



เอกสารแนบรายงานผลการวิจัยประจำปี 2554

โครงการวิจัย

การพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจจับและเฝ้าระวัง

โรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

- บทสรุปสำหรับผู้บริหาร จำนวน 1 ชุด
- และการนำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ 3 เรื่อง
 1. Poosittisak, S. and Wongkaew, P. 2011. Electrochemical behavior of phytoplasma infected sugarcane plant DNA on a chitosan modified glassy carbon electrode. *Proceeding of The 14th Asian Chemical Congress 2011 “ Contemporary Chemistry for Sustainability and Economic Sufficiency”*, 5-8 September 2011, Bangkok, Thailand. PO-S12-01. P. 534.
 2. Wongkaew, P. and Poosittisak, S. 2012. Electro-affinity of SCWL-dsDNA on different high deacetylation degree chitosans deposited glassy carbon electrode. *The International Conference on Technological Challenges in Developing Affordable In-Vitro Molecular Diagnostics*. 11- 14 March 2012 , Navi Mumbai, India, p. S-36.
 3. Poosittisak, S. and Wongkaew, P. 2012. Electrochemical characterization of the hexacyanides of a bare screen printed carbon electrode and chitosan thin film modified -screen printed carbon electrode. *The International Conference on Technological Challenges in Developing Affordable In-Vitro Molecular Diagnostics*. 11- 14 March 2012 , Navi Mumbai, India, p. S-35.



บทสรุปผู้บริหาร

ของรายงานผลการวิจัยประจำปี 2554 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการวิจัย

การพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจจับและเฝ้าระวัง

โรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

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

บทสรุปผู้บริหาร

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทำการวิจัย

อ้อยเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อประชาคมโลก ทั้งในด้านการเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำตาล เอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทน และเชื้อเพลิง การผลิตอ้อยในประเทศไทยมีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ โดยเป็นแหล่งสร้างงานการเกษตรและแรงงานไทยนับล้านคน สามารถสร้างรายได้จากการจำหน่ายน้ำตาลในประเทศปีละกว่าสองหมื่นล้านบาทและส่งออกมูลค่ามากกว่าปีละห้าหมื่นล้านบาท พื้นที่การผลิตอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคเหนือตามลำดับ รวมพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศของปีการผลิต 2550/2551 มีจำนวน 6.2 ล้านไร่ เก็บเกี่ยวได้ผลผลิตรวม 73.2 ล้านตัน จากการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกใหม่ประมาณ 2 ล้านไร่ ขณะที่เมื่อคิดเป็นผลผลิตเฉลี่ยก็ยังคงอยู่ในระดับ 9-11 ตัน/ไร่เช่นเดิม ซึ่งจัดว่าต่ำกว่าประเทศคู่แข่งเช่นบราซิลและออสเตรเลีย ที่ได้ผลผลิตเฉลี่ยสูงถึง 13-16 ตัน/ไร่ (ศูนย์สถิติทางการเกษตร, 2538; กลุ่มสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย, 2551) ทั้งนี้ปัญหาที่สำคัญมากประการหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายกับอ้อยในประเทศไทย คือการระบาดของโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ถือเป็นตัวแปรหลักต่อผลผลิตอ้อยในแต่ละปี โดยพบการลดลงเป็นอย่างมากของผลผลิตเฉลี่ยทั้งประเทศเมื่อมีการระบาดของโรค ซึ่งไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลยจำนวนหลายแสนไร่การผลิตอ้อยในแต่ละปีจึงมีความเสี่ยงค่อนข้างมาก ทั้งยังมีการการลงทุนค่าใช้จ่ายและแรงงานสูงมาก จากการต้องหาพื้นที่ปลูกใหม่เพื่อเลี่ยงการเกิดโรคและการจัดหาท่อนพันธุ์ใหม่ตลอดเวลา โดยที่ไม่สามารถไว้วางใจได้หลายปีดังเช่นประเทศผู้ผลิตอ้อยรายใหญ่อื่นๆของโลก อีกทั้งจวบจนปัจจุบันยังไม่พบว่ามีพันธุ์อ้อยต้านทานต่อโรคใบขาว การป้องกันกำจัดเท่าที่สามารถทำได้คือการจัดหาท่อนพันธุ์ปลอดโรคและการสร้างระบบเฝ้าระวังการเกิดโรค ซึ่งจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบที่ทรงประสิทธิภาพด้วยความรวดเร็วทันการทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณเพื่อให้มีการปฏิบัติของโรค สำหรับการตรวจโรคแต่เดิมนั้นดูจากอาการที่ปรากฏที่อาจสายเกินไปสำหรับการดำเนินการป้องกันกำจัด เทคโนโลยีการตรวจเชื้อโรคใบขาวของอ้อยที่ใช้ในปัจจุบันคือการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) แม้ว่ามีประสิทธิภาพดีเป็นที่เชื่อถือ แต่ก็ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องมีการใช้สารเคมีและอุปกรณ์ที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ มีต้นทุนค่าใช้จ่ายสูง และยังต้องใช้เวลาเตรียมการและการแสดงผลไม่ต่ำกว่า 2 วัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการวิจัยวิธีการตรวจเชื้อโรคแบบใหม่อย่างต่อเนื่องให้มีความรวดเร็วและสะดวกยิ่งขึ้น เพื่อมุ่งเกษตรกรและเอกชนที่เกี่ยวข้องให้มีความเต็มใจร่วมมือทำการตรวจสอบท่อนพันธุ์ก่อนปลูกหรือแม้แต่ในแปลงปลูก และช่วยให้สามารถเพิ่มผลผลิตอ้อยได้เป็นอย่างดีในที่สุด ซึ่งวิธีการใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจนำมาประยุกต์ใช้สำหรับพัฒนาวิธีการตรวจโรคได้แก่วิธีตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอเซนเซอร์ (Gooding, 2002; Drummond *et al.*, 2003) เนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่จะช่วยให้ได้วิธีการที่ตรงกับความต้องการของทุกฝ่าย ที่ต้องการทั้งความแม่นยำเที่ยงตรง ความไวอย่างรวดเร็ว ความสามารถในการให้บริการในปริมาณมากทั้งในสภาพไร่และในห้องปฏิบัติการ พร้อมๆไปกับความประหยัด ความสะดวก ความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

2. วัตถุประสงค์

สำหรับวัตถุประสงค์ในการวิจัยขั้นต้นครั้งนี้ เป็นการวิจัยเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของแนวคิดการตรวจโรคใบขาวของอ้อยด้วยดีเอ็นเอเซนเซอร์ และการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการตรวจดีเอ็นเอ โดยทำการศึกษาวิธีการสกัดให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว และตรงต่อเป้าหมายที่ต้องการทำการทดลองตรวจสอบ การคัดเลือกวิธีการทางเคมีไฟฟ้าที่สามารถใช้สำหรับการตรวจจับสัญญาณชีวภาพของดีเอ็นเอ การทดสอบชนิดอิเล็กโทรดที่มีความไวในการวัดสัญญาณไฟฟ้า การศึกษาวิธีการดัดแปลงขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารตัวนำไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการตรึงดีเอ็นเอ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอดังกล่าว รวมทั้งศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวัดจำนวนหรือความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จาก

สัญญาณเคมีไฟฟ้าได้อย่างชัดเจนในเชิงปริมาณ เพื่อประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่สมบูรณ์ได้ในลำดับต่อไป

3. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจจับ และเฝ้าระวังโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งต้องทำการพัฒนาองค์ประกอบในด้านต่างๆเพื่อให้ได้ผลงานที่สมบูรณ์ที่สุด ได้แก่การพัฒนาขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารตัวนำไฟฟ้าที่เหมาะสม การพัฒนาวิธีการตรึงดีเอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพสำหรับการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ การพัฒนาชนิดดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจง สำหรับการตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย การพัฒนาระบบปฏิกิริยาเคมีและสารดัชนีที่บ่งชี้ความสำเร็จในการจับคู่ดีเอ็นเอเป้าหมาย และการพัฒนาวิธีการทางเคมีไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการวัดผลในเชิงปริมาณของการตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยดีเอ็นเอเซนเซอร์

4. ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ ของแนวคิดการตรวจโรคใบขาวของอ้อยด้วยดีเอ็นเอเซนเซอร์ และการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง ครั้งนี้ เบื้องต้นได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว(SCWL-DNA) และมีปริมาณพอเพียงตรงต่อความต้องการทำการทดลองตรวจสอบ โดยวิธีการทางเคมีไฟฟ้าที่สามารถใช้สำหรับการตรวจจับสัญญาณชีวภาพของดีเอ็นเอ ซึ่งในขั้นแรกนี้ได้คัดเลือกใช้วิธีการมาตรฐานทางเคมีไฟฟ้าทั่วไปคือวิธี cyclic voltammetry (CV) และวิธี differential pulse voltammetry (DPV) จากการทดสอบชนิดอิเล็กโทรดที่มีความไวในการวัดสัญญาณไฟฟ้าได้แก่ glassy carbon electrode (GCE) และ platinum electrode (PTE) โดยการตรวจวัด CV ในอิเล็กโทรไลต์มาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบการแลกเปลี่ยนประจุของ ferri-ferro ion แสดงว่าอิเล็กโทรดทั้งสองชนิดมีความสามารถในการตรวจวัดสัญญาณไฟฟ้าได้ดีเช่นกันแม้ว่าอาจมีรูปแบบของกราฟ CV ต่างกันออกไป และจากการศึกษาวิธีการดัดแปลงขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารที่เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติไคโตซาน(chitosan-modified electrode)ทั้งที่เป็นชนิด 85% DD และ 95% DD พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงดังกล่าวก็ยังคงความสามารถในการนำไฟฟ้าที่สามารถตรวจวัดได้ในรูปแบบเฉพาะตัวของกราฟ CV และ DPV และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม กับการตรวจวัดสัญญาณไฟฟ้าด้วยวิธีการ CV และ DPV ในระบบ supporting electrolyte เป็น $K_3Fe(CN)_6^{3-} / K_3Fe(CN)_6^{4-}$ พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงทั้งที่เป็น chitosan-modified GCE และ chitosan-modified PTE ต่างก็มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงดีเอ็นเอที่ตรวจสอบคือ SCWL-DNA สายเดี่ยวและสายคู่อย่างมีประสิทธิภาพ 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 ซึ่งสามารถใช้ระบบการติดฉลากนี้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอในเชิงปริมาณได้ 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 1.38344×10^{-21} ng และยังสามารถเทียบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ได้จากค่าความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเมื่อเทียบเป็นค่า log ความเข้มข้นกับค่ากระแส peak ของ DPV จากสมการความสัมพันธ์ $Y = -0.95669 + 0.5286X$ ด้วยค่า $R = 0.9916$ ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณเช่นนี้ จึงเป็นส่วนที่สำคัญสำหรับการกำหนดและหาปริมาณ

ของสิ่งที่ต้องการทราบในเป้าหมายที่นำมาตรวจสอบ ทำให้สามารถระบุได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณได้ใน
คราวเดียวกันอย่างชัดเจน เพื่อประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่สมบูรณ์ได้ในลำดับต่อไป