ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
191027

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

เรื่อง

การพัฒนาหัววัดดีเอ็นเอความไวสูง

โดย

อาจารย์ ดร. ปาริยา ณ นคร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

b 00255522

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
191027

การพัฒนาหัววัดดีเอ็นเอความไวสูง

Development of high sensitive DNA sensor

โดย

อาจารย์ ดร. ปาริยา ณ นคร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณแผ่นดิน 2554 นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมงานวิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณ รศ.ดร.วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย ผู้ซึ่งเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนแก้ปัญหาต่างๆอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง รวมถึงนักศึกษาที่ช่วยงานวิจัย เจ้าหน้าที่ทุกคนที่เกี่ยวข้อง ทำให้งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ดร.ปาริยา ณ นคร
ผู้วิจัย
กันยายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณแผ่นดิน 2554 นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมงานวิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณ รศ.ดร.วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย ผู้ซึ่งเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนแก้ปัญหาต่างๆอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง รวมถึงนักศึกษาที่ช่วยงานวิจัย เจ้าหน้าที่ทุกคนที่เกี่ยวข้อง ทำให้งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ดร.ปาริยา ณ นคร
ผู้วิจัย
กันยายน 2555

บทคัดย่อ

191027

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) หรือ / และดีเอ็นเอ หรือ PbSe หรือ / และดีเอ็นเอบนอนุภาคนาโนไคโตซานเพื่อใช้เป็นแนวทางในการสร้างหัววัดเซนเซอร์ การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานโดยกระบวนการทางเคมีแบบวิธีเจลไอออนิค จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะสีขาวขุ่น จากนั้นนำอนุภาคนาโนไคโตซานที่ได้มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงกับ ALP ที่สภาวะความเป็นกรด – ด่าง (pH) อุณหภูมิ ความเข้มข้นเริ่มต้นของ ALP ต่างๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ที่ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสความเข้มข้น ALP เริ่มต้น ที่ 11 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร และศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวอยู่ที่ 0.012 ± 1.05 Units/ml และ 0.009 ± 3.12 Units/ml สำหรับอนุภาคนาโนไคโตซาน – เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) หรือ / และดีเอ็นเอ ตามลำดับ นองจากนี้ยังได้มีการศึกษาค่าเซต้าของอนุภาคต่างๆ ที่ได้ด้วย ต้นแบบของดีเอ็นเอที่นำตรวจวัดเป็น CaMV35S promoter gene ที่นิยมใช้สำหรับการทำพืชตัดต่อพันธุกรรม

อนุภาคควอนตัม PbSe ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยเพื่อเป็นการเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เอนไซม์ พบว่า การตรวจวัดด้วย PbSe นี้ให้ความไวที่มากกว่า แต่ค่าความเข้มเข้นต่ำสุดที่ตรวจได้ใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ ไคโตซาน อนุภาคนาโน เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส PbSe การขยายสัญญาณ ตรวจวัด

Abstract

191027

This study has an objective to study enzyme Alkaline phosphatase (ALP) or/and DNA immobilization with chitosan nanoparticles for fabricating sensor electrode applications. From a preparation of chitosan nanoparticles by chemical process via ionic gelation method obtained colloid solution. Then the amount of chitosan nanoparticles was examined in order to investigate an optimal condition for ALP immobilization. 0.02 % chitosan showed the best results in ALP or/and DNA immobilization. Moreover, a variation of pH, temperature and ALP initial concentration were examined. The ALP activity of chitosan – ALP was studied by diethanolamine assay. It had 0.012 ± 1.05 Units/ml enzyme for chitosan – ALP nanoparticles and 0.009 ± 3.12 Units/ml enzyme for chitosan – ALP – DNA nanoparticles. Furthermore zeta potential was studied to determine a stability of those nanoparticles. In this work, *P* – DNA was used as a specific sequence related to CaMV35S promoter gene that is often used for some transgenic plants.

PbSe quantum dots were also utilized for another technique of detection to compare with enzymatic method as previous mention. The PbSe nanoparticles were immobilized with chitosan nanoparticles for *P* – DNA detection. It revealed the faster detection time than enzymatic method. Nevertheless, the linear range of detection of both methods was nearly the same (limit at 10^{-20} M). It is the idea for a model of DNA sensor with colorimetric detection.

Keywords chitosan, nanoparticles, alkaline phosphatase, PbSe, signal amplification

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	**5**
2.1 ไบโอเซนเซอร์	5
2.1.1 โครงสร้างและการทำงานของไบโอเซนเซอร์	5
2.1.2 สารที่ต้องการตรวจวัดหรือสับสเตรท	6
2.1.3 สารชีวภาพ	6
2.1.4 ทรานส์ดิวเซอร์	6
2.1.5 ชนิดของไบโอเซนเซอร์	6
2.1.6 คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์	9
2.1.7 ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้	9
2.2 ไคโตซาน	10
2.2.1 การผลิตไคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมี	13
2.2.2 การสกัดไคโตซานจากไคตินด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	16
2.2.3 คุณสมบัติของไคโตซาน	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.4 อนุภาคนาโนไคโตซาน	18
2.3 เอนไซม์ Alkaline phosphatase	19
2.3.1 หนาที่ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP)	19
2.3.2 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส	20
2.4 DNA	21
2.4.1 DNA sensor	23
2.5 ควอนตัม ดอท (Quantum Dots)	27
2.5.1 โครงสร้างพื้นฐานของควอนตัมดอท	28
2.5.2 การกักขัง Electron	29
2.5.3 คุณสมบัติและพลังงาน	29
2.5.4 ประโยชน์ของควอนตัม ดอท	30
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	**31**
3.1 สารเคมี และวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	31
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	32
3.3 วิธีการทดลอง	33
3.3.1. การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานโดยวิธี ionization gelation	33
3.3.2. การตรึงเอนไซม์ ALP ลงบนอนุภาคนาโนไคโตซาน	34
3.3.3. การตรึง DNA ลงบนอนุภาคนาโนไคโตซาน-เอนไซม์	35
3.3.4. การเตรียม 96 micro – wells สำหรับการตรวจวัด target DNA	36
3.3.5. การตรวจวัดของ DNA sensor (ต้นแบบ)	37
3.3.6. การวิเคราะห์ต่างๆ	37
3.3.7. การเตรียมอนุภาคนาโนเลดเซเลไนด์	39
3.3.8. การเตรียมสารละลาย PbSe/CHIT และตรึงกับ DNA	39
3.3.9. การหาคุณลักษณะของเซนเซอร์ที่ได้	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	**41**
4.1 การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน และขนาดอนุภาคที่ได้	41
4.2 สภาวะการตรึงอนุภาคนาโนไคโตซานกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส	46
4.2.1 การตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสบนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ค่าพีเอชต่างๆ	46
4.2.2 การตรึงเอนไซม์ Alkaline Phosphatase บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่อุณหภูมิต่างๆ	47
4.2.3 การตรึงเอนไซม์ Alkaline Phosphatase บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้นต่างๆ	48
4.2.4 เสถียรภาพของเอนไซม์ Alkaline Phosphatase ที่ถูกตรึงบนอนุภาคนาโนไคโตซานที่สภาวะที่เหมาะสม	49
4.3 การตรวจวัด DNA เซนเซอร์ต้นแบบด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP – ssDNA	51
4.4 การติดฉลากของ PbSe อนุภาคนาโนไคโตซาน และ DNA	52
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	**55**
5.1 สรุปผลการทดลอง	55
5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	58
เอกสารอ้างอิง	**59**

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงขนาดอนุภาคไคโตซานที่ได้จากการตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)	44
4.2 แสดงขนาดอนุภาคไคโตซานที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Nanosizer	45
4.3 แสดงสรุปผลสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาการตรึงเอนไซม์ ALPบนอนุภาคนาโนไคโตซาน	49
4.4 แสดงลักษณะต่างๆ ที่ได้ของ Chitosan – ALP – DNA sensor ต้นแบบ	52
4.5 ขนาดของอนุภาคโดยเฉลี่ย และค่าซีต้าโพเทนเชียลของอนุภาคนาโนไคโตซาน และ PbSe ในสภาวะต่างๆ ด้วยเครื่อง Nanosizer (Malvern instrument)	53
4.6 แสดงลักษณะต่างๆ ที่ได้ของ DNA sensor ที่ใช้ PbSe เป็นตัวตรวจวัด	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงโครงสร้างและหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)	5
2.2	โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	11
2.3	ประโยชน์ของไคโตซานด้านอาหาร	13
2.4	ปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลโดยการใช้เอนไซม์ chitindeacetylase	14
2.5	ผงไคโตซานที่ได้จากปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิล	15
2.6	เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP)	19
2.7	การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสกับสายนิวคลีโอไทด์	20
2.8	โครงสร้างสายดีเอ็นเอ	21
2.9	โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ และเบสในกลุ่มของ purine และ pyrimidine	22
2.10	แสดงการทำงานของ E-DNA Sensor ที่ขึ้นอยู่กับรูปลักษณ์ของ DNA Pseudoknot และการทำปฏิกิริยากับ Methylene Blue (MB)	24
2.11	แสดงการทำงานของเครื่องมือ (single device) ในขณะที่ทำการวัด โดยสาย DNA คู่สมจะจับกับ thiolated ssDNA ที่ตรึงอยู่กับ MCH บนแผ่น gold Electrode ที่ PBS pH 7.4 ซึ่งสัญญาณที่ได้จะแสดงดังรูปกราฟ	25
2.12	แสดงค่า Resonant wavelength shift กับระยะเวลาการตรึงของ biotinylated DNA บน avidin-modified surface ของ SPR sensor โดยที่ (a) คือ avidin และ (b) คือ avidin + biotinylated DNA	26
2.13	แสดงโครงสร้างและสมบัติการเปล่งแสงของควอนตัม ดอท	27
2.14	แสดงส่วนประกอบของควอนตัม ดอท	28
2.15	แสดงขนาดและสีของควอนตัม ดอท	30
4.1	สารประกอบคอลลอยด์อนุภาคนาโนไคโตซาน	41
4.2	ขนาดเกล็ดอนุภาคไคโตซานก่อนเริ่มต้นการทดลอง (SEM)	42
4.3	ขนาดอนุภาคไคโตซานในสารละลายก่อนเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) วัดด้วยวิธี TEM	42
4.4	ขนาดอนุภาคไคโตซานหลังเติมสารละลาย Tripolyphosphate (TPP) วัดด้วยวิธี TEM	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.5 ขนาดอนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่ได้จากการตรึงโดยใช้ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น ALP เริ่มต้น 11 นาโนกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร จากการวัดด้วยกล้อง TEM	44
4.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส + ส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ค่าพีเอชต่างๆ	46
4.7 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส + ส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่อุณหภูมิต่างๆ	47
4.8 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส + ส่วนใสของตะกอนที่ได้จากการตรึงเอนไซม์ ALP บนอนุภาคนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ ALP เริ่มต้นต่างๆ	48
4.9 แสดงค่าเสถียรภาพ (storage stability) อนุภาคนาโนไคโตซาน – ALP ที่เวลาต่างๆ (วัน) เปรียบเทียบกับ เอนไซม์ ALP อิสระ	50
4.10 แสดง calibration curve ของ DNA sensor ที่ได้จากการวัด target DNA ที่ 1 – 150 ng DNA/ μl ที่อุณหภูมิห้อง	51
4.11 แสดง calibration curve ของ DNA sensor ที่ใช้ PbSe เป็นตัวตรวจวัดที่ได้จากการวัด target DNA ที่ 1 – 15 ng DNA/μl ที่อุณหภูมิห้อง	54
5.1 แสดงลักษณะของ DNA เซนเซอร์ต้นแบบที่ได้ และวิธีการตรวจวัด	57