รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจจับและเฝ้าระวังโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2554

Development of DNA biosensors for sensing and monitoring of the sugarcane white leaf disease caused by phytoplasma

: 2010 Annual Report

ชื่อผู้วิจัย

รศ.ดร. พรทิพย์ วงศ์แก้ว

รศ. สุธา ภู่สิทธิศักดิ์

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

ในการตรวจสอบคุณสมบัติของอิเล็กโทรดสองชนิดคือ ชนิดที่เป็น glassy carbon electrode (GCE) และชนิด platinum electrode (PTE) โดยวิธีการมาตรฐานทางเคมีไฟฟ้าทั่วไปคือ วิธี cyclic voltammetry (CV) ในระบบอิเล็กโตรไลท์มาตรฐาน $K_3Fe(CN)_6$ ที่ pH 7.0 เพื่อการตรวจสอบการแลกเปลี่ยนประจุของ ferri-ferro ion พบว่าอิเล็กโทรดทั้งสองชนิดมีความสามารถในการตรวจวัดสัญญาณไฟฟ้าได้ดีทัดเทียมกัน แม้ว่าอาจมีรูปแบบของกราฟ CV ต่างกันออกไป เมื่อทำการดัดแปลงขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารที่เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติไคโตซาน (chitosan-modified electrode) ทั้งที่เป็นชนิด 85% DD และ 95% DD และตรวจวัดด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) และวิธี differential pulse votammetry (DPV) ก็พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงดังกล่าวยังคงความสามารถในการนำไฟฟ้าที่สามารถตรวจวัดได้ในรูปแบบเฉพาะตัวของกราฟ CV และ DPV ของchitosan-modified GCE และ chitosan-modified PTE นอกจากนี้ผลการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม และการตรวจวัดสัญญาณชีวภาพของดีเอ็นเอทางเคมีไฟฟ้าแบบ CV กับ DPV บ่งชี้ว่าอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงด้วยสารไคโตซานเหล่านี้ ยังมีความสามารถในการตรึงดีเอ็นเอ SCWL-DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีเสถียรภาพสูง สำหรับผลการศึกษาพฤติกรรมของดีเอ็นเอ SCWL-DNA ที่ตรึงอยู่บน chitosan-modified GCE ด้วยการติดฉลากสาร methylene blue (MB) ซึ่งใช้เป็นสาร DNA intercalator และดัชนีการตอบสนองอย่างจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอ ในระบบ supporting electrolyte ที่เป็น 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ระบบการติดฉลากนี้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอในเชิงปริมาณได้ และจากการทดสอบกับ SCWL-DNA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก็พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนกันระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอ กับระดับของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ ณ ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นตำแหน่งจำเพาะระหว่างปฏิกิริยาของดีเอ็นเอกับสาร MB คือ ณ ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.25 V ในที่นี้จึงทำให้ได้ค่า EC_{50} ของ SCWL-DNA ที่ตรึงอยู่บนพื้นผิว chitosan-modified GCE ขนาดรัศมี 2 mm ได้เท่ากับ 1.38344 E-21 ng และยังสามารถเทียบหาหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ได้จากค่าความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเมื่อเทียบเป็นค่า log ความเข้มข้น กับค่ากระแส peak ของ DPV จากสมการความสัมพันธ์ Y = -0.95669+0.5286X ด้วยค่า R = 0.9916 ดังนั้นด้วยประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณเช่นนี้ จึงเป็นส่วนที่สำคัญสำหรับการกำหนดและตรวจสอบเป้าหมาย ทำให้สามารถระบุได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณในคราวเดียวกันได้อย่างชัดเจน เพื่อประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้นในลำดับต่อไป

Abstract

Electrochemical properties of the two standard electrodes, glassy carbon electrode (GCE) and platinum electrode (PTE) were examined using cyclic votammetry (CV) technique. Measurement of a ferri-ferro ion exchange under $K_3Fe(CN)_6$ at pH 7.0 with nitrogen atmosphere has indicated similar electrical conductivity capable for electrochemical performa nce. Although some differences in cyclic voltammogram were appeared. A high response to electrical measurement by CV and differential pulse voltammetry (DPV) has been steadily verified even after modification of each glassy carbon and platinum electrode surface with either 85% or 95% DD chitosan natural biopolymer with their signify patterns. Successful immobilization of sugarcane white leaf plant DNA (SCWL-DNA) onto the chitosan-modified electrode was illustrated by an atomic force microscopical (AFM) observation. An efficiency and a stability of SCWL-DNA immobilization on these modified electrodes were confirmed by CV and DPV investigation through the standard $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ exchange system. Electrochemical behavior of the immobilized SCWL-DNA on GCE was further traced out using methylene blue (MB) as the DNA intercalator and guanine indicator. Both CV and DPV responses in tris buffer saline (TBS) pH 7.0 supporting electrolyte have suggested the quantificable possibility of this DNA on the GCE surface. It has been shown that the specific DNA-MB interaction peak current (Ip) at -0.25V potential (E) was increased following the increase of SCWL-DNA concentration. The results were more appreciated with DPV according to the more obvious peaks. The amount of SCWL on the 2 mm radius surface chitosan-modified GCE then could be calculated in term of an EC_{50} as 1.38344 E-21 ng and the correlative regression between peak current obtained and log of DNA concentration could be formulated as the equation of Y = -0.95669+0.5286X with the R value of 0.9916 concerning the DPV results. Thus, these electrochemical studies suggested the system could be applied for qualification as well as quantification of the target DNA which are necessary steps of the require DNA sensor fabrication.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ (ไทย)	3
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	11
บทนำ	12
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์	33
สรุปและเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 ค่าของกระแสและศักย์ไฟฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C จากการวัดอิเล็กโทรดชนิด glassy carbon (GCE) อิเล็กโทรดชนิด platinum (PTE) อิเล็กโทรด GCE กับ PTE ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน และการวัดหลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็ดโทรดดัดแปลงแต่ละชนิด 28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 1	กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon (GCE) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C	20
ภาพที่ 2	กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรด platinum (PTE) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C	21
ภาพที่ 3	กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon(GCE) ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 85% deacetylation degree (chitosan 85DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C	22
ภาพที่ 4	กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon(GCE) ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 95DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C	22
ภาพที่ 5	กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดplatinum(PTE) ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 95DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C	23

ภาพที่ 6 ภาพดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนฟิล์มบางไคโตซาน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope) ซึ่งสามารถตรวจพบดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA ที่วัดขนาดความหนาของเส้นสายดีเอ็นเอได้ว่ามีขนาดประมาณ 10-15 นาโนเมตร 24

ภาพที่ 7 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-/}$ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 25

ภาพที่ 8 กราฟ cyclic voltammogram แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างอิเล็กโทรด GCEเปลือย(a) กับอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน(b) และสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน(c) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 25

ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (Ipa) และกระแส reduction(Ipc) ของสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซานที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 25. 50. 100. 150. และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 26

ภาพที่ 10 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรด platinum ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการ 27

สแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C

ภาพที่ 11 กราฟ cyclic voltammogram แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างอิเล็กโทรดPTEเปลือย(a) กับอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน(b) และสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน(c) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 27

ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (Ipa) และกระแส reduction(Ipc) ของสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซานที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 25. 50. 100. 150. และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 28

ภาพที่ 13 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรด GCE ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน ในระบบ redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s (จาก a ถึง e) ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 29

ภาพที่ 14 กราฟ Differential pulse voltammetry (DPV) ในระบบ redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 โดย (a) = อิเล็กโทรดGCE ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน, (b) = 30

อิเล็กโทรดGCEเปลือย, (c) =สัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน

ภาพที่ 15 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้จากปฏิกิริยา redox ในระบบ redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการตรวจสารละลายของดีเอ็นเอสายคู่(dsDNA)จากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 0 (a), 1 (b), 6.25(c), และ 12.5(d) ng/mlจากการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 31

ภาพที่ 16 กราฟ differential pulse voltammogram ที่ได้จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการตรวจสารละลายของดีเอ็นเอสายคู่(dsDNA)จากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 1 (a), 6.25 (b), 12.5(c), และ 25(d) ng/mlจากการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 31

ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ Dose response curve ที่ได้จากการวัดสัญญาณ DPV จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator ของสารละลายดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 1-25 ng/ml ทำให้ได้ค่า EC_{50} ของดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการตรึงบนพื้นผิว template เท่ากับ 1.38344E-21 32

ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเมื่อเทียบเป็นค่า log ความเข้มข้น กับค่าสัญญาณ DPV จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator ทำให้ได้สมการความสัมพันธ์ regression เป็น Y = -0.95669+0.5286X, และค่า R = 0.9916 32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย:

CV = cyclic voltammetry

DPV = differential pulse voltammetry

DD = deacetylation degree

DNA = deoxyribonucleic acid

MB = methylene blue

Ip = electric current

Ipa = anodic electric current

Ipc = cathodic electric current

A = ampare

E = electric potential

V = volt

SCE = electrical scan rate (millivolt/second)

AFM = atomic force microscope

บทนำ

อ้อยเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อประชาคมโลก ทั้งในด้านการเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำตาล เอธานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทน และเชื้อเพลิง การผลิตอ้อยในประเทศไทยมีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ โดยเป็นแหล่งสร้างงานการเกษตรและแรงงานไทยนับล้านคน สามารถสร้างรายได้จากการจำหน่ายน้ำตาลในประเทศปีละกว่าสองหมื่นล้านบาท และส่งออกมูลค่ามากกว่าปีละห้าหมื่นล้านบาท พื้นที่การผลิตอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคเหนือตามลำดับ รวมพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศของปีการผลิต 2550/2551 มีจำนวน6.2 ล้านไร่ เก็บเกี่ยวได้ผลผลิตรวม 73.2 ล้านตัน จากการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกใหม่ประมาณ 2 ล้านไร่ ขณะที่เมื่อคิดเป็นผลผลิตเฉลี่ยก็ยังคงอยู่ในระดับ 9-11 ตัน/ไร่เช่นเดิม ซึ่งจัดว่าต่ำกว่าประเทศคู่แข่งเช่นบราซิลและออสเตรเลีย ที่ได้ผลผลิตเฉลี่ยสูงถึง 13-16 ตัน/ไร่ (ศูนย์สถิติทางการเกษตร, 2538; กลุ่มสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย, 2551) ทั้งนี้ปัญหาที่สำคัญมากประการหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับอ้อยในประเทศไทย คือการระบาดของโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ถือเป็นตัวแปรหลักต่อผลผลิตอ้อยในแต่ละปี โดยพบการลดลงเป็นอย่างมากของผลผลิตเฉลี่ยทั้งประเทศเมื่อมีการระบาดของโรค ซึ่งไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลยจำนวนหลายแสนไร่การผลิตอ้อยในแต่ละปีจึงมีความเสี่ยงค่อนข้างมาก ทั้งยังมีภาระการลงทุนค่าใช้จ่ายและแรงงานสูงมาก จากการต้องหาพื้นที่ปลูกใหม่เพื่อเลี่ยงการเกิดโรคและการจัดหาท่อนพันธุ์ใหม่ตลอดเวลา โดยที่ไม่สามารถไว้ตอต่อไปได้หลายปีดังเช่นประเทศผู้ผลิตอ้อยรายใหญ่อื่นๆของโลก อีกทั้งจวบจนปัจจุบันยังไม่พบว่ามีพันธุ์อ้อยต้านทานต่อโรคใบขาว การป้องกันกำจัดเท่าที่สามารถทำได้คือการจัดหาท่อนพันธุ์ปลอดโรคและการสร้างระบบเฝ้าระวังการเกิดโรค ซึ่งจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบที่ทรงประสิทธิภาพด้วยความรวดเร็วทันการ ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณเพื่อมิให้เกิดการอุบัติซ้ำของโรค สำหรับการตรวจโรคแต่เดิมนั้นดูจากอาการที่ปรากฏ ที่อาจสายเกินไปสำหรับการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างทันท่วงที

ในส่วนของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยนั้น จัดเป็นเชื้อโรคประเภท obligate parasite ที่อาศัยอย่างจำกัดตนอยู่ในท่อลำเลียงอาหารของพืช และในต่อมน้ำลายท่อน้ำลาย ทางเดินอาหารและช่องว่างลำตัวของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hyroglyphicus*) ซึ่งเป็นแมลงพาหะ ปัจจุบันยังไม่สามารถทำการแยกเชื้อออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกเพื่อตรวจสอบลักษณะสมบัติและพฤติกรรมต่างๆได้ การวินิจฉัยว่าเป็นโรคหรือไม่นั้นแต่เดิมจึงต้องรอกระทั่งต้นอ้อยปรากฏอาการที่เป็นใบสีขาวออกมาเสียก่อนทำให้สายเกินการ นอกจากนี้เชื้อชนิดนี้ยังมีขนาดเล็กยิ่งกว่าแบคทีเรีย โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 60 x 300 นาโนเมตร (Shikata *et al.*, 1969) จึงไม่สามารถตรวจดูเชื้อภายในเนื้อเยื่อพืชได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป หากต้องการตรวจสอบความมีอยู่ของเชื้อในพืชก็จำเป็นต้องต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้ยากต่อการ

ตรวจเชื้อเป็นอย่างมาก ในระยะแรกของการศึกษาวิจัยวิธีตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมจากการสังเกตอาการของโรค ยังต้องอาศัยวิธีการทางอ้อม คือใช้การย้อมสีเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารแล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ด้วยสีย้อมชนิดพิเศษเช่น สี Dienes' stain (Deeley *et al*., 1979) สี aniline blue สี 4',6-diamidino-2-phenylindole (Hituki, 1976) เพื่อช่วยตรวจสิ่งที่คาดว่าเป็นกลุ่มก้อนของไฟโตพลาสมาหรือสิ่งที่เป็นผลผลิตจากการติดเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งวิธีการเหล่านี้แม้ดูเหมือนง่ายแต่ก็ต้องอาศัยประสบการณ์ ทักษะและความชำนาญไม่น้อย และยังเป็นเพียงวิธีที่บ่งถึงความเป็นไปได้ที่ต้นอ้อยอาจมีการติดเชื้อไฟโตพลาสมา แต่ไม่สามารถอธิบายรายละเอียดอื่นๆเพื่อยืนยันชนิดเชื้อและการติดเชื้อที่แท้จริงได้

สำหรับการศึกษาวิจัยวิธีการวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อย และการตรวจเชื้อสาเหตุโรคโดยคณะผู้วิจัยที่เกี่ยวข้อง ได้มีความพยายามศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อโรคใบขาวของอ้อย ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ประกอบกับวิธี DNA dot blot hybridization และวิธีพีซีอาร์ (พรทิพย์, 2542; Wongkaew *et al.,* 1995, Nakashima *et al.,* 1999) ซึ่งการวิจัยแนวทางการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระยะแรก ทำให้ได้แนวทางการตรวจเชื้อโรควิธีดีเอ็นเอโพรบแบบ dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจจำเพาะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของ extrachromosomal DNA และ chromosomal DNA จากวิธี random cloned DNA fragment และที่เป็น ribosomal DNA probes จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rDNA และ 16S-23S rDNA spacer gene ซึ่งก็สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อได้เป็นอย่างดี (พรทิพย์และคณะ, 2541, Nakashima *et al.,* 1994; Namba *et al.,* 1993; Wongkaew *et al.,* 1995) แต่การตรวจเชื้อแบบ DNA dot blot hybridization ประกอบด้วยการเตรียมการทั้งเครื่องมือและสารเคมีหลายขั้นตอนซึ่งยังค่อนข้างยากต่อการทำงาน ต้องใช้เวลานานนับสัปดาห์สำหรับการเตรียมชิ้นงานจนถึงการแสดงผล จึงมีการวิจัยเทคนิคการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ ที่ใช้หลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction จากดีเอ็นเอต้นแบบ(DNA template) การตรวจดีเอ็นเอโดยวิธีนี้มีความแม่นยำและความไวสูงกว่าในเวลาที่รวดเร็วกว่าวิธี DNA dot blot hybridization คือใช้เวลาประมาณ 2 วันก็ทราบผล สามารถช่วยให้ตรวจพบเชื้อโรคในพืชและในแมลงพาหะได้ดียิ่งขึ้น พร้อมกับค่าใช้จ่ายในการตรวจที่สูงขึ้นตามต้นทุนวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี (พรทิพย์, 2542ก, 2542ข, 2544; Wongkaew *et al.,* 1996, 1997; Wongkaew and Fletcher, 2004) อย่างไรก็ตามในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีวิธีการตรวจโรคที่แม่นยำสูงด้วยความไวยิ่งยวดและทราบผลอย่างรวดเร็วมากที่สุด ขณะที่แม้วิธีพีซีอาร์มาตรฐานซึ่งใช้ตรวจเชื้อโรคชนิดต่างๆกันอยู่ในปัจจุบัน ยังมีราคาสูงทั้งไม่รวดเร็วและสะดวกเท่าที่ต้องการ จึงเริ่มมีการศึกษาวิธีการอื่นๆที่อาจให้ประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ซึ่งแนวคิดที่ได้รับความสนใจมากที่สุด

ได้แก่แนวคิดการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอ ที่สามารถนำมาเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับการพิสูจน์สมบัติทางชีวภาพต่างๆได้เป็นอย่างดี

การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาดีเอ็นเอเซนเซอร์แบบต่างๆ มีความก้าวหน้าตามลำดับ ทำให้เชื่อว่าจะสามารถนำมาใช้ในทางปฏิบัติได้จริงในไม่ช้า(Wang *et al.,* 1998; Berggren *et al.,* 1999; Gooding, 2002; Drummond *et al.,* 2003; Lubin *et al.,* 2006; Lu *et al.,* 2008; Wongkaew and Poosttisak, 2008) มีการนำเสนอเทคนิคประกอบต่างๆเพื่อการนี้อย่างหลากหลาย แต่เทคนิคที่ค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดขณะนี้ได้แก่ดีเอ็นเอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ด้วยความสามารถในการแสดงผลและวิเคราะห์โดยวิธีเคมีไฟฟ้า จากผลของปฏิกิริยาในกระบวนการจดจำและจับคู่ได้อย่างเฉพาะเจาะจงของสารชีวโมเลกุลดังเช่นดีเอ็นเอเป็นต้น โดยการชักนำให้เกิดการจับคู่ของดีเอ็นเอบนผิวอีเล็กโทรดและตรวจผลของปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธีต่างๆเช่น Cyclic Voltammetry, Differntial Pulse Voltammetry, และ Amperometry (Hianik *et al.,* 2001; Cai *et al.,* 2002; Drummond *et al.,* 2003; Suye *et al.,* 2005) ความเสถียรของดีเอ็นเอเซนเซอร์และความไวของการแสดงผลขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรึงดีเอ็นเอบนผิวอิเล็กโทรด และสารประกอบที่ใช้ในการช่วยเพิ่มสัญญาณการแสดงผลปฏิกิริยา รวมทั้งวิธีการตรวจทางเคมีไฟฟ้า ขณะที่ความเที่ยงตรงหรือความเฉพาะเจาะจงของการตรวจสอบ ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดดีเอ็นเอตัวตรวจและเทคนิคการทำปฏิกิริยาจับคู่ของดีเอ็นเอคู่สม (DNA hybridization) สำหรับการทดลองใช้ดีเอ็นเอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า เพื่อตรวจสอบทางด้านพันธุกรรมตลอดจนการวินิจฉัยโรคและการตรวจเชื้อโรค พบว่าสามารถดำเนินการอย่างได้ผลในกรณีศึกษาต่างๆเป็นจำนวนมากเช่น การตรวจยีน Cecropin *CM4* ขนาด 108 เบส ด้วยการตรึงดีเอ็นเอบน cysteine modified gold electrode และตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Differential Pulse Voltammetry โดยใช้สาร Hoechst 33258 เป็นดัชนีแสดงผลปฏิกิริยาการจับคู่ของดีเอ็นเอ(Fan *et al.,* 2000) การตรวจ DNA polymorphisms ของยีน *CYP3A4* โดยการตรึงและตรวจปฏิกิริยาจับคู่ดีเอ็นเอบน gold electrode (Leonel *et al.,* 2003) การตรวจหายีน BAR ในข้าวโพดตัดแต่งพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน และยีน CP4 Epsps ในถั่วเหลืองตัดแต่งพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน จากการวัดปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าในสารละลาย methylene blue โดยวิธี Differential Pulse Voltammetry ด้วย stearic acid-modified carbon paste electrode ที่ใช้ตรึงดีเอ็นเอ (Ren *et al.,* 2003) การตรวจหาความเสียหายของคู่สายดีเอ็นเอที่เกิดจากสารก่อมะเร็งจำพวก styrene oxide จากการตรึงดีเอ็นเอบน polystyrene sulfonate – poly(diallyldimethyl ammonium) modified pyrolytic graphite electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าในสารละลาย methylene blue โดยวิธี Cyclic Voltammetry (Zhang and Hu 2007) การตรวจดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* และไวรัสตับอักเสบชนิด B (hepatitis B) โดยการตรึงและจับคู่บน carbon paste electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธี Chronopotentiometry โดยใช้ $Co(phen)^{+3}_{3}$ เป็นดัชนีแสดงผลปฏิกิริยาซึ่งสามารถตรวจปริมาณต่ำสุดได้ 3.4 nmole/l (Wang *et*

al., 1997; Erdem *et al.,* 1999) หรือตรวจดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบชนิด B โดยการตรึงและจับคู่บน glassy carbon electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธี AC impedance โดยใช้ $[Os(bpy)2Cl2]^{+}$ เป็น ดัชนีแสดงผลปฏิกิริยา (Zhao and Ju 2004) และการตรวจดีเอ็นเอขนาด 18-244 เบส ของไวรัสตับอักเสบชนิด C (hepatitis C) ด้วยการตรึงและจับคู่บน polypyrrole-modified microelectrode ซึ่งสามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างน้อยที่สุด 1.82×10^{-21} mole/ml จากการวัด Cyclic Voltammetry และ Constant Potential Amperometry (Riccardi *et al.,* 2008) การตรวจยีน *invA* ที่แสดงออกถึงความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย Salmonella จากการตรึงดีเอ็นเอที่ผิว carbon paste electrode และตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Amperometry โดยใช้ pyrroquainolinequinone-glucose dehydrogenase ติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจเพื่อช่วยเพิ่มสัญญาณการแสดงผล(Ikebukuro *et al.,* 2002) การตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Microcystis* spp. จากการตรึงดีเอ็นเอที่ผิว carbon paste electrode และตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Cyclic Voltammetry และ Differential Pulse Voltammetry ในสารละลาย methylene blue (Erdem *et al.,* 2002) การตรวจดีเอ็นเอสายสั้นของเชื้อไวรัสเอดส์ HIV-1 และเชื้อวัณโรค Mycobacterium ด้วยการตรึงและจับคู่บน N-[6-(thien-3-yl) acetotoxy]-pyrrolodine-2,5-dione modified gold electrode ซึ่งตรวจพบปริมาณต่ำสุดที่ 2×10^{-9} mole/l โดยวิธี Cyclic Voltammetry (Peng *et al.,* 2002) การทดลองตรวจดีเอ็นเอขนาด 1.35×10^{7} คู่เบสของยีสต์จากการตรึงดีเอ็นเอที่ผิว carbon paste electrode และตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Cyclic Voltammetry ในสารละลาย ferroceneum (Ju *et al.,* 2004) การตรวจเชื้อไวรัส SAR (severe acute respiratory syndrome) ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจที่ติดฉลากสาร sodium aurothiomalate โดยการตรึงและจับคู่บน glassy carbon electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Cyclic Voltammetry ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจพบและแยกแยะดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ในระดับ 3 เบส (three-based mismatch oligonucleotide) จากตัวอย่างปริมาณ 15 fmole ใน 30ul (de la Escosura-Muniz *et al.,* 2007) การตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เป็นสาเหตุโรคของระบบท่อปัสสาวะได้แก่ *Enterococus faecalis, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, pseudomonas aeruginosa,* และ *Proteus mirabilis* ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจชนิด16S rDNAติดฉลาก horseradish peroxidase-anti-fluorescein monoclonal Fab conjugate ที่ตรึงบน alkenethiolate-modified gold electrode แล้วตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าโดยวิธี Amperometry (Liao *et al.,* 2007) เหล่านี้เป็นต้น จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถนำวิธีการทางเคมีไฟฟ้าดังกล่าว มาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจเชื้อโรคใบขาวของอ้อย เพื่อให้ได้วิธีการที่ตรงกับความต้องการของทุกฝ่าย ที่ต้องการทั้งความแม่นยำเที่ยงตรง ความไวยิ่งยวด ความรวดเร็ว ความสามารถในการให้บริการในปริมาณมากทั้งในสภาพไร่และในห้องปฏิบัติการ พร้อมๆไปกับความประหยัด ความสะดวก ความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

สำหรับวัตถุประสงค์ในการวิจัยขั้นต้นครั้งนี้ เป็นการวิจัยเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของแนวคิดการตรวจโรคใบขาวของอ้อยด้วยดีเอ็นเอเซนเซอร์ และการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการตรวจดีเอ็นเอ โดยทำศึกษาวิธีการสกัดให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว และตรงต่อเป้าหมายที่ต้องการทำการทดลองตรวจสอบ การคัดเลือกวิธีการทางเคมีไฟฟ้าที่สามารถใช้สำหรับการตรวจจับสัญญาณชีวภาพของดีเอ็นเอ การทดสอบชนิดอิเล็กโทรดที่มีความไวในการวัดสัญญานไฟฟ้า การศึกษาวิธีการดัดแปลงขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารตัวนำไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการตรึงดีเอ็นเอ ได้อย่างมีเสถียรภาพ และการศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอดังกล่าว รวมทั้งศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวัดจำนวนหรือความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสัญญานเคมีไฟฟ้าได้อย่างชัดเจนในเชิงปริมาณ เพื่อประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่สมบูรณ์ได้ในลำดับต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชและเชื้อสาเหตุโรคที่ทดสอบ

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ที่พบการระบาดอย่างหนักในเขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี เพื่อใช้สำหรับการทดลองและสกัดดีเอ็นเอเป้าหมายจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวนั้น โดยเก็บตัวอย่างต้นอ้อยที่มีลักษณะอาการเป็นโรคอย่างชัดเจน คือต้นอ้อยที่มีใบขนาดเรียวเล็กลง และสีของใบกลายเป็นสีขาวตั้งแต่ยอดจนเกือบทั่วทั้งต้น บริเวณโคนต้นมีหน่ออ้อยที่เจริญขึ้นมาพร้อมการแตกกอของใบเรียวยาวขนาดเล็กสีขาว ทำการเก็บตัวอย่างและสำรองในกระถางเพาะชำ หรือด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับการตรวจสอบในขั้นต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค (sugarcane white leaf DNA) โดยคัดเลือกเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นกลางใบ (mid-rib) ของอ้อยเป็นโรค เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมามีการอยู่อาศัยเฉพาะภายในท่อลำเลียงอาหารของพืชเท่านั้น หั่นซอยเส้นกลางใบให้สะดวกต่อการบด แล้วนำมาบดในสารละลาย CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) แล้วสกัดดีเอ็นเอจากน้ำคั้นที่ได้ด้วยวิธี phenol-chloroform extraction ร่วมกับการใช้ proteinase K เพื่อขจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนออกจากดีเอ็นเอที่สกัดได้ ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายด้วย 0.01M TE buffer (1mM sodiumEDTA ใน 10mM trisHCL pH8.0) ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ SCWL-DNA ในเบื้องต้นโดยวิธี spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

ชนิดอิเล็กโทรดและการเตรียมผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรด

ทดลองตรวจสอบศักยภาพหรือความไวในการให้สัญญานไฟฟ้าของอิเล็กโทรด โดยทดสอบกับอิเล็กโทรดมาตรฐานสองชนิดคือ ชนิดที่เป็น glassy carbon electrode (GCE) และชนิดที่เป็น platinum electrode (PTE) ทำการจัดเตรียมอิเล็กโทรดให้พร้อมใช้งาน โดยการขัดผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดดังกล่าว ซึ่งแต่ละชนิดต่างก็มีขนาดรัศมีของผิวขั้ว 2 mm ขัดผิวหน้าขั้วนั้นด้วยสารแขวนลอยของผงอลูมินาขนาด 0.3 μM และด้วยขนาด 0.5 μM อีกครั้งบนผ้าขัดกำมะหยี่ จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน(deionized water) หรือที่เรียกว่าน้ำ DI จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วย acetone 3 ครั้ง แล้วทำความสะอาดต่อโดยการสแกนด้วยศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -200 และ +1500 mV ใน 0.05 M H_2SO_4 ที่อัตราการสแกน 40mV/s ประมาณ 10 นาที ในบรรยากาศไร้ออกซิเจนจากการไล่ออกแล้วแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจนจากถังพ่นแก๊ส เสร็จแล้วล้างขั้วผิวหน้าอิเล็กโทรดอีกครั้งด้วยน้ำ DI ในเครื่อง ultrasonicator ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ได้ผิวขั้วอิเล็กโทรดที่พร้อมต่อการใช้งานต่อไป

การเตรียมสารชีวภาพไคโตซานตัวนำไฟฟ้า

สารชีวภาพไคโตซานที่ใช้สำหรับการทดลองนี้ เตรียมจากการหมักและสกัดเปลือกกุ้งที่เป็นเศษกากเหลือจากอุตสาหกรรมประมงและส่งออกกุ้ง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ร่วมมือในการผลิตจากห้องปฏิบัติการบริษัทไบโอไลน์จำกัด จังหวัดชลบุรี และการตรวจรับรองบ่งชี้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยสารชีวภาพไคโตซานที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นไคโตซานชนิด 85%DD ($M_v = 2.27 \times 10^5$ Da) และ 95%DD ($M_v = 1.11 \times 10^5$ Da) ตามลำดับ

การเตรียมอิเล็กโทรดดัดแปลง

เตรียมสารละลายไคโตซานทดสอบ โดยทำการละลายสารชีวภาพไคโตซานแต่ละชนิดใน 1% acetic acid และใช้ความเข้มข้นของไคโตซานในอัตรา 1% ในสารละลาย 1% acetic acid นั้น แล้วนำมาหยดลงในปริมาณ 2 μl บนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดGCE และขั้วอิเล็กโทรดPTE พร้อมใช้งานที่เตรียมไว้ เมื่อสารละลายไคโตซานแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 25°C แล้ว จึงแช่ผิวหน้าขั้วลงใน 0.1 M NaOH ประมาณ 30 นาที จึงนำออกมาผึ่งให้แห้งสนิทตามธรรมชาติ ซึ่งทำให้ได้อิเล็กโทรดดัดแปลงไคโตซานบนGCE(chitosan-modified glassy carbon electrode) และPTE(chitosan-modified platinum electrode) ที่พร้อมสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป

การตรึงดีเอ็นเอบนอิเล็กโทรดดัดแปลง

ทำการตรึงดีเอ็นเอทดสอบ ซึ่งในที่นี้คือดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากต้นออ้ยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่อัตราความเข้มข้น 0.05 μg/ μl ใน 0.01M TE buffer แล้วหยดลงในปริมาณ 2 μl บนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE หรือ chitosan-modified PTE แต่ละชนิดทดสอบ และบ่มค้างคืนที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นล้างผิวหน้าขั้วด้วย 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) pH 7.0 ประมาณ 3 ครั้ง และน้ำ DI อีก 2ครั้ง เพื่อขจัดการปนเปื้อนอื่นๆบนผิวหน้าที่ตรึงดีเอ็นเอแล้ว

การติดตามอัตลักษณ์ของดีเอ็นเอด้วยสาร methylene blue (MB)

การใช้สาร methylene blue (MB) ที่มีความจำเพาะต่อเบส guanine ของดีเอ็นเอ ในการติดฉลากดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความเสถียร และเอกลักษณ์ทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE และ chitosan-modified PTE โดยเตรียมสารละลาย MB ความเข้มข้น 20 μM ใน 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 แล้วนำอิเล็กโทรดที่ต้องการตรวจสอบจุ่มในสารละลายMB ประมาณ 1 ชั่วโมงบนเครื่องหมุนความเร็วรอบต่ำประมาณ80-100 รอบต่อนาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างผิวหน้าขั้วด้วยสารละลาย 20 mM TBS pH 7.0 ประมาณ 10 วินาที จึงพร้อมต่อการตรวจวัดตามวิธีการทางเคมีไฟฟ้า

การวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าโดยวิธี cyclic voltammetry (CV) และวิธี Differential pulse voltammetry (DPV)

ทำการตรวจวัดค่ากระแสและศักย์ไฟฟ้าเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตามวิธี cyclic voltammetry (CV) และวิธี Differential pulse voltammetry (DPV) ด้วยเครื่อง EcoChemie Autolab PSTAT 30 ที่ควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GPES เวอร์ชั่น 5.9 ของบริษัท Metrohm Autolab B.V., Utrecht, ประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยใช้เซลล์ไฟฟ้าขนาด 10 ml ระบบอิเล็กโทรด 3 ขั้ว คือ อิเล็กโทรดใช้งาน (working electrode) ที่เป็น GCE หรือ PTE ซึ่งมีขนาดพื้นที่ผิวหน้าขั้ว 2 mm กับอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) ที่เป็น Ag/AgCl/3M KCl และเคาเตอร์อิเล็กโทรด (couter electrode) ที่เป็น platinum ทั้งนี้ก่อนการวัดค่าไฟฟ้าต้องทำการขจัดออกซิเจนจากสารละลายที่ใช้เป็น supporting electrolyte ออกให้หมด โดยการแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจนจากถังพ่นแก๊สอย่างน้อย 10 นาที

สำหรับการวัดค่าและวิเคราะห์โดยวิธี CV เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของอิเล็กโทรดปกติ อิเล็กโทรดดัดแปลง และการตรึงดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ supporting electrolyte 2 ชนิดคือ 1) 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6$ ในสารละลาย 0.1M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ในการใช้ศักย์ไฟฟ้าช่วงระหว่าง -0.2 ถึง +0.6 V ที่อัตราการสแกน 25, 50, 100, 150, และ 200 mV/s และ 2)

20 mM TBS pH 7.0 ในการใช้ศักย์ไฟฟ้าช่วงระหว่าง 0.0 ถึง -0.5 V ที่อัตราการสแกน 25, 50, 100, 150, และ 200 mV/s

ส่วนการวัดค่าสัญญานไฟฟ้าโดยวิธี DPV จากอิเล็กโทรดที่นำมาตรวจสอบ ทำการวัดใน supporting electrolyte ที่เป็นสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 และทำการวัดกระแสที่เกิดขึ้นในศักย์ไฟฟ้าช่วงระหว่าง 0.0 ถึง -0.5 V

การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope)

ทำการตรวจสอบอัตลักษณ์ของดีเอ็นเอ ที่ถูกตรึงด้วยสารชีวภาพไคโตซานบนพื้นผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(กล้องAFM)ที่มีความละเอียดระดับนาโนเมตร ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องจากบริษัทโคแอกซ์ กรุป คอร์ปอเรชั่น จำกัด กรุงเทพฯ เครื่องที่ใช้เป็นโมเดล XE-70 (Park Systems Corp., Suwon, Korea) ซึ่งเชื่อมต่อกับระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมด้วยโปรแกรม XEP และโปรแกรม XEI และตั้งค่าความเที่ยงของหัวสแกน 0.2 nM ที่ 12 μM ด้วยระบบ trye non-contact mode และ cantilevers ที่เป็น PPP-NCHR silicon ขนาดรัศมีของ tip < 10 nM และแรงอะตอมคงที่ 42 N/m (Nanosensors TM, Neuchâtel, Switzerland)

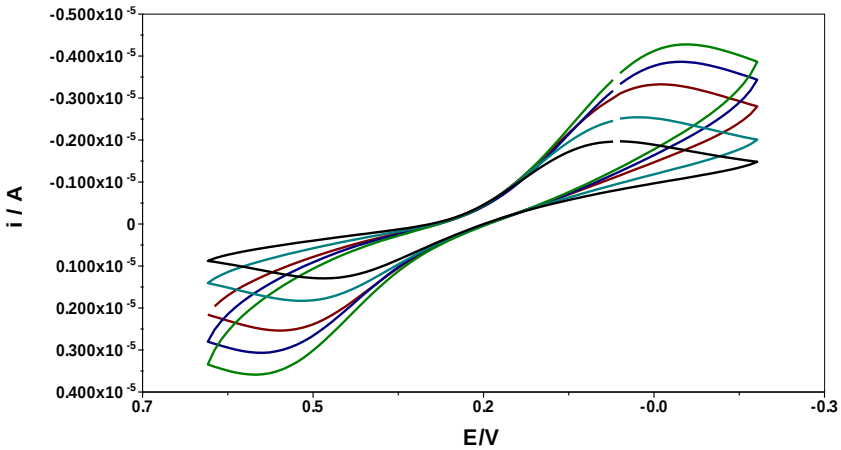
ผลการทดลอง

โรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาและการสกัดดีเอ็นเอ

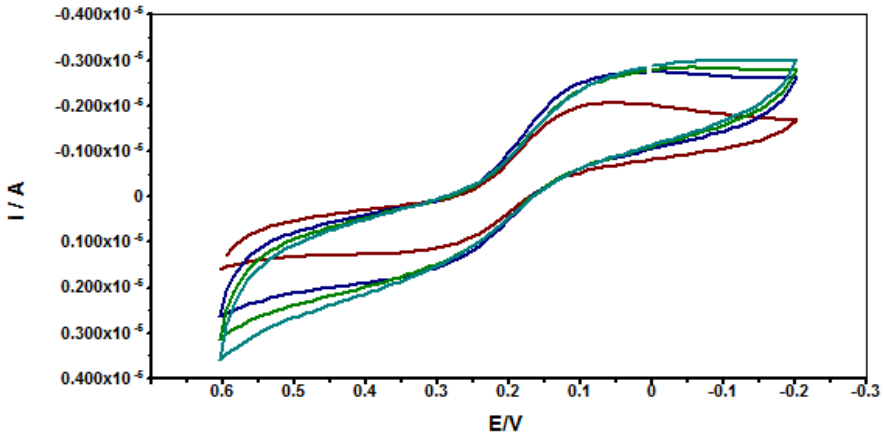
ผลการสำรวจและตรวจเก็บอย่างต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวจากไร่อ้อย ในเขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ซึ่งเป็นเขตเพาะปลูกที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง สามารถเก็บตัวอย่างต้นอ้อยที่มีลักษณะอาการเป็นโรคอย่างชัดเจน และสำรองตัวอย่างโรคเพื่อใช้สำหรับการทดลองและสกัดดีเอ็นเอเป้าหมายจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวนั้น ด้วยการปักชำและเพาะเลี้ยงส่วนตาหน่อ ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป ในส่วนของการทดสอบเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีการต่างๆ พบว่าการสกัดด้วยวิธี phenol-chloroform extraction จากตัวอย่างบดใน CTAB buffer ให้ผลลัพธ์ดีเอ็นเอของดีเอเอจากอ้อยเป็นโรคใบขาว(SCWL-DNA) ที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าวิธีการอื่นๆรวมทั้งวิธี solid phase extraction ด้วย column kit เช่น DNeasy Kit แบบสำเร็จรูปที่มีการจำหน่ายเป็นการค้าโดยทั่วไปเป็นอย่างมาก คือสามารถทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ระดับความบริสุทธิ์ถึง 1.8-1.9 เมื่อเทียบจากการวัดอัตราดูดกลืนแสงที่A_{260} / A_{280} ตามมาตรฐาน

สมบัติทางไฟฟ้าเคมีของอิเล็กโทรดGCE และอิเล็กโทรดPTE

ในการทดสอบสมบัติการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดGCE เปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดPTE ในสภาพปกติ เมื่อทำการตรวจวัดโดยวิธี cyclic voltammetry (CV) พบว่าได้ผลการวัดในรูปของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแส(I) และศักย์ไฟฟ้า (E) ในระบบ supporting electrolyte ของ 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6$ ในสารละลาย 0.1M PBS pH 7.0 ที่มีการแลกเปลี่ยน ferri-ferro ion ในเซลล์ไฟฟ้า ดังภาพที่ 1 เป็นกราฟ CV ของGCEปกติ เมื่อทำการสแกนในแต่ละอัตราการสแกนคือ 25, 50, 100, 150, และ 200 mV/s ขณะที่ภาพที่ 2 เป็นกราฟ CV จากการสแกนในแต่ละอัตราการสแกนทั้ง 5 อัตราเช่นกัน ของอิเล็กโทรดPTE จากผลการทดลองทำให้สามารถสรุปได้ว่าอิเล็กโทรดทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นฐานการตรวจสอบพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าแบบต่างๆ



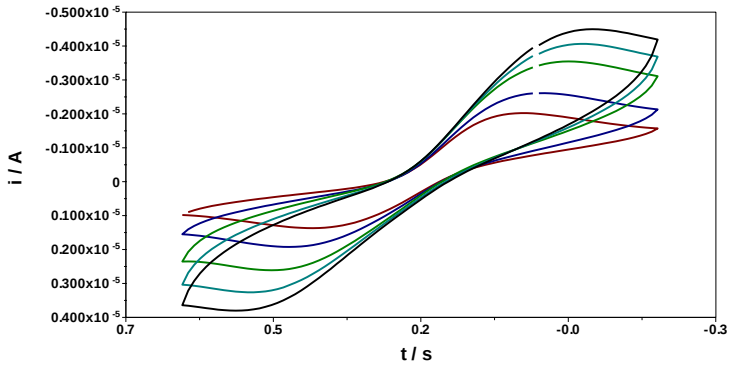
ภาพที่ 1 กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon (GCE) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$ / $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



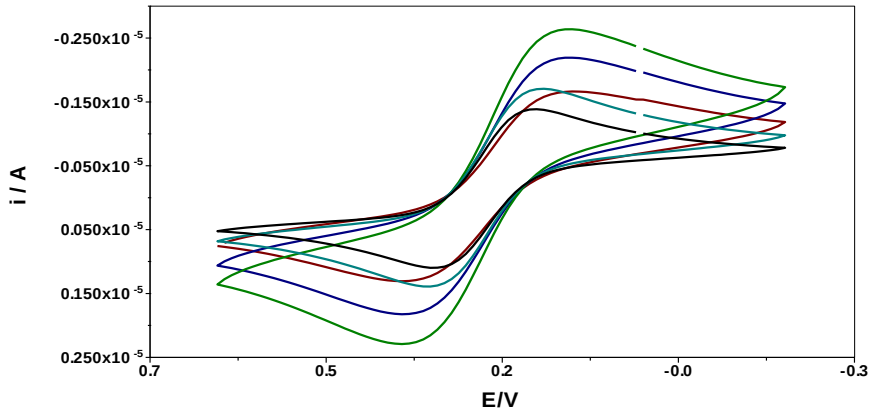
ภาพที่ 2 กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรด platinum (PTE) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$ / $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C

สมบัติทางไฟฟ้าเคมีของอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE และอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified PTE

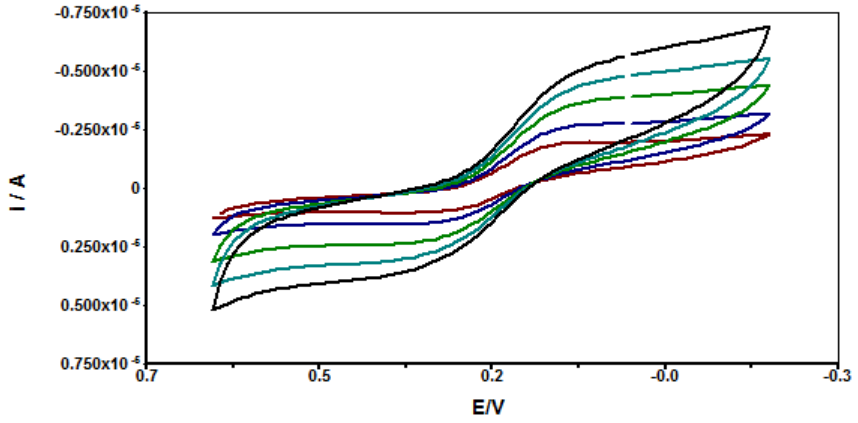
จากการตรวจสอบสมบัติการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลง ด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 85%DD หรือ 95%DD GCE บนผิวหน้าอิเล็กโทรดGCE กับผิวหน้าอิเล็กโทรด PTE เมื่อทำการตรวจวัดโดยวิธี cyclic voltammetry (CV) พบว่าได้ผลการวัดในรูปของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแส(I) และศักย์ไฟฟ้า (E) ในระบบ supporting electrolyte ของ 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6$ ในสารละลาย 0.1M PBS pH 7.0 ที่มีการแลกเปลี่ยน ferri-ferro ion ในเซลล์ไฟฟ้า ดังภาพที่ 3 เป็นกราฟ CV ของอิเล็กโทรดดัดแปลง 85%DD chitosan-modified GCE เมื่อทำการสแกนในแต่ละอัตราการสแกนคือ 25, 50, 100, 150, และ 200 mV/s และภาพที่ 4 เป็นกราฟ CV จากการสแกนในแต่ละอัตราการสแกน ของอิเล็กโทรดดัดแปลง 95%DD chitosan-modified GCE ขณะที่ภาพที่5 เป็นกราฟ CV จากการสแกนในแต่ละอัตราการสแกนดังกล่าว ของอิเล็กโทรดดัดแปลง 95%DD chitosan-modified PTE



ภาพที่ 3 กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon(GCE) ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 85% deacetylation degree (chitosan 85DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



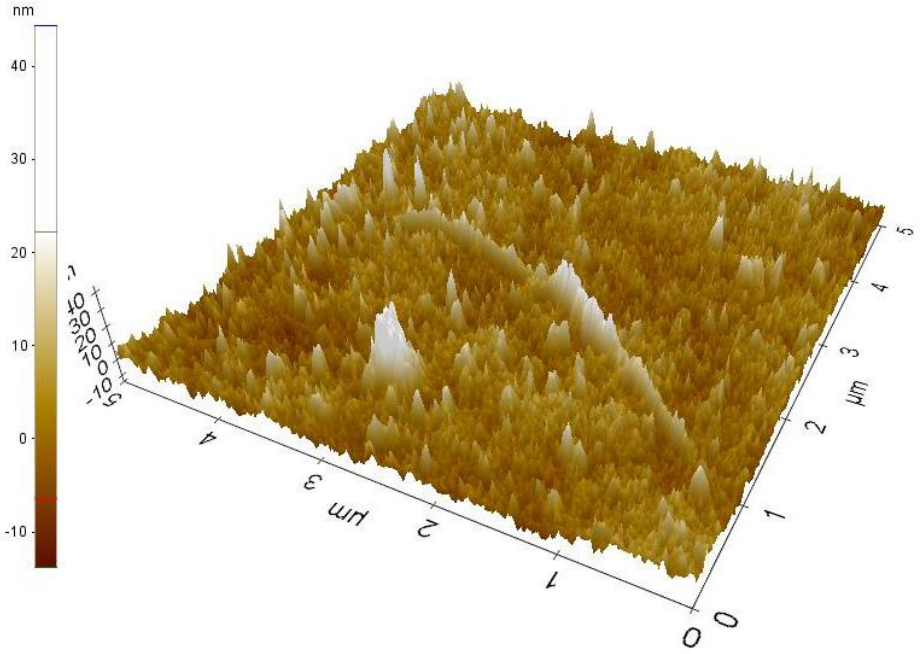
ภาพที่ 4 กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon(GCE) ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 95DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



ภาพที่ 5 กราฟ cyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดplatinum(PTE) ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 95DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C

ความสำเร็จในการตรึงดีเอ็นเอที่ถูกตรึงด้วยสารชีวภาพไคโตซานบนอิเล็กโทรดดัดแปลง

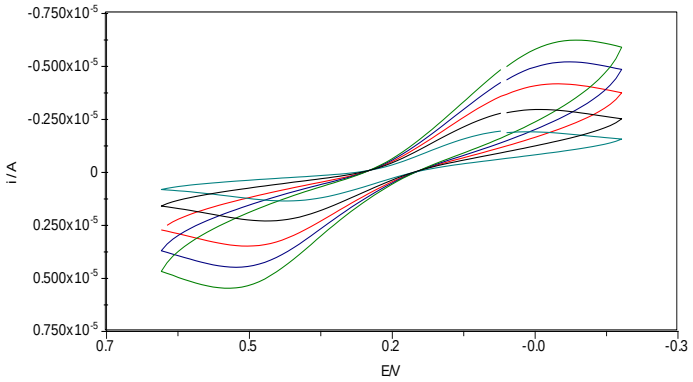
จากการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(Atomic force microscope) ตรวจสอบโครงสร้างพื้นผิวในระดับจุลภาคหรือระดับนาโนภาค เพื่อตรวจสอบผลการตรึงดีเอ็นเอ SCWL-DNA บนผิวหน้าขั้วฟิล์มบางของสารชีวภาพไคโตซานที่ใช้เคลือบดัดแปลงอิเล็กโทรดจับสัญญานไฟฟ้า พบว่า สามารถตรวจพบดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบคือ SCWL-DNA ที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) ถูกตรึงอยู่บนผิวหน้าฟิล์มบางไคโตซานดังกล่าวอย่างชัดเจน และยังสามารถวัดขนาดความหนาของเส้นสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA นี้ได้ว่ามีขนาดประมาณ 10-15 นาโนเมตร ดังปรากฏในภาพที่ 6



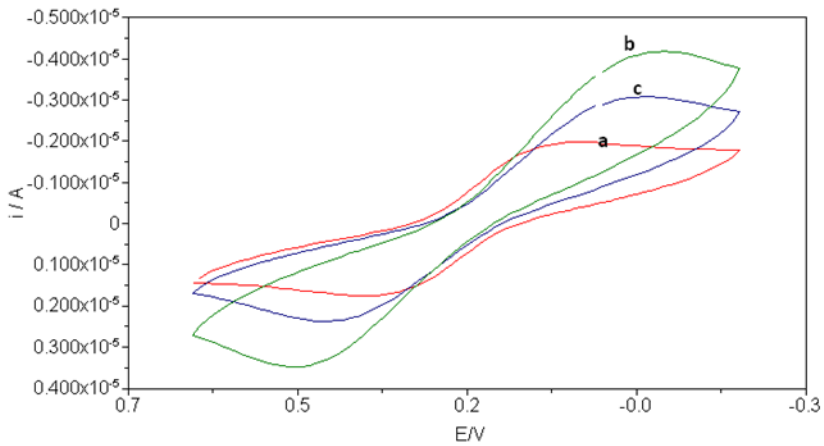
ภาพที่ 6 ภาพดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนฟิล์มบางไคโตซาน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope) ซึ่งสามารถตรวจพบดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA ที่วัดขนาดความหนาของเส้นสายดีเอ็นเอได้ว่ามีขนาดประมาณ 10-15 นาโนเมตร

พฤติกรรมทางไฟฟ้าเคมีของดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE

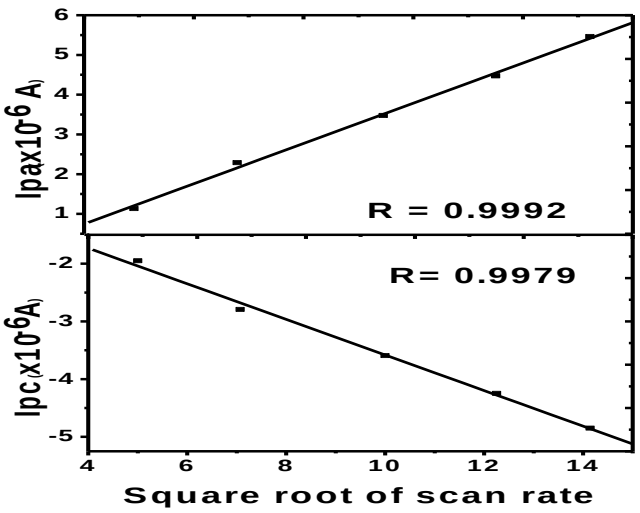
ผลการวัดค่าของกระแสอะโนด (Ipa) และกระแสคะโทด (Ipc) ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.2 ถึง + 0.8 V ในระบบ supporting electrolyte เป็น $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s พบว่ามีค่าบ่งชี้ทางเคมีไฟฟ้าแตกต่างกันออกไป โดยสามารถนำมาเปรียบเทียบเพื่อแสดงความสัมพันธ์ในระดับต่างๆได้ ดังภาพที่ 7 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้หลังการตรึง SCWL-ssDNA บนอิเล็กโทรดดัดแปลงนี้ จากการสแกนด้วยอัตราและระบบ supporting electrolyte ข้างต้น ขณะที่ภาพที่8 เป็นกราฟ CVที่แสดงผลเปรียบเทียบกระแสและศักย์ไฟฟ้าของปฏิกิริยา redox ที่เกิดขึ้นเมื่อทำการวัด GCE (a) กับอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน(b) และสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน (c)ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s และภาพที่ 9 เป็นกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) จากปฏิกิริยา redox ของ SCWL-ssDNA ของกระแสอะโนด(Ipa) และกระแสคะโทด (Ipc) จากการวัดในแต่ละอัตราการสแกนที่ 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยมีค่า R ของ Ipa และ Ipc เป็น 0.9992 และ 0.9979 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM K3Fe(CN)63-/ K3Fe(CN)64- ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



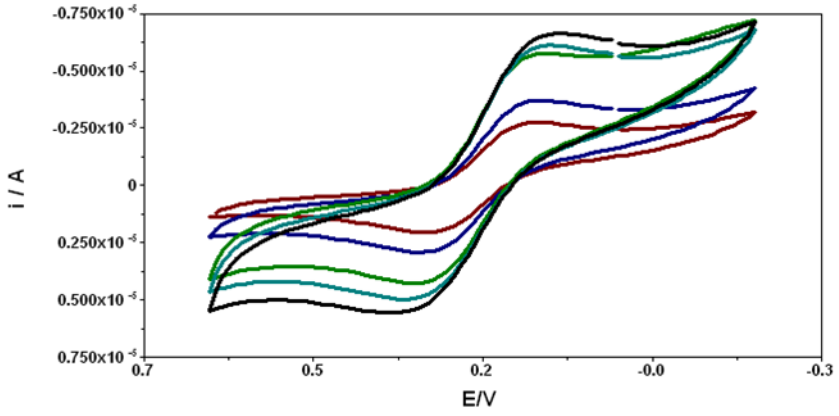
ภาพที่ 8 กราฟ cyclic voltammogram แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างอิเล็กโทรดGCEเปลือย(a) กับอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน(b) และสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน(c) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



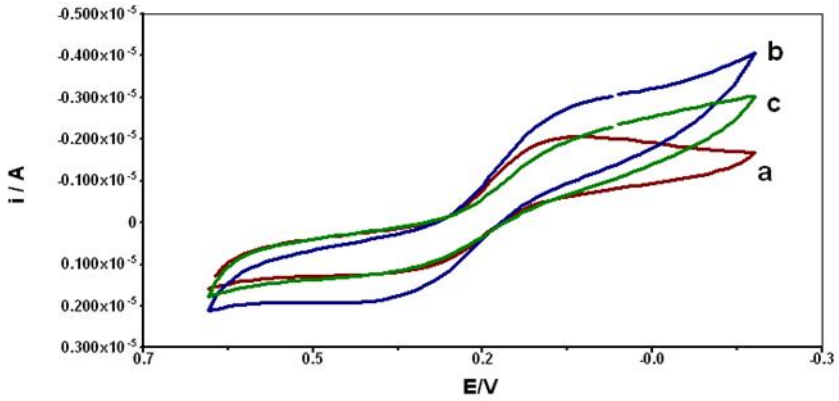
ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (Ipa) และกระแส reduction(Ipc) ของสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซานที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 25. 50. 100. 150. และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM K3Fe(CN)63-/ K3Fe(CN)64- ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C

พฤติกรรมทางไฟฟ้าเคมีของดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified PTE

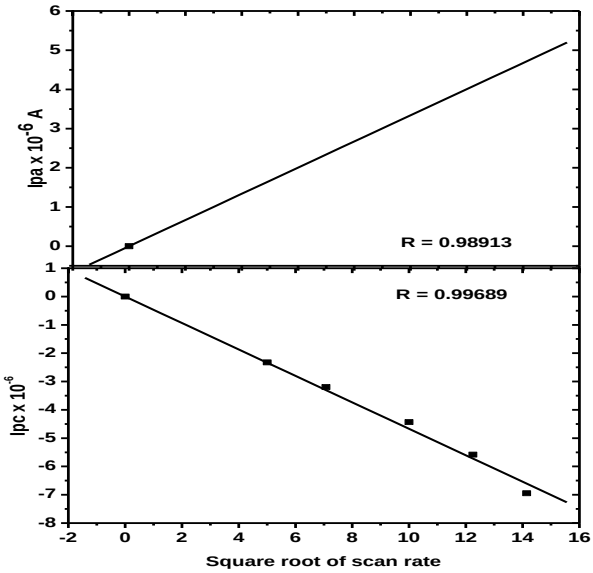
ในการวัดค่าของกระแสอะโนด (Ipa) และกระแสคะโทด (Ipc) ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.2 ถึง + 0.8 V ในระบบ supporting electrolyte เป็น $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s พบว่ามีค่าบ่งชี้ทางเคมีไฟฟ้าแตกต่างกันออกไป โดยสามารถนำมาเปรียบเทียบเพื่อแสดงความสัมพันธ์ในระดับต่างๆได้ ดังภาพที่ 10 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้หลังการตรึง SCWL-ssDNA บนอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified PTE จากการสแกนด้วยอัตราและระบบ supporting electrolyte ข้างต้น ขณะที่ภาพที่11 เป็นกราฟ CVที่แสดงผลเปรียบเทียบกระแสและศักย์ไฟฟ้าของปฏิกิริยา redox ที่เกิดขึ้นเมื่อทำการวัด PTE (a) กับอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน(b) และสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน(c)ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s และภาพที่ 12 เป็นกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) จากปฏิกิริยา redox ของ SCWL-ssDNA ของกระแสอะโนด(Ipa) และกระแสคะโทด (Ipc) จากการวัดในแต่ละอัตราการสแกนที่ 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยมีค่า R ของ Ipa และ Ipc เป็น 0.98913 และ 0.99689 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบค่าของกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้ของปฏิกิริยา redox ที่เกิดขึ้น ณ อัตราการสแกน 100 mV/s ของอิเล็กโทรดทั้งชนิด GCE และ PTE ก่อนและหลังการดัดแปลงด้วยสารโพลิเมอร์ธรรมชาติไคโตซาน และหลังจากการตรึง SCWL-ssDNA แล้ว ก็สามารถสรุปผลที่ได้ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 10 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรด platinum ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM K3Fe(CN)63-/ K3Fe(CN)64- ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



ภาพที่ 11 กราฟ cyclic voltammogram แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างอิเล็กโทรดPTEเปลือย(a) กับอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน(b) และสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน(c) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C



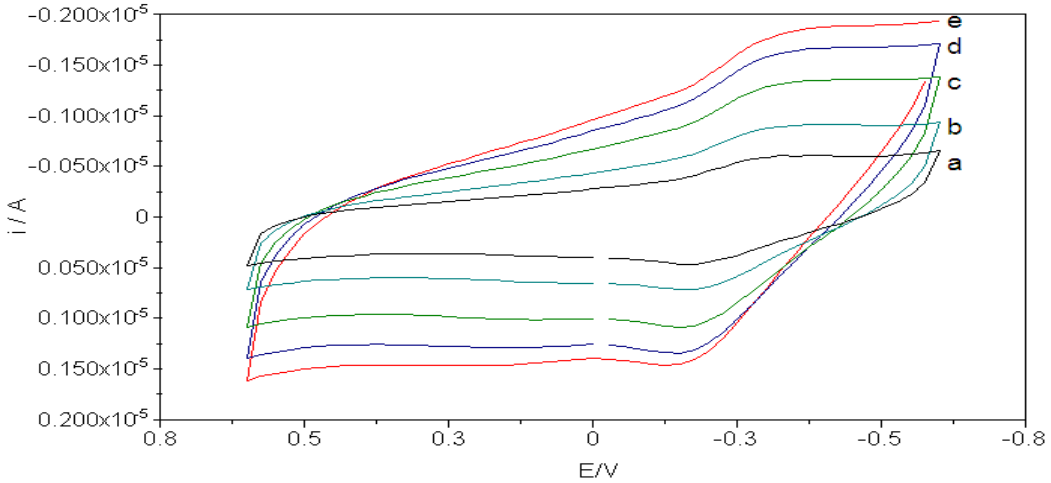
ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (Ipa) และกระแส reduction(Ipc) ของสัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดPTEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซานที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 25, 50, 100, 150, และ 200 mV/s ในระบบสารละลาย 1.0 mM K3Fe(CN)63-/ K3Fe(CN)64- ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C

ตารางที่ 1 ค่าของกระแสและศักย์ไฟฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบสารละลาย 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ ใน 0.1 M PBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C จากการวัดอิเล็กโทรดชนิด glassy carbon (GCE) อิเล็กโทรดชนิด platinum (PTE) อิเล็กโทรด GCE กับ PTE ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน และการวัดหลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็ดโทรดดัดแปลงแต่ละชนิด

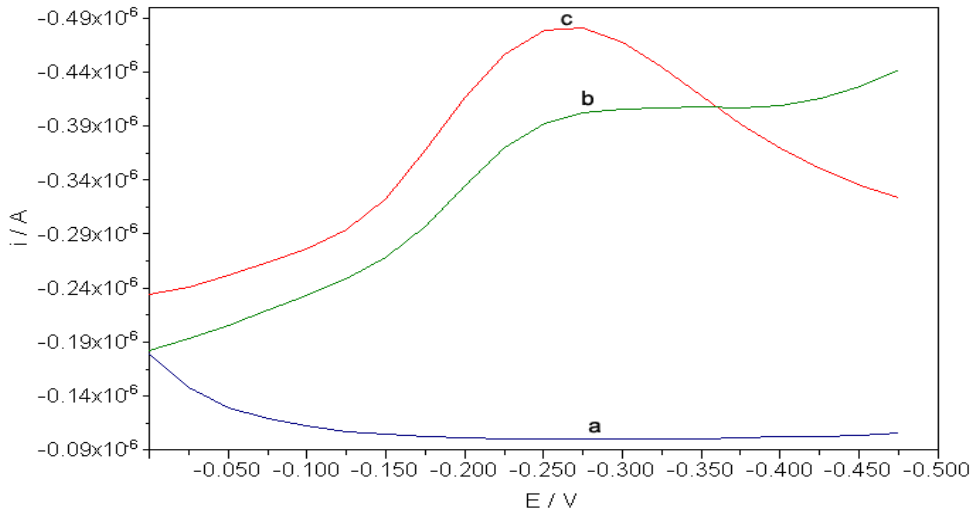
Electrode species	E_{pa} (V/SCE)	I_{pa} (µA)	E_{pc} (V/SCE)	I_{pc} (µA)	I_{pa}/I_{pc}	ΔE_p	$\Delta E_p/2$
Bare GCE	0.5136	2.4136	-0.0806	-3.3255	0.7258	0.4330	0.2165
GCE-Chitosan	0.4229	1.4297	0.01007	-2.0837	0.7879	0.4129	0.2065
GCE-Chitosan-ssDNA	0.4129	2.3697	0.01007	-2.8592	0.8288	0.4028	0.2014
Bare PTE	0.6043	2.6404	0.0	-2.7487	0.9606	0.6546	0.3273
PTE-Chitosan	0.6043	4.1141	-2.0142	-7.1960	0.5717	0.8057	0.4028
PTE-Chitosan-ssDNA	0.6043	3.1046	-2.0142	-4.4333	0.7003	0.8057	0.4028

การตอบสนองของ chitosan-modified GCE ที่มีการตรึง SCWL-ssDNA ต่อสาร Methylene blue ที่เป็น DNA intercalator

ในการตรวจสอบพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของ SCWL-ssDNA ที่ตรึงอยู่บน chitosan-modified GCE จากการติดฉลากดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยสาร methylene blue (MB) ซึ่งใช้เป็น DNA intercalator ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอโดยเฉพาะส่วนที่เป็นเบส guanine และสามารถใช้เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redoxของดีเอ็นเอในระบบ supporting electrolyte เป็น tris buffer saline pH 7.0 นี้ ทำให้ได้ค่าความสัมพันธ์ของกระแสและศักย์ไฟฟ้าในรูปแบบของ cyclic voltammogram ดังภาพที่13 ซึ่งแสดงจุดสูงสุด (peak)ของกระแส Ipa และ (Ipc) ณ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่จุดหนึ่งซึ่งเป็นค่าจำเพาะของปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับMB คือตำแหน่ง Ep ที่ประมาณ -0.25V ในแต่ละรอบของการสแกนที่ 25, 50, 100, 150, และ 200 mV/s และเมื่อทำการตรวจสอบปฏิกิริยา redox ที่เกิดขึ้น จากการวัดโดยวิธี differential pulse (DPV) ก็สามารถตรวจพบการปรากฏขึ้นของค่าสูงสุดหรือ peak ของกระแส I ณ ตำแหน่ง Ep ที่จำเพาะนั้นคือที่ตำแหน่งประมาณ -0.25V เช่นกัน ขณะที่ไม่ปรากฏว่ามี peak ของกระแส I เกิดขึ้นจากการวัด GCEเปลือย และ chitosan-modified GCE แต่อย่างใด ดังกราฟเปรียบเทียบในภาพที่ 14



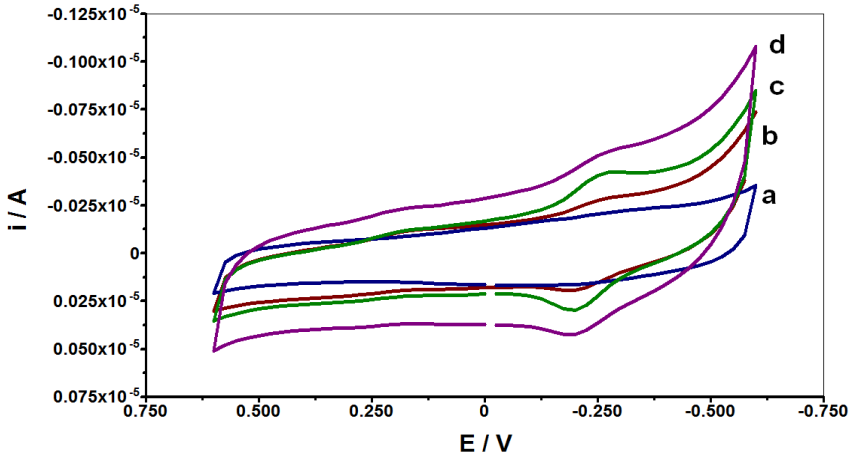
ภาพที่ 13 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรด GCE ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซาน ในระบบ redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s (จาก a ถึง e) ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0



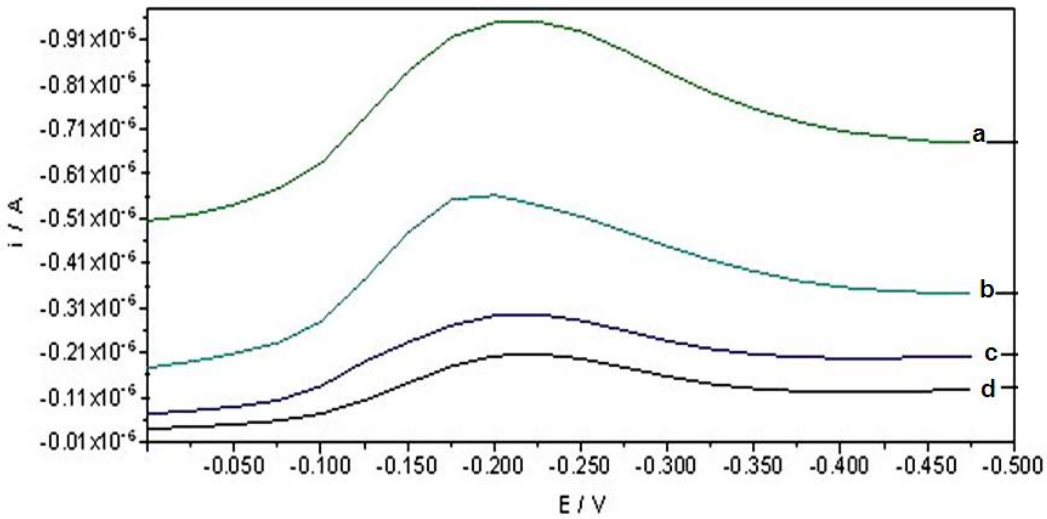
ภาพที่ 14 กราฟ Differential pulse voltammetry (DPV) ในระบบ redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 โดย (a) = อิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานไคโตซาน, (b) =อิเล็กโทรดGCEเปลือย, (c) =สัญญานที่ได้หลังการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ SCWL-DNA บนอิเล็กโทรดGCEดัดแปลงด้วยสารชีวภาพไคโตซาน

การวิเคราะห์ในเชิงปริมาณของดีเอ็นเอโดยวิธีเคมีไฟฟ้า

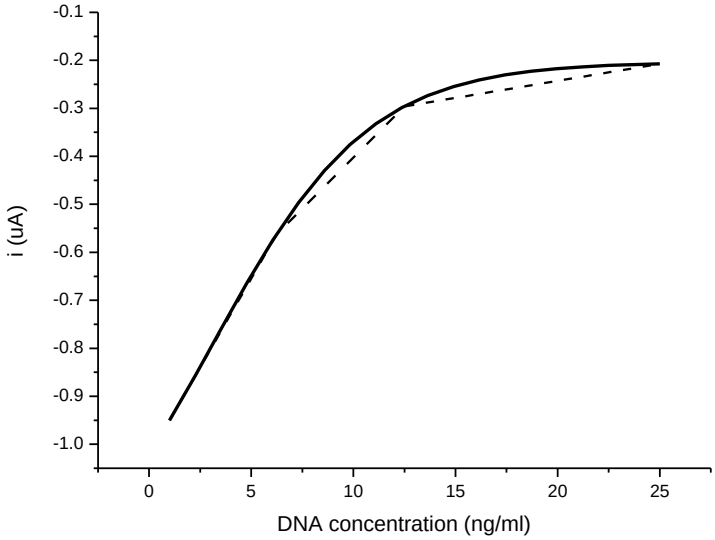
จากการตรวจวัดปฏิกิริยา redox ที่ตอบสนองต่อสาร intercalater MB ของดีเอ็นเอ ข้างต้น เมื่อทำการตรวจวัดโดยใช้ดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือตั้งแต่ 0-25 ng/ml พบว่าค่าของการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าทั้งในรูปแบบ cyclic voltammetry และ differential pulse voltammetry มีค่ากระแสเพิ่มสูงขึ้นหรือลดหลั่นกัยไปตามระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยเฉพาะค่าที่วัดได้จาก DPV ซึ่งเมื่อทำการวัดดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว (SCWL-DNA) ในระดับความเข้มข้นต่างๆดังกล่าว ทำให้สามารถใช้ความสัมพันธ์นี้ในการตรวจหาค่า EC_{50} ของ SCWL-DNA ที่ใช้สำหรับการตรึงบนพื้นผิว chitosan-modified GCE ได้ ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 1.38344 E-21 บนพื้นผิวขนาดรัศมี 2 mm และในทำนองเดียวกันก็สามารถวัดหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ได้จากค่าความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเมื่อเทียบเป็นค่า log ความเข้มข้น กับค่ากระแส peak ของ DPV จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator ซึ่งมีสมการความสัมพันธ์ regression เป็น Y = -0.95669+0.5286X, และค่า R = 0.9916 ดังผลการทดลองในภาพที่ 15, 16, 17, และ 18 ตามลำดับ



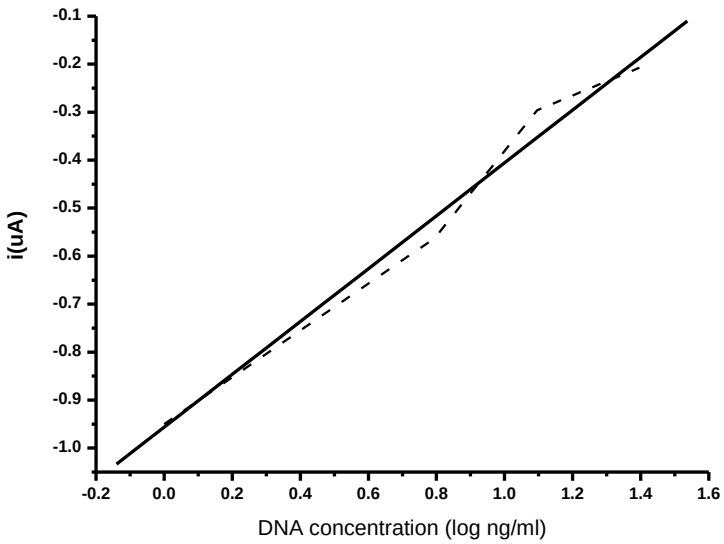
ภาพที่ 15 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้จากปฏิกิริยา redox ในระบบ redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการตรวจสารละลายของดีเอ็นเอสายคู่(dsDNA)จากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 0 (a), 1 (b), 6.25(c), และ 12.5(d) ng/ml จากการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0



ภาพที่ 16 กราฟ differential pulse voltammogram ที่ได้จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator เมื่อทำการตรวจสารละลายของดีเอ็นเอสายคู่(dsDNA)จากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 1 (a), 6.25 (b), 12.5(c), และ 25(d) ng/mlจากการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s ในระบบสารละลาย 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0



ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ Dose response curve ที่ได้จากการวัดสัญญาณ DPV จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator ของสารละลายดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 1-25 ng/ml ทำให้ได้ค่า EC_{50} ของดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการตรึงบนพื้นผิว template เท่ากับ 1.38344E-21



ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเมื่อเทียบเป็นค่า log ความเข้มข้น กับค่าสัญญาณ DPV จากปฏิกิริยา redox ที่ใช้สาร methylene blue เป็น DNA intercalator ทำให้ได้สมการความสัมพันธ์ regression เป็น Y = -0.95669+0.5286X, และค่า R = 0.9916

วิจารณ์

จากการตรวจสอบคุณสมบัติการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรด 2 ชนิดคือ ชนิด glassy carbon (GCE) และชนิด platinum (PTE) ด้วยการวัดผลการตอบสนองในอิเล็กโตรไลท์มาตรฐาน 1.0 mM $K_3Fe(CN)_6$ ใน 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.0 สามารถบ่งชี้ประสิทธิภาพการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดทั้งสองชนิดได้อย่างชัดเจน แม้มีรูปแบบของ cyclic voltammogram (CV) แตกต่างกัน ดังภาพที่ 1 ซึ่งเป็นกราฟ CV จากการวัด GCE และ ภาพที่ 2 ซึ่งเป็นกราฟจากการวัด PTE แต่ก็แสดงถึงระดับการเกิดกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยา redox ที่เกิดขึ้นระหว่างการวัดในอิเล็กโตรไลท์มาตรฐานได้เป็นอย่างดี และเมื่อทำการดัดแปลงอิเล็กโทรด GCE และPTE โดยการเคลือบพื้นผิวหน้า glassy carbon และ platinum ด้วยสารโพลิเมอร์ชีวภาพไคโตซาน แล้วตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธี cyclic voltammetry ในอิเล็กโตรไลท์มาตรฐานนั้น พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงดังกล่าวยังคงความสามารถในการนำไฟฟ้า แต่มีระดับการตอบสนองของการเกิด peak ของกระแสในศักย์ไฟฟ้าที่กำหนดเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะเฉพาะตัวของอิเล็กโทรดดัดแปลงแต่ละชนิด จากการเปรียบเทียบลักษณะของกราฟ CV ที่เกิดขึ้นทั้งจากการวัดอิเล็กโทรด GCE ที่เคลือบสารไคโตซานชนิด 85%DD และอิเล็กโทรด GCE ที่เคลือบสารไคโตซานชนิด 95%DD กับอิเล็กโทรด PTE ที่เคลือบด้วยสารไคโตซานชนิด 95%DD ดังภาพที่ 3,4, และ 5 ตามลำดับ โดยมีลักษณะรูปแบบความสัมพันธ์ของกระแส (I) และศักย์ไฟฟ้า (E) ที่เกิดขึ้น ชี้ให้เห็นถึงความเสถียรและการแพร่กระจายอย่างสม่ำเสมอของฟิล์มบางไคโตซานบนอิเล็กโทรด GCE และ PTE ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์ในการทดลองครั้งนี้ เป็นไปในลักษณะเคียงกันกับการศึกษาของ Xu, *et al.* (2001) และ Liu and Hu (2007) ที่สรุปว่าการดัดแปลงอิเล็กโทรดทั้งที่เป็นชนิด gold electrode และ graphite electrode ด้วยการเคลือบสารไคโตซานชนิด chitosan oligomer ให้ผลการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าในระดับที่ต้องการได้เช่นเดียวกัน

เมื่อทำการทดลองตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เตรียมได้จากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว (SCWL-ssDNA) บนอิเล็กโทรดดัดแปลงด้วยสารโพลิเมอร์ชีวภาพไคโตซานชนิด 95%DD ด้วยวิธี self assembly ตามคุณสมบัติการเป็นประจุบวกของสารไคโตซาน ที่สามารถยึดเหนี่ยวกับประจุลบของดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบความสำเร็จของการตรึงดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope) ซึ่งใช้ในการตรวจสอบพื้นผิวอย่างละเอียดในระดับนาโนภาค ก็สามารถยืนยันความสำเร็จของการตรึงได้จากภาพที่ปรากฏในภาพที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นเส้นสายของ SCWL-ssDNA ถูกตรึงอยู่บนโครงข่ายของฟิล์มบางไคโตซานอย่างชัดเจน สำหรับการพิสูจน์คุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE และ chitosan-modified PTE ที่ได้ทำการตรึง SCWL-ssDNA แล้วนั้น ทำการวิเคราห์ด้วยวิธี cyclic voltammetry ในอิเล็กโตรไลท์มาตรฐานข้างต้น ก็พบว่ามีการแสดงผลยืนยันความสำเร็จในการตรึงดีเอ็นเอนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน ดังรูปแบบ cyclic voltammogram ที่ได้จากการสแกนที่ 25, 50, 100, 150 และ 200 mv/s ของ chitosan-

midified GCE ที่ได้ตรึง SCWL-ssDNA แล้ว ในภาพที่ 7 และการเปรียบเทียบระดับกระแส (I) ของกราฟ CV จากการวัด GCE กับ chitosan-modified GCE และ chitosan-modified GCE ที่ตรึง SCWL-ssDNA ในภาพที่ 8 และจากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง (Linear regression analysis) ระหว่างกระแสทั้งในช่วงอะโนด (Ipa) และช่วงคะโทด (Ipc) ของอิเล็กโทรด chitosan-modified GCE ที่ตรึง SCWL-ssDNA ดังภาพที่ 9 ชี้ให้เห็นว่าเป็นลักษณะของการตรึงดีเอ็นเอที่มีความเสถียรสูงมาก และในทำนองเดียวกันนี้ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์การตรึงดีเอ็นเอ SCWL-ssDNA บน chitosan-modified PTE ก็สามารถพิสูจน์ความสำเร็จของการตรึงดีเอ็นเอดังกล่าวได้อย่างมีเสถียรภาพ ดังรูปแบบกราฟ CV ในแต่ละอัตราการสแกนในภาพที่ 10 และการเปรียบเทียบระดับกระแส (I) ในปฏิกิริยา redox ที่อัตราการสแกน 100 mV/s จาก CV ของ PTE กับ chitosan-modified PTE และ chitosan-modified PTE ที่ตรึง SCWL-ssDNA แล้วในภาพที่ 11 และกราฟแสดงความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างกระแส Ipa และ Ipc ที่พบหลังการตรึงดีเอ็นเอนี้ ในภาพที่ 12 นอกจากนี้ค่าที่ได้จากการวัดกระแส Ipa และ Ipc กับศักย์ไฟฟ้า Epa และ Epc ของอิเล็กโทรด GCE และ PTE ที่วัดก่อนและหลังการดัดแปลงด้วยสารโพลิเมอร์ชีวภาพไคโตซาน(chitosan-modified electrode) และหลังจากการตรึงดีเอ็นเอบน chitosan-modified electrode นั้นๆ ดังสรุปในตารางที่ 1 ยังแสดงถึงศักยภาพของอิเล็กโทรด GCE และ PTE ในการใช้เป็นฐานการวัดพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าได้อย่างไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน ดังนั้นจึงสามารถใช้อิเล็กโทรดทั้งสองชนิด สำหรับการตรวจวัดคุณสมบัติและการสร้างฐานของดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากอิเล็กโทรดชนิด PTE มีราคาที่สูงกว่าชนิด GCE มาก ในการทดลองลำดับต่อไปจึงพิจารณาใช้อิเล็กโทรดชนิด GCE เป็นหลักสำหรับการศึกษาเพื่อสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ของการตรวจโรคใบขาวของอ้อยนี้

ในด้านการศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของ SCWL-ssDNA ที่ตรึงอยู่บน chitosan-modified GCE โดยใช้สาร methylene blue (MB) เป็นดัชนีแสดงการเกิดขึ้นของปฏิกิริยา redox ที่จำเพาะต่อชนิดของดีเอ็นเอ จากการวัดในอิเล็กโตรไลท์ Tris buffer saline pH 7.0 ทำให้ตรวจพบการเกิดความสัมพันธ์ของกระแส I และศักย์ไฟฟ้า E ณ จุดที่เป็นตำแหน่งจำเพาะ โดยมีจุดสูงสุด (peak) ของค่า I ณ ตาแหน่ง Ep เท่ากับ -0.25V ทั้งในการตรวจวัดแบบ cyclic voltammetry (CV) และ differential pulse voltammetry (DPV) ซึ่งบ่งชี้การมีอยู่ของดีเอ็นเอดังกล่าวอย่างชัดเจน ดังการเปรียบเทียบกราฟของกระแส I และศักย์ไฟฟ้า E ของ GCE กับ chitosan-modified GCE และ chitosan-modified GCE ที่ตรึงดีเอ็นเอ SCWL-ssDNAแล้ว ดังภาพที่ 13 และภาพที่ 14 ตามลำดับ อันเป็นผลจากคุณสมบัติของการเป็น guanine oxidation และ redox indicator ของ MB ที่จำเพาะต่อเบสนี้ (Moa *et al*., 2008; Henry *et al*., 2009)

และจากปรากฏการณ์เกิด peak ของกระแส I ณ ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้า E ที่จำเพาะระหว่างดีเอ็นเอกับสาร MB นี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่อเนื่อง ในการศึกษาเชิงปริมาณของดีเอ็นเอบนพื้นผิวของอีเล็กฌดทรดดัดแปลงนี้ได้เป็นอย่างดี เมื่อทำการทดลองตรวจวัดอิเล็กโทรดดัดแปลงที่มีการตรึง

ดีเอ็นเอของอ้อยเป็นโรคใบขาว (SCWL-DNA) ที่มีความเข้มข้นในระดับตั้งแต่ 0-25 ng/ml พบว่าทำให้เกิด peak ของกระแส I ในระดับที่สูง-ต่ำ ลดหลั่นกันไปตามระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่ง E เดียวกันนั้นทั้งจากการวัดโดยวิธี CV (ภาพที่ 15) และ DPV (ภาพที่ 16) อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้จากวิธี DPV ค่อนข้างมีความชัดเจนสูงกว่าวิธี CV จึงใช้ค่าจากวิธี DPV เป็นหลักในการคำนวณกลับเป็นค่าสหสัมพันธ์มาตรฐานเพื่อการหาค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยพบว่าค่า EC_{50} ของ SCWL-DNA ที่ได้จากการทดลองในช่วงความเข้มข้นข้างต้น มีค่าเป็น 1.38344E-21 และได้สมการหาค่าความเข้มข้นจากความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง (regression analysis) เป็น Y = -0.95669+0.5286 X โดยมีค่า R = 0.9916 ดังภาพที 15-18 ซึ่งเป็นผลความสามารถในเชิงปริมาณวิเคราะห์สำหรับดีเอ็นเอ โดยวิธีเคมีไฟฟ้าที่สอดคล้องกับการทดลองของ Steel *et al.*(1998) ที่ทดสอบกับกรณีการตรึงดีเอ็นเอบนอิเล็กโทรดทอง (gold electrode, GE) และหาระดับความหนาแน่นของดีเอ็นเอบนพื้นผิว GE นั้น ซึ่งเป็นที่ยอมรับในการปฏิบัติขั้นต้นสำหรับการศึกษา และคุณสมบัติข้อนี้เป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดระดับปริมาณที่เหมาะสม ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ การวินิจฉัยและการวัดปริมาณของเชื้อโรคหรือสารสำคัญต่างๆที่ต้องการตรวจสอบจากแหล่งเป้าหมายได้ตามความต้องการ

สรุปและเสนอแนะ

ในการวิจัยเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ ของแนวคิดการตรวจโรคใบขาวของอ้อยด้วยดีเอ็นเอเซนเซอร์ และการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจงครั้งนี้ เบื้องต้นได้ทำศึกษาวิธีการสกัดให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว(SCWL-DNA) และมีปริมาณพอเพียงตรงต่อความต้องการทำการทดลองตรวจสอบ โดยวิธีการทางเคมีไฟฟ้าที่สามารถใช้สำหรับการตรวจจับสัญญาณชีวภาพของดีเอ็นเอ ซึ่งในชั้นแรกนี้ได้คัดเลือกใช้วิธีการมาตรฐานทางเคมีไฟฟ้าทั่วไปคือวิธี cyclic voltammetry (CV) และวิธี differential pulse votammetry (DPV) จากการทดสอบชนิดอิเล็กโทรดที่มีความไวในการวัดสัญญานไฟฟ้าได้แก่ glassy carbon electrode (GCE) และ platinum electrode (PTE) โดยการตรวจวัด CV ในอิเล็กโตรไลท์มาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบการแลกเปลี่ยนประจุของ ferri-ferro ion แสดงว่าอิเล็กโทรดทั้งสองชนิดมีความสามารถในการตรวจวัดสัญญาณไฟฟ้าได้ดีเช่นกันแม้ว่าอาจมีรูปแบบของกราฟ CV ต่างกันออกไป และจากการศึกษาวิธีการดัดแปลงขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารที่เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติไคโตซาน(chitosan-modified electrode)ทั้งที่เป็นชนิด 85% DD และ 95% DD พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงดังกล่าวก็ยังคงความสามารถในการนำไฟฟ้าที่สามารถตรวจวัดได้ในรูปแบบเฉพาะตัวของกราฟ CV และ DPV และการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม กับการตรวจวัดสัญญาณไฟฟ้าด้วยวิธีการ CV และ DPV ในระบบ supporting electrolyte เป็น $K_3Fe(CN)_6^{3-}$/ $K_3Fe(CN)_6^{4-}$ พบว่า

อิเล็กโทรดดัดแปลงทั้งที่เป็น chitosan-modified GCE และ chitosan-modified PTE ต่างก็มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงดีเอ็นเอที่ตรวจสอบคือ SCWL-DNA สายเดี่ยวและสายคู่อย่างมีเสถียรภาพ แต่เนื่องจากอิเล็กโทรดชนิด PTE มีราคาที่สูงกว่าชนิด GCE หลายเท่าตัว ดังนั้นการเลือกใช้อิเล็กโทรดชนิด GCE จึงช่วยให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้อย่างมาก ในการทดสอบขั้นต่อไปสำหรับตรวจพฤติกรรมของดีเอ็นเอ SCWL-DNA ที่ตรึงอยู่บน chitosan-modified GCE ด้วยการติดฉลากสาร methylene blue (MB) ซึ่งใช้เป็นสาร DNA intercalator และดัชนีการตอบสนองอย่างจำเพาะเจาะจงของดีเอ็นเอ ในระบบ supporting electrolyte ที่เป็น 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 ชี้ว่าสามารถใช้ระบบการติดฉลากนี้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอในเชิงปริมาณได้ เมื่อทดสอบกับ SCWL-DNA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก็พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนกันระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอ กับระดับของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ ณ ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นตำแหน่งจำเพาะระหว่างปฏิกิริยาของดีเอ็นเอกับสาร MB คือ ณ ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.25 V ในที่นี้จึงได้ค่า EC_{50} ของ SCWL-DNA ที่ตรึงอยู่บนพื้นผิว chitosan-modified GCE ขนาดรัศมี 2 mm ได้เท่ากับ 1.38344 E-21 ng และยังสามารถเทียบหาหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ได้จากค่าความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเมื่อเทียบเป็นค่า log ความเข้มข้น กับค่ากระแส peak ของ DPV จากสมการความสัมพันธ์ $Y = -0.95669+0.5286X$ ด้วยค่า $R = 0.9916$ ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณเช่นนี้ จึงเป็นส่วนที่สำคัญสำหรับการกำหนดและหาปริมาณของสิ่งที่ต้องการทราบในเป้าหมายที่นำมาตรวจสอบ ทำให้สามารถระบุได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณได้ในคราวเดียวกันอย่างชัดเจน เพื่อประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่สมบูรณ์ได้ในลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542ก. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนาจำกัด.
2. พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542ข. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : บริษัทโรงพิมพ์ ที แอน อาร์ ซีเลคคา โปรดัคท์จำกัด.
3. พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2544. มอลลิคิวท์สาเหตุโรคพืช. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนาจำกัด.
4. พรทิพย์ วงศ์แก้ว, พิศาล ศิริธร, ยุพา หาญบุญทรง, ธวัช ตินนังวัฒนะ และ รุ่งรัตน์ กิจเจริญปัญญา. 2542. การสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับโรคใบขาวอ้อยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารอ้อยและน้ำตาลไทย 6(2): 36-52.

5. พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ยุพา หาญบุญทรง, พิศาล ศิริธร, สมคิด บุญครอง และ ชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระดับไร่โดยวิธี รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติครั้งที่ 3, หน้า 50-61. กรุงเทพฯ. สมาคมอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งประเทศไทยร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย.
6. Azek , F., C. Grossiord , C., M. Joannes , M., B. Limoges, B. and Brossier, P. 2000. Hybridization Assay at a Disposable Electrochemical Biosensor for the Attomole Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA**.** Anal. Biochem. 284: 107-113.
7. Berggren, C., Stalhandske, P., Brundell, J. and Johansson, G.A. 1999. A feasibility study of a capacitive biosensor for direct detection of DNA hybridization. Electroanal. 11: 156.
8. Deeley, J., Stevens, W.A. and Fox, R.T.V. 1979. Uses of Dienes' stain to detect plant diseases induces by mycoplasmalike organisms. Phytopathology 69: 1169-1171.
9. dela Escosura-Muniz, A., Gonzalez-Garcia, M.B. and Costa-Garcia, A. 2007. DNA hybridization sensor based on aurothiomalate electroactive label on glassy carbon electrodes. Biosensor and Bioelectronics. 22: 1048-1054.
10. Drummond, T.G., Hill, M.G. and Barton, J.K. 2003. Electrochemical DNA sensors. Nat. Biotechnol 21: 1192.
11. Erdem, A., Kerman,K., Meric, B., Akarca, U.S., and Ozsoz, M. 1999. Electrochemical biosensor for the diction of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. Electroanal. 11: 586-587.
12. Erdem, A., Kerman,K., Meric, B., Akarca, U.S., and Ozsoz, M. 1999. DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. Electroanal. 11: 586.
13. Erdem, A., Kerman,K., Meric, B., Akarca, U.S., and Ozsoz, M. 2000. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. Anal. Chim. Acta 422: 139-149.
14. Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara, P., and Ozsoz, M. 2002. DNA biosensor for *Microcyctis* spp. sequence detection by using methylene blue and ruthenium complex as electrochemical hybridization label. Turk J. Chem. 26: 851-862.
15. Fan, c.H., Li, G.X., Gu, Q.R., Zhu, J.Q. and ZU, D.X. 2000. Electrochemical detection of cecropin CM4 gene by single stranded probe and cysteine modified gold electrode. Anal. Lett. 33: 1479.
16. Gooding, J.J. 2002. Electrochemical DNA hybridization biosensors. Electroanal. 14: 1149-1156.

17. Henry, O.Y.F., Acero Sanchez, J.L., Latta, D. and Sullivan, C.K.O. 2009. Electrochemical quantification of DNA amplicons via the detection of non-hybridised guanine bases on low-density electrode arrays. Biosensors and Bioelectronics 24: 2064-2070.
18. Hiruki, C. 1986. Little leaf of *Bragmansia candida*, a new disease associated with mycoplasma-like organisms. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 52: 675-682.
19. Jin, Y., Yao, X., Liu, Q. and Li, J. 2007. Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator. Biosensor and Bioelectronics 22: 1126-1130.
20. Ju, H., Ye, B., and Gu, J. 2004. Supermolecular interaction of ferrocenium with yeast DNA and application in electrochemical sensing for hybridization recognition of yeast DNA. Sensors 4: 71-83.
21. Liao, J.C., Mastali, M., Li, Y., Gau, V., Suchard, M.A., Babbitt, J., Gornbein, J., Landaw, E.M., McCabe, E.R.B., Churchill, B.M. and Haake, D.A. 2007. Development of an advanced electrochemical DNA biosensor for bacterial pathogen detection. J. Mol. Diagn. 9: 158-168.
22. Lu, Y-C., Chuang, Y-S., Chen, Y-Y., Shu, A-C., Hsu, H-Y., Chang, H-U., and Yew, T-R. 2008. Bacteria detection utilizing electrical conductivity. Biosensor and Bioelectronics. 23: 1856-1861.
23. Mao, X., Jiang, J., Xu, X., Chu, X., Luo, Y., Shen, G. and Yu, R. 2008. Enzymatic amplification detection of DNA based on "molecular beacon" biosensors. Biosensors and Bioelectronics 23: 1555-1561.
24. Nakashima, K., Chaleeprom, W., **Wongkaew, P.**, and Sirithorn, P. 1994. Detection of mycoplasmalike organism associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probes. JIRCAS J. 1 : 57-67.
25. Nakashima, K., **Wongkaew,P.,** Chaleeprom,W., Sirithorn,P., and Hayashi,T.1999. Molecular detection and characterization of phytoplasmas that cause sugarcane white leaf disease. JIRCAS J. 7 : 1-17.
26. Namba, S., Oyaisu, H., Kato, S., Iwanami, S. and Tsuchizaki, T. 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma like organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 461-467.
27. Peng, T., Cheng, Qi. And Cheng, Qu. 2002. Determination of short DNA ologomers using an electrochemical biosensor with a conductive self-assembled membrane. Electroanalysis. 14: 455-458.
28. Riccardi, C.S., Kranz, C., Kowalik, J., Yamanaka, H., Mizaikoff, B. and Josowicz, M. 2008. Label-free DNA Detection of hepatitis C virus based on modified conducting polypyrrole films

at microelectrodes and atomic force microscopy tip-integrated electrodes. Anal. Chem. 80: 237-245.

29. Shikata, E., Teng, W.S. and Matsumoto, T. 1969. Mycoplasma or PLT-like microorganism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline group. J. Fac. Agri.. Hokkaido Univ. 56: 70-90.
30. Shiraishi, H., Itoh, T., Hayashi, H., Takagi, K., Sakane, M., Mori, T. and Wang, J. 2007.Electrochemical detection of *E. coli* 16S rDNA sequence using air-plasma-activated fullerene-impregnated screenprinted electrodes. Bioelectrochem. 70: 481-487.
31. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D. and Valera, F.S. 1997. Sequence-specific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA. Anal. Chim. Acta 337: 41-48.
32. Wongkaew, P. and Fletcher, J. 2004. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long – term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. Plant Cell Rep. 23: 426-434.
33. Wongkaew, P. and Poosttisak, S. 2008. Direct electrochemical DNA sensor for sugarcane white leaf disease diagnosis using label free DNA probes and oligochitosan self assembled monolayer-modified glassy carbon electrodes. *Proceeding of the 2nd Technology and Innovation for Sustainable Development Conference*, 28-29 January 2008, Khon Kaen, Thailand. International Session 06_008_2008I: p. 504-507.
34. Wongkaew. P., Hanboonsong, Y., Sirithorn, P., Choosai. C., Boonkrong, S., Tinnangwattana, T., Kitchareonpanya. R., and Damak, S. 1997. Differentiation of phytoplasma associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. Theor. Appl. Genet. 95 : 660-663.
35. Wongkaew. P., Hanboonsong, Y., Sirithorn, P., Choosai. C., Boonkrong, S., Tinnangwattana, T., and Damark, S. 1998. Genetic diversity among phytoplasma associated with sugarcane white leaf, sugarcane grassy shoot, gramineous weed white leaf diseases and potential insect vectors. 7th Intl. Cong. Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, 9-16 Augt. 1998. Theme 2.2.99.
36. Wongkaew. P., Hanboonsong, Y., Sirithorn, P., Tinnangwattana, T. and Kitchareonpanya. R. 1996. Detection and differentiation of phytoplasma associated with sugarcane white leaf disease using DNA probes and polymerase chain reaction. The 8th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1996 Annual Meeting of National Center for

Genetic Engineering and Biotechnology, *Biotechnology: Prospects for The Future.* 14-15 November 1996. P.1-11.

37. Wongkaew, P., Sirithorn, P., Chaleeprom, W., Nakashima, K, Hayashi. T., and Koizumi., M. 1995. Detection of sugarcane white leaf mycoplasma-like organism in field plants and tissue cultures by DNA probes. *In*: Matangkasombat, P. and Yoshida, T., eds. *Microbial Utilization of Renewable Resources.* Osaka, Japan. International Center of Cooperative Research in Biotechnology. 9 : 406-419.
38. Zhao, H. and Ju, H. 2004. Biosensor for hepatitis B virus DNA PCR product and electrochemical study of the interaction of Di(2,2-bipyridine)Osmium(III) with DNA. Electroanalysis 16: 1642-1646.