ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยระยะแรกนี้จึงเป็นการวิจัยในเบื้องต้น เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของแนวคิดการตรวจโรคใบขาวของอ้อยด้วยดีเอ็นเอเซนเซอร์ และการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการตรวจดีเอ็นเอ โดยศึกษาวิธีการสกัดให้ได้ดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้า การดัดแปลงขั้วอิเล็กโทรดโดยใช้สารตัวนำไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการตรึงดีเอ็นเอ วิธีการตรึงดีเอ็นเออย่างมีเสถียรภาพเพื่อประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอเซนเซอร์ในลำดับต่อไป และวิธีการทางเคมีไฟฟ้าขั้นต้นสำหรับการตรวจจับสัญญาณชีวภาพของดีเอ็นเอ

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 แล้วนำมาบดในสารละลายCTAB (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 โดยวิธี spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การเตรียมผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรด

จัดเตรียมอิเล็กโทรดพร้อมใช้งาน โดยการขัดผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดที่ใช้คือชนิด glassy carbon electrode (GCE) ขนาดพื้นที่ผิวขั้ว 2 mm ด้วยสารแขวนลอยของผงอลูมินาขนาด 0.3 μM และ 0.5 μM อีกครั้งบนผ้าขัดกำมะหยี่ จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน(deionized water) หรือ

ที่เรียกว่าน้ำDI 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 ในบรรยากาศไร้ออกซิเจนจากการไล่ออกแล้วแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจนจากถังพ่นแก๊สเสร็จแล้วล้างขั้วผิวหน้าอิเล็กโทรดอีกครั้งด้วยน้ำDI ในเครื่องultrasonicator ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ได้ผิวขั้วอิเล็กโทรดที่พร้อมต่อการใช้งานต่อไป

การเตรียมสารชีวภาพไคโตซานตัวนำไฟฟ้า

สารชีวภาพไคโตซานที่ใช้สำหรับการทดลองนี้ เตรียมจากการหมักและสกัดเปลือกกุ้งที่เป็นเศษกากเหลือจากอุตสาหกรรมประมงและส่งออกกุ้ง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ร่วมมือในการผลิตจากห้องปฏิบัติการบริษัทไบโอไลน์จำกัด จังหวัดชลบุรี และการตรวจรับรองบ่งชี้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ทำให้ได้ไคโตซานสำหรับทดสอบจำนวน 5 ชนิดตามระดับ degree of deacetylation (DD) ได้แก่ไคโตซานชนิด 80%DD (M_v = 2.45 x 10^5 Da), 85%DD (M_v = 2.27 x 10^5 Da), 90%DD (M_v = 1.26 x 10^5 Da), 95%DD (M_v = 1.11 x 10^5 Da) และ chitosan oligomer ($M_v \cong$ 0.05-0.1 x 10^5 Da) เพื่อการเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นตัวนำไฟฟ้า และการตรึงดีเอ็นเอเป้าหมาย

การเตรียมอิเล็กโทรดดัดแปลง

เตรียมสารละลายไคโตซานทดสอบ โดยทำการละลายสารชีวภาพไคโตซานแต่ละชนิดใน 1% acetic acid และใช้ความเข้มข้นของไคโตซานในอัตรา 1% ในสารละลาย 1% acetic acid นั้นแล้วนำมาหยดลงในปริมาณ 2 µl บนผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดGCEพร้อมใช้งานที่เตรียมไว้ เมื่อสารละลายไคโตซานแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 25°C แล้ว จึงแช่ผิวหน้าขั้วลงใน 0.1 M NaOH ประมาณ 30 นาที จึงนำออกมาผึ่งให้แห้งสนิทตามธรรมชาติ ซึ่งทำให้ได้อิเล็กโทรดดัดแปลงไคโตซานบน GCE (chitosan-modified glassy carbon electrode) ที่พร้อมสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป

การตรึงดีเอ็นเอบนอิเล็กโทรดดัดแปลง

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

การติดตามเอกลักษณ์ของดีเอ็นเอด้วยสาร methylene blue (MB)

การใช้สาร methylene blue (MB) ที่มีความจำเพาะต่อเบส guanine ของดีเอ็นเอ ในการติดฉลากดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความเสถียร และเอกลักษณ์ทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบน

อิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE โดยเตรียมสารละลาย MB ความเข้มข้น 20 μM ใน 20 mM tris buffer saline (TBS) pH 7.0 แล้วนำอิเล็กโทรดที่ต้องการตรวจสอบจุ่มในสารละลาย MB ประมาณ 1 ชั่วโมงบนเครื่องหมุนความเร็วรอบต่ำประมาณ80-100 รอบต่อนาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างผิวหน้าขั้วด้วยสารละลาย 20 mM TBS pH 7.0 ประมาณ 10 วินาที จึงพร้อมต่อการตรวจวัดตามวิธีการทางเคมีไฟฟ้า

การวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าโดยวิธี cyclic voltammetry (CV)

ทำการตรวจวัดค่ากระแสและศักย์ไฟฟ้าเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตามวิธี cyclic voltammetry (CV) ด้วยเครื่อง EcoChemie Autolab PSTAT 30 ที่ควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GPES เวอร์ชั่น 5.9 ของบริษัท Metrohm Autolab B.V., Utrecht, ประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยใช้เซลล์ไฟฟ้าขนาด 10 ml ระบบอิเล็กโทรด 3 ขั้ว คืออิเล็กโทรดใช้งาน (working electrode) ที่เป็น GCEขนาดพื้นที่ผิวหน้าขั้ว 2 mm กับอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) ที่เป็น Ag/AgCl/3M KCl และเคาเตอร์อิเล็กโทรด (couter electrode) ที่เป็น platinum ซึ่งก่อนการวัดค่าไฟฟ้า ต้องทำการขจัดออกซิเจนจากสารละลายที่ใช้เป็น supporting electrolyte ออกให้หมดโดยการแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจนจากถังพ่นแก๊สอย่างน้อย 10 นาที

สำหรับการวัดค่าและวิเคราะห์โดยวิธี CV เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของอิเล็กโทรด 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

การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope)

ทำการตรวจสอบลักษณะของพื้นผิวหน้าขั้วอิเล็กโทรดGCE อิเล็กโทรดดัดแปลง chitosan-modified GCE หรือฟิล์มบางไคโตซานที่เคลือบบนผิวหน้าGCEสำหรับสร้างอิเล็กโทรดดัดแปลง และดีเอ็นเอที่ตรึงบนฟิล์มบางไคโตซานที่เคลือบบนผิวหน้าGCEดังกล่าว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม(กล้องAFM)ที่มีความละเอียดระดับนาโนเมตร ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องจากบริษัทโคแอกซ์ กรุป คอร์ปอเรชั่น จำกัด กรุงเทพฯ เครื่องโมเดล XE-70 (Park Systems Corp., Suwon, Korea) ที่เชื่อมต่อกับระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมด้วยโปรแกรม 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)