Final Report

Project Title

Rapid detection of mutans streptococci by substrate specific binding of automutanolysin

By

Panida Thanyasrisung

September 2016

Contract No.TRG5780043

Final Report

Project Title

Rapid detection of mutans streptococci by substrate specific binding of automutanolysin

Researcher	Institute
1. Panida Thanyasrisung	Chulalongkorn University
2. Aemvika Vittayaprasit	Chulalongkorn University
3. Voravee Hoven	Chulalongkorn University
4. Motoyuki Sugai	Hiroshima University
5. Oranart Matangkasombut	Chulalongkorn University

This project granted by the Thailand Research Fund

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5780043

ชื่อโครงการ : การตรวจหาเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยความจำเพาะต่อการจับซับสเตรตของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน

ชื่อนักวิจัย : พนิดา ธัญญศรีสังข์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : panida.t@g.chula.edu

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

การตรวจเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคอย่างรวดเร็วข้างเก้าอี้เป็นตัวช่วยที่สำคัญในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุ ชุดตรวจเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์สำเร็จรูปสามารถหาซื้อได้ในท้องตลาด แต่ก็ยังมีน้อย ออโตมิวตะโนไลซิน (เอเอ็มแอล) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปปทิโดไกลเคน ไฮโดรเลส ซึ่งส่วนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์นี้มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจอย่างรวดเร็วโดยใช้โดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์มาเชื่อมกับเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส อย่างไรก็ตามโปรตีนลูกผสมที่ได้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นอนุภาคแม่เหล็กนาโนจึงถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกของตัวแสดงผลในการยึดติดกับโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (CWBD-conjugated MNPs) โดยอนุภาคแม่เหล็กนาโนนี้จะตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดผ่านพันธะเอไมด์เพื่อให้มีหมู่คาร์บอกซิลไว้ใช้สำหรับยึดกับโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอล เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับ และความจำเพาะของสารประกอบอนุภาคนี้ต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และเชื้อสเตรปโตคอคคัส แซงกิวนิส และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซาลิวาเรียส สารประกอบอนุภาคนี้ถูกผสมรวมกับเชื้อแต่ละตัวที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหลังจากนั้นทำการแยกประกอบอนุภาคนี้ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก เมื่อแยกออกมาแล้วสารประกอบอนุภาคจะถูกนำ

แขวนลอยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน สารประกอบอนุภาคที่สามารถจับเชื้อได้จะถูกแยกออกจากที่จับเชื้อไม่ได้โดยการกรองแบบสูญญากาศผ่านกระดาษกรองขนาด 0.8 ไมโครเมตร ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของจุดสีของอนุภาคแม่เหล็กที่ถูกกรองค้างอยู่บนกระดาษกรอง กับจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่ช่วง 10^2-10^7 CFU/ml แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้กับเชื้อสเตรปโตคอคไคอีกสองสายพันธุ์ สำหรับการนำไปใช้จริงในทางคลินิกจะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคของสารประกอบอนุภาคนี้กับเชื้อผสม รวมถึงในน้ำลายจริงจากผู้ป่วยเพิ่มเติมในอนาคต

คำหลัก : การตรวจอย่างรวดเร็ว, สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์, มิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค, อนุภาคแม่เหล็กนาโน และเปปทิโดไกลเคน ไฮโดรเลส

Abstract

Project Code : TRG5780043

Project Title : Rapid detection of mutans streptococci by substrate specific binding of automutanolysin

Investigator : Panida Thanyasrisung

Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

E-mail Address : panida.t@g.chula.edu

Project Period : 2 years

Chair-side rapid detection of mutans streptococci is an important aid to clinical dental caries risk assessment. Rapid *Streptococcus mutans* detection tools are available on the market but there are a small number. Automutanolysin (Aml) is a peptidoglycan hydrolase whose cell wall-binding domain (CWBD) has substrate-specificity towards mutans streptococci. This study aims to develop a rapid detection assay using CWBD conjugated with horseradish peroxidase (HRP). However, the recombinant protein was an insoluble form. Therefore, magnetic nanoparticles were used as an alternative reporter to conjugate with CWBD (CWBD-conjugated MNPs). Magnetic nanoparticles were grafted with poly(acrylic acid) (PAA) providing active carboxyl groups for conjugation with CWBD of Aml. To determine binding ability and specificity of CWBD-conjugated MNPs against mutans streptococci and *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus salivarius*, the composite particles were mixed with single-species bacterial solution and then isolated with external magnet. The isolated CWBD-conjugated MNPs were then re-suspended in phosphate buffer saline. Bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs were separated from unbound one by vacuum filtration through a 0.8 μm nitrocellulose filter membrane. There was a linear relationship

between the intensity of colored spots of filtered-MNPs on a membrane and the number of mutans streptococci (range 10^2-10^7 CFU/ml) but not with other two streptococci. Addition of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) enhance a signal of MNPs and thus improve the detection limit. For clinical application, the detection ability against mutans streptococci in mixed culture and also patient's saliva will be further examined.

Keywords : Rapid detection, *Streptococcus mutans*, mutans streptococci, magnetic nanoparticles and peptidoglycan hydrolase.

Executive Summary

Caries risk assessment (CRA) is a method that evaluates the risk of caries development in an individual. This method allows dental professionals to be more efficient and to provide successful prevention and treatment. CRA assesses an individual's risk based on several factors such as past caries experience, dietary habits, socioeconomic status, and laboratory tests (bacterial caries activity tests, salivary flow rate and buffer capacity). For microbiological caries activity test, bacterial culture is necessary. Since this process requires specific laboratory supplies and time to grow bacteria, it is not practical for rural areas. Currently, a rapid detection kit based on antigen-antibody reaction is available in markets. Gao and colleagues reported that this kit could determine the number of *S. mutans* in saliva samples more accurately than the culture-based method [1]. However, the classification of caries risk is still based on the salivary MS levels obtained from the culture-based method.

Automutanolysin (AmI) is peptidoglycan hydrolase showing substrate specificity towards mutans streptococci (MS) but not to other oral streptococci. The substrate specificity to MS is corresponded to a cell wall binding domain (CWBD) of AmI. With this unique ability, CWBD can be a probe for detection of MS. To visualize the target bacteria, a chromogenic/fluorescent reporter is required. The enzyme horseradish peroxidase (HRP) catalyzes the oxidation of substrates in the presence of hydrogen peroxide, resulting in a colored product. At the beginning, we constructed the recombinant protein between CWBD and HRP but the purified protein was in an insoluble form.

Recently; magnetic nanoparticles (MNPs) became a novel method to isolate/concentrate targeted-bacteria even in a dilute sample containing various background materials due to their reaction to magnetic field. Moreover, MNPs exhibit brown color that can be detected by naked eyes. Therefore, the aim of this study is to develop a semi-quantitative rapid detection assay of mutans streptococci using CWBD-conjugated MNPs.

Magnetic nanoparticles (MNPs) were synthesized by solvothermal method and then grafted with poly(acrylic acid) (PAA). Surface-grafted PAA provide carboxyl groups for conjugation with cell wall binding domain (CWBD) of Aml. For CWBD, his-tagged CWBD proteins were expressed from a recombinant CWBD plasmid in *Escherichia coli* BL-21. The proteins were then purified using HIS-Select® Nickel Affinity Gel under native condition. The active fractions were pooled and dialyzed against 0.1M phosphate buffer (pH 6.8). Purifed-CWBD proteins were immobilized on PAA-grafted MNPs by EDC/NHS coupling method. To determine recognition and differentiation abilities of CWBD-conjugated MNPs, mutans streptococci, including *S. mutans* and *S. sobrinus*, and other two oral streptococci (*S. sanguinis* and *S. salivarius*) were used in the study. Each of bacterial culture was prepared in various concentrations in a range of 10^2 to 10^7 CFU/ml. Each culture was then mixed with CWBD-conjugated MNPs and incubated at 4 ^{o}C for 30 min. After incubation, the CWBD-conjugated MNPs were isolate from culture by an external magnet and then re-suspended in 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.4). The suspension was filtered through a 0.8 μm nitrocellulose membrane by a vacuum. Bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs were remained on the membrane since their sizes are larger than the size of membrane pores. The color intensity of bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs spots on a membrane were quantified using a

scion image. We found that mutans streptococci exhibits higher color intensity than the other two oral streptococci. Moreover, the linear regression analysis showed the strong relationship between the colored intensity and the number of bacteria which means the color can used to approximate the number of bacteria. All of these results indicated a potential to develop the CWBD-conjugated MNPs as a chair-side mutans streptococci detection tool for distinguishing the high caries risk group (mutans streptococci $>10^6$ CFU/ml) from other groups.

Introduction to the research problem and its significance

Dental caries still remains an important oral health problem in many countries. It is caused by multiple factors such as cariogenic bacteria (*S. mutans* and *S. sobrinus*), fermentable sugars, host factors and time. All these factors are different among individuals leading to the difference in caries development. However, the management of dental caries in many countries including Thailand did not focus on individual risk. The high-risk caries patients receive the same treatment and prevention as the low-risk caries group. This may be a reason why the prevalence of dental caries has remained at the similar level for more than 20 years in Thailand [2].

Caries risk assessment (CRA) is a method that evaluates the risk of caries development in an individual. The method allows dental professionals to be more efficient and successful in planning for prevention and treatment. CRA assesses an individual's caries risk based on several factors such as past caries experience, dietary habits, socioeconomic status, saliva characteristics, and the amount of cariogenic bacteria [3-5]. Most factors can be tested at the chair-side except bacterial detection. There are commercial bacterial detection kits that are more convenient and easier to use than conventional ones. However, they still require laboratory supplies, expensive equipment and incubation time that are not practical for working in community dental services [6, 7]. In the past few years, commercial *S. mutans* rapid detection kit based on antigen-antibody reactions became available. The assay used monoclonal antibodies specific for *S. mutans* as a probe. The kit could determine the number of *S. mutans* in saliva samples more accurately than the culture-based method [1]. However, the classification of caries risk is still based on the salivary MS levels obtained from the culture-based method.

Automutanolysin (Aml) is a peptidoglycan hydrolase produced by *S. mutans*. The enzyme selectively digests *S. mutans* and also *S. sobrinus*, which are bacteria causing caries in human[8]. This substrate specificity towards cariogenic bacteria is related to a cell wall binding domain (CWBD) of the enzyme (unpublished observation). So, CWBD has a potential to be a specific probe. Magnetic nanoparticles (MNPs) have been an interesting novel material used for bacterial detection since they, with some modifications, can separate targeted-bacteria from biological samples by using an external magnet and exhibit detectable color[9, 10]. The color can be semi-quantitated by naked eyes, so it is useful for the development of tools to be used in community health services.

Therefore, the objective of this study is to develop a rapid mutans streptococci detection using a conjugation of the cell wall binding domain of Aml and magnetic nanoparticles.

Objectives

1. To develop a probe specific to mutans streptococci for rapid detection assay using a genetically engineered CWBD of Aml linked to HRP.
2. To develop a probe specific to mutans streptococci for rapid detection assay using CWBD of Aml conjugated with PAA-grafted MNPs.
3. To evaluate the specific affinity of CWBD-conjugated MNPs to mutans streptococci.
4. To examine the quantitative ability of the chromogenic assay in the detection of mutans streptococci.

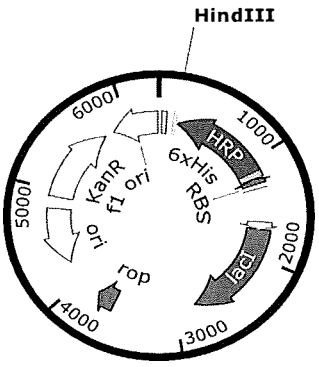
Research methodology

<u>Objective 1) To develop a probe specific to mutans streptococci for rapid detection assay using a genetically engineered CWBD of AmI linked to HRP.</u>

- **Construction of CWBD-HRP fusion gene and expression of CWBD-HRP protein**

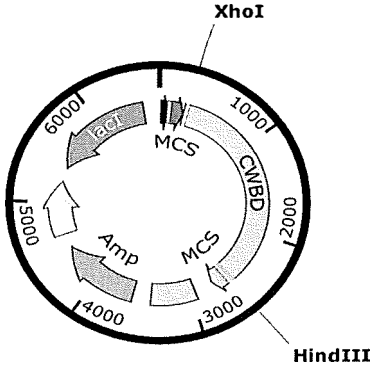
Plasmid pET-26b (+) containing HRP gene with a directed evolution (pETpelBHRP1A6Kan, Biotechnol Progress, 1999: 15: 467–471.) was a kind gift of Prof. Frances H. Arnold (Caltech, CA, USA) (Fig.1A). The HRP gene was inserted into the vector as a fusion to the signal peptide pelB enhancing protein solubility. CWBD of AmI with 6xhistidine tag was constructed in pColdIII vector with *capA* gene (Fig.1B). The gene also helps in protein solubility.

A)



pET26b(+)-HRP-2pelB
6313 bp

B)



pColdIII-PT4-6xHis
6640 bp

Figure 1 A) HRP gene in pET26b(+) vector and B) CWBD gene with 6xHis in pColdIII

HRP gene with pelB sequence was amplified by PCR with *Nde*I restriction sites and was inserted into pColdIII-CWBD-6xHis plasmid (Fig. 2).

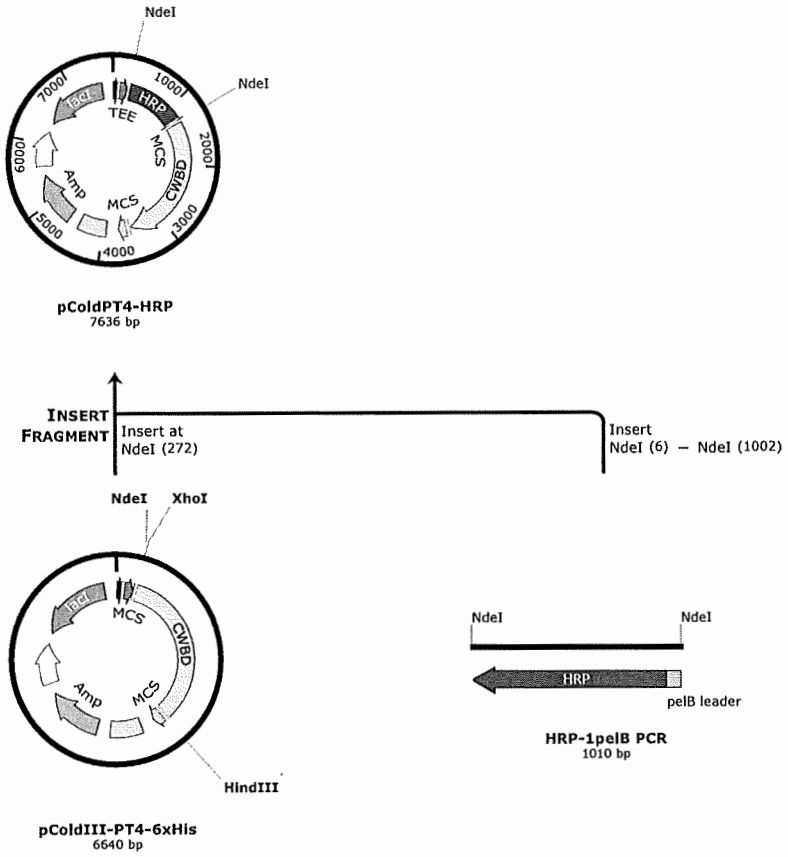


Figure 2 Construction of CWBD-HRP fusion gene in pColdIII vector.

The expression of 6xHis-tagged HRP-CWBD protein (size ~ 120 kDa) was induced by the addition of 1 mM isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG) and incubated at 15°C for 24 hours. The bacterial cells were collected and broken by osmotic shock method. The periplasm, cytoplasm and total cell extracts were run SDS-PAGE gel and stained by Coomassie Brilliant Blue to examine the protein solubility. The protein was in cytoplasm that is an insoluble form (Fig. 3).

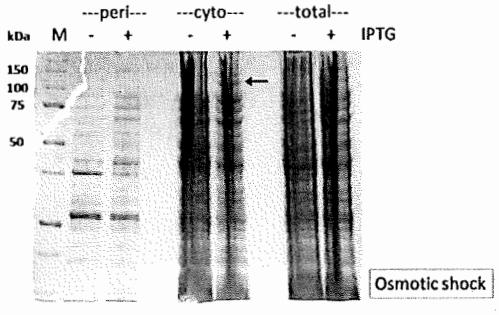


Figure 3 The expression of CWBD-HRP protein (120 kDa)

To improve the protein solubility, we varied IPTG concentration from 0.1-1mM in order to reduce the rate of protein synthesis. We also changed the growth medium by adding 1% glucose to repress induction of the *lac* promoter by lactose which is present in most rich media and adding 1% sorbitol to increase osmotic pressure for accumulation of osmoprotectants to stabilize the native protein structure. Moreover, we changed the vector from pColdIII to pCold ProS2 that facilitate correct protein folding. However, all conditions could not yield soluble proteins.

<u>Objective 2</u> To develop a probe specific to mutans streptococci for rapid detection assay using CWBD of AmI conjugated with PAA-grafted MNPs.

- **Preparation of CWBD of AmI**

Escherichia coli BL-21 carrying a recombinant CWBD plasmid were grown in LB broth at 37 ^{o}C until reach OD_{600nm} of 0.4-0.6. The expression of 6xHis-tagged CWBD proteins was induced by the addition of 1 mM isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG) and incubated at 15 ^{o}C for 24 h. The proteins then were purified using HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) under native condition. The active fractions were pooled and dialyzed against 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8). The concentration of protein was measured by using the Bradford protein assay.

- **Preparation of PAA-grafted MNPs**

Magnetic nanoparticles (MNPs) were synthesized by solvothermal method (Shim et al., 2014). Briefly, 1.35 g of iron chloride hexahydrate ($FeCl_3$•$6H_2O$) was dissolved in 20 mL of ethylene glycol with vigorous stirring. After the solution became colorless, 3.6 g of sodium acetate (NaAc) was added with continuous stirring for 30 min. at room

temperature. Then the mixture was transferred into a 50 mL Teflon-lined stainless-steel autoclave and reacted at 200 °C for 12 h. After the reaction completed, the autoclave was cooled to room temperature. The formed black Fe_3O_4 nanoparticles were collected under external magnetic field, rinsed with ethanol for 10 times, and dried at 60 °C to yield black powder of MNPs (69% yield).

Poly(acrylic acid) (PAA) was grafted on MNPs surface by a grafting form method. Firstly, 0.1 g of MNPs was dispersed ultrasonically in 100 mL of 9:1 (v/v) ethanol-water mixture containing 1 mL of ammonia solution for 30 min. One mL of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) was added dropwise to the dispersed solution. The mixture then was stirred at the room temperature for 12 h. The APTES-modified MNPs were isolated using an external magnet, washed with ethanol for several time and then were vacuum dried. The APTES-modified were immersed in 20 mL DMF containing ACVA (37.5 mmol), DCC (47.0 mmol) and DMAP (3.74 mmol) at room temperature for 20 h under nitrogen atmosphere. After a reaction was complete, the product was rinsed thoroughly with DMF and ethanol for four times each. The obtained initiator-immobilized MNPs were then placed in a vial containing ACVA (0.5 mmol), CTA (5.0 mmol) and acrylic(acid) (0.8 mol) in 10 mL of milli-Q water. The mixture then was heated at 70 °C for 20 h under nitrogen atmosphere. The resulting surface-grafted PAA were removed from the vial and washed with ethanol and milli-Q water, respectively.

- **Conjugation of CWBD on PAA-grafted MNPs by the EDC/NHS coupling method**

Five mg of PAA-grafted MNPs were dispersed in 1 mL of 0.01 M PBS (pH 7.4). 0.1 mL of EDC (2 M) and NHS (0.5 M) were added to the mixture and then incubated

for 30 min at room temperature with shaking (240 rpm). 0.1 mL of CWBD proteins (1 mg/mL) were added to the mixture and incubated for 24 h at 4 °C. Finally, CWBD-conjugated MNPs isolated using an external magnet and rinsed with 0.01 M PBS (pH 7.4) and milli-Q water, respectively. CWBD-conjugated MNPs were stored at 4 °C until use.

Objective 3 To evaluate the specific affinity of CWBD-conjugated MNPs to mutans streptococci.

The binding affinity of CWBD-conjugated MNPs was tested with *S. mutans* UA159, *S. sobrinus* OMZ176, *S. sanguinis* ATCC10556 and *S. salivarius* DMST18781. Bacteria were cultured in brain hear infusion (BHI) broth at 37 ^{o}C, 5% CO_2 with shaking (180 rpm) for overnight. The optical density of overnight cultures was measure at 600 nm (OD_{600nm}) and then was adjusted to OD_{600nm} of 0.1. The adjusted cultures were then incubated at 37 ^{o}C, 5% CO_2 with shaking (180 rpm) to obtain OD_{600nm} of 0.5 ($\approx 10^{10}$ CFU/ml; log phase). The cultures then were diluted to 10^{6} CFU/ml with 0.01 M PBS (pH 7.4). The colony count was performed to confirm the number of bacteria (before treatment).

0.1 mL of each tested bacterial cultures was mixed with 0.2 mL of CWBD-conjugated MNPs solution (0.15 mg/mL in 0.01 M PBS (pH 7.4)) and added 0.01 M PBS (pH 7.4) upto 1 mL in a 1.5 mL tube. For a control group, bacterial cells were substituted with PBS. All tubes were then incubated for 30 min at 4^{o}C. After incubation, a magnet was used to isolate CWBD-conjugated MNPs from a mixture. The supernatant liquids were transferred to a new tube and then plated on BHI agar plates to perform

the colony count (after treatment). CWBD-conjugated MNPs were re-suspended in 0.1 mL of 0.01 M PBS (pH 7.4). 50 µL of the suspensions were filtered through a 0.8 µm nitrocellulose membrane with a vacuum. The bacterial-bound CWBD-conjugated MNPs were then retained on the membrane since their size was bigger than the membrane pore size. The color intensity of the spots on a membrane, which reflected the amount of bacteria, was quantified by scion image for windows, beta 4.0.2. The experiment was performed 6 times.

Objective 4 To examine the quantitative ability of the chromogenic assay in the detection of mutans streptococci.

The experimental protocol is same as in objective 2 except the dilution process. To examine the quantitative ability, the log phase cultures were serially diluted ten-fold from 10^7 to 10^2 CFU/ml with 0.01 M PBS (pH 7.4). After filtration, the color intensity of the spots on a membrane was quantified by scion image for windows, beta 4.0.2. The experiment was done in triplicate. The capture efficiency (CE) of the CWBD-conjugated MNPs was determined by colony count (CFU). The CE was calculated using the formula:

$$CFU_{before}\text{-}CFU_{after}/CFU_{before} \times 100.$$

Furthermore, the relationship between the color intensity and the number of bacteria was analyzed by a simple linear regression.

Results and discussion

CWBD-conjugated MNPs showed a substrate-specific binding ability towards mutans streptococci but not to *S. sanguinis* and *S. salivarius.*

A substrate-specific binding ability of CWBD-conjugated MNPs was determined against 4 oral streptococci (10^6 CFU/ml) and a control without bacteria. The color intensity of CWBD-conjugated MNPs on a filter membrane with 0.8 μm pore size represents bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs. *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* OMZ176 which are cariogenic streptococci exhibited higher signal intensity than the other two oral streptococci (Fig. 1). Based on the color intensity, we could apparently differentiate cariogenic streptococci from others with the naked eye.

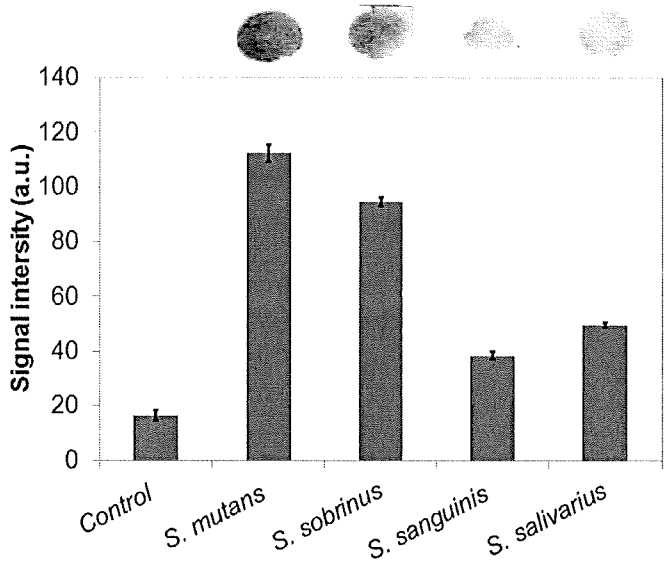


Fig.1 Signal intensity of bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs on a nitrocellulose membrane.

Moreover, we determined the number of bacteria before and after binding to CWBD-conjugated MNPs by counting the colony. As seen in the figure 2, the number of *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* OMZ176 was decreased dramatically after binding to

the CWBD-conjugated MNPS but not found this finding in *S. sanguinis* ATCC10556 and *S. salivarius* DMST18781.

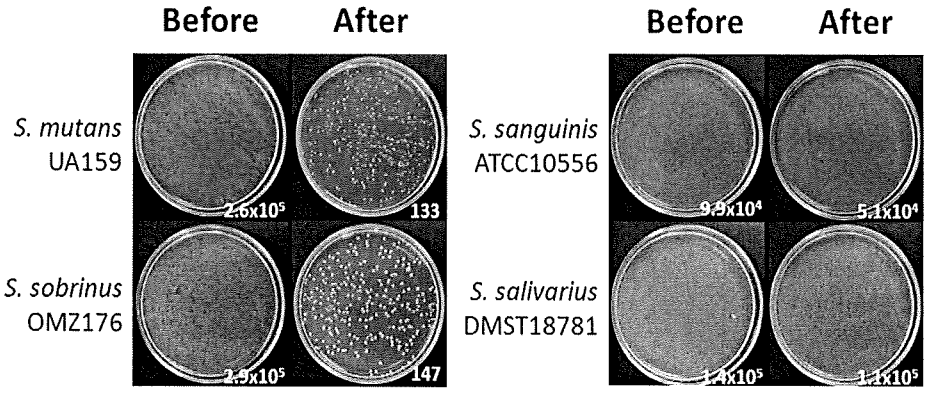


Fig. 2 Photographs of tested oral streptococci colonies on BHI agar plate before and after binding to CWBD-conjugated MNPs. The white numbers represent the number of bacteria (CFU/ml).

The capture efficiency of the CWBD-conjugated MNPs for *S. mutans* and *S. sobrinus* were 77 and 69%, respectively, whereas that for *S. sanguinis* and *S. salivarius* (non-MS) was 38 and 15%, respectively.

CWBD-conjugated MNPs exhibits semi-quantitative measurement ability in cariogenic streptococci detection.

Since the caries risk prediction relates to the number of mutans streptococci, the semi-quantitative measurement ability of CWBD-conjugated MNPs was determined. We found that the color intensity of bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs remaining on 0.8 μm pore size membrane show a strong positive relationship with the number of bacteria (Fig. 3). Moreover, the regression coefficients of *S. mutans* and *S. sobrinus* indicated that the color intensity increased by 11.35 and 10.92, respectively for each log

CFU/ml which are approximately 3 times of those of *S. sanguinis* and *S. salivarius* (b = 3.70 and 3.81, respectively) (Fig. 3).

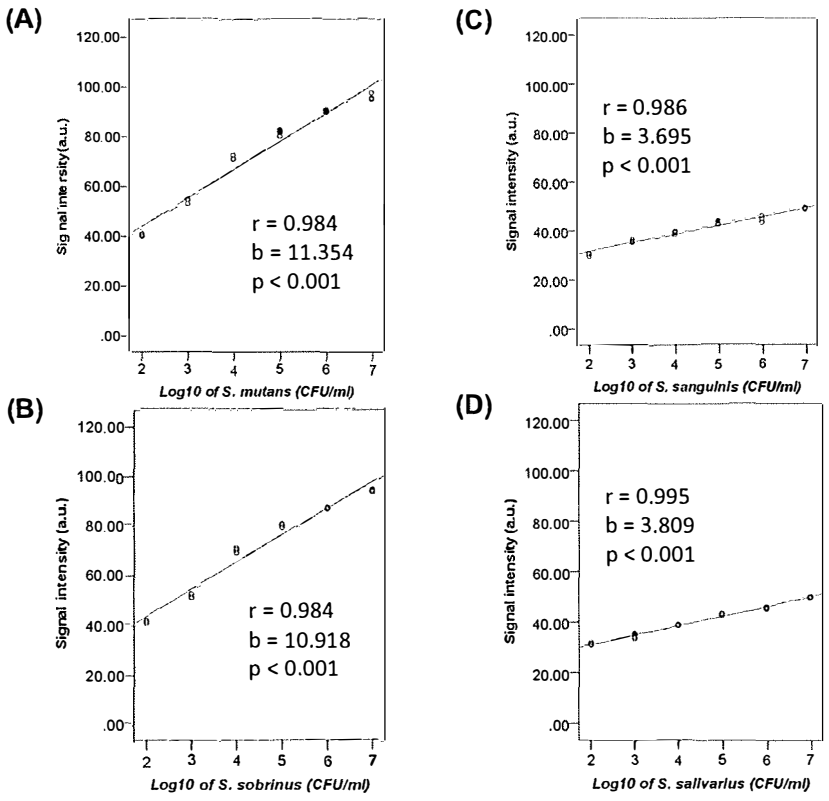


Fig. 3 Relationship between signal intensity and log 10 (CFU/ml) of *S. mutans* UA159 (A), *S. sobrinus* OMZ176 (B), *S. sanguinis* ATCC10556 (C) and *S. salivarius* DMST18781.

r = correlation coefficient and b = regression coefficient.

Conclusion

The colorimetric assay using CWBD-conjugated MNPs had an efficiency to bind to MS and distinguish MS from the other two predominant streptococcal species in oral cavity. Moreover, the color intensity of CWBD-conjugated MNPs can represent the semi-quantitative number of bacteria in range using in caries risk assessment (CRA).

Therefore, it could be developed into a visual MS detection tool for CRA. However, to develop this method for clinical applications, we need to perform the experiment using saliva, which is more complex than single species culture.

References

1. Gao, X.L., et al., *Novel and conventional assays in determining abundance of Streptococcus mutans in saliva.* Int J Paediatr Dent, 2012. **22**(5): p. 363-8.
2. รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 7 พ.ศ. *2555*. 2556, สำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัยกระทรวงสาธารณสุข.
3. Young, D.A. and J.D. Featherstone, *Implementing caries risk assessment and clinical interventions.* Dent Clin North Am, 2010. **54**(3): p. 495-505.
4. Domejean, S., J.M. White, and J.D. Featherstone, *Validation of the CDA CAMBRA caries risk assessment--a six-year retrospective study.* J Calif Dent Assoc, 2011. **39**(10): p. 709-15.
5. *Guideline on caries-risk assessment and management for infants, children and adolescents*. 2011, American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD): Chicago (IL).
6. Saxena, S., S. Pundir, and J. Aena, *Oratest: a new concept to test caries activity.* J Indian Soc Pedod Prev Dent, 2013. **31**(1): p. 25-8.
7. Nishikawara, F., et al., *Evaluation of cariogenic bacteria.* Eur J Dent, 2007. **1**(1): p. 31-9.
8. Yoshimura, G., et al., *Identification and molecular characterization of an N-Acetylmuraminidase, Aml, involved in Streptococcus mutans cell separation.* Microbiol Immunol, 2006. **50**(9): p. 729-42.
9. Shim, W.B., et al., *Rapid colorimetric detection of Salmonella typhimuriumusing a selective filtration technique combined with antibody-magnetic nanoparticle nanocomposites.* Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(3): p. 859-66.
10. Wright, D.J., P.A. Chapman, and C.A. Siddons, *Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating Escherichia coli O157 from food samples.* Epidemiol Infect, 1994. **113**(1): p. 31-9.

Outputs (Supporting documents: Appendix)

1. International conference: Poster presentation (the 31st International Association of Dental Research South East Asian Division Joint Annual Meeting, August 10th-13th, 2017, at the Taipei International Convention Center,Taipei, Taiwan)
2. Patent:
    a. 1 patent pending (เลขที่คำขอ 1601003554)
    b. 1 petty patent (เลขที่อนุสิทธิบัตร 13042)
3. Manuscript submission:
    a. Biosensors and Bioelectronics – Rejected (the paper does not fully fall within the scope of our journal)
    b. Analytica Chimica Acta – Rejected (your manuscript is not suitable for publication in ACA)
    c. Talanta – Rejected (it does not appear to meet the aims and scope of TALANTA)
    d. Analyst – Rejected (I regret to inform you that I do not find your work suitable for publication in Analyst)
    e. Analytical Methods (Impact factor 2016 = 1.900) – Accepted

Appendix

CONTROL ID: 2757733

TITLE: Colorimetric Detection of Mutans Streptococci Using Magnetic Nanoparticles

Objectives: Chair-side detection of mutans streptococci (MS: Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus) is an important aid to clinical dental caries risk assessment. Automutanolysin (Aml) is a peptidoglycan hydrolase whose cell wall binding domain (CWBD) has substrate specificity towards MS. This study aimed to develop a visual detection assay using magnetic nanoparticles (MNPs) conjugated with CWBD of Aml.

Methods: MNPs were grafted with poly(acrylic-acid) providing active carboxyl-groups for conjugation with CWBD of Aml. To determine the binding specificity to MS, the CWBD-conjugated-MNPs were mixed with pure cultures of standard strains of 4 different species of streptococci. Bacteria-bound MNPs were then separated from unbound-cells by magnets and re-suspended in phosphate buffer saline. The suspension was then filtered through a membrane (pore-size 0.8μm). The color intensity of MNPs remained on the membrane represents the quantity of bound-bacteria. Moreover, to determine the capture efficiency (CE) of the CWBD-conjugated MNPs, bacterial cultures were incubated with the CWBD-conjugated MNPs and the amounts of cells before and that remained after the incubation were determined by colony count (CFU). The CE was calculated using the formula: CFU_{before}-CFU_{after}/CFU_{before} x 100.

Results: The color intensity of CWBD-conjugated MNPs bound to MS was higher than those bound to the non-MS. This result implies that the CWBD-conjugated MNPs have greater binding specificity towards MS than non-MS. Moreover, the capture efficiency of the CWBD-conjugated MNPs for S. mutans and S. sobrinus were 77 and 69%, respectively, whereas that for S. sanguinis and S. salivarius (non-MS) was 38 and 15%, respectively. These values confirmed the specificity of the CWBD-conjugated MNPs towards S. mutans and S. sobrinus, but not to non-MS.

Conclusions: These results suggest that the colorimetric assay using MNPs conjugated with CWBD can specifically bind to MS and could be developed into a visual MS detection tool.

AUTHORS (FIRST NAME INITIAL LAST NAME): P. Thanyasrisung[1], A. Vittayaprasit[2], O. Matangkasombut[1], M. Sugai[3], V. P. Hoven[4]

INSTITUTIONS (ALL):

1. Microbiology and Research Unit on Oral Microbiology and Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand.
2. Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
3. Bacteriology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima, Japan.
4. Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,, Bangkok, Thailand.

PRESENTER: Panida Thanyasrisung

PRESENTER (EMAIL ONLY): tpanida@gmail.com

PREFERRED PRESENTATION TYPE: Poster

Support: Yes

Support Funding Agency/Grant Number: Thailand Research Fund (RSA5980071 and DBG5580003 granted to VPH and TRG5780043 granted to PT)

AWARDS:

TABLE TITLE: (No Tables)

(no table selected)

(No Image Selected)

Declaration of Helsinki of the World Medical Association Compliance: Declaration of Helsinki of the World Medical Association Compliance

Financial Interest Disclosure - Account create: Panida Thanyasrisung: No Answer. | Aemvika Vittayaprasit: No Answer. | Oranart Matangkasombut: No Answer. | Motoyuki Sugai: No Answer. | Voravee P. Hoven: No Answer.

First Publishing/Presentation : First Publising/Presentation Confirmation

Permission to Publish: Permission to Publish

Pre-Registration: Pre-Registration

Poster
0036

Colorimetric Detection of Mutans Streptococci Using Magnetic Nanoparticles

Panida Thanyasrisung[1*], Aemvika Vittayaprasit[2], Oranart Matangkasombut[1] Motoyuki Sugai[3] and Voravee P. Hoven[4]

[1] Department of Microbiology and RU on Oral Microbiology and Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[2] Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[3] Department of Bacteriology, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan
[4] Department of Chemistry, Faculty of Science and Center of Excellence in Materials and Bio-interfaces, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Introduction

Chair-side rapid mutans streptococci detection

- An important aid to clinical dental caries risk assessment.

Automutanolysin (Aml)

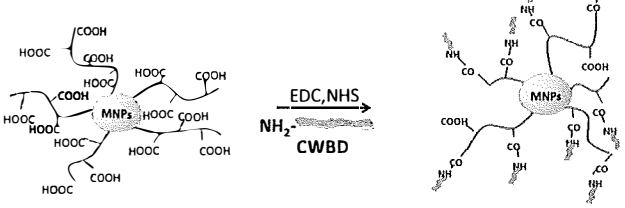
- A peptidoglycan hydrolase, an enzyme that cleaves glycosidic bonds within peptidoglycan structure of bacterial cell wall.
- Two domains: a C-terminal catalytic domain and an N-terminal cell wall-binding domain (CWBD).
- Its CWBD has substrate specificity towards cariogenic streptococci; *S. mutans* and *S. sobrinus*.

Objective

To develop a visual detection assay using magnetic nanoparticles (MNPs) conjugated with CWBD of Aml.

Materials and Methods

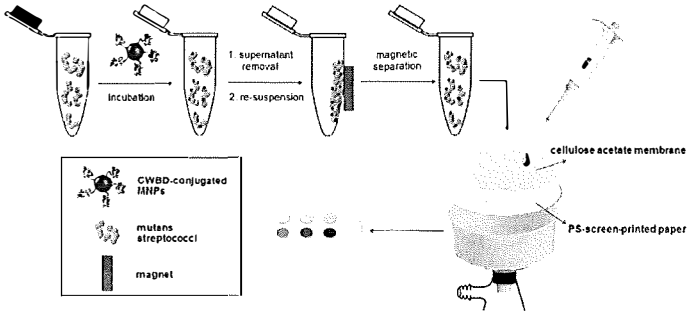
Immobilization of CWBD on MNPs-PAA



MNPs-PAA — CWBD-conjugated MNPs

EDC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
NHS = N-hydroxysuccinimide

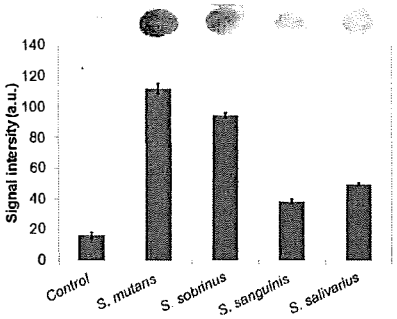
Determination of binding ability and specificity of CWBD-conjugated MNPs against MS and other oral streptococci



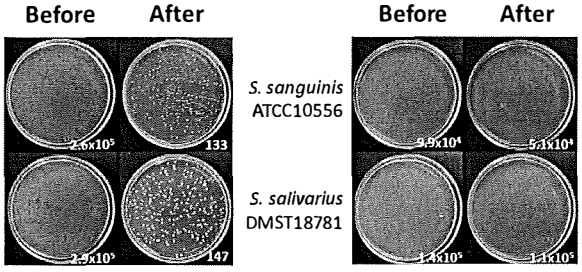
Capture efficiency (%) = $\{(C_{before} - C_{after})/C_{before}\} \times 100$

Results

The color intensity of CWBD-conjugated MNPs bound to MS was higher than those bound to the non-MS.



The number of MS after binding to the CWBD-conjugated MNPs dramatically decreased compared to those before binding whereas non-MS were not.



The capture efficiency of the CWBD-conjugated MNPs for *S. mutans* and *S. sobrinus* was 77% and 69%, respectively, whereas that for *S. sanguinis* and *S. salivarius* was 38% and 15%, respectively.

Conclusion

- These results suggest that the colorimetric assay using CWBD-conjugated MNPs can specifically bind to MS and could be developed into a visual MS detection tool.
- Future studies: detection of mutans streptococci in saliva samples

Acknowledgements: This study is supported by the Thailand Research Fund (RSA5980071 and DBG5580003 granted to VPH and TRG5780043 granted to PT) and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (to RU on Oral Microbiology and Immunology).

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☑ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ 2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 16 ธ.ค. 2559	เลขที่คำขอ 1601003554
วันยื่นคำขอ 16 ธ.ค. 2559	
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1.ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ยกเว้นค่าธรรมเนียม

2.คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) ดูที่หน้า 3	3.1 สัญชาติ
	3.2 โทรศัพท์
	3.3 โทรสาร
	3.4 อีเมล์

4.สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☑ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5.ตัวแทน(ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์) ดูที่หน้า 3	5.1 ตัวแทนเลขที่
	5.2 โทรศัพท์
	5.3 โทรสาร
	5.4 อีเมล์

6.ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)
ดูที่หน้า 3

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

8.การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9.การแสดงการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ

12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 8 หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ 3 หน้า
ง. รูปเขียน 1 รูป 1 หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์
☐ รูปเขียน รูป หน้า
☐ ภาพถ่าย รูป หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14.เอกสารประกอบคำขอ
☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☐ เอกสารอื่น ๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/ อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....

16.ลายมือชื่อ (☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; ☑ ตัวแทน)
นายบัญชา วงศ์ณัฐภัทร

<u>หมายเหตุ</u> บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรือคงสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

3.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อยู่ที่ 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
3.1 สัญชาติ ไทย 3.2 โทรศัพท์ 0-2218-4180 3.3 โทรสาร 0-2218-4181

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
อยู่ที่ ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
3.1 สัญชาติ ไทย 3.2 โทรศัพท์ 0-2278-8200 3.3 โทรสาร 0-2298-0476

5. ตัวแทน(ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)
นายมงคล แก้วมหา
อยู่ที่ สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 อาคารวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 14 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
5.1 ตัวแทนเลขที่ 1453 5.2 โทรศัพท์ 0-2218-4180 5.3 โทรสาร 0-2218-4181

และ/หรือ

นายบัญชา วงศ์ณัฐภัทร
อยู่ที่ สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 อาคารวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 14 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
5.1 ตัวแทนเลขที่ 2392 5.2 โทรศัพท์ 0-2218-4180 5.3 โทรสาร 0-2218-4181 5.4 อีเมล์ Bancha.V@chula.ac.th

6.ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

นางสาวพนิดา ธัญญศรีสังข์
อยู่ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

นางสาวเอมวิกา วิทยาประสิทธิ์
อยู่ที่ หลักสูตรปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

นางวรวีร์ โฮเว่น
อยู่ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

นายโมโตยูกิ ซูไก
อยู่ที่ ภาควิชาแบคทีเรียวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ และวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยฮิโรชิมา จังหวัดฮิโรชิมา ประเทศญี่ปุ่น

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเคมี และวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โรคฟันผุยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากรายงานผลการสำรวจทันตสาธารณสุขแห่งชาติครั้งที่ 7 พ.ศ. 2555 ที่ความชุกของโรคในกลุ่มเด็กก่อนวัยเรียนอายุ 3 และ 5 ปี และในกลุ่มเด็กวัยเรียน และเยาวชนอายุ 12 และ 15 ปีมีมากเกินกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรที่ถูกสำรวจ ความชุกของโรคฟันผุในประชากรไทยอยู่ในระดับนี้มาตลอดระยะเวลาเกือบ 10 กว่าปีที่ผ่านมา สาเหตุหนึ่งอาจจะมาจากการให้การรักษา และป้องกันโรคฟันผุในคนไข้ทุกคนในระดับเดียวกัน ทั้ง ๆ ที่ความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุเป็นเรื่องของแต่ละบุคคล ทำให้กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงได้รับการรักษา และป้องกันไม่เพียงพอที่จะทำให้หยุดการเกิดโรคขึ้นได้ การประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ เป็นกระบวนการประเมินว่าบุคคลนี้มีความเสี่ยงที่จะเกิดฟันผุอยู่ในระดับไหน ซึ่งค่าที่ประเมินได้นั้นจะช่วยให้ทันตแพทย์เลือกวิธีการรักษา และป้องกันได้อย่างเหมาะสม ความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุนี้ประเมินโดยอาศัยหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น พฤติกรรมการทานอาหาร การดูแลสุขภาพช่องปาก คุณลักษณะของน้ำลาย และปริมาณเชื้อก่อโรคฟันผุ เป็นต้น ปัจจัยที่นำมาประเมินนี้ส่วนใหญ่สามารถทำได้ทันทีข้างเก้าอี้ทำฟัน ยกเว้นการหาปริมาณเชื้อ ถึงแม้จะมีชุดตรวจเชื้อสำเร็จรูปออกมาจำหน่ายทำให้สะดวกมากขึ้น แต่ก็ยังต้องอาศัยเวลาในการอบเลี้ยงเชื้อ และต้องการอุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่เกินพกพา และมีราคาแพง ทำให้ไม่สะดวกที่จะนำมาใช้ในงานระดับชุมชน

มีเอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรแสดงเครื่องมือตรวจเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (rapid bacterial detection tool) โดยอาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟี และทองคอลลอย์ (colloidal gold- based immunochromatography) โดยในชุดตรวจนี้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์เป็นเครื่องมือในการจับเชื้อ (probe) นำไปติดกับทองคอลลอยด์ (colloidal gold) ทำให้เห็นสีได้ด้วยตาเปล่า (เอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 20080240993 A1) มีรายงานการวิจัยถึงประสิทธิภาพของ

เครื่องมือนี้ว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อ (sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 97.6 แต่มีความจำเพาะ (specificity) เพียงร้อยละ 90.6 เท่านั้นเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นวิธียืนยันจำนวนเชื้อ (Int J Paediatr Dent., Vol 22, p 363-368, 2012) ด้วยเหตุนี้ทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไว และความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นและยังคงเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า

เอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลส (peptidoglycan hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด มีหน้าที่ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) แต่เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในเซลล์ของมนุษย์ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัว และแยกตัวของเซลล์แบคทีเรีย จากรายงานสิทธิบัตร และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ผลิตเอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสซึ่งถูกตั้งชื่อว่า ออโตมิวตะโนไลซิน (automutanolysin) หรือเอเอ็มแอล (Aml) ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (mutans streptococci) อันเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งต่อการเกิดโรคฟันผุ และเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ โครงสร้างของเอนไซม์นี้ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 979 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 กิโลดาลตัน และมีสองโดเมนหลักได้แก่ คาตาไลติกโดเมนอยู่ทางฝั่งปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal catalytic domain) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์ และอีกโดเมนอยู่ฝั่งปลายด้านหมู่อะมิโนทำหน้าที่ในการจับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (Microbiol Immunol., Vol 50, p 729-42, 2006 และสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 7,776,325 B2 และ US 8,852,584 B2) ด้วยความจำเพาะนี้หากทำการตัดต่อยีนโดยเอาส่วนคาตาไลติกโดเมนที่ใช้ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนออกไป ก็จะสามารถใช้เอนไซม์ดังกล่าวนี้ในการจับกับผนังเซลล์ของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (probe) เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อได้

ในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียได้มีการพัฒนากรรมวิธีการผลิตของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สามารถตรวจวัดปริมาณของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่สามารถเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งทำได้โดยการยึดติดโดเมนจับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอลกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetic nanoparticles, MNPs) ที่มีขนาดตั้งแต่ 5 ถึง 500 นาโนเมตร กลายเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยทั่วไปอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่นิยมใช้มักเป็นแบบแมกเนไทต์ (Fe_3O_4) หรือแมกฮีไมต์ (γ-Fe_2O_3) มีสมบัติที่สามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอกได้อย่างรวดเร็ว ด้วยสมบัติดังกล่าวจึงทำให้อนุภาคแม่เหล็กนาโนสามารถนำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยการควบคุมผ่านสนามแม่เหล็กภายนอก เชื้อแบคทีเรียที่แยกมาได้จึง

มีความบริสุทธิ์ และง่ายต่อการตรวจวัดยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) สารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนไม่สามารถผ่านรูพรุนของแผ่นเมมเบรนมาได้ โดยปริมาณของสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะแปรผันตรงกับความเข้มของสีบนแผ่นเมมเบรน จึงสามารถวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า (semi-quantitative analysis)

มีสิทธิบัตรรายงานการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีมาใช้ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย โดยจากรายงานพบว่าจากกรรมวิธีการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีนี้ อนุภาคสามารถจับกับเชื้อแบคทีเรียได้ตามสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ 8,883,455 และเลขที่ 9,201,066 แต่ยังไม่มีงานวิจัยใดคิดค้นเกี่ยวกับกรรมวิธีการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนติดกับโดเมนที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอล ซึ่งผลของการตรวจวัดปริมาณเชื้อนี้สามารถใช้ประกอบการประเมินความเสี่ยงการเกิดโรคฟันผุได้

มีงานวิจัยที่รายงานการตรวจวัดปริมาณของเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมิวเรียม *(Salmonella typhimurium)* โดยมีกรรมวิธีการผลิตของอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ ผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และหมู่อะมิโนของแอนติบอดี โดยใช้ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลลามีนโพรพิล) คาร์โบดิไอไมด์ไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethylaminepropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังประสบปัญหาการตรวจวัดเนื่องจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจวัดได้ยังมีค่าสูง ดังนั้นจึงควรมีกรรมวิธีการตรึงพอลิเมอร์ลงไปบนพื้นผิวของอนุภาคเพื่อให้ได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สามารถตรวจวัดเชื้อในปริมาณต่ำได้และสามารถตรวจวัดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Anal. Chem., Vol 406, p 406-866, 2014)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเอาพอลิเมอร์มาตรึงบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน เพื่อช่วยทำให้อนุภาคมีความเสถียรมากขึ้น ไม่เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคและสามารถกระจายตัวอยู่ในสารละลายได้ดียิ่งขึ้น มีงานวิจัยที่เปรียบเทียบสมบัติการกระจายตัว และความเสถียรของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึง และไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ โดยได้สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) หรือพอลิสไตรีน (polystyrene) ลงบนพื้นผิว เริ่มจากนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาทำปฏิกิริยากับโอโซน เพื่อเกิดหมู่เปอร์ออกไซด์ (peroxide group) บนพื้นผิว ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยา และใช้ 1-เฟนิลเอทิลไดไทโอเบนโซเอท (1-phenylethyl dithiobenzoate; PVB) ทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ (chain transfer agent) นำไปทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) ด้วยกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดหรือพอลิสไต

รีน แล้วนำไปทดสอบสมบัติการกระจายตัวและความเสถียร พบว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวสามารถกระจายตัว และมีความเสถียรดีกว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิว (Macromolecules, Vol 27, p 1665-1669, 2006)

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุด้วยพอลิเมอร์คือ การเตรียมเป็นพอลิเมอร์บรัช (polymer brushes) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีปลายของโซ่ด้านหนึ่งยึดติดบนพื้นผิวด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้มีเสถียรภาพในการยึดติดบนพื้นผิวสูงกว่าการดูดซับทางกายภาพ (physical absorption) การเตรียมพอลิเมอร์บรัชนิยมเตรียมด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ทั้งนี้ความยาวของโซ่พอลิเมอร์สามารถควบคุมได้หากใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) เช่น atom transfer radical polymerization (ATRP) และ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) (Prog. Polym. Sci., Vol 25, p 677-710, 2000 และ Chem. Rev., Vol 109, p 5437-5527, 2009) โดยสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิเมอร์บรัชขึ้นกับชนิดของมอนอเมอร์ (monomer) ที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์

การประดิษฐ์นี้สนใจที่จะตรึงพอลิเมอร์บรัชของพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid); PAA) ลงบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน ผ่านปฏิกิริยา และ reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization โดยโครงสร้างของพอลิเมอร์บรัชมีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ซึ่งสามารถยึดติดกับหมู่อะมิโน (amino group) ของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) ผ่านการเกิดพันธะเอไมด์ (amide bond) ได้ จึงสามารถติดโดเมนนี้ได้ปริมาณมาก ส่งผลให้สารประกอบอนุภาคมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเชื้อที่ดีขึ้น

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ประกอบรวมด้วยกรรมวิธีการเตรียมโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคฟันผุอย่างจำเพาะ และกรรมวิธีการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโน เตรียมโดยการนำโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ มายึดติดกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดผ่านพันธะเอไมด์ เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค จึงสามารถเลือกจับเฉพาะเชื้อนี้ได้

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อผลิตสารประกอบอนุภาคที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์และยึดติดโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะ โดยกรรมวิธีในการผลิตสารประกอบอนุภาคใช้วิธีการตรึงอนุภาคแม่เหล็กนาโนด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิด ทำให้สามารถยึดติดโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงพลาสมิดลูกผสมที่มียีนส่วนที่มีความจำเพาะในการจับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pColdIII

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า มีขั้นตอนประกอบด้วยการนำโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่ม สเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดผ่านพันธะเอไมด์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่มสเตรปโตคอคไค โดยกรรมวิธีดังกล่าวประกอบรวมด้วยขั้นตอนย่อยดังนี้

<u>การเตรียมโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่ม สเตรปโตคอคไค ได้อย่างจำเพาะ มีขั้นตอนประกอบด้วย</u>

(1) การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่มียีนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับ ผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ไปข้างหน้า และย้อนกลับ (forward and reward primers) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเจนแบงค์ รหัส เอบี253514 (GenBank accession AB253514) โดยดัดแปลงให้ทางปลาย 5' ของไพรเมอร์ไปข้างหน้ามีนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Xho*I โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'AAAACTCGAGGATGAGCAAAAT3' และดัดแปลงให้ทางปลาย 5' ของไพรเมอร์ย้อนกลับมีนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'AAAAGGATCCTGGCAGAGCAACAGC3' จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้โครโมโซมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) แล้วเชื่อมชิ้นยีนนี้เข้ากับเวคเตอร์ pColdIII ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮิสทิดีน

(histidine) อยู่ภายในลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซีลิน (ampicillin resistant gene) เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปในเซลล์ได้สำเร็จ (รูปที่ 1) จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล สายพันธุ์ BL-21 (*Escherichia coli* BL-21) (transformation) คัดเลือกเชื้อที่รับ พลาสมิดลูกผสมนี้เข้าไปได้สำเร็จโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ลูเรีย-เบอร์ทานิ (Luria Bertani agar) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซีลิน (ampicillin)

(2) การผลิตโปรตีนจากเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*; *E. coli*) ที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปได้สำเร็จ และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL-21 ที่มีพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ของยีนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลูเรีย-เบอร์ทานิ (Luria Bertani; LB) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซีลิน (ampicillin) นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) ถ่ายโอนหัวเชื้อที่ได้ในปริมาตร ที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซีลิน นำไปอบเลี้ยงต่อจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phage; 0.4-0.6) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเติมสารละลายไอโซโพรพิล-เบต้า-ดี-ไทโอกาแลคโตไซด์ (isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG) 0.5-1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูง นำเซลล์ที่ได้ละลายในไลซิส บัฟเฟอร์ (lysis buffer) และนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องที่ให้คลื่นความถี่สูง (sonicator) เพื่อที่จะได้นำโปรตีนที่ถูกสร้างภายในเซลล์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่แยกสารตามความจำเพาะ (affinity column) ล้างคอลัมน์ด้วยวอช บัฟเฟอร์ (wash buffer) และแยกโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยอีลูชั่น บัฟเฟอร์ (elusion buffer) โดยแยกเก็บโปรตีนที่ได้ออกเป็นส่วนๆ (fractions) นำแต่ละส่วนแยกที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส-เพจ (polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) เพื่อเลือกส่วนแยกที่มี ปริมาณโปรตีนมากที่สุด (active fraction) มารวมกัน และนำไปไดอะไลซิส (dialysis) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

<u>การเตรียมอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิว มีขั้นตอนประกอบด้วย</u>

(1) สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กนาโนด้วยวิธีโซโวเทอร์มอล (solvothermal) โดยชั่งไอรอนคลอไรด์เฮกซาไฮเดรต (iron chloride hexahydrate) 0.01-0.05 โมลาร์ ละลายในเอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยสารละลายจะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 0.3-0.7 โมลาร์ ลงไปในขวดแก้วแล้วคนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30-50 นาที แล้ว

จึงถ่ายสารละลายนี้ลงสู่ถ้วยสเตนเลสที่พื้นผิวเคลือบเทฟลอนเพื่อนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150-300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปแยกอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ต้องการออกจากสารละลายโดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอก ล้างอนุภาคด้วยเอทานอลแล้วนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียส จะได้ผงอนุภาคแม่เหล็กนาโนตามที่ต้องการ

(2) นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สังเคราะห์ได้มาตรึงหมู่อะมิโนซึ่งเป็นหมู่ริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาโดยใส่อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่เตรียมได้จาก (1) ในขวดก้นกลมที่บรรจุเอทานอล แล้วเติมด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane; APTES) และสารละลายแอมโมเนีย เขย่าสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-14 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนไปล้างด้วยเอทานอล ได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาพร้อมจะนำไปใช้ในการติดสารริเริ่ม (initiator) ในขั้นการสังเคราะห์พอลิเมอร์ต่อไป

(3) ทำการกราฟต์พอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน โดยละลาย 4,4-บิสไซยาโนวาเลอิก แอซิด (4,4-bis(4-cyanovaleic acid; ACVA) 0.1-0.3 โมลาร์, ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบดิ ไอไมด์ 0.02-0.05 โมลาร์, (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; DCC) และ 4-ไดเมทิลแอมิโนไพริดีน (4-dimethylamino pyridine; DMAP) 0.01-0.04 โมลาร์ ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide; DMF) คนให้สารละลายเข้ากันเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ไปยังขวดแก้วที่บรรจุอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีหมู่อะมิโนที่เตรียมได้จาก (2) ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์และเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งในขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่ม

(4) ละลาย 4,4-บิสไซยาโนวาเลอิก แอซิด (4,4-bis (4-cyanovaleic acid; ACVA) 0.03-0.06 โมลาร์ และ 4-ไซยาโน-4-เฟนิลคาร์โบโนไทโออิลไทโอเพนทาโนอิก แอซิด (4-cyano-4-phenyl carbonothioylthio) pentanoic acid) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ (chain transfer agent; CTA) 0.3-0.7 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 (PBS buffer) และเติมมอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือ อะคริลิกแอซิด 0.05-0.1 โมลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากันก่อนถ่ายโอนสารละลายนี้ไปยังขวดแก้วที่บรรจุอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่มแล้วทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้มาล้างด้วยเอทานอล และน้ำ ตามลำดับ ทำอนุภาคแม่เหล็กนาโนให้แห้ง ในขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิด เพื่อนำไปใช้ในการติดกับโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์

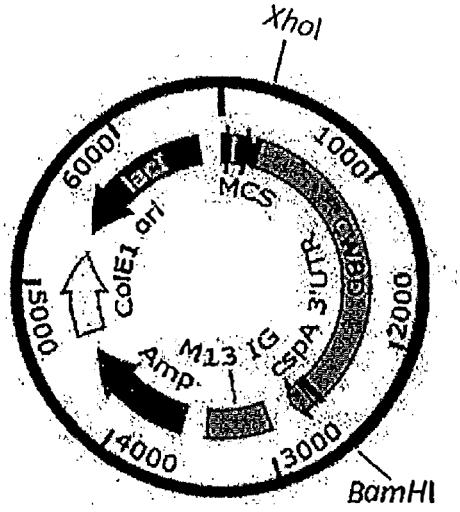
<u>กรรมวิธีการยึดติดโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดขั้นตอนประกอบด้วย</u>

(1) ละลาย 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลเอมีนโพรพิล) คาร์โบดีไอไมด์ไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminepropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC) ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ และเอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์ (*N*-hydroxysuccinimide; NHS) ความเข้มข้น 0.3-0.6 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 ตามลำดับ คนสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ไปยังขวดแก้วที่บรรจุอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิว ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 แล้วคนสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-50 นาที

(2) เติมโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ความเข้มข้น 0.1-0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1-3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้ไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 และน้ำ ตามลำดับ ทำอนุภาคแม่เหล็กนาโนให้แห้ง จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดที่ยึดติดกับโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์สำหรับนำไปใช้ในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคต่อไป

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์


XhoI
1000
MCS
CMV
IE1
2000
3'UTR
BGH
3000
BamHI
4000
Amp
M13 IG
5000
ColE1 ori
6000
IRI

รูปที่ 1

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า มีขั้นตอนประกอบด้วยการนำโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าจับกับผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่มสเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่มสเตรปโตคอคไค
2. กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่ม สเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะ มีขั้นตอนประกอบด้วย

(1) การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่มียีนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน โดยเชื่อมชิ้นยีนนี้ เข้ากับเวคเตอร์ pColdIII ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮิสทิดีน (histidine) อยู่ภายในลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistant gene) เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปในเซลล์ได้สำเร็จ จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) (transformation) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่รับพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าไปได้ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะชนิดเดียวกับที่ในพลาสมิดมียีนดื้อต่อยานี้

(2) การผลิตโปรตีนจากเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*; *E. coli*) ที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปได้สำเร็จ และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากทำการเลี้ยงเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phage) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเติมสารละลายไอโซโพรพิล-เบต้า-ดี-ไทโอกาแลคโตไซด์ (isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG) เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูง หลังจากนั้นสกัดโปรตีนภายในเซลล์ โดยการทำให้เซลล์แตก นำโปรตีนที่ได้ ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่แยกสารตามความจำเพาะ (affinity column) แยกเก็บโปรตีนที่ได้ออกเป็นส่วนๆ (fractions) นำแต่ละส่วนแยกที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส-เพจ (polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) เพื่อเลือกส่วนแยกที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (active fraction) มา

รวมกัน และนำไปไดอะไลซิส (dialysis) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

3. กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดมีขั้นตอนประกอบด้วย

(1) เตรียมไอรอนคลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ความเข้มข้น 0.01-0.05 โมลาร์ ในเอทิลีนไกลคอล แล้วเติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.3-0.7 โมลาร์ คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30-50 นาที นำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150-300 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ต้องการโดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอก ล้างอนุภาคด้วยเอทานอลแล้วนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียส จะได้ผงอนุภาคแม่เหล็กนาโน

(2) เติมเอทานอล ลงไปในอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่เตรียมได้จาก (1) แล้วเติมด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane; APTES) และสารละลายแอมโมเนีย เขย่าสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-14 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนไปล้างด้วย เอทานอล ได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาพร้อมจะนำไปใช้ในการติดสารริเริ่ม (initiator) ในขั้นการสังเคราะห์พอลิเมอร์ต่อไป

(3) ละลาย 4,4-บิสไซยาโนวาเลอิกแอซิด 0.1-0.3 โมลาร์, ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบดิไอไมด์ 0.02-0.05 โมลาร์และ 4-ไดเมทิลแอมิโนไพริดีนในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 0.01-0.04 โมลาร์ คนให้สารละลายเข้ากันเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ต่อมาผสมสารละลายกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์และเอทานอล ตามลำดับ ขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่ม

(4) ละลาย 4,4-บิสไซยาโนวาเลอิก แอซิด 0.03-0.06 โมลาร์ และ 4-ไซยาโน-4-เฟนิลคาร์โบโนไทโออิลไทโอเพนทาโนอิกแอซิด 0.3-0.7 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 และเติมมอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรืออะคริลิกแอซิด 0.05-0.1 โมลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วถ่ายสารละลายนี้ไปผสมกับกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่ม โดยทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้มาล้างด้วยเอทานอลและน้ำ ตามลำดับ ทำอนุภาคนาโนแม่เหล็กให้แห้ง ขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิด

4. กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่งกรรมวิธีการยึดติดโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด มีขั้นตอนประกอบด้วย

(1) ละลาย 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลเอมีนโพรพิล) คาร์โบดิไอไมด์ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ และเอ็นไฮดรอกซีซักซินิไมด์ ความเข้มข้น 0.3-0.6 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 ตามลำดับ จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ไปผสมกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิว ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 แล้วคนสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-50 นาที

(2) เติมโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ที่มีความเข้มข้น 0.1-0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1-3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้ไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 และน้ำ ตามลำดับ แล้วทำอนุภาคแม่เหล็กนาโนให้แห้ง

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า เตรียมโดยการนำโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่ม สเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดผ่านพันธะเอไมด์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก หรือพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) ซึ่งการตรึงพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิวอนุภาคแม่เหล็กนี้ ทำให้สามารถยึดติดโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

เลขที่อนุสิทธิบัตร 13042

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
บดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
กฎในอนุสิทธิบัตรนี้

ที่คำขอ	1603001055
อรับอนุสิทธิบัตร	16 มิถุนายน 2559
ดิษฐ์	นางสาวพนิดา ธัญญศรีสังข์ และคณะ
ชดงถึงการประดิษฐ์	สารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ให้ผู้ทรงอ บัตรมีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 1 เดือน กันยายน พ.ศ. 2560

หมดอายุ ณ วันที่ 15 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2565

(ลงชื่อ).....

(นายดิเรก บุญแท้)

รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน

อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา

ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวก็ได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนด

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเคมี และวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โรคฟันผุยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากรายงานผลการสำรวจทันตสาธารณสุขแห่งชาติครั้งที่ 7 พ.ศ. 2555 ที่ความชุกของโรคในกลุ่มเด็กก่อนวัยเรียนอายุ 3 และ 5 ปี และในกลุ่มเด็กวัยเรียน และเยาวชนอายุ 12 และ 15 ปีมีมากเกินกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรที่ถูกสำรวจ ความชุกของโรคฟันผุในประชากรไทยอยู่ในระดับนี้มาตลอดระยะเวลาเกือบ 10 กว่าปีที่ผ่านมา สาเหตุหนึ่งอาจจะมาจากการให้การรักษา และป้องกันโรคฟันผุในคนไข้ทุกคนในระดับเดียวกัน ทั้ง ๆ ที่ความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุเป็นเรื่องของแต่ละบุคคล ทำให้กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงได้รับการรักษา และป้องกันไม่เพียงพอที่จะทำให้หยุดการเกิดโรคขึ้นได้ การประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ เป็นกระบวนการประเมินว่าบุคคลนี้มีความเสี่ยงที่จะเกิดฟันผุอยู่ในระดับไหน ซึ่งค่าที่ประเมินได้นั้นจะช่วยให้ทันตแพทย์เลือกวิธีการรักษา และป้องกันได้อย่างเหมาะสม ความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุนี้ประเมินโดยอาศัยหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น พฤติกรรมการทานอาหาร การดูแลสุขภาพช่องปาก คุณลักษณะของน้ำลาย และปริมาณเชื้อก่อโรคฟันผุ เป็นต้น ปัจจัยที่นำมาประเมินนี้ส่วนใหญ่สามารถทำได้ทันทีข้างเก้าอี้ทำฟัน ยกเว้นการหาปริมาณเชื้อ ถึงแม้จะมีชุดตรวจเชื้อสำเร็จรูปออกมาจำหน่ายทำให้สะดวกมากขึ้น แต่ก็ยังต้องอาศัยเวลาในการอบเลี้ยงเชื้อ และต้องการอุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่เกินพกพา และมีราคาแพง ทำให้ไม่สะดวกที่จะนำมาใช้ในงานระดับชุมชน

มีเอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรแสดงเครื่องมือตรวจเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (rapid bacterial detection tool) โดยอาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟี และทองคอลลอยด์ (colloidal gold- based immunochromatography) โดยในชุดตรวจนี้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์เป็นเครื่องมือในการจับเชื้อ (probe) นำไปติดกับทองคอลลอยด์ (colloidal gold) ทำให้เห็นสีได้ด้วยตาเปล่า (เอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 20080240993 A1) มีรายงานการวิจัยถึงประสิทธิภาพของ

เครื่องมือนี้ว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อ (sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 97.6 แต่มีความจำเพาะ (specificity) เพียงร้อยละ 90.6 เท่านั้นเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นวิธียืนยันจำนวนเชื้อ (Int J Paediatr Dent., Vol 22, p 363-368, 2012) ด้วยเหตุนี้ทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไว และความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังคงเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า

เอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลส (peptidoglycan hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด มีหน้าที่ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) แต่เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในเซลล์ของมนุษย์ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัว และแยกตัวของเซลล์แบคทีเรีย จากรายงานสิทธิบัตร และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ผลิตเอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสซึ่งถูกตั้งชื่อว่า ออโตมิวตะโนไลซิน (automutanolysin) หรือเอเอ็มแอล (AmI) ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (mutans streptococci) อันเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งต่อการเกิดโรคฟันผุ และเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ โครงสร้างของเอนไซม์นี้ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 979 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 กิโลดาลตัน และมีสองโดเมนหลักได้แก่ คาตาไลติกโดเมนอยู่ทางฝั่งปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal catalytic domain) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์ และอีกโดเมนอยู่ฝั่งปลายด้านหมู่อะมิโนทำหน้าที่ในการจับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (Microbiol Immunol., Vol 50, p 729-42, 2006 และสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 7,776,325 B2 และ US 8,852,584 B2) ด้วยความจำเพาะนี้หากทำการตัดต่อยีนโดยเอาส่วนคาตาไลติกโดเมนที่ใช้ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนออกไป ก็จะสามารถใช้เอนไซม์ดังกล่าวนี้ในการจับกับผนังเซลล์ของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (probe) เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อได้

ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่สามารถเห็นผลได้ด้วยตาเปล่านี้นอกจากการนำโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์มาใช้ในการตรวจจับเชื้อที่ต้องการแล้ว การแยกเชื้อออกจากเชื้ออื่น หรือสารเจือปนอื่นๆ และการนำเชื้อที่คัดแยกแล้วมาตรวจวัดปริมาณ และแสดงผลให้เห็นได้ด้วยตาเปล่านั้นทำได้โดยการยึดติดโดเมนดังกล่าวกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetic nanoparticles, MNPs) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 5 ถึง 500 นาโนเมตร กลายเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยทั่วไปอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่นิยมใช้มักเป็นแบบแมกเนไทต์ (Fe_3O_4) หรือแมกฮีไมต์ (γ-Fe_2O_3) มีสมบัติที่สามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอกได้อย่างรวดเร็ว ด้วยสมบัติดังกล่าวจึงทำให้อนุภาคแม่เหล็กนาโนสามารถ

นำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยการควบคุมผ่านสนามแม่เหล็กภายนอก เชื้อแบคทีเรียที่แยกมาได้จึงมีความบริสุทธิ์ และง่ายต่อการตรวจวัดยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) สารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนไม่สามารถผ่านรูพรุนของแผ่นเมมเบรนมาได้ โดยปริมาณของสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะแปรผันตรงกับความเข้มของสีบนแผ่นเมมเบรน จึงสามารถ
5 วิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า (semi-quantitative analysis).

มีสิทธิบัตรรายงานการนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีมาใช้ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย และแยกเชื้อออกจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก แล้วนำมาตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย โดยจากรายงานพบว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีนี้สามารถจับกับเชื้อแบคทีเรีย และแยกเชื้อออกมาจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอกได้จริง และสามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อได้ตามสิทธิบัตรประเทศ
10 สหรัฐอเมริกาเลขที่ 8,883,455 และเลขที่ 9,201,066 แต่ยังไม่มีงานวิจัยใดคิดค้นเกี่ยวกับการแยก และตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนติดกับโดเมนที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอล ซึ่งผลของการตรวจวัดปริมาณเชื้อนี้สามารถใช้ประกอบการประเมินความเสี่ยงการเกิดโรคฟันผุได้

มีงานวิจัยที่รายงานการตรวจวัดปริมาณของเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมิวเรียม *(Salmonella typhimurium)* โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ ผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และหมู่อะมิโนของแอนติบอดี โดยใช้ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลลามีนโพรพิล) คาร์โบดิไอไมด์ไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethylaminepropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ จากนั้นจึงแยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากสารเจือปนอื่นๆ โดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก ตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองแบบเลือกผ่านโดยใช้เมมเบรนเซลลูโลสแอซิเตต (cellulose acetate membrane) ที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร เพื่อแยกเชื้อที่ถูกจับ
20 ด้วยอนุภาค และวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจากความเข้มสีที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน โดยพบว่าความเข้มของสีบนแผ่นเมมเบรนแปรผันตรงกับปริมาณเชื้อ ทั้งนี้สามารถตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียได้ความเข้มข้นต่ำสุด (Limit of detection; LOD) ที่ 2×10^{1} โคโลนีต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังประสบปัญหาการตรวจวัดเนื่องจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจวัดได้ยังมีค่าสูง ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดเชื้อในปริมาณที่ต่ำได้ (Anal. Chem., Vol 406, p 406-866, 2014)

25 นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเอาพอลิเมอร์มาตรึงบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน เพื่อช่วยทำให้อนุภาคมีความเสถียรมากขึ้น และสามารถกระจายตัวอยู่ในสารละลายได้ดียิ่งขึ้น มีงานวิจัยที่เปรียบเทียบสมบัติการกระจายตัว และความเสถียรของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึง และไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ โดยได้สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) หรือพอลิสไตรีน (polystyrene) ลงบนพื้นผิว เริ่ม

จากนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาทำปฏิกิริยากับโอโซน เพื่อเกิดหมู่เปอร์ออกไซด์ (peroxide group) บนพื้นผิว ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยา และใช้ 1-เฟนิลเอทิลไดไทโอเบนโซเอท (1-phenylethyl dithiobenzoate; PVB) ทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ (chain transfer agent) นำไปทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) ด้วยกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดหรือพอลิสไตรีน แล้วนำไปทดสอบสมบัติการกระจายตัวและความเสถียร พบว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวสามารถกระจายตัว และมีความเสถียรดีกว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิว (Macromolecules, Vol 27, p 1665-1669, 2006)

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุด้วยพอลิเมอร์คือ การเตรียมเป็นพอลิเมอร์บรัช (polymer brushes) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีปลายของโซ่ด้านหนึ่งยึดติดบนพื้นผิวด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้มีเสถียรภาพในการยึดติดบนพื้นผิวสูงกว่าการดูดซับทางกายภาพ (physical absorption) การเตรียมพอลิเมอร์บรัชนิยมเตรียมด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ทั้งนี้ความยาวของโซ่พอลิเมอร์สามารถควบคุมได้หากใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) เช่น atom transfer radical polymerization (ATRP) และ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) (Prog. Polym. Sci., Vol 25, p 677-710, 2000 และ Chem. Rev., Vol 109, p 5437-5527, 2009) โดยสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิเมอร์บรัชขึ้นกับชนิดของมอนอเมอร์ (monomer) ที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์

การประดิษฐ์นี้สนใจที่จะนำสารประกอบอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด และยึดติดโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินซึ่งสามารถจับกับเชื้อ ก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะ มาใช้ในการแยก และตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

โดยอนุภาคแม่เหล็กนาโนนอกจากจะทำหน้าที่ในการแยกเชื้อออกมาจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอกแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีของซับสเตรทเทตราเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB) และยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (urea-hydrogen peroxide; H_2O_2) ได้มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase; HRP) ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Woo และคณะ ที่นำเอาอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาใช้ในการหาปริมาณเชื้อไวรัสเอดส์ หรือเชื้อรีโทรไวรัส (retroviruses) และเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells) โดยนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ แล้วใส่ลงไปในสารละลายที่มีเชื้อรีโทรไวรัส หรือเซลล์มะเร็งเต้านม วิเคราะห์ปริมาณของเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็งเต้านมที่พบได้โดยพิจารณาการเปลี่ยนสีของซับสเตรทเทตราเมทิลเบนซิดีน และยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนในการทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา

การเปลี่ยนสี จากการศึกษาพบว่าสีของสารละลายที่ปรากฏมีความเสถียรมากกว่าสีของสารละลายที่เกิดจากการใช้ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดสเอนไซม์ในการขยายสัญญาณ และสามารถสังเกตเห็นผลได้ด้วยตาเปล่าเช่นกัน แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบงานวิจัยใดที่ทำการขยายสัญญาณบนแผ่นเมมเบรนจากปฏิกิริยาการเกิดสีของซับสเตรทเททราเมทิลเบนซิดีน และยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนบนแผ่นเมมเบรนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Int J Mol Sci., Vol 14, p 9999-10014, 2013)

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ประกอบรวมด้วย อนุภาคแม่เหล็กนาโน และโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคฟันผุอย่างจำเพาะ เตรียมโดยการนำโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ มายึดติดกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดผ่านพันธะเอไมด์ เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค จึงสามารถเลือกจับเฉพาะเชื้อนี้ ในขณะที่อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดที่ยึดติดกับโดเมนของเอนไซม์ข้างต้นก็จะทำหน้าที่แยกเชื้อที่ถูกจับอยู่กับโดเมนให้ออกมาจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก และยังสามารถวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อที่แยกออกมาได้ โดยทำการกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) ผ่านแผ่นเมมเบรนเพื่อแยกสารประกอบอนุภาคที่จับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ออกจากสารประกอบอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อ ซึ่งสามารถวิเคราะห์จำนวนเชื้อเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative analysis) ได้ โดยพิจารณาจากความเข้มสีของสารประกอบอนุภาคที่ค้างอยู่บนแผ่นเมมเบรน นอกจากนี้เมื่อเติมเททราเมทิลเบนซิดีน และยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนเมมเบรน สามารถขยายสัญญาณจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีโดยมีอนุภาคแม่เหล็กนาโนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดทั้งในแง่ของความไว (sensitivity) และขีดจำกัด (detection limit)

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยการทำงานของสารประกอบอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด และยึดติดกับโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคฟันผุอย่างจำเพาะ ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้สามารถทำได้ข้างเก้าอี้คนไข้ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความยุ่งยากซับซ้อน และประหยัดเวลา

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ประกอบรวมด้วย อนุภาคแม่เหล็กนาโน และโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคฟันผุอย่างจำเพาะ เตรียมโดยการนำโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่ม สเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดผ่านพันธะเอไมด์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุในกลุ่มสเตรปโตคอคไค

โดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค จึงสามารถเลือกจับเฉพาะเชื้อนี้ ในขณะที่อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด ก็จะสามารถแยกเชื้อที่จับกับสารประกอบอนุภาคนี้ออกมาจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก และยังสามารถวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อที่แยกออกมาได้

การแยกและตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคเบื้องต้นแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้

(1) นำเอาสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่บรรจุเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่มีความเข้มข้นของเชื้อตามต้องการ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20-50 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วแยกสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคนี้ ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) โดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอกเป็นเวลา 5-20 นาที ใช้หลอดดูดทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อใสทิ้ง แล้วนำสารประกอบอนุภาคที่แยกออกมาไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่พบ

(2) เตรียมสารประกอบอนุภาคที่แยกได้จาก (1) ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายนี้ เพื่อนำไปกรองแบบสุญญากาศผ่านแผ่นเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตตที่มีรูพรุนขนาดขนาด 0.8-1.0 ไมครอน โดยสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคได้จะมีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของแผ่นเมมเบรน ทำให้สารประกอบอนุภาคค้างอยู่บนแผ่นเมมเบรน ส่วนสารประกอบอนุภาคที่ไม่ได้จับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคจะมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเมมเบรนจึงผ่านรูพรุนไปได้ ในขั้นนี้สามารถแยกสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคออกมาวิเคราะห์เชื้อเชิงกึ่งปริมาณได้โดยพิจารณาจากความเข้มสีที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน

(3) การขยายสัญญาณการตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้โดยการหยดเททราเมทิลเบนซิดีน, ยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และบัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตตที่มีพีเอช 4-6 (sodium acetate; NaAc)

ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-60 วินาที แผ่นเมมเบรนจะเกิดการเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีฟ้า ทำให้เห็นสีได้ชัดเจนขึ้น

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

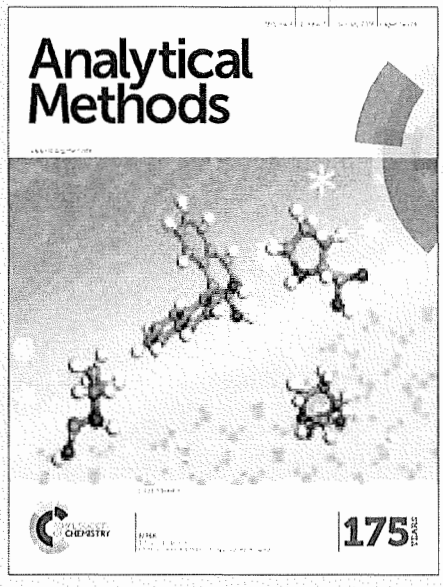
Check for updates

View Article Online
View Journal

Analytical Methods

Accepted Manuscript

This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: P. Thanyasrisung, A. Vittayaprasit, O. Matangkasombut, M. Sugai, P. Na Nongkai, S. Saipia and V. Hoven, *Anal. Methods*, 2018, DOI: 10.1039/C8AY00114F.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the author guidelines.

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard Terms & Conditions and the ethical guidelines, outlined in our author and reviewer resource centre, still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

rsc.li/methods

View Article Online
DOI: 10.1039/C8AY00114F

Journal Name
ARTICLE

Separation and Detection of Mutans Streptococci by Magnetic Nanoparticles Stabilized with Cell Wall Binding Domain-Conjugated Polymer

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Panida Thanyasrisung[a]*†, Aemvika Vittayaprasit[b]†, Oranart Matangkasombut[a,c], Motoyuki Sugai[d], Piyaporn Na Nongkai[e], Suttawan Saipia[b], Voravee P. Hoven[f,g]*

The number of salivary mutans streptococci (MS: *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*) is used in dental caries risk assessment. In this study, a simple, yet effective assay was developed for MS detection. Magnetic nanoparticles (MNPs) were first grafted with poly(acrylic acid) that bears active carboxyl groups available for conjugation with the cell-wall-binding-domain (CWBD) of automutanolysin which specifically binds to MS. The binding efficiency of CWBD-conjugated MNPs to MS was tested with pure cultures of streptococcal standard strains. After mixing CWBD-conjugated MNPs with culture, bacteria-bound particles were separated from unbound cells using a magnet and filtered through a cellulose acetate membrane (pore-size 0.8 μm). The color intensity of particles remaining on the membrane represents the number of bound bacteria. The CWBD-conjugated MNPs showed higher efficiency in binding to *S.mutans* and *S.sobrinus* than to non-mutans streptococci (*S.sanguinis* and *S.salivarius*) with capture efficiency of 77 and 69% for MS, and 38 and 15% for non-MS, respectively. Moreover, this method can quantify the number of MS in the range of 10^2–10^7 colony-forming units (CFU)/mL, which covers the range of MS levels used in caries risk assessment. The calculated limit of detection of the assay was 16 and 72 CFU/mL for *S. mutans* and *S. sobrinus*, respectively. Furthermore, the CWBD-conjugated MNPs could be used to efficiently quantify the number of MS in human saliva samples containing highly complex mixtures of bacterial species. These results suggest that the assay could be applicable as a simple tool for MS determination in not only clinical settings but also community fields without clinical expert requirement.

Introduction

Dental caries is one of the most prevalent infectious diseases in mankind. Although it is not life-threatening, it can cause pain and lead to severe infection. [1] Moreover, the disease impacts on quality of life, especially in children. [2, 3] While the direction of caries management has been gradually shifting from treatment by restoration to prevention in recent decades, the prevalence of dental caries remains high, especially in underprivileged populations worldwide. This situation is caused by the failure of treatments and ineffective prevention strategies. Caries risk assessment is a tool to help solve the problem since it gives information on individual risk of caries development and the dominant etiological factors in each patient. This information allows dentists to select an individualized treatment and prevention program for the patient. [2, 4]

The number of mutans streptococci (MS; *S mutans* and *S. Sobrinus*) in saliva is one of the factors determining the risk of caries development since there is much evidence showing association between the amount of MS and caries status. [5] The culture-based method is still widely used to determine the level of salivary MS, and is considered the gold standard. [6] However, the method requires laboratory skill, equipment, and also time for bacterial growth, so it is impractical in clinical settings and for community field studies. To overcome these limitations, a number of commercial chair-side kits have been developed. [7, 8] However, despite their ease of use and their equivalent efficiency to the conventional culture-based method, these kits still require an incubator and time to grow bacteria. Recently, a commercial *S mutans* rapid-detection kit

[a] *Department of Microbiology ond Research Unit on Oral Microbiology and Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road, Pathumwon, Bangkok 10330, Thailand.*
[b] *Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand.*
[c] *Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Vibhavadi Rangsit Road, Laksi, Bangkok 10210, Thailand.*
[d] *Department of Bacteriology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical ond Health Sciences, Hiroshima 734-8551, Japan.*
[e] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131, Thailand.*
[f] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand.*
[g] *Center of Excellence in Materials and Bio-interfaces, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*
†*These two authors contributed equally and are considered co first authors.*
†Electronic Supplementary Information (ESI) available: Characteristics of CWBD, XRD pattern of bare MNPs, FTIR spectra, average size, zeta potential and TGA data of MNPs both before and after stepwise chemical modification, Explanation on how to determine limit of detection and capture efficiency, Photographs of oral streptococci colonies before and after binding to CWBD-conjugated MNPs. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

based on antigen-antibody reaction has become available. Gao and colleagues reported that this kit could determine the number of *S. mutans* in saliva samples more accurately than the culture-based method. [9] Nevertheless, classification of caries risk is still based on the salivary MS levels obtained from the culture-based method. A level of MS $>10^5$ colony forming units (CFU)/mL is considered as high-risk for caries, whereas that below 10^4 CFU/mL is considered low-risk.[10, 11]

Here, to develop a specific detection system for MS, we exploit the binding specificity of the enzyme automutanolysin, a peptidoglycan hydrolase produced by *S. mutans*. The enzyme selectively digests MS.[12] The substrate specificity of automutanolysin towards MS is conferred by the cell wall binding domain (CWBD) of the enzyme (unpublished observation). Thus, the CWBD could be a good probe for MS detection.

Magnetic separation in combination with size-selective membrane filtration was recently introduced as a rapid, versatile, simple, low-cost and effective method for bacterial separation/detection.[13, 14] Magnetic nanoparticles (MNPs) usually appear in a magnetite form (Fe_3O_4) which responds to a magnetic field.[15] Moreover, their small sizes (5 to 500 nm diameter) result in a large surface to volume ratio available for conjugation of probes (mostly antibodies) specific for bacteria, which enhances the bacterial capture efficiency.[16-19] Based on these properties of MNPs and the binding specificity of the probe, target bacteria can be isolated from contaminants using an external magnet.[13, 20, 21] After magnetic separation, the targeted bacterial suspension is filtered through a membrane with a specific pore size. If the MNPs conjugated with the probe capture target bacteria, their size increases, so they are retained on the membrane.[14, 22] Since MNPs are brown, the bacteria-bound MNPs remaining on the membrane can easily be detected by the naked eye.

A number of polymers such as dextran,[23] polystyrene (PS),[24, 25] and poly(acrylic acid) (PAA)[26, 27] have been coated onto MNPs to increase their stability and dispersibility. The polymeric stabilizer can increase the affinity of MNPs for a specific solvent and inhibit particle aggregation.[28-31] Polymer-grafted MNP nanocomposites form very stable dispersions in organic solutions.[32-34] Among the most effective methods for preparing polymer-coated MNPs is surface functionalization by grafting of polymer, particularly via the "grafting from" approach or surface-initiated polymerization. This strategy involves the formation of a covalently bound polymeric layer growing from a surface-attached initiator. This method provides high grafting density with controlled polymer molecular weight so as the thickness of coated polymer layer if controlled polymerization process (i.e. atom transfer radical polymerization (ATRP), reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization) is employed.[32, 35-37]

Based on these previous studies, this research aimed to develop CWBD-conjugated MNPs as a simple tool for MS detection based on magnetic separation and size-selective membrane filtration. MNPs were grafted with PAA via surface-initiated RAFT polymerization to yield PAA-grafted MNPs. CWBD was then conjugated to the carboxyl groups of PAA via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) coupling chemistry. The CWBD-conjugated MNPs specifically bound to the target bacteria and then an external magnetic field was applied to separate and concentrate the MNPs-bound captured bacteria from contaminants. The bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs were subsequently filtered through a cellulose acetate membrane. With appropriate pore size of the membrane, the bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs remained on the membrane and could be detected by the naked eye.

Experimental

Materials

Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$) was purchased from Merck (Germany). MNPs were prepared via a solvothermal method following a published procedure.[38] 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), 4,4-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA), 4-cyano-4-(phenylcarbonothio) pentanoic acid, 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dimethylformamide (DMF), EDC, NHS, acrylic acid (AA), sodium acetate, and ethylene glycol were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), and cellulose acetate membrane (CA membrane with a 0.2, 0.45, 0.8 and 1.2-μm pore sizes were purchased from Merck Millipore (USA). All culture media except Mitis Salivarius Bacitracin (MSB) agar were purchased from HiMedia (India). Mitis salivarius agar and bacitracin were bought from Becton, Dickinson and Company (USA) and Sigma-Aldrich respectively. Materials for protein expression and purification, isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), HIS-Select® Nickel Affinity Gel, imidazole, dialysis bags (MWCO 10 kDa) and Bradford Protein Assay reagent were bought from Calbiochem (India), Sigma-Aldrich, Affymetrix (USA), Thermo Scientific (USA) and Bio-Rad (USA), respectively. All reagents and materials were analytical grade and used without further purification. Ultrapure distilled water was obtained using a Millipore Milli-Q system (USA).

Characterization of MNPs

The crystal structure of MNPs was characterized by X-ray diffraction (XRD). The XRD pattern was obtained using a Rigaku RINT-2000 diffractometer (Japan) using CuKα radiation (λ = 1.5418 Å). Infrared spectra of surface-modified MNPs prepared as KBr disks were obtained from a Fourier Transform-Infrared (FTIR) spectrometer (Nicolet, USA), model Impact 410, with 32 scans at resolution 4 cm^{-1}, in the frequency range 400-4000 cm^{-1}, using a TGS detector. The morphology of MNPs before and after modification was examined by transmission electron microscopy (TEM) using a Philips Tecnai 12, FM 208 instrument (USA) at 100 kV acceleration. Negative staining was performed by dropping 1% (w/v) aqueous solution of phosphotungstic acid on the MNPs deposited on the carbon-coated copper grid. The excess solution was blot-dried by filter paper. The sample was then air-dried in the dark overnight before subjected to TEM analysis. Thermogravimetric analysis (TGA) was

This journal is © The Royal Society of Chemistry 20xx

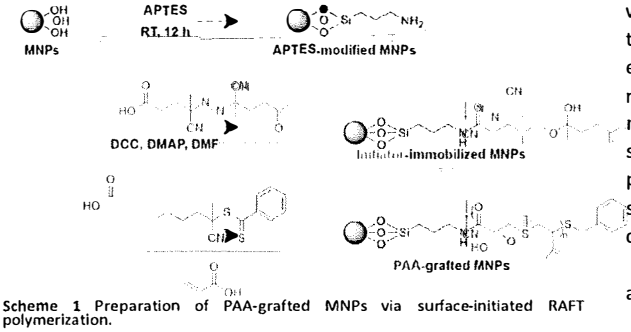
performed on a SDTA 8S1 (Mettler-Toledo, USA) in the range of 32–900 °C at a heating rate of 20 °C/min under nitrogen. The size and zeta potential of the MNPs were measured by dynamic light scattering using a Malvern Nano ZS90 instrument (UK) at room temperature at a scattering angle of 90°.

Preparation of CWBD of automutanolysin

Escherichia coli BL-21 carrying a recombinant CWBD-expressing plasmid were grown in Luria-Bertani broth at 37 °C until an $OD_{600\ nm}$ of 0.4–0.6 was reached. The expression of 6×His-tagged CWBD protein was induced by addition of 1 mM IPTG and incubation of cells at 1S °C for 24 h. The proteins were then purified using HIS-Select® Nickel Affinity Gel in native conditions. The active fractions were pooled and dialyzed against 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8. The protein concentration was measured by the Bradford protein assay. Sequence of CWBD together with schematic plasmid map including CWBD and the expressed CWBD protein on SDS-PAGE (Fig.S1) are shown in ESI†.

Preparation of PAA-grafted MNPs

PAA was grafted onto the surface of MNPs via a "grafting from" method. MNPs were first immobilized with APTES. Briefly, 0.1 g of MNPs was dispersed ultrasonically in 100 mL of 9:1 (v/v) ethanol-water mixture with 1 mL of added ammonia solution (38%) for 30 min. To the above dispersed solution, 1 mL of APTES was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. Thereafter, the APTES-modified MNPs obtained were magnetically concentrated, washed thoroughly with ethanol, and vacuum dried. The APTES-modified MNPs were immersed in 20 mL DMF containing ACVA (37.5 mmol), DCC (47.0 mmol) and DMAP (3.74 mmol) at room temperature for 20 h under a nitrogen atmosphere. After the reaction was complete, the product was rinsed thoroughly with DMF and ethanol four times each. The obtained initiator-immobilized MNPs were then placed in a vial containing ACVA (0.5 mmol), CTA (5 mmol), and AA (0.8 mol) in 10 mL of Milli-Q water. The vial was then placed in a preheated oil bath at 70 °C for 20 h under a nitrogen atmosphere. The resulting PAA-grafted MNPs were removed from the vial and washed with ethanol and Milli-Q water, respectively. The synthetic scheme for the preparation of PAA-grafted MNPs via surface-initiated RAFT polymerization is shown in **Scheme 1**.



Scheme 1 Preparation of PAA-grafted MNPs via surface-initiated RAFT polymerization.

Immobilization of CWBD on PAA-grafted MNPs

PAA grafted MNPs were conjugated with the CWBD of automutanolysin via the EDC/NHS coupling method, as follows. PAA-grafted MNPs (5 mg) were dispersed in 1 mL 0.01 M PBS, pH 7.4. To this, 0.1 mL of EDC (2 M) and 0.1 mL of NHS (0.5 M) were added, and then the mixture was incubated for 30 min at room temperature at 240 rpm on a rotary shaker. CWBD (0.1 mL, 1 mg/mL) was added to the mixture and it was incubated for 24 h at 4°C. Finally, the CWBD-conjugated MNPs were isolated using a magnet and rinsed with 0.01 M PBS, pH 7.4 and Milli-Q water, respectively. The product was stored at 4 °C until use.

Bacterial preparation

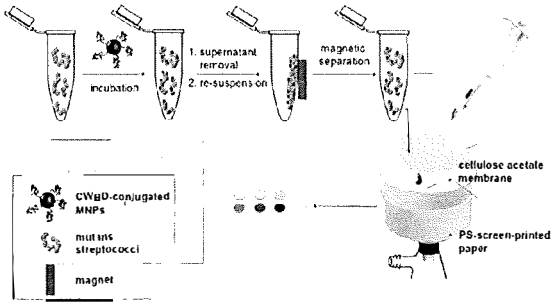
S. mutans UA159, *S. sobrinus* OMZ176, *S. sanguinis* ATCC10556 and *S. salivarius* DMST18781 were cultured in brain heart infusion broth at 37 °C in a 5 %CO_2 atmosphere with shaking at 180 rpm for 24 h. The optical density of 24-h culture was measured at 600 nm (OD_{600nm}). The cultures were then diluted to OD_{600nm} = 0.1 and incubated for 2.5 h to obtain an OD_{600nm} of 0.5 (~10^{10} CFU/mL). After that, the bacterial cultures were 10-fold serially diluted from 10^7 to 10^2 CFU/mL with 0.01 M PBS, pH 7.4. Colony counting was performed to verify the number of bacteria.

Determination of bacteria captured by CWBD-conjugated MNPs

The efficiency of CWBD-conjugated MNPs in capturing *S. mutans* UA159, *S. sobrinus* OMZ176, *S. sanguinis* ATCC10556, and *S. salivarius* DMST18781 was determined. Briefly, 0.1 mL bacterial suspensions in the range 10^2 to 10^7 CFU/mL were transferred to a 1.5-mL tube containing 0.2 mL of CWBD-conjugated MNP suspension (0.15 mg/mL in 0.01 M PBS, pH 7.4) and then incubated for 30 min at 4 °C. After incubation, the tube was placed on a magnet for 10 min to isolate and concentrate the bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs. The supernatant was removed and bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs were resuspended in 0.1 mL of 0.01 M PBS, pH 7.4. A piece of filter paper (Whatman #1, i.d .125 mm) was screen-printed with PS in a pattern that leaves circular areas of 5 mm diameter uncovered with PS, using a previously published method.[39] For selective filtration, a CA membrane with selected pore size (0.2, 0.45, 0.8, or 1.2 μm) was placed on top of the PS-screen-printed paper in a Büchner funnel equipped with an Erlenmeyer flask and an aspirator. The membrane was wetted with 0.01 M PBS, pH 7.4. Fifty microliters of the bacteria-bound CWBD-conjugated MNP suspension was then pipetted onto the membrane in a position that exactly matched the circular area of the PS-screen-printed paper underneath under vacuum. The overall concept for bacterial detection is illustrated in **Scheme 2**.

The color intensity on the membrane, which reflected the amount of bacteria in the sample, was quantified and averaged

ARTICLE DOI 10.1039/C8AY00124F Journal Name



Scheme 2 Schematic representation of the stepwise procedure for colorimetric detection of mutans streptococci by CWBD-conjugated MNPs based on magnetic separation and selective filtration.

from three independent samples using scanned images recorded on an Epson Perfection V33 scanner in 24 bit Professional Mode. The brightness/contrast/resolution was set to 128/128/300. The images were saved as TIFF files. The intensity of each spot was determined using Scion image software by first converting to grayscale at 300 dpi. Intensity measurements were carried out using the Line tool to select an area for analysis to obtain profile images. The amount of bacteria was determined from a standard curve generated from the intensity as a function of known bacterial concentration.

Study population and saliva collection

The study protocol was approved by the Ethics Committee at the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University (HREC-DCU-P 2016-013). Sixteen healthy adult volunteers were recruited from among dental students at the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and workers at a private company. Saliva samples were collected following the procedures of Wennerholm and Emilson with some modifications.[40] Briefly, all volunteers were informed not to brush their teeth and to refrain from having breakfast before collection of the saliva. Stimulated saliva was collected while chewing a piece of paraffin film for 10 min .The collected saliva was immediately placed on ice, delivered to the laboratory directly, kept at 4 °C, and used the same day.

Determination of the number of salivary mutans streptococci

Conventional culture-based method. Saliva was tenfold serially diluted with sterile 0.01 M PBS, pH 7.4, and then 100 µL of each dilution was spread onto a MSB agar plate. The MSB plates were incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 24–48 h. After incubation, the number of mutans streptococci was determined under a stereomicroscope.

CWBD-conjugated MNP assay. To determine the number of bacteria in saliva using CWBD-conjugated MNPs, 800 µL of stimulated saliva was treated by adding 200 µL of 1 M citric acid and 50 µL of 0.1 M sodium hydroxide[9] and then boiled for 20 min to denature proteins in the saliva. After that, 100 µL of treated saliva was mixed with 200 µL CWBD-conjugated MNP suspension (0.15 mg/mL in 0.01 M PBS, pH 7.4) and sterile 0.01 M PBS, pH 7.4, was added to make 1 mL total volume in a 1.5-mL test tube. The mixture was then incubated at 4°C for 30 min. Magnetic separation and selective filtration of the bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs were performed by the same procedure as described earlier.

Results and discussion

Preparation and characterization of PAA-grafted MNPs and CWBD-conjugated MNPs

MNPs were synthesized by a solvothermal method .As displayed in **Fig .S2** (ESI†), an XRD pattern of the MNPs showed diffraction peaks at 2θ = 30.12, 35.48, 43.12, 57.02 and 62.62°, which can be assigned to (311), (440), (220), (511), and (400) planes of Fe_3O_4, respectively. This characteristic coincides with that of standard magnetite (JCPDS card no. 19-0629). No other diffraction peaks corresponding to other iron oxides, such as α-Fe_2O_3 and γ-Fe_2O_3, could be detected, suggesting that the MNPs obtained are in the form of pure Fe_3O_4.

PAA-grafted MNPs were prepared by surface-initiated RAFT polymerization. The success of stepwise surface modification of MNPs was confirmed by FTIR as shown in **Fig. S3** (ESI†). A characteristic Fe–O vibration of the unmodified MNPs **(Fig. S3a)** was observed at 584 cm^{-1}. The spectrum of PAA-grafted MNPs **(Fig. S3b)** shows a band at 1740 cm^{-1}, which is assignable to C=O stretching of carboxyl groups of PAA. This signal disappeared upon CWBD conjugation **(Fig. S3c)**, indicating that an amide linkage was formed between carboxyl group of PAA and amino group of the enzyme.

Fig .1 illustrates the morphology of the MNPs before and after modification as examined by TEM. The unmodified MNPs **(Fig. 1a)** were spherical with an average diameter of 328.2 ± 22.7 nm. The average diameter of the MNPs increased upon surface modification, to 357.4 ± 19.2 and 745.5 ± 29.9 nm for PAA-grafted MNPs **(Fig. 1b)** and CWBD-conjugated MNPs **(Fig. 1c)**, respectively. A higher degree of aggregation was also realized in the case of CWBD-conjugated MNPs. This may be ascribable to the conjugation with relatively large molecule of CWBD (MW ≈80 kDa). Negative-stained TEM images of both PAA-grafted MNPs and CWBD-conjugated MNPs demonstrating the organic shell layer of grafted PAA and conjugated CWBD, respectively are shown in **Fig.1e-f**.

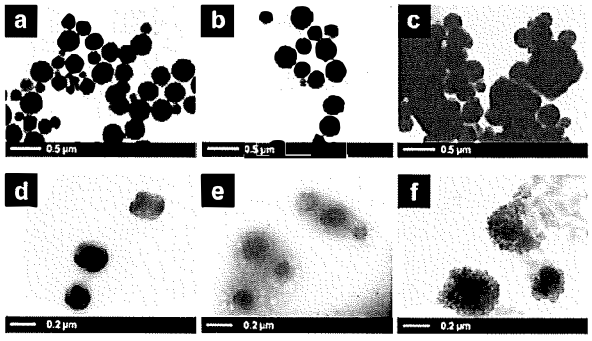


Fig. 1 Transmission electron micrographs of bare MNPs (a,d), PAA-grafted MNPs (b,e), and CWBD-conjugated MNPs (c,f) before (a-c) and after (d-f) negative staining (scale bars 0.5 µm (top) and 0.2 µm (bottom)).

This journal is © The Royal Society of Chemistry 20xx

View Article Online
DOI: 10.1039/C8AY00114F

Published on 19 June 2018. Downloaded by CHULALONGKORN UNIVERSITY on 6/27/2018 8:52:23 AM.

The particle size and zeta potential of the MNPs were also evaluated by DLS (**Table S1** (ESI†). In good agreement with the TEM data, the average size of the MNPs increased after PAA grafting and again after CWBD conjugation. The pK_a of PAA is about 4.5 [41] and the isoelectric point of CWBD determined by calculation is approximately 5.17, which should result in both PAA and CWBD being negatively charged in PBS solution at pH 7.4. For this reason, the PAA-grafted MNPs exhibited a negative zeta potential (-31.43 mV), verifying the presence of ionizable carboxyl groups of PAA surrounding the MNPs .After CWBD conjugation, the zeta potential of the MNPs became less negative (-14.40 mV), which was due to CWBD being less negatively charged than PAA. This set of data also indicated the successful immobilization of CWBD on the PAA-grafted MNPs.

The presence of organic components of PAA and CWBD on the PAA-grafted MNPs and CWBD-conjugated MNPs, respectively, was further confirmed by TGA analysis. As shown in **Fig. S4** (ESI†), the first weight loss of all MNPs took place below 200°C, which should originate from evaporation of water. CWBD-conjugated MNPs showed the highest weight loss (about 3.44%), implying that they contained the greatest bound water content. The second weight loss, occurring in the temperature range 300-600 °C, could be ascribed to the decomposition of organic content bonded to MNPs. The greater weight loss of 9.1 and 9.8% from PAA-grafted MNPs and CWBD-conjugated MNPs respectively, compared with 5.5% from MNPs, confirmed the presence of PAA and CWBD on the modified MNP forms. The third weight loss, appearing at the highest temperatures (>730 °C) in both PAA-grafted MNPs and CWBD-conjugated MNPs, is assigned as char of macromolecular organic content (PAA and CWBD) on the MNPs, because such weight loss was absent from the unmodified MNPs curve. As determined by Bicinchoninic acid protein assay, the quantity of immobilized CWBD was found to be 6.66 mg/g of PAA-grafted MNPs. The calculated immobilization efficiency was 32.8%.

Selection of filter membrane suitable for selective filtration assay

To determine an appropriate pore size of the filter membrane that would selectively retain bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs, CA membranes with pore sizes in the range 0.2–1.2 µm were tested. The CWBD-conjugated MNPs would become larger in size once bound with bacteria and therefore retain on the membrane upon filtration if their size is larger than the pore diameter of the membrane. Since MNPs are brown, the bacteria-bound MNPs would appear as brown spot on the membrane. The higher bacterial concentration leads to higher level of MNPs aggregation and thus yielded the brown spot with greater intensity. As **Fig . 2** shows, even the unmodified MNPs (the smallest particles) could not go through the 0.2-µm pore-size filter membrane. This outcome corresponded to the results of TEM and DLS analyses, which indicated that the approximate diameter of the unmodified MNPs was 0.32 µm. When membranes with pore-size 0.45 µm were used, they could not separate bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs from the unbound, CWBD-conjugated MNPs. This finding was consistent with TEM and DLS analyses showing the diameter of CWBD-conjugated MNPs was approximately 0.75 ± 0.03 and 0.63 ± 0.02 µm, respectively. The 0.8-µm pore-size filter membrane worked effectively; a difference in brown color intensity was apparent between bacteria-bound and unbound CWBD-conjugated MNPs. Moreover, higher color intensity of retained CWBD-conjugated MNPs when bound to *S .Mutan* (MS bacteria) implied greater binding efficiency of the CWBD toward *S. mutans* compared with *S. salivarius* (non-MS bacteria). All tested particles could pass through the 1.2-µm pore-size filter membrane. Based on these findings, the 0.8-µm pore-size filter membrane was selected for further investigation.

Pore size	MNPs	PAA-grafted MNPs	CWBD-conjugated MNPs	*S.Salivarius* CWBD-conjugated MNPs	*S.Mutans* CWBD-conjugac MNPs
0.2µm					
Intensity (a.u.)	132.88	128.73	131.70	119.83	129.92
0.45µm					
Intensity (a.u.)	21.70	81.12	118.60	118.16	120.18
0.8µm					
Intensity (a.u.)	21.70	30.15	40.13	80.54	141.65
1.2µm					
Intensity (a.u.)	10.23	12.74	16.14	23.18	31.84

Fig. 2 Color signal and corresponding intensity (arbitrary unit) of the brown spot on the CA membrane with various pore sizes after filtering MNPs, PAA-grafted MNPs and CWBD-conjugated MNPs both before and after bacterial capture.

Determination of bacterial binding efficiency of CWBD-conjugated MNPs

Bacterial binding efficiency of the CWBD-conjugated MNPs was determined with *S. mutans* and *S. sobrinus* (MS bacteria) in the range 10^2–10^7 CFU/mL. **Fig. 3** shows the intensity of the brown spots produced by bacteria-bound CWBD-conjugated MNPs on 0.8-µm pore-size filter membranes. The intensity was converted to numeric values to generate a standard curve. The intensity of the colored spots increased linearly as a function of log (CFU/mL) for both bacteria **(Fig. 3a and 3b)**. The limit of detection (LOD) is the lowest detectable bacterial concentration, which is calculated following **Eq. S3** (ESI†). The background intensity (0 CFU/mL) was 23.82 ± 5.13, which resulted in LOD values of 16 and 72 CFU/mL for *S. mutans* and *S. sobrinus*, respectively.

Determination of bacteria capturing efficiency of CWBD-

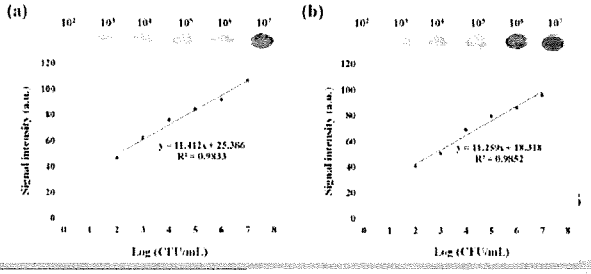


Fig. 3 Linear relationship between log (CFU/mL) and signal intensity (a.u.) for (a) *S.mutans* and (b) *S.sobrinus*.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 20xx

View Article Online
DOI: 10.1039/C8AY00114F

Published on 19 June 2018. Downloaded by CHULALONGKORN UNIVERSITY on 6/27/2018 8:52:23 AM.

conjugated MNPs for various streptococcal species

Capture efficiency of MS bacteria (*S. mutans* and *S. Sobrinus*) and non-MS bacteria (*S. sanguinis* and *S. salivarius*) by the CWBD-conjugated MNPs was determined. First, a colony counting assay was performed before (C_{before}) and after (C_{after}) binding of bacteria to the CWBD-conjugated MNPs .As shown in **Fig. S5** (ESI†), the number of *S. mutans* and *S. sobrinus* before binding to the CWBD-conjugated MNPs was approximately 10^5 CFU/mL, whereas after binding the numbers decreased to 133 and 147 CFU/mL, respectively. In contrast, the numbers of *S. sanguinis* and *S. salivarius* after binding to the CWBD-conjugated MNPs were only slightly decreased from the values before binding. The capture efficiency (CE) was calculated following **eq .S4** (ESI†) .The capture efficiency of the CWBD-conjugated MNPs for *S. mutans* and *S. sobrinus* was 77 and 69%, respectively, whereas that for *S. sanguinis* and *S. salivarius* was 38 and 15%, respectively. These values indicated the specificity of the CWBD-conjugated MNPs for MS bacteria (*S. mutans* and *S. sobrinus*), rather than non-MS bacteria (*S. sanguinis* and *S. salivarius*). This specificity towards MS bacteria was further confirmed by the selective filtration assay. .As shown in **Fig. 4**, the signal intensities obtained from the interaction with non-MS species (*S. sanguinis* and *S. salivarius*) were much lower than those detected with the MS species (*S. mutans* and *S. sobrinus).*

Comparative investigation of bacterial detection by the magnetic separation/selective filtration method using CWBD-conjugated MNPs and the culture method in saliva samples

To develop the CWBD-conjugated MNPs for clinical application, we demonstrated that CWBD-conjugated MNPs can detect MS in human saliva, which contains a complex mixture of many bacterial species. Saliva samples were collected and then incubated with CWBD-conjugated MNPs. The number of MS was determined by comparing the detection intensity to the standard curve for *S. mutans.* Culture-based determination method was performed in parallel by inoculating the same saliva samples on MSB agar to determine the number of MS. As **Table 1** shows, the number of MS determined by the CWBD-conjugated MNPs method was similar to that obtained by the culture-based method. This similarity is important and useful, since the level of caries risk is classified based on the saliva MS

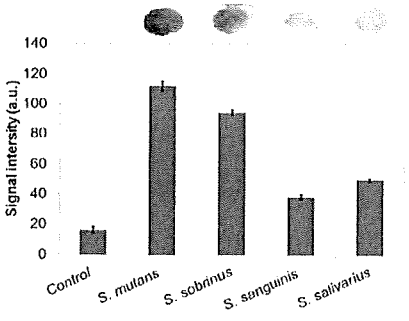


Fig. 4 Determination of binding specificity of the CWBD-conjugated MNPs to MS (*S. mutans* and *S .sobrinus*) and non-MS (*S .sanguinis* and *S .salivarius*) species.

Table 1 Number of mutans streptococci determined by the magnetic separation/selective filtration method using CWBD-conjugated MNPs in comparison with the culture-based method.

	Number of colonies (CFU/mL)	
Saliva sample	Magnetic separation/selective filtration method	Culture-based method
1	$7.2x10^4$	$3.7x10^4$
2	$1.3x10^4$	$1.6x10^4$
3	$4.8x10^2$	$5.2x10^3$
4	N/A	$< 10^2$
5	$5.7x10^2$	$< 10^2$
6	N/A	$< 10^2$
7	N/A	$< 10^2$
8	N/A	$< 10^2$
9	$1.5x10^4$	$3.3x10^3$
10	$3.6x10^2$	$2.9x10^2$
11	$7.4x10^3$	$1.3x10^3$
12	N/A	$< 10^2$
13	N/A	$< 10^2$
14	N/A	$< 10^2$
15	N/A	$< 10^2$
16	N/A	$< 10^2$

N/A = out of range of the standard curve (10^2–10^7 CFU/mL).

level obtained from the culture-based method. Together, our results indicated that the CWBD-conjugated MNPs have potential to be a simple colorimetric method to quantify the number of salivary mutans streptococci.

Conclusions

The present study demonstrated that PAA-grafted MNPs could be prepared by surface-initiated RAFT polymerization. They were successfully conjugated to the CWBD of automutanolysin by EDC/NHS coupling chemistry. The properties of CWBD-conjugated MNPs were characterized by XRD, FTIR, TEM, TGA and DLS. By combining bacterial binding to CWBD-conjugated MNPs with magnetic separation and selective filtration, we developed a colorimetric assay for quantitative MS detection in both pure cultures and human saliva samples. Most importantly, the assay could differentiate levels of salivary MS relevant for dental caries risk assessment. Without requiring for bacteria culturing or clinical experts, this effective assay is a promising tool for MS detection that can be easily implemented in not only clinical settings but also community fields. The simplicity of the assay would make dental caries risk assessment more accessible and efficient. The success of this work also suggests that the magnetic-based immunoassay may be applicable for detection of other bacteria in saliva, another biologically relevant matrix that has not been much explored.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 20xx

Please do not adjust margins
View Article Online
DOI: 10.1039/C8AY00114F

Published on 19 June 2018. Downloaded by CHULALONGKORN UNIVERSITY on 6/27/2018 8:52:23 AM.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Thailand Research Fund (RSA5980071 and DBG5580003 granted to VPH and TRG5780043 granted to PT) and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (to R.U., on Oral Microbiology and Immunology).

References

1. Z. Ling and H. Tao, in *Dental Caries: Principles and Management*, ed. Z. Xuedong, Springer, Heidelberg, Berlin, 2016, pp. 129-155.
2. M. Bönecker, J. Abanto, G. Tello and L. B. Oliveira, *Braz. Oral. Res.*, 2012, **26**, 103-107.
3. A. Sheiham, *Br. Dent. J.*, 2006, **201**, 625-626.
4. M. Hurlbutt and D. A. Young, *J. Evid. Based Dent. Pract.*, 2012, **14**, 77-86.
5. G. Conrads, J. J. de Soet, L. Song, K. Henne, H. Sztajer, I. Wagner-Döbler and A.-P. Zeng, *J. Oral. Microbiol.*, 2014, **6**, 26189.
6. M. Hurlbutt, *Journal*, 2011, **31**, 95-109.
7. H. V. Jordan, R. Laraway, R. Snirch and M. Marmel, *J. Dent. Res.*, 1987, **66**, 57-61.
8. B. Jensen and D. Bratthall, *J. Dent. Res.*, 1989, **68**, 468-471.
9. X.-L. Gao, C. J. Seneviratne, E. C. M. Lo, C. H. Chu and L. P. Samaranayake, *Int. J. Paediatr. Dent.*, 2012, **22**, 363-368.
10. B. Krasse, *Int. Dent. J.*, 1988, **38**, 219-225.
11. B. Krasse and S. Fure, *Periodontol. 2000*, 1994, **4**, 139-147.
12. G. Yoshimura, H. Komatsuzawa, I. Hayashi, T. Fujiwara, S. Yamada, Y. Nakano, Y. Tomita, K. Kozai and M. Sugai, *Microbiol. Immun.*, 2006, **50**, 729-742.
13. D. J. Wright, P. A. Chapman and C. A. Siddons, *Epidemiol. Infect.*, 1994, **113**, 31-39.
14. W. B. Shim, J. E. Song, H. Mun, D. H. Chung and M. G. Kim, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 859-866.
15. H. Gu, K. Xu, C. Xu and B. Xu, *Chem. Commun.*, 2006, 941-949.
16. Z. Mei, A. Dhanale, A. Gangaharan, D. K. Sardar and L. Tang, *Talanta*, 2016, **151**, 23-29.
17. J. Gao, H. Gu and B. Xu, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 1097-1107.
18. Y. Cheng, Y. Liu, J. Huang, K. Li, W. Zhang, Y. Xian and L. Jin, *Talanta*, 2009, **77**, 1332-1336.
19. H. Tumturk, F. Sahin and E. Turan, *Analyst*, 2014, **139**, 1093-1100.
20. K. S. Cudjoe, T. Hagtvedt and R. Dainty, *Int. J. Food. Microbiol.*, 1995, **27**, 11-25.
21. Y. Mine, *J. Agric. Food. Chem.*, 1997, **45**, 3723-3727.
22. Y. J. Sung, H. J. Suk, H. Y. Sung, T. Li, H. Poo and M. G. Kim, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **43**, 432-439.
23. M. Khalkhali, S. Sadighian, K. Rostamizadeh, F. Khoeini, M. Naghibi, N. Bayat, M. Habibizadeh and M. Hamidi, *Bioimpacts*, 2015, **5**, 141-150.
24. W.-C. Wang, K.-G. Neoh and E.-T. Kang, *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, **27**, 1665-1669.
25. M. Ramasamy, Y. Zhu, U. Paik and D. K. Yi, *Mater. Lett.*, 2014, **137**, 479-482.
26. M. Rutnakornpituk, N. Puangsin, P. Theamdee, B. Rutnakornpituk and U. Wichai, *Polymer*, 2011, **52**, 987-995.
27. P. Padwal, R. Bandyopadhyaya and S. Mehra, *Langmuir*, 2014, **30**, 15266-15276.
28. H. Li, K. Yan, Y. Shang, L. Shrestha, R. Liao, F. Liu, P. Li, H. Xu, Z. Xu and P. K. Chu, *Acta. Biomater.*, 2015, **15**, 117-126.
29. E. Kadar, I. L. Batalha, A. Fisher and A. C. Roque, *Sci. Total Environ.*, 2014, **487**, 771-777.
30. G. Chen, Z. Wu and Y. Ma, *J. Biotechnol.*, 2015, **196-197**, 52-57.
31. H. Eskandari and A. Naderi-Darehshori, *Anal. Chim. Acta.*, 2012, **743**, 137-144.
32. S. Qin, L. Wang, X. Zhang and G. Su, *Appl. Surf. Sci.*, 2010, **257**, 731-735.
33. M. Khoobi, T. M. Delshad, M. Vosooghi, M. Alipour, H. Hamadi, E. Alipour, M. P. Hamedani, S. E. Sadat ebrahimi, Z. Safaei, A. Foroumadi and A. Shafiee, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2015, **375**, 217-226.
34. A. Akbarzadeh, N. Zarghami, H. Mikaeili, D. Asgari, A. M. Goganian, H. K. Khiabani, M. Samiei and S. Davaran, *Nanotechnol. Sci. Appl.*, 2012, **5**, 13-25.
35. R. Falatach, C. McGlone, M. S. Al-Abdul-Wahid, S. Averick, R. C. Page, J. A. Berberich and D. Konkolewicz, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 5343-5346.
36. X. Fan, L. Lin and P. B. Messersmith, *Compos. Sci. Technol.*, 2006, **66**, 1198-1204.
37. B. Mu, T. Wang, Z. Wu, H. Shi, D. Xue and P. Liu, *Colloids. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 2011, **375**, 163-168.
38. Q. Yang, Z. Dai, K. Yang and Y. Li, London, UK, 2015.
39. Y. Sameenoi, P. N. Nongkai, S. Nouanthavong, C. S. Henry and D. Nacapricha, *Analyst*, 2014, **139**, 6580-6588.
40. K. Wennerholm and C.-G. Emilson, *Eur. J. Oral Sci.*, 2013, **121**, 389-393.
41. R. Dong, M. Lindau and C. K. Ober, *Langmuir*, 2009, **25**, 4774-4779.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 20xx

Please do not adjust margins

View Article Online
DOI: 10.1039/C8AY00114F

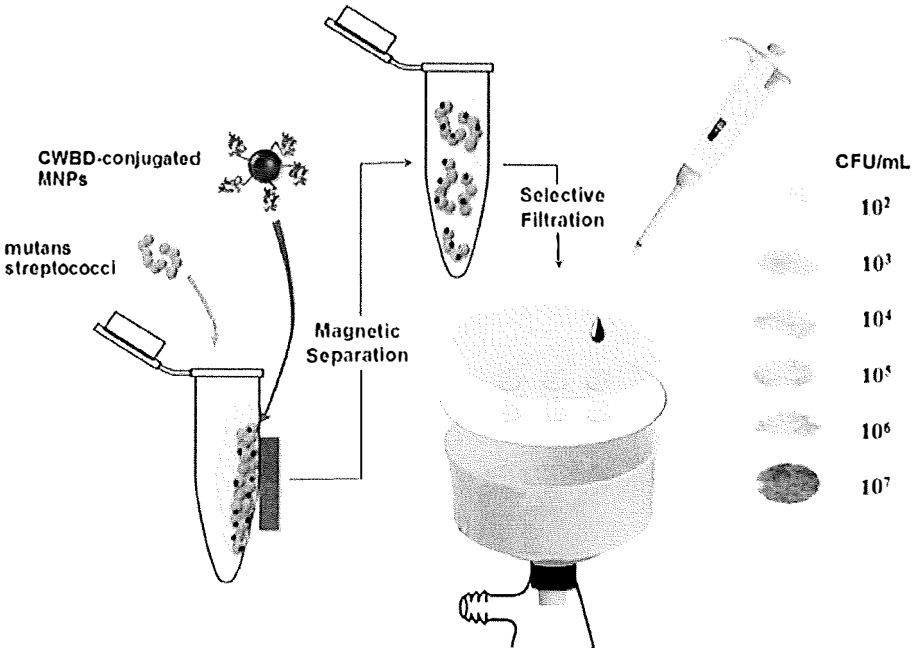
Published on 19 June 2018. Downloaded by CHULALONGKORN UNIVERSITY on 6/27/2018 8:52:23 AM.

Highlight statement to be included with GA (no more than 20 words)

Colorimetric assay based on magnetic separation/selective filtration can differentiate salivary mutans streptococci levels relevant for dental caries risk assessment.

View Article Online
DOI: 10.1039/C8AY00114F

Published on 19 June 2018. Downloaded by CHULALONGKORN UNIVERSITY on 6/27/2018 8:52:23 AM.



42x29mm (300 x 300 DPI)