

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อุตสาหกรรมอาหารสดหั่นชิ้นเป็นอุตสาหกรรมที่มีอัตราการเติบโตสูงสุดในกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้เนื่องจากอุปสงค์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากผู้บริโภคที่ต้องการความสะดวกสบายภายใต้มาตรฐานการดำรงชีวิตที่สูงขึ้นในปัจจุบัน (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2547) นอกจากนี้ด้วยกระแสการใส่ใจในสุขภาพทำให้อุดมการณ์ของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้แปรรูปในรูปอาหารสดหั่นชิ้นเพิ่มสูงขึ้นมาก ในสหรัฐอเมริกายอดขายของสินค้าผักและผลไม้แปรรูปในรูปอาหารสดหั่นชิ้นสูงถึง 15000 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2005 การเติบโตของอุปสงค์เดียวกันพบได้ในตลาดยุโรปและกำลังขยายตัวในตลาดเอเชีย

ในปี 2546 ออสเตรเลียนำเข้าสินค้าผักและผลไม้แช่แข็งมีมูลค่าสูงถึง 21.13 ล้านดอลลาร์สหรัฐเพิ่มขึ้นในอัตรา 38.01% โดยทั้งนี้เป็นการนำเข้าจากประเทศไทย คิดเป็นมูลค่าถึง 0.334 ล้านดอลลาร์สหรัฐ

ภายใต้ภาวะแข่งขันอย่างรุนแรงของตลาดในปัจจุบันและการค้าเสรีที่จะมีขึ้นในอนาคต นอกจากการแข่งขันในเรื่องราคาแล้ว การแข่งขันในคุณภาพและความปลอดภัยในตัวสินค้าอาหารจัดเป็นดัชนีที่สำคัญ เมื่อรูปแบบและระเบียบควบคุมเกี่ยวกับอาหารในสากลเปลี่ยนไป (WHO, 2003) การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในอาหารเพื่อหาหลักฐานที่เชื่อมโยงทางวิทยาศาสตร์ในการบ่งบอกคุณภาพและความปลอดภัย เพื่อสำรวจและยกระดับคุณภาพของอาหารของไทยไปสู่สากลเป็นเรื่องที่จำเป็นซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการผลักดันยุทธศาสตร์การแข่งขันครัวของโลกของประเทศ

ปัญหาที่เกิดขึ้นในทศวรรษที่ผ่านมาทั้งการระบาดของวัวบ้า (BSE) ปัญหาการปนเปื้อน GMOs และการระบาดของไข้หวัดนกทำให้การพัฒนาตรวจวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกได้รับความนิยมและพัฒนาก้าวหน้าไปมากกว่าเทคนิคการตรวจสอบบนพื้นฐานโมเลกุลอื่น (Lockley and Bardsley, 2000) เนื่องจากโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกเป็นโมเลกุลในอาหารที่มีเสถียรภาพและจะสลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการได้ช้ากว่า (ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ์, 2543) และการตรวจสอบไปที่โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกนี้เป็นที่สิ้นสุดและสามารถใช้เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์

การตรวจบนพื้นฐานโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก จะประกอบด้วยขั้นตอน 3 ประการ ได้แก่ การสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้ออาหาร การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมายและการตรวจสอบสัญญาณของกรดนิวคลีอิกเพื่อการแสดงผลการสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้ออาหารเป็นขั้นตอนที่ได้รับการพัฒนาไปมาก วิธีการการสกัดดีเอ็นเอและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเอนิเมออิงตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้รายงานไว้ในแหล่งข้อมูลต่างๆเช่น AOAC หรือตามที่ปรากฏในวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานตามเอกสารของแต่ละประเทศ ส่วนใหญ่มักจะพบว่าสามารถนำหลักการและวิธีมาปรับแต่ง

ให้มีความสะดวก เหมาะสม ให้ง่าย และมีประสิทธิภาพ สอดคล้องไปกับตัวอย่างที่ส่งมาวิเคราะห์ได้ ไม่ยากนัก หากมีความรู้ความเข้าใจก็จะสามารถปรับแต่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้ออาหาร แต่ละชนิดได้

ในขั้นตอนที่สอง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีจำนวนมาก (amplification) นั้น ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส หรือ PCR (Polymerase Chain Reaction) มาใช้ ตัวเทคนิคมีบทบาทอย่างมากในงานวิจัยสาขาต่างๆ ช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายใดๆที่นักวิทยาศาสตร์สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างที่ไม่เคยมีมาก่อน โดยหลักการ เทคนิค PCR เลียนแบบการจำลองดีเอ็นเอในธรรมชาติ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase หนร้อน กลไกเริ่มจากการคลายเกลียวของดีเอ็นเอแม่แบบด้วยความร้อนทดแทนการทำหน้าที่ของเอนไซม์ helicase และ topoisomerase จนได้ดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นสายเดี่ยว ssDNA จากนั้นอาศัยความจำเพาะของดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่เป็น oligonucleotide primer แทนการสังเคราะห์ RNA primer ในธรรมชาติโดยเอนไซม์ primase ช่วยให้เกิดการจับตัวระหว่าง oligonucleotide primer กับดีเอ็นเอแม่แบบภายหลังการลดอุณหภูมิลง เมื่อไพรเมอร์มาจับตัวกับดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นสายเดี่ยวที่ได้จากขั้นตอนแรก บริเวณปลาย 3' ของ primer จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวออกไปด้วยปฏิกิริยา polymerization โดยพอลิเมอร์เรส หนร้อนที่เรียกว่า thermophilic DNA polymerase โดยใช้ dNTP เป็นวัตถุดิบ ทั้ง 3 ขั้นตอนมี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน การคลายเกลียวที่เรียกว่า denaturation จะดำเนินการที่ 50-53°C การชักนำให้ไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอแม่แบบเรียกว่า annealing จะดำเนินการที่ 50-55°C และท้ายสุด การต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นเรียกว่า extention จะดำเนินการที่อุณหภูมิ 70-73°C ในหนึ่งรอบดีเอ็นเอจะเพิ่มจาก 1 เป็น 2 และเมื่อครบ 30 รอบ จะเพิ่มดีเอ็นเอได้ในระดับ 1030 ล้านโมเลกุล ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ต้องขึ้นกับระบบการควบคุมอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับให้แม่นยำอยู่ตลอดเวลา การควบคุมอุณหภูมิอยู่นี้ดำเนินการในรูปอุปกรณ์เฉพาะที่รู้จักในนาม thermo cycler (Saiki, 1988)

การที่ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้องผูกติดกับระบบควบคุมอุณหภูมิ ทำให้การดำเนินการต้องลงทุนด้านเครื่องมือ ซึ่งปัจจุบันมีราคาไม่น้อยกว่า 3-4 แสนบาทสำหรับตัวมาตรฐาน และต้องใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่อาจนานถึง 3-4 ชั่วโมง ต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะความชำนาญ และต้องเสริมด้วยเทคนิคบางเทคนิคในการวิเคราะห์ วินิจฉัยและสรุปผล เหล่านี้ทำให้ไม่สามารถตอบสนองหลักการ point of care ที่เน้นการตรวจวิเคราะห์ที่ดำเนินการได้ในทุกที่ แม้ในคลินิกเล็กๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม ในสถานที่เกิดเหตุ หรือในไร่ นา เป็นต้น

แม้ในปัจจุบัน เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อหลายชนิด ตรวจการปนของพืชตัดแปรพันธุกรรม ตรวจหาโอกาสปนด้วยโมเลกุลที่กระตุ้นการเกิดภูมิแพ้ ตรวจหาชนิดของเนื้อสัตว์ และความแท้ของสายพันธุ์ ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าใช้งานได้เป็นอย่างดี (Lockley and Bardsley, 2000) อย่างไรก็ตามการพัฒนาระบบที่ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์อาหารใน

ประเทศไทยมีอยู่น้อยมาก เทคนิคที่ใช้ในต่างประเทศต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและใช้บุคลากรที่มีความรู้ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปขยายผล นอกจากนี้ขาดการพัฒนาให้อยู่ในรูปชุดสำเร็จที่ใช้งานได้ง่าย การพัฒนาต่อยอดจึงมีความจำเป็น (Chaumpluk, 2003)

นวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันส่งผลให้วิธีการตรวจมีความหลากหลายมากขึ้น ตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequence-based amplification) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเอง (self-sustained replication) (Guatelli *et al.*, 1990) การเพิ่มปริมาณโดยการใช้ปฏิกิริยาแทนที่สายดีเอ็นเอ (strand displacement amplification) และการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิระนาบเดียว (Walker *et al.*, 1992) โดยการชักนำในระบบห่วง (Loop mediated isothermal amplification) (Notomi, 2000) นอกเหนือจากนี้ยังพบว่าผู้คิดค้นวิธีการเพิ่มปริมาณสัญญาณที่เป็นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ได้แก่ branched DNA amplification (bDNA) invader และ rolling circle amplification (Lyamichev *et al.*, 1999 และ Lizardi *et al.*, 1998) ซึ่งเทคนิคในกลุ่มหลังจัดเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณเป้าหมาย

จากการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียทางเทคนิคพบว่า นอกจากเทคนิค PCR แล้ว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำในระบบห่วง (LAMP) มีข้อเด่นกว่าเทคนิคอื่นโดยเฉพาะการใช้อุณหภูมิระนาบเดียว (Notomi, 2000) โดยที่ไม่มีกระบวนการทางความร้อนต่างระดับอุณหภูมิ ภาคลายสายดีเอ็นเอจากเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวมาเกี่ยวข้อง จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ปฏิกิริยา LAMP อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่มีกิจกรรมแทนที่สายดีเอ็นเอในตัว โดยการผลัดสายดีเอ็นเอเดิมให้หลุดออกและแทนที่ด้วยการสังเคราะห์สายใหม่ การใช้ไพรเมอร์ 2-3 คู่ ทำให้ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาสูงมาก มากกว่าเทคนิค PCR ที่เคยทำได้ถึง 1000 เท่าในเวลาที่น้อยกว่า นำให้เทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากแหล่งที่มีดีเอ็นเอหลากหลายชนิดปนกัน เช่นที่พบในอาหาร การที่อุณหภูมิเป็นระนาบเดียวที่ 65°C (BcaBest™ DNA polymerase) จึงทำให้การตรวจสอบไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติที่ใช้สำหรับ PCR ซึ่งมีราคาแพง จึงเหมาะอย่างยิ่งในการออกแบบระบบตรวจสอบให้สามารถดำเนินการได้ แม้ในสถานที่ที่ขาดความพร้อมของเครื่องมือ

ขณะที่ขั้นตอนสุดท้าย การตรวจวิเคราะห์สัญญาณซึ่งถือเป็นขั้นตอนสำคัญมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา ด้วยวิธีการใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพ การตรวจเอกสารเกี่ยวกับการทดสอบอาหารในช่วงล่าสุด 10 ปี พบการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงของโมเลกุลสี fluorophore ทั้งในรูปแบบไมโครและนาโน เช่น SYBR green (Lipsky *et al.*, 2001) Gy3 Gy5 ฯลฯ และการนำหลักการถ่ายทอดพลังงานระหว่างโมเลกุล (FRET) ของโมเลกุล probe มาใช้ร่วมกับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การจับตัวระหว่าง probe กับดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นไปตามหลักการ hybridization ของกรดนิวคลีอิกพื้นฐาน อย่างไรก็ตามการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern hybridization จำเป็นต้องดำเนินการผ่านระบบเมมเบรน ทำให้ยุ่งยากและใช้เวลา นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่อง background ของสัญญาณดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้

การแก้ปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการนำ DNA analogues มาประยุกต์ใช้ DNA analogues เหล่านี้ยังคงจับตัวเป็นไปตามกฎคู่สมของ Watson and Click Model ซึ่งในปัจจุบัน DNA analogues กลุ่มนี้มี peptide nucleic acid (PNA) เป็นโมเลกุลที่ได้รับความสนใจมากที่สุด

PNA เป็นโมเลกุลชนิดใหม่ที่เป็นสายผสมระหว่างโครงสร้างของสาย peptide backbone กับเบสของกรดนิวคลีอิก มีคุณสมบัติที่สามารถจับตัวกับดีเอ็นเอในลักษณะเดียวกันกับดีเอ็นเอแต่จะให้ affinity ในการจับตัวและความจำเพาะที่สูงกว่า (Nielsen *et al.*, 2004) และที่สำคัญการจับตัวนั้นไม่เกี่ยวข้องกับเกลือในระบบ คุณสมบัติดังกล่าวช่วยให้ PNA มีความโดดเด่น การจับตัวในรูปแบบพิเศษกว่าดีเอ็นเอเช่นนี้จะถูกทำลายลงทันทีหากการจับตัวเป็นแบบ mismatch แม้เพียงนิวคลีโอไทด์เดียว PNA จึงเหมาะสมต่อการตรวจสอบดีเอ็นเอใดๆ ทั้งในระบบ perfect match และ single nucleotide polymorphism (SNP) ที่มีความแตกต่าง 1 นิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันเริ่มมีรายงานการใช้ PNA ในการตรวจ human papilloma virus (HPV) ทำให้สามารถจำแนกไวรัสทั้ง 32 ไทป์ด้วยโพลบที่เป็น PNA ทั้ง 32 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Thiede *et al.*, (1996) รายงานการใช้ PNA ในการตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *ras* proto onco gene และ Carlsson *et al.*, (1996) ได้ประยุกต์ใช้ PNA probe ร่วมกับ capillary electrophoresis ในการตรวจ SNP ด้วยเหตุนี้ PNA จึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในระบบตรวจวิเคราะห์

ในช่วง 2 – 3 ปีที่ผ่านมาความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีโดยเฉพาะในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ materials science และเคมีโมเลกุล ช่วยให้การตรวจวิเคราะห์พัฒนาไปสู่ การตรวจวิเคราะห์บนพื้นฐานของหลักการทางกายภาพ(physic) มากขึ้น เช่นการวัดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงทางแสงจากการจับตัวของโมเลกุลเรืองแสง การเปลี่ยนแปลงทางแสงอันเนื่องจากการเปลี่ยนไปของระดับพลังงานของอนุภาคอิเล็กทรอนิกส์ของอะตอมเป้าหมายที่เชื่อมโยงกับสัญญาณโมเลกุล การเปลี่ยนไปของการสั่นสะเทือนของฟลิกควอซ เหล่านี้เป็นตัวอย่างที่ช่วยทำให้การตรวจวิเคราะห์บนพื้นฐานของการตรวจดีเอ็นเอหลุดจากพันธนาการที่เป็นกำแพงขวางกั้นที่จะต้องดำเนินการโดยอาศัยเครื่องมือและประสบการณ์เฉพาะทางไปสู่ยุคที่สามารถดำเนินการตรวจวิเคราะห์ได้อิสระได้ทุกที่ ทุกเวลา กล่าวคือสามารถตอบสนองต่อหลักการ point of care test หรือตอบสนองการตรวจในรูปแบบ field monitoring ได้เป็นอย่างดี อยู่ที่ว่าควรเลือกเทคนิคใดมาประกอบเข้ากับขั้นตอนใด พร้อมเชื่อมโยงให้เกิดการทำงานในภาพรวมที่ประกอบเข้าเพื่อตอบคำถามขนาดของสัญญาณทางโมเลกุลที่ต้องการวัดที่เชื่อมโยงไปสู่ข้อมูลคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารที่กำลังสนใจในที่สุด

สำหรับประเทศไทย ในการกำหนดยุทธศาสตร์ให้ไทยเป็นครัวของโลกนั้น การดำเนินการเพื่อกระตุ้นคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารถือว่าเป็นกิจกรรมสำคัญ เนื่องจากในกรอบเวทีที่การแข่งขันในตลาดการค้าเสรีที่จะมาถึงภายใน 5-10 ปีข้างหน้า เกณฑ์คุณภาพและความปลอดภัยของอาหารมาตรฐานในระดับสากล จะใช้เป็นเครื่องมือหลักในการประกันคุณภาพ และความปลอดภัย และเป็นสิ่งซึ่งที่เชื่อมโยงตรงกับภาพลักษณ์ของสินค้าที่ประเทศไทยส่งออก

โครงการนี้ใช้จุดแข็งของความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุลซึ่งเป็นจุดแข็งของทีมงานวิจัยที่มีอยู่แล้วมาบูรณาการร่วมกับนวัตกรรมทางเทคโนโลยีเน้นการนำองค์ความรู้และหลักการทางไบโอ/นาโนเทคโนโลยีมาใช้ ในการพัฒนาการตรวจคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารในกลุ่มผลไม้สดแปรรูป เน้นการตรวจบนพื้นฐานการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมายด้วยวิธีการอย่างง่ายในรูปชุดสำเร็จ โดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และการตรวจสัญญาณด้วยวิธีการใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพ

โครงการจะนำปัญหาหลักที่จำเป็นต้องให้การดูแลเร่งด่วนได้แก่ การรับรองความตรงพันธุ์ การตรวจการปนของเชื้อก่อโรค และการตรวจดัชนีทางคุณภาพ มาพัฒนาเป็นวิธีนวัตกรรมในรูปแบบชุดสำเร็จรูปรองรับ ปัญหาหลักดังกล่าวมีระเบียบรองรับและส่งผลกระทบต่อการผลิตและส่งออกของอาหารกลุ่มนี้

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แนวใหม่ด้วยไบโอ/นาโนเซ็นเซอร์นี้ ยังช่วยให้ลดการขาดดุลในเรื่องการสั่งซื้อน้ำยาจากต่างประเทศ ช่วยให้การตรวจรับรองมีประสิทธิภาพซึ่งเชื่อมโยงทางอ้อมไปสู่ภาพลักษณ์และความเชื่อมั่นในตัวสินค้า และช่วยให้เกิดการต่อยอดทางเทคโนโลยีแนวใหม่ โดยเฉพาะการใช้ PNA และ metal nanoparticle มาประยุกต์ร่วมกับหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งในระบบ bead PCR และ LAMP และการประยุกต์ใช้โครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจจับเพื่อช่วยให้การวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารออกมาอยู่ในรูปชุดทดสอบอย่างง่ายโดยใช้ไบโอ/นาโนเซ็นเซอร์โดยเฉพาะ PNA ในรูป beta pyrrolidinyI PNA และ gold หรือ silver nanoparticles ในระบบ colorimetric detection ที่ต่างไปจากที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดยที่ไม่มีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือยุ่งยาก ให้ผลการตรวจไว และนำไปใช้นอกสถานที่ได้ ผลลัพธ์ดังกล่าวเป็นนวัตกรรมที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินการ จึงเป็นการวิจัยเพื่อเพิ่มศักยภาพในด้านนำในงานวิจัยด้านคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหาร การดำเนินการช่วยให้ได้องค์ความรู้ในระดับผู้นำด้านการประยุกต์ศาสตร์ทางนาโนเทคโนโลยีเข้ากับการวิจัยการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารได้ในเวลาอันสั้น เหล่านี้เหมาะสมกับทั้งภาวะของประเทศไทยและภาวะความจำเป็นและความต้องการที่จะต้องตรวจรับรองคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารตามหลัก point of care ในระดับสากลของผู้ประกอบการ

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจรับรองคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารที่เหมาะสมกับการตรวจผลิตภัณฑ์ในกลุ่มผลไม้สดแปรรูป ในรูปชุดสำเร็จรูปอย่างง่ายแบบคล่องตัว
2. เพื่อสร้างระบบการตรวจสอบร่วมกับผู้ประกอบการ ถ่ายทอดและอบรมการดำเนินการตามคู่มือเพื่อการนำร่องสู่การรับรองจริง

## บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

### กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่นอกจากจะช่วยให้ชีวิตอยู่รอดแล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับสุขภาพและพลาสมาที่ดี โดยเฉพาะอาหารในกลุ่มผักและผลไม้ซึ่งเป็นแหล่งให้วิตามินและ เยื่ออาหาร สารประกอบในกลุ่มไบโอแอคทีฟ และ สารต้านอนุมูลอิสระ กระแสความต้องการบริโภคอาหารในกลุ่มนี้จึงพุ่งสูงขึ้นมากในปัจจุบัน

อุตสาหกรรมอาหารในส่วนผักและผลไม้สดเพิ่มขึ้นและแปรรูปเป็นอุตสาหกรรมที่มีอัตราการเติบโตสูงสุดในกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้เนื่องจากอุปสงค์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากผู้บริโภคที่ต้องการความสะดวกสบายภายใต้มาตรฐานการดำรงชีวิตที่สูงขึ้นในปัจจุบัน (กรมส่งเสริมการค้าส่งออก, 2547) นอกจากนี้ด้วยกระแสการใส่ใจในสุขภาพทำให้ยอดจำหน่ายของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้แปรรูปในรูปอาหารสดเพิ่มขึ้นเพิ่มสูงขึ้นมาก

ภายใต้ภาวะแข่งขันอย่างรุนแรงของตลาดในปัจจุบันและการค้าเสรีที่จะมีขึ้นในอนาคต นอกจากการแข่งขันในเรื่องราคาแล้ว การแข่งขันในคุณภาพและความปลอดภัยในตัวสินค้าจัดเป็นดัชนีที่สำคัญ การตรวจสอบและให้การรับรองที่ถูกต้องและเหมาะสม เป็นมาตรการที่สอดคล้องกับที่องค์กรระหว่างประเทศเรียกร้องให้ให้ความสำคัญและต้องพิถีพิถันในเรื่องคุณภาพและความปลอดภัยมากขึ้น (WHO, 2003) และยังคงสอดคล้องกับกฎ ระเบียบต่างๆ ที่มีปฏิบัติในต่างประเทศ

การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพความปลอดภัยในผลไม้สดเพิ่มขึ้น นั้นจำเป็นต้องตรวจหาหลักฐานเชื่อมโยงกับคุณภาพและอันตรายที่เกี่ยวข้องซึ่งสามารถดำเนินการได้ด้วย การประเมินทางกายภาพ และทางเคมี ขณะที่ความเสี่ยงอาจอยู่ในรูปสิ่งมีชีวิตจำพวก เชื้อโรคทำโดยการตรวจทางจุลชีววิทยา และความเสี่ยงในรูปสารเคมีหรืออันตรายทางกายภาพตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ทางเคมีและกายภาพ ซึ่งที่ผ่านมาจะพบว่าการทดสอบทางเคมีและกายภาพโดยรวมมีข้อจำกัด เทคนิคการตรวจสอบสมัยใหม่จึงพัฒนาสู่การทดสอบเชิงโมเลกุลมากขึ้นโดยเฉพาะโปรตีนและดีเอ็นเอที่พบในเนื้ออาหาร (Lockley and Bardsley, 2000) องค์ประกอบสารเคมีในเนื้ออาหารจะเปลี่ยนไปตามความชื้น รูปแบบในการแปรรูป และสารเคมีที่อยู่ในระบบแปรรูปนั้น ความชื้นในรูปแบบทั้งหมดทำให้โมเลกุลโปรตีนในเนื้ออาหารอาจเสื่อมสลายไปก่อน การตรวจวิเคราะห์จึงทำได้ยากขึ้น และเมื่อองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เปลี่ยนไป โมเลกุลที่จะตรวจสอบได้ก็จะมีน้อยลง เทคนิคการตรวจสอบไปที่โมเลกุลดีเอ็นเอนี้ สามารถดำเนินการได้แม้ในภาวะที่ตัวอย่างผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนมาก่อน (Chaumpluk, 2003)

เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจ เช่นการตรวจเชื้อ การตรวจการปนของวัตถุดิบตัดแปรรูปธรรมชาติ ตรวจหาชนิดของเนื้อสัตว์ และความแท้ของสายพันธุ์ ตัว

เทคนิคเป็นที่ยอมรับว่าใช้งานได้เป็นอย่างดี (Lockley and Bardsley, 2000) อย่างไรก็ตาม เทคนิค PCR มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้เครื่อง thermocycler และใช้บุคลากรที่มีความรู้เฉพาะทาง ทำให้ต้องจำกัดการวิเคราะห์อยู่เฉพาะห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์ต้องอาศัยกระบวนการมากกว่า 1 ขั้นตอน ทำให้ต้องใช้เวลา 2-5 วันกว่าจะทราบผล เหล่านี้เป็นข้อจำกัดในการนำไปขยายผล

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ให้ตอบสนองความต้องการทั้งในแง่ความง่าย ความรวดเร็ว ความแม่นยำและไม่พึ่งพาห้องปฏิบัติการทำให้สามารถไปใช้ในภาคสนามหรือนอกสถานที่ได้ จำเป็นต้องดำเนินการเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่ การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณทางดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับดัชนีชี้บ่งภาวะทางคุณภาพและความปลอดภัย และการตรวจจับสัญญาณโดยใช้นวัตกรรมสมัยใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและสนองตอบหลักการ point of care

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิระนาบเดียว ช่วยลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ ตอบโจทย์ point of care ได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันมีรายงานในหลายรูปแบบ เช่น เทคนิคการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอ Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) ที่อาศัยกลไกการเพิ่มปริมาณด้วย T7 RNA polymerase self-sustained sequence replication (3SR) ที่อาศัยเอ็นไซม์ 3 ชนิดได้แก่ T7 RNA polymerase Rnase H และ MMLV reverse transcriptase (Guatelli et al, 1990) strand displacement amplification (SDA) ที่ใช้เอ็นไซม์จำเพาะควบคู่กับ DNA polymerase (Walker et al, 1992) และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ที่อาศัยกลไกการวนตัวแบบ loop ของบริเวณไพรเมอร์ 6 บริเวณ (Notomi et al., 2000)

อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาความเฉพาะเจาะจงและความสะดวกในการปฏิบัติการแล้ว วิธี LAMP เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงมาก โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยใช้อุณหภูมิระนาบเดียวและเอ็นไซม์เฉพาะ โดยอาศัยไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ 6 บริเวณของยีนเป้าหมาย โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 40 นาที โดยไม่ต้องใช้สารเคมีหรือเครื่องมือพิเศษอื่นๆ จึงทำให้สามารถประยุกต์ใช้กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการได้เป็นอย่างดี

สำหรับการตรวจการตรวจจับสัญญาณ พบว่าในทางปฏิบัติการใช้คุณสมบัติคู่สมของดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจที่แม่นยำ (Palchetti et al., 2008) และหากพิจารณาในรายละเอียด จะพบว่า ความจำเพาะ รวดเร็วและแม่นยำเป็นหัวใจสำคัญในการพัฒนาเทคนิค (Hahn et al., 2005, Sassolas et al., 2008.) การตรวจวิเคราะห์ที่ต้องตอบโจทยี่นี้จำเป็นต้องอาศัยหลักการไฮบริดซ์เข้มข้นระหว่างกรดนิวคลีอิกที่แสดงภาวะคู่สมระหว่างกันในแต่ละสาย การศึกษาในระยะหลังพบว่า PNA สามารถตอบโจทยี่ในการ (Wang et al., 1998)

PNA เป็นกรดนิวคลีอิกที่มีโครงสร้างของกระดูกฟอสเฟตแบบโคบอนเป็นเปปไทด์สังเคราะห์ พัฒนาขึ้นและนำมาใช้ครั้งแรกโดย Nielsen และคณะ (Nielsen et al., 2001) ความเป็นกลางของกระดูกอะมิโนในโมเลกุลของ PNA แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลไม่มี electrostatic repulsion

จึงทำให้การจับตัวมีเสถียรภาพสูงมาก จึงเป็นข้อดีที่ช่วยให้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทั้งในรูปดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อย่างเหมาะสม

ดังนั้นหากสามารถออกแบบสร้างระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพและความปลอดภัยในผลไม้หั่นขึ้นได้ พร้อมกับการออกแบบระบบการตรวจสอบสัญญาณในรูปแบบ rapid Southern hybridization ได้ ก็จะสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบอย่างง่ายและรวดเร็วที่ตอบสนองหลักการ point of care ได้เป็นอย่างดี

ในการพัฒนาวิธีการตรวจบนพื้นฐานไบโอนานอโนในครั้งนี้อาศัยการเชื่อมโยงและพัฒนาแนวคิดการตรวจแนวใหม่ นวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันส่งผลให้วิธีการตรวจมีความหลากหลายมากขึ้นตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequence-based amplification) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเองโดยการชักนำในระบบห่วง (Loop mediated isothermal amplification) (Notomi, 2000) ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งในการออกแบบระบบตรวจสอบให้สามารถดำเนินการได้ แม้ในสถานที่ที่ขาดความพร้อมของเครื่องมือ เนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่ใหม่มาก และอยู่ในช่วงเริ่มต้น ปัจจุบันยังไม่มีผู้นำเทคนิคมาใช้ทดสอบดีเอ็นเอในผลไม้และผักมาก่อน การบุกเบิกนำเทคนิคมาต่อยอดเพื่อการตรวจวิเคราะห์จะช่วยตรวจสอบระดับคุณภาพและความปลอดภัยในอาหารทำได้แม้ในภาวะความไม่พร้อมทางเครื่องมือซึ่งเหมาะกับประเทศแล้ว ยังช่วยสร้างโอกาสในการในการเป็นผู้นำนวัตกรรมนี้ในการตรวจวิเคราะห์อาหารโดยเฉพาะในกลุ่มผักและผลไม้ได้

สำหรับการตรวจสอบและติดตามสัญญาณดีเอ็นเอ ในปัจจุบันการพัฒนาโมเลกุลในระดับนาโนไบโอก้าวหน้าไปมาก PNA สามารถใช้ร่วมกับหลักการเรืองแสงในรูปการถ่ายทอดพลังงานจากตัวโมเลกุลของสีส่งถ่ายไปยังโมเลกุลอื่นขณะจับตัวกับซิงติเอ็นเอ (FRET) โดยตัวจับที่มีผลต่อ probe สามารถออกแบบให้เฉพาะกับยีนที่สนใจและให้อยู่ในรูปโครงสร้าง 2 มิติ เพื่ออาศัยกลไกการจับตัวแสดงปฏิกิริยาด้วยหลักการเรืองแสง (Clegg, 1992) หรือการนำหลักการ Plasmon ของอนุภาคนาโนของโลหะในรูปแบบ unmodified nanoparticle มาประยุกต์ในรูป colorimetric ทำให้การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เข้าสู่ระบบตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบนาโนเซ็นเซอร์ ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและอาจทำให้การตรวจสอบทำได้ง่ายขึ้น

### **การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง**

การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพความปลอดภัยในผลไม้สดหั่นขึ้น นั้นจำเป็นต้องตรวจหาหลักฐานเชื่อมโยงกับคุณภาพและอันตรายที่เกี่ยวข้องให้ได้ โดยปกติคุณภาพและความปลอดภัย อาจวัดได้ด้วยการประเมินทางกายภาพ ทางเคมี ขณะที่อันตรายอาจอยู่ในรูปสิ่งมีชีวิตจำพวก เชื้อโรค ในรูปสารเคมีหรืออันตรายทางกายภาพที่พบในอาหารซึ่งมีผลต่อสุขภาพ ที่ผ่านมา

การทดสอบทางกายภาพและเคมีโดยรวมมีข้อจำกัด จึงพัฒนาสู่การทดสอบเชิงโมเลกุลมากขึ้น โดยเฉพาะโปรตีนและดีเอ็นเอที่พบในเนื้ออาหาร (Lockley and Bardsley, 2000)

ในอาหารแปรรูป องค์ประกอบสารเคมีในเนื้ออาหารจะเปลี่ยนแปลงไปตามความซับซ้อน รูปแบบในการแปรรูป และสารเคมีที่อยู่ในระบบแปรรูปนั้น ความซับซ้อนในรูปแบบทั้งหมดทำให้ โมเลกุลโปรตีนในเนื้ออาหารอาจเสื่อมสลายไปก่อน การตรวจวิเคราะห์จึงทำได้ยากขึ้น และเมื่อ องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงไป โมเลกุลที่จะตรวจสอบได้ก็จะมีน้อยลง เทคนิคการตรวจสอบ ไปที่โมเลกุลดีเอ็นเอนี้ สามารถดำเนินการได้แม้ในภาวะที่ตัวอย่างผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนมา ก่อน (Chaumpluk, 2003)

การวิเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอในฐานะเป็นตัวกลางที่เชื่อมโยงไปถึงคุณภาพ และ อันตรายในอาหารได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน (Lockley and Bardsley, 2000) ความนิยมนี้ ช่วยให้การประยุกต์การตรวจโมเลกุลดีเอ็นเอขยายครอบคลุมไปถึงการจำแนกสายพันธุ์ การตรวจ ภาวะปัจเจกและความแท้ของพันธุ์ การวิเคราะห์โรค การตรวจสอบการติดเชื้อ การตรวจทางนิติ วิทยาศาสตร์ การตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ และตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมเพื่อช่วยการปรับปรุง พันธุ์ ทั้งนี้เพราะโมเลกุลดีเอ็นเอมีเสถียรภาพสูง ย่อยสลายในภาวะรุนแรงได้ช้ากว่าโมเลกุลชนิดอื่น (Bauer, 2003) การตรวจสอบไปที่โมเลกุลดีเอ็นเอนี้จึงสามารถเชื่อมโยงตรง และเป็นดัชนีชี้บอกภาวะ ทางคุณภาพและอันตรายในอาหารได้

การตรวจสอบนิยมใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป็นหัวใจหลัก โดย หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นอันที่ได้รับความสนใจมากที่สุด ตัวเทคนิคกระตุ้นให้เกิด การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบถัดๆ ไป จากการใช้ความร้อนในการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่คลายตัวออก พร้อมสังเคราะห์ดีเอ็นเอโมเลกุลใหม่ จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่น้อยในตอนเริ่มต้นให้มาก ขึ้นได้ (Saiki *et al.*, 1988) ปัจจุบันระบบดังกล่าวประยุกต์ได้เป็น 2 รูปแบบได้แก่ การใช้อุปกรณ์ ขนาดเล็ก วิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า และใช้เทคนิคการเรืองแสงของ โมเลกุลเคมีเป็นสื่อเชื่อมโยงไปสู่การระบุปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นซึ่งทำให้สามารถคำนวณปริมาณดี เอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจริงในแต่ละหน่วยเวลา (real-time) ได้

เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อหลายชนิด ตรวจการ ปนของพืชดัดแปรพันธุกรรม ตรวจหาโอกาสปนด้วยโมเลกุลที่กระตุ้นการเกิดภูมิแพ้ ตรวจหาชนิด ของเนื้อสัตว์ และความแท้ของสายพันธุ์ ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าใช้งานได้เป็นอย่างดี (Lockley and Bardsley, 2000) อย่างไรก็ตามการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์อาหารใน ประเทศไทยมีอยู่น้อยมาก เทคนิคที่ใช้ในต่างประเทศต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและใช้บุคลากรที่มีความรู้ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปขยายผล นอกจากนี้ขาดการพัฒนาให้อยู่ในรูปชุดสำเร็จที่ใช้งานได้ ง่าย การพัฒนาต่อยอดจึงมีความจำเป็น (Chaumpluk, 2003)

สำหรับการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ให้ตอบสนองความต้องการจำเป็นต้อง ดำเนินการเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่ การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณทางดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับ

ดัชนีชี้บอกภาวะทางคุณภาพและอันตรายในอาหารและการตรวจจับสัญญาณโดยใช้นวัตกรรมสมัยใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและสนองตอบหลักการ point of care ในทางปฏิบัติ การใช้กรดนิวคลีอิกแอซิดเป็นตัวจับสัญญาณที่ปรากฏจากสิ่งมีชีวิตในการพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์เป็นศาสตร์แขนงใหม่ในการพัฒนาเทคโนโลยีการวิเคราะห์ (Palchetti et al., 2008) หากพิจารณาจากความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน จะพบว่าการสร้างระบบตรวจจับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป้าหมายด้วยความจำเพาะสูง รวดเร็วและแม่นยำเป็นหัวใจสำคัญ (Hahn et al., 2005, Sassolas et al., 2008.) พื้นฐานการตรวจวิเคราะห์นี้อาศัยหลักการไฮบริดซ์เซชันระหว่างกรดนิวคลีอิกที่แสดงภาวะคู่สมระหว่างกันในแต่ละสาย ด้วยระบบนี้ ความสามารถในการจับแบบคัดเลือกตามคุณสมบัติคู่สมมีความสำคัญต่อความสำเร็จของระบบวิเคราะห์ (Wang et al., 1998) ความสามารถในการคัดเลือกเพื่อจับตัวกับสายคู่สมขึ้นอยู่กับ การคัดเลือกโพรบที่เหมาะสมและการจับตัวของดีเอ็นเอ ดังนั้น การออกแบบโพรบจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ การศึกษาในระยะหลังพบว่าการใช้นิวคลีอิกแอซิดที่มีการดัดแปลงโครงสร้างไปจากธรรมชาติจะให้ความเฉพาะเจาะจงในการจับตัวสูงกว่ามาก ในบรรดาโมเลกุลในกลุ่มดังกล่าว พบว่า PNA มีความโดดเด่นเป็นพิเศษ (Wang et al., 1998)

PNA เป็นอนุภาคของกรดนิวคลีอิกที่มีโครงสร้างของกระดูกฟอสเฟตแบบโคโบนถูกทดแทนด้วยโครงสร้างเปปไทด์สังเคราะห์ PNA พัฒนาขึ้นครั้งแรกและนำมาใช้งานในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาในรูปโพลิโกเมอร์ขนาดสั้นๆ ที่สามารถจับตัวกับดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Egholm et al., 1992, Nielsen et al., 2001) การจับตัวของ PNA เป็นไปตาม Watson-Crick base pairing rules โดยที่ N terminus ของ PNA จะจับบริเวณ 5' หรือ 3' ของโพลิโนคลีโอไทด์ โดยจะจับตัวเป็นรูป B-like helix กับดีเอ็นเอ และ A-like helix กับอาร์เอ็นเอ ความเป็นกลางของกระดูกอะมิโนในโมเลกุลของ PNA แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลไม่มี electrostatic repulsion จึงทำให้การจับตัวมีเสถียรภาพสูงมาก จึงเป็นข้อดีที่ช่วยให้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทั้งในรูปดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อย่างเหมาะสม

สำหรับการจับตัวไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตามการทำให้การจับตัวปรากฏแก่สายตาเป็นหัวใจสำคัญ โดยในปัจจุบันสามารถนำองค์ความรู้ในการแสดงฉลากโดยการเรืองแสง fluorescence หรือ chemiluminescence หรือ การใช้หลักการ surface plasmon (Schaferling and Nagl, 2006) โดยการตรวจระบบดังกล่าวจะทำให้สามารถตอบความไวในการตรวจในระบบดีเอ็นเอได้ดี โดยปกติ การตรวจสอบยีนในจีโนมที่มีขนาด 100-1000 Mbp จำเป็นต้องใช้ความไวในการตรวจสอบในระดับ femto molar (Lucarelli et al., 2008) โดยปกติการที่จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ไปสู่ระดับนั้นได้จำเป็นต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณโดยใช้ พีซีอาร์ หรือเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบอื่น

PNA probe เป็นโมเลกุลทางเลือกที่ให้ความเหมาะสมทั้งในแง่ประสิทธิภาพและเสถียรภาพในการตรวจในเทคนิค microarrays (Weiler et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการนำเอา PNA มาประยุกต์ร่วมกับหลักการไบโอเซนเซอร์ (Wang et al., 1998) โดยเฉพาะกับการประยุกต์ในการตรวจทางการแพทย์ในรูปแบบ array formats (Hashimoto et al., 2001, Song et al., 2005)

Germini et al, 2004 เป็นคนแรกที่ได้ใช้ PNA ในการตรวจวิเคราะห์การปนของพืชตัดแปรพันธุกรรมในอาหาร Germini et al, 2005 ยังได้ใช้ PNA โพรบ ขนาด 15 เมอร์ ในการตรวจจำแนกสายพันธุ์ปนของ GMOs ทั้ง Bt11, Bt176, MON810 และ GA21 โดยวิธีการดังกล่าว จำแนก GMOs ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาศัยเครื่องมือราคาสูง

แม้ว่าเทคนิคพีซีอาร์ สามารถนำมาใช้รวมกันกับ PNA ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เหมือนกับการทำ PCR Southern hybridization คุณสมบัติที่โดดเด่นของ PNA ทำให้การไฮบริดซ์เกิดขึ้นในเวลาที่รวดเร็วและง่ายกว่าเทคนิคมาตรฐานมาก หลักการเดียวกันนี้จึงสามารถนำไปใช้กับวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรูปแบบอื่นๆ ในปัจจุบันเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีรายงานในหลายรูปแบบทั้ง (NASBA) self-sustained sequence replication (3SR) (Guatelli et al, 1990) และ strand displacement amplification (SDA) (Walker et al, 1992) และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi et al., 2000) อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาความเฉพาะเจาะจงและความสะดวกในการปฏิบัติการแล้ว วิธี LAMP เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงมาก โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยใช้อุณหภูมิระนาบเดียวและเอนไซม์เฉพาะ โดยอาศัยไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ 6 บริเวณของยีนเป้าหมาย โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า 60 นาทีโดยไม่ต้องใช้สารเคมีหรือเครื่องมือพิเศษอื่นๆ จึงทำให้การประยุกต์ใช้ร่วมกับ PNA มีประสิทธิภาพสูงสุด

สำหรับการประยุกต์ระบบการตรวจวิเคราะห์ Raymond, (2005) ใช้ PNA เป็นโพรบ จับบนผิวหน้าของกระจกสไลด์และใช้ polythiophene ในรูปประจุบวกที่เรืองแสงเป็นตัวแสดงการจับตัวและการเปลี่ยนแปลงทาง electrostatic ในการตรวจขึ้นนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย บน microarray โดยไม่ต้องติดฉลาก เฉพาะการจับตัวของดีเอ็นเอและ PNA ที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น จะให้สัญญาณในรูปของการเรืองแสง

Rossi et al, (2007) ใช้ PNA โพรบจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ก่อนขจัดดีเอ็นเอที่ไม่จับตัวกับโพรบออกด้วย Nuclease S1 และวิเคราะห์โดยการทำ anion exchange chromatography ในการตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ การตรวจสอบทำให้เห็น peak ของ PNA-DNA ซึ่งจะแตกต่างในชุดควบคุมบวก อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องอาศัย HPLC และระยะเวลาในการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างควบคุมบวกและลบ

Choi et al, (2009) รายงานการทำ microarray ด้วยพีซีอาร์รูปแบบใหม่ในการตรวจ HPV ด้วยความจำเพาะเจาะจงสูง Roth et al, (2009) ได้ทดลองใช้ PNA เป็น capture probe ร่วมกับเทคนิคทางเซรั่มวิทยา โดยอาศัยการจับตัวระหว่าง biotylated DNA และ streptavidin ในการจับดีเอ็นเอเป้าหมาย ในเบื้องต้นก่อนจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ real time PCR วิธีดังกล่าว capture probe จะจับตัวบนผิวของหลุมบน microtiter plate ก่อนที่ดีเอ็นเอซึ่งมีไบโอดีเอ็นเอจับอยู่จะเข้าจับตัว หลังจากการล้างดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการทิ้งและทำปฏิกิริยากับ คอนจูเกตดีเอ็นเอที่มี streptavidin ดีเอ็นเอเป้าหมายจะจับตัวและทำหน้าที่เป็น reporter ซึ่งเป็นแม่แบบสำหรับทำพีซีอาร์ต่อไป การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้เป็นตัวบ่งบอกการปรากฏของดีเอ็นเอเป้าหมาย

ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงรูปแบบในการนำ PNA มาประยุกต์ในการพัฒนากระบวนการตรวจสอบที่ได้ดำเนินการในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี พบว่าการใช้การเรืองแสง fluorescence โดยการใช้การติดฉลาก fluorophore ไปที่ปลาย 5' จะช่วยให้ภายหลังจากที่ PNA จับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วจะสามารถตรวจสอบการเรืองแสงได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

Mathur et al, (2008) รายงานการใช้หลักการ Forster resonance energy transfer (FRET) ระหว่าง โมเลกุลโดเนอร์ และรีเซปเตอร์ ด้วย PNA ในการตรวจวิเคราะห์ *Bacillus anthracis* ในตัวอย่างโดยใช้ โพลีเมอร์ PFP และ PNA ที่มีการติดฉลาก fluorescence ในการตรวจสอบ

รูปแบบการใช้ FRET เป็นรูปแบบที่ประสบความสำเร็จในการตรวจเชื้อต่างๆในอาหาร ในการตรวจการปนของ GMOs ในข้าวโพดหรือถั่วเหลืองและการตรวจโมเลกุลภูมิแพ้แต่ส่วนใหญ่ที่กล่าวมามากปรากฏอยู่ในรูปแบบของการใช้งาน FRET กับ real time PCR ในรูปแบบ Taqman chemistry หรือ molecular beacon เท่านั้น การใช้ FRET มีข้อได้เปรียบเหนือกว่า HPLC หรือ microarray ทั้งนี้เนื่องจาก วิธีการมีความง่าย รวดเร็ว อย่างไรก็ดีหากจะนำมาประยุกต์ใช้กับ PNA จะต้องตรวจสอบการออกแบบ PNA และการจับตัวด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสม โดยปกติโครงสร้างทุติยภูมิของโอลิโกนิวคลีโอไทด์และไพรเมอร์ มีผลต่อการไฮบริดซ์เซชัน ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ จึงเป็นหัวใจที่สำคัญ (Gamper et. al, 1987, Tyaki and Kramer, 1996, Lima et. al, 1992) การพบโครงสร้างทุติยภูมิภายในไพรเมอร์แม้เพียงน้อยนิดสามารถลดระดับความแม่นยำในการจับตัวและการอ่านผลลงถึง 50 เท่า (Anthony et al, 2003) นอกจากนี้ โครงสร้างทุติยภูมิในดีเอ็นเอเป้าหมายก็มีส่วนทำให้เกิดการล้มเหลวในส่วนที่ทำปฏิกิริยา ไฮบริดซ์เซชัน (Lane et. al, 2004) ดังนั้นจึงควรพิจารณาออกแบบทั้งไพรเมอร์และโครงสร้างดีเอ็นเอเป้าหมายในการวางแผนเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่คาดว่าจะใช้ แม้ว่าในปัจจุบัน การออกแบบหลีกเลี่ยงโครงสร้างทุติยภูมิอาจทำได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ การตรวจสอบโครงสร้างที่ออกแบบขึ้นได้ก็จะช่วยทำให้ตัดปัจจัยที่ทำให้ล้มเหลวออกได้ ในการคัดเลือก nucleic hybridization assays ความจำเพาะขึ้นกับตัวไพรเมอร์และเงื่อนไขในการจับตัวด้วยไฮบริดซ์เซชัน (Wang, 1998)

Vilavain et al (2001, 2002, 2003, 2006) ได้พัฒนา PNA ที่มีโครงสร้างรูปแบบใหม่เรียกว่า beta-pyroridinyl PNA ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงเหนือกว่า PNA ของ Nelson โครงสร้างใหม่นี้จะไม่เกิดการจับตัวแบบ triplex ไม่เกิดการจับตัวภายในโครงสร้าง PNA กับ PNA ด้วยกัน หรือแม้กระทั่งเกิด self hybridization คุณสมบัติพิเศษดังกล่าวทำให้ beta-pyroridinyl PNA สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยประสิทธิภาพที่สูง ดังนั้น การเลือกใช้คุณสมบัติพิเศษของ PNA ดังกล่าว จึงสอดคล้องและตอบสนองความต้องการในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้ตอบคำถาม หลักการ point of care ได้เป็นอย่างดี

นอกเหนือจากการตรวจสอบการเรืองแสงแล้ว การใช้คุณสมบัติพิเศษในการเปลี่ยนแปลงทางสี อันเกิดเนื่องจากการจับตัวสะสมของอนุภาคนาโนทองคำ สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นวิธีการตรวจที่มีข้อได้เปรียบที่ง่ายกว่า มีความไวสูงกว่าและมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าได้ การใช้รูปแบบการตรวจวิเคราะห์กับโมเลกุลดีเอ็นเอที่เหมาะสมสามารถช่วยให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้ง่ายขึ้นและมีต้นทุนหลักที่ต่ำลง

วิธีการดังกล่าวเรียกว่า Colorimetric DNA detection ซึ่งใช้ nanoparticle ที่ทำจากโลหะ ซึ่งรายงานการใช้ครั้งแรกโดย Mirkin et al (1996) จากการค้นพบวิธีการทำให้ดีเอ็นเอจับตัวกับอนุภาคนาโนทองคำโดยหลักการใช้อุณหภูมิทองคำ 2 ชุด จับตัวกับดีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิด และนำโพรบที่ได้ไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย หาก PNA ที่ได้สามารถจับกับโพรบทั้ง 2 จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ sandwich hybridization ยังผลให้เกิดการ aggregation ของอนุภาค ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง Plasmon ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของอนุภาค จากแดงเป็นม่วง ต่อมาหลักการเดียวกันได้ถูกนำมาใช้กับ Ag/Au core-shell และ Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบทาง nanosensor ในการตรวจวิเคราะห์ นอกเหนือจากรูปแบบที่กล่าวมา ยังมีรูปแบบที่เรียกว่า non-crosslinking ที่เกิดจากการนำ DNA-Gold nanoparticle conjugate มาใช้ โดยที่ดีเอ็นเอจะจับตัวแบบคู่สมแบบสมบูรณ์กับโพรบ การจับตัวของอนุภาคทองคำในระบบการตรวจสอบดังกล่าวอาศัยการกระตุ้นให้เกิดการ aggregation ด้วยเกลือในระบบ ซึ่งเป็นตัวอย่างแรกในการใช้เกลือเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดแรง วันเดอวาลส์ ในการต่อยอดเป็น nanosensor (Elghanian et al., 1997)

อย่างไรก็ดี การนำเอาดีเอ็นเอมาจับตัวบนอนุภาคนาโนมีความยุ่งยากและจำเป็นต้องควบคุมความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอกับพื้นผิวเพื่อให้เกิดเสถียรภาพ ต้องมีขั้นตอน functionalization ดังนั้น จึงมีความพยายามในการเลือกใช้อนุภาคนาโนของโลหะในรูปแบบที่ไม่จำเป็นต้องดัดแปลงใดๆ (non functionalized) โดยเลือกใช้การเปลี่ยนแปลงของสี อันเนื่องมาจากปรากฏการณ์ Plasmon เป็นกลไกหลัก หลักการดังกล่าวถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Li and Rothberg, 2004 ซึ่งใช้คุณสมบัติต่างกันระหว่าง single strand และ double strand DNA ในการจับตัวกับอนุภาคนาโนทองคำ และใช้เกลือเป็นตัวกระตุ้นเพื่อให้แสดงผล ที่สำคัญไม่จำเป็นต้องทำให้อนุภาคนาโนทองคำเกิดพันธะ โควาเลนต์ กับดีเอ็นเออย่างที่เคยทำมาก่อน วิธีดังกล่าว นอกเหนือจากจะทำให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้ง่ายขึ้นแล้ว ยังลดขั้นตอนยุ่งยากในการจับดีเอ็นเอกับอนุภาคนาโนทองคำ

และลดระยะเวลาในการทำงาน นอกจากนี้การจับตัวในลักษณะดังกล่าวยังเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีที่รวดเร็วมาก หลักการดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค พีซีอาร์ single-base mismatch detection และ ssDNA detection (Li et al, 2004, Cho et al, 2008, Rho et al, 2009)

ในการพัฒนาวิธีการตรวจบนพื้นฐาน โปโลนาโนในครั้งนี้ อาศัยการเชื่อมโยงและพัฒนานวัตกรรมการตรวจแนวใหม่ นวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันส่งผลให้วิธีการตรวจมีความหลากหลายมากขึ้นตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequence-based amplification) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเอง (self-sustained replication) (Guatelli *et al.*, 1990) การเพิ่มปริมาณโดยการใช้ปฏิกิริยาแทนที่สายดีเอ็นเอ (strand displacement amplification) และการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิระนาบเดียว(Walker *et al.*, 1992) โดยการชักนำในระบบห่วง (Loop mediated isothermal amplification) (Notomi, 2000) นอกเหนือจากนี้ยังพบว่ามีผู้คิดค้นวิธีการเพิ่มปริมาณสัญญาณที่เป็นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ได้แก่ branched DNA amplification (bDNA) invader และ rolling circle amplification (Lyamichev *et al.*, 1999 และ Lizardi *et al.*, 1998) ซึ่งเทคนิคในกลุ่มหลังจัดเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณเป้าหมาย จากการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียทางเทคนิคพบว่า นอกจากเทคนิค PCR แล้ว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำในระบบห่วง (LAMP) มีข้อเด่นกว่าเทคนิคอื่นโดยเฉพาะการใช้อุณหภูมิระนาบเดียว(Notomi, 2000) โดยที่ไม่มีกระบวนการทางความร้อนต่างระดับอุณหภูมิ มาคลายสายดีเอ็นเอจากเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวมาเกี่ยวข้อง จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ปฏิกิริยา LAMP อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่มีกิจกรรมแทนที่สายดีเอ็นเอในตัว โดยการผลักสายดีเอ็นเอเดิมให้หลุดออกและแทนที่ด้วยการสังเคราะห์สายใหม่ การใช้ไพรเมอร์ 2-3 คู่ ทำให้ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาสูงมาก มากกว่าเทคนิค PCR ที่เคยทำได้ถึง 1000 เท่าในเวลาที่น้อยกว่า นำให้เทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากแหล่งที่มีดีเอ็นเอหลากหลายชนิดปนกัน เช่นที่พบในอาหาร การที่อุณหภูมิเป็นระนาบเดียวที่ 65°C (BcaBest™ DNA polymerase) จึงทำให้การตรวจสอบไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติที่ใช้สำหรับPCRซึ่งมีราคาแพง จึงเหมาะอย่างยิ่งในการออกแบบระบบตรวจสอบให้สามารถดำเนินการได้ แม้ในสถานที่ที่ขาดความพร้อมของเครื่องมือ

ที่ผ่านมาก็มีผู้นำเทคนิคดังกล่าวไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และรา (Horisaka *et al.*, 2004 และ Parida, 2004) โดยหลักการถ้าเพียงทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ก็จะสามารถออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ 2-3 คู่ ที่มีอุณหภูมิจับตัว (annealing temperature) ใกล้เคียงกันเป็นหลัก ในปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบดีเอ็นเอในถั่วเหลือง ข้าวโพด มะละกอ และมะเขือเทศตัดแปรพันธุ์ ข้าวสายพันธุ์ประเทศไทย ชนิดของเนื้อสัตว์ ความแท้ของสายพันธุ์ กล้วยไม้และไม้ผลบางชนิด จึงมีความพร้อมในข้อมูลลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ดังกล่าว(Chaumpluk, 2003) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังประสบความสำเร็จในการพัฒนาไบโอเซ็นเซอร์ในการตรวจใช้หัดสายพันธุ์ใหม่ทำให้การนำประสบการณ์ไปต่อยอดทำได้โดยง่าย

ในการดำเนินงานหัวใจสำคัญอยู่ที่การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มสัญญาณดีเอ็นเอและการตรวจจับสัญญาณ การเปรียบเทียบเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพบว่าเทคนิค LAMP มีความโดดเด่นมากที่สุด เนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่ใหม่มาก และอยู่ในช่วงเริ่มต้นของการประยุกต์ และปัจจุบันยังไม่มีผู้นำเทคนิคมาใช้ทดสอบอาหาร การบุกเบิกนำเทคนิคมาต่อยอดเพื่อการตรวจวิเคราะห์อาหาร การดำเนินการนอกจากจะช่วยให้ตรวจสอบระดับคุณภาพและความปลอดภัยในอาหารทำได้แม้ในภาวะความไม่พร้อมทางเครื่องมือซึ่งเหมาะสมกับประเทศแล้ว ยังช่วยสร้างโอกาสในการในการเป็นผู้นำนวัตกรรมนี้ในการตรวจวิเคราะห์อาหารโดยเฉพาะในกลุ่มผักและผลไม้ได้

สำหรับการตรวจสอบและติดตามโมเลกุลนั้น ในปัจจุบันการพัฒนาโมเลกุลในระดับนาโนไบโอแก้วก้าวหน้าไปมาก การนำ PNA ร่วมกับหลักการเรืองแสงในรูปการถ่ายทอดพลังงานจากตัวโมเลกุลของสีส่งถ่ายไปยังโมเลกุลอื่นขณะจับตัวกับชิ้นดีเอ็นเอ(FRET) โดยตัวจับที่มีผลต่อ probe สามารถออกแบบให้อยู่ในรูปโครงสร้าง 2 มิติต่างกัน เพื่ออาศัยกลไกการเปลี่ยนโครงสร้าง หรือปฏิกิริยา exonuclease ของเอ็นไซม์ ช่วยให้โมเลกุลของสีที่เคยจับอยู่กับดีเอ็นเอแสดงปฏิกิริยาด้วยหลักการเรืองแสง(Clegg, 1992) มาประยุกต์ก็ดี การนำหลักการ Plasmon ของอนุภาคนาโนของโลหะในรูปแบบ unmodified nanoparticle มาประยุกต์ในรูป colorimetric ก็ดี ทำให้การพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์เข้าสู่ระบบตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบนาโนเซ็นเซอร์ ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและอาจทำให้การตรวจสอบทำได้ง่ายขึ้นอีกด้วย

### บทที่ 3 วิธีการทดลอง

#### วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การดำเนินการวิจัยในโครงการย่อยนี้แบ่งขั้นตอนการทำงานเป็น 4 ส่วนได้แก่

1. การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยด้วย  
อณูภูมิระนาบเดี่ยวเน้นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ เริ่มจาก
  - ค้นหาข้อมูลและการเลือกใช้บริเวณนิวคลีโอไทด์และข้อมูลที่เฉพาะเจาะจงกับ  
รายละเอียดปลีกย่อยโดยฐานข้อมูลดีเอ็นเอในธนาคารข้อมูล
  - เลือกใช้ไพรเมอร์และทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ในระบบรอบ จากการ  
แปรผัน อณูภูมิทางลาดในทุกคู่ไพรเมอร์ ประเมินจากผลกิจกรรมการแทนที่สาย  
ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้
  - ประกอบปฏิกิริยาและปรับให้มีความง่ายในการดำเนินการ
  - ทดสอบปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ขึ้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ
  - ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ
2. การพัฒนาระบบตรวจสอบสัญญาณบนพื้นฐานทางไบโอนานอ
  - ศึกษารูปแบบการจับตัวระหว่าง binder หรือ probe กับ ดีเอ็นเอในระบบ  
ตรวจสอบ
  - แปรผันภาวะของปฏิกิริยาเพื่อหาจุดเหมาะสมจากปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อณูภูมิ  
ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ binder ลักษณะการ  
ตรวจวัด ละการสร้างกราฟมาตรฐาน
  - ประกอบระบบที่คัดเลือกและทดสอบภาวการณ์ใช้งานผ่านการทดสอบ  
ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ validation test
3. พัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการอ้างอิง
  - เตรียมระบบการตรวจสอบตามที่มีรายงานในวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบ
  - เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของแต่ละระบบ
  - ทำความสะอาดขึ้นดีเอ็นเอ
  - โคลนขึ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดโดยหลักการ TA cloning และถ่ายยีนเข้า  
แบคทีเรียสายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธี Heat shock
  - คัดเลือกโคลนที่ได้
  - ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ
  - นำโมเลกุลไปใช้ในการตรวจสอบในเชิงคุณภาพ ตรวจสอบจำนวนโมเลกุลเพื่อ  
สังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

4. สร้างระบบการตรวจสอบโดยวางโครงสร้างการตรวจสอบต้นแบบที่ประกอบด้วย ตัวอย่าง เอกสารขณะดำเนินการวิเคราะห์ เอกสารกำกับ เอกสารรายงานผล การจัดทำระบบที่พร้อมสำหรับการถ่ายทอดไปสู่ ภาคเอกชน สถาบัน และหน่วยงาน ที่มีความต้องการ เน้นการนำระบบไปปฏิบัติได้จริงในสนามเพื่อเป็นแรงขับเคลื่อนให้แต่ละหน่วยงานสามารถดำเนินการได้เอง อบรม และถ่ายทอดเริ่มดำเนินการวิเคราะห์ วิธีเก็บข้อมูลเอกสารกำกับ เอกสารรายงานผลสู่ผู้ประกอบการ

ขั้นตอนการทดลอง	ผลลัพธ์
1	การเพิ่มปริมาณ DNA
2	การพัฒนา ระบบ Biosenser
3	การใช้ DNA ในการอ้างอิง
4	การตรวจสอบในสถานประกอบการของมะม่วงหั่นชิ้น

#### แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

แผนการดำเนินงานแบ่งออกเป็น 5 ส่วน โดยแผนการดำเนินการจะดำเนินการในส่วนที่เกี่ยวกับการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมที่นำมาใช้อ้างอิง กับดัชนีคุณภาพ เนื่องจากขั้นตอนนี้เป็นหัวใจสำคัญในการพัฒนาระบบและวิธีการตรวจวิเคราะห์ การค้นหาอยู่บนหลักการตรวจสอบ unique identifier ซึ่งเป็นยีน หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ ระบบที่ต้องการตรวจ ทั้ง การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ การตรวจความตรงพันธุ์การปลอมปนหรือความแท้ของสายพันธุ์ ในระหว่างการดำเนินการ ผู้ร่วมโครงการจะดำเนินการออกแบบและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา LAMP ครอบคลุมระบบการตรวจวิเคราะห์การดำเนินการอยู่บนพื้นฐานของการเลือกบริเวณและออกแบบชุดของไพรเมอร์ที่ให้ความเฉพาะเจาะจงและประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด จากการคัดเลือกชุดไพรเมอร์ไม่น้อยกว่า 3 ซีรีส์ ต่อรายการการตรวจวิเคราะห์ ทดสอบเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานที่มีรายงาน เน้นการออกแบบไปที่ element ของยีนเฉพาะ( Maeda et al., 2005; Parida et al., 2004)(Chaumpluk, 2005<sup>a,b</sup>)

การดำเนินการในส่วนที่ 3 เกี่ยวข้องระบบการตรวจวัดในขั้นต้น ในขั้นต้นศึกษา รูปแบบความเป็นไปได้และต้นทุนรวมของการตรวจวัดแต่ละรูปแบบได้แก่ การตรวจวัดจากการเรืองแสงตามหลักการ fluorescence หรือ FRET และการเปลี่ยนสีในรูปแบบ colorimeter เปรียบเทียบประสิทธิภาพและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์เป็นหลัก

การดำเนินการในส่วนที่ 4 เกี่ยวข้องกับการวางระบบ และการวางแผนการถ่ายทอดรูปแบบการใช้งานสู่ผู้ประกอบการ และการดำเนินการในส่วนที่ 5 เน้นการพัฒนาโมเดลชุดดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจ

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ระดับความบริสุทธิ์ 80% เก็บเกี่ยวจากสวนมะม่วงที่ตำบลพันชาลี อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก ทำการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำประปาที่มีการเติมสารละลายคลอรีน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการปอกเปลือก และหั่นชิ้นมะม่วงสุก ขนาด 4x6 เซนติเมตร

การปลูกเชื้อ *E. coli* strain Top 10 ปริมาณ 5 CFU โดยการนำก้อนสำลี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ทาบบนพื้นผิวของมะม่วงหั่นชิ้น (swatting surface) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37<sup>0</sup>C เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ในสารละลาย Terrific broth จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างของมะม่วงหั่นชิ้นใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารละลาย Terrific brith ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 16,000 g เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนของเหลวใส (supernatant) ออกและเติมน้ำ (deionized water) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำส่วนที่เหลืออยู่ใช้ในการศึกษาต่อไป

ชนิดของไพรเมอร์ (primer) มีความจำเพาะต่อ gene mal B gene สำหรับจัดลำดับคู่เบส ของ *E. coli* ดังนี้

F3     5' CCGTTTCTCACCGATGAACA3'  
B3     5' GCTGTCGATGACAGGTTGTT3'  
FIP    5' GTTTGTCTGGACCGTCTGGCTGTTTGTCTCAAGCCCGGCAATC3'  
BIP    5' TTCGTACCAACGACCTCGCCTTTCAAAGGGAGAGGGCATGG3'

- 20  $\mu$ l section mixture solution ประกอบด้วย ชิ้นส่วนของ
- DNA polymerase (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA)
- 14 mM deoxynucleoside triphosphate
- 0.8 M betain (Sigma –Aldrich, St.louis, MO, USA)
- 20 mM Tris –HCl (pH 8.3)
- 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>
- 16 mM Mg SO<sub>4</sub>
- 0.1% Tween 20
- 2  $\mu$ l DNA template

ส่วนผสมดังกล่าวจะถูกบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 25 นาที การยืนยันผลโดยใช้ Total plate count technique และเทคนิค PCR amplification ของ  $\beta$ -D-glucuronidase gene (Talcashi และคณะ,2009)

การตรวจสอบ DNA ของ *E. coli* โดยการใช้การเรืองแสง ด้วยตาเปล่า ภายหลังจากการผสม DNA และ Pico Green (Invitrogen Corp, Carlsbad, California, USA) ที่เจือจาง 50 เท่า จากนั้น มองผ่านหลอด Ultraviolet เช่นเดียวกับ LAMP product ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ภายหลังจากการนำไปแยก DNA ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 3% agarose TAE

การทดสอบความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์โดยใช้ *mal B* DNA ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า ทำปฏิกิริยา (reaction) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 25 นาที ความไวของการ assay เปรียบเทียบกับ  $\beta$ -D-glucuronidase PCR โดยวิธี Electrophoresis

#### ผลการทดลอง

การทดสอบ *E. coli* ในมะม่วงหั่นชิ้น การเพิ่มปริมาณ DNA (Amplification) โดยการใช้เทคนิค LAMP และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *mal B* gene ของ *E. coli* มีขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 1) โดยที่มีผล + (positive) ต่อเชื้อ *E. coli* เท่านั้น โดยไม่แสดงผลต่อเชื้ออื่นๆ ได้แก่ *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholera*, *Cyclospora* sp. และ *Xanthomonas* sp.

การใช้การตรวจสอบของ DNA เป้าหมาย คือ *mal B* gene ใน *E. coli* ให้ผล เช่นเดียวกันกับการใช้การเพิ่มปริมาณของ  $\beta$ -D-glucuronidase gene ด้วยเทคนิค PCR (Talcashi และคณะ,2009)

การทดสอบ *E. coli* บนมะม่วงหั่นชิ้นจากมะม่วงหั่นชิ้นจำนวน 7 ตัวอย่าง ในจังหวัดพิษณุโลกพบว่า ในตัวอย่างที่ 5 มีการปนเปื้อนของ *E. coli* (ภาพที่ 2)

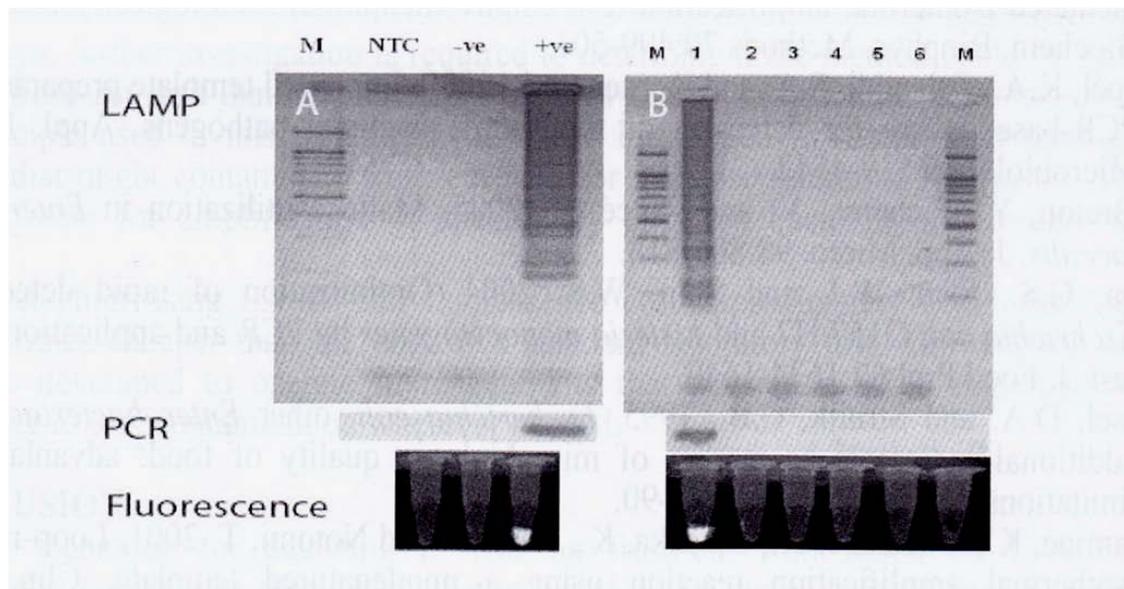


Fig. 1 Amplification of the target *malB* gene using LAMP and the designed primer set (A) and the specificity of the primer set using DNA template from food borne bacteria. The corresponding LAMP fluorescence and confirmation by PCR using B-D-glucuronidase gene amplification were demonstrated. Lane M 100 nucleotide ladder. Lane NTC, non template control; Lane -ve, negative amplification of *Salmonella* DNA, and +ve, positive amplification of *E. coli*. Lane 1, DNA of *E. coli*; Lane 2, DNA of *Salmonella sp.*; Lane 3 DNA of *Shigella sp.*; Lane 4 DNA of *Vibrio cholerae*; Lane 5, DNA of *Xanthomonas sp.*; Lane 6, non template control

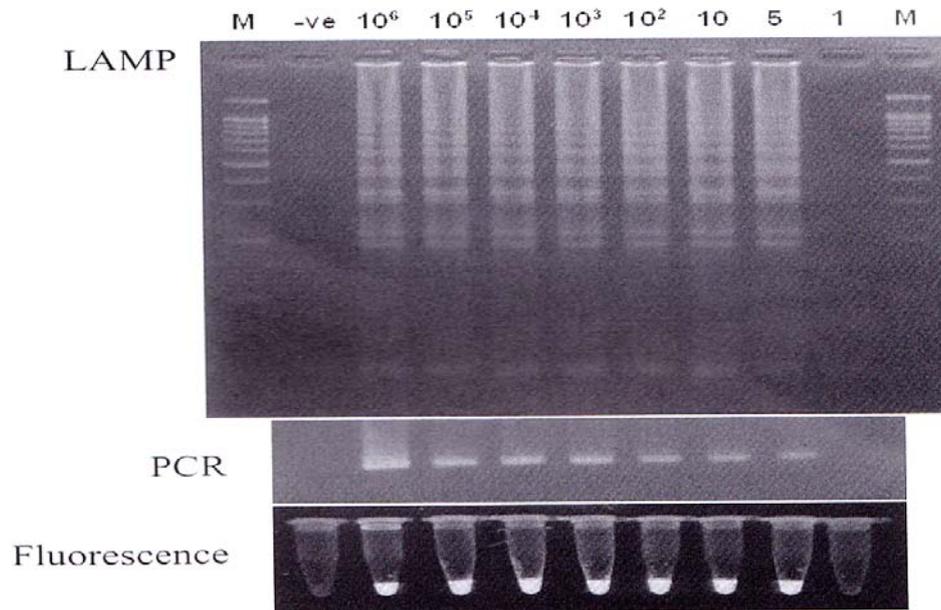


Fig. 2 Sensitivity of primer for amplification of target DNA of known copies using cloned *mol B* gene via LAMP (upper) and its LAMP fluorescence detection (lower). The confirmation by PCR using  $\beta$ -D glucuronidase gene amplification is in the middle. Lane M, 100 nt ladder marker; Lane -ve, negative amplification of Salmonella DNA, Lane numbering indicates the number of DNA copies involved in detection

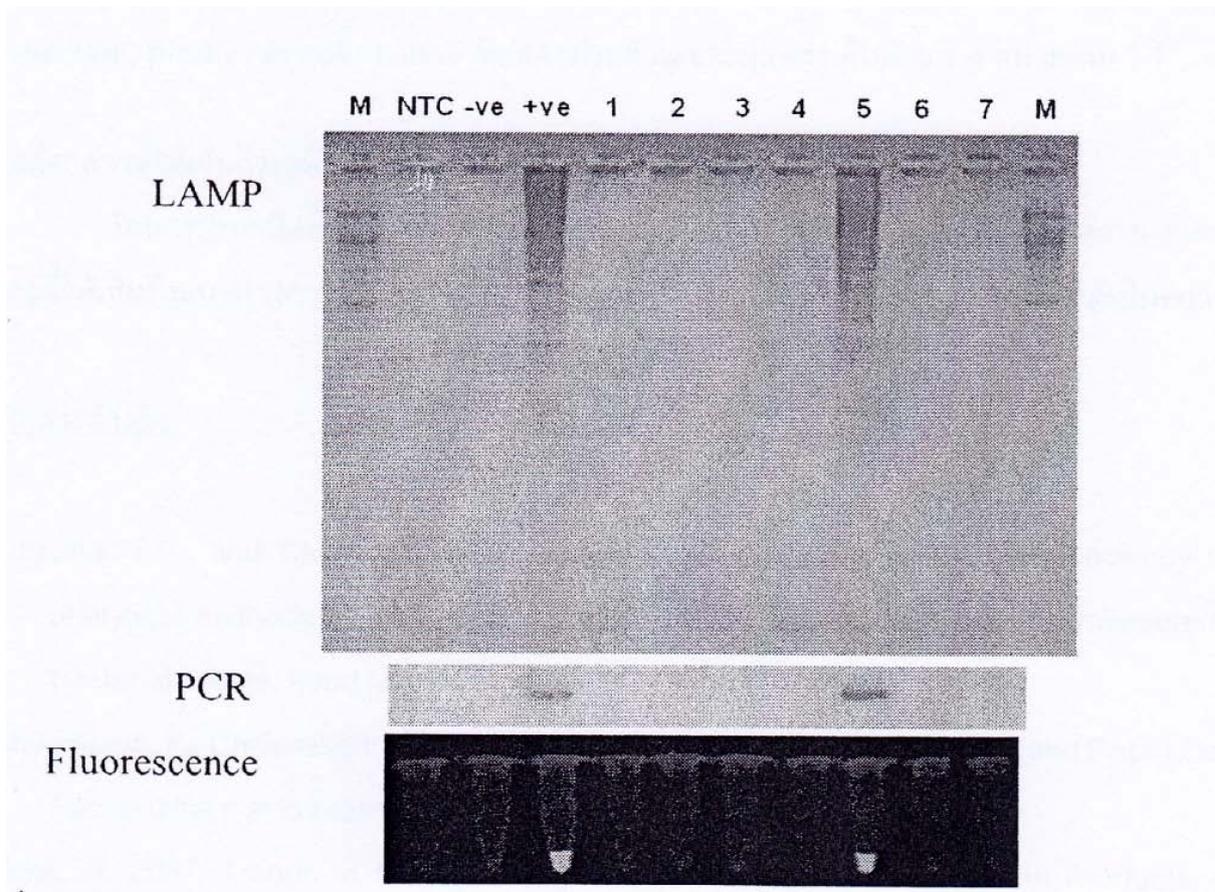


Fig 3. Detection of *E. coli* in fresh-cut mango products collected from 7 commercial sources. Results based on LAMP (upper) and its PCR (middle) and fluorescence detection (lower) are illustrated. Lane M, 100 nt ladder marker; Lane ntc, non templete control; Lane -ve, negative amplification of Samonella DNA; Lane +ve, positive *E. coli*; Lane number indicates the seven different sources of commercial samples tested.

## บทที่ 5

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

#### วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *E.coli* เป็นตัวทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์บนอาหารสด (Mossel และคณะ, 1995) หลักการตรวจสอบ *E.coli* บนผลไม้หั่นชิ้นสดขึ้นอยู่กับปริมาณของแบคทีเรียจากพื้นผิวของผลไม้หั่นชิ้นโดยการใช้เทคนิค swabbing ด้วยก้อนสำลี จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณใน terrific amplification ยีนเป้าหมาย (*mal B gene*) ด้วยสารเรืองแสง การเพิ่มปริมาณก่อนการทำ PCR เป็นขั้นตอนที่สำคัญและได้รับการยอมรับในกระบวนการตรวจสอบ การปนเปื้อนของเชื้อ (Jasson และคณะ, 2009, Worakhupiset and Tharnpoophasiam, 2009)

Terrific broth ที่ใช้จะประกอบด้วยสารอาหารใน Phosphate buffer ในการรักษาระดับ pH ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณจะไม่มีการสกัด DNA ซึ่งจะเป็นวิธีที่ประหยัดเวลาในการตรวจสอบปริมาณ (Lawpel และคณะ, 2000) การตรวจสอบปริมาณ *E.coli* ในตัวอย่างจากการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย (*mal B gene*) ซึ่งเป็นยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาล maltose ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (enterococcus) (Le Breton และคณะ, 2005) จึงเป็นวิธีการทดสอบการปนเปื้อนของอาหารที่มีประสิทธิภาพ

เทคนิค LAMP สามารถใช้ในการทดสอบ *E.coli* ได้เช่นเดียวกับ PCR เป็นการใช้อุณหภูมิคงที่ (isothermal property) ในการเพิ่มปริมาณ DNA ปริมาณมากๆ (Parida และคณะ, 2008) การมีปริมาณ DNA เป้าหมายปริมาณมากๆ จะทำให้เกิดการเรืองแสงดี (fluorescence) การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี LAMP จะเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA โดยไม่ใช้เครื่อง PCR และใช้อุณหภูมิคงที่ที่จะทำให้สะดวกในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายนอกห้องปฏิบัติการ (Nagemine และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการยับยั้งการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายน้อยกว่าวิธี PCR และใช้เวลาน้อยกว่าด้วย (Kaneko และคณะ, 2007) โดยการใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบจำนวนน้อยร่วมกับ DNA binder โดยใช้ตาเปล่าดูภายใต้หลอด UV เรืองแสงหรือปากกา black light ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบที่ง่ายและสะดวกรวดเร็ว

DNA binder หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการเรืองแสง (Hashimoto และคณะ, 1994) Pico Green เป็นหนึ่งใน DNA binder ที่ได้รับการยอมรับในการตรวจพิสูจน์โดยมีคุณสมบัติเสถียร (stable) ต่อสภาพมีแสง (photo bleaching) และสามารถคงรูปได้ในระยะเวลาอันยาวนาน คุณสมบัติในการเรืองแสงจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อ Pico Green เชื่อมติดกับ dsDNA และไม่เรืองแสงหากไม่มีการเชื่อมติดกับ DNA เป้าหมาย (Cosa และคณะ, 2002)

### สรุปการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* บนมะม่วงหั่นชิ้นด้วยเทคนิคไบโอนาโนเซ็นเซอร์ โดยการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย *mal B gene* ที่พบทั่วไปใน *E.coli* โดยใช้เทคนิค cotton ball swabbing ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ DNA เป้าหมายสามารถตรวจวัดได้จาก 100 นิวคลีโอไทด์ ความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ที่ทดสอบได้ (detect) น้อยที่สุดเท่ากับ 5 copies ของมะม่วงหั่นชิ้นน้ำหนัก 50 กรัม ระยะเวลาตั้งแต่ swabbing techniques ถึง culture ประมาณ 3.5 ชั่วโมง และใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย 25 นาที รวมใช้เวลาดังกล่าวทั้งหมดประมาณ 4 ชั่วโมง วิธีการดังกล่าวเป็นเทคนิคการตรวจสอบ *E.coli* ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องใช้เครื่องมือ PCR เหมาะสำหรับการตรวจสอบจุดวิกฤต (critical control point, CCP) ในระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต(HACCP)ของอุตสาหกรรมมะม่วงหั่นชิ้น (fresh-cut mango industry)

## เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการส่งออก. 2547. รายงานข้อมูลการส่งออกสินค้าของไทย ประจำปี 2547.กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. มปท.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ, 2543. GMOs สำหรับผู้ประกอบการ. เอกสารประกอบการสัมมนามาตรการและข้อกำหนดเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารของประเทศในทวีปยุโรป. สถาบันฝึกอบรมการค้าระหว่างประเทศ กรมส่งเสริมการส่งออก 14-15 มีนาคม 2543. ISBN: 974-333-625-7.
- Anthony, R.M., Schuitema, A.R.J., Chan, A.B., Boender, P.J., Klatser, P.R., Oskam, L., 2003. Effect of secondary structure on single nucleotide polymorphism detection with a porous microarray matrix; implications for probe selection. *Biotechniques* 34, 1082–1089.
- Buaer, T., Weller, P., Hammes, W.P. and Hertel, C. 2003. The effect of processing parameters on DNA degradation I food. *Eur Food Res Technol* 217:338-343.
- Carlsson, C., Jonsson, M., Norde´n, B., Dulay, M. T., Zare, R. N., Noolandi, J., Nielsen, P. E., Tsui, L-C., and Zielenski, J. 1996. Screening for genetic mutations. *Nature (London)* 380: 207
- Chaumpluk Piyasak.2003.Tracing of DNA molecule for quality assurance in food matrix using PCR technique. 29<sup>th</sup> Congress on science and Technology of Thailand. 32. (invited)
- Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2005a. Novel electrochemical identification and quantification of bovine species in feedstuffs. *JAIST International Symposium on Nano Technology 2005*. 17-18.
- Chaumpluk, P. and Tamiya, E. 2005b. Novel electrochemical biosensor for identification and quantification of specific DNAs in foods and feedstuffs. *The International Conference on BioNanotechnology: A New Chapter of Life*. 18. Queen Sirikit Convention Center 2-5 Nov 2005.
- Cho, K.; Lee, Y.; Lee, C.; Lee, K.; Kim, Y.; Choi, H.; Ryu, P.; Lee, S. Y.; Joo, S. 2008. Selective Aggregation Mechanism of Unmodified Gold Nanoparticles in Detection of Single Nucleotide Polymorphism. *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, 8629–8633.
- Choi, J.J., Kim, C., Park, H. 2009. A novel PNA based array for detecting and genotyping human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* Doi:10.1128/JCM.01398-08.
- Clegg, R.M. 1992. Fluorescent resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol* 211:353-388.

- Clemens, T ; Christoph,G , Christian H, Martin, H., Manfred W.M., Bernd, B, Alexander, R, Lukas  
 A.H.2007. Frequency of 23 human papillomavirus types using DNA microarray in women with and without cytological anomalies. *Anticancer research* 27: 1721-1726
- Compton, J.1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350:91-92.
- Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P.E., Berg, R.H. 1992. Recognition of guanine and adenine in DNA by cytosine and thymine containing peptide nucleic acids (PNA), *J. Am. Chem. Soc.* 114 1895–1897.
- Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. 1997. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles *Science* 277:1078–1081.
- Gamper, H.B., Cimino, G.D., Hearst, J.E., 1987. Solution hybridization of crosslinkable DNA oligonucleotides to bacteriophage M13 DNA. Effect of secondary structure on hybridization kinetics and equilibria. *J. Mol. Biol.* 197, 349–362.
- Guatelli, J.C., Whitefield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. and Gingeras, T.R.1990.Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retro viral replication. *Proc.Nat. Acad. Sci., USA* 87:392-396.
- Hahn, S., Mergenthaler, S., Zimmermann, B., Holzgreve, W. 2005. Nucleic acid based biosensors: the desires of the user, *Bioelectrochemistry* 67 :151–154.
- Fabani MM, Gait MJ. 2008. miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates. *RNA* 14:336- 346.
- Hashimoto, K.; Ishimori, Y. 2001. Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab. Chip* 1: 61-63.
- Hirisaka, T., Fujita, Kayoko, Iwata, Taketoshi, Nakadai, Aya, Otani, T. A., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y. and Hayashidani, H. 2004. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clinical Microbiol.* 42(11):5349-5352.
- Lane, S., Evermann, J., Loge, F., Call, D.R., 2004. Amplicon secondary structure prevents target hybridization to oligonucleotide microarrays. *Biosens. Bioelectron.* 20, 728–735.
- Li, H.; Rothberg, L. Colorimetric Detection of DNA Sequences Based on Electrostatic Interactions with Unmodified Gold Nanoparticles *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101, 14036– 14039.

- Li H, Rothberg LJ. 2004 . Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction. *J Am Chem Soc* 126:10958–10961
- Lipsky, R.H., Mazzanti, C.M., Rudolph, J.G., Xu, K., Vyas, G., Bozak, D., Radel, M.Q. and Goldman, G. 2001. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clinical Chemistry* 47(4 ):635-644.
- Lima, W.F., Monia, B.P., Ecker, D.J., Freier, S.M., 1992. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry* 31, 12055–12061.
- Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. and Ward, D.C. 1998. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification *Nature Genetics* 19:225-232.
- Lockley, A.K. and Bardsley, R.G., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Sci. and Technol.* **11**: 6777-9.
- Lyamichev, V., Mast, A.L., Hall, J.G., Prudent, J.R., Kaiser, M.W., Takova, T., Kwiatkowski, R.W., Sander, T. J., de Arruda, M., Arco, D.A., Neri, B.P. and Brow, M.A. 1999. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nature Biotech.* 17:929-926.
- Lucarelli F, Tombelli S, Minunni M et al .2008. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridization detection. *Anal Chim Acta* 609:139-159.
- Maeda, H., Kokeguchi, S., Fujimoto, C., Tanimoto, I., Yoshizumi, W. Nishimura, F. and Takashiba, S. 2005. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43:233-239.
- Mathur, N., Aneja, A., Bhatnagar, P. K., Mathur, P. C. 2008. A New FRET-Based Sensitive DNA Sensor for Medical Diagnostics using PNA Probe and Water-Soluble Blue Light Emitting Polymer. *J. of Sensors* doi:10.1155/2008/270475
- Mirkin, C.A, Letsinger, RL, Mucic RC, Storhoff, JJ. 1996. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature* 382 : 607–609.
- Nelson, K.E., Levy, M., Miller, S.L. 2000. Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 : 3868–3871.
- Nielsen P.E. 2001. Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:16-20.
- Nielsen P.E, editor. 2004. *Peptide Nucleic Acids-Protocol and Applications*. Norfolk: Horizon Bioscience.

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28:e63.
- Palchetti, I. , Mascini, M. 2008. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring, *Analyst* 133 :846–854.
- Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of west nile virus. *J. Clinical Microbiol.* 42(1):257-263.
- Raymond, F.R., Ho H. A., Peytavi, R., Bissonnette, L., Boissinot, M., Picard F. J., Leclerc, M. , Bergeron, M. G. 2005. Detection of target DNA using fluorescent cationic polymer and peptide nucleic acid probes on solid support *BMC Biotechnology* 2005, 5:10
- Rho, S.; Kim, S. J.; Lee, S. C.; Chang, J. H.; Kang, H.; Choi, J. 2009. Colorimetric detection of ssDNA in a solution. *Curr. Appl. Phys.* 9:534–537.
- Rossi, R., Lesignoli, F., Germini, A., Faccini, A, Sforza, S., Corradini, R., Marcheeli, R.2007. Identification of PCR-Amplified Genetically Modified Organisms (GMOs) DNA by Peptide Nucleic Acid (PNA) Probes in Anion-Exchange Chromatographic Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2509-2516
- Roth L., Zagon, J., Ehlers, A., Kroh, L.W. Broll, H. 2009. A novel approach for the detection of DNA using immobilized peptide nucleic acid (PNA) probes and signal enhancement by real-time immuno-polymerase chain reaction (RT-iPCR) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394: 529-537.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sassolas, A. Leca-Bouvier, B.D. Blum, L.J 2008. DNA biosensors and microarrays, *Chem. Rev.* 108 :109–139.
- Schäferling M, Nagl S. 2006. Analysis of biosensors by chemically specific optical techniques. Chemiluminescence-imaging and infrared spectroscopic mapping ellipsometry. *Anal Bioanal Chem* 385:500-507.
- Song, J. Y.; Park, H. G.; Jung, S. O.; Park, J. C. 2005. Diagnosis of HNF-1R mutations on a PNA zip-code microarray by single base extension. *Nucleic Acid Res.* 33 (2), e19
- Thiede, C., Bayerdo"rffer, E., Blasczyk, R., Wittig, B., and Neubauer, A. (1996) Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 24, 983–984

- Tyagi, S., Kramer, F.R., 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14, 303–308.
- Wang, J. 1998. DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review. *Biosens. Bioelectron.* 13, 757-762.
- Weiler, J.; Gausepohl, H.; Hauser, N.; Jensen, O. N.; Hoheisel, J. D. 1997. Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligonucleotide arrays. *Nucleic Acid Res.* 25, 2792- 2799.
- Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. "Synthesis and properties of novel pyrrolidiny PNA carrying beta-amino acid spacers", *Tetrahedron Lett.* 2001, 42(32), 5533-5536.
- Vilaivan, T.; Lowe, G. "A novel pyrrolidiny PNA showing high sequence specificity and preferential binding to DNA over RNA" *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124(32), 9326-9327.
- Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Duanglaor, P.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. "Synthesis and nucleic acid binding studies of novel pyrrolidiny PNA carrying an N-amino-N-methylglycine spacer" *Tetrahedron Lett.* 2003, 44(8), 1663-1666.
- Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. "Hybridization of pyrrolidiny peptide nucleic acids and DNA: Selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding" *Org. Lett.* 2006, 8(9), 1897-1900.
- Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.C. and Shank, D.D. 1992. Strand displacement amplification- isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research* 20:1691-1696.
- WHO. 2003. Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems. Food and agriculture organization of United Nations World Health Organisation. Rome FAO/WHO publication. np.