บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือที่ปัจจุบันนี้นิยมใช้ในการการวิเคราะห์ /ตรวจวัดซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปคือ ความรวดเร็วและความง่ายในการตรวจวัดนั้น นอกจากนี้ยังมีความแม่นยำและจำเพาะเจาะจงสูงกับสารที่ต้องการวัด (specificity) ด้วยความสามารถที่ใช้วิเคราะห์สารได้ในทุกๆสภาวะที่ต้องการ (selectivity) แม้ว่าจะมีสารปนเปื้อนอื่นๆอยู่ก็ตาม ประกอบกันการที่เครื่องมือวัดประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้นาน และใช้ซ้ำๆได้ (stability) จึงยิ่งเป็นข้อได้เปรียบที่ทำให้มีการวิจัยและพัฒนาการนำเอาหลักการทางไบโอเซนเซอร์มาใช้กันมากขึ้นในทุกๆด้าน ไม่ว่าจะเป็นอาหาร, ยา, การแพทย์, อุตสาหกรรม, สิ่งแวดล้อม รวมทั้งด้านความปลอดภัยต่างๆโดยเฉพาะทางการทหาร เป็นต้น (Luo, et al. 2004)

ลักษณะเด่นที่สำคัญอีกอย่างของเครื่องมือวิเคราะห์ / ตรวจวัดนี้คือ ความไวสูงที่มีต่อสารตรวจวัดสารต่างๆ (sensitivity) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการวิจัยและผลิตเครื่องมือตรวจวัดที่ใช้ทดแทนการตรวจวัดสารจำพวก DNA หรือ Protein กันมากขึ้น เนื่องจากวิธีเดิมที่ใช้ในการตรวจวัดสารจำพวกนี้นั้นในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป ได้แก่ PCR สำหรับ DNA หรือ ELISA สำหรับ protein นั้นมีข้อเสียเปรียบต่างๆ เช่น ขั้นตอนยุ่งยากในการตรวจวัด, ระยะเวลาในการตรวจวัดนาน, ต้องการสารที่ใช้ในการติดฉลากที่เป็นฟลูโอเรนเซนส์, product ที่ได้ไม่เสถียร หรือ ระดับความเข้มข้นในการตรวจวัดได้ต่ำ (10^{-12}M) (Shan, et al. 2007, Xu, et al. 2006, Tan, et al. 2005, Luo, et al. 2004) ซึ่งข้อเสียเปรียบเหล่านี้สามารถชดเชยได้ด้วยวิธีการทางไบโอเซนเซอร์ และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาระดับการวัดที่สามารถตรวจวัดระดับของสารที่ต้องการได้ในระดับที่ต่ำมากๆ ที่เรียกว่า ultrasensitive detection (Mateus, et al. 2004) โดยที่การตรวจวัดสารแบบนี้อาศัยหลักการตรวจวัดสารที่ระดับต่ำๆแต่มีความจำเพาะกับสารที่ใช้เป็นตัวตรวจวัดสูง และจากนั้นทำการขยายสัญญาณที่ได้ให้มากขึ้น (amplification signal) ในระดับที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น electrochemical method (Wang,

2005) ตัวอย่างการใช้การหักเหของแสงผ่านวัสดุที่เป็นช่องโดยใช้ antibody เป็นตัวจับกับ antigen ที่ต้องการวัดอันเป็นการตรวจวัดแบบ ultra sensitive detection สามารถวัดปริมาณสารได้ระดับต่ำมากถึง 1 pg/ml หรือ 6.7 femtoMolar (Mateus, et al. 2004)

ในขณะที่ปัจจุบันนี้มีการพัฒนาด้าน nanotechnology มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาด้าน nanomaterials ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างมากในการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวัดแบบไบโอเซนเซอร์นี้จึงมีการนำเอาประโยชน์ของวัสดุจำพวก nanomaterials ไม่ว่าจะเป็น Quantum Dots, Nanowire, carbon nanotube หรือว่า gold particles การนำเอาวัสดุเหล่านี้มาใช้ควบคู่ไปกับความสามารถด้านการจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์ด้วยแล้วยิ่งทำให้ความไวในการตรวจวัดมีมากขึ้นไปด้วยและยังเป็นการเพิ่มสัญญาณที่ได้ไปพร้อมๆกัน อนุภาคนาโนที่มีการใช้เพื่อวัตถุประสงค์นี้มีมากมาย อาทิเช่น การนำเอา Nanoparticle ติดกับ gold particle ใช้ร่วมกับ carbon nanotube เพื่อทำเป็น DNA sensors ที่อาศัยการหลักการวัดทาง electrochemistry สามารถที่เพิ่มศักยภาพในการตรวจวัดและเป็นการเพิ่มสัญญาณที่ได้ด้วย (Wang, 2005) หรือใช้วัสดุจำพวก magnetic particle (Katz, et al. 2005) หรือ silica nanoparticles (Tan, et al. 2004) ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มสัญญาณเช่นกัน

การตรึงเอนไซม์เพื่อใช้เป็นหัวตรวจวัดหรือตัวขยายสัญญาณนั้นได้มีการวิจัยพัฒนาวิธีการและการเลือกใช้วัสดุกันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นการตรึงเอนไซม์ลงบน Carbon nanotubes ซึ่งเป็นการใช้ hybrid layers ของเอนไซม์กับโพลิอิเล็คโตรไลท์บน carbon nanotube เป็นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และสัญญาณที่ได้จากการวัด choline ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Wang, et al. 2006), หรือว่าจะเป็นการตรึงเอนไซม์ endo-1,3-β-D-glucanase (laminarinases) ลงบน hydrid polysaccharide-silica nanoparticles เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึง (Shchipunov, et al. 2006), หรือการใช้วิธีการตรึงเอนไซม์บนอนุภาค latex ในการสร้างเครื่องตรวจวัด phenol and catechol ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการตรึงเอนไซม์ทำให้มีปริมาณเอนไซม์มีมากขึ้นด้วย (Rijiravanich, et al. 2006) นอกจากนี้ยังมีวัสดุอีกประเภทที่นิยมนำมาใช้เป็น supporter ในการตรึงเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวัดสารแบบไบโอเซนเซอร์นั้นคือ ไคโตซาน (Chitosan) ซึ่งเป็นวัสดุที่เป็น ideal supporter สำหรับเอนไซม์เนื่องจากไคโตซานนี้ ช่วยเพิ่มความคงทนต่อการย่อยสลายด้วยสารเคมี (chemical degradation), หลีกเลี่ยงการรบกวนของ metal ions ต่อเอนไซม์ และมีคุณสมบัติด้าน anti-bacteria (Tang, et al. 2006, Duran, et al.

2002, Juang, et al. 2002) อีกด้วย นอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณลักษณะอื่นๆ ที่ทำให้เป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในการนำไปใช้ตรึงเอนไซม์คือ ความจำเพาะเจาะจงสูง (high affinity) ต่อสารพวกโปรตีน, มีหมู่ (reactive functional groups) ที่สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเอนไซม์ หรือ การดัดแปลงทางเคมีได้ (chemical modifications), มีความเป็น hydrophilicity, ทนต่อการเปลี่ยนแปลงทางกลศาสตร์ (mechanical stability) และมีความแข็งตัว (rigidity), regenerability และง่ายต่อการเตรียม / ขึ้นรูปให้เป็นรูปทรงลักษณะต่างๆ อันเป็นผลให้เกิด permeability และ พื้นที่ผิวนั้นเหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่ต้องการได้ (chosen biotransformation) (Krajewska 2004) ในขณะที่การตรึงเอนไซม์ในวัสดุพวก carbon nanotube นั้นมีความยุ่งยากและใช้ขั้นตอนในการตรึงที่ซับซ้อน หรือว่าการตรึงลงบนสารจำพวก latex beads หรือ polymer ต่างๆ หรือสารจำพวก silica นั้นมีความจำเป็นต้องมีการดัดแปลงคุณลักษณะบางประการของวัสดุเหล่านั้นก่อนเช่น การสร้างประจุ หรือ เติมหมู่ functional group เข้าไปก่อน และในบางครั้งมีความจำเป็นต้องใช้ glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการตรึงแบบ cross-linking หรือ covalent methods ซึ่งสุดท้ายแล้วจะไปมีผลต่อการสูญเสีย activity ของเอนไซม์ได้ (Tan, et al. 2005)

นอกจากนี้ ในปัจจุบันเทคโนโลยีต่างๆเกิดขึ้นมากมาย เพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ หนึ่งในเทคโนโลยีเหล่านั้น คือ พืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plants) หรือที่รู้จักกันเป็นอย่างดีในชื่อ พืชจีเอ็มโอ (GMOs) เป็นพืชที่มีการตัดแต่งยีน หรือปรับปรุง เปลี่ยนแปลงยีนบางส่วน แล้วเสริมยีนที่ไม่ใช่ยีนของพืชเข้าไป ซึ่งมักเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ ได้เป็นพืชพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้ไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีผสมพันธุ์พืชแบบปกติ โดยผลผลิตที่เกิดขึ้นนี้กลายมาเป็นส่วนหนึ่งในชีวิตประจำวันอย่างหลีกเลี่ยงได้ยาก ความปลอดภัยของพืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงกลายเป็นสิ่งที่น่าสนใจและมีผู้ให้ความสำคัญมากขึ้น จึงมีการคิดค้นวิธีการตรวจหาพืชดัดแปลงพันธุกรรมนี้ขึ้นมาหลายวิธี เช่น Polymerase Chain Reaction, Enzymatic method, Fluorescence spectroscopy, Quartz crystal microbalance, Surface plasmon resonance spectroscopy และ DNA biosensor เป็นต้น

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้นำเสนอการตรวจหาพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยวิธี DNA biosensor ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ราคาถูก และให้ความแม่นยำสูง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นไม่นานมานี้เอง ควอนตัม ดอท (Quantum Dots) เป็นผลึกอนุภาคที่มีขนาดเพียงระดับนาโนเมตร มีคุณสมบัติเป็นสารกึ่งตัวนำ มีคุณสมบัติทางแสง จึงมีการนำควอนตัม

ดอทมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดโดยวิธี DNA biosensor เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ Alkaline Phosphatase ที่สามารถตรวจวัดโดยใช้สี มาสร้างเป็นเครื่องมือที่ใช้เพื่อตรวจหาพืชดัดแปลงพันธุกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาการสร้างวัสดุและวิธีการที่ใช้ในการเพิ่มสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดเพื่อใช้ในการตรวจวัดสารต่างๆที่มีอยู่ในปริมาณน้อยๆ

1.2.2 เพื่อพัฒนาต้นแบบดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่ใช้ tags labeling ด้วย quantum dots

1.2.3 เพื่อส่งเสริมให้อาจารย์/นักวิจัยได้พัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัย เพื่อก้าวไปสู่การทำงานวิจัยในระดับที่สูงขึ้น

1.2.4 เพื่อผลิตอาจารย์/นักวิจัยที่มีเชี่ยวชาญในการพัฒนาด้านการตรวจวัดต่างๆ และงานด้านนาโนเทคโนโลยี เพื่อสร้างความแข็งแกร่งให้กับระบบการวิจัยด้านนี้ของประเทศต่อๆไป

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานสำหรับใช้สร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์

1.3.2 ติดฉลาก เอนไซม์ หรือ quantum dots กับ DNA ที่เลือกใช้มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์

1.3.3 ทดสอบคุณสมบัติของเซนเซอร์ที่ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1. ได้เครื่องมือให้ในวิเคราะห์หา DNA ที่สนใจในปริมาณน้อยได้

1.4.2. มีบทความวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง

1.4.3. นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมในประเทศ / ต่างประเทศอย่างน้อย 1 เรื่อง

1.4.4. สร้างความสามารถ และพัฒนาศักยภาพของอาจารย์ / นักวิจัยในการพัฒนางานด้านการตรวจวัดต่างๆ และงานด้านนาโนเทคโนโลยีให้แก่มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และหน่วยงานอื่นๆ