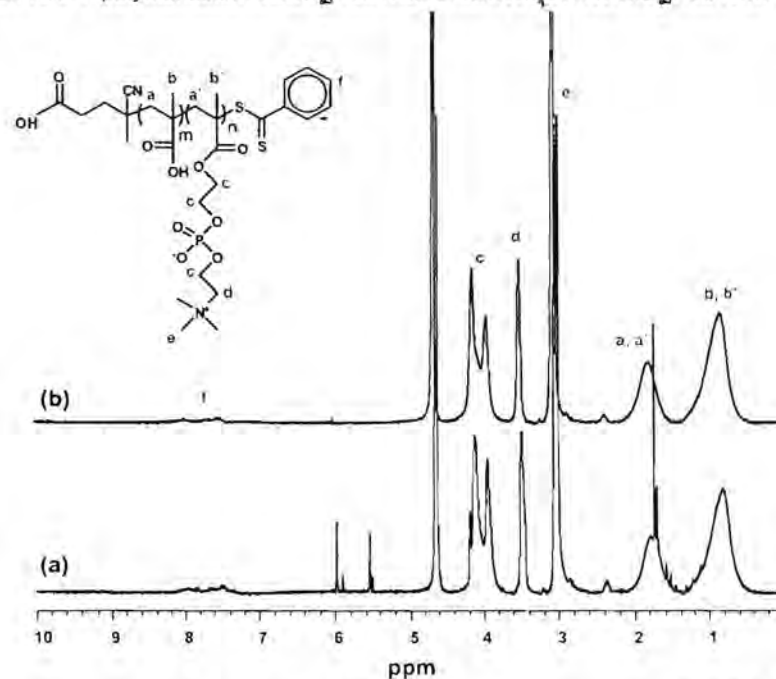
3.1 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแท่งนาโนทองที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC

ขั้นแรกเป็นการสังเคราะห์ PMAMPC ที่มี degree of polymerization (DP) = 30 และอัตราส่วนระหว่าง MA และ MPC = 70:30 ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) ตามด้วยการเปลี่ยนหมู่ dithiobenzoate ที่ปลายโซ่พอลิเมอร์ให้เป็นหมู่ thiol โดยการทำปฏิกิริยา aminolysis ด้วย hydrazine ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์ PMAMPC-SH ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization

จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ PMAMPC ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (รูปที่ 3.2) พบว่า PMAMPC จะแสดงสัญญาณโปรตอนของ CH_2 ในโครงสร้างหลัก (H_a และ H_a') ที่ตำแหน่ง 1.4-2.0 ppm สัญญาณโปรตอนของ CH_3 (H_b และ H_b') ที่ตำแหน่ง 0.6-1.2 ppm สัญญาณโปรตอนของ $\text{N}'(\text{CH}_3)_3$ (H_c) ที่ตำแหน่ง 2.8-3.2 ppm สัญญาณโปรตอน c และ d (H_c และ H_d) ที่ตำแหน่ง 3.8-4.2 ppm และ 3.4-3.6 ppm ตามลำดับ และโปรตอนของหมู่ dithiobenzoate (H_e) ที่ตำแหน่ง 7.4-8.2 ppm โดยสามารถนำค่าพื้นที่ใต้พีกในสเปกตรัมของ PMAMPC ก่อนทำให้บริสุทธิ์มาคำนวณหา % conversion ได้ โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของ H_a และ H_a' (1.4-2.0 ppm) ใน PMAMPC backbone กับผลรวมพื้นที่ใต้พีกของ H_a และ H_a' ใน PMAMPC backbone และในโครงสร้างมอนอเมอร์ (H_a และ H_a' ในโครงสร้างมอนอเมอร์จะปรากฏที่ตำแหน่ง 5.5 และ 6.0 ppm) นอกจากนี้ สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนระหว่าง MA:MPC ในโคพอลิเมอร์ได้ตามสมการที่ 4 และ 5-6 ตามลำดับ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีกในสเปกตรัมของ PMAMPC หลังทำให้บริสุทธิ์ ตารางที่ 3.1 แสดง % conversion น้ำหนักโมเลกุล และสัดส่วนระหว่าง MA:MPC ของ PMAMPC ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมาย ซึ่งพบว่าค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าเป้าหมาย แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา RAFT polymerization เป็นปฏิกิริยาที่สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ดี



รูปที่ 3.2 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ (a) PMAMPC ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และ (b) PMAMPC หลังทำให้บริสุทธิ์ เมื่อใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} = \left\{ \frac{\text{integral of the Hb และ Hb'/6}}{\text{integral of the Hf/5}} \right\} \times 2 \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC} = \left\{ \frac{\text{integral of the Hd/2}}{\text{integral of the Hf/5}} \right\} \times \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MA} = \text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} - \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC} \quad \text{สมการที่ 3.3}$$

$$M_n = [\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MA} \times \text{MW ของ MA (86.06 g/mol)} + \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC} \times \text{MW ของ MPC (295.68 g/mol)}] \quad \text{สมการที่ 3.4}$$

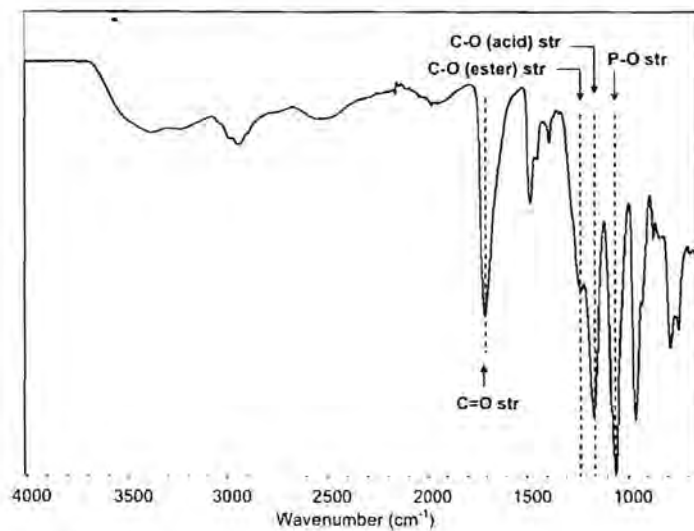
$$\text{สัดส่วนของ MA ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MA}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.5}$$

$$\text{สัดส่วนของ MPC ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.6}$$

ตารางที่ 3.1 % conversion น้ำหนักโมเลกุล และสัดส่วนระหว่าง MA:MPC ของ PMAMPC ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมาย

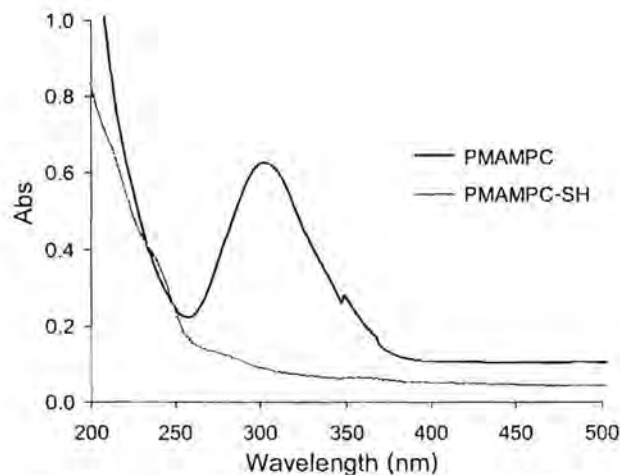
	ค่าเป้าหมาย	ค่าที่ได้จาก ¹ H-NMR
% conversion (%)	-	61.1
น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	4468.38	5498.03
สัดส่วน MA:MPC ในโคพอลิเมอร์ (%)	70:30	64:36

จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ PMAMPC ด้วยเทคนิค FT-IR (รูปที่ 3.3) จะพบพีกที่แสดงลักษณะเฉพาะดังนี้ ในส่วนของ MPC จะพบพีก C=O ของเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 1706 cm⁻¹, C-O ที่ตำแหน่ง 1222 cm⁻¹, P-O ที่ตำแหน่ง 1056 cm⁻¹ และ -N(CH₃)₃ ที่ตำแหน่ง 962 cm⁻¹ สำหรับส่วนของ MA จะพบพีก C=O ของ carboxylic acid ที่ตำแหน่ง 1706 cm⁻¹ และ C-O ที่ตำแหน่ง 1162 cm⁻¹ แสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ PMAMPC ได้



รูปที่ 3.3 FTIR spectrum ของ PMAMPC

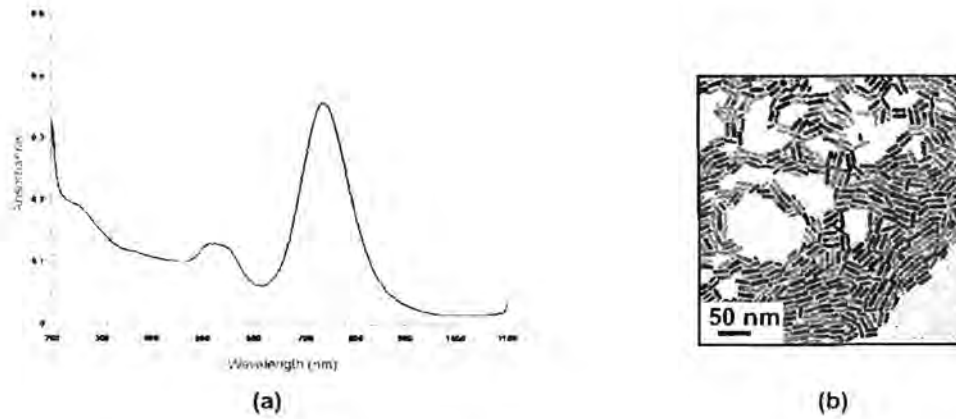
หมู่ dithioester ที่ปลายโซ่พอลิเมอร์สามารถเปลี่ยนให้เป็นหมู่ thiol ได้โดยการทำปฏิกิริยา aminolysis กับ hydrazine และสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้จากการหายไปของฟลักการดูดกลืนแสงของหมู่ dithioester เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy ดังแสดงในรูปที่ 3.4 พบว่า PMAMPC ก่อนการทำปฏิกิริยา aminolysis จะแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 300 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ dithioester ที่ปลายสายโซ่พอลิเมอร์ และฟลักดังกล่าวจะหายไปหลังจากทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ dithioester แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา aminolysis อย่างสมบูรณ์



รูปที่ 3.4 UV-Vis spectra ของ PMAMPC ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยา aminolysis

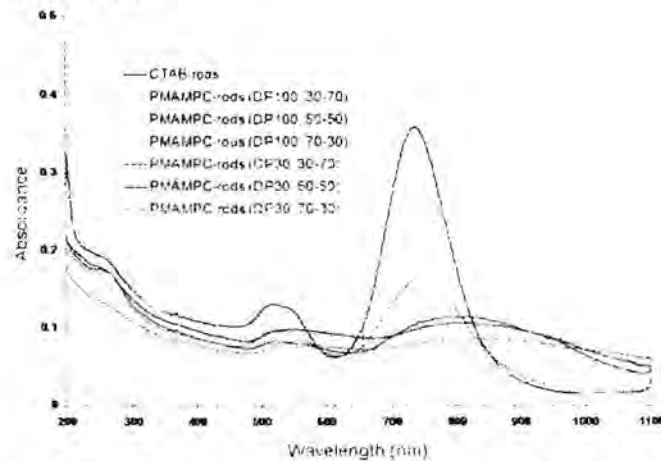
สำหรับ AuNRs ที่ทำให้เสถียรด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB-AuNRs) ซึ่ง CTAB ทำหน้าที่เป็น template ควบคุมให้อนุภาคมีรูปร่างเป็นแท่งด้วยนั้น สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธี seed-mediated growth โดยจากผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาค CTAB-AuNRs ด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy (รูปที่ 3.5a) จะพบฟลักการดูดกลืนแสง 2 ช่วงได้แก่ ที่ช่วงประมาณ 500 nm ซึ่งจะเป็นการดูดกลืนแสงในทิศทางด้านขวางของอนุภาค และที่ช่วงความยาวคลื่นในช่วงของ NIR คือประมาณ 800 nm ซึ่งจะเป็นการดูดกลืน

แสงในทิศทางด้านยาวของอนุภาค และเมื่อพิจารณารูปร่างของอนุภาคด้วยเทคนิค TEM (รูปที่ 3.5b) พบว่าอนุภาคมีรูปร่างเป็นแท่งเกือบทั้งหมด และมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดในแนวยาวและแนวขวางเท่ากับ 24.6 ± 3.15 nm และ 8.53 ± 1.42 nm ตามลำดับ







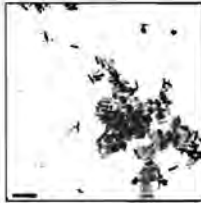

รูปที่ 3.5 (a) UV-Vis spectrum และ (b) ภาพถ่าย TEM ของ CTAB-AuNRs

จากนั้นสามารถเตรียม PMAMPC-AuNRs ได้โดยการนำ PMAMPC-SH มาแทนที่ CTAB บนพื้นผิวของ CTAB-AuNRs ที่สังเคราะห์ได้ข้างต้น (ligand exchange) ด้วยวิธี grafting-to ผ่านการเกิดพันธะ Au-S ระหว่างพื้นผิวทองและโคพอลิเมอร์ โดยจากผลการทดลองพบว่าทั้งน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนโคมอนอเมอร์ในโคพอลิเมอร์มีผลต่อความเสถียรของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ หากพิจารณาจาก UV-visible spectra (รูปที่ 3.6) และข้อมูลจากการวิเคราะห์ TEM (ตารางที่ 3.2) จะเห็นว่าการใช้พอลิเมอร์ที่มี DP เท่ากับ 100 จะได้อนุภาคที่ยังคงมีเสถียรภาพดี ซึ่งจะสังเกตได้จากการที่อนุภาคมีความยาวคี่นในการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ CTAB-AuNRs เริ่มต้นและมีการกระจายตัวที่ดี ยกเว้นในกรณีที่โคพอลิเมอร์มีสัดส่วน MPC น้อยคือ MA:MPC เท่ากับ 70:30 อนุภาคบางส่วนจะเกิดการรวมกลุ่มกัน (aggregation) ซึ่งพิจารณาได้จากพีกการดูดกลืนแสงที่กว้างมากขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปปรากฏที่ความยาวคลื่นที่สูงขึ้น สำหรับการวิเคราะห์โคพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง (DP=30) พบว่าอนุภาคจะเกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคในทุกสัดส่วนของโคมอนอเมอร์

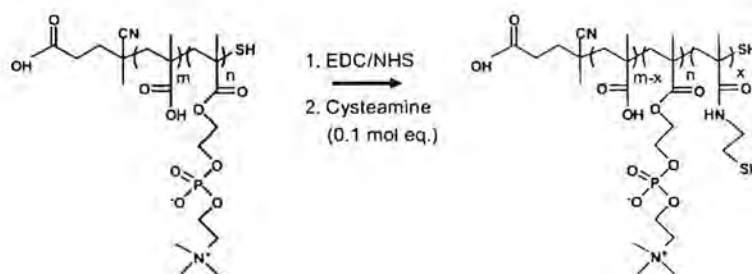


รูปที่ 3.6 UV-Vis spectra ของ PMAMPC-AuNRs ที่เตรียมจาก PMAMPC ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนโคมอนอเมอร์ต่างๆ

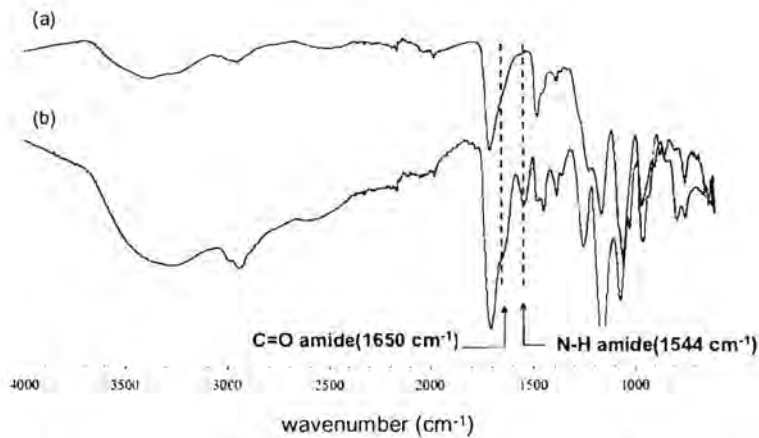
ตารางที่ 3.2 ภาพถ่าย TEM ของ PMAMPC-AuNRs ที่เตรียมจาก PMAMPC ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนโคมอนอเมอร์ต่างๆ (scale bar = 50 nm)

สัดส่วน (MA:MPC)	30:70	50:50	70:30
DP = 100			
DP = 30			

จากการทำการทดลองพบว่า การเพิ่มหมู่ไทออลลงในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ก่อนจะทำการตรึงบนอนุภาคจะทำให้ได้อนุภาคที่มีความเสถียรสูงขึ้น เนื่องจากเป็นหมู่ฟังก์ชันที่ใช้ในการติดพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวของ AuNRs จึงทำให้เกิดการติดสายโซ่พอลิเมอร์บน AuNRs ได้ดีขึ้น ทั้งนี้สามารถเพิ่มหมู่ไทออลได้โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบางส่วนของโครงสร้างของโคพอลิเมอร์กับ cysteamine (0.10 mol eq. to COOH in MA units) โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ (รูปที่ 3.7) ทั้งนี้สามารถยืนยันการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้จากเทคนิค FTIR (รูปที่ 3.8) โดยจะพบสัญญาณของ C=O stretching และ N-H bending ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพันธะเอไมด์ที่ตำแหน่ง 1650 และ 1544 cm^{-1} ตามลำดับ

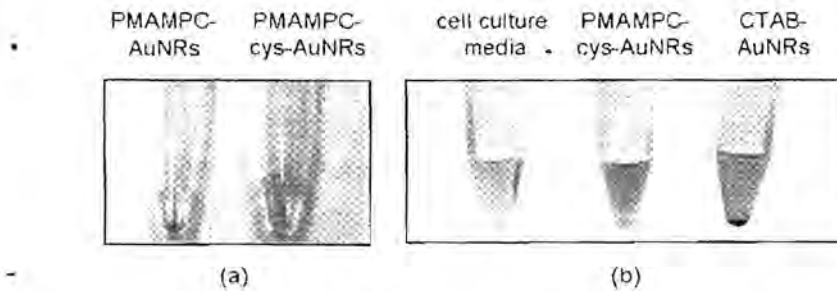


รูปที่ 3.7 สมการแสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง PMAMPC กับ cysteamine



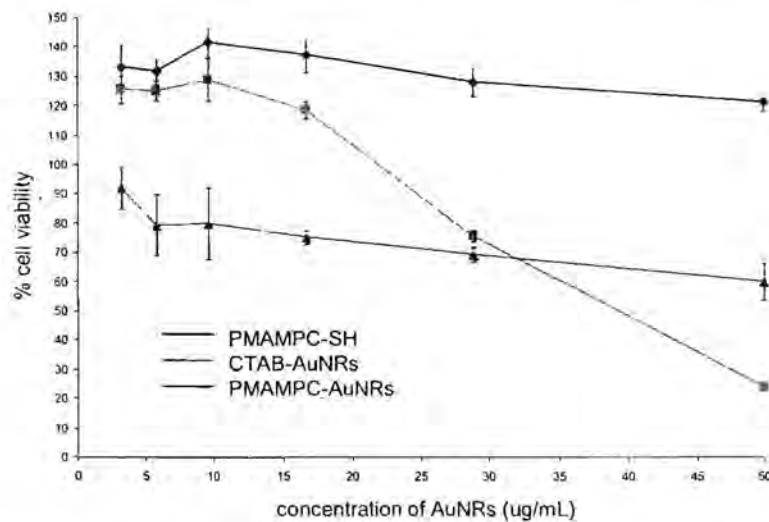
รูปที่ 3.8 FTIR spectra ของ PMAMPC-SH (a) ก่อน และ (b) หลังการทำปฏิกิริยากับ cysteamine

จากการพิจารณาเสถียรภาพของ AuNRs ที่ติดด้วย PMAMPC-SH ที่มีการเพิ่มหมู่ไทออลไปในโครงสร้าง (PMAMPC-cys-AuNRs) ดังแสดงในภาพถ่ายในรูปที่ 3.9 พบว่าจะได้อนุภาคที่มีความเสถียรสูง ไม่เกิดการรวมกลุ่มกันเมื่อนำไปกระจายตัวทั้งใน 10 mM PBS (pH 7.4) และอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture media) ที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนก็ตาม



รูปที่ 3.9 ภาพถ่ายของ AuNRs เมื่อกระจายตัวอยู่ใน (a) 10 mM PBS (pH 7.4) (b) cell culture media

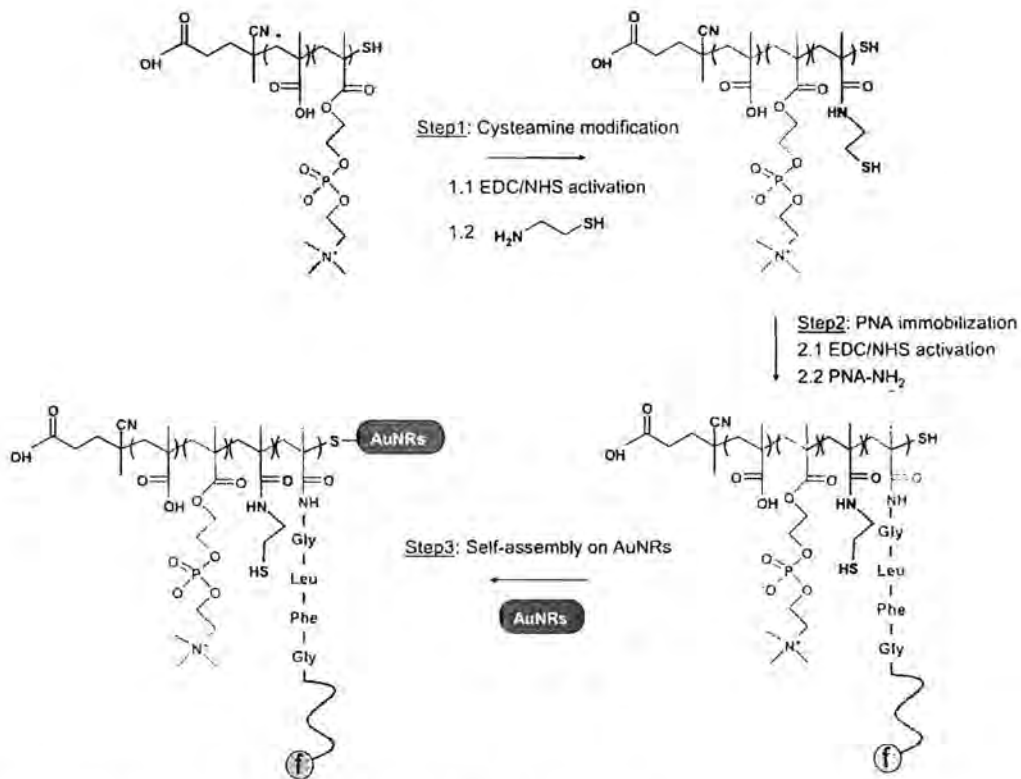
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ของ PMAMPC-AuNRs ที่เตรียมได้ ด้วยเทคนิค MTT assay (รูปที่ 3.10) พบว่า CTAB-AuNRs เริ่มต้นมีความเป็นพิษ เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคจะทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ (%cell viability) ลดลง ในขณะที่เมื่อทำการติดอนุภาคด้วย PMAMPC-SH ที่มีการเพิ่มหมู่ไทออลไปในโครงสร้างจะสามารถลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ได้ โดยจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตยังอยู่ในช่วง 70-90% ทำให้อนุภาคมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นพาหะสำหรับนำส่ง PNA เข้าสู่เซลล์ได้



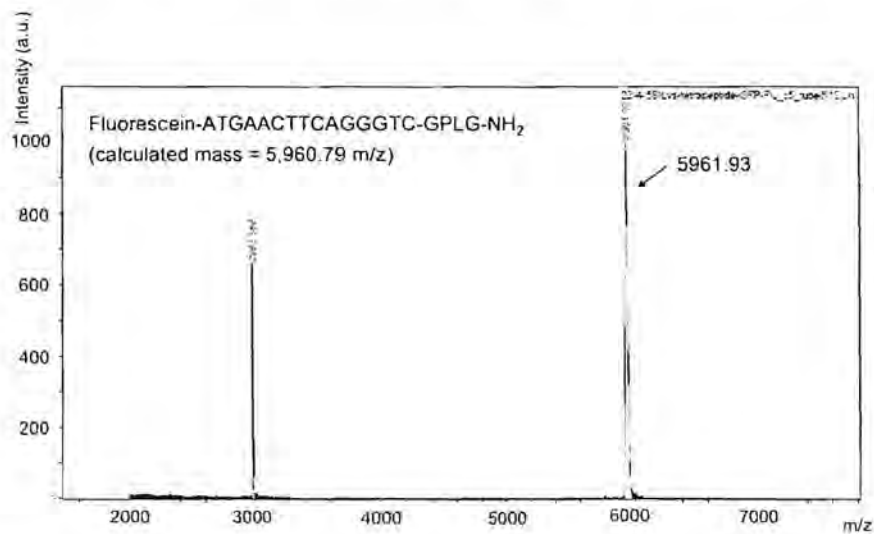
รูปที่ 3.10 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ HepG2 ที่รอดชีวิต (cell viability) เมื่อทดสอบกับ AuNRs ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแท่งนาโนทองที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC และตรึงด้วย PNA (PNA-PMAMPC-AuNRs)

ในขั้นตอนการเตรียม PNA-PMAMPC-AuNRs ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนย่อย ในขั้นแรกจะทำการปรับปรุงโครงสร้างของ PMAMPG ด้วย cysteamine เพื่อเพิ่มหมู่ไทออลและตรึงด้วย PNA ตามลำดับ โดยในการปรับปรุงโครงสร้างพอลิเมอร์ทั้ง 2 ขั้นตอนจะตรึงผ่านพันธะเอไมด์ (amidation) ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของ PMAMPC และหมู่แอมิโนในโครงสร้างของ cysteamine และ PNA โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ (coupling agent) จากนั้นในขั้นตอนที่ 2 จะนำ PMAMPC ที่ผ่านการติด cysteamine และ PNA (PNA-Cys-PMAMPC) แล้วมาตรึงลงบนพื้นผิวของ AuNRs ผ่านวิธี grafting-onto ดังแสดงในรูปที่ 3.11 โดยสภาวะที่ใช้ในการตรึง PNA-Cys-PMAMPC จะใช้สภาวะเช่นเดียวกับการตรึง PMAMPC ลงบน AuNRs ที่ได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วในก่อนหน้า โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้ PNA ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงกับ mRNA ที่ทำหน้าที่สร้าง Green Fluorescein Protein (GFP) ในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งระดับเพื่อให้ง่ายต่อการติดตามการทำหน้าที่เป็น antisense oligonucleotide ของ PNA โดยสามารถติดตามได้จากการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ GFP เนื่องจากสาย PNA ที่ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคจะไปจับกับ mRNA ที่ทำหน้าที่สร้าง GFP ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้าง GFP นอกจากนี้ในโครงสร้างของ PNA จะมีการปรับปรุงปลายสายด้านหนึ่งให้มี tetrapeptide (-Gly-Phe-Leu-Gly-) เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสาย PNA จากอนุภาค AuNRs ด้วยเอนไซม์ cathepsin B ซึ่งจะพบมากในเซลล์มะเร็ง และปลายสายอีกด้านหนึ่งจะทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein เพื่อที่จะสามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ สามารถยืนยันความสำเร็จในการสังเคราะห์ PNA ที่มีโครงสร้างดังกล่าวได้ด้วยเทคนิค Mass spectrometry ดังแสดงในรูปที่ 3.12 โดยจะพบว่า PNA ที่สังเคราะห์ได้มีค่า $m/z = 5,961.93$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณซึ่งมีค่าเท่ากับ $m/z = 5960.79$



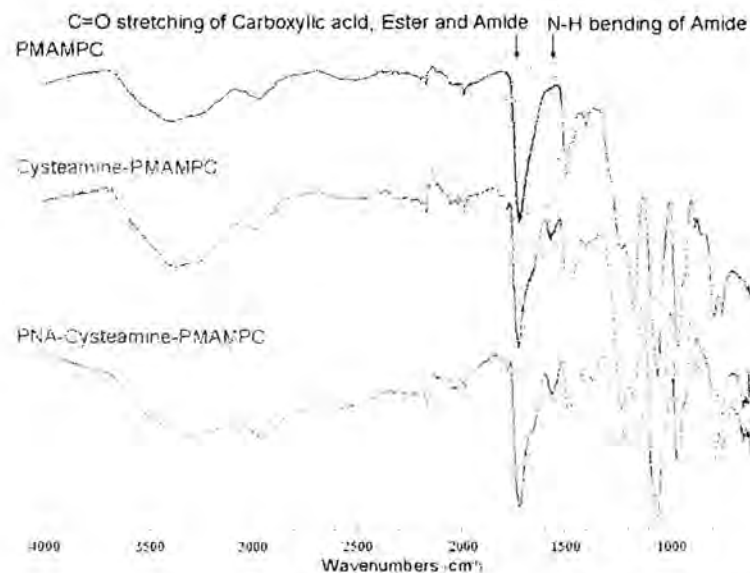
รูปที่ 3.11 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียม PNA-PMAMPC-AuNRs



รูปที่ 3.12 Mass spectrum ของ PNA ที่สังเคราะห์ได้

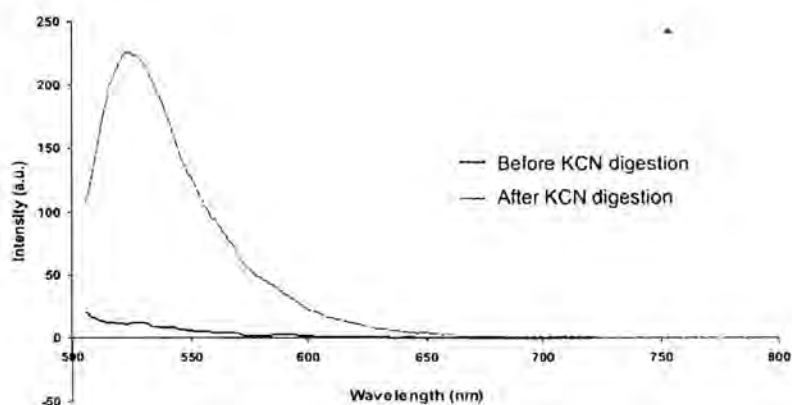
สามารถยืนยันการปรับปรุงโครงสร้าง PMAMPC-SH ด้วย cysteamine และ PNA ตามลำดับได้ด้วยเทคนิค FTIR (รูปที่ 3.13) โดยจะพบการเกิดพันธะเอไมด์ซึ่งจะปรากฏสัญญาณของ N-H bending ที่ตำแหน่ง 1544 cm⁻¹ ในขั้นตอนแรกของการปรับปรุงโครงสร้างพอลิเมอร์ด้วย cysteamine และพบการเพิ่มขึ้นของสัญญาณดังกล่าวหลังจากทำการปรับปรุงโครงสร้างของพอลิเมอร์ด้วย PNA ในขั้นต่อไป โดยสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำปฏิกิริยาได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ N-H bending ของ amide ที่ตำแหน่ง 1544 cm⁻¹ กับพื้นที่ใต้พีคของ C=O

stretching ของ carboxylic acid, ester และ amide ที่ขึ้นรวมกันในช่วง $1600-1800\text{ cm}^{-1}$ และจากผลการทดลองพบว่า หลังการทำปฏิกิริยากับ cysteamine จะให้เปอร์เซ็นต์การเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 3.8% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ต้องการคือ 5.0% เนื่องจากต้องการให้หมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของ MA เพียงบางส่วนทำปฏิกิริยากับ cysteamine เพื่อเพิ่มหมู่ไทออลและยังคงเหลือหมู่คาร์บอกซิลที่มากพอเพื่อไปทำปฏิกิริยาการติด PNA ในขั้นต่อไป และพบว่าหลังการทำปฏิกิริยาการตรึง PNA จะให้เปอร์เซ็นต์การเข้าทำปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเป็น 9.1% จึงสามารถยืนยันการติดของสาย PNA ได้

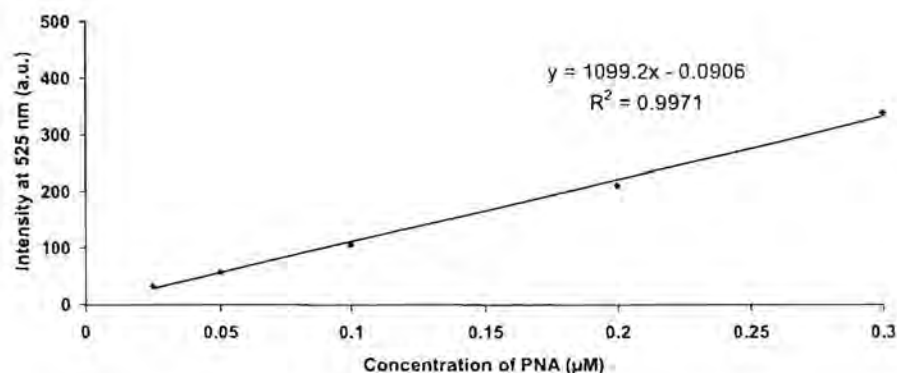


รูปที่ 3.13 FTIR spectra ของ PMAMPC หลังการทำปฏิกิริยากับ cysteamine และ PNA ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันการมีอยู่ของ PNA และคำนวณประสิทธิภาพการตรึง PNA-Cys-PMAMPC บน AuNRs ได้ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy รูปที่ 3.14 แสดง fluorescence spectra ของ PNA-PMAMPC-AuNRs ก่อนและหลังทำการย่อย AuNRs ด้วย KCN โดยพบว่าก่อนการย่อยจะไม่พบการเรืองแสงของ PNA เนื่องจาก AuNRs สามารถระงับสัญญาณ fluorescence ของ fluorescein ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ติดอยู่ในโครงสร้างของ PNA จากนั้นเมื่อทำการย่อย AuNRs จะพบสัญญาณ fluorescence ของสารเรืองแสงปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าสามารถติด PNA ลงในโครงสร้างของ PMAMPC ที่ล้อมรอบบน AuNRs ได้ และเมื่อทำการคำนวณประสิทธิภาพการตรึง PNA-PMAMPC-SH ลงบน AuNRs เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) (รูปที่ 3.15) พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การตรึงเท่ากับ 85.1%



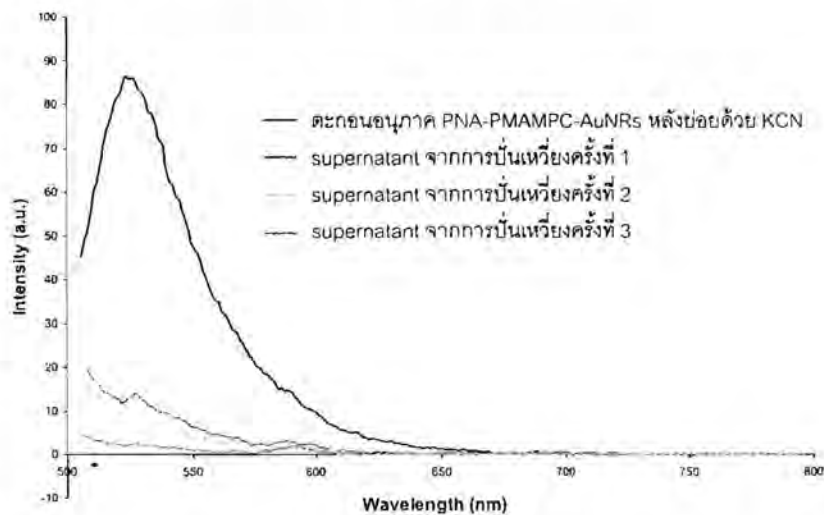
รูปที่ 3.14 Fluorescence spectra ของ PNA-PMAMPC-AuNRs ก่อนและหลังทำการย่อย AuNRs ด้วย KCN



รูปที่ 3.15 Calibration curve ของ PNA ที่สร้างด้วยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์

จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า PNA ที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้จะมีการปรับปรุงปลายสายด้านหนึ่งให้มี tetrapeptide (Gly-Phe-Leu-Gly) เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสาย PNA จากอนุภาค AuNRs ด้วยเอนไซม์ cathepsin B ได้ ดังนั้นในเบื้องต้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลดปล่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* release) โดยในการทดลองจะทำการ incubate PNA-PMAMPC-AuNRs (12.64 µg/mL) ที่สังเคราะห์ได้กับเอนไซม์ cathepsin B (1U/mL) ในสารละลาย phosphate buffer (0.1 M, pH 6) 1.0 mL ที่ประกอบด้วย NaCl (0.05 M) EDTA (1 mM) และ reduced glutathione (5 mM) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนสารละลายด้านบน (supernatant) และนำตะกอนด้านล่างมาทำการล้างด้วยการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกันอีก 2 รอบ นำ supernatant จากการปั่นเหวี่ยงในแต่ละรอบมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy และเปรียบเทียบกับ calibration curve เพื่อหาปริมาณ PNA ที่ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาค โดยจากผลการทดลอง (รูปที่ 3.16) พบว่ามี PNA เพียงบางส่วนที่ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคและการล้างอนุภาคจำนวน 2 รอบมากเพียงพอที่จะนำ PNA ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคได้หมด เนื่องจากใน supernatant จากการล้างครั้งที่ 2 จะไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แสดงให้เห็นว่า PNA ที่ถูกปลดปล่อยถูกล้างออกจากอนุภาคหมดแล้ว จากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ PNA ที่เหลืออยู่บนอนุภาคซึ่งสามารถหาได้จากการนำตะกอนอนุภาคไปย่อยด้วย KCN และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เปรียบเทียบกับ calibration curve โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณ PNA ที่ถูกปลดปล่อยกับปริมาณที่ PNA ที่เหลืออยู่บนอนุภาคจะได้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเท่ากับ 22.9% ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ทำการติดยา doxorubicin (DOX) ลงบนเพปไทด์ Tat

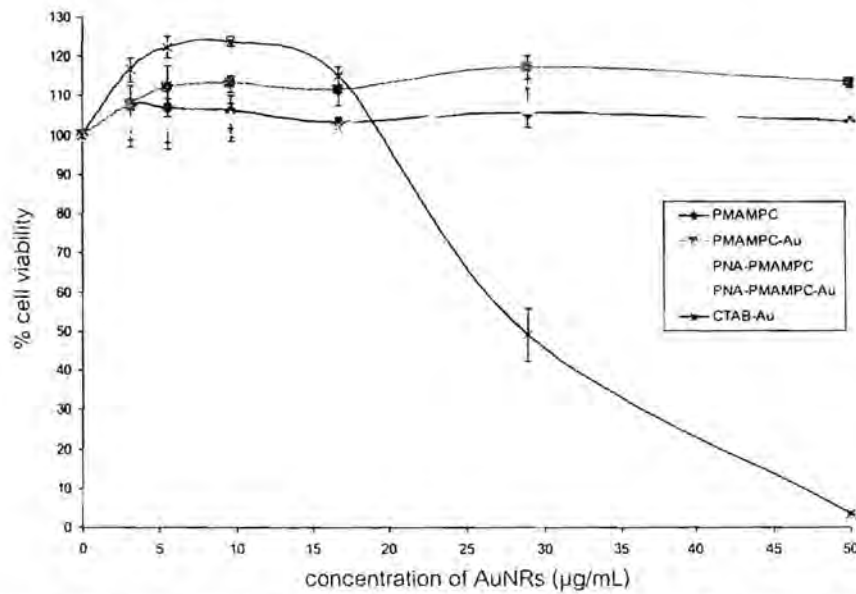
ผ่าน tetrapeptide linker (Gly-Phe-Leu-Gly) เพื่อช่วยนำส่งยาเข้าสู่เซลล์ โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยระหว่างโมเลกุลที่มีการติดยา 1, 2 และ 4 โมเลกุลลงบนเพปไทด์ 1 โมเลกุลซึ่งพบว่า โมเลกุลที่มีการติดยา 4 โมเลกุลจะให้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยน้อยที่สุดเท่ากับ 40.0% เนื่องจากมีความเกาะสูงทำให้การเข้าถึงของเอนไซม์ไปที่ tetrapeptide linker เกิดได้ยากขึ้น นอกจากนี้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ยังได้มีการศึกษาการติดยาลงบนพอลิเมอร์ผ่าน tetrapeptide linker ดังกล่าว และจากผลการทดลองพบว่าความเกาะของสายโซ่พอลิเมอร์จะขัดขวางการย่อย tetrapeptide linker ด้วยเอนไซม์ดังกล่าวโดยจะต้องใช้เวลานานถึง 80 ชั่วโมงจึงจะเกิดการปลดปล่อยอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นในการทดลองส่วนนี้ผู้วิจัยจำเป็นต้องทำการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลดปล่อย เช่น ระยะเวลาหรือความเข้มข้น เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยที่เพิ่มขึ้นต่อไป



รูปที่ 3.16 Fluorescence spectra แสดงการปลดปล่อย PNA ออกจากอนุภาค PNA-PMAMPC-AuNRs ด้วยเอนไซม์ cathepsin B

3.3 การนำ PNA-PMAMPC-AuNRs ที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาความเข้ากันได้กับเซลล์

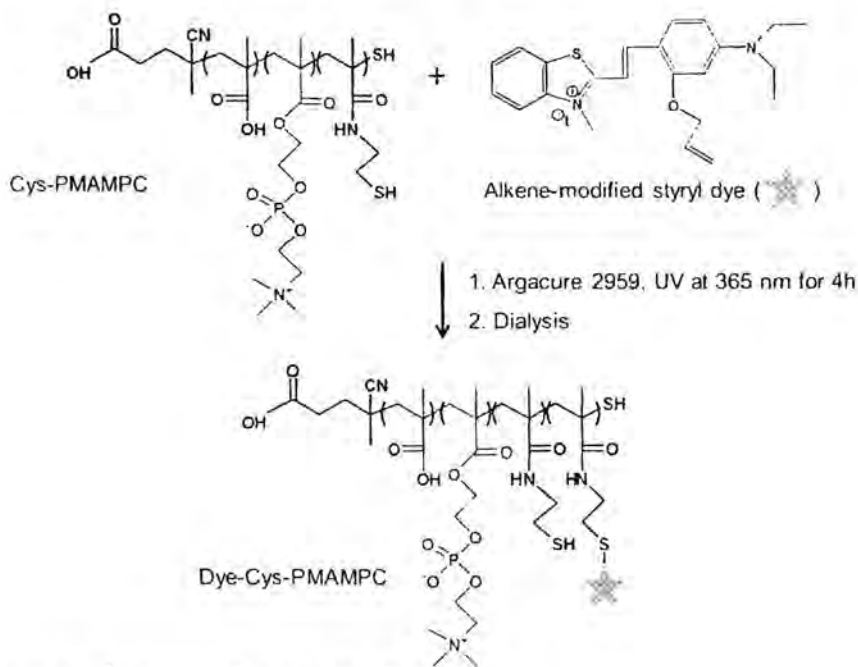
ในเบื้องต้นจะทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาค AuNRs หลังการเคลือบด้วยพอลิเมอร์และพอลิเมอร์ที่ติด PNA (Cys-PMAMPC และ PNA-Cys-PMAMPC) ด้วยเทคนิค MTS assay (รูปที่ 3.17) โดยจะทำการศึกษากับเซลล์ HepG2 ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น และทำการ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจากผลการทดลองพบว่า อนุภาค CTAB-AuNRs เริ่มต้นมีความเป็นพิษเนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคจะทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่พอลิเมอร์และพอลิเมอร์ที่ติด PNA ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเมื่อนำมาเคลือบลงบน AuNRs จะสามารถช่วยลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ได้



รูปที่ 3.17 กราฟแสดง cell viability ของเซลล์ HepG2 เมื่อ incubate กับอนุภาคที่มีความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

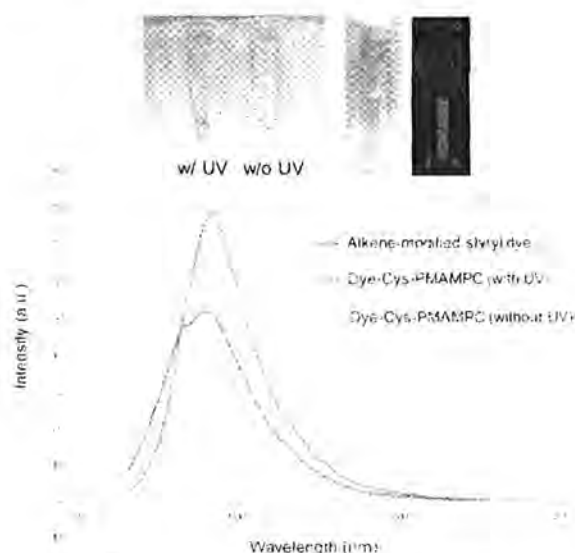
3.4 การเตรียมแท่งนาโนทองที่ติดสารเรืองแสงสามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่สนใจนำมาศึกษาในการทดลองนี้ได้แก่สีย้อมในกลุ่ม styryl ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และมีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสามารถเกิดการเรืองแสงเมื่อจับกับ DNA หรือ RNA ดังนั้นสีย้อมดังกล่าวจึงน่าจะสามารถนำมาใช้ติดฉลากบนแท่งนาโนทองได้ โดยคาดว่าเมื่อเข้าสู่เซลล์จะเกิดการจับกับ RNA หรือ DNA ใน cytoplasm หรือ nucleus ทำให้เกิดการเรืองแสงสามารถตรวจติดตามได้ โดยในขั้นตอนการเตรียม PMAMPC-AuNRs ที่ติดฉลากด้วยสีย้อม (Dye-PMAMPC-AuNRs) จะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนย่อย เช่นเดียวกับการตรึง PNA ลงบน PMAMPC-AuNRs ที่ได้รายงานไว้ข้างต้น โดยจะเริ่มจากการนำ PMAMPC ที่มีการปรับปรุงโครงสร้างด้วย cysteamine (Cys-PMAMPC) เพื่อเพิ่มหมู่ไทออลสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการติดลงบนพื้นผิวอนุภาคทองมาทำการตรึงสีย้อมผ่านการเกิดปฏิกิริยา thiol-ene ระหว่างพันธะคู่ในโครงสร้างของสีย้อมและหมู่ไทออลบางส่วนในโครงสร้างของ PMAMPC ดังแสดงในรูปที่ 3.18 จากนั้นจึงนำ Cys-PMAMPC ที่ผ่านการติดสีย้อม (Dye-Cys-PMAMPC) มาตรึงลงบนพื้นผิวของ AuNRs ผ่านวิธี grafting-onto โดยใช้สภาวะในการตรึงที่เหมาะสมที่ได้ทำการศึกษาและรายงานมาก่อนหน้านี้



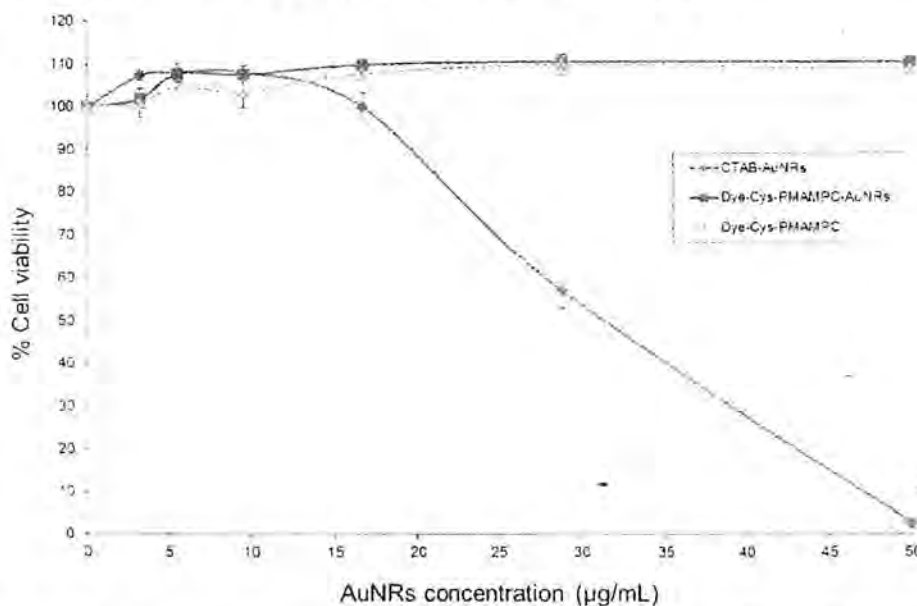
รูปที่ 3.18 สมการแสดงขั้นตอนการเตรียม Dye-Cys-PMAMPC

ทั้งนี้สามารถยืนยันการติดสีของลงบน Cys-PMAMPC ได้ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy ดังแสดงในรูปที่ 3.19 โดยจะพบฟลักการเรืองแสงของสีย้อมในโครงสร้างของ Dye-Cys-PMAMPC ที่ค่าความยาวคลื่นประมาณ 576 nm ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับการเรืองแสงของสีย้อมเริ่มต้น นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้ว่าสีย้อมดังกล่าวติดลงบนโครงสร้างพอลิเมอร์ผ่านปฏิกิริยา thiol-ene ไม่ได้เกิดการติดผ่าน nonspecific interaction โดยการทำการทดลองควบคุมที่ไม่มีการฉายแสงยูวี ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏฟลักการเรืองแสงของสีย้อมจึงสามารถยืนยันการเกิดปฏิกิริยา thiol-ene ได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ซึ่งจะปรากฏสีส้มจากสีย้อมเฉพาะในกรณีที่มีการฉายแสงยูวีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา thiol-ene เท่านั้นและพบการเรืองแสงของสารละลาย Dye-Cys-PMAMPC ที่เตรียมได้



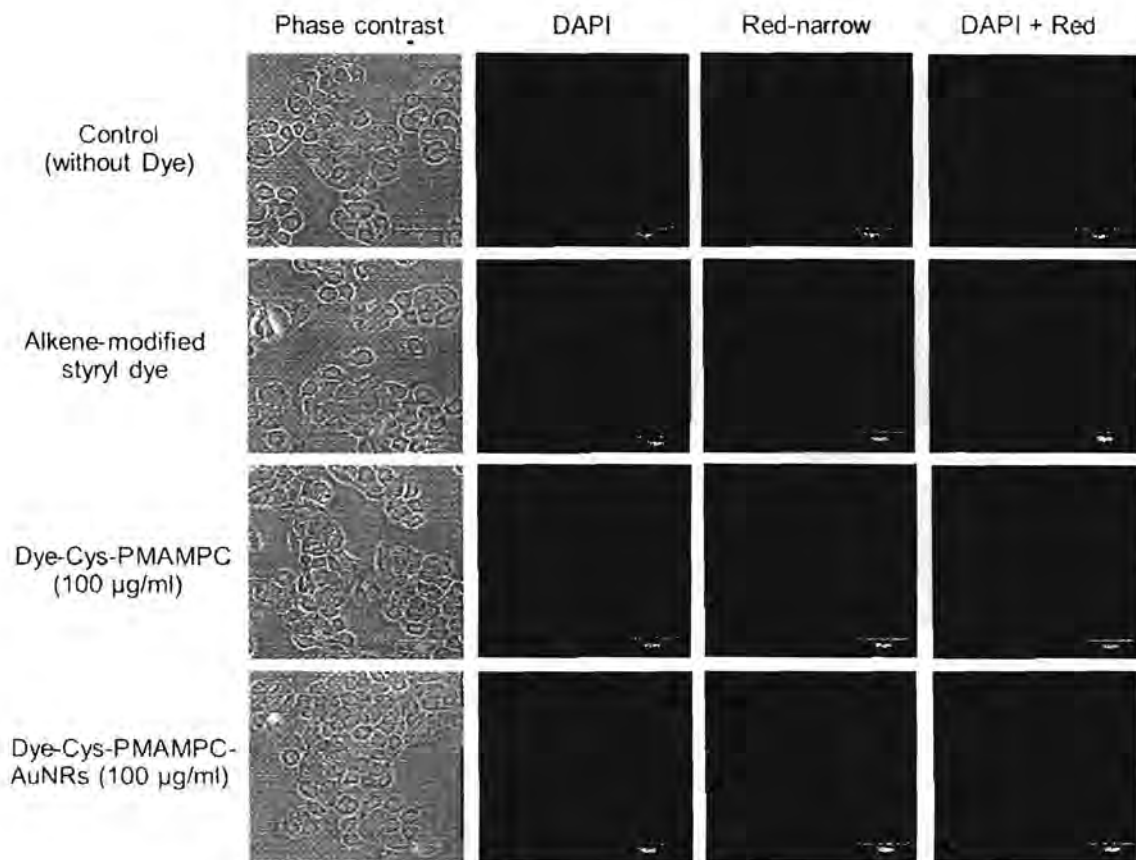
รูปที่ 3.19 Fluorescence spectra และลักษณะทางกายภาพของ Dye-Cys-PMAMPC

จากนั้นจะทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาค AuNRs หลังการเคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่มีการติดสีย้อม (Dye-Cys-PMAMPC) ด้วยเทคนิค MTS assay โดยจะทำการศึกษากับเซลล์ HepG2 และทำการ incubate กับอนุภาคที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่แสดงใน รูปที่ 3.20 พบว่า อนุภาค CTAB-AuNRs เริ่มต้นมีความเป็นพิษเนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคจะทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่อนุภาค AuNRs ที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่ติดสีย้อมจะไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสีย้อมดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถนำมาใช้เพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของนาโนทองเพื่อพัฒนาเป็นพาหะในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ และการเคลือบ Dye-Cys-PMAMPC ลงบน CTAB-AuNRs สามารถลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ได้



รูปที่ 3.20 กราฟแสดง cell viability ของเซลล์ HepG2 เมื่อ incubate กับอนุภาคที่มีความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โดยเมื่อพบว่าอนุภาค AuNRs ที่มีการติดตามด้วยสีย้อมดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขั้นตอนต่อไป จะเป็นการศึกษาว่าสีย้อมที่ติดอยู่บนอนุภาคสามารถเกิดการเรืองแสงเพื่อใช้ในการตรวจติดตามเมื่อเข้าสู่เซลล์ HepG2 ด้วยการศึกษารับเข้าเซลล์ (cellular uptake) ด้วยเทคนิค confocal fluorescence microscopy โดยการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสีย้อม DAPI และทำการ incubate กับอนุภาคที่มีความเข้มข้น 100 µg/mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.21 พบการเรืองแสงของสีย้อมบนอนุภาค Dye-Cys-PMAMPC-AuNRs ภายในเซลล์ โดยจะมีการเรืองแสงในลักษณะเดียวกับการใช้สีย้อมเพียงอย่างเดียวในการนำเข้าสู่เซลล์ คือพบการเรืองแสงในบริเวณส่วน cytoplasm ของเซลล์มากกว่าในบริเวณส่วนนิวเคลียสของเซลล์แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สีย้อมดังกล่าวในการติดตามการเคลื่อนที่ของ PMAMPC-AuNRs เพื่อเตรียมพาหะในการนำส่งที่มีเสถียรภาพสูง ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของนาโนทองที่พัฒนาขึ้น ในการเป็นพาหะในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปที่นิวเคลียสของเซลล์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ผู้วิจัยสนใจที่จะติดแท็ก nuclear localization signal (NLS) เข้าไปที่หมู่คาร์บอกซิลที่เหลือในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างทำการทดลอง

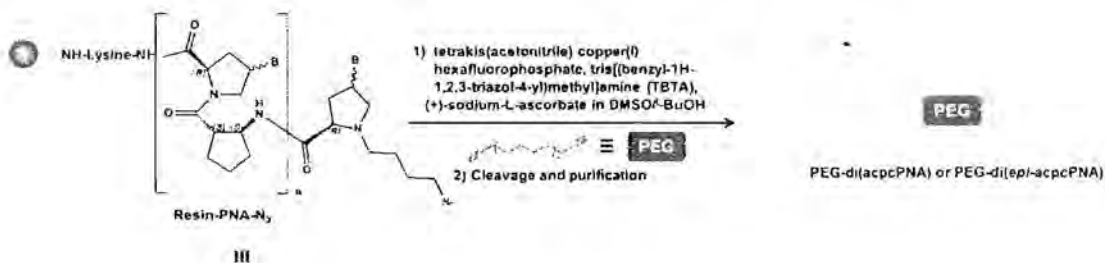


รูปที่ 3.21 ภาพถ่ายจากเทคนิค confocal fluorescence microscopy ของเซลล์ HepG2 เมื่อ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้น 100 µg/mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (scale bar = 50 µm)

ตอนที่ 4 การสังเคราะห์ พิสจูร์เอกลักษณะ และการประกอบตัวเองของมอนอเมอร์ที่มีเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นองค์ประกอบ

4.1. การสังเคราะห์พอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีหมู่ปลายเป็น acpcPNA หรือ epi-acpcPNA

มอนอเมอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นประกอบด้วยกัน 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งคือ linker โดยเลือกใช้ linker ที่มีความยาวของหน่วยซ้ำเอทิลีนออกไซด์ 3 ชนิด ได้แก่ tetra(ethylene glycol) (TEG), octa(ethylene glycol) (OEG) และ polyethylene glycol ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 600 gmol⁻¹ (PEG 600) ส่วนที่สองคือ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น N'-TTT TTT TT-C' (P1) หรือ epi-acpcPNA ที่มีลำดับเบสคือ N'-GCG CGC GC-C' (P2) ในขณะที่ linker เป็น TEG และ OEG มอนอเมอร์จะถูกเตรียมผ่านปฏิกิริยา copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) click reaction (รูปที่ 4.1) ระหว่าง TEG-di(alkyne) ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 270 gmol⁻¹ หรือ OEG-di(alkyne) ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 446 gmol⁻¹ กับ azide-modified PNA (N₃-PNA) น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์มอนอเมอร์ในส่วนนี้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4.1

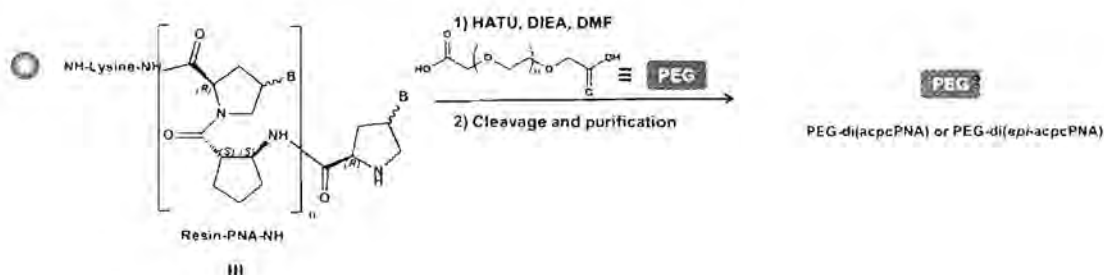


รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยา copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) click reaction ของ PEG-di(alkyne) และ N₃-PNA

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักโมเลกุลของ PEG-di(alkyne), วิเคราะห์โดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry.

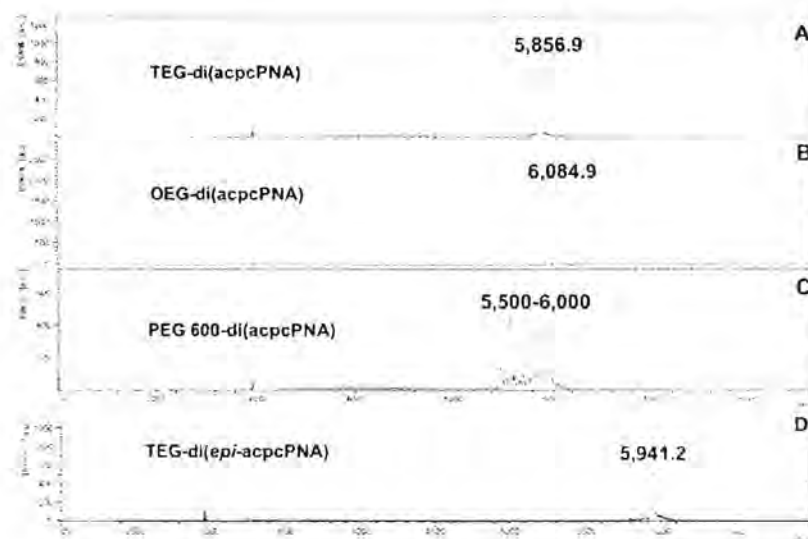
Sample	Sequence (N to C)	m/z (calcd)	m/z
TEG-di(alkyne)	-	270.0	270.0
OEG-di(alkyne)	-	446.0	446.0
P1	TTT TTT TT	2693.9	2691.3
P2	GCG CGC GC	2733.9	2729.8
N ₃ -P1	TTT TTT TT	2791.9	2791.0
N ₃ -P2	GCG CGC GC	2831.9	2831.9

ในกรณีนี้ linker เป็น PEG 600 มอนอเมอร์จะถูกเตรียมผ่านปฏิกิริยา amidation ของ PEG-di(acid) และ NH-PNA (รูปที่ 4.2) โดยใช้ 1-[is(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) เป็น peptide coupling reagent และ *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งทั้งสองปฏิกิริยาเกิดขึ้นบนตัวรองรับของแข็ง (solid support) หลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้นผลิตภัณฑ์ถูกปลดออกจากตัวรองรับด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ตกตะกอนด้วย diethyl ether (DE) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC)



รูปที่ 4.2 ปฏิกิริยา amidation ของ PEG-di(acid) และ NH-PNA

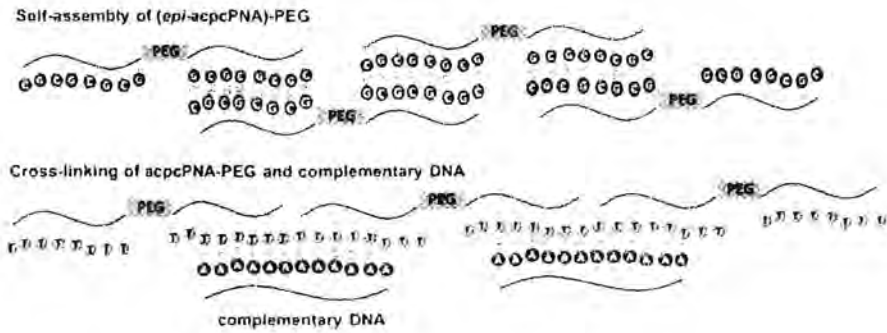
หลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้น พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าสามารถสังเคราะห์มोनอเมอร์ของ TEG-di(acpcPNA), OEG-di(acpcPNA), PEG 600-di(acpcPNA) และ TEG-di(epi-acpcPNA) ได้ โดยพบพิกมวลโมเลกุลของมอนอเมอร์ที่ต้องการ (รูปที่ 4.3) คือ 5,856.9, 6,084.9, 5,500-6,000 และ 5,941.2 M/Z ตามลำดับ สำหรับ PEG 600-di(acpcPNA) ที่มีมวลโมเลกุลในช่วง 5,500-6,000 M/Z เนื่องจาก PEG 600 มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 300-700 M/Z โดยแต่ละพิกของมวลโมเลกุลมีค่าห่างกัน 44 M/Z ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลของเอทิลีน (-CH₂-CH₂-)



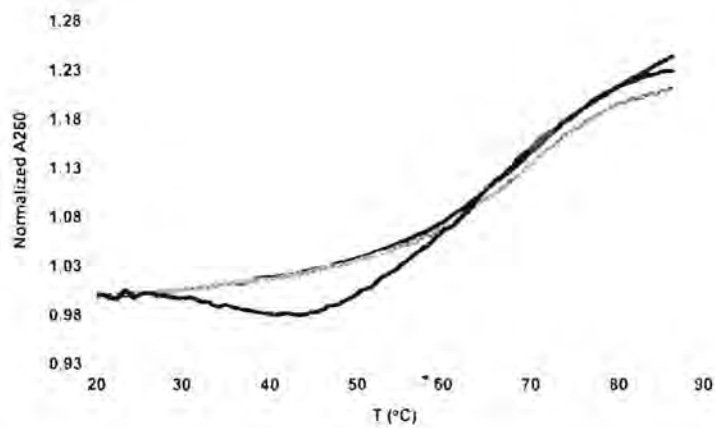
รูปที่ 4.3 แมสสเปกตรัมของ TEG-di(acpcPNA) (A), OEG-di(acpcPNA) (B), PEG 600-di(acpcPNA) (C) และ TEG-di(epi-acpcPNA)(D)

4.2 การศึกษาสมบัติไฮบริดเซชันของมอนอเมอร์

ทำการศึกษาค่า melting temperature (T_m) ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ทำให้ 50% โมเลกุลที่เข้าคู่แยกออกจากกัน ดังนั้นการมี T_m จึงสามารถยืนยันในเบื้องต้นได้ว่ามอนอเมอร์สามารถเกิด hybridization ได้ ทั้งนี้สามารถหา T_m โดยใช้เทคนิค UV-vis spectroscopy ที่มีการให้อุณหภูมิในช่วง 20- 90 °C ในอัตราการให้ความร้อนที่ 1 °C/นาที สำหรับ TEG-di(acpcPNA), OEG-di(acpcPNA) จะทำการเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม คือ 5'-AAA AAA AAA AAA-3' (DNA A12) เพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สม (รูปที่ 4.4) โดยใช้ความเข้มข้นของมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สมคือ 1 μ M ในสภาวะที่มี phosphate buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 10 mM และสารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 100 mM สำหรับ TEG-di(epi-acpcPNA) จะศึกษาการเกิด self-hybridization ของมอนอเมอร์ โดยใช้ความเข้มข้นของมอนอเมอร์คือ 2 μ M ในสภาวะเดียวกัน จากกราฟของ melting curve (รูปที่ 4.5) พบ single transition ในกรณีที่ TEG-di(acpcPNA) และ OEG-di(acpcPNA) เกิดไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และเมื่อทำ derivative plot จะพบ T_m เท่ากับ 70 °C และพบ single transition ที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 °C แสดงการเกิด self-hybridization ของ TEG-di(epi-acpcPNA) (รูปที่ 4.4)

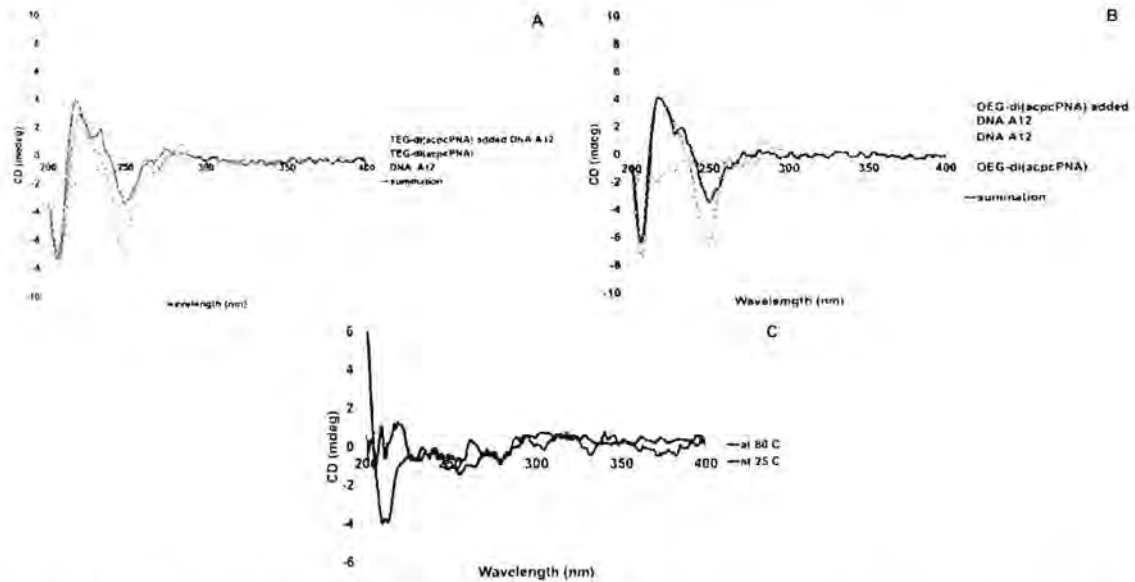


รูปที่ 4.4 การเกิดไฮบริดเซชันของมอนอเมอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของพีเอ็นเอ



รูปที่ 4.5 กราฟ melting curve ของ TEG-di(acpcPNA) (เส้นสีเขียว), OEG-di(acpcPNA) (เส้นน้ำเงิน) ที่เกิดไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และการเกิด self-hybridization ของ TEG-di(epi-acpcPNA) (เส้นสีแดง)

ทำการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของมอนอเมอร์ที่เตรียมได้โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD) โดยใช้ความเข้มข้นและสภาวะเช่นเดียวกับการศึกษาหา T_m ของมอนอเมอร์ จาก CD spectra ของ TEG-di(acpcPNA) และ OEG-di(acpcPNA) ที่มีการเติมดีเอ็นเอคู่สม (รูปที่ 4.6) พบว่ามี intensity ใน negative region ที่ความยาวคลื่น 208 และ 250 nm มากกว่า intensity ของ CD spectra ของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (A12) แสดงว่ามีอันตรกิริยาระหว่างมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สมเกิดขึ้นและเมื่อเปรียบเทียบกับ CD spectra ของผลรวมระหว่างมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สม (summation) มีความแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่ามอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สมสามารถเกิดไฮบริดเซชันได้จริง สำหรับมอนอเมอร์ TEG-di(epi-acpcPNA) ได้ทำการทดลองที่ 2 อุณหภูมิคือ 25 และ 80 °C เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของ CD spectra พบว่า CD spectra ของ TEG-di(epi-acpcPNA) มีลักษณะโครงสร้างแบบ helix สังเกตจากการมีพีคใน negative region ที่ตำแหน่ง 210 และ 260 nm ที่ 25 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิต่ำกว่า T_m (65 °C) แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวที่อุณหภูมิ 80 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิสูงกว่า T_m จึงสามารถสรุปได้ว่ามอนอเมอร์ TEG-di(epi-acpcPNA) มีสมบัติ self-hybridization

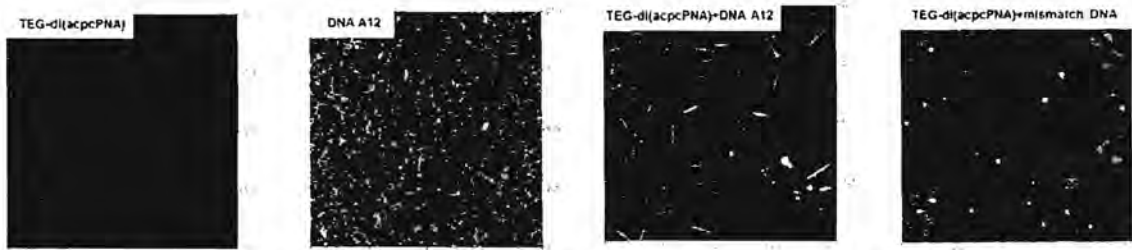


รูปที่ 4.6 CD spectra ของ TEG-di(acpcPNA) (A), OEG-di(acpcPNA) (B) ทั้งก่อนและหลังการเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และ TEG-di(epi-acpcPNA) ที่อุณหภูมิ 25 และ 80 °C (C)

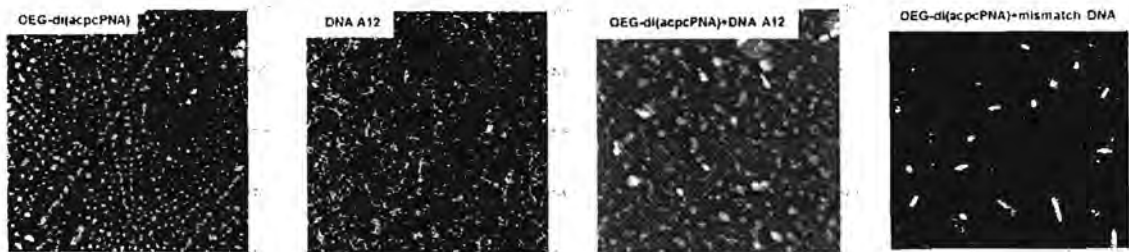
4.3 การศึกษาสัญญาณวิทยาของโครงสร้างที่เกิดจากไฮบริดเซชันของมอนอเมอร์

เพื่อยืนยันการเกิดเป็นอนุภาคของมอนอเมอร์ผ่านการเกิดไฮบริดเซชัน จึงได้ทำการศึกษาสัญญาณวิทยา (morphology) ของโครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นด้วยเทคนิค Atomic force microscopy (AFM) และ Field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM) เพื่อหาขนาดและรูปร่างของโครงสร้างที่เกิดขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบของการใช้ฟลูออรีนที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ ในการทดลองนี้จึงทำการปรับพีเอช ของสารละลายมอนอเมอร์ด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนีย หลังจากนั้นกำจัดแอมโมเนียออกด้วยวิธี freeze drying ในการเตรียมตัวอย่างของ AFM และ FESEM ใช้ความเข้มข้นของมอนอเมอร์และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมเท่ากับ 10 μM ปริมาตร 30 μL หยดลงบนแผ่น silicon wafer ขนาด 1x1 cm จากนั้นทำให้ตัวอย่างบนแผ่น silicon wafer แห้งด้วยการ vacuum drying ทั้งนี้ไม่ได้มีการเติมสารละลาย NaCl ในชั้นไฮบริดเซชันเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบของการเกิดผลึกของเกลือที่อาจรบกวนการสังเกตสัญญาณวิทยาของโครงสร้างที่เกิดขึ้นจากการเกิดไฮบริดเซชัน

จากรูปภาพของ AFM (รูปที่ 4.7) พบว่า ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม A12 มีลักษณะเป็นเส้นใยสั้นขนาดเล็ก ในขณะที่มอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12 พบอนุภาคมีลักษณะเป็นแท่งและแตกต่างกับตัวอย่างของมอนอเมอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป (mismatched DNA) คือ 5'-GCA GGA CTA ACT-3' สำหรับมอนอเมอร์ OEG-di(acpcPNA) (รูปที่ 4.8) มีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลม หลังจากเติมดีเอ็นเอคู่สม DNA A12 พบลักษณะของการรวมกลุ่มกันของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและแตกต่างจากมอนอเมอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอแบบที่มีลำดับเบสผิดไป จากผลของ AFM สามารถยืนยันในเบื้องต้นได้ว่ามอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) และ OEG-di(acpcPNA) สามารถเกิดไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม เกิดเป็นอนุภาคที่มีรูปร่างแตกต่างกันได้

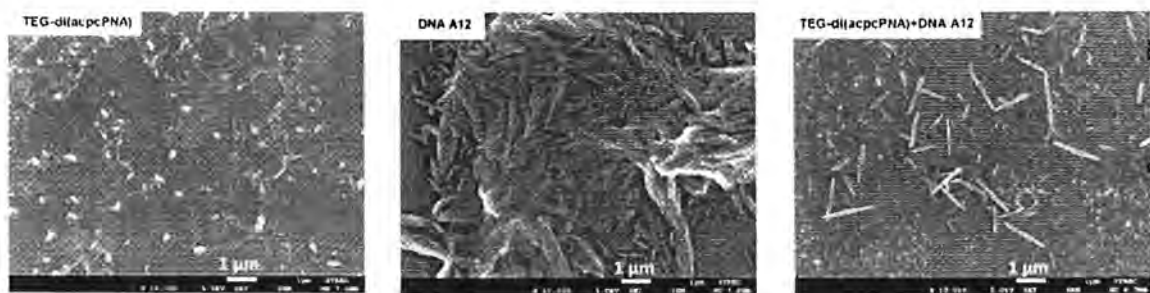


รูปที่ 4.7 AFM micrographs ของ TEG-di(acpcPNA), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12, TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12 และ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป



รูปที่ 4.8 AFM micrographs ของ OEG-di(acpcPNA), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12, OEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12 และ OEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป

จากรูปภาพของ FE-SEM (รูปที่ 4.9) พบว่ามอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) มีลักษณะเป็นแบบวงรีขนาด 0.2 μm ดีเอ็นเอคู่สม DNA A12 มีลักษณะเป็นทรงเมลิคซ์ยาวขนาด 0.6 μm แต่จากรูปภาพพบว่าการรวมกลุ่มกันของดีเอ็นเอเนื่องจากความผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่างทำให้อนุภาคกระจายตัวไม่ดี สำหรับมอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12 มีลักษณะเป็นแท่งซึ่งสอดคล้องกับรูปภาพ AFM มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 1.6 μm



รูปที่ 4.9 FESEM micrographs ของ TEG-di(acpcPNA), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12 และ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12

จากข้อมูลในการวิเคราะห์ด้วยการหา T_m และ CD และสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่เกิดขึ้นจากไฮบริดเซชันสามารถใช้ในการยืนยันเบื้องต้นได้ว่ามอนอเมอร์ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเกิดไฮบริดเซชันเป็นโครงสร้างเฉพาะได้ ในขณะที่อยู่ระหว่างการปรับเปลี่ยนลำดับเบสของพีเอ็นเอ การศึกษาผลของอุณหภูมิ

ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่เกิดขึ้น รวมทั้งการปรับเปลี่ยน linker ให้เป็นโอลิโกเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น เช่น oligomeric poly(lactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาโครงสร้างดังกล่าวในการนำไปประยุกต์ทางด้านทางการแพทย์ต่อไปได้ในอนาคต

ชื่อโครงการย่อย Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการวิจัยย่อย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ภาวรังกูร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรากร ลิ้มบุตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตนนท์ บุรณชัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงดี บุรณชัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัด PNA-DNA hybridization ผ่านตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยการปรับปรุงผิวหน้าอิเล็กโทรดด้วยวัสดุคอมโพสิตระหว่างกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะ
2. เพื่อพัฒนาเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการตรวจวัด cysteine โดยอาศัยเทคนิค catalyzed hairpin assembly (CHA) ร่วมกับ PNA

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ
การดำเนินงาน

กิจกรรม/เดือน	เดือน					
	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36
1. Graphene-conducting polymer-metal nanoparticle nanocomposite modified electrode for ultrasensitive detection of PNA-DNA hybridization based on the electrical signal of a redox						
1.1 Comparative study of the electrical signal of electroactive redox indicator with different modification of electrodes for detection of PNA-DNA hybridization	←→ ←- - -→					
1.2 Optimization		←→ ←- - -→				
1.3 Study of analytical performances				←→ ←- - -→		
2. Electrochemical DNA biosensor based on the PNA probe/polypyrrole/Silver nanofoam modified electrode						
2.1 Fabrication of PNA probe/Polypyrrole/Silver nanofoam modified gold electrode		←→ ←- - -→				
2.2 PNA probe/Polypyrrole/Silver nanofoam modified gold electrode			←→ ←- - -→			
2.3 Optimization of a electrochemical DNA biosensor system				←→ ←- - -→		
2.4 Study of analytical performances					←→ ←- - -→	
3. A PNA-assisted highly selective cysteine sensor based on catalyzed hairpin assembly						
3.1 Designing DNA hairpins (H1, H2, DNA sensing strand) and PNA hairpin (PNA sensing strand) and testing the sensor response to target DNA			←→ ←- - -→			
3.2 optimization of parameters affecting the performance of the sensor, such as the length of hairpin stem, the length of toehold region, probes concentration, buffer concentration and incubation time				←→ ←- - -→		
3.3 Study of analytical performances					←→ ←- - -→	

←→ กิจกรรมขั้นตอนการดำเนินงานที่วางแผนไว้
←- - -→ กิจกรรมขั้นตอนการดำเนินการแล้ว

การดำเนินงาน

โครงการที่ 4: Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

โครงการนี้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่มีความไววิเคราะห์สูงและความจำเพาะต่อการตรวจวัดสูง โดยใช้พีริโรตินิลพีเอ็นเอเป็นโพรบ แบ่งงานวิจัยเป็นสามส่วนย่อยตามรายละเอียดดังนี้

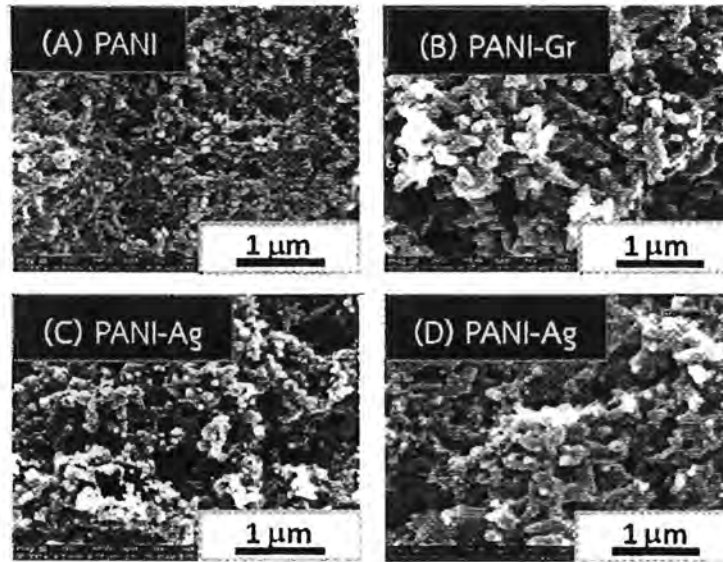
โครงการย่อยที่ 1: การพัฒนาอิเล็กโทรดที่ดัดแปรด้วยกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะสำหรับ การตรวจวัดการเกิดไฮบริดเซชันระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอโดยอาศัยสัญญาณจากรีดอกซ์อินดิเคเตอร์

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) แบบติดฉลาก โดยการตรึง acpcPNA-AQ probe ที่มีแอนทราควิโนน (anthraquinone, AQ) ติดตรงตำแหน่งปลายโพรบบน ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีน (screen printed carbon electrode, SPCE) ที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุ คอมโพลีเมอร์ชนิดนำไฟฟ้าพอลิอะนิลีน (polyaniline, PANI) ร่วมกับกราฟีน (graphene, Gr) และอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles, AgNPs) เมื่อเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง acpcPNA-AQ probe กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ทำให้ส่วนของ AQ ที่ติดไว้ปลายโพรบอยู่ห่างจากผิวขั้วไฟฟ้า ท่อง การส่งผ่านอิเล็กตรอนของ AQ มายังผิวอิเล็กโทรดจึงเกิดได้ยากขึ้น สัญญาณการตรวจวัดจึงมีค่า ลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA ซึ่งงานวิจัยที่ได้ดำเนินการ ประกอบด้วย

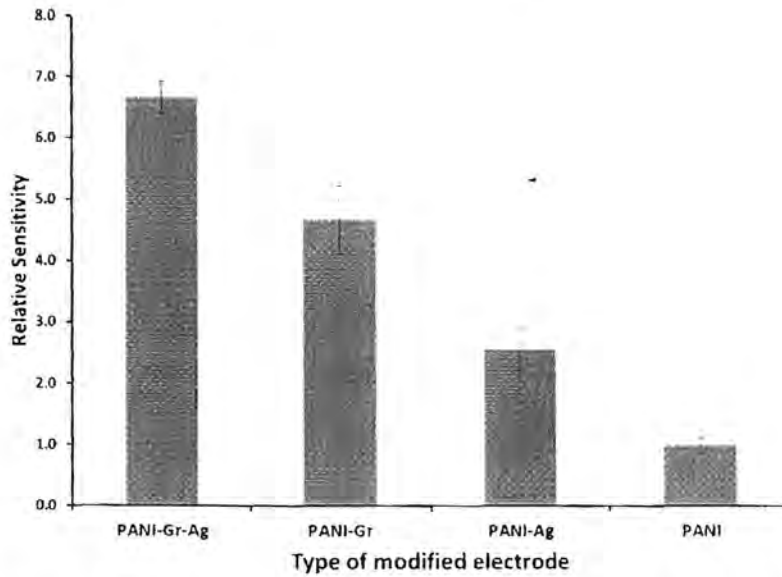
1.1 ศึกษาการเตรียมขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยวัสดุที่แตกต่างกัน

เปรียบเทียบสัญญาณไฟฟ้าจากการตรึง lysine acpcPNA-AQ probe (AQ-GCT CCG TCC TC-LysNH₂) ที่มี AQ ติดตรงตำแหน่งปลายโพรบ บนขั้วไฟฟ้าที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุที่แตกต่างกัน 4 แบบ ได้แก่ พอลิเมอร์ชนิดนำไฟฟ้า PANI PANI ที่คอมโพลีกับกราฟีน (PANI-Gr) PANI ที่คอมโพลี กับอนุภาคนาโนเงิน (PANI-Ag) และ PANI ที่คอมโพลีกับกราฟีนร่วมกับอนุภาคนาโนเงิน (PANI-Gr-Ag) จากภาพ SEM (รูปที่ 1.1) ขั้วที่ปรับปรุงด้วย PANI (A) พบว่าจะมีท่อ PANI ปกคลุมพื้นผิวของ ขั้วไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr (B) จะมีแผ่นกราฟีนเคลือบบนท่อ PANI ที่ปกคลุมอยู่บนขั้ว ส่วนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Ag (C) พบว่าผิวของท่อ PANI จะมีก้อนของอนุภาคนาโนเงินเกาะอยู่ และขั้วที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag (D) พบว่าผิวของท่อ PANI จะมีทั้งแผ่นกราฟีนและก้อนของอนุภาคนาโนเงินเกาะอยู่ด้วย

เมื่อเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง acpcPNA-AQ probe กับ target DNA ทำให้ส่วนของ AQ ที่ติดไว้ปลายโพรบอยู่ห่างจากผิวขั้วไฟฟ้าของ ดังนั้น การส่งผ่านอิเล็กตรอนของ AQ มายังผิวอิเล็กโทรดจึง เกิดได้ยากขึ้น สัญญาณการตรวจวัดจึงมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA ซึ่งจากการจากการ เปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงทั้ง 4 แบบ (รูปที่ 1.2) พบว่า ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุง ด้วยคอมโพลีของ PANI-Gr-Ag จะให้ค่าความไววิเคราะห์สูงสุด (มากกว่า PANI-Gr PANI-Ag และ PANI ประมาณ 6.7, 4.7 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ) เนื่องจากคอมโพลีของวัสดุโนดังกล่าวช่วย เพิ่มการนำไฟฟ้าทำให้สัญญาณการตรวจวัดสูงที่สุด



รูปที่ 1.1 SEM ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย (A) PANI (B) PANI-Gr (C) PANI-Ag และ (D) PANI-Gr-Ag ด้วยวิธี electrodeposition ในช่วงศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง 1.0 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 50 mV/s

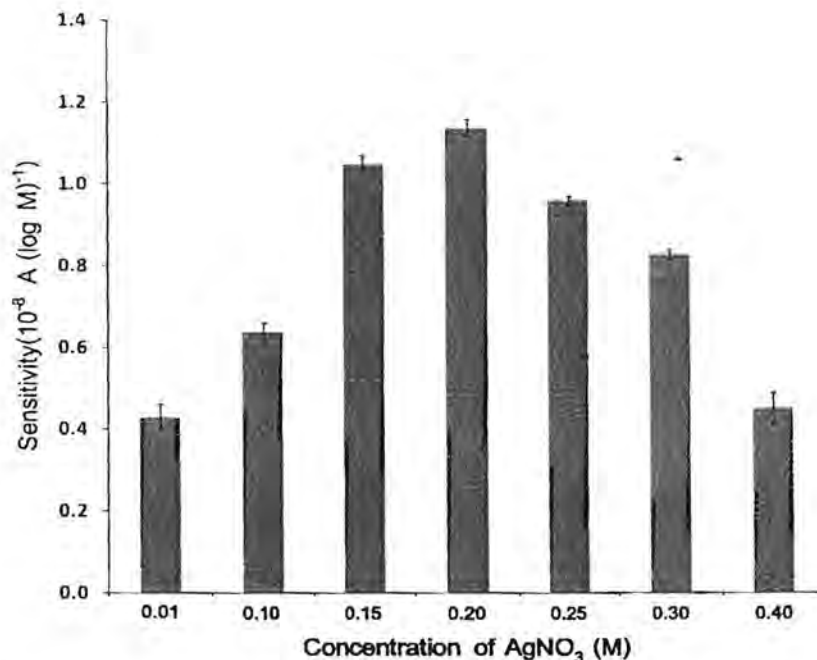


รูปที่ 1.2 ค่าความไววิเคราะห์จากการไฮบริไดซ์ระหว่าง PNA-AQ probe กับ DNA ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-10} ถึง 1.0×10^{-7} M บนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI PANI-Gr PANI-Ag และ PANI-Gr-Ag

1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

1.2.1 ความเข้มข้นของ Ag

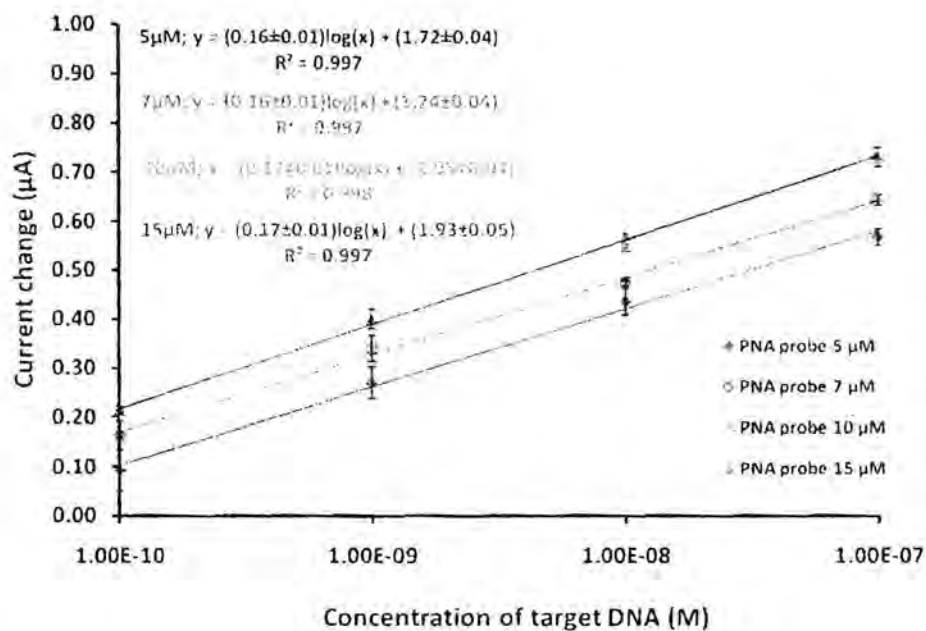
ปริมาณของ Ag ใน PANI-Gr-Ag ที่อยู่บนขั้วไฟฟ้าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสัญญาณไฟฟ้า เพราะ Ag ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาและช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอน จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย AgNO_3 ที่ใช้ในขั้นตอน electrodeposition (โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี) และเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ของไฮบริดเซชันระหว่างโพรบกับ target DNA ที่ตรึงอยู่บนผิวขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag ที่ความเข้มข้นของ AgNO_3 ที่ 0.010 0.10 0.20 0.25 0.30 และ 0.40 โมลาร์พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ AgNO_3 เพิ่มจาก 0.010 ถึง 0.20 โมลาร์ สัญญาณไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้น เนื่องจาก Ag nanoparticles ที่เพิ่มขึ้นทำให้พื้นที่ผิวมากขึ้น จึงช่วยเพิ่มสัญญาณไฟฟ้าให้สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่า 0.20 โมลาร์ อาจเกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนทำให้พื้นที่ผิวน้อยลงจึงทำให้สัญญาณไฟฟ้าลดลง (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 ผลของความเข้มข้น AgNO_3 ต่อความไววิเคราะห์จากการไฮบริดเซชันระหว่าง PNA-AQ probe กับ target DNA ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-10} ถึง 1.0×10^{-7} M บนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag

1.2.2 ความเข้มข้นของ PNA probe

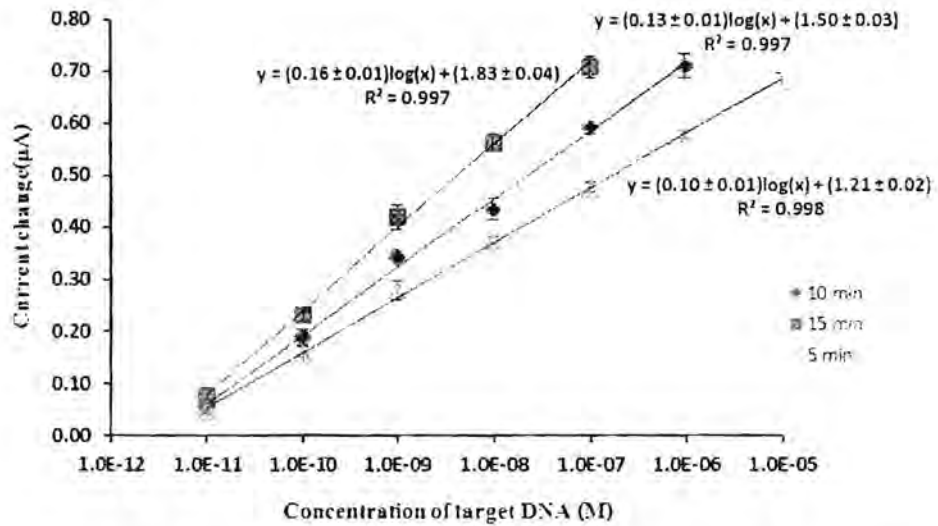
โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของ PNA probe ที่ความเข้มข้นดังนี้ 5, 7, 10, 15 ไมโครโมลาร์ ในการตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้าด้วย PANI-Gr-Ag จากผลการทดลองพบว่าความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ PNA-AQ เพิ่มขึ้นจาก 5.0 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ เนื่องจาก PNA-AQ ที่เพิ่มขึ้นจะไฮบริดกับ DNA ได้มากขึ้น ทำให้สัญญาณไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ probe สูงกว่า 10 ไมโครโมลาร์ สัญญาณจะมีค่าคงที่ (รูปที่ 1.4) นั่นคือความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PNA-AQ probe คือ 10 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 1.4 ผลของความเข้มข้นของ PNA-AQ probe ต่อความไววิเคราะห์ของการตรวจวัด

1.2.3 เวลาที่ใช้ในการไฮบริดระหว่าง PNA-DNA

ได้ศึกษาระยะเวลาในการไฮบริดไคเซชันระหว่าง PNA-DNA ที่เวลา 5, 10 และ 15 นาที โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้าด้วย PANI-Gr-Ag จากผลการทดลองดังรูปที่ 1.5 พบว่าเมื่อใช้เวลาในการไฮบริดไคเซชันที่เวลา 15 นาที จะให้ค่าความไววิเคราะห์ที่สูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่เวลา 5, 10 และ 15 นาที มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดเท่ากัน คือ 10^{-11} โมลาร์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เวลาในการไฮบริดไคเซชัน 5 นาที เนื่องจากที่เวลานี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดที่ดี และใช้เวลาในการไฮบริดไคเซชัน

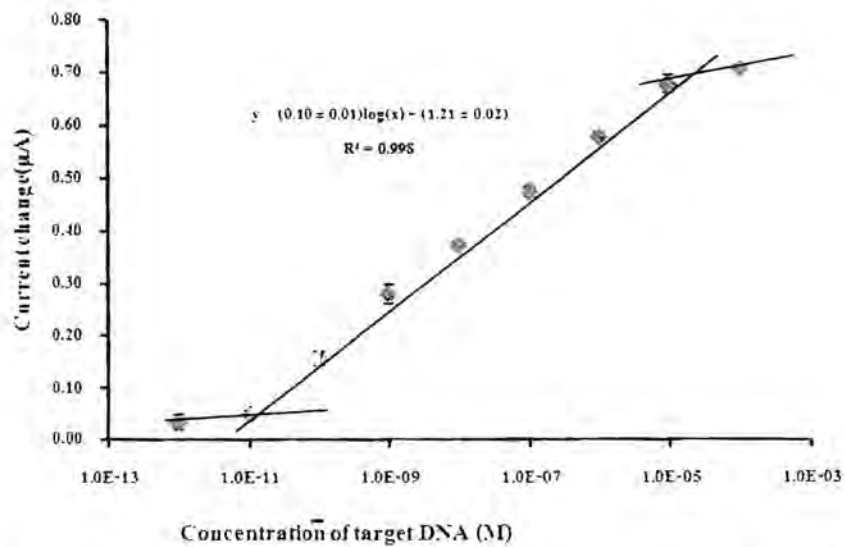


รูปที่ 1.5 ค่าความไววิเคราะห์จากการไฮบริดระหว่าง PNA-AQ probe กับ DNA บน ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag โดยเวลาที่ใช้ในการไฮบริดได้เขียนระหว่าง PNA-DNA ที่ระยะเวลา 5 10 และ 15 นาที

1.3 ประสิทธิภาพของเซนเซอร์

1.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง และ ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด

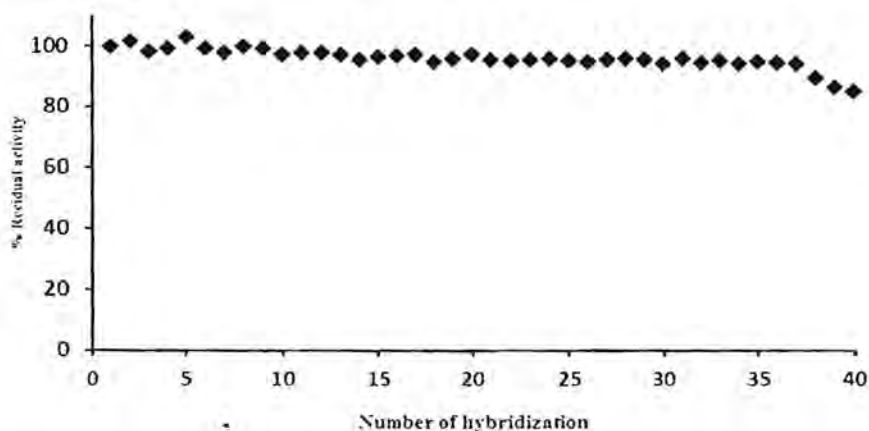
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ศึกษาประสิทธิภาพของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ DNA ที่ความเข้มข้น 10^{-12} ถึง 10^{-5} โมลาร์ ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 10^{-11} - 10^{-5} โมลาร์ ดังรูปที่ 1.6 และให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด 10^{-11} โมลาร์



รูปที่ 1.6 สัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของ Target DNA ที่ 10^{-12} ถึง 10^{-5} โมลาร์

1.3.2 เสถียรภาพของขั้วไฟฟ้า

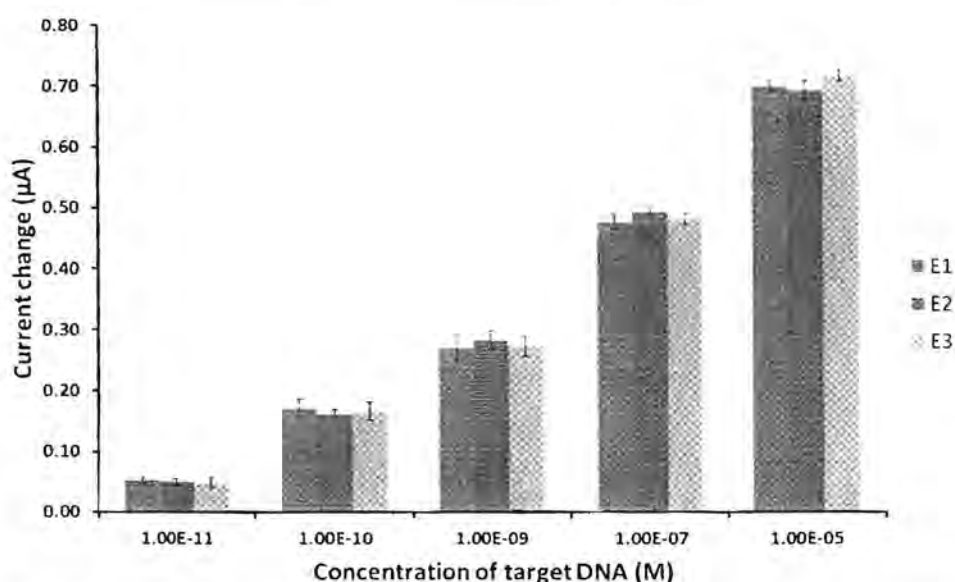
ได้ศึกษาความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัด PNA-DNA hybridization ด้วยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี (differential pulse voltammetry, DPV) จากนั้นจะใช้สารทำลายพันธะระหว่าง PNA probe กับ DNA เพื่อให้ PNA probe ที่ตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้าสามารถใช้งานซ้ำได้ แล้วเปรียบเทียบการลดลงของสัญญาณการตอบสนองที่ได้กับการวิเคราะห์ครั้งที่ 1 ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงนี้สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 37 ครั้ง (รูปที่ 1.7) หลังจากนั้นสัญญาณไฟฟ้าจะลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากบางส่วนของชั้นคอมโพสิต PANI-Gr-Ag หลุดไปพร้อมกับโพรบทำให้การนำไฟฟ้าลดลง



รูปที่ 1.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดและจำนวนของการไฮบริดไธระหว่างโพรบและ target DNA (จำนวนการใช้ซ้ำของขั้วไฟฟ้า)

1.3.3 การทำซ้ำ

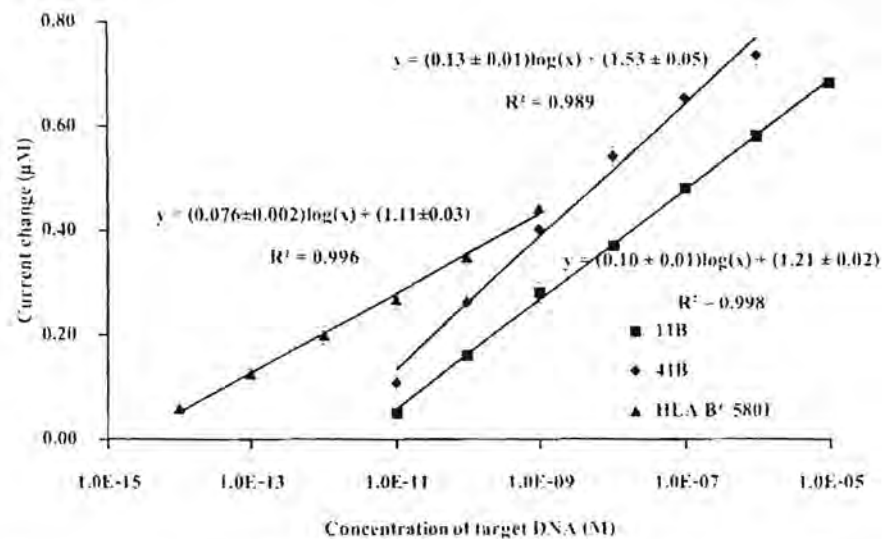
ศึกษาการเตรียมขั้วไฟฟ้าซ้ำที่ต่างกัน จำนวน 3 ขั้วไฟฟ้า และตรวจวัด Target DNA ที่ความเข้มข้น 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-7} และ 10^{-5} M จากรูปที่ 1.8 พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น มีค่า 1.7-3.5 % ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ตาม AOAC (± 3.3 %) ซึ่งสรุปได้ว่าการทำซ้ำที่ดี



รูปที่ 1.8 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดและความเข้มข้นของ Target DNA ที่ตรวจจากชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag จำนวน 3 ชั้น

1.3.4 ผลของความยาวสาย DNA

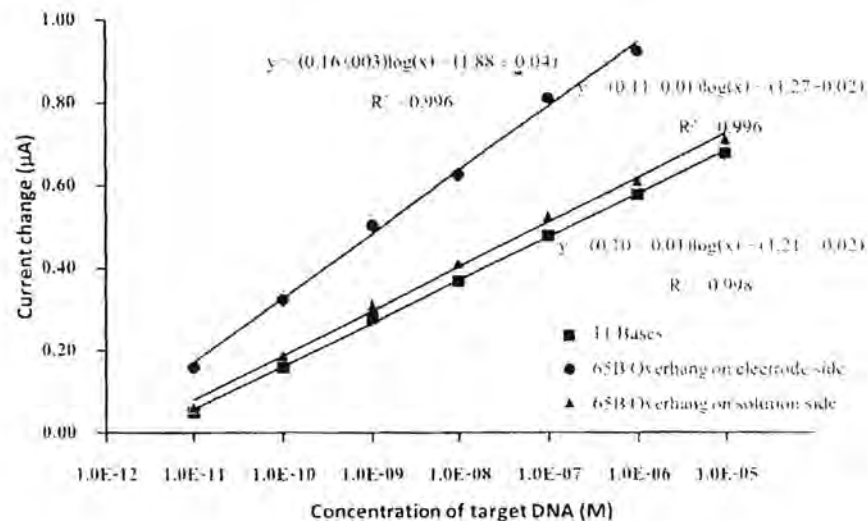
ศึกษาผลของจำนวนเบสในสายของ DNA ที่มีผลต่อการ hybridization โดยใช้ DNA 3 สายที่มีความยาวหรือจำนวนเบสแตกต่างกันคือ ยีน HLA-B*58:01 ซึ่งมีจำนวนเบส 200 เบส, DNA 41 เบส และ 11 เบส พบว่า DNA ที่มีจำนวนเบส 41 เบส จะมีความไววิเคราะห์ที่สูงกว่า 11 เบส เนื่องมาผลของ overhang เมื่อเกิดการ hybridization ระหว่าง PNA-DNA ทำให้ AQ ที่ติดอยู่ที่ปลาย โพรบเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ยากขึ้น จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่ได้มีค่าที่สูงขึ้น ในส่วนของยีน HLA-B*58:01 จะเห็นได้ว่าให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด (10^{-14} M) แต่ให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำลง (ดังรูปที่ 1.9) อาจเนื่องมาจากเหตุผล 2 ประการคือ ยีน HLA-B*58:01 เป็น DNA ที่มีความยาวเบส 200 เบส ซึ่งมีขนาดที่ใหญ่ทำให้ตัวมันเองเกิดความแออัดซึ่งอาจไปลดความสามารถในการเข้าไปจับ PNA บนผิวหน้าชีวไฟฟ้า และเหตุผลที่สองคือ DNA ซึ่งจะมีประจุลบ เมื่อมีจำนวน overhang ที่ยาวอาจทำให้เกิดการผลักกันเองทำให้ความสามารถในการเข้าไปจับกับ PNA บริเวณผิวหน้าชีวลดลงเช่นกัน



รูปที่ 1.9 ผลความยาวของสาย target DNA ที่มีจำนวนเบสแตกต่างกัน ต่อสัญญาณการตรวจวัด

1.3.5 ผลของตำแหน่ง overhang ของ target DNA

ศึกษาตำแหน่งของ overhang ที่แตกต่างกันโดยใช้ target DNA ที่มีความยาวเบส 65 เบส จากรูปที่ 1.10 พบว่า target DNA ที่มีตำแหน่งของ overhang อยู่บนหัวอิเล็กโทรดมีความไววิเคราะห์สูงกว่า target DNA ที่มีตำแหน่งของ overhang อยู่ในสารละลาย เนื่องจากตำแหน่งของ overhang อยู่บนหัวอิเล็กโทรดทำให้ผิวหน้าของอิเล็กโทรดหนาขึ้นจึงทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนยากขึ้น



รูปที่ 1.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของ target DNA ตำแหน่งของ overhangs ที่แตกต่างกัน

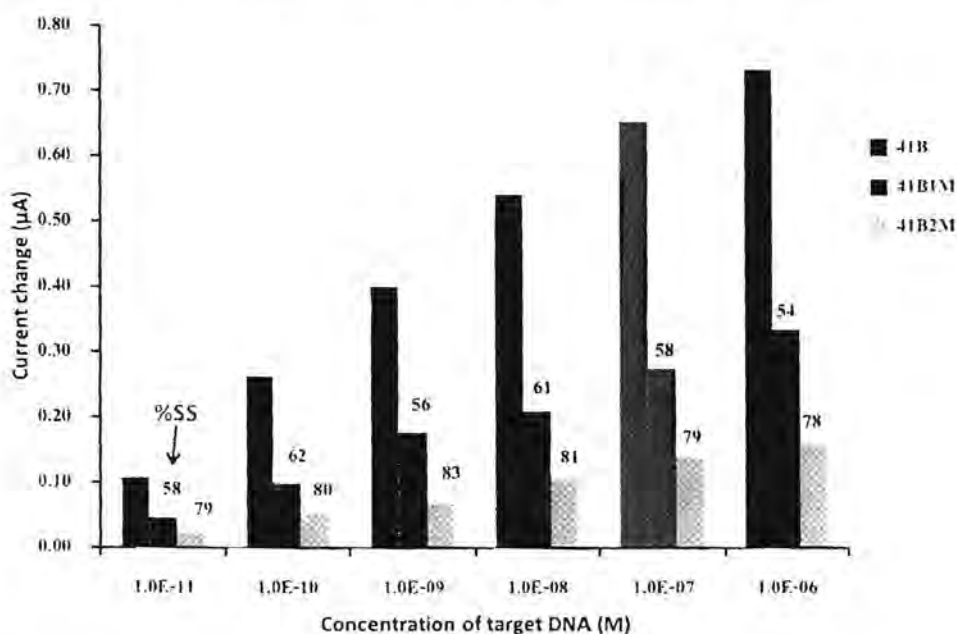
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความไววิเคราะห์ของ complementary DNA (11 เบส) กับ target DNA ที่มีตำแหน่งของ overhang อยู่ในสารละลาย พบว่า ความไววิเคราะห์ของ DNA ทั้งสองสาย มีค่าที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งของ overhang ซึ่งอยู่ในสารละลายไม่ส่งผลกระทบต่อสัญญาณการวิเคราะห์

1.3.6 ความจำเพาะเจาะจง

โดยนำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้าด้วย PANI-Gr-Ag ตรวจวัด target DNA ที่มีความยาวของเบส 41 เบส ซึ่งเป็น complementary target DNA และ DNA ที่มีเบสแตกต่างกัน จำนวน 1 เบส (single mismatch) และ 2 เบส (double mismatch) ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-11} ถึง 1.0×10^{-6} โมลาร์ แล้วนำค่าผลต่างของกระแสไฟฟ้าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า %signal suppression(%SS) ดังสมการที่ 2 โดยถ้า %SS แสดงว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงสูง

$$\%SS = \frac{\Delta C_{complementary DNA} - \Delta C_{mismatched DNA}}{\Delta C_{complementary DNA}} \times 100$$

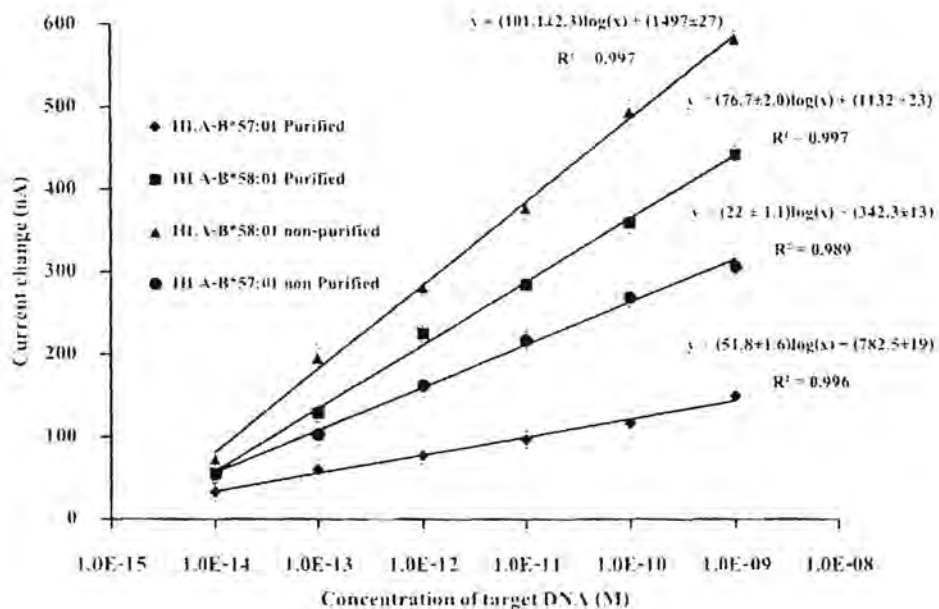
จากรูปที่ 1.11 พบว่า complementary target DNA ให้ค่าความไววิเคราะห์สูงสุด ส่วน %SS ของเบสที่ต่างจำนวน 1 เบส มีค่าเท่ากับ 54-62% และ %SS ของเบสที่แตกต่าง จำนวน 2 เบส มีค่าเท่ากับ 78-83% แสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อ target DNA



รูปที่ 1.11 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้น DNA ที่เป็น complementary target DNA และ DNA ที่มีเบสแตกต่างกันจำนวน 1 เบส และ 2 เบส

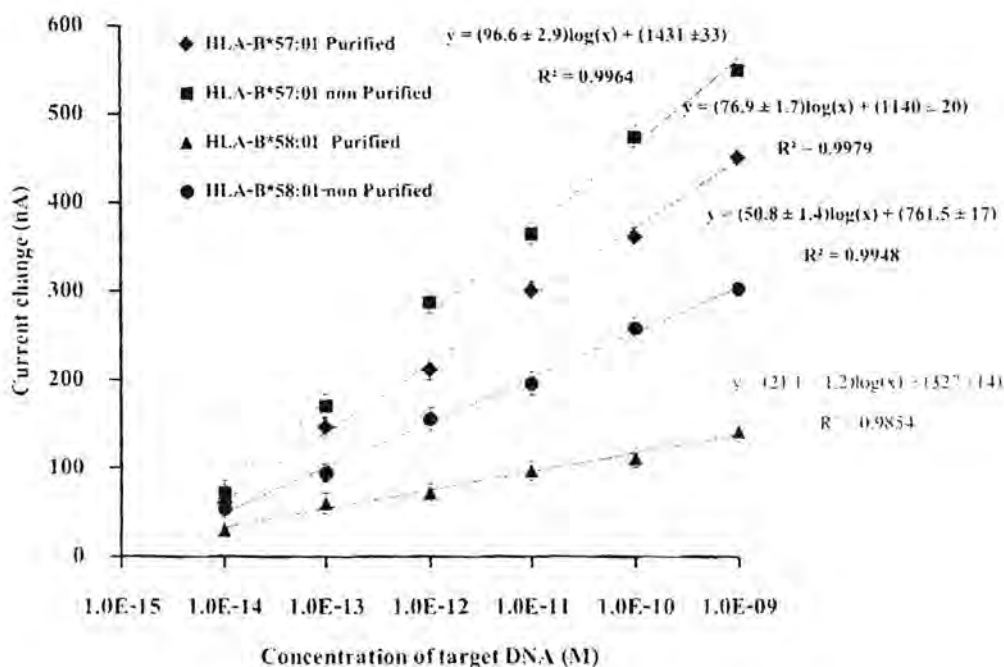
1.3.7. การวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ HLA-B*57:01 genes

โดยนำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag ที่มีคาร์ตริงโพรบที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ โพรบ P1 ซึ่งจำเพาะกับยีน HLA-B*58:01 และ โพรบ P2 ซึ่งจำเพาะกับยีน HLA-B*57:01 ยีนทั้งสองชนิดนี้มีจำนวนเบสเท่ากัน แต่มีเบสแตกต่างกันจำนวน 2 เบส โดยนำทั้งสองขั้วไฟฟ้าไปวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ HLA-B*57:01 ที่ทราบความเข้มข้น ซึ่งในกรณีของการใช้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยโพรบ P1 (รูปที่ 1.12) พบว่า ค่าความไววิเคราะห์ของ purified PCR HLA-B*58:01 มีค่าต่ำกว่า unpurified PCR HLA-B*58:01 เนื่องจากในตัวอย่าง unpurified PCR มีองค์ประกอบของสารอื่นที่เหลื่อมมาจากขั้นตอนการ PCR ซึ่งอาจไปเกาะอยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำให้ AQ ที่ติดอยู่ที่ปลายโพรบเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ยากขึ้นจึงทำให้สัญญาณการตรวจวัดลดลง และเมื่อพิจารณาการตรวจวัดในตัวอย่าง purified PCR ของยีน HLA-B*57:01 พบว่าให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำสุด เนื่องจากยีน HLA-B*57:01 มีลำดับเบสที่ต่าง 2 ตำแหน่งจึงทำให้ความสามารถในการเกิด hybridization ลดลง ส่วน unpurified PCR ของยีน HLA-B*57:01 ให้ค่าความไววิเคราะห์ที่สูงกว่า purified PCR ของยีน HLA-B*57:01 ซึ่งเหตุผลเช่นเดียวกับกรณีของ unpurified PCR ในยีน HLA-B*58:01



รูปที่ 1.12 สัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของเซนเซอร์ที่พัฒนา ขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ ยีน HLA-B*57:01 โดย probe P1

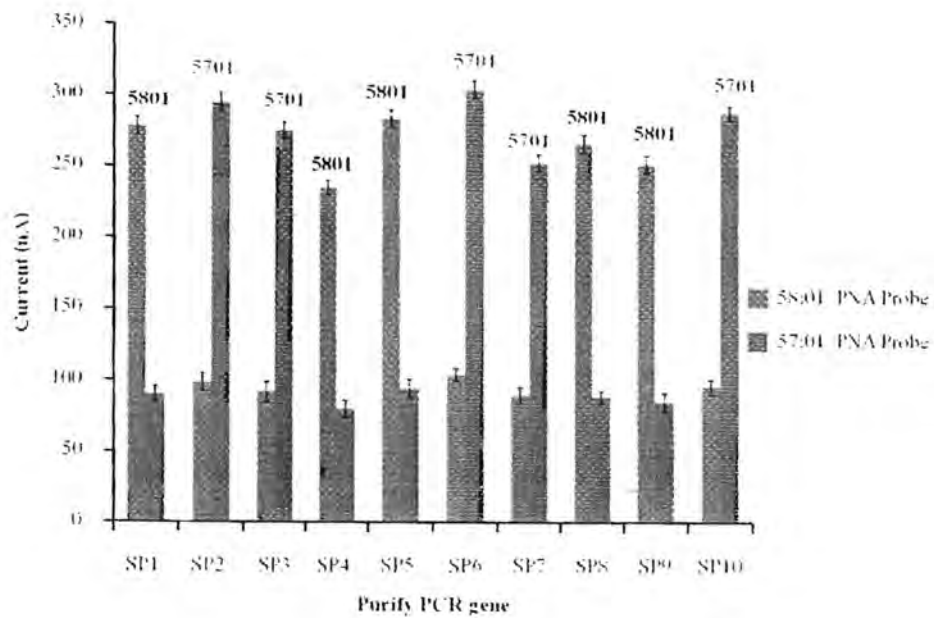
สำหรับกรณีของการใช้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยโพรบ P2 ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน HLA-B*57:01 มากกว่า HLA-B*58:01 จากรูปที่ 1.13 จะเห็นได้ว่าค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากการค่าความไววิเคราะห์ของ purified PCR HLA-B*57:01 มีค่าต่ำกว่า unpurified PCR HLA-B*57:01 และ purified PCR ของยีน HLA-B*58:01 พบว่าให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำสุด ซึ่งสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับการใช้โพรบ P1



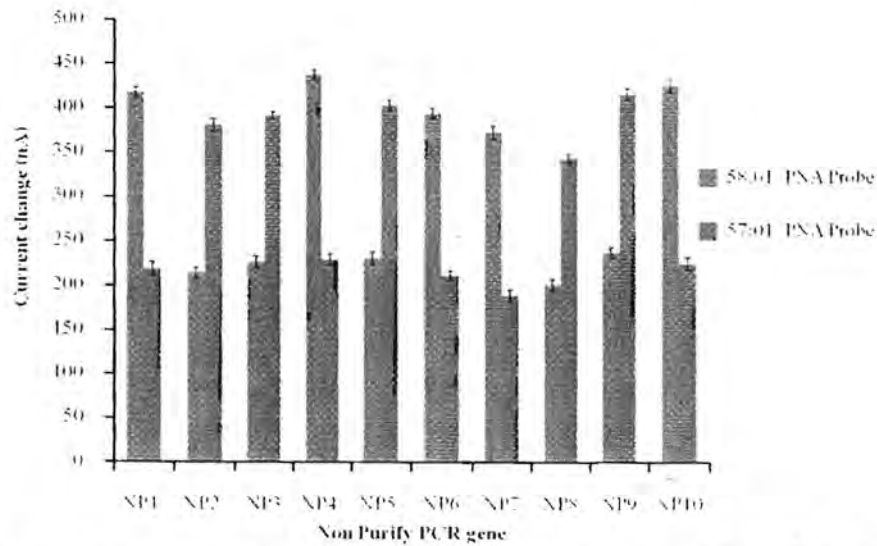
รูปที่ 1.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ ยีน HLA B*57:01 genes โดย probe P2

1.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

นำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag ที่มีการตรึงโพรบ P1 และ P2 ตรวจวัด DNA ในตัวอย่างจริง ที่ผ่านการ purified และ unpurified PCR ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าโพรบ P1 จะให้สัญญาณการตรวจวัดต่อยีน HLA-B*58:01 สูงกว่า ยีน HLA-B*57:01 ประมาณ 3 เท่า ในตัวอย่าง purified PCR และ 2 เท่า ในตัวอย่าง unpurified PCR (ดังรูปที่ 1.14 และ 1.15) ส่วนกรณีการใช้โพรบ P2 ให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน คือจะให้สัญญาณการตอบสนอง ต่อยีน HLA-B*57:01 สูงกว่า ยีน HLA-B*58:01 ประมาณ 3 เท่า ในตัวอย่าง purified PCR และ 2 เท่า ในตัวอย่าง unpurified PCR จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสัญญาณการตอบสนองของยีนทั้งสองชนิดชนิดได้



รูปที่ 1.14 สัญญาณการตรวจวัดในตัวอย่าง purified PCR ด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ probe P1 และ P2



รูปที่ 1.15 สัญญาณการตรวจวัดในตัวอย่าง unpurified PCR ด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ probe P1 และ P2

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต
เขียนบทความตีพิมพ์

โครงการย่อยที่ 2: การพัฒนาเซนเซอร์เพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยวิธียัดเกาะทางไฟฟ้า (electrodeposition) ของอนุภาคนาโนเงินที่มีลักษณะโครงสร้างนาโนโพมร่วมกับพอลิเมอร์นำไฟฟ้า

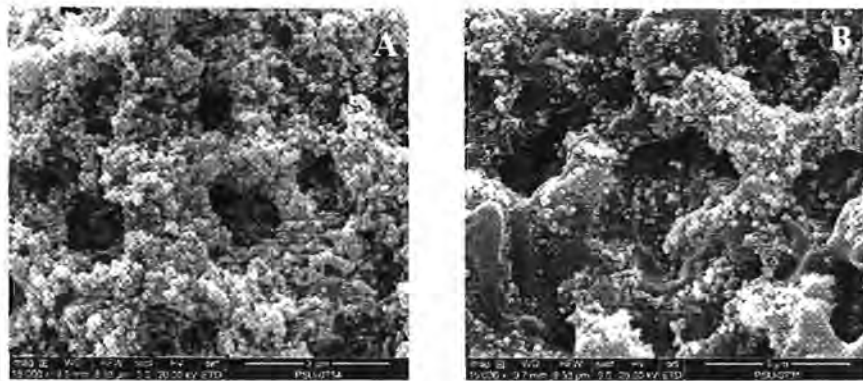
งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) แบบไม่ติดฉลากโดยอาศัยวิธียัดเกาะทางไฟฟ้า (electrodeposition) ของอนุภาคนาโนเงินที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นนาโนโพม (silver nanofoam, AgNF) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเพิ่มพื้นที่ผิว เป็นตัวเพิ่มสัญญาณ และทำหน้าที่เป็น redox probe ไปด้วยในขณะเดียวกัน ร่วมด้วยการใช้การพอลิไพโรล (polypyrrole, PPy) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์นำไฟฟ้า (conducting polymer) ที่มีหมู่เอมีน เพื่อเพิ่มปริมาณ active site ของ PNA probe ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มปริมาณของการ hybridization ของ complementary PNA-DNA ต่อไป โดยการตรวจวัดสัญญาณจะตรวจวัดผ่านสัญญาณที่ลดลงของ redox probe (silver nanofoam) ก่อนและหลังการเกิด PNA-DNA hybridization

เนื่องด้วยงานวิจัยนี้สนใจที่จะนำเซนเซอร์ที่พัฒนาไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ถูกถอดรหัสจากจีโนมในบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์ มีบทบาทควบคุมการทำงานของเซลล์โดยควบคุมการแสดงออกของยีน หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า miRNA มีส่วนร่วมในการควบคุมกระบวนการก่อมะเร็งในการบ่งชี้ระดับความรุนแรง การแพร่กระจาย การพยากรณ์โรค และการตอบสนองต่อการรักษาโรคมะเร็ง ดังนั้นสามารถใช้ miRNA เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) ได้ (Wen et al., 2013; Yin et al., 2012; Kumarswamy et al., 2011) miRNA มีหลายชนิด แต่ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาที่จะตรวจวัด miRNA-21 เนื่องจากปริมาณของ miRNA-21 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพในมะเร็งหลายชนิด โดย miRNA-21 มีจำนวนเบสทั้งหมด 22 เบส โดยงานวิจัยที่ได้ดำเนินการ ประกอบด้วย

2.1 การเตรียมขั้ว PPy/AgNF/Au และการทดสอบคุณลักษณะ

ปรับปรุงผิวขั้วไฟฟ้าทองด้วยชั้นของ AgNF (electrodeposition) ด้วยเทคนิค chronopotentiometry โดยให้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ -0.010 A เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นปรับปรุงด้วยชั้น polypyrrole ด้วยเทคนิค ไชคลิกโวลแทมเมตรี ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.4-0.9 โวลต์ จำนวน 3 รอบ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าพื้นผิวของขั้วไฟฟ้า AgNF/Au มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายโฟมปกคลุมทั่วบริเวณผิวขั้วไฟฟ้าทอง (รูปที่ 2.1 A) กรณีขั้ว PPy/AgNF/Au จะสังเกตเห็นการเกิดเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ของ PPy เข้าไปปกคลุมชั้นของ AgNF (รูปที่ 2.1B)

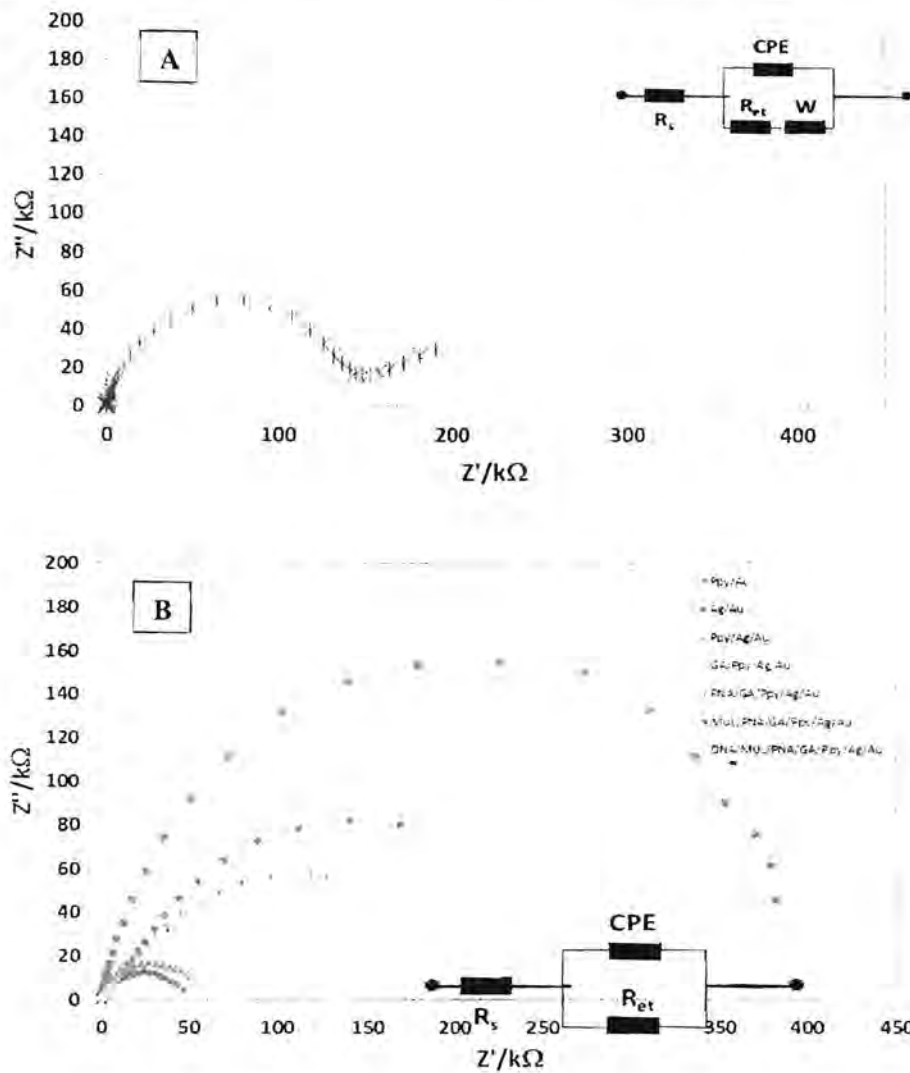


รูปที่ 2.1 ภาพ SEM จากการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วย (A) AgNF/Au และ (B) PPy/AgNF/Au

ได้ศึกษาพฤติกรรมทางไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าในขั้นตอนของปรับปรุงผิวหน้าด้วยวัสดุทางเคมีและขั้นตอนการตรึง PNA probe ขั้วที่ถูกปรับปรุงในแต่ละขั้นถูกนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิคอิมพีแดนซ์ สเปคโตรสโคปี (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) ในสารละลาย 0.3 M phosphate buffer (pH 7) โดยใช้ความถี่ของศักย์ไฟฟ้าในช่วง 10 kHz-1 mHz โดยขั้วที่ทำการศึกษาได้แก่

1. Bare Au electrode
2. AgNF/Au electrode
3. PPy/Au electrode
4. PPy/AgNF/Au electrode
5. GA/PPy/AgNF/Au electrode *GA คือ glutaraldehyde เป็นตัว cross-linker
6. PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode
7. MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode *MUL คือ 11-mercapto-1-undecanol เป็นตัว blocking
8. DNA/MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode

จากการทดลอง ลักษณะของ impedance spectra ของขั้วไฟฟ้าในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุง แสดงดังรูปที่ 2.2

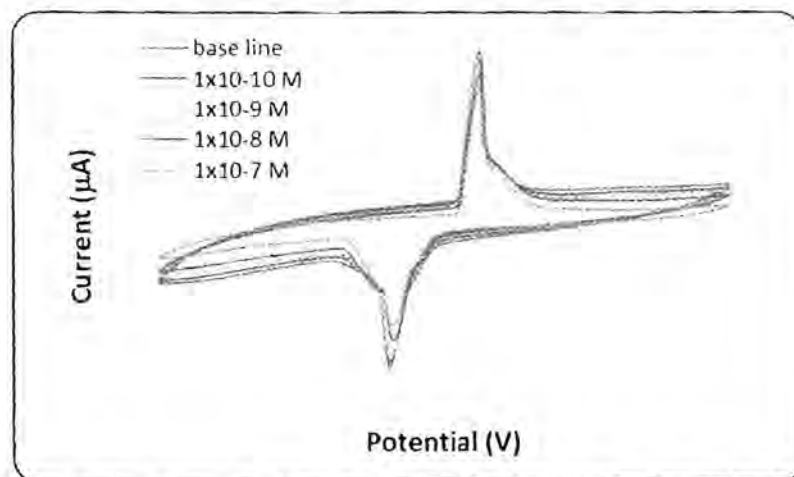


รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะ impedance spectra และวงจรที่เป็นไปได้ของ (A) Bare Au electrode (B) PPy/Au electrode, AgNF/Au electrode, PPy/AgNF/Au electrode, GA/PPy/AgNF/Au electrode, PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode, MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode และ DNA/MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode

จากรูปที่ 2.2A ขั้ว bare Au ให้ค่าความต้านทานของการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer resistance (R_{et}) $136.7 \text{ k}\Omega$ และจากรูปที่ 2.2B หลังจาก electrodeposite silver nanofoam ลงบน ขั้วทอง (AgNF/Au electrode) ขั้วดังกล่าวให้ค่า R_{et} เพิ่มขึ้น ($R_{et} = 0.401 \text{ M}\Omega$) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ พื้นผิวขั้วมีลักษณะเป็นรูพรุนของอนุภาคนาโนเงินซึ่งรูพรุนที่มีขนาดเล็ก จะส่งผลให้ electrical double layer ที่เกิดขึ้นภายในรูพรุนอยู่ใกล้กัน ทำให้ไอออนของอิเล็กโทรไลต์เคลื่อนที่ภายในขั้วได้ยาก ส่งผลให้

ความต้านทานของระบบเพิ่มขึ้น แต่เมื่อปรับปรุงขั้วดังกล่าวด้วย polypyrrole ซึ่งเป็น conducting polymer (PPy/AgNF/Au electrode) ค่า R_{et} ลดลง ($R_{et} = 57.0 \text{ k}\Omega$) เนื่องจาก PPy ที่ไปเคลือบบนผิวเพิ่มการนำไฟฟ้า ในขณะที่ R_{et} เพิ่มขึ้น ($R_{et} = 115.6 \text{ k}\Omega$) เมื่อขั้วถูกปรับปรุงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, GA) (GA/PPy/AgNF/Au electrode) ในขั้นถัดไป เนื่องมาจากการมีสมบัติเป็นฉนวนของ GA และเมื่อ PNA probe ถูกตรึงไว้บนผิวหน้าขั้วโดยสารเชื่อมโยงโซ่ที่เป็น GA ซึ่งเป็นการเพิ่มความเป็นฉนวนให้กับขั้วส่งผลให้ค่า R_{et} เพิ่มขึ้น ($R_{et} = 163.1 \text{ k}\Omega$) และเมื่อ block ด้วย 11-MUL ค่า R_{et} เพิ่มขึ้นเช่นกัน ($R_{et} = 0.332 \text{ M}\Omega$) ซึ่งเป็นผลของสมบัติความเป็นฉนวนของ 11-MUL และหลังจากการ hybridization กับ target DNA ขั้วไฟฟ้าให้ค่า R_{et} เพิ่มขึ้นอีก ($R_{et} = 0.466 \text{ M}\Omega$) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงขั้วในแต่ละขั้นเป็นไปตามจุดประสงค์ของการปรับปรุง

ได้ทดสอบเบื้องต้นการตรวจวัดสัญญาณจากการเกิด hybridization ระหว่าง probe และ target DNA ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (cyclic voltammetry) พิจารณาจากการลดลงของค่ากระแสไฟฟ้าในปฏิกิริยา redox ของ silver อันเนื่องมาจากสมบัติความเป็นฉนวนที่เพิ่มขึ้น พบว่าการลดลงของค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ target DNA ดังรูปที่ 2.3



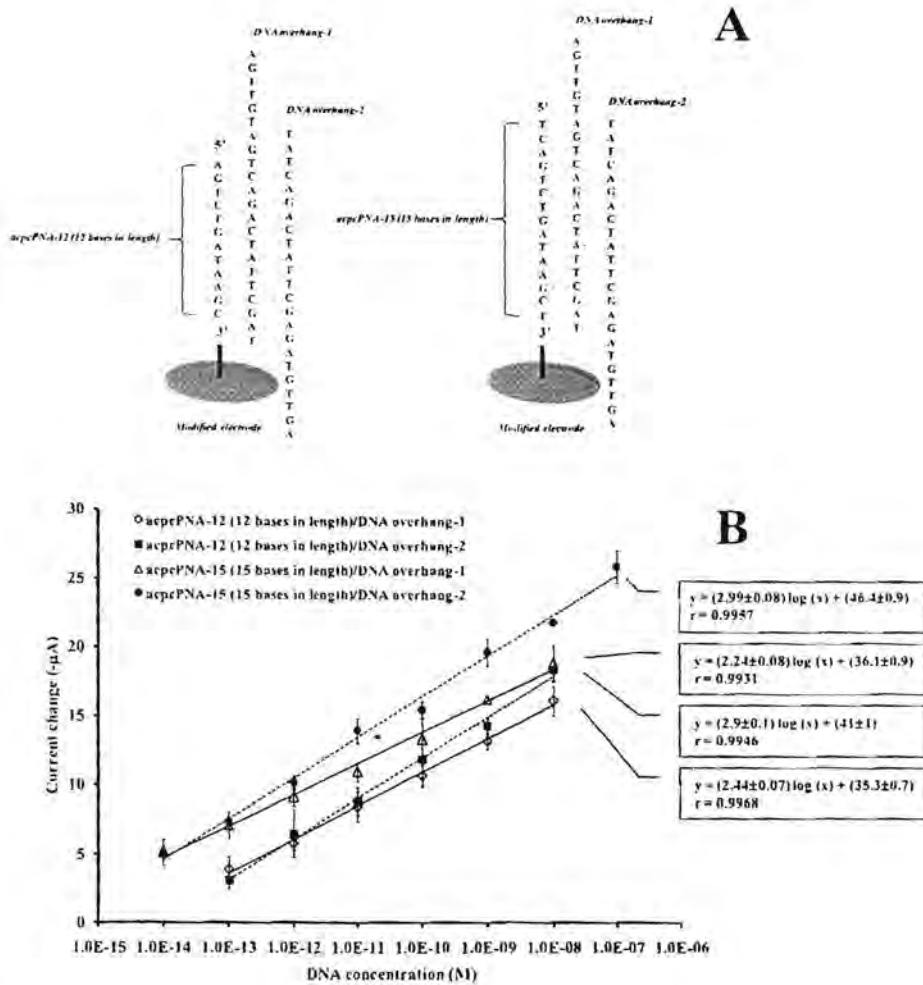
รูปที่ 2.3 สัญญาณการตรวจวัดที่ได้เมื่อความเข้มข้นของ target DNA ที่แตกต่างกัน (1×10^{-10} - 1×10^{-7} M)

2.2. การศึกษาผลความยาวของ acpcPNA probe และผลของ overhang

ศึกษาผลของความยาว probe ที่มีต่อการตรวจวัด target นั้น acpcPNA probe ที่มีความยาว 12 bases (acpcPNA-12) และ acpcPNA probe ที่มีความยาว 15 bases (acpcPNA-15) ซึ่งนำมาใช้ในการตรวจวัด target DNA (ทดสอบเบื้องต้น) ซึ่ง DNA ที่ใช้นั้นมีจำนวนและลำดับเบสเหมือนกับ target miRNA-21 (ใช้เบส T แทนเบส U) ลักษณะการเข้าคู่กันระหว่าง PNA กับ target DNA ที่คาดว่าจะแสดงดังรูปที่ 2.4 A

จากการทดลองพบว่าการใช้ acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 ในการตรวจวัด DNA-overhang 1 (DNA ที่มีตำแหน่งเบสคู่สมและส่วนของ overhang เหมือนกับ miRNA-21) ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 2 ช่วงคือ 1.0×10^{-13} - 5.0×10^{-8} M และ 5.0×10^{-8} - 1.0×10^{-5} M (สำหรับการใช้ acpcPNA-12) และ ให้ 1.0×10^{-14} - 1.0×10^{-7} M และ 1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-5} M (สำหรับการใช้ acpcPNA-15) พฤติกรรมดังกล่าว อาจเนื่องมาจากในกรณีช่วงความเข้มข้นของ DNA ต่ำ การจับกันระหว่าง PNA probe กับ DNA บน ผิวหน้าขั้วมีปริมาณน้อยมากส่งผลให้ค่า ΔI เพิ่มขึ้นทีละน้อย แต่เมื่อความเข้มข้นของ DNA เพิ่มสูงขึ้นที่ ระดับความเข้มข้นช่วงหนึ่ง จะส่งผลให้เกิดเบสคู่สมมากขึ้น เบสคู่สมที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้เกิดการยึดตัว (rigid) ของเกลียวสายคู่มากขึ้น ส่งผลให้ DNA สามารถเข้าไปจับกับ PNA probe ได้ง่ายและมากขึ้น ซึ่ง นำมาสู่การเปลี่ยนแปลงของค่า ΔI ที่มากขึ้นดังผลที่ได้ข้างต้น (Li et al., 2014) อย่างไรก็ตามเพื่อให้ สอดคล้องกับปริมาณของ miRNA-21 ในตัวอย่างพลาสมาหรือซีรัมที่พบในช่วงประมาณ fM ถึง nM (Komatsu et al., 2010; Tsujiura et al., 2010) ดังนั้น ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นต่ำจะ ถูกนำมาใช้พิจารณาในการศึกษาพารามิเตอร์อื่น และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวนเบสที่ มากกว่าของ probe ส่งผลต่อสัญญาณการตรวจวัดที่สูงขึ้น และให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด กว้างกว่า ดังนั้น acpcPNA-15 จึงถูกเลือกใช้ในการศึกษาในพารามิเตอร์อื่นต่อไป

นอกจากนี้เนื่องจาก target มีความยาวมากกว่า PNA probe ที่ใช้ในการตรวจวัดส่งผลให้มีส่วน ของ overhang (รูปที่ 2.4A) ดังนั้น ได้มีการศึกษาผลของ target overhang ด้วย จากผลการทดลองดัง รูปที่ 2.4B พบว่าทั้งการใช้ acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 ในการตรวจวัด DNA-overhang 2 ซึ่งมี ส่วน overhang ที่ยาวอยู่บนผิวหน้าขั้วให้สัญญาณการตรวจวัดที่สูงกว่าการตรวจวัด DNA-overhang 1 ซึ่งมีส่วน overhang ที่ยาวอยู่ในสารละลาย อาจเนื่องมาจากเมื่อเกิด hybridization ทำให้ความเป็นฉนวนที่ บริเวณผิวหน้าขั้วมากกว่า ส่งผลให้ค่าการเปลี่ยนของกระแสหลังการตรวจวัดเห็นความแตกต่างมากกว่า



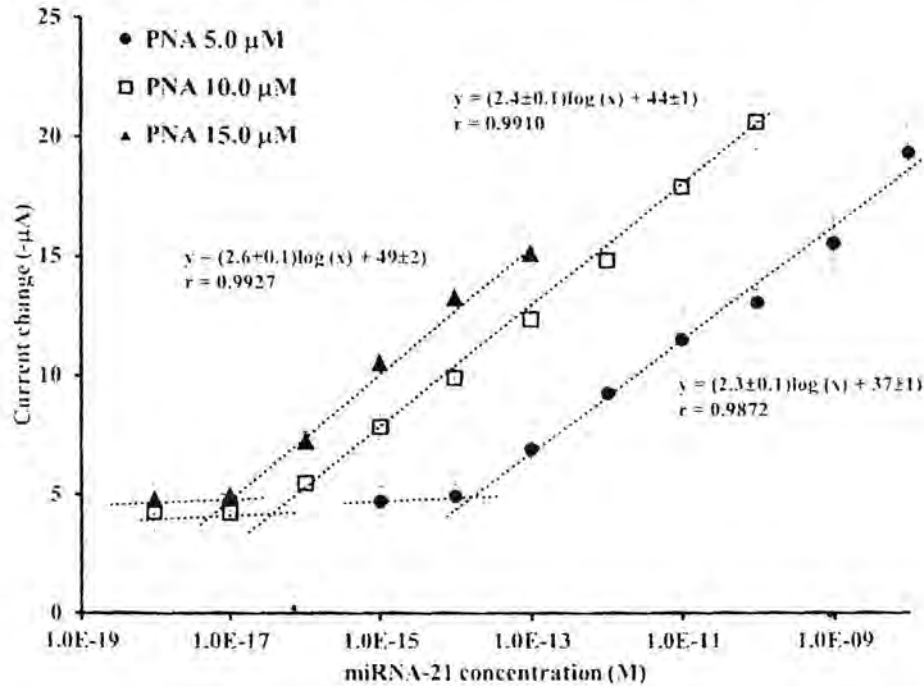
รูปที่ 2.4 (A) แบบจำลองการเข้าคู่กันระหว่าง acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 กับ DNA-overhang 1 และ DNA-overhang 2 (B) กราฟมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด DNA-overhang 1 และ DNA-overhang 2 ด้วยขั้วที่ปรับปรุงด้วย acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 probe

2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

2.3.1 ความเข้มข้นของ acpcPNA probe

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PNA probe ในการใช้ตรวจวัด target miRNA-21 นั้น acpcPNA-15 ความเข้มข้น 5.0, 10.0 และ 15.0 μM ถูกนำมาปรับปรุงขั้ว PPy/AgNF/Au จากนั้นนำมาใช้ในการตรวจวัด miRNA-21 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จากการทดลอง (รูปที่ 2.5) พบว่าทั้งความไววิเคราะห์ (ความชันกราฟ) และค่า LOD มีค่าที่ดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้น probe ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น 15.0 μM acpcPNA-15 probe ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่สั้น เนื่องจากปริมาณ probe ที่มากเกินไปส่งผลให้สัญญาณแรก (original signal) มีค่าต่ำ ทำให้ช่วงการ

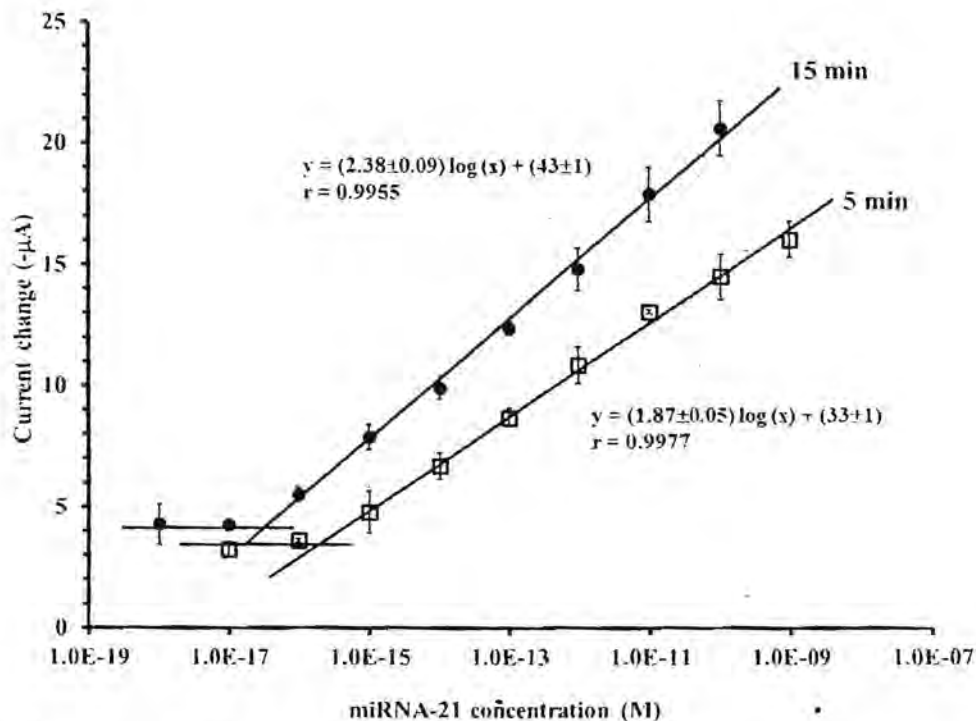
ตรวจวัดระหว่างสัญญาณเริ่มต้นกับสัญญาณสูงสุดที่จะตรวจวัดได้เมื่อมี target (saturated condition) แคลบลง ดังนั้น เพื่อให้ได้ค่า LOD ที่ต่ำร่วมกับการมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง 10.0 μM acpcPNA-15 probe จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของ acpcPNA-15 probe ที่ความเข้มข้น 5.0, 10.0 และ 15.0 μM ต่อสัญญาณการตรวจวัด miRNA-21

2.3.2 เวลาที่ใช้ในการไฮบริดระหว่าง PNA-DNA

ได้ศึกษาระยะเวลาในการไฮบริดไคเซชันระหว่าง PNA-DNA ที่เวลา 5 และ 15 นาที จากผลการทดลองดังรูปที่ 2.6 พบว่า ที่เวลา 5 นาที เซนเซอร์ให้ค่า LOD เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 0.030 fM เป็น 0.20 fM อย่างไรก็ตาม LOD ดังกล่าวก็ยังเพียงพอต่อการตรวจวัด miRNA-21 ที่อาจพบในตัวอย่างเหลวสม่าหรือซีรัมในช่วงประมาณ fM ถึง nM (Komatsu *et al.*, 2010; Tsujiura *et al.*, 2010) ดังนั้น เวลา 5 นาทีในการเกิด hybridization จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจวัด miRNA-21 ด้วยขั้วที่พัฒนานี้



รูปที่ 2.6 ผลของเวลาในการเกิด hybridization ที่ 5 และ 15 นาที ต่อสัญญาณการตรวจวัด miRNA-21

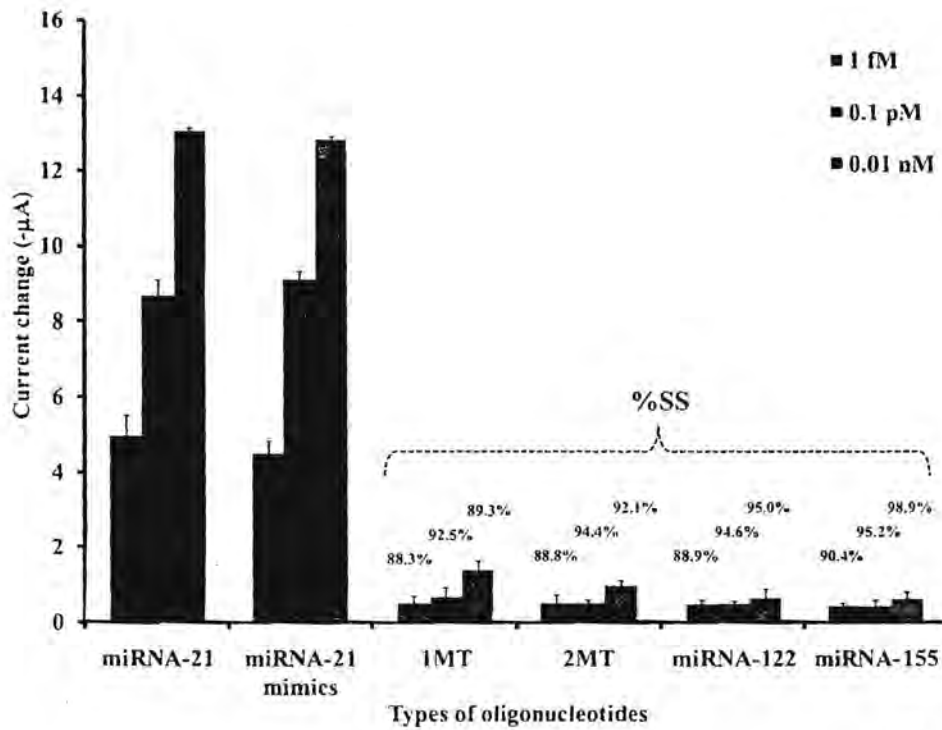
2.4 ประสิทธิภาพของเซนเซอร์

2.4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง และ ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ด้วยเวลาในการเกิด hybridization 5 นาที) เซนเซอร์ที่พัฒนาให้ช่วงความเป็นตรงอยู่ในช่วง 2.0×10^{-16} (0.20 fM) ถึง 1.0×10^{-9} M (1.0 nM) ด้วยค่า LOD เท่ากับ 2.0×10^{-16} (0.20 fM) (ดังรูปที่ 2.6)

2.4.2 ความจำเพาะเจาะจง

ศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) โดยนำเซนเซอร์ที่พัฒนาไปใช้ตรวจวัด oligonucleotide interferences ประกอบไปด้วย single mismatch target (1 MT) double mismatch (2MT) miRNA-122 และ miRNA-155 ซึ่งในการศึกษากรณีดังกล่าวใช้ DNA สังเคราะห์ (miRNA-21 mimics) โดยที่ส่วนของ backbone เหมือน DNA แต่เปลี่ยนเบส A เป็นเบส U จากการทดลอง (รูปที่ 2.7) พบว่าเซนเซอร์ที่พัฒนามีความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างระหว่าง target miRNA-21 และ oligonucleotide interferences ได้ดี โดยสามารถพิจารณาได้จากค่า %SS ที่สูงหลังจากการตรวจวัด

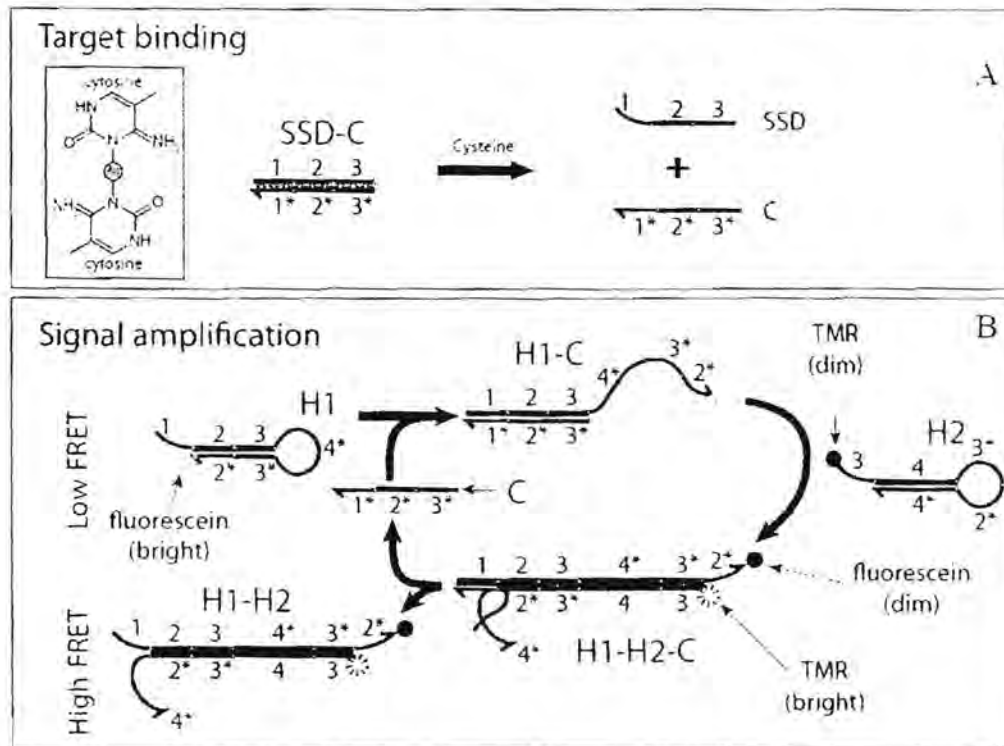


รูปที่ 2.7 สัญญาณการตอบสนองจากการตรวจวัด miRNA-21 miRNA-21 mimics และ oligonucleotide interferences (single mismatch target (1 MT) double mismatchtarget (2MT) miRNA-122 และ miRNA-155) ความเข้มข้น 1 fM 0.1 pM และ 0.01 nM ด้วยขั้วที่ปรับปรุงด้วย acpcPNA-15 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

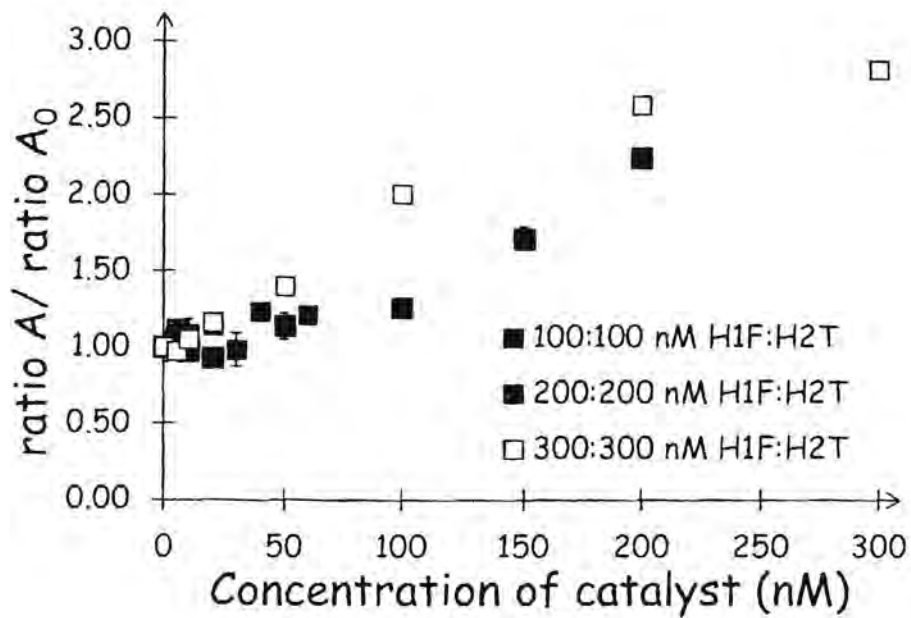
ศึกษาการประยุกต์ใช้เซนเซอร์ในการตรวจวัด target miRNA-21 ในตัวอย่างจริงซึ่งเป็นตัวอย่างพลาสมา และเขียน manuscript

โครงการย่อยที่ 3: พัฒนาเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการตรวจวัด cysteine โดยอาศัย PNA และเทคนิค catalyzed hairpin assembly (CHA)

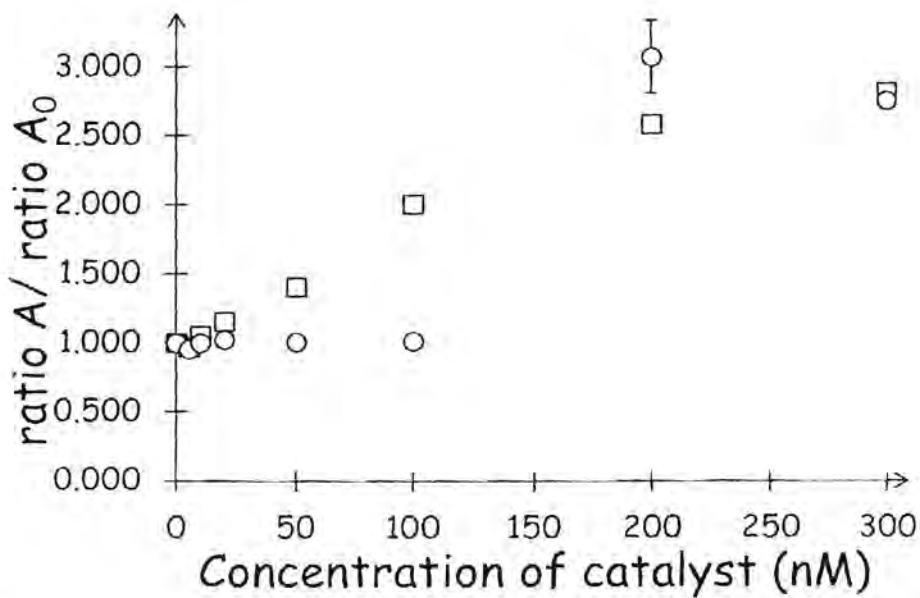


รูปที่ 3.1 แสดงหลักการการทำงานของเซนเซอร์ ซึ่งประกอบด้วยสองส่วนคือส่วน Target binding และส่วน Signal amplification

ในช่วง 6 เดือนนี้ ได้ทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเซนเซอร์ในขั้นตอนที่ 2 (Signal amplification) (รูปที่ 3.1) ในบัฟเฟอร์ชนิดใหม่คือ HEPES เนื่องจากโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ใช้ อยู่เดิมจะทำปฏิกิริยากับไอออนเงินทำให้เกิดการตกตะกอนและขัดขวางการทำงานของเซนเซอร์ (ตาม คำแนะนำของ ศ. ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) โดยควบคุมให้ pH มีค่า 7.4 เท่าเดิม แต่ลดความเข้มข้นของ บัฟเฟอร์เหลือ 10 mM เพิ่ม 200 mM NaNO₃ และ 1.5 μM AgNO₃ จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าใน บัฟเฟอร์ชนิดใหม่เซนเซอร์มีการตอบสนองต่อ DNA catalyst ได้ดีไม่แตกต่างกับกรณีที่ใช้โพแทสเซียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H1 และ H2 โดยใช้ DNA catalyst เป็นโมเลกุลเป้าหมาย พบว่าค่าที่ได้คือ 300 nM ทั้ง H1 และ H2 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 10 – 100 nM (catalyst) และค่าความไววิเคราะห์คือ 10.51 ± 0.64 μM⁻¹ ดังแสดงในรูปที่ 3.2

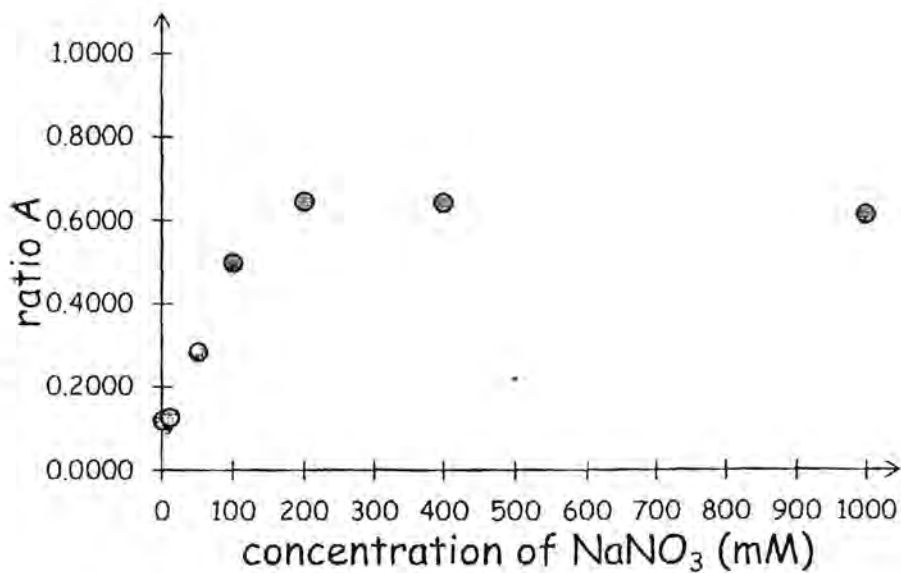


รูปที่ 3.2 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ DNA catalyst ที่ความเข้มข้นของ H1 และ H2 แตกต่างกัน



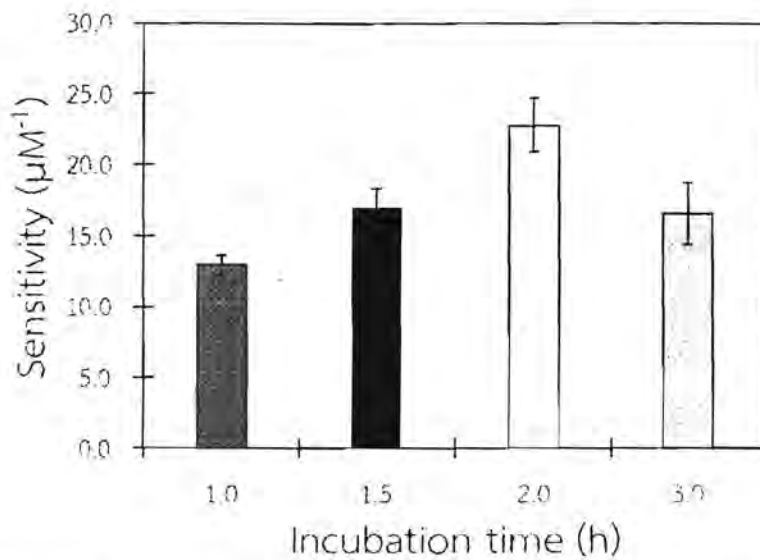
รูปที่ 3.3 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ PNA catalyst ที่ 300 nM H1 และ 300 nM H2

จากนั้นทดสอบการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ PNA catalyst โดยใช้เงื่อนไขเดียวกัน พบว่าเริ่มเห็นการตอบสนองที่ค่ามากกว่า 100 nM (ดังรูปที่ 3.3) จึงสรุปได้ว่า DNA catalyst ทำหน้าที่ได้ดีกว่า PNA catalyst ภายใต้เงื่อนไขดังกล่าว ทั้งนี้การที่ PNA catalyst ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ดีเท่า DNA catalyst อาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของเกลือไนบัพเฟอร์สูงเกินไป จึงได้ทดสอบการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ PNA catalyst ที่ความเข้มข้นของ NaNO_3 แตกต่างกัน ตั้งแต่ 0 - 1000 mM พบว่าเซนเซอร์มีการตอบสนองสูงสุดเมื่อ NaNO_3 มีความเข้มข้น 200 mM เป็นต้นไป (ดังรูปที่ 3.4) จึงสรุปว่าเซนเซอร์ตอบสนองต่อ DNA catalyst ได้ดีกว่า PNA catalyst จึงใช้ DNA catalyst ในการพัฒนาเซนเซอร์ต่อไป

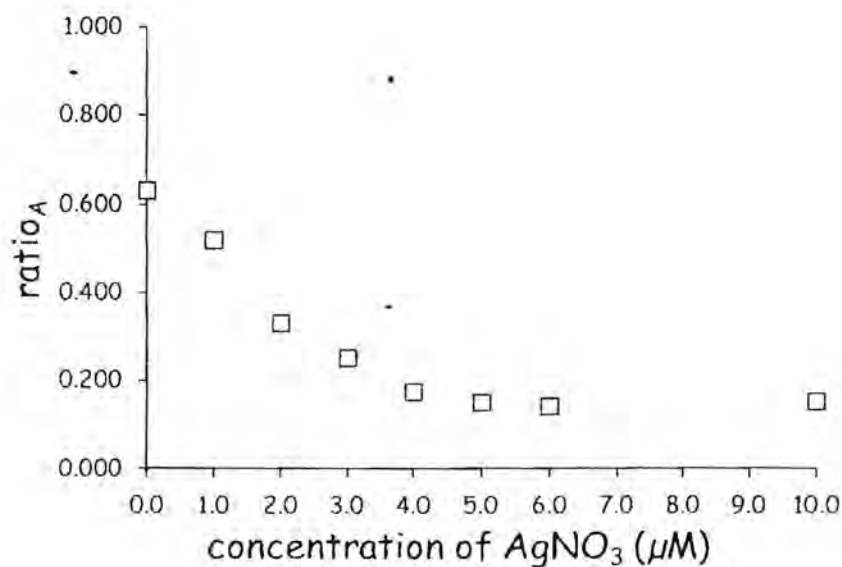


รูปที่ 3.4 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ 200 nM PNA catalyst ในบัฟเฟอร์ที่มี NaNO_3 ความเข้มข้นต่างๆ

ขั้นตอนถัดไปคือการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaNO_3 จากการทดลองพบว่าค่าที่ได้คือ 200 mM ทดสอบหา incubation time ที่เหมาะสม พบว่าได้ค่า 2 ชั่วโมง (รูปที่ 3.5) จากนั้นทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AgNO_3 ซึ่งวัดจากค่าที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้ค่า FRET efficiency (วัดผ่านค่า $(\text{ratio})_{\mu}/(\text{ratio})_{A0}$) มีค่าต่ำที่สุด พบว่าได้ค่า 5 μM (รูปที่ 3.6)

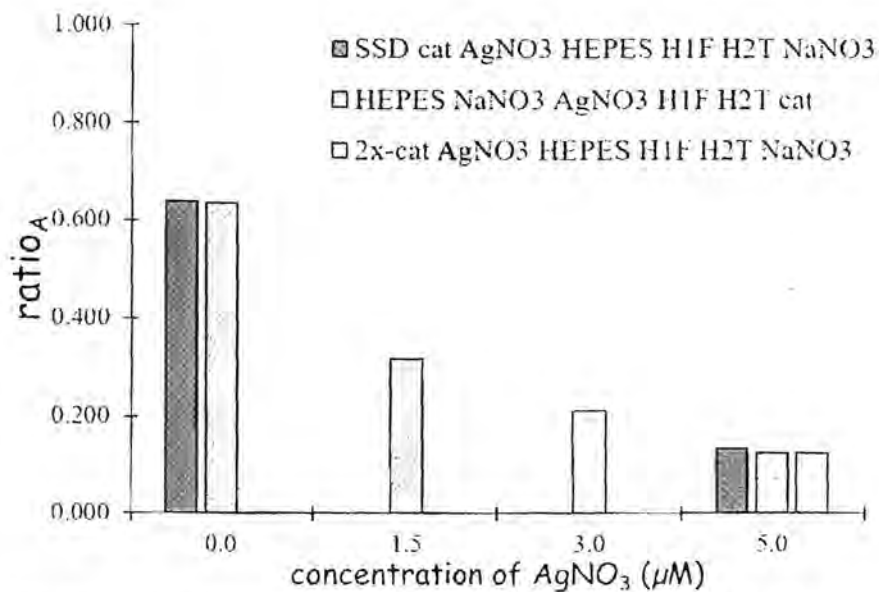


รูปที่ 3.5 แสดงผลของ incubation time ต่อการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ DNA catalyst



รูปที่ 3.6 แสดงผลของความเข้มข้นของ AgNO_3 ต่อค่า FRET efficiency (วัดผ่านค่า $(\text{ratio})_A/(\text{ratio})_{A0}$)

นอกจากนั้นยังพบว่าในกรณีที่มี C เพียงอย่างเดียว เซนเซอร์ก็มีการตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของ NaNO_3 ไม่แตกต่างกับกรณีที่มีทั้ง C และ SSD (ดังแสดงในรูปที่ 3.7) เบื้องต้นตั้งสมมติฐานว่าน่าจะมาจากสาเหตุที่ C มี cytosine อยู่จำนวนมากพอที่สามารถเข้าคู่เบสแบบ self-complementary ได้เมื่อมีไอออนเงิน เพื่อลดความซับซ้อนของเซนเซอร์ ในการทดลองหลังจากนี้จึงใช้ C เพียงอย่างเดียวในขั้นตอน Target binding



รูปที่ 3.7 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ในกรณีที่ใช้ C เพียงอย่างเดียว เทียบกับ ใช้ทั้ง C และ SSD ในขั้นตอน Target binding

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

ขณะนี้อยู่ในระหว่างการทดสอบการทำงานของเซนเซอร์โดยใช้ cysteine เป็น target analyte ซึ่งเป็นการผนวกรวมการสองส่วนเข้าด้วยกัน (ส่วน Target binding และส่วน Signal amplification) จากการทดลองพบว่าเซนเซอร์มีการตอบสนองต่อ cysteine ที่ความเข้มข้นสูง (ประมาณ 600 μM) และกำลังทำการศึกษาการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ cysteine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนจะทดสอบการใช้งานของเซนเซอร์กับตัวอย่างจริง และเขียน manuscript เพื่อส่งผลงานตีพิมพ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Kant, K., Priest, C., Shapter, J.G. and Losic, D. 2014. The Influence of Nanopore Dimensions on the Electrochemical Properties of Nanopore Arrays Studied by Impedance Spectroscopy. *Sensors.*, 14, 21316-21328.
- Wen, Y., Liu, G., Pei, H., Li, L., Xu Q., Liang, W., Li, Y., Xu, Li., Ren, S. and Fan, C. 2013. DNA nanostructure-based ultrasensitive electrochemical microRNA biosensor. *Methods.* 64: 276-282.
- Kumarswamy, R., Volkmann, I. and Thum, T. 2011. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biology.* 8 (5): 706-713.
- Yin, H., Zhou, Y., Zhang, H., Meng, X., Ai, S. 2012. Electrochemical determination of

- microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system. *Biosensors and Bioelectronics*. 33: 247-253.
- Li, F., Peng, J., Wang, J., Tang, H., Tan, L., Xie, Q., Yao, S. 2014. Carbon nanotube-based label-free electrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA-24. *Biosensors and Bioelectronics*. 54: 158-164
- Komatsu, S., Ichikawa, D., Takeshita, H., Tsujiura, M., Morimura, R., Nagata, H., Kosuga, T., Iitaka, D., Konishi, H., Shiozaki, A., Fujiwara, H., Okamoto, K., Otsuji, E., 2010. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 105(1), 104-111.
- Tsujiura, M., Ichikawa, D., Komatsu, S., Shiozaki, A., Takeshita, H., Kosuga, T., Konishi, H., Morimura, R., Deguchi, K., Fujiwara, H., Okamoto, K., Otsuji, E., 2010. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 102(7), 1174-1179.

ชื่อโครงการย่อย Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA
 ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
 รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย

รศ.ดร.เมธา รัตนกรพิทักษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.บุญจิรา บุญทา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.อุทัย วิชัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หลักการและเหตุผล

ปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP) กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลายเนื่องจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีขนาดเล็กระดับนาโน และมีสมบัติการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอก จึงได้มีการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ไปใช้ประโยชน์หลายด้านเช่น การพัฒนาวัสดุทางอิเล็กทรอนิกส์ แผ่นเก็บข้อมูลแม่เหล็กและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการใช้สารชีวโมเลกุลเช่น DNA หรือ เปปไทด์ ตรึงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เพื่อใช้ในการทำให้ DNA หรือเปปไทด์บริสุทธิ์ขึ้น โดยการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการตรึงสารเหล่านี้ ออกมาโดยใช้สนามแม่เหล็กจากภายนอก

จากผลงานวิจัยจากความร่วมมือระหว่างกลุ่มวิจัยของกลุ่มศาสตราจารย์ ดร. ชिरุพุทธ วิไลวัลย์ ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสในสายโซ่ DNA โดยการใช้ pyrolydinyl PNA (acpcPNA) เป็นโพรบร่วมกับกลุ่มวิจัยของ รศ.ดร.เมธา รัตนกรพิทักษ์ ที่มีความสนใจการตัดแปรและการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์นั้น จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ ซึ่งจะศึกษาการตัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยพอลิเมอร์ชนิด พอลิเอินอะไคริลอิลไกลซีน (poly(*N*-acryloyl-glycine), PNAG) และ พอลิอะไคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid), PAA) โดยมีแนวทางการวิจัย 2 แนวทางได้แก่

- 1) การตัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PNAG ซึ่งเป็นประจุลบเพื่อใช้ตรึงสารสเตรปตาวิดิน (streptavidin) ลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ เนื่องจาก streptavidin เป็นโปรตีนที่มีอัตราการจับที่จำเพาะเจาะจงกับสาร biotin ดังนั้นการดูดจับ acpcPNA ที่มีสาร biotin ที่ปลาย (biotin-terminated PNA) จะเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ
- 2) การตัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PAA เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction)

โดยอนุภาคที่มี acpc PNA บนพื้นผิวนี้น่าจะไปใช้เป็นโพรบในการทำให้ DNA บริสุทธิ์ขึ้นโดยอาศัยหลักการของการเข้าคู่กันระหว่าง PNA กับ DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันและแยก DNA ที่ไม่เป็นคู่สมกันออก โดยใช้แท่งแม่เหล็กแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลาย และสามารถวิเคราะห์

ผลการทดลองที่ได้ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น UV-Vis spectrophotometer, Thermogravimetric Analysis (TGA), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) เป็นต้น

วัตถุประสงค์

สังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วย PNAG หรือ PAA และศึกษาการประยุกต์ใช้โดยการตรึง acpc PNA บนพื้นผิวของอนุภาค และนำไปใช้เป็นโพรบในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

ดังนั้น ในการรายงานผลการทดลอง จะแบ่งการรายงานเป็น 2 แนวทาง ดังนี้

แนวทางที่ 1 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ด้วย PNAG เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA โดยการใช้อันตรกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin

แนวทางที่ 2 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ด้วย PAA เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction)

แนวทางที่ 1 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ด้วย PNAG เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA โดยการใช้ข้อตรึงระหว่าง streptavidin และ biotin

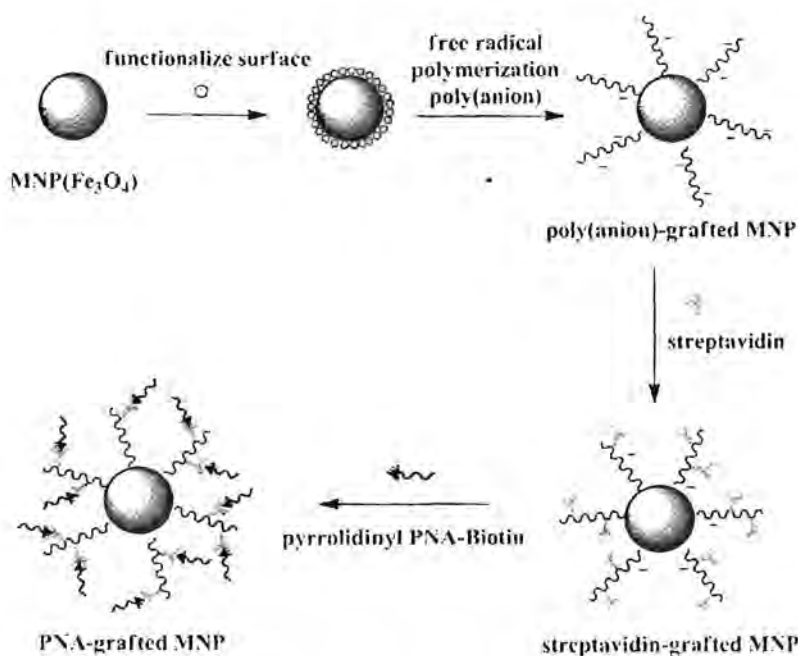
วิธีการทดลอง

วิธีดำเนินการทดลองในแนวทางที่ 1 แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ (ภาพ 1)

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอินอะคริลอิลไกลซีน (poly(*N*-acryloyl-glycine)(PNAG)

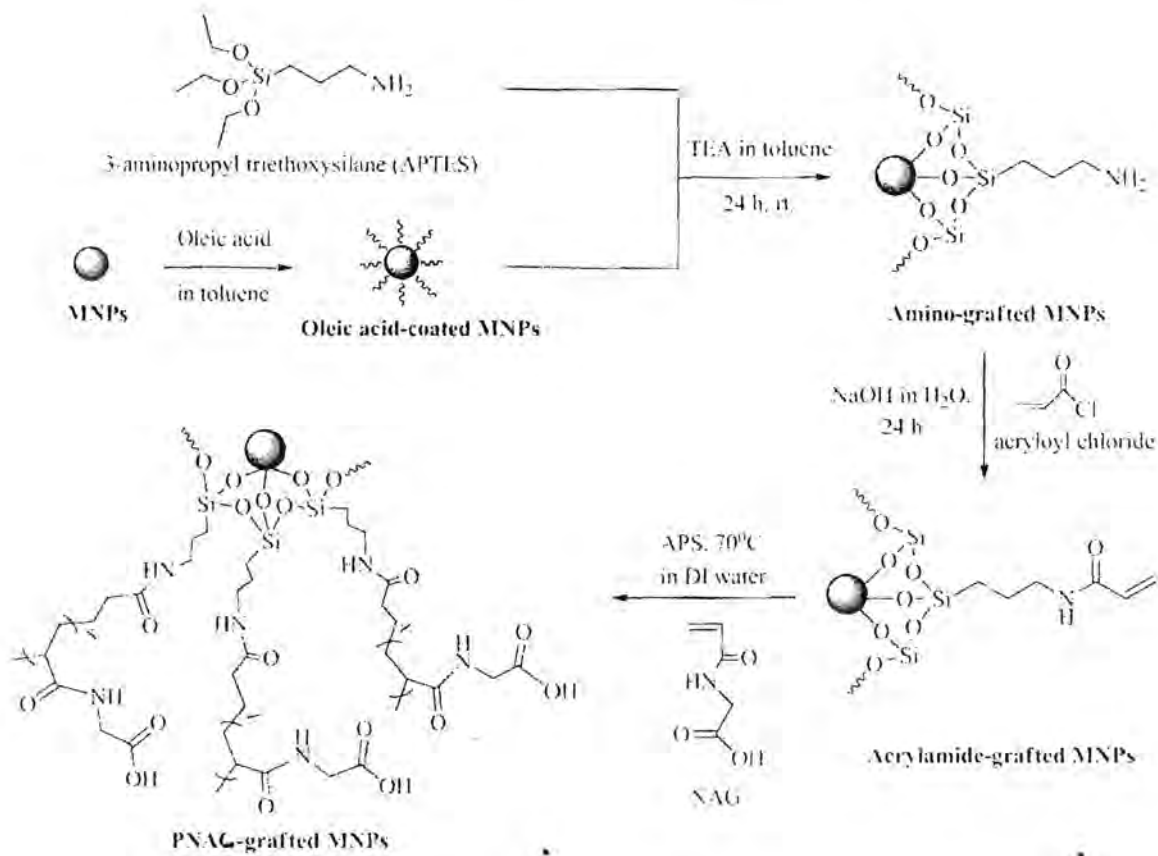
ขั้นตอนที่ 2 การตรึงสเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ลงบนพื้นผิวอนุภาค ตามด้วยการตรึง acpcPNA-Biotin บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ตรึงสเตรปตาวิดินแล้ว

ขั้นตอนที่ 3 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ตรึง acpcPNA-Biotinแล้ว ใช้ในการทำให้ DNA บริสุทธิ์



ภาพ 1 การดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทต์เพื่อใช้ในการตรึง acpcPNA-Biotin

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ดัดแปรบนพื้นผิวด้วยพอลิเอินอะคริลอิลไกลซีน (poly(*N*-acryloyl-glycine) (ภาพ 2)

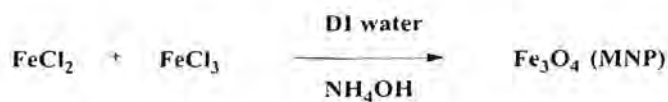


ภาพ 2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอินอะคริลอิลไกลซีน (PNAG)

โดยขั้นตอนที่ 1 แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ส่วนย่อยดังนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม (co-precipitation) (ภาพ 3)

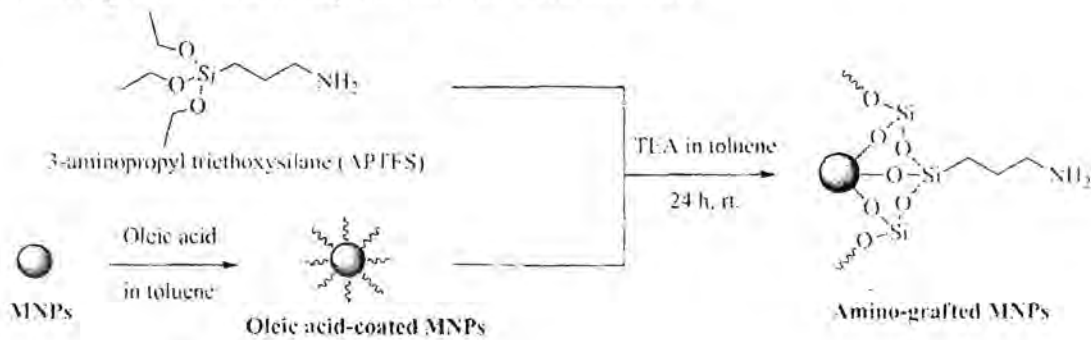
ทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) และเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_2$) ในน้ำ (DI water) ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (25% NH_4OH) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลายที่ได้ล้างด้วยน้ำ (DI water) 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA



ภาพ 3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม

2. การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (ภาพ 4)

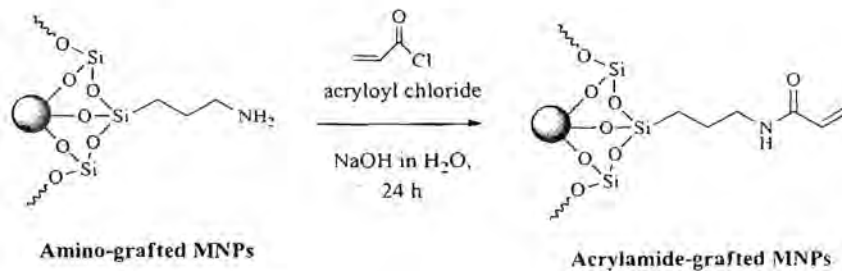
กระจายอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยโอเลอิกแอซิดในเฮกเซน ล้างอนุภาคด้วยอะซิโตนหลายๆครั้ง จากนั้นกระจายตัวอีกครั้งในโทลูอีน เติมไตรเอทอซิลามีน (triethoxylamine, TEA) และหยด APTES ลงในสารละลายช้า ๆ ภายใต้สภาวะในโครเจนที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคแมกนีไทท์ออกจากสารละลายโดยใช้แท่งแม่เหล็ก ล้างอนุภาคด้วยเอทานอลหลายๆครั้ง เพื่อกำจัด TEA และ APTES ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA



ภาพ 4 การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

3. การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (ภาพ 5)

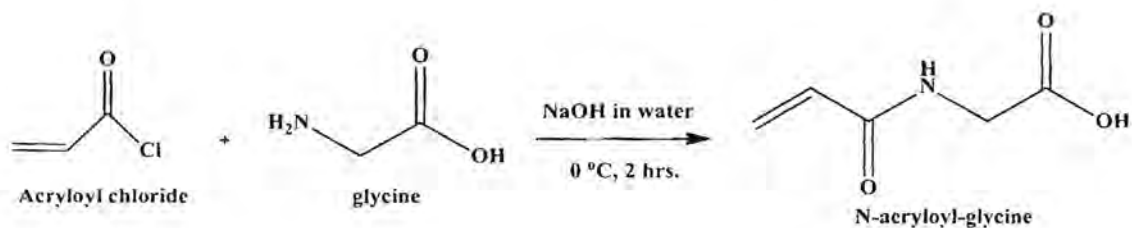
นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย APTES กระจายตัวอีกครั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หยดอะคริลอิลคลอไรด์ (Acryloyl chloride) อย่างช้าๆลงในสารละลาย (NaOH: Acryloyl chloride = 2:1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกอนุภาคด้วยแท่งแม่เหล็กออกแล้วล้างด้วยน้ำ (DI water) 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดอะคริลอิลคลอไรด์ (Acryloyl chloride) ที่ไม่ทำปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์อื่นที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยา ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA



ภาพ 5 การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (acrylamide) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

4. การสังเคราะห์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) เพื่อเป็นมอนอเมอร์ (ภาพ 6)

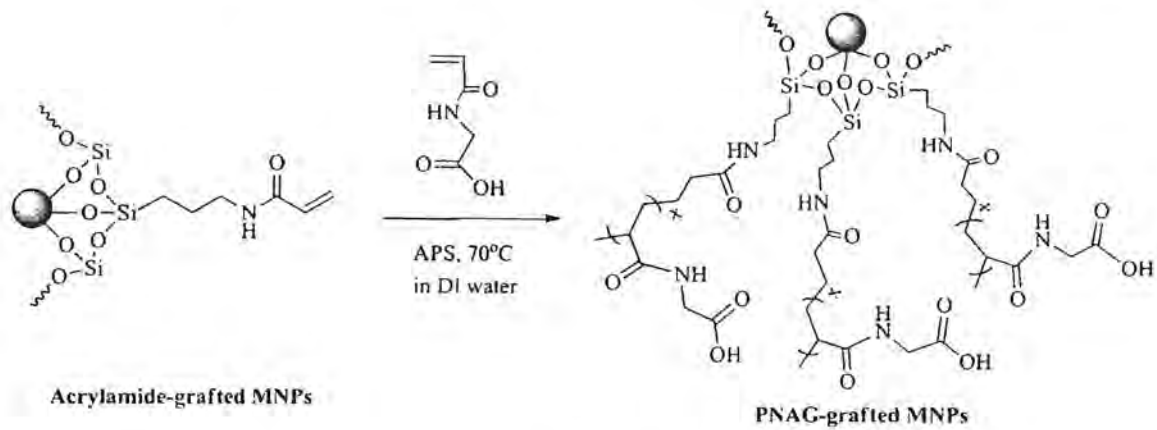
เตรียมสารละลายไกลซีนความเข้มข้น 10 mmol ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 M จำนวน 10 mL หยดอะไครโลอิลคลอไรด์ (Acryloyl chloride) 1 mL (อัตราส่วน NaOH: Acryloyl chloride = 2:1) อย่างช้าๆลงในสารละลายที่อุณหภูมิ 0 °C ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสารละลายด้วยไดเอทิลอีเทอร์ 2-3 ครั้ง (ครั้งละ 20 mL) และปรับค่า pH ขึ้นน้ำด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้นจนได้ค่า pH เท่ากับ 3 จากนั้นสกัดสารละลายด้วยเอทิลอะซิเตท 3-4 ครั้ง เติมแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) เพื่อกำจัดน้ำที่อยู่ในสารละลาย ระเหย ethyl acetate ออกจากสารผลิตภัณฑ์ สารผลิตภัณฑ์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR



ภาพ 6 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine)

5. การตัดแปรบนพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน(PNAG)โดยใช้ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระแบบดั้งเดิม (conventional free radical polymerization) (ภาพ 7)

ละลายเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) ในน้ำ เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เพื่อเป็น radical initiator ในอัตราส่วน โมลเป็น 100:1 (*N*-acryloyl-glycine:APS) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยหมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ลงในสารละลายภายใต้สภาวะในโตรเจนที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง แยกอนุภาคออกจากถังแม่เหล็กแล้วล้างอนุภาคด้วยน้ำ 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR, TGA และ Zetasizer (ZS)

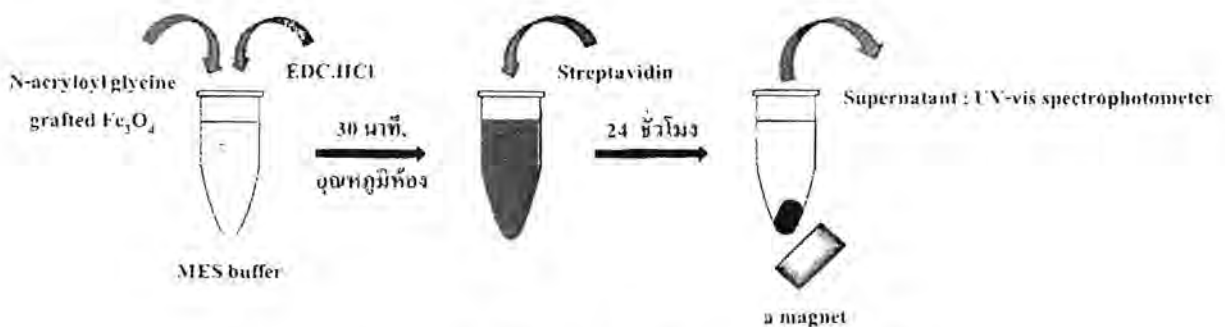


ภาพ 7 การดัดแปรบนพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเอ็นอะไคร โลอิล ไกลซีน (PNAG)

ขั้นตอนที่ 2 การตรึงสเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ลงบนพื้นผิวอนุภาค ตามด้วยการตรึง pyrrolidinyl PNA-Biotin บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงสเตรปตาวิดินแล้ว แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนย่อยดังนี้

1. การตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (ภาพ 8)

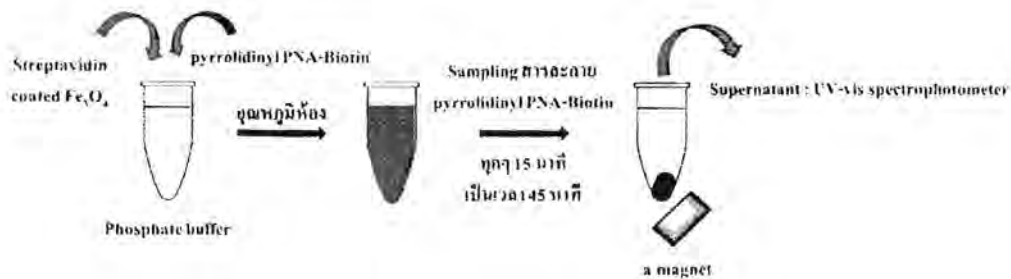
นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยพอลิเอ็นอะไคร โลอิล ไกลซีน (PNAG-grafted MNP) ที่กระจายตัวใน 2-(N-morpholino)ethanesul-fonic acid buffer (MES buffer) pH 5.2 จากนั้นเติม N-ethylcarbo diimide hydrochloride (EDC.HCl) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารละลายสเตรปตาวิดินลงไปและทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคออกแล้วล้างด้วย MES buffer ทำให้แห้งและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometer และ photocalibration spectroscopy (PCS)



ภาพ 8 การตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2. การตรึง *acpcPNA-Biotin* ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน (ภาพ 9)

เติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน 5 mg ลงในสารละลายของ *acpcPNA-Biotin* (Biotin-CTACAAGCATAT-lys-NH₂) ความเข้มข้น 32.15 μM ใน phosphate buffer pH 7 ทำการปั่นเหวี่ยง จากนั้น sampling สารละลาย *acpcPNA-Biotin* ตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำสารละลาย *acpcPNA-Biotin* ที่ได้จากการ sampling มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry



ภาพ 9 การตรึง *acpcPNA-Biotin* ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

ขั้นตอนที่ 3 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง *acpcPNA-Biotin* แล้วมาใช้ในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

โดยขั้นตอนที่ 3 นี้ได้ทำการทดสอบกับ PNA จำนวน 2 ลำดับเบส ได้แก่ PNA1 และ PNA2 โดยมีรายละเอียดการทดลองดังนี้

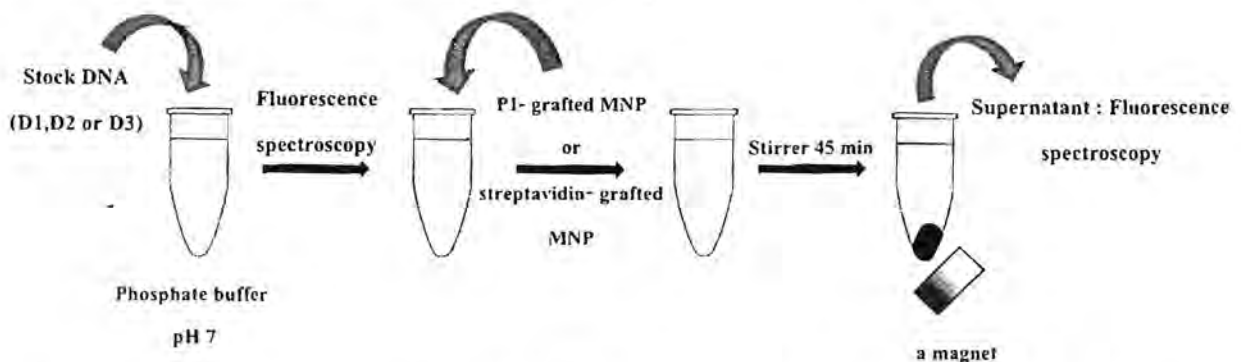
1) การทดลองการใช้ PNA1 เพื่อเป็น probe

ขั้นตอนนี้ได้นำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง *acpcPNA-Biotin* (P1) มาybridจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้งหมด 3 ลำดับเบส โดยลำดับเบสของ *acpcPNA-Biotin* และ DNA ที่ใช้แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ลำดับเบสของ Biotin-conjugated PNA (P1) และ DNA สัมเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง

Biotin-conjugated PNA (P1)	Sequence of DNA
	D1 : 5'-ATATgCITgTAG-FAM (Fully match)
Biotin-O-O-CTACA AGCATAT-lys-NH ₂	D2 : 5'-CACgTTCCAggA-TAMRA (Fully mismatch)
	D3 : 5'-ATATgCATgTAG-TAMRA (Single -based mismatch)

ทำการศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) ในการยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1, fully match), DNA(D2, fully mismatch) หรือ DNA(D3, single based mismatch) โดยเตรียมสารละลายของ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA (D1), DNA (D2) หรือ DNA (D3) ที่ความเข้มข้น $0.8 \mu\text{M}$ ใน phosphate buffer pH 7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy (ภาพ 10) โดยทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ที่เหมาะสมของแต่ละ Fluorophor ของ DNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการยึดจับกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) 2 มิลลิกรัม หรืออนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) 2 มิลลิกรัม ลงในสารละลายของ DNA (D1), DNA (D2) หรือ DNA (D3) ที่เตรียมไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการจับยึด DNA และศึกษาถึง non-specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) กับ DNA แต่ละชนิด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย (supernatant) ออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy และ Gel electrophoresis (agarose gel)



ภาพ 10 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) แล้ว และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA (P1) (ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส (D1, D2 หรือ D3)

2) การใช้ PNA2 (มีลำดับเบสสอดคล้องกับลำดับเบสของ zein gene ของข้าวโพด) เพื่อเป็น probe

2.1) เป็นการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์มาใช้เป็นตัวดูดซับในการทำให้ DNA บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยชนิด DNA ที่สนใจศึกษาเป็น DNA ของโปรตีน zein ที่พบในเฉพาะข้าวโพด โดยจะเป็นการศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ที่มีลำดับเบสที่สอดคล้องกับ DNA ตัวอย่างจริง (synthetic DNA) และ

2.2) การศึกษาการนำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA มาประยุกต์ใช้กับ DNA จริง (real DNA) ที่สกัดมาจากข้าวโพด

โดยลำดับเบสของ Biotin-conjugated PNA (P2) และ DNA สังเคราะห์ที่มีลำดับเบสสอดคล้องลำดับเบสของ DNA จริง ที่ใช้แสดงดังตาราง 2

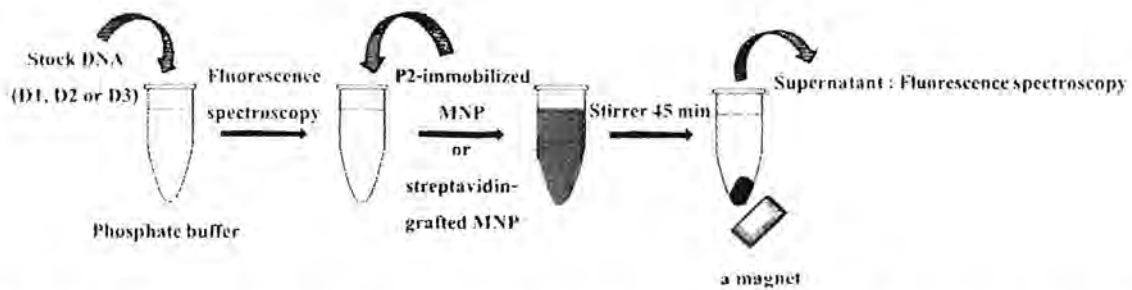
ตาราง 2 ลำดับเบสของ Biotin-conjugated PNA (P2) และ DNA สังเคราะห์ที่มีลำดับเบสสอดคล้องลำดับเบสของ DNA จริง ที่ใช้

Biotin-conjugated PNA(P2)	Sequence of DNA
	D1 : 5'-ACATTgTggCAT-FAM (Fully match)
Biotin-O-ATGCCACAATGT-lys-NH ₂	D2 : 5'-TgCgATCCATgC-TAMRA (Fully mismatch)
	D3 : 5'- ACATTATggCAT-Cy5 (Single based mismatch)

รายละเอียดการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อยดังนี้

1. การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (*specificity*) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) ในการจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) (ภาพ 11)

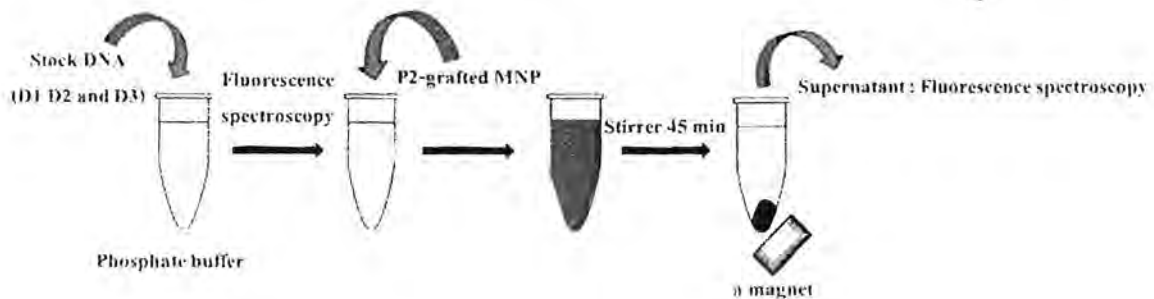
โดยทำเตรียมสารละลายของ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) ที่ความเข้มข้น 0.9 μ M ใน phosphate buffer pH 7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry โดยทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ที่เหมาะสมของแต่ละ Fluorophore ของ DNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการจับกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) 2 มิลลิกรัม หรืออนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) 2 มิลลิกรัม ลงในสารละลายของ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) ที่เตรียมไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการจับยึด DNA และศึกษาถึง non-specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) กับ DNA แต่ละชนิด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย (supernatant) ออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry และ Gel electrophoresis (agarose gel)



ภาพ 11 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้วและอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส (D1, D2 หรือ D3)

2. การศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) (ภาพ 12)

เตรียมสารละลายของ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบสคือ DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) โดยความเข้มข้นของ DNA แต่ละลำดับเบสที่ 0.9 μM ใน phosphate buffer pH 7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการยึดจับกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) 2 มิลลิกรัม ลงในสารละลายของ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบสคือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) ที่เตรียมไว้แล้ว ทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย (supernatant) ออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry



ภาพ 12 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้ว มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3)

3. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการยึดจับของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) กับ DNA จริงของข้าวโพด (real DNA)

ตัวอย่าง DNA จริงของข้าวโพดจำนวน 30 ไมโครลิตร ถูกนำทำให้เสียสภาพ (Denaturation) เพื่อให้อยู่ในรูปของ DNA สายเดี่ยว โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นตัวอย่างรวดเร็วด้วยอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเติมลงในอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA (2 มิลลิกรัม กระจายตัวใน 10 ไมโครลิตร ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการแยกส่วนของอนุภาคออกจากสารละลายและล้างอนุภาคด้วยน้ำ DI หลายๆ ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนของอนุภาคซึ่งมี DNA ถูกดูดซับอยู่ มาทำการล้างด้วย 7 % acetonitrile เพื่อล้างเอาส่วนของ DNA ที่ถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคออกแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณของ DNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction ; PCR)

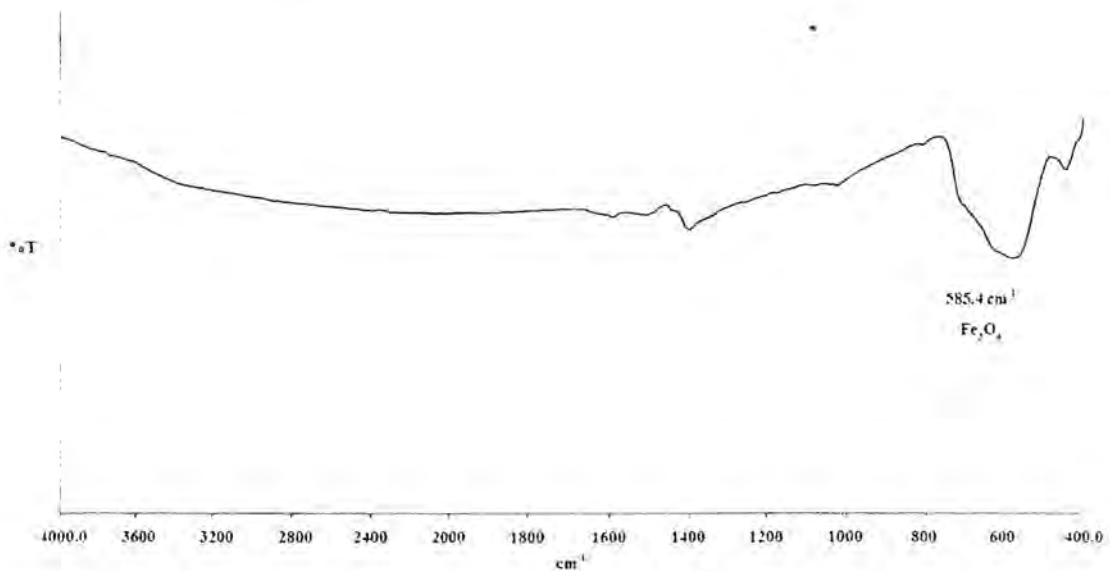
โดยการเพิ่มปริมาณของตัวอย่าง DNA ที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาค เพื่อตรวจสอบหาชิ้น zein ของข้าวโพดจะใช้คู่ไพรเมอร์ ze-1 (5'-TGCTTGCATTGTTTCGCGCTCTCCTAG-3') และ ze-2 (5'-GTCGCA GTGACATTGTGGCAT-3') สำหรับสภาวะในการทำพีซีอาร์นั้นจะให้ความร้อนเริ่มต้น (preheat) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้ DNA เสียสภาพ (Denaturation) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ DNA ดั้งเดิม (Annealing) ที่ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และจะสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (Extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 50 รอบ จากนั้นให้ DNA สังเคราะห์สายใหม่ต่อ (final extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังสิ้นสุดการทำ PCR นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1% ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วย PNAG

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม

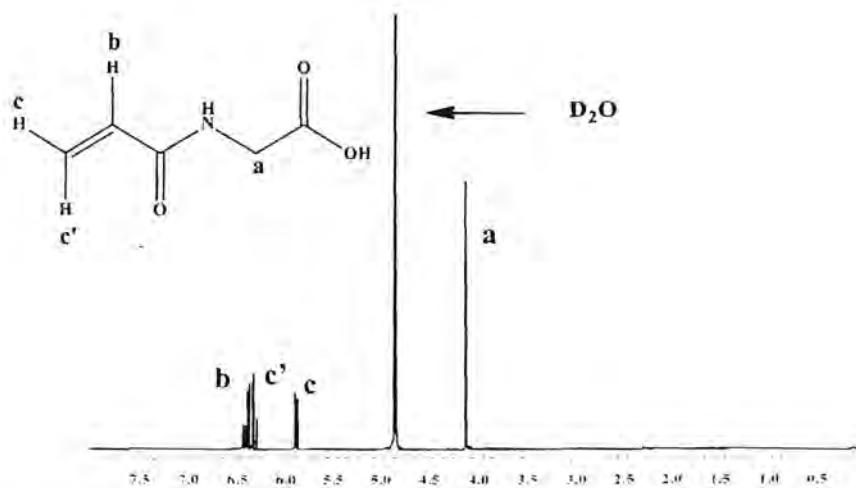
จากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วมแล้วนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่แห้งแล้วมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR (ภาพ 13) พบว่าปรากฏสัญญาณ Fe-O ที่ตำแหน่ง 585.4 cm^{-1} ซึ่งเป็นของสารประกอบเหล็กออกไซด์



ภาพ 13 สเปกตรัม FTIR ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2. การสังเคราะห์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีนมอนอเมอร์ (N-acryloyl-glycine monomer)

เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (N-acryloyl-glycine) มีลักษณะเป็นผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว สังเคราะห์ได้น้ำหนัก 2.6426 g คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (% yield) เท่ากับ 51.15 เปอร์เซ็นต์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR โดยพบสัญญาณของเมทิลีนโปรตอนตำแหน่ง 4.080 ppm (สัญญาณ a) และสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งพันธะคู่ที่ 5.84 ppm (สัญญาณ c) , 6.27 ppm (สัญญาณ c') และ 6.35 ppm (สัญญาณ b)(ภาพ 14)

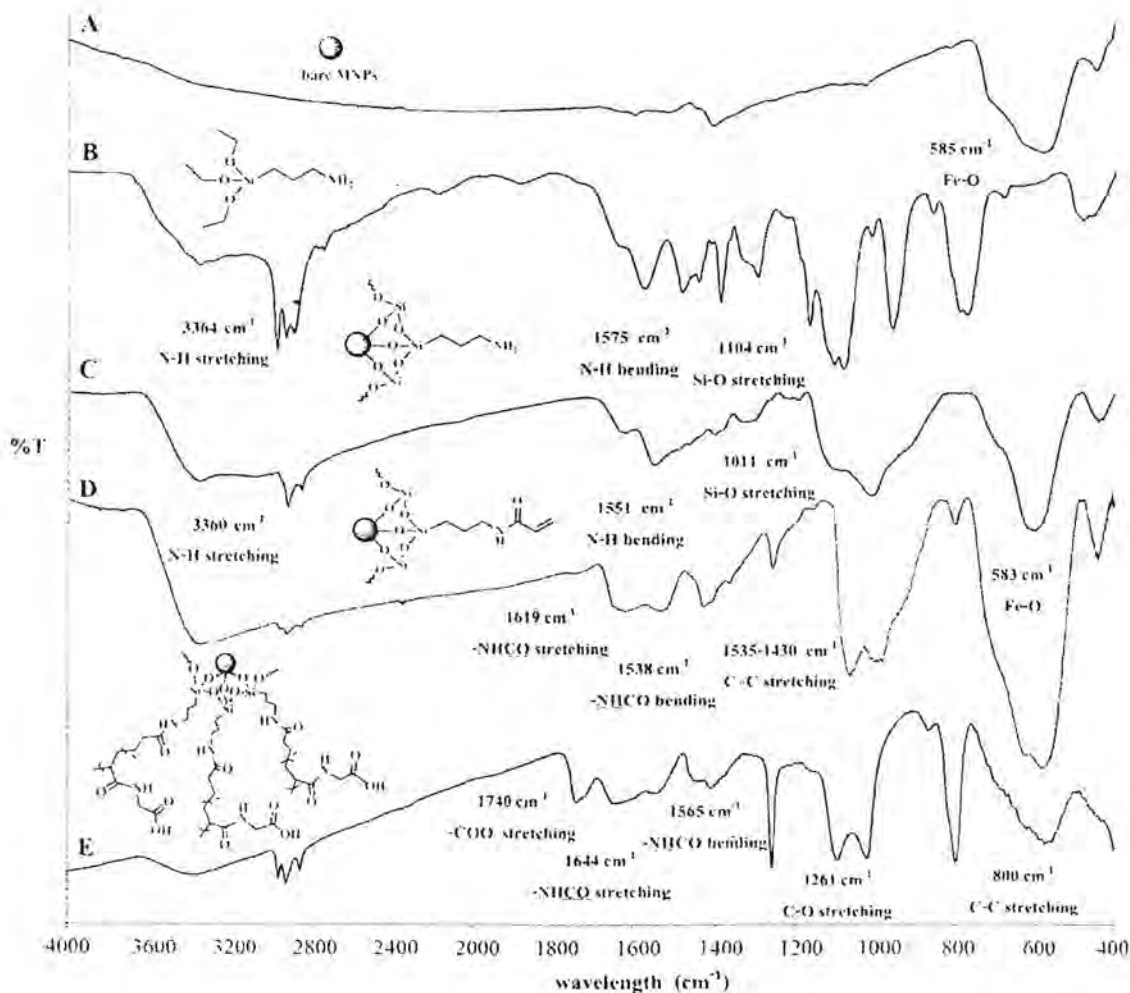


ภาพ 14 สเปกตรัม ¹H NMR ของเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (N-acryloyl-glycine) ใน D₂O

3. การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ด้วย PNAG

3.1 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) (ภาพ 15)

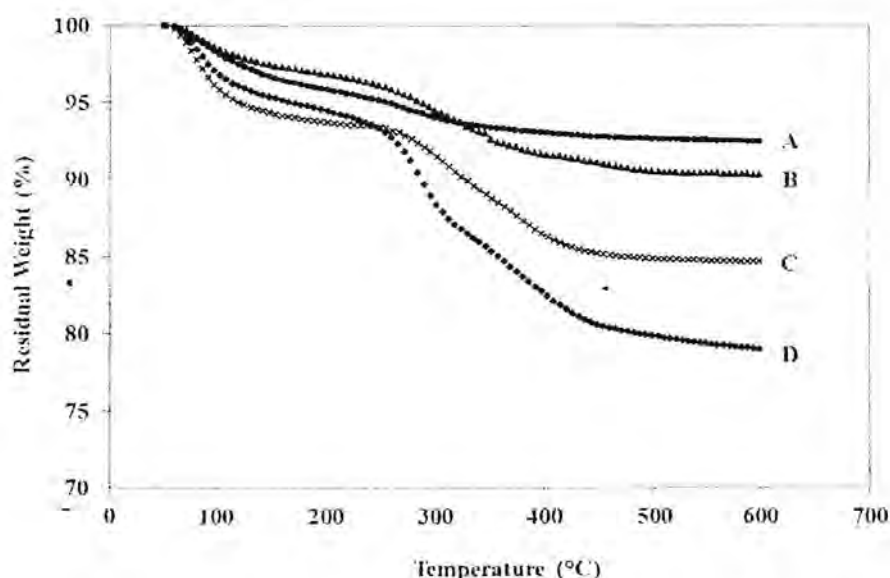
จากสเปกตรัม A พบสัญญาณ Fe-O (585.4 cm^{-1}) ของสารประกอบเหล็กออกไซด์ สเปกตรัม B และ C พบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันเอมีนของ APTES ที่อยู่บนพื้นผิวอนุภาค ได้แก่ N-H stretching (3368 cm^{-1}) C-H stretching (2926 cm^{-1}) และ Si-O stretching ($1116\text{-}1040 \text{ cm}^{-1}$) สเปกตรัม D พบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ของอะคริลามิด (Acrylamide) ได้แก่ -NH-CO- stretching (1615 cm^{-1}) และ N-H bending (1557 cm^{-1}) ส่วนสเปกตรัม E พบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกของพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน คือ C=O stretching (1740 cm^{-1}) และ C-O stretching (1261 cm^{-1})



ภาพ 15 สเปกตรัม FTIR ของ A) bare MNP , B) APTES, C) APTES-coated MNP ,D) acrylamide-coated MNP และ E) PNAG-grafted MNP

3.2 Thermogravimetric Analysis (TGA) (ภาพ 16)

จาก TGA curves จะพบว่า %weight residue ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ มีค่าลดลงในแต่ละขั้นตอน ได้แก่ A) bare MNP , B) APTES-coated MNP , C) acrylamide-coated MNP และ D) PNAG-grafted MNP มีน้ำหนักที่เหลือเท่ากับ 92.49, 90.34, 84.69 และ 79.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย %weight residue เป็นเปอร์เซ็นต์เหล็กออกไซด์ (inorganic component) ที่เหลือจากการออกซิไดซ์ที่อุณหภูมิสูง ส่วน %weight loss เป็นส่วนของสารประกอบอินทรีย์บนอนุภาคที่น้ำหนักหายไปจากการเผาที่อุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศออกซิเจน จากผลของ TGA แสดงว่าการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆหรือดัดแปรด้วยพอลิเมอร์ ทำให้มีส่วนของสารประกอบอินทรีย์บนอนุภาคมากขึ้นในแต่ละขั้นตอน



ภาพ 16 เทอร์โมแกรม TGA ของ A) bare MNP, B) APTES-coated MNP, C) acrylamide-coated MNP และ D) PNAG-grafted MNP

3.3 Zetasizer (ZS) (ตาราง 3)

เนื่องจากพอลิเอินอะไคโลอิลไกลซีน (Poly(*N*-acryloyl-glycine) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของสารละลายได้เนื่องจากผลของหมู่คาร์บอกซิลิกอยู่บนสายโซ่ จึงได้ทำการวิเคราะห์หาค่า hydrodynamic size (D_h) และค่าประจุลบของอนุภาคในสารละลาย pH ต่างๆ โดยใช้เทคนิค Zetasizer (ZS) แสดงผลดังตาราง 3

จากตารางจะพบว่า hydrodynamic size (D_h) ของอนุภาคในสารละลาย pH ต่างๆไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 334-495 นาโนเมตร ส่วนจากการวิเคราะห์ประจุลบของอนุภาคพบว่า

เมื่อสารละลายมีค่า pH เพิ่มขึ้น (เป็นเบสมากขึ้น) ทำให้คีกรีของประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีค่าเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก COOH จากหน่วยของ *N*-acryloyl glycine บนพื้นผิวอนุภาคอยู่ในฟอร์ม COO⁻ เพิ่มมากขึ้น เมื่อ pH ของสารละลายเป็นเบสมากขึ้น จึงทำให้คีกรีของประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคมีค่าเพิ่มมากขึ้น

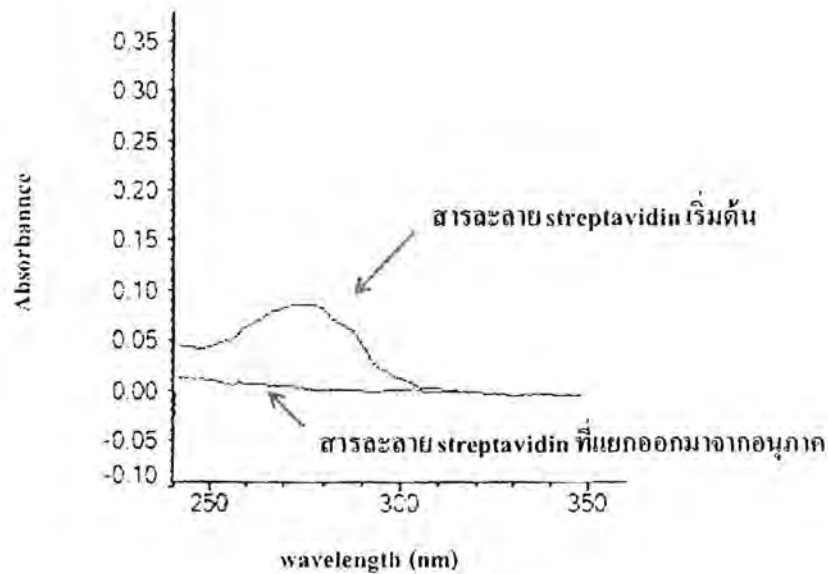
ตาราง 3 การหา hydrodynamic size (Dh) และค่าประจุลบของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วย PNAG ในสารละลาย pH ต่างๆ

pH	D _h (nm)	Zeta potential (mV)
3.00	458.2	-26.1
4.00	367.2	-41.6
5.01	424.8	-44.4
6.02	453.4	-46.4
7.08	400.3	-54.1
8.02	399.4	-59.6
9.09	494.5	-60.8
10.04	460.5	-64.0
11.01	334.6	-74.6
DI water	473.8	-45.4

ขั้นตอนที่ 2 การตรึงสเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ลงบนพื้นผิวอนุภาค ตามด้วยการตรึง acpPNA-Biotin บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงสเตรปตาวิดินแล้ว

1) การตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากการทดลองเมื่อสิ้นสุดปฏิบัติการตรึงสเตรปตาวิดินบนอนุภาคนาโนแมกนีไทด์แล้วทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายสเตรปตาวิดินโดยการปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นนำสารละลายสเตรปตาวิดินที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยเทียบกับสารละลายสเตรปตาวิดินเริ่มต้น ผลการทดลองแสดงดังภาพ 17



ภาพ 17 สเปกตรัมยูวีของสารละลายสเตรปตาวิดอินเริ่มต้นและสารละลายสเตรปตาวิดอินที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากสเปกตรัมยูวีพบว่าสารละลายสเตรปตาวิดอินเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.093 ส่วนสารละลายสเตรปตาวิดอินที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.006 จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณของสารละลายสเตรปตาวิดอินลดลงหลังจากแยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ ซึ่งเป็นสเตรปตาวิดอินที่ถูกบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์โดยวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง

นอกจากนี้ส่วนของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดอินจะถูกนำมาวิเคราะห์ขนาดไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic size, D_h) ด้วยเทคนิค photocorrelation spectroscopy (PCS) ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 การหาขนาดไฮโดรไดนามิกของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดอิน

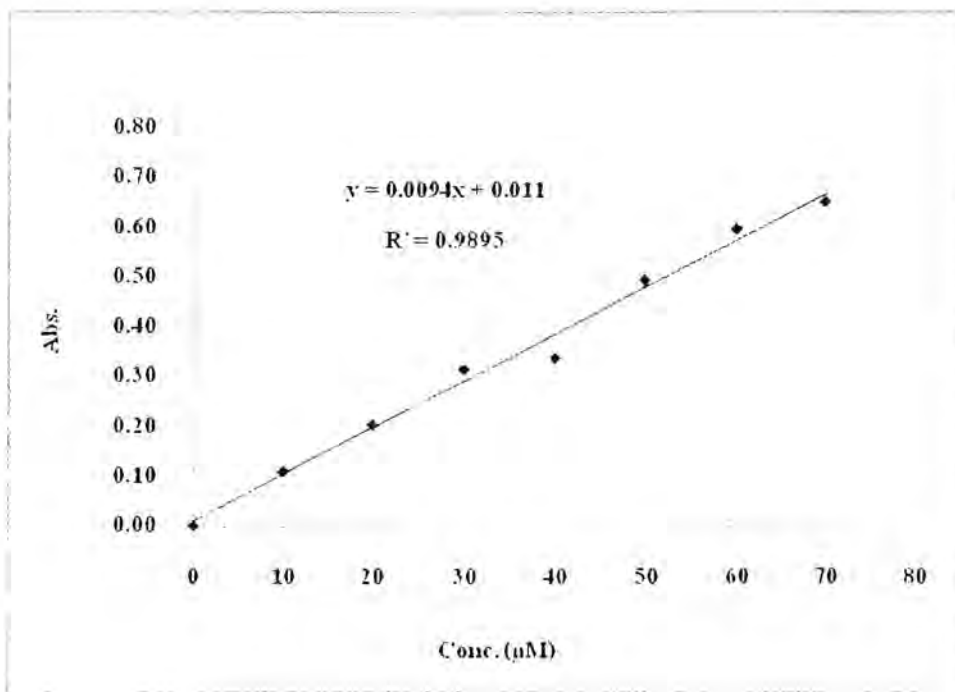
PNAG-grafted MNP		Streptavidin-grafted MNP	
pH(mV)	D_h (nm)	pH(mV)	D_h (nm)
DI water	474	DI water	736.5
7.08	400	7.08	730.7

จากผลการวิเคราะห์พบว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดินจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน ทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.08 และในน้ำ ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงสามารถใช้ในการยืนยันว่าสเตรปตาวิดินถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2) การตรึง *acpcPNA-Biotin* ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อยดังนี้

2.1) การทำกราฟมาตรฐานของ *acpcPNA-Biotin* (*Biotin-CTACAAGCATAT-lys-NH₂*)

โดยทำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 μM โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 nm ดังภาพ 18



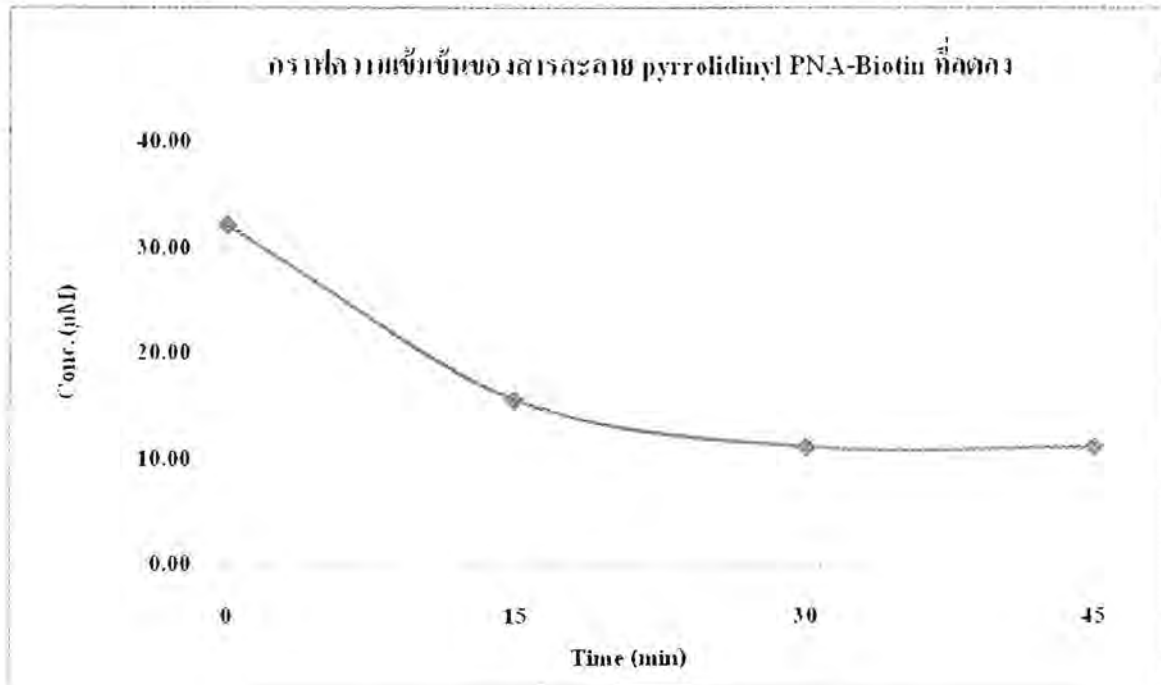
ภาพ 18 กราฟมาตรฐานของ *acpcPNA-Biotin*

จากกราฟมาตรฐาน *acpcPNA-Biotin* พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรง $R^2 = 0.9895$ ซึ่งถือเป็นค่าที่ยอมรับได้

2.2) การตรึง *acpcPNA-Biotin* ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน

โดยความเข้มข้นของ *acpcPNA-Biotin* เริ่มต้นเท่ากับ 32.15 μM หลังจากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดินลงในสารละลาย *acpcPNA-Biotin* ทำการ sampling สารละลาย

acpcPNA-Biotin โดย sampling ทุก 15 นาที เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ได้จากการ sampling ทุก 15 นาที มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามาเทียบกับกราฟมาตรฐาน acpcPNA-Biotin ในรูปที่ 5 เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่แต่ละช่วงเวลา จากนั้นนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้น (μM) กับ เวลา (นาที) ดังภาพ 19



ภาพ 19 กราฟความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ลดลง หลังจากถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากกราฟแสดงความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ลดลง หลังจากการผสมกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์และทำการแยกอนุภาคออกแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของ acpcPNA-Biotin ที่ตรึงบนพื้นผิวอนุภาค จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin เริ่มต้นเท่ากับ $32.15 \mu\text{M}$ และเริ่มลดลงที่เวลา 15 นาทีแรก (ลดลง $16.44 \mu\text{M}$) หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงและคงที่ในช่วงเวลา 30-45 นาที (ลดลง $21.01 \mu\text{M}$) ซึ่งความเข้มข้นของ PNA ที่ลดลงสอดคล้องกับความเข้มข้นของ PNA ที่ถูกตรึงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ จากกราฟแสดงความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ลดลง สามารถใช้คำนวณหาปริมาณของ acpcPNA-Biotin ที่ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ได้ดังตาราง 5 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการตรึง acpcPNA-Biotin อยู่บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์สูงสุด 126 pmol/mg ของ MNP

ตาราง 5 ความเข้มข้นของสารละลาย acpPNA-Biotin ที่ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ PNA ใน สารละลายที่ลดลง (μM) ^a	% yield ^b	ปริมาณ PNA บน อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (pmol/mg MNP)
0	0	0	0
15	16.44	51	99
30	20.99	65	126
45	21.01	65	126

น้ำหนักของ streptavidin-grafted MNP ที่ใช้เป็น 5 mg และปริมาตรสารละลายเป็น 30 μL

^b % yield เทียบกับความเข้มข้นของ acpPNA-Biotin เริ่มต้นที่ใช้เป็น 32.15 μM

ขั้นตอนที่ 3. การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง acpPNA-Biotin แล้วมาใช้ในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

1) ผลการทดสอบการใช้ PNA1 เพื่อเป็น probe

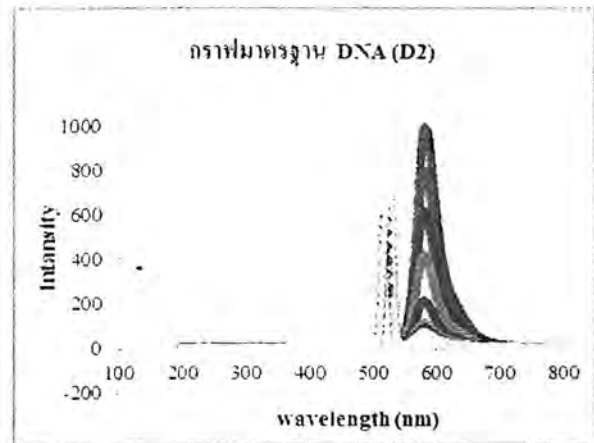
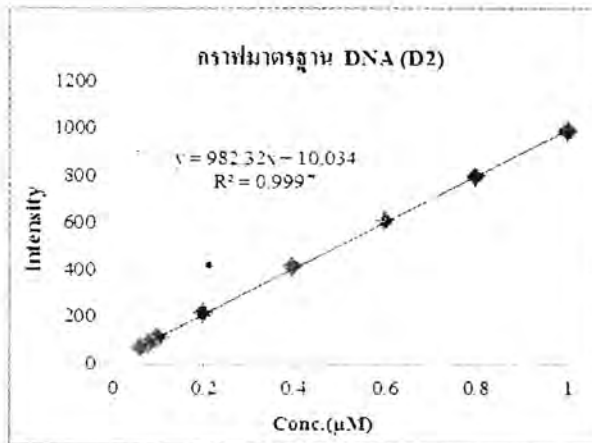
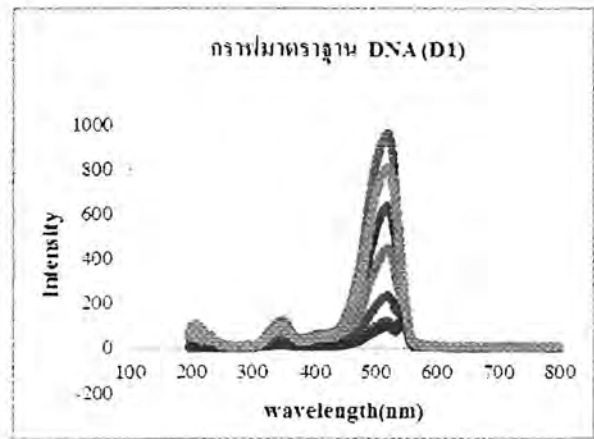
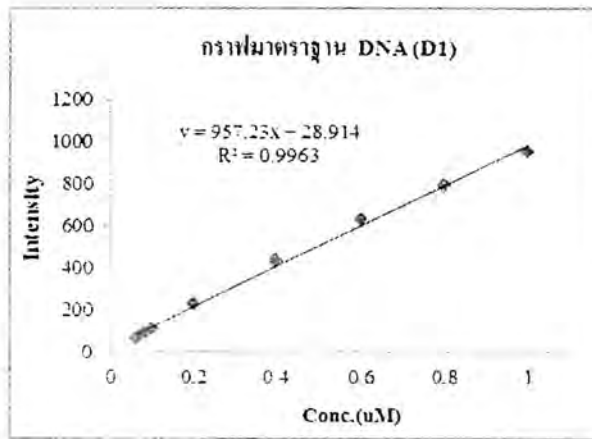
การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) ในการจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA (D1), DNA (D2) หรือ DNA (D3) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนย่อยดังนี้

1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยทำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 μM แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ดังตาราง 6

ตาราง 6 ความยาวคลื่นของ DNA ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ D1, D2 และ D3

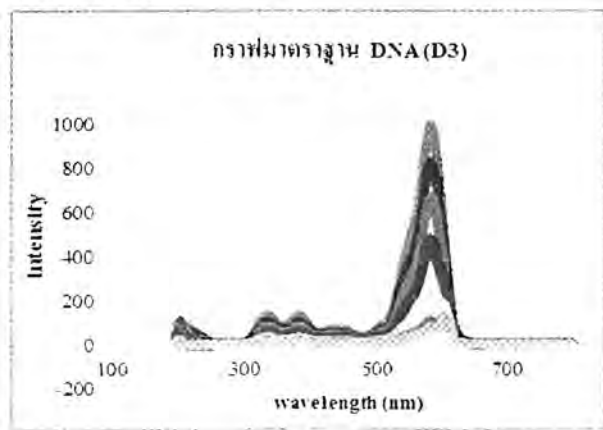
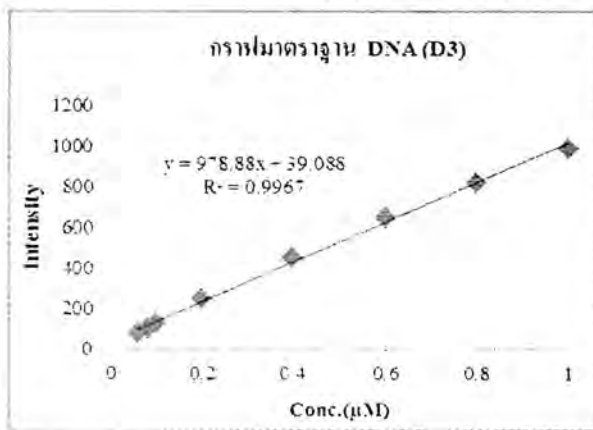
DNA	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
D1 : 5'-ATATgCTTgTAg-FAM	494	521
D2 : 5'-CACgTTCCAggA-TAMRA	552	584
D3 : 5'-ATATgCATgTAg-TAMRA	552	584

กราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบสมีลักษณะ ดังนี้ (ภาพ 20-22)



ภาพ 20 กราฟมาตรฐานของ DNA(D1, fully match)

ภาพ 21 กราฟมาตรฐานของ DNA(D2, fully mismatch)



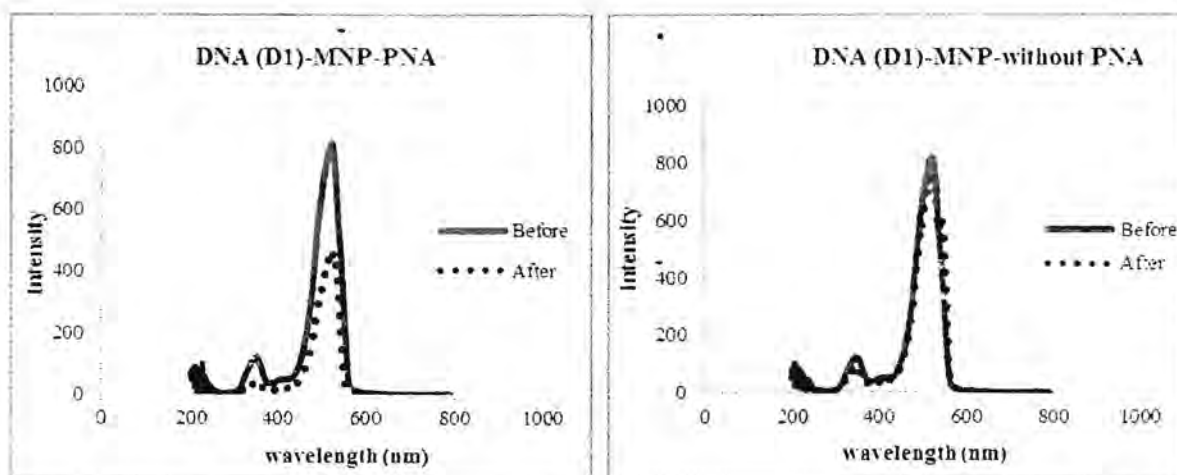
ภาพ 22 กราฟมาตรฐานของ DNA(D3, single based mismatch)

จากกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA (D1), DNA (D2) และ DNA (D3) พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรง $R^2 = 0.9963, 0.9997$ และ 0.9967 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่า R^2 ที่ยอมรับได้ และเมื่อความเข้มข้นของ DNA เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ค่า Intensity สูงขึ้นด้วย

1.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) โดยการเติม DNA ที่ละหนึ่ง sequence

การทดลองจะใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1, full match), DNA(D2, full mismatch) หรือ DNA(D3, single based mismatch) โดยการเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy และ Gel electrophoresis (agarose gel)

1.2.1 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA (D1, fully match) โดยความเข้มข้นของ DNA(D1, fully match) ที่ใช้เริ่มต้นเท่ากับ $0.8 \mu\text{M}$ ผลที่ได้แสดงดังภาพ 23

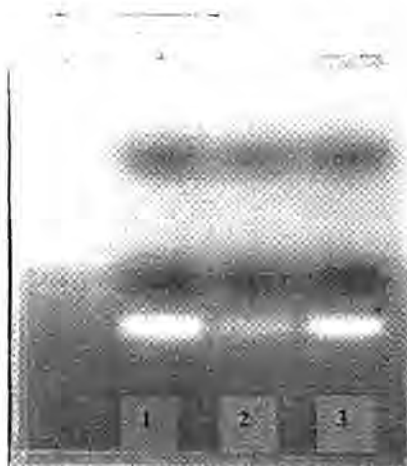


MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA (P1) และ MNP-without PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม)

ภาพ 23 สเปกตรัมของสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากหลังการเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด

จากภาพ 23 พบว่าสารละลาย DNA(D1, fully match) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (รูปซ้าย (เส้นประ)) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย (เส้นทึบ))

จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่ามีปริมาณของ DNA(D1) ลดลงคิดเป็น 45.73 % แสดงว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) คิดเป็นปริมาณ 745.01 pmol ในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) พบว่า สารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(รูปขวา) แสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) กับ DNA(D1) นอกจากนี้เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA (D1) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA (D1) เริ่มต้นกับสารละลายที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 24



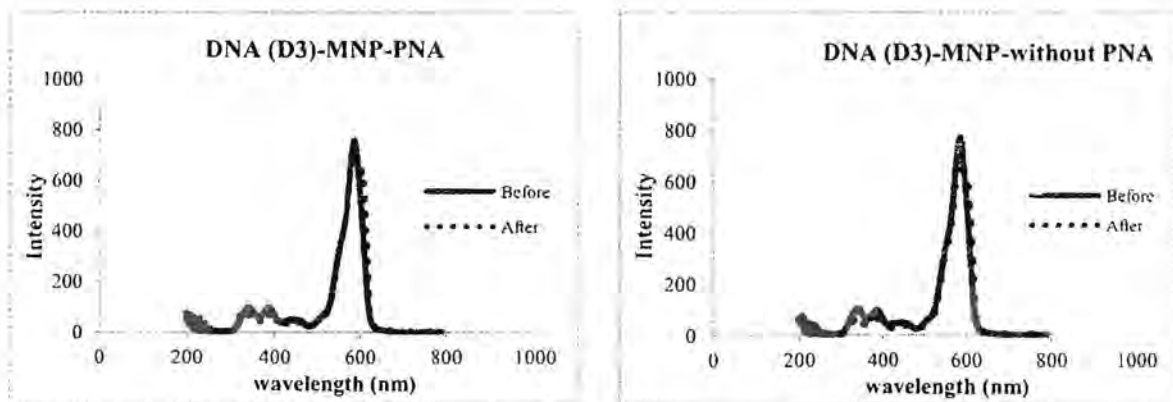
ภาพ 24 แถบของ DNA โดย (1) Stock DNA (D1) 0.8 μ M, (2) สารละลาย DNA (D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) และ (3) สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)

จากภาพ 24 พบว่าแถบของสารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (หมายเลข 2) มีลักษณะของแบนด์ที่เล็กและจางลง เมื่อเทียบกับแถบแบนด์หมายเลข 1 และ 3 แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงและถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) ส่วนหมายเลข 3 คือ DNA(D1) ที่แยกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) พบว่ามีขนาดแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Stock DNA(D1) เริ่มต้น (หมายเลข 1) แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ไม่ได้ถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) รวมทั้งแสดงถึงความไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) กับ DNA(D1) อีกด้วย

1.2.2 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) แล้วยึดจับกับ DNA(D2, fully mismatch) โดยความเข้มข้นของ DNA(D2, fully mismatch) เริ่มต้นเท่ากับ 0.8 μ M ผลที่ได้แสดงดังภาพ

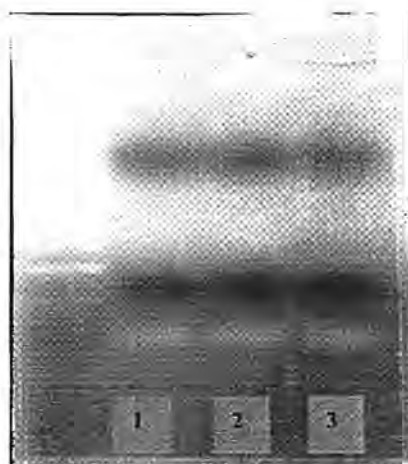
จากภาพ 26 พบว่าแถบของ DNA(D2) ทั้ง 3 แบนด์ มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D2, fully mismatch) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของ DNA(D2) เริ่มต้น (หมายเลข 1)

1.2.3 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) แล้วยึดจับกับ DNA (D3, single base mismatch) โดยความเข้มข้นของ DNA(D3, single based mismatch) เริ่มต้นเท่ากับ $0.8 \mu\text{M}$ ผลที่ได้แสดงดังภาพ 27



ภาพ 27 สเปกตรารายของสารละลาย DNA(D3) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) และ MNP-without PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม)

จากภาพ 27 พบว่าสารละลาย DNA(D3, single-based mismatch) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการขึ้นชั้นการยึดจับของ DNA (D3) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA (D3) เริ่มต้นกับสารละลายที่ถูกแยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 28



ภาพ 28 แถบของ DNA โดย (1) Stock DNA (D3) $0.8 \mu\text{M}$, (2) สารละลาย DNA (D3) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรง PNA (P1) และ (3) สารละลาย DNA (D3) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรง PNA(P1)

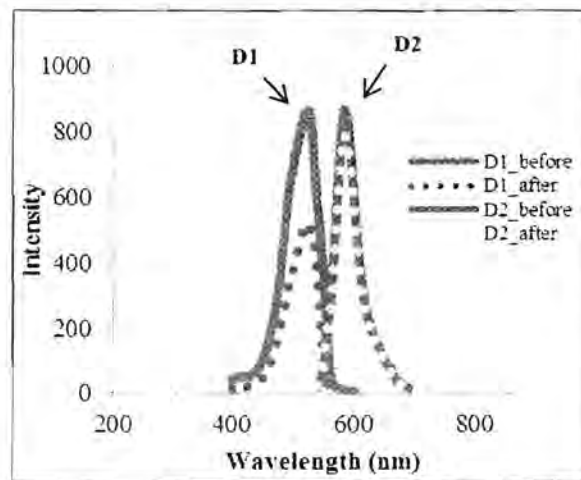
จากภาพ 28 พบว่าแถบของ DNA(D3, single based mismatch) ทั้ง 3 แบนด์มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรง PNA(P1) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรง PNA(P1)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3)

1.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรง PNA(P1)

โดยการเติม DNA ที่สอง sequence (DNA mixture ของ D1+D2 และ D1+D3)

แบ่งผลการทดลองออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

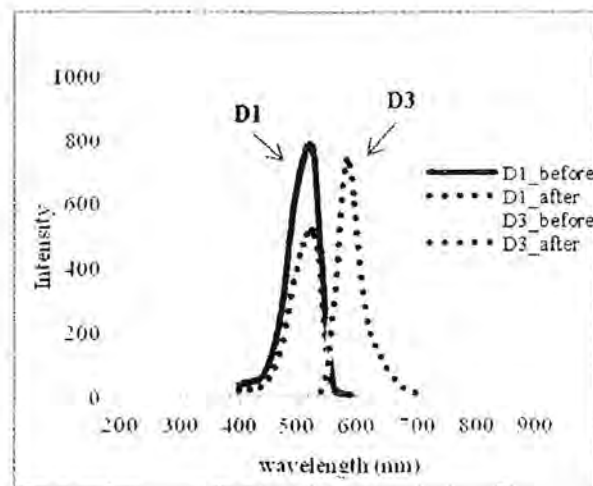
1.3.1 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรง PNA(P1) ในการยึดจับกับ DNA แบบผสม 2 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1, fully match) + DNA(D2, fully mismatch) ผลที่ได้แสดงดังภาพ 29



ภาพ 29 สเปกตรัมของสารละลาย DNA(D1) + DNA(D2) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) + DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากภาพ 29 พบว่าสเปกตรัมของสารละลาย DNA ผสม DNA(D1)+ DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) พบว่า ในส่วนที่เป็น DNA(D1) (เส้นประ) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น (เส้นทึบ) จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงคิดเป็น 42.42 % แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) ส่วนปริมาณของ DNA(D2) ในสารละลายผสม DNA(D1) + DNA(D2) (เส้นประ) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) พบว่า มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (เส้นทึบ) ซึ่งแสดงว่า DNA(D2) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1)

- 1.3.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) ในการยึดจับกับ DNA แบบผสม 2 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1, fully match) + DNA(D3, single based mismatch) ผลที่ได้แสดงดังภาพ 30



ภาพ 30 สเปกตร้าของสารละลาย DNA(D1) + DNA(D3) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) + DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากภาพ 30 สเปกตร้าของสารละลาย DNA ผสม DNA(D1) + DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) พบว่า DNA(D1) (เส้นประ) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น(เส้นทึบ) จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงคิดเป็น 40.66 % แสดงว่า DNA(D1) ในสารละลายผสม DNA(D1) + DNA(D3) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) ส่วนปริมาณของ DNA(D3) ในสารละลายผสม DNA(D1) + DNA(D3) (เส้นประ) พบว่า มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(เส้นทึบ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1)

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) มีความจำเพาะเจาะจงสูงซึ่งสามารถเลือกยึดจับกับ DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น โดยการยืนยันด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มาใช้กับ DNA จริงเพื่อเป็นอนุภาคในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

2) การใช้ PNA2 (มีลำดับเบสสอดคล้องกับลำดับเบสของ zein gene ของข้าวโพด) เพื่อเป็น probe

2.1 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง

PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) ในการยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

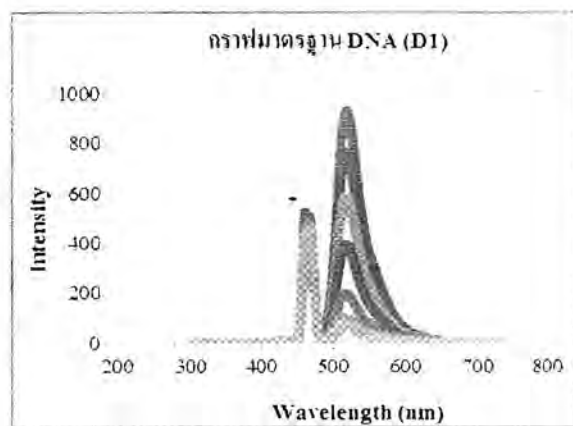
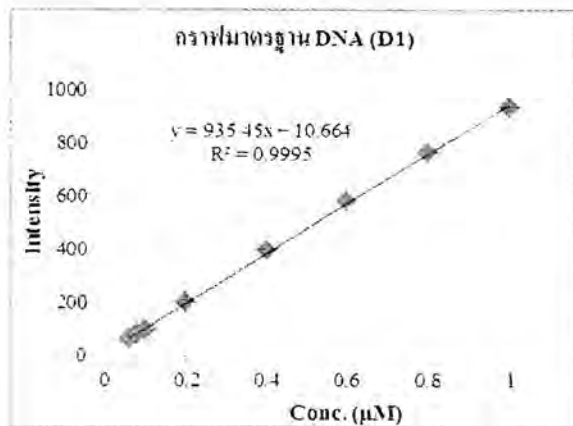
2.1.1 กราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยทำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 μM แล้วนำมาวิเคราะห์

ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น(excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ดังตาราง 7

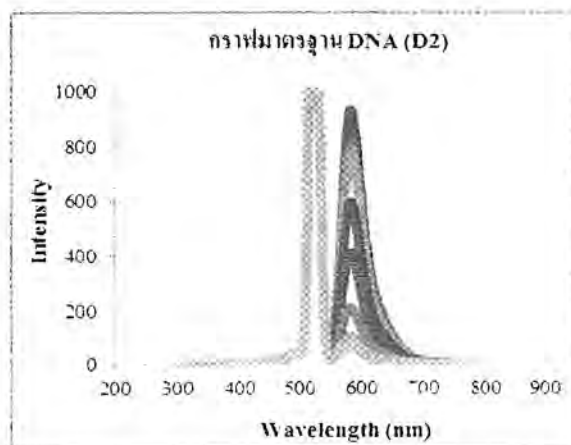
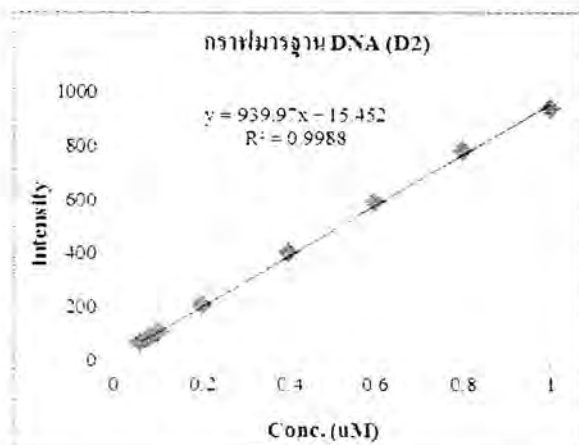
ตาราง 7 ความยาวคลื่นของ DNA ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ D1, D2 และ D3

Sequence of DNAs	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
D1 : 5'-ACATTGTGGCAT-FAM	494	521
D2 : 5'-TGCGATCCATGC-TAMRA	552	584
D3 : 5'- ACATTATGGCAT-Cy5	650	670

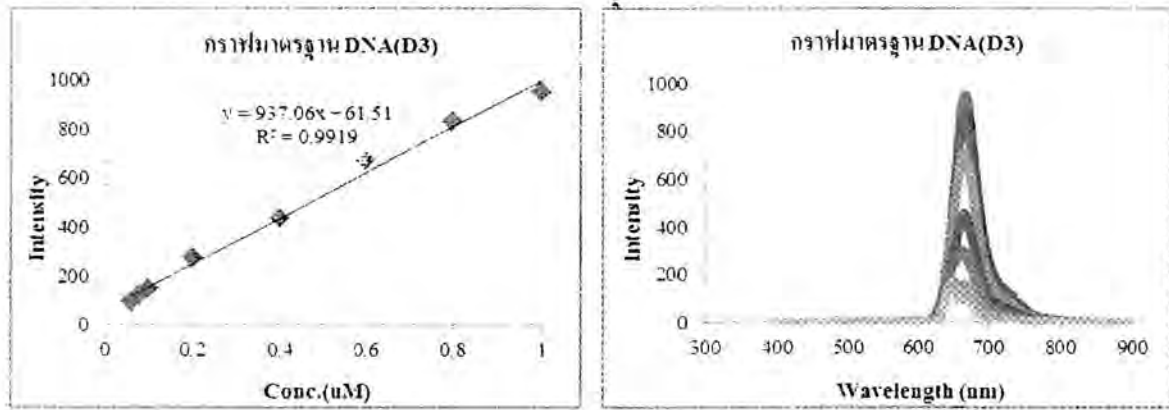
โดยกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบสมีลักษณะ ดังนี้



ภาพ 31 กราฟมาตรฐานของ DNA(D1)



ภาพ 32 กราฟมาตรฐานของ DNA(D2)

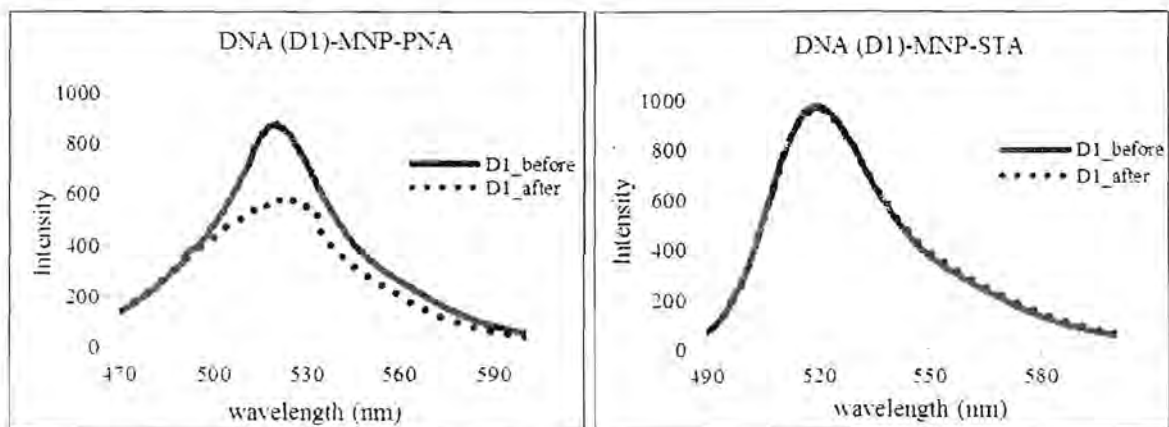


ภาพ 33 กราฟมาตรฐานของ DNA(D3)

จากกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรงโดยค่า $R^2 = 0.9995, 0.9988$ และ 0.9919 ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าที่ยอมรับได้ และเมื่อความเข้มข้นของ DNA เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ค่า Intensity สูงขึ้นด้วย

2.1.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) โดยใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยการเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry และ Gel electrophoresis (agarose gel)

ก) การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA(D1, fully match) โดยความเข้มข้นของ DNA(D1) ที่ใช้เริ่มต้นเท่ากับ $0.9 \mu\text{M}$ ผลที่ได้แสดงดังภาพ 34



ภาพ 34 สเปกตรัมของสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) และ MNP-STA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม)

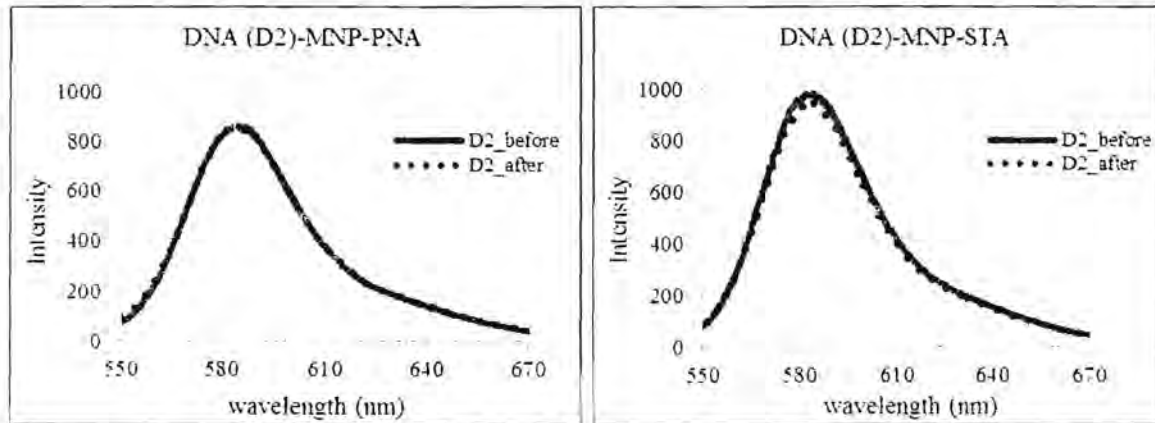
จากรูป 7 พบว่าสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (รูปซ้าย (เส้นประ)) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย (เส้นทึบ)) จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่ามีปริมาณของ DNA(D1) ลดลงคิดเป็น 32 % แสดงว่า DNA(D1) ถูกจับจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) คิดเป็นปริมาณ 297 pmol DNA nucleotide/mg MNP ในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(รูปขวา) แสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) กับ DNA(D1) นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการจับของ DNA(D1) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้นกับสารละลายที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 35



ภาพ 35 แถบของ (1) DNA (1) Stock DNA(D1) 0.9 μ M (2) สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (3) สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)

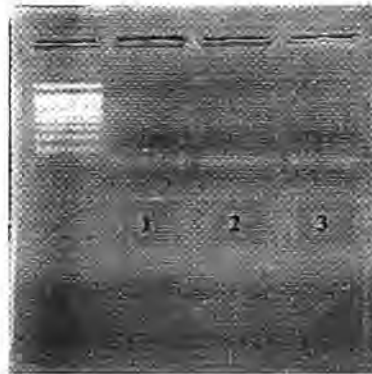
จากภาพ 35 พบว่าแถบของ สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (หมายเลข 2) มีลักษณะของแบนด์ที่เล็กและจางลง เมื่อเทียบกับแถบแบนด์หมายเลข 1 และ 3 แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงและถูกจับจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) ส่วนหมายเลข 3 คือ DNA(D1) ที่แยกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่ามีขนาดแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Stock DNA(D1) เริ่มต้น (หมายเลข 1) แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ไม่ได้ถูกจับจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) รวมทั้งแสดงถึงความไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) กับ DNA(D1) อีกด้วย

ข) การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้วยึดจับกับ DNA(D2, full mismatch) โดยความเข้มข้นของ DNA(D2) เริ่มต้นเท่ากับ $0.9 \mu\text{M}$ ผลที่ได้แสดงดังภาพ 36



ภาพ 36 สเปกตรัมของสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) และ MNP-STA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม)

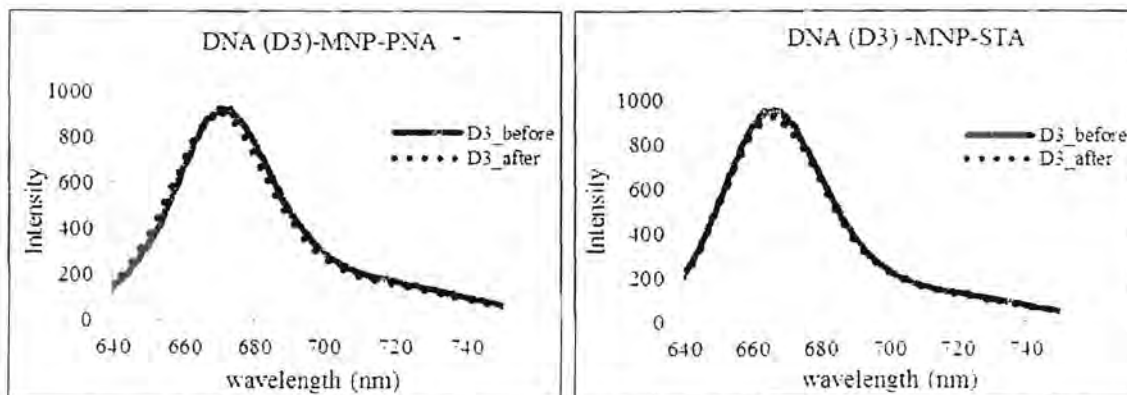
จากภาพ 36 พบว่าสารละลาย DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D2) ไม่ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) กับ DNA(D2) นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA(D2) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้นกับสารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 37



ภาพ 37 แถบของ (1) DNA (1) Stock DNA(D2) 0.9 μ M (2) สารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (3) สารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)

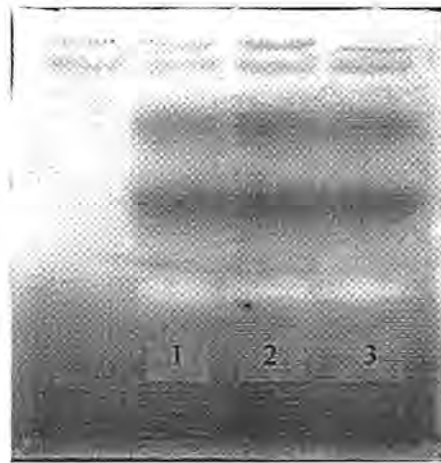
จากภาพ 37 พบว่าแถบของ DNA(D2) ทั้ง 3 แบนด์ มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D2) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของ DNA(D2) เริ่มต้น (หมายเลข 1)

ค) การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้วยึดจับกับ DNA(D3, single-base mismatch) โดยความเข้มข้นของ DNA(D3) เริ่มต้นเท่ากับ 0.9 μ M ผลที่ได้แสดงดังภาพ 38



ภาพ 38 สเปกตรัมของสารละลาย DNA(D3) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) และ MNP-STA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม)

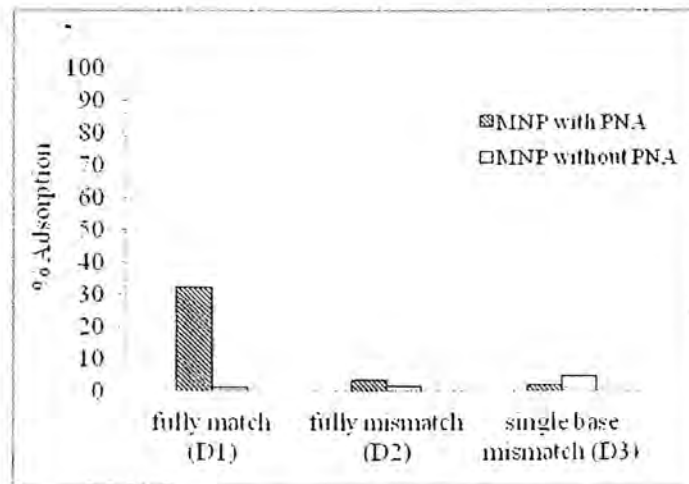
จากภาพ 38 พบว่าสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA(D2) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้นกับสารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 39



ภาพ 39 แถบของ (1) DNA (1) Stock DNA(D3) 0.9 μ M (2) สารละลาย DNA(D3) ที่ถูกแยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (3) สารละลาย DNA(D3) ที่ถูกแยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)

จากภาพ 39 พบว่าแถบของ DNA(D3) ทั้ง 3 แบนด์ มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของ DNA(D3) เริ่มต้น (หมายเลข 1)

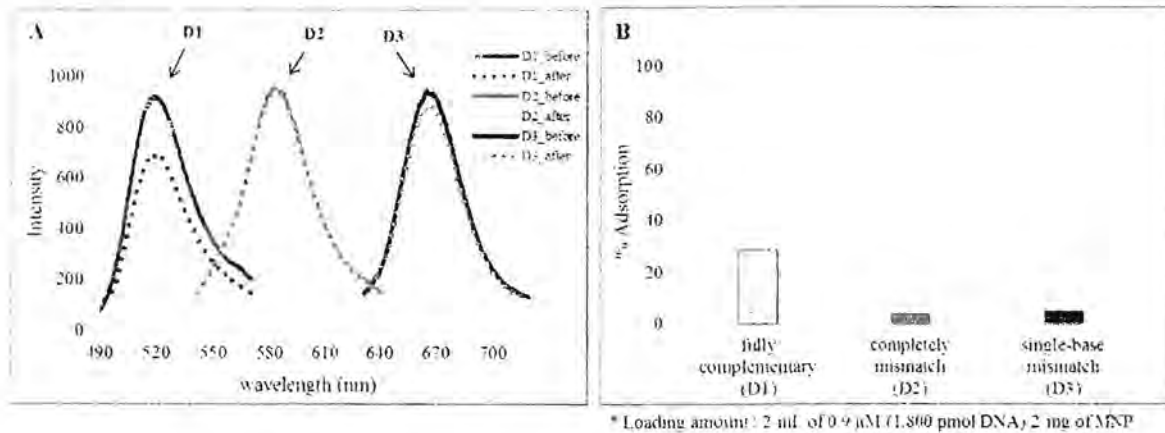
โดยรูปกราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดูดซับของ DNA (D1-D3) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการตรึง PNA และอนุภาคที่ไม่มีการตรึง PNA แสดงดังภาพ 40



ภาพ 40 เปรอ์เซ็นต์การดูดซับของ DNA (D1-D3) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2.2 การศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) มาจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3)

โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของ DNA แต่ละลำดับเบสเท่ากับ 0.9 μ M จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry ผลที่ได้แสดงดังภาพ 41



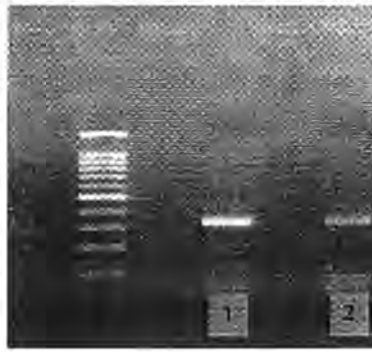
ภาพ 41 (A) สเปกตรัมของสารละลาย DNA แบบผสม 3 ลำดับเบสเริ่มต้น และสารละลาย DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ และ (B) เปรอ์เซ็นต์การดูดซับของ DNA (D1-D3) แบบผสมบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากภาพ 41(A) พบว่าสเปกตรัมของสารละลาย DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) พบว่า ในส่วนที่เป็น DNA(D1) (เส้นประ) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น (เส้นทึบ) จากนั้นนำ

ค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่ามีปริมาณลดลงคิดเป็น 29 % (ดังภาพ 41(B)) แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) คิดเป็นปริมาณ 290 pmol DNA nucleotide/mg MNP ส่วนปริมาณของ DNA(D2) และ DNA(D3) ในสารละลายผสม (เส้นจุดประ) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) พบว่า มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(เส้นทึบ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D2) และ DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2)

2.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการยึดจับของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) กับ DNA จริงที่สกัดจากข้าวโพด

การศึกษาเพื่อยืนยันว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) สามารถยึดจับกับ DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น จึงนำมาทดสอบกับ DNA ตัวอย่างจริงที่สกัดมาจากข้าวโพดดังขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อนำสารละลาย DNA ตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์แล้วมาทดสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจล พบว่า DNA ตัวอย่างแสดงแถบขึ้นตรงตำแหน่งเดียวกับ DNA จริงของข้าวโพด (ภาพ 42) แสดงว่า DNA ตัวอย่างที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาคมีลำดับเบสเช่นเดียวกับ DNA จริงของข้าวโพด นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันผลการทดลองที่ได้ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิทรี (UV-Vis spectrophotometry) โดยเปรียบเทียบระหว่าง DNA ตัวอย่างที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาคก่อนและหลังนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ตัวอย่างหลังจากนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ตัวอย่างก่อนทำ PCR แสดงว่า DNA ตัวอย่างที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาค คือ DNA ตัวอย่างจริงที่สกัดมาจากข้าวโพด จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) สามารถแยก DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันได้จาก DNA จริงที่สกัดมาจากข้าวโพด (ภาพ 42)



- (1) Initial real DNA of corn
 (2) Real DNA of corn after desorption from MNPs and then PCR

ภาพ 42 แถบของ real DNA ที่สกัดจากข้าวโพด หลังจากล้างออกจากพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์และนำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์ส (PCR) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) แบบอะกาโรสเจล

สรุปผลการทดลองแนวทางที่ 1

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอินอะไคโลอิลไกลซีน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและพีเอชจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ทำให้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีพื้นผิวเป็นประจุลบที่ยังคงคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็กสูง สามารถกระจายตัวได้ดีขึ้นเมื่อกระจายตัวในน้ำ และส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาขนาดไฮโดรไดนามิกของอนุภาคพบว่าอยู่ในช่วง 300-500 นาโนเมตร และมีค่าประจุลบเท่ากับ -45.4 มิลลิโวลต์ เมื่อกระจายตัวอยู่ในน้ำ โดยคิกริของประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (ความเป็นเบสเพิ่มขึ้น) อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเอินอะไคโลอิลไกลซีนถูกนำมาตรึงด้วยสเตรปตาวิดินผ่านปฏิกิริยาควบคู่ (amino acid coupling) พบว่ามีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 736.5 นาโนเมตร และจากการศึกษาการตรึง acpcPNA ที่มีหมู่ปลายเป็นไบโอดีนโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงระหว่างสเตรปตาวิดินกับไบโอดีน พบว่ามีปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เท่ากับ 126 pmol/mg ของ MNP และจากการศึกษานำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA เป็นโพรบเพื่อใช้ในการทดสอบการแยก DNA ทั้งใน DNA สังเคราะห์และ DNA จริงที่สกัดจากข้าวโพด โดยทำเปรียบเทียบกับตัวควบคุมกล่าวคือ อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA พบว่า acpcPNA โพรบ มีความสามารถในการแยก DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสของ PNA ได้ ดังนั้นจากการศึกษานี้พบว่า อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอินอะไคโลอิลไกลซีน (PNAG) แล้วตรึงด้วย acpcPNA เพื่อเป็นโพรบสามารถประยุกต์ใช้เป็นวัสดุในการจำแนกและเพิ่มความเข้มของ DNA จากตัวอย่างจริงได้

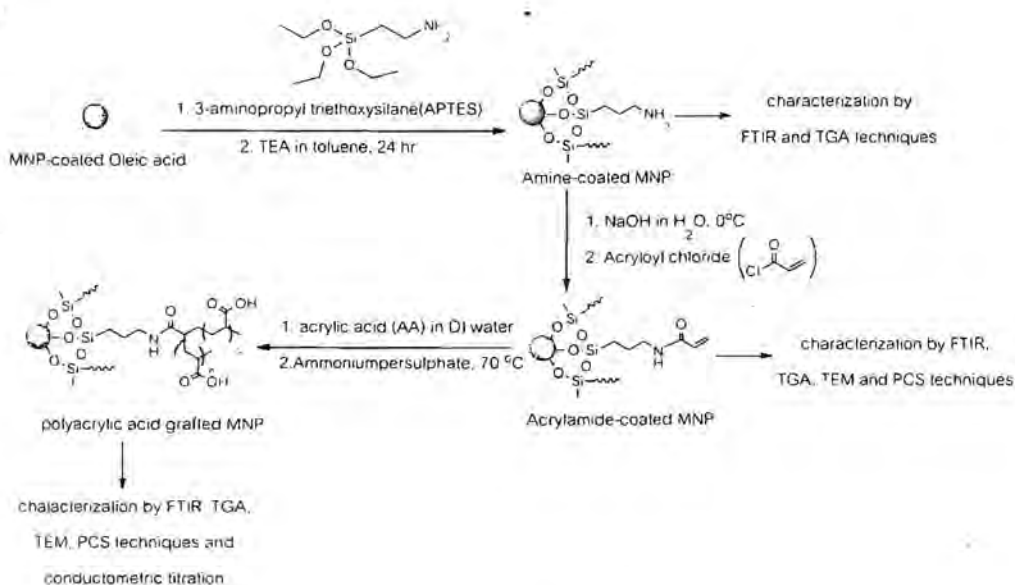
แนวทางที่ 2 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PAA เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction)

วิธีการทดลอง

วิธีดำเนินการทดลองในแนวทางที่ 2 แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนหลักดังนี้

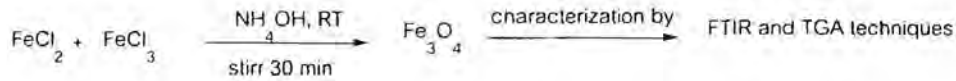
- ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกเอซิด
- ขั้นตอนที่ 2 การตรึง acpc-PNA ลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกเอซิด ด้วยแรงระหว่างประจุ
- ขั้นตอนที่ 3 การนำอนุภาคที่มีการตรึง acpcPNA มาศึกษาการดูดซับดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์
- ขั้นตอนที่ 4 การนำอนุภาคที่มีการตรึง acpcPNA เพื่อมาประยุกต์ใช้ร่วมกับดีเอ็นเอจริง

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ ชนิดพอลิอะไคริลิกเอซิดแสดงดังภาพ 43 โดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพ 43 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกเอซิด

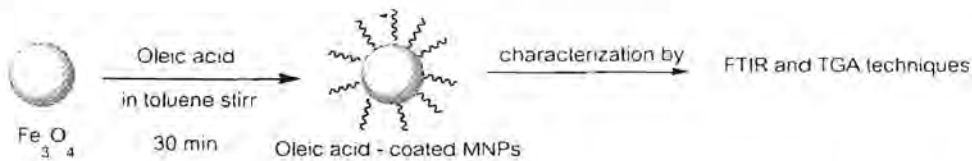
1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP) ด้วยเทคนิคการตกตะกอนร่วม (Co-Precipitation) ดังภาพ 44



ภาพ 44 ปฏิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิริยาการตกตะกอนร่วม

โดยการทำให้ปฏิริยาระหว่างเฟอร์รคลอไรด์ (FeCl_2) และเฟอริกคลอไรด์ (FeCl_3) ทำการคนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) คนต่อไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ขณะที่ปฏิริยากำลังดำเนินไปจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสารจากสารละลายสีเขียวเหลืองเป็นสีดำ หลังสิ้นสุดปฏิริยาทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกด้วยแม่เหล็ก ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค ฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR) และ เทอร์โมกราวิเมตริกอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis, TGA)

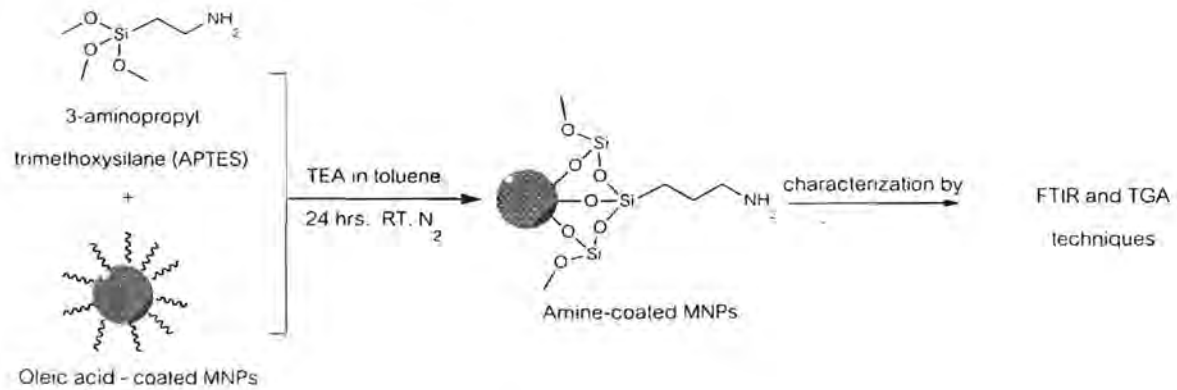
1.2 การเคลือบ Oleic acid บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP-Oleic) เพื่อเสถียรอนุภาคไม่ให้เกิดเกาะกลุ่มเป็นตะกอนใหญ่ (aggregation) ดังภาพ 45



ภาพ 45 การเคลือบ Oleic acid บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

นำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์ที่ได้มาทำปฏิริยากับ Oleic acid ใน Toluene คนเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างด้วยอะซิโตน 2-3 ครั้ง แยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบ Oleic acid ด้วยแม่เหล็กทำให้แห้งแล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่ได้ด้วยเทคนิค ฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR) และ เทอร์โมกราวิเมตริกอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis, TGA)

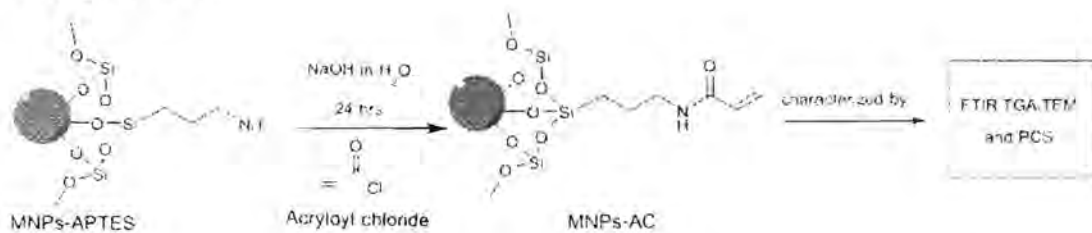
1.3 การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ ดังภาพ 46



ภาพ 46 การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์

โดยการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่เสถียรด้วย oleic acid มากระจายตัวใน toluene จากนั้นค่อยๆเติม triethoxylamine (TEA) ลงในสารละลายโทลูอีนที่มีอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ หลังจากนั้นค่อยๆเติม 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES) ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคแมกนีไทต์ออกโดยใช้แม่เหล็กทำการล้างด้วยเอทานอล 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA

1.4 การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ (MNP-Ac) ดังภาพ 47

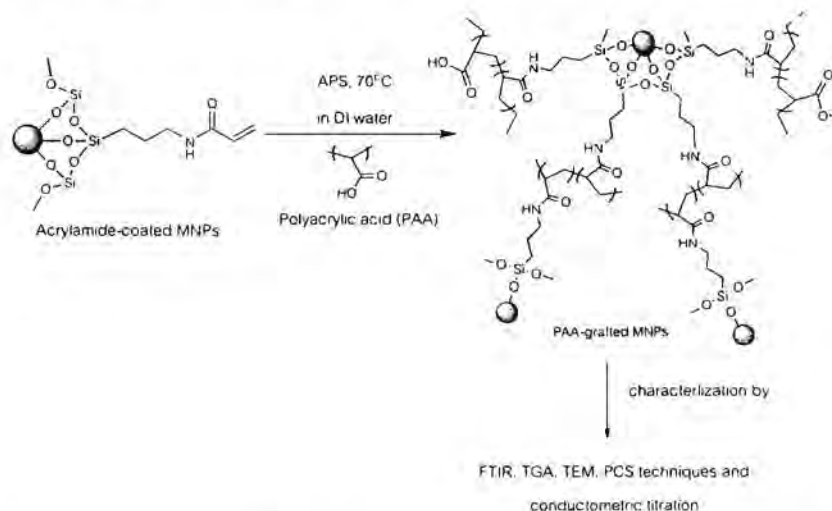


ภาพ 47 การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (acrylamide) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทต์

โดยการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่ถูกตรึงด้วย APTES มากระจายตัวอีกครั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ acryloyl chloride ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อไปที่อุณหภูมิห้องจนครบ 24 ชั่วโมง

หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคออกด้วยแม่เหล็ก ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ โฟโตคอร์เรลชันสเปกโตรสโคปี (Photo correlation spectroscopy ,PCS)

1.5 การตัดแปรบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยพอลิอะคริลิกแอซิด (MNP-PAA) ดังภาพ 48



ภาพ 48 การตัดแปรบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยพอลิอะคริลิกแอซิด (MNP-PAA)

ละลายอะคริลิกแอซิดมอนอเมอร์ในน้ำ คนเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการหยดแอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulphate, APS) (ใช้อัตราส่วนโมลของ initiator : monomer เท่ากับ 1 : 100) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงภายใต้สภาวะบรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนเพื่อทำให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ชนิด พอลิอะคริลิกแอซิดจากนั้นเติม อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วย Acrylamide เพื่อทำการพอลิเมอไรซ์ลงบนพื้นผิวของอนุภาคเป็นเวลา 30 นาทีหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคออกด้วยแม่เหล็ก ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM, PCS และการไทเทรตโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductometric Titration)

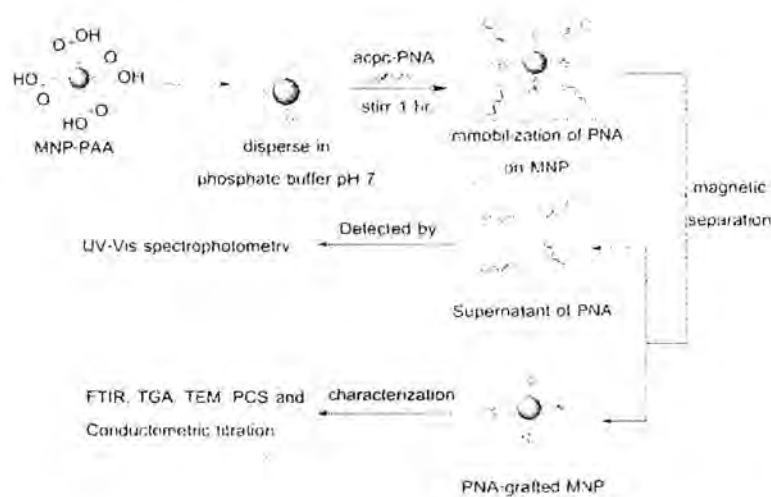
2 การตรึงพีโรลิดินิลพีเอ็นแอลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิดด้วยแรงระหว่างประจุโดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ acpc-PNA

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ acpcPNA ที่มีลำดับเบสคือ Ac-ATG-CCA-CAA-TGT-Lys-NH₂

นำสารละลาย acpcPNA ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มาทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้มีความเข้มข้น 0,10,20,30,40 และ 50 ไมโครโมลาร์ปริมาตรรวมเท่ากับ 5 ไมโครลิตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ acpcPNA และค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA ที่แต่ละความเข้มข้น

2.2 การตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิดโดยใช้แรงระหว่างประจุ ดังภาพ 49



ภาพ 49 การตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิดโดยใช้แรงระหว่างประจุ

นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิด 10 มิลลิกรัม มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย acpcPNA ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลาย acpcPNA ด้วยแม่เหล็ก นำสารละลาย acpcPNA เหลือหลังการทำปฏิกิริยามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) หลังจากนั้นนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำ การตรึงด้วย acpcPNA แล้วมาทำการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้งแล้วทำให้แห้ง และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM, PCS และการไทเทรตโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductometric Titration) จากนั้นทำการหาปริมาณ acpcPNA ทั้งสองชนิดที่ถูกตรึงลงบนอนุภาคด้วย เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยการนำส่วนของละลาย acpcPNA ก่อนตรึงและหลังตรึงลงบน อนุภาคนาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

เพื่อหาปริมาณ acpcPNA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย acpcPNA และคำนวณหาปริมาณ acpc-PNA ดังสมการ

$$\text{ปริมาณ PNA ที่รีงบนอนุภาค} = \text{ปริมาณ PNA ก่อนรีง} - \text{ปริมาณ PNA ที่เหลือในสารละลาย}$$

3. การนำอนุภาคที่มีการรีง acpcPNA มาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอ

3.1 การนำอนุภาคที่มีการรีง acpcPNA มาศึกษาการดูดจับดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic DNA)

3.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอสังเคราะห์

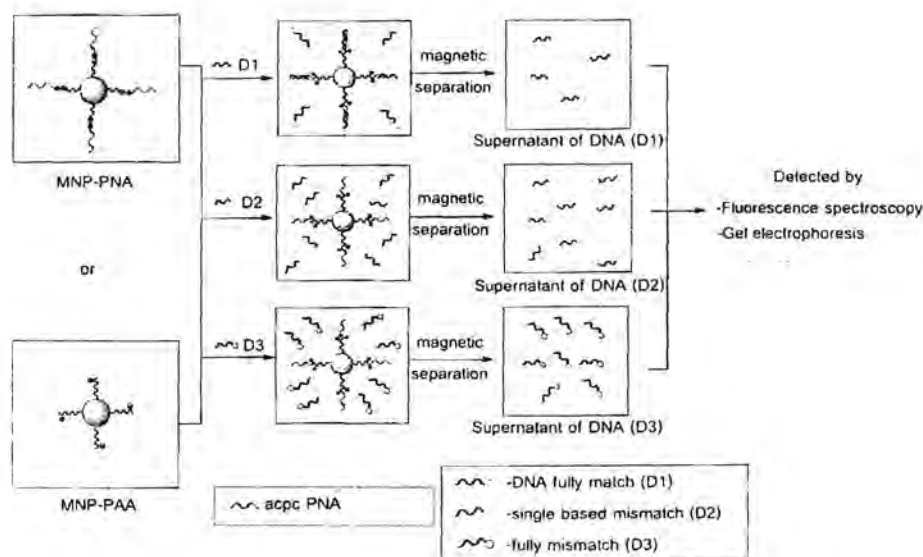
โดยลำดับเบสของ acpcPNA และ ดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่มีลำดับเบสสอดคล้องกับดีเอ็นเอจริงที่ใช้แสดงดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้ทำปฏิกิริยากับอนุภาคที่รีงด้วยดีเอ็นเอ

ชนิดของดีเอ็นเอ (acpc-PNA)	ลำดับเบสของดีเอ็นเอ	excitation	emission
.	FAM-5'-ACATTGTGGCAT-3' Fully match (D1)	490	520
Ac-ATGCCACAATGT-LysNH ₂	Cy5-5'-ACATTATGGCAT-3' Single based mismatch (D2)	650	670
	TAMRA-5'-TGCGATCCATGC-3' Fully mismatch (D3)	552	584

นำสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตรมาทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ไมโครโมลาร์ จากสารละลาย stock ของดีเอ็นเอ 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรรวมเท่ากับ 2 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมตรีทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอที่แต่ละความเข้มข้น

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอแต่ละชนิด (D1, D2 และ D3) และศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกรีงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) เทียบกับอนุภาคก่อนรีงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) ดังแสดงดังภาพ 50

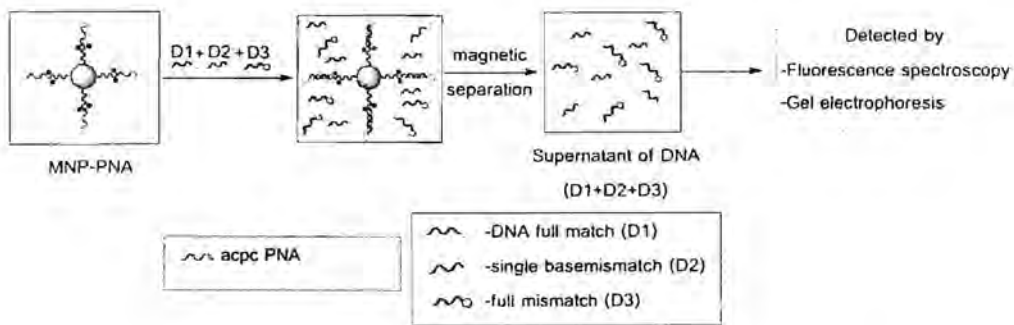


ภาพ 50 การทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอ และศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) เทียบกับอนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA)

นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) หรืออนุภาคหลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) 2 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ทำการคนให้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้แม่เหล็กภายนอก ทำการศึกษาผลการทดลองเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคเจล-อีเล็กโตรโฟรีซิส และทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ถูกดูดจับบนอนุภาค โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่แต่ละชนิดก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคมาตรวจวัดค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี และนำค่าการคายแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิด และทำการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) และอนุภาคหลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) โดยใช้สมการ

$$\text{ปริมาณ DNA ที่ถูกดูดจับ} = \text{ปริมาณ DNA ก่อนเติมอนุภาค} - \text{ปริมาณ DNA ที่เหลือในสารละลาย}$$

3.1.3 การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA มาศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการดูดจับดีเอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ดังแสดงในภาพ 51



ภาพ 51 การทดสอบการจับดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpc-PNA

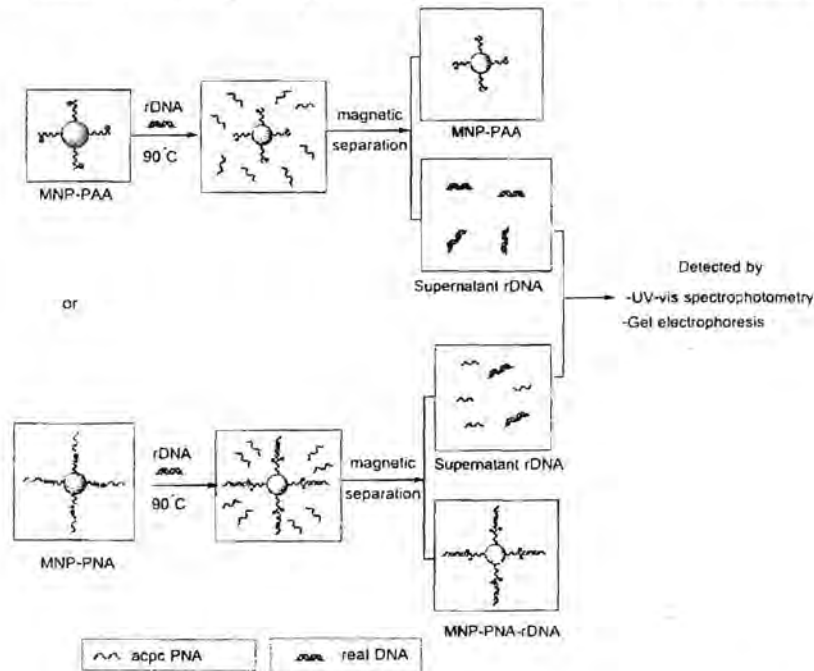
นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์หลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) ปริมาณ 2 มิลลิกรัม เติมนลงในสารละลายดีเอ็นเอผสม D1+D2+D3 โดยดีเอ็นเอแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากทำปฏิกิริยาแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายโดยใช้แม่เหล็กภายนอก และทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกจับบนอนุภาค โดยนำสารละลายดีเอ็นเอผสมก่อนและหลังทำการจับกับอนุภาคที่ตรึงด้วย acpc-PNA (MNP-PNA) ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปีแล้วนำค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดทำการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpc-PNA (MNP-PNA) โดยใช้สมการ

$$\text{ปริมาณ DNA ที่ถูกจับ} = \text{ปริมาณ DNA ก่อนเติมอนุภาค} - \text{ปริมาณ DNA ที่เหลือในสารละลาย}$$

3.2 การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) มาทำการทดสอบเบื้องต้นในการจับดีเอ็นเอจริง (rDNA) เทียบกับอนุภาคก่อนตรึง acpcPNA

นำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA จำนวน 2 มิลลิกรัม มาเติมนลงในสารละลายดีเอ็นเอจริงที่ทำการแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสในปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยดีเอ็นเอจริงที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดและดีเอ็นเอจริงที่สกัดได้จากกล้วยไม้ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร. มติวรรณ นาคขุนทด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้แม่เหล็กภายนอก และทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการจับดีเอ็นเอจริงของอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA และอนุภาค MNP-PAA โดยนำ

สารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคทั้ง 2 ชนิดทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) และเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แสดงดังภาพที่ 52



ภาพ 52 การนำอนุภาค MNP-PNA มาทำการทดสอบเบื้องต้นในการดูดจับดีเอ็นเอจริงเทียบกับอนุภาค MNP-PAA

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการตัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ให้มีประจุลบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิก แอซิด (Polyacrylic acid, PAA) เพื่อนำมาใช้ตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) ในสภาวะที่เหมาะสม โดยอนุภาคที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ป็นอนุภาคในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ และดูดจับดีเอ็นเอที่สนใจ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แบ่งผลการทดลองทั้งหมด 4 ส่วนโดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิด (MNP-PAA)
2. การตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิด (MNP-PAA)
3. การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสังเคราะห์
4. การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอตัวอย่างจริง

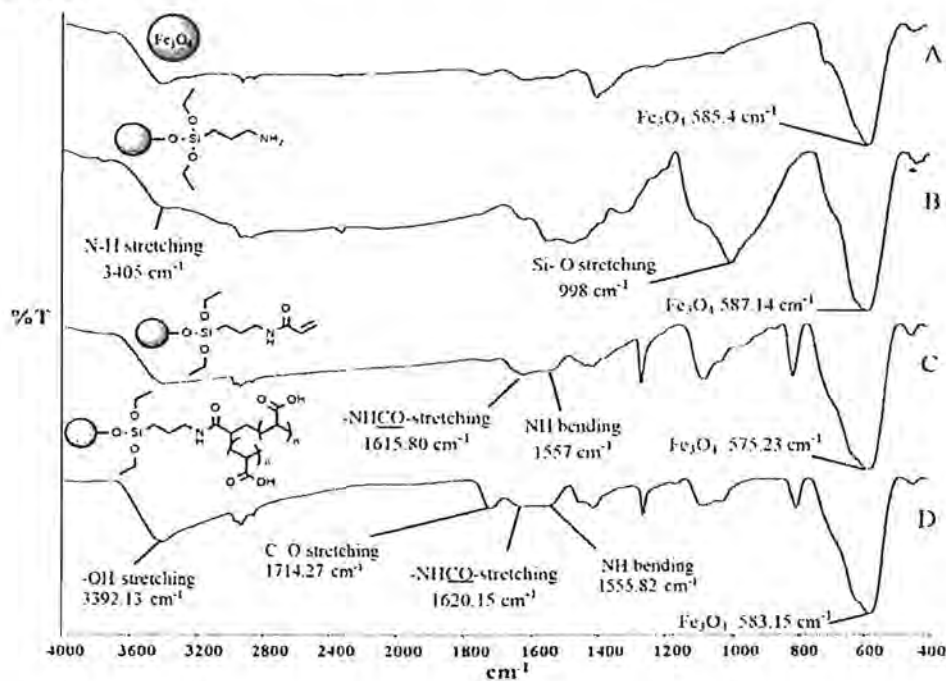
โดยแต่ละผลการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิด (MNP-PAA)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิด จะใช้วิธีการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยหมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide, Ac) มาทำปฏิกิริยากับมอนอเมอร์ ชนิดอะคริลิกแอซิด (Acrylic acid, AA) โดยผ่านอนุมูลอิสระ (free-radical polymerization) ดังภาพ 59 โดยอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ PCS โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนด้วยเทคนิคฟูเรียรทรานส์

ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) โดยผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพ 53

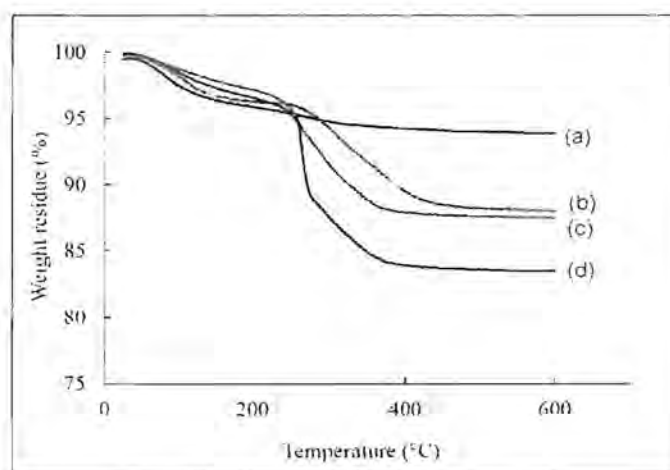


ภาพ 53 สเปกตรัม FTIR ของ A) MNP, B) MNP-APTES, C) MNP-Ac และ D) MNP-PAA

จาก FT-IR สเปกตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนพบว่าในสเปกตรัม A เป็นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (Fe_3O_4) จะพบ สัญญาณ Fe-O ของสารประกอบเหล็กออกไซด์ที่ 585.4 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ สเปกตรัม B เป็นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) จะพบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันเอมีน NH stretching ที่ 3405 cm^{-1} และสัญญาณ Si-O stretching ที่ 998.16 cm^{-1} ซึ่ง

แสดงถึงการมี 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) เคลือบอยู่บนพื้นผิวอนุภาค สเปกตรัม C เป็นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยกลุ่มของ Acrylamide (Ac) จะพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลของหมู่เอไมด์ -NH-C=O- stretching ที่ 1615.8 cm^{-1} และสัญญาณของ N-H bending ที่ 1557 cm^{-1} ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมี หมู่ Acrylamide เคลือบอยู่บนพื้นผิวอนุภาค และสเปกตรัม D เป็นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ คัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด จะพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C=O stretching) ของหมู่ คาร์บอกซิลิก แอซิด ของพอลิอะไคริลิกที่ 1714 cm^{-1} และ พบสัญญาณของ หมู่ไฮดรอกซิลของหมู่คาร์บอก ซิลิก แอซิด ที่ 3392 cm^{-1} ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีพอลิอะไคริลิก แอซิดเคลือบอยู่บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ ซึ่งจากผลของเทคนิค FTIR ที่ได้สามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์หิพอลิเมอร์ ชนิดพอลิอะไคริลิกแอซิดเคลือบอยู่ที่ผิวของอนุภาค

1.2 การศึกษาองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่เคลือบอยู่บนอนุภาคในแต่ละขั้นตอนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก อนุไลซิส (Thermo gravimetric analysis, TGA) ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพ 54

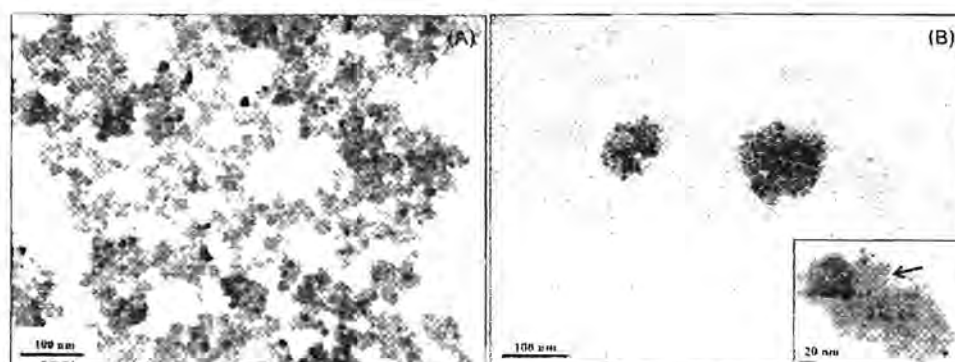


ภาพ 54 เทอร์โมแกรม TGA ของ a) MNP, b) MNP-APTES, c) MNP-Ac และ d) MNP-PAA ที่อุณหภูมิ 25-600 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันบรรยากาศของออกซิเจน

จาก TGA เทอร์โมแกรมภาพ 54 พบว่าเมื่อทำการคัดแปรพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ในแต่ละขั้นตอนมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การหายไปของสารอินทรีย์ที่เคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้น โดยในขั้นตอนการคัดแปรพื้นผิวของอนุภาคด้วย APTES มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 5.9% (b) อนุภาคที่คัดแปรพื้นผิวด้วยหมู่อะคริลลาไมด์ (Ac) มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 6.4% (c) และ อนุภาคที่คัดแปรพื้นผิวด้วย PAA มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิด

เป็น 10.4% (d) ตามลำดับ สามารถกล่าวได้ว่าบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มีพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกแอซิดซึ่งผลการวิเคราะห์ได้นี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR

1.3 การศึกษาขนาดและลักษณะของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนและหลังทำการตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ผลการวิเคราะห์ที่แสดงดังภาพ 55

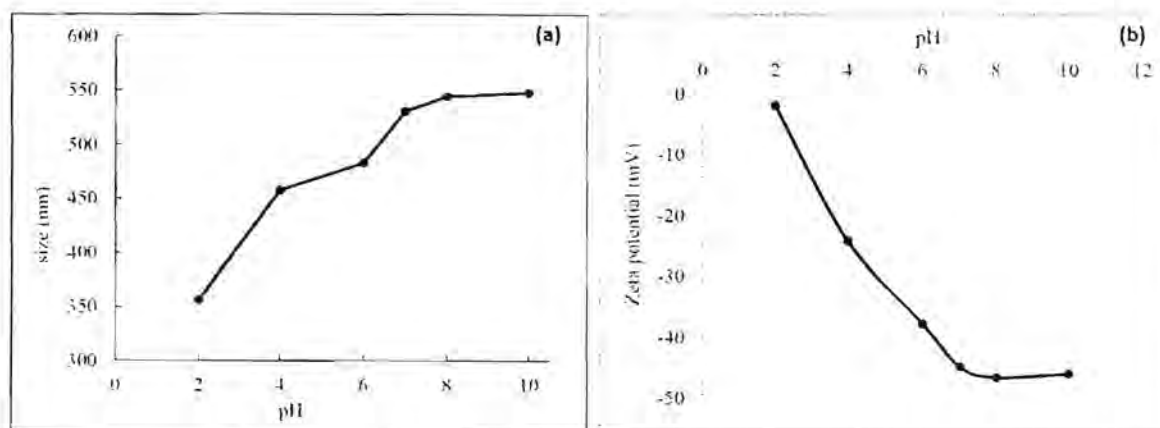


ภาพ 55 ภาพจากเทคนิค TEM ของอนุภาค (A) MNP-Ac และ (B) MNP-PAA

จากภาพ TEM พบว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการตัดแปรพื้นผิวด้วยหมู่อะคริลลาไมด์ (Ac) ซึ่งเป็นอนุภาคก่อนการตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-Ac) ภาพ 55(A) แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของอนุภาคในน้ำปราศจากไอออนได้ดี ในขณะที่อนุภาคที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-PAA) ภาพ 55(B) พบว่าเกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่ม (clusters) โดยจะสังเกตเห็นมีเขี้ยวของพอลิเมอร์หุ้มอยู่โดยรอบ และแต่ละกลุ่มแยกกันอยู่อย่างชัดเจนซึ่งขนาดของ clusters อยู่ที่ประมาณ 100 นาโนเมตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพอลิอะไคริลิกแอซิดมีส่วนทำให้เกิดการเชื่อมโยงค้ำยันระหว่างอนุภาคด้วยกันเองซึ่งมีผลทำให้อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกัน

1.4 การศึกษาความเป็นประจุและขนาดของอนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกแอซิดด้วยเทคนิค โฟโตคอรีเรชันสเปกโตรสโกปี (Photo correlation spectroscopy, PCS)

เนื่องจากพอลิอะไคริลิกแอซิด (Polyacrylic acid) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุในสารละลายที่มีค่าพีเอชที่ต่างกัน เนื่องจากผลของการมีหมู่คาร์บอกซิลิก อยู่บนพื้นผิว ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์หาขนาดและค่าความเป็นประจุของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างกันเพื่อพิสูจน์คุณสมบัติของพอลิเมอร์ชนิดนี้ โดยใช้เทคนิค PCS ผลการทดลองแสดงดังภาพ 56



ภาพ 56 (a) ขนาดไฮโดรไดนามิกของอนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2-10 และ (b) ค่าความเป็นประจุของอนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2-10

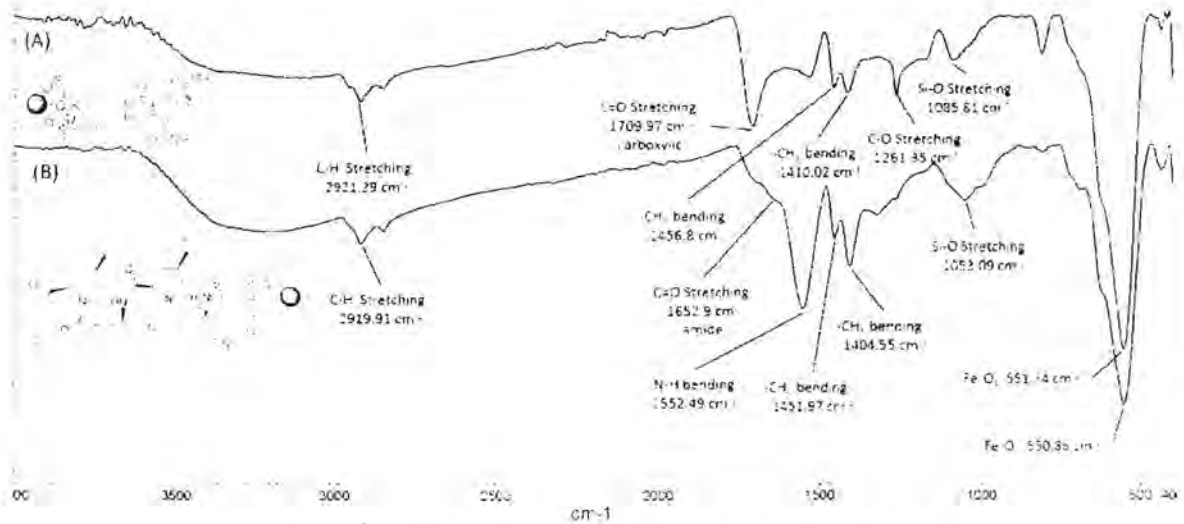
จากภาพ 56 พบว่าเมื่ออนุภาคอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH สูงขึ้นทำให้ประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มากขึ้น และขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH สูงมีผลทำให้การแตกตัวให้โปรตอนของหมู่คาร์บอกซิลิก แอซิด ของพอลิอะไคริลิกแอซิดเพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดเป็นหมู่คาร์บอกซิเลตซึ่งเป็นประจุลบมากขึ้นและนอกจากนี้ยังเกิดการบวมตัวของพอลิเมอร์ได้มากขึ้น ซึ่งมีผลให้ขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย จากผลการวิเคราะห์ที่ได้นี้สามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดสามารถตอบสนองทางด้านความเป็นประจุ และขนาดของอนุภาคเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างกัน

จากผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดแล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์ได้มีพอลิอะไคริลิกแอซิดเคลือบอยู่ที่ผิว

2. การตรึงพีโรลิดีนิลพีเอ็นเอ (acpc-PNA) ลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด

ในงานวิจัยนี้ได้เลือก acpcPNA เพื่อตรึงลงบนอนุภาคที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดโดยอาศัยแรงระหว่างประจุลบของพอลิอะไคริลิกแอซิดบนพื้นผิวของอนุภาคและประจุบวกของ acpcPNA ในสภาวะที่เหมาะสมโดยลำดับเบสของ acpcPNA มีลำดับเบสดังนี้ Ac-ATG-CCA-CAA-TGT-Lys-NH₂ โดยทำการยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ PCS โดยมีรายละเอียดดังนี้

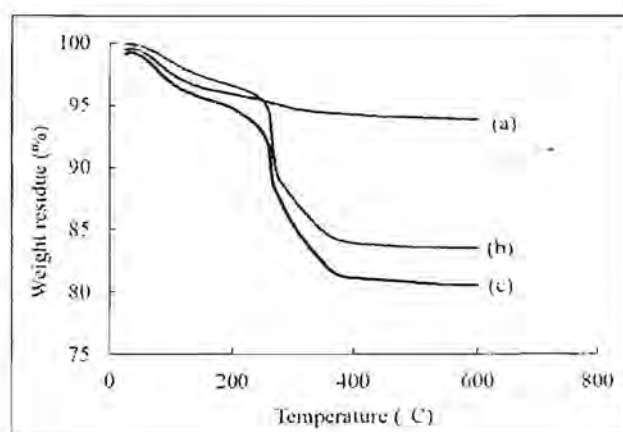
2.1 การขึ้นชั้นการตรึง *acpcPNA* ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดด้วยเทคนิคฟูริเยร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR) ผลการวิเคราะห์แสดงภาพ 57



ภาพ 57 สเปกตรัม FTIR ของ A) MNP-PAA และ B) MNP-PNA

จากสเปกตรัมของ FTIR เมื่อทำการนำอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดมาทำการตรึงด้วย *acpcPNA* พบว่าสัญญาณ C=O Stretching คาร์บอกซิลิกของพอลิอะไคริลิกแอซิดที่ 1709.97 cm^{-1} ซึ่งมีความเข้มลดลง ซึ่งในขณะเดียวกันจะพบสัญญาณ C=O Stretching ของหมู่เอไมด์ของ *acpcPNA* (P1) ที่ 1652.9 cm^{-1} และสัญญาณของหมู่เอมีน N-H bending ของ *acpcPNA* ที่ 1552.49 cm^{-1} ได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงการมีหมู่ฟังก์ชันของเอมีนบนพื้นผิวของอนุภาคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจาก *acpcPNA* ที่ถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคซึ่งในโครงสร้างของ *acpcPNA* มีหมู่ฟังก์ชันของเอไมด์เป็นจำนวนมาก

2.2 การขึ้นชั้นการตรึง *acpcPNA* ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก อานาไลซิส (Thermogravimetric analysis, TGA) ผลการวิเคราะห์แสดงภาพ 58

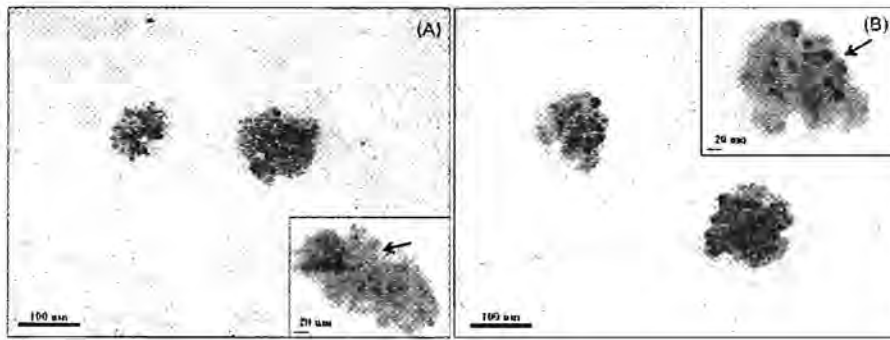


ภาพ 58 เทอร์โมแกรม TGA ของ a) MNP, b) MNP-PAA และ c) MNP-PNA ที่อุณหภูมิ 25-600 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันบรรยากาศของออกซิเจน

จากผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ในแต่ละขั้นตอน มีเปอร์เซ็นต์การหายไปของน้ำหนักเพิ่มขึ้น ในขั้นตอนการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคด้วยพอลิเมอร์ชนิด polyacrylic acid มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 10.4% และเมื่อทำการตรึง acpcPNA มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 13.3% แสดงให้เห็นว่า acpcPNA ถูกตรึงลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะคริลิกแอซิด ซึ่งสอดคล้องกับการพิสูจน์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR

2.3 การยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

เมื่อนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 59

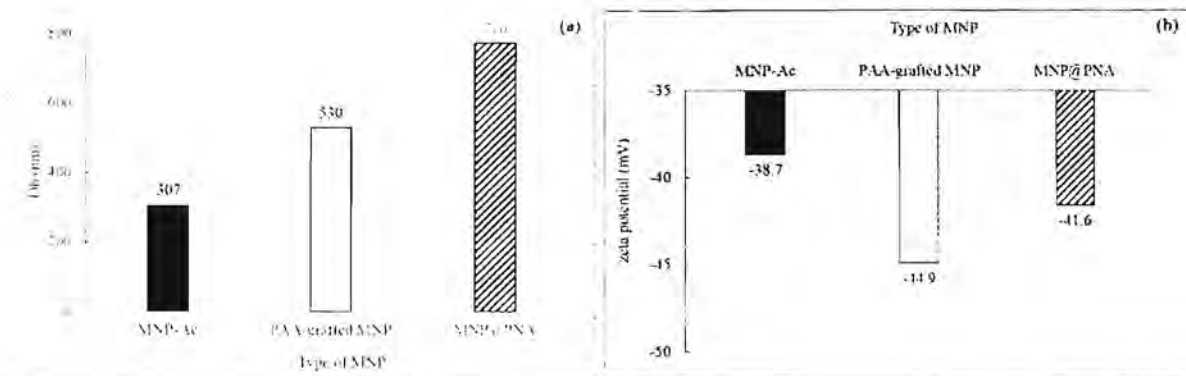


ภาพ 59 ภาพจากเทคนิค TEM ของอนุภาค (A) MNP-PAA และ (B) MNP-PNA

จากภาพ 59 พบว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดมาทำการตรึงด้วย *acpcPNA* (ภาพ 59B) สามารถสังเกตเห็นเชือกของพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคได้ชัดเจนและมากกว่าอนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด (ภาพ 59A) ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มี *acpcPNA* เคลือบอยู่ที่ผิว

2.4 การยืนยันการตรึง *acpcPNA* ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดด้วยเทคนิคโฟโตคอรัลเรชันสเปกโตรสโคปี (*Photo correlation spectroscopy*, PCS)

การทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบขนาดและประจุของอนุภาคก่อนเคลือบด้วย PAA(MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไคริลิกแอซิด(MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA, P1) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 60



ภาพ 60 (a) ขนาดไฮโดรไดนามิก และ (b) ค่าความเป็นประจุของอนุภาคก่อนดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไคริลิกแอซิด(MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA)

จากภาพ 60 พบว่าอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิก แอซิด และ acpc-PNA ลงทั้งนี้เนื่องจากพื้นผิวของอนุภาคดังกล่าวมีประจุลบมากกว่าอนุภาคก่อนดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac) จึงทำให้มีการบวมตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ได้ดีกว่า นอกจากนี้พบว่าอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดมีค่าประจุลบจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากพอลิอะไครลิกแอซิดซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ตอบสนองต่อค่า pH เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH สูงจะทำให้หมู่คาร์บอกซิลิกแตกตัวให้โปรตอนทำให้อยู่ในรูปของคาร์บอกซิเลตที่มีประจุลบมากขึ้น ในขณะที่อนุภาคที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA พบว่าค่าความเป็นประจุลดลงอาจเนื่องมาจากการตรึง acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุลบของพอลิอะไครลิกแอซิดและประจุบวกของ acpcPNA มีผลทำให้หมู่คาร์บอกซิเลตที่มีอยู่บนอนุภาคนานาโนแมกนีไทต์ลดลงซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นประจุลดลง

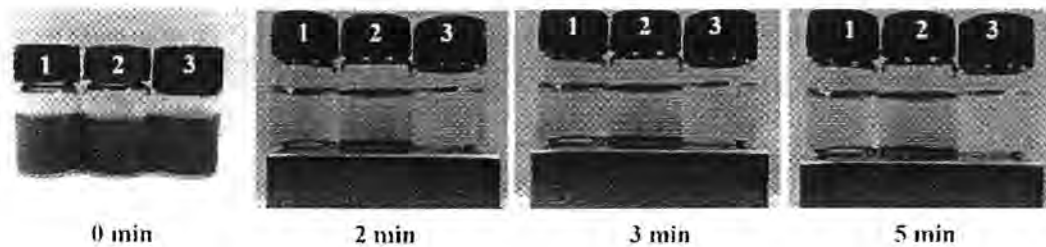
2.6 การศึกษาการกระจายตัวในน้ำปราศจากไอออนของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด อนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด และอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA

นำอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) แต่ละชนิดทำการกระจายตัวในน้ำ DI ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงผลการทดลองแสดงดังภาพ 61



ภาพ 61 การทดสอบการกระจายตัวในน้ำของอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA)

จากภาพ 61 พบว่าอนุภาคทั้ง 3 ชนิดสามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำในช่วงเวลา ก่อน 24 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac) เกิดการตกตะกอนลงมาก่อนอนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอนุภาคทั้ง 2 ชนิดนี้มีหมู่คาร์บอกซิลิกของพอลิอะไครลิกแอซิดที่อยู่บนอนุภาคซึ่งช่วยในการกระจายตัวในน้ำได้ดีนั่นเอง เมื่อทำการทดสอบการตอบสนองต่อแม่เหล็กของอนุภาคทั้ง 3 ชนิดผลการทดลองแสดงดังภาพ 62



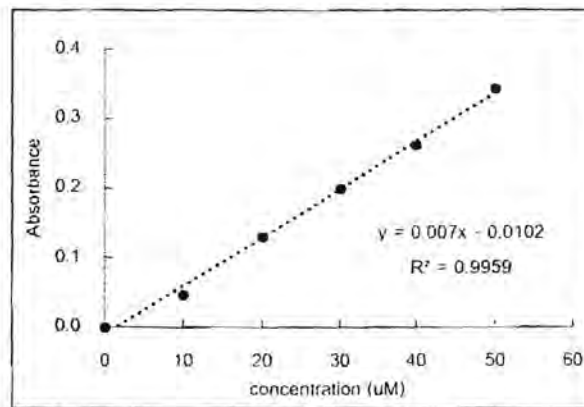
ภาพ 62 การทดสอบการตอบสนองต่อแม่เหล็กของอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA)

จากภาพ 62 เมื่อมีการใช้แม่เหล็กจากภายนอกมาทำการล่อให้อนุภาคตกตะกอนพบว่าอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-AC) ตกตะกอนภายในเวลา 2 นาที จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาที อนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) จึงเกิดการตกตะกอนในขณะที่อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไคริลิกแอซิด (MNP-PAA) เกิดการตกตะกอนช้าสุดเมื่อเวลาผ่านไปเวลา 5 นาที จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงอนุภาคที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิดมีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำได้ดีที่สุด ในขณะที่อนุภาคที่ถูกตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) จะมีส่วนของหมู่คาร์บอกซิลเลตน้อยลงและมี acpcPNA ซึ่งเป็น โมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำจึงทำให้เกิดการตกตะกอนลงมาก่อนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด

2.7 การหาปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทต์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด

2.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ acpc-PNA

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย acpcPNA ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครโมลาร์ โดยนำสารละลาย acpcPNA แต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของพีโรลิดีนีนีลพีเอ็นเอและค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA แต่ละความเข้มข้น ผลการทดลองแสดงดังภาพ 63

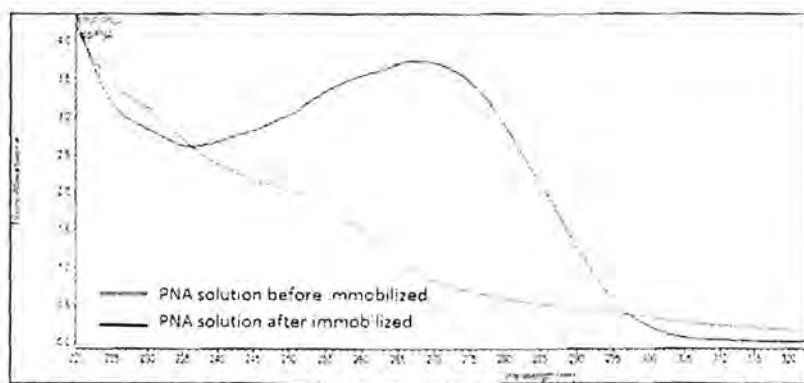


ภาพ 63 กราฟมาตรฐานของ acpcPNA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพ 63 พบว่ากราฟมาตรฐานของ acpcPNA มีความเป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7.2 การหาปริมาณของ acpcPNA ถูกตรึงลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกแอซิด โดยใช้แรงระหว่างประจุ

การตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไคริลิกแอซิด จะทำในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 เมื่อทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลาย acpcPNA ด้วยแม่เหล็ก นำสารละลาย acpcPNA ที่เหลือหลังการทำปฏิกิริยามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA ก่อนการตรึงลงบนอนุภาค ผลการทดลองแสดงดังภาพ 64



ภาพ 64 ค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA ก่อนและหลังตรึงลงบนอนุภาค

จากภาพ 64 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ acpc-PNA หลังจากตรึงลงบนอนุภาคมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA ก่อนตรึงลงบนอนุภาค และเมื่อทำการหาปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนอนุภาค พบว่า acpcPNA ถูกตรึงลงบนอนุภาคคิดเป็น 0.18 นาโนโมลต่อมิลลิกรัม ของอนุภาค

3. การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยพีโรลิดีนีสพีเอ็นเอทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอ

3.1 การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ที่สอดคล้องกับบางส่วนของดีเอ็นเอ ตัวอย่างจริง

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาได้มีการติดสารเรืองแสงที่ปลายสายเพื่อให้ง่ายต่อการตรวจวัดซึ่งประกอบไปด้วยดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีลำดับเบสคู่สม (Fully match, D1), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมหนึ่งตำแหน่ง (Single based mismatch, D2) และ ดีเอ็นเอที่ไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม (Fully mismatch, D3) ซึ่งมีลำดับเบสแสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้ร่วมกับอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ

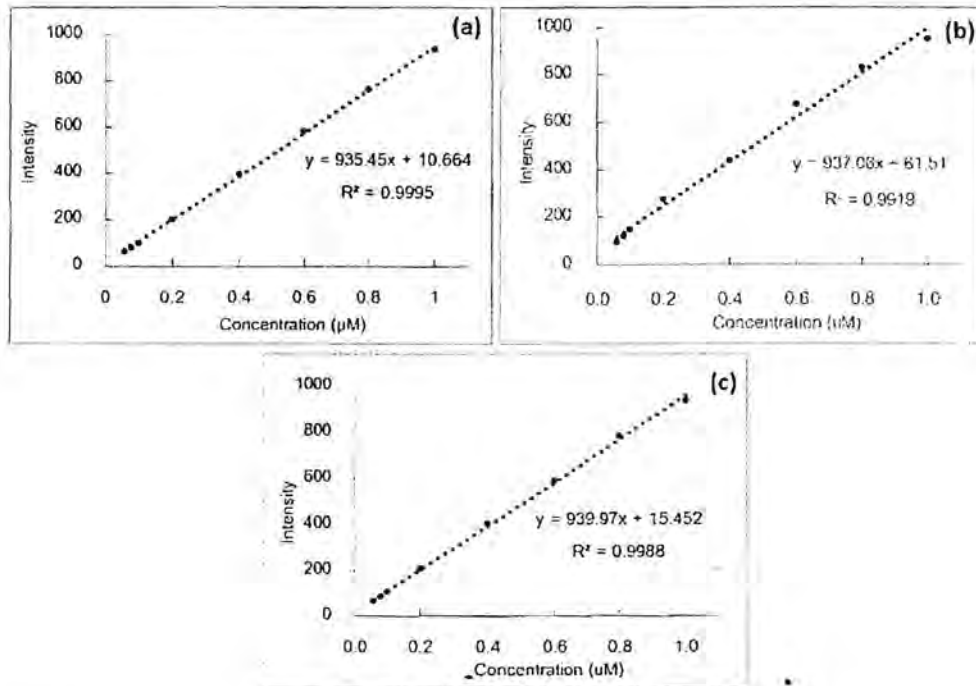
	ลำดับเบสของดีเอ็นเอ	excitation	emission
Ac-ATGCCACAATGT-LysNH ₂	FAM-5'-ACATTGTGGCAT-3' Fully match (D1)	490	520
	Cy5-5'-ACATTATGGCAT-3' Single based mismatch (D2)	650	670
	TAMRA-5'-TGCGATCCATGC-3' Fully mismatch (D3)	552	584

ในการศึกษาการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอสังเคราะห์แบ่งเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอ (D1, D2 และ D3)

นำสารละลายมาตรฐานดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ไมโครโมลาร์ ทำการวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปีจากนั้น ทำการ

พลอต กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอเอ็นเอที่แต่ละความเข้มข้น ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 65



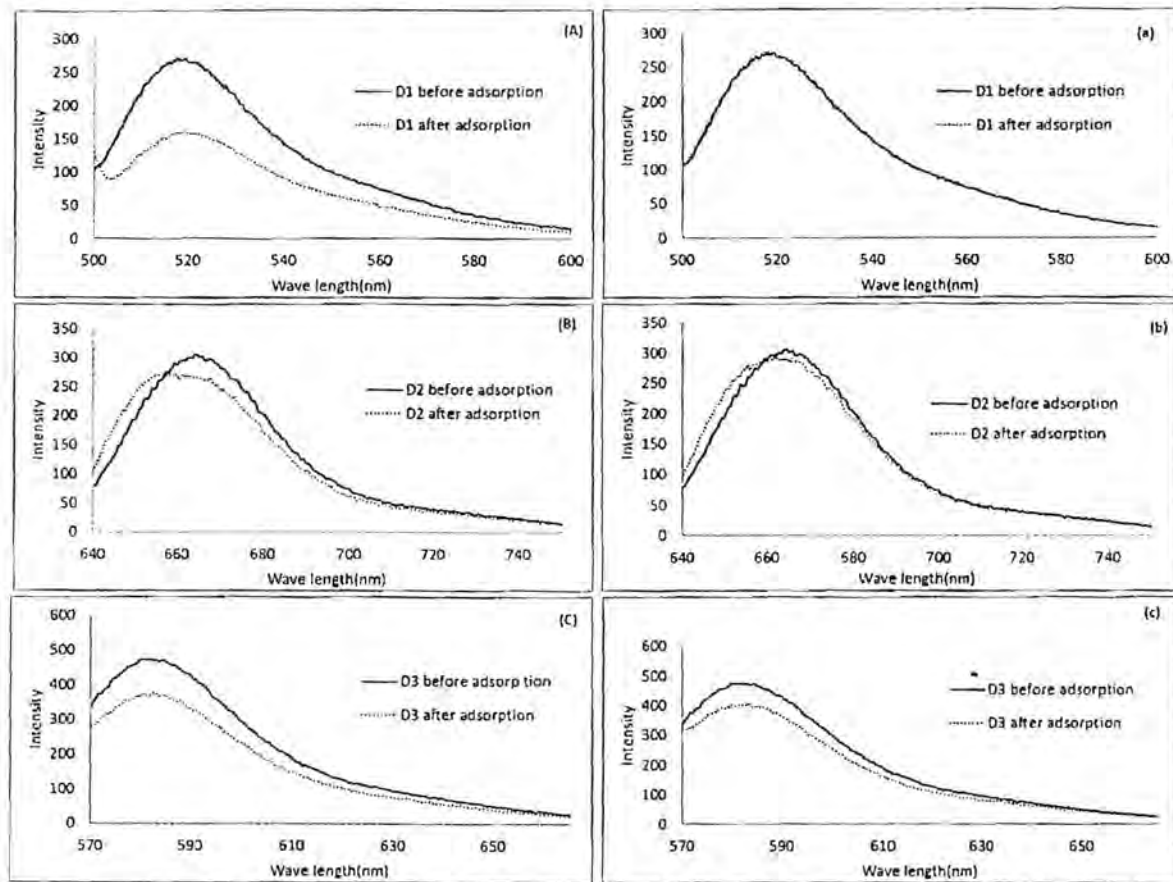
ภาพ 65 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอ (a) Fully match (D1), (b) Single based mismatch (D2) และ (c) Fully mismatch (D3)

พบว่ากราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอแต่ละชนิดอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.1.2 การศึกษาความสามารถและความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) ในการดูดจับดีเอ็นเอเทียบกับอนุภาคก่อนตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PAA)

โดยนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) และอนุภาคหลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) ทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอ 3 ชนิด ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (Fully match, vD1), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่คู่สมหนึ่งตำแหน่ง (Single based mismatch, D2) และดีเอ็นเอที่ไม่มีลำดับเบสที่คู่สม (Fully mismatch, D3) โดยการเติมอนุภาคแต่ละชนิดลงในสารละลายของดีเอ็นเอ D1, D2 และ D3 ทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกดูดจับบนอนุภาค โดยนำสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิด ก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคทำการตรวจวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรส

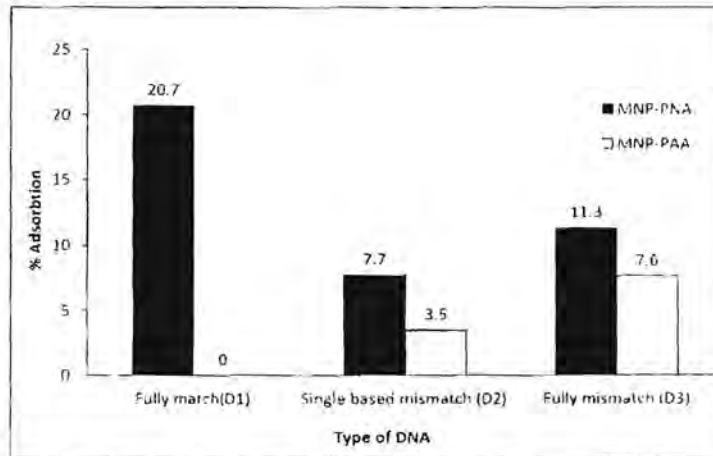
เซนส์สเปกโตรสโคปีแล้วนำค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอแต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 66



ภาพ 66 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดก่อน และหลังทำการดูดซับลงบนอนุภาค A-C : อนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) และ a-c : อนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA)

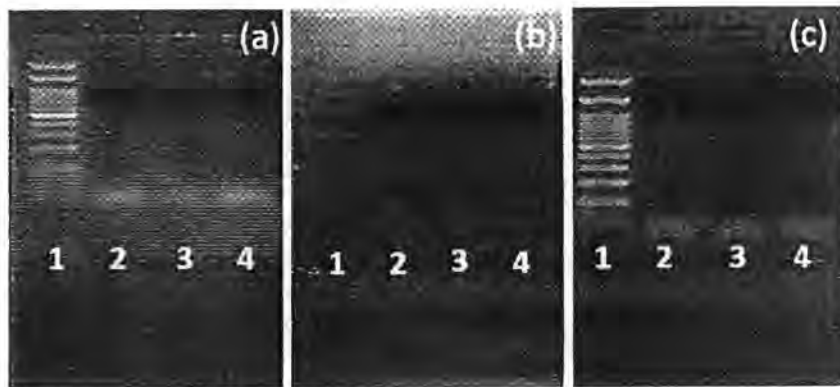
จากภาพพบว่าเมื่อใช้อนุภาคที่ตรึง acpcPNA (MNP-PNA) มาทำการดูดซับดีเอ็นเอแต่ละชนิดอนุภาคสามารถดูดซับได้เฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (Full match, D1) เท่านั้น โดยจากค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายดีเอ็นเอ D1 หลังเติมอนุภาคมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 66A) ในขณะที่ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายดีเอ็นเอ D2 และ D3 มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับสารละลายดีเอ็นเอก่อนเติมอนุภาค (ภาพ 66 B และ C) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) นี้มีความจำเพาะเจาะจงในการดูดซับดีเอ็นเอเฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้น ในทางกลับกันเมื่อทดสอบความสามารถของอนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA มาดูดซับกับดีเอ็นเอ D1, D2 และ D3 พบว่าอนุภาคดูดซับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดได้น้อยมาก โดยดูได้จากค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอแต่ละ

ชนิดก่อน และหลังการเติมอนุภาคมีค่อนข้างค่าใกล้เคียงกันมาก (ภาพ 66 a-c) จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคก่อนตรึง acpcPNA (MNP-PAA) ไม่เกิดแรงกระทำ หรือดูดจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific adsorption) กับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด เมื่อคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ถูกดูดจับลงบนอนุภาค และนำค่าปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดจับดีเอ็นเอลงบนอนุภาคแต่ละชนิดพบว่าได้ผลดังภาพ 67



ภาพ 67 ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดจับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด D1, D2 และ D3 โดยใช้อนุภาค MNP-PNA เทียบกับอนุภาค MNP-PAA

จากภาพ 67 พบว่าอนุภาค MNP-PNA สามารถดูดจับดีเอ็นเอ D1 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ acpcPNA ได้ปริมาณมากที่สุดโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ของการดูดจับดีเอ็นเอคิดเป็น 20.7 ส่วนดีเอ็นเอ D2 และ D3 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมเพียง 1 ตำแหน่ง และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมตามลำดับ มีค่าเปอร์เซ็นต์ของการดูดจับค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับ D1 ซึ่งอาจเกิดจากการหายไปของดีเอ็นเอในขั้นตอนของการแยกดีเอ็นเอออกจากอนุภาค จึงทำให้เกิดการสูญหายไปของดีเอ็นเอในขณะที่การใช้ออนุภาค MNP-PAA ในการดูดจับดีเอ็นเอแต่ละชนิดให้ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน จึงกล่าวได้ว่าอนุภาค MNP-PNA สามารถดูดจับดีเอ็นเอ D1 ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้น ส่วนอนุภาค MNP-PAA สามารถดูดจับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด ได้น้อยมาก นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถและความจำเพาะเจาะจงในการดูดจับดีเอ็นเอของอนุภาคแต่ละชนิดในเชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 68

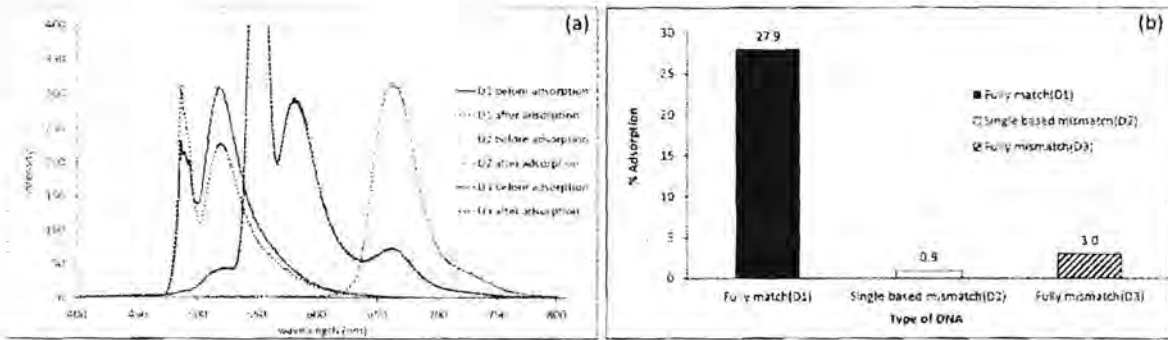


ภาพ 68 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส a. Fully match (D1), b. Single based mismatch (D2) และ c. Fully mismatch (D3) 1: มาร์คเกอร์ 100 เบส, 2: สารละลายดีเอ็นเอก่อนการเติมอนุภาค, 3: สารละลายดีเอ็นเอหลังเติมอนุภาค MNP-PNA และ 4: สารละลายดีเอ็นเอหลังเติมอนุภาค MNP-PAA

จากภาพพบว่าแบนด์ที่ 3 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (Fully match, D1) (ภาพ 68 a) หลังการเติมอนุภาค MNP-PNA มีสีจางลงเท่านั้นซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีดีเอ็นเอ (D1) บางส่วนถูกดูดซับบนอนุภาคจึงทำให้สารละลายดีเอ็นเอ (D1) มีปริมาณลดลงในขณะที่สารละลายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมเพียง 1 ตำแหน่ง (Single based mismatch, D2) (ภาพ 68 b) และ สารละลายดีเอ็นเอที่ไม่มีลำดับเป็นคู่สม (Fully mismatch, D3) (ภาพ 68 c) มีขนาดของแบนด์เท่าเดิมเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอก่อนเติมอนุภาคซึ่งแสดงในแบนด์ที่ 2 (ภาพ 68 b และ c) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า D2 และ D3 ไม่ได้ถูกดูดซับบนอนุภาค ในทางกลับกันเมื่อทำการดูดซับดีเอ็นเอด้วยอนุภาค MNP-PAA พบว่าขนาดและสีของแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดหลังการเติมอนุภาค ซึ่งแสดงในแบนด์ที่ 4 (ภาพ 68 a-c) ไม่มีการจางลง ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดไม่ถูกดูดซับบนอนุภาค MNP-PAA ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี

3.1.3 การทดสอบการดูดซับดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย *acpc-PNA*

เพื่อยืนยันความสามารถและความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคที่ถูกตรึงด้วย *acpcPNA* ในการดูดซับดีเอ็นเอจึงได้ทำการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย *acpcPNA* (MNP-PNA) มาทดสอบการดูดซับดีเอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ระหว่างสารละลายดีเอ็นเอ D1+D2+D3 จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ก่อนและหลังทำการดูดซับกับอนุภาค MNP-PNA ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี แล้วทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการดูดซับดีเอ็นเอ ผลการทดลองแสดงดังภาพ 69

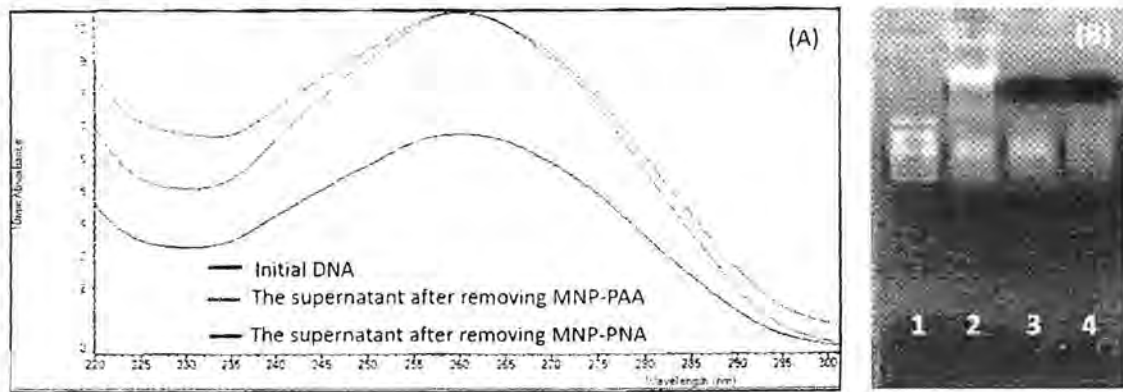


ภาพ 69 (a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของสารละลายดีเอ็นเอผสม D1+D2+D3 ก่อนและหลังการดูดซับด้วยอนุภาคที่ตรึง acpcPNA (MNP-PNA) และ (b) ค่าร้อยละของการดูดซับดีเอ็นเอแต่ละชนิด

จากภาพพบค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอ D1 ในสารละลายดีเอ็นเอผสม (D1+D2+ D3) หลังการเติมอนุภาค MNP-PNA ลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่ค่าการคายแสงของ D2 และ D3 มีค่าลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการดูดซับดีเอ็นเอแต่ละชนิดพบว่าอนุภาค MNP-PNA สามารถดูดซับดีเอ็นเอ D1 ในสารละลายดีเอ็นเอผสมระหว่าง D1+D2+D3 คิดเป็น 27.9 จากผลการทดลองที่ได้นั้นสามารถยืนยันได้ว่าอนุภาค MNP-PNA แสดงความสามารถในการดูดซับดีเอ็นเอที่ดี และมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับดีเอ็นเอที่สูงซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม และ ไม่เป็นคู่สมรวมถึงดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ต่างกันเพียง 1 ลำดับเบสได้อย่างชัดเจน

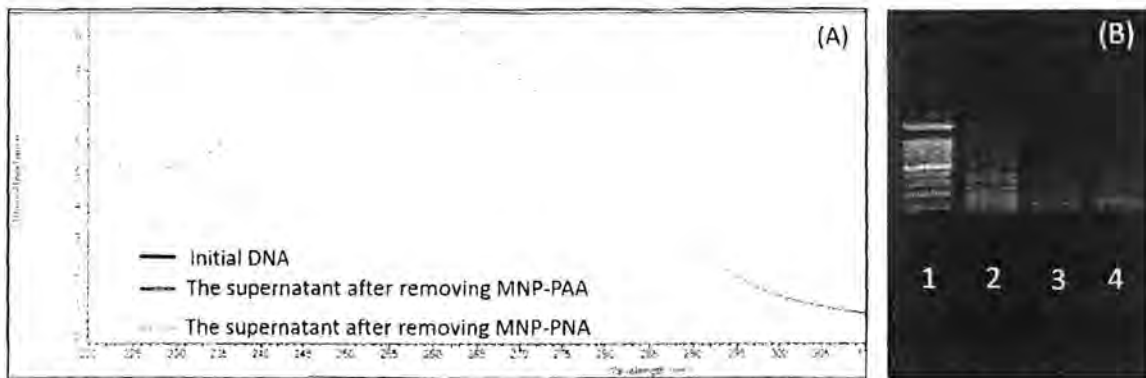
3.2. การศึกษาเบื้องต้นในการนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpc-PNA (PI) (MNP-PNA) มาทำการดูดซับดีเอ็นเอจริงเพื่อใช้เป็นอนุภาคในการดูดซับดีเอ็นเอที่สนใจ

ดีเอ็นเอจริงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร. มลิวรรณ นาคขุนทด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งการทดลองได้นำอนุภาคที่ตรึงด้วยพีวีโรลิดินิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA มาทำการเติมลงในสารละลายดีเอ็นเอจริงที่เกี่ยวข้องกับ โพรตีนซินที่สกัดได้จากข้าวโพดที่ทำการแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้ว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนและหลังทำการดูดซับกับอนุภาคที่ตรึงด้วยพีวีโรลิดินิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA ทำการตรวจวัดเบื้องต้นด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และเจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองแสดงดังภาพ 70



ภาพ 70 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอจริงที่ได้จากการสกัดจากข้าวโพด ก่อนและหลังทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PNA หรือ MNP-PAA
 (B) เจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส 1: มาร์คเกอร์ 100 เบส, 2: สารละลายดีเอ็นเอก่อนการเติมอนุภาค, 3: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PAA และ 4: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PNA

จากภาพ 70(A) พบว่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PNA มีค่าลดลงอย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ภาพ 70(B) ซึ่งพบว่าความเข้มของแบนด์ที่ 4 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PNA จางลงเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PNA (ภาพ 70(B) หมายเลข 2) แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอจริงบางส่วนถูกดูดจับไปบนอนุภาคซึ่งเป็นผลมาจากส่วนของดีเอ็นเอจริงมีลำดับเบสบางส่วนเป็นคู่สมกับ acpPNA ที่ถูกตรึงอยู่ที่ผิวของอนุภาค ในทางกลับกันเมื่อใช้อนุภาค MNP-PAA ในการจับดีเอ็นเอพบว่าค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากทำการดูดจับดีเอ็นเอซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งพบว่าแบนด์ที่ 3 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PAA มีความเข้มเท่าเดิมเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PAA ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอไม่ถูกดูดจับลงบนอนุภาค MNP-PAA เพื่อทำการยืนยันประสิทธิภาพของอนุภาคที่ตรึงด้วยพีร์โรลิดีนิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA) ในการเลือกจับดีเอ็นเอที่สนใจอย่างจำเพาะเจาะจง ได้ทำการทดสอบกับดีเอ็นเอจริงที่สกัดได้จากกล้วยไม้ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีนซินและมีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมกับ PNA ซึ่งทำการตรวจวัดสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคที่ตรึงด้วยพีร์โรลิดีนิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA เบื้องต้นด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และเจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองแสดงดังภาพ 71



ภาพ 71 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอจริงที่ได้จากการสกัดจากกล้วยไม้ ก่อนและหลังทำการดูดซับด้วยอนุภาค MNP-PNA หรือ MNP-PAA (B) เจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส 1: มาร์คเกอร์ 100 เบส, 2: สารละลายดีเอ็นเอก่อนการเติมอนุภาค, 3: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PAA และ 4: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PNA

จากภาพ 71(A) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PAA และ MNP-PNA มีค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอก่อนเติมอนุภาค ซึ่งสอดคล้องกับเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ภาพ 71(B) ซึ่งพบว่าความเข้มของแบนด์ที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PNA และ MNP-PAA ไม่แตกต่างจากแบนด์ที่ 2 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนทำการดูดซับด้วยอนุภาค แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอจริงไม่ถูกดูดซับไปบนอนุภาคทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งเนื่องมาจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้วยไม้ไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ acpcPNA ที่ตรึงบนพื้นผิวของอนุภาค จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถของอนุภาคที่ตรึงด้วยพีร์โรลิดีนิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA) ในการเลือกจับดีเอ็นเอเฉพาะที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้น

จากผลการทดลองเบื้องต้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA สามารถนำมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอตัวอย่างจริงได้ โดยสามารถนำมาใช้เป็นอนุภาคในการดูดซับเฉพาะดีเอ็นเอที่สนใจได้และยังมีความจำเพาะเจาะจงสูงอีกด้วย

สรุปผลการทดลองแนวทางที่ 2

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไคริลิกแอซิด ซึ่งอนุภาคที่สังเคราะห์ได้แสดงคุณสมบัติมีประจุลบบนพื้นผิวสูง มีความเสถียร และการกระจายตัวในน้ำที่ดี นอกจากนี้ยังสามารถตอบสนองต่อค่า pH ของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากนั้นเมื่อทำการตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยแรงระหว่างประจุพบว่าปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนอนุภาคคิดเป็น 0.18 นาโน โมลต่อมิลลิกรัมของอนุภาค

เมื่อนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA ทำการทดสอบความสามารถและความจำเพาะเจาะจงในการจับกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA สามารถจับกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้นซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับดีเอ็นเอ และความสามารถในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมกันเพียงตำแหน่งเดียวได้ จากนั้นเมื่อนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA มาศึกษาเบื้องต้นร่วมกับดีเอ็นเอจริง โดยนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบการจับกับดีเอ็นเอจริงที่สกัดได้จากข้าวโพด ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA สามารถจับดีเอ็นเอตัวอย่างจริงได้

จากการทดลองที่ได้สามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA มีความสามารถ และมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับดีเอ็นเอได้ ซึ่งคาดว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ได้ดังกล่าวนี้สามารถนำมาประยุกต์เป็นอนุภาคในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ และจับดีเอ็นเอที่สนใจในอนาคตได้

ชื่อโครงการย่อย A theoretical study of structural and energetic properties of peptide nucleic acid
 ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 - 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
 รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 ถึงวันที่ 16 กันยายน 2560

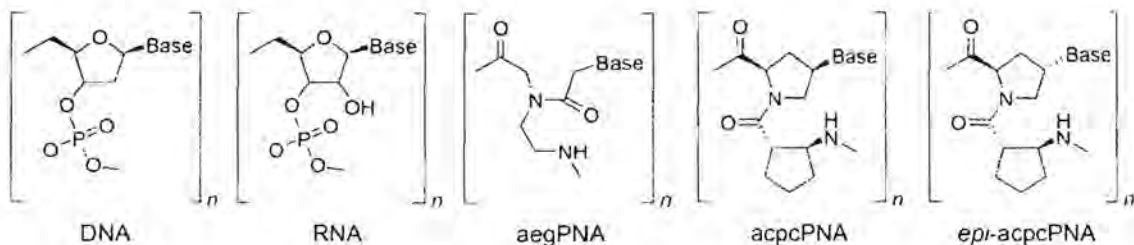
หัวหน้าโครงการย่อย

ผศ.ดร.ศุภรินทร์ ศิริวงศ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หลักการและเหตุผล

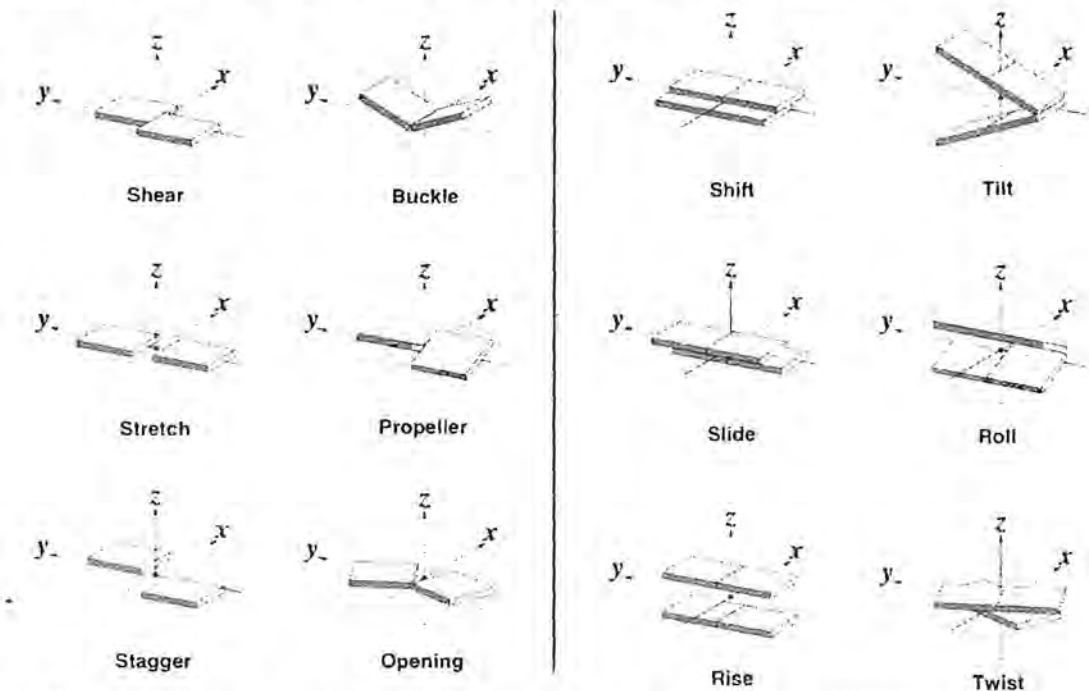
เนื่องจากผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า pyrrolidinyl PNA มีความสามารถในการเข้าคู่กับกรดนิวคลีอิกเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA ได้โครงสร้างที่มีความเสถียรเชิงความร้อนสูง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่มีโครงสร้าง 3 มิติของพีเอ็นเอชนิดดังกล่าว จึงไม่สามารถอธิบายสมบัติการเข้าคู่ที่แตกต่างกันของพีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาสมบัติทางโครงสร้างด้วยวิธีทางทฤษฎี หรือ วิธีทางเคมีเชิงคอมพิวเตอร์ ดังนั้นโครงการย่อยนี้จึงมีวัตถุประสงค์คือเพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลังงานการจับยึดของ pyrrolidinyl PNA ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation) โดยศึกษาทั้งหมด 2 ชนิด (รูปที่ 1) ซึ่งได้แก่ (2*R*,4*R*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (acpcPNA) และ (2*R*,4*S*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (*epi*-acpcPNA) เมื่อเข้าคู่กันกับ DNA, RNA และ PNA ด้วยกันเองเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA ตามลำดับ



รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของ DNA, RNA และ PNA ชนิด N-(2-amino-ethyl)-glycine หรือ aegPNA, (2*R*,4*R*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (acpcPNA) และ (2*R*,4*S*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (*epi*-acpcPNA)

การเข้าคู่กันของกรดนิวคลีอิกเกิดเป็นเกลียวคู่ (double helix) นั้นเป็นไปได้หลายรูปแบบ (form) เช่น ในโมเลกุลสายคู่ของ DNA ที่พบมากจะเป็นแบบ A-form และแบบ B-form (Saenger, 1988) ในขณะที่การเข้าคู่ของ PNA ชนิด aegPNA จะเป็นแบบ P-form (Sen & Nielsen, 2006) โดยพารามิเตอร์ที่บอกความแตกต่างกันของโมเลกุลสายคู่แต่ละแบบแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวางตัวของคู่เบส หรือ base-pair parameter (ประกอบด้วย 6 พารามิเตอร์ ได้แก่ shear, stretch stagger, buckle, propeller และ opening) และ การวางตัวของสองคู่เบสที่อยู่ติดกัน หรือ base-step parameter (ได้แก่ shift, slide, rise, tilt, roll และ twist) (ดูรูปที่ 2) สำหรับโมเลกุลสายคู่

แบบ A-form จะมีพารามิเตอร์ rise = 2.5 Å และ twist = 32.7° (ทำให้มีจำนวนคู่เบส 11 คู่ต่อการหมุนเกลียว 1 รอบ) โมเลกุลสายคู่แบบ B-form จะมีพารามิเตอร์ rise = 3.4 Å และ twist = 36.0° (ทำให้มีจำนวนคู่เบส 10 คู่ต่อการหมุนเกลียว 1 รอบ) และโมเลกุลสายคู่แบบ P-form จะมีพารามิเตอร์ rise = 3.3 Å และ twist = 20° (ทำให้มีจำนวนคู่เบส 18 คู่ต่อการหมุนเกลียว 1 รอบ) และค่าพารามิเตอร์ slide มีค่าประมาณ -2.5 Å (Rasmussen et al., 1997)



รูปที่ 2 แสดงการวางตัวของคู่เบสสำหรับบอกพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ base-pair (ซ้ายมือ) และ base-step parameter (ขวามือ)

ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าไม่มีโครงสร้าง 3 มิติของ pyrrolidinyI PNA ทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นในการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของ PNA ดังกล่าวจึงต้องสร้างโครงสร้างเริ่มต้นทั้ง 3 รูปแบบ เพื่อศึกษาว่าโครงสร้างที่เป็นไปได้ของ PNA ว่ามีรูปแบบอย่างไร อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าระเบียบวิธีวิจัยมีความถูกต้อง จึงต้องศึกษาโครงสร้างของ aegPNA ซึ่งเป็น PNA ที่มีโครงสร้าง 3 มิติ ด้วยทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ว่าผลที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลให้โครงสร้างสอดคล้องกับโครงสร้าง 3 มิติ ที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการหรือไม่ จากนั้นนำโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลนำมาคำนวณพลังงานยึดจับ (binding energy, $\Delta E_{\text{binding}}$) เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรเชิงโครงสร้างของโมเลกุลกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลังงานของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA, PNA-DNA และ PNA-RNA เมื่อ PNA เป็น acpcPNA และ epi-acpcPNA โดยใช้การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลร่วมกับการคำนวณทางเคมีควอนตัม

วิธีการคำนวณ

การศึกษาด้วยวิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำเป็นต้องสร้างพารามิเตอร์ที่แสดงถึงอันตรกิริยาระหว่างอะตอมของระบบที่ศึกษา เรียกพารามิเตอร์เหล่านี้ว่า สนามแรง (force field) โดยในงานวิจัยนี้ได้สร้าง force field สำหรับ PNA ทั้ง 3 ชนิด แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส อะดีนีน (A), ไซโทซีน (C), กัวนีน (G) และ ไทมิน (T) โครงสร้างที่นำมาเป็นฐานข้อมูลสำหรับ force field ของ PNA ข้างต้นได้จากการคำนวณทางกลศาสตร์ควอนตัมด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และคำนวณประจุของแต่ละอะตอม (atomic point charge) ด้วยวิธี HF/6-31G(d) นำผลที่ได้ไปสร้างเป็น force field เพื่อใช้กับการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ต่อไป

ในการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจะให้ระบบ (โมเลกุลสายคู่) อยู่ในสภาวะสารละลาย โดยอยู่ในกล่องสี่เหลี่ยมที่มีน้ำล้อมรอบห่างจากโมเลกุลสายคู่เป็นระยะประมาณ 10 Å ในทุกทิศทาง และทำการจำลองแบบเป็นเวลา 10 ns จากนั้นนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบไปคำนวณพลังงาน

ผลการคำนวณ

1. โมเลกุลสายคู่ PNA-PNA

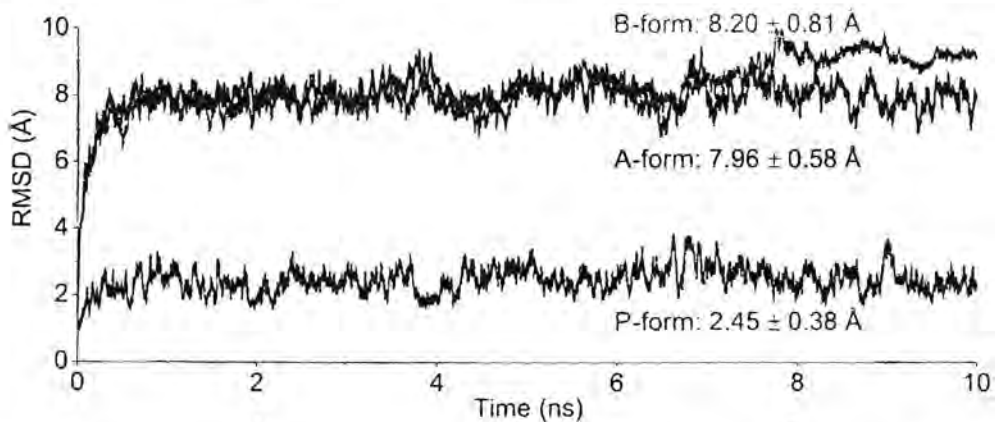
เนื่องจากการลักษณะของโมเลกุล PNA เมื่อมีการเข้าคู่เกิดเป็น PNA-PNA แล้ว สามารถจัดเรียงตัวในทิศทางที่แตกต่างกันได้ 2 แบบ คือ (1) แบบขนาน (parallel) โดยปลายด้าน *N-terminus* ของสายสายที่หนึ่งจับคู่กับด้าน *N-terminus* ของอีกสายหนึ่ง และ (2) แบบขนานสวน (antiparallel) โดยปลายด้าน *N-terminus* ของสายที่หนึ่งจับคู่กับปลายด้าน *C-terminus* ของสายที่สอง โดยลำดับเบสที่เลือกมาศึกษาคือ *N-GCGAATTCGC-C: PNA1* และ *N-CGCTTAAGCG-C: PNA2* ดังนั้น การศึกษาโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ของ *acpcPNA* และ *epi-acpcPNA* ที่สายของ PNA จับกันในทิศทาง antiparallel ระบบโมเลกุลสายคู่จะเป็น PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 ในขณะที่ การศึกษาโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ที่สาย PNA จับกันในทิศทาง parallel ระบบโมเลกุลสายคู่จะเป็น PNA1-PNA2

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า *acpcPNA* ไม่สามารถเข้าคู่กับ PNA อีกสายหนึ่งในทิศทาง antiparallel ได้ (หมายความว่าไม่สามารถเกิดโมเลกุลสายคู่ของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2) แต่สามารถเข้าคู่กับ PNA อีกสายหนึ่งในทิศทาง parallel ได้เป็นอย่างดี (สามารถเกิดโมเลกุลสายคู่ PNA1-PNA2 ได้) โดยมีค่า T_m ประมาณ 31 °C สำหรับ *epi-acpcPNA* พบว่าสามารถเข้าคู่ PNA อีกสายหนึ่งในทิศทาง antiparallel ได้เป็นอย่างดี ทั้งโมเลกุลสายคู่ของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 โดยมีค่า T_m ประมาณ 33 °C และ 39 °C ตามลำดับ (Mansawat et al., 2012) ส่วนการจับกันแบบ parallel ของ *epi-acpcPNA* ให้ค่า T_m ประมาณ 35 °C

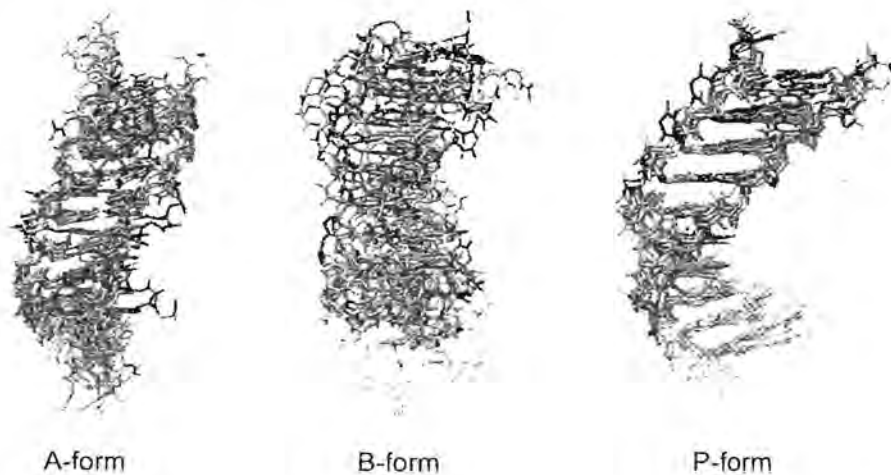
1.1 aegPNA

เมื่อจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ *aegPNA-aegPNA* ที่เข้าคู่แบบ antiparallel โดยเริ่มต้นจาก A-, B- และ P-form เป็นเวลา 10 ns จากนั้นหาค่า root-mean-square deviation หรือ RMSD

เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น และเลือกบางโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบมาซ้อนทับกับโครงสร้างเริ่มต้น ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 3 และ 4 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเริ่มต้นการจำลองแบบด้วยโครงสร้างแบบ A-form และ B-form พบว่าได้โครงสร้างที่ไม่เสถียรและเบี่ยงเบนจากโครงสร้างเริ่มต้น (มีค่า RMSD เฉลี่ยประมาณ 8 Å) และมีลักษณะของโมเลกุลสายคู่ที่ไม่ดี แสดงว่าโครงสร้างโมเลกุลสายคู่ของ aegPNA ไม่ใช่แบบ A- และ B-form ในขณะที่โครงสร้างเริ่มต้นแบบ P-form มีค่า RMSD เฉลี่ยประมาณ 2.5 Å และมีลักษณะเป็นสายคู่อย่างดีและคู่เบสสามารถเข้าคู่กันได้เป็นอย่างดีซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้าง X-ray ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าระเบียบวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้มีความน่าเชื่อถือ



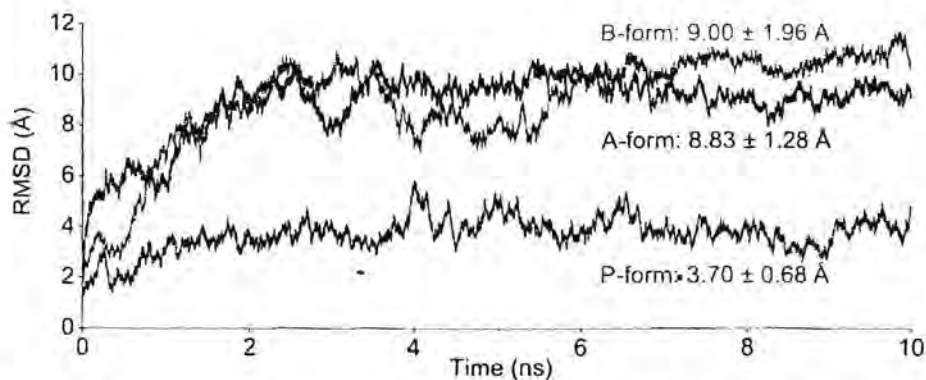
รูปที่ 3 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ PNA1-PNA1 ที่จับกันแบบ antiparallel เมื่อ PNA เป็น aegPNA ซึ่งมีรูปแบบเริ่มต้นเป็น A-, B- และ P-form



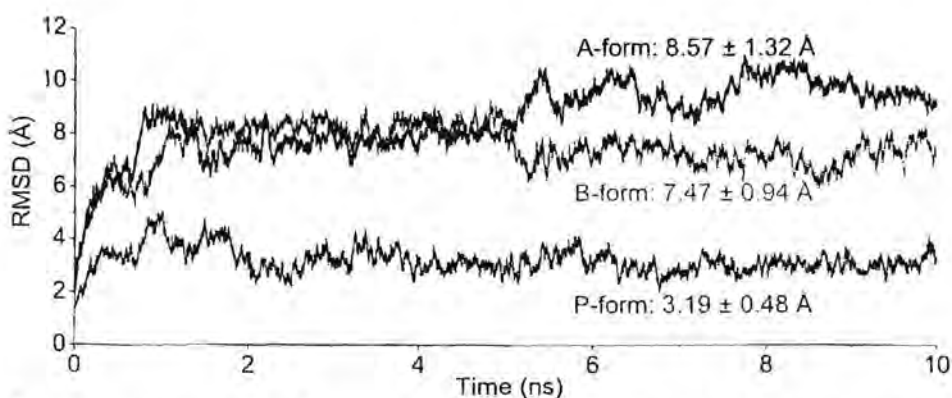
รูปที่ 4 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ PNA1-PNA2 ที่จับกันแบบ antiparallel เมื่อ PNA เป็น aegPNA

1.2 Antiparallel PNA-PNA: acpcPNA

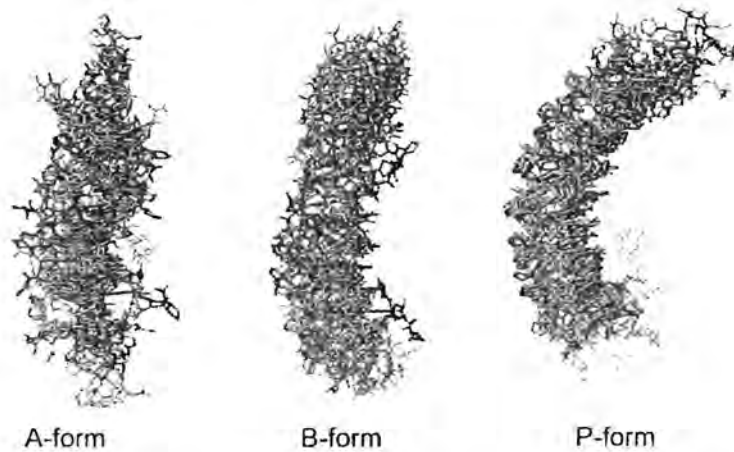
ผลการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ acpcPNA-acpcPNA แบบ antiparallel พบว่า โครงสร้างของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสทั้ง PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 มีความผันผวนและแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นค่อนข้างมากทั้งแบบ A-form และ B-form ในขณะที่โครงสร้างแบบ P-form มีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเริ่มต้นน้อยกว่า (ดูรูปที่ 5 และ 6) แต่เมื่อพิจารณาโครงสร้าง (รูปที่ 7 และ 8) พบว่า โครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบของโมเลกุลสายคู่แบบ P-form มีความผันผวนของโครงสร้างในส่วนปลายของสายคู่และคู่เบสในส่วนนี้ยังเบี่ยงเบนออกนอกโมเลกุลอีกด้วย เมื่อวิเคราะห์การเกิดพันธะไฮโดรเจนตามการจับคู่เบสแบบ Watson-Crick ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบจำนวน 10,000 โครงสร้าง พบว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจนของบางคู่เบสมีค่าน้อยมากดังแสดงในตารางที่ 1 แสดงว่า acpcPNA ไม่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่แบบ antiparallel PNA-PNA ได้



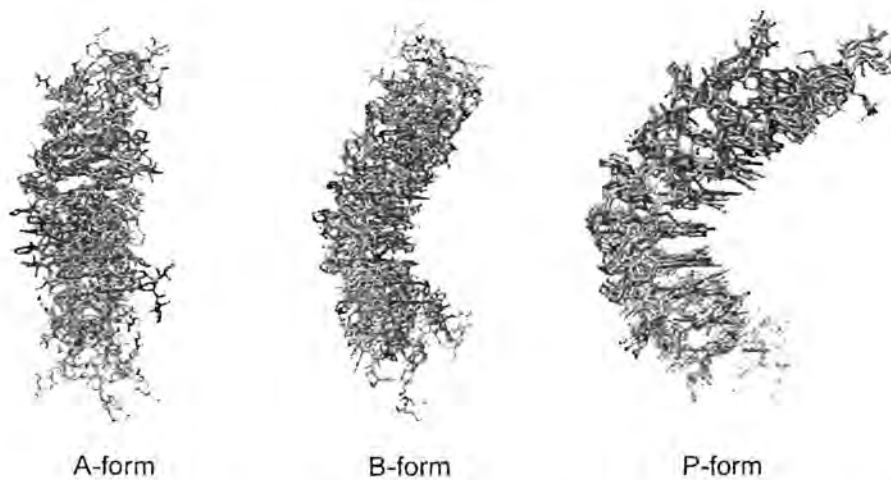
รูปที่ 5 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA1



รูปที่ 6 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA2-PNA2



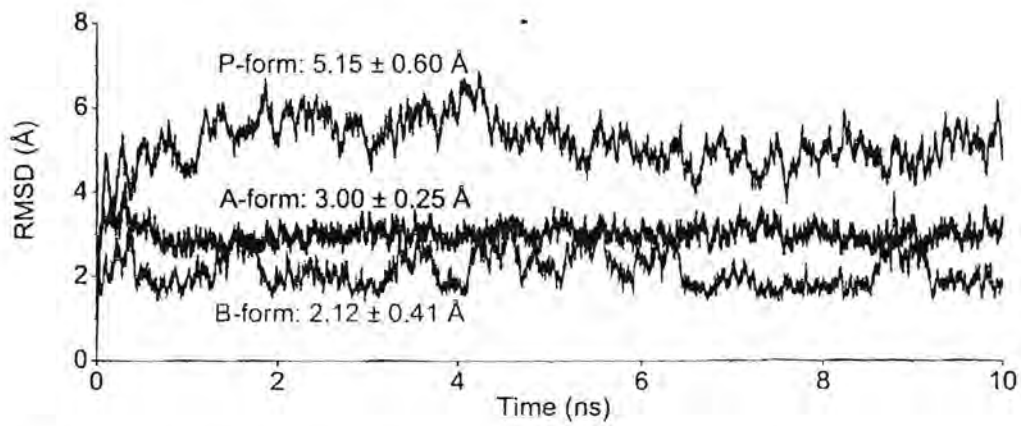
รูปที่ 7 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA1



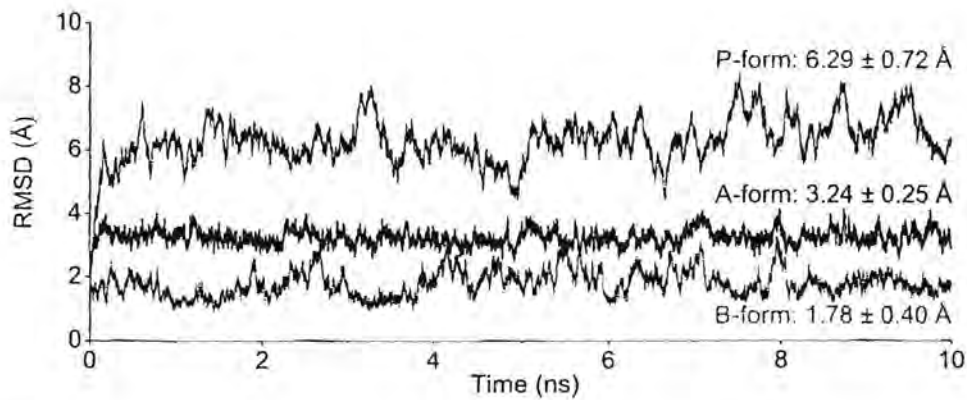
รูปที่ 8 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA2-PNA2

1.3 Antiparallel PNA-PNA: *epi-acpcPNA*

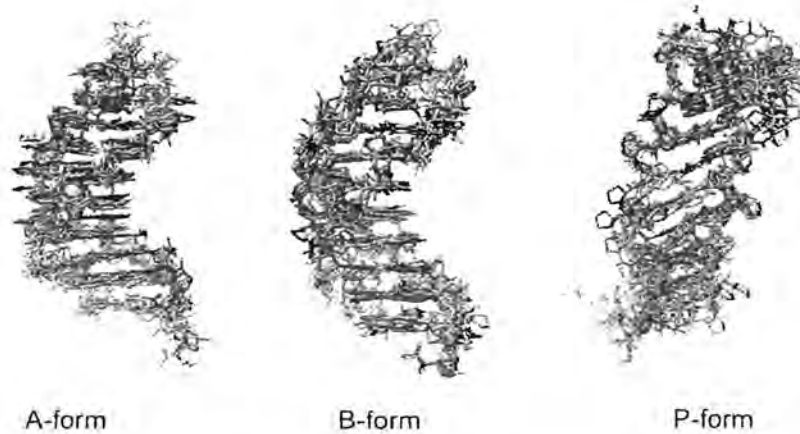
สำหรับการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลของ antiparallel PNA-PNA ที่ชนิดของ PNA เป็น *epi-acpcPNA* ค่า RMSD ของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 แสดงดังรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ และโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ โมเลกุลสายคู่ที่โครงสร้างเริ่มต้นเป็นแบบ A-form และ B-form เปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเริ่มต้นน้อยที่สุด (มีค่า RMSD ต่ำ) เมื่อนำโมเลกุลสายคู่ทั้งสองมาหาค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ base-step parameter (ตารางที่ 2) พบว่าการเข้าคู่ของ PNA ชนิดนี้มีลักษณะการวางตัวของคู่เบสคล้ายแบบ B-form มากที่สุด ดังนั้นโครงสร้างจากการจำลองแบบที่เริ่มต้นจาก B-form จึงถูกนำมาศึกษาการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่จำเพาะระหว่างคู่เบส Watson-Crick ซึ่งพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนมากกว่า 90%



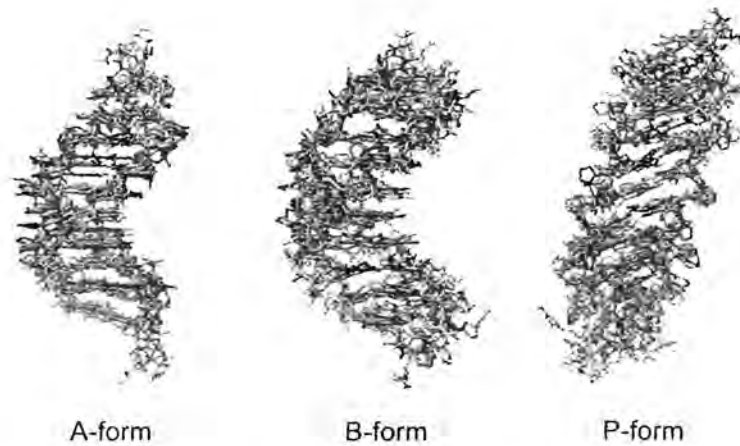
รูปที่ 9 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel *epi-acpcPNA* ของระบบ PNA1-PNA1



รูปที่ 10 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel *epi-acpcPNA* ของระบบ PNA2-PNA2



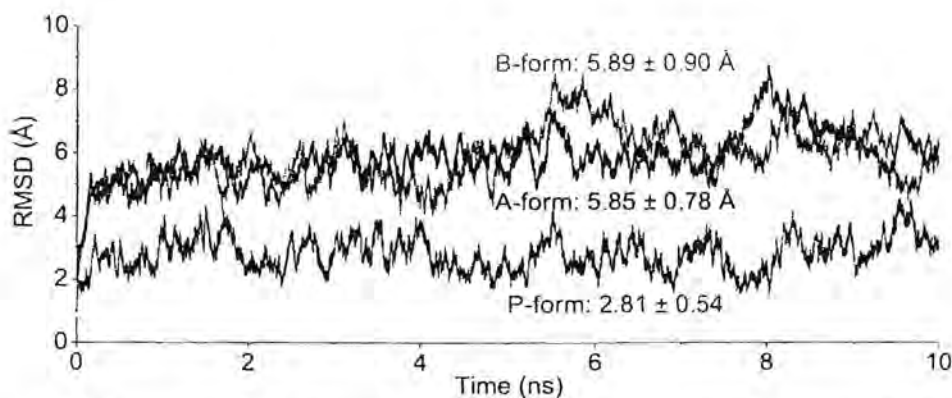
รูปที่ 11 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับ - โครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ antiparallel *epi-acpcPNA* ของระบบ PNA1-PNA1



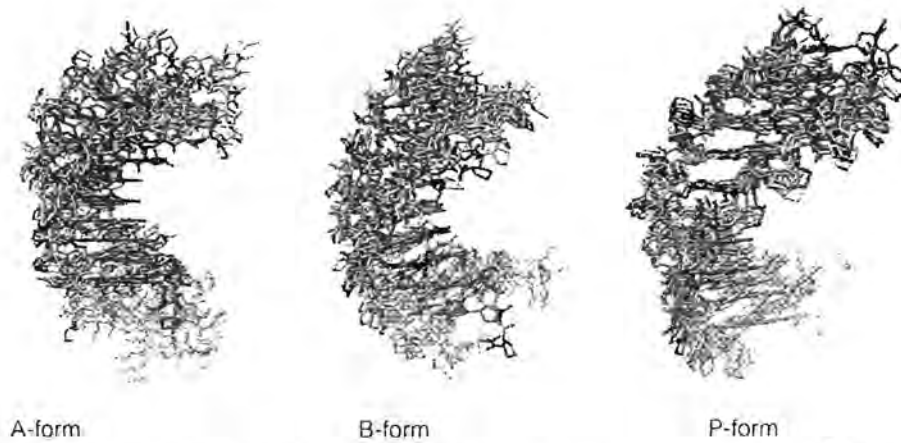
รูปที่ 12 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ antiparallel *epi-acpcPNA* ของระบบ PNA2-PNA2

1.4 Parallel PNA-PNA: *acpcPNA*

จากผลการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ PNA1-PNA2 ซึ่งเป็นการจับกันของ PNA ในทิศทาง parallel เมื่อ PNA คือ *acpcPNA* พบว่าระบบที่ค่า RMSD ต่ำที่สุดคือ P-form (รูปที่ 13) ค่า RMSD ประมาณ 2.8 Å จากการพิจารณาโครงสร้าง (รูปที่ 14) และจากการศึกษาค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ base-step parameter (ตารางที่ 2) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับ P-form ดังนั้นโครงสร้างที่เป็นไปได้ของโมเลกุลสายคู่ของ PNA ชนิดนี้น่าจะเป็นแบบ P-form นอกจากนี้ยังพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนตามการจับคู่เบสแบบ Watson-Crick มากกว่า 95% ของทั้ง 10,000 โครงสร้าง (ตารางที่ 1)



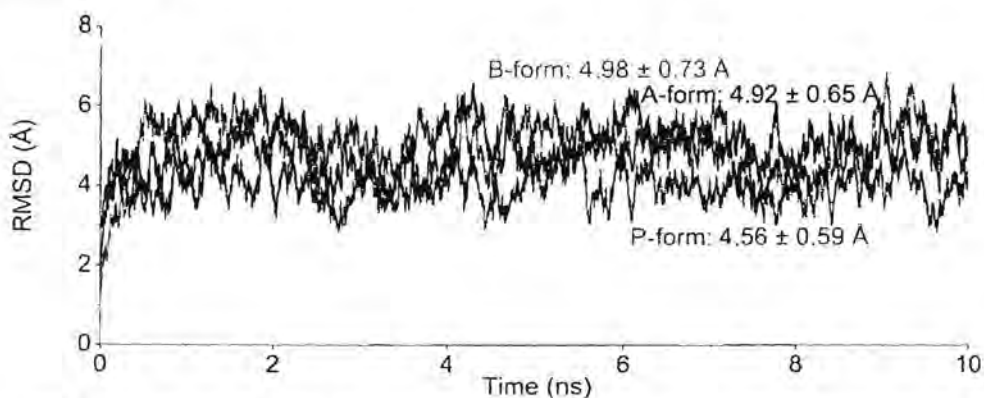
รูปที่ 13 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ parallel *acpcPNA* ของระบบ PNA1-PNA2



รูปที่ 14 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของโมเลกุลสายคู่ parallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA2

1.4 Parallel PNA-PNA: *epi-acpcPNA*

ในกรณีของ parallel PNA-PNA ของ *epi-acpcPNA* จากผลของ RMSD พบว่า โครงสร้างที่ได้จากการจำลองทั้ง 3 รูปแบบ มีความแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 15) จากการพิจารณาโครงสร้างที่ได้จากการจำลองทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าคู่เบสสามารถเข้าคู่กันได้อย่างดี (รูปที่ 16) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของโครงสร้างพีเอ็นเอทั้ง 3 รูปแบบ แต่เมื่อวิเคราะห์ base-pair parameter และ base-step parameter (ตารางที่ 2) พบว่า โครงสร้างเริ่มต้นแบบ A-form และ B-form ให้ลักษณะการวางตัวของคู่เบสที่ใกล้เคียงกันคือคล้าย B-form แต่มีค่า twist ค่อนข้างต่ำ ขณะที่การจำลองแบบด้วยโครงสร้างเริ่มต้นแบบ P-form ให้ผลต่างออกไป ไม่แสดงลักษณะของการเกิดเป็นเกลียวคู่ สังเกตได้จาก twist มีค่าเป็นบวก-ลบสลับกันไป (ตารางที่ 3) ดังนั้นสรุปได้ว่า *epi-acpcPNA* สามารถเกิดเป็นโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวแบบ parallel ได้ แต่โครงสร้างที่ได้มีความเสถียรเชิงโครงสร้างค่อนข้างต่ำ



รูปที่ 15 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ parallel *epi-acpcPNA* ของระบบ PNA1-PNA2



A-form

B-form

P-form

รูปที่ 16 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ parallel *epi-acpcPNA* ของระบบ PNA1-PNA2

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของการเกิดพันธะไฮโดรเจนตามการจับคู่เบสแบบ Watson-Crick ของระบบต่างๆ ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำนวน 10,000 โครงสร้าง

Base- pair	Concerned atoms	% Occupied					
		Antiparallel				Parallel	
		acpcPNA		epi-acpcPNA		acpcPNA	epi-acpcPNA
		P-form (PNA1- PNA1)	P-form (PNA2- PNA2)	B-form (PNA1- PNA1)	B-form (PNA2- PNA2)	P-form (PNA1- PNA2)	B-form (PNA1- PNA2)
1	O(G)···H-N(C)	97.1	99.4	97.2	98.7	99.2	99.0
	N-H(G)···N(C)	99.7	100	99.9	100.0	99.9	100.0
	N-H(G)···O(C)	99.6	-	99.9	100.0	99.6	99.9
2	N-H(C)···O(G)	89.8	99.5	99.7	99.7	99.9	99.7
	N(C)···H-N(G)	93.5	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	O(C)···H-N(G)	98.5	100	99.5	100.0	100.0	100.0
3	O(G)···H-N(C)	46.4	99.9	99.1	96.9	99.6	99.6
	N-H(G)···N(C)	54.3	100	100.0	99.9	99.8	100.0
	N-H(G)···O(C)	95.4	100	100.0	100.0	99.9	100.0
4	N-H(A)···O(T)	97.2	96.7	97.7	99.2	99.0	99.4
	N(A)···H-N(T)	99.3	100	93.8	99.7	100.0	99.9
5	N-H(A)···O(T)	98.8	99.4	99.9	98.2	99.2	98.4
	N(A)···H-N(T)	99.9	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0
6	O(T)···H-N(A)	99.5	97.8	100.0	96.5	99.7	97.4
	N-H(T)···N(A)	100.0	99.9	99.8	99.9	99.7	100.0
7	O(T)···H-N(A)	99.9	97.6	99.3	96.4	99.8	97.5
	N-H(T)···N(A)	98.3	100	99.1	100.0	99.9	99.9
8	N-H(C)···O(G)	99.7	99.9	99.0	99.8	99.9	99.1
	N(C)···H-N(G)	100.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	O(C)···H-N(G)	100.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
9	O(G)···H-N(C)	12.2	99.9	99.7	99.7	99.9	99.9
	N-H(G)···N(C)	28.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	N-H(G)···O(C)	19.4	99.9	99.8	100.0	100.0	99.9
10	N-H(C)···O(G)	8.5	1.9	98.7	99.6	99.8	95.3
	N(C)···H-N(G)	8.0	2.5	99.7	100.0	100.0	97.9
	O(C)···H-N(G)	8.0	-	99.8	99.9	99.9	98.8

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ base-step parameter ของระบบต่างๆ ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำนวน 10,000 โคจรสร้าง (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในวงเล็บ)

Parameters	Antiparallel <i>epi</i> -acpcPNA				Parallel acpcPNA P-form	Parallel <i>epi</i> -acpcPNA			aegPNA	aegPNA (X-ray)
	PNA1-PNA1		PNA2-PNA2			PNA1-PNA2				
	A-form	B-form	A-form	B-form		A-form	B-form	P-form		
Shear (Å)	0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.4)	0.1(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0
Stretch (Å)	-0.1(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	-0.1(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	-0.1(0.1)	-0.1
Stagger (Å)	0.1(0.4)	-0.2(0.4)	0.2(0.4)	-0.1(0.4)	-0.1(0.4)	-0.1(0.4)	0.0(0.4)	-0.1(0.4)	-0.1(0.4)	0.1
Buckle (°)	-1.4(9.1)	-7.1(9.2)	0.0(9.0)	-0.3(9.6)	3.4(9.5)	8.0(10.6)	1.3(9.4)	5.6(11.1)	-0.3(9.4)	0.0
Prop-Tw (°)	-2.6(8.5)	-10.8(7.1)	-0.9(8.0)	-10.5(7.4)	-5.7(8.0)	-2.6(10.6)	-9.3(7.6)	-4.8(9.9)	-10.4(7.6)	-7.2
Opening (°)	-1.3(3.6)	1.9(4.6)	-2.3(3.7)	-0.7(4.4)	-0.2(3.8)	-0.4(4.1)	0.8(4.2)	1.3(5.0)	0.2(4.1)	-1.8
Shift (Å)	0(0.4)	0.1(0.4)	0.0(0.4)	0.0(0.5)	0.2(0.5)	-0.4(0.5)	-0.5(0.4)	0.3(0.7)	0.0(0.4)	0.0
Slide (Å)	0.3(0.5)	-0.1(0.6)	0.3(0.5)	0.0(0.9)	-2.2(0.5)	-1.1(0.7)	-1.7(0.5)	-3.4(0.6)	-2.2(0.4)	-2.5
Rise (Å)	3.4(0.3)	3.3(0.3)	3.4(0.3)	3.2(0.3)	3.4(0.4)	3.5(0.4)	3.4(0.3)	3.4(0.4)	3.4(0.4)	3.3
Tilt (°)	-0.4(4.3)	0.6(4.4)	0.0(4.1)	0.3(4.5)	-2.3(5.2)	-3.1(5.4)	-2.4(4.9)	-2.9(5.8)	0.2(4.6)	-0.3
Roll (°)	0.7(5.7)	5.2(5.0)	-1.1(5.2)	2.9(5.3)	7.3(5.5)	0.9(6.5)	8.0(5.3)	9.3(6.7)	6.1(5.0)	3.0
Twist (°)	33.8(3.3)	33.3(3.8)	33.9(3.3)	34.7(4.1)	21.4(4.1)	25.9(5.8)	25.6(4.6)	7.2(6.7)	21.4(4.1)	19.7

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ step parameter ของ P2 ที่มีการเรียงตัวแบบ parallel (PNA1-PNA2) ของโมเลกุลสายคู่แบบ P-form ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำนวน 10,000 โครงสร้าง

Base-pair	Shear(Å)	Stretch(Å)	Stagger(Å)	Buckle(°)	Prop-Tw(°)	Opening(°)	Shift Å	Slide Å	Rise Å	Tilt(°)	Roll(°)	Twist(°)
2	0.41	-0.11	-0.12	-5.07	-7.56	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	-0.40	-0.14	0.09	8.65	-8.06	-1.41	0.75	-4.15	3.24	-2.47	12.53	-14.55
4	0.20	0.05	-0.04	-7.60	-3.34	4.70	-0.50	-2.54	3.54	-2.90	9.42	36.49
5	0.08	0.01	-0.02	9.16	-8.03	-0.50	0.80	-4.20	3.25	-0.97	10.39	-12.56
6	-0.09	0.01	-0.64	5.77	-12.30	7.87	-0.49	-2.51	3.50	2.40	4.89	29.19
7	-0.08	0.01	-0.29	9.77	-8.19	-0.43	1.24	-3.84	3.67	-0.93	10.65	-4.28
8	0.41	-0.11	-0.16	-2.78	-5.47	0.70	-0.74	-2.11	3.60	-2.96	14.19	34.71
9	-0.49	-0.06	0.19	27.13	14.32	-1.56	1.07	-4.26	2.85	-12.24	2.72	-18.94

จากผลการศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้างโดยวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล ทำให้ทราบลักษณะโครงสร้างที่เป็นไปได้ในการเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ของ PNA แต่ละชนิด โดย acpcPNA สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ในทิศทางแบบ parallel ในขณะที่ *epi-acpcPNA* เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ได้ในทิศทางทั้งแบบ antiparallel และแบบ parallel โดยที่แบบ parallel ให้โครงสร้างที่ไม่ค่อยเสถียรมากนัก ผลการศึกษาสรุปได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบของ PNA ชนิดต่างๆ

เมื่อ ✓ หมายถึง สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้

✗ หมายถึง ไม่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้

PNA	Strand 1	Strand 2	Direction	Duplex	Form
acpcPNA	PNA1	PNA1	antiparallel	✗	-
	PNA2	PNA2	antiparallel	✗	-
	PNA1	PNA2	parallel	✓	P-form
<i>epi-acpcPNA</i>	PNA1	PNA1	antiparallel	✓	B-form
	PNA2	PNA2	antiparallel	✓	B-form
	PNA1	PNA2	parallel	✓	P-form

(ความเสถียรต่ำ)

ตารางที่ 5 พลังงานการยึดจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล จากการคำนวณด้วยวิธี B3LYP/6-31G** เปรียบเทียบกับค่า T_m (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แสดงในวงเล็บ)

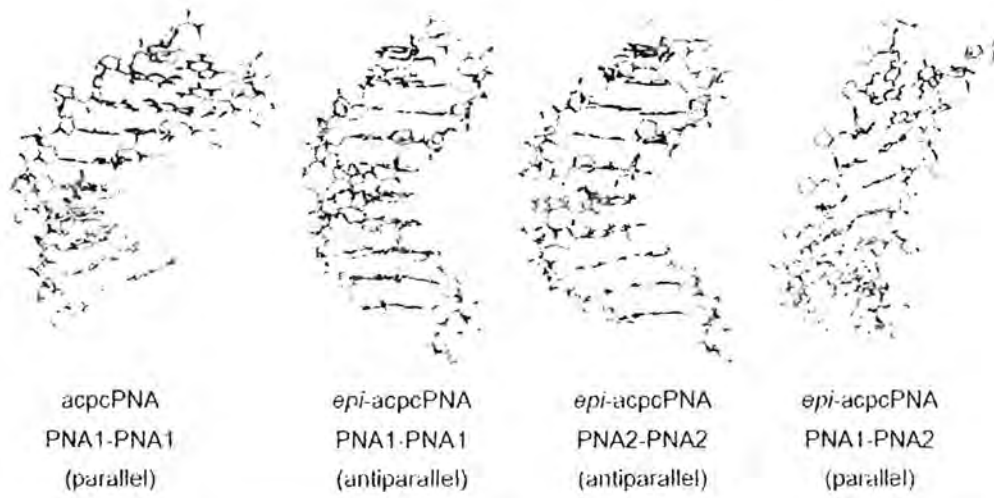
PNA	Strand 1	Strand 2	Direction	$\Delta E_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	T_m (°C)
acpcPNA	PNA1	PNA1	antiparallel	-173.2(12.2)	<20 ^a
	PNA2	PNA2	antiparallel	-173.7(9.4)	<20 ^a
	PNA1	PNA2	parallel	-199.4(8.5)	30.8
<i>epi-acpcPNA</i>	PNA1	PNA1	antiparallel	-194.4(8.4)	31.9 ^a
	PNA2	PNA2	antiparallel	-191.4(7.9)	38.7 ^a
	PNA1	PNA2	parallel	-180.4(8.5)	35.4

^a Mansawat et al, 2012.

เมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล โดยเลือกระบบที่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้มาคำนวณพลังงานการยึดจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ด้วยวิธีกลศาสตร์ควอนตัมด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G** โดยใช้โปรแกรม GAUSSIAN09 โดย $\Delta E_{\text{binding}} = E_{\text{duplex}} - (E_{\text{strand1}} + E_{\text{strand2}})$ ทั้งนี้ระบบที่ศึกษาอยู่ในวัฏภาคแก๊ส เมื่อ E_{duplex} คือพลังงานของโมเลกุลสายคู่ E_{strand1} และ E_{strand2} คือพลังงานของสายเดี่ยวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 5

จากผลการคำนวณจะเห็นว่า สำหรับโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ที่มีแกนหลักเป็นชนิด acpcPNA ที่มีลำดับเบสทั้งแบบ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 และเข้าคู่แบบ antiparallel ให้ค่าพลังงานที่มีความเป็นลบน้อยกว่าระบบอื่นๆ แสดงว่าโมเลกุลสายคู่ของ antiparallel acpcPNA มีความเสถียรต่ำ และเมื่อพิจารณาโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบจะเห็นว่าไม่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่า T_m ($< 20^{\circ}\text{C}$) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การเข้าคู่แบบ parallel จะให้ค่าพลังงานการยึดจับประมาณ -199 kcal/mol ซึ่งค่อนข้างสูงและโครงสร้างโมเลกุลสายคู่มีความเสถียรเมื่อเทียบกับแบบ antiparallel ส่วนการเกิดโมเลกุลสายคู่ของ *epi-acpcPNA* นั้นพบว่าสามารถเกิดได้ทั้งในทิศทางแบบ parallel และ antiparallel อย่างไรก็ตามค่าพลังงานยึดจับที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่าทิศทางแบบ parallel มีความเสถียรน้อยกว่าทิศทางแบบ antiparallel อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าการเข้าคู่กันของ parallel *epi-acpcPNA* ให้โครงสร้างโมเลกุลที่ไม่ค่อยยัดแน่นซึ่งสอดคล้องกับค่าพลังงานยึดจับที่ไม่สูงมากนัก โดยโครงสร้างเฉลี่ยของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองแบบแสดงในรูปที่ 17 ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสมบัติทางสเตอริโอเคมีและทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่ส่งผลต่อลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA โดยพบว่าทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ antiparallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่ลึกและแกนหลักทั้งสองสายหันเข้าด้านในโมเลกุลสายคู่ ในขณะที่ทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ parallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่แบนออกนอกโมเลกุลสายคู่ ดังแสดงในรูปที่ 18 อย่างไรก็ตามผู้วิจัยเชื่อว่าในระบบที่ประกอบไปด้วยสายของ *epi-acpcPNA1* และ *epi-acpcPNA2* นั้นน่าจะเกิดเป็น PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 ในทิศทางแบบ antiparallel มากกว่าที่จะเกิดเป็น PNA1-PNA2 (parallel) ซึ่งถ้าเป็นเช่นนั้นค่า T_m ที่วัดได้ในตารางที่ 5 (35.4°C) จะเป็นค่าเฉลี่ยของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2

สาเหตุที่ acpcPNA ไม่สามารถเข้าคู่กันเกิดเป็น PNA-PNA ในทิศทาง antiparallel ได้ ในขณะที่ *epi-acpcPNA* เกิดได้อาจเนื่องมาจากหากพิจารณาโครงสร้างเริ่มต้น (รูปที่ 19) โดยให้เบสเข้าคู่กันได้ดีที่สุดจะทำให้แกนหลักคู่เข้าหากันและอยู่ใกล้กันมาก (ห่างกันประมาณ 3.5 \AA) ทั้งนี้เป็นผลมาจากลักษณะทางสเตอริโอเคมีของเบสที่ต่อกับแกนหลัก ดังนั้นเมื่อทำการจำลองแบบจึงทำให้แกนหลักผลักกันมากส่งผลให้เบสเข้าคู่กันได้ไม่ดีและการวางตัวของแกนหลักไม่เหมาะสม จึงไม่มีความเป็นโมเลกุลสายคู่ทำให้ได้พลังงานยึดจับที่เป็นลบน้อย แต่ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่เกิดกับ PNA ชนิด *epi-acpcPNA* ซึ่งมีสเตอริโอเคมีที่ต่างกันทำให้ *epi-acpcPNA* เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ในทิศทางแบบ antiparallel ได้



รูปที่ 17 โครงสร้างเฉลี่ยที่ได้จากการจำลองแบบของ PNA ที่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้



acpcPNA (antiparallel)
(ไม่เป็น duplex)



acpcPNA (parallel)
(เป็น duplex)

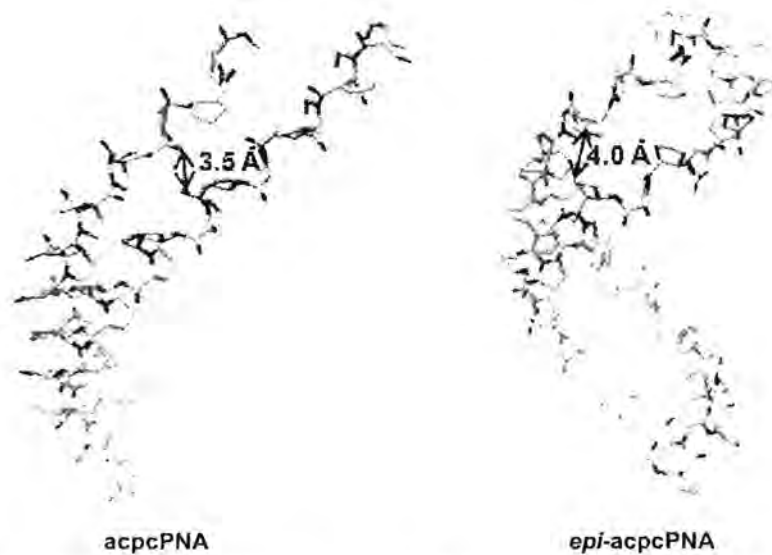


epi-acpcPNA (antiparallel)
(เป็น duplex)



epi-acpcPNA (parallel)
(เป็น duplex ไม่มี)

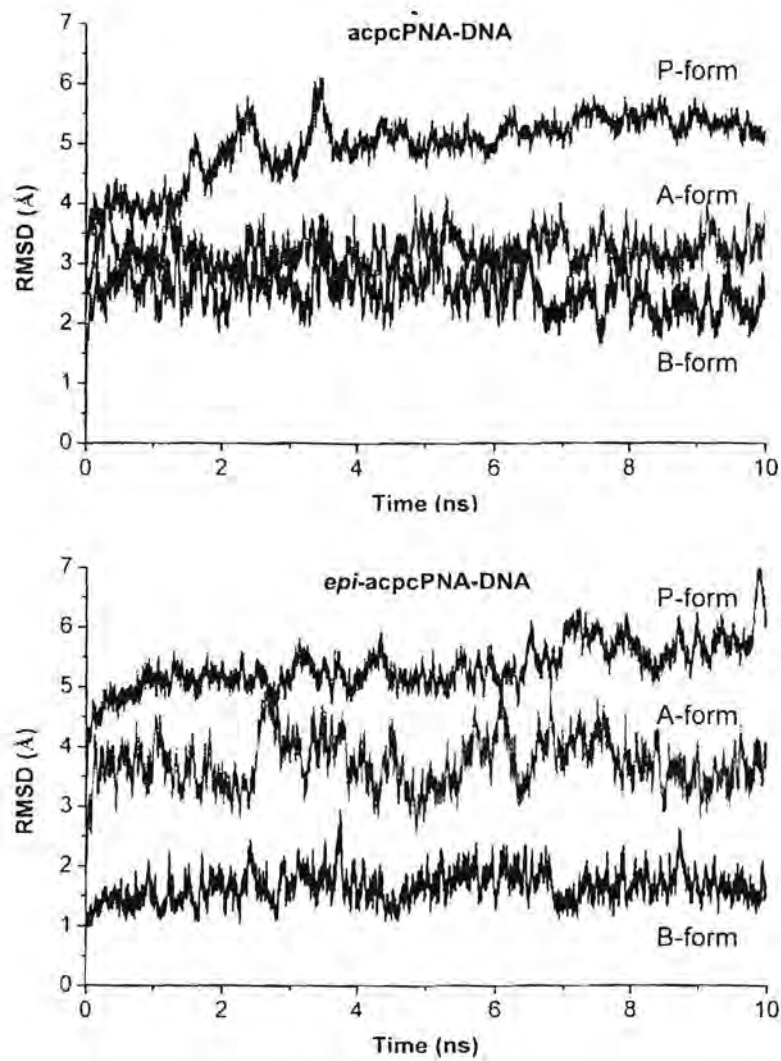
รูปที่ 18 ลักษณะร่องของแกนหลักของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล



รูปที่ 19 ลักษณะร่องของแกนหลักของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

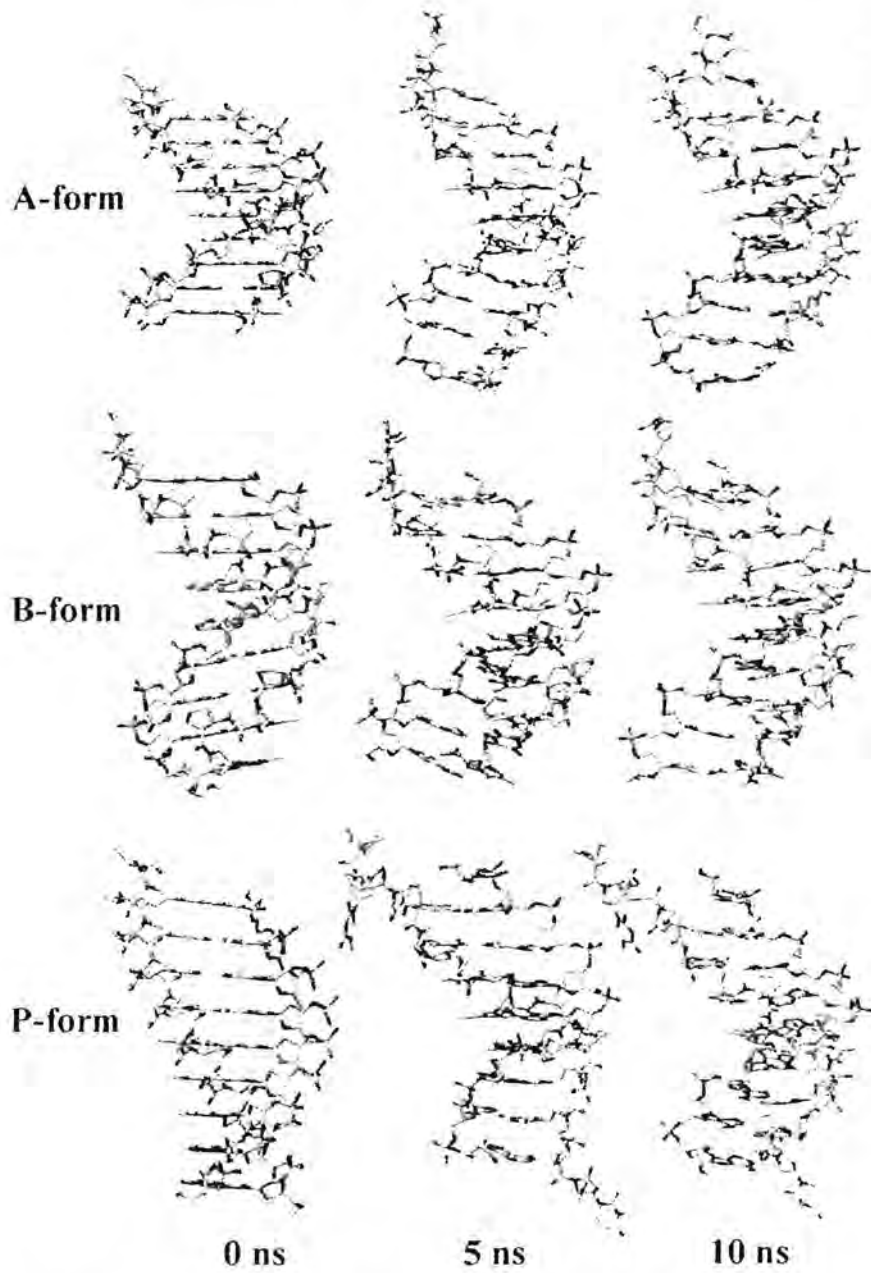
2. โมเลกุลสายคู่ PNA-DNA และ PNA-RNA

เพื่อศึกษาโครงสร้างที่เป็นไปได้ของโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA ได้ทำการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ PNA-DNA เมื่อ PNA เป็น acpcPNA และ epi-acpcPNA โดยระบบเบสที่ทำการศึกษาเป็น N-TTTTTTTT-C สำหรับ PNA จับกับ DNA ที่เป็นเบสคู่สม เป็นเวลา 10 ns โครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทั้งหมดเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นโดยพิจารณาจากค่า RMSD ซึ่งเป็นค่าที่บอกความแตกต่างของโครงสร้างใดๆ กับโครงสร้างอ้างอิง จากรูปที่ 20 จะพบว่าโครงสร้างเริ่มต้นแบบ P-form ของทั้ง acpcPNA-DNA และ epi-acpcPNA -DNA ให้โครงสร้างจากการจำลองแบบแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นค่อนข้างมาก (มีค่า RMSD ประมาณ 5 Å) แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลสายคู่ทั้งสองไม่ใช่แบบ P-form ในทำนองเดียวกันการใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบ A-form ให้โครงสร้างจากการจำลองแบบเบี่ยงเบนจากเดิมไปพอสมควรโดยมีค่า RMSD ประมาณ 3 - 4 Å ในขณะที่โครงสร้างเริ่มต้นแบบ B-form ให้โครงสร้างที่ไม่ต่างจากเดิมมากนัก (ค่า RMSD ประมาณ 2.5 Å และ 1.5 Å สำหรับ acpcPNA-DNA และ epi-acpcPNA-DNA ตามลำดับ) จึงสามารถกล่าวได้ว่า acpcPNA และ epi-acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA จะทำให้เกิดโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA ที่มีโครงสร้างเป็นแบบ B-form

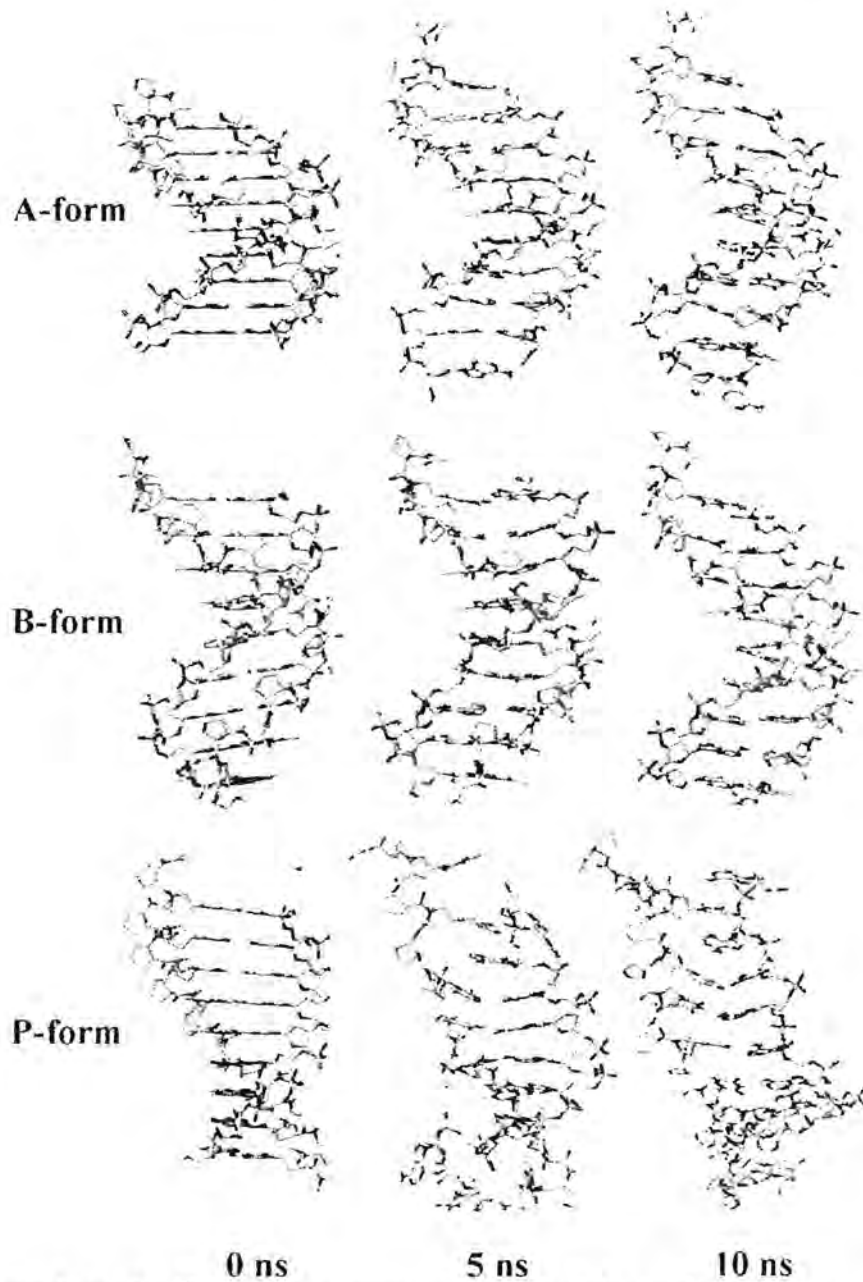


รูปที่ 20 แสดงค่า RMSD ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลตลอดช่วง 10 ns ของ acpcPNA-DNA และ epi-acpcPNA -DNA ที่ใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบต่างๆ

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ที่เปลี่ยนตามเวลาของการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล พบว่าทั้ง acpcPNA-DNA (รูปที่ 21) และ epi-acpcPNA-DNA (รูปที่ 22) เมื่อเวลาผ่านไป โครงสร้างแบบ A-form และแบบ P-form จะเบี่ยงเบนไปจากเดิม โดยแบบ A-form จะให้โครงสร้างที่เบี่ยงเบนเข้าหาโครงสร้างแบบ B-form ในขณะที่แบบ P-form จะพบว่า การเข้าคู่ของเบสคู่สมไม่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบ epi-acpcPNA-DNA ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSD ที่เพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 21 แสดงโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลในช่วงเวลา 0, 5 และ 10 ns ของ acpcPNA-DNA ที่ใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบต่างๆ



รูปที่ 22 แสดงโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลในช่วงเวลา 0, 5 และ 10 ns ของ *epi-acpcPNA-DNA* ที่ใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบต่างๆ

เมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบมาวิเคราะห์ base-step parameter (rise และ twist) ทุกๆ 2ns จะเห็นว่าโครงสร้างแบบ B-form จะมีความเสถียรตลอดช่วงเวลาของการจำลองแบบโดยมีค่า rise ประมาณ 3.3 Å และค่า twist ประมาณ 34° ในขณะที่แบบ A-form และ P-form จะให้ค่า parameter ทั้งสองแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้น (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7. ค่า base-step parameter (rise และ twist) ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบ ทุกๆ 2 ns

System		Rise (Å)/Twist (°)					
		0 ns	2 ns	4 ns	6 ns	8 ns	10 ns
acpcPNA-DNA	A-form	2.5/32.7	3.4/35.9	3.5/35.0	3.3/36.3	3.5/35.5	3.3/34.7
	B-form	3.4/35.8	3.4/34.0	3.3/33.2	3.2/31.4	3.2/33.7	3.2/33.5
	P-form	3.2/20.0	3.2/28.6	3.3/32.6	3.4/31.2	3.3/33.6	3.3/32.8
epi-acpcPNA-DNA	A-form	2.5/32.7	3.2/36.4	3.3/37.3	3.3/39.2	3.2/37.2	3.4/38.5
	B-form	3.4/35.8	3.3/34.6	3.2/36.8	3.2/36.6	3.2/38.9	3.3/35.3
	P-form	3.2/20.0	3.3/24.9	3.2/21.3	3.0/27.6	3.2/24.8	3.5/16.7

นำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทั้ง 10,000 โครงสร้าง (โครงสร้างแบบ B-form) มาคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับ ($\Delta G_{\text{binding}}$) พบว่าโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA มีพลังงานอิสระการยึดจับเป็นลบมากกว่า epi-acpcPNA-DNA แสดงให้เห็นว่า acpcPNA-DNA มีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับค่า T_m ที่ได้จากการทดลอง (Suparpprom et al., 2005) (ดูตารางที่ 8)

ตารางที่ 8. ค่า $\Delta G_{\text{binding}}$ (ในหน่วย kcal/mol) ของโมเลกุลสายคู่

System	$\Delta G_{\text{binding}}$	T_m (°C)
acpcPNA-DNA	-49.9	72.9
epi-acpcPNA-DNA	-28.0	67.8

นอกจากนี้ จากการคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ของคู่เบสเดี่ยว T-A ที่มีแกนหลักแบบต่างๆ โดยวิธีทางเคมีควอนตัม (คำนวณหาโครงสร้างเสถียรโดยวิธี B3LYP/6-31G** และคำนวณพลังงานโดยวิธี BP86/6-31+G**) พบว่าวิธีการคำนวณดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองโดยเปรียบเทียบจากกรณีของคู่เบสเดี่ยว T-A ที่ไม่มีแกนหลักที่ได้ค่าการคำนวณและการทดลองประมาณ -13 kcal/mol (ตารางที่ 9) ในส่วนของโครงสร้างของ 1 คู่เบสที่มีแกนหลักชนิดต่างๆ จากการคำนวณพบว่า แกนหลักไม่ว่าจะเป็นหมู่น้ำตาล-ฟอสเฟต (ของ DNA), aegPNA และ acpcPNA ไม่มีผลต่อระยะห่างและมุมของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่เบส T-A เลย แต่แกนหลักแบบต่างๆ มีผลต่อความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจน โดย acpcPNA-DNA ให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนมากกว่า epi-acpcPNA-DNA ซึ่งสอดคล้องกับความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ทั้งสองแบบที่ได้จากการจำลองแบบ ($\Delta G_{\text{binding}}$) และจากการทดลอง (T_m) ในขณะที่แกนหลักที่เป็น DNA และ aegPNA ให้พลังงานพันธะไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 9. พลังงานพันธะจับ ($\Delta E_{\text{binding}}$ ในหน่วย kcal/mol) คู่เบสเดี่ยว T-A ที่มีแกนหลักแบบต่างๆ

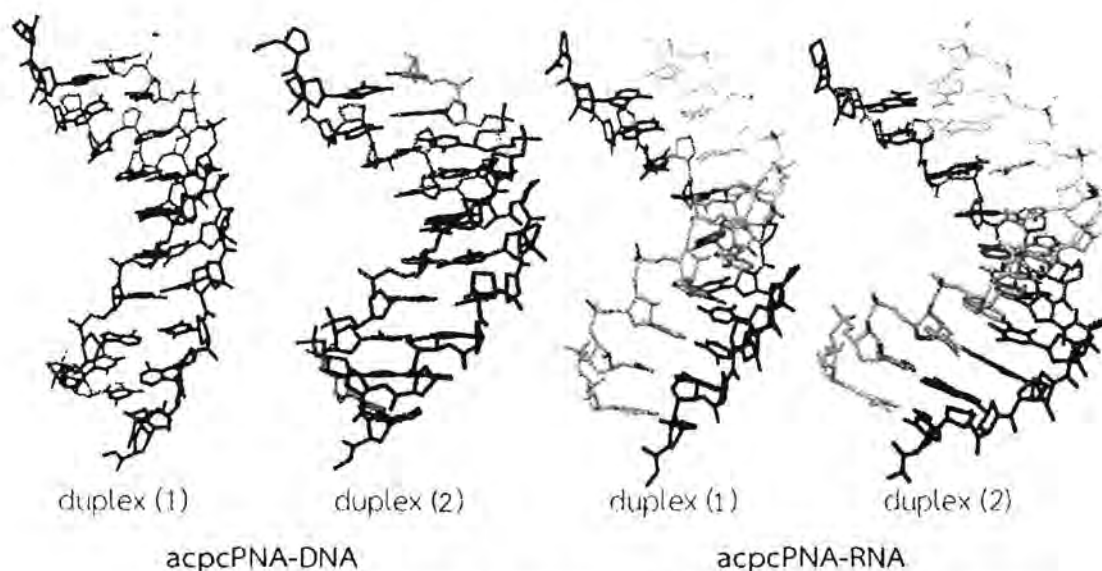
	$\Delta E_{\text{binding}}$	Expt. ^a
isolated T-A base pair	-13.2	-13.0
DNA-DNA	-9.7	
aegPNA-DNA	-9.1	
acpcPNA-DNA	-13.9	
epi-acpcPNA-DNA	-13.6	

^a Saenger, 1988

เนื่องจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า acpcPNA สามารถเข้าคู่ได้ทั้งกับ DNA และ RNA แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าความเสถียรเชิงความร้อนของโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA สูงกว่า PNA-RNA ดังนั้น เพื่อความเข้าใจในโครงสร้างและคุณสมบัติการเข้าคู่ของ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ในระดับโมเลกุล จึงได้ทำการศึกษาสมบัติเชิงทฤษฎีโดยการสร้างแบบจำลองเชิงโมเลกุล ในที่นี้ ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้าง และพิจารณาปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ทั้งสองในระดับโมเลกุล โดยได้จำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ acpcPNA-RNA และ acpcPNA-DNA ที่ประกอบด้วยจำนวนคู่เบส G-C ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ระบบ ดังตารางที่ 10 ในหน้าเป็นเวลา 60 ns โดยโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลแสดงดังรูปที่ 23

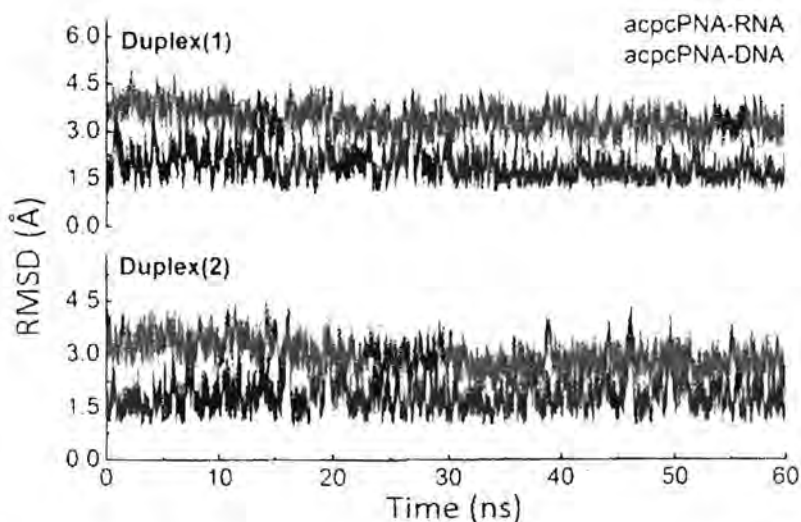
ตารางที่ 10 แสดงระบบของการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ acpcPNA-RNA และ acpcPNA-DNA

ระบบ		PNA sequence	DNA/RNA sequence	%(G+C) content	โครงสร้างเริ่มต้น
acpcPNA-RNA	duplex (1)	N-AGTGATCTAC-C	3'-UCACUAGAUG-5'	40	A-form
	duplex (2)	N-GCGACGTAGC-C	3'-CGCUGCAUCG-5'	70	
acpcPNA-DNA	duplex (1)	N-AGTGATCTAC-C	3'-TCACTAGATG-5'	40	B-form
	duplex (2)	N-GCGACGTAGC-C	3'-CGCTGCATCG-5'	70	



รูปที่ 23 โครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

นำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลมาคำนวณค่า RMSD (รูปที่ 24) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล พบว่าโครงสร้างที่มีความเสถียรตลอดการจำลองแบบ เมื่อคำนวณค่า base-pair parameter และ base-step parameter พบว่า ทั้งระบบ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA มีค่า rise ประมาณ 3.3 Å และค่า slide มีค่าเป็นลบ นอกจากนี้ค่า twist ซึ่งบ่งบอกความเป็นเกลียวของโมเลกุลมีค่าลดลงจากโครงสร้างเริ่มต้น โดย twist ของ acpcPNA-DNA มีค่ามากกว่า acpcPNA-RNA ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างโมเลกุลสายคู่ของทั้งสองระบบมีลักษณะโครงสร้างอยู่ระหว่าง B-form และ P-form



รูปที่ 24 ค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น

จากการศึกษาความสามารถในการเข้าคู่ของ acpcPNA กับ DNA และ RNA พบว่า acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ได้ดีกว่า RNA ยืนยันได้จากค่า $\Delta G_{\text{binding}}$ ซึ่งค่า $\Delta G_{\text{binding}}$ ของ acpcPNA-DNA มีค่าเป็นลบมากกว่า acpcPNA-RNA (ตารางที่ 11) และผลการคำนวณสอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาพลังงานย่อยของแต่ละระบบ พบว่า ΔH_{gas} ของระบบ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA แตกต่างกันเล็กน้อย โดยค่า ΔH_{gas} จะขึ้นอยู่กับจำนวนคู่เบส G-C เป็นหลัก ซึ่งถ้าจำนวนคู่เบส G-C มาก ΔH_{gas} ก็จะมีค่ามากด้วยเช่นกัน ในขณะที่ ΔG_{soliv} ซึ่งบ่งบอกความสามารถในการละลายน้ำของโมเลกุล พบว่า ระบบที่ประกอบด้วย DNA และ RNA มีความสามารถในการละลายน้ำต่างกัน จากการคำนวณพบว่าโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-RNA ละลายน้ำได้มากกว่า acpcPNA-DNA พิจารณาจากค่า ΔG_{soliv} ของ acpcPNA-RNA มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ acpcPNA-DNA ที่มีลำดับเบสเดียวกัน

ตารางที่ 11 แสดงค่า $\Delta G_{\text{binding}}$ และพลังงานย่อยของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบจำนวน 5000 โครงสร้าง

ระบบ		พลังงาน (kcal/mol)				T_m (°C)
		ΔH_{gas}	ΔG_{soliv}	$T\Delta S$	$\Delta G_{\text{binding}}$	
acpcPNA-RNA	duplex (1)	-298.81	202.37	-43.17	-53.27	40.8
	duplex (2)	-348.06	236.55	-40.50	-71.01	49.3
acpcPNA-DNA	duplex (1)	-303.56	184.11	-45.15	-74.30	52.8
	duplex (2)	-347.75	215.25	-46.84	-85.65	60.8

ได้คำนวณอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสาย PNA กับ DNA หรือกับ RNA ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลโดยใช้วิธี density functional theory (DFT) ภายใต้ระเบียบวิธี B3LYP/6-31G** อันตรกิริยาที่คำนวณได้อยู่ในเทอมของพลังงานยึดจับ ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสองสายของโมเลกุลสายคู่ ($\Delta E_{\text{binding}}$) ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี DFT

ระบบ		$\Delta E_{\text{binding}}$ (kcal/mol)
acpcPNA-RNA	duplex (1)	-185.12
	duplex (2)	-222.48
acpcPNA-DNA	duplex (1)	-186.46
	duplex (2)	-229.47

จากตารางที่ 12 จะพบว่าระบบที่มี %(G+C) มากกว่าจะมีความเสถียรมากกว่า (ค่าพลังงานยึดจับเป็นลบมากกว่า) อย่างไรก็ตาม สำหรับโมเลกุลสายคู่ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน จะเห็นว่า acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA มีความเสถียรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ acpcPNA-DNA มีความเสถียรมากกว่า เล็กน้อย ($\Delta E_{\text{binding}}$ มีค่าเป็นลบมากกว่าเล็กน้อย) แต่จากค่า $\Delta G_{\text{binding}}$ และ T_m ในตารางที่ 11 จะเห็นว่า acpcPNA-DNA มีความเสถียรมากกว่า acpcPNA-RNA อย่างชัดเจน แสดงว่าความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ไม่ได้ขึ้นกับอันตรกิริยาระหว่างสาย PNA กับ DNA หรือ PNA กับ RNA เป็นหลัก แต่น่าจะขึ้นกับปัจจัยอื่น เมื่อศึกษาอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำของ acpcPNA-DNA เปรียบเทียบกับ acpcPNA-RNA โดยเปรียบเทียบจำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ที่ระยะห่าง 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 Å (ตารางที่ 13) และพิจารณาโอกาสที่จะพบโมเลกุลของน้ำแทรกอยู่ในบริเวณ minor groove (ช่องว่างระหว่างแกนหลัก) ของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ของ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ที่ระยะห่างต่าง ๆ (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในวงเล็บ)

ระบบ		จำนวนโมเลกุลของน้ำเฉลี่ยที่ระยะห่างต่าง ๆ			
		2.0 Å	2.5 Å	3.0 Å	3.5 Å
acpcPNA-RNA	duplex (1)	100.2 (5.7)	194.6 (7.3)	292.4 (8.9)	367.6 (9.2)
	duplex (2)	101.9 (5.8)	197.8 (7.5)	296.0 (8.3)	371.9 (9.7)
acpcPNA-DNA	duplex (1)	93.1 (5.2)	175.2 (7.0)	263.1 (8.9)	332.5 (9.2)
	duplex (2)	93.5 (5.4)	175.8 (7.0)	262.3 (8.3)	325.8 (9.6)

จากการพิจารณาจำนวนของน้ำที่เข้าล้อมรอบโครงสร้างโมเลกุลสายคู่พบว่าที่ระยะ first solvation shell (ประมาณ 3.5 Å) จะพบจำนวนโมเลกุลน้ำล้อมรอบ acpcPNA-RNA มากกว่า acpcPNA-DNA อย่างชัดเจน ทำให้เมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย acpcPNA-RNA จะมีความเสถียรน้อยกว่า acpcPNA-DNA เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA พบว่า ขนาด minor groove ของ acpcPNA-RNA (9.06 ± 0.51 Å) กว้างกว่า acpcPNA-DNA (5.25 ± 1.03 Å) (ความกว้างของ minor groove ที่แตกต่างกันนี้เป็นผลจากลักษณะของ sugar pucker ที่แตกต่างกันของ DNA (C2' endo) และ RNA (C3' endo) ความแตกต่างกันของ sugar pucker ส่งผลให้โครงสร้างของ DNA และ RNA เมื่อเข้าคู่กับ acpcPNA แตกต่างกันไปด้วย) ความกว้างของ minor groove ของ acpcPNA-RNA ที่กว้างกว่าทำให้น้ำมีโอกาสเข้าไปอยู่ใน minor groove ได้มากกว่า จากโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพบว่า acpcPNA-RNA จะมีน้ำจะเข้าไปอยู่ใน minor groove ได้มากกว่า acpcPNA-DNA ประมาณ 10% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของ acpcPNA-RNA คือความสามารถในการละลายน้ำของ acpcPNA-RNA ที่มีโครงสร้างที่เอื้อต่อการให้น้ำเข้าล้อมรอบได้มากกว่า acpcPNA-DNA กล่าวคือการทำมีโมเลกุลน้ำ

มาล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ได้มากกว่าจะทำให้แต่ละสายเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดี ซึ่งส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างสายทั้งสองลดลงทำให้ความเสถียรลดลง

จากการศึกษาโครงสร้างและพลังงานของโมเลกุล acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ที่ประกอบด้วยหนึ่งคู่เบส (single base pair) โดยการคำนวณด้วยกลศาสตร์ควอนตัมในบรรยากาศที่มีน้ำ (solvated phase) และไม่มีน้ำ (gas phase) ซึ่งโครงสร้างเสถียร (optimized structure) ที่เหมาะสมของ 1 คู่เบส ที่มีแกนหลักแตกต่างกันหาได้จากการคำนวณด้วยวิธี DFT ภายใต้ระเบียบวิธี B3LYP/6-31G* และคำนวณพลังงานด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31+G** ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 14 พบว่าคู่เบส G-C ให้ค่าพลังงานเป็นลบมากกว่า แสดงว่าโครงสร้างสามารถยึดจับกันได้ดีสอดคล้องกับจำนวนพันธะไฮโดรเจนของ G-C ที่มีมากกว่า A-T โครงสร้างของโมเลกุลเมื่อคำนวณในสภาวะของ solvated phase จะมีพลังงานสูงกว่า หมายความว่า น้ำมีส่วนในการทำให้โครงสร้างมีความเสถียรลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความแตกต่างของแกนหลักพบว่า ไม่ว่าแกนหลักจะเป็น DNA หรือ RNA พลังงานที่ได้จากการคำนวณ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 14 อันตรกิริยาระหว่าง 1 คู่เบสที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีกลศาสตร์ควอนตัม

ระบบ	อันตรกิริยาระหว่าง 1 คู่เบส (kcal/mol)			
	XNA = DNA		XNA = RNA	
	Gas phase	Solvated phase	Gas phase	Solvated phase
acpcPNA(A)-XNA(T/U)	-13.93	-8.25	-14.26	-8.48
acpcPNA(T)-XNA(A)	-14.46	-8.40	-14.11	-8.48
acpcPNA(C)-XNA(G)	-27.48	-14.25	-26.90	-14.24
acpcPNA(G)-XNA(C)	-30.96	-14.82	-31.30	-14.44

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ที่มี %(G+C) แตกต่างกันพบว่าโครงสร้างของโมเลกุลมี form ผสมระหว่าง B-form และ P-form และ acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ได้ดีกว่า RNA ซึ่งความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่คำนวณได้ ($\Delta G_{\text{binding}}$) สอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยปัจจัยหลักที่มีผลให้ความเสถียร acpcPNA-RNA น้อยกว่า acpcPNA-DNA คือความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำ เมื่อพิจารณาจำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ที่ระยะ first solvation shell พบว่า จำนวนของน้ำที่ล้อมรอบ acpcPNA-RNA มีมากกว่า acpcPNA-DNA เนื่องจากโครงสร้างของ acpcPNA-RNA มีขนาดของ minor groove กว้างกว่า acpcPNA-DNA ส่งผลให้ออกาสที่น้ำจะเข้าไปอยู่ในบริเวณของ minor groove ของโมเลกุลมีมากกว่า acpcPNA-DNA นอกจากนี้ยังพบว่าอันตรกิริยาระหว่าง acpcPNA กับ DNA หรือ acpcPNA กับ RNA ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการดำเนินงาน

จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA พบว่า acpcPNA สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ในทิศทางแบบ parallel ในขณะที่ epi-acpcPNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ได้ในทิศทางแบบ antiparallel และแบบ parallel โดยที่แบบ parallel ให้โครงสร้างที่ไม่ค่อยเสถียรมากนัก

สำหรับการศึกษาความสามารถในการเข้าสู่ของ PNA-DNA และ PNA-RNA พบว่าทั้ง acpcPNA และ epi-acpcPNA สามารถเข้าสู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA ในทิศทาง antiparallel ได้ดีกว่าเข้าสู่กับตัวมันเองและได้ดีกว่า RNA ซึ่งความเสถียรทางเทอร์มอดินามิกส์ที่คำนวณได้ ($\Delta G_{\text{binding}}$) สอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยปัจจัยหลักที่มีผลให้ความเสถียร PNA-RNA น้อยกว่า PNA-DNA คืออันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของน้ำกับโมเลกุลสายคู่

References

- Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, A.; Aitken, A. J.; Vilaivan, T. *Organic Letters* **2012**, *14*, 1440–1443.
- Rasmussen, H.; Kastrup, J. S.; Nielsen, J. N.; Nielsen, J. M.; Nielsen, P. E. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 98–101.
- Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2833–2837.
- Saenger, W. *Principles of Nucleic acid Structure*. New York: Springer; 1988.
- Sen, A.; Nielsen, P. E. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1329–1337.