พีเอ็นเอ : นวัตกรรมใหม่ในการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ

PNA : Novel Innovation for DNA Sequence Analysis

บุญจิรา รัตนากรพิทักษ์*
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
Boonjira Rutnakornpituk*
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University.

บทคัดย่อ

พีเอ็นเอหรือเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นโมเลกุลสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับดีเอ็นเอและมีสมบัติที่น่าสนใจหลายประการ เช่น สามารถยึดจับกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงกว่าดีเอ็นเอธรรมชาติ และมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอส จากสมบัติที่ดีเหล่านี้ จึงทำให้ในปัจจุบันได้มีการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้แทนดีเอ็นเอธรรมชาติโดยการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้เป็นตัวติดตามหรือโพรบในการตรวจสอบการปรากฏของลำดับเบสที่สนใจบนดีเอ็นเอ ในบทความวิชาการนี้จะเน้นถึงการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจวัดในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสที่สนใจบนดีเอ็นเอ เช่น เทคนิคทางฟลูออเรสเซนส์ เทคนิคคัลเลอริเมตริก เทคนิคมัลดิ-ทอฟแมสสเปกโทรเมตรีและเทคนิคทางอิเล็คโตรเคมิคอล เป็นต้น

คำสำคัญ : เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด คัลเลอริเมตริก มัลดิ-ทอฟแมสสเปกโทรเมตรี ฟลูออเรสเซนส์

Abstract

PNA or Peptide Nucleic Acid is a synthetic molecule that is structurally similar to DNA. It shows many potential promising features for its use in place of natural DNA. For instance, hybridization of PNA·DNA duplex shows a stronger bonding than that of natural DNA:DNA duplex. In addition, PNA resists to many enzymes such as nuclease and protease. According to special features, many works have been devoted for developing PNA to use as a probe for detection of the DNA sequences. Therefore, this article focuses on the use of PNA in combination with several techniques such as fluorescence, colorimetry, MALDI-TOF mass spectrometry and electrochemical techniques for detection of DNA sequences.

Keywords : Peptide Nucleic Acid, Colorimetry, MALDI-TOF mass spectrometry, Fluorescence

***Corresponding author.** E-mail: b_boonjira@hotmail.com

บทนำ

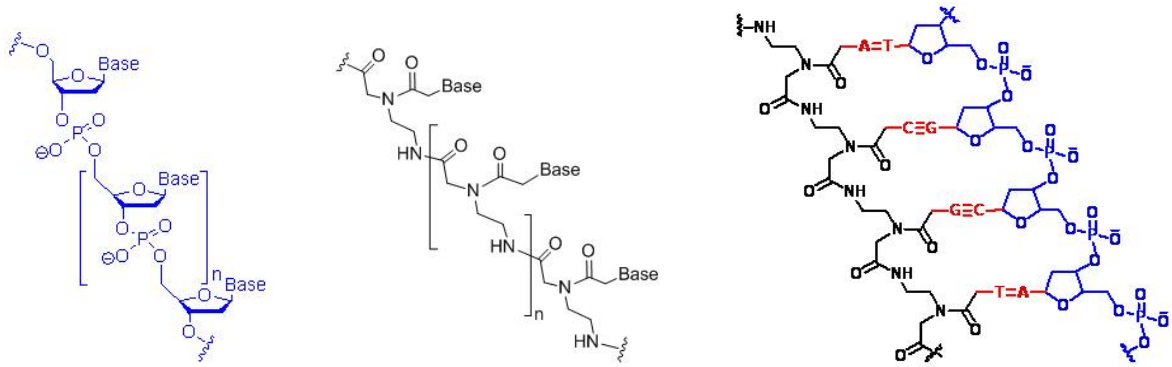
ในปัจจุบันจำนวนของผู้ป่วยที่เป็นโรคทางพันธุกรรมมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งโรคทางพันธุกรรมนั้นเกิดจากการถ่ายทอดความผิดปกติจากพ่อแม่สู่ลูกโดยผ่านยีนและโครโมโซม โรคทางพันธุกรรมที่พบมาก ได้แก่ โรคฮีโมฟีเลียซึ่งมีผลทำให้เลือดแข็งตัวช้าผิดปกติ เมื่อผู้ป่วยมีบาดแผล เลือดจะออกไม่หยุดและอาจเสียเลือดจนเสียชีวิตได้ อีกตัวอย่างหนึ่งคือโรคซาลัสซีเมียซึ่งทำให้ผู้ป่วยเป็นโรคโลหิตเรื้อรัง นอกจากนี้ความผิดปกติของโครโมโซมยังเป็นสาเหตุให้เกิดโรคดาวน์ซินโดรมส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการปัญญาอ่อนและมีหน้าตาผิดปกติ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบตัวยาใดที่จะสามารถยับยั้งหรือรักษาโรคเหล่านี้ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นนักวิจัยจึงทำการศึกษาเพื่อหาวิธียับยั้งการเกิดโรคดังกล่าวตั้งแต่ในระดับพันธุกรรม ซึ่งจะต้องศึกษาถึงระดับโมเลกุลของยีน โดยทั่วไปการถ่ายทอดรหัสพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งสู่รุ่นถัดไปในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดจะเกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดีว่า ดีเอ็นเอ (DNA) หรือมีชื่อเต็มว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) (ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์, 2546) ซึ่งพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้ง คน สัตว์และพืช โดยดีเอ็นเอจะทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต และถ่ายทอดไปสู่ลูกหลาน ไม่ว่าจะเป็นลักษณะที่ปรากฏออกมาเป็นรูปลักษณ์ภายนอกหรือลักษณะภายในที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า

ดีเอ็นเอที่เป็นสายเดียวจะประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่านิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งประกอบด้วยเฮเทอโรไซคลิกเบส 4 เบส คือ ไทมีน (T) อะดินีน (A) ไซโตซีน (C) และกัวนีน (G) เมื่อดีเอ็นเอแต่ละสายมาเข้าคู่กันจะมีรูปร่างเป็นเกลียวคู่คล้ายบันไดลิงที่บิดตัวทางขวา หรือบันไดเวียนขวา และจะมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนของเบสที่เป็นคู่สมกัน โดยเบสไทมีน (T) จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสอะดินีน (A) 2 พันธะ ส่วนเบสไซโตรซีน (C) จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสกัวนีน (G) 3 พันธะ การเข้าคู่กันของเบสเหล่านี้จะเป็นไปตามกฎของวัตสัน-คลิก โดยข้อมูลทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะเกิดขึ้นจากการเรียงลำดับของเบสในดีเอ็นเอนั่นเอง (Watson & Crick, 1953 ; Blackburn & Gait, 1996)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าดีเอ็นเอเทคโนโลยีมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์ในหลายๆ ด้าน เช่น การหาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprint การพิสูจน์สารพันธุกรรม (DNA diagnosis) การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) และการหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งส่วนใหญ่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ เพื่อนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปเป็นตัวติดตามหรือโพรบ (probe) ในการตรวจสอบลำดับเบสที่ผิดปกติของดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบความผิดปกติของโรคทางพันธุกรรมบางชนิด หรือพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาแอนติยีน-แอนติเซนส์ (antigene-antisense drug) (Dias & Stein, 2002) แต่เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตอยู่ในสายโซ่หลักทำให้มีประจุลบภายใต้สภาวะของร่างกายปกติและมีความเป็นขั้วสูง จึงทำให้ไม่เสถียรและถูกย่อยด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสได้ง่าย (Watson & Crick, 1953) จากข้อจำกัดเหล่านี้ของดีเอ็นเอจึงทำให้มีนักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการสังเคราะห์สารเลียนแบบดีเอ็นเอเพื่อพัฒนาสมบัติบางประการทั้งในเรื่องสมบัติการจับยึด (hybridization) กับดีเอ็นเอหรือการเพิ่มความเสถียรต่อเอ็นไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอสเพื่อใช้แทนโอลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติ

ในปี ค.ศ 1991 ทีมนักวิจัยจากประเทศเดนมาร์กสามารถสังเคราะห์สารประกอบเลียนแบบดีเอ็นเอที่เรียกว่าเปปไทด์-นิวคลีอิกแอซิด (Peptide Nucleic Acid) หรือพีเอ็นเอ (PNA) (Uhlmann *et al*., 1998) โดยโมเลกุลของพีเอ็นเอนี้สามารถเกิดจากการแทนที่หมู่น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตในดีเอ็นเอด้วยหน่วยที่ซ้ำๆ กันของ 2-อะมิโนเอธิลไกลซีน เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ขึ้นในโมเลกุล โดยชนิดของเบสในโมเลกุลของพีเอ็นเอก็ยังคงเหมือนกับดีเอ็นเออยู่ ดังภาพที่ 1

พีเอ็นเอมีสมบัติที่คล้ายคลึงกับดีเอ็นเอธรรมชาติ โดยสามารถยึดจับกับดีเอ็นเอเกิดเป็นโครงสร้างเกลียวคู่พันเกลียวคล้ายบันไดวนได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน–คริก เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอ ซึ่งมีความเสถียรมากกว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอตามธรรมชาติด้วยกันเอง ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของพีเอ็นเอประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์ที่ไม่มีประจุ ทำให้การเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอปราศจากแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตดังที่พบในโมเลกุลเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและดีเอ็นเอด้วยกันเอง นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอ็นเอยังมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอสอีกด้วย จึงทำให้พีเอ็นเอมีความเสถียรในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ด้วยสมบัติที่น่าสนใจเหล่านี้จึงทำให้มีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับพีเอ็นเออย่างต่อเนื่องเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานต่างๆ เช่นด้านการเกษตร ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์ เช่น การใช้พีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอ พีเอ็นเอ และ สารคู่ผสมดีเอ็นเอกับพีเอ็นเอ

เพื่อควบคุมการแสดงออกทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยหลักการของแอนติเซนส์ (antisense) โดยอาศัยการติดฉลากสารนำพาเข้าสู่เซลล์และการติดฉลากสารเรืองแสงกับโมเลกุลของพีเอ็นเอเพื่อศึกษาการทำงานของยีนในสิ่งมีชีวิต (Hyrup & Nielsen, 1991; Nielsen, 2004) นอกจากนี้ยังมีการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้แทนดีเอ็นเอเพื่อเป็นโพรบในการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมและใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัยทางชีววิทยาโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งนำไปพัฒนาชุดตรวจโรคที่ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อให้มีความว่องไวและถูกต้องมากขึ้น (Uhlmann *et al*., 1998; Franck & Petra, 2004; Hahm & Lieber, 2004; Gao *et al*., 2007) งานวิจัยที่ผ่านมานั้นส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการนำเอาพีเอ็นเอมาในงานด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้เป็นโพรบในการตรวจสอบลำดับเบสที่สนใจของดีเอ็นเอตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรม หรือการตรวจหาการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ โดยการตรวจวิเคราะห์นี้จำเป็นต้องใช้ควบคู่กับเทคนิคตรวจวัดรูปแบบต่างๆ เพื่อให้มีความสะดวก หลากหลาย รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น

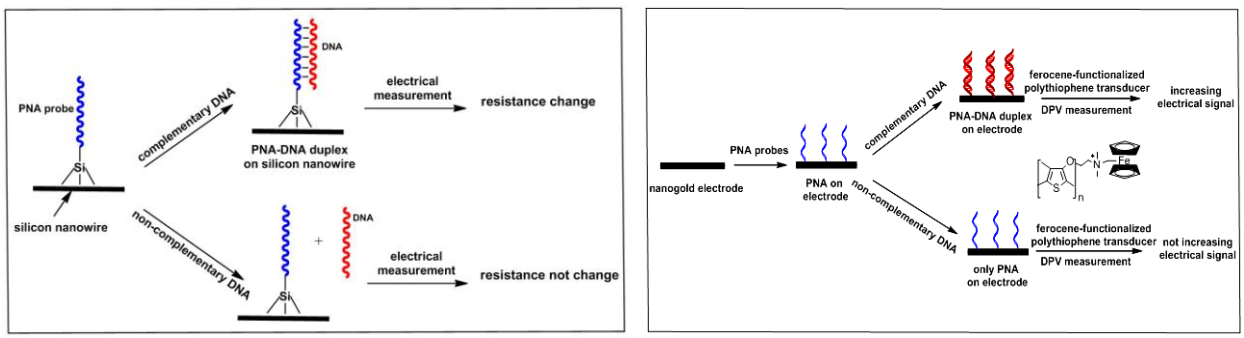
โดยทั่วไปเทคนิคที่นำมาใช้ร่วมกับพีเอ็นเอเพื่อมาใช้เป็นโพรบในการตรวจสอบลำดับเบสที่สนใจของดีเอ็นเอนั้นมีหลายเทคนิคด้วยกัน ซึ่งในบทความวิชาการนี้จะกล่าวถึงตัวอย่างงานวิจัยบางส่วนที่มีการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิครูปแบบต่างๆ โดยจะแบ่งตามลักษณะของสัญญาณการตรวจวัด (sensing mechanism) ของเทคนิคนั้นๆ ซึ่งได้แก่

1. เทคนิคทางอิเล็คโตรเคมิคอล (Electrochemical technique)

วิธีนี้เป็นวิธีการตรวจสอบการปรากฏของลำดับเบสที่สนใจบนดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณค่าการนำไฟฟ้า ก่อนและหลังการยึดจับกันระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ ตัวอย่าง ตัวอย่างเช่น การนำเอาพีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสารกึ่งตัวนำ (semiconductor) ประเภทซิลิกอน (Gaylord *et al*., 2002; Liu & Bazan, 2005) โดยอาศัยการตรึงพีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสที่แน่นอนลงบนพื้นผิวของลวดนาโนซิลิกอน (silicon nanowire) เพื่อทำเป็นพีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์หรือเป็นพีเอ็นเอชิปสำหรับใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยสมบัติด้านการนำไฟฟ้าบนพื้นผิวของลวดนาโนซิลิกอนเป็นตัวตรวจวัด โดยก่อนและหลังการจับยึดกันระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอนั้นค่าการนำไฟฟ้าบนพื้นผิวของลวดนาโนซิลิกอนจะแสดงค่าที่แตกต่างกัน กล่าวคือเมื่อเกิดการยึดกันระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเข้าคู่กัน ค่าการนำไฟฟ้าบนพื้นผิวของลวดนาโนซิลิกอนจะมีค่ามากกว่าในกรณีที่ดีเอ็นเอมีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมซึ่งจะทำให้สามารถบอกการปรากฏของลำดับเบสที่สนใจบนดีเอ็นเอตัวอย่างได้ ดังภาพ 2A

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับวัสดุอื่นอีก เช่น การนำเอาพีเอ็นเอมาตรึงไว้บนผิวของอิเล็คโทรดที่ทำการดัดแปลงพื้นผิวด้วยอนุภาคทองและใช้สารประเภทแคทไอออนิค-พอลิไธโอฟีน (cationic polythiophene) ที่มีสารเฟอร์โรซีนอยู่ในโมเลกุลซึ่งเป็นสารที่สามารถเกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุกับดีเอ็นเอและเป็นตัวทรานส์ดิวเซอร์ (transducer) (Willhelmsson *et al*., 2002) โดยจะทำหน้าที่แปลงสัญญาณของการยึดจับกันระหว่างพีเอ็นเอกับตัวอย่างดีเอ็นเอให้กลายเป็นกระแสไฟฟ้าและสามารถทำการตรวจสอบกระแสไฟฟ้าบนผิวของอิเล็คโทรดที่เกิดขึ้นได้โดยใช้เทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตตรี (Differential pulse voltammetry, DPV) ซึ่งถ้าดีเอ็นเอมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ

พีเอ็นเอและดีเอ็นเอบนผิวของอิเล็คโทรดขึ้น เมื่อเติมสารประเภทแคทไอออนิคพอลิไธโอฟีนที่มีสารเฟอร์โรซีนลงไปจะทำให้สารชนิดนี้เกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุบวกของสารประเภทแคทไอออนิคกับประจุลบของดีเอ็นเอจะมีผลทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าบนผิวของอิเล็คโทรดมีค่าสูง ในทางกลับกันถ้าตัวอย่างดีเอ็นเอมีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอจะทำให้บนผิวของอิเล็คโทรดไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอขึ้นมีผลทำให้ค่าทางไฟฟ้าบนผิวของอิเล็คโทรดมีค่าลดลง ซึ่งวิธีนี้สามารถบอกการปรากฏของลำดับเบสที่สนใจบนดีเอ็นเอตัวอย่างได้โดยดูจากค่ากระแสไฟฟ้าบนผิวอิเล็คโทรดที่เปลี่ยนแปลงไป ดังภาพ 2B



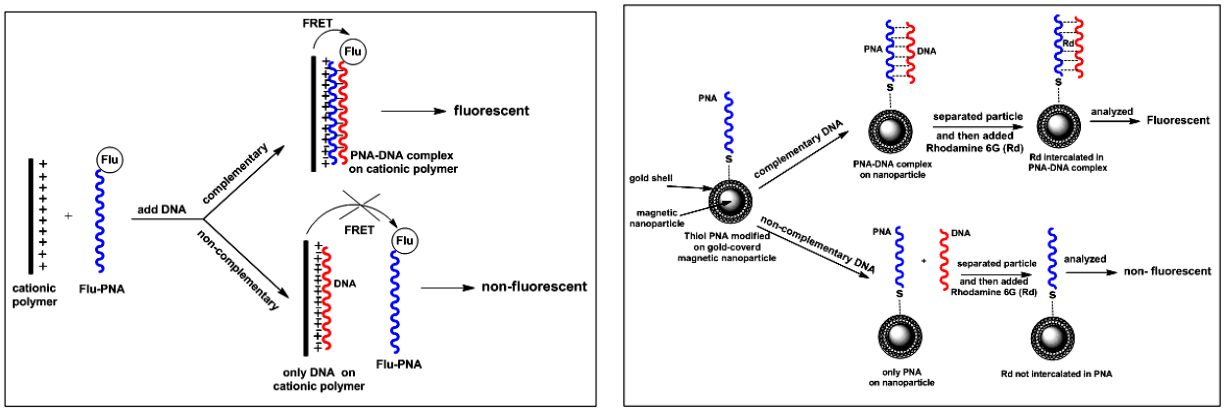
ภาพที่ 2 A : การใช้พีเอ็นเอมาตรวจสอบลำดับเบสที่สนใจของดีเอ็นเอจากค่าการนำไฟฟ้าบนพื้นผิวของลวดนา โนซิลิกอน
B : การใช้พีเอ็นเอตรวจสอบลำดับเบสที่สนใจของดีเอ็นเอจากกระแสไฟฟ้าบนผิวของอิเล็คโทรดที่เกิดขึ้น

2. เทคนิคทางฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence technique)

โดยทั่วไปวิธีนี้เป็นวิธีการตรวจสอบลำดับเบสที่สนใจของดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณของการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนส์ที่ติดอยู่กับพีเอ็นเอโพรบหรือดีเอ็นเอตัวอย่าง เมื่อมีการจับยึดกันของพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันเกิดขึ้น ตัวอย่างเช่นการติดสารฟลูออเรสเซนส์บางชนิดที่ปลายสายของพีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสที่แน่นอนเพื่อใช้เป็นโพรบในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยการนำมาใช้ร่วมกับแคทไอนิกพอลิเมอร์เรืองแสงและอาศัยหลักการของ FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) และใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปคโตรสโคปี (Fluorescence spectroscopy) ตรวจวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนส์นั้น (Ross & Belgrader, 1997; Jiang-Baucom *et al*., 1997) ซึ่งถ้าดีเอ็นเอตัวอย่างมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอโพรบจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอขึ้นมีผลทำให้สารประกอบเชิงซ้อนนี้ไปเกาะอยู่ที่พื้นผิวของพอลิเมอร์เรืองแสง ทั้งนี้เนื่องจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุบวกของพอลิเมอร์กับประจุลบของสารประกอบเชิงซ้อนพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอนั่นเองทำให้ระยะห่างระหว่างพอลิเมอร์เรืองแสงกับสารฟลูออเรสเซนส์ที่ติดบนพีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถเกิดปรากฏการณ์ FRET ได้ มีผลทำให้เกิดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนส์ที่ติดอยู่กับพีเอ็นเอ ในทางตรงกันข้ามถ้าดีเอ็นเอตัวอย่างมีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอจะทำให้พื้นผิวของแคทไอออนิกพอลิเมอร์มีเฉพาะดีเอ็นเอเท่านั้นทำให้ระยะห่างระหว่างพอลิเมอร์เรืองแสงกับสารฟลูออเรสเซนส์ที่ติดบนพีเอ็นเออยู่ห่างกันมากเกินไปทำให้ปรากฏการณ์ FRET ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนส์ที่ติดอยู่บนพีเอ็นเอจึงไม่เกิดขึ้น วิธีนี้สามารถบอกการปรากฏของลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างได้โดยดูจากสัญญาณของการเรืองแสงของที่เปลี่ยนไปของสารฟลูออเรสเซนส์ที่ติดอยู่บนพีเอ็นเอนั่นเอง ดังภาพ 3A

นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างอื่นอีก เช่นการตรึงโมเลกุลของพีเอ็นเอที่มีการดัดแปลงปลายสายด้วยหมู่ไธออลไปบนอนุภาคนาโนแม่เหล็กที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยทอง (Pita *et al*., 2008) และใช้ร่วมกับสารเรืองแสงประเภทโรดามีน 6G (Rhodamine 6G) ซึ่งทำหน้าที่ให้สัญญาณโดยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งถ้าตัวอย่างดีเอ็นเอมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอบนอนุภาคขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างหมู่ไธออลที่ติดอยู่ที่ปลายของพีเอ็นเอโพรบกับทองที่เคลือบบนอนุภาคแม่เหล็กและเมื่อเติมสารประเภทโรดามีน 6G ลงไปสารชนิดนี้จะสามารถเข้าไปแทรก (intercalate) ในสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอ

กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันที่อยู่บนอนุภาคได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารเรืองแสงชนิดนี้จะเกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุบวกกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอได้เท่านั้น การเรืองแสงของโรดามีน 6G นี้สามารถตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปคโตรสโคปี ในทางกลับกันถ้าตัวอย่างดีเอ็นเอไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอ สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอจะไม่เกิดขึ้น ทำให้บนอนุภาคมีแต่เฉพาะพีเอ็นเอโพรบเท่านั้นซึ่งโรดามีน 6G ไม่สามารถเข้าไปแทรกในโมเลกุลของพีเอ็นเอได้ ดังนั้นการเรืองแสงของโรดามีน 6G จะไม่เกิดขึ้นทำให้สามารถบอกการปรากฏของลำดับเบสที่สนใจบนดีเอ็นเอตัวอย่างได้โดยพิจารณาจากการเรืองแสงของโรดามีน 6G ที่เกิดขึ้น ดังภาพ 3B



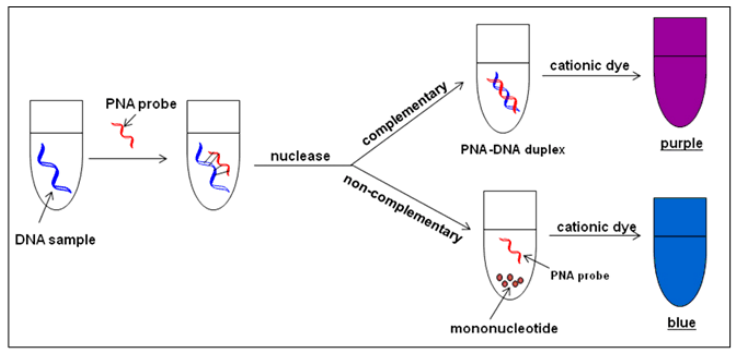
ภาพที่ 3 A : แสดงการใช้พีเอ็นเอร่วมกับอนุภาคพอลิเมอร์เรืองแสงมาตรวจสอบการปรากฏของลำดับเบสดีเอ็นเอที่สนใจ
B : แสดงการใช้พีเอ็นเอร่วมกับอนุภาคแม่เหล็กเพื่อตรวจสอบการปรากฏของลำดับเบสดีเอ็นเอที่สนใจ

3. เทคนิคคัลเลอริเมตริก (Colorimetric technique)

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคการตรวจสอบการปรากฏของลำดับเบสดีเอ็นเอที่สนใจโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย เมื่อการยึดจับของพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีลำดับเบสคู่สมกันเกิดขึ้น ตัวอย่างของเทคนิคนี้ เช่นการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับเอ็นไซม์นิวคลีเอสและเทคนิคการย้อมสารละลายด้วยสีย้อมประเภทแคทไอออนิก (cationic dye) บางประเภท เช่น 3,3-ไดเอธิลอะไดคาร์โดไซยาไนต์ ($DisC_2(5)$) ซึ่งสีย้อมชนิดนี้สามารถใช้ย้อมสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอได้ และจะให้สีที่แตกต่างจากโมเลกุลของสีอิสระ (Fang *et al*., 2008) ซึ่งถ้าดีเอ็นเอตัวอย่างมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอโพรบจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอในสารละลายขึ้น ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอนี้จะทนต่อการย่อยด้วยเอ็นไซม์นิวคลีเอส เมื่อสารละลายนี้ถูกย้อมด้วยสีย้อมประเภทแคทไอออนิกชนิดนี้จะเกิดเป็นสารละลายสีม่วงขึ้น แต่ถ้าดีเอ็นเอตัวอย่างมีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอนั้นจะไม่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอขึ้น ดังนั้นเมื่อทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์นิวคลีเอสแล้วดีเอ็นเอเท่านั้นที่จะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์กลายเป็นนิวคลีโอไทด์ทำให้เหลือแต่พีเอ็นเอโมเลกุลอิสระ เมื่อถูกย้อมด้วยสีย้อมชนิดนี้จะเกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินซึ่งทำให้บอกความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างได้โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายหลังจากการเติมสีย้อมลงไป ดังภาพ 4

4. เทคนิคมัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปี (MALDI-TOF mass spectroscopy technique)

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของตัวอย่างดีเอ็นเอโดยพิจารณาจากมวลโมเลกุลของพีเอ็นเอโพรบที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อมีการยึดจับกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเข้าคู่กัน ตัวอย่างเช่น การนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับตัวดูดซับของแข็งประเภทอนุภาคแม่เหล็ก และใช้เทคนิคมัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปีตรวจสอบ (Mehiri *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2003) โดยวิธีนี้จะอาศัยการติดสารประเภทไบโอติน (biotin) ที่ปลายสายของตัวอย่างดีเอ็นเอจากนั้นนำไปจับยึดกับพีเอ็นเอโพรบที่รู้ลำดับเบสที่แน่นอน ซึ่งถ้าดีเอ็นเอมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอขึ้น หลังจากนั้นทำการแยกเอาเฉพาะสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอออกจากพีเอ็นเอที่ไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการใช้อนุภาคแม่เหล็กที่เคลือบด้วยสารสเตรปตาวิดิน

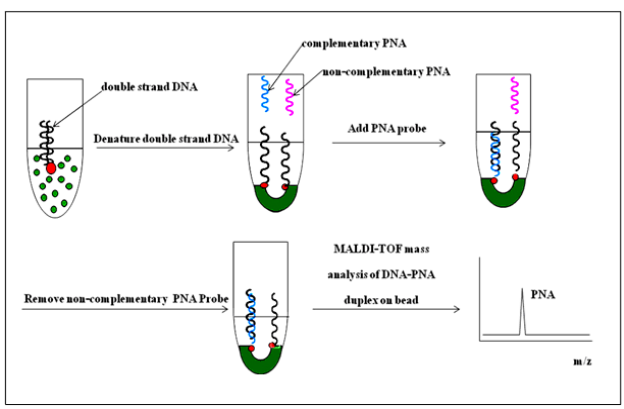


ภาพที่ 4 แสดงการใช้พีเอ็นเอมาตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคคัลเลอริเมตริก

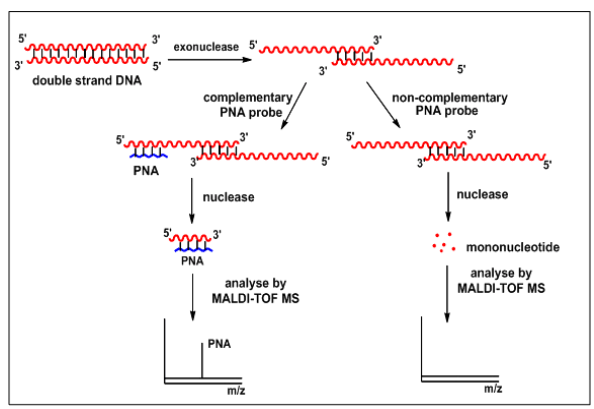
(streptavidin) ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างหมู่ไบโอตินที่ติดอยู่ที่ปลายของดีเอ็นเอตัวอย่างกับสเตรปตาวิดินที่เคลือบบนอนุภาคแม่เหล็กจะมีผลทำให้ที่ผิวของอนุภาคแม่เหล็กมีเฉพาะสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและตัวอย่างดีเอ็นเอเท่านั้น จากนั้นจึงนำอนุภาคแม่เหล็กที่มีเฉพาะสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคมัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปีซึ่งผลที่ได้จะแสดงเฉพาะมวลโมเลกุลของพีเอ็นเอโพรบที่ใช้เท่านั้นเนื่องจากโมเลกุลของพีเอ็นเอซึ่งเป็นเปปไทด์สามารถไอออไนซ์ได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอมากซึ่งจะทำให้ทราบลำดับเบสของตัวอย่างดีเอ็นเอได้ ดังภาพ 5A

อีกตัวอย่างของเทคนิคนี้คือ การนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับเอนไซม์เอคโซนิวคลีเอสและนิวคลีเอส มาตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอเกลียวคู่ (Ren *et al*., 2004) โดยวิธีนี้ขั้นแรกจะอาศัยการย่อยดีเอ็นเอเกลียวคู่ทางด้านปลาย 5’ ด้วยเอนไซม์เอคโซนิวคลีเอสเพื่อให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อน แล้วจึงนำไปจับยึดกับพีเอ็นเอโพรบที่รู้ลำดับเบสที่แน่นอน และหลังจากนั้นทำการเติมเอนไซม์นิวคลีเอส ถ้าพีเอ็นมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้วจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอขึ้นซึ่งจะทนต่อการย่อยของเอนไซม์นิวคลีเอส ในขณะที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ไม่มีลำดับเบสคู่สมกับพีเอ็นเอโพรบจะถูกย่อยกลายเป็นนิวคลีโอไทด์ ทำให้ในสารละลายเหลือแต่เฉพาะสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น เมื่อนำสารละลายนี้ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคมัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปี ผลก็จะแสดงเฉพาะมวลโมเลกุลของพีเอ็นเอโพรบที่ใช้เท่านั้น ดังภาพ 5B

จากที่กล่าวมาข้างต้นเป็นเพียงบางตัวอย่างของการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยดูลักษณะสัญญาณการตรวจวัดของเทคนิคที่แตกต่างกันออกไป โดยแต่ละเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางต่อไปนี้



A



B

ภาพที่ 5 A : การใช้พีเอ็นเอมาตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปี
B : การใช้พีเอ็นเอร่วมกับเอนไซม์เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปี

ตารางที่ 1 แสดงข้อดีและข้อเสียของแต่ละเทคนิคที่กล่าวข้างต้น (Lorincz, 2006; ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์, 2546)

เทคนิค	ข้อดี	ข้อเสีย
อิเล็คโตรเคมิคอล	1. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ 2. ใช้สารในปริมาณน้อย	1. พีเอ็นเอที่ใช้จำเป็นต้องดัดแปลงปลายสายให้เหมาะสมกับลักษณะพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำให้มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน 2. ไม่สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างแบบมัลติเพล็กได้
ฟลูออเรสเซนส์	1. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ 2. ใช้สารในปริมาณน้อย	1. พีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่ใช้จำเป็นต้องดัดแปลงปลายสายด้วยหมู่ฟลูออเรสเซนส์ซึ่งทำให้มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก 2. สารฟลูออเรสเซนส์บางชนิดมีราคาค่อนข้างแพง 3. ไม่สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างจำนวนมากๆ ได้ในเวลาเดียวกันได้
คัลเลอริเมตริก	1. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ 2. บางวิธีพีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่ใช้ไม่จำเป็นต้องดัดแปลงปลายสายด้วยหมู่ฟังค์ชั่นอื่นๆ 3. ใช้สารในปริมาณที่น้อย	1. ไม่สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างจำนวนมากๆ ได้ในเวลาเดียวกันได้ 2. ไม่สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างแบบมัลติเพล็กได้ 3. สีย้อมบางชนิดมีราคาค่อนข้างแพง
มัลดิทอฟ-แมสสเปคโตรสโคปี	1. พีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่ใช้ไม่จำเป็นต้องดัดแปลงปลายสายด้วยหมู่ฟังค์ชั่นอื่นๆ 2. มีความไวสูง, รวดเร็วและใช้สารในปริมาณที่น้อย 3. สารที่มาตรวจสอบไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มาก 4. สามารถวิเคราะห์สารจำนวนมากๆ ได้ในเวลาเดียวกันได้	1. เครื่องมือมีราคาแพง 2. วิเคราะห์เชิงปริมาณได้ยาก

บทสรุป

จะเห็นได้ว่าจากสมบัติของพีเอ็นเอที่ดีกว่าดีเอ็นเอธรรมชาติทั้งทางด้านการยึดจับอย่างแข็งแรงและจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอรวมถึงความเสถียรต่อเอนไซม์ดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้น จึงทำให้มีการนำเอาพีเอ็นเอมาใช้แทนดีเอ็นเอธรรมชาติเพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นสิ่งที่ยืนยันถึงศักยภาพที่ดีและประโยชน์ของพีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี โดยการใช้ประโยชน์ที่สำคัญของพีเอ็นเอส่วนใหญ่จะอยู่ในเรื่องของการนำมาเป็นโพรบตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมเป็นหลักและในปัจจุบันได้มีการนำเอาพีเอ็นเอไปพัฒนาต่อยอดเป็นพีเอ็นเอชิปเพื่อใช้เป็นเครื่องมือตรวจลำดับเบสของสารพันธุกรรม รวมไปถึงพัฒนาไปเป็นชุดอุปกรณ์ตรวจโรคบางชนิดซึ่งการพัฒนาดังกล่าวนี้เป็นการเพิ่มเทคโนโลยีใหม่จากพีเอ็นเอในวงการแพทย์อีกทางหนึ่งและตราบใดที่จำนวนของผู้ป่วยที่เป็นโรคทางพันธุกรรมยังมีจำนวนมากอยู่นั้น การนำเอาพีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์การตรวจสอบหาความผิดปกติทางพันธุกรรมก็ยังคงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ รศ. ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นอย่างสูง ที่ช่วยให้คำแนะนำและตรวจทานบทความนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. (2546). ยีนและยีโนมของมนุษย์. *เวชศาสตร์โมเลกุล*, 1-33.

Blackburn, G.M., & Gait, M.J. (1996). *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. (pp-20-25). New York: Oxford University Press Inc.

Dias, N., & Stein, C.A. (2002). Antisense Oligonucleotides; Basic Concepts and Mechamisms. *Molecular Cancer Therapeutics, 1*, 347-355.

Fang, B., Jiao, S., Li, M., Qu, Y., & Jiang, X. (2008). Label-free Electrochemical Detection of DNA Using Ferrocene-containing Cationic Polythiophene and PNA Probes on Nanogold Modified Electrodes. *Biosensors and Bioelectronics, 23*, 1175-1179.

Franck, P., & Petra, P. (2004). The Peptide Nucleic Acids (PNAs); Powerful Tools for Molecular Genetics and Cytogenetics, *European Journal of Human Genetics, 12*, 694-700.

Gao, Z., & Agarwal, A., Trigg, A.D., Singh, N., Fang, C., Tung, C.H., Fan, Y., Buddharaju, K.D., & Kong, J. (2007). Silicon Nanowire Arrays for Label-free Detection of DNA. *Analytical Chemistry, 79*, 3291-3297.

Gaylord, B.S., Heeger, A.J., & Bazan, G.C. (2002). DNA Detection Using Water-soluble Conjugated Polymers and Peptide Nucleic Acid Probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99*, 10954-10957.

Hahm, J.I., & Lieber, C.M. (2004). Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors. *Nano Letters, 4*, 51-54.

Hyrup, B., & Nielsen, P.E. (1991). Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 4*, 5-23.

Jiang-Baucom, P., Girard, J.E., Butler, J., & Belgrader, P. (1997). DNA Typing of Human Leukocyte Antigen Sequence Polymorphisms by Peptide Nucleic Acid Probes and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry, 69*, 4894-4898.

Liu, B., & Bazan, G.C. (2005). Methods for Strand-specific DNA Detection with Cationic Conjugated Polymers Suitable for Incorporation into DNA Chips and Microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102*, 589-593.

Lorincz, A. (2006). *Nucleic Acid Testing for Human Disease*. (pp-170-175). CRC Press.

Mehiri, M., Caldarelli, S., Barouillet, T., Giorgio, A. D., Doglio, A., Condom, R. & Patino, N. (2007). A ''Ready-To-Use'' Fluorescent-labelled-cysteine-TBTP (4-thiobutyltriphenylphosphonium) Synthon to Investigate the Delivery of Non-permeable PNA (Peptide Nucleic Acids)-based Compounds to Cells. *Bioorganic Chemistry., 35*, 313–326.

Nielsen, P.E. (2004). *Peptide nucleic acid protocols and application*. (pp-1-20). Horizon Bioscience.

Pita, M., Abad, J. M., Vaz-DFominguez, C., Briones, C., & Mateo-Marti, E. (2008). *Journal of Colloid and Interface Science, 321*, 484-492.

Ren, B., Zhou, J.-M., & Komiyama, M. (2004). Straightforward Detection of SNPs in Double-Stranded DNA by Using Exonuclease III/Nuclease S1/PNA System. *Nucleic Acids Research, 32*, e42.

Ross, P.L., Lee, K., & Belgrader, P. (1997). Discrimination of Single Nucleotide Polymorphisms in Human DNA Using Peptide Nucleic Acid Probed Detected by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry, 69*, 4197-4202.

Uhlmann, E., Peyman, A., Breipohl, G., & Will, D.W. (1998). PNA: Synthesis Polyamide Nucleic acids with Unusual Binding Properties. *Angewandte Chemie International Edition, 37*, 2796-2823.

Watson, J.D., & Crick, F.H. (1953). A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature, 171*, 737-738.

Willhelmsson, L.M., Nordén, B., Mukherjee, K., Dulay, M.T., & Zare, R.N. (2002). Genetic Screening Using the Colour Change of a PNA-DNA Hybrid-binding Cyanine Dye. *Nucleic Acids Research, 30*, e3.

Zhou, P., Wang, M., Du, L., Fisher G.W., Waggoner A., & Ly, D.H. (2003). Novel Binding and Efficient Cellular Uptake of Guanidine-based Peptide Nucleic Acids (GPNA). *Journal of the American Chemical Society, 125*, 6878-6879.