บทที่ 1 บทนำ

หัวใจสำคัญของไบโอเซนเซอร์คือในส่วนของสารทางชีวภาพที่ใช้ซึ่งจำต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับสารหรือโมเลกุลที่ต้องการตรวจวัด ในกรณีเดียวกันของดีเอ็นเอเซนเซอร์นั้นใช้ความจำเพาะเจาะจงของลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์นั้นหัววัดดีเอ็นเอทั่ว ๆ ไปจะใช้ดีเอ็นเอสายเดียวสั้น ๆ (ssDNA) ที่มีลำดับเบสประมาณแปดถึงเจ็ดสิบเบส โดยดีเอ็นเอนี้จะถูกออกแบบมาให้เข้าจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ ssDNA เป้าหมายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ นอกจากจะสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรงแล้วยังมีการใช้โปรตีนหรือโมเลกุลขนาดเล็กเข้าช่วยใน การเกิดปฏิกิริยาโดยจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี หรือกายภาพที่บริเวณผิวหน้าของหัววัด คือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางแสง มวล หรือ ไฟฟ้าเคมี ดังนั้นจึงสามารถตรวจวัด และวิเคราะห์สัญญาณที่เกิดขึ้นนี้ได้ ในการตรวจวัดลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) ในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอหลายชนิดผสมอยู่นั้นต้องอาศัยพื้นฐานสำหรับการจัดจำแนกยีน (identify genes) รูปแบบดีเอ็นเอ (DNA profile) และวิธีใหม่ ๆ เพื่อให้ได้ลำดับดีเอ็นเอ

ในการออกแบบเครื่องดีเอ็นเอเซนเซอร์นั้นต้องการการพัฒนาวิธีการตรวจวัดนั้นมีเป้าหมายพื้นฐานหลักสองอย่าง อย่างแรกคือการตรวจวัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้การตอบสนองที่สูง และไม่ต้องทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ก่อนทำการตรวจวัด แต่การเพิ่มปริมาณด้วยวิธีทางเคมีหรือฟิสิกส์รวมอยู่ในวิธีการวิเคราะห์ เป้าหมายที่สองเกี่ยวข้องในส่วนการตรวจวัดนั้นต้องตระหนักถึงความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการคัดเลือกสูงเพื่อทำการตรวจวัดตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์

ดังที่ได้กล่าวในตอนต้นว่าการทรานส์ดิวซ์สัญญาณวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าสามารถพัฒนาให้ได้เครื่องมือที่มีราคาถูก สร้างได้ด้วยกระบวนการที่ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังใช้งานง่ายสามารถพกพาและอำนวยความสะดวกต่อการนำไปใช้งานภาคสนาม แม้แต่การใช้เป็นเครื่องมือวัดส่วนตัว เช่นเครื่องวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน ในการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้ามีรูปแบบการวัดง่ายๆ คือทำการตรึงโพรบ ssDNA บนพื้นผิวทรานส์ดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งลำดับเบสที่เลือกใช้ต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างเป็นคู่สมกัน (complementary) เมื่อเกิดการไฮบริไดเซชั่นสัญญาณจาก transducer ที่วัดได้แปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้า ดังนั้นการวัดนี้จะอาศัยความต่างระหว่าง dsDNA และ ssDNA เมื่อทำการวัดค่าการนำไฟฟ้า นอกจากนี้ที่ผ่านมามีงานวิจัยมากมายที่ใช้ฉลากช่วยในการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น เช่นสีอินทรีนย์ (เช่น methylene blue) โลหะผสม (เช่น rutheniumbipyridine) เอนไซม์ (เช่น ALP) และอนุภาคขนาดนาโน (เช่น อนุภาคทองขนาดนาโน) ในการตรวจวัด DNA hybridization โดยทั่วไปแล้วมี 4 วิธีคือ

1) การวัดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกระแสออกซิเดชั่นหรือรีดักชั่นของเบสดีเอ็นเอเช่น guanine และ adenine[1-2]

2) การวัดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกระแสออกซิเดชั่นหรือรีดักชั่นของ indicator ที่ใช้ซึ่งจะจับกับ dsDNA และ ssDNA[3-5]

3) การวัดสัญญาณเคมีไฟฟ้าของสับสเตรทหลังจากเกิดไฮบริไดเซชั่นกับเอนไซม์ที่ติดอยู่กับดีเอ็นเอโพรบ[6-7]

4) การวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคโลหะนาโนโพรบหลังจากเกิดไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอเป้าหมาย[8-13]

ในการวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าในวิธีที่ 4 นั้นฉลากที่ใช้โดยส่วนใหญ่จะเป็นวัสดุนาโน (เช่น AuNPs, AgNPs, CdSe เป็นต้น) โดยมีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ความไวสูงที่อาศัยวัสดุนาโนเพื่อขยายสัญญาณวัดทางเคมีไฟฟ้าขึ้น จากการใช้อนุภาคทองขนาดนาโนเป็นตัวชี้นำสัญญาณวัดโดยติดฉลากอนุภาคดังกล่าวกับดีเอ็นเอโพรบหรือแอนติบอดี เมื่อเกิดการไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายหรือการจับอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดี้กับแอนติเจน และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงโดยใช้เทคนิคทางแสง ในขณะเดียวกันสามารถใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดได้เช่นกัน วิธีการคือหลังจากเกิดไฮบริไดเซชันจะใช้กรดละลายอนุภาคทองที่เป็นตัวติดฉลากออกมาในสารละลายในรูปของ Au^{3+} จำนวนมาก (1 อนุภาคทองนาโนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 20 นาโนเมตร จะมีปริมาณทอง 2.3×10^5 อะตอม) เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า -0.3 โวลต์ แก่อิเล็กโทรดทำงานเทียบอิเล็กโทรดอ้างอิง จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Au^{3+} ได้เป็น Au สะสมที่ผิวหน้าอิเล็กโทรด (เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า electrodeposition) จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้าในทิศทางบวกแก่อิเล็กโทรด ในขั้นตอนนี้ทองที่สะสมจะหลุดจากผิวหน้าอิเล็กโทรด และเกิดกระแสออกซิเดชันซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอหรือแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ เทคนิคที่ใช้ในขั้นตอนที่สองเรียกว่า "anodic stripping voltammetry" ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าผลการวิเคราะห์มีปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ถึงระดับ 10^{-12} โมลาร์[14]

โดยในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค (DNA bio-barcode-latex; BBL) มาใช้งานสำหรับเซนเซอร์วัดดีเอ็นเอความไวสูง ขั้นตอนการตรวจวัดดังแสดงในรูปที่ 1 โดยตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายบนขั้วอิเลคโทรดแบบพิมพ์สกรีน และทำการไฮบริไดซ์ดีเอ็นเอบนหัววัดกับดีเอ็นเอโพรบที่มี BBL เป็นฉลาก หลังจากนั้นจะทำการเติมสารละลายผสมซิลเวอร์เพื่อทำให้เกิดการสะสมซิลเวอร์ปริมาณมาก ๆ บนดีเอ็นเอบาร์โคดที่อยู่บนอนุภาคลาเทค ท้ายที่สุดในส่วนของขั้นตอนการวัดจะทำการละลายโลหะเงินที่อยู่บนฉลาก BBL ให้อยู่ในรูปของ Ag+ ด้วยกรด และทำการวัดปริมาณไอออนโลหะนี้ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า anodic stripping voltammetry (ASV) จะเกิดเป็นสัญญาณกระแสที่สัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งการใช้ฉลาก BBL จะช่วยเพิ่มสัญญาณกระแสต่อการวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมากบนอนุภาคลาเทคนี้ทำให้มีปริมาณโลหะเงินที่เข้ามาเกาะเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเทียบกับการใช้อนุภาคทองขนาดนาโนร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โคด ซึ่งจะมีปริมาณดีเอ็นเอบาร์โคดติดอยู่ในหลักร้อยเส้นเป็นฉลาก และเมื่อมีการเกิดคู่สมระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอโพรบน่าจะช่วยเพิ่มความไวของเซนเซอร์วัดให้สามารถวัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่ำได้

1.1 สืบค้นวรรณกรรม

การพัฒนาดีเอ็นเอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางพันธุศาสตร์เป็นที่สนใจมากขึ้น ดังนั้น สัญญาณการวัดดีเอ็นเอจึงจำเป็นต้องมี sensitivity สูงโดยวัดผ่านตัวเพิ่มสัญญาณการวัด(amplifiers) โดยเทคนิคต่างๆ เช่นการตรวจวัดทางแสง[15] (optical) chemiluminesence[16] SPR(surface plasmon resonance)[17] QCM(quartz crystal microbalance)[18] และทางเคมีไฟฟ้า(electrochemistry)[19-33] ได้ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง จากกระบวนการตรวจวัดดีเอ็นเอเหล่านี้จำเป็นต้องมีขั้นการเพิ่มสัญญาณการวัด(amplification stratergies) เพื่อทำให้ความไวในการตรวจวัดสูง ระบบการเพิ่มสัญญาณการวัดนี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ผ่านกระบวนการ PCR (polymerase chain reaction) หรือใช้ระบบการเพิ่มสัญญาณผ่าน fluorogenic substrate-active enzymes liposome ดัดแปลง และวัสดุขนาดนาโนเมตร(nanoparticles) เป็นต้น โดยการพัฒนาเทคนิค และระบบต่างๆ เหล่านี้มีเป้าหมายเดียวกันคือสามารถเอาชนะระบบพีซีอาร์ที่มีค่าใช้จ่ายสูง และต้องมีผู้เชี่ยวชาญ นอกจากนี้ยังคาดว่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวินิจฉัยแบบเทคโนโลยีฐาน จากเทคนิคต่างๆ ที่ได้กล่าวในตอนต้นวิธีการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการตรวจวัดสารทางชีวภาพเนื่องจากวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายต่ำขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และมีความไวสูง

Mirkin และคณะ เป็นกลุ่มวิจัยแรกที่คิดค้นเทคนิคใหม่ที่เรียกว่าเทคนิคในการวัดด้วยไบโอบาร์โคด (bio-barcode assay; BBA) ซึ่งสามารถเพิ่มสัญญาณการวัดได้อย่างมากคือสามารถวัดได้ระดับต่ำถึง 10^{-18} โมลาร์ สำหรับการตรวจวัดโปรตีน[34] และ 10^{-21} โมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกรดนิวคลีอิคเป้าหมาย[35] ซึ่งหลักการของเทคนิค BBA นี้จะประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลัก ๆ คือ

(1) ส่วนตรวจวัดดีเอ็นเอบาร์โคด; ในส่วนนี้จะประกอบไปด้วย อนุภาคทองขนาดนาโนเมตรที่ถูกออกแบบให้ติดกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี้หรือดีเอ็นเอโพรบ1 (DNA reporter probe) ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โคดที่มีลำดับเบสซีเควซ์ที่มีเอกลักษณ์เฉพาะ

(2) การแยกดีเอ็นเอหรือโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการตรวจวัด; ในส่วนนี้เป็นการใช้อนุภาคแม่เหล็กขนาดไมครอน (magnetic microparticles) เคลือบด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี้ หรือดีเอ็นเอโพรบ2 (DNA capture probe)

เมื่อทำการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายอนุภาคทองขนาดนาโนและอนุภาคแม่เหล็กจะจับกันแบบ sandwich ผ่านการจับกันระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี้ หรือ DNA-DNA hybridization หลังจากนั้นชุด sandwich นี้จะถูกแยกออกจากสารละลายด้วยแม่เหล็กต่อมาจะทำการ dehybridization ของดีเอ็นเอบาร์โคดที่อยู่บนอนุภาคทองขนาดนาโน โดยดีเอ็นเอบาร์โคดที่ถูกปล่อยออกมานี้จะสัมพันธ์กับปริมาณโมเลกุลเป้าหมายที่ตรวจวัด โดยระบบการวัดนี้มีข้อดีคือความไวในการตรวจวัดสูงมากมีความสามารถในการคัดเลือกสูง สามารถประยุกต์ใช้ตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายหลายๆ ชนิดพร้อมกัน (multiplex targets) และทำให้ระบบวัดมีศักยภาพสูงขึ้นเพราะใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยๆ ได้

จากจุดเริ่มต้นของการใช้ BBA ในงานด้านไบโอแอสเสดังกล่าวจึงมีการประยุกต์ใช้หลักการนี้ในการพัฒนาเทคนิควัดความไวสูงมากขึ้น อาทิการขยายสัญญาณด้วยโลหะเงิน(silver) หลักการคือหลังจากที่ปล่อยดีเอ็นเอบาร์โคดออกมาแล้วจะมาทำให้เกิดการไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบ1ดีเอ็นเอบาร์โคดและโพรบ 2 ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองขนาดนาโนเมตรบนสไลด์กระจก หลังจากนั้นจะเติมสารละลายที่เป็นสารผสมระหว่างอิออนเงินและไฮโดรควิโนน (Ag^+ + hydroquinone) จะเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ที่รอบอนุภาคทองขนาดนาโนเกิดเป็นโลหะเงินล้อมรอบอนุภาค ซึ่งสามารถนำไปตรวจวัดปริมาณจากระดับความเข้มสีเทา

(grey scale) โดย การสำเนาภาพด้วยสแกนเนอร์และอ่านด้วยโปรแกรม histrogram averages ใน Adobe Photoshop วิธีการดังกล่าว โดยวิธีการเช่นนี้ทำให้ระบบการวัดเป็นแบบ "multiplexing system" ได้ และด้วยหลักการเดียวกันนี้สามารถใช้วิเคราะห์แอนติเจน (Ag) โดยมีแอนติบอดี้ (Ab1) ตรึงอยู่บนอนุภาคแม่เหล็ก ส่วนของบาร์โคดจะมีแอนติบอดี้อีกชนิดหนึ่ง (Ab2) ตรึงอยู่ ทั้ง Ab1 และ Ab2 สามารถจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจนได้[34] และให้ผลในแง่ของการขยายสัญญาณผ่านบาร์โคดเช่นเดียวกับการศึกษาโดยดีเอ็นเอ ที่กล่าวมานี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิเคราะหโดยอาศัยคุณสมบัติทางแสงเป็นสัญญาณวัดโดยมีวัสดุนาโนเป็นตัวช่วยขยายสัญญาณให้ได้ความ ไวในการวัดสูง

แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนยุ่งยาก และซับซ้อน ดังนั้นจึงได้มีงานวิจัยที่มีขั้นตอนที่ง่ายกว่าและยังคงอาศัยหลักการของดีเอ็นเอบาร์โคดนี้เข้ามาประยุกต์เช่นมีการติดอนุภาค PbS[36] และ CdS[21, 37] เข้าไปที่ดีเอ็นเอบาร์โคด หลังจากเกิดไฮบริไดเซชั่นแล้วจะทำการละลายโลหะด้วยกรดและทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า anodic stripping voltammetry ต่อไปซึ่งหลักการนี้แม้จะทำการตรวจวัดดีเอ็นเอได้ที่ LOD ประมาณ 4-5 เฟมโตโมลาร์ นอกจากนี้มีการประยุกต์ให้สามารถทำการตรวจวัดสารชีวภาพสองชนิดพร้อมกันได้โดยมีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โคด2 แบบคือเป็นดีเอ็นเอบาร์โคดที่มีเบสเป็น A ทั้งหมด (polyA DNA) และ ที่มีเบสเป็น G ทั้งหมด (polyG DNA)[33] ซึ่งบาร์โคดแต่ละแบบสามารถตรวจวัดสารชีวภาพที่ต่างกัน หลังจากที่ทำการคัดเลือกแล้วจะทำการละลายปล่อยดีเอ็นเอบาร์โคดด้วย DTT และ กรด เพื่อให้เบส G และ A ละลายอยู่ในสารละลายหลังจากนั้นจะทำการตรวจวัดเบส G และ A ได้ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าซึ่งสามารถตรวจวัดเบส G และ A ที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.97 และ 1.3 โวลท์ตามลำดับ แม้ว่าการประยุกต์นี้จะสามารถตรวจวัดได้ที่ระดับพิโคโมลาร์ และข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถทำการตรวจวัดสารทางชีวภาพพร้อมกัน 2 ชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ได้เมื่อเทียบกับเทคนิคของ Mirkin ตั้งต้น แต่ด้วยเทคนิคของ Hu และคณะ[32] ที่อาศัยการสะสมของ $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ ที่สามารถจับกับประจุลบของ หมู่ฟอสเฟตที่ดีเอ็นเอบาร์โคด ร่วมกับการใช้ nanoporous gold electrode และทำการตรวจวัดสัญญาณของ $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งสามารถวัดดีเอ็นเอได้ต่ำถึงระดับ 28 แอตโตโมลาร์

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันมีความต้องการเครื่องมือหรือวิธีตรวจวัดปริมาณสารที่สามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว และมีความไวสูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ สิ่งแวดล้อม และอาหาร แนวทางหนึ่งเพื่อบรรลุสู่จุดมุ่งหมาย ได้แก่การพัฒนาเซนเซอร์วัดโดยเซนเซอร์ดังกล่าวมีลักษณะของการทรานส์ดิวซ์สัญญาณหลากหลายรูปแบบ แต่ที่มีความโดดเด่นด้านความไวได้แก่เซนเซอร์วัดที่อาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้า นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาวิธีการปรับปรุงผิวหน้าหัววัด (modified) และการขยายสัญญาณวัดเพื่อให้ได้เซนเซอร์ที่มีความจำเพาะ และมีความไวของการตรวจวัดสูงมากซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอและโปรตีนซึ่งถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้สำคัญในการวินิจฉัยโรคในสิ่งมีชีวิต

ในการวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัด จุดมุ่งหมายที่เป็นประเด็นหลักคือเซนเซอร์วัดต้องมีความจำเพาะ (specificity) หรือความสามารถคัดเลือกเฉพาะ (selectivity) และต้องมีความไว (sensitivity) ในการใช้งานวัด นอกนั้นเป็นความสำคัญในประเด็นของการนำไปใช้งานเช่น ความเสถียร (stability) ความถูกต้องแม่นยำ ความเร็วในการตอบสนอง และการยอมรับของผู้ใช้งานเป็นต้น โดยสัญญาณไฟฟ้าที่วัดได้จากงานวิจัยด้านไบโอเซนเซอร์ (biosensor) เกิดจากการทรานส์ดิวซ์ (transduce) สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือเคมีเช่น สัญญาณแสง (optical sensor) การเปลี่ยนแปลงมวล (mass sensor) และประจุ หรืออิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า (electrochemical sensor) การเลือกใช้เทคนิคใดขึ้นกับประเภทของสารที่ต้องการตรวจวัดรวมทั้งวัสดุที่ใช้โมดิฟายด์ (modifiers) หัววัดเพื่อเพิ่มความจำเพาะการคัดเลือกเฉพาะ และความไวของเซนเซอร์ เซนเซอร์วัดที่อาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้ามีข้อโดดเด่นด้านความไว (ด้วยเทคนิคเช่น pulse voltammetry และ stripping analysis) ซึ่งมีความสามารถด้านการคัดเลือกเฉพาะโดยไม่จำเป็นต้องโมดิฟายด์ขั้วอิเล็กโทรดในบางกรณี เช่นการวัดแบบโวลแทมเมตรี (voltammetry) ที่มีลักษณะเฉพาะของสัญญาณพีคเกิดในตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าที่เฉพาะเช่นกัน รวมถึงความสามารถในการพัฒนาระบบวัดทั้งแบบตั้งโต๊ะและแบบใช้งานภาคสนาม (portable) ได้ในราคาไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องมือวัดชั้นสูงอื่นๆ เช่น HPLC หรือ GC ในกรณีที่ต้องมีการโมดิฟายด์หัววัดเพื่อสร้างความจำเพาะและความไวของเซนเซอร์ก็สามารถทำได้ง่ายและผลิตเป็นจำนวนมากได้ (mass production)

ความท้าทายในงานวิจัยพื้นฐานและเชิงประยุกต์สำหรับไบโอเซนเซอร์คือการสร้างเซนเซอร์ที่มีความไวของการตรวจวัดสูงมาก (highly sensitive sensors) ความไวของเซนเซอร์วัดบ่งบอกถึงความสามารถต่ำสุดที่วัดได้ (limit of detection, LOD) ด้วยสมบัติที่ต้องการดังกล่าวทำให้สามารถประยุกต์ใช้เซนเซอร์วัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้หลายสาขาทั้งด้านการแพทย์ สิ่งแวดล้อม และอาหาร ในทางการแพทย์หากตรวจวัดหรือวินิจฉัยโรคโดยวัดความผิดปกติในระดับโมเลกุลาร์หรือดีเอ็นเอที่ปริมาณต่ำ มากๆ ด้วยเซนเซอร์ความไวสูงจะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัย และการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการขั้นต้นซึ่งอาการของโรคอาจยังไม่ปรากฏอย่างชัดเจนได้ทันท่วงที ด้านสิ่งแวดล้อมการตรวจวัดปริมาณจุลชีพที่ปนเปื้อนบ่งบอกคุณภาพของสภาวะแวดล้อมซึ่งจะช่วยในการวางแผนเพื่อป้องกันต่อไป หรือในด้านอาหารการตรวจวัดปริมาณเพียงเล็กน้อยของจุลชีพในวัตถุดิบ หรือในอาหารจะมีประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของการผลิตและความปลอดภัยของผู้บริโภคได้เป็นอย่างมาก

ปัจจุบันดีเอ็นเอและโปรตีนถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการวินิจฉัยโรคในสิ่งมีชีวิต โดยตรวจวัดจุลชีพ และเชื้อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อม รวมถึงอาวุธชีวภาพที่ใช้ในสงครามและการก่อการร้าย ดังนั้นการพัฒนาเซนเซอร์วัดความไวสูงสำหรับตรวจวัดตัวบ่งชี้ดังกล่าวจะมีประโยชน์อย่างมหาศาลต่อวงการการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยทั่วไปการวิเคราะห์ดีเอ็นเอใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ที่อาศัยการขยายปริมาณดีเอ็นเอ เทคนิคนี้มีความไวสูงมากแต่มีข้อด้อยในเรื่องความยุ่งยากของการใช้งานและค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง จุดอ่อนที่สำคัญประการหนึ่งคือความไวที่เกิดขึ้นเป็นการขยายปริมาณดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเช่นกัน และนำมาซึ่งความผิดพลาดของการวัด ส่วนเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนที่มี

ความไวสูงได้แก่ ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ซึ่งให้ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ถึงระดับ 10^{-12} โมลาร์ (picomolar, pM) เทคนิคนี้อาศัยการวัดและขยายสัญญาณจากการติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) อย่างไรก็ตาม ELISA มีข้อเสียประการแรกจากความไวต่อแสงของสารติดฉลาก ทำให้ขาดสมบัติความเสถียรอีกประการหนึ่งคือค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างฐานเทคโนโลยีการตรวจวัดดีเอ็นเอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าความไวสูง โดยอาศัยการเพิ่มสัญญาณการตรวจวัดด้วยฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคร่วมกับการเพิ่มปริมาณซิลเวอร์บนฉลาก และทำการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าด้วยเทคนิคที่เรียกว่าแอนโนดิคสตริปปิ้งโวลแทมเมทรี ซึ่งคาดว่าจะสามารถสร้างฐานเทคโนโลยีการตรวจวัดที่มีความไวสูง และสามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอได้ต่ำถึงระดับ 10^{-18} โมลาร์ (attomolar; aM)

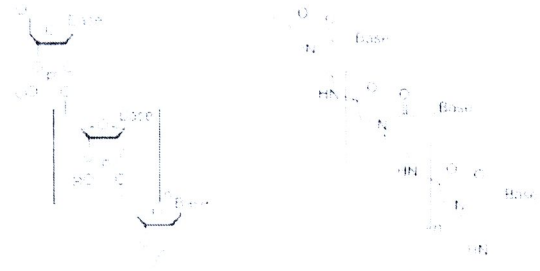
1.4 วารสารปริทรรศน์และทฤษฎี

1.4.1 ดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นชื่อย่อของสารพันธุกรรมของ "กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก(Deoxyribonucleic acid)" เป็นพวกกรดนิวคลีอิก(Nucleic acid) โดยดีเอ็นเอมักพบอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นลักษณะเกลียวคู่(double helix) จากการจับคู่กันของพอลินิวคลีโอไทด์(polynucleotide) 2 สายในแนวตรงข้ามกัน โดยทั้งสองสายนี้จะเอาส่วนที่เป็นเบสหันเข้าหากัน และส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซี-ไรโบส(Deoxyribose Sugar) ไว้ด้านนอก ดังนั้นเมื่อดีเอ็นเอแต่ละสายมาเข้าคู่กันจะมีรูปร่างเป็นเกลียวคู่คล้ายบันไดลิงที่บิดตัวทางขวาหรือบันไดเวียนขวา จากโครงสร้างดีเอ็นเอสายเดียว(รูปที่ 1.1) จะประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่านิวคลีโอไทด์(nucleotide) ซึ่งประกอบด้วยเฮเทอโรไซคลกิเบส 4 เบส คือ ไทมีน(T) อะดีนีน(A) ไซโตซีน(C) และกัวนีน(G) และจะมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนของเบสที่เป็นคู่ส่มกัน โดยเบสไทมีน(T) จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสอะดนินี(A) แบบพันธะคู่(double bonds) ส่วนเบสไซโตรซีน(C) จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสกัวนีน(G) แบบพันธะสาม(triple bonds) การเข้าคู่กันของเบสเหล่านี้ จะเป็นไปตามกฎของวัตสัน-คลิก โดยข้อมูลทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะเกิดขึ้นจากการเรียงลำดับของเบสในดีเอ็นเอนั่นเอง

ในปีค.ศ1991ทมีนักวิจัยจากประเทศเดนมาร์กสามารถสังเคราะห์สารประกอบเลียนแบบดีเอ็นเอที่เรียกว่าเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (Peptide Nucleic Acid) หรือพีเอ็นเอ (PNA) (Uhlmann et al., 1998)[38] โดยโมเลกุลของพีเอ็นเอนี้สามารถ เกิดจากการแทนที่หมู่น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตในดีเอ็นเอด้วยหน่วยที่ซ้ำๆ กันของ 2-อะมิโนเอธิลไกลซีน เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ขึ้นในโมเลกุล (โครงสร้างแสดงในรูปที่ 1.1) โดยชนิดของเบสในโมเลกุลของพีเอ็นเอก็ยังคงเหมือนกับดีเอ็นเออยู่ พีเอ็นเอมีสมบัติที่คล้ายคลึงกับดีเอ็นเอธรรมชาติโดยสามารถจับกับดีเอ็นเอเกิดเป็นโครงสร้างบันไดวนได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสันคริกเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอ ซึ่งมีความสเถียรมากกว่า

สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอตามธรรมชาติด้วยกันเอง ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของพีเอ็นเอประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์ที่ไม่มีประจุ ทำให้การเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอปราศจากแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตตังที่พบในโมเลกุลเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอด้วยกันเอง นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอ็นเอยังมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอสอีกด้วยจึงทำให้พีเอ็นเอมีความเสถียรในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ด้วยสมบัติที่น่าสนใจเหล่านี้จึงทำให้มีการศึกษา และพัฒนาเกี่ยวกับพีเอ็นเออย่างต่อเนื่องเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่นด้านการเกษตร ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และ ด้านการแพทย์



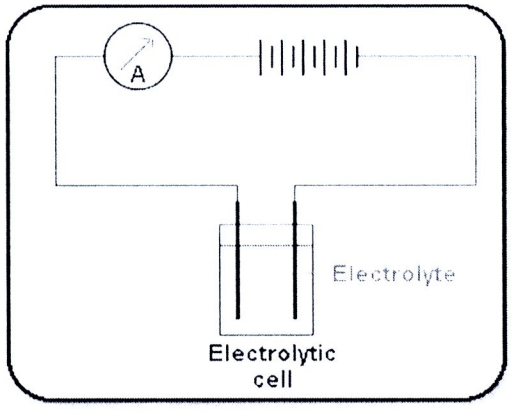
DNA PNA

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของดีเอ็นเอ และ พีเอ็นเอ

1.4.2 ทฤษฎีการวัดทางเคมีไฟฟ้า

สรุปหลักการพื้นฐานทางเคมีไฟฟ้าวิเคราะห์(electroanalytical chemistry) เป็นหลักการทางเคมีไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งทางด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองทางไฟฟ้าของสารสองชนิดที่ทำปฏิกิริยากันแบบไม่รุนแรง และเกิดกระบวนการขนถ่ายอิเลคตรอนอย่างง่ายขึ้นซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของปฏิกิริยาเคมี เทคนนี้มีข้อดีกว่าวิธีวิเคราะห์ธรรมดาคือสามารถใช้วิธีทางไฟฟ้าควบคุมขอบข่าย และทิศทางของการเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ ข้อดีของการวิเคราห์ปริมาณสารด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าทั่วไฟคือมีความไวสูง และความจำเพาะสูงเช่นกัน

โดยทั่วไปเคมีไฟฟ้าสามารถแยกออกเป็นสองประเภทด้วยกัน คือปฏิกิริยาเคมีสามารถก่อให้เกิดปริมาณทางไฟฟ้าได้เรียกว่าเซลล์กัลวานิก(galvanic cell) และอีกประเภทคือปฏิกิริยาทางเคมีเกิดเมื่อมีการกระตุ้นด้วยพลังงานทางไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานภายนอกเรียกว่าเซลล์อิเล็กโตรไลติก (electrolytic cell)



รูปที่ 1.2 แสดงเซลล์เคมีไฟฟ้าแบบอิเล็กโตรไลติกอย่างง่าย

ที่มา : http://www.physchem.co.za/OB12-che/Graphics/GRDE0046.gif

โดย Electrolytic cell (รูปที่ 1.2) ต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกมากระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี และเมื่อปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นเกิดการให้หรือรับอิเล็กตรอน ซึ่งตัวทำปฏิกิริยาอาจเป็นอิออนหรือโมเลกุลที่เกิดขึ้นในระบบการวัดผ่านขั้วไฟฟ้าด้วยสมบัติดังนี้

- ปฏิกิริยารีดอกซ์(redox reaction)
  คือปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือรีดักชั่น ดังสมการ (1)

$$O + ne^- \leftrightarrow R \qquad (1)$$

  โดย O คือสารออกซิไดซ์ที่เกิดปฏิกิริยารีดักชั่น และ R เป็นสารรีดิวซ์ที่เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชั่น

- ปฏิกิริยา heterogeneous คือปฏิกิริยาเกิดขึ้นระหว่างผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากับสารละลายด้วยกระบวนการถ่ายเทมวล อิเลคตรอนดังสมการที่ (2-4)

$$O_{bulk} \longrightarrow O_{electrode} \qquad (2)$$

$$O_{electrode} \longrightarrow R_{electrode} \qquad (3)$$

$$R_{electrode} \longrightarrow R_{bulk} \qquad (4)$$

- กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวหรือกระแสไฟฟ้าที่ให้เพื่อเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีการส่งผ่านสู่เซลเคมีไฟฟ้า
- ปริมาณกระแสไฟฟ้าจะถูกควบคุมด้วยกระบวนการของการถ่ายเทมวล ซึ่งมีด้วยกัน 3 ลักษณะ คือการเคลื่อนที่(migration) การแพร่(diffusion) และ การพา(convection) รวมถึงจลศาสตร์ของปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเลคตรอน

Potentiostat

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กระบวนการทำปฏิกิริยาทางเคมีหรืออิเล็คโทรเคมีคัล ซึ่งจะใช้หลักการเคลื่อนที่ของตัวอิเล็คตรอน และเป็นเครื่องมือวัดที่สามารถจะรับสัญญาณที่อยู่ในรูปคลื่นได้ผ่านตัว Working Electrode สัมพันธ์กับ Reference Electrode โดยที่จะวัดผลของกระแสที่ตัวเซลล์ของWorking Electrode เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์กระบวนการทำปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งการควบคุมการจ่ายกระแส และการวัดค่าของสัญญาณที่อ้างอิงจากความต่างศักย์ ในการทำงานของ potentiostat จะมีส่วนที่เชื่อมต่อกับขั้วไฟฟ้าทั้งสามตัว คือ Reference Electrode (RE), Working Electrode (WE) และ Counter Electrode (CE) ซึ่งจะเป็นหลักสำคัญของกระบวนการวิเคราะห์ทางเคมี

Reference Electrode (RE) ควรใช้อุปกรณ์ที่ไม่มีขั้ว เช่น Ag/AgCl หรือ calomel electrode เพราะตัวอิเล็คโทรดนี้จะมีความต่างศักย์อ้างอิงที่ค่อนข้างคงที่ และมีเสถียรภาพสูง ซึ่งจะใช้เทียบกับความต่างศักย์ของ Working Electrode จะทำให้คำนวณค่าออกมาได้อย่างแม่นยำ เพราะช่วงการเปลี่ยนของศักย์จะมีขนาดเล็กมากๆประมาณ 1 mV ซึ่งตรงจุดนี้จะมีความสำคัญต่อความแม่นยำในการวัดของหลักการทางเคมีไฟฟ้า สมบัติของ RE จะมีความสำคัญมากในเรื่องของความต่างศักย์อ้างอิง โดยที่ตัว potentiostat จะถูกออกแบบมาให้สามารถวัดกระแสที่ผ่าน RE ที่มีค่าต่ำ เพราะว่ากระแสของสัญญาณจะทำให้อินพุตมีค่าความต้านทานสูงมาก ดังนั้นจะต้องมั่นใจว่าเงื่อนไขของศักย์ไฟฟ้าต้องคงที่

Working Electrode (WE) จะเป็นส่วนที่เกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอน การเลือกชนิดของ WE มีความสำคัญมาก เพราะชนิดของวัสดุที่ใช้จะให้ผลการวัดสารแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ความเหมาะสมของชนิด WE ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสิ่งที่ต้องเลือกเป็นกรณีเฉพาะไป โดยมีเหตุผลในการเลือกที่แตกต่างกันไป

Counter Electrode (CE) ทำหน้าที่ถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่มาจากภายนอกให้กลับเข้าสู่สารละลายอิเล็กโตรไลต์ (Electrolyte solution) โดยที่เคาน์เตอร์อิเล็กโทรดต้องมีสมบัติดังนี้คือ มีค่าการนำไฟฟ้าที่ดี มีความเป็นรูพรุนสูงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา และจะต้องเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดีด้วย วัสดุที่นิยมใช้ทำเป็นเคาน์เตอร์อิเล็กโทรดคือ โลหะแพลทินัม (Pt) แต่ในหลายกรณีจะพบว่าโลหะชนิดนี้ไม่เหมาะมาใช้ทำ counter electrode เช่นในกรณีที่พื้นที่ผิวของ working electrode มีค่าสูง ตามหลักทางเคมีไฟฟ้าพื้นที่ผิวของ counter electrode จะต้องมีค่ามากกว่า อาจจะเป็นต้องใช้โลหะชนิดอื่นทดแทนเช่น แสตนเลส เพื่อลดต้นทุน

เทคนิควิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้านั้นมีหลายวิธี เช่น โพเทนชิโอเมทรี(potentiometry) โวลแทมเมทรี (voltammetry) และคูลอมเมทรี(coulometry) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีค่าสัญญาณไฟฟ้า และค่าศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนหรือวัดจะแตกกต่างกัน โดยแต่ละวิธีที่กล่าวมาจะสามารถแยกย่อยเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ได้แตกต่างกันอีกมาก โดยในงานวิจัยนี้จะได้ใช้เทคนิค anodic stripping voltammetry ซึ่งเป็นวิธีทางโวลแทมเมทรีวิธีหนึ่งเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของอิออนได้อย่างจำเพาะเจาะจง

1.4.3 Anodic stripping voltammetry

เทคนิคนี้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือ (1) การสะสมอิออนของโลหะบนผิวหน้าอิเลคโทรดผ่านกระบวนการ electroplate และ(2) ขั้นตอนการ strip คือการออกซิไดซ์โลหะที่สะสมอยู่ออกจากผิวหน้าหัววัด ซึ่งกระแสที่ได้จะเป็นกระแสที่วัดในระหว่างขั้นตอนที่ 2 โดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารที่สนใจจะแสดงออกในรูปของพีคระหว่างค่ากระแสที่วัดได้และศักย์ไฟฟ้าที่จำเพาะต่ออิออนของโลหะนั้น ๆ ซึ่งเทคนิคที่ใช้สำหรับขั้นตอนการทำ stripping สามารถใช้โวลแทมโมแกรทหลายวิธีเช่น linear staircase squarewave หรือ pulse เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค differential pulse voltammetry

- ขั้นตอนการวัดด้วยเทคนิค anodic stripping voltammetry

ในการวัดด้วยเทคนิค anodic stripping voltammetry ประกอบด้วยขั้วเซลล์สามชนิดคือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน(working electrode) ขั้วไฟฟ้าช่วย(counter electrode) และขั้วอ้างอิง(reference electrode) ในสารละลายที่มีอิเลคโทรไลท์ที่ช่วยทำให้สภาพการนำไฟฟ้าในสารละลายมีเสถียรภาพ ซึ่งในทางเคมีไฟฟ้าขั้วไฟฟ้าทำงานจะเป็นขั้วสำหรับศึกษาปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ส่วนขั้วไฟฟ้าอ้างอิงจะเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการควบคุมศักย์ไฟฟ้าในระบบเซลล์วัดให้คงที่ และขั้วไฟฟ้าช่วยจะทำหน้าที่เพิ่มเสถียรภาพในการควบคุมศักย์ไฟฟ้า และสามารถแบ่งขั้นตอนการวัดเป็น 4 ขั้นคือ โดยขั้นที่ (1 และ 2) ต้องทำการกวนสารละลาย

(1) เป็นการทำสะอาดผิวหน้าขั้วทำงาน โดยจะทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่สูงกว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารที่สนใจศึกษา ณ ช่วงขณะหนึ่งเพื่อทำให้เกิดการผลักสารต่าง ๆที่อาจติดอยู่ที่ผิวหน้าหัววัดให้หลุดออก

(2) เป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำพอให้เกิดการรีดิวซ์สารที่สนใจเพื่อให้เกิดการสะสมที่ผิวหน้าบนหัววัด

(3) ทำการหยุดการกวนสารละลาย แต่ยังคงป้อนศักย์ไฟฟ้าเช่นเดียวกับในขั้นที่ (2) เพื่อให้ยังคงให้เกิดการสะสมสารที่ผิวหน้าหัววัดให้เกิดการจัดเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอมากขึ้น

(4) ในขั้นนี้จะเป็นการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าให้ศักย์ไฟฟ้าสูง (anodic) และเกิดการผลักสารที่สนใจ (stripping เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น) โดยค่ากระแสที่ได้รับจะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่สนใจตรวจวัด

เทคนิคการวัดแบบ stripping เกี่ยวเนื่องกับขั้นตอนการ preconcentrate โลหะบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเมื่อป้อนศักย์ไฟฟ้าทางลบ และสามารถเลือกให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสำหรับแต่ละโลหะที่สนใจในระหว่างการป้อนศักย์ไฟฟ้าทางบวก ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่นิยมสำหรับการตรวจวัดปริมาณอิออนของโลหะที่ปริมาณน้อย ดังนั้นขั้นตอนการทำ preconcentration จะช่วยทำให้สามารถวัดสารในปริมาณต่ำ และนำไปสู่การวัดที่มีค่าจำกัดในการวัด(limit of detection)ที่ต่ำได้