

รายงานผลการดำเนินงาน

โครงการวิจัย การคัดเลือกโมเลกุลดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็น ดีเอ็นเอบอดีสำหรับการตรวจจับคานาบินอยด์
เป้าหมาย

ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีและไบโอเซ็นเซอร์

ธันวาคม 2564

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสาร CBD อยู่บนพื้นฐานการรวบรวมสัญญาณโมเลกุลโดยใช้ ดีเอ็นเอในรูปแบบ antibody ซึ่งเป็นนวัตกรรมรูปแบบใหม่ เรียกว่า DNAbody เป็นโมเลกุลตรวจจับสัญญาณ (recognition molecule) แทน antibody ในรูปโปรตีนเดิมที่ใช้ระบบ ดีเอ็นเอในรูปแบบ DNAbody เป็นโมเลกุล oligonucleotide จับตัวกับ CBD เป้าหมาย ในลักษณะที่มี binding affinity สูงและเสถียร อาศัยความได้เปรียบของคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่เหนือกว่า antibody ที่โครงสร้างหลักเป็นนิวคลีโอไทด์ มีความเสถียรและปรับให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมของปฏิกิริยาได้ง่ายและมีประสิทธิภาพกว่า

ในการพัฒนา ได้คัดเลือก oligonucleotide ที่เหมาะสม ด้วยวิธี SELEX ได้โคลนของแคนติเบตโมเลกุลที่จำเพาะต่อ CBD 9 โคลน ต่อมา การศึกษาและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และ การคัดเลือกความสามารถในการจับตัวกับโมเลกุลเป้าหมายทำให้ได้แคนติเบตโมเลกุลที่เป็น oligonucleotide จำเพาะต่อ CBD 4 โคลน และเมื่อนำ oligonucleotide ดังกล่าวมาใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับสัญญาณ ร่วมกับการพัฒนาวิธีการตรวจที่อยู่บนพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคนาโนทองคำ (colorimetric assay) โดยอาศัยการแลกเปลี่ยนประจุไฟฟ้าบนพื้นผิวและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ plasmon ของอนุภาคนาโนทองคำทำให้สามารถคัดเลือก oligonucleotide ที่จำเพาะต่อ CBD 1 โคลน

ผลการตรวจสอบ CBD พบว่าในกรณีที่มีพบโมเลกุล CBD สารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนทองคำจะยังคงเป็นสีชมพูแดง และในกรณีที่ไม่พบ CBD สารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคนาโนทองคำจะเปลี่ยนสีไปเป็นสีม่วง ทั้งนี้เพราะคุณสมบัติ electrostatic ของ oligonucleotide ที่ใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับสัญญาณ ต่างกันในกรณีที่มี CBD หรือไม่มี CBD ในระบบ

Oligonucleotide ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็น DNAbody นี้ ให้ความจำเพาะต่อ CBD ในระดับที่สูง โดยจับตัวอย่างจำเพาะกับ CBD certified reference material ของตัวอย่างกัญชงและกัญชา แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาร่วมกับสารเคมีอื่นในกลุ่มควบคุมระบบประสาทเดียวกัน (cross reaction) ทั้ง Caffeine, Ibuprofen Buprenorphine, Marcaine, Tramadol, Fentanyl หรือ THC certified reference material และให้ความไวของปฏิกิริยาในการตรวจ ในรูป LOD หรือ Limit of detection ที่ 10 ppb สะท้อนศักยภาพของปฏิกิริยาเมื่อใช้ oligonucleotide เป็น DNAbody เพื่อการตรวจสอบและตรวจวัดปริมาณ CBD ที่สามารถนำไปประยุกต์ร่วมกับหลักการตรวจการเรืองแสง หรือการตรวจทางเคมีไฟฟ้า หรือการตรวจในรูปแบบ immuno-chromato graphic platform เพื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปต่อไป

โครงการวิจัย การคัดเลือกโมเลกุลดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็น ดีเอ็นเอบอดีสำหรับการตรวจจับคานาบินอยด์ เป้าหมาย

แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

กัญชาและกัญชงเป็นพืชในวงศ์กัญชา พืชทั้งสองมีสารฐานวิทยาที่คล้ายกันมากจนมีอาจจำแนกความแตกต่างด้วยสายตาได้โดยง่าย จากการศึกษาพบว่า พืชตระกูลกัญชา สามารถสร้างสาร cannabinoids ถึง 60 ชนิด แต่ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดคือ tetrahydrocannabinol (THC) กัญชา มีระดับของสาร THC ในปริมาณสูง ขณะที่กัญชง มีระดับของ THC ต่ำกว่า ดังนั้นจึงมักพบการใช้เกรด ชนิดและระดับปริมาณ THC มาช่วยจำแนกความแตกต่างของพืชทั้งสองชนิด เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา กำหนดเกณฑ์ปริมาณ THC สูงสุดในกัญชงไว้ที่ไม่เกิน 0.3% หากค่า THC สูงกว่า 0.3% จะจำแนกเป็นกัญชา โดยกัญชาที่นำมาใช้ในทางการแพทย์ มีค่า THC สูง 5-20% โดยเฉลี่ย และบางสายพันธุ์ อาจให้ค่า THC สูงถึง 25-30%

นอกจาก THC แล้ว พืชในวงศ์กัญชายังสังเคราะห์สารทุติยภูมิในกลุ่ม cannabinoid ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ CBD (cannabidiol) สารนี้ ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาท โดยกัญชาจะผลิตสาร THC มากกว่า CBD ขณะที่กัญชงจะผลิตสาร CBD มากกว่า THC สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ ยับยั้ง กระตุ้น ระบบประสาท ฮอโมน ภูมิคุ้มกัน ผ่านระบบ endocannabinoid ของร่างกาย

อย่างไรก็ดี การใช้กัญชาในการรักษาในทางการแพทย์ เน้นการมีสารประกอบทุติยภูมิที่มีองค์ประกอบทางเคมีเอื้อประโยชน์ในรูปแบบ cannabidiol, CBD สูง แต่จะมีสารเคมีที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทจำพวก tetrahydro cannabinol, d9-THC ต่ำ เนื่องจาก CBD ไม่ทำให้จิตใจเลือนลอย และไม่มีผลข้างเคียงร้ายแรง การใช้งานเป็นไปเพื่อบรรเทาอาการเจ็บป่วยต่าง ๆ และเน้นสรรพคุณที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายและจิตใจ ทั้งฟื้นฟูระบบสมองและกระตุ้นการทำงานของระบบสุขภาพที่สมบูรณ์ ทำให้ผู้ป่วยในกลุ่มคนไข้วิกฤต อดอยากอาหารมากขึ้น ลดความวิตกกังวล ช่วยให้หลับได้ดีขึ้น บรรเทาการเกร็งของกล้ามเนื้อ ลดการอักเสบ และระงับอาการคลื่นไส้อาเจียน

การเปลี่ยนแปลงของกฎระเบียบในการควบคุมกัญชาและกัญชง ส่งผลต่อการอัตราเร่งในการเปลี่ยนแปลงของตลาด สร้างความตื่นตัวของทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้อง และยังส่งผลต่อเนื่องให้เกิดความจำเป็นเร่งด่วน ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบและวิเคราะห์การมีอยู่และระดับปริมาณของสารออกฤทธิ์ ทั้ง cannabidiol และ tetrahydrocannabinol ที่มีความแม่นยำ ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพเพื่อรองรับการตื่นตัวในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในระยะหลัง ประกอบกับการนำสกัดบริสุทธิ์ของสารประกอบทุติยภูมิจากกัญชาและกัญชงมาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ในวงกว้างมากขึ้นทั้งในรูปแบบยาทาเฉพาะที่ เครื่องสำอางค์

อาหารในกลุ่มต่าง ๆ อาหารเสริม สารปรุงแต่ง และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทั้งชนิดที่มีและไม่มีแอลกอฮอล์ ความหลากหลายนี้ส่งผลให้เกิดความท้าทายในการพัฒนาวิธีการทดสอบมากขึ้น

โดยปกติ ความแม่นยำในการทดสอบ การปรากฏและปริมาณของ cannabinoid ในผลิตภัณฑ์ขึ้นกับความน่าเชื่อถือของรูปแบบวิธีที่นำมาใช้ในการทดสอบ เพราะหากให้ผลไม่ถูกต้อง จะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภค รวมถึงความกังวลด้านศีลธรรมองค์กรรวม ส่งผลต่อผู้ประกอบการ ในแง่การการสูญเสียผลประโยชน์ทางเศรษฐศาสตร์หากการทดสอบให้ผลเบี่ยงเบนไปจากเกณฑ์

การตรวจในปัจจุบัน เน้นการใช้เทคนิค reversed-phase liquid chromatography ร่วมกับการตรวจด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต แม้ว่าจะได้ความแม่นยำ ความจำเพาะในการตรวจที่สูง แต่ก็จำกัดการตรวจให้ดำเนินการได้เฉพาะห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่และมีความพร้อม ใช้บุคลากรเฉพาะทาง ใช้เวลาและมีค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์สูง ไม่สามารถทดสอบเป็นจำนวนมาก หรือ ไม่ตอบโจทย์การทดสอบในภาคสนามเพื่อตรวจคัดกรองที่ผู้ประกอบการหรือผู้ใช้ผลิตภัณฑ์มีความต้องการได้ ทำให้เกิดปัญหาในการบริหารจัดการการทดสอบให้ด้วยประสิทธิภาพลง

ทางออกประการหนึ่งคือการใช้เทคนิคอย่างง่าย เช่น การทดสอบโดยวิธี Duquenois-Levine test ที่อาศัยปฏิกิริยาเคมี ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเมื่อทำปฏิกิริยากับสาร THC อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนสีดังกล่าวไม่มีความจำเพาะ วิธีดังกล่าวจึงขาดความเหมาะสมในทางปฏิบัติ

การอนุญาตให้ผลิตภัณฑ์ขงเป็นการค้าทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับพืชวงศ์กัญชาต้องสงสัยรวมถึงผลิตภัณฑ์มากขึ้น ขณะที่ยังไม่มีวิธีในการตรวจจำแนกพืชทั้งสองแบบคัดกรองอย่างง่ายและถูกต้องแม่นยำที่เป็นทางเลือกได้ ทำให้เป็นภาระและเกิดตัวอย่างค้างคั่งในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ทางเลือกหนึ่งได้แก่ การพัฒนาวิธีการตรวจโดยการพึ่งพาองค์ความรู้สมัยใหม่ Aptamers ในรูปแบบ DNAbody เป็นโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก ในรูปแบบ single-stranded nucleic acid ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากการคัดเลือกโมเลกุลโดยเทคนิคการพัฒนาโมเลกุลไลแกรนผ่านวิวัฒนาการโดยการเพิ่มปริมาณแบบยกกำลัง (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) เพื่อคัดเฉพาะ โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกที่จับอย่างจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย (ในกรณีนี้คือ CBD) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมีในปัจจุบัน การใช้ DNAbody มีเสถียรภาพเหนือกว่า วิธีการใช้งานดีกว่า และอายุการเก็บรักษานานกว่า ทำให้การพัฒนาวิธีการตรวจบนพื้นฐานการใช้ DNAbody เป็นทางเลือกที่มีความเหมาะสมกว่าทางเลือกอื่น

การศึกษาโครงการนี้ เน้น การคัดเลือกโมเลกุลดีเอ็นเอสายสั้นที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายกลุ่ม cannabinoid อย่างจำเพาะในหลอดทดลองด้วยพันธะทางเคมี เช่น ปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต (electrostatic) แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals interactions) หรือพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) เพื่อนำโมเลกุลที่

คัดเลือกได้ไปใช้ร่วมกับเทคนิคทางกายภาพ เช่น การเรืองแสง หรือการตกตะกอนของอนุภาคทองคำ เพื่อประยุกต์เป็นวิธีการตรวจด้วยไบโอเซ็นเซอร์ (biosensor) สำหรับตรวจติดตามโมเลกุลที่เป็นเป้าหมายในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกและพัฒนาโมเลกุล DNAbody ที่จำเพาะต่อสารเคมีเป้าหมายกลุ่ม cannabinoid CBD

กรอบการวิจัย

ในการศึกษานี้ จะทำการคัดเลือก และพัฒนาโมเลกุล DNAbody จากไลบรารี ssDNA แบบสุ่ม ผ่านระบบ Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment โคลนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโมเลกุล DNAbody ที่ได้ และทดสอบความจำเพาะและความไวของโมเลกุลในการทดสอบการจับกับเป้าหมาย

ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยโมเลกุล cannabinoid และวิธีการตรวจวิเคราะห์
2. เตรียมเมทริกคาร์บอน เพื่อตรึงสาร
3. คัดเลือกโมเลกุล DNA ที่ใช้เป็น aptamer หรือ DNAbody ในหลอดทดลอง
ไลบรารี ssDNA แบบสุ่มบ่มกับ Binding buffer ที่ประกอบไปด้วย 10 mM Tris HCl pH 8.0 ที่ 50 mM, NaCl 0.5 mM, EDTA และ 70% Ethanol ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง 15 นาที และนำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อได้ ssDNA ที่อยู่ในสถานะที่พร้อมนำไปคัดเลือกแล้ว นำไปทำการคัดเลือกผ่านระบบ Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment โดยนำดีเอ็นเอที่คัดเลือกไว้ไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยขั้นตอนคัดเลือกแอปตาเมอร์นี้ถูกทำซ้ำทั้งหมด 8 รอบ เป็นอย่างน้อย
4. โคลนและหาลำดับเบสของ DNA aptamer
ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบสุดท้าย นำโคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pSC-A-amp/kan (Stratgene, USA) โดยใช้วิธี TA-cloning และคัดเลือกโคลนที่ทำได้ด้วยการทำ direct PCR สกัดพลาสมิดจากโคลนที่ได้ และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านการ sequencing ผ่านตัวแทน custom DNA sequencing service ข้อมูลโครงสร้างของแอปตาเมอร์จะได้รับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn เปรียบเทียบ
5. สังเคราะห์และคัดเลือก DNA aptamer

สังเคราะห์แอปตาเมอร์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 และคัดเลือก aptamer ที่มีความสัมพันธ์ที่ดีที่สุดเพื่อหาความจำเพาะ ผ่านการทดสอบกับตัวอย่างสารเคมีในกลุ่ม cannabinoid และสารอื่นรวมกันไม่น้อยกว่า 12 ชนิด โดยการทดสอบเบื้องต้น ใช้วิธีตกตะกอนกับอนุภาคทองคำ ทำการทดสอบความไว (sensitivity) ผ่านการใช้สารเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างกัน 1 ระดับจากมากที่สุด 1000 ppm เพื่อหาขีดจำกัดของการทดสอบ (Limit of Detection, LOD)

สถานที่ทำวิจัย ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะเวลาดำเนินการ

มีนาคม 2564-ธันวาคม 2564

ผลการดำเนินงาน

หลักสำคัญในการพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบเสถียรภาพค้ำบนพื้นฐานการจดจำโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย จึงจำเป็นต้องมีโมเลกุลจำเพาะเพื่อช่วยในกระบวนการจดจำโมเลกุลเป้าหมาย ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในการจับสัญญาณ ก่อนส่งสัญญาณเหล่านั้นเข้าสู่การตรวจสอบและแสดงผล

ที่ผ่านมาเทคนิคบนพื้นฐานการจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่ใช้เป็น gold standard เป็นเทคนิคบนพื้นฐานทางเคมีวิทยา โดยแอนติบอดีทำหน้าที่เป็นชีวโมเลกุลที่ช่วยในกระบวนการจดจำโมเลกุลเป้าหมาย (bio recognition molecules) ซึ่งมักจับกับเป้าหมายอย่างจำเพาะ (high specificity) และมีความไวสูง (high sensitivity) ส่งผลให้สามารถนำมาใช้ออกแบบวิธีการตรวจโมเลกุลเป้าหมายอย่างจำเพาะได้ แต่การใช้แอนติบอดียังมีข้อจำกัด เนื่องจากเป็นโปรตีนที่เสื่อมประสิทธิภาพได้ง่ายและความสามารถในการจับตัวขึ้นอยู่กับชุด (batch) ที่ผลิต สภาวะ และวิธีการในการเก็บรักษา ที่สำคัญการเลือกใช้อันติบอดียังจำกัดให้จับโมเลกุลเป้าหมายเฉพาะที่เป็นโปรตีนเท่านั้น ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจโมเลกุลเป้าหมาย CBD ได้

การใช้โมเลกุลดีเอ็นเอในรูป oligonucleotide ที่เรียกว่า aptamer มาทำหน้าที่แทนแอนติบอดีจะช่วยให้สามารถคัดเลือกโมเลกุลดีเอ็นเอที่จับกับเป้าหมายนอกเหนือไปจากโปรตีนได้ด้วย ที่สำคัญเทคโนโลยีใหม่นี้ใช้ความรู้ทางเคมีของดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติต่างไปอย่างสิ้นเชิงกับความรู้ในการจัดการแอนติบอดีที่เป็นโปรตีน ทำให้สามารถก้าวข้ามข้อจำกัดต่าง ๆ ที่มีความซับซ้อนได้

ในการทดลองในครั้งนี้ ได้นำดีเอ็นเอสังเคราะห์ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมาจับกับโมเลกุลเป้าหมาย ในครั้งนี้ได้แก่โมเลกุล CBD ในรูป (1R',2R')-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1', 2', 3'. 4'-tetrahydro-[1, 1'-biphenyl]-2,6-diol (THC Pharm, Germany) โดยระบบการจับตัวและดำเนินการคัดเลือก เพื่อค้นหาโมเลกุลดีเอ็นเอในรูป oligonucleotide ที่ทำหน้าที่แทนแอนติบอดี ซึ่งอยู่บนพื้นฐานการ

คัดเลือกของหลักการ SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (Darmostuk, et al., 2015) ทั้งนี้ผลการดำเนินงานเริ่มจาก

การเตรียมคาร์บอนเมทริกซ์เพื่อการคัดเลือก

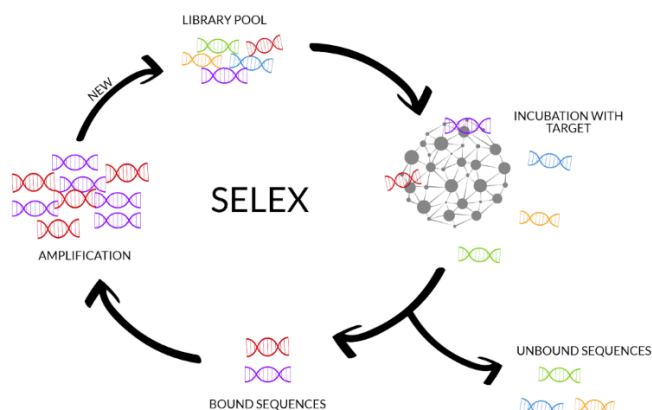
ในขั้นตอนการคัดเลือกโมเลกุลดีเอ็นเอในรูป oligonucleotide ที่จับตัวจำเพาะกับสารเป้าหมาย เริ่มจากการนำ oligonucleotide ที่ประกอบไปด้วย enriched oligonucleotide pool ไปบ่มร่วมกับสารเป้าหมาย จากนั้นจะคัดเฉพาะ oligonucleotide ที่จับตัวกับเป้าหมายเก็บไว้ และแยก oligonucleotide ที่ไม่จับตัวกับเป้าหมายออกไป แต่เพื่อให้ oligonucleotide จับตัวกับเป้าหมายได้ง่ายและมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องตรึงโมเลกุล oligonucleotide เหล่านั้นให้อยู่ในรูปโครงสร้าง linear form ซึ่งทำโดยอาศัยการใช้พื้นผิวที่มีคุณสมบัติเฉพาะเพื่อการตรึง ที่ผ่านมา สามารถเลือกใช้ผิววัสดุของ magnetic bead หรือ agarose bead หรือผิววัสดุของคาร์บอนเมทริกซ์ในรูปกราฟไฟท์ออกไซด์ ซึ่งการศึกษารั้งนี้ เลือกใช้คาร์บอนเมทริกซ์จากกราฟไฟท์ (Song et al., 2014)

การสังเคราะห์และเตรียมโมเลกุล DNA

ดำเนินการเตรียมโมเลกุลดีเอ็นเอโดยสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมีให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงแปรผันอย่างสุ่ม (5'-TAG GGA AGA GAA GGA(N)₄₉ AGT ACA TGA CCA CTT-3') โดยบริเวณ 5'-TAG GGA AGA GAA GGA และ AGT ACA TGA CCA CTT-3' จะเป็นบริเวณที่สามารถจับกับ oligonucleotide ชนิด 5'-TAGGGAAGAGAAGGA-3' และ 5'-AAGTGGTCATGTACT-3' ที่ใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อการคัดเลือกโมเลกุลที่จับตัวต่อไป และบริเวณ (N)₄₉ เป็นบริเวณเรียงแปรผันอย่างสุ่ม ทำให้ได้ oligonucleotide ในรูป DNA library ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่าง ซับซ้อน และแปรผันอย่างมาก ภายหลังการสังเคราะห์ นำโมเลกุลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาละลายใน สารละลาย TE buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ให้ได้ความเข้มข้น 1 nmol/ μ L และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

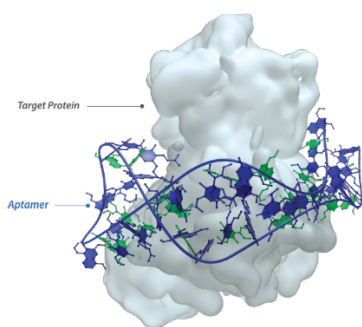
การคัดเลือกโมเลกุล DNA

การคัดเลือกโมเลกุล DNA ที่จำเพาะต่อเป้าหมาย ดำเนินการโดยกระบวนการที่เรียกว่า systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) (Tuerk and Gold, 1990, Darmostuk, et al., 2015) โดยใช้ single stand DNA ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไลบรารี จากขั้นตอนก่อนหน้านี้เป็นโมเลกุลเริ่มต้น (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนในการคัดเลือกโมเลกุลโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความสามารถในการจับกับสารเคมีหรือชีวโมเลกุลเป้าหมาย ด้วยเทคนิค systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) ที่มา <http://2018.igem.org/>

ด้วยคุณสมบัติ single stand DNA ที่เป็น oligonucleotide ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า มีขนาดเล็ก และด้วยการที่โมเลกุลมีขนาดเล็กจึงเข้าจับกับโครงสร้างทางกายภาพได้ดีกว่า และสามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายโดยอาศัยคุณสมบัติที่หลากหลาย ทั้ง electrostatic และ/หรือ hydrophobic hydrophilic และ/หรือโครงสร้างแบบ complementary structure ที่มีการจัดตัวแบบ π - π stacking และ/หรือแรงวัลเดอร์วาลส์ (Keefe et al., 2010) ทำให้การสังเคราะห์และดัดแปลงปลาย 5' และ 3' ทำได้ง่าย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การจับตัวของโมเลกุล single stand DNA ที่ใช้เป็น DNAbody (aptamer) ต่อโมเลกุลเป้าหมาย

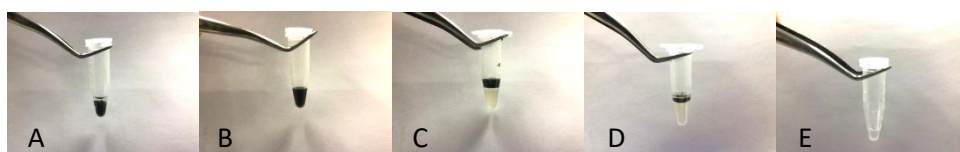
การคัดเลือกด้วยระบบ SELEX อาศัยกลไกการจับตัวของ oligonucleotide ที่ใช้เป็น DNA library ขนาด 40-115 นิวคลีโอไทด์หรืออาจมากกว่านี้กับโมเลกุลเป้าหมาย ด้วยความซับซ้อนในการคัดเลือกโมเลกุล oligonucleotide ที่มีความเหมาะสมในการจับตัว ทำให้การคัดเลือกโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ CBD ทำได้อย่างจำกัด เนื่องจากสารมีโมเลกุลขนาดเล็ก ทำให้การจับตัวและการแยกโมเลกุลที่จับและไม่จับ ของ oligonucleotide กับโมเลกุลเป้าหมายออกจากกันทำได้ยาก ที่ผ่านมามีการใช้โมเลกุลที่มี

ความสามารถในการจับตัวกับสารเคมี เช่น จับตัวกับ BSA (Bovine serum albumin) เป็นสื่อกลาง (Cao, et al., 2016) หรือการคัดเลือกผ่านเมมทริกซ์ออกไซด์ของคาร์บอน

การคัดเลือกสำหรับสารเป้าหมาย CBD

CBD ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ได้แก่ CBD ในรูป (1R',2R')-5'-methyl-4-pentyle-2'-(prop-1-en-2-yl)-1', 2', 3', 4'-tetrahydro-[1, 1'-biphenyl]-2,6-diol (THC Pharm, Germany) โดยพบว่า สารเคมีดังกล่าวมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นในขั้นต้น ละลาย CBD ด้วย acetonitrile ขณะที่ oligonucleotide ที่ใช้เป็น DNA library สามารถละลายได้ในน้ำและในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 70% ในกรณี เอทานอล (ethanol) และ ไม่เกิน 60% ในกรณีโพรพานอล (propanol) โดยในการทดลองได้ทำการคัดเลือกเป้าหมายประกอบปฏิกิริยาใน buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA ที่มีแอลกอฮอล์ชนิด Ethanol อยู่ 70%) เพื่อให้เข้ากันกับเงื่อนไขทั้งสอง

DNA library ที่ไม่จับตัวจะอยู่ที่ชั้นสารละลายในบัฟเฟอร์ ขณะที่ดีเอ็นเอที่จับตัวจะอยู่ร่วมกับ CBD (fractionation) ทำการแยกชั้นโดยนำชั้นคาร์บอนที่ได้มาเติมสารละลาย buffer แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัด CBD ที่อยู่ร่วมกับเมมทริกซ์ โดยโมเลกุลของ oligonucleotide จะละลายอยู่ในสารละลาย buffer และในขั้นตอนสุดท้าย ทำการตกตะกอน oligonucleotide ด้วย 80% Ethanol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที (precipitation) ละลายส่วนตะกอนของ oligonucleotide ที่จับตัวอยู่บนผิวหลอดทดลอง ด้านในด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 30 μ L (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการคัดเลือกโมเลกุลโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่อาศัยการคัดเลือกผ่านความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกันร่วมกับผิวเมมทริกซ์คาร์บอน เริ่มจากการบ่ม DNA library ในสารละลาย CBD ที่มีเมมทริกซ์คาร์บอน (A ก่อนผสม และ B หลังผสม) และการกำจัดโมเลกุลที่ไม่จับตัวออกจากระบบด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ฟีนอลและการปั่นเหวี่ยง (C ก่อน และ D หลัง) และส่วนที่คัดเลือกได้ (E) ก่อนนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ alcohol precipitation

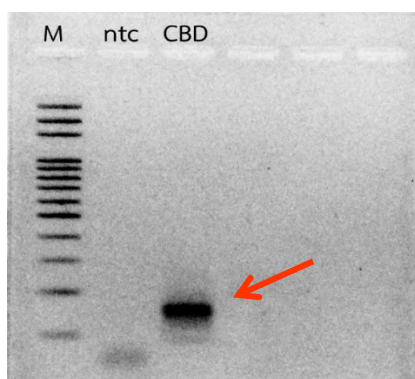
จากนั้นนำโมเลกุล oligonucleotide ที่จับตัว ไปดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 5' และ 3' ของ DNA library แลบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดในช่วง ประมาณ 100 นิวคลีโอไทด์ เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ในขั้นต้น จับตัวกับ CBD เป้าหมาย (ภาพที่ 4)

ขั้นต่อไปคือ การคัดเลือกแลบดีเอ็นเอ ดำเนินการโดยการ elute แลบดีเอ็นเอในสารละลาย 0.1x TE และใช้ดีเอ็นเอนี้เป็นแม่แบบในการทำ asymmetric PCR (Sambrook et al., 1989)

สำหรับขั้นตอนการเก็บดีเอ็นเอ ได้ดำเนินการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายใน 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl 0.5 mM EDTA ปริมาตร 30 μ L ดีเอ็นเอที่ได้จะนำไปใช้ในการคัดเลือกผ่านการจับตัวกับ CBD ในรอบถัดไป การดำเนินการถึงขั้นตอนดังกล่าวนับเป็นหนึ่งรอบ

ในรอบถัดไป เริ่มจากการนำดีเอ็นเอที่ได้จากรอบก่อนหน้ามาบ่มกับสารละลาย CBD ความเข้มข้นเท่ากับขั้นตอนแรกด้วย buffer เดียวกัน แต่แทนที่ oligonucleotide 1 nmol ในรอบแรก ด้วยนิวคลีโอไทด์ที่คัดเลือกได้ (โดยนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการคัดเลือกในรอบถัดไป) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะดำเนินการซ้ำขั้นตอน และดำเนินการคัดเลือกโดยทำซ้ำขั้นตอนเดิม เช่นนี้ อีกเป็นจำนวน 8 รอบ

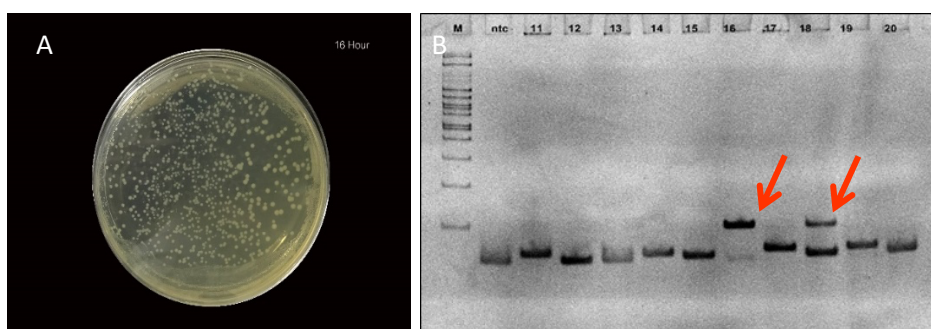
เมื่อเสร็จสิ้นการดำเนินการคัดเลือก ในรอบที่ 8 ได้ ปฏิบัติถูกหยุดไว้ที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยไม่ทำ elution ทำให้ได้ single stand DNA ที่มีขนาดประมาณ 100-120 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับขนาดในทางทฤษฎี ดังภาพที่ 5 ดีเอ็นเอนี้พร้อมจะนำไปโคลน เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 5 single stand DNA ที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 8 ที่มีความจำเพาะต่อ CBD เป้าหมาย เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์คเกอร์ เลน ntc โมเลกุลโอลิโกนิวคลีโอไทด์ควบคุม เลน single stand DNA จำเพาะต่อ CBD(ครี)

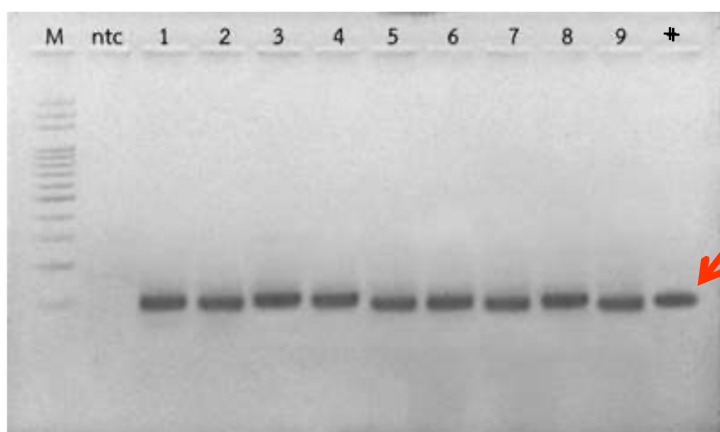
การโคลนชิ้นดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับพันธุกรรม

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป้าหมายเฉพาะในรูป double strand DNA นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาโคลนเข้าสู่ พลาสมิด pSC-A-amp/kan ด้วยวิธี TA cloning โดยชุดสำเร็จรูป Strataclone TA Cloning Kit (Stratgene, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคำอธิบายของวิธีใช้ชุดสำเร็จรูป คัดเลือกโคลนที่ต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin (ภาพที่ 6 A) จำนวน 18 โคลน โคลนที่คัดเลือกได้จัดเป็นโคลนที่ plasmid ที่มีชิ้นส่วนของ DNA ของ aptabody เป้าหมายอยู่ โดยการคัดเลือกในเบื้องต้นดำเนินการด้วยเทคนิค plasmid disruption โดยนำโคลนของแบคทีเรียที่มีโคลนเป้าหมายมาละลายในสารละลายที่ประกอบด้วย 2 mM EDTA, 10 mM NaCl และ 0.1 N NaOH, pH 9.0 ในสภาพที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที คัดเลือกโคลนที่ตอบสนองต่อการรับชิ้นดีเอ็นเอโดยแสดงแถบขนาดที่ใหญ่กว่าเดิม ซึ่งแสดงว่าการโคลนประสบผลสำเร็จ เพื่อเป็นตัวแทนของการคัดเลือกในรอบถัดไป



ภาพที่ 6 A) แสดงโคลนที่ได้ หลังการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ CBD และ B) ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค plasmid disruption เฉพาะโคลนที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนที่ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมีขนาดสอดคล้องกับขนาดเป้าหมายของ DNA ใน library (ศรชี้) เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์คเกอร์ เลน ntc non template control เลนตัวอย่าง ระบุหมายเลขตามโคลนที่ได้คัดเลือกไว้เบื้องต้น

จากนั้นนำโคลนที่คัดเลือกไว้นี้มาตรวจสอบยืนยันโดยการทำปฏิกิริยา colony direct PCR (Woodman et al., 2016) โดยการคัดเลือกโคลนที่ให้แถบดีเอ็นเอสอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอก่อนโคลนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไลบรารี ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาแบบเดียวกันกับที่ใช้ในการคัดเลือก oligonucleotide ในขั้นตอน Selex ด้วยภาวะอุณหภูมิที่เป็น pre-denaturation 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และรอบการเพิ่มปริมาณ 40 รอบ ของอุณหภูมิ denaturation ที่ 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ post extension ที่ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ภายหลังเสร็จปฏิกิริยา ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยสแนมไฟฟ้าได้ผลดังในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค colony direct PCR เฉพาะโคลนที่มียื่นเป้าหมายจะให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมีขนาดสอดคล้องกับขนาดเป้าหมายของ DNA ใน library (เลน +) เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์คเกอร์ เลน ntc non template control เลน 1-9 ตัวแทนตัวอย่างที่คัดเลือกจากการสกรีนในรอบแรก

จากภาพ แอบดีเอ็นเอที่ได้แสดงตัวแทนของโคลนที่ได้นำมาทดสอบด้วยเทคนิค colony direct PCR จากโคลนที่ทดสอบจำนวน 9 โคลน พบว่าทุกโคลนที่คัดเลือกสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แอบดีเอ็นเอที่มีขนาดสอดคล้องกับขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ มากกว่า 100 นิวคลีโอไทด์

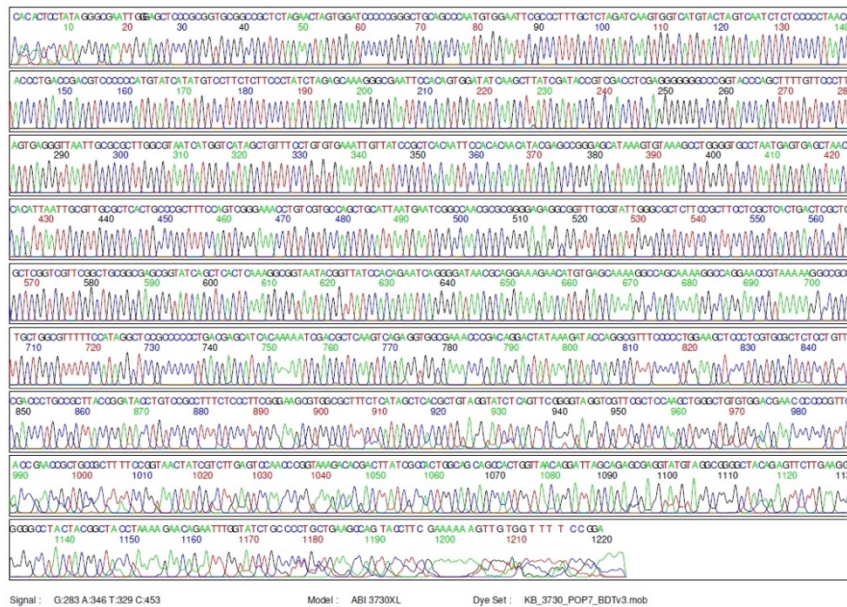
ผลการคัดเลือกโคลนที่ได้ พบว่าสามารถคัดเลือกโมเลกุล oligonucleotide ที่จับตัวกับ CBD ได้ 9 โคลน จึงได้นำโคลนทั้งหมดไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและสกัดดีเอ็นเอโดยการทำให้ Overnight Culture ในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 50 ppm และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี small scale plasmid preparation ตามที่ได้รายงาน Sambrook et al., (1989) ผลลัพธ์ดีเอ็นเอที่ได้ ถูกนำไปตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์โดยพิจารณาจากสัดส่วน OD260/OD280 ในช่วง 1.98-2.03 และความเข้มข้นคำนวณจากค่า OD ที่ 260 nm และดีเอ็นเอของพลาสมิดที่ได้ใช้เป็นดีเอ็นเอตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมต่อไป (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของโคลนพลาสมิดตัวอย่างเพื่อตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

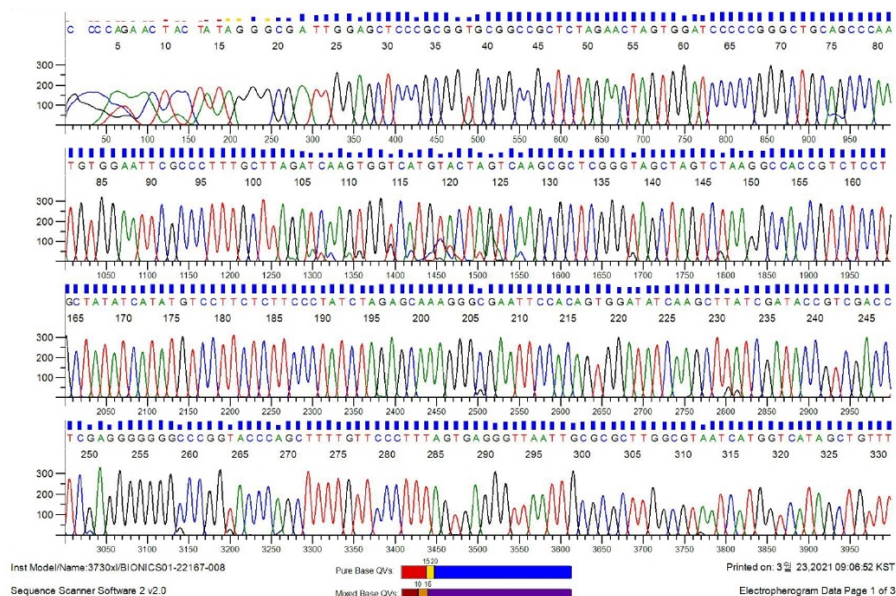
Samples	A260	A260/280	Concentration
CBDAP 1	2.739	1.98	137.0
CBDAP 2	2.789	1.99	139.5
CBDAP 3	2.257	1.98	112.9
CBDAP 4	2.534	1.99	126.7
CBDAP 5	2.408	2.01	120.4
CBDAP 6	2.352	1.97	117.6
CBDAP 7	2.632	1.99	131.6
CBDAP 8	2.187	2.03	109.3
CBDAP 9	2.683	1.98	134.1

ทำการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยปฏิกิริยา dideoxy termination (Sanger et al., 1997) ผ่าน custom sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R ผลการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 9 โคลน (CBD AP1-9) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ได้มีเพียง 4 โคลนเท่านั้นที่เป็นแคนดิเดท โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่เป็นแคนดิเดททั้ง 4 โคลน แสดงดังภาพที่ 8 ส่วนที่เหลืออีก 5 โคลน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความซ้ำซ้อนกับแขนของ cloning vector ที่ใช้ในการโคลนยีน (ไม่แสดงผล)

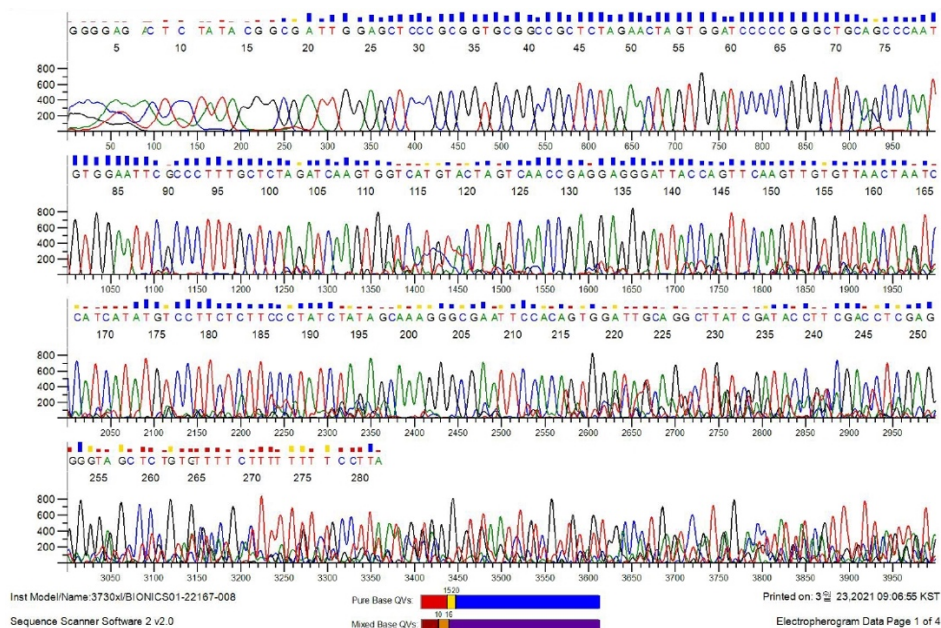
CBD AP2



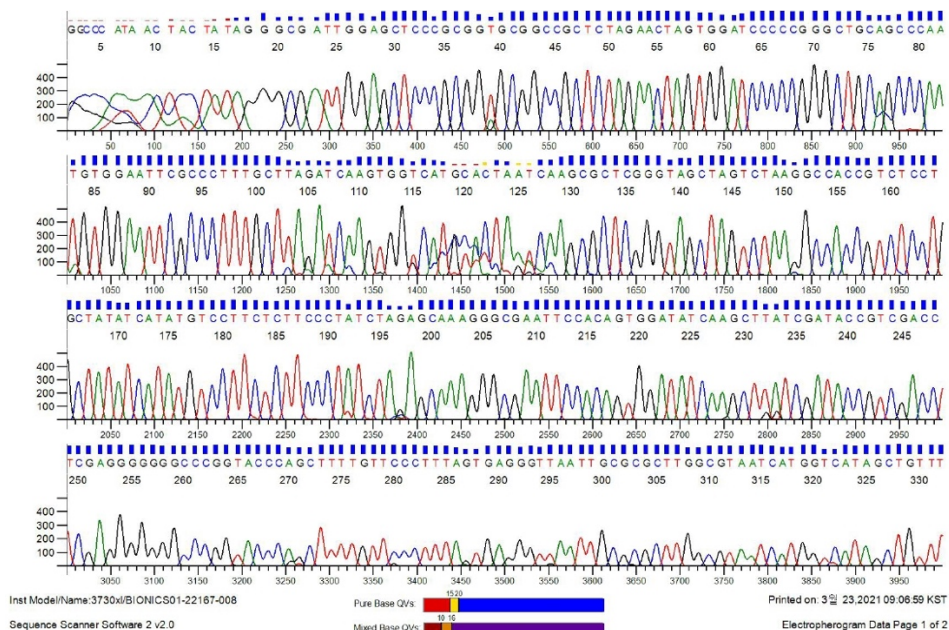
CBD AP3



CBD AP6



CBD AP8



ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนของพลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะต่อสาร CBD เป้าหมาย จาก CBD AP2 AP3 AP6 และ AP8

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่เป็นแคนดิเดทไปวิเคราะห์ โดยตัดโครงสร้างที่ไม่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ส่วนแขนของพลาสมิด และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ linker ไพร์เมอร์ที่อยู่รอบบริเวณ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ oligonucleotide ที่เป็นแคนดิเดท มีขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ มีค่า GC content ในช่วง 41.9-

51.2% โดย CBD AP 02 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ A 23 ตัว G 30 ตัว T 19 ตัว และ C 14 ตัว CBD AP 03 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ A 26 ตัว G 33 ตัว T 17 ตัว และ C 10 ตัว CBD AP 06 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ A 28 ตัว G 20 ตัว T 22 ตัว และ C 16 ตัว และ CBD AP 08 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ A 26 ตัว G 26 ตัว T 18 ตัว และ C 16 ตัว ค่า GC content และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ oligonucleotide ที่เป็นแคนดิเดท แสดงดังภาพที่ 9

```
>1st_BASE_22562XX_ApASYM_PCR_8_M13F_20_(CBD1_AP_02)
TAGGGAAGAGAAGGACATATGATCATGCGCCGGGTTCGGGTGGGGGGTAGGGACATGATCTACTTACTAGTACATGACCACTTGA// A23 T19 G30 C14 %GC51.2
>1st_BASE_22562XX_ApASYM_PCR_8_M13F_20_(CBD1_AP_03)
TAGGGAAGAGAAGGACATATGATCATGCGCGGGACGTCGGTCAGGGTAGGTTAGGGGGAGAGATTGACTAGTACATGACCACTTGA// A26 T17 G33 C10 %GC50.0
>1st_BASE_22562XX_ApASYM_PCR_8_M13F_20_(CBD1_AP_06)
TAGGGAAGAGAAGGACATATGATGGATTAGTTAACACAACCTTGAACCTGGTAATCCCTCCGTTGACTAGTACATGACCACTTGA// A28 T22 G20 C16 %GC41.9
>1st_BASE_22562XX_ApASYM_PCR_8_M13F_20_(CBD1_AP_08)
TAGGGAAGAGAAGGACATATGATATAGCAGGAGACGGTGGCCTTAGACTAGTACCCGAGCGCTTGATTAGTGCATGACCACTTGA// A26 T18 G26 C16 %GC48.8
```

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแคนดิเดท oligonucleotide ที่ได้จากโคลนที่คัดเลือกไว้ ที่จำเพาะต่อสาร CBD เป้าหมาย

เมื่อเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมที่ได้ระหว่างโคลนที่ได้คัดเลือกไว้ด้วยวิธี global (pairwise) alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thomson et al., 1994) พบว่าลำดับพันธุกรรมของขึ้นดีเอ็นเอของทั้ง 2 โคลน คล้ายกันในระดับสูงมาก (ภาพที่ 10) โดยเฉพาะลำดับพันธุกรรมของขึ้นดีเอ็นเอของ CBD AP 02 และ CBD AP 03 เหมือนกันในระดับ 100 % ขณะที่ลำดับพันธุกรรมของขึ้นดีเอ็นเอของระหว่างทั้งสองหมายเลขกับลำดับพันธุกรรมของขึ้นดีเอ็นเอของหมายเลขอื่นมีความคล้ายกันเพียง 53.49-60.47% เท่านั้น (ภาพที่ 10)

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

```
Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: NO.1 AP02 86 bp
Sequence 2: NO.2 AP03 86 bp
Sequence 3: NO.3 AP06 86 bp
Sequence 4: NO.4 AP08 86 bp
Start of Pairwise alignments
Aligning...
```

```
Sequences (1:2) Aligned. Score: 100%
Sequences (1:3) Aligned. Score: 53.4884%
Sequences (1:4) Aligned. Score: 56.9767%
Sequences (2:3) Aligned. Score: 53.4884%
Sequences (2:4) Aligned. Score: 56.9767%
Sequences (3:4) Aligned. Score: 60.4651%
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
NO.1 TAGGGAAGAGAAGGACATATGATCATGCGCCGGGTTCGGGTGGGGGGTAGGGA--CATGA
NO.2 TAGGGAAGAGAAGGACATATGATCATGCGCCGGGTTCGGGTGGGGGGTAGGGA--CATGA
NO.3 TAGGGAAGAGAAGGACATATGATGGATTAGTTAACACAA--CTTGAACCTGGTAATCCCTC
NO.4 TAGGGAAGAGAAGGACATATGATATAGCAGGAGACGGTGGCCTTAGACTAGC--TACCCG
*****
NO.1 TCTACTTGACTAGTACATGACCACTTGA
NO.2 TCTACTTGACTAGTACATGACCACTTGA
NO.3 CTCGGTTGACTAGTACATGACCACTTGA
NO.4 AGCGCTTGATTAGTGCATGACCACTTGA
**** *
```

ภาพที่ 10 ผลการเปรียบเทียบ similarity ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ oligonucleotide ที่ได้จากโคลนที่คัดเลือกไว้ alignment ของ แสดงให้เห็น similarity ที่สมบูรณ์ระหว่าง CBD AP 02 และ CBD AP 03

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงภาวะ homogeneities ของ oligonucleotide ที่คัดเลือกได้หมายเลข CBD AP 02 และ CBD AP 03 และภาวะ heterogeneities ลำดับพันธุกรรมของ CBD AP หมายเลขอื่น และเพื่อตรวจสอบในระดับลึก จึงได้นำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล

ผลการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของขึ้นดีเอ็นเอกับข้อมูลลำดับพันธุกรรมที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยการทำการตรวจสอบความคล้ายในรูปแบบ local alignment ด้วยโปรแกรม Blastn (Altschul et al., 1990) ไม่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีความสัมพันธ์ขึ้นดีเอ็นเอใดที่ปรากฏในฐานข้อมูล No significant similarity found (ภาพที่ 11) และตารางที่ 2

1. TAGGGAAGAGAAGGACATATGATCATGCGCCGGTTCGGGTGGGGGTAGGGACATGATCTACTTGACTAGTACATGACCACTTGA

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	V4FA0A9A016 Search expires on 12-11 00:30 am Download All
Program	Citation
Database	nt See details
Query ID	lcl Query_26365
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	86
Other reports	?

Filter Results

Percent Identity	E value	Query Coverage
to	to	to
Filter Reset		

⚠ No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

2. TAGGGAAGAGAAGGACATATGATACATGGGGGACGTCGGTCAGGGTAGGTTAGGGGAGAGATTGACTAGTACATGACCACTTGA

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	V4FD1EF1013 Search expires on 12-11 00:32 am Download All
Program	Citation
Database	nt See details
Query ID	lcl Query_45561
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	86
Other reports	?

Filter Results

Percent Identity	E value	Query Coverage
to	to	to
Filter Reset		

⚠ No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

3. TAGGGAAGAGAAGGACATATGATGGATTAGTTAACACAACCTGAACTGGTAATCCCTCCTCGGTTGACTAGTACATGACCACTTGA

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	V4FGEY2Y013 Search expires on 12-11 00:34 am Download All
Program	Citation
Database	nt See details
Query ID	lcl Query_37971
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	86
Other reports	?

Filter Results

Percent Identity	E value	Query Coverage
to	to	to
Filter Reset		

⚠ No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

4. TAGGGAAGAGAAGGACATATGATATAGCAGGAGACGGTGGCCTTAGACTAGCTACCCGAGCGCTTGATTAGTGCATGACCACTTGA

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	V4FJ2XC5013 Search expires on 12-11 00:34 am Download All
Program	Citation
Database	nt See details
Query ID	lcl Query_34199
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	86
Other reports	?

Filter Results

Percent Identity	E value	Query Coverage
to	to	to
Filter Reset		

GACCACTTGA **⚠** No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

ภาพที่ 11 การตรวจสอบความคล้ายในรูปแบบ local alignment ด้วยโปรแกรม Blastn ไม่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีความสัมพันธ์ขึ้น DNA ใด

ตารางที่ 2. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

หมายเลข	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์	ข้อมูลที่ตรงกันกับ ฐานข้อมูล	Max score	E-value	Accession number
1 AP02	TAGGGAAGAGAAGGACATATGATCA TGCGCCGGGTTCGGGTGGGGGGTAG GGACATGATCTACTTGACTAGTACAT GACCACTTGA	ไม่ปรากฏข้อมูลที่ ตรงกัน	-	-	-
2 AP03	TAGGGAAGAGAAGGACATATGATAC ATGGGGGGACGTCGGTCAGGGTAGG TTAGGGGGAGAGATTGACTAGTACAT GACCACTTGA	ไม่ปรากฏข้อมูลที่ ตรงกัน	-	-	-
3 AP06	TAGGGAAGAGAAGGACATATGATGG ATTAGTTAACACAACCTTGAACCTGGTA ATCCCTCCTCGGTTGACTAGTACATG ACCACTTGA	ไม่ปรากฏข้อมูลที่ ตรงกัน	-	-	-
4 AP08	TAGGGAAGAGAAGGACATATGATAT AGCAGGAGACGGTGGCCTTAGACTA GCTACCCGAGCGCTTGATTAGTGCA TGACCACTTGA	ไม่ปรากฏข้อมูลที่ ตรงกัน	-	-	-

ผลการตรวจสอบข้อมูลที่ไม่ซ้ำกับส่วนหนึ่งส่วนใดของยีนในฐานข้อมูลนี้ ทำให้สามารถยืนยันความแตกต่าง และระบุเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ oligonucleotide ที่คัดเลือกได้ ซึ่งไม่ซ้ำกับรายการใดที่ปรากฏในฐานข้อมูลได้อย่างชัดเจน ดังนั้นลำดับ oligonucleotide ดังกล่าวจัดเป็นข้อมูลของดีเอ็นเอใหม่ที่สามารถใช้พัฒนาเป็นแอนติบอดีได้ต่อไป

เนื่องจาก oligonucleotide ที่ได้และใช้เป็นแอนติบอดีนี้ คัดเลือกผ่านความสามารถในการจับตัวกับ CBD ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบการตรวจสัญญาณ เพื่อทดสอบการจับตัวระหว่าง oligonucleotide ที่ได้กับสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ในทางกายภาพ ซึ่งจะได้ดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

สังเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอ

จากผลการคัดเลือกเบื้องต้น ได้สังเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแอนติบอดี 3 โมเลกุล ได้แก่ AP03 AP06 และ AP08 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น

5'TAGGGAAGAGAAGGACATATGATACATGGGGGGACGTCGGTCAGGGTAGGTTAGGGGGAGAGATTGA
CTAGTACATGACCACTTGA3'

5'TAGGGAAGAGAAGGACATATGATGGATTAGTTAACACAACCTTGAAGTGGTAATCCCTCCTCGGTTGAC
TAGTACATGACCACTTGA3'และ

5'TAGGGAAGAGAAGGACATATGATATAGCAGGAGACGGTGGCCTTAGACTAGCTACCCGAGCGCTTGAT
TAGTGCATGACCACTTGA 3' ตามลำดับ

ทดสอบประสิทธิภาพในการจับตัว

การทดสอบประสิทธิภาพในการจับตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้กับเป้าหมาย CBD ดำเนินการผ่านระบบการแสดงผลสัญญาณโดยอาศัยคุณสมบัติการเปลี่ยนสีทางแสงของอนุภาคนาโนของโลหะ ซึ่งในระบบที่นำมาใช้เป็นของโลหะอนุภาคนาโนทองคำ

จากการทดลองพบว่าสามารถทำให้ทองคำที่มีอนุภาคเล็กระดับนาโนเมตรดูดกลืนแสงในช่วงสีเขียว (ประมาณ 520 nm) ไปทั้งหมด และกระเจิงแสงอื่นออกมา ส่งผลให้อนุภาคทองคำขนาดน้อยกว่า 50 nm มีสีแดงทับทิม (ruby red) ส่วนอนุภาคที่ขนาดใหญ่กว่ามีชมพูถึงสีม่วง และหากสามารถทำให้อนุภาคนาโนทองคำมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นโดยการจับตัวระหว่างอนุภาค (ขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค) โดยอนุภาคทองคำที่มีขนาดเปลี่ยนไป สามารถส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมทางแสงผ่านคุณสมบัติ plasmon สารละลายคอลลอยด์อนุภาคก็จะเปลี่ยนสีไปเรื่อย ๆ ตามขนาดอนุภาคที่เพิ่มขึ้น จากเล็กสุดสีแดงจนเป็นใหญ่ขึ้นสีม่วง ในระบบที่ได้ดำเนินการนี้ จะตรวจสอบสัญญาณบนพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงทางประจุที่ผิวหรือ electrostatic ที่เกิดบริเวณผิวอนุภาค อันเกิดเนื่องจากผลลัพท์การจับตัวของ oligonucleotide กับโมเลกุล analytes เป้าหมาย ซึ่งในที่นี้คือ CBD

เนื่องจากการทดลองนี้ เป้าหมายไม่ใช่โมเลกุลดีเอ็นเอ แต่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กของ CBD พฤติกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CBD เป้าหมายจะต่างออกไป กล่าวคือ

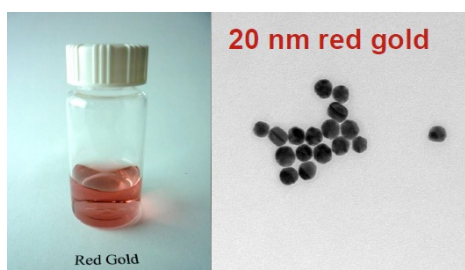
- 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CBD มีความยาวกว่าระบบที่ใช้โดย Li and Rothberg (2004) ทำให้การจัดตัวเกิดโครงสร้างทุติยภูมิมีความต่างไปจาก oligonucleotide สายสั้นที่ใช้โดยทั่วไป และ
- 2) การจัดตัวเกิดโครงสร้างทุติยภูมิหลังจับกับ CBD ส่งผลต่างไปจากพฤติกรรมของ single strand DNA และ double strand DNA ปกติ

ทำให้จำเป็นต้องทดสอบหาเงื่อนไขปฏิกิริยาและพฤติกรรมการกระตุ้นการตกตะกอนในเบื้องต้นก่อน โดยใช้อุณหภูมิทองคำเป็นหลัก

อนุภาคนาโนทองคำ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ จากสารละลายออริกคลอไรด์ (auric chloride) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ไอออนของทองจะรีดิวซ์ด้วย 1.12 มิลลิโมลาร์ไตรโซเดียมซิเตรท (Kimling et al., 2006) ภายใต้การปั่นเหวี่ยงอย่าง แรงที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการรีฟลักซ์ (reflux) ใช้เวลาประมาณ 20 นาที โดยยังคงปั่นผสมตลอดเวลาด้วย stirrer bar จากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิลดลง เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย 0.03 ไมโครโมลาร์ กลูต้าไธโอน เพื่อเคลือบอนุภาคทอง และปั่นเหวี่ยง โดยใช้เวลา 15 นาที คอลลอยด์ของอนุภาคนาโนทองคำจะให้สีแดงทับทิม การคัดเลือกขนาดอนุภาคกระทำโดยการควบคุมการปั่นเหวี่ยงที่ 13000x g เป็นเวลา 5 นาที อนุภาคนาโนทองคำที่ได้ มีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 nm ดังภาพที่ 12

โดยสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในระบบ จะเป็น Analytical Grade หรือ Molecular Grade และน้ำกลั่นในระบบเป็น Ultra-pure Milli Q (Millipore, USA) และเพื่อความปลอดภัย ขั้นตอนทั้งหมดดำเนินการใน fume hood



ภาพที่ 12 คอลลอยด์ของอนุภาคนาโนทองคำสีแดงทับทิม (ซ้าย) และรูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ขึ้น (ขวา)

การทดสอบการจับตัวกับโมเลกุลเป้าหมาย

ระบบการตรวจจับโมเลกุลของ CBD ในครั้งนี้ เลือกใช้ (1R',2R')-5'-methyl-4-pentyle-2'-(prop-1-en-2-yl)-1', 2', 3'. 4'-tetrahydro-[1, 1'-biphenyl]-2,6-diol (THC Pharm, Germany) สังเคราะห์เป็นชุดควบคุมบวก โดยใช้ความเข้มข้นคงที่ 100 ppb เป็นความเข้มข้นหลักในการปรับหาเงื่อนไขปฏิกิริยาที่เหมาะสม และใช้เปรียบเทียบกับคอลลอยด์อนุภาคนาโนทองคำที่ไม่ผ่านการทำปฏิกิริยา อนุภาคนาโนทองคำที่มีตัวอย่างควบคุมบวก อนุภาคนาโนทองคำที่มีตัวอย่างควบคุมลบ และแปรผันความเข้มข้นของเกลือเป็น 2 ระดับ โดยอ้างอิงหลักการเดิมของ Li and Rothberg (2004) เนื่องจากการจับตัวของ oligonucleotide ที่ใช้เป็นตัวตรวจจับที่คัดเลือกได้ ผลการทำปฏิกิริยาระหว่าง ความเข้มข้นของ oligonucleotide ความเข้มข้นของเกลือในระบบกับ CBD เป้าหมายในเบื้องต้นเป็นดังตาราง 3

ตารางที่ 3 อิทธิพลของเกลือและความเข้มข้นของ oligonucleotide ต่อการตกตะกอนและการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนทองคำ

ความเข้มข้นของเกลือ (mM)	ความเข้มข้นของ oligonucleotide (pmol)							
	5		10		20		50	
	+	-	+	-	+	-	+	-
20								
30								

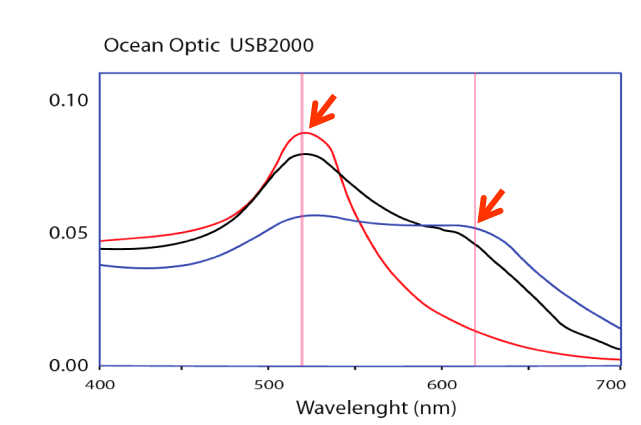
+ เมื่อตัวอย่าง analyte เป็น CBD

- เมื่อตัวอย่าง analyte เป็นโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย (เป็น ibuprofen)

ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น เกลือมีแนวโน้มกระตุ้นให้อนุภาคนาโนทองคำเกิดการตกตะกอนและเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนทองคำ ขณะเดียวกันเมื่อมี oligonucleotide ในระบบ oligonucleotide จะจับตัวกับ CBD เป้าหมาย ส่งผลต่อปฏิกิริยาที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลง electrostatic บนผิวอนุภาค ในกรณีที่ไม่มีตัวอย่าง CBD แต่เป็นตัวอย่างอื่น oligonucleotide จะสร้างตัวเป็นโครงสร้างมิติ (secondary or tertiary structure) แสดงพฤติกรรมคล้าย double strand DNA ซึ่งจะกระตุ้นให้ เกิดการจับตัวของอนุภาคในภาวะที่มีเกลือเป็นตัวกระตุ้น อนุภาคนาโนทองคำจึงเปลี่ยนสีจากแดงเป็นม่วง ขณะที่ ในภาวะที่ตัวอย่างมี CBD ปรากฏอยู่ ดีเอ็นเอจะจับตัวกับ CBD เป็นโครงสร้างเชิงซ้อน ไม่รบกวนและในทางกลับกัน ยังปกป้องพื้นผิวอนุภาคจากการกระตุ้นการตกตะกอนโดยเกลือ ทำให้จึงยังคงเห็นอนุภาคนาโนทองคำมีสีไม่เปลี่ยนแปลง กล่าวคือยังคงมีสีแดงใกล้เคียง ruby red ซึ่งเป็นสีของทองคำสีเดิมในที่สุด

การแปรผันทั้งสองปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลือและความเข้มข้นของ oligonucleotide และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสีของอนุภาคทองที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างชุดควบคุมบวกและชุดควบคุมลบทำให้สามารถจำแนกการมีอยู่ของ CBD ในตัวอย่างได้ ซึ่งสังเกตได้จากสีของคอลลอยด์นาโนทองคำที่เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับของเดิม โดยผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีปริมาณของ oligonucleotide ที่ 10 pmol ปริมาณเกลือที่ 20 mM ให้ความต่างของสีสัญญาณดีที่สุด (การเปลี่ยนจากแถบสีแดงระหว่างตัวอย่างลบไปเป็นบวกที่ให้แถบสีเทาในตาราง) ดังนั้นเมื่อใช้ปริมาณของ oligonucleotide ที่ 10 pmol ปริมาณเกลือที่ 20 mM และความเข้มข้นของ CBD ที่ 100 ppb จะส่งผลต่อการปรับค่า electrostatic บนผิวอนุภาคทองคำในช่วงที่สามารถใช้การตกตะกอนหรือไม่ตกตะกอนของทองคำเป็นตัวบ่งบอกสัญญาณการตรวจทางโมเลกุล CBD เป้าหมาย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

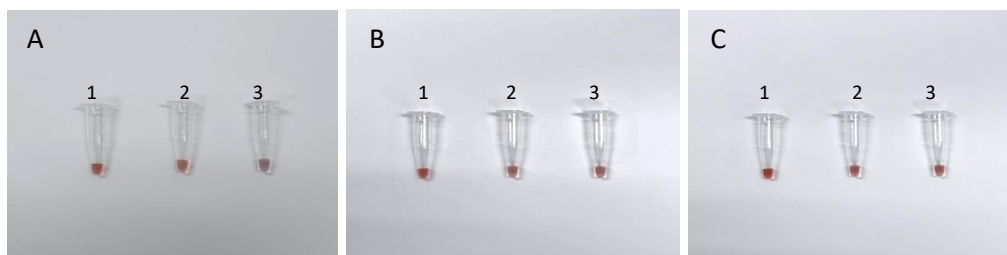
การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแสงอันเนื่องจากการปกป้อง หรือการกระตุ้นให้เกิดการตกตะกอนในตัวอย่างที่เป็นลบ สามารถตรวจสอบได้จากสมบัติทางแสงภายใต้การสแกนด้วย UV-visible spectroscopy ชนิด Deuterium Lamp ด้วย detector ชนิด Ocean Optic @ USB2000 เป็นดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงทางแสงในรูป UV-Vis spectroscopy ของอนุภาคทองคำในภาวะที่ตัวอย่างมี CBD ปรากฏอยู่ ซึ่งอนุภาคทองคำไม่ตกตะกอนและให้สีชมพูทำให้เห็น peak ที่ $\lambda = 520$ nm (กราฟเส้นสีแดง ครีซซี่ซ้าย) เปรียบเทียบกับในภาวะที่ไม่มีตัวอย่าง หรือ ตัวอย่าง analyte ไม่ใช่ CBD อนุภาคทองคำตกตะกอนและให้สีม่วงทำให้เห็น peak ที่ $\lambda = 620$ nm (กราฟเส้นน้ำเงิน ครีซซี่ขวา) และช่วงขนาดของการเปลี่ยนแปลงขณะเริ่ม (กราฟเส้นดำ)

โดยตัวอย่างที่มี CBD ที่อนุภาคยังคงเป็นสีแดงทึบทึม เนื่องจากไม่มีการตกตะกอนของอนุภาค แม้ว่า จะพบการลดลงของ peak ที่ $\lambda = 520$ nm บ้างก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากการเติมสารเคมีอื่นเข้าสู่ระบบ (มากับตัวอย่าง) (ครีซซี่ซ้าย) ขณะที่ในตัวอย่างที่ไม่มี CBD ซึ่งจะพบการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำและเปลี่ยนสีจากสีแดงทึบทึมเป็นสีม่วง โดยจะพบการลดลงของ peak ที่ $\lambda = 520$ nm (สีแดง) และการเพิ่มขึ้นของ peak $\lambda = 620$ nm (สีน้ำเงิน) (ครีซซี่ขวา) ส่งผลให้ตะกอนที่เห็นด้วยตาเปล่าเป็นสีม่วง (เนื่องจากการผสมกันของสีที่เปลี่ยนแปลงที่เกิดจากอนุภาคนาโนทองคำ ในรูปแบบเดียวกับการผสมแม่สีแสง สีแดงและสีน้ำเงิน)

ผลการคัดเลือก oligonucleotide จากตัวอย่าง oligonucleotide ที่คัดเลือกไว้ 3 โมเลกุลเป็นดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การทดสอบเพื่อคัดเลือก oligonucleotide สำหรับตรวจจับโมเลกุลของ CBD โดยใช้โมเลกุล AP03 (ภาพ A) AP06 (ภาพ B) และ AP08 (ภาพ C) เป็น oligonucleotide ที่ทำหน้าที่จับกับ CBD โมเลกุล หลอดหมายเลข 1 อนุภาคนาโนทองคำ หลอดหมายเลข 2 ตัวอย่างที่เป็นบวก หลอดหมายเลข 3 ตัวอย่างที่เป็นลบ

พบว่าเฉพาะ โมเลกุล oligonucleotide CBD1 AP03 เท่านั้นที่แสดงผลต่างระหว่างการป้องกันการตกตะกอนในตัวอย่างที่เป็นบวกและการกระตุ้นการตกตะกอนของอนุภาคทองคำในตัวอย่างที่เป็นลบ ส่งผลให้เห็นสีแดงของอนุภาคทองคำในตัวอย่างที่เป็นบวก (มี CBD ในตัวอย่าง) ขณะที่ตัวอย่างที่เป็นลบกลับเห็นตะกอนทองคำเป็นสีม่วงอ่อน (ภาพที่ 14 A3) ขณะที่ทั้ง โมเลกุล oligonucleotide CBD1 AP06 และ โมเลกุล oligonucleotide CBD1 AP08 พบว่าโมเลกุล oligonucleotide ไม่แสดงผลต่างระหว่างตัวอย่างที่เป็นบวก (มี CBD ในตัวอย่าง) และตัวอย่างที่เป็นลบ

จากผลการทดสอบเบื้องต้น ทำให้ได้ข้อสรุปในการเลือกโมเลกุล oligonucleotide CBD1 AP03 เป็นโมเลกุล oligonucleotide ที่จะใช้เป็น แอนติบอดีในรูปแบบดีเอ็นเอ สำหรับการจับตัวอย่างจำเพาะกับ CBD ตัวอย่าง ซึ่งโมเลกุลดังกล่าวมีผลต่อการพัฒนาวิธีการตรวจในอนาคต

การตรวจการปรากฏของ CBD ด้วย CBD1 AP03 DNAbody

ในการตรวจการปรากฏของ CBD เนื่องจากโมเลกุลดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ใช้เป็นแอนติบอดีอยู่ในรูป DNAbody ทั้งหมดโดยอยู่บนพื้นฐานการใช้โมเลกุลดีเอ็นเอสังเคราะห์เป็นแคณติเตอร์โมเลกุล ภายหลังจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ดี การนำโมเลกุลมาใช้งานจำเป็นต้องวางแผนออกแบบโมเลกุล oligonucleotide ให้สอดคล้องกับรูปแบบในการแสดงสัญญาณโมเลกุล

เนื่องจากอนุภาคนาโนทองคำเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็ก ทำให้พื้นผิวอนุภาคต่อหน่วยปริมาตรมีอยู่สูงมาก (high surface-to-volume ratio) การนำ โมเลกุล oligonucleotide ที่ใช้เป็น DNAbody ไปจับบนผิว

จึงสร้างความได้เปรียบ ไม่นับรวมถึงคุณสมบัติทางพลาสมอน และความปลอดภัยและเข้ากันได้ของทองคำกับชีวโมเลกุล

ในการพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการทดสอบในครั้งนี้ เน้นการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแสงด้วยการเปลี่ยนแปลงทางพลาสมอนของอนุภาคนาโนทองคำ เนื่องจากเทคนิคนี้ให้ความจำเพาะ ความไวของปฏิกิริยาที่ดี และช่วยปรับให้การใช้งานทำได้ง่ายอีกด้วย สำหรับโคลนของ CBD ที่ใช้เป็นฐานในการออกแบบและผลลัพธ์ของโมเลกุลที่ออกแบบเพื่อให้จับกับอนุภาคนาโนทองคำเป็นดังภาพที่ 15 โมเลกุลโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น DNAbody จะจับกับอนุภาคนาโนทองคำได้ด้วยการใช้หมู่ thiol เป็นตัวช่วย

CBD

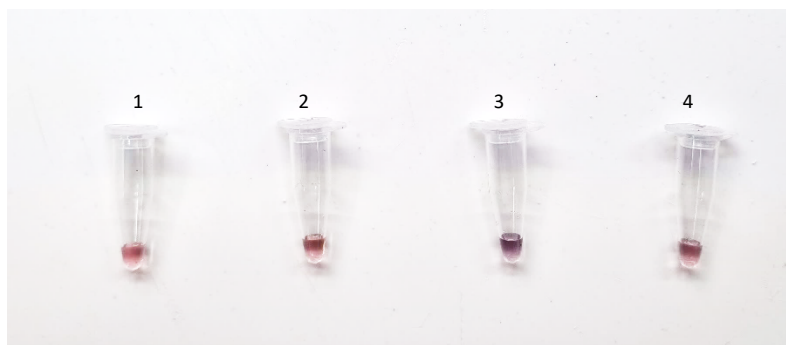
```
5' -TAGGGAAGAGAAGGACATATGATACATGGGGGACGTCGGTCAGGGTAGGTTAGGGGAGAGATTGACTAGTACATGACCACTTGA3'  
3' -ATCCCTTCTCTTCTGTATACTATGTACCCCTCGAGCCAGTCCCATCCAATCCCTCTCTAACTGATCATGTACTGGTGAAGT5'
```

```
5' -GAAGGACATATGATACATGGGGGACGTCGGTCAGGGTAGGTTAGGGGAGAGATTGACTAG AAAAAAAAAAAAAAAAAA-3' Thio  
MC3-D-3'
```

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนของCBD ที่ใช้เป็นฐานในการออกแบบ(บน) และโอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้งานที่ออกแบบได้ (ล่าง ระบายพื้น)

การทดสอบ DNAbodies ที่ได้กับอนุภาคนาโนทองคำ

ภายหลังการสังเคราะห์โมเลกุล oligonucleotide ที่มีหมู่ thiol การทดสอบการจับตัวของ oligonucleotide ที่มีความจำเพาะเพื่อใช้เป็น DNAbody ต่อ CBD โดยอาศัยระบบ functionalized nanoparticles ได้ดำเนินการตามวิธีที่รายงานโดย Liu and Liu (2017) ภายใต้เงื่อนไข ปริมาณของ oligonucleotide ที่ 10 pmol ปริมาณเกลือที่ 20 mM พบว่า oligonucleotide ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสาร CBD เป้าหมาย โดยในภาวะที่ไม่มีตัวอย่าง CBD แต่เป็นตัวอย่างอื่น oligonucleotide ที่จับอยู่ที่ผิวอนุภาคจะสร้างตัวเป็นโครงสร้างมิติ (secondary or tertiary structure) แสดงพฤติกรรมคล้าย double strand DNA และกระตุ้นให้อนุภาคเกิดการจับตัวในภาวะที่มีเกลือเป็นตัวกระตุ้น ส่งผลให้อนุภาคนาโนทองคำเปลี่ยนสีจากแดงเป็นม่วง ขณะที่ ในภาวะที่ตัวอย่างมี CBD ปรากฏอยู่ oligonucleotide ที่เป็น DNAbody ต่อ CBD ที่จับอยู่ที่ผิวอนุภาค จะจับตัวกับ CBD เป็นโครงสร้างเชิงซ้อน ทำให้แสดงพฤติกรรมต่างไปจากดีเอ็นเอปกติ ส่งผลในทางกลับกันให้เกิดการปกป้องพื้นผิวอนุภาคจากการกระตุ้นการตกตะกอนโดยเกลือ หรือให้หลุดพ้นจากการตอบสนองของปฏิกิริยาการจับตัวของอนุภาคในภาวะที่มีเกลือเป็นตัวกระตุ้นได้ จึงทำให้ ยังคงเห็นอนุภาคนาโนทองคำมีสีไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 16)

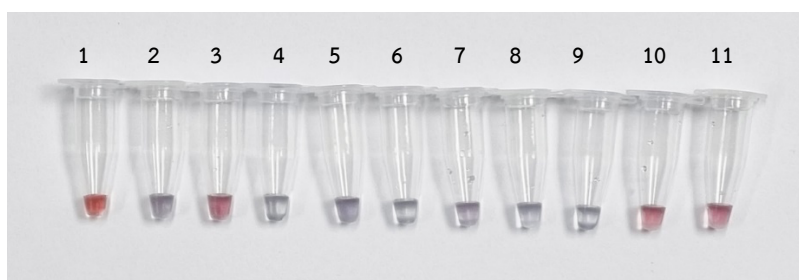


ภาพที่ 16 ผลการทดสอบ DNA bodies functionalized บนอนุภาคทองคำ กับโมเลกุล CBD เป้าหมาย โดย

1.อนุภาคทองคำปกติสำหรับเทียบสี 2. ระบบที่มี DNA bodies functionalized บนอนุภาคทองคำ 3. ตัวอย่างที่ไม่มี CBD (ตัวอย่างที่เป็นลบ) และ 4. ตัวอย่าง CBD เป้าหมาย

ความจำเพาะของปฏิกิริยา

การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา ดำเนินการกับตัวอย่างที่ประกอบไปด้วย caffeine, certified reference material of CBD, Ibuprofen, Buprenorphine, Marcaine, Tramadol, Fentanyl, certified reference material of THC ตัวอย่างกัญชง และตัวอย่างกัญชา โดยใช้เงื่อนไขในการทดสอบเดียวกับที่รายงานในตอนที่ผ่านมา พบว่า เฉพาะหลอดตัวอย่างที่มีสาร CBD reference material และตัวอย่างจากกัญชงและกัญชาที่มี CBD เท่านั้นที่พบการปกป้องพื้นผิวอนุภาคนาโนทองคำจากการกระตุ้นการตกตะกอน โดยเกลือ จึงยังคงเห็นสีของอนุภาคเป็นสีแดงทับทิม (ruby red) ขณะที่ตัวอย่างที่เป็นลบอื่น ทั้ง Caffeine, Ibuprofen, Buprenorphine, Marcaine และ Fentanyl ปฏิกิริยาทำให้อนุภาคทองคำตกตะกอน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของอนุภาคจากสีแดงทับทิมเป็นสีม่วงและเทาในเวลาต่อมา (ภาพที่ 17)

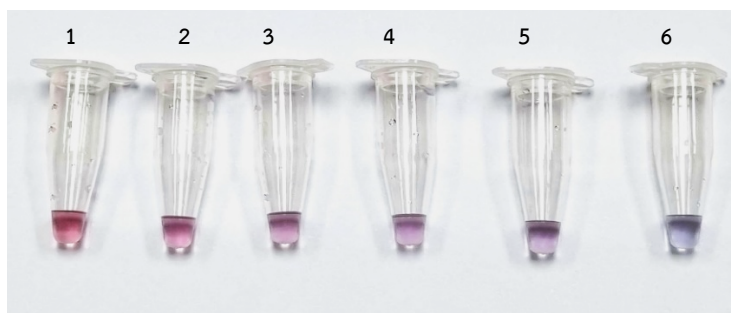


ภาพที่ 17 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา กับตัวอย่าง สารเป้าหมาย ร่วมกับสารที่มีผลกระทบต่อระบบประสาทอื่น จากซ้ายไปขวา 1.Standard 30nm AuNP 2.Negative control (caffeine) 3. Positive control (reference material) 500 ppb 4. Ibuprofen 300 ppb 5. Buprenorphine 500 ppb 6. Marcaine 10^{-1} 7. 8. Fentanyl 9. 100 ppm THC reference material 10. กัญชง เจือจาง 10 เท่า 11. 10^{-1} กัญชา เจือจาง 10 เท่า

ผลดังกล่าวแสดงการทำหน้าที่จับตัวของโมเลกุล oligonucleotide ที่จำเพาะต่อสาร CBD เป้าหมาย และจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ในกลุ่มสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทที่ทดสอบในระบบแต่อย่างใด

ความไวของปฏิกิริยา

การทดสอบความไวของปฏิกิริยา ดำเนินการกับตัวอย่าง CBD reference material ที่ทราบความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นเจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับ โดยกำหนดขอบเขตการทดสอบครอบคลุมความเข้มข้น ตั้งแต่ 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb และ ไม่พบตัวอย่าง หรือ 0 ppb โดยใช้เงื่อนไขในการทดสอบเดียวกับที่รายงานในตอนที่ผ่านมา พบว่า ที่ความเข้มข้นของสาร CBD reference material 10 ppm ถึง 10 ppb เท่านั้นที่พบการปกป้องพื้นผิวอนุภาคนาโนทองคำจากการกระตุ้นการตกตะกอนโดยเกลือ จึงยังคงเห็นสีของอนุภาคเป็นสีแดงทับทิม (ruby red) หรือเริ่มเป็นสีชมพูอ่อน ขณะที่ ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ppb ปฏิกิริยาทำให้อนุภาคทองคำตกตะกอน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของอนุภาคจากสีแดงทับทิมเป็นสีม่วง และเทา



ภาพที่ 18 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา กับตัวอย่าง CBD reference material ที่ทราบความเข้มข้น โดยเจือจางสิบเท่าเป็นลำดับ ครอบคลุมความเข้มข้นตั้งแต่ 1. 10 ppm 2. 1 ppm 3. 100 ppb 4. 10 ppb 5. 1 ppb และ 0 ppb ตามลำดับ

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึง limit of detection ของปฏิกิริยา ที่ 10 ppb เมื่อใช้โมเลกุล oligonucleotide จำเพาะที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ ในการทดสอบการจับตัวผ่านระบบการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำ จากผลการดำเนินการในขั้นต้น ทำให้ได้โมเลกุลของ oligonucleotide ที่จำเพาะต่อ CBD โมเลกุลดังกล่าว สามารถนำไปเชื่อมโยงกับหมู่เคมีเรืองแสง สำหรับการตรวจในรูปแบบ fluorescence หรือนำไปเชื่อมโยงกับดีเอ็นเอขนาดเล็กอื่นเพื่อบ่งบอกภาวะจับ/ไม่จับตรวจ สำหรับตรวจจำแนก CBD ด้วยวิธีการทางเคมีไฟฟ้า หรือเชื่อมโยงกับโมเลกุลเฉพาะที่ลิ้งค์กับ immunogenic molecule เพื่อการตรวจในรูปแบบ immunochromatographic platform ได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bagheri, E., Abnous, K., Alibolandi, M., Ramezani, M., and Taghdisi, S.M. 2018. Triple-helix molecular switch-based aptasensors and DNA sensors. *Biosens Bioelectron.* 111:1–9.
- Bonel, L., Vidal, J. C., Duato, P. and Castillo, J. R. 2011. An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer. *Biosens. Bioelectron.* 26: 3254-3259.
- Cao, F., Lu, X., Hu, X., Zhang, Y., Zeng, L., Chen L. and Sun, M.. 2016. In vitro selection of DNA aptamers binding pesticide fluoacetamide. *Biosci. Biotechnol. Bio chem.* 80: 823-832.
- Chaumpluk, P. and Chaiprasart, P. 2013. Fluorescence biosensor based on N amino ethyl glycine peptide nucleic acid for a simple and rapid detection of *Escherichia coli* in fresh-cut mango. *Acta Horticulturae*, 992: 551-560.
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbeicova, H., and Ruml, T. 2015. Current approaches in SELEX: an update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances* 33:1141-1161.
- Eustis, S. and El-Sayed, M. A. 2006. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* 35: 209-217.
- Keefe, A. D., Pai, S., and Ellington, A. 2010. Aptamers as therapeutics. *Nature*, 537-550.
- Kim, Y.S., Raston, N.H., and Gu, M.B. Aptamer-based nanobiosensors. *Biosens Bioelectron* 76:2–19.
- Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B* 110:15700–15707.
- Li, H., Rothberg, L. 2004. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:14036-9.
- Liu, B., and Liu., J. 2017. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Anal. Methods* 9:2633–2643.

- Lu, C., Tang, Z., Liu, C., Kang, L. and Sun, F. 2015. Magnetic nanobead-based competitive enzyme-linked aptamer assay for the analysis of oxytetracycline in food. *Anal. Bioanal. Chem.* 407:4155-4163.
- Luan, Y., Lu, A., Chen, J., Fu, H. and Xu, L. 2016. A Label Free Aptamer-Based Fluorescent Assay for Cadmium Detection. *Appl. Sci.* 6: 432.
- Patel, B., Wene, D., and Fan, Z.T. 2017. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146:15-23.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463–5467.
- Song, J., Wang, X., and Chang, C.T. 2014. Preparation and characterization of grapheneoxide. *J. of Nanomaterials* 27:6143.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22: 4673–4680.
- Tuerk, C., and Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.
- Woodman, M.E. Savage, C.R., Arnold, W.K., and Stevenson, B. 2016. Direct PCR of Intact Bacteria (Colony PCR). *Current Protocols in Microbiology* 42: A.3D.1-A.3D.7.
