

**A STUDY TOWARDS THE DEVELOPMENT OF A RAPID  
DIAGNOSTIC TEST TO DETECT MICROBIAL SPECIFIC  
NUCLEOTIDE SEQUENCES**

**PAKAVADEE RAKTHONG**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MICROBIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

A STUDY TOWARDS THE DEVELOPMENT OF A RAPID DIAGNOSTIC TEST TO  
DETECT MICROBIAL SPECIFIC NUCLEOTIDE SEQUENCES.

PAKAVADEE RAKTHONG 4236998 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: KAVI RARANABANANGKON, Ph.D., CHALOBON YOOSOOK,  
Ph.D., PEERAPAN TAN-ARIYA, Ph.D.

ABSTRACT

The aim of the present study was to prepare luminol encapsulated biotinylated liposomes to be used as generic signal generators capable of conjugation to biotinylated biomolecules. Liposome has been prepared using two types of biotinylated phospholipids: biotin.PEG<sub>2000</sub>disteroylphosphatidyl ethanolamine (B-PEG-DSPE) and biotin caproyl dipalmitoylphosphatidyl ethanolamine (B-Cap-DPPE) with luminol entrapped. These liposomes were characterized in terms of size, lamellarity, stability, and encapsulation efficiency. The length and chemical nature of spacers in the two biotinylated phospholipids and also the biotin ligand density were shown to affect the interaction of the liposome with soluble or immobilized streptavidin. The lysis of the liposome and the effects on the chemiluminescent reactions of liberated luminol by various detergents (SDS, Triton X-100 and deoxycholate (DOC)) were studied and DOC was shown to be the most suitable reagent.

Using biotinylated 20-mer oligonucleotides (ONTs) as prototypes, the specific hybridization of the (+) and (-) strands of ONT immobilized on a microtiter plate were studied using streptavidin coated, luminol encapsulated biotinylated liposomes. It was found that the streptavidin coated liposome could specifically bind to the hybridized biotinylated ONTs and served as a signal generator. The hybridization was inhibited only by the corresponding ONT with the detection limit of 20 picomole. This streptavidin coated/luminal-encapsulated biotinylated liposome could serve as a versatile, generic signal generator capable of conjugation to, and for the detection of, biotinylated biomolecules.

KEY WORDS: LIPOSOME/BIOTIN/STREPTAVIDIN/OLIGONUCLEOTIDE/  
HYBRIDIZATION/CHEMILUMINESCENCE/LUMINOL

121 P.

การศึกษาเพื่อนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะของจุลชีพ (STUDY TOWARDS THE DEVELOPMENT OF A RAPID DIAGNOSTIC TEST TO DETECT MICROBIAL SPECIFIC NUCLEOTIDE SEQUENCES)

ภควดี รัชท์ทอง 4236998 SCMI/D

ปร.ค. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : กวี รัตนบรรณางกูร Ph.D., ชโลบล อยู่สุข, Ph.D., พีรพรรณ ตันอารีย์, Ph.D.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือผลิตลิโปโซมที่มีลูมินอลซึ่งเป็นสารเรืองแสงเคมีอยู่ภายใน และมีกลุ่มไบโอตินบนผิวเพื่อใช้เป็นตัวให้สัญญาณในชุดตรวจวิเคราะห์ต่างๆ โดยลิโปโซมนี้จะต้องสามารถจับกับสารชีวโมเลกุลที่มีไบโอตินเชื่อมอยู่ได้ ได้ทำการเตรียมลิโปโซมโดยใช้ฟอสโฟลิปิดที่มีไบโอติน 2 ชนิดคือโพลิเอทธิลีนไกลคอล(2000) ไคสเตริลฟอสฟาทีดิลเอทาโนลามีน และ คาโปรริลไดปามีโดลฟอสฟาทีดิลเอทาโนลามีน และทำการศึกษาคณสมบัติต่าง ๆ ของลิโปโซมที่เตรียมได้ เช่น ขนาด, จำนวนชั้นของไขมัน, ความเสถียรและประสิทธิภาพในการเก็บลูมินอลไว้ภายใน พบว่าความยาวและชนิดของแขนที่อยู่ระหว่างหมู่ไบโอตินกับผิวลิโปโซมรวมทั้งความหนาแน่นของกลุ่มไบโอตินบนผิวมีผลต่อการเกาะของลิโปโซมกับสเตรปตาวิดินที่ถูกตรึงหรือที่อยู่ในสารละลาย ลิโปโซมที่มีสเตรปตาวิดินทำปฏิกิริยาเคลือบอยู่บนผิวนี้จะเป็นตัวให้สัญญาณในชุดตรวจต่างๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่างๆ(เฮกซีเอส, ไตรตอนเอ็ก100 และดีออกซีโคเลท)ต่อการทำลายผิวของลิโปโซมเพื่อปลดปล่อยลูมินอลและผลต่อปฏิกิริยาของลูมินอลในการให้แสง ผลการศึกษาพบว่าดีออกซีโคเลท เหมาะสมที่สุด จากที่ใช้ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่มีเบส 20 ตัวและมีสารไบโอตินติดปลายอยู่เป็นต้นแบบ พบว่าการเกาะอย่างจำเพาะของสาย (-) และสาย (+) ที่ถูกตรึงบนผิวของไมโครไดเตอร์เพลท สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับลิโปโซมที่มีสเตรปตาวิดินเคลือบอยู่บนผิวได้ และสามารถใช้เป็นตัวให้สัญญาณได้จริงนอกจากนี้ยังพบว่า การเกาะของโอลิโกนิวคลีโอไทด์มีความจำเพาะซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสเดียวกันเข้ากัน โดยมีความไวในการวิเคราะห์ที่  $20 \times 10^{-12}$  โมล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ลิโปโซมที่มีลูมินอลอยู่ภายใน, มีไบโอตินอยู่ที่ผิวและเคลือบผิวด้วยสเตรปตาวิดิน สามารถใช้เป็นตัวให้สัญญาณและใช้ตรวจหาชีวโมเลกุลที่มีไบโอตินติดปลายอยู่ได้