ชื่อผลงาน: การพัฒนาเทคนิคบนแผ่นกระดาษสำหรับตรวจหาอัตรส่วนที่เหมาะสมระหว่างดีเอ็นเอกับตัวพาที่มีประจุบวกในตำรับนำส่งยีน

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราธา

แหล่งทุนสนับสนุน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์บนแผ่นกระดาษวิธีใหม่สำหรับตรวจหาอัตราส่วนที่สมมูลกันระหว่างตัวพาซึ่งมีประจุบวกกับดีเอ็นเอในตำรับนำส่งยีน เนื่องจากอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าวจะส่งผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ในการทำยีนบำบัด จากการบูรณาการความรู้ทางเคมีวิเคราะห์ เคมีสีเขียว วัสดุศาสตร์ ชีววิทยาโมเลกุล และเภสัชศาสตร์ ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ซึ่งทำได้ง่าย รวดเร็ว มีขั้นตอนน้อย อ่านผลได้ชัดเจน ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องไม่แตกต่างจากวิธี gel retardation และวิธีวัด zeta potential บนพื้นผิวของอนุภาค ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนหรือมีราคาแพง และไม่ใช้พลังงานไฟฟ้าในการวิเคราะห์ แต่ใช้วัสดุและสารเคมีซึ่งมีราคาถูกและหาได้ง่าย ได้แก่ กระดาษกรอง และสีย้อมเพียงชนิดเดียว ซึ่งปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และไม่ก่อให้เกิดของเสียที่ย่อยสลายยากหรือเป็นพิษ เช่น หลอดพลาสติก หรือแผ่นอะกาโรสเจลที่ปนเปื้อนเอทิเดียมโบรไมด์ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพสำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนการตั้งตำรับนำส่งยีนหรือใช้ประเมินความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดนิวคลีอิกของตัวพาชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นพร้อมกันหลายตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งยังเป็นตัวอย่างหรือต้นแบบการวิเคราะห์ซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

การพัฒนาเทคนิคบนแผ่นกระดาษสำหรับตรวจหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างดีเอ็นเอกับตัวพาที่มีประจุบวกในตำรับนำส่งยีน

ธีรศักดิ์ โรจนราธา[1] และ สมาวดี เปลี่ยนวงษ์[2]
[1]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม
[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

บทคัดย่อ

ในการตั้งตำรับที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสำหรับนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ ดีเอ็นเอต้องถูกผสมเข้ากับตัวพาที่มีประจุบวกในอัตราส่วนโดยปริมาณที่พอเหมาะ ซึ่งในทางปฏิบัติสามารถตรวจหาอัตราส่วนนี้โดยประมาณได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลหรือวิธีวัดค่าศักย์ซีต้า อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ใช้เวลานาน ใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย หรือต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีใหม่สำหรับตรวจหาอัตราส่วนดังกล่าว เริ่มต้นจากการหยดตำรับที่มีสารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอกับตัวพาในอัตราส่วนต่าง ๆ ลงบนกระดาษกรอง แล้วทำให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย 2′,7′-ไดคลอโรฟลูออเรสซีน ซึ่งมีสีเขียวตามลงไป เนื่องจากสีย้อมซึ่งมีประจุลบชนิดนี้ถูกดูดซับบนอนุภาคของสารประกอบเชิงซ้อนได้เมื่ออนุภาคเริ่มมีประจุเป็นบวกและเปลี่ยนเป็นสีชมพูได้ ดังนั้นจุดแรกของตำรับที่ปรากฏเป็นสีชมพูจึงบ่งบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอและตัวพาที่ใกล้เคียงกับอัตราส่วนซึ่งสมมูลกันมากที่สุด จากการศึกษาพบว่ากระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1, 3 และ 4 เป็นวัสดุรองรับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากกระดาษมีคุณสมบัติเป็นตัวดูดซับจึงช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนและทำให้สังเกตเห็นสีของจุดได้อย่างชัดเจนบนพื้นสีขาว อีกทั้งยังเป็นวัสดุที่มีราคาถูกและกำจัดได้ง่ายหลังใช้งาน ความเข้มข้นของสารละลาย 2′,7′-ไดคลอโรฟลูออเรสซีนที่เหมาะสมคือ 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงกว้าง 5-8 เมื่อนำวิธีนี้ไปใช้ทดสอบกับตัวพาซึ่งมีประจุบวก ทั้งที่เป็นพอลีเอทิลลีนอิมีน ลิโพโซม นิโอโซม รวมถึงเดนไดรเมอร์ พบว่าสามารถตรวจหาอัตราส่วนได้ภายใน 5 นาที และให้ผลวิเคราะห์สอดคล้องกับวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล วิธีวัดศักย์ซีต้า และวิธีซึ่งใช้หลักการเดียวกันนี้แต่ทำในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งประหยัด รวดเร็ว ปลอดภัย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นประโยชน์ในการเตรียมตำรับเพื่อใช้นำส่งยีน

คำสำคัญ: ตัวพาที่มีประจุบวก, ดีเอ็นเอ, อัตราส่วน, นำส่งยีน, กระดาษ

Development of paper-based technique for testing the optimal DNA to cationic carrier ratio in gene delivery formulations

Theerasak Rojanarata[1] and Samarwadee Plianwong[2]

[1]Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom

[2]Faculty of Pharmacy, Burapha University, Chonburi

Abstract

To obtain an efficient and safe formulation for gene delivery, DNA must be incorporated with cationic carriers at an optimal ratio. In practice, this ratio can be approximately determined by gel electrophoresis or zeta potential analysis. These methods, however, take time, use harmful reagents or require expensive or sophisticated instruments. A new method, therefore, was developed in this study. It started with spotting the formulations containing DNA/carrier complexes at various DNA to carrier ratios on typical filter paper. After being allowed to dry, the spots were overlaid with green 2′,7′-dichlorofluorescein solution. Since this negatively charged dye was adsorbed on the positively charged complexes and changed its color to pink, the first spot of the formulation which showed a pink color represented the closest ratio in which the DNA was equivalent to the carriers. The results revealed that Whatman® filter papers of all types tested (No. 1, 3 and 4) were suitable support materials since they acted efficiently as adsorbent, helping to concentrate the complexes for a distinct detection of the spots' color on their white background. Furthermore, paper is cheap and can be disposed of easily after use. The appropriate concentration of 2′,7′-dichlorofluorescein was 0.075 mg/mL and the optimal pH of this solution was in the broad range of 5 - 8. When the method was applied to the testing of various types of cationic carriers, i.e. polyethyleneimine, liposome, niosome and dendrimer, the optimal ratios could be successfully determined within 5 min and all the results were in agreement with those obtained from gel electrophoresis, zeta potential measurement and a method relying on the same principle, but carried out in tubes. Thus, the paper-based method is a cheap, fast, simple and safe and green alternative which is useful for the preparation of gene delivery formulations.

Keywords: cationic carriers, DNA, ratio, gene delivery, paper