247508
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247508

รายงานฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

การพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจจับและเฝ้าระวังโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา
: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2553

Development of DNA biosensors for sensing and monitoring of the sugarcane white leaf disease caused by phytoplasma
: 2009 Annual Report

ชื่อผู้วิจัย
รศ.ดร. พรทิพย์ วงศ์แก้ว
รศ. สุธา ภู่สิทธิศักดิ์

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

b00252081

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247508

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจจับและเฝ้าระวังโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2553

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

: 2009 Annual Report

ชื่อผู้วิจัย

รศ.ดร. พรทิพย์ วงศ์แก้ว

รศ. สุธา ภู่สิทธิศักดิ์

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

247508

ในการศึกษาชนิดสารโพลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติทั้งการเป็นตัวนำไฟฟ้า และมีความสามารถในการจับหรือตรึงดีเอ็นเอได้อย่างมีเสถียรภาพ เพื่อเป็นพื้นฐานการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าสารชีวภาพไคโตซานในรูปที่มี deacetylation degree (DD) สูงมาก ได้แก่ ชนิด 80, 85, 90, 95%DD และ chitosan oligomer ที่นำมาทดสอบทั้ง 5 ชนิด สามารถก่อให้เกิดฟิล์มบางโพลิเมอร์ที่เคลือบเกาะพื้นผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนแก้วหรือ glassy carbon electrode (GCE) และแสดงศักยภาพการนำไฟฟ้าที่ดี ด้วยคุณสมบัติของประจุบวกบนพื้นผิว และยังช่วยตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาว(SCWL-DNA)อย่างแน่นหนาด้วยแขนของ amine group (NH2) จากการพิสูจน์ตามขั้นตอนทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) ในทุกระบบ supporting electrolytes มาตรฐานที่ใช้ทดสอบ และการวัดค่ากระแสและศักย์ไฟฟ้าของ CV ในเซลล์ไฟฟ้าที่มีระบบอิเล็กโตรไลท์ K3Fe(CN)6ใน PBS pH 7.0 ที่วัดได้ค่าศักย์ไฟฟ้า Epa ระหว่าง 0.3424 – 0.4229 V/SCE สำหรับอิเล็กโทรดGCE-chitosanแต่ละชนิดตลอดจนการติดตามผลการตรึง SCWL-DNA หลังการติดฉลากด้วยสารดัชนี methylene blue (MB) ของปฏิกิริยา redox บนพื้นผิวอิเล็กโทรดดัดแปลงด้วยฟิล์มโพลิเมอร์ไคโตซานชนิดต่างๆแต่ละชนิดดังกล่าวข้างต้น ในระบบอิเล็กโตรไลท์ TBS pH 7.0 ที่วัดได้ค่ากระแสสูงสุด ณ ศักย์ไฟฟ้า E ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง -1.5015 หรือ -1.7517 V/SCE และ -2.7527 V/SCE นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างจุลภาคของพื้นผิวในระดับนาโนเมตรโดยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(AFM) ก็ปรากฏภาพรายละเอียดของพื้นผิวอิเล็กโทรด GCE และฟิล์มโพลิเมอร์ไคโตซาน รวมทั้งเส้นสายของ SCWL-DNA ที่ถูกตรึงบนฟิล์มโพลิเมอร์ไคโตซานได้อย่างชัดเจน

Abstract

Initial strategy for DNA-based biosensor preparation has been developed for the identification and diagnosis of a phytoplasma causing sugarcane white leaf disease, one among the most destructive problems in sugarcane industry of Thailand. Experiments on the establishment of high electro-conductivity and bioaffinity materials have been performed using a natural biomaterial such as chitosan polymers due to their diverse properties that offer a unique set of such requirements. In this study, five high deacetylation degree (DD) chitosan formulas such as chitosan 80, 85, 90, 95 %DD and chitosan oligomer were examined for their electro-properties using cyclic voltammetry (CV) technique. A stable electro-transducer film of each chitosan could be addressed to glassy carbon electrode (GCE) surface and yielded excellent relationship between electric current

(I) and potential (E) in all standard supporting electrolytes. Electrochemical behaviors of modified GCE-chitosan have also been investigated both before and after an immobilization of the DNA extracted from sugarcane white leaf diseased plants (SCWL-DNA). The corresponding cyclic voltammetric profiles obtained from ferri-ferro ion transter and methylene blue redox reaction indicated the stable immobility of SCWL-DNA onto modified GCE-chitosan surfaces. Accordingly, a firm immobilization of this SCWL-DNA on electro-bioaffinity chitosan interface has been obviously shown upon nanostructure observation under atomic force microscope as well.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ (ไทย)	3
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	3
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	13
บทนำ	14
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์	42
สรุปและเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45

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) และอิเล็กโทรดดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานรูปแบบต่างๆ	25
ตารางที่ 2	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 เมื่อทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็คโทรดดัดแปลงที่มีการเคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานรูปแบบต่างๆ	31
ตารางที่ 3	ค่าของกระแสและศักย์ไฟฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s ภายใต้ระบบการใช้สารดัชนี methylene blue ของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C จากการวัดอิเล็กโทรดชนิด glassy carbon (gce) และอิเล็กโทรดดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานรูปแบบต่างๆ	35
ตารางที่ 4	ค่าของกระแสและศักย์ไฟฟ้าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) ที่อัตราการสแกน(scan rate) 100 mV/s จากการใช้สารดัชนี methylene blue ของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C เมื่อทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็คโทรดดัดแปลงที่มีการเคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานรูปแบบต่างๆ	39

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 1	กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon 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 2	กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 80% deacetylation degree (chitosan 80DD) 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 3	กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon 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	23
ภาพที่ 4	กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 90% deacetylation degree (chitosan 90DD) 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 5	กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon 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	24
ภาพที่ 6	กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด chitosan oligomer 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	24

ภาพที่ 7 กราฟcyclic voltammogram เปรียบเทียบระหว่าง อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิดต่างๆ เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 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 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 80% deacetylation degree (chitosan 80DD) 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 26

ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (I_{pa}) และกระแส reduction(I_{pc}) ที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 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 หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 80% deacetylation degree (chitosan 80DD) 27

ภาพที่ 10 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 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 27

ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (I_{pa}) และกระแส reduction(I_{pc}) ที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 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 หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบ 28

สารชีวภาพไคโตซานชนิด 85% deacetylation degree (chitosan 80DD)
ภาพที่ 12 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจาก อ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบ สารชีวภาพไคโตซานชนิด 90% deacetylation degree (chitosan 90DD) 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 28
ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (I_{pa}) และกระแส reduction(I_{pc}) ที่พบ จากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 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 หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจาก อ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบ สารชีวภาพไคโตซานชนิด 90% deacetylation degree (chitosan 90DD) 29
ภาพที่ 14 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจาก อ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบ สารชีวภาพไคโตซานชนิด 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 29
ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (I_{pa}) และกระแส reduction(I_{pc}) ที่พบ จากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 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 หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจาก อ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบ สารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 80DD) 30
ภาพที่ 16 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจาก อ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบ 30

สารชีวภาพไคโตซานชนิด chitosan oligomer 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 17 ความสัมพันธ์ของกระแส oxidation (I_{pa}) และกระแส reduction(I_{pc}) ที่พบจากการวัดในแต่ละรอบของการสแกนที่ 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 หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด chitosan oligomer 31

ภาพที่ 18 กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 32

ภาพที่ 19 กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 80% deacetylation degree (chitosan 80DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 33

ภาพที่ 20 กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 85% deacetylation degree (chitosan 85DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 33

ภาพที่ 21 กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 90% deacetylation degree (chitosan 90DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 34

ภาพที่ 22 กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 95DD) 34

เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C

ภาพที่ 23 กราฟcyclic voltammogram ของ อิเล็กโทรดglassy carbon ที่เคลือบด้วยสารชีวภาพไคโตซานชนิด chitosan oligomer เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ในสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 35

ภาพที่ 24 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 80% deacetylation degree (chitosan 80DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 36

ภาพที่ 25 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 85% deacetylation degree (chitosan 85DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 37

ภาพที่ 26 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 90% deacetylation degree (chitosan 90DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 37

ภาพที่ 27 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด 95% deacetylation degree (chitosan 95DD) เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 38

ภาพที่ 28 กราฟcyclic voltammogram ที่ได้หลังจากทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิด chitosan oligomer เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 25, 50, 100, 150 และ 200 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 38

ภาพที่ 29 กราฟcyclic voltammogram เปรียบเทียบระหว่างการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรดglassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานชนิดต่างๆ เมื่อทำการวัดกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ระดับการสแกนอัตรา 100 mV/s โดยใช้สาร methylene blue เป็นดัชนีของปฏิกิริยา redox ของดีเอ็นเอในระบบสารละลาย 20 mM TBS ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 25 °C 39

ภาพที่ 30 ผลการตรวจพื้นผิวเปลือยของอีเล็กโทรดที่เป็น glassy carbon electrode ก่อนปรับผิวหน้า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(Atomic force microscope) 40

ภาพที่ 31 ผลการตรวจสอบพื้นผิวหน้าอิเล็กโทรดที่ปรับผิวหน้าด้วยการเคลือบสารโพลิเมอร์ไคโตซานในรูปที่มีการลดระดับอะเซทธีล 80-85% ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(Atomic force microscope) 41

ภาพที่ 32 ผลการตรวจสอบพื้นผิวหน้าอิเล็กโทรดที่ปรับผิวหน้าด้วยการเคลือบด้วยสารโพลิเมอร์ไคโตซานในรูปที่มีการลดระดับอะเซทธีล 90-95%ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(Atomic force microscope) 41

ภาพที่ 33 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(Atomic force microscope) ที่บ่งชี้ 42

ความสำเร็จของการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดจากอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาความเข้มข้น 50 ng/ µl จำนวน 2 µl บนอิเล็กโทรด glassy carbon ดัดแปลงด้วยการเคลือบสารชีวภาพไคโตซานบนผิวหน้า

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย:

DD = deacetylation degree

MB = methylene blue

CV = cyclic voltammetry

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247508
เลขเรียกหนังสือ