



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

อนุภาคนาโนบรรจุควอนตัมดอทสำหรับการตรวจวินิจฉัยมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย  
Quantum dot-containing DNA nanosphere as a diagnostic tool for NPC detection

อ.ดร. อนุตตรา อุดมประเสริฐ

ผศ.ดร. ธเนศ กังสักรศิลป์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา



รหัสโครงการ 2560A10802020

สัญญาเลขที่ 143/2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

อนุภาคนาโนบรรจุควอนตัมดอทสำหรับการตรวจวินิจฉัยมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย

Quantum dot-containing DNA nanosphere as a diagnostic tool for NPC detection

อ.ดร. อนุตตรา อุดมประเสริฐ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. ธเนศ กังสักรศิลป์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กุมภาพันธ์ 2562

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 143/2560

## บทคัดย่อ

โรคมะเร็งนับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ อย่างไรก็ตามโรคมะเร็งสามารถรักษาให้หายขาดได้ หากสามารถตรวจพบในระยะเริ่มแรก แต่ทั้งนี้ผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่มักจะตรวจพบเมื่ออยู่ในระยะรุนแรงหรือระยะลุกลามแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ค่อนข้างยาก รวมถึงยาที่ใช้ในการรักษามีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อโอกาสการรอดชีวิตของผู้ป่วย โรคมะเร็งโพรงจมูกกร่วมคอหอย (Nasopharyngeal carcinoma; NPC) จัดเป็นโรคมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในประเทศแถบเอเชีย อีกทั้งโรคมะเร็งดังกล่าวนี้ยังสามารถตรวจพบได้ยากในระยะเริ่มแรก เนื่องด้วยผู้ป่วยอาจไม่มีอาการใด ๆ บ่งชี้หรือมีอาการที่ไม่ชัดเจนและเนื้องอกที่เกิดขึ้นมักอยู่ในบริเวณด้านหลังโพรงจมูก ซึ่งเป็นบริเวณซ่อนเร้นที่ตรวจพบได้ยาก มีรายงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการนำเอาเทคโนโลยีเข้ามาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านทางการแพทย์เพื่อพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคเพื่อให้การรักษาเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำเอาคุณสมบัติของ DNA nanostructure และควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกกร่วมคอหอย โดยอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่พัฒนาขึ้นนี้เกิดขึ้นจากการนำเอาโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิค scaffolded DNA origami ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของโครงสร้างด้วย DNA aptamer ที่สามารถจับจำเพาะกับโปรตีน HER2 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis กล้องจุลทรรศน์ Atomic Force Microscope (AFM) และกล้องจุลทรรศน์ Transmission Electron Microscope (TEM) แล้วนำโครงสร้างดังกล่าวไปใช้ในการห่อหุ้มควอนตัมดอท (QD) ไว้ภายในโครงสร้าง ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น signaling molecule ที่ส่งสัญญาณเพื่อให้เราสามารถติดตามสัญญาณและสามารถตรวจวัดได้ จากการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน HER2 ด้วยเทคนิค Western blot และ Immunocytochemistry เปรียบเทียบในเซลล์มะเร็ง NPC สองชนิด ได้แก่ HK-1 และ TW-01 พบว่า เซลล์ HK-1 มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 น้อยกว่าเซลล์ TW-01 นอกจากนั้น ทำการทดสอบความเป็นพิษของโครงสร้าง aptamer-modified DNA nanosphere, QD และ DNA nanobiosensor ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิด พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (12.5 nM) aptamer-modified DNA nanosphere และ DNA nanobiosensor นั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด แต่ตรงกันข้ามกับ QD ที่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (3.13 nM) ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นทำการศึกษาความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่มีต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด พบว่าอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor นี้มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง TW-01 มากกว่า จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้คณะผู้วิจัยสรุปว่า อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายได้ตามที่ได้ออกแบบไว้ ทั้งนี้ อนุภาคนาโนดังกล่าวยังสามารถนำไปประยุกต์เพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยรักษา ป้องกัน และลดการเกิดของโรคมะเร็งโพรงจมูกกร่วมคอหอยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

**คำสำคัญ:** ดีเอ็นเอโอริจามิ, อนุภาคนาโนของดีเอ็นเอ, ตัวตรวจวัดทางชีวภาพ, มะเร็งโพรงจมูกกร่วมคอหอย

## ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death worldwide. The early diagnosis of cancer could lead to better treatment. However, most patients are diagnosed at late stages with serious symptoms or the cancer has spread to other areas already resulting in inefficiency of the treatment. Also, chemotherapeutic drugs have lots of side effects on patients. Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is one of cancer which often found in Asian countries. This kind of cancer is difficult to detect at the early stage as the patients might have no symptom. Moreover, the tumors occurred in nasopharynx are hard to find since the area is located behind the nose and above the back of the throat. Nowadays nanotechnology has been applied for many medical applications to improve the capability of diagnosis and treatment. The aim of this research is to develop a DNA nanobiosensor for NPC diagnosis. The DNA nanobiosensor is composed of (1) DNA nanosphere constructed via scaffolded DNA origami technique, (2) DNA aptamer specific for specific protein overexpressed in certain types of cells, and quantum dot (QD). Here, DNA aptamer specific for HER2 proteins is utilized to modify onto DNA nanosphere as a targeting ligand and QD is used as a signaling molecule. Agarose gel electrophoresis, atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM) were used for structural verification. The expression of HER2 proteins of two specific NPC cell lines, HK-1 and TW-01, was verified using Western blot and immunocytochemistry. The results indicated that HK-1 has a lower level of HER2 protein expression than TW-01. Next, the cytotoxicity of aptamer-modified DNA nanosphere, QD, and DNA nanobiosensor was investigated by MTT assay. Interestingly, these results showed that aptamer-modified DNA nanosphere and DNA nanobiosensor are not toxic to cells even the highest concentrations tested (12.5 nM). In contrast, QD at high concentrations (3.13 nM and higher) are obviously toxic to the cells. Finally, the specificity of the DNA nanobiosensor was examined and the results demonstrated that the DNA nanobiosensor specifically binds to TW-01 cells more than HK-1 cells. In conclusion, this DNA nanobiosensor could be used to distinguish between these two cell lines as designed. Furthermore, this nanobiosensor could also be applied for the development of theranostic tools for effective NPC cancer treatment.

**Keywords:** DNA origami, DNA nanoparticle, biosensor, nasopharyngeal carcinoma

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
บทนำ	4
วิธีการทดลอง	13
ผลการทดลอง	20
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	33
ข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	46
ประวัติคณะผู้วิจัย	51

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 เทคนิค immunohistochemistry ที่มีการนำเอาสารเรืองแสงไปติดไว้กับ antibody ที่จับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย	6
รูปที่ 2 ภาพถ่ายของ human epithelial cells ที่มีการติดฉลากควอนตัมดอทสีต่าง ๆ	9
รูปที่ 3 ภาพถ่ายหนูที่มีการติดฉลากควอนตัมดอทสีต่าง ๆ	9
รูปที่ 4 อนุภาคนาโนรูปทรงกลมที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอ (DNA nanosphere) ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกทรงกลมด้วย DNA aptamer โดยรูปทางซ้าย คือ อนุภาคนาโนแบบปิด ส่วนรูปทางขวา คือ อนุภาคนาโนที่เปิดให้เห็นด้านในที่มีการบรรจุ QD ไว้ภายใน	12
รูปที่ 5 อนุภาคนาโนรูปทรงกลมที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอ (DNA nanosphere) ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกทรงกลมด้วย DNA aptamer และมีการบรรจุ QD ไว้ภายใน	13
รูปที่ 6 กระบวนการ cell-SELEX ที่ใช้ในการคัดเลือก DNA aptamer	14
รูปที่ 7 ควอนตัมดอทที่มี polyTs หุ้มอยู่ด้านนอก	17
รูปที่ 8 โครงสร้างอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor โดยเส้นสีแดงคือ aptamer และวงกลมสีส้มคือ QD	20
รูปที่ 9 ปริมาณ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ที่จำนวนรอบต่าง ๆ กันของการทำ SELEX กับเซลล์ SUNE 5-8F	21
รูปที่ 10 ปริมาณ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ที่จำนวนรอบต่าง ๆ กันของการทำ SELEX กับเซลล์ SUNE 6-10B	21
รูปที่ 11 ปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่มีการแสดงออกในเซลล์แต่ละชนิด	22
รูปที่ 12 การตรวจวิเคราะห์ความจำเพาะของ aptamer ต่อเซลล์เป้าหมายด้วย flow cytometry	23
รูปที่ 13 การวิเคราะห์โปรตีน HER2 ในเซลล์ HK-1 และ TW-01 ด้วยเทคนิค Western blot	24
รูปที่ 14 การวิเคราะห์โปรตีน HER2 ในเซลล์ HK-1 และ TW-01 ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry	24
รูปที่ 15 การวิเคราะห์ความจำเพาะของ HER2-specific aptamer ต่อเซลล์ HK-1 และ TW-01	25
รูปที่ 16 ไดอะแกรมแสดงการปิดโครงสร้าง nanosphere แบบ no overhang และ overhang	26
รูปที่ 17 ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA nanosphere ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis	26
รูปที่ 18 ภาพโครงสร้าง DNA nanosphere จากกล้องจุลทรรศน์ AFM	27
รูปที่ 19 ภาพโครงสร้าง DNA nanosphere แบบ closed จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	28
รูปที่ 20 ความมีชีวิตรอดของเซลล์ TW-01 เมื่อปนเปื้อนกับ aptamer-modified DNA nanosphere	29
รูปที่ 21 ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HK-1 เมื่อปนเปื้อนกับ aptamer-modified DNA nanosphere	29
รูปที่ 22 การทดสอบความเป็นพิษของ HER2-aptamer modified DNA nanosphere และ QD ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง HK-1 เมื่อทำการปนเปื้อนกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	30



รูปที่ 23	ความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิดเมื่อปน่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	30
รูปที่ 24	ความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิดเมื่อปน่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	31
รูปที่ 25	การทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด	32

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DNA	deoxyribonucleic acid
QD	quantum dot
AFM	atomic force microscope
TEM	transmission electron microscope
NPC	nasopharyngeal carcinoma
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งติดต่อกันมาเป็นเวลาหลายปี อีกทั้งยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี อย่างไรก็ตามโรคมะเร็งสามารถรักษาให้หายขาดได้ หากพบในระยะเริ่มแรก แต่ทั้งนี้ผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่มักจะตรวจพบเมื่ออยู่ในระยะรุนแรงหรือระยะลุกลามแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ค่อนข้างยาก รวมถึงยาที่ใช้ในการรักษามีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยสูง ซึ่งส่งผลต่อโอกาสการรอดชีวิตของผู้ป่วย นั่นหมายความว่ายิ่งสามารถตรวจพบโรคมะเร็งได้เร็วแค่ไหน โอกาสที่จะรักษาให้หายขาดหรือโอกาสที่จะรอดชีวิตของผู้ป่วยก็จะสูงขึ้นเท่านั้น นอกจากการรักษาโรคมะเร็งในระยะเริ่มแรกจะได้ผลที่ดีกว่าแล้วนั้น ยังพบว่าจะสามารถช่วยป้องกันการลุกลามหรือแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ ทั่วร่างกายได้อีกด้วย

โรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย (nasopharyngeal carcinoma; NPC) เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยมากในประเทศแถบเอเชีย เช่น ประเทศจีนตอนใต้ ไต้หวันฮ่องกง และประเทศไทย โดยสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดกันว่าอาจจะมีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อม อาหาร พันธุกรรม และการติดเชื้อไวรัส Epstein-Barr Virus (EBV) อาการในระยะเริ่มแรกจะไม่ค่อยชัดเจน ส่วนใหญ่อาการของผู้ป่วยที่พบบ่อย คือ คัดจมูก มีเลือดกำเดาไหลบ่อย ๆ หรือมีหนองไหลออกทางรูจมูกด้านเดียว หายใจไม่สะดวก หรือหูอื้อ เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยนั้นสามารถทำได้ยาก เนื่องจากเมื่อผู้ป่วยมีการเกิดเนื้องอกผิดปกติในระยะเริ่มแรกของโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยมักไม่แสดงอาการใด ๆ ซึ่งมะเร็งชนิดนี้ถือเป็นมะเร็งชนิดที่ตรวจสอบได้ยากสำหรับแพทย์ทั่วไป เนื่องจากบริเวณดังกล่าวอยู่ด้านหลังของโพรงจมูกเข้าไป เป็นบริเวณซ่อนเร้นที่ยากต่อการตรวจพบ และมักถูกกลืนได้ง่ายกว่าบริเวณอื่น ๆ ทำให้การวินิจฉัยโรคมะเร็งมีความล่าช้า แพทย์มักตรวจพบเมื่อผู้ป่วยแสดงอาการรุนแรง ซึ่งมักจะอยู่ในระยะลุกลามเข้าสู่อวัยวะอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น ปอด ตับและกระดูก ทั้งนี้การตรวจวินิจฉัยของแพทย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจทางหู คอ จมูก โดยใช้กล้องส่องเพื่อตรวจดูโพรงจมูก ร่วมกับการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างออกมาตรวจสอบทางพยาธิวิทยา การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ เช่น Computed tomography (CT scan) หรือ Magnetic resonance imaging (MRI) นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบเพิ่มเติมเพื่อดูการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) เช่น การตรวจเอกซเรย์ปอด การทำอัลตราซาวด์ตับ หรือการทำ Bone scan เป็นต้น

ปัจจุบันนี้ วิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน รวมถึงวิธีการรักษาและติดตามผลที่ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ ทำให้การรักษามะเร็งในบริเวณดังกล่าวและการควบคุมการแพร่กระจายของมะเร็งไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร และเนื่องด้วยจำนวนผู้ป่วยมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยที่มีจำนวนมากในประเทศไทย ทำให้ภาครัฐต้องใช้งบประมาณมหาศาลเพื่อเป็นค่าใช้จ่ายในการป้องกันและรักษา ส่งผลกระทบต่อสังคมและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ นักวิจัยทั่วโลกมีความสนใจในการค้นคว้าเกี่ยวกับเทคนิคต่าง ๆ ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งเพื่อให้การรักษาเป็นไปได้

ทันทั้งที่มีรายงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการนำเอาเทคโนโลยีเข้ามาประยุกต์ใช้กับงานทางการแพทย์ เช่น การพัฒนาอนุภาคนาโน (nanoparticle) เพื่อใช้ในการนำส่งยาเข้าไปยังเซลล์หรือบริเวณเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำเอาคุณสมบัติของ DNA nanostructure และควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง โพร่งจุมกร่วมคอคอย ทั้งนี้ เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย รักษา ป้องกัน และลดการเกิดของโรคมะเร็งโพร่งจุมกร่วมคอคอยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

### วัตถุประสงค์ของการทดลอง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือ การพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพร่งจุมกร่วมคอคอยเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการวินิจฉัยโรค โดยทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่เกิดจากการนำเอาควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) ไปบรรจุไว้ภายในโครงสร้าง DNA nanosphere โดยจะสามารถติดตามอนุภาคนาโนได้ด้วย fluorescence microscope และทำการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของโครงสร้าง DNA nanosphere ด้วยการติด DNA aptamer ที่มีความสามารถในการจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายเพื่อให้อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นสามารถระบุบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ และทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

กล่าวโดยสรุปเป้าหมายของงานวิจัยครั้งนี้ คือ

6.1 เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอเป็นรูปทรงกลม ซึ่งมี QD บรรจุอยู่ภายใน และมี DNA aptamer อยู่ที่ผิวด้านนอก

6.2 เพื่อทดสอบความเป็นพิษ และความจำเพาะของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นต่อเซลล์เป้าหมาย

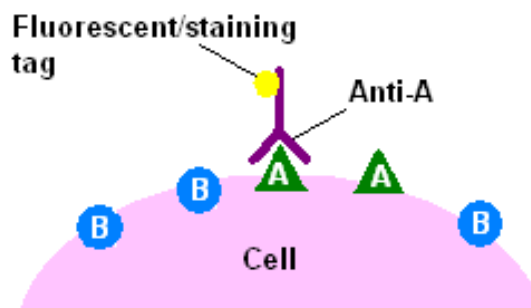
### ขอบเขตของการทดลอง

ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้ เริ่มจากการเลือก DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งโพร่งจุมกร่วมคอคอย หรือมีความจำเพาะต่อ biomarker ที่สำคัญของเซลล์มะเร็งโพร่งจุมกร่วมคอคอย เพื่อนำมาใช้เป็นตัวตรวจจับ (probe) เซลล์หรือโมเลกุลเป้าหมาย โดยจะนำ DNA aptamer ดังกล่าวไปติดไว้ที่ด้านนอกของ DNA nanosphere ซึ่งภายในมีควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) บรรจุอยู่ พร้อมทั้งทดสอบความเป็นพิษ และทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นกับเซลล์มะเร็งโพร่งจุมกร่วมคอคอย เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติและ/หรือเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ

## ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีได้เข้ามามีบทบาททางการแพทย์อย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นทางด้าน การวินิจฉัยโรค ตรวจรักษา การติดตามผลการรักษาโรคร้ายแรงต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพื่อช่วยยกระดับคุณภาพชีวิตให้สูงขึ้น มีงานวิจัยจำนวนมากที่นำเอาวัสดุหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นสารชีวโมเลกุล สารอินทรีย์ สารสังเคราะห์ต่าง ๆ มาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ วินิจฉัย รักษา หรือติดตามผลการรักษาโรค ซึ่งวัสดุที่นำมาใช้แต่ละชนิดนั้นก็มีความสมบัติ รวมถึงข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันออกไป แต่คุณสมบัติสำคัญอันหนึ่งที่จะขาดไม่ได้สำหรับวัสดุที่จะนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิต นั่นคือ ต้องเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) ต้องไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย (non-toxicity) และควรที่จะถูกย่อยสลายได้โดยไม่เกิดการตกค้างอยู่ในร่างกาย (biodegradability)

เทคนิคหรือวิธีการต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลากหลายวิธี การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาโดยทั่วไปจะนำชิ้นเนื้อไปย้อมสี เช่น สี Hematoxylin แต่ก็มีเนื้อเยื่อบางชนิดที่ยากต่อการวินิจฉัยด้วยวิธีดังกล่าว โดยเฉพาะหากมีการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งหรือเซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไปก็ทำให้แพทย์แปลผลได้ยาก อาจต้องอาศัยการตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC) ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบโดยอาศัยการจับจำเพาะระหว่าง antibody กับ antigen ซึ่งการจับจำเพาะกันระหว่างโมเลกุลทั้งสองสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี โดยส่วนมากมักใช้การตรวจสอบจากปฏิกิริยาเอนไซม์ (enzymatic reaction) โดยนำเอนไซม์ไปยึดติดไว้กับ antibody ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีเมื่อมีการเติมสารตั้งต้น (substrate) ลงไป นอกจากเอนไซม์แล้วยังมีการนำเอาสารเรืองแสง (fluorophores) ไปติดไว้กับ antibody เพื่อใช้ในการติดตาม ดังรูปที่ 1



<https://en.wikipedia.org/wiki/File:Immunohistochemicalstaining1.PNG>

รูปที่ 1 เทคนิค immunohistochemistry ที่มีการนำเอาสารเรืองแสงไปติดไว้กับ antibody ที่จับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย

แต่ทั้งนี้โมเลกุลทางชีวภาพที่สามารถเรืองแสงได้ ทั้งจากธรรมชาติและสารอินทรีย์บางชนิดยังคงมีข้อจำกัดบางประการ เช่น แสงที่เรืองออกมาจากโมเลกุลเหล่านี้มีความเข้มแสงที่ค่อนข้างน้อยและยังจางหายไปในระยะเวลาดำเนินการ ทำให้สามารถติดตามสัญญาณที่เกิดขึ้นได้ยาก โมเลกุลเหล่านี้เสียสภาพได้ง่ายเมื่อ

สัมผัสถูกแสงสว่าง รวมถึงมีความยืดหยุ่นในการเลือกใช้สีที่ค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีช่วงของการดูดกลืนแสงค่อนข้างแคบและมีช่วงของการเรืองแสงที่ค่อนข้างกว้าง เป็นต้น เพื่อที่จะแก้ปัญหาต่าง ๆ ดังกล่าว จึงมีผู้นำเอาควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) มาใช้ในการตรวจหาเซลล์เป้าหมาย หรือบริเวณเป้าหมายแทนการใช้โมเลกุลเรืองแสงแบบเดิม โดย QD จัดเป็นสารกึ่งตัวนำที่มีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตร แสงที่เรืองออกมามีความสว่างกว่าโมเลกุลเรืองแสงแบบเดิมถึง 20 เท่า ทำให้สัญญาณที่เกิดขึ้นค่อนข้างชัดเจน สามารถติดตามได้ง่าย โดยสีของแสงที่เกิดขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นจะขึ้นกับสารที่เป็นแกนกลางและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ QD เช่น CdSe ขนาด 3 nm จะเปล่งแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่น 520 nm แต่ CdSe ขนาด 5.5 nm จะเปล่งแสงสีแดงที่มีความยาวคลื่น 630 nm เป็นต้น โดยที่ขนาดของ QD สามารถเปลี่ยนแปลงหรือควบคุมได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี อีกทั้ง QD ที่มีขนาดต่างกันยังสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการเรืองแสงสีต่างกันได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแหล่งกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่นเพียงค่าเดียว นอกจากนี้ยังพบว่า QD มีความคงตัวมากกว่าโมเลกุลเรืองแสงแบบเดิม 100 เท่า อย่างไรก็ตาม อุปสรรคหนึ่งในการนำเอา QD มาใช้งานทางชีวภาพ คือ QD ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยทั่วไปนั้นมักมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เนื่องจากถูกห่อหุ้มด้วยสารอินทรีย์ จึงต้องมีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกให้มีความชอบน้ำมากขึ้น สามารถคงสภาพได้ในน้ำ หรือมีความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้น แต่ทั้งนี้ QD ที่จะนำมาใช้ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

นอกจากนี้ ยังมีการนำ QD มาดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกเพื่อให้สามารถจับกับโมเลกุล หรือเซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น การติดฉลาก QD ด้วย antibody ที่จำเพาะกับ antigen ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า antibody จะมีความจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย แต่ก็มีข้อจำกัดในการใช้งาน เช่น มีต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากการสังเคราะห์ antibody ทำได้ไม่ถี่ยนัก ใช้เวลาค่อนข้างนาน และไม่ใช่ antibody ทุกชนิดที่จะสามารถสังเคราะห์ได้ตามต้องการ เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA aptamer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA; ssDNA) ที่มีความสามารถในการจับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายเช่นเดียวกัน พบว่า DNA aptamer สามารถสังเคราะห์ได้ทางเคมีและมีขนาดเล็กกว่า (DNA aptamer มีขนาดประมาณ >30 kDa ในขณะที่ antibody มีขนาดประมาณ 150 kDa) ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ามาก โครงสร้างของ DNA aptamer มีความเสถียรและทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้มากกว่า อีกทั้งการดัดแปลงทางเคมียังสามารถทำได้ง่ายกว่า

ขณะนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย โดยนำเอาคุณสมบัติเชิงแสงของ QD กับคุณสมบัติในการจับจำเพาะของ DNA aptamer มาใช้ร่วมกับ DNA nanosphere ซึ่งเป็นโครงสร้างระดับนาโนเมตรที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยให้ดีขึ้น

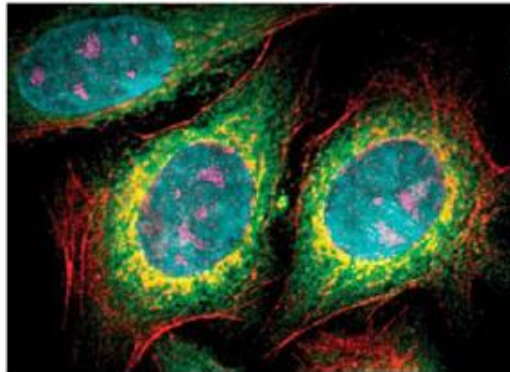
## ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

Nanomedicine เป็นการนำความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อการวินิจฉัย ตรวจรักษา ติดตามผลการรักษา และป้องกันโรค ซึ่งอาจหมายรวมถึงการศึกษา ค้นคว้าเพื่อสร้างความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาของโรคต่าง ๆ (pathophysiology) มีงานวิจัยจำนวนมากที่นำเอาควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) เข้ามาใช้ในการแพทย์ ไม่ว่าจะเป็นเพื่อใช้ในการถ่ายภาพเซลล์ทั้งที่เป็น fixed cells และ live cells (Wu, 2003; Larson, 2003) การตรวจวัดหรือติดตามโมเลกุลบางชนิดทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* (Dubertret, 2002; Medintz, 2005; Michalet, 2005; So, 2006; Peng, 2010) การถ่ายภาพเซลล์หรือเนื้องอกเพื่อการวินิจฉัยโรค (Akerman, 2002; Gao, 2004; Cai, 2006; Zhao, 2015) การทำ sentinel lymph-node mapping (Kim, 2004; Zimmer, 2006; Ballou, 2007) เป็นต้น

เนื่องด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวของ QD ที่โดดเด่นหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลเรืองแสงแบบดั้งเดิม (organic dyes/fluorescent proteins) สีของแสงที่จะเกิดขึ้นเมื่อ QD ถูกกระตุ้น สีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับสารที่เป็นแกนกลางและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ QD (Rossetti, 1982) นั่นหมายความว่าหากต้องการให้ QD เรืองแสงที่มีความยาวคลื่นเท่าใดก็สามารถที่จะควบคุมได้จากธาตุที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์ และขนาดของ QD ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงหรือควบคุมได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี มีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่า QD สามารถเรืองแสงได้สว่างกว่าโมเลกุลเรืองแสงแบบดั้งเดิมประมาณ 10-20 เท่า (Dahan, 2003; Medintz, 2003; Ishii, 2003) และมีความคงตัวทางแสง (photostability) ที่ค่อนข้างสูง (Borchert, 2003) ทนต่อการฟอกสี (photobleaching) สามารถให้แสง fluorescence ที่คงอยู่นานกว่าโมเลกุลเรืองแสงแบบดั้งเดิม (Alivisatos, 2005) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการใช้ Green Fluorescent Protein (GFP) ซึ่งเป็นโมเลกุลเรืองแสงแบบดั้งเดิมในการติดฉลากเซลล์มะเร็งเพื่อการถ่ายภาพในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) (Yang, 2002) ทำให้ Gao และคณะต้องการที่จะเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากโมเลกุล GFP และ QD ซึ่งพบว่าถึงแม้ว่าจะพบสัญญาณของทั้งสองโมเลกุลชัดเจนเมื่อทำการทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell cultures) แต่เมื่อทำการทดสอบภายในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) มีเพียงแค่สัญญาณของ QD เท่านั้นที่ตรวจพบ (Gao, 2004) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เสนอความคิดเห็นไว้ว่าที่เป็นเช่นนั้นอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น QD มีการเรืองแสงที่สว่างกว่าทำให้สามารถตรวจพบได้ที่ความเข้มสัญญาณค่อนข้างต่ำ (low signal intensities) และการเรืองแสงของ QD ไม่ตรงกับช่วงความยาวคลื่นที่องค์ประกอบบางชนิดภายในเซลล์สามารถเรืองแสงได้ (autofluorescence) เช่น collagen porphyrin หรือ flavin (Troy, 2004) รวมถึง QD มีค่า absorption coefficient ที่ค่อนข้างสูง ทำให้การเรืองแสงที่เกิดขึ้นมีความสว่างกว่ามากภายใต้สภาวะในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ซึ่งมีปริมาณ photon จำกัด เนื่องจาก photon ที่ส่งผ่านไปเพื่อกระตุ้นนั้นเกิดการ scattering และ absorption ภายในสิ่งมีชีวิต

นอกจากนั้น การใช้โมเลกุลเรืองแสงแบบดั้งเดิมนั้นยังมีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถใช้สีมากกว่า 3 ชนิดในการย้อมสีตัวอย่างเพื่อถ่ายภาพพร้อม ๆ กันได้ อีกทั้งสีที่เกิดขึ้นจากโมเลกุลเรืองแสงแบบดั้งเดิมนั้นจะค่อย ๆ

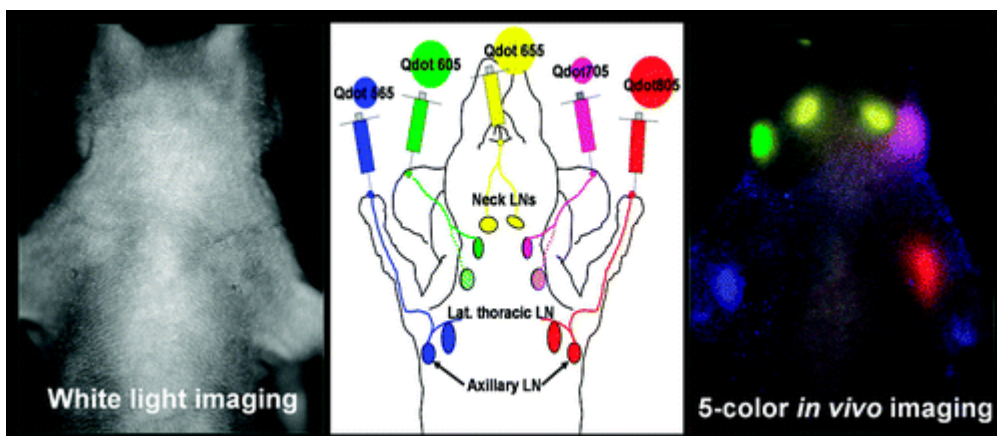
ลดความชัดเจนลงและจางหายไปในระยะเวลานานขึ้น ตรงข้ามกัน QD เป็นโมเลกุลที่มีช่วงของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) ค่อนข้างกว้าง และมีช่วงของการเปล่งหรือเรืองแสง (emission spectra) ที่ค่อนข้างแคบ และมี photostability ที่ค่อนข้างสูง พบว่ามีการนำเอา QD มาติดฉลากส่วนต่าง ๆ ของ human epithelial cells เพื่อให้สามารถถ่ายภาพในเวลาเดียวกันได้ถึง 5 สี โดยการกระตุ้นด้วยแหล่งกำเนิดแสงเพียงความยาวคลื่นเดียว ดังรูปที่ 2 โดย (1) cyan QD ติดที่นิวเคลียส (2) magenta QD ติดที่ Ki-67 protein (3) orange QD ติดที่ไมโทคอนเดรีย (4) green QD ติดที่ไมโครทิวบูล และ (5) red QD ติดที่ actin (Gao, 2009)



(Gao, J. and Xu, B. 2009. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today*, 4, 37-51.)

**รูปที่ 2** ภาพถ่ายของ human epithelial cells ที่มีการติดฉลากควอนตัมดอทสีต่าง ๆ

นอกจากการติดฉลากส่วนประกอบของเซลล์แล้ว ยังมีการนำเอา QD ไปใช้ในการติดฉลาก lymphatic basins ในบริเวณต่าง ๆ ของหนู (Kobayashi, 2007) ดังรูปที่ 3



(Kobayashi, H., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Regino, C. A. S., Urano, Y. and Choyke, P. L. 2007. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett.*, 7, 1711-1716.)

**รูปที่ 3** ภาพถ่ายหนูที่มีการติดฉลากควอนตัมดอทสีต่าง ๆ



และยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ QD ในการพัฒนาการตรวจสอบแบบ multiplexing เพื่อใช้ตรวจสอบตัวอย่างเดียวกัน (Borchert, 2003; de Farias, 2005; Geho, 2005; Mulder, 2007)

ในการสังเคราะห์แกนกลางของ QD วัสดุต่าง ๆ ที่อยู่ในกลุ่มที่ II-VI หรือ III-V หรือ IV-VI เช่น แคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) แคดเมียมเซเลไนด์ (CdSe) แคดเมียมเทลลูไรด์ (CdTe) มักถูกนำมาใช้ ซึ่ง Farias และคณะพบว่า QD ที่สังเคราะห์ขึ้นจาก CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดในการนำไปใช้ติดฉลากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็ง เมื่อเปรียบเทียบกับ QD ที่สังเคราะห์ขึ้นจาก CdTe-CdS และ CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> (Farias, 2009) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแกนกลางของ QD จะถูกห่อหุ้มด้วยสารอนินทรีย์อีกชั้นหนึ่ง ทำให้ QD มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ นับเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำเอา QD ไปใช้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต มีงานวิจัยมากมายที่มุ่งเน้นการพัฒนา QD ให้มีความเหมาะสมในการนำเอา QD มาใช้งานในน้ำ อีกทั้งเพื่อให้เกิดความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) โดยทำการดัดแปลงทางเคมีที่พื้นผิวของ QD เพื่อให้มีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น และสามารถที่จะนำไปใช้กับเซลล์สิ่งมีชีวิตได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ (non-toxicity) (Farias, 2009) หรือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต ถึงแม้ว่าจะยังมีข้อกังวลในเรื่องของความปลอดภัยในการนำ QD มาใช้กับสิ่งมีชีวิตเนื่องจาก QD มีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบหลัก แต่จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พิสูจน์ให้เห็นว่า การนำเอา QD ที่บรรจุอยู่ภายในโครงสร้างแบบ micelles ไปใช้ในการติดตามการพัฒนาตัวอ่อนของกบ ไม่ส่งผลกระทบต่อใด ๆ ต่อการพัฒนาของตัวอ่อน อีกทั้ง QD-micelles ยังมีความเสถียรสูงภายในเซลล์อีกด้วย โดยสามารถส่งสัญญาณแสงที่สามารถตรวจวัดได้ยาวนาน และสามารถเปล่งแสงได้แม้จะอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยมากนัก และยังสามารถต้านทานการฟอกสี (photobleaching) ได้มากกว่าสารเรืองแสงอื่น ๆ ที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์ (Dubertret, 2002) นอกจากนี้ยังมีอีกหนึ่งงานวิจัยสำคัญที่พยายามแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของการนำเอา QD มาใช้กับสิ่งมีชีวิต นั่นคือ การศึกษาทดลองถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับมนุษย์ โดยผู้วิจัยทำการศึกษาถึงผลที่เกิดขึ้นเมื่อฉีด phospholipid micelle encapsulated QD ปริมาณ 25 mg/kg เข้าไปในลิงวอก (*rhesus macaques*) เป็นเวลา 90 วัน ซึ่งจากการศึกษา standard haematological และ biochemical markers ต่าง ๆ ไม่พบว่ามีผลผิดปกติหรือความเป็นพิษเกิดขึ้น (Ye, 2012)

การนำ QD มาใช้สำหรับ in vivo imaging นั้น นอกจาก QD จะต้องเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิตและไม่เป็นพิษ ต้องมีความคงตัว (stability) ที่ดีใน biological fluids ต้องสามารถเรืองแสงได้นานพอสมควร (sufficiently long time) เพื่อให้สามารถติดตามสัญญาณที่เกิดขึ้นได้ ซึ่ง QD ที่นำมาใช้ควรที่จะเรืองแสงในช่วง Near-Infrared (NIR; 700-900 nm) สาเหตุเพราะชีวโมเลกุลส่วนใหญ่จะมีช่วงการดูดกลืนแสง (absorbance spectra) ที่ค่อนข้างต่ำในช่วง NIR ทำให้ภาพที่ได้จาก in vivo optical imaging ในช่วงนี้ค่อนข้างชัดเจน (Massoud, 2003; Frangioni, 2003; Cai, 2006)

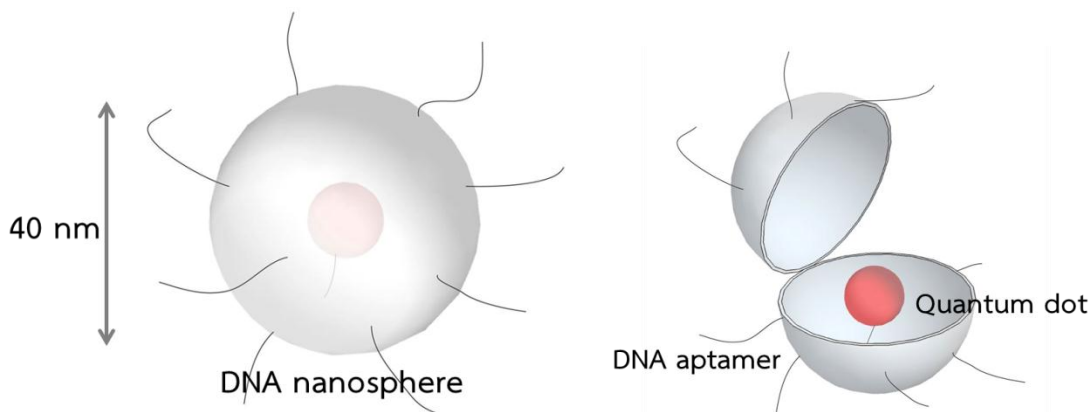
อย่างไรก็ตาม พบว่า QD ที่นำมาใช้นั้นสามารถเกิด non-specific binding กับโมเลกุลต่าง ๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ หรือโปรตีน ซึ่งการเกิด non-specific binding ของ QD นั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ มากมาย

ไม่ว่าจะเป็นขนาด มวลโมเลกุล ประจุที่ผิวด้านนอก และหมู่ฟังก์ชันที่ผิวด้านนอก (Bentzen, 2005) จึงมีงานวิจัยมากมายที่พยายามดัดแปลงพื้นผิวของ QD เพื่อลดการเกิด non-specific binding โดยการทำให้พื้นผิวด้านนอกของ QD มีหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ เช่น hydroxyl group (Pathak, 2001) หรือ carboxyl group (Liu, 2012) โมเลกุลอีกชนิดที่มีการนำมาใช้ห่อหุ้ม QD กันอย่างแพร่หลาย คือ polyethylene glycol (PEG) (Ballou, 2004; Kelf, 2010) ซึ่งพบว่านอกจากจะช่วยป้องกันความเป็นพิษของ QD แล้ว ยังช่วยลด non-specific interaction ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการนำเอาชีวโมเลกุลมาใช้ในการห่อหุ้ม QD อีกด้วย เช่น โปรตีน bovine serum albumin (BSA) (Zhang, 2012) อย่างไรก็ตาม Kairdolf และคณะได้ทำการเปรียบเทียบการเกิด non-specific binding ของ QD ที่มีการดัดแปลงผิวด้านนอกให้มีหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ โดยพบว่า hydroxylated QD นั้นสามารถลดปริมาณ non-specific binding ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับ carboxylated QD หรือ protein-coated หรือ PEG-coated QD (Kairdolf, 2010) ทั้งนี้จากการค้นคว้างานวิจัยก่อนหน้าพบว่างานวิจัยที่เกี่ยวกับการนำเอา DNA มาใช้ในการดัดแปลงพื้นผิวหรือห่อหุ้ม QD ยังมีค่อนข้างน้อย (Ko, 2013; Samanta, 2014) ทั้ง ๆ ที่มีการนำเสนอถึงการประยุกต์ใช้ DNA กับงานวิจัยทางการแพทย์มากมาย (Abu-Salah, 2010; Pinheiro, 2011; Zadegan, 2012; Zahid, 2013) ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงสนใจนำ DNA มาประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้ม QD เพื่อนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิต

DNA เป็นชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่พบในธรรมชาติ ทำให้โมเลกุลชนิดนี้มีคุณสมบัติในด้าน biocompatibility และ biodegradability อีกทั้งไม่ทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายสิ่งมีชีวิต ทำให้มีการนำเอา DNA มาใช้ในงานวิจัยในด้านต่าง ๆ ทางชีวภาพมากมาย หนึ่งในเทคนิคสำคัญที่ทำให้งานวิจัยทางด้าน structural DNA nanotechnology มีการพัฒนาแบบก้าวกระโดด คือ เทคนิคที่เรียกว่า scaffolded DNA origami ที่นำเสนอโดย Paul Rothemund (Rothemund, 2006) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนำมาใช้ในการออกแบบและสังเคราะห์ DNA nanostructure รูปร่างต่าง ๆ โดยอาศัย ssDNA สายสั้น ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (staple strand) มาเป็นตัวกำหนดการม้วนพับของ ssDNA สายยาวที่ได้จากไวรัส M13mp18 (scaffold strand) เพื่อให้เกิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ ที่มีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตรตามที่ได้ออกแบบไว้ (Rothemund, 2006; Andersen, 2009; Han, 2011; Douglas, 2012) จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Jiang และคณะที่แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างขนาดใหญ่ที่สร้างขึ้นจาก DNA นั้นไม่แสดงความเป็นพิษใด ๆ ต่อเซลล์ พร้อมทั้งไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Jiang, 2012) นอกจากนี้โครงสร้าง DNA origami ที่สร้างขึ้นยังสามารถดัดแปลงให้มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายได้อย่างง่ายดายโดยการดัดแปลงให้พื้นผิวด้านนอกของโครงสร้างมี DNA aptamer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA; ssDNA) ที่มีความสามารถในการจับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย เมื่อเปรียบเทียบกับ peptide (Cai, 2006) หรือ antibody (Xing 2007; Bae, 2014) ซึ่งเป็นชีวโมเลกุลที่มีผู้นำมาใช้ในการกำหนดเป้าหมายของ QD เช่นกัน จะเห็นว่า DNA aptamer มีข้อดีต่าง ๆ ที่เหนือกว่า เช่น DNA aptamer สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ขั้นตอนในการสังเคราะห์ไม่ซับซ้อนหรือยุ่งยาก การดัดแปลงทางเคมีสามารถทำได้ง่าย ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า antibody ยิ่งไปกว่านั้น DNA เป็นชีวโมเลกุลที่ไม่กระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตซึ่งต่างจาก antibody ที่อาจทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้

นอกจากนี้ขนาดของ DNA aptamer ( $> 30$  kDa) ก็ยังเล็กกว่า antibody ( $\sim 150$  kDa) ทำให้สามารถดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของ QD ด้วย DNA aptamer ได้ในจำนวนโมเลกุลที่มากกว่า ซึ่งน่าจะส่งผลให้เกิด polyvalency effect (Mammen, 1998) ที่ช่วยให้การทำงานของ QD มีประสิทธิภาพดีขึ้น มีงานวิจัยต่าง ๆ ที่นำเอา aptamer มาใช้ในการดัดแปลง QD ให้มีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (Shieh, 2005; Ferreira, 2006; Cheng, 2009) ทั้งนี้ มีการรายงานถึงการค้นหา DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ nasopharyngeal carcinoma และติพิมพ์เผยแพร่ในปี 2013 (Chen, 2013)

โครงการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะสังเคราะห์อนุภาคนาโน (nanoparticles) ที่สามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายสิ่งมีชีวิต ไม่เป็นพิษ ไม่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในร่างกาย และมี non-specific binding ต่ำ โดยนำเอาโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ผู้วิจัยได้ออกแบบและสังเคราะห์ด้วยเทคนิค scaffolded DNA origami ไว้แล้วนั้นมาใช้ในการห่อหุ้ม QD ไว้ภายใน และทำการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของ DNA nanosphere ด้วย DNA aptamer ที่มีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งโพรงจมูกกรวมคอคอย ดังรูปที่ 4 เพื่อพัฒนาเทคนิคที่จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งดังกล่าว ซึ่งถ้าหากว่าโครงการนี้ประสบความสำเร็จคณะผู้วิจัยจะนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้ต่อยอดในโครงการวิจัยที่จะนำเอาอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ไปทดสอบกับหนูทดลอง เพื่อพัฒนาเทคนิคที่สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งภายในสิ่งมีชีวิต



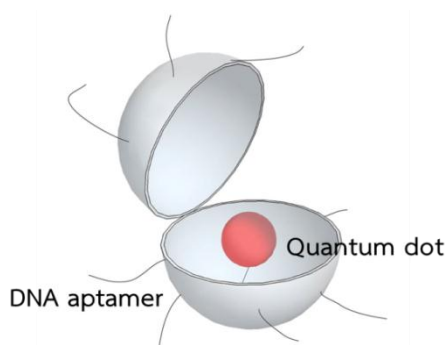
**รูปที่ 4** อนุภาคนาโนรูปทรงกลมที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอ (DNA nanosphere) ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกทรงกลมด้วย DNA aptamer โดยรูปทางซ้าย คือ อนุภาคนาโนแบบปิด ส่วนรูปทางขวา คือ อนุภาคนาโนที่เปิดให้เห็นด้านในที่มีการบรรจุ QD ไว้ภายใน

## วิธีการทดลอง

โครงการวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อสร้างอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor โดยการนำเอาควอนตัมดอท (quantum dot; QD) ไปบรรจุไว้ภายในโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ออกแบบและสังเคราะห์ด้วยเทคนิค scaffolded DNA origami ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของโครงสร้างด้วย DNA aptamer ที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งโพรงจมูกกรวมคอหอย (nasopharyngeal carcinoma; NPC)

### (1) การออกแบบอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor

ในโครงการวิจัยครั้งนี้จะใช้โครงสร้าง DNA nanosphere ที่คณะผู้วิจัยได้เคยรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ (Chaithongyot, et al., 2016; Chaithongyot, et al., 2018) มาทำการดัดแปลงเพื่อบรรจุ QD ไว้ภายในเพื่อทำหน้าที่เป็น signaling molecule และทำการติดฉลากอนุภาคนาโนดังกล่าวด้วย DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมายไว้ด้านนอกเพื่อทำหน้าที่เป็น targeting ligand ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 อนุภาคนาโนรูปทรงกลมที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอ (DNA nanosphere) ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกทรงกลมด้วย DNA aptamer และมีการบรรจุ QD ไว้ภายใน

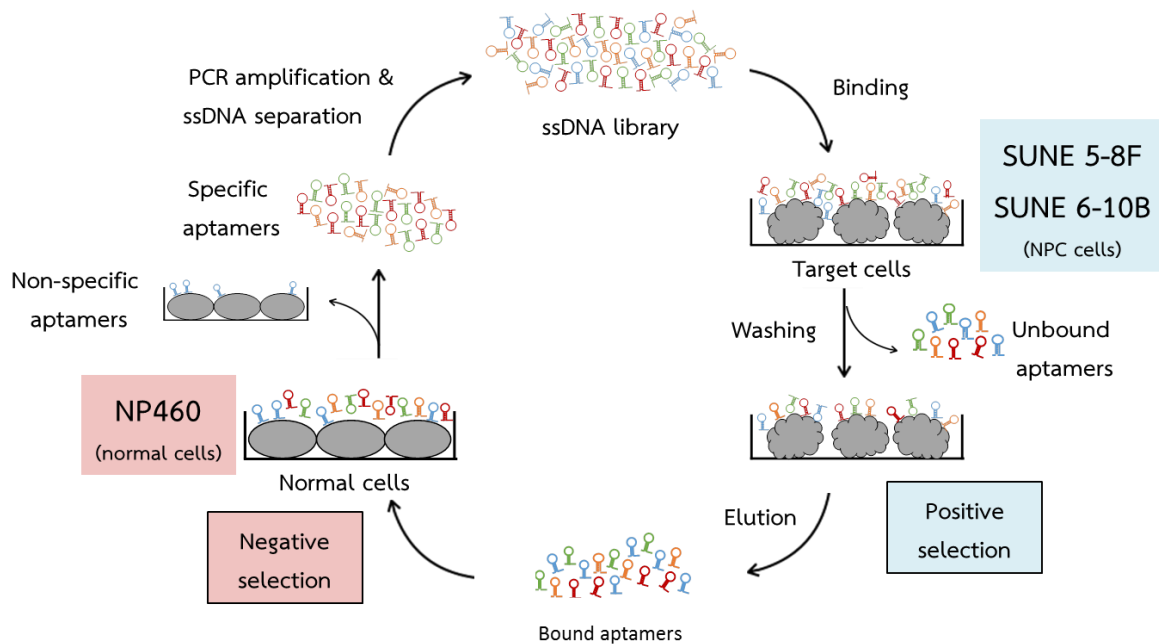
### (2) การคัดเลือก DNA aptamer

เพื่อที่จะทำให้ DNA nanobiosensor ที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้ aptamer เป็น targeting ligand มาดัดแปลงติดที่ผิวด้านนอกของโครงสร้าง ทั้งนี้ aptamer ที่เหมาะสมจะต้องสามารถจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง NPC เป้าหมาย แต่ไม่สามารถจับกับเซลล์ปกติได้ เพื่อที่จะช่วยให้ DNA nanobiosensor ที่จะพัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการจำแนกระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติได้อย่างแม่นยำ

#### a. Cell-SELEX

โดยงานวิจัยนี้ต้องการที่จะพัฒนา nanobiosensor ที่จะใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกกรวมคอหอย ซึ่งเป็นโรคมะเร็งที่มีการตรวจพบในระยะเริ่มต้นได้ยาก คณะผู้วิจัยจึงทำการคัดเลือก DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งโพรงจมูกกรวมคอหอย (NPC) โดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า Systematic evolution of ligands by exponential enrichment หรือ SELEX ซึ่งใช้เซลล์มะเร็งเป้าหมาย

เป็น target (cell-SELEX) กระบวนการดังกล่าวนี้มีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 6 ในงานวิจัยนี้ใช้ nasopharyngeal carcinoma cell line 2 ชนิด ได้แก่ SUNE 5-8F และ SUNE 6-10B เป็นเซลล์เป้าหมาย



รูปที่ 6 กระบวนการ cell-SELEX ที่ใช้ในการคัดเลือก DNA aptamer

ทำการบ่ม single-stranded DNA (ssDNA) library (5'-ATACCAGCTTATTCAATT-40N-AGATAGTAAGTGCAATCT-3') ร่วมกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายในสภาวะที่ต้องการ หลังจากนั้น ssDNA ที่ไม่จับกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายจะถูกล้างออกไป ทำการคัดแยก ssDNA ที่จับอยู่กับเซลล์เป้าหมายโดยทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใส (supernatant) ออกมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในขั้นตอนต่อไป

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยจะใช้ primer ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 5'-FAM-ATACCAGCTTATTCAATT-3' เป็น forward primer และ primer ที่มีการติดฉลากด้วย biotin 5'-Biotin-AGATTGCACTTACTATCT-3' เป็น reverse primer ตามสภาวะดังนี้ 95 °C เป็นเวลา 2.5 นาที 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที 56.3 °C เป็นเวลา 30 วินาที 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที และปิดท้ายด้วย 72 °C เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 10-20 รอบเพื่อหาจำนวนรอบ PCR ที่เหมาะสมที่จะทำได้ PCR product ที่เยอะที่สุดและมีปริมาณของ non-specific amplicons น้อยที่สุด หลังจากนั้นทำการแยก antisense strands ออกโดยใช้การทำให้ DNA เสียสภาพด้วยเบส (alkaline denaturation) 0.2 M NaOH และ streptavidin-coated magnetic beads แล้วทำการ desalting โดยใช้ NAP-5 column ซึ่งสารละลาย ssDNA ที่ได้จะถูกนำไปใช้เป็น ssDNA library สำหรับการทำให้ SELEX ในรอบถัดไป หรือสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์การจับกันระหว่าง ssDNA ที่ได้กับเซลล์เป้าหมายอีกด้วย

### (3) การเพาะเลี้ยงเซลล์ Nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines

NP460 (a nasopharyngeal epidermal cell line) เป็น normal cell ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งต้องเลี้ยงใน 1:1 mixture of Defined Keratinocyte-SFM and EpiLife™ medium with full supplements, defined K-SFM growth supplement and human keratinocyte growth supplement (HKGS) ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO<sub>2</sub> atmosphere

SUNE 5-8F (a highly metastatic NPC cell line) และ SUNE 6-10B (a non-metastatic NPC cell line) ซึ่งต้องเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 100 U/mL penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO<sub>2</sub> atmosphere

HK-1 (a differentiated squamous carcinoma cell line) ได้รับมาจาก Prof. Maria Li Lung, Center for Nasopharyngeal Carcinoma Research, University of Hong Kong ซึ่งต้องเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 100 U/mL penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO<sub>2</sub> atmosphere

TW01 (an EBV-negative NPC cell line established from the NPC patient in Taiwan) ได้รับมาจาก Chin-Tang Lin, National Taiwan University ซึ่งต้องเลี้ยงในอาหาร DMEM supplemented with 10% FBS และ 100 U/mL penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO<sub>2</sub> atmosphere

### (4) การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA (mRNA expression) ด้วยเทคนิค RT-PCR

เพื่อที่จะตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติโดยอาศัยการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของโปรตีนชนิดนั้นที่มีการแสดงออก ทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั้นทำการสกัดแยก mRNA โดยใช้ GF-1 Total RNA Extraction Kit (Qiagen, USA) ตรวจวัดปริมาณ RNA ทั้งหมดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นำ RNA ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างไปทำ reverse transcription โดยใช้ RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) และใช้ hexamer primers แบบสุ่ม ทำการ reverse transcription ในปริมาตร 20  $\mu$ L ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำการหาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเทคนิค real-time PCR โดยนำ complementary DNA หรือ cDNA ที่ได้ไปใช้ในการทำ PCR และใช้  $\beta$ -actin เป็น internal control สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR คือ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที 90 °C เป็นเวลา 30 วินาที 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวนทั้งหมด 30 รอบ และ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการคัดแยก PCR product ที่ได้ด้วย 1% agarose gel ย้อมสีด้วย ethidium bromide นอกจากนั้นทำการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วย qRT-PCR โดยใช้ SYBR green PCR master mix (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) from Roche) ใช้วิธี  $\Delta\Delta$ Ct ในการคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### (5) การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบใน 6-cm petri dish ปริมาณ  $1 \times 10^6$  เซลล์ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  ที่มี  $5\% \text{CO}_2$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ด้วยสารละลาย lysis buffer ที่มี protease inhibitors (pH 7.4) นำตะกอนเซลล์ไปทำการ lyse ใน TENT lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% (v/v) TritonX-100, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF) นำ lysate ที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยเริ่มจากการรันเจล SDS-PAGE โดยโหลดโปรตีนปริมาณ 40 mg ใน 8% polyacrylamide gel ทำการรันเจลแล้วย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane ด้วย Semi-Dry Transfer cell (Bio-Rad) พร้อมทั้ง block membrane ด้วย 5% BSA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อป้องกัน non-specific binding site หลังจากนั้นทำการตรวจสอบด้วย primary antibody บ่มร่วมกับ membrane ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  ซ้ำมคืนหลังจากล้างสารละลาย primary antibody ออกแล้ว ทำการบ่ม membrane ร่วมกับ secondary antibody โดยใช้ rabbit anti-mouse antibody ที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบสัญญาณของ ECL ที่เกิดขึ้นโดยใช้ G-box chemiluminescence ในการทดลองนี้ใช้  $\beta$ -actin เป็น internal control

#### (6) การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Immunofluorescence staining

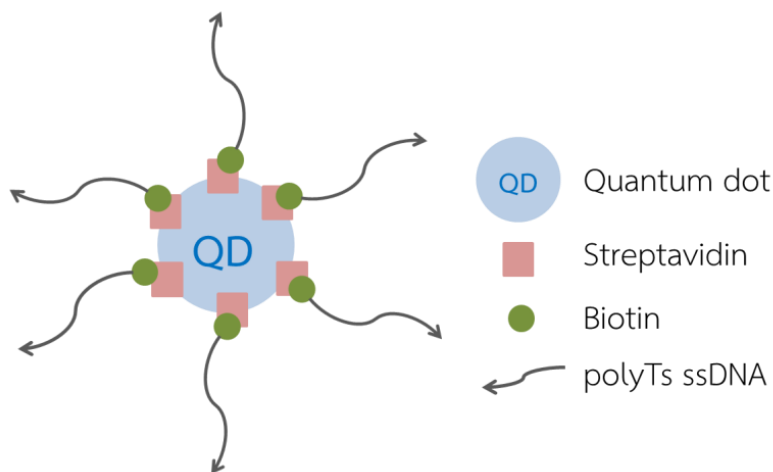
ทำการตรวจสอบโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ต้องการทดสอบด้วยเทคนิค immunocytochemistry เริ่มจากทำการเลี้ยงเซลล์ใน 12-well plate ที่ความหนาแน่น 10,000 cells/well หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำการ fixed ด้วย 4% paraformaldehyde ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และทำการ block เซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่มี 20% FBS เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยใช้ primary antibody และ secondary antibody ที่มีการติดฉลากสารเรืองแสง FITC แล้วทำการ counterstain เซลล์ด้วย Hoechst 33342 (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และ phalloidin หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์และถ่ายภาพด้วย live cell fluorescence imaging system

#### (7) การวิเคราะห์การจับกันของ DNA aptamer และเซลล์เป้าหมาย ด้วยเทคนิค flow cytometry

ทำการบ่ม DNA aptamer ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงร่วมกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการ fixed เซลล์ด้วย 3.7% formaldehyde ใน PBS ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค flow cytometry

### (8) การสังเคราะห์หอนภาคนาโน DNA nanobiosensor

ในโครงการวิจัยนี้ใช้โครงสร้าง DNA nanosphere ที่คณะผู้วิจัยได้เคยรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ (Chaithongyot, et al., 2016; Chaithongyot, et al., 2018) ทำการดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้สามารถบรรจุ QD ไว้ภายในโครงสร้าง โดยการเลือก staple strand ในตำแหน่งที่เหมาะสมจำนวน 5 เส้นมาทำการดัดแปลงให้มีลำดับเบส polyAs (15As) อยู่ทางด้านปลาย 3' เพื่อให้สามารถจับจำเพาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว polyTs ที่มีการดัดแปลงด้วย biotin ที่ปลาย 5' ด้วย biotin ที่สามารถจับกับ streptavidin-coated QD ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ควอนตัมดอทที่มี polyTs หุ้มอยู่ด้านนอก

นอกจากนี้ยังทำการดัดแปลงโครงสร้าง DNA nanosphere ดังกล่าวด้วย DNA aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC โดยการเลือก staple strands ในตำแหน่งที่ต้องการแล้วสังเคราะห์ให้ยาวขึ้นโดยเพิ่มลำดับเบสที่เป็น aptamer เข้าไป เพื่อให้ aptamer ดังกล่าวยื่นออกด้านนอกของโครงสร้าง

#### a. การสังเคราะห์โครงสร้าง DNA nanosphere

นำองค์ประกอบต่าง ๆ ได้แก่ M13mp18, staple strands, modified staple strands ทั้งหมดมารวมกันในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg<sup>2+</sup> (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, 12.5 magnesium acetate) โดยใช้อัตราส่วนของ M13 ต่อ staple strands เท่ากับ 1:2 แล้วนำไป anneal ด้วยเครื่อง thermocycler โดยใช้ protocol ดังนี้ 68°C 2.5 นาที 68°C to 25°C (40°C/hr) และ 25°C to 4°C (60°C/hr) หลังจากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่เกิดขึ้น

#### b. QD incubation

นำโครงสร้างที่ผ่านการ anneal แล้วมาบ่มร่วมกับ streptavidin-coated QD ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม closed strands ลงไปแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่เกิดขึ้น



## (9) การวิเคราะห์อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor

ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาค DNA nanosphere ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิคต่าง ๆ

### a. Agarose gel electrophoresis

นำโครงสร้างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (44.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) ที่มี 16 mM MgCl<sub>2</sub> ภายใต้สภาวะแบบ native conditions ใช้กระแสไฟฟ้า 70V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide

### b. Atomic Force Microscopy (AFM)

นำโครงสร้างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ AFM โดยนำโครงสร้างไป deposit ลงบน freshly cleaved mica ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วทำให้แห้งด้วย compressed air นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ AFM ด้วย tapping in air mode โดยใช้ ScanAssyst-Air silicon nitride cantilever

### c. Transmission Electron Microscopy (TEM)

นำโครงสร้างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM โดยนำโครงสร้างไปหยดลงบน negatively-glow discharged carbon-coated grid เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการย้อมสีด้วย 0.7% uranyl acetate ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM รุ่น FEI Tecnai G2 TWIN ที่ 120 kV และถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพแบบ CCD

## (10) การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่มีต่อเซลล์

นำอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่สังเคราะห์ขึ้นไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง NPC โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทดสอบในงานทดลอง หลังจากนั้นนำเซลล์ไปบ่มร่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม QD ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0 nM - 12.5 nM) ลงไป การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ทำได้โดยใช้ MTT cytotoxicity assay ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณโดยการทดสอบหา cell viability ทำการทดลองใน 96-well plate โดยเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 2 mg/mL หลุมละ 50  $\mu$ L จากนั้นหุ้ม microplate เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่มีอยู่ในไมโทคอนเดรียทำปฏิกิริยากับ MTT (สีเหลือง) เปลี่ยนเป็นผลึกฟอร์มazan (formazan) ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงินได้ หลังจากนั้นทำการละลายผลึกฟอร์มazanภายในเซลล์ด้วย DMSO แล้วนำไปทำการวัดปริมาณฟอร์มazanที่เกิดขึ้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm

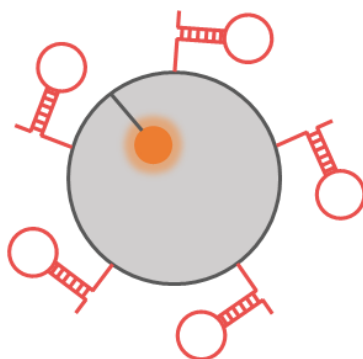
(11) การทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ต่อเซลล์เป้าหมาย

นำอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่สังเคราะห์ขึ้นไปทำการทดสอบความจำเพาะของอนุภาคที่มีต่อเซลล์มะเร็งโพรงจมูกกร่วมคหอยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ การเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทดสอบในงานทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ไปบ่มร่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal fluorescence microscope

## ผลการทดลอง

### (1) การออกแบบอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor

โครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีรูปทรงกลม (DNA nanosphere) ที่สามารถปิด-เปิดได้ตรงบริเวณรอยต่อตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางตามที่คณะผู้วิจัยได้เคยรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ (Chaithongyot, et al., 2016; Chaithongyot, et al., 2018) โดยมีการนำ staple strands บางส่วนมาดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อให้สามารถบรรจุควอนตัมดอท (quantum dot; QD) ไว้ภายในโครงสร้างและเพื่อให้มี DNA aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย NPC อยู่ที่ยึดด้านนอกของโครงสร้าง ดังแสดงในรูปที่ 8 กล่าวคือ DNA aptamer (เส้นสีแดง) ที่ติดอยู่ที่ผิวด้านนอกของโครงสร้างจะทำหน้าที่เป็น targeting ligand ที่จะทำให้อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor สามารถจับจำเพาะได้กับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย NPC แต่จะไม่จับกับเซลล์ปกติ เนื่องด้วย aptamer ที่นำมาใช้นี้มีความสามารถในการจับจำเพาะกับโปรตีนที่มีการแสดงออกมาเป็นพิเศษ (over-expressed proteins) ในเซลล์มะเร็งเท่านั้น ทำให้เราสามารถแยกแยะระหว่างเซลล์มะเร็งเป้าหมายและเซลล์ปกติได้ และสามารถติดตามสัญญาณได้จากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของ QD (วงกลมสีส้ม) ที่ถูกบรรจุอยู่ภายในโครงสร้างอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor รายละเอียดของ staple strands ดังแสดงในภาคผนวก



รูปที่ 8 โครงสร้างอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor โดยเส้นสีแดงคือ aptamer และวงกลมสีส้มคือ QD

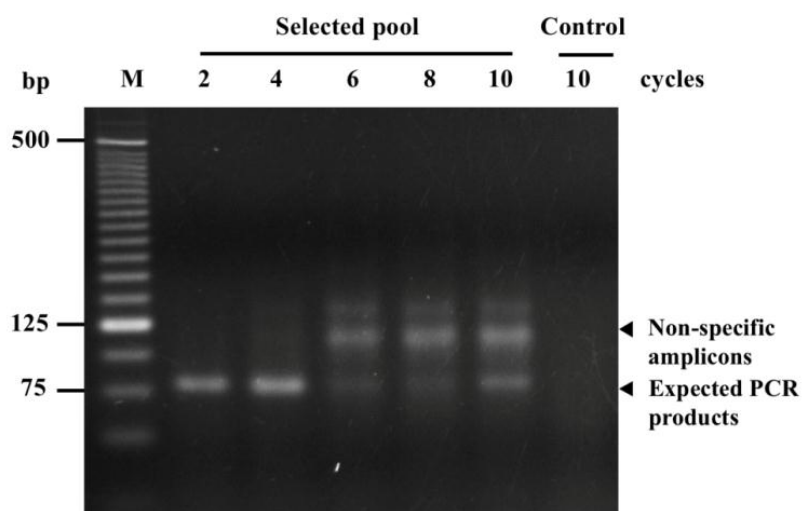
### (2) การคัดเลือก DNA aptamer

#### a. Cell-SELEX

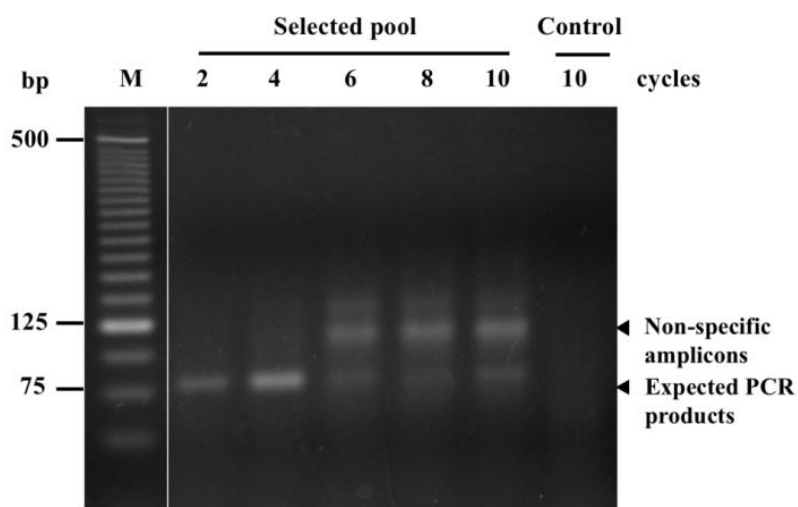
เนื่องจากงานวิจัยที่เกี่ยวกับมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยยังคงมีไม่มากนัก และพบว่ายังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับ aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ที่น่าเชื่อถือ ทำให้คณะผู้วิจัยพยายามที่จะทำการคัดเลือก DNA aptamer ด้วยวิธีที่เรียกว่า Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) โดยใช้โมเลกุลเป้าหมายเป็นเซลล์มะเร็ง NPC ในการทดลองนี้ใช้ cell line สองชนิด คือ SUNE 5-8F ซึ่งจัดเป็นเซลล์มะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยที่มีการแพร่กระจายสูง (a highly metastatic NPC cell line)

และ SUNE 6-10B ซึ่งจัดเป็นเซลล์มะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยที่ไม่มีการแพร่กระจาย (a non-metastatic NPC cell line)

จากการทำ SELEX ในรอบแรกนั้น หลังจากทำการบ่ม ssDNA library กับเซลล์มะเร็งเป้าหมายในสภาวะที่เหมาะสม ล้าง ssDNA ที่ไม่จับกับเซลล์เป้าหมายออกไป แล้วแยก ssDNA ที่จับอยู่กับเซลล์เป้าหมายออกเพื่อนำไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 9 และรูปที่ 10 จากผลการทดลองที่ได้ จะเห็นได้ว่า ทั้งในเซลล์ SUNE 5-8F และ SUNE 6-10B จำนวนรอบของการทำ PCR ที่ทำให้ได้ปริมาณ PCR products ที่เหมาะสมที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณ PCR products มากที่สุดและมีจำนวนของ non-specific amplicons น้อยที่สุด คือ จำนวน 4 รอบ



รูปที่ 9 ปริมาณ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ที่จำนวนรอบต่าง ๆ กันของการทำ SELEX กับเซลล์ SUNE 5-8F



รูปที่ 10 ปริมาณ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ที่จำนวนรอบต่าง ๆ กันของการทำ SELEX กับเซลล์ SUNE 6-10B

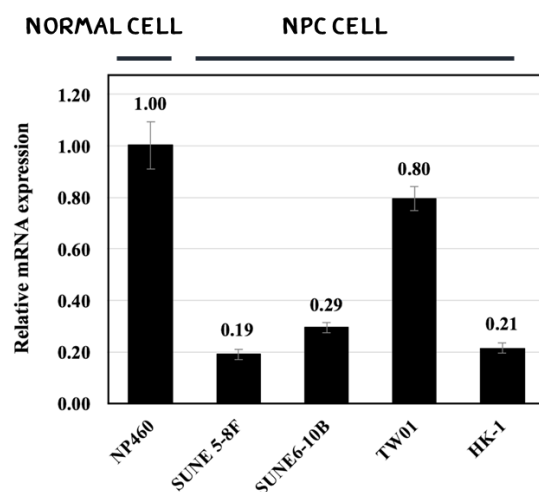
หลังจากนั้น นำ PCR products ที่ได้ไปทำการแยกจากดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ streptavidin-coated magnetic beads เพื่อให้ได้เป็น ssDNA library สำหรับการทำให้ SELEX ในรอบต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยพบว่า ปริมาณของ ssDNA ที่ได้จากการแยกด้วย magnetic beads ดังกล่าวนี้นี้มีปริมาณที่น้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการทำให้ SELEX รอบถัดไปถึงแม้ว่าคณะผู้วิจัยจะทำการปรับเปลี่ยนสถานะต่าง ๆ ที่ใช้แล้วก็ตาม และเนื่องจากเวลาที่ค่อนข้างจำกัดทำให้คณะผู้วิจัยลองทำการค้นหาข้อมูลงานวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับ aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ที่มีการรายงานไว้แล้วอีกทางหนึ่งด้วย

### b. Reported aptamer

จากการค้นคว้าเพิ่มเติมคณะผู้วิจัยพบว่า เพิ่งมีรายงานเกี่ยวกับการคัดเลือก DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC โดย Weidong Liu และคณะ จาก Central South University, Hunan, China (Jia et al., 2016) ได้ทำการคัดเลือก DNA aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ด้วยเทคนิค cell-SELEX และทำการศึกษาเพื่อยืนยันว่า anti-CD109 aptamer ที่คัดเลือกได้นั้นมีความจำเพาะต่อโปรตีน CD109 ซึ่งเป็น membrane protein ที่มีการแสดงออกมากกว่าปกติ (over express) ในเซลล์มะเร็ง NPC แต่มีการแสดงออกที่น้อยหรือไม่มีเลยในเซลล์ปกติ นั้นแสดงว่า anti-CD109 aptamer นี้จะนำมาใช้ในการแยกแยะระหว่างเซลล์มะเร็ง NPC และเซลล์ปกติได้

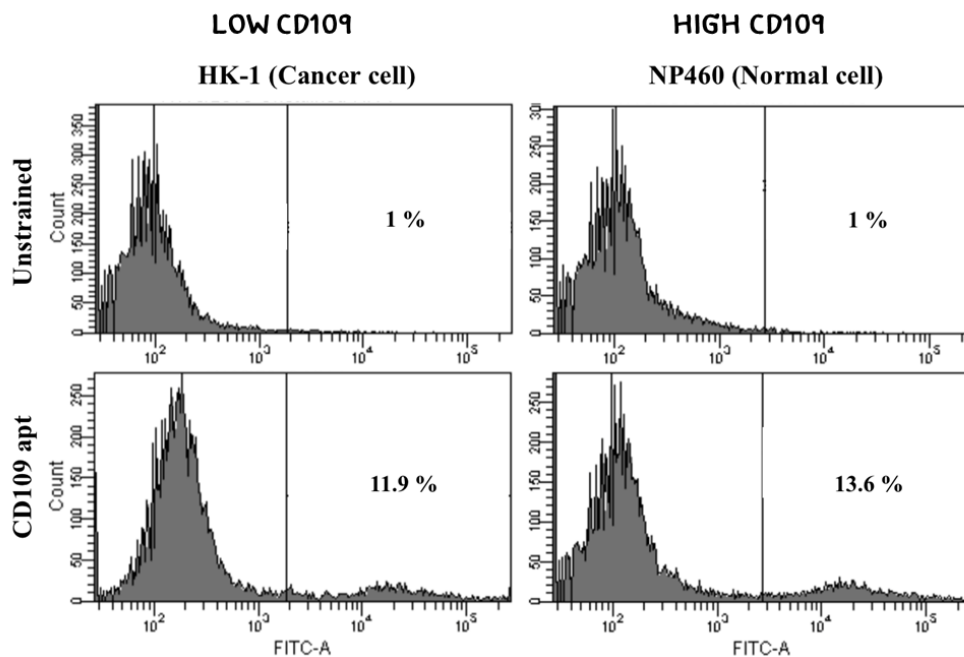
#### - การแสดงออกของโปรตีน CD109

เพื่อที่จะใช้ aptamer ที่มีการรายงานไว้ดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงทำการทดสอบเพื่อดูการแสดงออกของโปรตีน CD109 ในเซลล์มะเร็ง NPC และเซลล์ปกติ โดยในลำดับแรกนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่มีการแสดงออกใน cell lines ของเซลล์มะเร็ง NPC จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ SUNE 5-8F, SUNE 6-10B, TW-01 และ HK-1 และใช้ NP460 ซึ่งเป็น nasopharyngeal epidermal cell line เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 ปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่มีการแสดงออกในเซลล์แต่ละชนิด

ทั้งนี้ จะเห็นได้จากผลการทดลองที่ได้นั้นกลับพบว่าปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่มีการแสดงออกในเซลล์ NP460 นั้นมีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ TW-01, SUNE 6-10B, HK-1 และ SUNE 5-8F ตามลำดับ กล่าวคือ จากผลการทดลองตรวจสอบปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 นั้น พบว่าเซลล์ปกติมีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวที่สูงกว่าเซลล์มะเร็ง NPC ทุกชนิด ซึ่งตรงกันข้ามกับในรายงานวิจัยของ Weidong Liu และคณะ นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 แล้วนั้น คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบเพื่อวิเคราะห์การจับกันระหว่าง aptamer ที่มีการรายงานว่าสามารถจับจำเพาะกับโปรตีน CD109 ที่มีการแสดงออกบนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำการติดฉลากสารเรืองแสง FAM ให้กับ aptamer หลังจากบ่มร่วมกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบแล้ว นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry ซึ่งเมื่อทำการทดสอบกับเซลล์ NP460 (เซลล์ปกติ) ซึ่งมีปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่สูง (high CD109) และเซลล์ HK-1 (เซลล์มะเร็ง NPC) ซึ่งมีปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่ต่ำ (low CD109) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 12 ซึ่งพบว่า aptamer ที่มีการรายงานนั้นไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ตามที่รายงานไว้ เนื่องจากจะเห็นได้ว่าผลที่ได้จากเครื่อง flow cytometer นั้น ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด สรุปคือ aptamer ดังกล่าวไม่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการเป็น targeting ligand เพื่อใช้ในการแยกแยะระหว่างเซลล์มะเร็ง NPC และเซลล์ปกติได้

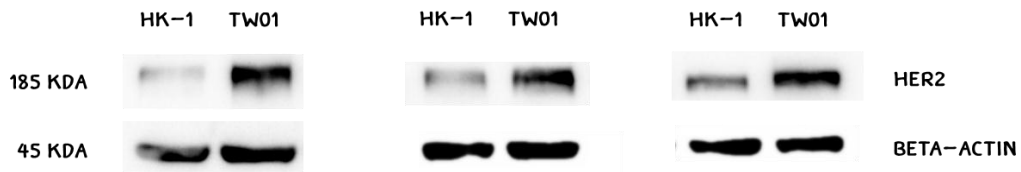


รูปที่ 12 การตรวจวิเคราะห์ความจำเพาะของ aptamer ต่อเซลล์เป้าหมายด้วย flow cytometry

- การแสดงออกของโปรตีน HER2

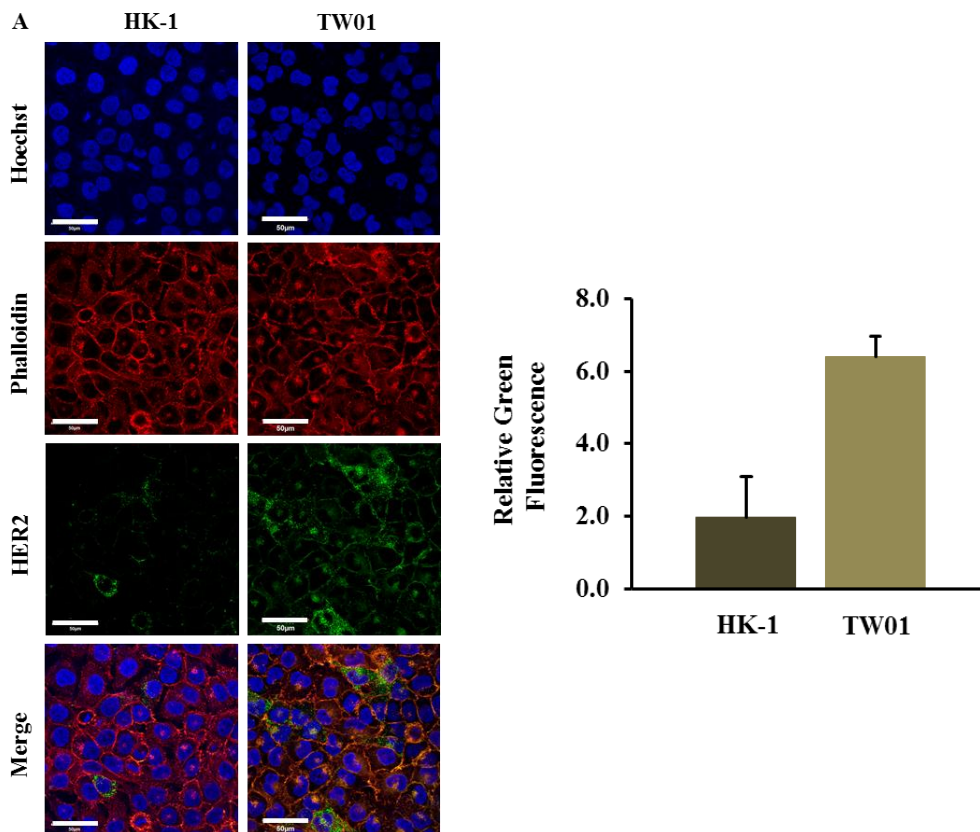
ทั้งนี้ เพื่อให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการต่อไปได้ คณะผู้วิจัยจึงทำการค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อหา aptamer ที่มีการรายงานไว้แล้วและมีความน่าเชื่อถือที่สามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์ DNA nanobiosensor ได้ โดยพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับ DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HER2 ซึ่งมีการรายงานการนำไปใช้

กันอย่างกว้างขวางแล้ว (Liu, et al., 2012; Gijs, et al., 2016) ทำให้คณะผู้วิจัยเปลี่ยนแผนมาใช้ aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HER2 (HER2-specific aptamer) โดยเช่นเดิมเริ่มต้นด้วยการวิเคราะห์การ แสดงออกของโปรตีน HER2 ด้วยเทคนิค Western blot เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ใน เซลล์มะเร็ง NPC สองชนิด ได้แก่ HK-1 และ TW-01 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13 จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า เซลล์ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่แตกต่างกัน โดยเซลล์ HK-1 จะมีการ แสดงออกของโปรตีน HER2 ที่ต่ำกว่าเซลล์ TW-01



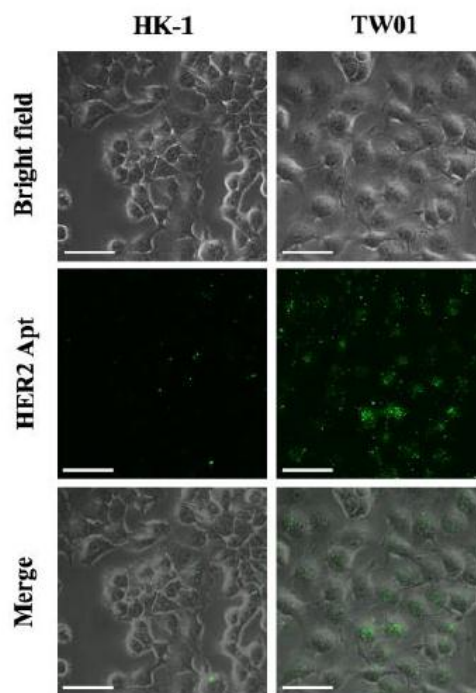
รูปที่ 13 การวิเคราะห์โปรตีน HER2 ในเซลล์ HK-1 และ TW-01 ด้วยเทคนิค Western blot

นอกจาก Western blot แล้วนั้น คณะผู้วิจัยยังทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน HER2 ด้วย เทคนิค Immunocytochemistry เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ HK-1 และ TW-01 ได้ผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 14 ผลที่ได้ก็แสดงให้เห็นว่าเซลล์ TW-01 มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่สูงกว่าเซลล์ HK-1 อย่าง เห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ Western blot



รูปที่ 14 การวิเคราะห์โปรตีน HER2 ในเซลล์ HK-1 และ TW-01 ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry

หลังจากการทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีน HER2 เปรียบเทียบในเซลล์มะเร็ง NPC สองชนิดแล้วนั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของ HER2-specific aptamer ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิด โดยทำการติดฉลากสารเรืองแสง FAM ให้กับ HER2-specific aptamer แล้วนำไปบ่มกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบ หลังจากล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 3 รอบ นำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง confocal microscope ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งจากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า HER2-specific aptamer มีความจำเพาะต่อเซลล์ TW-01 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่สูงกว่าเซลล์ HK-1 ทำให้พบว่ามีสารเรืองแสง FAM ติดอยู่กับเซลล์มากกว่า

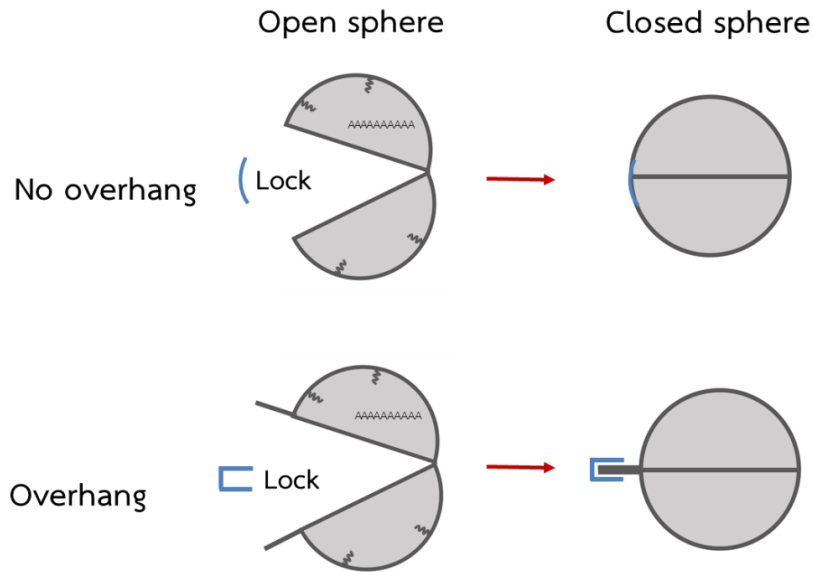


รูปที่ 15 การวิเคราะห์ความจำเพาะของ HER2-specific aptamer ต่อเซลล์ HK-1 และ TW-01

### (3) การสังเคราะห์และวิเคราะห์อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor

อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ ได้รับการออกแบบดัดแปลงมาจากโครงสร้าง DNA nanosphere ที่เคยมีการรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ และเนื่องด้วยการนำไปใช้งานที่แตกต่างกัน ทำให้คณะผู้วิจัยออกแบบการปิดโครงสร้าง nanosphere ที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งการทำให้โครงสร้าง hemisphere สองส่วนที่เชื่อมกันอยู่เกิดการปิดเป็นรูปทรงกลมนั้นต้องอาศัย ssDNA ที่ทำหน้าที่เป็นตัวล็อก โดยในงานวิจัยก่อนหน้าได้ออกแบบให้การปิดของโครงสร้างเกิดขึ้นในลักษณะที่เรียกว่า overhang กล่าวคือ จะมี ssDNA ยื่นออกมาจากโครงสร้างเพื่อให้ Lock เข้าจับแล้วเกิดการปิดโครงสร้างเป็นทรงกลม ดังแสดงในรูปที่ 16 (ล่าง) ส่วนในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบเพิ่มเติมการปิดอีกลักษณะที่เรียกว่า no overhang กล่าวคือ จะไม่มี ssDNA ยื่นออกมาจากโครงสร้าง แต่ Lock จะเข้าจับกับ M13 เพื่อให้เกิดการปิดโครงสร้างเป็นทรงกลม ดังแสดงในรูปที่ 16 (บน)

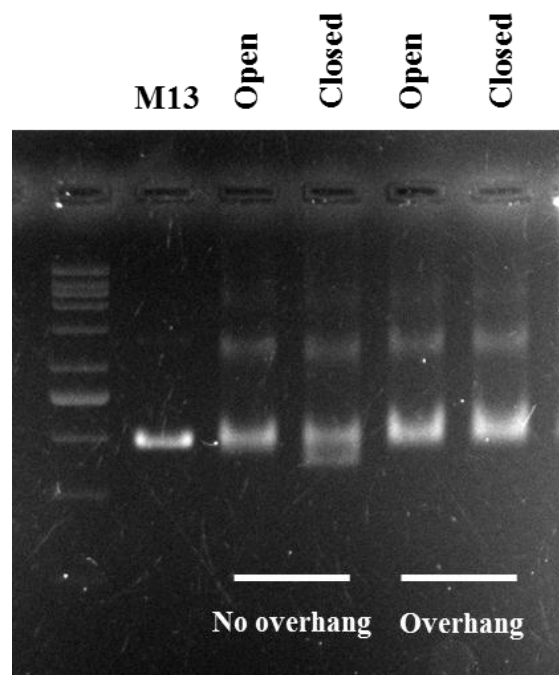




รูปที่ 16 ไดอะแกรมแสดงการปิดโครงสร้าง nanosphere แบบ no overhang และ overhang

a. Agarose gel electrophoresis

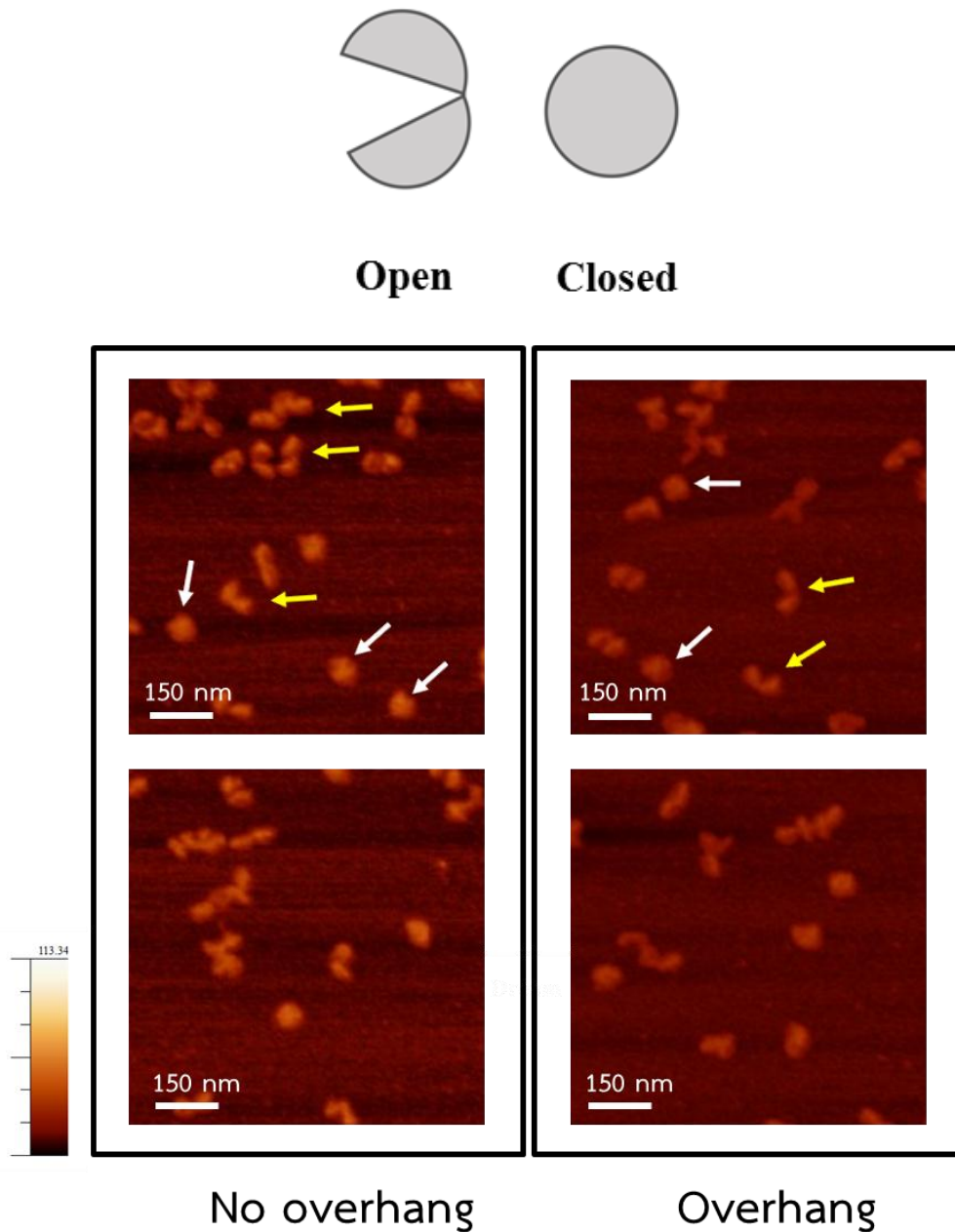
หลังจากทำการ anneal โครงสร้าง DNA nanosphere ทั้งแบบ no overhang และ overhang ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg<sup>2+</sup> ด้วยเครื่อง thermocycler แล้วก็นำโครงสร้างที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA nanosphere ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (Lane 1: 1kB ladder, Lane 2: M13, Lane 3: no overhang แบบ open, Lane 4: no overhang แบบ closed, Lane 5: overhang แบบ open และ Lane 6: overhang แบบ closed)

b. Atomic force microscopy (AFM)

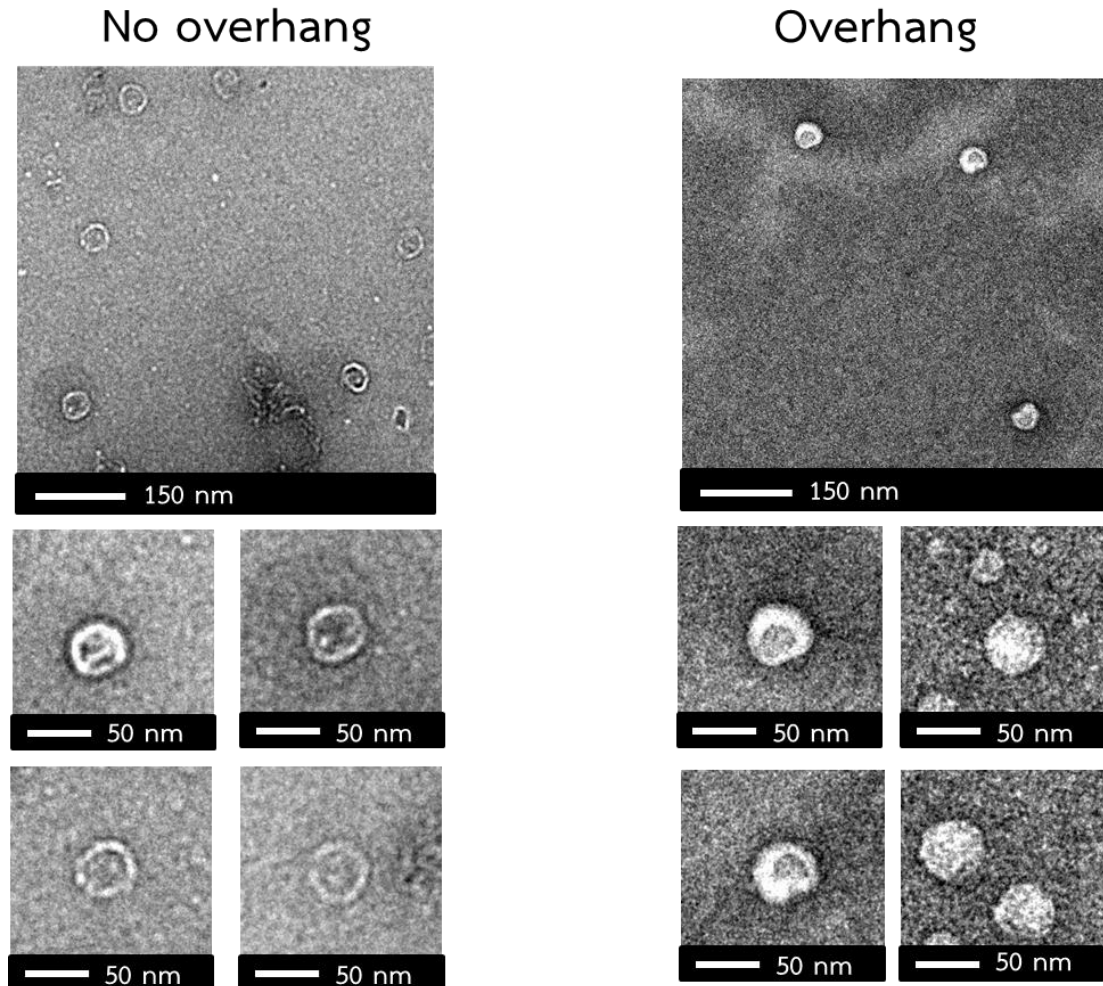
นำโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Atomic Force Microscopy (AFM) โดยใช้ tapping in air mode เปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่มีการปิดให้เป็นทรงกลมแบบ no overhang และ overhang ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 ภาพโครงสร้าง DNA nanosphere จากกล้องจุลทรรศน์ AFM (ลูกศรสีเหลืองแสดงโครงสร้างแบบ open และลูกศรสีขาวแสดงโครงสร้างแบบ closed)

c. Transmission electron microscopy (TEM)

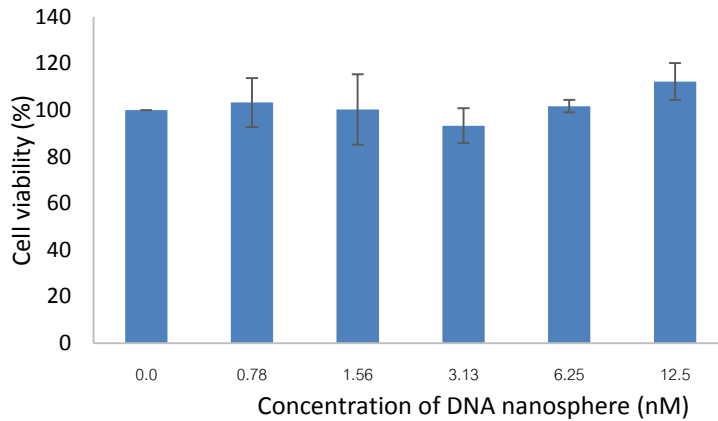
นำโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM) เปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่มีการปิดให้เป็นทรงกลมแบบ no overhang และ overhang ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19



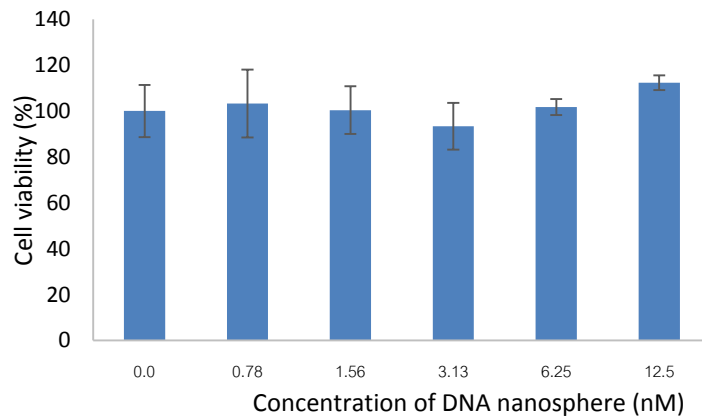
รูปที่ 19 ภาพโครงสร้าง DNA nanosphere แบบ closed จากกล้องจุลทรรศน์ TEM

(4) การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่มีต่อเซลล์

ทำการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาค HER2-aptamer modified DNA nanosphere ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิด ได้แก่ เซลล์ TW-01 และ HK-1 หลังจากทำการบ่มร่วมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำการทดสอบความมีชีวิตรอดด้วย MTT assay ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 20 และรูปที่ 21

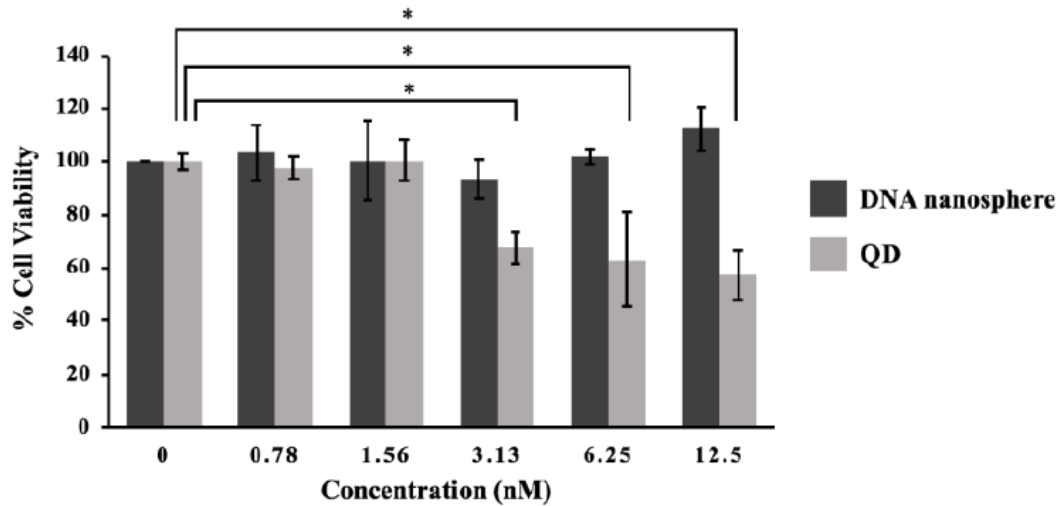


รูปที่ 20 ความมีชีวิตรอดของเซลล์ TW-01 เมื่อปนร่วมกับ aptamer-modified DNA nanosphere



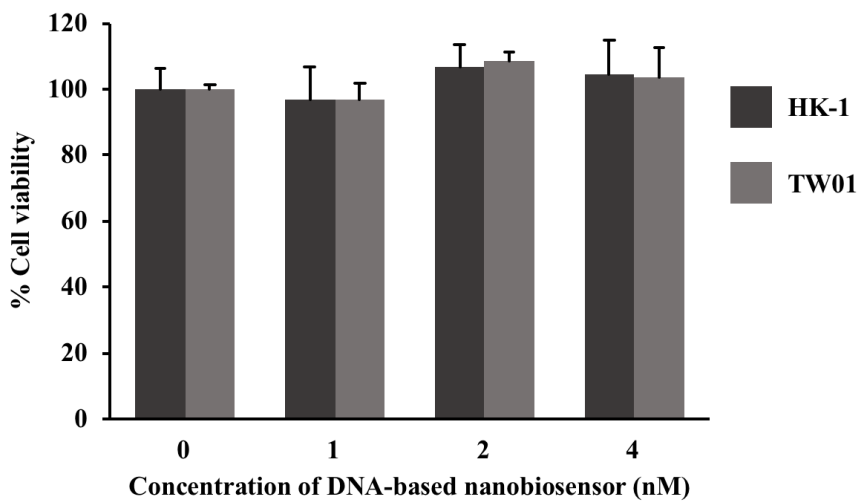
รูปที่ 21 ความมีชีวิตรอดของเซลล์ HK-1 เมื่อปนร่วมกับ aptamer-modified DNA nanosphere

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของอนุภาค HER2-aptamer modified DNA nanosphere กับความเป็นพิษของควอนตัมดอต (quantum dot; QD) ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง HK-1 ภายหลังจากการปนอนุภาคทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0 nM - 12.5 nM) ร่วมกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 22 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ QD เพิ่มสูงขึ้น (3.13 nM - 12.5 nM) เซลล์ HK-1 มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับอนุภาค HER2-aptamer modified DNA nanosphere

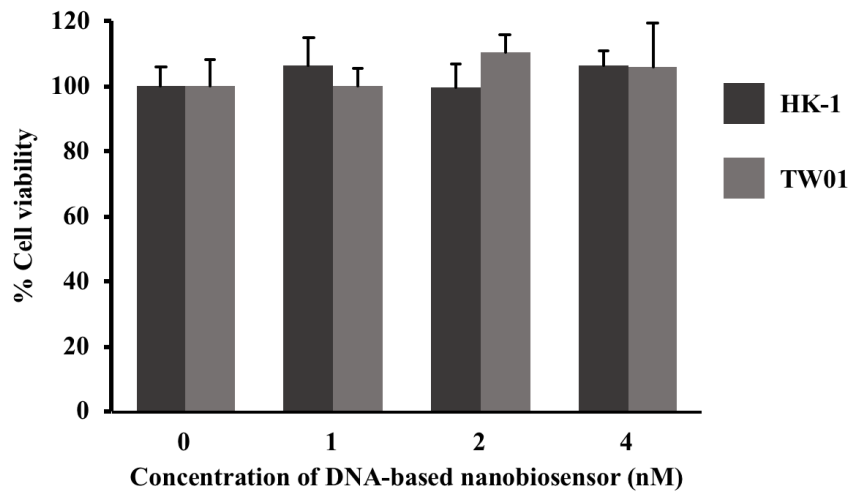


รูปที่ 22 การทดสอบความเป็นพิษของ HER2-aptamer modified DNA nanosphere และ QD ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง HK-1 เมื่อทำการบ่มร่วมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ( $p$ -value < 0.05)

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่มีการบรรจุ QD ไว้ภายในกับเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิด ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 23 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และรูปที่ 24 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง



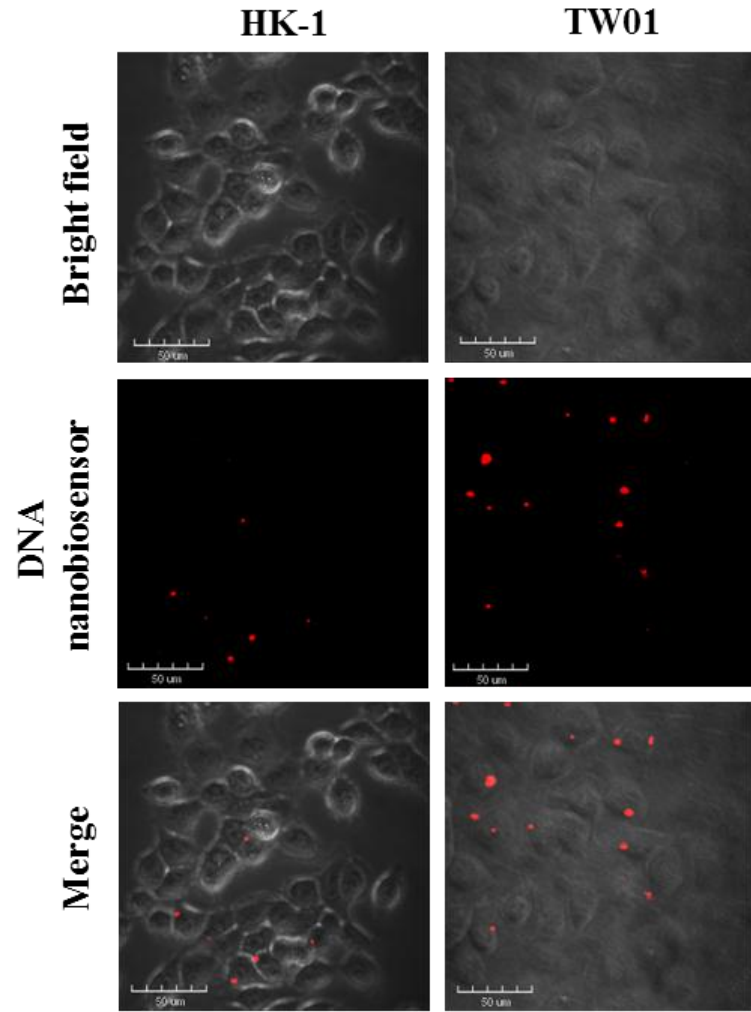
รูปที่ 23 ความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิดเมื่อบ่มร่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 24 ความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิดเมื่อบ่มร่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### (5) การทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ต่อเซลล์เป้าหมาย

เพื่อทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่มีต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์มะเร็ง NPC สองชนิด คือ HK-1 และ TW-01 ซึ่งเซลล์มะเร็งทั้งสองนี้มีปริมาณการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่เยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกัน โดยเซลล์ HK-1 จัดเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ต่ำ (HER2-low cell) ส่วนเซลล์ TW-01 จัดเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 สูง (HER2-high cell) นั้นแสดงว่าอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ซึ่งมีการติด targeting ligand เป็น HER2 aptamer นั้นควรที่จะสามารถจับจำเพาะกับเซลล์ TW-01 ได้ดีกว่าเซลล์ HK-1 จากการทดลองนำเอาอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ไปทำการบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างอนุภาคนาโนส่วนที่ไม่จับกับเซลล์ออก แล้วนำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal microscope ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 การทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด

## อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

### อภิปรายผลการทดลอง

โรคมะเร็งนับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ อย่างไรก็ตามโรคมะเร็งสามารถรักษาให้หายขาดได้ หากสามารถตรวจพบในระยะเริ่มแรก แต่ทั้งนี้ผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่มักจะตรวจพบเมื่ออยู่ในระยะรุนแรงหรือระยะลุกลามแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ค่อนข้างยาก รวมถึงยาที่ใช้ในการรักษามีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อโอกาสการรอดชีวิตของผู้ป่วย นอกจากการรักษาโรคมะเร็งในระยะเริ่มแรกจะได้ผลที่ดีกว่าแล้วนั้น ยังพบว่าสามารถช่วยป้องกันการลุกลามหรือแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ ทั่วร่างกายได้อีกด้วย โรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย (Nasopharyngeal carcinoma; NPC) จัดเป็นโรคมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบมากในประเทศแถบเอเชีย อีกทั้งโรคมะเร็งดังกล่าวนี้ยังสามารถตรวจพบได้ยากในระยะเริ่มแรก เนื่องจากผู้ป่วยอาจไม่มีอาการใด ๆ บ่งชี้หรือมีอาการที่ไม่ชัดเจนและเนื้องอกที่เกิดขึ้นมักอยู่ในบริเวณด้านหลังโพรงจมูก ซึ่งเป็นบริเวณซ่อนเร้นที่ตรวจพบได้ยาก ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน รวมถึงวิธีการรักษาและติดตามผลที่ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ ทำให้การรักษามะเร็งในบริเวณดังกล่าวและการควบคุมการแพร่กระจายของมะเร็งไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

มีรายงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการนำเอาเทคโนโลยีเข้ามาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านการแพทย์เพื่อพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคเพื่อให้การรักษาเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การพัฒนาอนุภาคนาโน (nanoparticle) เพื่อใช้ในการนำส่งยาเข้าไปยังเซลล์หรือบริเวณเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำเอาคุณสมบัติของ DNA nanostructure และควอนตัมดอท (Quantum dot; QD) มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย โดยอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่พัฒนาขึ้นนี้เกิดขึ้นจากการนำเอาโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิค scaffolded DNA origami ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของโครงสร้างด้วย DNA aptamer ที่สามารถจับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายที่ต้องการมาใช้ในการห่อหุ้ม QD ไว้ภายในโครงสร้าง ซึ่ง QD จะทำหน้าที่เป็น signaling molecule ที่ส่งสัญญาณเพื่อให้เราสามารถติดตามสัญญาณและสามารถตรวจวัดได้

โดยคณะผู้วิจัยใช้โครงสร้าง DNA nanosphere ที่มีการรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ (Chaithongyot, et al., 2016; Chaithongyot, et al., 2018) ขั้นตอนถัดไปจึงเป็นขั้นตอนการคัดเลือก DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอย (NPC) ซึ่งอาจจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ (biomarker) ที่สำคัญของเซลล์มะเร็งชนิดดังกล่าว เนื่องจากพบว่ามีกรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจทำการคัดเลือก DNA aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC โดยอาศัยเทคนิค cell-SELEX โดยใช้เซลล์มะเร็ง nasopharyngeal carcinoma cell line 2 ชนิดเป็นเซลล์เป้าหมาย ได้แก่ SUNE 5-8F ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งโพรงจมูกร่วมคอหอยแบบที่มีการแพร่กระจายสูง (highly metastatic) และ SUNE 6-10B ซึ่งเป็นเซลล์โพรงจมูกร่วมคอหอยที่ไม่มีการแพร่กระจาย (non-metastatic) และใช้เซลล์



nasopharyngeal epidermal cell NP40 เป็นเซลล์ปกติ ผลการทดลองที่ได้จากการทำ SELEX ในรอบแรก นั้น พบว่าเมื่อนำ ssDNA ที่สามารถจับกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR จะเห็นได้ว่า จำนวนรอบของการทำ PCR ที่ทำให้ได้ปริมาณ PCR products ที่เหมาะสมที่สุด คือได้ปริมาณ PCR products มากที่สุดและมีจำนวนของ non-specific amplicons น้อยที่สุด คือ จำนวน 4 รอบ เหมือนกันทั้งในเซลล์ SUNE 5-8F และ SUNE 6-10B แต่อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยพบว่าเมื่อนำ PCR products ดังกล่าวที่ได้ไปทำการแยกให้กลายเป็น ssDNA เพื่อที่จะนำไปใช้เป็น ssDNA library สำหรับการทำให้ SELEX ในรอบต่อไปนั้น กลับได้ปริมาณ ssDNA ที่น้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการทำให้ SELEX ในรอบถัดไป และถึงแม้ว่าคณะผู้วิจัยจะทำการปรับเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้แล้วก็ตาม เนื่องจากเทคนิค SELEX เป็นเทคนิคที่ค่อนข้างมีความซับซ้อนและยุ่งยาก ประกอบกับระยะเวลาในการวิจัยที่ค่อนข้างจำกัดทำให้คณะผู้วิจัยลองทำการค้นหาข้อมูลงานวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับ aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ที่มีการรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้

จากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่า Weidong Liu และคณะ จาก Central South University, Hunan, China (Jia et al., 2016) ได้รายงานการคัดเลือก DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ด้วยเทคนิค cell-SELEX อีกทั้งยังทำการศึกษายืนยันว่า anti-CD109 aptamer ที่คัดเลือกได้นั้นมีความจำเพาะต่อโปรตีน CD109 ซึ่งเป็น membrane protein ที่มีการแสดงออกมากกว่าปกติ (over express) ในเซลล์มะเร็ง NPC แต่มีการแสดงออกที่น้อยหรือไม่มีเลยในเซลล์ปกติ นั้นแสดงว่า anti-CD109 aptamer นี้จะนำมาใช้ในการแยกแยะระหว่างเซลล์มะเร็ง NPC และเซลล์ปกติได้ ดังนั้นเพื่อที่จะยืนยันว่า anti-CD109 aptamer ที่มีการรายงานนี้จะสามารถนำมาใช้ในการแยกแยะความแตกต่างของเซลล์มะเร็ง NPC และเซลล์ปกติได้นั้น คณะผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน CD109 ในเซลล์มะเร็ง NPC จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ SUNE 5-8F, SUNE 6-10B, TW-01 และ HK-1 พร้อมทั้งในเซลล์ปกติ NP460 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของโปรตีนดังกล่าว แต่จากผลการทดลองที่ได้นั้นก็กลับพบผลการทดลองที่ตรงกันข้ามกับที่มีการรายงานไว้ในรายงานวิจัยของ Weidong Liu และคณะ กล่าวคือ เซลล์ปกติ NP460 มีปริมาณการแสดงออกของโปรตีน CD109 สูงกว่าเซลล์มะเร็ง NPC ทุกชนิด (TW-01, SUNE 6-10B, HK-1 และ SUNE 5-8F) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ทำการตรวจสอบการจับจำเพาะกันระหว่าง anti-CD109 aptamer ดังกล่าวกับเซลล์มะเร็ง HK-1 (เซลล์มะเร็ง NPC) ซึ่งมีปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่ต่ำ (low CD109) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ NP460 ซึ่งมีปริมาณ mRNA ของโปรตีน CD109 ที่สูง (high CD109) โดยทำการติดฉลากสารเรืองแสง FAM ให้กับ anti-CD109 aptamer หลังจากทำการบ่ม FAM-labeled anti-CD109 aptamer ร่วมกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบแล้ว นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า anti-CD109 aptamer ที่มีการรายงานนั้นไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC ตามที่รายงานไว้ เนื่องจากผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer นั้น ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด สรุปคือ anti-CD109 aptamer ดังกล่าวไม่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการเป็น targeting ligand เพื่อใช้ในการแยกแยะระหว่างเซลล์มะเร็ง NPC และเซลล์ปกติได้

ทั้งนี้ เพื่อให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการต่อไปได้ คณะผู้วิจัยจึงทำการค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อหา aptamer ที่มีการรายงานไว้แล้วและมีความน่าเชื่อถือที่สามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์ DNA

nanobiosensor ได้ โดยพบว่ามีการรายงานเกี่ยวกับ DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HER2 ซึ่งมีการรายงานการนำไปใช้กันอย่างกว้างขวางและดูมีความน่าเชื่อถือ (Liu, et al., 2012; Gijis, et al., 2016) ทำให้คณะผู้วิจัยเปลี่ยนแผนมาใช้ aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HER2 (HER2-specific aptamer) โดยเช่นเดิมเริ่มต้นด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน HER2 ด้วยเทคนิค Western blot เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในเซลล์มะเร็ง NPC สองชนิด ได้แก่ HK-1 และ TW-01 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เซลล์ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่แตกต่างกัน โดยเซลล์ HK-1 จะมีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่ต่ำกว่าเซลล์ TW-01 นอกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot แล้วนั้น คณะผู้วิจัยยังทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน HER2 ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ HK-1 และ TW-01 ซึ่งจากผลที่ได้ก็ยืนยันว่าเซลล์ TW-01 มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่สูงกว่าเซลล์ HK-1 อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ Western blot หลังจากทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีน HER2 เปรียบเทียบในเซลล์มะเร็ง NPC สองชนิดแล้วนั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของ HER2-specific aptamer ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง NPC ทั้งสองชนิด โดยทำการติดฉลากสารเรืองแสง FAM ให้กับ HER2-specific aptamer แล้วนำไปบ่มกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบ หลังจากล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 3 รอบ นำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง confocal microscope จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า HER2-specific aptamer มีความจำเพาะต่อเซลล์ TW-01 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ที่สูงกว่าเซลล์ HK-1 ทำให้พบว่ามีสารเรืองแสง FAM ติดอยู่กับเซลล์มากกว่า

เมื่อทำการคัดเลือก DNA aptamer ที่จะนำมาดัดแปลงเข้ากับโครงสร้าง DNA nanosphere ได้แล้ว คณะผู้วิจัยจึงนำเอาโครงสร้าง DNA nanosphere ที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้ามาทำการออกแบบและดัดแปลงเพื่อนำมาใช้เป็นอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ซึ่งเดิมนั้นในการทำให้โครงสร้างมีลักษณะปิดเป็นทรงกลมจะต้องอาศัย ssDNA ที่ทำหน้าที่เป็นตัวล๊อคที่ยื่นออกมาจากโครงสร้างทรงกลม เรียกลักษณะดังกล่าวว่า overhang โดยมีการออกแบบเพิ่มเติมเปลี่ยนแปลงลักษณะการปิดโครงสร้างที่แตกต่างไปจากเดิม เป็นลักษณะที่เรียกว่า no overhang คือไม่มีการยื่นของตัวล๊อคออกมาด้านนอกโครงสร้าง แต่ ssDNA ที่ทำหน้าที่เป็นตัวล๊อคจะเข้าจับกับ M13 เพื่อให้เกิดการปิดโครงสร้างเป็นทรงกลมขึ้น ทำการตรวจวิเคราะห์โครงสร้างที่ได้ออกแบบขึ้นนี้ โดยทำการ anneal โครงสร้าง DNA nanosphere ทั้งแบบ overhang และ no overhang ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg<sup>2+</sup> ด้วยเครื่อง thermocycler แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ agarose gel electrophoresis, Atomic Force Microscopy (AFM) และ Transmission Electron Microscopy (TEM) พบว่า มีโครงสร้างเกิดขึ้นตามที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งผลที่ได้จาก agarose gel จะเห็นได้ว่าการปิดโครงสร้างเป็นทรงกลมแบบ no overhang ทำให้เห็นความต่างของโครงสร้างแบบ open และ closed ได้อย่างชัดเจนมากกว่าการปิดโครงสร้างเป็นทรงกลมแบบ overhang ส่วนผลที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ AFM นั้นจะเห็นได้ว่ามีโครงสร้างแบบ open เกิดขึ้นพอ ๆ กับโครงสร้างแบบ closed ในทั้งสองรูปแบบการปิดโครงสร้าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ AFM ที่ใช้การสแกนของเข็มขนาดเล็ก ซึ่งแรงที่เกิดขึ้นจากปลายทิ่มกับพื้นผิวสามารถทำให้โครงสร้างแบบ closed กลายเป็นโครงสร้าง

แบบ open ได้ เนื่องจากจะเห็นได้ว่า ผลที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ TEM นั้น พบโครงสร้างแบบ closed เกิดขึ้นมากกว่า

หลังจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่ยังไม่มีการบรรจุ QD และ free QD ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง HK-1 โดยทำการบ่มเซลล์ที่ต้องการทดสอบร่วมกับอนุภาคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0 nM - 12.5 nM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ QD เพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ 3.13 nM ขึ้นไป เซลล์ HK-1 มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแตกต่างจากอนุภาคนาโน HER2-aptamer modified DNA nanosphere ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HK-1

ทำการทดสอบความจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง NPC เป้าหมาย ได้แก่ HK-1 ซึ่งจัดเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 ต่ำ (HER2-low cell) และ TW-01 ซึ่งจัดเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 สูง (HER2-high cell) เมื่อทำการบ่มเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกับอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal microscope จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor นั้นสามารถจับกับเซลล์ TW-01 ได้มากกว่าเซลล์ HK-1 เนื่องจาก targeting ligand ที่ติดอยู่กับโครงสร้าง DNA nanosphere คือ HER2-specific aptamer ทำให้อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor นั้นสามารถจับจำเพาะกับเซลล์ TW-01 ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน HER2 มากกว่าได้ดีกว่านั่นเอง

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้ จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่พัฒนาขึ้นจากการนำเอาโครงสร้าง DNA nanosphere มาดัดแปลงด้วย DNA aptamer เป็น targeting ligand และมีการบรรจุ QD ไว้ภายในเพื่อทำหน้าที่เป็น signaling molecule นี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวตรวจวัดที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายตามที่ได้ออกแบบไว้ นอกจากนี้อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor นี้ยังสามารถที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นตัวตรวจวัด (biosensor) สำหรับการตรวจวัดเซลล์เป้าหมายเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งบางชนิดที่ยากต่อการตรวจพบในระยะเริ่มแรกที่น่าจะช่วยให้การตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคเป็นไปได้อย่างทันท่วงทีและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

### สรุปผลการทดลอง

1. อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA origami เป็นรูปทรงกลม (DNA nanosphere) ได้ถูกสร้างขึ้นตามที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งสามารถอยู่ในรูปแบบเปิด (open sphere) และปิด (closed sphere) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis กล้องจุลทรรศน์ AFM และกล้องจุลทรรศน์ TEM

2. DNA aptamer ที่คัดเลือกมาเพื่อนำมาใช้เป็น targeting ligand ที่ทำให้อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC เป้าหมาย คือ DNA aptamer ที่จำเพาะกับโปรตีน

HER2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกมากที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเซลล์มะเร็ง NPC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ เซลล์ HK-1 ซึ่งจัดเป็น HER2-low cell และเซลล์ TW-01 ซึ่งจัดเป็น HER2-high cell ตามที่ได้จากผลการทดลองด้วยเทคนิค Western blot และ Immunocytochemistry

3. โครงสร้าง DNA nanosphere ที่มีการตัดแปลงด้วย DNA aptamer นั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำการทดสอบเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (12.5 nM) ตรงข้ามกับควอนตัมดอท (QD) ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (3.13 nM)

4. อนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ที่พัฒนาขึ้นจากโครงสร้าง DNA nanosphere ที่ผ่านการตัดแปลงให้มี HER2-specific aptamer อยู่ที่ผิวด้านนอกและมี QD บรรจุอยู่ภายในมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง NPC เป้าหมาย

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการวิเคราะห์จำนวนของ DNA aptamer ที่นำมาดัดแปลงลงบนผิวด้านนอกของโครงสร้าง DNA nanosphere ว่ามีผลต่อการจับจำเพาะของอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor กับเซลล์มะเร็งเป้าหมายหรือไม่ อย่างไร
2. ควรมีการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA nanosphere ภายหลังจากการบรรจุควอนตัมดอท (QD) ไว้ภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM
3. ควรมีการทดสอบการกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อทำการป้อนอนุภาคนาโน DNA nanobiosensor ร่วมกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ว่าอนุภาคนาโนดังกล่าวทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือไม่

## บรรณานุกรม

- Abu-Salah, K. M., Ansari, A. A. and Alrokayan, S. A. 2010. DNA-based applications in nanobiotechnology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 715295.
- Akerman, M. E., Chan, W. C. W., Laakkonen, P., Bhatia, S. N. and Ruoslahti, E. 2002. Nanocrystal targeting in vivo. *PNAS*, 99, 12617-12621.
- Alivisatos, A. P., Gu, W. and Larabell, C. 2005. Quantum dots as cellular probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 7, 55-76.
- Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Birkedal, V., Besenbacher, F., Gothelf, K. V. and Kjems, J. 2009. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 459, 73-77.
- Bae, P. K. and Chung, B. H. 2014. Multiplexed detection of various breast cancer cells by perfluorocarbon/quantum dot nanoemulsions conjugated with antibodies. *Nano Convergence*, 1:23.
- Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P. and Waggoner, A. S. 2004. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate Chem.*, 15, 79-86.
- Ballou, B., Ernst, L. A., Andreko, S., Harper, T., Fitzpatrick, J. A., Waggoner, A. S. and Bruchez, M. P. 2007. Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. *Bioconjugate Chem.*, 18, 389-396.
- Bentzen, E. L., Tomlinson, I. D., Mason, J., Gresch, P., Warnement, M. R., Wright, D., Sanders-Bush, E., Blakely, R. and Rosenthal, S. J. 2005. Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjugate Chem.*, 16, 1488-1494.
- Borchert, H., Talapin, D. V., Gaponik, N., McGinley, C., Adam, S., Lobo, A., Moller, T. and Weller, H. 2003. Relations between the photoluminescence efficiency of CdTe nanocrystals and their surface properties revealed by synchrotron XPS. *J. Phys. Chem. B.*, 107, 9662-9668.

- Cai, W., Shin, D. W., Chen, K., Gheysens, O., Cao, Q., Wang, S. X., Gambhir, S. S. and Chen, X. 2006. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.*, 6, 669-676.
- Chaithongyot, S., Chomane, N., Charngkaew, K., **Udomprasert, A.**, and Kangsamaksin, T. (2016). DNA nanosphere as a drug delivery system for cancer cells. In Proceedings of the 5th international biochemistry and molecular biology conference 2016, (pp. 247-250). Songkhla: Prince of Songkla University.
- Chaithongyot, S., Chomane, N., Charngkaew, K., **Udomprasert, A.**, and Kangsamaksin, T. (2018). Aptamer-functionalized DNA nanosphere as a stimuli-responsive nanocarrier. *Materials Letters* 214, 72-75.
- Chen, W. X., Zhang, K. H., Zou, X. S., Chen, Y. Q. and Li, J. G. 2013. Screening and identification of the nucleic acid aptamers in nasopharyngeal carcinoma. *Genet. Mol. Res.*, 12, 6850-6857.
- Cheng, A. K. H., Su, H., Wang, Y. A. and Yu, H. Z. 2009. Aptamer-based detection of epithelial tumor marker mucin 1 with quantum dot-based fluorescence readout. *Anal Chem.*, 81, 6130-6139.
- Dahan, M., Levi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B. and Triller, A. 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, 302, 442-445.
- De Farias, P. M., Santos, B. S., de Menezes, F. D., de Carvalho Ferreira, R., Barjas-Castro, M. L., Castro, V., Lima, P. R., Fontes, A. and Cesar, C. L. 2005. Investigation of red blood cell antigens with highly fluorescent and stable semiconductor quantum dots. *J. Biomed. Opt.*, 10, 440231-440234.
- Douglas, S. M., Bachelet, I. and Church, G. M. 2012. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science*, 335, 831-834.
- Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H. and Libchaber, A. 2002. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science*, 298, 1759-1762.
- Farias, P. M., Santos, B. S. and Fontes, A. 2009. Semiconductor fluorescent quantum dots: efficient biolabels in cancer diagnostics. *Methods Mol. Biol.*, 544, 407-419.

- Ferreira, C. S., Matthews, C. S. and Missailidis, S. 2006. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumor Biol.*, 27, 289-301.
- Frangioni, J. V. 2003. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 626-634.
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K. and Nie, S. 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotech.*, 22, 969-976.
- Gao, J. and Xu, B. 2009. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today*, 4, 37-51.
- Geho, D., Lahar, N., Gurnani, P., Huebschman, M., Herrmann, P. Espina, V., Shi, A., Wulfkuhle, J., Garner, H., Petricoin, E. 3<sup>rd</sup>, Liotta, L. A. and Rosenblatt, K. P. 2005. Pegylated, streptavidin-conjugated quantum dots are effective detection elements for reverse-phase protein microarrays. *Bioconjugate Chem.*, 16, 559-566.
- Gijs, M., Penner, G., Blackler, G. B., Impens, N. R. E. N., Baatout, S., Luxen, A. & Aerts, A. M. 2016. Improved aptamers for the diagnosis and potential treatment of HER2-positive cancer. *Pharmaceuticals*, 9, 29.
- Han, D., Pal, Suchetan, Nangreave, J., Deng, Z., Liu, Y. and Yan, H. 2011. DNA Origami with Complex Curvatures in Three-Dimensional Space. *Science*, 332, 342-346.
- Ishii, D., Kinbara, K., Ishida, Y., Ishii, N., Okochi, M., Yohda, M. and Aida, T. 2003. Chaperonin-mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles. *Nature*, 423, 628-632.
- Jia, W., Ren, C., Wang, L., Zhu, B., Jia, W., Gao, M., Zeng, F., Zeng, L., Xia, X., Zhang, X., Fu, T., Li, S., Du, C., Jiang, X., Chen, Y., Tan, W., Zhao, Z. & Liu, W. 2016. CD109 is identified as a potential nasopharyngeal carcinoma biomarker using aptamer selected by cell-SELEX. *Oncotarget*, 7:55328-55342.
- Jiang, Q., Song, C., Nangreave, J., Liu, X., Lin, L., Qiu, D., Wang, Z., Zou, G., Liang, X., Yan, H. and Ding, B. 2012. DNA Origami as a Carrier for Circumvention of Drug Resistance. *JACS.*, 134, 13396-13403.



- Kelf, T. A., Sreenivasan, V. K. A., Sun, J., Kim, E. J., Goldys, E. M. and Zvyagin, A. V. 2010. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology*, 21, 28105-28112.
- Kim, S., Lim, Y. T., Soltesz, E. G., de Grand, A. M., Lee, J., Nakayama, A., Parker, J. A., Mihaljevic, T., Laurence, R. G., Dor, D. M., Cohn, L. H., Bawendi, M. G. and Frangioni, J. V. 2004. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature Biotechnol.*, 22, 93-97.
- Ko, S. H., Du, K. and Liddle, J. A. 2013. Quantum-dot fluorescence lifetime engineering with DNA origami constructs. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 1193-1197.
- Kobayashi, H., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Regino, C. A. S., Urano, Y. and Choyke, P. L. 2007. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett.*, 7, 1711-1716.
- Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W. and Webb, W. W. 2003. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, 300, 1434-1436.
- Liu, L., Yong, K. T., Roy, I., Law, W. C., Ye, L., Liu, J., Liu, J., Kumar, R., Zhang, X. and Prasad, P. N. 2012. Bioconjugated pluronic triblock-copolymer micelle-encapsulated quantum dots for targeted imaging of cancer: in vitro and in vivo studies. *Theranostics*, 2, 705-713.
- Liu, Z., Duan, J.-H., Song, Y.-M., Ma, J., Wang, F.-D., Lu, X. & Yang, X.-D. 2012. Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells *in vitro*. *Journal of Translational Medicine*, 10:148.
- Mammen, M., Choi, S. K. and Whitesides, G. M. 1998. Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 2754-2794.
- Massoud, T. F. and Gambhir, S. S. 2003. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Dev.*, 17, 545-580.
- Medintz, I. L., Clapp, A. R., Mattoussi, H., Goldman, E. R., Fisher, B. and Mauro, J. M. 2003. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat. Mater.*, 2, 630-639.

- Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R. and Mattoussi, H. 2005. Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nat. Mater.*, 4, 435-446.
- Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S. and Weiss, S. 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307, 538-544.
- Mulder, W. J., Griffioen, A. W., Strijkers, G. J., Cormode, D. P., Nicolay, K. and Fayad, Z. A. 2007. Magnetic and fluorescent nanoparticles for multimodality imaging. *Nanomedicine*, 2, 307-324.
- Pathak, S., Choi, S. K., Arnheim, N. and Thompson, M. E. 2001. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *JACS*, 123, 4103-4104.
- Peng, C. W. and Li, Y. 2010. Application of quantum dots-based biotechnology in cancer diagnosis: Current status and future perspectives. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 1-11.
- Pinheiro, A. V., Han, D., Shih, W. M. and Yan, H. 2011. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nature Nanotechnology*, 6, 763-772.
- Rossetti, R. And Brus, L. 1982. Electron-hole recombination emission as a probe of surface chemistry in aqueous CdS colloids. *J. Phys. Chem.*, 86, 4470-4472.
- Rothemund, P. W. K. 2006. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440, 297-302.
- Samanta, A., Deng, Z. and Liu, Y. 2014. Infrared emitting quantum dots: DNA conjugation and DNA origami directed self-assembly. *Nanoscale*, 6, 4486-4490.
- Shieh, F., Lavery, L., Chu, C. T., Richards-Kortum, R., Ellington, A. D. and Korgel, B. A. 2005. Semiconductor nanocrystal-aptamer bioconjugate probes for specific prostate carcinoma cell targeting. *Proc. SPIE 5705, Nanobiophotonics and Biomedical Applications II*, 159. doi:10.1117/12.597249.
- So, M. K., Xu, C., Loening, A. M., Gambhir, S. S. and Rao, J. 2006. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. *Nat. Biotech.*, 24, 339-343.

- Troy, T., Jekic-McMullen, D., Sambucetti, L. and Rice, B. 2004. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol. Imaging*, 3, 9-23.
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F. and Bruchez, M. P. 2003. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, 21, 41-46.
- Xing, Y., Chaudry, Q., Shen, C., Kong, K. Y., Zhau, H. E., Chung, L. W., Petros, J. A., O'Regan, R. M., Yezhelyev, M. V., Simons, J. W., Wang, M. D. and Nie, S. 2007. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nature Protocols*, 2, 1152-1165.
- Yang, M., Baranov, E., Wang, J. W., Jiang, Ping, Wang, X., Sun, F. X., Bouvet, M., Moossa, A. R., Penman, S. and Hoffman, R. M. 2002. Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. *PNAS*, 99, 3824-3829.
- Ye, L., Yong, K. T., Liu, L., Roy, I., Hu, R., Zhu, J., Cai, H., Law, W. C., Liu, J., Wang, K., Liu, J., Liu, Y., Hu, Y., Zhang, X., Swihart, M. T. and Prasad, P. N. 2012. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nature Nanotechnology*, 7, 453-458.
- Zadegan, R. M. and Norton, M. L. 2012. Structural DNA nanotechnology: From design to applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 7149-7162.
- Zahid, M., Kim, B., Hussain, R., Amin, R. and Park, S. H. 2013. DNA nanotechnology: a future perspective. *Nanoscale Research Letters*, 8, 119.
- Zhang, B., Wang, X., Liu, F., Cheng, Y. and Shi, D. 2012. effective reduction of nonspecific binding by surface engineering of quantum dots with bovine serum albumin for cell-targeted imaging. *Langmuir*, 28, 16605-16613.
- Zhao, M. X. and Zeng, E. Z. 2015. Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale Research Letters*, 10, 171.

Zimmer, J. P., Kim, S. W., Ohnishi, S., Tanaka, E., Frangioni, J. V. and Bawendi M. G. 2006. Size series of small indium arsenide-zinc selenide core-shell nanocrystals and their application to in vivo imaging. *JACS.*, 128, 2526-2527.

ภาคผนวก

ลำดับเบสของ staple strand (5' → 3')

North-1 (40)	TTCCATTAAATTAAGGGATTTTAGACAGGGAGATAGAAC
North-2 (40)	CCTTCTGACCCAGCCCTCATAGTTAGCGTAATGAGGAAGT
North-3 (39)	CAGGGCGATGGAGCTAAACAGGAGGCCGACGGGTAAAAT
North-4 (39)	ACGTAATGCCATGGTTTAATTTCAACTTTAACCGTCTAT
North-5* (47)	AATGAATCGGCCAACGTGGACTCCAACGTC TT AAAAAAAAAAAAAA
North-6 (37)	AAGGGCGAAAAATCATTGTGATCGTGCCAGCTGCATT
North-7 (50)	CCAACCTAAAACGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTACGATCTAAAGTT
North-8 (48)	TAAGAACTGGCTAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGACTACGAAGGCA
North-9 (36)	ATAAATATCGGGAAACCTGATTACCTTATGCGATTT
North-10 (41)	GCGAAAGAGACGAGAACACCAGCATTATCTGCGGAATCGTC
N5 (50)	TTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGTAAATGAGCAACGGCTACAGAGAAAGAG
North-12 (29)	ACTGCCCGCTTTCCAGTTCATTGAATCCC
North-13 (46)	CCTCAAATGCTTTGCTCCTTTTGATAAGAGGGATGTGCTGCAAGG
North-15 (33)	CGATTAAGTTGGGTAATTAATTGCGTTGCGCTC
North-16 (40)	TGCATCTGCCTACGCCAGCTGGCGAAAGGGTCATTTTTGC
North-17 (31)	GGATGGCTTATAGATACATTCATCGTAACCG
North-18 (32)	CAATTCTAGATGGGCGTCGCAAATGGTGGCAT
N4 (44)	TCATCTTTGACGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGGGTAATTTTC
North-20 (50)	GGAAGAAAAATCTATTCAAGTGAATAAGGCTTGCCCTATACACTAAAACAC
North-21 (32)	TGGATAGCGTCCAATAACCAGTCAGGACGTTG
North-22 (44)	GATTATACTAACAAAGCTGCTCACGTTAAGTAAAATGTTTAGAC
N3 (48)	ATTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGTCACCCTCAGCACCCCCAGC
North-24 (50)	AATAGAAAGGAACAACCTAAAGGAATTGCGCTGAGGCTTGCAGAGATTTGT
North-25 (43)	ATCATCGCTTCGACAAGAACCACAGGTTTTTGCAAAGAAGTT
North-26 (50)	TTGCCAGAGGGTAAATCAAAAATCAGGTCTTTACCCTGACCAGACCGGAA
North-27 (48)	GCAAACCTCAACAGATCTGGTGCTGTAGCTCAACATGTTTTTCTGCGA
North-28 (48)	ACGAGTAGACCTGTTTAGCTATATGCTGAAAAGGTCAATAATTTAGTT
North-29 (35)	TGACCATGAGCTTAATTGCTGAGTCAGGATTAGAG
North-30 (26)	AGTACCTTTAATTAACAGTTCAGAA
North-31 (36)	AACGAGAATGACCAGGTAATATAAAAACGAACCTAACG
North-32 (49)	GAACAACATTATTGGATATTCATTACCCAAATCAACGCAAGCGCGAAAC
North-33 (50)	AAAGTACAACGGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGATCAGCGGAGTGAG
N2 (22)	TGACAACAACCATCGCGACCTG
North-35 (44)	CTCCATGTCCAGGCGCATAGGCACCACAAGACGACGATAAAAAC
North-36 (34)	CAAAATAGCGAGAGGCAGAAAGATTCATCAGTTG
North-37 (53)	AGATTTAGGAATTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCCTGATAAATTGTGTCG
North-38 (58)	AAATCCGCCCCACGCATAACCGATATATTCGGTTCGAATAATAATTTTTTACGTTGAAA
North-39 (50)	AGTAATAAAAAGGGACATTCTGGCCAACAACGGTACGCCAGAAGTTGGAA

North-40 (44)	TCAGAGCGGGCCCACTACGTGAAGAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
North-41 (50)	TTGCGTATTGGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACACGCCAGGGTT
North-42 (49)	TTCCCAGTCACGACGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATAGTTTGAG
North-43 (47)	GGGACGACATAGGTTACGTTGGTGTACTAATAGTATGGGGACCGTAT
North-44 (35)	CGGCCTCACAACCTGTTGGGAAGGTTGTAAAACGAC
North-45 (28)	GGCCAGTGCCAAGACGAGCCGGAAGCAT
North-46 (37)	AAAGTGTAAGCCTGCGCCATCCAGTTTGAACAAGA
North-47 (48)	GTCCACTATTAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGAGCACGTATAAC
North-48 (50)	GTGCTTTCCTCTCTTGAGAAGTGTTTTTATAATCAGTCAGTCACACGACC
N6 (37)	CATTGGCAGATTCACGAGGCCACCGAGTAATATGGTT
North-50 (44)	GCTTTGACTGGGGTCGAGGTGCTGTTGTGGGTGGTTTTTCTTTT
North-51 (31)	CACCAGTGAGACGGGCTCAAAGAATAGCCC
North-52 (49)	GAGATAGGGTTGAGCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCAATGCGCCGCTA
N7 (55)	CAGGGCGCGTACAAGAGTCTGCCATCACGCAAATTACTCAATCGTCTGAAATGG
N8 (38)	TACCTACATTTTGACGACCGTTGTAGCAATAACACCCG
North-55 (44)	CCGCGCTTTAAAGGGAGCCCCCTATAAAAACAGCTGATTGCCCT
North-56 (50)	TCACCGCCTGGTGTATCCGCTCACAATCCACACAACATCTTGCATGCC
North-57 (27)	TGCAGGTCGACTCTAAGCGCCATTTCGC
North-58 (36)	CATTCAGGCTGCGGGAAGATCGCACTCCCAGCGGAT
North-59 (43)	TGACCGTAAGTAGCATTTCGGATTGCGGATTTCAACAGTTGA
North-60 (35)	TTCCAATAAATATGCAACTAATTTTAATTCGAGC
North-61* (43)	TTCAAAGCGAACTATTATAGTCAGAA TT AAAAAAAAAAAAAAAAAA
North-62 (36)	CAAAGCGGATTGCATTTACCTTCAACTAATGCAGAT
North-63 (50)	ACATAACGCCAAAAGGACAGATGAACGGTGTACAGATACTTAGCCGGAAC
FILL-IN-64 (37)	GAGGCGCAGACCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAA
North-65 (41)	CCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTTGCTTTCTGGTAATA
N1 (22)	TGCCTGAGTAGAAGAGGCGCTG
North-67 (44)	GCAAGTGTGCGGCAACGTGGCGCTGTTTGAAGTTGCAGCAAGC
North-68 (30)	GGTCCACGCTGGCATAGTAAGAGCAACACT
North-69 (27)	ATCATAACCCTCGTCAAAAAGATTAAG
North-70 (29)	AGGAAGCCCGTAATCATGGTCATAGCTGT
North-71 (38)	TTCCTGTGTGAAATCCCTGAGATGGTGGTTCCGAAATC
North-72 (53)	GGCAAAATCCCTGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCAGCGGTCACGCTGCGCG
North-73 (59)	TAACCACCCTTCTTTGATTAGTAATAACATCACTGCAACAGGAAAAACGCTCATGGAAA
North-74 (40)	TCGGCCTTGCGAGGTGAATTTCTTAAACAGGGTCAATCAT
North-75 (39)	AAGGGAACCGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGACTCAAACCTA
North-76 (51)	GGGAAGAAAGAACTGACCAACTTTGAAAGAGGAATTACGAGGTTTGCCCCA
North-77 (22)	GCAGGCGAAAATCAGAAAGGAA
North-78 (48)	GGTACCGAGCTCGAATTCGAAAGACTTCAATATCGCGAGTACGGTGT
North-79 (43)	CTGGAAGTTTTCTGGTGCCGAAACCAGGCAAGAGGATCCCCG
North-80 (34)	CGGCACCGCTCATCCATGTATTTGGGCTCCGTG
North-81* (36)	GGAACAAAAGCCAGCTTTC TT AAAAAAAAAAAAAAAAAA

South-1 (40)	TTATCATTTTACAGTGCCCGTATAAACAGTAACGCCTGTA
South-2 (40)	GCATTCCACAAAAGCGTAAGAATACGTGGCTTGAGTAACA
South-3 (39)	CCATCTTTTCGGGGTCAGTGCCTTGAGTAGCGGAACAAA
South-4 (39)	GAAACCACCACAATATATGTGAGTGAATATTAGCGTTTG
South-5* (47)	AAATTCATATGGTTTAGGCATTTTCGGTCA TT AAAAAAAAAAAAAA
South-6 (37)	AGCCCCCTTAACCTTGCTTCTTGTCACAATCAATAGA
South-7 (50)	TTATCATCATATCCCGAACGTTATTAATTTTAAAAGTACAGACAATATTT
South-8 (48)	ATTAATTTTCCCTTTTAATGGAAACAGTACATAAATGAAGGAGCGGAA
South-9 (36)	AAGCCTGTTAAGTTTATTTGTAATCGTCGCTATTA
South-10 (41)	TATCAGATATTTGAATTACCTTTTAGAATAATTACTAGAAA
South-11 (50)	TTGAATGGCTATTAGTCTTTAATGCGCGGTATTAAATCCTTTGTCCTGAT
South-12 (29)	GCAAAGACACCACGGAATTAGTATCATAT
South-13 (46)	GCGTTATACAAAAACAATAGATAAGTCCTGATAATTGAGCGCTAAT
South-15 (33)	ATCAGAGAGATAACCCCAACATATAAAAGAAAC
South-16 (40)	TTTCCAGAGCCCCTGAACAAAGTCAGAGGGACAAGAAAAA
South-17 (31)	TAATATCCCATTACCGCGCCTAACGAGCGTC
South-18 (32)	AACCTCTTACCAACGCCAATAGCAAGCTAGCG
South-19_HER2 (60)	TCGACAACCTCAACTGAT TTT TCTAAAAGGATTCTTCCAAGGGGATCCAATTCAAACAGC
Filll_South-19 (27)	AATATAATCCTAGACTTTACAAACAAT
South-20 (50)	GATAGCTTAGATTAATTAATTACATTTAACAATTTTCGATGGCAATTCATC
South-21 (32)	ATAAACACCGGAATCATCCTTGAAAACATAGC
South-22 (44)	TGGATTATCATCAAGAAAAACAAAAGACGAAGGCGTTAAATAAGA
S4 (22)	GGATTTAGAAGTATTGATTGTT
S3 (50)	AGATAAACAGAGGTGAGGCGGTCAGTCAACTAATAGATTAGAACCAACC
South-25 (43)	ATATCAAATTTCAATTACCTGAATCATTTAATGGTTTGAATA
South-26 (50)	CCGACCGTGTGCAGTAGGGCTTAATTGAGAATCGCCATATGACGACAATA
South-27 (48)	AACAACATGTTAGATGTAGAAACCAATCAATAATCGGCTCAAGCCGT
South-28 (48)	TTTTATTTAGATATAGAAGGCTTAGCGAGGCGTTTAAATCTCATCGTA
South-29 (35)	GGAATCATCCTAATTTACGAGCCTAATGCAGAACG
South-30 (26)	CGCCTGTTTATCTTCTTACCAGTATA
South-31 (36)	AAGCCAACGCTCAAATAAATCTGAGAAGAGTCAATA
South-32 (49)	GTGAATTTATCAAAGCAAAGAAGATGATGAAACAAAACCTTCTGAATTA
South-33 (50)	TGGAAGGAATTGAGCCGTCATAGATAATACATTTGAAACCACCAGCAGA
S1_HER2 (57)	TCTAAAAGGATTCTTCCAAGGGGATCCAATTCAAACAGC TTT CTGAGAGCCAGCAG
Fill_S1 (22)	AATTGAGGAAGGTTATAAAGAA
South-35 (44)	ATTGCGTAAATACCAAGTTACAGCTTAGTATTTTAGTTAATTTTC
South-36 (34)	ATCTTCTGACCTAAATAGGTCTGAGAGACTACCT
South-37 (48)	TTTTAACCTCCGAAATCGCGCAGAGGCGAATTATTCAATTATTAGCAC
S2 (55)	GTA AACAGAAATCTAAAATATCTTTAGGTGCACTAAATTAACACCGCCTGCAAC
S5 (50)	ACTGAGTTTCGTACCAGTACAACTACTAATGCCCCCTGCCTGGTAATA
South-40 (44)	AGTTTTAACATAATCAAATCATTATCCAGCGCCAAAGACAA
South-41 (50)	AAGGGCGACATAAACGTAGAAAATACATACATAAAGGTGGACAAGAATTG

South-42 (49)	AGTTAAGCCCAATAACATTAGACGGGAGAATTAAGTGAACACTAATTTG
South-43 (47)	CCAGTTACAATTTTATCCTGAATCCCGACTTGCGGCTACAAAATAAA
South-44 (35)	CAGCCATAAAAAACAGGGAAGCGTAAGAGCAAGAA
South-45 (28)	ACAATGAAATAGCTAAGACTCCTTATTA
South-46 (37)	CGCAGTATGTTAGCTCAACCTTGCCCTTAGCGTCAGA
South-47 (48)	CTGTAGCGCGTCCGGAACCAGAGCCACCACCGACTTTTGATGATAC
South-48_HER2 (60)	CTGAAACACATGTACCG TTT TCTAAAAGGATTCTTCCCAAGGGGATCCAATTCAAACAGC
Fill_South-48 (29)	AGGAGTGTACTATTTTCGGAACCTATTATT
S6 (22)	TGAAAGTATTAAGAGAAGCGTC
South-50 (44)	ATACATGGACCGCCTCCCTCAGTCAAGTGATTGAGGGAGGGAAG
South-51 (31)	GTAATATTGACGGAATAGCAGCACCGTAAT
South-52 (49)	CAGTAGCGACAGAAAGCCGCCACCTCAGAACCGCCAAGTCTCTGAATT
South-53 (50)	TACCGTCCAGTGCTGAGACTCCTCAAGAGAAGGATTCACCACCCTCATT
S7 (13)	TTCAGGGATAGCA
South-54 (50)	CCACCCTCAGAACCGCCACCTCAGAGCAGGATTAGCGGGGTTTCAAGATG
South-55 (44)	GAAAGCGCCCCTCAGAGCCACCCATCGAATTATTCATTAAGGT
South-56 (50)	GAATTATCACCAACGGAATACCCAAAAGAACTGGCATGATAATAGCTATC
South-57 (27)	TTACCGAAGCCCTTAGCAGCCTTTACA
South-58 (36)	GAGAGAATAACATTTATTTATCCCAATCTGCTATTT
South-59 (43)	TGCACCCAGGAGGTTTTGAAGCCTAAGAACTCCGGCTCATCGA
South-60 (35)	GAACAAGGTCTTTCCTTATCATAAAGGTAAAGTAA
South-61* (43)	TTCTGTCCAGACTTAAACAACGCCAAC TT AAAAAAAAAAAAAAAAAA
South-62 (36)	TGTAATTTAGGCAGCAAATAGTTGGGTTATATAACT
South-63 (50)	ATATGTAATGCTAACGGATTGCGCTGATTGCTTTGGATTTTCAGGTTTA
South-64 (50)	ACGTCAGATGACAGTTGGCAAATCAACAGTAGAAAGGCAAATGAAAAATC
South-65_HER2 (57)	TAAAGCATCACCTT TTT TCTAAAAGGATTCTTCCCAAGGGGATCCAATTCAAACAGC
S8_HER2 (57)	TCTAAAAGGATTCTTCCCAAGGGGATCCAATTCAAACAGC TTT TACTCAGGAGGTTT
Fill_S8 (31)	AGTACCGCCCGTCGAGAGGGTTGATGGCCTT
South-67 (44)	GATATTCACCACCAGAGCCGCTACCATGACTTGAGCCATTTGG
South-68 (30)	GAATTAGAGCCATCGCAAGACAAAGAACGC
South-69 (27)	GAGAAAACCTTTTAGGCATTTTCGAGC
South-70 (29)	CAGTAATAAAGTTACCAGAAGGAAACCGA
South-71 (38)	GGAAACGCAATAATGTCACCTAGCAAGGCCGGAAACGT
South-72 (50)	CACCAATGAAACACCCTCAGAGCCGCCACCAGAACCCTCAAACGAATGGATC
South-73 (50)	TTCATTAAGCTTGCTCAGTACCAGGCGGATAAGTGCACCCTCAGAACCG
South-74 (40)	GCCCCGAATAACCCTCAATCAATATCTGGTATATACAGTA
South-75 (39)	ACAGTACCTTTTGAGGCAGGTCAGACGATTATAAGTATA
South-76 (51)	TGACAGGAGGTTACATCGGGAGAAACAATGATGCAAATCCAAGCAAATCA
South-77 (22)	CCAGTAGCACCATCGCCAGCAT
South-78 (48)	AAGCAGATAGCCGAACAAGAGAATATAAAGTACCGACATCCAAGAACG
South-79 (43)	GGTATTAACCTTAAACGTCAAAAATGAAAATTTTAAGAAAAGT
South-80 (34)	CGATTTTTTGAAGTACCGCATATTCCTTAAATCA



South-81 (19)	AGATTAGTCAAATAAGAAA
Lock-1 (34)	AGTGCCAC T CAGAACAATATTACCGCCAGCCATT
Lock-2 (35)	ATTATTTA T AACATCGCCATTAATAATACCGAACG
Lock-3 (24)	TGTATCAC T ATCTCCAAAAAAG
Lock-4 (24)	TGTATGGG T AGCCCAATAGGAACC
Lock-5 (35)	GCTCCAAAAGGAG T GCTGAACCTCAAATATCAAGG