การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิคแอปตาไซม์สำหรับตรวจหาเชื้อเอนเทอโรฮีโมเรจิก *เอสเชอริเชีย โคไล*

Development of Biosensor Using Aptazyme Techniques for the Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

ศิวะพร ประชูโชติ* และ เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล

Siwaporn Prachoochote* and Kiattawee Choowongkomon

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

**Corresponding author, E-mail: siwaporn.pr@ku.th*

บทคัดย่อ

เอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไล (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) เป็นสาเหตุหลักของโรคบวมน้ำ (Edema disease) ในสุกร ลูกสุกรจำนวนมากตายด้วยโรคนี้ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมของสุกรเป็นอย่างมาก และยังทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัจจุบันวิธีวินิจฉัยลูกสุกรที่ติดเชื้ออี โคไล (*Escherichia coli*; *E. coli*) ต้องใช้ระยะเวลานาน และราคาแพง ด้วยเหตุผลนี้ จึงได้มีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) สำหรับตรวจจับเชื้ออี โคไล โดยใช้เทคนิคแอปตาไซม์ (Aptazyme) อันดับแรกในการพัฒนาแอปตาไซม์เป็นไบโอเซนเซอร์ คือ การออกแบบโพรบของแอปตาไซม์ และทดสอบความเป็นเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสของแอปตาไซม์ ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี ในสารละลายที่มีเชื้ออี โคไล แอปตาไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจะสูญเสียหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) จึงไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียว ชุดแอปตาไซม์ที่ออกแบบนี้ตรวจจับเชื้ออี โคไลได้อย่างจำเพาะเจาะจง และตรวจหาเชื้ออี โคไลได้น้อยสุดที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cells/ml) ข้อดีของชุดแอปตาไซม์นี้ ได้แก่ สามารถตรวจเชื้ออี โคไลที่เป็นตัวเซลล์ ใช้ระยะเวลาน้อยในการตรวจวินิจฉัย และสังเกตผลที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้น แอปตาไซม์นี้จึงเป็นไบโอเซนเซอร์ที่น่าสนใจสำหรับการนำไปใช้ตรวจเชื้ออี โคไลในฟาร์มสุกรในอนาคต

คำสำคัญ: *เอนเทอโรฮีโมเรจิก เอสเชอริเชีย โคไล ไบโอเซนเซอร์ แอปตาไซม์*

เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a major cause of edema disease in swine. Many piglets die from this disease, and this greatly affects the pig industry in Thailand and could cause damage to the economy of Thailand. Currently, the diagnostic approach of *Escherichia coli* (*E. coli*) infection consumes much time and is costly. For this reason, the biosensor for the *E. coli* detection using aptazyme technique was developed. First of all, the probes of aptazyme were designed and tested to see the peroxidase activity, which provided a colored product. In the presence of the *E. coli*, the peroxidase-mimicking aptazyme lost its activity in the catalysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and then the green product was not generated. The aptazyme had a good specificity to *E. coli* detection and could detect the lowest *E. coli* concentration at 10^8 cells/ml. Some advantages of aptazyme included the direct detection of *E. coli* cells, the fast analysis, and the result observation with the naked eye. Therefore, this biosensor can be used to detect the *E. coli* in pig farms in the future.

Keywords: *Enterohemorrhagic Escherichia coli, Biosensor, Aptazyme*

1. บทนำ

โรคบวมน้ำ (Edema disease) ในสุกร จัดเป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในลูกสุกรหลังหย่านม ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สาเหตุหลักของโรคนี้เกิดจากการติดเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) หรืออี โคไล (*E. coli*) ในกลุ่มเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไล (Enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC) อี โคไลกลุ่มนี้สามารถผลิตสารพิษชิกา (Shiga toxins) ที่ส่งผลต่อร่างกายของโฮสต์ (Host) เช่น คน สุกร วัว ควาย เป็นต้น (Fratamico, Smith, & Buchanan, 2002) ลูกสุกรที่ติดเชื้ออี โคไลกลุ่มนี้จะมีอาการบวมน้ำที่เปลือกตา หน้าผาก จมูก ปาก คาง และหน้าอก มีผิวหนังผื่นแดง หายใจลำบาก มีอาการท้องเสีย ถ่ายเป็นมูกเลือด (Imberechts, De Greve, & Lintermans, 1992) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อระบบประสาท โดยมีอาการทางประสาท คือ ไม่อยากอาหาร เดินเซ อัมพาต หรือชักแบบขาตะกุย ลูกสุกรบางตัวที่มีอาการรุนแรง จะทำให้เกิดการตายแบบฉับพลัน (Crepeau et al., 2012) ด้วยเหตุนี้ จำนวนลูกสุกรจึงลดลงอย่างรวดเร็ว และนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจของไทย

โดยทั่วไป การวินิจฉัยลูกสุกรที่ติดเชื้อทำโดยการสังเกตอาการเบื้องต้น (Luppi, 2017) การตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคพอลิเมอเรสเชนรีแอคชัน (Polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของอี โคไล (Johnson, 2000) หรือการใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอบเบน แอดเส (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) ซึ่งใช้แอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับตัวเซลล์ของอี โคไลในกลุ่มเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไล (Shan et al., 2016) แต่เทคนิคนี้เหล่านี้มีข้อเสีย คือใช้ระยะเวลานาน มีความยุ่งยาก และต้องใช้เครื่องมือพิเศษ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Tarditto และคณะ ที่รายงานการตรวจเชื้อเอนเทอโรท็อกซิจีนิก เอสเชอริเชีย โคไล (Enterotoxicgenic *Escherichia coli*; ETEC) ในสุกร ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical sensor) โดยสามารถทำการตรวจเชื้ออี โคไล จากอุจจาระของสุกรได้ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือเฉพาะ และยังมีขั้นตอนที่ซับซ้อนในการเตรียม

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

อุปกรณ์สำหรับตรวจเชื้ออี โคไล ทำให้ใช้ระยะเวลานาน และราคาแพง (Tarditto et al., 2016) ดังนั้น เพื่อให้การวินิจฉัยที่รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคแอปตาไซม์ขึ้น

เทคนิคแอปตาไซม์ (Aptazyme) หรือเรียกอีกอย่างว่า ดีเอ็นเอไซม์ (DNAzyme) หรืออาร์เอ็นเอไซม์ (RNAzyme) จัดเป็นหนึ่งในไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) ที่วิเคราะห์โดยการสังเกตสี (Colorimetric assay) แอปตาไซม์พัฒนามาจากแอปตาเมอร์ (Aptamer) ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นสายเดี่ยว และสามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลเป้าหมายด้วยแรง electrostatic interaction (Ellington & Szostak, 1992) การประยุกต์ใช้แอปตาไซม์เป็นไบโอเซอร์ จะเป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอสายสั้นให้สามารถทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS (2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) และทำให้เกิดสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ (Han, Liang, & Zhou, 2010) จากงานวิจัยของ Seok และคณะ รายงานการตรวจสารอัลฟาทอกซิน บี1 (Aflatoxin B1) ด้วยเทคนิคแอปตาไซม์ โดยถ้าในสารละลายไม่มีสารอัลฟาทอกซิน บี1 แอปตาไซม์จะสามารถทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ในการเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรท ABTS และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียว แต่ถ้าในสารละลายมีสารอัลฟาทอกซิน บี1 แอปตาไซม์จะสูญเสียหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สารละลายไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว (Seok et al., 2015) ปัจจุบันมีการนำเทคนิคแอปตาไซม์มาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ที่หลากหลาย ทั้งในงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจ การวินิจฉัย รวมถึงการรักษา เนื่องด้วยข้อดีของแอปตาไซม์ ได้แก่ ง่ายต่อการออกแบบ ดัดแปลง หรือติดฉลาก มีความชอบ และจำเพาะเจาะจงสูงต่อโมเลกุลเป้าหมาย อีกทั้งยังมีความเสถียรสูง ง่ายต่อการนำไปใช้ และง่ายต่อการมองเห็น (Saberian-Borujeni et al., 2014) ด้วยเหตุนี้ เทคนิคแอปตาไซม์จึงเป็นไบโอเซนเซอร์ที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้ออี โคไลในลูกสุกร

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจหาเชื้อเอสเชอริเชีย โคไลด้วยเทคนิคแอปตาไซม์

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

แอปตาเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับอี โคไล นำมาจากงานวิจัยของ Wu และคณะ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5’-CCG GAC GCT TAT GCC TTG CCA TCT ACA GAG CAG GTG TGA CGG-3’ (Wu et al., 2012) แอปตาเมอร์โพรบแอลฟา และโพรบเบตา ได้รับการสังเคราะห์โดยบริษัท Integrated DNA Technologies ประเทศสิงคโปร์ 2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) จากบริษัท SeraCare Life Sciences ประเทศสหรัฐอเมริกา Hemin จากบริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

3.2 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย *Escherichia coli* strain 2013C-4282 (เป็นเชื้อที่แยกมาจากอุจจาระของสุกรที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคบวมน้ำ โดยคณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าใกล้เคียงกับ strain นี้) *Salmonella* sp. (ATCC29890) *Staphylococcus aureus* (ATCC23235) *Cedecea davisae* (ATCC33431) *Citrobacter freundii* (ATCC8090) และ *Bacillus thuringiensis* (ATCC10792) แบคทีเรียทั้งหมดถูกเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นเก็บเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วกระจายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง

3.3 การเตรียมแอปตาไซม์

นำโพรบแอลฟาความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ผสมกับโพรบเบตาความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ แอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับอี โคไล ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ และฮีมิน (Hemin) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.4 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของแอปตาไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ใส่ลงในหลอดแอปตาไซม์ที่เตรียมไว้ก่อนหน้า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจาก 10 นาที จึงเติมสารละลาย ABTS แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย

3.5 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของแอปตาไซม์

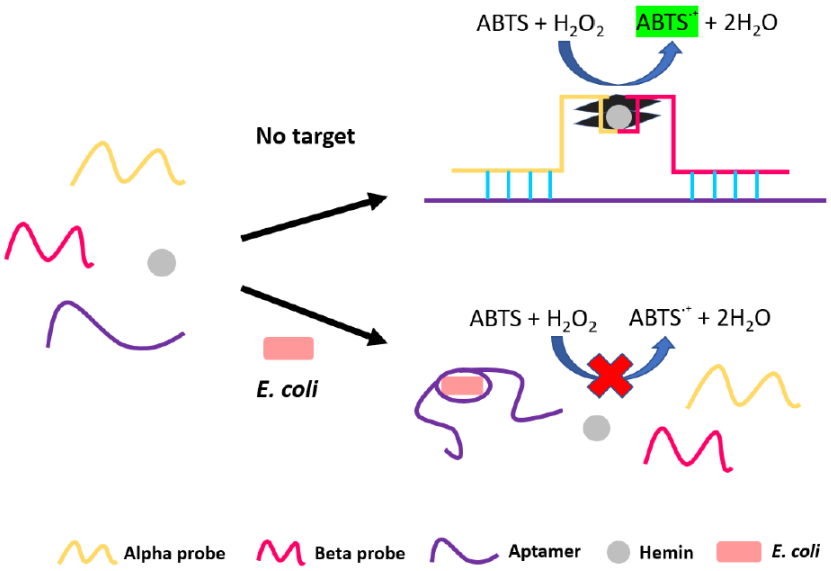
นำเชื้ออี โคไลที่ความเข้มข้น 1×10^{6}-1×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแอปตาไซม์ที่เตรียมไว้ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจาก 10 นาที จึงเติมสารละลาย ABTS แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 หลักการในการตรวจจับเชื้ออี โคไล ด้วยแอปตาไซม์

ถ้าในสารละลายไม่มีเชื้ออี โคไล โพรบแอลฟา และโพรบเบตาจะสามารถจับกับแอปตาเมอร์ และฮีมินกลายเป็นโครงสร้างที่สามารถทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส เรียกว่า แอปตาไซม์ แอปตาไซม์จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียว แต่ถ้าในสารละลายมีเชื้ออี โคไล แอปตาเมอร์จะจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับอี โคไล ทำให้โพรบแอลฟา และโพรบเบตา ไม่สามารถจับกับแอปตาเมอร์ จึงไม่เกิดเป็นแอปตาไซม์ ส่งผลให้ไม่มีการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสี ดังนั้น สารละลายจึงไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว แผนภาพของหลักการนี้แสดงในรูปที่ 1

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

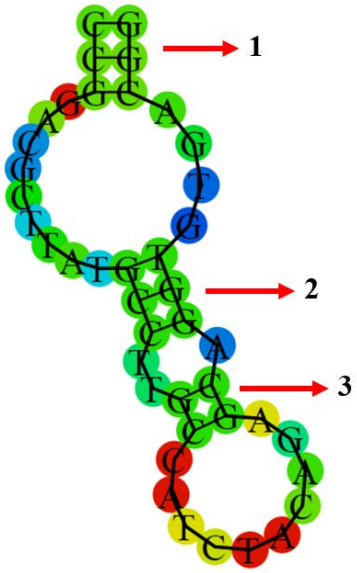


รูปที่ 1 แผนภาพแสดงการตรวจจับเชื้ออี โคไลด้วยแอปตาไซม์

4.2 การออกแบบโพรบแอลฟา และโพรบเบตา

แอปตาไซม์ ประกอบด้วย โพรบแอลฟา โพรบเบตา แอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้ออี โคไล และฮีมิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบโพรบแอลฟา และโพรบเบตา โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ของแอปตาเมอร์ ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ RNAfold web server (Gruber et al., 2008) โครงสร้างทุติยภูมิของแอปตาเมอร์แสดงในรูปที่ 2 จากการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของแอปตาเมอร์ พบว่า บริเวณที่แอปตาเมอร์สามารถเกิดการจับกันเอง (Self-complementary) มี 3 บริเวณ แต่การออกแบบโพรบแอลฟา และเบตานี้เลือกบริเวณที่ 2 เนื่องจาก Seok และคณะ รายงานว่า โพรบที่จดจำบริเวณตรงกลางของแอปตาเมอร์จะทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากกว่าการจดจำที่บริเวณปลายของแอปตาเมอร์ (Seok et al., 2015) ดังนั้น จึงออกแบบให้โพรบแอลฟา และโพรบเบตาเกิดคอมพลีเมนทารีกับแอปตาเมอร์ที่บริเวณนี้ จากนั้นเติม linker และ G-rich sequence ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรบแอลฟา และเบตาแสดงในตารางที่ 1

เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิของแอปตาเมอร์

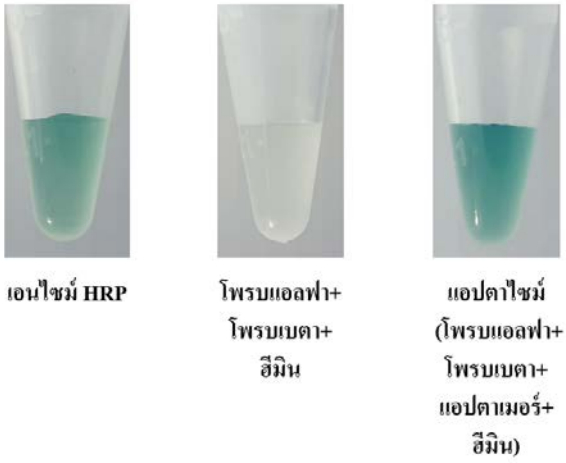
ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรบแอลฟา และเบตา

ชื่อโพรบ	ลำดับนิวคลีโอไทด์
แอลฟา	5’-TACGG-$(OCH_2CH_2)_3OPO^{3-}$-GGGTAGGG-3’
เบตา	5’-GGGTTGGG-$(OCH_2CH_2)_3OPO^{3-}$-ACGGT-3’

4.3 การทดสอบความเป็นเอนไซม์ของแอปตาไซม์

เพื่อทดสอบว่า โพรบแอลฟา และโพรบเบตาที่ออกแบบจากการทดลองก่อนหน้า สามารถจับกับแอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับอี โคไล และฮีมิน เกิดเป็นแอปตาไซม์ ซึ่งทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรทแล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ ABTS เป็นสับสเตรทของปฏิกิริยา ผลพบว่าสารละลายที่มีแอปตาไซม์เปลี่ยนเป็นสีเขียวเช่นเดียวกับผลของตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) นั่นคือ สารละลายที่มีเอนไซม์ HRP (Horseradish peroxidase) ผลนี้แสดงให้เห็นว่า โพรบแอลฟา และโพรบเบตาที่ออกแบบ สามารถจับกับแอปตาเมอร์ และฮีมิน ส่งผลให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS เช่นเดียวกับเอนไซม์ HRP ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียว ในขณะที่ผลของตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) คือ สารละลายที่ไม่มีแอปตาเมอร์ พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนสีของสารละลาย ดังนั้น แอปตาไซม์จึงเกิดจากการรวมกันของโพรบแอลฟา โพรบเบตา แอปตาเมอร์ และฮีมิน แล้วสามารถทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้ ผลการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 3

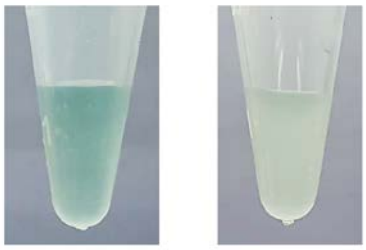
เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต



รูปที่ 3 แสดงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS

4.4 การตรวจจับเชื้ออี โคไล ด้วยแอปตาไซม์

การตรวจหาเชื้ออี โคไลที่ก่อโรคในสุกร โดยใช้แอปตาไซม์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ ผลปรากฏว่า สารละลายที่มีเชื้ออี โคไล ไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายที่ไม่มีเชื้ออี โคไล ซึ่งเปลี่ยนเป็นสีเขียว ผลนี้แสดงให้เห็นว่า แอปตาเมอร์จับกับเชื้ออี โคไล ทำให้โพรบแอลฟา และเบตาไม่สามารถจับกับแอปตาเมอร์ จึงไม่เกิดเป็นแอปตาไซม์ และไม่เกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS ดังนั้น แอปตาไซม์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้สามารถตรวจจับเชื้ออี โคไลได้ ผลการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 4



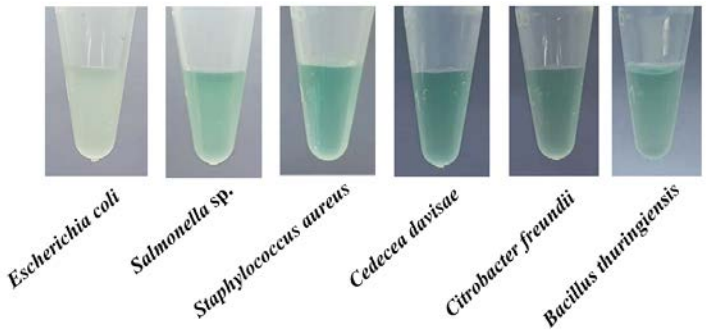
รูปที่ 4 แสดงการตรวจจับเชื้อเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไลด้วยแอปตาไซม์

4.5 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของแอปตาไซม์

เพื่อที่จะทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับเชื้อเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไลของแอปตาไซม์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ จึงได้มีการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus Cedecea davisae Citrobacter freundii* และ *Bacillus thuringiensis* ผลพบว่า สารละลายที่มีเชื้อเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไล ไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว ในขณะที่สารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว ผลเหล่านี้แสดงให้เห็น

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

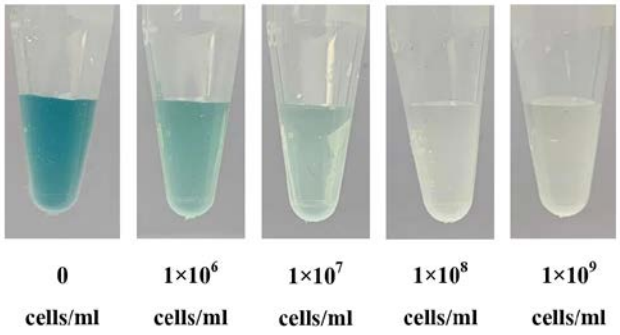
ว่า แอปตาเมอร์ไม่สามารถจับกับเชื้อ *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus Cedecea davisae Citrobacter freundii* และ *Bacillus thuringiensis* ส่งผลให้เกิดการรวมกันของโพรบแอลฟา โพรบเบตา แอปตาเมอร์ และฮีมินได้ จึงเกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ABTS ดังนั้น แอปตาไซม์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้จึงมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับเชื้ออี โคไล ผลการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการตรวจจับเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ด้วยแอปตาไซม์

4.6 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของแอปตาไซม์

เพื่อที่จะตรวจสอบความไวในการตรวจจับเชื้ออี โคไลของแอปตาไซม์ จึงทำการทดสอบกับเชื้ออี โคไลตั้งแต่ความเข้มข้น 1×10^{6}-1×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cells/ml) ผลปรากฏว่า สารละลายไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว เมื่อมีความเข้มข้นของอี โคไลตั้งแต่ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลนี้แสดงให้เห็นว่า แอปตาไซม์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ สามารถตรวจจับเชื้ออี โคไลได้น้อยสุดที่ความเข้มข้น 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการตรวจจับเชื้ออี โคไลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

5. บทสรุป

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิคแอปตาไซม์ (Aptazyme-based biosensor) สำหรับตรวจหาเชื้อเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไล ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ตรวจหาเชื้ออี โคไลนี้ในลูกสุกรหลังหย่านม

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

โดยชุดตรวจแอปตาไซม์ที่ออกแบบ ประกอบด้วย 4 องค์ประกอบ ได้แก่ โพรบแอลฟา โพรบเบตา แอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้ออี โคไล และฮีมิน โดยปกติทั้ง 4 องค์ประกอบ จะเกิดการรวมกัน และนำไปสู่การทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส สำหรับเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี แต่ในการตรวจเชื้ออี โคไล ด้วยชุดตรวจแอปตาไซม์ ทั้ง 4 องค์ประกอบ จะไม่เกิดการรวมกันจึงไม่สามารถทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์ และไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ชุดตรวจแอปตาไซม์นี้สามารถตรวจเชื้ออี โคไลได้อย่างจำเพาะเจาะจง และตรวจเชื้ออี โคไลได้น้อยสุดที่ความเข้มข้น 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ข้อดีของชุดตรวจแอปตาไซม์สำหรับตรวจเชื้ออี โคไล คือ สามารถตรวจเชื้ออี โคไลที่เป็นตัวเซลล์ได้เลย มีขั้นตอนการใช้งานที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะ เนื่องจากสามารถสังเกตสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้น ชุดแอปตาไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีความน่าสนใจที่จะนำไปใช้ตรวจหาเชื้อเอนเทอโรฮีโมเรจิก อี โคไล ในฟาร์มสุกร เพื่อลดระยะเวลาในการวินิจฉัยลูกสุกรที่ติดเชื้อได้ต่อไปในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.)

7. เอกสารอ้างอิง

Crepeau, R., Matar, A., Spitzer, T. R., Robson, S., Pathiraja, V., Sachs, D. H., Huang, C. A., and Duran-Struuck, R. (2012). Edema and tetraparesis in a miniature pig after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Comparative Medicine*, *62*(4), 298-302.

Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, *355*, 850-852.

Fratamico, P. M., Smith, J. L., and Buchanan, R. L. (2002). *Escherichia coli*. In D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Ed.), *Foodborne Diseases*, pp. 79-100. New York: Academic Press.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. Nucleic Acids Research, 36(Web Server issue), W70-74.

Han, K., Liang, Z., and Zhou, N. (2010). Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors (Basel)*, *10*(5), 4541-4557.

Imberechts, H., De Greve, H., and Lintermans, P. (1992). The pathogenesis of edema disease in pigs. *Veterinary Microbiology*, *31*, 221-233.

Johnson, J. R. (2000). Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. *Journal of Microbiological*, *41*, 201-209.

Luppi, A. (2017). Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, *3*(16), 1-18.

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

Saberian-Borujeni, M., Johari-Ahar, M., Hamzeiy, H., Barar, J., and Omidi, Y. (2014). Nanoscaled aptasensors for multi-analyte sensing. *Bioimpacts*, *4*(4), 205-215.

Seok, Y., Byun, J. Y., Shim, W. B., and Kim, M. G. (2015). A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B1 detection based on assembly of an aptamer/split DNAzyme. *Analytica Chimica Acta*, *886*, 182-187.

Shan, S., Liu, D., Guo, Q., Wu, S., Chen, R., Luo, K., Hu, L., Xiong, Y., and Lai, W. (2016). Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on cascade signal amplification in ELISA. *Journal of Dairy Science*, *99*(9), 7025-7032.

Tarditto, L. V., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Ovando, H. G., Vettorazzi, N. R., and Fernández, H. (2016). Electrochemical sensor for the determination of enterotoxigenic *Escherichia coli* in swine feces using glassy carbon electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes. *Microchemical Journal*, *127*, 220-225.

Wu, W. H., Li, M., Wang, Y., Ouyang, H. X., Wang, L., Li, C. X., Cao, Y. C., Meng, Q. H., and Lu, J. X. (2012). Aptasensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Nanoscale Research Letters*, *7*(1), 658-664.

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต