บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

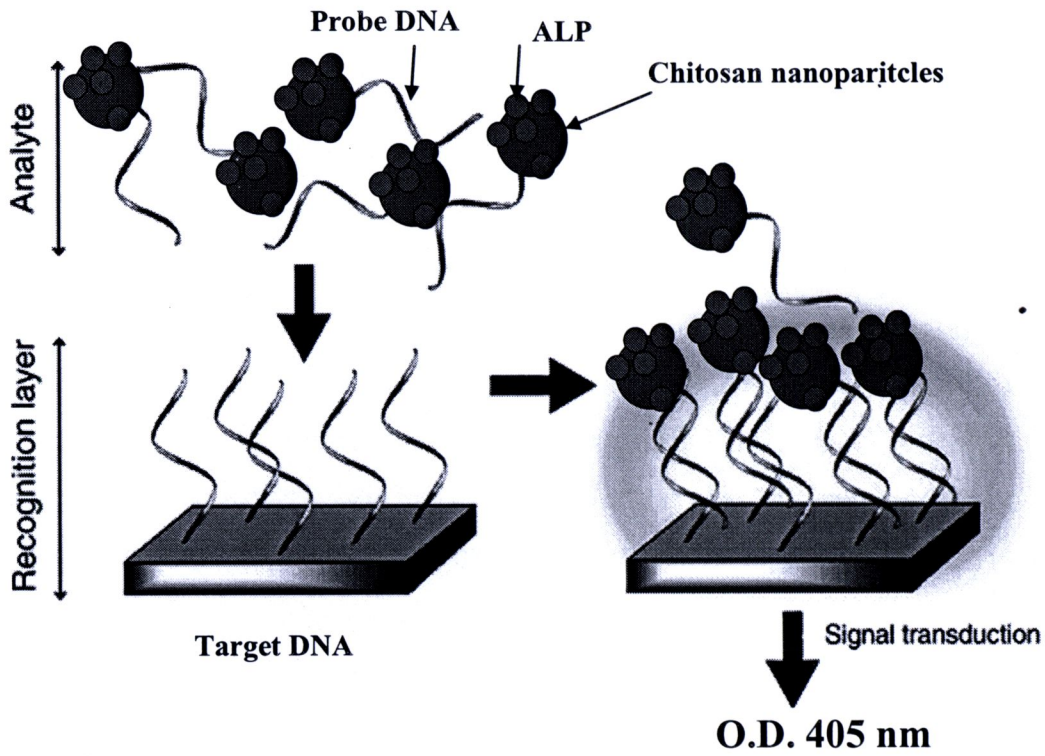
5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า อนุภาคไคโตซานที่เตรียมด้วยกระบวนการทางเคมี (chemical process) ด้วยวิธี ionic gelation ได้ให้คอลลอยด์ที่มีลักษณะสีขาวขุ่น และเมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าขนาดของอนุภาคไคโตซานหลังจากเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) มีขนาดเล็กลง จาก 500 นาโนเมตร เป็น 67 นาโนเมตร ด้วยเหตุผลที่ว่า สารละลาย Tripolyphosphate (TPP) ที่มีประจุตรงข้ามกับไคโตซานทำให้เกิดการครอสลิงค์ภายใน (intramolecular crosslinkages) และระหว่างโมเลกุล (intermolecular crosslinkages) ของไคโตซาน เกิดเป็นอนุภาคนาโนไคโตซานขึ้น จึงทำให้ไคโตซานหลังจากเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) มีลักษณะเป็นคอลลอยด์สีขาวขุ่นมากขึ้น และมีขนาดเล็กลง ดังนั้นจึงใช้อนุภาคนาโนไคโตซานมาทำการทดลองในขั้นตอนการศึกษาการตรึงกับเอนไซม์ ALP ต่อไปเพราะอนุภาคนาโนไคโตซานมีพื้นที่ผิวมาก ทำให้มีการจับกับเอนไซม์ได้ในปริมาณมากด้วยเช่นกัน ซึ่งผลการศึกษาสภาวะการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซาน พบว่าที่ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6 เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซาน แม้ว่าที่ pH เดียวกันแต่ชนิดของบัฟเฟอร์ต่างกัน ปริมาณเอนไซม์ที่เหลืออยู่นั้นไม่เท่ากัน เนื่องจากค่าความจุบัฟเฟอร์หรือ buffer capacity ของแต่ละบัฟเฟอร์ที่ใช้ศึกษานั้นต่างกัน เพราะฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีคู่กรด-คู่เบสที่เหมาะสมจึงมีความสามารถในการต้านการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชได้มากกว่า ในขณะที่ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานนั้น พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซาน เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการจับกันของเอนไซม์ ALP กับไคโตซาน และผลการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ ALP ในการตรึงบนอนุภาคนาโนไคโตซาน พบว่า เอนไซม์ ALP ที่ความเข้มข้น 11 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซาน นั่นอาจจะเป็นเพราะว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP มากพอที่จะทำให้การจับกับอนุภาคนาโนไคโตซานพอเหมาะ และไม่เหลือเอนไซม์จากการตรึงที่มากเกินไปนั่นเอง ดัง

แสดงได้จากผลของการตรึงที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP ที่ 15 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร นั้น ให้ค่าปริมาณเอนไซม์ที่เหลือจากการตรึงมากเกินไป อันเนื่องมาจากเกิดการอิ่มตัวในการจับกันระหว่างเอนไซม์ ALP กับอนุภาคนาโนไคโตซาน

และเมื่อนำผลการทดลองการศึกษาสภาวะการตรึงเอนไซม์ ALPบนอนุภาคนาโนไคโตซานเหล่านี้ จึงนำฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP 11 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ามีขนาดเท่ากับ 83 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดเพิ่มมากขึ้นแสดงว่าอนุภาคนาโนไคโตซานมีการจับกับเอนไซม์ ALP นั่นเอง นอกจากนี้จากการศึกษาค่าเสถียรภาพของอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่ได้นั้นพบว่าให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ ALP อิสระ (รักษาสภาพได้นานถึง 30 วัน) และจากสภาวะการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานข้างต้นนี้ จึงนำไปศึกษาการตรึงกับ DNA เพื่อทำเป็น DNA sensor ต้นแบบต่อไป

โดยแนวทางในการสร้างหัววัดเซนเซอร์โดยใช้อนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP นั้นจะนำอนุภาคนาโนไคโตซานที่ตรึงเอนไซม์ ALP แล้วมาติดกับสาย DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัดทำให้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่ต้องการได้ และสามารถตรวจวัดสัญญาณที่ได้จากเอนไซม์ ALP ถึงแม้จะมีความเข้มข้นน้อยมาก แต่ยังสามารถตรวจวัดออกมาเป็นสัญญาณได้ แสดงดังภาพที่ 5.1 นี้



ภาพที่ 5.1 แสดงลักษณะของ DNA เซนเซอร์ต้นแบบที่ได้ และวิธีการตรวจวัด

ซึ่งจากการตรวจวัดด้วย DNA sensor ต้นแบบนี้ พบว่า sensor ที่ได้มีลักษณะดังนี้ ค่า calibration range อยู่ที่ 1 – 150 ng DNA/ μl ค่า lower detection limit เท่ากับ 1 ng DNA/ μl ด้วย sensitivity 0.0088 ng DNA/ μl และ response time คือ 4 – 7 นาที นอกจากนี้เมื่อนำไปวัดซ้ำๆ ได้ระยะเวลาเป็น (usage stability) 14 วัน ดังจะเห็นได้ว่า sensor ที่ได้มีการพัฒนาด้านความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ และความไวในการตรวจวัดที่ดีนั่นเอง

ในขณะที่การตรวจวัดโดยใช้อนุภาคนาโน Quantum dots ที่ในงานวิจัยนี้ใช้ คือ PbSe ที่เตรียมได้มีขนาดเล็กมากถึง 48 นาโนเมตร ทำให้ผลการตรวจวัดได้ค่าการตอบสนองที่ดีกว่าการใช้เอนไซม์ แต่ข้อจำกัดจะอยู่ที่ปริมาณช่วงการตรวจวัดที่ได้ (linear range) จะน้อยกว่าการใช้เอนไซม์ แต่ทั้งสองวิธีเป็นการตรวจวัดที่ให้ค่าความไวที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการใช้อนุภาคนาโนที่คล้ายกัน นอกจากนี้ระยะเวลาของการตรวจวัดจะให้ผลที่เร็ว หากเปรียบเทียบกับการตรวจวัด DNA แบบอื่นๆ เนื่องจากเป็นการตรวจวัดที่ใช้การดูสีเป็นหลัก ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทำให้ใช้ระยะเวลาที่น้อยลง

5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากการทำ DNA sensor นี้ยังขาดในเรื่องการตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์ ALP DNA ปริมาณของ dots ที่ตรึงได้ และรูปแบบการติดของ DNA ที่ได้ ดังนั้นควรที่จะต้องทำการทดสอบค่าต่างๆ ดังกล่าวเพิ่มเติม แต่เนื่องจากระยะเวลา และงบประมาณของการวิจัยมีจำกัด ทำให้ผลที่ได้อาจจะยังไม่สมบูรณ์ รวมทั้งปัญหาจากวิกฤตการณ์น้ำท่วม ซึ่งจะต้องทำการทดสอบต่อไปในอนาคต แต่ทว่า DNA sensor นี้สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบการตรวจวัดสารปริมาณน้อยๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับตัวอย่างจริง ไม่ว่าจะเป็น DNA เอง หรืออาจจะนำไปประยุกต์กับการตรวจวัดแบบอิมมูโนเซนเซอร์ได้เช่นเดียวกัน เพื่อหวังให้เป็นอุปกรณ์ที่มีความไวในการตรวจวัดสูง มีประสิทธิภาพสูงในกิจกรรมชีวภาพ ราคาถูก ใช้งานง่าย และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบให้มีการผลิตเพื่อวางจำหน่ายในอนาคตต่อไปได้นั่นเอง