Micro total analysis system (μ-TAS) สำหรับการตรวจการปนของปลาปักเป้าในอาหาร

Micro total analysis system (μ-TAS) for detection of puffer fish constituents in foods

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ *[1] มะซาโต ไซโต[2] และเออิชิ ทามิยา[2]

[1] ห้องปฏิบัติการทรานเจนิคเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

[2] Department of Applied Physics, Graduated School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 Japan

บทคัดย่อ

ด้วยความจำเป็นในการตรวจวิเคราะห์การปนของปลาปักเป้าในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 264/2545 ให้สามารถดำเนินการได้ในภาคสนาม จึงได้พัฒนาเทคนิคการตรวจอย่างง่ายที่อยู่บนพื้นฐานการใช้ห้องปฏิบัติการสมบูรณ์ในรูปย่อ Micro total analysis system (μ-TAS) หรือชิป (Lab-on-a-chip) ทำจากวัสดุ polydimethysiloxane (PDMS) สำหรับการตรวจการปนของดีเอ็นเอวัตถุดิบจากปลาปักเป้า การตรวจประกอบด้วยการสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียว และการตรวจปฏิกิริยาด้วยการเรืองแสงในชิปเดียวกัน การตรวจวิเคราะห์สามารถดำเนินการได้ภายใน 40 นาที โดยมีขั้นตอนที่ง่ายและที่สำคัญไม่ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการ การตรวจความไวที่ระดับดีเอ็นเอ 10 copies มีความเฉพาะเจาะจงสูง โดยใช้ต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำเพียง 400 บาทต่อตัวอย่าง

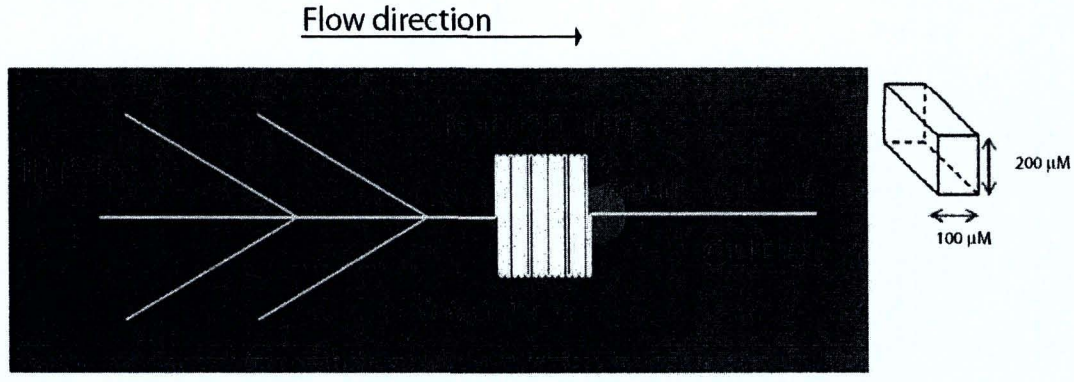
วิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

ใช้ตัวอย่างปลาและตัวอย่างอาหารที่ได้จาก ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชิป การออกแบบ การสร้าง การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ

1. ออกแบบโครงสร้างของระบบปฏิบัติการที่ประกอบด้วย ช่องรับตัวอย่างบริเวณปฏิกิริยา และช่องระบายปฏิกิริยาขนาด 100x 200 ไมโครเมตร (ภาพที่ 1) และขึ้นรูปด้วยหลักการ photolithography และวัสดุ PDMS (Nakayama *et al.*, 2006) เชื่อมต่อระบบเข้ากับสนามแม่เหล็ก และท่อนำปฏิกิริยาโดยใช้ syring ขนาด 1 mL และเข็มฉีดยาขนาดเบอร์ G20 ตัดปลาย



ภาพที่ 1 โครงสร้างชิปและรายละเอียดของโครงสร้าง

2.พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของปลาปักเป้าบนพื้นฐานของยีน sagitoxin binding protein มีรายละเอียดดังนี้

2.1 สกัดดีเอ็นเอโดยละลายเนื้อของอาหารในสารละลาย 50mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 1 M Guanidine HCl, 0.1M DTT บดด้วยก้านบดขนาดเล็ก 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศา เป็นเวลา 8 นาที ปั่นแยกตะกอน ถ่ายส่วนใส ผสมกับ ferrous oxide resin เพื่อจับดีเอ็นเอในสารละลาย 3 % และดูดสารละลายทั้งหมดฉีดเข้าสู่ชิป โดยใช้ syring ขนาด 1 mL ผ่านสารละลายเข้าสู่บริเวณปฏิกิริยา โดย ferrous oxide resin ที่มีดีเอ็นเอเคลือบจะถูกจับตัวไว้ ล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 80% propanol และปล่อยให้แห้งโดยผ่านอากาศเข้าสู่บริเวณปฏิกิริยา ขั้นตอนดังกล่าวถือเป็นการเสร็จสิ้นการสกัดดีเอ็นเอ

2.2 ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน sagitoxin *binding protein* เพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์จำเพาะต่อ 6 บริเวณของยีนเป้าหมาย โดยประกอบปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ 20 mM Tris pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1%.., 2 mM $MgCl_2$, 400 µM dNTP และ 10 U *Bst* DNA polymerase (NEB, USA และ50 uM ไบนด์เดอร์เรืองแสง Syber Green 40X โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 63 °C 40 นาที (Notomi *et al*, 2000)

2.2 และ soybean grain ฉีดสารละลายปฏิกิริยาเข้าสู่บริเวณปฏิกิริยาและบ่มชิปไว้ที่อุณหภูมิ 63 องศา เป็นเวลา 30 นาที

2.3 ตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยนำชิปไปส่องด้วยแสดง UV ความยาวคลื่น 320 nm ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า บนวุ้นอะกาโรส TAE เข้มข้น 2.5%