

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ.....

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

1.1 รหัส ชื่อโครงการ

1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
 เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย)

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ

1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ

1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา; เกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สังคมศาสตร์
 โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขัน
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ ถึงปีงบประมาณ

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ บาท ประกอบด้วย
 งบประมาณ ได้รับ บาท งบประมาณ ได้รับ บาท
 งบประมาณ ได้รับ บาท งบประมาณ ได้รับ บาท
 งบประมาณ ได้รับ บาท งบประมาณ ได้รับ บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
1.	1-6
	7-12
2.	1-6
	7-12
3.	1-6
	7-12

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1.....	1.....	1.....
2.....	2.....	2.....
3.....	3.....	3.....

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ.....
- บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....) เหตุผล.....
- ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

- องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน.....
- สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์.....
- ผลิตภัณฑ์.....
- สิ่งประดิษฐ์.....
- เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....
- ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....
- คู่มือ.....
- วิดีทัศน์.....
- การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี.....คน ปริญญาโท.....คน ปริญญาเอก.....คน
- สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ.....เรื่อง (ระบุ).....วิทยานิพนธ์.....เรื่อง (ระบุ).....
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

- ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน.....
- ด้านการเกษตร.....
- ด้านอุตสาหกรรม.....
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....
- ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย.....

- ด้านเศรษฐกิจ.....
- ด้านสังคม.....
- ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....
- ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....
- เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ.....
- นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป.....
- ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....
- อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด **ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ** (ระบุรายละเอียด อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น **ภาคผนวก**ของรายงาน)

- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- นำเสนอทางนิทรรศการ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดีทัศน์..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอดฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์)..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด สิทธิบัตร อนุสิทธิบัตร ลิขสิทธิ์
 มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าจะก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

- ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และ บริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกัน ความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....

- ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริการจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ยุทธศาสตร์การขจัดความยากจน
- ยุทธศาสตร์การพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ
- ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
- ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ยุทธศาสตร์การพัฒนากฎหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี
- ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาสังคม
- ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ
- ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก
- อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข.....

1.19 งานที่จะทำต่อไป/คำชี้แจงเพิ่มเติม.....

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(.....)

...../...../.....วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2554

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)24.53

(ชื่อโครงการภาษาไทย การพัฒนาวัสดุนาโนเพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อ
E. coli O157.....)

(ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ Development of bioconjugated dye
dopped silica nanoparticle for E. coli O157 detection)

(ชื่อผู้วิจัยภาษาไทย สมรณี ดุ้ยเต็มวงศ์⁽¹⁾ ประเวทย์ ดุ้ย
เต็มวงศ์⁽²⁾)

(ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Kooranee Tuitemwong⁽¹⁾,
Pravate Tuitemwong⁽²⁾)

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน (FDS-NPs) โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ร่วมกับเทคนิคโซลเจล เพื่อตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 เมื่อตรวจลักษณะทางกายภาพและทางเคมีโดยใช้ SEM-EDS, TEM และ XRD ร่วมกับคุณสมบัติในการเรืองแสงของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้พบว่าอนุภาคมีลักษณะกลมสี่เหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 45 ± 6 นาโนเมตร มีความสม่ำเสมอสามารถเรืองแสงได้เป็นเวลานาน หลังจากดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนบนพื้นผิวอนุภาคแล้วนำอนุภาคที่ได้นี้ไปติด (coat) กับโพลีโคลนอลแอนติบอดี IgG *E. coli* O157 ที่ทำให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ affinity chromatography นำอนุภาคที่ติดกับแอนติบอดี IgG *E. coli* O157 แล้วมาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* O157 ตรวจผลโดยใช้วิธีสไลด์แก้วแทนหลอดทดสอบ และนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescens พบว่าเซลล์ *E. coli* O157 ไปจับกับอนุภาคที่ติดกับแอนติบอดี IgG *E. coli* O157 ได้ดีและเรืองแสงสีส้ม การตรวจหา *E. coli* O157 โดยวิธีนี้ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการ enrichment และมีศักยภาพที่จะพัฒนาอนุภาคและแอนติบอดีเพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารอื่นๆ ตลอดจนตรวจหาสารชีวโมเลกุลต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน โพลีโคลนอลแอนติบอดี *E. coli* O157

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop fluorescent dye-doped silica nanoparticles (FDS-NPs) for the rapid detection of foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157. The FDS-NPs were prepared using the combination of microemulsion and sol-gel technique. They were characterized using SEM-EDS, TEM, XRD, and their photostability. Polyclonal IgG antibodies were purified with affinity chromatography. It was found that the synthesis gave particles of amorphous structure with consistently clear orange spherical shape of 45 ± 6 nm in diameter. They are high intensity with good photostability of orange color luminescent (Rubpy dye). The particles surfaces were modified chemically to add amine groups that allowed them to capture the purified IgG against *E. coli* O157 onto the surfaces. Results of the slide method indicated that *E. coli* O157 cells were successfully captured by the FDS-NPs giving a very bright orange fluorescent. It appears that no enrichment step is not required for this test. It was concluded that FDS-NPs were successfully developed with a high potential to be used for the detection of pathogenic bacteria in food and food products and other biomolecules.

Key words: IgG fluorescent silica nanoparticles, *E. coli* O157, Polyclonal

บทนำ

การเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากผลกระทบของ “ภาวะโลกร้อน” (Global warming) หรือ “การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ” (Climate change) ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ในหลายรูปแบบทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศมีผลโดยตรงต่อการขยายพันธุ์และการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่างๆ (Epstein, 2000; Finlay, 2005) เมื่อเกิดการระบาดของโรคสิ่งสำคัญคือการตรวจวินิจฉัยโรคให้รวดเร็วที่สุดเพื่อรักษาให้ทันเวลาและป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วและกระจายเป็นวงกว้าง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีที่รวดเร็วในการตรวจหาชนิด และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นๆ วิธีแบบดั้งเดิม (Conventional method) ที่ยังคงใช้ในปัจจุบันซึ่งได้แก่ การเพาะเลี้ยง การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ การตรวจวิเคราะห์ และการพิสูจน์หรือยืนยันเชื่อนั้น มีขั้นตอนที่ซับซ้อนยุ่งยาก ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงาน ใช้อุปกรณ์จำนวนมาก และจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ (Enrichment) ให้มีปริมาณมากพอจึงจะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Zhao *et al.*, 2004) ทำให้มีปัญหาการกำจัดเชื้อ และผู้ปฏิบัติงานมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคได้ ปัจจุบันได้มีความพยายามในการพัฒนาปรับปรุงวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคให้มีความรวดเร็ว และมีความไว (Sensitivity) สูง เช่น Immunofluorescent antibody technique (วนิดา บริราช และคณะ, 2541; Brayton *et al.*, 1986), Time-resolved immunofluorometric assay (Soukka *et al.*, 2001), Immunomagnetic separation (Bruce and Sen, 2005; Lee *et al.*, 2006; Paton *et al.*, 2001), Quantum dot (Medintz *et al.*, 2005), Plasmon resonance immunosensors (Micheli *et al.*, 2001), ELISA (Kelkar *et al.*, 2004; Worthington *et al.*, 2002), PCR (Gerba *et al.*, 2001), Flow cytometry (Gunasekera *et al.*, 2002; Malacrino *et al.*, 2001) และ Fluorescent-doped silica nanoparticles (FDS-NPs) (Wang *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี และข้อเสียแตกต่างกันไป ในงานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการตรวจหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ให้ผลรวดเร็ว มีความไวสูง และมีความน่าเชื่อถือโดยอาศัยความรู้ด้านนาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) ร่วมกับความรู้อันระบบวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) โดยใช้อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโน (FDS-NPs) ซึ่งภายในมีโมเลกุลของสีฟลูออเรสเซนต์แทรกอยู่ภายในโครงร่างของอนุภาคซิลิกาทำให้มีความเข้มของการเรืองแสงสูง สามารถคงการเรืองแสงได้นาน (Photostability) และตรวจผลการเรืองแสงได้ง่าย (Zhao *et al.*, 2004)

วัสดุอุปกรณ์

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tris(2'2-bipyridyl) dichlororuthenium(II)hexahydrate (RuBpy dye) (Fluka, Germany)
2. Tetraethylorthosilicate (TEOS) (Fluka, Germany)
3. Triton X -100 (Sigma-Aldrich, USA)
4. 1-Hexanol (Sigma-Aldrich, Germany)
5. Cyclohexane (Labscan, Thailand)
6. Ammonia (30wt.%) (Panreac, EU)
7. Sat. Ammonium sulfate
8. Acetone (Anala, England)
9. Acetic acid (BHD, Malaysia)
10. 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES) (Fluka, USA)
11. Glutaraldehyde (Fluka, USA)
12. Brovine serum albumin (BSA)(Fluka, Switzerland)
13. Phosphate buffer saline (PBS)
14. Quenching solution
15. Trimethoxysilyl-propyl diethyleanetriamine (DETA)
16. Succinic anhydride
17. 2.5% glutaraldehyde
18. 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)
19. Hitrap Protein A HP,5 mL
20. Storage buffer
21. 95% ethanol
22. 85% NaCl
23. Citric acid pH3
24. Tris HCl pH9
25. Distilled and deionized water
26. Plate Count Agar (PCA)

เครื่องมือ

1. Erlenmeyer flask
2. Cylinder
3. Tube
4. Glass pipette
5. Micropipette
6. Glass slide
7. Cover glass
8. Aluminum foil
9. Magnetic bar
10. Magnetic stirrer (VELP scientifica Model F203A0160, EU)
11. pH meter (EUTECH instrument Model pH/Ion 510, Malaysia)
12. Vortex mixture (Scientific Industries Model G-560E, USA)
13. Centrifuge (Sigma Model 202M, Germany)
14. Ultrasonicator (Sonics & Materials Model VCX500, USA)
15. Ultrafiltration (vivaspin 20-30,000MWCO)
16. Sonicator bath (Branson Model 2210R-MT, USA)
17. Epifluorescence microscope (Olympus Model Cover-Q18, Japan)
18. Transmission electron microscope (TEM)(JEOL Model Cover-Q18, Japan)
19. X-ray diffractometer (XRD)(Bruker AXS Model D8 Discover, Germany)
20. Fourier transformed infrared spectrometer (FT-IR spectrometer)(Perkin Elmer Model Spectrum One, USA)
21. Scanning electron microscope with energy dispersive X-ray spectrometer (SEM-EDS) (JSM-6400, Japan)
22. UV-visible spectrophotometer (Hitachi Model U-188, Japan)
23. Spectrofluorometer (Cary Eclipse, Australia)
24. Incubator (Mettler, Germany)
25. Hot air oven (Mettler, Germany)
26. Millipore filter 0.20 micrometer
27. SDS-Page
28. Swab
29. Glass rod

30. Amber glass bottle

จุลินทรีย์

1. *Escherichia coli* O157:H7
2. *Escherichia coli* ATCC 8739
3. *Enterobacter aerogenes*
4. *Proteus mirabilis*
5. *Salmonella Typhimurium* DMST 16809
6. *Bacillus cereus* ATCC 11778
7. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

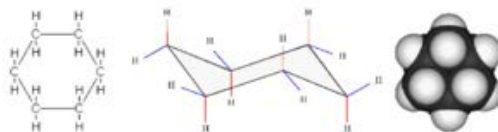
วิธีวิจัย

1. การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา นาโน (FDS-NPs)

ทำการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา นาโน FDS-NPs โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil microemulsion) ร่วมกับเทคนิคโซลเจล (sol-gel technique) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Lian *et al.*, 2004 สารที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย cyclohexane เป็นเฟสของน้ำมัน (oil phase) สารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescein Rubpy dye solution) เป็นเฟสของน้ำ (water phase) triton X-100 เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic surfactant) I-hexanol เป็นตัวช่วยสารลดแรงตึงผิว (co-surfactant) tetraethylorthosilicate (TEOS) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลิกา นาโน และ ammonium hydroxide (NH_4OH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการแตกตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) และปฏิกิริยาการรวมตัวด้วยน้ำ (condensation) ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา นาโนมีวิธีการทำเป็นขั้นตอนคือ ทำการผสม cyclohexane, I-hexanol, Rubpy dye solution, TEOS และ 30% ammonium hydroxide ในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร กวนผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากปฏิกิริยาดำเนินจนเสร็จสมบูรณ์ อนุภาคที่ได้จะถูกตกตะกอนด้วยอะซิโตน จากนั้นล้างอนุภาคด้วยเอทานอลและน้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อกำจัดตัวทำละลายและสารลดแรงตึงผิว นำอนุภาคมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จนแห้ง แล้วบดเป็นผงเก็บไว้ในขวดที่ปิดแสง

ในการเตรียมอนุภาคสังเคราะห์ได้มีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสังเคราะห์ได้แก่ 1. อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (triton X-100) 2. อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิว (I-hexanol) ต่อสารลดแรงตึงผิว (triton X-100) 3. ปริมาณสารตั้งต้น (TEOS) และ 4. ปริมาณสารเร่งปฏิกิริยา (NH_4OH)

นอกจากนี้เพื่อให้ได้ปริมาณอนุภาคต่อครั้งการผลิตเพิ่มมากขึ้น จึงทำการทดลองโดยเพิ่มปริมาณส่วนผสมต่างๆเป็น 2 เท่า โดยใช้พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นภาชนะในการทำปฏิกิริยาเช่นเดิม



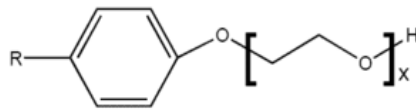
สูตรโครงสร้างของ cyclohexane

ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclohexane>



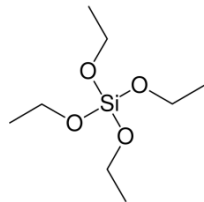
สูตรโครงสร้างของ n- Hexanol

ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/1-Hexanol>



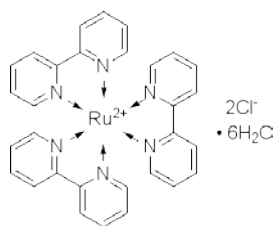
สูตรโครงสร้างของ triton X-100

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Triton_X-100



สูตรโครงสร้างของ tetraethylorthosilicate

ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/Tetraethylorthosilicate>



สูตรโครงสร้างของ Rubpy dye

ที่มา : [http://en.wikipedia.org/wiki/Tris\(bipyridine\)ruthenium\(II\)_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Tris(bipyridine)ruthenium(II)_chloride)

อนุภาค FDS-NPs ที่ได้นั้น ก่อนนำไปวิเคราะห์ในด้านต่างๆ ต้องทำให้อนุภาคกระจายตัวออกจากกัน (disperse) ใน 95% เอทานอลโดยใช้เครื่อง ultrasonicator เป็นเวลา 15 นาที (เปิด 7 วินาที ปิด 2 วินาที)

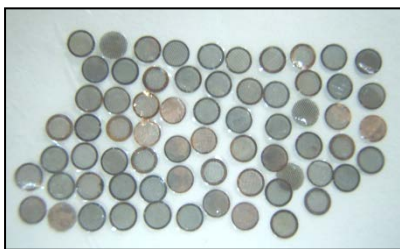


เครื่อง ultrasonicator

2. การตรวจวิเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนที่สังเคราะห์ได้

2.1 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาค (ขนาด รูปร่าง และความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค)

หลังจากอนุภาคกระจายตัวและอยู่อย่างเสถียร นำชั้นเพนชั้นของอนุภาคมาหยดลง Formvar carbon-coated copper grid ทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)



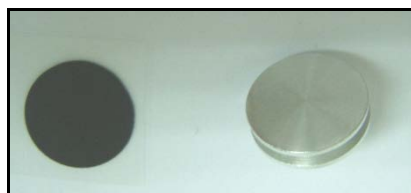
Formvar carbon-coated copper grid (TEM)



กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

2.2 วิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของอนุภาค

บดอนุภาค FDS-NPs ให้ละเอียดแล้วนำมาเคลือบบน carbon tape แล้วนำไปติดกับ holder จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดประกอบ อุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุด้วยรังสีเอ็กซ์ (SEM-EDS)



Holder และ Carbontape



กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.3 วิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาค

ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุภาค FDS-NPs ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้

Target	:	Cu
Voltage	:	40 kV
Current	:	40 mA
Angle	:	5-45 degree
Increment	:	0.02 degree/step
Scan speed	:	0.3 sec/step



เครื่อง X-ray diffractometer (XRD)

3. ศึกษาคุณสมบัติเชิงแสงของอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้

3.1 ศึกษาช่วงคลื่นแสงของการถูกกระตุ้น และ ช่วงคลื่นแสงของการเปล่งแสง

ช่วงคลื่นแสงของการถูกกระตุ้น (excitation wavelength) และช่วงคลื่นแสงของการเปล่งแสง (emission wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs จะถูกเปรียบเทียบกับของสารละลายสี Rubpy Dye

สำหรับการหาช่วงคลื่นของการถูกกระตุ้น ทำโดยนำเอาอนุภาค FDS-NPs มากระจายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสี Rubpy Dye นำมาเจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้ scan wavelength mode ส่วนการหาช่วงคลื่นการเปล่งแสง ทำโดยเตรียมตัวอย่างเหมือนขั้นตอนการหาช่วงคลื่นของการถูกกระตุ้นข้างต้น แต่นำไปตรวจด้วยเครื่อง spectrofluorometer



Spectrofluorometer



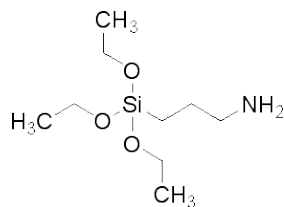
UV-visible spectrophotometer

3.2. ศึกษาความคงอยู่ของการเรืองแสง

ทำการศึกษาความคงอยู่ของการเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs โดยเปรียบเทียบกับสารละลายสี Rubpy Dye โดยนำเอาอนุภาค FDS-NPs มากระจายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสี Rubpy นำมาเจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำตัวอย่างมาวางใต้แสง UV ขนาด 8 วัตต์ แล้วเก็บมาวัดค่าการเรืองแสงทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที

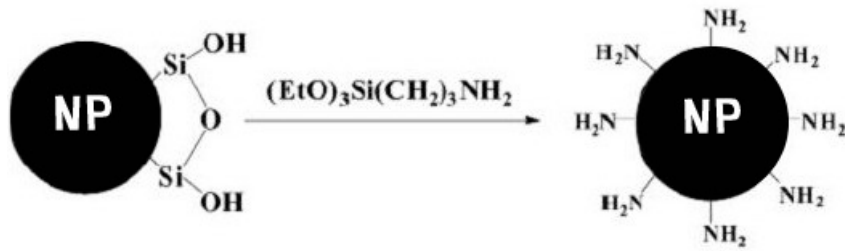
4. ทำการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค FDS-NPs ให้เกิดหมู่เอมีน และหมู่คาร์บอกซิล เพื่อติดแอนติบอดี

เนื่องจากการจะนำเอาอนุภาค FDS-NPs ไปใช้งานได้นั้น จำเป็นที่จะต้องทำให้สารชีวโมเลกุลสามารถติดอยู่บนผิวอนุภาคได้ก่อน ดังนั้นจึงต้องดัดแปลงผิวอนุภาคให้มีหมู่เคมีที่เหมาะสมเสียก่อน ซึ่งในที่นี้เป็นการดัดแปลงผิวอนุภาคให้มีหมู่อะมิโนโดยใช้สาร APTES และดัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลโดยใช้ trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) คือทำให้เกิดหมู่เอมีนก่อน หลังจากนั้นใช้สาร succinic anhydride แทนที่หมู่เอมีนทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล และยืนยันการมีอยู่ของหมู่อะมิโนหลังขั้นตอนการดัดแปลง ด้วยเครื่อง FT-IR

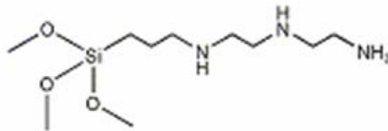


สูตรโครงสร้างของ APTES

ที่มา : <http://www.sigmaaldrich.com>

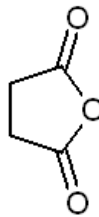


APTES ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุภาคนาโนเกิดเป็นหมู่เอมีน



สูตรโครงสร้างของ DETA

ที่มา : <http://www.sibond.com>



สูตรโครงสร้างของ succinic anhydride

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Succinic_anhydride



เครื่อง Fourier Transformed Infrared Spectrophotometer

5. การทำโพลีโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

E. coli O157 polyclonal IgG 20 มิลลิลิตร ได้จาก S&A Reagent Lab โดยทางบริษัทแยก IgG จาก plasma ของเลือดกระต่าย แล้วมาทำให้เข้มข้น (concentrate) ได้นำมาทดสอบดังนี้

5.1 ตรวจสอบ specificity test โดยวิธี slide agglutination

5.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ของ *E. coli* O157 polyclonal IgG

5.3 ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography method โดยใช้ SDS-PAGE

วิธีเตรียมตัวอย่าง polyclonal IgG ก่อนทำให้บริสุทธิ์

นำ concentrate polyclonal IgG ที่เตรียมไว้ ผสม 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:1 ปรับ pH ด้วย Tris-HCl (pH 8.0) นำมาตกตะกอนด้วย Sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000Xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตะกอนของ mixed protein ที่อยู่ในซีรัมนั้น ต่อก่อนนำไปละลายใน PBS(1X) ที่ pH 7.2 แยกต่อกับ ultrafiltration (vivaspin 20-30,000 MWCO ที่ 3 wash cycles แล้วกรองผ่านเครื่องกรองขนาดรู 0.20 μM รอทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การทำให้ IgG บริสุทธิ์

โดยใช้ Protein A sepharose affinity column (Hitrap Protein A HP, 5 mL) โดย equilibrated ด้วย 5 เท่าปริมาตรของ binding buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) ก่อน เสร็จแล้วใส่ antiserum IgG ลงไป ชะล้าง impurities และ unbound materials อื่นๆ ด้วย 5-10 เท่าปริมาตรของ binding buffer เก็บ fraction ละ 1 mL หลายๆ fraction นำมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วย UV spectrometer ที่คลื่นแสง 280 nm หลังจากนั้น ทำการชะล้างโดยใช้ ด้วย 5 เท่าปริมาตร ของ elution buffer (0.1M citric acid pH 3) เลือก fraction ที่มี IgG ทำให้เป็นกลางด้วย Tris HCl pH 9.0 และนำมารวมกัน ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ lowry method แล้วนำมา purified ด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เชื้อทดสอบ

นำเชื้อที่ใช้ทดสอบกับ concentrate *E. coli* O157 polyclonal IgG ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ

Staphylococcus aureus ATCC 25923 ใน แต่ละสายพันธุ์ลงในอาหาร TSB บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบ agglutination test โดยใช้สไลด์แก้ว

6. การติด (coat) IgG บนผิวอนุภาคซิลิกาnano

ใช้ ชัสเฟนชั้น IgG ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ความเข้มข้น 100 mg/mL บ่มกับอนุภาคที่ ดัดแปลงผิวแล้วโดย ปรับอุณหภูมิในการบ่ม 2 อุณหภูมิ คือที่ 4 และ 37 องศาเซลเซียส และปรับระยะเวลาในการบ่มที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยใช้ condition ที่ดีที่สุดที่ได้ (maximum loading capacity) ต่อไปทดสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดบน อนุภาค โดย วิธี Lowry โดยตรวจวัดค่าการเปลี่ยนสีจากเครื่อง colorimetric techniques

6.1 ทดสอบความเสถียรหรือการกระจายตัวกันของอนุภาคซิลิกาnanoที่ติด (coat) ด้วย IgG

ความเสถียรหรือการกระจายตัวกันของอนุภาคซิลิกาnanoที่ติด (coat) ด้วย IgG ตรวจสอบ โดยการวัดค่า Zeta potential วิธีการ คือ นำอนุภาคซิลิกาnanoที่โค้ตด้วย IgG และที่ไม่โค้ต มาผสมกับ 0.1XPBS (0.2mg/mL) ที่ pH 7.4 ซึ่งเป็นค่า pH ที่ เหมาะสมต่อการจับกับ antigen และ antibody และผสม NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อให้มีค่า ionic strength ต่าง ๆ กัน แล้ววัดค่า zeta potential ด้วยเครื่อง Zeta meter จากการทดลองพบว่า อนุภาคซิลิกาnano ที่ยังไม่โค้ตด้วย IgG จะกระจายตัวดีที่สุดในที่ ionic strength 0.167 ซึ่งมีค่า zeta potential ประมาณ -115 mV แต่เมื่อนำอนุภาค มา coat ด้วย IgG ค่า Zeta potential เปลี่ยนไปคือมีค่าประมาณ -40(-50) mV เมื่อค่า ionic strength อยู่ในช่วง 0.05-0.3 ตามลำดับ (ค่าลดลงอีกเล็กน้อยเมื่อค่า ionic strength เพิ่มขึ้น) เนื่องจากมี IgG ที่เกาะอยู่บนพื้นผิว สรุปได้ว่าอนุภาคซิลิกาnanoที่ จับกับ IgG จะเสถียรและกระจายตัวกันดี อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่ม ion concentration ให้ สูงขึ้นมีผลทำให้แอนติบอดีสูญเสียสภาพและประสิทธิภาพการเกาะของแอนติเจนกับ แอนติบอดีลดลง ดังนั้นจึงใช้ค่า ionic strength 0.167 และค่า ionic strength ของ PBS(1X) ประมาณ 0.17 จึงเป็นการดีที่ใช้ PBS(1X) ในการเตรียม solution ต่อไป

$$\text{สูตรคำนวณ } I = \frac{1}{2} \sum CZ^2$$



เครื่อง Zeta meter

7. การจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีกับเชื้อ *E. coli* O157:H7

หลังจากตัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคซิลิกาnano ให้มีหมู่ NH_2 แล้ว ทำซัสเพนชันของอนุภาคโดยใช้อนุภาค 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน PBS(1X) ผสม 2.5% glutaraldehyde ที่ pH 7.4 กวนผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงให้อนุภาคตกตะกอน แล้วล้างด้วย PBS เพื่อเอา glutaraldehyde ออก นำมา resuspended ใน PBS(1X) แล้วใส่ *E. coli* O157:H7 IgG 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ Final concentration ของอนุภาค เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งอนุภาคซัสเพนชันเป็น 2 ส่วน คือ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส แต่ละอุณหภูมิ ตรวจผล ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วทดสอบโปรตีนโดย วิธี Lowry เช่นเดียวกัน

8. การตรวจสอบการจับกันของ อนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีกับเชื้อ *E. coli* O157 H:7

8.1 ทดสอบอนุภาคซิลิกา nano ที่เคลือบ IgG แล้วกับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ในหลอดทดสอบ โดยการนำอนุภาคมาผสมกับเซลล์ซัสเพนชันของ *E. coli* O157:H7

ในหลอดทดสอบ นำซัสเพนชันส่องดูใต้กล้อง epifluorescence

8.2 ทดสอบอนุภาคซิลิกา nano ที่เคลือบ IgG แล้วกับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 บนแผ่นสไลด์แก้ว โดยเพาะเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนสไลด์แก้วก่อน แล้วจึงทดสอบกับอนุภาคซิลิกา nano ที่เคลือบ IgG โดยนำอนุภาคมาย้อมด้วย DAPI (สาร fluorescent dye มา bind กับ DNA ของจุลินทรีย์ ตรวจดูโดยใช้กล้อง epifluorescence microscope นำมาส่องกับ แสง UV จะให้สารเรืองแสงสีฟ้า (blue luminescence) ทำ 3 ซ้ำในแต่ละ treatment

8.2.1 ปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่ม

8.2.2 ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอนุภาค

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับของอนุภาค = $\frac{\text{เซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดกับอนุภาค} \times 100}{\text{เซลล์แบคทีเรียทั้งหมด}}$
(captured efficiency)

8.3 การตรวจหา specificity

ใช้ แผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ในแต่ละสายพันธุ์ลงในอาหาร TSB บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่สลับมา swab ลงบน PCA แล้ววาง แผ่นสไลด์แก้วบนอาหาร PCA ปิดฝาจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเจริญเกาะบนผิวสไลด์แก้ว ใช้ปากคีบคีบ สไลด์ออกมาล้างเบาๆเพื่อเอาเชื้อที่ไม่ได้เกาะสไลด์ออก จากนั้นนำมาทดสอบกับ อนุภาคซิลิกาโนที่เคลือบแอนติบอดี 0.5 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมด้วยสี DAPI และตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescence แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความจำเพาะเช่นเดียวกัน

ผลและวิจารณ์

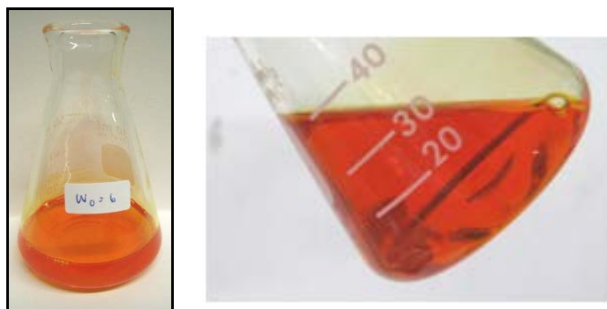
1. การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา (FDS-NPs)

จากการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล ผลทดลองพบว่าทุก ๆ ปัจจัย ได้แก่ 1. อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (W_o) 2. อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิว (P) โดยให้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวคงที่ 3. ปริมาณของสารตั้งต้น (TEOS) ในการสังเคราะห์ซิลิกา และ 4. ปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยา (NH_4OH) ในการสังเคราะห์ซิลิกา มีผลต่ออนุภาคที่สังเคราะห์ได้ (FDS-NPs) ทั้งสิ้น

ขั้นตอนการสังเคราะห์แต่ละขั้นตอนได้แสดงไว้ในภาพที่ 1.1 ในระยะเริ่มต้นของการสังเคราะห์ ส่วนผสมต่างๆจะมีสีส้ม เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไป 24 ชั่วโมง ลักษณะโดยทั่วไปยังคงเหมือนเดิมดังภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.1 การสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ด้วยไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เสถียร ในระยะเริ่มต้น



ภาพที่ 1.2 การสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ด้วยไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เสถียร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

เมื่อเติมอะซีโตน (acetone) ลงไปเพื่อหยุดระบบไมโครอิมัลชันที่เสถียร จะมีตะกอนสีส้มขุ่นลักษณะคล้ายเจลเกิดขึ้น ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงปฏิกิริยาการเกิดอนุภาคสมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว

อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะกลม มีสีส้มใสคล้ายเจล สามารถมองทะลุผ่านได้ และมีความเสถียร คือสามารถคงความเป็นไมโครอิมัลชันได้นานในระบบปิด ดังภาพที่ 1.3



ภาพที่ 1.3 หลังจากเติมอะซีโตน EDS-NPs ซึ่งตะกอนที่ได้จะมีลักษณะคล้ายเจลสีส้ม

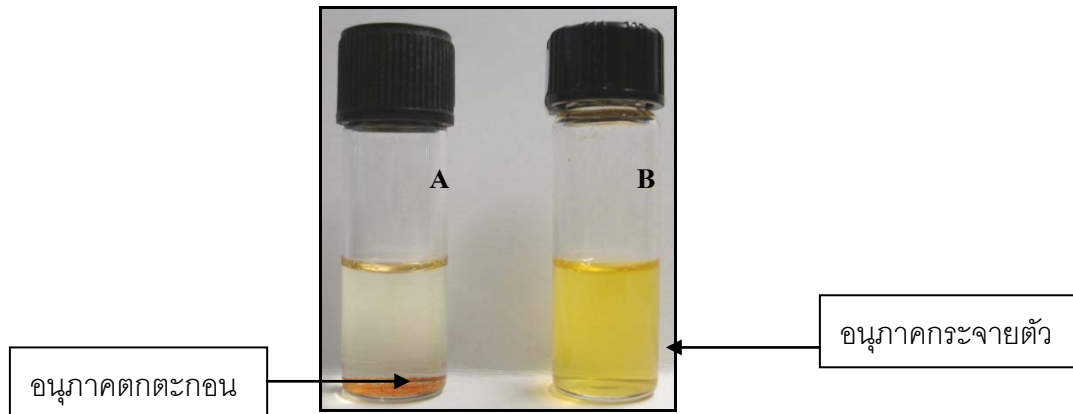
หลังจากนั้น อนุภาค EDS-NPs ที่ได้จะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเพื่อกำจัดสารลดแรงตึงผิวและสีส่วนเกินออก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และบดให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้ว อนุภาคที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม ดังภาพที่ 1.4 นำมาเก็บในขวดทึบแสงก่อนนำมาวิเคราะห์ด้านอื่นต่อไป



ภาพที่ 1.4 อนุภาค EDS-NPs มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม

ปริมาณอนุภาคที่ได้จากการสังเคราะห์แต่ละครั้งนั้น ถ้าใช้สารตั้งต้นปริมาณ 1 เท่า (EDS-NPs1X) จะได้ปริมาณอนุภาคประมาณ 20 มิลลิกรัม และถ้าใช้สารตั้งต้นปริมาณ 2 เท่า (EDS-NPs2X) จะได้ปริมาณอนุภาคประมาณ 40 มิลลิกรัม

อนุภาค FDS-NPs ก่อนนำไปวิเคราะห์ในด้านต่างๆ ต้องทำให้กระจายตัวออกจากกัน (disperse) ใน 95% เอทานอลโดยใช้เครื่อง ultrasonicator จึงได้อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนที่มีความเสถียรแขวนลอยใน 95% เอทานอลอย่างคงตัว (ภาพที่ 1.5)

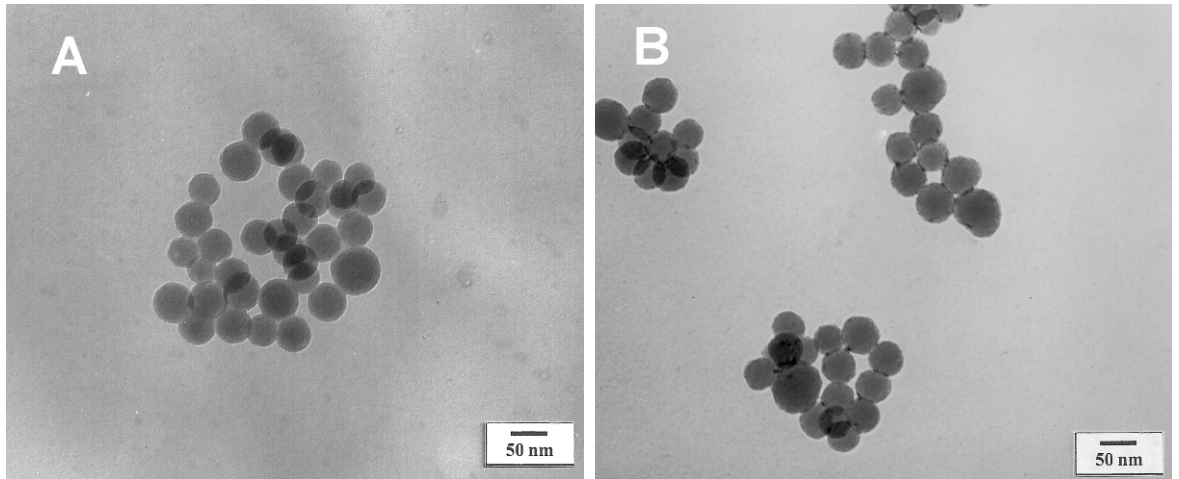


ภาพที่ 1.5 อนุภาค FDS-NPs ก่อน (A) และ หลัง (B) ทำให้กระจายใน 95% เอทานอล

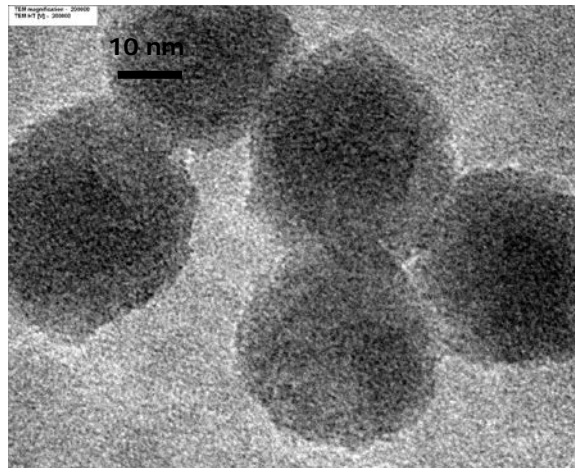
2. การตรวจวิเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกานาโนที่สังเคราะห์ได้

2.1 ตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาค

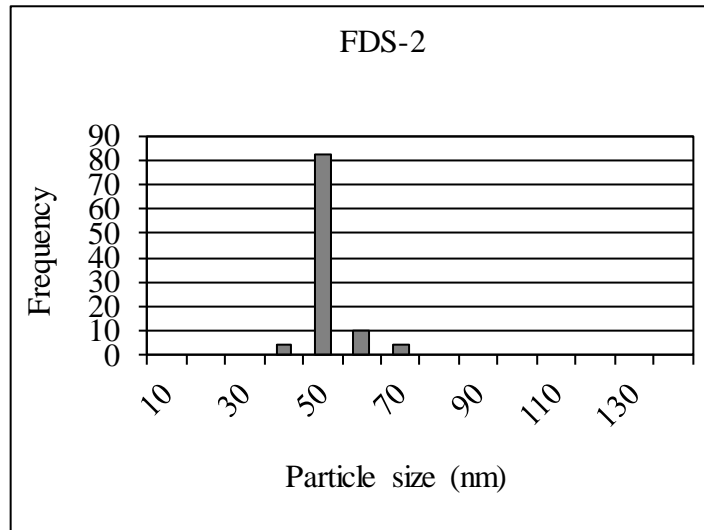
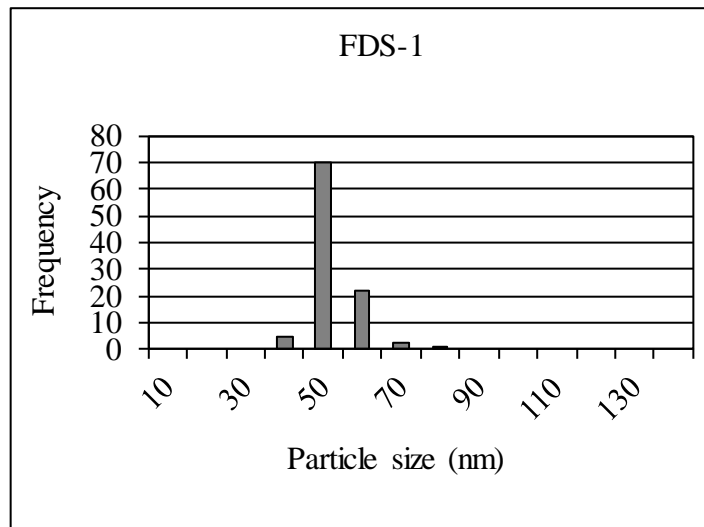
ลักษณะทางสัณฐานของอนุภาคถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) โดยแสดงไว้ในภาพที่ 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 และ ตารางที่ 2.1.1 ขนาดเฉลี่ยของ FDS- NPs1X คือ 47 ± 6 นาโนเมตร และ FDS- NPs2X คือ 45 ± 6 นาโนเมตร อนุภาคจากทั้งสองตัวอย่างมีรูปร่างกลมค่อนข้างจะเหมือนกัน และมีขนาดที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจาก FDS- NPs2X ให้อนุภาคที่มีการกระจายตัวของขนาดที่ต่ำกว่า และให้ปริมาณอนุภาคต่อการสังเคราะห์มากกว่า ดังนั้นจึงเลือก FDS- NPs2X มาทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 2.1.1 อนุภาคซิลิกานาโน FDS- NPs1X (A) และ FDS- NPs2X (B) วิเคราะห์โดยใช้ TEM ที่กำลังขยาย 160,000 เท่า



ภาพที่ 2.1.2 อนุภาคซิลิกานาโนวิเคราะห์โดยใช้ TEM ที่กำลังขยาย 200,000 เท่า



ภาพที่ 2.1.3 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค FDS- NPs1X และ FDS- NPs2X

ตารางที่ 2.1.1 พารามิเตอร์และขนาดของอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้

Sample	Parameter	Size (nm): d = diameter	Average size (nm)
FDS- NPs1X	7.5 ml cyclohexane 1.8 ml 1-hexanol 3.54 ml Triton X-100 0.48 ml Rubpy solution 0.1 ml TEOS 0.09 ml NH ₄ OH	35<d<71	47 ± 6
FDS- NPs2X	15 ml cyclohexane 3.6 ml 1-hexanol 3.54 ml Triton X-100 0.96 ml Rubpy solution 0.2 ml TEOS 0.18 ml NH ₄ OH	38<d<68	45 ± 6

ในการสังเคราะห์ FDS-NPs นี้ TEOS ถูกใช้เป็นสารตั้งต้น แล้วทำปฏิกิริยากับน้ำโดยกระบวนการโซลเจลเกิดเป็นโพลิเมอร์ของ SiO₂ หรือซิลิกา (Santra *et al.*, 2001) กระบวนการเกิดโพลิเมอร์จะถูกเร่งโดย NH₄OH ภายในระบบไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน ส่วนที่เป็นน้ำจะกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆภายในน้ำมัน โดยถูกล้อมรอบด้วยชั้นบางๆของสารลดแรงตึงผิวซึ่งก็คือ Triton X-100 และ 1-hexanol ดังนั้นส่วนของน้ำและน้ำมันจึงถูกแยกออกจากกัน และภายในหยดน้ำเล็กๆนั่นเองจะเป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาเคมีเพื่อให้เกิดอนุภาค (Zhao *et al.*, 2004) ยิ่งกว่านั้น ขนาดของอนุภาคยังสามารถถูกควบคุมได้ด้วย การปรับอัตราส่วนระหว่างน้ำและสารลดแรงตึงผิว (Abarkan *et al.*, 2006) ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไปนั้นโมเลกุลของสี Rubpy ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของน้ำ ก็จะถูกโครงสร้างของซิลิกาที่ก่อตัวขึ้นโอบล้อมและถูกกักไว้ในโครงสร้างของซิลิกาในที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงทำให้อนุภาคซิลิกาที่ได้มีคุณสมบัติในการเรืองแสง

2.2 วิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของอนุภาค (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด)

ผลการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของ FDS-NPs โดยใช้เครื่อง SEM-EDS (ภาพที่ 2.2 และตารางที่ 2.2) ได้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคประกอบด้วยธาตุซิลิกอน (Si) 11.31% atomic ธาตุออกซิเจน (O) 64.43% atomic ธาตุรูทีเนียม (Ru) 0.15% atomic และ

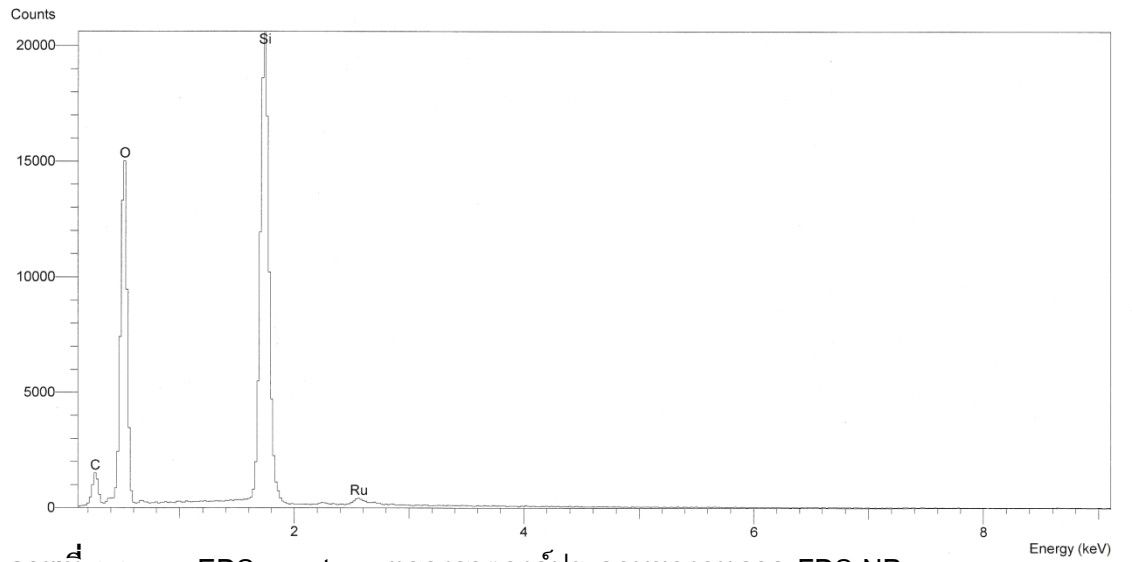
ธาตุคาร์บอน (C) 24.11% atomic จากผลการตรวจพบธาตุที่นิยมในอนุภาคเป็นการ ยืนยันได้ว่ามีสี Rubpy ภายในอนุภาค ส่วนการตรวจพบธาตุคาร์บอนนั้น มีความเป็นไปได้ 3 กรณี คือ

1. ธาตุคาร์บอนมาจากโมเลกุลของสี Rubpy dye
2. ธาตุคาร์บอนมาจากโมเลกุลของแอลกอฮอล์ที่เกิดจากปฏิกิริยา alcohol condensation ในกระบวนการโซล-เจล
3. ธาตุคาร์บอนมาจากสารอินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งติดแน่นกับตัวอนุภาค

ส่วนในกรณีของธาตุออกซิเจนซึ่งถูกตรวจพบเป็นปริมาณมากเกินกว่าอัตราส่วนของ SiO_2 ที่ควรจะมีอัตราส่วน Si ต่อ O เท่ากับ 1:2 นั้น มีความเป็นไปได้ว่าออกซิเจนที่เกินมานั้นมาจากโมเลกุลของน้ำที่เกาะแน่นกับอนุภาค ซึ่งสามารถยืนยันได้จากผลการวิเคราะห์ด้วย FT-IR ที่แสดงถึงโมเลกุลน้ำในอนุภาค

ตารางที่ 2.2 ธาตุองค์ประกอบของ FDS-NPs

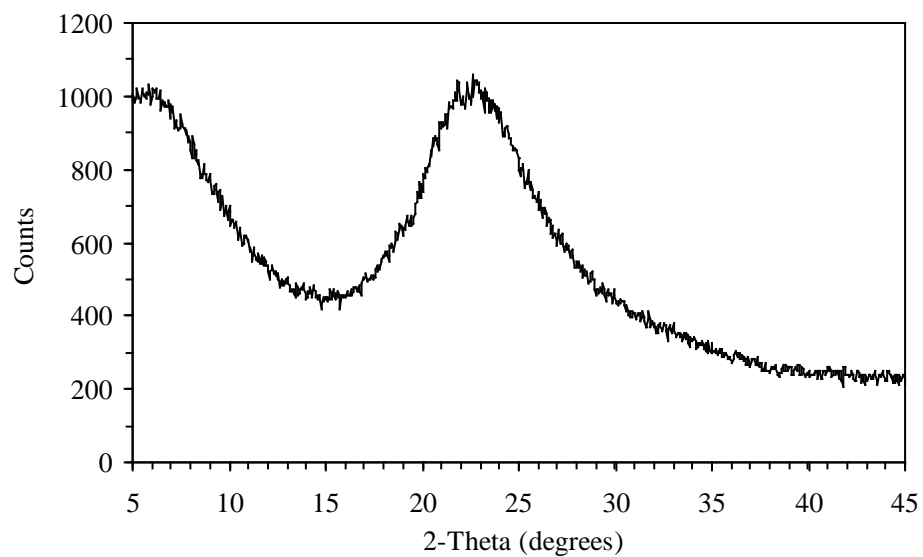
Element	Weight %	Atomic %
Si	19.22	11.31
O	62.35	64.43
Ru	0.92	0.15
C	17.51	24.11
Total	100.00	100.00



ภาพที่ 2.2 EDS spectrum แสดงธาตุองค์ประกอบของอนุภาค FDS-NPs

2.3 ตรวจสอบโครงสร้างด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD)

เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วสารประเภทซิลิกาสามารถแบ่งได้เป็นสองรูปแบบคือ แบบผลึกและแบบอสัณฐาน ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบโครงสร้างของ FDS-NPs ด้วยเครื่อง XRD นั้น ลักษณะของกราฟที่ได้ดัง แสดงในภาพที่ 2.3 ซึ่งลักษณะเส้นกราฟมีช่วงสูงระหว่าง 18 ถึง 30 องศา (มีจุดสูงสุดที่ 22 องศา) ลักษณะที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาค FDS-NPs มีโครงสร้างเป็นแบบอสัณฐาน (Zhao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010)



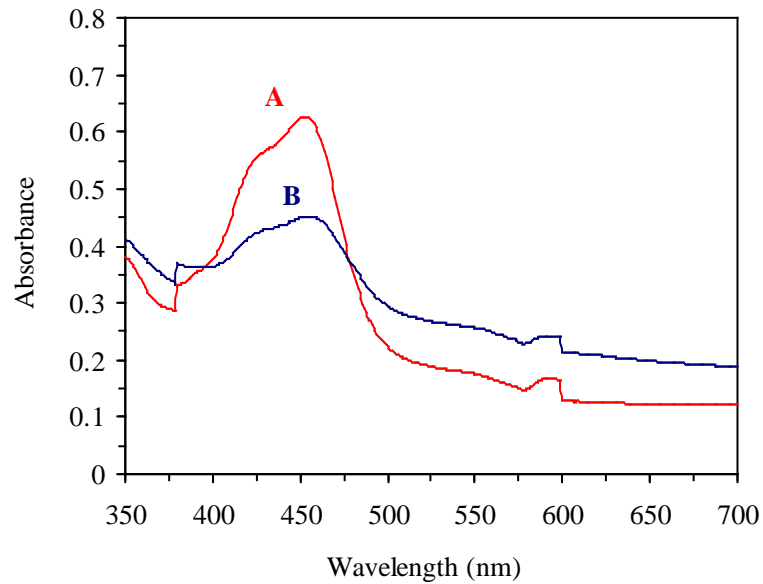
ภาพที่ 2.3 รูปแบบ XRD สเปกตรัมของอนุภาค FDS-NPs

3. คุณสมบัติเชิงแสงของอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้

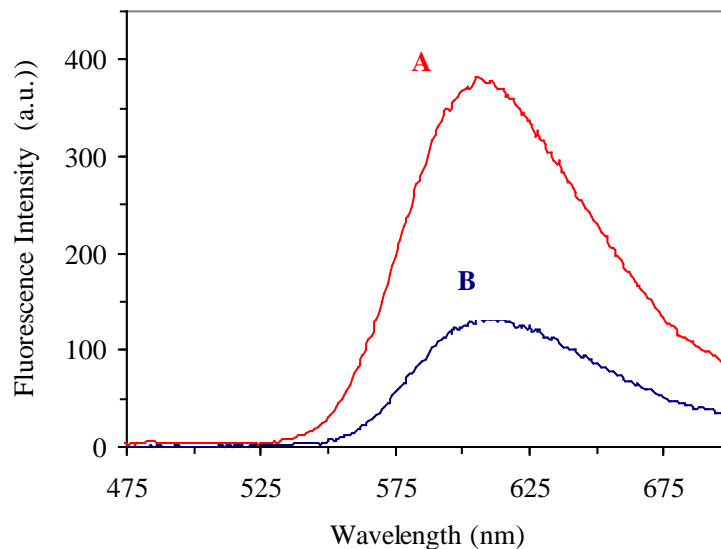
ศึกษาช่วงคลื่นแสงของการถูกกระตุ้นและการเปล่งแสง

ในการศึกษานี้สีเรืองแสงที่เลือกใช้ คือ Rubpy ซึ่งเป็นสีย้อมอินทรีย์เรืองแสงที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ดังนั้นจึงสามารถละลายในส่วนของน้ำได้ดี เหมาะต่อการสังเคราะห์ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน ช่วงคลื่นแสงของการถูกกระตุ้นและการเรืองแสงถูกตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer และ spectrofluorometer ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 3.1 และ 3.2 ในแต่ละภาพแสดงการเปรียบเทียบระหว่างสารละลายสี Rubpy และอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสี Rubpy และอนุภาค FDS-NPs มีค่าการกระตุ้นหรือค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงแสง UV ถึงแสงสีน้ำเงิน โดยมีค่าสูงสุดเหมือนกันที่ความยาวคลื่น

455 นาโนเมตร และมีค่าการเรืองแสงในช่วงแสงสีส้ม โดยมีค่าสูงสุดเหมือนกันที่ความยาวคลื่น 606 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.1 สเปกตรัมการถูกกระตุ้นด้วยแสงของ (A) อนุภาค FDS-NPs และ (B) สารละลายสี Rubpy ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

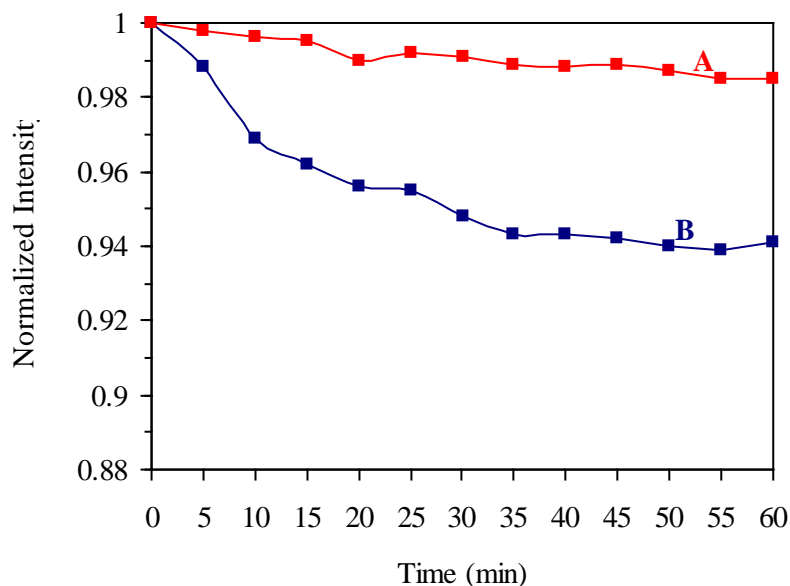


ภาพที่ 3.2 สเปกตรัมการเปล่งแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่น 455 นาโนเมตรของ (A) อนุภาค FDS-NPs และ (B) สารละลายสี Rubpy ด้วยเครื่อง spectrofluorometer

สำหรับการทดลองเรื่องความคงอยู่ของการเรืองแสง โดยให้อนุภาค FDS-NPs ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV (ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร) โดยใช้หลอดเมอคิวรีกำลัง 8 วัตต์ เป็นเวลา 60 นาที (ภาพที่ 3.3) เมื่อเปรียบเทียบความคงอยู่ของการเรืองแสง พบว่าความสว่างของการเรืองแสงลดลงไปประมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่สารละลายสี Rubpy ลดลงไปมากประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.4) สาเหตุที่ FDS-NPs มีความเสถียรของแสงเนื่องจากภายในอนุภาคมีโมเลกุลของสีเรืองแสงอยู่อย่างหนาแน่นภายในอนุภาคขนาดเล็ก (Yan *et al.*, 2007) นอกจากนี้โครงสร้างของซิลิกา ยังทำหน้าที่ปกป้องสีจากการเกิด photobleaching และ photodegradation ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบได้ในสีเรืองแสงทั่วไป



ภาพที่ 3.3 ลักษณะการเรืองแสงของอนุภาค FDS-NPs เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV 8 W (ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร)

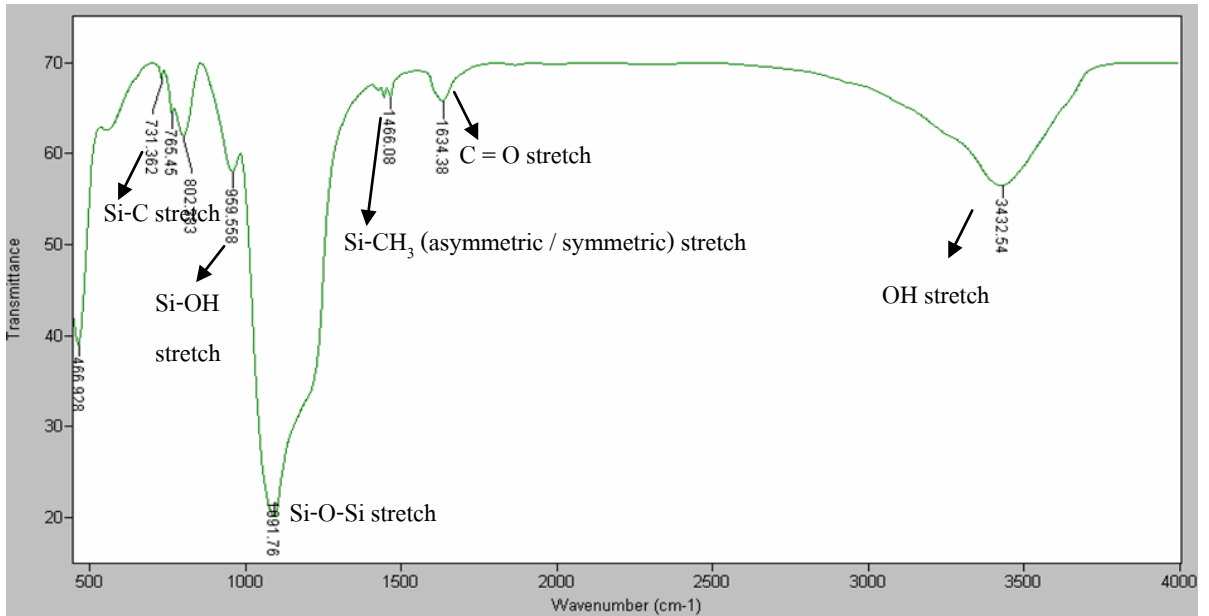


ภาพที่ 3.4 เปรียบเทียบความคงอยู่ของการเรืองแสงระหว่าง (A) อนุภาค FDS-NPs และ (B) สารละลายสี Rubpy exposed to UV (8W, 365 nm) light of mercury lamp

4. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาnano FDS-NPs ก่อนและหลังตัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค

4.1 อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา nano ก่อนตัดแปลงพันธะเคมี

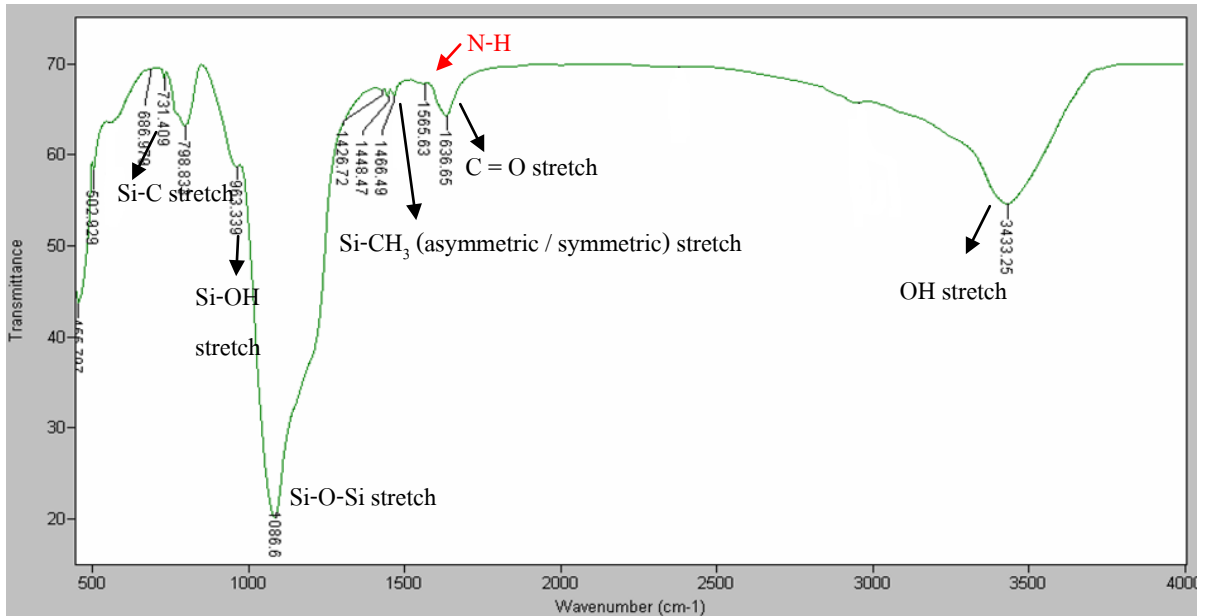
เมื่อนำอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้ และยังไม่ผ่านการตัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค นำมาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR พบว่าประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ซึ่งพบในช่วงความยาวคลื่น 3,200 –3,600 cm^{-1} หมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 1,091 cm^{-1} และหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 1,634 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคที่แสดงถึงโครงสร้างหลักของซิลิกาแสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs ก่อนดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค

4.2 อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาnano ที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีน

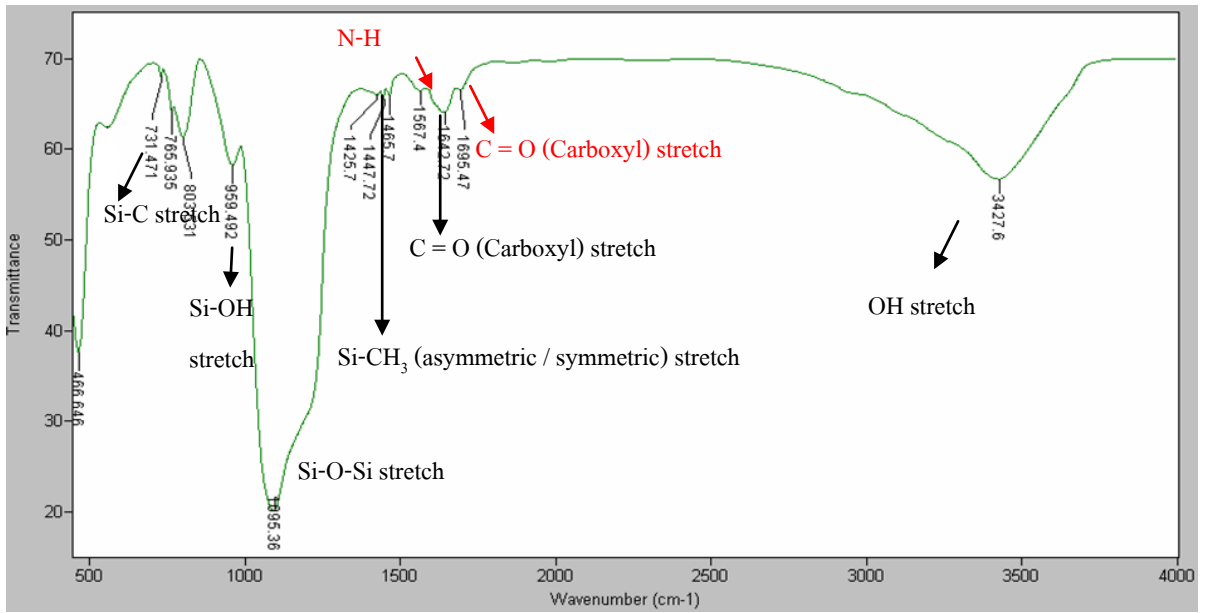
จากผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาค FDS-NPs หลังจากดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีนด้วย (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) แสดงดังภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบกับกราฟของอนุภาค FDS-NPs ที่ไม่ได้มีการดัดแปลงพันธะเคมีใดๆ (ภาพที่ 4.1) พบว่ามีความแตกต่างกันที่ความยาวคลื่น $1,565\text{ cm}^{-1}$ มีพีคเกิดขึ้นดังภาพที่ 4.2 พบว่าเป็นตำแหน่งของหมู่เอมีนชนิด primary amine (แม้แอมรลิตี้ และ อมร เพชรสม, 2535; เย็นหทัย แน่นหนา, 2549) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ APTES ทำให้เกิดหมู่เอมีนได้ตามต้องการ



ภาพที่ 4.2 FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีนด้วย (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES)

4.3 อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกาโนที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

จากผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาค FDS-NPs หลังจากดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลโดยใช้ trimethoxysilyl-propyl diethylenetriamine (DETA) เพื่อให้เกิดหมู่เอมีนก่อน หลังจากนั้นใช้ succinic anhydride เพื่อแทนที่หมู่เอมีนทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่ากราฟที่เกิดขึ้นมีพีคที่แตกต่างจากอนุภาค FDS-NPs ที่ยังไม่ผ่านการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค (ภาพที่ 4.1) ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น $1,567\text{ cm}^{-1}$ เป็นหมู่เอมีนชนิด primary amine และที่ตำแหน่งความยาวคลื่น $1,695\text{ cm}^{-1}$ เป็นหมู่คาร์บอกซิลเกิดขึ้นดังภาพที่ 4.3 (มัน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535; เย็นหทัย แน่นหนา, 2549) แสดงว่าสามารถติดตั้งหมู่คาร์บอกซิลที่ผิวอนุภาคได้ตามวัตถุประสงค์แต่ยังคงเหลือหมู่เอมีนที่ไม่ได้ถูกแทนที่ด้วยหมู่คาร์บอกซิลเหลืออยู่



ภาพที่ 4.3 FTIR Spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาคด้วย trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) และ succinic anhydride ให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

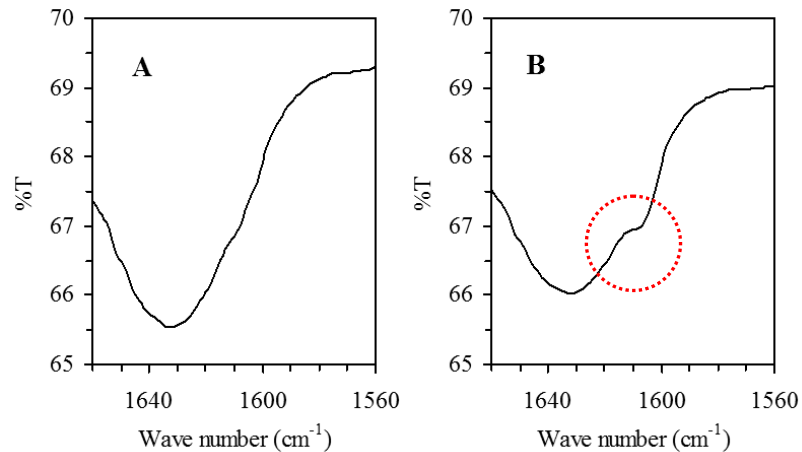
จากลักษณะของเส้นกราฟที่ได้ สามารถสรุปออกมาเป็นตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงหมู่เคมีและพันธะต่างๆที่พบในอนุภาค FDS-NPs

ตารางที่ 4.1 หมู่เคมีและพันธะเคมีที่พบในอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้ ก่อนและหลังดัดแปลง

Wave number (cm ⁻¹)	Assignment	References
1030-1130	Si–O–Si stretching	Liu <i>et al.</i> , 2007; Shi <i>et al.</i> , 2009
1000-1200	vibration C–H stretching vibration	Shi <i>et al.</i> , 2009
1600-1630	O–H bending vibration of adsorbed H ₂ O	Asouhidou <i>et al.</i> , 2009; Shi <i>et al.</i> , 2009
1580-1650	N–H bending vibration	Asouhidou <i>et al.</i> , 2009; Shi <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2010
2925	C–H asymmetric stretching vibration	Liu <i>et al.</i> , 2007; Asouhidou <i>et al.</i> , 2009
3280-3400	–NH ₂ asymmetric and symmetric stretching vibration	Asouhidou <i>et al.</i> , 2009; Shi <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2010
3000-3600	O–H asymmetric and symmetric stretching vibration of adsorbed H ₂ O	Asouhidou <i>et al.</i> , 2009; Shi <i>et al.</i> , 2009
3000-3600	O–H stretching vibrations of Si–OH	White and Tripp, 2000; Liu <i>et al.</i> , 2007

เนื่องจาก IR bands มีช่วงที่ทับซ้อนกันคือ N–H bending vibration ทับซ้อนกับ O–H bending vibration of adsorbed H₂O ที่ 1600-1650 และ –NH₂ asymmetric and symmetric stretching vibration ทับซ้อนกับ O–H asymmetric and symmetric stretching vibration of adsorbed H₂O และ O–H stretching vibrations of Si–OH ที่ 3000-3600 จึงยากที่จะแยกให้เห็นความแตกต่างของ อนุภาคซิลิกานาโนที่ดัดแปลงหมู่ functional group แล้วกับที่ยังไม่ดัดแปลง อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ จะเห็นได้ว่ากราฟของอนุภาค FDS-NPs ก่อนการดัดแปลงและหลังการดัดแปลงให้มีหมู่อะมิโน มีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างมาก แต่เมื่อนำมาขยายดูเฉพาะในช่วงเลขคลื่น 1600-1630 cm⁻¹ จะมีจุดแตกต่างสองตำแหน่งคือ อนุภาคที่ผ่านการ

ดัดแปลงจะมีตำแหน่งดูดกลืนเพิ่มขึ้นมาบริเวณเลขคลื่นที่ 1600 ถึง 1610 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนของหมู่อะมิโน ในขณะที่อนุภาคที่ไม่ดัดแปลงบริเวณนี้จะมีเส้นกราฟที่ค่อนข้างเรียบ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบ FTIR Spectrum ในช่วงเลขคลื่น 1600-1630 cm^{-1} ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ ระหว่างอนุภาคก่อนการดัดแปลงพันธะเคมี (A) และหลังการดัดแปลง พันธะเคมี (B)

นอกจากนี้หากพิจารณาในช่วงคลื่น 3000 ถึง 3600 cm^{-1} ซึ่งโดยปกติเป็นช่วงการดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ของ Si-OH และ ของน้ำ จะพบว่ากราฟของอนุภาคซิลิกาโนที่ผ่านการดัดแปลงจะมีช่วงการดูดกลืนที่กว้างกว่าเล็กน้อยอันเนื่องมาจากการดูดกลืนของหมู่อะมิโนที่เพิ่มเข้ามา

5. การทำโพลีโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

E. coli O157 polyclonal IgG นี้ได้จาก S&A Reagent Lab โดยแยก IgG จาก plasma ของเลือดกระต่าย มาทำให้เข้มข้น (concentrate) และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography method ในห้องปฏิบัติการ ชั้นแรกได้ตรวจสอบ antiserum *E. coli* O157 polyclonal IgG กับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้ ดังนี้

5.1 การทดสอบ ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ได้นำ concentrate *E. coli* O157 polyclonal IgG มาทดสอบการเกิด agglutination กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี slide agglutination ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 การทดสอบ การเกิด agglutination ของ *E. coli* O157 polyclonal IgG กับเชื้อ *E. coli* O157:H7

แบคทีเรีย	ผล agglutination
<i>Escheria coli</i> O157:H7	+
<i>E. coli</i> ATCC 8739	—
<i>En. aerogenes</i>	—
<i>P. mirabilis</i>	—
<i>S. Typhimurium</i> DMST 16809	—
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	—
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	—

+ : ผลบวก เกิดตะกอนของซัสเฟนชัน

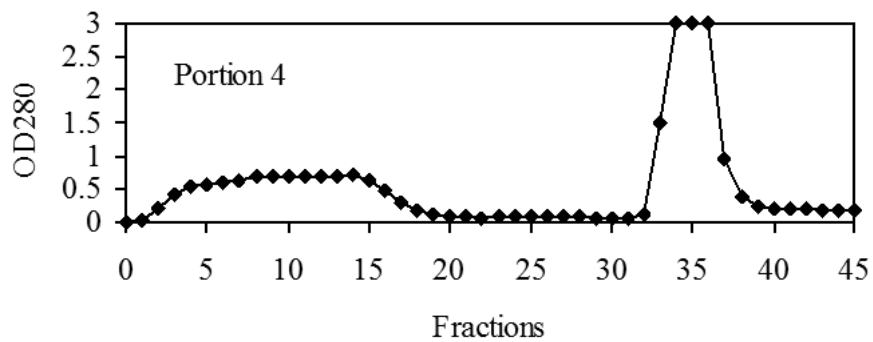
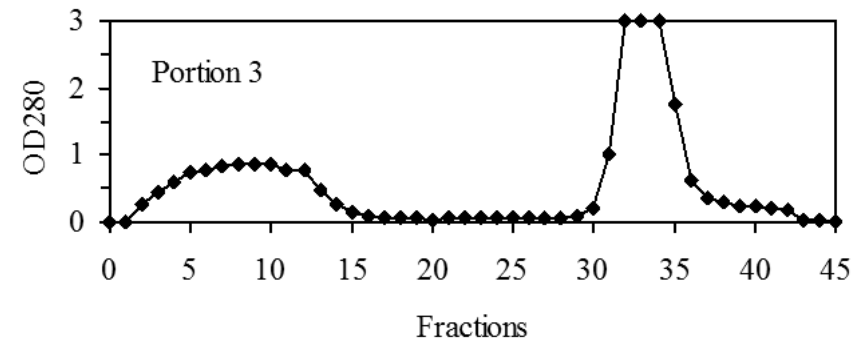
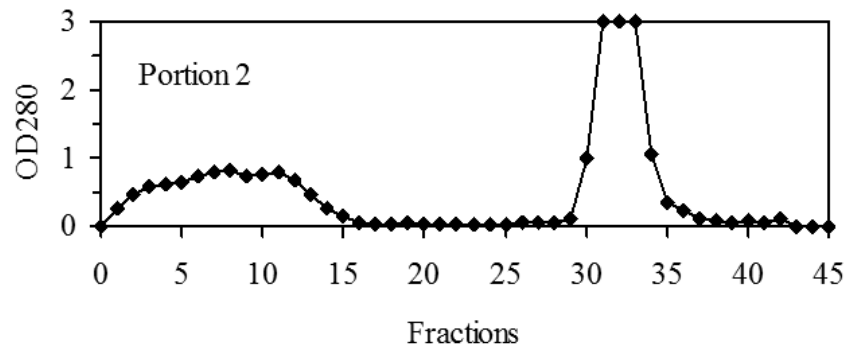
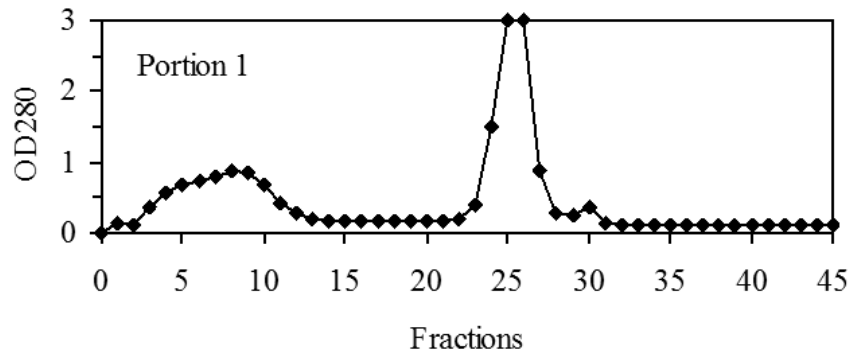
- : ผลลบ ซัสเฟนชันขุ่นขาว ไม่เกิดตะกอน

จากตารางแสดงให้เห็นว่า polyclonal antiserum *E. coli* O157 ที่ได้จาก S&A Reagent Lab มีความจำเพาะต่อ *E. coli* O157:H7 ดังนั้นเหมาะที่นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

5.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ก่อนนำ polyclonal antiserum *E. coli* O157 ไปทำให้บริสุทธิ์นั้น ได้นำ antiserum มาหาปริมาณของโปรตีน พบว่ามีปริมาณ 56 mg/mL ซึ่งถ้าใช้ปริมาตร 5 mL จะเท่ากับ 280 mg ซึ่งเกินค่า binding capacity ของคอลัมน์ (จุได้ประมาณ 100 mg IgG) ดังนั้นจึงแบ่ง serum ออกเป็น 4 ส่วน เท่าๆกัน แต่ละส่วนต่อ 1 คอลัมน์ โดยทำ 2 รอบ อย่างไรก็ตามผลที่ออกมาพบว่า IgG เกาะอยู่คอลัมน์เฉพาะรอบที่ 1 เท่านั้น รอบที่ 2 ตรวจไม่พบ IgG

ภาพด้านล่างแสดงปริมาณโปรตีนของ polyclonal antiserum *E. coli* O157 IgG ที่แบ่งเป็น 4 ส่วน เท่าๆกัน (4 คอลัมน์) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD280 ในแต่ละ ส่วนแสดงให้เห็น ปริมาณโปรตีนในแต่ละ fraction ที่แยกได้มีค่าไม่เท่ากัน ปริมาณ โปรตีนสูงสุดในส่วนที่ 1 2 3 และ 4 อยู่ใน fraction ที่ 22-33, 29-40, 29-42 และ 34-40 ตามลำดับ

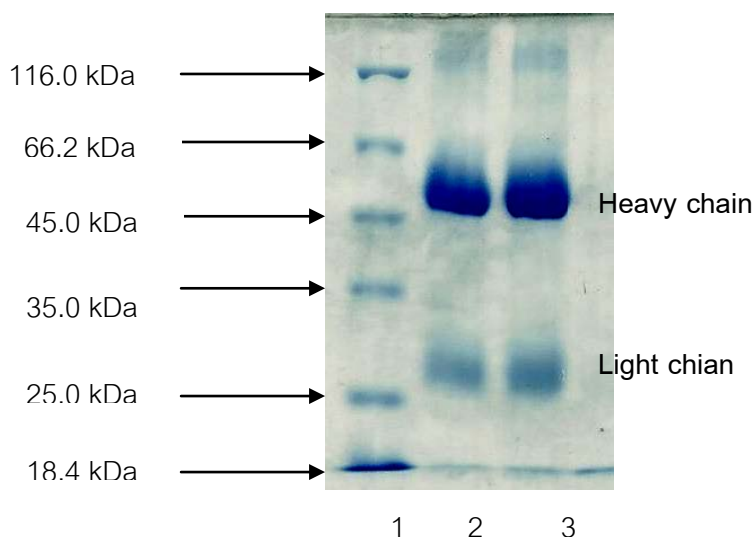


ภาพที่ 5.2 แสดงปริมาณโปรตีนใน polyclonal antiserum IgG ของ *E. coli* O157 ในแต่ละ คอลัมน์ (portions 1-4)

5.3 การทำ polyclonal antiserum *E. coli* O157 ให้บริสุทธิ์

โปรตีน A เป็น surface protein พบที่ cell wall ของ *Staphylococcus aureus* โปรตีน A ประกอบด้วย region 6 regions ที่แตกต่างกัน 5 จาก 6 พบว่ามีการ bind ที่แข็งแรงและมีความจำเพาะต่อส่วน Fc ของ IgG เท่านั้น และปล่อยให้ ด้าน antigens อิสระ Immobilite protein A 1 โมเลกุล สามารถเกาะอย่างน้อย 2 โมเลกุลของ IgG ขณะที่ใส่ IgG เข้าในคอลัมน์ IgG จะเกาะกับโปรตีน A sepharose ขณะที่โปรตีนอื่นๆไม่เกาะ พันธะการเกาะกันของโปรตีน A และ IgG ทำให้แยกได้โดยความเป็นกรดของ elution buffer

เก็บ IgG จาก fraction ดังกล่าวของแต่ละส่วน (ทั้งหมด 4 ส่วน) จาก 5.2 นำมารวมกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE และตรวจผลที่ได้เทียบกับ IgG จาก โปรตีนอ้างอิง standard (ladder) เพื่อยืนยัน จากแถบที่ปรากฏ 2 แถบใน SDS-PAGE ซึ่งเป็นแถบของ Heavy chain (50 kDa) และ Light chain (ประมาณ 28 kDa) จากภาพด้านล่าง

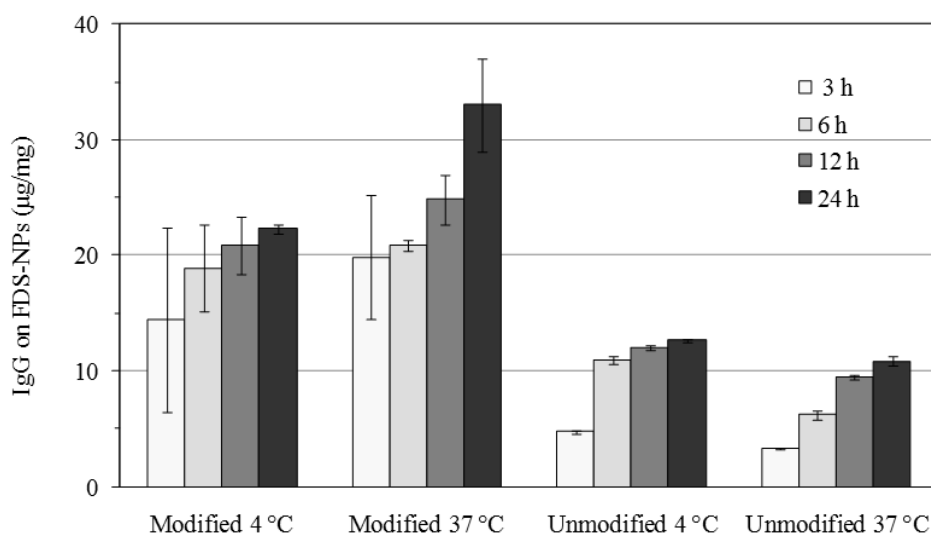


ภาพที่ 5.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG จาก SDS-PAGE ช่อง 1 โปรตีนอ้างอิง standard (ladder) ช่อง 2 และ 3 คือ *E. coli* O157 antiserum (ทำ 2 ซ้ำ)

6. การติด (coat) IgG บนผิวอนุภาคซิลิกาnano

ทำการ coat โดยใช้ซัสเพนชัน IgG ความเข้มข้น 100 mg/mL บ่มกับอนุภาคที่ดัดแปลงผิวแล้ว โดยปรับ condition ให้ได้ maximum loading capacity แล้วทดสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดบนอนุภาค โดยวิธี Lowry โดยตรวจวัดจากการเปลี่ยนสีจากเครื่อง colorimetric techniques ตรวจดูผลจาก IgG ในรูป immobilized protein ที่เกาะอนุภาคซิลิกา nano ของอนุภาคนั้นๆ coat คือ ที่ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส และผลของระยะเวลาในการ coat คือ ที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าที่

อนุภาคนิว 4 องศาเซลเซียส มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.20, 18.90, 20.89 และ 22.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และที่อนุภาคนิว 37 องศาเซลเซียส มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.83, 20.85, 24.83 และ 33.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อปริมาณ IgG ที่เกาะบนอนุภาคซิลิกา นาโน คือเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้น การเกาะจับก็มีค่ามากขึ้น อนุภาคนิวที่บ่มก็มีผลต่อการเกาะจับ คือที่อนุภาคนิว 37 องศาเซลเซียส พบปริมาณโปรตีนที่เกาะจับมากขึ้น อาจเป็นเพราะอนุภาคนิวช่วยส่งเสริมปฏิกิริยาเคมีระหว่าง IgG กับ พื้นผิวของอนุภาค ดังนั้นจึงเลือกใช้ อนุภาคนิวที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อไม่ได้ดัดแปลงผิวอนุภาคซิลิกา นาโน แต่ยังมี การเกาะติดของอนุภาคซิลิกา นาโนกับ IgG เกิดขึ้น แสดงว่าเกิดการยึดกันของ non covalent binding อาจมาจาก electrostatic force Vander Waals หรือ แรงจากพันธะ H-bond ก็ได้ จากภาพด้านล่างจะเห็นว่าการเกาะติดของ IgG กับอนุภาคนิว ไม่ว่าจะบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส หรือ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้น การเกาะติดก็มีค่ามากขึ้น ปริมาณโปรตีนที่วัดได้จากการบ่มที่อนุภาคนิว 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 เท่ากับ 4.74, 10.94, 12.01 และ 12.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และที่อนุภาคนิว 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 3.34 6.20 9.43 10.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ (ภาพที่ 6)



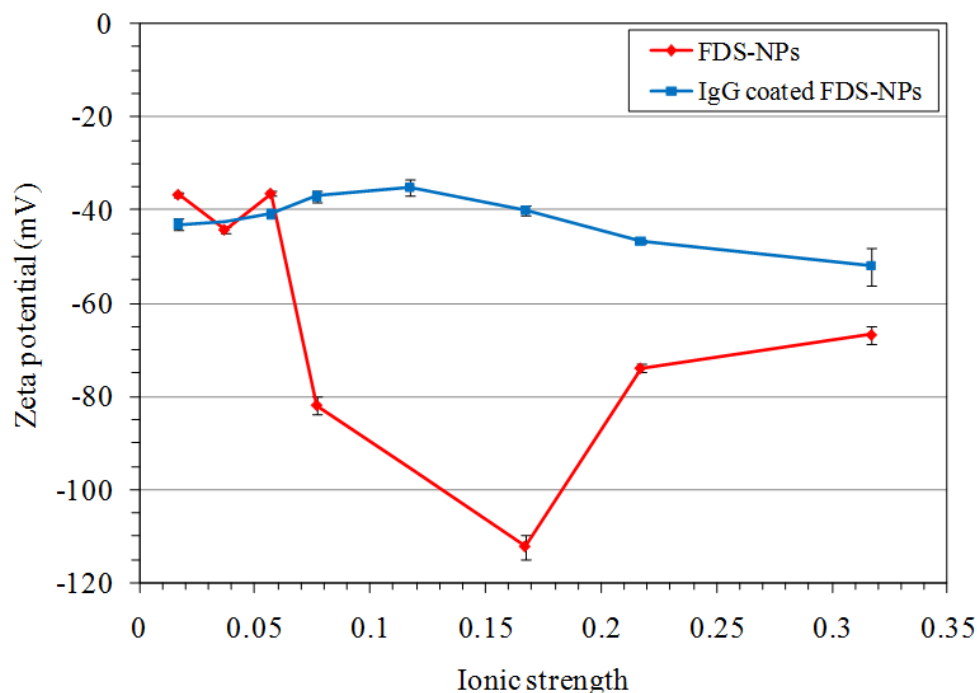
ภาพที่ 6 ปริมาณ IgGs ที่จับบนผิวของอนุภาค FDS-NPs ที่ดัดแปลงพันธะและไม่ดัดแปลงพันธะ เมื่อใช้อนุภาคนิว 4 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆกัน

6.1 ทดสอบความเสถียรหรือการกระจายตัวกันของอนุภาคซิลิกา นาโนที่ติดด้วย IgG

โดยวัดค่า Zeta potential ดูผลค่า stability และ dispersibility ของอนุภาคจากกราฟ Zeta potential (mV)

Zeta potential คือค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้า(ไอออน)ระหว่างบนพื้นผิวอนุภาค และบริเวณรอบนอก มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์ และ เป็นค่า ionic strength ของอนุภาค แสดงถึงแนวโน้มของอนุภาคที่จะเกาะกัน

หรือกระจายตัวกัน อนุภาคจะกระจายตัวกันดีหรือเสถียร (เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้งาน) เมื่อค่า zeta มากกว่า + 30 mV หรือ น้อยกว่า -30 mV (ห่างจากค่า 0 จะยิ่งดี) ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น pH conductivity ชนิดของอนุภาค ชนิดของ medium และค่า ionic strength ของ medium ปกติค่า pH ที่เหมาะต่อการทำปฏิกิริยาของ Ag ต่อ Ab เท่ากับ 7.4 ดังนั้นจึงทำการหาค่า zeta potential ที่ pH นี้



ภาพที่ 6.1 ค่า Zeta potential ของอนุภาค FDS-NPs ที่ ติด IgG และไม่ติด IgG ที่ ionic strength ต่างๆกัน

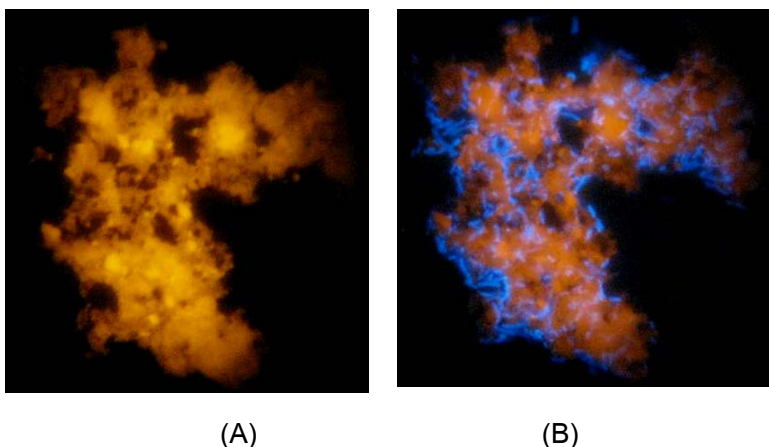
7. การจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีกับเชื้อ *E. coli* O157 H:7

อนุภาคซิลิกาโนที่ จะนำมาเกาะติดกับ IgG นั้นได้ถูกดัดแปลงทำให้เกิดอะมิโนกรุปบนพื้นผิวก่อน เพื่อง่ายต่อการทำให้เกิดลักษณะการเกาะติดแบบ Bioconjugation ในที่นี้ได้สาร glutaraldehyde เป็น cross linking agent ระหว่าง amino acid 2 กรุปในโปรตีน คือเกาะกับ อนุภาค coat ด้วย IgG ด้านหนึ่ง และเกาะกับเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายอีกข้างหนึ่ง ในโมเลกุลของ glutaraldehyde จะมี 2 aldehyde กรุป เป็น reactive group ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ อะมิโนกรุปผ่านทางพันธะโควาเลนต์ มีผลทำให้ IgG เกาะติดกับ อนุภาคได้ เทคนิคนี้ง่าย ไม่ต้องการสารตั้งต้นและขั้นตอนมาก ใช้เวลาน้อยและมีประสิทธิภาพสูง

8. การตรวจสอบการจับกันของ อนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีกับเชื้อ *E. coli* O157 H:7

8.1 ทดสอบอนุภาคซิลิกาที่เคลือบ IgG แล้วกับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 โดยการนำอนุภาค มาผสมกับเซลล์ชั้นของ *E. coli* O157:H7 ในหลอดทดสอบ นำชั้นสเฟนส่งดูใต้กล้อง epifluorescence

ผลปรากฏว่าอนุภาคได้รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนแล้วตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดสอบ ได้นำเอา ตะกอนไปส่งดูใต้กล้อง epifluorescence พบว่ามีทั้งอนุภาคซิลิกาและเซลล์ *E. coli* O157:H7 ผสมกันตั้ง รูป สามารถอธิบายว่าเกิด agglutination ระหว่างแอนติเจน(เซลล์)กับแอนติบอดี เหมือน latex bead agglutination หลังจากนั้นได้ลองปรับเปลี่ยนเวลาในการบ่ม แต่ก็มีปัญหาดังเช่นนี้อยู่ ปฏิกริยาเช่นนี้ไม่สามารถแยกอนุภาคซิลิกาที่ไม่ได้จับกับเซลล์ *E. coli* O157:H7 ออกจากอนุภาคที่จับเซลล์ได้ และไม่สามารถหาปริมาณของ *E. coli* O157:H7 ที่เกาะติดกับอนุภาคได้



ภาพที่ 8.1 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ของการจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีของ *E. coli* O157:H7 ในหลอดทดสอบ โดยที่ (A) ส่งด้วยแสง blue light และ(B) ใช้แสง UV

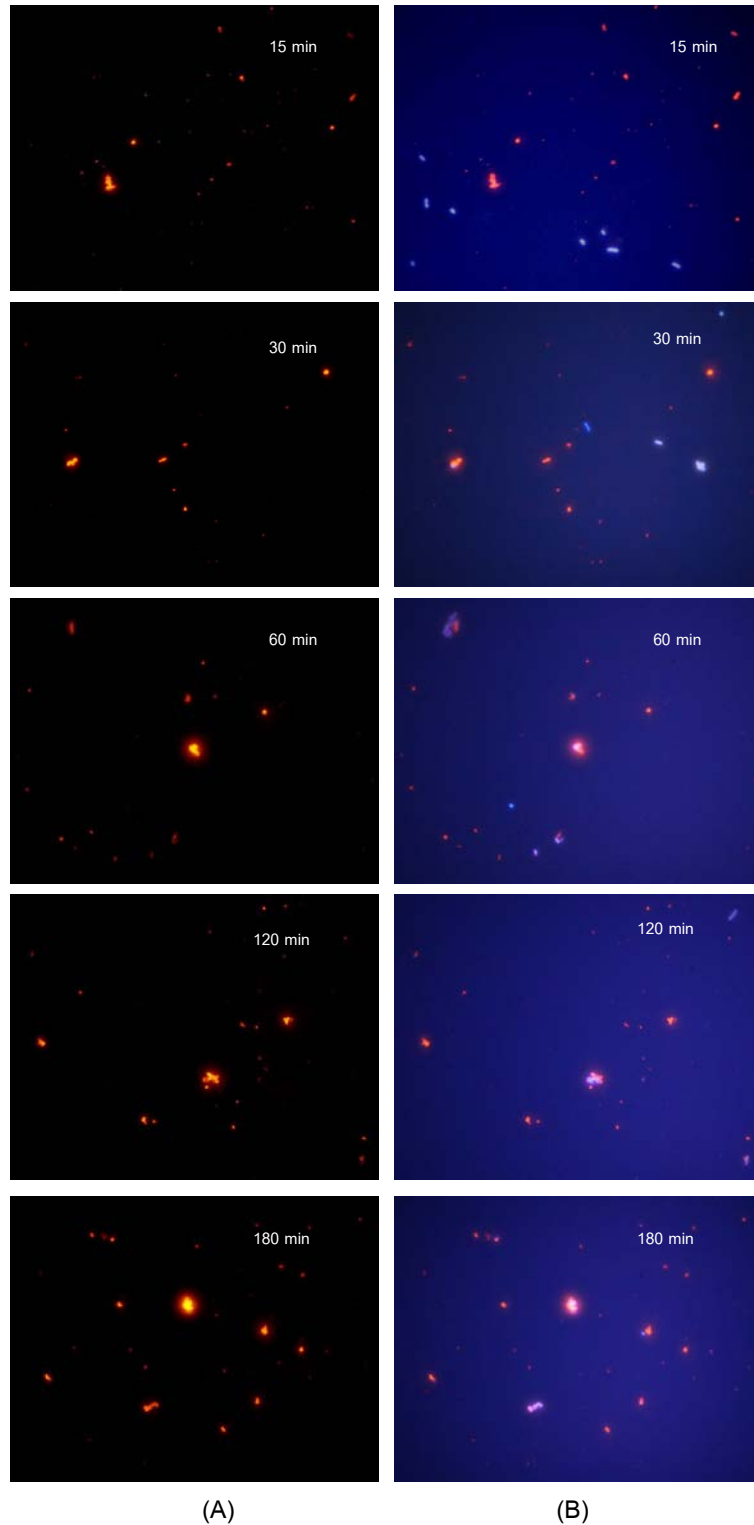
8.2 ทดสอบอนุภาคซิลิกาที่เคลือบ IgG แล้วกับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 บนสไลด์แก้ว

เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด agglutination ดังข้างต้น (8.1) จึงใช้วิธีเลี้ยงเซลล์ *E. coli* O157:H7 บนสไลด์แก้วแทน โดยปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มและความเข้มข้นของอนุภาค จากนั้นนำมาทดสอบกับแบคทีเรียอื่น ๆ เพื่อดูค่าความจำเพาะ (specificity)

8.2.1 ผลของระยะเวลาในการบ่มอนุภาค

นำแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วย *E. coli* O157:H7 มาเคลือบทับด้วยอนุภาคซิลิกาที่เคลือบด้วย IgG (0.2 mg/mL) 0.5 mL แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิห้องที่เวลาต่าง ๆ กันคือ 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ อนุภาคซิลิกาที่ติดแอนติบอดีจะจับกับ *E. coli* O157:H7 หลังจากนั้นล้างเอาอนุภาคที่ไม่ได้จับกับเชื้อออก แล้วนำมาย้อมด้วยสารละลาย DAPI ส่งดูใต้กล้อง epifluorescence Microscope โดยใช้ทั้ง blue light และ

แสง UV เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของเซลล์ที่เกาะติดกับอนุภาค (targeted cell) และเซลล์อิสระ แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ ที่จับกับอนุภาค ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดใน field เดียวกัน เลื่อน fields แล้วทำซ้ำทั้งหมด 10 fields



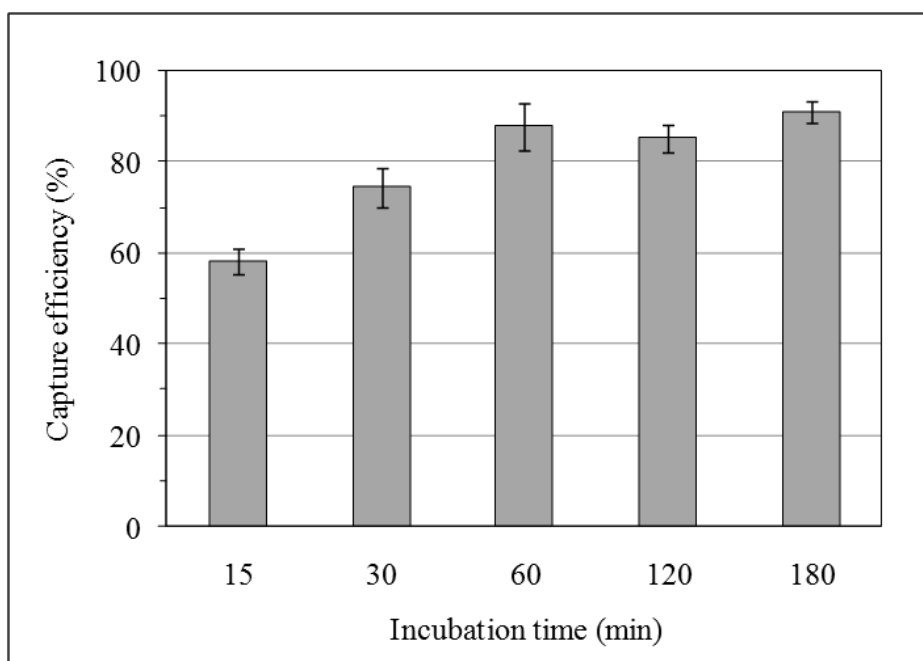
ภาพที่ 8.2.1.1 ภาพไต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ที่กำลังขยาย 1000X ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ป่มกับอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดี IgG ที่เวลาในการป่มต่างๆกัน เมื่อส่องดูโดยใช้แสงธรรมดา (A) และแสง UV(B)

ต่อจากนั้นได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การจับของอนุภาคซิลิกาโนกับ *E. coli* O157:H7 ดังนี้

$$\text{จำนวน เปอร์เซ็นต์การจับ} = \frac{\text{เซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดอนุภาค}}{\text{เซลล์แบคทีเรียทั้งหมด}} \times 100$$

(Captured efficiency,%)

เปอร์เซ็นต์การจับของอนุภาคซิลิกาโนกับ *E. coli* O157:H7 เท่ากับ 58.17, 74.48, 87.83, 85.23 และ 90.91 เมื่อบ่มเป็นเวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ จากผลสรุปได้ว่า เมื่อเวลาการบ่มนานขึ้น เปอร์เซ็นต์การจับกันของอนุภาคจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาการบ่มนานกว่า 120 นาที ปริมาณ *E. coli* O157:H7 ที่เกาะกับอนุภาคไม่ได้เพิ่มมากไปกว่าเมื่อบ่มที่ 60 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ที่เวลา 60 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการจับกันระหว่างอนุภาคและเซลล์เป้าหมาย *E. coli* O157:H7 จึงได้เลือกเวลาบ่มที่เวลา 60 นาทีในการทดลองต่อไป

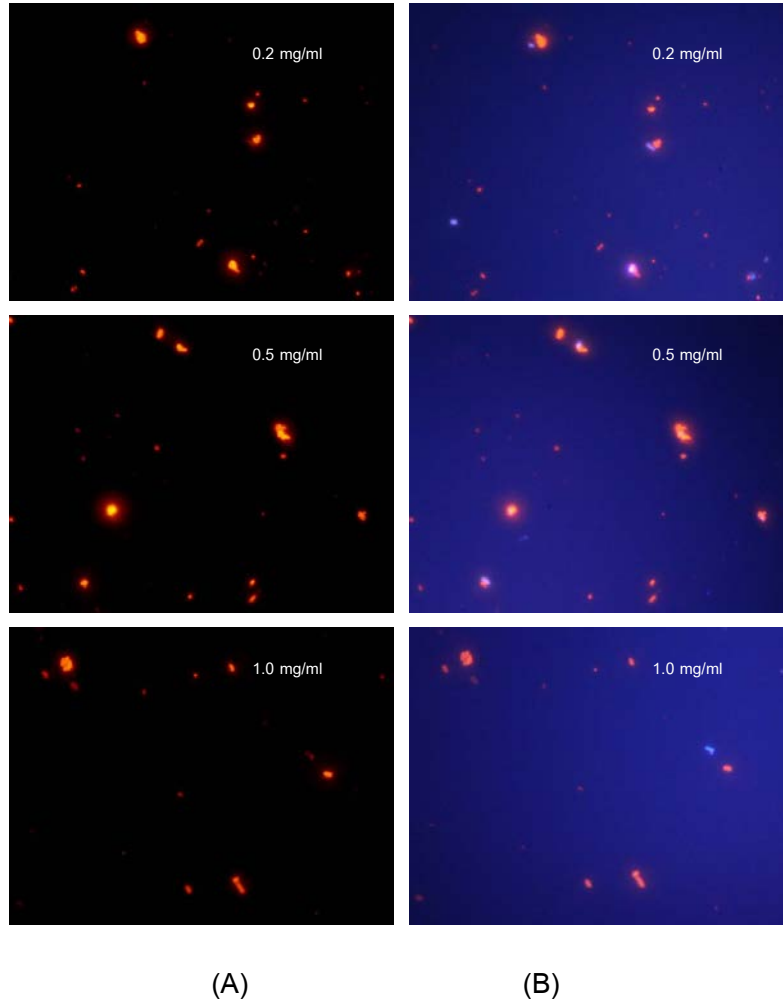


ภาพที่ 8.2.1.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่ติด IgG กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ระยะเวลาบ่มต่างๆกัน

8.2.2 ผลของความเข้มข้นของอนุภาคซิลิกาโน

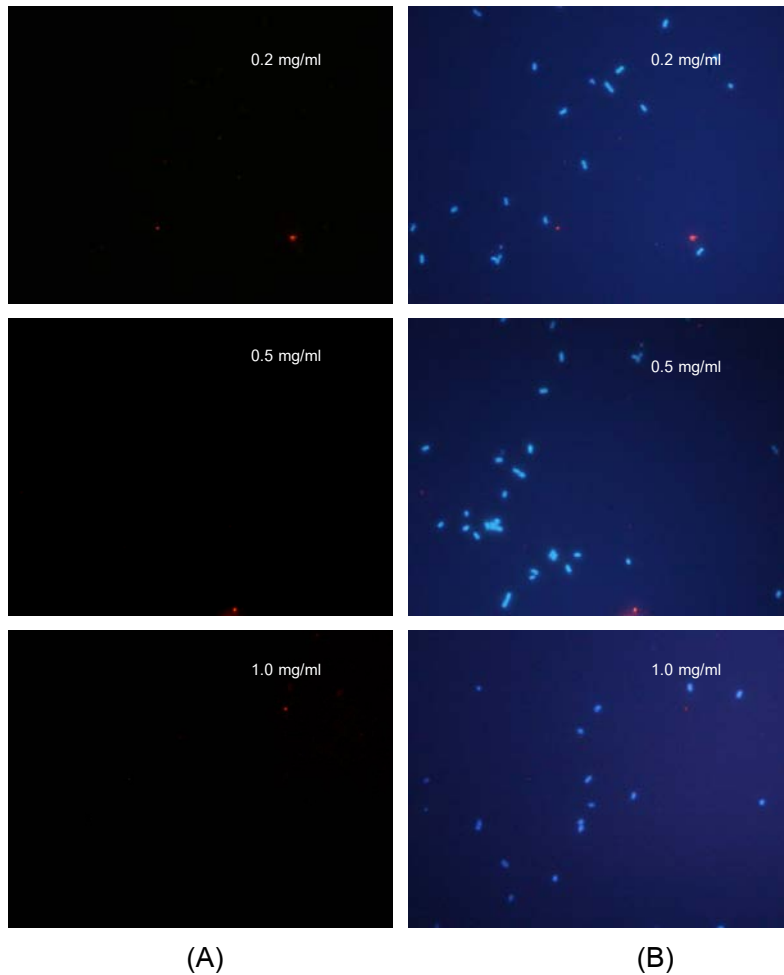
นำอนุภาคซิลิกาโน ที่ coated กับ Ig G ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยให้อนุภาคซิลิกาโนกระจายตัวใน Ig G ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/mL ใน 1XPBS pH 7.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อเอาอนุภาคที่ไม่ได้เกาะติดออก นำมาย้อมด้วยสารละลาย DAPI ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescences ในภาพ 8.2.2.1 เมื่อ นำมาคำนวณหาค่า capture efficiency หรือ เปอร์เซ็นต์การจับกัน ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ การจับเท่ากับ 87.31, 87.77 และ

88.77 เปอร์เซนต์ เมื่อความเข้มข้น IgG เท่ากับ 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน
จึงเลือกความเข้มข้น IgG ที่ 0.2 mg/mL มาทดลองต่อไป

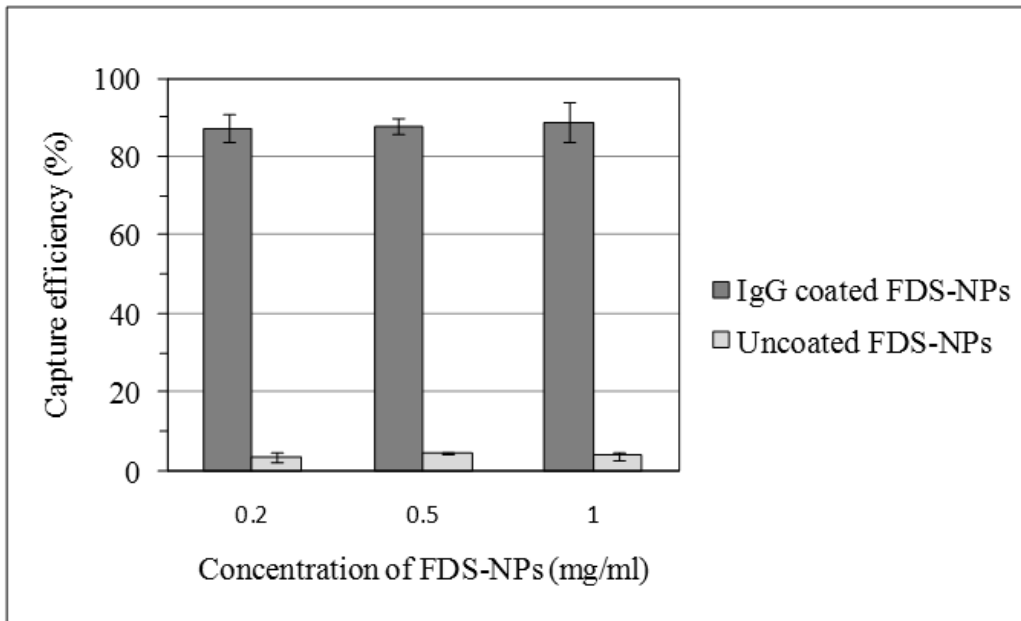


ภาพที่ 8.2.2.1 ภาพไตกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ที่กำลังขยาย 1000X ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ป่มกับอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดี IgG ที่ความเข้มข้นของ IgG ต่าง ๆ กันเมื่อส่องดูโดยใช้แสงธรรมดา (A) และแสง UV (B)

เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ *E. coli* O157:H7 ที่จับกับอนุภาคนั้น จับโดยปฏิกิริยาของแอนติเจนต่อแอนติบอดี จริง จึงได้ลองทำ non specific binding โดยใช้อนุภาคซิลิกาโนที่ไม่ได้เคลือบแอนติบอดี ผสมกับ *E. coli* O157:H7 แล้วสังเกตการเกาะติดของเชื้อเช่นเดิม ดังภาพ 8.2.2.2 นำมาหาค่า capture efficiency ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การจับกันอยู่ที่ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น IgG เท่ากับ 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/mL ตามลำดับ การจับนี้เป็น non-specific binding เกิดโดยปฏิกิริยาอย่างอ่อน (weak interaction) เช่น electrostatic force ระหว่างเซลล์เมมเบรนและผิวของอนุภาคเอง ดังภาพ 8.2.2.3



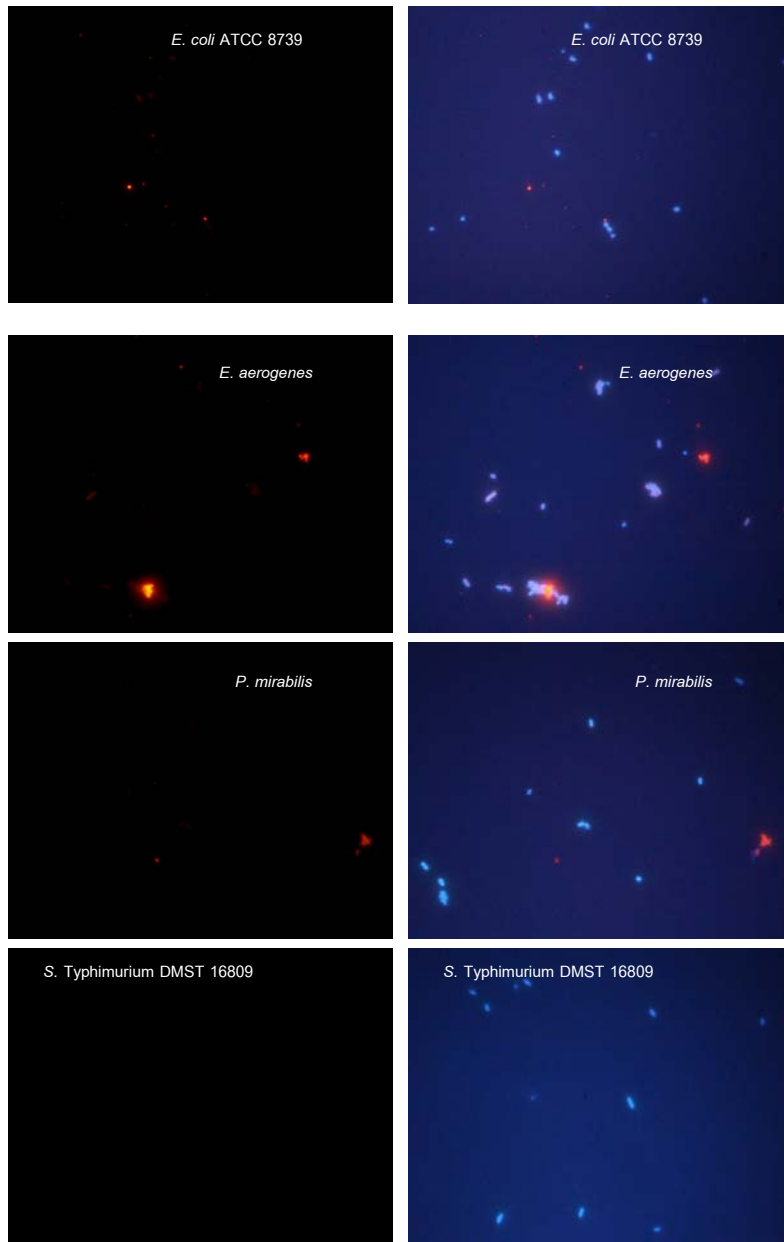
ภาพที่ 8.2.2.2 ภาพไตกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ที่กำลังขยาย 1000X ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ป่มกับอนุภาค FDS-NPs ที่ไม่ติดแอนติบอดี IgG ที่ความเข้มข้นของ อนุภาคต่างๆกันเมื่อส่องดูโดยใช้แสงธรรมดา (A) และแสง UV (B)



ภาพที่ 8.2.2.3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่ติด IgG และไม่ติด IgG กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ความเข้มข้นของอนุภาคต่างๆกัน

8.3 การตรวจหา specificity

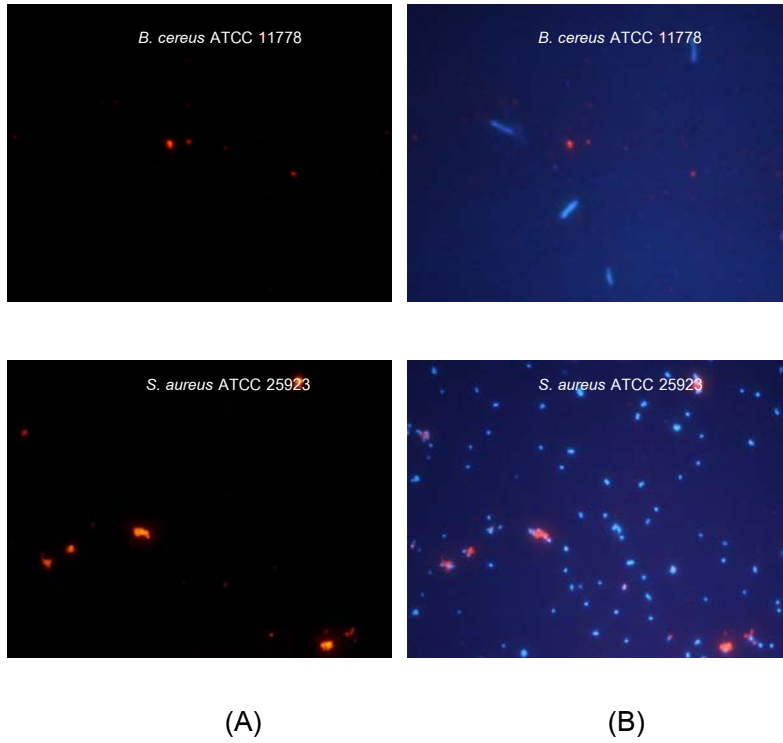
จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้อนุภาคจับกับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ได้แก่ *E. coli* ATCC 8739, *En. aerogenes*, *P. mirabilis*, และ *S. Typhimurium* DMST 16809 หาค่า capture efficiency เท่ากับ 5.20, 8.38, 13.34 และ 3.21 สำหรับ ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่าค่า capture efficiency เท่ากับ 9.53 และ 14.80 สำหรับ ตามลำดับ แสดงดังภาพด้านล่าง



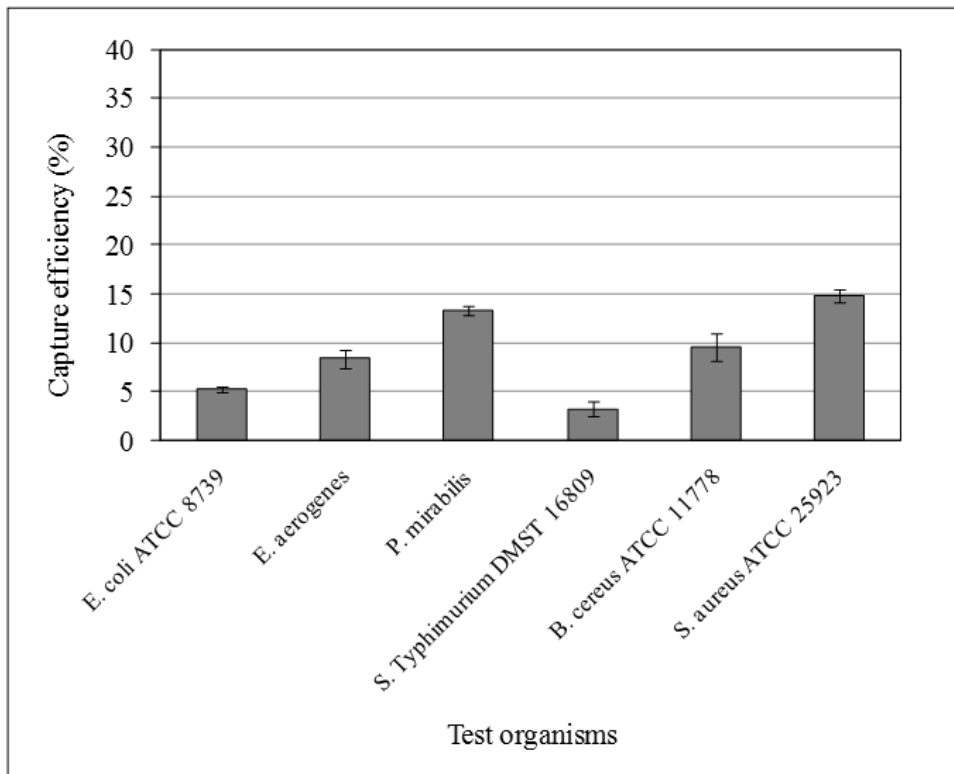
(A)

(B)

ภาพที่ 8.3.1 ภาพไตกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ที่กำลังขยาย 1000X ของแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อป่มกับอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดี IgG เมื่อส่องดูโดยใช้แสงธรรมดา (A) และแสง UV (B)



ภาพที่ 8.3.2 ภาพไตกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ที่กำลังขยาย 1000X ของแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อป้อนกับอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดี IgG เมื่อส่องดูโดยใช้แสงธรรมดา (A) และแสง UV (B)



ภาพที่ 8.3.3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่ติด IgG กับแบคทีเรียอื่นๆ

การเกิด cross reaction ระหว่างอนุภาคซิลิกาโนที่ติด IgG *E. coli* O157:H7 กับแบคทีเรียอื่นๆ ตามผล
ที่แสดงเป็นสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ มีสาเหตุมาจาก IgGs บนพื้นผิวอนุภาค IgGs ที่นำมาทดสอบนี้เป็น
polyclonal IgGs เติร์มจากกระต่าย ซึ่งจะจำ specific antigen ที่ epitopes ที่หลากหลายต่าง ๆ กัน ดังนั้น
ค่า specificity ก็ไม่คงที่ ทำให้เกิดปฏิกิริยา cross reaction ได้

สรุปและเสนอแนะ

เมื่อตัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่ฟังก์ชันสำหรับติดแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค ซึ่งทำการทดลอง 2 วิธี คือการตัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนที่ผิวอนุภาค และการตัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลที่ผิวอนุภาค ซึ่งจะต้องนำอนุภาคที่ได้นั้นไปทดสอบกับการจับกับแอนติบอดีของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ต่อไป

ทำการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา (FDS-NPs) โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ร่วมกับเทคนิคโซลเจล ซึ่งอนุภาคประกอบด้วยสาร tetraethylorthosilicate (TEOS) เป็นสารตั้งต้น สาร cyclohexane เป็น oil phase และ สารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ (RUBY DYE) เป็น waterphase โดยใช้ triton X-100 เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และ n-hexanol เป็นตัวช่วยสารลดแรงตึงผิว และใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแตกตัวและการรวมตัวด้วยน้ำในการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกา พบว่าปัจจัยต่างๆคือ การปรับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (triton X-100) การปรับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อตัวช่วยสารลดแรงตึงผิว (n-hexanol) การปรับปริมาณสารตั้งต้น (TEOS) ในการสังเคราะห์ซิลิกา และการปรับปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา (แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์) ในการสังเคราะห์ พบว่าทุกปัจจัย มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนต์ซิลิกา อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างกลมสี่เหลี่ยมคล้ายเจลลี่ ส่วนขนาดขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำกับสารลดแรงตึงผิว (triton X-100) (W_0) อัตราส่วนโดยโมลของตัวช่วยของสารลดแรงตึงผิว (n-hexanol) (P) ปริมาณสารตั้งต้น (TEOS) และปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา (แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์) ผลจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (TEM) พบว่าขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 45-47 นาโนเมตร แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อขนาดของอนุภาค เมื่อปริมาณแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้นอนุภาคมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามสามารถควบคุมขนาดโดยการปรับอัตราส่วนระหว่างน้ำและสารลดแรงตึงผิว และในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไปนั้น โมเลกุลสีฟลูออเรสเซนต์ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของน้ำจะถูกโครงสร้างของซิลิกาที่ก่อตัวขึ้นโอบล้อมและถูกกักไว้ในโครงสร้างของซิลิกาเป็นพันธะไฮโดรเจน โครงสร้างนี้ช่วยปกป้องสีจากการถูกชะล้างโดยออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อม ทำให้สามารถเรืองแสงได้นาน ผลการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบโดยใช้เครื่อง SEM-EDS แสดงให้เห็นว่า อนุภาคประกอบด้วยธาตุซิลิกอน 11.3% atomic ธาตุออกซิเจน 64.43% atomic ธาตุคาร์บอน 0.15% atomic และธาตุไนโตรเจน 24.11% atomic คุณสมบัติเชิงแสงของอนุภาคแสดงให้เห็นว่าสีฟลูออเรสเซนต์และอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดกลืนแสงหรือค่ากระตุ้นอยู่ในช่วงแสง UV ถึงแสงสีน้ำเงินโดยมีค่าสูงสุดเหมือนกันที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร ในช่วงแสงสีส้ม และมีค่าการเรืองแสงโดยมีค่าสูงสุดเหมือนกันที่ความยาวคลื่น 606 นาโนเมตร และมีความคงอยู่ของการเรืองแสงอยู่ในเกณฑ์เสถียรคือเมื่อเวลา 60 นาทีผ่านไปความสว่างลดลง 1.5% เท่านั้น ต่อมาได้วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคก่อนและหลังตัดแปลงพันธะเคมีพบว่า ก่อนตัดแปลงพันธะเคมีอนุภาคประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ในช่วงความยาวคลื่น $3,200-3,600\text{ cm}^{-1}$ และหมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่ความยาวคลื่น $1,091\text{ cm}^{-1}$ และหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่ความยาวคลื่น $1,634\text{ cm}^{-1}$ หลังจากถูกตัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนพบว่า ที่ความยาวคลื่น $1,565\text{ cm}^{-1}$ เกิดพีคในตำแหน่งหมู่เอมีนชนิด primary amine แต่อนุภาคที่ตัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลนั้นมีความแตกต่างของพีคที่ความยาวคลื่น $1,695\text{ cm}^{-1}$ ในส่วน concentrate polyclonal IgG *E. coli* O157 ได้มาทดสอบ specificity กับเชื้อ *E. coli* O157 และแบคทีเรียอื่นๆ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และทำให้บริสุทธิ์

โดยวิธี affinity chromatography method โดยใช้ SDS-PAGE หลังจากนั้นนำแอนติบอดีไปติดบนผิวอนุภาคซิลิกาโน ทดสอบความเสถียรหรือการกระจายตัวกันของอนุภาคซิลิกาโนที่ติดด้วย IgG แล้วจึงนำมาทดสอบจับกับเชื้อ *E. coli* O157 :H7 ตรวจการจับบนแผ่นสไลด์แก้ว ส่องดูโดยใช้กล้อง epifluorescence microscope ใช้แสง UV จะให้สารเรืองแสงสีฟ้า (blue luminescence) พบว่าอนุภาคที่ได้มีการติดกับ polyclonal IgG *E. coli* O157 อยู่ในเกณฑ์ดี และจับกับเชื้อ *E. coli* O157 :H7 ได้ดี หลังจากตรวจหา specificity กับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แล้ว พบเกิด cross reaction ระหว่างอนุภาคซิลิกาโนที่ติด IgG *E. coli* O157 กับแบคทีเรียอื่นๆ บ้าง สาเหตุมาจาก IgGs บนพื้นผิวอนุภาค IgGs ที่นำมาทดสอบนี้เป็น polyclonal IgGs อย่างไรก็ตามจะศึกษาและใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IgG *E. coli* O157 แทนและนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535, หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิง เครื่องมือ, ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ, หน้า 108-192.
- เย็นหทัย แนนหนา, 2549, สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์, จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 530 หน้า
- วนิดา บรรราช, สุชีพ ขำสวัสดิ์, วิมล เพชรกาญจนางค์, ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ และพิมพ์ใจ นัยโกวิท, 2541, “การใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสให้ได้ผลรวดเร็ว”, วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ปีที่ 40, เล่มที่ 1, หน้า 57-65.
- Abarkan, I., T. Doussineau, M. Smalhi. 2006. Tailored macro/microstructural properties of colloidal silica nanoparticles via microemulsion preparation. **Polyhedron** 25 (8): 1763-1770.
- Asouhidou, D.D., K.S. Triantafyllidis, N.K. Lazaridis and K.A. Matis. 2009. Adsorption of Remazol Red 3BS from aqueous solutions using APTES- and cyclodextrin-modified HMS-type mesoporous silicas. **Colloids Surf., A** 346 (1-3): 83-90.
- Brayton, P.R., Roszak, D.B., Palmer, L.M., Huq, S.A., Grimes, D.J. and Colwell, R.R., 1986, “Fluorescent antibody enumeration of *Vibrio cholerae* the marine environment”, **Actes de Colloques**, Vol. 3, pp. 507-514.
- Bruce, I.J. and Sen, T., 2005, “Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations”, **Langmuir**, Vol. 21, pp. 7029-7035.
- Epstein, P.R., 2000, “Is Global warming harmful to health?”, **Scientific American**, August 2000, pp. 50-57.
- Finlay, G., 2005, “Global warming: the human costs”, **Creation Crisis and Conservation Conference**, February 2005, Auckland, pp. 1-12.
- Gerba, C.P., Reynolds, K.A., Dowd, S.E. and Pepper, I.L., 2001, “Polymerase chain reaction for the detection of parasites and viruses”, **International Conference on Developments in Rapid Diagnostic Methods**, 15-17 March 1999, York, pp. 49-54.
- Gunasekera, T.S., Attfield, P.V., and Veal, D.A., 2002, “A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk”, **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 66, No. 3, pp. 1228-1232
- Kelkar, S.D., Bhide, V.S., Ranshing, S.S. and Bedekar, S.S., 2004, “Rapid ELISA for the diagnosis of rotavirus” **Indian Journal of Medical Research**, Vol. 119, pp. 60-65.
- Lee, J.H., Jun, Y.W., Yeon, S.I., Shin, J.H. and Cheon, J., 2006, “Dual-mode nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance and fluorescence imaging of neuroblastoma”, **Nanoparticle Probes**, Vol. 45, pp. 8160 –8162.
- Li, H., G.-S. Ding, J. Chen and A.-N. Tang. 2010. Amphiphilic silica nanoparticles as pseudostationary phase for capillary electrophoresis separation. **J. Chromatogr., A** 1217 (47): 7448-7454.

- Lian, W., S.A. Litherland, H. Badrane, W. Tan, D. Wu, H.V. Baker, P.A. Gulig, D.V. Lim and S. Jin. 2004. Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles. **Anal. Biochem.** 334 (1): 135-144.
- Liu, Q.-P., L.-X. Gao, Z.-W. Gao and L. Yang. Preparation and characterization of polyimide/silica nanocomposite spheres. **Mater. Lett.** 61 (23-24): 4456-4458.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S. and Dellaglio, F, 2001, "Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry" **Journal of Microbiological Methods**, Vol. 45, pp. 127-134.
- Medintz, I.L., Uydea, H.T., Goldman, E.R. and Mattoussi, H., 2005, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing", **Nature Materials**, Vol. 4, pp. 435-446
- Micheli, L., Moscone, D., Marini, S., Di Stefano, S and Palleschi, G., 2001, "Development of disposable immunosensors for the rapid assay of seafood toxins", **International Conference on Developments in Rapid Diagnostic Methods**, 15-17 March 1999, York, pp. 190-193.
- Park, J.T., J.A. Seo, S.H. Ahn, J.H. Kim and S.W. Kang. 2010. Surface modification of silica nanoparticles with hydrophilic polymers. **J. Ind. Eng. Chem.** 16 (4): 517-522.
- Paton, C.A., Kelsey, D.E., Reeve, E.A., Punter, K., Crabb, J.H. and Smith, H.V., 2001, "Immunomagnetsable separation for the recovery of *Cryptosporidium* sp. Oocysts", **International Conference on Developments in Rapid Diagnostic Methods**, 15-17 March 1999, York, pp. 38-43.
- Santra, S., P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç and W. Tan. 2001. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. **Anal. Chem.** 73 (20): 498-4993.
- Shi, B., Y. Wang, Y. Guo, Y. Wang, Y. Wang, Y. Guo, Z. Zhang, X. Liu and G. Lu. 2009. Aminopropyl-functionalized silicas synthesized by W/O microemulsion for immobilization of penicillin G acylase. **Catal. Today** 148 (1-2): 184-188.
- Soukka, T., Paukkunen, J., Harma, H., Lonnberg, S., Lindroos, H. and Lovgren, T., 2001, "Supersensitive time-resolved immunofluorometric assay of free prostate-specific antigen with nanoparticle label technology" **Clinical Chemistry**, Vol. 47, No. 7, pp. 1269-1278.
- Wang, L., Wang, K., Santra, S., Zhao, X., Hilliard, L.R., Smith, J.E. Wu, Y. and Tan, W., 2006, "Glow in the biological world", **Analytical Chemistry**, 1 February, pp. 647-654.
- White, L.D. and C.P. Tripp. 2000. Reaction of (3-aminopropyl) dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. **J. Colloid Interface Sci.** 232: 400-407.
- Worthington, W., Lambert, P.A., Traube, A. and Elliott, T. S. J., 2002, "A rapid ELISA for the diagnosis of intravascular catheter related sepsis caused by coagulase negative staphylococci", **Journal of Clinical Pathology**, Vol. 55, pp. 41-43.

Yan, J., Estevez, M.C., Smith, J.E., Wang, K., He, X., Wang, L. and Tan, W., 2007, "Dye-doped nanoparticles for bioanalysis", **Nanotoday**, Vol. 2, No. 3, pp. 44-50.

Yan, Estevez, Smith, Wang, He and Tan. 2007. Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. **Nanotoday** 2: 44-50.

Zhao, X., Hilliard, L.R., Mechery, S.J., Wang, Y., Bagwe, R.P., Jin, S. and Tan, W., 2004, "A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, Vol. 101, No. 42, pp. 15027-15032.

Zhao, M., L. Zheng, X. Bai, N. Li and L. Yu. 2009. Fabrication of silica nanoparticles and hollow spheres using ionic liquid microemulsion droplets as templates. **Colloids Surf., A** 346 (1-3): 229-236.

Zhao, H., Y. Li, R. Liu, F. Zhao and Y. Hu. 2008. Synthesis method for silica needle-shaped nano-hollow structure. **Mater. Lett.** 62 (19): 3401-3403.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclohexane>

<http://en.wikipedia.org/wiki/1-Hexanol>

http://en.wikipedia.org/wiki/Triton_X-100

<http://en.wikipedia.org/wiki/Tetraethylorthosilicate>

<http://www.sigmaaldrich.com>

<http://www.sibond.com>

http://en.wikipedia.org/wiki/Succinic_anhydride

[http://en.wikipedia.org/wiki/Tris\(bipyridine\)ruthenium\(II\)_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Tris(bipyridine)ruthenium(II)_chloride)

(1) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University

(2) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Department of Microbiology, Faculty of Science, KMUTT