

## บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

### 2.1 เครื่องมือ

- 2.1.1 Potentiostat (Autolab รุ่น PGSTAT 12, EcoChemie, ประเทศเนเธอร์แลนด์)  
ทำหน้าที่ป้องกันศักย์และแสดงผลสัญญาณไฟฟ้าด้วยโปรแกรมควบคุม GPES (General Purpose Electrochemical System)
- 2.1.2 เครื่อง UV spectrophotometry (Beckman Spectrophotometer model DU7000, สหรัฐอเมริกา)
- 2.1.3 TEM (JEOL, model JM-2100)
- 2.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich model micro 120, เยอรมันนี)
- 2.1.5 sonicator
- 2.1.6 overhead stirrer
- 2.1.7 cooling bath
- 2.1.8 water bath
- 2.1.9 refrigerated incubator shaker (New Brunswick Scientific Co., model innova 4340, นิวเจอร์ซีย์)
- 2.1.10 Semiautomatic screen printer (model 248, DEK-S)

### 2.2 สารเคมีและวัสดุ

ในการดำเนินงานวิจัยนี้มีสารเคมีและวัสดุที่ใช้งานดังต่อไปนี้

- 2.2.1 Styrene (Fluka)
- 2.2.2 Acrylic acid (Fluka)
- 2.2.3 poly(allyamine) hydrochloride (PAA, MW ~ 70000; from Sigma-Aldrich)
- 2.2.4 glutaraldehyde (Aldrich)
- 2.2.5 Ammonium persulfate (APS; from Riedel-DeHaën)
- 2.2.6 Lithium chloride (Aldrich)
- 2.2.7 Bovine serum albumin (BSA; Aldrich)
- 2.2.8 Tween 20 (Aldrich)
- 2.2.9 Propylamine (Aldrich)

- 2.2.10 98% *N*-hydroxysuccinimide (NHS; Aldrich)
- 2.2.11 Hydrobromic acid (Ajax Finechem)
- 2.2.12 Bromine (Panreac)
- 2.2.13 Silver enhancer solution (A และ B; Aldrich)
- 2.2.14 Sodium dodecyl sulfate (SDS; Aldrich)
- 2.2.15 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC; Fluka)
- 2.2.16 Sodium acetate (Fluka)
- 2.2.16 Sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ; Prolabo)
- 2.2.17 Sodium chloride (Merck)
- 2.2.18 Nitric acid (Merck)
- 2.2.10 Glacial acetic acid (Merck)
- 2.2.11 Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris; Merck)
- 2.2.12 Hydrochloric acid (HCl; Merck)
- 2.2.13 Difco™ Nutrient broth (Dickinson Co., France)
- 2.2.14 Silver/Silver chloride reference electrode (3M NaCl)
- 2.2.15 platinum disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
- 2.2.16 Conducting carbon ink (type 145, MCA Service)
- 2.2.17 Silver/Silver chloride ink (type C2DR15, MCA Service)
- 2.2.18 PVC sheet
- 2.2.19 Insulating tape (Permacel model p221)
- 2.2.20 พีเอ็นเอโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ซื้อจากบริษัท Bio-Synthesis Inc. (เท็กซัส, สหรัฐอเมริกา) และ ดีเอ็นเอเป้าหมาย รวมถึงดีเอ็นเอโพรบ และดีเอ็นเอบาร์โคด ซื้อจากบริษัท Bio Basic Inc. ในขณะที่ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิด (mismatched DNA) ได้จากบริษัท Bioservice Unit โดยรายละเอียดชื่อและลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 2.1 รายละเอียดชื่อและลำดับเบสของดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ชื่อ	ลำดับเบส	รายละเอียดเพิ่มเติม
target DNA	5'-TAT TCA CTC AGG AAG TTA TTA CTC AGG AAG-3'	ดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอโพรบ
PNA (capture probe)	N' Acetylation-CTT CCT GAG TGA ATA-OO-Lysine C'	พีเอ็นเอโพรบซึ่งจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย 15 เบส
pDNA1 (reporter probe1)	5'-NH <sub>2</sub> -TTT TTT TTC TTC CTC AGT AAT AAC TTC CTG AGT GAA TA-3'	โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบซึ่งดัดแปลง ปลาย 5' ด้วยหมู่อะมิโน ใช้สำหรับตรึงบน อนุภาคลาเทค และโพรบนี้เป็นคู่สมอีก ด้านหนึ่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย (สำหรับ การวิเคราะห์แบบตรวจวัดโดยตรง; direct hybridization detection)
pDNA2 (reporter probe2)	5'-NH <sub>2</sub> -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC TTC CTG AGT AAT AA- 3'	โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบซึ่งดัดแปลง ปลาย 5' ด้วยหมู่อะมิโน ใช้สำหรับตรึงบน อนุภาคลาเทค และโพรบนี้เป็นคู่สมอีก ด้านหนึ่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย (สำหรับ การวิเคราะห์แบบตรวจวัดโดยตรง; Sandwich-hybridization detection)
bDNA (barcode DNA)	5'-NH <sub>2</sub> TTT TTT TTG CTC ATA TGG ACC TC-3'	โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบซึ่งดัดแปลง ปลาย 5' ด้วยหมู่อะมิโน ซึ่งใช้สำหรับ ตรึงบนอนุภาคลาเทค (ดีเอ็นเอบาร์โค้ด)
single mismatched DNA	5'-TAT TCA CTC AGG AAG TTA TTA CTC ACG AAG-3'	เบส C (ขีดเส้นใต้) เป็นลำดับเบส ที่ผิดพลาด
non complementary DNA	5'-AAA GTG CTA TGC AGT AAA AAG TGC TAT GCA GTA A-3'	

ซึ่งสารละลายพีเอ็นเอโพรบจะเตรียมที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6 และเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง โดยจะทำการเจือจางโดยใช้อะซิเตดบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 4.8 ในขณะที่ดีเอ็นเอตั้งต้นเตรียมที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในน้ำมิลลิคิวที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองจะทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 โดยสารละลายทั้งหมดจะเตรียมด้วยน้ำมิลลิคิวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



## 2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

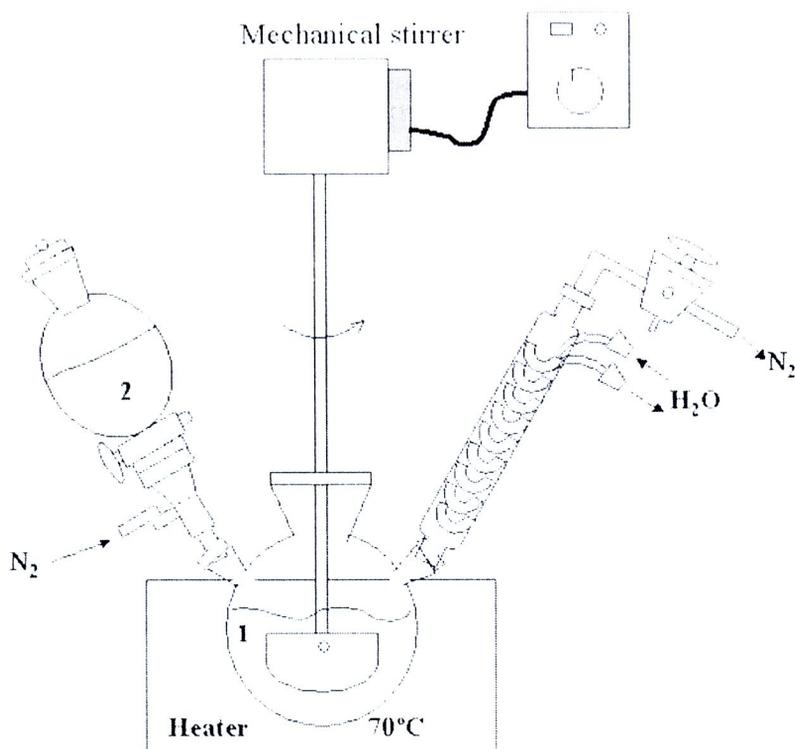
### 2.3.1 การเตรียมอิเล็กโทรด

สกรีนปรินท์อิเล็กโทรด(screen printed electrodes; SPEs) เตรียมโดยใช้เครื่อง semiautomatic screen printer โดยจะทำการพิมพ์สกรีนชั้นของ conducting carbon ink (Type 145, MCA service, สหรัฐอเมริกา) ตามด้วยชั้นของ ซิลเวอร์/ซิลเวอร์ คลอร์ไรด์เฉพาะส่วนที่เป็นหัววัดอ้างอิงบนแผ่นพีวีซีขนาดกว้าง 150 มิลลิเมตร และยาว 200 มิลลิเมตร ทำให้ได้ชุดหัววัดแบบพิมพ์สกรีนทั้งหมด 24 ชุด ซึ่งแต่ละชุดจะประกอบไปด้วย หัววัดทำงานคาร์บอน และหัววัดซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอร์ไรด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งหัวอ้างอิงและหัว counter โดยในแต่ละชั้นของการพิมพ์สกรีนจะทำการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืนแล้วจึงตั้งไว้ให้หายร้อนที่อุณหภูมิห้อง โดยจะได้ทำการติดเทปจนวนในตำแหน่งที่กำหนดทำให้ส่วนของหัววัดทำงานมีขนาด กว้าง x ยาว เท่ากับ 2 x 5 มิลลิเมตร และในส่วนของหัวอ้างอิงและ counter มีขนาด 3 x 5 มิลลิเมตร

ขั้วแพลทินัม (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) สามารถสร้างขึ้นมาใช้เองเพื่อใช้เป็นหัว counter โดยใช้แผ่นแพลทินัมตัดให้เป็นแผ่นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เชื่อมต่อกับเส้นลวดทองแดงด้วยตะกั่ว แผ่นแพลทินัมจะสามารถปิดที่ปลายหลอดแก้วด้านหนึ่ง และทำให้ยึดติดกับแท่งแก้วโดยการหล่ออีพ็อกซีเรซิน จากนั้นทิ้งไว้ให้เรซินแข็งตัว และทำการขัดผิวหน้าขั้วแพลทินัมด้วยผงอะลูมินา ขนาดผง 0.3 ไมโครเมตร และล้างด้วยน้ำกลั่นในเครื่อง sonicator 2-3 ครั้ง

### 2.3.2 การเตรียมอนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก

อนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก (polystyrene-co-acrylic acid; PSA) สามารถสังเคราะห์ได้ดัดแปลงจากวิธีในบทความวิจัยก่อนหน้า<sup>39</sup> ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 330 นาโนเมตร สังเคราะห์ขึ้นโดยใส่น้ำกลั่น 190 กรัม ในขวดก้นกลมสามคอที่ต่อกับเครื่องกวนสาร และควบคุมอุณหภูมิโดยใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 2.1 หลังจากนั้นจะทำการกวนสารที่ความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที พร้อมทั้งใส่ก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนที่อยู่ในน้ำ และระบบออกโดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่โมโนเมอร์สไตรีน (ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และกลั่นที่ความดันต่ำ) 20 กรัม และโมโนเมอร์กรดอะคริลิก 4 กรัม และเพิ่มอุณหภูมิให้น้ำในอ่างควบคุมอุณหภูมิตั้งที่ 70 องศาเซลเซียส (โดยยังคงกวนสารที่ 350 รอบต่อนาที และ ใส่ก๊าซไนโตรเจนตลอดการสังเคราะห์) กระบวนการสังเคราะห์เริ่มขึ้นเมื่อใส่แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต(APS) 0.2 กรัมซึ่งละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการสังเคราะห์ทั้งสิ้น 8 ชั่วโมงจะได้สารละลายสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ในส่วนของการสังเคราะห์อนุภาคลาเทคขนาดอื่น ๆ เช่น 399 และ 468 นาโนเมตร ก็จะใช้กระบวนการเช่นเดียวกันแต่เพียงลดปริมาณของโมโนเมอร์กรดอะคริลิกเป็น 1 กรัม (สำหรับลาเทคขนาด 399 นาโนเมตร) และ 0.5 กรัม (สำหรับลาเทคขนาด 468 นาโนเมตร) เมื่อได้สารละลายสีขาวขุ่นก็จะทำการล้างสารต่างๆ ออกโดยการปั่นแยกตกตะกอน และใช้น้ำกลั่นล้างที่ความเร็วการปั่นแยก 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีต่อการปั่นแยกแต่ละครั้ง โดยจะทำการล้างโดยการปั่นแยก 4 ครั้งจากนั้นจึงทำให้แห้งและเก็บในรูปผงที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงการต่อชุดเครื่องมือสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก (1) ขวดก้นกลมสามคอ (2) กรวยแยกสารไว้ใส่สารต่างๆ เข้าสู่ระบบ

### 2.3.3 การเตรียมฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทค

ซังอนุภาค PSA (ทั้ง 3 ขนาดคือ 330, 399 และ 468 นาโนเมตร) 0.3 กรัม ผสมกับเอทานอล 95% ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร และนำเข้าเครื่องเขย่าคลื่นความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคลาเทคแขวนลอยได้ดี จากนั้นนำสารแขวนลอยอนุภาคลาเทคที่ได้ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย พอลิเอริลเอมีน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และทำการบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที (กวนทุก ๆ ครั้งชั่วโมง) จากนั้นทำการล้างสารพอลิเอริลเอมีนที่มากเกินไปออกด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (ที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที) และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ จะทำให้ได้ PAA-latex โดยจะแขวนลอยในน้ำมิลลิว ซึ่งสามารถหาน้ำหนักต่อปริมาตรได้โดยการชั่งน้ำหนักก่อนและหลังอบแห้ง

จากนั้นนำ PAA-latex (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมกับ 50% glutaraldehyde ในสัดส่วนปริมาตรที่เท่ากัน และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเหวี่ยงเท่ากับ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำการล้างสาร glutaraldehyde ที่มากเกินไปออกโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง และล้างด้วยน้ำกลั่น 4 รอบ จะได้เป็น G-latex ซึ่งแขวนลอยในน้ำมิลลิวปริมาณเดียวกับปริมาตร PAA-latex ที่ใช้ตั้งต้น ต่อมาจึงทำการผสม G-latex ด้วยสาร propylamine เพื่อทำการนำส่วน glutaraldehyde ที่เกาะบนอนุภาคลาเทคแบบไม่แข็งแรงออก ทำโดยการบ่ม G-latex 1 มิลลิลิตร ด้วย

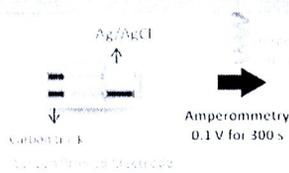
500 ไมโครลิตรของ propylamine ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเหวี่ยงเท่ากับ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำการล้างสาร propylamine ที่มากเกินไปออกโดยการปั่นเหวี่ยง ความเร็วสูง และล้างด้วยน้ำกลั่น 4 รอบ จะได้เป็น NGL แขนงลอยในน้ำมีลิลคิวปริมาตร 800 ไมโครลิตร

ดีเอ็นเอบาร์โคดสามารถสร้างได้โดยใช้ NGL ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ที่เตรียมทันทีผสมกับ 100 ไมโครลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมอยู่ และเติม 99 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอบาร์โคดความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 1 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอโพรบที่ตัดแปลงปลายสายด้วยหมู่เอมีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (pDNA1 ใช้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยตรง และ pDNA2 ใช้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบ sandwich) โดยได้ทำการบ่มสารผสมที่ 37 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำการล้างดีเอ็นเอที่มากเกินไปออกโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำมีลิลคิว (จะได้ทำการเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงรอบแรกเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องยิวส์เปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร) จะทำให้ได้ฉลากบาร์โคดดีเอ็นเอลาเทคซึ่งแขวนลอยในน้ำมีลิลคิวหนึ่งมาเชื่อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (ปริมาณลาเทคแขวนลอยโดยประมาณ = 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 2.3.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรง

ทำการล้างหัวอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกิน (หัวคาร์บอน และ ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์) 5 รอบ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 และน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อ จึงทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ในการตรึงดีเอ็นเอบนหัวคาร์บอนทำงานทำได้โดยการหยดสารละลายดีเอ็นเอเป้าหมาย 20 ไมโครลิตร บนหัวทำงานทั้งคาร์บอนและหัวอ้างอิง จากนั้นทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ 0.1 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที จึงทำการล้างเอาดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่ถูกตรึงบนหัวทำงานออกโดยใช้ TTL บัฟเฟอร์ (TTL = 0.1 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ tween 20 และ 1 โมลาร์ ลิเทียมคลอไรด์ เป็นส่วนผสม) ล้าง 3 รอบ ขั้นตอนต่อมาได้ทำการผสมสารละลายแขวนลอยของฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคกับ TTL บัฟเฟอร์ ในสัดส่วนปริมาตรเท่ากัน และนำสารผสมที่ได้ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนหัวทำงานที่ได้ตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายไว้แล้วบ่มเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย TT บัฟเฟอร์ (TT = 0.25 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ tween 20 เป็นส่วนผสม) 3 ครั้ง และ ล้างด้วย washing buffer A (= 0.5 โมลาร์ NaNO<sub>3</sub> ผสมกับ 0.02% tween 20 และ 0.01% SDS) 3 ครั้ง ตามด้วย washing buffer B (= 0.5 โมลาร์ NaNO<sub>3</sub>) เพื่อทำการล้างดีเอ็นเอที่ไม่ถูกไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมายบนหัวทำงานออก รวมถึงล้างคลอไรด์ที่ปนเปื้อนบนหัวตัวออก ทั้งนี้คลอไรด์สามารถทำปฏิกิริยากับซิลเวอร์ไอออนในขั้นตอนการทำรูปซิลเวอร์ และทำให้เกิดการตกตะกอนของซิลเวอร์ได้ ลำดับขั้นตอนการตรวจวัดได้แสดงในรูปที่ 2.2

## Direct Hybridization Detection



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไคเซชันโดยตรงบนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน

### 2.3.5 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไคเซชันแบบ sandwich

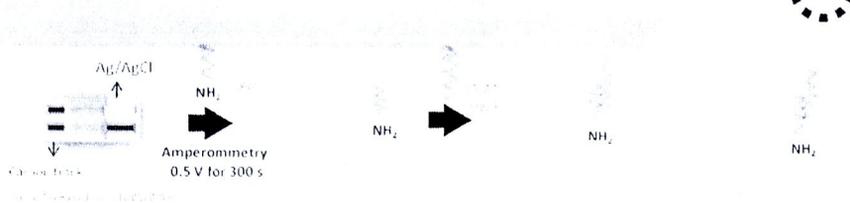
ทำการล้างขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน (ขั้วคาร์บอน และ ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์) ด้วยน้ำมิลลิคิวที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยล้างประมาณ 5 ครั้ง และทำให้แห้งด้วยไนโตรเจนแก๊ส จากนั้นทำการตรึงพีเอ็นเอบนหัววัดด้วย 2 วิธีคือ (ก) วิธีตรึงด้วยเคมีไฟฟ้า และ (ข) การตรึงแบบโควาเลนต์

(ก) การตรึงด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า ; หยดสารละลาย 1 ไมโครโมลาร์ พีเอ็นเอในอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พีเอช 4.8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่  $-0.5$  โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที จึงทำการล้างเอาดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่ถูกตรึงบนขั้วทำงานออกโดยใช้อะซิเตดบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 4.8 2 ครั้ง และล้างด้วยทริสบัฟเฟอร์ (Tris HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7) 2 ครั้ง และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

(ข) การตรึงแบบโควาเลนต์; ก่อนทำการตรึงพีเอ็นเอบนขั้วทำงานจะได้ทำการบ่มเฉพาะขั้วคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนด้วยสารผสมกรด(1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ผสมกับ 1 โมลาร์ กรดไนตริก ในสัดส่วนเท่ากัน) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำมิลลิคิวนิ่งฆ่าเชื้อ 5 รอบ(รอบละประมาณ 1 มิลลิลิตร) และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน หลังจากบ่ม และล้างด้วยกรดแล้วจะได้ทำการตรึงพีเอ็นเอทันทีโดยหยดสารละลายผสม (45 มิลลิโมลาร์ EDC 15.75 มิลลิโมลาร์ NHS และ 1 ไมโครโมลาร์ พีเอ็นเอในอะซิเตดบัฟเฟอร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรบนขั้วคาร์บอนทำงาน และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการล้างพีเอ็นเอที่ไม่ถูกตรึงบนขั้วไฟฟ้าออกด้วย 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 2-3 ครั้งจึงทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาไฮบริดไคเซชันสามารถทำได้โดยการบ่มดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาตร 20 ไมโครลิตรความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์บนขั้วไฟฟ้าทำงาน และทำการบ่ม 30 นาทีเพื่อให้เกิดการไฮบริดไคซ์กันระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย และพีเอ็นเอโพรบแล้วทำการล้าง 4 ครั้งด้วยทริสบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการผสมสารแขวนลอยฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคกับ 40 มิลลิโมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ด้วยสัดส่วนปริมาตรเท่ากัน และหยด 20 ไมโครลิตรบ่ม 30 นาทีจึงทำการล้างขั้วอิเล็กโทรดด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ตามด้วย washing buffer A และ B อย่างละ 5 ครั้ง โดยลำดับขั้นตอนการเกิดแสดงใน รูปที่ 2.3

## Sandwich Hybridization Detection



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไคเซนแบบ sandwich บนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน โดยใช้ พีเอ็นเอโพรบ

ในการศึกษาสภาวะต่างๆ (เช่นความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบ เวลาและอุณหภูมิในการเกิดไฮบริดไคเซน และระยะเวลาที่ใช้ในการก่อรูปเงิน เป็นต้น) ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไคเซนแบบ sandwich ทำโดยควบคุมสภาวะต่างๆ คือ

- ความเข้มข้นพีเอ็นเอโพรบ = 1 ไมโครโมลาร์
- ระยะเวลาในการบ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย และ พีเอ็นเอโพรบ = 20 นาที
- ระยะเวลาในการบ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย และฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค = 20 นาที
- อุณหภูมิในการบ่ม = 25 องศาเซลเซียส
- ระยะเวลาที่สำหรับการก่อรูปเงิน = 10 นาที

### 2.3.6 การก่อรูปเงิน และการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

หลังจากทำการติดฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคและล้างทำความสะอาดเรียบร้อย ในขั้นตอนการตรวจวัดการเกิดดีเอ็นเอไฮบริดไคเซนโดยตรงจะต้องทำการตัดขั้ว ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ แบบพิมพ์สกรีนออกก่อนและทำการตัดส่วนพลาสติกพีวีซีที่ใกล้กับขั้วทำงานออก เพื่อลดการเกิดการตกตะกอนเงินบนผิวพลาสติก จากนั้นจึงทำการผสมสารก่อรูปเงิน (A และ B ผสมในสัดส่วนปริมาตรเท่ากัน) และหยดลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานปริมาตร 10 ไมโครลิตร และทำการบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จึงทำการล้างทันทีด้วยน้ำมีลลิคว 5 ครั้ง และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ทำการละลายโลหะเงินโดยใช้กรดไนตริกเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำอออนเงินที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ที่มี 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร และนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิค DPASV

การตรวจวัดอออนเงินด้วยเทคนิค DPASV สามารถทำได้โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ -0.4 โวลต์เป็นเวลา 300 วินาที โดยช่วง 290 วินาทีแรกจะต้องทำการกวานสารเพื่อให้เกิดการสะสมโลหะเงินที่ขั้วอิเล็กโทรดให้มากที่สุด (ขั้นตอน preconcentration) จากนั้นทำการหยุดการกวานสารเพื่อให้สารละลาย ในระบบหยุดนิ่งซึ่งเหมาะต่อการตรวจวัดด้วยเทคนิค differential pulse voltammetry คือเป็น

ขั้นตอนการผลึกโลหะเงินที่สะสมอยู่บนขั้วทำงานออก ทำได้โดยการตรวจวัดกระแสที่ศักย์ไฟฟ้าต่าง ๆ ช่วง 0.05 ถึง 0.3 โวลต์ ที่ความเร็วในการวัด 0.5 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

### 2.3.7 การตรวจวัดจีโนมคติเอ็นเอ

เชื้ออีโคไลสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (สายพันธุ์ BL2(DE3)) และเชื้อซัลโมเนลลา โซฟิมูเรียม สามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ทั้งแบบเหลวและแบบวุ้นแข็ง เชื้อทั้ง 2 ชนิดเริ่มแรกจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วจะแบ่งเชื้อที่ได้ส่วนหนึ่งเพื่อทำการหาปริมาณเชื้อที่มีอยู่โดยการบ่มเชื้อที่เจือจางสัดส่วนต่างๆ บนอาหารวุ้นแข็ง เพื่อทำการตรวจหาปริมาณเชื้อในรูปโคโลนี ต่อมิลลิลิตร (colony forming unit; CFU) เชื้อส่วนที่เหลือจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก และไม่ทำให้เชื้อ เจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเชื้อจะถูกล้างและเก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มีโซเดียม-คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมอยู่ โดยเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร จะถูกเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 50 ไมโครลิตรของ 10% SDS

จีโนมคติเอ็นเอสามารถสกัดจากเชื้อแบคทีเรียอย่างง่ายโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้จากการต้มไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บจีโนมคติเอ็นเอที่ละลายอยู่ในสารละลายด้านบนไว้ โดยจะทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การนำจีโนมคติเอ็นเอเข้มข้นมาทำการเจือจางเป็นลำดับทำโดยการใช้ Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 มาใช้ เพื่อใช้ในการตรวจวัดกราฟมาตรฐานของจีโนมคติเอ็นเอโดยใช้ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค ก่อนการตรวจวัดไฮบริดเซชันได้ทำการต้มจีโนมคติเอ็นเอที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและใส่แซนในน้ำแข็งทันทีเพื่อให้เกิดการแยกสายกันของจีโนมคติเอ็นเอ ในการตรวจวัดจีโนมคติเอ็นเอจะได้ทำการผสมจีโนมคติเอ็นเอที่ผ่านการแยกสายออกกับฉลากไบโอบาร์โคดแซนในสัดส่วน 1 ต่อ 1 (ปริมาตร) และหยดสารผสมที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงพีเอ็นเอไว้จึงทำการบ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการล้าง และเพิ่มสัญญาณด้วยการก่อรูปโลหะเงิน ต่อด้วยการละลายโลหะเงินในรูปไอออนเงินด้วยกรดเข้มข้น จึงทำการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า DPASV