ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250398

รายงานการวิจัย

ดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดบน
อนุภาคลาเทคร่วมกับโลหะเงิน

Electrochemical DNA biosensor based on silver loading on bio-barcode DNA-latex as probe labeling

คณะผู้วิจัย

1. ดร.พรรษมณฑ์ ริจิรวนิช
2. ดร.มิตรทราน โชมาซันดรัม
3. รศ.ดร.วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย

หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
49 ซ.เทียนทะเล 25, ท่าข้าม, บางขุนเทียน, กทม 10150

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250398
b00256533

รายงานการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดบน
อนุภาคลาเทคร่วมกับโลหะเงิน

Electrochemical DNA biosensor based on silver loading on bio-barcode DNA-latex as probe labeling

คณะผู้วิจัย

1. ดร.พรรษมณฑ์ ริจิรวนิช
2. ดร.มิตรทราน โซมาซันดรัม
3. รศ.ดร.วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย

หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
49 ซ.เทียนทะเล 25, ท่าข้าม, บางขุนเทียน, กทม 10150

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2555 ที่ทำให้งานวิจัยนี้ลุล่วง และทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ ๆ เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเซนเซอร์เทคโนโลยีสำหรับสถานที่ทำงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ "คุณกฤษณพร ชื่นรังสิกุล" สำหรับความช่วยเหลือในการเตรียมขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน และคุณบุญเหลือจาก "ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี" สำหรับการถ่ายภาพ TEM

คณะผู้จัดทำ

ตุลาคม 2555

250398

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสอนวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นความไวสูงอาศัยฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค ร่วมกับสารก่อรูปเงิน ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคสร้างโดยการตรึงดีเอ็นเอบนอนุภาค พอลีสไตรีน-โค-อะคริลิคแอซิดเคลือบทับด้วยสารพอลิเอริลเอมีน และ กลูตาอัลดีไฮด์ ดีเอ็นเอที่ ใช้ตรึงมี 2 ชนิดคือ ดีเอ็นเอโพรบที่สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และดีเอ็นเอบาร์โคดซึ่งใช้เป็นฉลากเท่านั้น โดยปริมาณดีเอ็นเอที่ตรึงบนอนุภาคลาเทคทั้งสามขนาด คือ 330, 399 และ 468 นาโนเมตร ได้ถึง 10^4 โมลเลกุลต่ออนุภาคซึ่งมากกว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ตรึงบนอนุภาคทองนาโนได้ถึง 100 เท่า เนื่องจากอนุภาคลาเทคมีขนาดใหญ่กว่า ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทคสามารถใช้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรงบนขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน หรือการตรวจวัดแบบ sandwich ซึ่งใช้พีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีน นอกจากนี้ยังอาศัยการจับกันระหว่างอิออนเงินประจุบวก และประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของสายดีเอ็นเอ รวมถึงการรีดิวซ์อิออนเงินให้เป็นกลุ่มก้อนโลหะเงินปริมาณมากบนอนุภาคบาร์โคดลาเทค ซึ่งปริมาณโลหะเงินนี้สามารถละลายด้วยกรด และวัดด้วยเทคนิคแอนโนดิคสตริปปิ้งโวลแทมเมทรี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฐานเทคโนลยีนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 30 เบสจากเชื้ออีโคไลน์ได้ต่ำถึง 182 แอตโตโมลาร์(สำหรับการตรวจวัดโดยตรง) และ 0.56 แอตโตโมลาร์(สำหรับการตรวจวัดแบบ sandwich โดยใช้พีเอ็นเอโพรบ) ซึ่งดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอคู่สมได้แตกต่างอย่างชัดเจนจากดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมและมีลำดับเบสผิดพลาด นอกจากนี้สามารถประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้ออีโคไลน์ได้ต่ำถึง 382 CFU/mL

คำสำคัญ ไบโอบาร์โคดลาเทค การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า การเกิดไฮบริไดเซชั่นโดยตรง และแบบแซนวิช

250398

Abstract

A highly sensitive DNA hybridization detection method based on silver enhancement of DNA biobarcode latex particle has been developed. The DNA coated sequentially with biobarcode latex particles were composed of a polystyrene-co-acrylic acid core, polyallyamine, glutaraldehyde and DNA. Two types of DNA were used, one complementary to the target oligonucleotide and the other not, acting as a label only. The DNA coverage for 330, 399 and 468 -nm-diameter spheres was approximately 10^4 molecules per latex sphere, which is an increase of more than 2 orders of magnitude in previous for bio-barcode coverages of AuNPs. Due to the fact that the latex particles used here are larger size. The DNA biobarcode latex particles were directly hybridized with oligonucleotide targets immobilized on screen printed electrodes (SPEs), or sandwich hybridized with oligonucleotide targets using probe PNA-modified SPEs. Ag^+ ions were then electrostatically associated with the negative backbone of the biobarcode DNA, followed by autocatalytic reduction to Ag metal. The Ag content of the latex labels was then determined by anodic stripping voltammetry after oxidation the Ag metal to Ag ions. A 30 mer sequence common to *E. coli* was measured with limits of detection of 182 aM (for direct hybridization) and 0.56 aM (for sandwich hybridization using the PNA capture probes). The DNA biosensor using sandwich hybridization showed significantly different responses between complementary DNA sequences, sequence with a single mismatched and non-complementary sequences. The sandwich hybridization method allowed the detection of heat extracted cultured genomic *E. coli* down to 382 CFU mL^{-1} without requiring amplification by the polymerase chain reaction.

Keywords; Biobarcode-latex, Electrochemical detection, Direct- and Sandwich-hybridization

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	vii
รายการสัญลักษณ์	x
ประมวลศัพท์และคำย่อ	x
รายละเอียดข้อมูลงานวิจัย	
1. บทนำ	1
1.1 สืบค้นวรรณกรรม	3
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย	6
1.4 วารสารปริทัศน์และทฤษฎี	6
1.4.1 ดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอ	6
1.4.2 ทฤษฎีการวัดทางเคมีไฟฟ้า	7
1.4.3 Anodic stripping voltammetry	10
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย	11
2.1 เครื่องมือ	11
2.2 สารเคมีและวัสดุ	11
2.3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
2.3.1 การเตรียมอิเลคโทรด	14

2.3.2 การเตรียมอนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิค 14

2.3.3 การเตรียมฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทค 15

2.3.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยตรง 16

2.3.5 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นแบบ Sandwich 17

2.3.6 การก่อรูปเงิน และการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า 18

2.3.7 การตรวจวัดจีโนมิคดีเอ็นเอ 19

3. ผลการทดลอง และวิจารณ์ 20

3.1 การสร้างไบโอบาร์โคดลาเทค 20

3.2 การศึกษาการตรวจวัดอิออนเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า 24

3.2.1 การศึกษาการตรวจวัดอิออนเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า 24

3.2.2 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงาน 25

3.2.3 การศึกษาหาอัตรการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด 26

3.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยตรง(direct DNA hybridization) 29

3.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นแบบ sandwich

3.5 การตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอ 42

4. สรุปผลการวิจัย 44

เอกสารอ้างอิง 45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	รายละเอียดชื่อและลำดับเบสของดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้	13
3.1	เปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นด้วยวิธีต่าง ๆ โดยใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคด	41

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอ	7
1.2	แสดงเซลล์เคมีไฟฟ้าแบบอิเล็กโตรไลติกอย่างง่าย	8
2.1	แผนภาพแสดงการต่อชุดเครื่องมือสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิค	15
2.2	แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยตรงบนขั้วอิเลคโทรดแบบพิมพ์สกรีน	17
2.3	แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นแบบ Sandwich บนขั้วอิเลคโทรดแบบพิมพ์สกรีน โดยใช้พีเอ็นเอโพรบ	18
3.1	แผนภาพการ์ตูนการสร้างฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค	20
3.2	ภาพ TEM ของ GL1 – GL3 และ NGL1 – NGL3 โดยสเกลภาพเท่ากับ 100 นาโนเมตร	22
3.3	กราฟแสดงปริมาณจำนวนดีเอ็นเอบาร์โคด และดีเอ็นเอโพรบที่สามารถดึงอยู่บนอนุภาคลาเทคแบบต่างๆ	23
3.4	กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการสะสมโลหะ เงิน (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}	24

3.5 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และเวลาที่ใช้ในการสะสมโลหะเงิน (t_{dep}) ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ไนเตรด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลาย อยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ E_{dep}= -0.4 โวลท์ scan rate = 50 mV s^{-1} 25

3.6 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้า(scan rate) ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ไนเตรด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลาย อยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ E_{dep}= -0.4 โวลท์ t_{dep}= 300 วินาที 26

3.7 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรด ในสารละลาย 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} 27

3.8 ปริมาณอิออนเงินที่วัดได้จากเทคนิค ASV ต่ออุนภาคลาเทค 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} 28

3.9 ชนิดของบัฟเฟอร์สำหรับการเกิดไฮบริไดเซชั่น 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} 30

3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนกระแสสัญญาณที่วัดได้ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโคโมลาร์และ 0 โมลาร์ และ เวลาที่ใช้ในการบ่มสารก่อรูปเงิน (นาที) 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} 30

3.11 กราฟเชิงเส้นมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (ล็อกของความเข้มข้นระดับแอตโตโมลาร์) และ กระแสสัญญาณที่วัดได้ด้วยเทคนิค 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} 32

3.12 ภาพ TEM ของไบโอบาร์โคดลาเทคร่วมกับสารก่อรูปเงินหลังจากทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 50 แอตโตโมลาร์ 32

3.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายชนิดต่างๆ คือ ดีเอ็นเอคู่สม ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 เบส ที่ความเข้มข้น 0.1 เฟมโตโมลาร์ ถึง 100 พิคโคโมลาร์ 33

3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่ได้รับการการตรึงพีเอ็นเอด้วยวิธี electrosorption และ covalent bonding ต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโคโมลาร์ เทียบกับ 0 โมลาร์ 35

3.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสที่ได้ต่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบ เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ 36

3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ได้รับระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริไดเซชั่นของ PNA/tDNA ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที 37

3.1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ได้รับระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริไดเซชั่นของ tDNA/BBL ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที 37

3.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสสัญญาณที่วัดได้เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 - 35 องศาเซลเซียส 38

3.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสสัญญาณที่วัดได้เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน 39

3.20 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกระแสสัญญาณ (รูปแทรก; กราฟเชิงเส้นมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ ถึง 100 แซตโตโมลาร์) 40

3.21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายชนิดต่างๆ คือ ดีเอ็นเอคู่สม ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 เบส ที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ 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} 40

3.22 กราฟเชิงเส้นมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้ออีโคไลน์ (CFU/mL) และกระแสสัญญาณที่วัดได้ด้วยเทคนิค ASV ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตด บัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ E_{dep}= -0.4 โวลท์ t_{dep}= 300 วินาที และ scan rate = 50 mV s^{-1} 43

3.23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้ออีโคไลน์ 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} 43

รายการสัญลักษณ์

i	=	กระแสไฟฟ้า หน่วยเป็นแอมแปร์ (A)
t_{dep}	=	เวลาที่ใช้ในการสะสมโลหะอิออน หน่วยเป็นวินาที(s)
E_{dep}	=	ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำ deposition หน่วยเป็นโวลท์(V)

ประมวลศัพท์และคำย่อ

Ab	=	แอนติบอดี้
Ag	=	แอนติเจน
Ag^+	=	อิออนโลหะเงิน
aM	=	แอตโตโมลาร์
APS	=	Ammonium persulfate
ASV	=	Anodic stripping voltammetry
ATP	=	Adenosine-5'-triphosphate
Au	=	ทอง
AuNP, AuNPs	=	อนุภาคทองนาโน
BSA	=	Bovine serum albumin
CdS	=	Cadmium sulfide
CE	=	Counter electrode
CTAB	=	Cetyl trimethylammonium bromide
CO	=	คาร์บอนมอนอกไซด์

DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	=	Double strand DNA
ssDNA	=	Single strand DNA
DPASV	=	Differential pulse anodic stripping voltammetry
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
GC	=	Gas chromatography
GPES	=	General purpose electrochemical system
HPLC	=	High pressure liquid chromatography
LBL	=	Layer by layer
LOD	=	Limit of detection
MW	=	มวลโมเลกุล
mL	=	มิลลิลิตร
μL	=	ไมโครลิตร
PAA	=	Poly(allyamine)
PEG	=	Polyethylene glycol
PCR	=	Polymer chain reaction
pM	=	พิคโคโมลาร์
PSA	=	Poly styrene-co-acrylic acid, อนุภาคลาเทคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิค
PSS	=	Poly(sodium 4-styrene) sulfonate

RE	=	Reference electrode, ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SPE		Screen printed electrode
TEM	=	Transmission electron microscope
WE	=	Working electrode, ขั้วไฟฟ้าทำงาน
zM	=	แซตโตโมลาร์