การตรวจดีเอ็นเออย่างเร็วจากการเปลี่ยนสีบนพื้นฐานการทำนิวคลิอิคแอซิดไฮบริไดซ์เซชันในคอลลอยด์ผลึกเงินนาโนสีฟ้า

Rapid Colorimetric DNA Detection Based on Nucleic Acid Hybridization in Colloid Blue Silver Nanoplates

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

Piyasak Chaumpluk

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Corresponding author: piyasakcha@yahoo.com

บทคัดย่อ

เทคนิคใหม่ในการตรวจสอบโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายบนพื้นฐานการจับตัวของดีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอคู่สมเป้าหมายด้วยหลักการนิวคลิอิคแอซิดไฮบริไดซ์เซชัน ในคอลลอยด์ผลึกนาโนเงินสีฟ้าที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง พลาสมอนของอนุภาคได้รับการพัฒนาขึ้น โดยในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอหรือมีดีเอ็นเอที่ไม่ใช้เป้าหมาย โอลิโกนิวคลิโอไทด์โพรบจะไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ส่งผลให้ด้านที่ไม่มีประจุของโพรบจับตัวกับผิวของผลึกนาโนเงิน การกระตุ้นโดยการใส่เกลือในระบบ จะทำให้ผลึกนาโนเงินจับตัวตกตะกอนเปลี่ยนสีจากสีฟ้าไปเป็นใสไม่มีสี ในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายโพรบจะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดเป็นโครงสร้างสายคู่ซึ่งปกป้องการตกตะกอนของผลึกนาโนเงินทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสี การจับตัวของโพลบดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างจำเพาะภายใน 10-15 นาที และสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่า

ABSTRACT

Novel technique for target DNA detection, based on the hybridization between DNA probe and target complementary DNA via nucleic acid hybridization in colloid of blue silver nanoplates was developed to induce plasmonic changes of the nanoplates. When the test was absence of the target DNA or having non target DNA, oligonucleotide probe did not react with DNA allowing hydrophobic portions of probe to bind to surface of silver nanoplates. Induction via adding salt in the test system made those nanoplates aggregated and had plasmonic change of color from blue to clear color. In contrast, when there was target DNAs in the system, oligonucleotide probe did react with target DNA and formed double stranded conformation protecting nanoplates from aggregation. This result is no colorimetric change. The binding of probe to target was specific and happened in 10 to 15 min which visible with naked eye.

คำสำคัญ: คัลเลอริเมทริกดีเท็คชัน, ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น, ผลึกนาโนเงิน, พลาสมอน

Keywords: colorimetric detection, DNA hybridization, silver nanoplates, plasmon

บทนำ

การตรวจสอบดีเอ็นเอเป็นกระบวนการสำคัญในการตรวจวินิจฉัยดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งสามารถดำเนินการได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ การใช้สมบัติคู่สมในรูปแบบไพรเมอร์ ที่จับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะ และการใช้สมบัติคู่สมในรูปแบบโพรบบนหลักการนิวคลิอิกแอซิคไฮบริไดเซชั่น (nucleic acid hybridization)

รูปแบบแรกพบได้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูกโซ่พอลิเมอร์เรส หรือพีซีอาร์ (PCR) อย่างไรก็ดีแม้พีซีอาร์จะมีความแม่นยำและได้รับความนิยม แต่ทางเทคนิคการใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ จะทำให้มีโอกาสผิดพลาดได้ ดังนั้นการตรวจสอบโดยการทำนิวคลิอิคแอซิดไฮบริไดเซชั่นจึงมีความสำคัญ Southern ได้พัฒนาการตรวจสอบนี้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1975 จนแพร่หลายในนาม Southern hybridization (Southern, 1975) เทคนิคนี้อาศัยการดำเนินการโดยการแยกสายดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าและถ่ายดีเอ็นเอลงบนเมมเบรนสังเคราะห์ ก่อนที่จะใช้โพรบที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์คู่สมที่ได้ติดฉลากไว้ก่อนแล้วมาตรวจจับดีเอ็นเอเป้าหมายและแสดงสัญญาณ อย่างไรก็ดีการดำเนินการดังกล่าวมีความซับซ้อน ต้องใช้เวลาในการดำเนินการ ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการและใช้ความชำนาญทางเทคนิค

Mirkin et al., (1996) สร้างทางเลือกใหม่ โดยใช้คุณสมบัติพลาสมอนของอนุภาคนาโนโลหะบางชนิด การนำบริเวณ 5’ ของโพรบไปเชื่อมโยงกับหมู่ไธออล (thiol) กระตุ้นให้จับตัวกับผิวอนุภาคนาโนทองคำ อย่างไรก็ดี การเชื่อมโยงหมู่ thiol มีความยุ่งยาก Li and Rothberg (2004) จึงได้เสนอแนวทางที่ไม่ต้องจัดการใดๆ กับอนุภาคด้วยหมู่ทางเคมี แนวทางหลังนี้อาศัยคุณสมบัติทางอิเลคโตรสแตติก(electrostatic) ที่ต่างกันระหว่าง ดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่

แม้หลักการของ Li and Rothberg จะสะดวก แต่การทดสอบดีเอ็นเอกลับไม่อยู่บนหลักการคู่สม ทำให้ดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะปรากฏสัญญาณด้วย ผู้วิจัยได้เลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าวด้วยการเชื่อมโยงการใช้โพรบโดยใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์และการใช้สารละลายผลึกเงินนาโนสีฟ้าแทนการใช้อนุภาคทองคำ และได้ตรวจดีเอ็นเอด้วยหลักการนิวคลิอิคไฮบริไดเซชั่นระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเออื่นเพื่อให้ได้เทคนิคที่สามารถสังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอนุภาคได้ด้วยตาเปล่า

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **อนุภาคผลึกนาโนเงินสีฟ้า**

ผลึกนาโนเงิน(AgNPl)สีฟ้า สังเคราะห์ขึ้นตามรายงานของ (Pukdeenard *et al*., 2012)

2. **ดีเอ็นเอ และโอลิโกนิวคลิโอไทด์โพรบ**

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจแบ่งออกเป็น 2 ส่วนได้แก่

2.1 ดีเอ็นเอเป้าหมายได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวโดยใช้ไพรเมอร์ในคำขอสิทธิบัตรหมายเลข 0901002255 (ปิยะศักดิ์, 2552) และ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามที่รายงาน(Notomi *et al*., 2000)โดยบ่มปฏิกิริยาในอุณหภูมิ 63 °C 40 นาที ตรวจสอบโดยการนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาแยกด้วยสนามไฟฟ้า สำหรับการตรวจสอบต่อใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร

2.2 โพรบ ได้จากการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลิโอไทด์ที่เป็นคู่สมของยีน *Haemagglutinin* ของไวรัส Human Influenza A สายพันธุ์ H1N1 และการทำให้บริสุทธิ์ด้วย OPC column โดยมีลำดับนิวคลิโอไทด์ตามที่ระบุไว้ในสิทธิบัตรข้างต้น

3. **ดีเอ็นเอควบคุมบวก**

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *Haemagglutinin* ของไวรัส Human Influenza A สายพันธุ์ H1N1 ดีเอ็นเอควบคุมลบ ได้จากการเพิ่มปริมาณของยีน *Neuraminidase* ของไวรัสเดียวกัน

4. **การทำไฮบริไดเซชั่น**

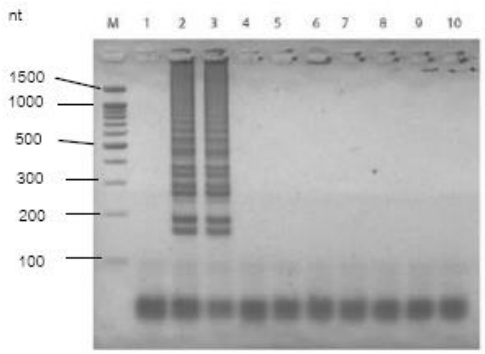
ดำเนินการภายใต้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1x phosphate buffer saline, pH 7.6 ใช้โพรบ 10 พิโคโมลต่อปฏิกิริยาและดีเอ็นเอจากข้อ 2.1 โดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 °Cและค่อยๆลดลง โดยใส่ผลึกนาโนเงินสีฟ้า 1000 ppm 15 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันเบาๆ และวัดสีของอนุภาคและค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 300-800 นาโนเมตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบครั้งนี้อยู่บนพื้นฐานการตรวจตัวยีน การตรวจอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารพันธุกรรมเป้าหมายกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นคู่สมหรือโพรบ ดีเอ็นเอเป้าหมายมักมีอยู่ไม่มากจึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อน วิธีการเพิ่มปริมาณที่นิยมได้แก่ วิธี PCR อย่างไรก็ดีวิธีนี้ต้องพึ่งพาเครื่อง thermocycler และต้องอาศัยประสบการทางเทคนิค การทดลองนี้จึงเลี่ยงมาใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิเดี่ยวแทน อาศัยข้อได้เปรียบของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายถึง 6 บริเวณทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะในเวลาอันสั้นซึ่งเป็นข้อดีเหนือการใช้ PCR (Notomi *et al.*, 2000) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะกับยีน heamagglutinin เป้าหมาย ได้แถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะและ ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 1) การเพิ่มปริมาณนี้จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้น ไม่พบการเพิ่มปริมาณในตัวอย่างอื่น

สำหรับการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ แม้จะสามารถนำหมู่ทางเคมีหรือโปรตีนมาเชื่อมโยงกับดีเอ็นเอ ก่อนไปทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนของโลหะที่เรียกว่า functionalize (Mirkin *et al.*, 1996) แต่ก็ยุ่งยาก จึงไม่เหมาะในการนำมาใช้ในภาคปฏิบัติ

โดยปกติสายดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวและสายคู่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าในรูป electrostatic ต่างกัน ดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีประจุที่หมู่ฟอสเฟต ในกรณีที่อนุภาคได้รับการป้องกันการจับตัวด้วยหมู่ซิเตรท อนุภาคมีประจุบวกทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับอยู่ที่ผิวป้องกันไม่ให้อนุภาคตกตะกอน ในดีเอ็นเอสายคู่การจับตัวกันเองภายในสาย มีทั้งแรงผลักและแรงดูดไม่เอื้อต่อการจับกับอนุภาคทำให้อนุภาคตกตะกอนได้ง่าย อย่างไรก็ดีในภาวะที่อนุภาคนาโนของโลหะได้รับการปกป้องไม่ให้ตก ตะกอนโดยโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรท อนุภาคแสดงความเป็นกลาง การจับตัวของโพรบจึงเกิดจาก การที่โพรบหันส่วนที่เป็น hydrophobic เข้าสู่พื้นผิวอนุภาค



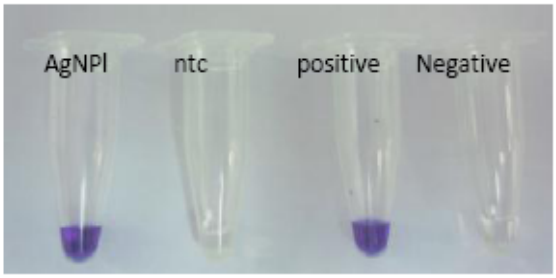
รูปที่ 1 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอและความจำเพาะที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน haemagglutinin ของไวรัส Human Influenza A สายพันธุ์ H1N1 จากอาร์เอ็นเอตัวอย่าง เลนซ้ายไปขวา เลน M: 100 nucleotide ladder, เลน 1: non template control, เลน 2: A/California/04/2009(H1N1), เลน 3: A/Nonthaburi/102/2009(H1N1), เลน 4: A/Thailand/NK165/2005(H1N1), เลน 5: A/chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/2004(H5N1), เลน 6: A/Swine/Thailand/05CB1/2006/(H1N1), เลน 7: A/Swine/Thailand/05CB2/2005(H3N2), เลน 8: A/Thailand/CU41/2006(H1N1), เลน 9: A/Thailand/CU46/2006(H3N2), เลน 10: B/Malaysia/2506/2004

ในการทดลองนี้ใช้อนุภาคนาโนของโลหะเงินเนื่องจากมีค่าextinction สูงกว่าของทองคำ ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ด้วยการเปลี่ยนสีจึงตอบสนองในรูปสัญญาณได้ดี นอกจากนี้โลหะเงินยังมีต้นทุนต่ำกว่าและมีเสถียรภาพดีกว่าการสาธิตการใช้อนุภาคโลหะเงินนาโนชนิดสีเหลืองกับการตรวจสอบโอลิโกนิวคลีโอไทด์เริ่มโดย Thompson *et al*., (2008) โดยพบการเปลี่ยนสีของอนุภาคจากเหลืองไปเป็นสีชมพู แต่แยกความต่างออกจากกันได้ไม่เด่นชัด งานวิจัยชิ้นนี้จึงใช้ผลึกเงินนาโนเพื่อให้การเปลี่ยนสีที่ชัดขึ้น ผลึกเงินนาโนสีฟ้านี้ไม่มีประจุ ใช้เป็นครั้งแรกโดยผู้วิจัย เมื่อตกตะกอนผลึกเงินนาโนจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นใสไม่มีสี และการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันแต่อย่างใด (Donraman *et al*., 2012)

ในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย โพรบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทาง electrostatic ที่ผิวอนุภาค เมื่อมีเกลือในระบบก็จะกระตุ้นให้ผลึกนาโนเงินมารวมตัวและตกตะกอน ขณะที่ในกรณีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายการจับตัวของดีเอ็นเอกับโพรบจะทำให้เกิดภาวะ electrostatic เปลี่ยนไป และจะช่วยป้องกันไม่ให้อนุภาคตกตะกอนได้ง่ายเมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (รูปที่ 2)

ในทางปฏิบัติการทำไฮบริไดเซชั่น อาศัย โพรบ ดีเอ็นเอตัวอย่าง บัฟเฟอร์ เกลือ และอนุภาคนาโนของโลหะ การจับตัวระหว่างโพรบและดีเอ็นเอเกิดโดยการเพิ่มอุณหภูมิกระตุ้นให้ดีเอ็นเอคลายตัวเป็นสายเดี่ยว และการลดอุณหภูมิในภาวะที่มีเกลือช่วยให้ดีเอ็นเอจับตัวกับตะกอน ขณะเดียวกันการจับตัวของดีเอ็นเอกับโพรบจะช่วยป้องกันการตก ตะกอนของผลึก ทั้งหมดเกิดขึ้นใน 15 นาที และตรวจสีได้ด้วยตาเปล่าหรือตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้

ผลึกเงินนาโนสีฟ้านี้ ช่วยให้การตรวจดีเอ็นเอด้วยหลักการนิวคลิอิคไฮบริไดเซชั่น โดยใช้โพรบสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในเวลาอันสั้น เหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันผลกับตัวอย่างจำนวนมาก เช่น ในรูปแบบคัดกรอง เพราะให้ผลรวดเร็วด้วยตาเปล่า และไม่มีความยุ่งยาก



รูปที่ 2 การตกตะกอนและเปลี่ยนสีของสารละลายผลึกเงินนาโน (AgNPl) สีฟ้า พบว่ากรณีที่ในระบบไม่มีดีเอ็นเอ (ntc, non template control) หรือมีดีเอ็นเอแต่ไม่ใช่เป้าหมาย (negative) สารละลายผลึกเงินนาโนสีฟ้าตกตะกอนและเกิดการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี ขณะที่ในระบบที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive) ปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชันปกป้องการตกตะกอนและการเปลี่ยนสีของสารละลายผลึกเงินนาโน AgNPl = สารละลายผลึกเงินนาโนก่อนทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดลอง

การทำนิวคลิอิคแอซิดไฮบริไดซ์เซชันในคอลลอยด์ผลึกนาโนเงินสีฟ้าอาศัยการเปลี่ยนแปลงพลาสมอนของอนุภาค ทำให้สามารถตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอที่ถูกต้องได้ โดยในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอหรือมีดีเอ็นเอที่ไม่ใช้เป้าหมาย โอลิโกนิวคลิโอไทด์โพรบจะไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ส่งผลให้ผลึกนาโนเงินจับตัวตกตะกอนเปลี่ยนสีจากสีฟ้าไปเป็นใสไม่มีสีภายหลังการกระตุ้นโดยการใส่เกลือในระบบ ขณะที่ในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายโพรบจะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดเป็นโครงสร้างสายคู่ ซึ่งปกป้องการตกตะกอนของผลึกนาโนเงินทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสี ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดใน 10-15 นาที สามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่าทำให้มีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก และการตรวจนอกสถานที่

เอกสารอ้างอิง

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. คำขอสิทธิบัตรหมายเลข 0901002255. โอลิโกนิวคลิโอไทด์เพื่อการตรวจเชื้อไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ 2009 ฮิวแมน อินฟลูเอนซ่า เอ ไวรัส เอชวัน เอ็นวัน. 2552.

Donraman, N., Ekgasit, S., Chaumpluk, P.. Lab-on-a-paper chip for Chikungunya Virus assay. Pure and Applied Chemistry International Conference 2012. 926-930.

Li, H., and Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) 2004;101 (39): 14036–14039.

Mirkin, C. A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C., Storhoff, J.J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature 1996;382: 607–609.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino N., T. Hase. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28 : e63.

Pakdeenard, S. Thammacharoen, C. Ekgasit, S. Synthesis of silver nanoparticles using a biopolymer as reducing agent stabilizer. Pure and Applied Chemistry International Conference 2010;363.

Southern, E. M . Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 1975;98 (3): 503–517.

Thompson, D. G., Enright, A., Faulds, K., Smith, W. E., Graham, D. Ultrasensitive DNA detection using oligonucleotide silver nanoparticle conjugates. Analytical Chemistry 2008; 8(80): 2805-2810.