

บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์

เทคนิคไบโอบาร์โคดเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาให้เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดในงานทางด้านดีเอ็นเอ^{32-33, 35, 40-44} และอิมมูโนเซนเซอร์^{34, 45-49} นอกจากนี้ยังรวมถึงการตรวจวัดสารโลหะไอออนโดยใช้ดีเอ็นเอไซม์ ในระบบการตรวจวัดดีเอ็นเอส่วนใหญ่ได้ถูกพัฒนาเพื่อลดขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเทคนิคไบโอบาร์โคดเป็นอีกเทคนิคที่สามารถทำได้แต่อย่างไรก็ตามอนุภาคของนาโนที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวบรรจุดีเอ็นเอบาร์โคด และดีเอ็นเอโพรบมีข้อจำกัดในเรื่องขนาด ซึ่งส่งผลต่อปริมาณของดีเอ็นเอที่สามารถบรรจุได้เพียงระดับร้อยเส้นดีเอ็นเอ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการบรรจุดีเอ็นเอให้มากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้อนุภาคลาเทคทรงแทงกลมขนาดต่างๆ เพื่อใช้ในการบรรจุดีเอ็นเอปริมาณมากซึ่งเมื่อมีปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้นจะส่งผลให้ความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอสูงขึ้นเช่นกัน

3.1 การสร้างไบโอบาร์โคดลาเทค

ในงานวิจัยได้ทำการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคลาเทคด้วยดีเอ็นเอ โดยอาศัยวิธีเชื่อมต่อดัวยพันธะโควาเลนต์ ขั้นตอนการดัดแปลงดังแสดงในรูปที่ 3.1 อนุภาคลาเทคที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ คืออนุภาคพอลิสไตรีน-โค-อะคริลิกแอซิด (Polystyrene-co-acrylic acid; PSA) ที่พื้นผิวของอนุภาคลาเทค PSA ชนิดนี้มีหมู่คาร์บอกซิลิกซึ่งแสดงความเป็นประจุลบได้ ดังนั้นสามารถดัดแปลงประจุบนผิวของอนุภาคได้โดยใช้สารพอลิอิเล็กโทรไลต์ (แคทไอออนิก และ แอนไอออนิก) โดยสารแคทไอออนิกที่เลือกใช้ในงานนี้คือสารพอลิเอริลเอมีนซึ่งมีประจุบวกจากหมู่เอมีน ดังนั้นจึงสามารถเคลือบทับบนอนุภาค PSA ได้เป็น PAA-latex ที่มีประจุบวก จากนั้นได้ทำการเคลือบทับด้วยสารกลูตาอัลดีไฮด์เพื่อให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างหมู่อัลดีไฮด์ของสารกลูตาอัลดีไฮด์ และหมู่เอมีนของPAA-latex รวมทั้งหมู่เอมีนที่ดัดแปลงที่ปลายสาย 5' ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ โดยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่อัลดีไฮด์และหมู่เอมีนนี้จะทำให้โพรบติดบนอนุภาคได้ดี จากงานวิจัยก่อนหน้า⁵⁰ พบว่าการใช้สารโพฟิลเอมีนจะช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตรึงบนพื้นผิวได้มากขึ้น โดยในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการใช้สารโพฟิลเอมีนด้วยเช่นกัน และพบว่าโพฟิลเอมีนช่วยทำให้สามารถตรึงโพรบบนอนุภาคลาเทคได้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโพฟิลเอมีนจะช่วยกำจัดสารกลูตาอัลดีไฮด์ที่จับแบบไม่สเถียรบนผิวหน้าอนุภาคลาเทคออกไปได้ โดยจะเรียนอนุภาคลาเทคที่เคลือบสารกลูตาอัลดีไฮด์ และบ่มสารโพฟิลเอมีนเป็น NGL

STEP 1

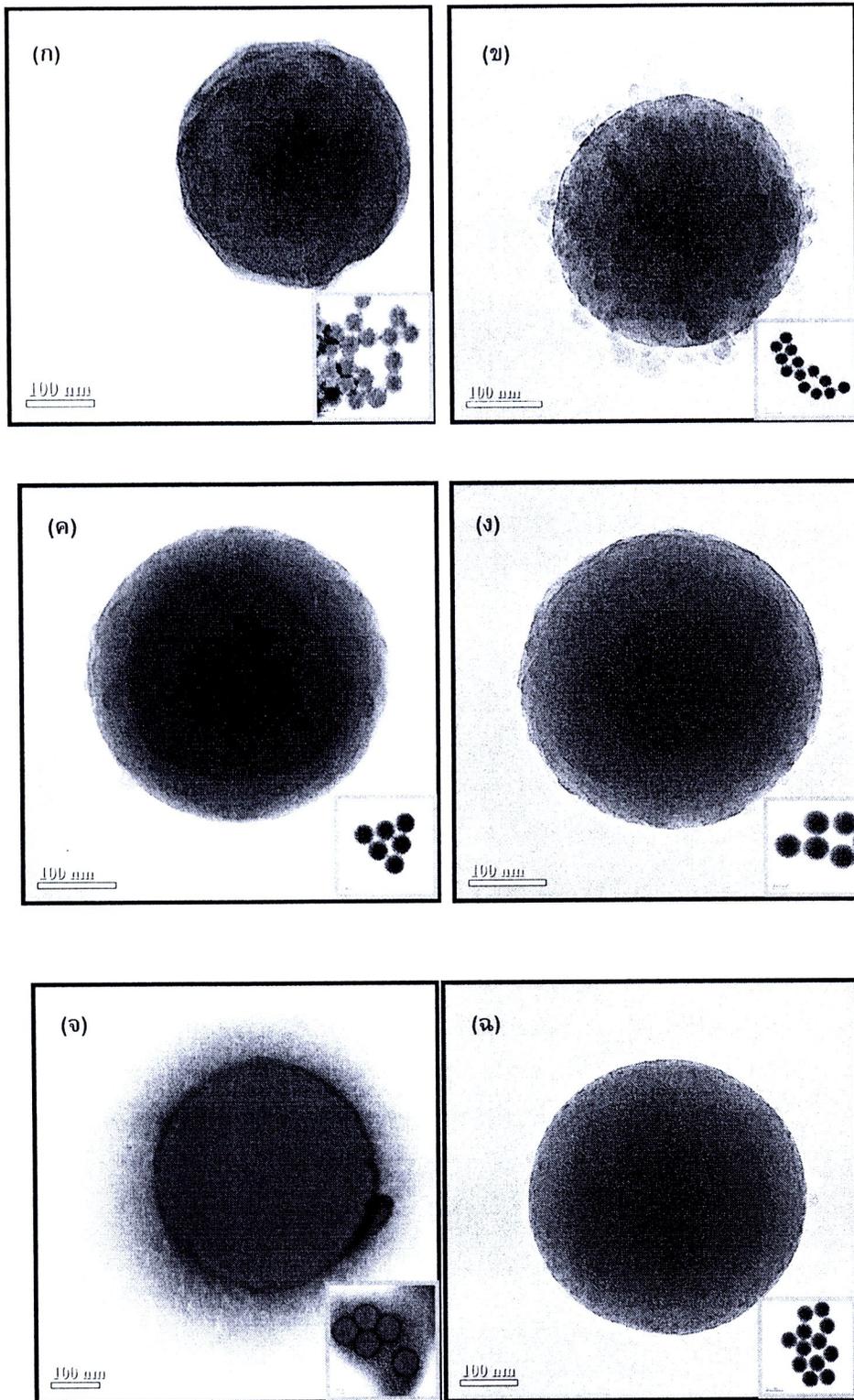


รูปที่ 3.1 แผนภาพการขั้นตอนการสร้างฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค

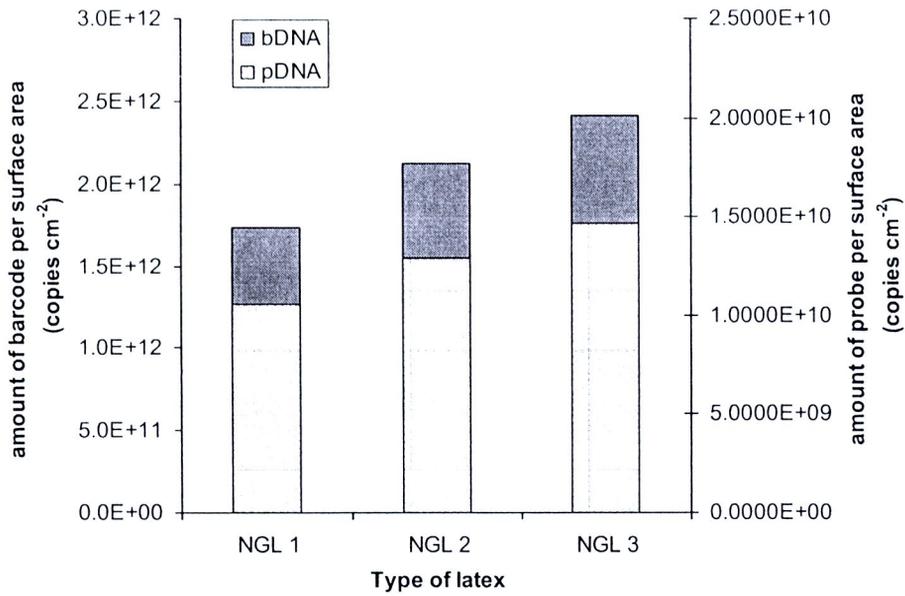
ขนาดของอนุภาคลาเทคส่งผลให้มีพื้นผิวในการตรึงดีเอ็นเอที่ต่างกัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา การตรึงดีเอ็นเอบาร์โคดบนอนุภาค NGL ที่ขนาดต่างๆ กันคือ 330 นาโนเมตร (NGL1), 395 นาโนเมตร (NGL2) และ 468 นาโนเมตร (NGL3) ในรูปที่ 3.2 แสดงภาพจาก TEM ของ GL และ NGL ขนาด ต่างๆ จากรูปแสดงให้เห็นว่าลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของอนุภาคลาเทคจะยังคงเป็นทรงกลม นอกจากนี้ NGL นี้จะแขวนลอยได้ดีในน้ำดังนั้นจึงเหมาะต่อการนำมาใช้ในการบรรจุดีเอ็นเอบาร์โคด เมื่อพิจารณาจากความหนาแน่นของอนุภาคพอลิสไตรีน (1.05 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ทำให้ สามารถคำนวณค่ามวลโดยเฉลี่ยของ อนุภาคได้เท่ากับ 5.64×10^{-14} (สำหรับ NGL1) 3.49×10^{-14} (สำหรับ NGL2) และ 1.98×10^{-14} (สำหรับ NGL3) ซึ่งมวลของอนุภาคแต่ละขนาดสามารถนำมาใช้ เพื่อคำนวณจำนวนอนุภาคในการเตรียมตัวอย่างได้

ข้อดีของการใช้ออนุภาคลาเทคแทนอนุภาคทองคำนาโนสำหรับการสร้างฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดโพรบ คือ (1) อนุภาคลาเทคสามารถแขวนลอยได้ดีในน้ำ และมีความเสถียรสูงกว่า, (2) อนุภาคลาเทคสามารถ ทำการสังเคราะห์ได้เองในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถสังเคราะห์ให้มีขนาดต่างๆกันตั้งแต่ระดับ นาโนเมตรจนถึงไมโครเมตร, (3) สามารถดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคลาเทคได้ง่าย

ทั้งนี้บนฉลากจะมีดีเอ็นเอ 2 ชนิดคือดีเอ็นเอโพรบซึ่งเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ และดีเอ็นเอบาร์โคดซึ่งทำหน้าที่เสมือนตัวเพิ่มสัญญาณ ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอโพรบบนฉลากไม่จำเป็นต้องมีปริมาณมากเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอบาร์โคดที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัดได้ โดยในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้สัดส่วนความเข้มข้นของดีเอ็นเอโพรบ และดีเอ็นเอ บาร์โคดเท่ากับ 1:99 และเมื่อทำการตรึงดีเอ็นเอบนอนุภาค NGL ในช่วงเวลาที่กำหนด จากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ถูกตรึง ไว้ออกมาโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่ติดอยู่บนฉลากสามารถคำนวณได้ จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ในสารละลายหลังจากทำการปั่นเหวี่ยงแล้ว โดยใช้เทคนิคยูวีสเปคโตรโฟโตเมทรีเพื่อทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (1 OD = 33 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ สายเดี่ยวต่อปริมาตรระดับไมโครลิตร) รูปที่ 3.3 แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถบรรจุบนฉลาก NGL1 ถึง NGL3 ได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบนฉลาก NGL3 สามารถบรรจุดีเอ็นเอได้มากที่สุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอได้สูงสุดเช่นกัน เนื่องจากในระบบวัด จะได้ใช้สารไลหะเงินอออนร่วมเพิ่มสัญญาณการตรวจวัด โดยไลหะอออนสามารถจับกับหมู่ฟอสเฟตที่เป็นโครงสร้างหลักของดีเอ็นเอได้ ดังนั้นเมื่อมีปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้นส่งผลให้อออนเงินเข้าไปจับได้มากขึ้นเช่นกัน และจากรูปที่ 3 แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรึงบนอนุภาค NGL1 ถึง NGL3 ได้ ซึ่งปริมาณที่ได้สูงกว่าการตรึงบนอนุภาคทองคำนาโน(รายงานโดย Hu และคณะ³²) ถึง 3700 แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่าการตรึงบนอนุภาคแก้ว (เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 3.53 ไมโครเมตร) เพียง 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคแก้วมีขนาดพื้นที่ผิวแบบรูพรุนจึงทำให้มีพื้นผิวสำหรับ ตรึงดีเอ็นเอมาก



รูปที่ 3.2 ภาพ TEM ของ GL1(ก), NGL1(ข), GL2(ค), NGL2(ง), GL3(จ) และ NGL3(ฉ)
โดยสเกลภาพเท่ากับ 100 นาโนเมตร



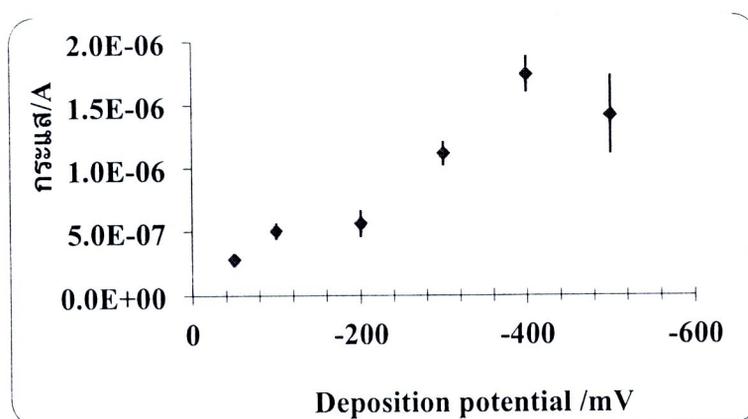
รูปที่ 3.3 กราฟแสดงปริมาณจำนวนดีเอ็นเอบาร์โค้ด และดีเอ็นเอโพรบที่สามารถตรึงอยู่บนอนุภาคลาเทคแบบต่างๆ

3.2 การศึกษาการตรวจวัดอออนเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

ในงานวิจัยได้ใช้สารก่อรูปเงินเพื่อช่วยในการเพิ่มสัญญาณในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าด้วยเทคนิคสตริปปีงโวลแทมเมตรี (ASV) เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถวัดปริมาณอออนของโลหะที่มีปริมาณน้อยๆได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่หายากที่สุดได้ ดังนั้นก่อนที่จะทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารก่อรูปเงิน จะได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดอออนเงินโดยวิธี ASV โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานแบบคาร์บอนพิมพ์สกรีน สภาวะต่างๆ ที่ศึกษาคือ (ก) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เพื่อสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงาน(deposition potential; E_{dep}) (ข) ระยะเวลาที่ใช้ในการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงาน(deposition time; t_{dep}) และ (ค) อัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด(scan rate; $mV s^{-1}$)

3.2.1 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

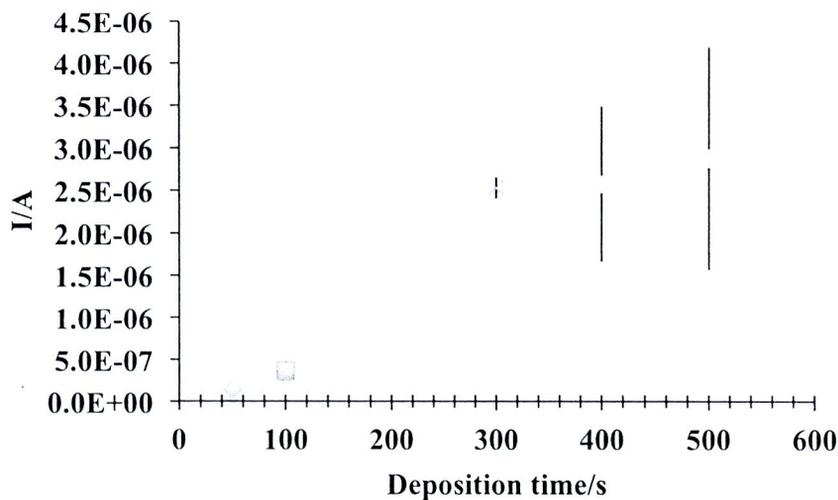
ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สำหรับการสะสมอออนเงินที่อยู่ในสารละลายให้เป็นโลหะเงินที่บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนทำงานสามารถทำได้โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าลบเนื่องจากโลหะเงินมีประจุบวก (Ag^+) โดยการทดลองนี้จะได้ใช้สารโซเดียมไนเตรทเป็นสารมาตรฐานเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ สำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิค ASV ต่ออออนเงิน ช่วง E_{dep} ที่ใช้ในการศึกษาคือ -0.05 ถึง -0.5 โวลท์ โดยควบคุมความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร $t_{dep} = 200$ วินาที และ scan rate = $50 mV s^{-1}$ รูปที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าที่ศักย์ไฟฟ้า -0.4 โวลท์ เป็นศักย์ไฟฟ้าที่ทำให้เกิดการสะสมของโลหะเงินมากที่สุดถึง 1.74 ไมโครแอมแปร์ ทั้งนี้เนื่องจากที่พื้นผิวของขั้วคาร์บอนทำงานแบบพิมพ์สกรีนถูกปกคลุมด้วยประจุลบซึ่งทำให้เกิดการสะสมของอออนเงินที่มีประจุบวกได้เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่า -0.4 โวลท์ นั้นจะส่งผลให้ที่พื้นผิวของขั้วไฟฟ้าไม่มีพลังงานมากพอที่จะทำให้เกิดการสะสมอออนเงินได้ แต่เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าที่มากกว่า -0.5 โวลท์ แสดงถึงสภาวะที่อิ่มตัวของอออนเงินที่ขั้วไฟฟ้า ดังนั้นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงานเท่ากับ -0.4 โวลท์ และจะได้ถูกใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 3.4 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการสะสมโลหะเงิน (E_{dep}) ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ไนเตรด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $t_{dep} = 200$ วินาที scan rate = $50 mV s^{-1}$

3.2.2 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

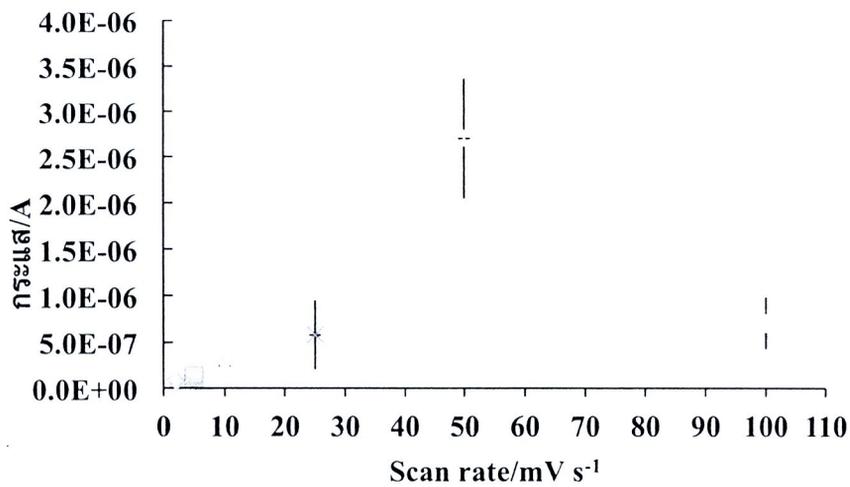
ระยะเวลาที่ใช้เพื่อโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงานเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งต่อการตรวจวัดไอออนเงินทั้งหมดที่ละลายในสารละลาย โดยในระหว่างการสะสมจะมีการกวนสารละลายไอออนเงินเพื่อให้เกิดการสะสมมากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยได้ทำการศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการสะสมที่เหมาะสมในช่วงตั้งแต่ 50 ถึง 500 วินาที ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 3.5 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาในการสะสมเพิ่มขึ้นปริมาณโลหะเงินที่สะสมมากขึ้นตามปริมาณกระแสที่สูงขึ้น และเมื่อเวลาดังแต่ 300 วินาทีขึ้นไปจะให้ค่ากระแสอิ่มตัว แต่หาที่เวลามากกว่า 300 วินาทีแสดงให้เห็นว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนที่สูงมากขึ้นตามเวลาที่มากขึ้น ดังนั้นจะได้เลือกเวลาในการสะสมที่ 300 วินาที เป็นเวลาที่เหมาะสม นอกจากนี้เวลาที่ใช้นี้จะช่วยให้สามารถวัดปริมาณไอออนโลหะที่มีปริมาณน้อยในสารละลายได้ดี



รูปที่ 3.5 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และเวลาที่ใช้ในการสะสมโลหะเงิน (t_{dep}) ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ในเตรด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ scan rate = 50 mV s⁻¹

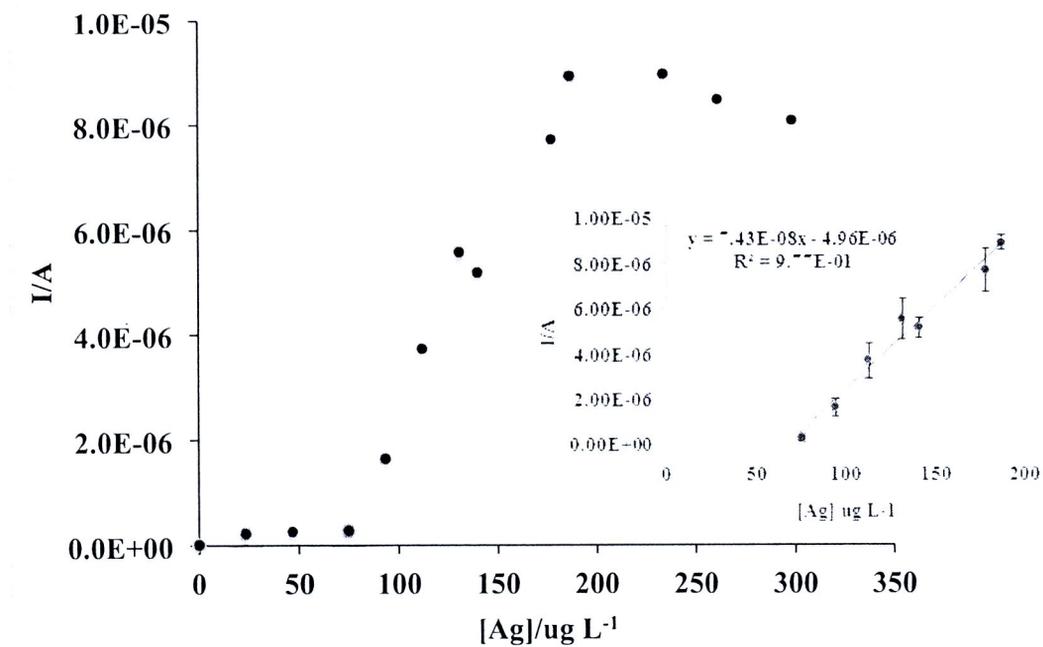
3.2.3 การศึกษาหาอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด

ปัจจัยที่สำคัญต่อการตรวจวัดไอออนเงินคือ อัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด (scan rate: mV s^{-1}) ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากทำการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าได้แล้ว จะต้องทำการกวาดศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้โลหะเงินที่สะสมอยู่หลุดออก และกลับมาละลายในสารละลายเหมือนเดิม โดยในระหว่างการกวาดศักย์ไฟฟ้าอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าจะต้องคงที่ และส่งผลต่อค่ากระแสจำกัด (limiting current) ที่เกิดขึ้น ดังนั้นค่า scan rate ที่ใช้ศึกษาจะอยู่ในช่วง 2 ถึง 100 mV s^{-1} ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6 ผลแสดงให้เห็นว่าที่ scan rate เท่ากับ 50 mV s^{-1} ให้ค่ากระแสสัญญาณสูงที่สุดซึ่งเป็นไปได้ว่าที่อัตรานี้จะส่งผลให้สามารถผลักโลหะเงินออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานได้มากที่สุด



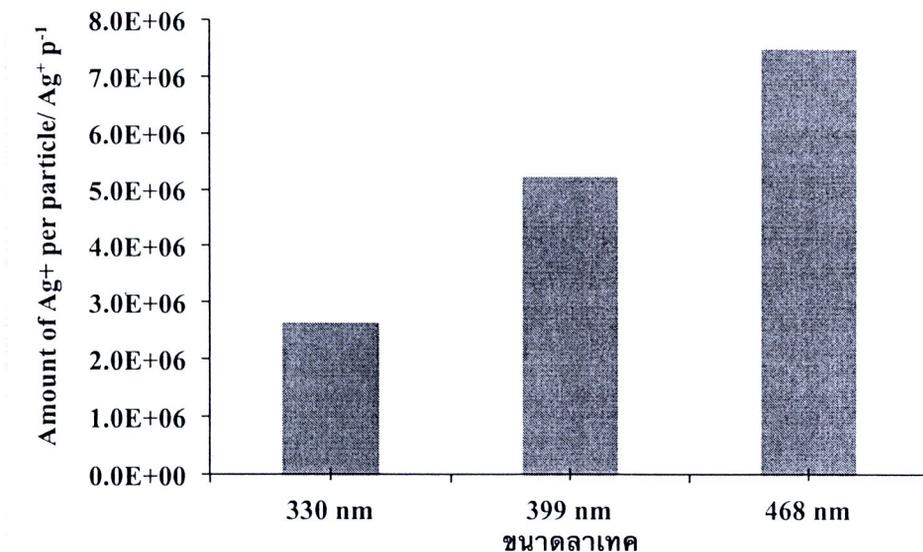
รูปที่ 3.6 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้า(scan rate) ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ไนเตรด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{\text{dep}} = -0.4$ โวลท์ $t_{\text{dep}} = 300$ วินาที

จากสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ คือ $E_{dep} = -0.4$ โวลต์ $t_{dep} = 300$ วินาที scan rate = 50 mV s^{-1} ได้ใช้เพื่อทำการศึกษากากราฟมาตรฐานการตรวจวัดไอออนเงินจากการใช้ซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้สามารถใช้หาปริมาณไอออนเงินในสารละลายที่ไม่ทราบปริมาณได้ แต่มีข้อจำกัดคือค่ากระแสที่วัดได้ต้องอยู่ในช่วงกราฟเชิงเส้น ในการทดลองนี้ได้ใช้สารซิลเวอร์ไนเตรท 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ตรวจวัดในอะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ค่ากระแสสัมพันธ์กับความเข้มข้นแสดงในรูปที่ 3.7 แสดงค่ากระแสเชิงเส้นสำหรับความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทในช่วง 74.5 ถึง 186.3 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยค่าสมการเชิงเส้นคือ $y = (7.43 \times 10^{-6})x - 4.96 \times 10^{-6}$ ซึ่ง x เป็นค่าความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทในถ้วยวัด (ไมโครกรัมต่อลิตร) และ y เป็นค่าความสูงของพีคที่วัดได้จากเทคนิค ASV (ไมโครแอมแปร์) และมีค่า $r^2 = 0.977$ ดังนั้นในการตรวจวัดปริมาณซิลเวอร์ไนเตรทตัวอย่างสามารถตรวจวัดและใช้สมการดังกล่าวข้างต้นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณไอออนเงินที่สามารถบรรจุอยู่บนฉลากไบโอบาร์โคดสาขาเทคโนโลยี



รูปที่ 3.7 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรดในสารละลาย ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลต์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1}

ได้ทำการศึกษาผลของสารก่อรูปเงินที่ใช้กับฉลากทั้ง 3 ชนิด ซึ่งทำโดยการผสมระหว่างสารก่อรูปเงิน A และ B ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ร่วมกับฉลากไบโออาร์โคดลาเทคทั้ง 3 ชนิด (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตัวอย่างละ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที โลหะเงินจะสามารถเกาะบนดีเอ็นเออาร์โคดได้จากอ็อนเงินที่มีประจุบวกเข้ากับจับกับประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยแรง electrostatic จากนั้นอ็อนเงินจะถูกเร่งปฏิกิริยาทางเคมี(สารก่อรูปเงิน:B) ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนโลหะเงิน ต่อมาจึงได้ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 14000 รอบต่อนาที เพื่อล้างเอาสารก่อรูปเงินที่เกินพอออก ปริมาณโลหะเงินที่ก่อรูปบนดีเอ็นเออาร์โคดสามารถตรวจวัดได้โดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า กล่าวคือทำการละลายโลหะเงินด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 50% ให้เป็นอ็อนเงิน ท้ายสุดสามารถทำการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า "แอนอ็อนนิคสตริบปีง โวลแทมเมตรี" (anodic stripping voltammetry) ซึ่งค่ากระแสที่วัดได้สามารถคำนวณหาปริมาณอ็อนเงินได้โดยใช้สมการเชิงเส้นที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้านี้ โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.8 เมื่อปริมาณดีเอ็นเออาร์โคดเพิ่มขึ้น ปริมาณโลหะเงินที่สามารถก่อรูปบนฉลากไบโออาร์โคดลาเทคจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ NGL3 เป็นตัวติด ฉลากดีเอ็นเออาร์โคดสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันต่อไป



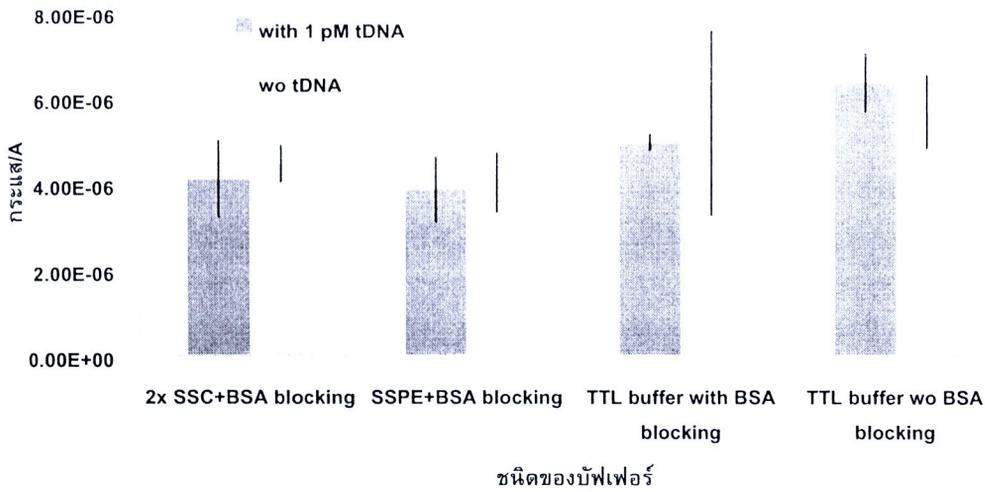
รูปที่ 3.8 ปริมาณอ็อนเงินที่วัดได้จากเทคนิค ASV ต่ออนุภาคลาเทค ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1}

3.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรง (direct DNA hybridization)

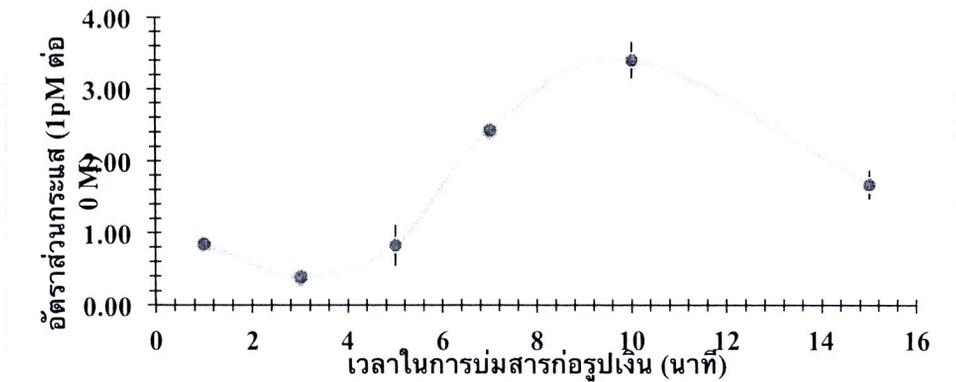
ได้ทำการศึกษาสภาพต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรง เช่น สภาพการตรวจวัดอ็อกซิเจนด้วยเทคนิค differential pulse anodic stripping voltammetry ชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเกิดไฮบริดเซชัน และระยะเวลาในการบ่มสารก่อรูปเงิน เป็นต้น ขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันสามารถทำได้โดยการตรึงดีเอ็นเอเป้าหมาย (tDNA) บนพื้นผิวขั้วทำงานแบบคาร์บอนพิมพ์สกรีนโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ 0.1 โวลท์ เป็นเวลา 5 นาที วิธีนี้จะสามารถตรึงดีเอ็นเอบนขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีนได้โดยอาศัยวิธี electrostatic ระหว่างประจุบวกของขั้วไฟฟ้าที่เกิดจากการป้อนศักย์ไฟฟ้า และประจุลบจากดีเอ็นเอ จากนั้นจึงทำการบ่มกับฉลากดีเอ็นเอบารโคดลาเทคเป็นเวลา 20 นาที และบ่มกับสารก่อรูปเงิน ซึ่งกระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดอ็อกซิเจนจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย

ชนิดของบัฟเฟอร์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการเกิดไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอ โดยทั่วไปได้มีการใช้บัฟเฟอร์ SSC และ SSPE ในการเกิดไฮบริดเซชันของดีเอ็นเอ แต่ทว่าในการตรวจวัดดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ให้ผลที่ไม่เป็นไปตามปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีอยู่ ดังนั้นจึงได้เลือกบัฟเฟอร์ TTL เข้ามาศึกษาเพิ่มเติม โดยจะได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ หลังจากทำการบ่มกับฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค (ที่ได้จากการใช้ NGL3) ที่ละลายในไฮบริดเซชันบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.9 โดยสภาวะควบคุมอื่นๆ คือ ทำการบ่มฉลาก 20 นาที และบ่มกับสารก่อรูปเงิน 15 นาที ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ TTL บัฟเฟอร์จะให้กระแสสัญญาณสูงกว่า แต่ทว่าการใช้ BSA ร่วมด้วยแสดงค่าสัญญาณที่ดีเอ็นเอเป้าหมาย 0 โมลาร์ สูงกว่าที่ 1 พิคโคโมลาร์ ทั้งนี้ เนื่องจาก BSA ที่ใช้มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.7 ดังนั้นในสภาวะที่พีเอชในสารละลายเท่ากับ 7 จะทำให้ BSA แสดงความเป็นประจุลบ ซึ่งทำให้อ็อกซิเจนที่มีประจุบวกเข้าไปจับได้จึงเกิดเป็นกระแสสัญญาณที่ไม่จำเพาะขึ้น ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ TTL บัฟเฟอร์ที่ไม่มี BSA ร่วมในการเกิดไฮบริดเซชัน

จากผลการทดลองรูปที่ 3.10 เป็นการตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบ่มกับสารก่อรูปเงินในสภาวะที่มี tDNA ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ เทียบกับ 0 โมลาร์ ผลแสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลาบ่ม 1 ถึง 5 นาทีไม่ให้ผลที่แตกต่างกัน จากนั้นเพิ่มขึ้นจนถึง 10 นาที และการตอบสนองลดลงเมื่อเวลา 15 นาที เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1 และ 0 พิคโคโมลาร์ ทั้งนี้อาจ เนื่องจากโลหะเงินที่ก่อรูปขึ้นบนฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคมีปริมาณมาก จนส่งผลทำให้ฉลากหลุดออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานได้ง่ายขึ้น ในขณะที่เวลา 10 นาทีจะให้ค่าสัดส่วนของกระแสสัญญาณสูงสุด ดังนั้นจึงได้เลือกบ่มสารก่อรูปเงิน 10 นาที



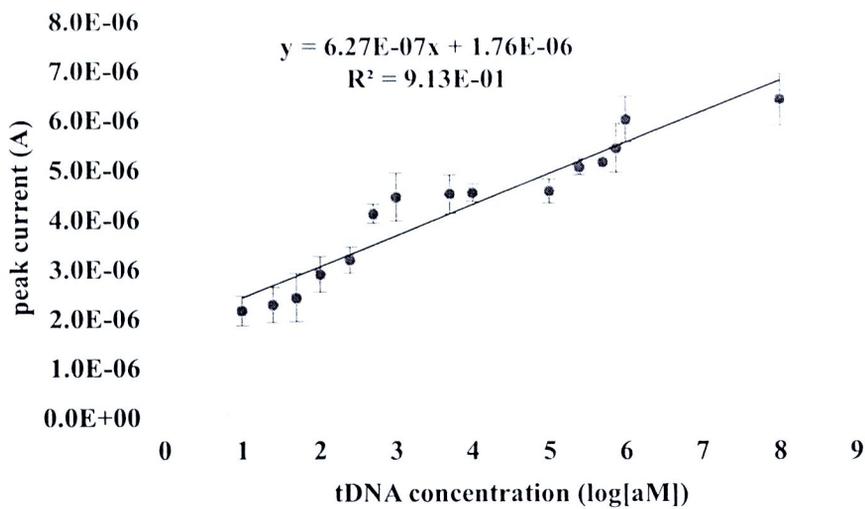
รูปที่ 3.9 ชนิดของบัฟเฟอร์สำหรับการเกิดไฮบริดเซชัน ภายใต้สภาวะความเข้มข้น วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 $mV s^{-1}$



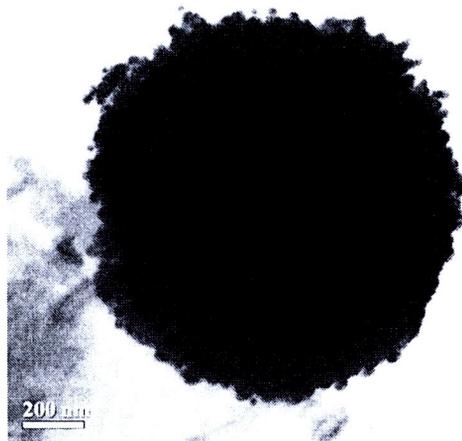
รูปที่ 3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนกระแสสัญญาณที่วัดได้ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิกโคโมลาร์และ 0 โมลาร์ และ เวลาที่ใช้ในการบ่มสารก่อรูปเงิน (นาที) ภายใต้สภาวะความเข้มข้น วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 $mV s^{-1}$

จากสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรงดังกล่าวข้างต้น สามารถนำมาใช้เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ รูปที่ 3.11 แสดงค่ากระแสสัญญาณที่ตรวจวัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ tDNA ที่เพิ่มขึ้น ช่วงความเข้มข้น 100 พิคโคโมลาร์ ถึง 10 แอดโตโมลาร์ เป็นช่วงพลียเชิงเส้นตรงที่มีค่าสมการเชิงเส้นเป็น $y = 6.27 \times 10^{-7} x + 1.76 \times 10^{-6}$ (y เป็นค่ากระแสสัญญาณมีหน่วยเป็นแอมแปร์ และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ tDNA ในหน่วย log ของความเข้มข้นในหน่วยแอดโตโมลาร์) และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.91 โดยมีค่าความสามารถในการวัดต่ำสุด (limit of detection) เท่ากับ 1.82×10^{-16} โมลาร์ (182 แอดโตโมลาร์) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการโดยใช้กระแสที่วัดได้จากการตรวจวัด noncomplementary DNA รวมกับค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน 3 เท่า ทั้งนี้ค่าความไวในการตรวจวัดสูงเนื่องจากสามารถบรรจุดีเอ็นเอปริมาณมากบนฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคได้ (ประมาณ 1010 ก๊อปปี้ดีเอ็นเอต่อตารางเซนติเมตร สำหรับดีเอ็นเอโพรบ และ 1012 ก๊อปปี้ต่อตารางเซนติเมตร สำหรับบาร์โคดดีเอ็นเอ) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจวัดจากวิธีนี้ดีกว่าจากผลงานตีพิมพ์ต่างๆ ก่อนหน้านี้ที่ได้ใช้ไบโอบาร์โคดแอสเสร่วมกับวิธีการตรวจวัดเทคนิคต่างๆ คือ แคปพิราลีดีเอ็นเออะนาไลซิส⁴² การตรวจวัดโดยใช้สแกนโนเมตรี⁵¹⁻⁵³ และเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า^{21, 32-33, 36-37}

รูปที่ 3.12 แสดงภาพ TEM ที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 50 แอดโตโมลาร์ จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้รับหลังจากบ่มสารก่อรูปเงินและล้างพร้อมใช้เพื่อการตรวจวัดด้วยเทคนิค ASV มาทำการแช่ในน้ำกลั่นและเข้าเครื่องเขย่าความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 30 วินาที จึงนำขั้วไฟฟ้าออกและนำสารตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย TEM จากรูปแสดงให้เห็นลักษณะฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคที่มีโลหะเงินเกาะอยู่ปริมาณมาก และส่งผลทำให้ขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเท่าตัว อีกทั้งยังสามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำถึง 50 แอดโตโมลาร์ ถึงแม้ว่าจากการคำนวณแล้วจะได้ค่า LOD เกือบ 200 แอดโตโมลาร์ก็ตาม

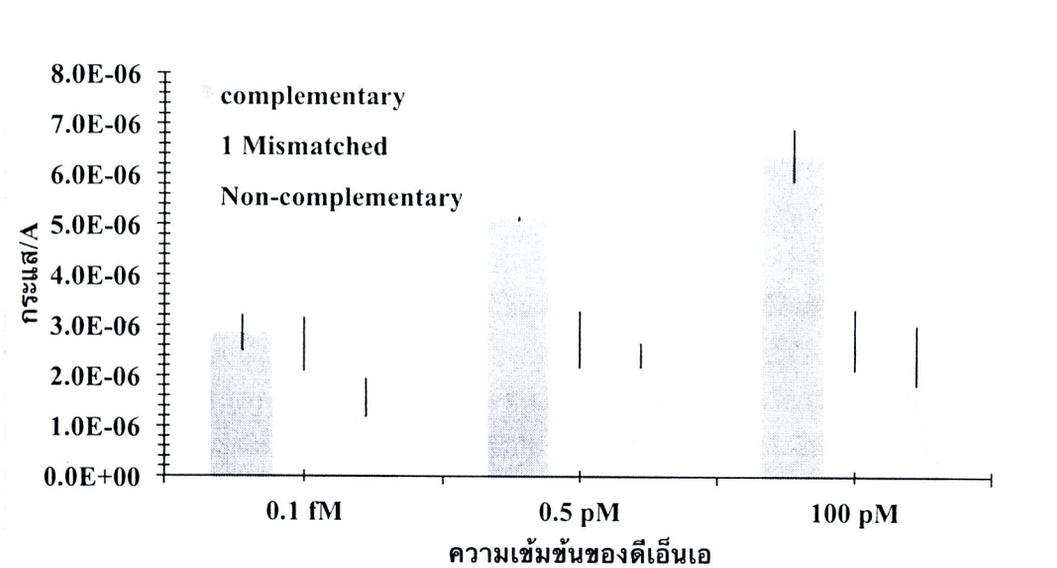


รูปที่ 3.11 กราฟเชิงเส้นมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (ล็อกของความเข้มข้นระดับแอดโตโมลาร์) และ กระแสสัญญาณที่วัดได้ด้วยเทคนิค ASV ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1}



รูปที่ 3.12 ภาพ TEM ของไบโอบาร์โคดลาเทอร์ร่วมกับสารก่อรูปเงินหลังจากทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 50 แอดโตโมลาร์

นอกจากนี้ความจำเพาะต่อการตรวจวัดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ได้ทำการศึกษาเช่นกัน โดยจะได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม(complementary DNA) ที่ไม่เป็นคู่สม(non-complementary DNA) และ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 ค่า(mismatched-DNA) ที่ 3 ค่าความเข้มข้นคือ 0.1 เฟมโตโมลาร์ 0.5 พิคโตโมลาร์ และ 100 พิคโตโมลาร์ จากผลการทดลอง(แสดงในรูปที่ 3.13) จะเห็นได้ว่าเมื่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมกันจะให้ค่ากระแสที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ ที่ไม่เป็นคู่สมหรือมีลำดับเบสผิดพลาดจะให้ค่ากระแสที่เกือบเท่ากัน หรือสูงขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสารก่อรูปเงินสามารถจับกับดีเอ็นเอทุกชนิดที่ถูกตรึงอยู่บนขั้วไฟฟ้าทำงานได้ จึงเกิดเป็นกระแสสัญญาณแบบไม่จำเพาะเจาะจงขึ้น ดังนั้นเพื่อลดค่ากระแสสัญญาณแบบไม่จำเพาะเจาะจงจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดซ์แบบ sandwich แต่จะได้เลือกใช้พีเอ็นเอโพรบแทนดีเอ็นเอโพรบ เนื่องจากการใช้ดีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงานจะทำให้เกิดสัญญาณพื้นฐานสูงเนื่องจากสารก่อรูปเงินสามารถจับกับดีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าได้โดยตรง เมื่อกระแสพื้นฐานสูงจะส่งผลให้ความไวในการตรวจวัดลดลงได้



รูปที่ 3.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายชนิดต่างๆ คือ ดีเอ็นเอคู่สม ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 เบส ที่ความเข้มข้น 0.1 เฟมโตโมลาร์ ถึง 100 พิคโตโมลาร์ ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s⁻¹

3.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดย sandwich (Sandwich DNA hybridization)

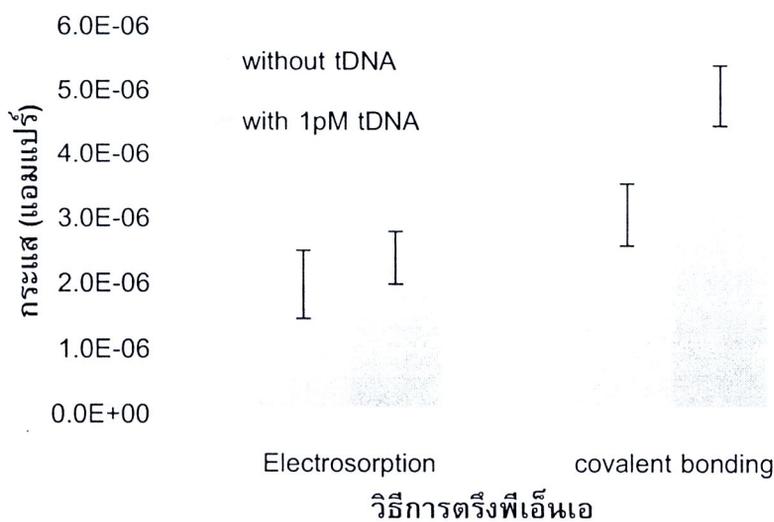
เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดโพรบ (หรือ พีเอ็นเอ โพรบ) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรบบนขั้วไฟฟ้าทำงานได้ ทั้งนี้เพราะพีเอ็นเอเป็นโมเลกุลสังเคราะห์ที่มีโครงสร้าง และมีสมบัติคล้ายดีเอ็นเอแต่ดีกว่าดีเอ็นเอคือสามารถจับกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงกว่า และเสถียรกว่าดีเอ็นเอธรรมชาติ เนื่องจากพีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นสายพอลิเพปไทด์ที่ไม่มีประจุตั้งนั้นเมื่อใช้ พีเอ็นเอเป็นโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงานจะสามารถลดการก่อรูปโลหะเงินแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ ซึ่งจะช่วยลดสัญญาณพื้นฐานได้ และทำให้ความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายสูงขึ้นได้ ดังนั้นในงานวิจัยส่วนนี้จึงได้เลือกใช้พีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันแบบ sandwich ร่วมกับการใช้ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคและการก่อรูปโลหะเงิน เพื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าแบบ ASV

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันจึงได้ทำการศึกษา (ก)วิธีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าทำงาน (ข)ความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบที่เหมาะสม (ค)เวลาในการเกิดไฮบริดเซชันระหว่างพีเอ็นเอโพรบ และดีเอ็นเอเป้าหมาย (ง)เวลาในการเกิดไฮบริดเซชันระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย และฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค (จ)อุณหภูมิสำหรับการบ่ม และ(ฉ)เวลาในการบ่มสารก่อรูปเงิน ซึ่งได้ใช้สภาวะควบคุมแบบเดียวกันในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ คือ เลือกใช้พีเอ็นเอโพรบที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เวลาในการบ่มพีเอ็นเอ/ดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือ ดีเอ็นเอเป้าหมาย/ฉลาก เท่ากับ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบ่มสารก่อรูปเงินที่ 10 นาที

3.4.1 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีน

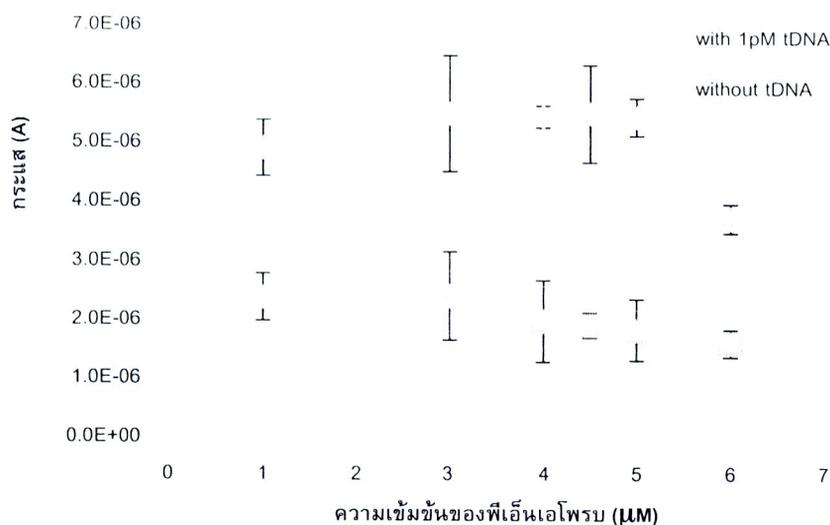
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีน 2 วิธีคือ (1)การตรึงโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าทางลบเพื่อให้หมู่เอมีนของพีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้า (เรียกว่าวิธี electrosorption) (2)การตรึงโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีผ่านพันธะโควาเลนต์(เรียกว่าวิธี covalent bonding) วิธีแรก electrosorption จะทำโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าเช่นเดียวกับวิธีการตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายในขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรง แต่สำหรับการตรึงพีเอ็นเอจะทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าทางลบ (เท่ากับ -0.5 โวลต์ เป็นเวลา 300 วินาที) เพื่อให้หมู่เอมีนที่ปลาย C ตรึงบนขั้วคาร์บอน ซึ่งหมู่เอมีนที่ปลาย C จะได้จากการติดไลซีน(lysine) ไว้ที่ปลาย C และได้ทำการดัดแปลงปลาย N ด้วยหมู่อะเซทิล เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาย N เข้ามาจับที่ขั้วไฟฟ้าได้ วิธี covalent bonding ทำโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีร่วมของสาร EDC และ NHS เพื่อให้เกิดการเชื่อมต่อหมู่เอมีนที่ปลาย C กับพื้นผิวของคาร์บอนอิเล็กโทรดได้ เมื่อทำการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าทำงานแล้วจึงทำการบ่มด้วยดีเอ็นเอเป้าหมาย ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค เพื่อทำให้เกิดไฮบริดเซชันแบบ sandwich ของ PNA/tDNA/BBL ขึ้น จากนั้นจึงทำการบ่มสารก่อรูปเงินเพื่อเพิ่มสัญญาณการตรวจวัดและทำการละลายเงินเพื่อตรวจวัดปริมาณอออนเงินที่สัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ด้วยเทคนิค ASV โดยจะได้ทำการเปรียบเทียบค่ากระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์

รูปที่ 3.14 แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรึงพีเอ็นเอบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีนแบบ covalent bonding จะให้ค่าความแตกต่างระหว่างกระแสที่วัดได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ความเข้มข้นต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าวิธี electro sorption ทำให้พีเอ็นเอตรึงบนขั้วคาร์บอนได้มากกว่าวิธี covalent bonding จึงทำให้ค่ากระแสพื้นฐานที่ได้จากวิธี electro sorption ต่ำกว่าวิธี covalent bonding นอกจากนี้ค่ากระแสที่วัดได้จากการวัดดีเอ็นเอจากวิธี electro sorption น้อยกว่าจากวิธี covalent bonding ซึ่งเป็นไปได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบมากเกินไปจะสามารถลดปริมาณการเกิดไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ถึงแม้ว่าค่ากระแสพื้นฐานที่ได้จากวิธี covalent bonding จะสูงกว่า electro sorption ก็ตาม แต่ทั้งนี้ความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบอาจจะไม่มากเพียงพอที่จะทำให้ปกคลุมทั่วพื้นผิวทั้งหมดของขั้วคาร์บอนพิมพ์สกรีน ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกวิธี covalent bonding สำหรับการตรึงพีเอ็นเอบนขั้วไฟฟ้าทำงาน และจะได้ศึกษาหาความเข้มข้นของพีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อไป



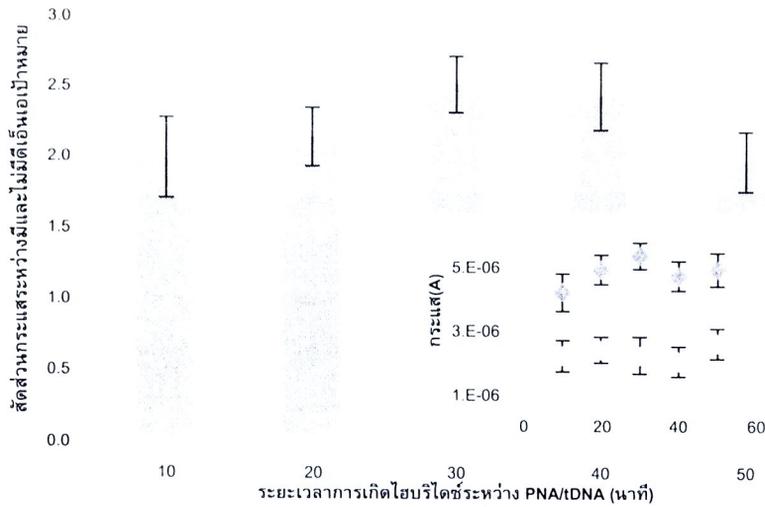
รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่วัดได้จากการตรึงพีเอ็นเอด้วยวิธี electro sorption และ covalent bonding ต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโคโมลาร์ เทียบกับ 0 โมลาร์

ในการศึกษาหาปริมาณพีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนโดยวิธี covalent bonding ได้ทำโดยการศึกษาหาผลของความเข้มข้นของพีเอ็นเอที่ใช้ในการตรึง และทำการเปรียบเทียบผลของกระแสที่วัดได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 และ 0 พิคโคโมลาร์ ผลแสดงในรูปที่ 3.15 แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอที่ใช้เพิ่มขึ้นค่ากระแสสัญญาณพื้นฐานที่ได้จากการบ่มสารก่อรูปเงินจะน้อยลงแสดงว่ามีปริมาณพีเอ็นเอที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่ากระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบเพิ่มขึ้นจาก 1 ถึง 5 ไมโครโมลาร์ และจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณพีเอ็นเอมีมากเกินไปจนทำให้เกิดการกีดกันการเกิดไฮบริดเซชัน PNA/DNA ได้ จึงทำให้กระแสสัญญาณวัดลดลงเมื่อความเข้มข้นพีเอ็นเอสูงกว่า 5 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นความเข้มข้นพีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันแบบ sandwich เท่ากับ 5 ไมโครโมลาร์

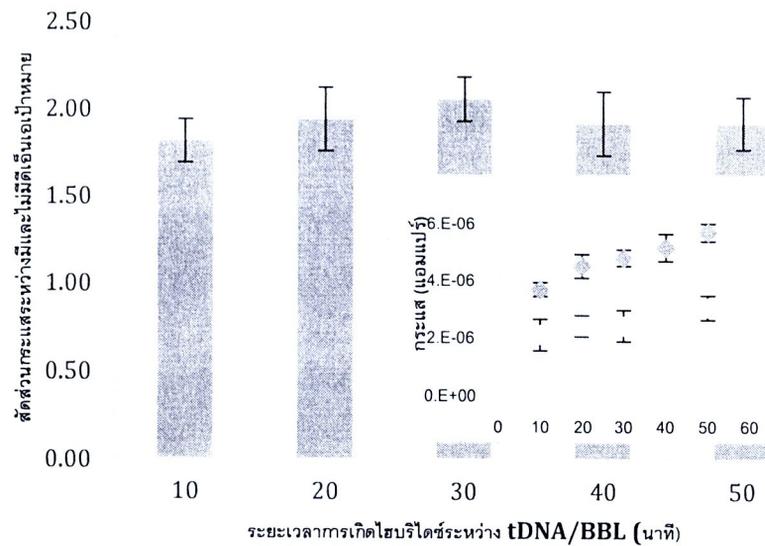


รูปที่ 3.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสที่ได้ต่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบ เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์

เวลาที่ใช้ในการเกิดไฮบริดเซชันจะมี 2 ช่วงคือ ช่วงที่พีเอ็นเอโพรบเกิดการไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย และดีเอ็นเอเป้าหมายไฮบริดซ์กับโพรบบนฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค ดังนั้นได้ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมของทั้งสองช่วง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.16 สำหรับการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง PNA/tDNA และรูปที่ 3.17 สำหรับการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง tDNA/BBL จากรูปที่ 3.16 จะเห็นได้ว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง PNA และดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 30 นาที ซึ่งได้ค่าสัดส่วนกระแสระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ความเข้มข้น และเมื่อพิจารณารูปแทรกในรูปที่ 3.16 จะเห็นได้ว่าค่ากระแสสัญญาณช่วง 10 ถึง 40 นาทีจะมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่เมื่อเวลามากกว่า 40 นาทีค่ากระแสสัญญาณจะเริ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่กระแสที่ได้รับจากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาในการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง PNA/tDNA เพิ่มขึ้นจาก 10 ถึง 30 นาที และเริ่มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทั้งนี้เป็นไปได้ว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไฮบริดซ์กับพีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น และส่งผลทำให้ฉลากไบโอบาร์โคดเข้าทำไฮบริดซ์ได้ยากขึ้นจึงส่งผลให้กระแสสัญญาณลดลง สำหรับผลการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง tDNA/BBL จากรูปที่ 3.17 แสดงให้เห็นว่าเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 30 นาทีเช่นกัน และเมื่อพิจารณารูปแทรกในรูปที่ 3.17 พบว่าเมื่อเวลาในการเกิดไฮบริดซ์กับฉลากเพิ่มขึ้นค่ากระแสสัญญาณพื้นฐานเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคอาจจะเข้าไปจับกับขั้วไฟฟ้าทำงานแบบไม่จำเพาะเจาะจงจึงทำให้กระแสสัญญาณพื้นฐานเพิ่มขึ้น ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมต่อการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง PNA/tDNA = 30 นาที และ tDNA/BBL = 30 นาที

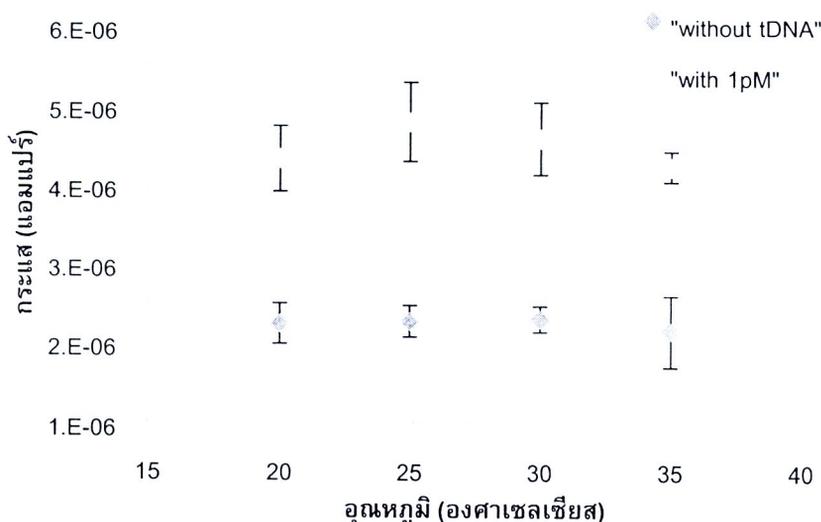


รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ไม่ได้เชื่อมเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริดของ PNA/tDNA ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที



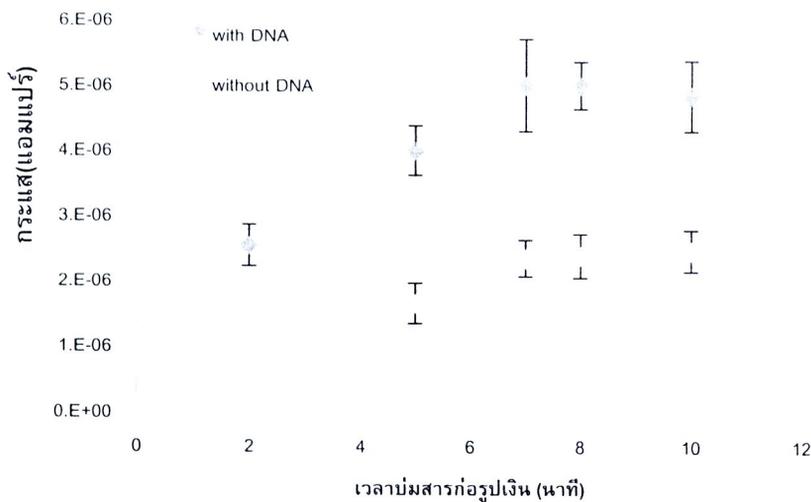
รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ไม่ได้เชื่อมเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริดของ tDNA/BBL ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที

อุณหภูมิในการเกิดไฮบริดเชนซ์จะมีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถจับกันได้ ดังนั้นในการทดลองได้ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการไฮบริดเชนซ์ระหว่าง PNA/tDNA และ tDNA/BBL ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.18 พบว่าค่ากระแสสัญญาณพื้นฐานที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ค่ากระแสสัญญาณจากการวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโคโมลาร์จะให้ค่ากระแสเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 20 เป็น 25 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ส่งผลทำให้ค่ากระแสสัญญาณลดลง ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าค่า melting temperature ของโพรบมีค่าต่ำจึงส่งผลทำให้โพรบยึดติดกับดีเอ็นเอได้ไม่แข็งแรงและยึดติดกันได้น้อยลง ดังนั้นอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสจึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม



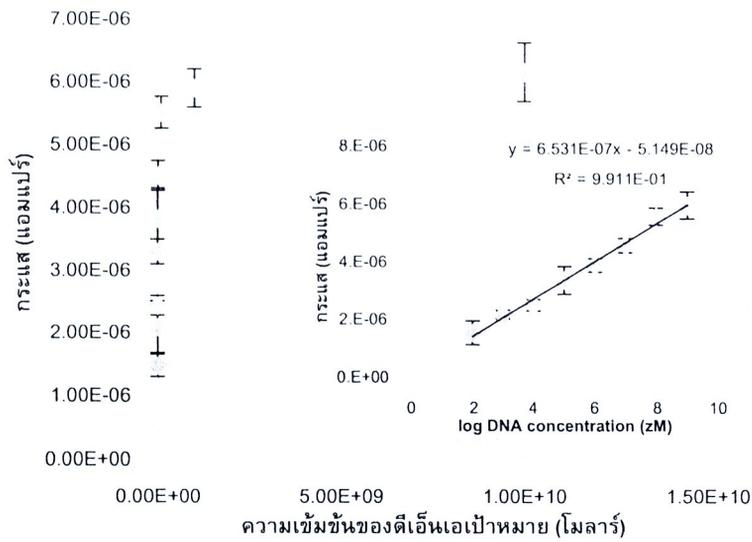
รูปที่ 3.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสสัญญาณที่วัดได้เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส

สภาวะควบคุมสุดท้ายที่ส่งผลต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยการใช้ร่วมกับสารก่อรูปเงิน คือเวลาในการบ่มสารก่อรูปเงิน เนื่องจากสารก่อรูปเงินสามารถเร่งปฏิกิริยาการก่อรูปเงินได้ด้วยตัวเองจึงส่งผลต่อปริมาณโลหะเงินที่เกิดขึ้นแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มสารก่อรูปเงินโดยการเปรียบเทียบการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 2 ความเข้มข้น จากรูปที่ 3.19 แสดงผลการทดลองที่ได้เมื่อเวลาที่ใช้ในการบ่มสารก่อรูปเงินเพิ่มขึ้น 2-7 นาที ค่ากระแสสัญญาณพื้นฐาน และกระแสสัญญาณวัดจริงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้เวลาในการบ่มนานกว่า 7 นาทีค่ากระแสสัญญาณเริ่มคงที่ เมื่อวิเคราะห์จากค่าสัดส่วนระหว่างกระแสที่ได้จากการวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ความเข้มข้นพบว่าเวลาในการบ่มสารก่อรูปเงิน 5 นาทีจะให้ค่าสัดส่วนมากที่สุด

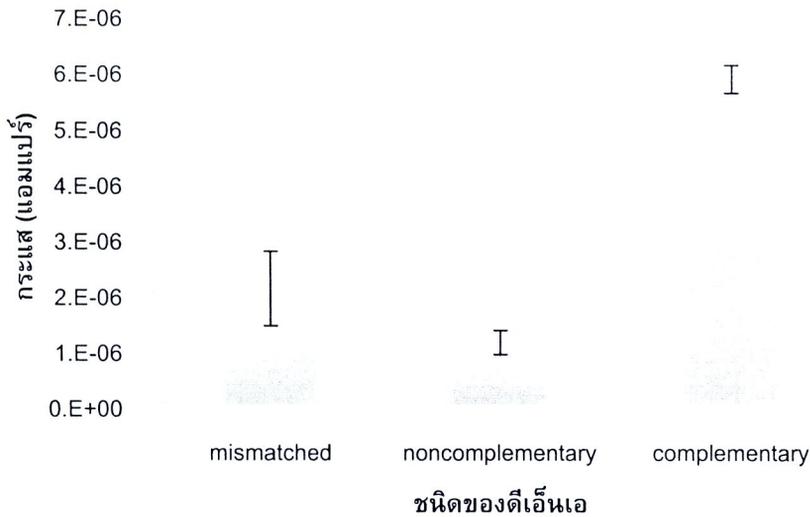


รูปที่ 3.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสสัญญาณที่วัดได้เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันแบบ Sandwich คือใช้พีเอ็นเอโพรบ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยทำการตรึงด้วยวิธี covalent bonding ใช้เวลาในการเกิด hybridization ระหว่าง PNA/tDNA = 30 นาที ระหว่าง tDNA/BBL = 30 นาที ทำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการบ่มด้วยสารก่อรูปเงินเป็นเวลา 5 นาที จึงทำการล้าง และ ละลายอ็อกซิเจนด้วยกรดจึงทำการวัดปริมาณอ็อกซิเจนด้วยเทคนิค ASV สภาวะที่เหมาะสมนี้จะได้ใช้เพื่อศึกษากราฟมาตรฐานเชิงเส้นโดยการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายช่วงความเข้มข้น 100 zM ถึง 100 pM แต่ช่วงกราฟเชิงเส้นตรงจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 100 zM ถึง 1 pM โดยมีค่าสมการเส้นตรงเป็น $y = 6.53e-7x - 5.15e-8$ (y คือค่ากระแสสัญญาณหน่วยแอมแปร์ที่วัดได้ด้วยเทคนิค ASV, x คือค่าลอจของค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วยแซตโตโมลาร์) จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมกับโพรบที่ใช้ทำให้ได้กระแสพื้นฐานที่แท้จริงเท่ากับ 1.09 ไมโครแอมแปร์ และมีความคลาดเคลื่อนเท่ากับ $2.18e-7$ ดังนั้นสามารถคำนวณหาความสามารถต่ำสุดที่วัดได้ (limit of detection; LOD) จาก 3 เท่าของค่าความคลาดเคลื่อนรวมกับค่ากระแสพื้นฐาน จากนั้นนำเข้าสู่สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานเชิงเส้นเพื่อคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.56 แอดโตโมลาร์ หรือเทียบได้กับดีเอ็นเอ 3 โมเลกุลในสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมาย 10 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ใช้เทคนิคไบโอบาร์โคดเป็นฉลากสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น scanometric electrochemiluminescence capillary electrophoresis และ electrochemical (ดังแสดงในตารางที่ 2) พบว่างานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอได้ด้วยควมไว และ LOD ดีที่สุด ดังนั้นฐานเทคโนโลยีการวัดโดยใช้ไบโอบาร์โคดลาเทรลร่วมกับการก่อรูปเงินจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ และโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ รวมถึงการตรวจวัดในตัวอย่างจริงเพราะว่าวิธีนี้ให้ความไวในการวัดสูง



รูปที่ 3.20 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกระแสสัญญาณ (รูปแทรก; กราฟเชิงเส้นมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ ถึง 100 แซตโตโมลาร์)



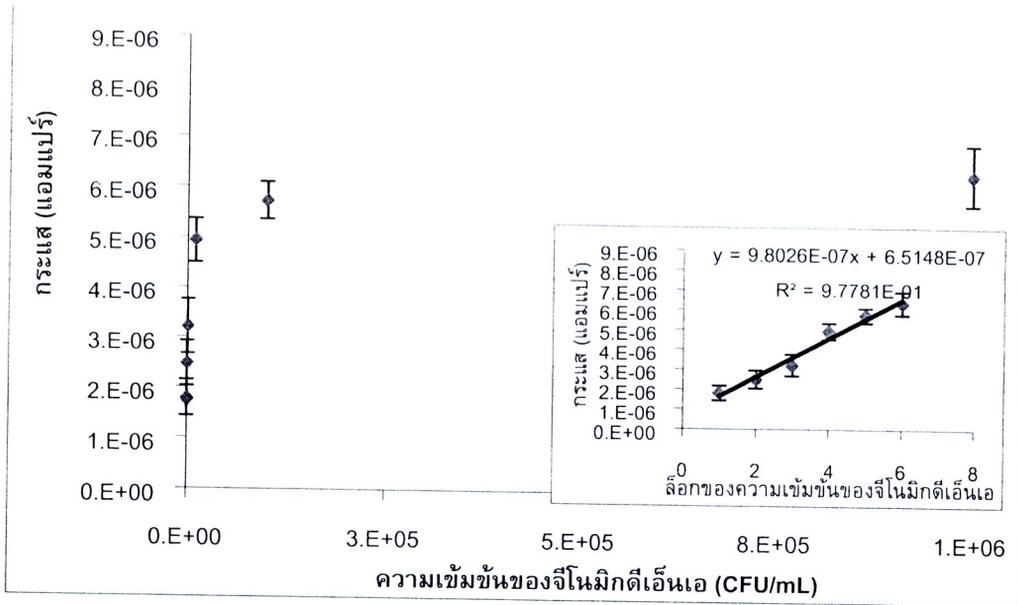
รูปที่ 3.21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายชนิดต่างๆ คือ ดีเอ็นเอคู่สม ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 เบส ที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1}

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริโดเซชันด้วยวิธีต่างๆ โดยใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคด

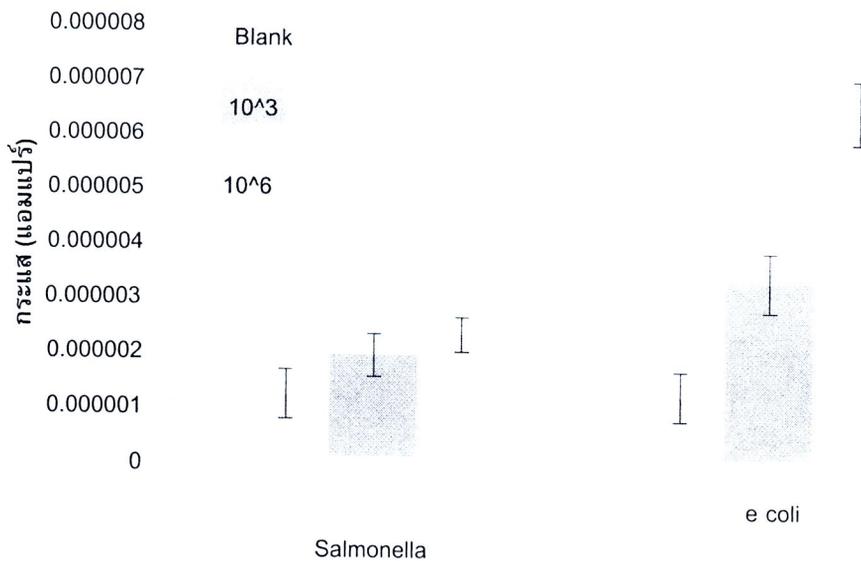
เทคนิคการวัด	การเพิ่มสัญญาณ	LOD	อ้างอิง
Scanometric	หลังจากเกิดไฮบริโดเซชันจึงทำการ dehybridized barcode DNA ให้ไปตรึงบนแผ่นแก้ว จากนั้นนำโพรบดีเอ็นเอติดอนุภาคทองคำนาโนที่เป็นคู่สมกับบาร์โคดดีเอ็นเอที่อยู่แผ่นแก้ว และป้อนด้วยสารก่อรูปเงินทำให้เกิดสีเทา	500 zM	Nam และคณะ ³⁵ (2004)
	หลังจากเกิดไฮบริโดเซชันจึงทำการ dehybridized barcode DNA ให้ไปตรึงบนแผ่นแก้ว จากนั้นนำโพรบดีเอ็นเอติดอนุภาคทองคำนาโนที่เป็นคู่สมกับบาร์โคดดีเอ็นเอที่อยู่แผ่นแก้ว และป้อนด้วยสารก่อรูปเงินทำให้เกิดสีเทา	500 fM	Stoeva และคณะ ⁵⁴ (2006)
	หลังจากเกิดไฮบริโดเซชันจึงทำการ dehybridized barcode DNA ให้ไปตรึงบนแผ่นแก้วในตำแหน่งต่างๆกันตามตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นนำโพรบดีเอ็นเอติดอนุภาคทองคำนาโนที่เป็นคู่สมกับบาร์โคดดีเอ็นเอที่อยู่แผ่นแก้ว และป้อนด้วยสารก่อรูปเงินทำให้เกิดสีเทา	2.5 fM	Hill และคณะ ⁵³ (2007)
Fluorescence	วัดการเรืองแสงของสาร Fluorescein ติดเป็นฉลากกับ ไบโอบาร์โคด	0.215 fmol	Zhang และคณะ ⁴⁰ (2009)
	วัดการเรืองแสงของสาร Cy3 ติดเป็นฉลาก กับไบโอบาร์โคด	1 pM	Nie และคณะ ⁵¹ (2009)
Capillary electrophoresis		5 pM	He และคณะ ⁴² (2008)
Electrochemiluminescence	วัดการเรืองแสงของสาร Tris-(2,2'-bipyridyl) ruthenium ติดเป็นฉลาก กับไบโอบาร์โคด	1 fmol in a volume of 25 mL	Zhu และคณะ ⁵⁵ (2008)
Electrochemical	$[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ เข้าจับกับ reporter DNA ด้วยแรง electrostatic	28 aM	Hu และคณะ ³² (2008)
	CdS nanoparticles เป็นฉลากสำหรับไบโอบาร์โคดดีเอ็นเอ จากนั้นจึงทำการละลายโลหะ CdS แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค ASV	4.2 fM	Ding และคณะ ²¹ (2009)
	การตรวจวัดเบส A และ G โดยตรงด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าหลังจากใช้ ไบโอบาร์โคดที่มีลำดับเบส A และ G ซ้ำๆ	1.71 pM (T1) and 1.55 pM (T2)	Zhang และคณะ ³³ (2009)
	ใช้อนุภาค CdS และ PbS ติดดีเอ็นเอบาร์โคด จากนั้นจึงทำการละลายโลหะด้วยกรด และวัด ด้วยเทคนิค SWASV	0.5 ng/ml 50 pg/ml	Zhang และคณะ ⁵⁶ (2010)
	สารก่อรูปเงินบนดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทค ติดดีเอ็นเอบาร์โคด จากนั้นจึงทำการละลายโลหะ ด้วยกรด และวัดด้วยเทคนิค ASV	182 aM (direct) 0.56 aM (sandwich)	งานวิจัยนี้

3.5 การตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

ในการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้เลือกใช้วิธีสกัดแบบง่าย คือการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิจุดเดือดซึ่งวิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยความร้อนนี้เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้เวลาานาน รวมถึงไม่มีสารเคมีอันตรายเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยในการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้เลือกใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียอีโคไลไนท์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการวิจัย จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้วิธีตรวจวัดแบบ Sandwich ไฮบริโดเซชันและใช้วิธีการผสมดีเอ็นเอเป้าหมายร่วมกับฉลากไบโอบาร์โคด เพื่อให้เกิดการไฮบริโดเซชันร่วมกัน ผลการทดลองในรูปที่ 3.22 แสดงกราฟมาตรฐานการตรวจวัดเชื้อที่ได้ ซึ่งกราฟเชิงเส้นตรงที่ได้จะอยู่ในช่วงความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^1 ถึง 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจวัดกระแสพื้นฐานโดยใช้เชื้อซัลโมเนลล่าความเข้มข้น 10^6 CFU/mL และนำมาคำนวณค่า LOD สำหรับการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อน พบว่ามีค่าเท่ากับ 382 CFU/mL หรือ เท่ากับ 38 CFU ในตัวอย่างเชื้อ 10^1 ไมโครลิตร พบว่าฐานเทคโนโลยีการวัดนี้สามารถตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้ต่ำกว่างานของ Hill และคณะ⁵³ที่ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์บลิ๊อกระหว่างการแยกสาย dsDNA เพื่อป้องกันคู่ดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกสายและสามารถตรวจวัดได้ความเข้มข้นต่ำถึงระดับ 2.5 เฟมโตโมลาร์ (7.5×10^4 ก้อนปี) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษากระแสสัญญาณพื้นฐานจากการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้เชื้อซัลโมเนลล่าที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 CFU/mL เปรียบเทียบกับการใช้อีโคไลไนท์ และบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อดังแสดงในรูปที่ 3.23 พบว่ากระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดเชื้ออีโคไลไนท์สูงกว่ากระแสพื้นฐานที่ได้จากการตรวจวัดเชื้อซัลโมเนลล่า และบัฟเฟอร์ ถึงแม้ว่าเมื่อความเข้มข้นของซัลโมเนลล่าเพิ่มขึ้นค่ากระแสสัญญาณพื้นฐานจะสูงขึ้นเล็กน้อยก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีปริมาณชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอขนาดเล็กติดบนขั้วไฟฟ้าแบบไม่จำเพาะเจาะจงจึงทำให้เกิดสัญญาณจากโลหะเงินที่เข้าไปจับได้



รูปที่ 3.22 กราฟเชิงเส้นมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของอีโคไล (CFU/mL) และกระแสสัญญาณที่วัดได้ด้วยเทคนิค ASV ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1}



รูปที่ 3.23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับอีโคไลที่สกัดได้จากเชื้ออีโคไล และซัลโมเนลล่าที่ความเข้มข้น 0, 10^3 และ 10^6 CFU/mL ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1}