

# รายงานการวิจัย

ดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดบน  
อนุภาคลาเทคร่วมกับโลหะเงิน

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

## คณะผู้วิจัย

1. ดร.พรชมณท์ ริจิรวณิช
2. ดร.มิตรทราน โขมาชนันดรัม
3. รศ.ดร.วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย

หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาศาสตร์ชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ  
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

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันความไวสูงอาศัยฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค ร่วมกับสารก่อรูปเงิน ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคสร้างโดยการตรึงดีเอ็นเอบนอนุภาค พอลิสไตรีน-โค-อะคริลิกแอซิดเคลือบด้วยสารพอลิเอริลเอมีน และ กลูตาอัลดีไฮด์ ดีเอ็นเอที่ใช้ตรึงมี 2 ชนิดคือ ดีเอ็นเอโพรบที่สามารถไฮบริดกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และดีเอ็นเอบาร์โคดซึ่งใช้เป็นฉลากเท่านั้น โดยปริมาณดีเอ็นเอที่ตรึงบนอนุภาคลาเทคทั้งสามขนาด คือ 330, 399 และ 468 นาโนเมตร ได้ถึง  $10^4$  โมเลกุลต่ออนุภาคซึ่งมากกว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ตรึงบนอนุภาคทองนาโนได้ถึง 100 เท่า เนื่องจากอนุภาคลาเทคมีขนาดใหญ่กว่า ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทคสามารถใช้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรงบนขั้วไฟฟ้าแบบฟิล์มสกรีน หรือการตรวจวัดแบบ sandwich ซึ่งใช้พีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบฟิล์มสกรีน นอกจากนี้ยังอาศัยการจับกันระหว่างอ็อนเงินประจุบวก และประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของสายดีเอ็นเอ รวมถึงการรีดิวซ์อ็อนเงินให้เป็นกลุ่มก้อนโลหะเงินปริมาณมากบนอนุภาคบาร์โคดลาเทค ซึ่งปริมาณโลหะเงินนี้สามารถละลายด้วยกรด และวัดด้วยเทคนิคแอนโนดิกสตริบปีง์โวลแทมเมตรี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฐานเทคโนโลยีนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 30 เบสจากเชื้ออีโคไลน์ได้ต่ำถึง 182 แอตโตโมลาร์(สำหรับการตรวจวัดโดยตรง) และ 0.56 แอตโตโมลาร์(สำหรับการตรวจวัดแบบ sandwich โดยใช้พีเอ็นเอโพรบ) ซึ่งดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอคู่สมได้แตกต่างอย่างชัดเจนจากดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมและมีลำดับเบสผิดพลาด นอกจากนี้สามารถประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้ออีโคไลน์ได้ต่ำถึง 382 CFU/mL

**คำสำคัญ** ไบโอบาร์โคดลาเทค การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า การเกิดไฮบริดเซชันโดยตรง และแบบแซนวิช

## 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, polyallylamine, 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.  $\text{Ag}^+$  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  $382 \text{ CFU mL}^{-1}$  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 การเตรียมอิเล็กโทรด	14

2.3.2	การเตรียมอนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก	14
2.3.3	การเตรียมฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทค	15
2.3.4	การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันโดยตรง	16
2.3.5	การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันแบบ Sandwich	17
2.3.6	การก่อรูปเงิน และการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า	18
2.3.7	การตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	19
3.	ผลการทดลอง และวิจารณ์	20
3.1	การสร้างไปโอบาร์โคดลาเทค	20
3.2	การศึกษาการตรวจวัดอออนเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า	24
3.2.1	การศึกษาการตรวจวัดอออนเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า	24
3.2.2	การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงาน	25
3.2.3	การศึกษาหาอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด	26
3.3	การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันโดยตรง(direct DNA hybridization)	29
3.4	การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันแบบ sandwich	
3.5	การตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	42
4.	สรุปผลการวิจัย	44
	เอกสารอ้างอิง	45

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	รายละเอียดชื่อและลำดับเบสของดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้	13
3.1	เปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันด้วยวิธีต่าง ๆ โดยใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคด	41

## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอ	7
1.2	แสดงเซลล์เคมีไฟฟ้าแบบอิเล็กโทรไลติกอย่างง่าย	8
2.1	แผนภาพแสดงการต่อชุดเครื่องมือสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก	15
2.2	แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรงบนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน	17
2.3	แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันแบบ Sandwich บนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน โดยใช้พีเอ็นเอโพรบ	18
3.1	แผนภาพการตั้งศูนย์การฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค	20
3.2	ภาพ TEM ของ GL1 – GL3 และ NGL1 – NGL3 โดยสเกลภาพเท่ากับ 100 นาโนเมตร	22
3.3	กราฟแสดงปริมาณจำนวนดีเอ็นเอบาร์โคด และดีเอ็นเอโพรบที่สามารถตรึงอยู่บนอนุภาคลาเทคแบบต่างๆ	23
3.4	กระแสดความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการสะสมโลหะเงิน ( $E_{dep}$ ) ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ไนเตรด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $t_{dep} = 200$ วินาที scan rate = $50 \text{ mV s}^{-1}$	24

3.5	กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และเวลาที่ใช้ในการสะสมโลหะเงิน ( $t_{dep}$ ) ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ คือวัดซีลเวอร์ในเตรต ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลาย อยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ scan rate = 50 mV s <sup>-1</sup>	25
3.6	กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และอัตราการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้า(scan rate) ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ คือวัดซีลเวอร์ในเตรต 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 และความเข้มข้นของซีลเวอร์ในเตรต ในสารละลาย ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s <sup>-1</sup>	27
3.8	ปริมาณอ็อกซิเจนที่วัดได้จากเทคนิค ASV ต่ออนุภาคลาเทค ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ 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 <sup>-1</sup>	28
3.9	ชนิดของบัฟเฟอร์สำหรับการเกิดไฮบริไดเซชัน ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s <sup>-1</sup>	30
3.10	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนกระแสสัญญาณที่วัดได้ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิกโคโมลาร์และ 0 โมลาร์ และ เวลาที่ใช้ในการบ่มสารก่อรูปเงิน (นาที่) ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s <sup>-1</sup>	30
3.11	กราฟเชิงเส้นมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (ลือกของความเข้มข้นระดับแอตโตโมลาร์) และ กระแสสัญญาณที่วัดได้ด้วยเทคนิค ASV ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ $E_{dep} = -0.4$ โวลท์ $t_{dep} = 300$ วินาที และ scan rate = 50 mV s <sup>-1</sup>	32
3.12	ภาพ TEM ของไบโอบาร์โคดลาเทคพร้อมกับสารก่อรูปเงินหลังจากทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 50 แอตโตโมลาร์	32
3.13	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายชนิดต่างๆ คือ ดีเอ็นเอคู่สม ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 เบส ที่ความเข้มข้น 0.1 เฟมโตโมลาร์ ถึง 100 พิกโคโมลาร์	33

3.14	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่ได้รับการตรึงพีเอ็นเอด้วยวิธี electro sorption และ covalent bonding ต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโคโมลาร์ เทียบกับ 0 โมลาร์	35
3.15	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสที่วัดต่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบ เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์	36
3.16	ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ได้รับระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริดเซชันของ PNA/tDNA ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที	37
3.17	ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ได้รับระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริดเซชันของ 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 พิคโคโมลาร์ 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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	43
3.23	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้ออีโคไลน์ และซัลโมเนลล่าที่ความเข้มข้น 0, 10 <sup>3</sup> และ 10 <sup>6</sup> 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 <sup>-1</sup>	43

### รายการสัญลักษณ์

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

### ประมวลศัพท์และคำย่อ

Ab	=	แอนติบอดี
Ag	=	แอนติเจน
$Ag^+$	=	อ็อนโลหะเงิน
aM	=	แอดโตโมลาร์
APS	=	Ammonium persulfate
ASV	=	Anodic stripping voltammetry
ATP	=	Adenosine-5'-triphosphate
Au	=	ทอง
AuNP, AuNPs	=	อนุภาคทองคำนาโน
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
$\mu$ L	=	ไมโครลิตร
PAA	=	Poly(allyamine)
PEG	=	Polyethylene glycol
PCR	=	Polymer chain reaction
pM	=	พิคโตโมลาร์
PSA	=	Poly styrene-co-acrylic acid, อนุภาคลาเทคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก
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	=	แซดโตโมลาร์

## บทที่ 1 บทนำ

หัวใจสำคัญของไบโอเซนเซอร์คือในส่วนของสารทางชีวภาพที่ใช้ซึ่งจำเป็นต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับสารหรือโมเลกุลที่ต้องการตรวจวัด ในกรณีเดียวกันของดีเอ็นเอเซนเซอร์นั้นใช้ความจำเพาะเจาะจงของลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์นั้นหัตถ์ดีเอ็นเอทั่ว ๆ ไปจะใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้น ๆ (ssDNA) ที่มีลำดับเบสประมาณแปดถึงเจ็ดสิบเบส โดยดีเอ็นเอนี้จะถูกออกแบบมาให้เข้าจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ ssDNA เป้าหมายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ นอกจากนี้จะสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรงแล้วยังมีการใช้โปรตีนหรือโมเลกุลขนาดเล็กเข้าช่วยในการเกิดปฏิกิริยา โดยจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี หรือกายภาพที่บริเวณผิวหน้าของหัตถ์ 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 เป้าหมายที่สองเกี่ยวข้องกับในส่วนการตรวจวัดนั้นต้องตระหนักถึงความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการคัดเลือกสูงเพื่อทำการตรวจวัดตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์

ดังที่ได้กล่าวในตอนต้นว่าการทรานสดิวซ์สัญญาณวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าสามารถพัฒนาให้ได้เครื่องมือที่มีราคาถูก สร้างได้ด้วยกระบวนการที่ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังใช้งานง่ายสามารถพกพาและอำนวยความสะดวกต่อการนำไปใช้งานภาคสนาม แม้แต่การใช้เป็นเครื่องมือวัดส่วนตัว เช่นเครื่องวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน ในการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้ามีรูปแบบการวัดต่าง ๆ คือทำการตรึงโพรบ ssDNA บนพื้นผิวทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งลำดับเบสที่เลือกใช้ต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างเป็นคู่สมกัน (complementary) เมื่อเกิดการไฮบริดเซชันสัญญาณจาก transducer ที่วัดได้แปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้า ดังนั้นการวัดนี้จะอาศัยความต่างระหว่าง dsDNA และ ssDNA เมื่อทำการวัดค่าการนำไฟฟ้า นอกจากนี้ที่ผ่านมามีงานวิจัยมากมายที่ใช้ฉลากช่วยในการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชัน เช่นสีอินทรีนีย์ (เช่น methylene blue) โลหะผสม (เช่น rutheniumbipyridine) เอนไซม์ (เช่น ALP) และอนุภาคขนาดนาโน (เช่น อนุภาคทองขนาดนาโน) ในการตรวจวัด DNA hybridization โดยทั่วไปแล้วมี 4 วิธีคือ

- 1) การวัดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกระแสออกซิเดชันหรือรีดักชันของเบสดีเอ็นเอเช่น guanine และ adenine<sup>1-2</sup>

- 2) การวัดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกระแสออกซิเดชันหรือรีดักชันของ indicator ที่ใช้ซึ่งจะจับกับ dsDNA และ ssDNA<sup>3-5</sup>
- 3) การวัดสัญญาณเคมีไฟฟ้าของสับสเตรทหลังจากเกิดไฮบริดเซชันกับเอนไซม์ที่ติดอยู่กับดีเอ็นเอโพรบ<sup>6-7</sup>
- 4) การวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคโลหะนาโนโพรบหลังจากเกิดไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอเป้าหมาย<sup>8-13</sup>

ในการวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าในวิธีที่ 4 นั้นฉลากที่ใช้โดยส่วนใหญ่จะเป็นวัสดุนาโน (เช่น AuNPs, AgNPs, CdSe เป็นต้น) โดยมีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ความไวสูงที่อาศัยวัสดุนาโนเพื่อขยายสัญญาณวัดทางเคมีไฟฟ้าขึ้น จากการใช้อุณหภูมิของขนาดนาโนเป็นตัวชี้สัญญาณวัดโดยติดฉลากอนุภาคดังกล่าวกับดีเอ็นเอโพรบหรือแอนติบอดี เมื่อเกิดการไฮบริดระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายหรือการจับอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงโดยใช้เทคนิคทางแสง ในขณะที่เดียวกันสามารถใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดได้เช่นกัน วิธีการคือหลังจากเกิดไฮบริดเซชันจะใช้กรดละลายอนุภาคของที่เป็นตัวติดฉลากออกมาในสารละลายในรูปของ Au<sup>3+</sup> จำนวนมาก (1 อนุภาคของนาโนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 20 นาโนเมตร จะมีปริมาณทอง  $2.3 \times 10^5$  อะตอม) เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า -0.3 โวลต์ แก้อิเล็กโทรดทำงานเทียบอิเล็กโทรดอ้างอิง จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Au<sup>3+</sup> ได้เป็น Au สะสมที่ผิวหน้าอิเล็กโทรด (เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า electrodeposition) จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้าในทิศทางบวกแก่อิเล็กโทรด ในขั้นตอนนี้ทองที่สะสมจะหลุดจากผิวหน้าอิเล็กโทรด และเกิดกระแสออกซิเดชันซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอหรือแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ เทคนิคที่ใช้ในขั้นตอนที่สองเรียกว่า "anodic stripping voltammetry" ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าผลการวิเคราะห์ที่มีปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ถึงระดับ  $10^{-12}$  โมลาร์<sup>14</sup>

โดยในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค (DNA bio-barcode-latex; BBL) มาใช้งานสำหรับเซนเซอร์วัดดีเอ็นเอความไวสูง ขั้นตอนการตรวจวัดดังแสดงในรูปที่ 1 โดยตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายบนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน และทำการไฮบริดดีเอ็นเอบนหัววัดกับดีเอ็นเอโพรบที่มี BBL เป็นฉลาก หลังจากนั้นจะทำการเติมสารละลายผสมซิลเวอร์เพื่อทำให้เกิดการสะสมซิลเวอร์ปริมาณมาก ๆ บนดีเอ็นเอบาร์โคดที่อยู่บนอนุภาคลาเทค หายที่สุดในส่วนของการวัดจะทำการละลายโลหะเงินที่อยู่บนฉลาก BBL ให้อยู่ในรูปของ Ag<sup>+</sup> ด้วยกรด และทำการวัดปริมาณไอออนโลหะนี้ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า anodic stripping voltammetry (ASV) จะเกิดเป็นสัญญาณกระแสที่สัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งการใช้นฉลาก BBL จะช่วยเพิ่มสัญญาณกระแสต่อการวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมากบนอนุภาคลาเทคนี้ทำให้มีปริมาณโลหะเงินที่เข้ามาเกาะเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเทียบกับการใช้อุณหภูมิของขนาดนาโนร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โคด ซึ่งจะมีปริมาณดีเอ็นเอบาร์โคดติดอยู่ในหลักร้อยเส้นเป็นฉลาก และเมื่อมีการเกิดคู่สมระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอโพรบน่าจะช่วยเพิ่มความไวของเซนเซอร์วัดดีเอ็นเอที่ปริมาณต่ำได้

## 1.1 สืบค้นวรรณกรรม

การพัฒนาดีเอ็นเอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางพันธุศาสตร์เป็นที่สนใจมากขึ้น ดังนั้น สัญญาณการวัดดีเอ็นเอจึงจำเป็นต้องมี sensitivity สูงโดยวัดผ่านตัวเพิ่มสัญญาณการวัด(amplifiers) โดยเทคนิคต่างๆ เช่นการตรวจวัดทางแสง<sup>15</sup> (optical) chemiluminescence<sup>16</sup> SPR(surface plasmon resonance)<sup>17</sup> QCM(quartz crystal microbalance)<sup>18</sup> และทางเคมีไฟฟ้า(electrochemistry)<sup>19-33</sup> ได้ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง จากกระบวนการตรวจวัดดีเอ็นเอเหล่านี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเพิ่มสัญญาณการวัด(amplification strategies) เพื่อให้ความไวในการตรวจวัดสูง ระบบการเพิ่มสัญญาณการวัดนี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ผ่านกระบวนการ PCR (polymerase chain reaction) หรือใช้ระบบการเพิ่มสัญญาณผ่าน fluorogenic substrate-active enzymes liposome ดัดแปลง และวัสดุขนาดนาโนเมตร(nanoparticles) เป็นต้น โดยการพัฒนาเทคนิค และระบบต่างๆ เหล่านี้มีเป้าหมายเดียวกันคือสามารถเอาชนะระบบพีซีอาร์ที่มีค่าใช้จ่ายสูง และต้องมีผู้เชี่ยวชาญ นอกจากนี้ยังคาดว่าจะจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวินิจฉัยแบบเทคโนโลยีฐาน จากเทคนิคต่างๆ ที่ได้กล่าวในตอนต้นวิธีการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการตรวจวัดสารทางชีวภาพเนื่องจากวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายต่ำขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และมีความไวสูง

Mirkin และคณะ เป็นกลุ่มวิจัยแรกที่คิดค้นเทคนิคใหม่ที่เรียกว่าเทคนิคในการวัดด้วยไบโอบาร์โคด (bio-barcode assay; BBA) ซึ่งสามารถเพิ่มสัญญาณการวัดได้อย่างมากคือสามารถวัดได้ระดับต่ำถึง  $10^{-18}$  โมลาร์ สำหรับการตรวจวัดโปรตีน<sup>34</sup> และ  $10^{-21}$  โมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย<sup>35</sup> ซึ่งหลักการของเทคนิค BBA นี้จะประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลัก ๆ คือ

(1) ส่วนตรวจวัดดีเอ็นเอบาร์โคด; ในส่วนนี้จะประกอบไปด้วย อนุภาคของขนาดนาโนเมตรที่ถูกออกแบบให้ติดกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีหรือดีเอ็นเอโพรบ1 (DNA reporter probe) ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โคดที่มีลำดับเบสซีเคอร์สที่มีเอกลักษณ์เฉพาะ

(2) การแยกดีเอ็นเอหรือโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการตรวจวัด; ในส่วนนี้เป็นการใช้อนุภาคแม่เหล็กขนาดเล็กไมครอน (magnetic microparticles) เคลือบด้วย ไมโนโคลนอลแอนติบอดี หรือดีเอ็นเอโพรบ2 (DNA capture probe)

เมื่อทำการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายอนุภาคของขนาดนาโนและอนุภาคแม่เหล็กจะจับกันแบบ sandwich ผ่านการจับกันระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี หรือ DNA-DNA hybridization หลังจากนั้นชุด sandwich นี้จะถูกแยกออกจากสารละลายด้วยแม่เหล็กต่อมาจะทำการ dehybridization ของดีเอ็นเอบาร์โคดที่อยู่บนอนุภาคของขนาดนาโน โดยดีเอ็นเอบาร์โคดที่ถูกปล่อยออกมาจะสัมพันธ์กับปริมาณโมเลกุลเป้าหมายที่ตรวจวัด โดยระบบการวัดนี้มีข้อดีคือความไวในการตรวจวัดสูงมากมีความสามารถในการคัดเลือกสูง สามารถประยุกต์ใช้ตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายหลายๆ ชนิดพร้อมกัน (multiplex targets) และทำให้ระบบวัดมีศักยภาพสูงขึ้นเพราะใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยๆ ได้

จากจุดเริ่มต้นของการใช้ BBA ในงานด้านไบโอแอสเสตดังกล่าวจึงมีการประยุกต์ใช้หลักการนี้ในการพัฒนาเทคนิควัดความไวสูงมากขึ้น อาทิการขยายสัญญาณด้วยโลหะเงิน(silver) หลักการคือหลังจากที่ปล่อยดีเอ็นเอบาร์โคดออกมาแล้วจะทำให้เกิดการไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบ1ดีเอ็นเอบาร์โคดและโพรบ 2 ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคของขนาดนาโนเมตรบนสโลด์กระຈก หลังจากนั้นจะเติมสารละลายที่เป็นสารผสมระหว่างออรอนเงินและไฮโดรควิโนน ( $Ag^+ + hydroquinone$ ) จะเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ที่รอบอนุภาคของขนาดนาโนเกิดเป็นโลหะเงินล้อมรอบอนุภาค ซึ่งสามารถนำไปตรวจวัดปริมาณจากระดับความเข้มสีเทา

(grey scale) โดย การสำเนาภาพด้วยสแกนเนอร์และอ่านด้วยโปรแกรม histogram averages ใน Adobe Photoshop วิธีการดังกล่าว โดยวิธีการเช่นนี้ทำให้ระบบการวัดเป็นแบบ “multiplexing system” ได้ และด้วยหลักการเดียวกันนี้สามารถวิเคราะห์แอนติเจน (Ag) โดยมีแอนติบอดี (Ab1) ตรึงอยู่บนอนุภาคแม่เหล็ก ส่วนของบาร์โคดจะมีแอนติบอดีอีกชนิดหนึ่ง (Ab2) ตรึงอยู่ ทั้ง Ab1 และ Ab2 สามารถจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจนได้<sup>34</sup> และให้ผลในแง่ของการขยายสัญญาณผ่านบาร์โคดเช่นเดียวกับการศึกษาโดยดีเอ็นเอ ที่กล่าวมานี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิเคราะห์โดยอาศัยคุณสมบัติทางแสงเป็นสัญญาณวัดโดยมีวัสดุนาโนเป็นตัวช่วยขยายสัญญาณให้ได้ความไวในการวัดสูง

แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนยุ่งยาก และซับซ้อน ดังนั้นจึงได้มีงานวิจัยที่มีขั้นตอนที่ง่ายกว่า และยังคงอาศัยหลักการของดีเอ็นเอบาร์โคดนี้เข้ามาประยุกต์เช่นมีการติดอนุภาค PbS<sup>36</sup> และ CdS<sup>21, 37</sup> เข้าไปที่ดีเอ็นเอบาร์โคด หลังจากเกิดไฮบริดเซชันแล้วจะทำการละลายโลหะด้วยกรดและทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า anodic stripping voltammetry ต่อไปซึ่งหลักการนี้แม้จะทำการตรวจวัดดีเอ็นเอได้ที่ LOD ประมาณ 4-5 เฟมโตโมลาร์ นอกจากนี้มีการประยุกต์ให้สามารถทำการตรวจวัดสารชีวภาพสองชนิดพร้อมกันได้โดยมีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โคด 2 แบบคือเป็นดีเอ็นเอบาร์โคดที่มีเบสเป็น A ทั้งหมด (polyA DNA) และ ที่มีเบสเป็น G ทั้งหมด (polyG DNA)<sup>33</sup> ซึ่งบาร์โคดแต่ละแบบสามารถตรวจวัดสารชีวภาพที่ต่างกัน หลังจากทำการคัดเลือกแล้วจะทำการละลายปล่อยดีเอ็นเอบาร์โคดด้วย DTT และ กรด เพื่อให้เบส G และ A ละลายอยู่ในสารละลายหลังจากนั้นจะทำการตรวจวัดเบส G และ A ได้ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าซึ่งสามารถตรวจวัดเบส G และ A ที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.97 และ 1.3 โวลต์ตามลำดับ แม้ว่าการประยุกต์นี้จะสามารถตรวจวัดได้ที่ระดับพิโคโมลาร์ และข้อดีของเทคนิคนี้คือสามารถทำการตรวจวัดสารทางชีวภาพพร้อมกัน 2 ชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ได้เมื่อเทียบกับเทคนิคของ Mirkin ตั้งต้น แต่ด้วยเทคนิคของ Hu และคณะ<sup>32</sup> ที่อาศัยการสะสมของ [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> ที่สามารถจับกับประจุลบของ หมู่ฟอสเฟตที่ดีเอ็นเอบาร์โคด ร่วมกับการใช้ nanoporous gold electrode และทำการตรวจวัดสัญญาณของ [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งสามารถวัดดีเอ็นเอได้ต่ำถึงระดับ 28 แอดโตโมลาร์

## 1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

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

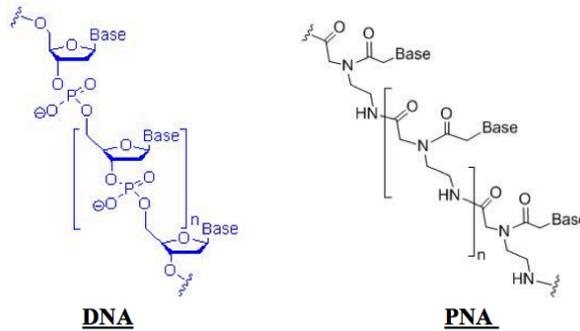
ในการวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัด จุดมุ่งหมายที่เป็นประเด็นหลักคือเซนเซอร์วัดต้องมีความจำเพาะ (specificity) หรือความสามารถคัดเลือกเฉพาะ (selectivity) และต้องมีความไว (sensitivity) ในการใช้งานวัด นอกนั้นเป็นความสำคัญในประเด็นของการนำไปใช้งานเช่น ความเสถียร (stability) ความถูกต้องแม่นยำ ความเร็วในการตอบสนอง และการยอมรับของผู้ใช้งาน เป็นต้น 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) ซึ่งมีความสามารถด้านการคัดเลือกเฉพาะโดยไม่จำเป็นต้องโมดิฟายด์หัวอิเล็กโทรดในบางกรณี เช่นการวัดแบบโวลแทมเมตรี (voltammetry) ที่มีลักษณะเฉพาะของสัญญาณฟลักเกิดในตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าที่เฉพาะเช่นกัน รวมถึงความสามารถในการพัฒนาระบบวัดทั้งแบบตั้งโต๊ะและแบบใช้งานภาคสนาม (portable) ได้ในราคาไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องมือวัดขั้นสูงอื่นๆ เช่น HPLC หรือ GC ในกรณีที่ต้องการโมดิฟายด์หัววัดเพื่อสร้างความจำเพาะและความไวของเซนเซอร์ก็สามารถทำได้ง่ายและผลิตเป็นจำนวนมากได้ (mass production)

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

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



สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอตามธรรมชาติด้วยกันเอง ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของ ดีเอ็นเอประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์ที่ไม่มีประจุ ทำให้การเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอและดีเอ็นเอ ปราศจากแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตดังที่พบในโมเลกุลเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอด้วยกันเอง นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอยังมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอสอีกด้วยจึงทำให้ ดีเอ็นเอมีความเสถียรในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ด้วยสมบัติที่น่าสนใจเหล่านี้จึงทำให้มีการศึกษา และพัฒนา เกี่ยวกับดีเอ็นเออย่างต่อเนื่องเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่นด้านการเกษตร ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และ ด้านการแพทย์

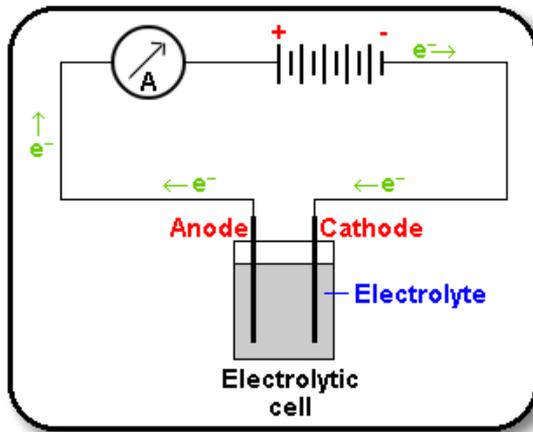


รูปที่ 1.1 โครงสร้างของดีเอ็นเอ และ พีเอ็นเอ

#### 1.4.2 ทฤษฎีการวัดทางเคมีไฟฟ้า

สรุปหลักการพื้นฐานทางเคมีไฟฟ้าวิเคราะห์(electroanalytical chemistry) เป็นหลักการทางเคมีไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งทางด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองทางไฟฟ้าของสารสองชนิดที่ทำปฏิกิริยากันแบบไม่รุนแรง และเกิดกระบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอนอย่างง่ายขึ้นซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของปฏิกิริยาเคมี เทคนิคนี้มีข้อดีกว่าวิธีวิเคราะห์ธรรมดา คือสามารถใช้วิธีทางไฟฟ้าควบคุมขอบข่าย และทิศทางของการเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ ข้อดีของการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าทั่วไปคือมีความไวสูง และความจำเพาะสูงเช่นกัน

โดยทั่วไปเคมีไฟฟ้าสามารถแยกออกเป็นสองประเภทด้วยกัน คือปฏิกิริยาเคมีสามารถก่อให้เกิดปริมาณทางไฟฟ้าได้เรียกว่าเซลล์กัลวานิก(galvanic cell) และอีกประเภทคือปฏิกิริยาทางเคมีเกิดเมื่อมีการกระตุ้นด้วยพลังงานทางไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานภายนอกเรียกว่าเซลล์อิเล็กโทรไลติก (electrolytic cell)



รูปที่ 1.2 แสดงเซลล์เคมีไฟฟ้าแบบอิเล็กโทรไลต์อย่างง่าย

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

โดย Electrolytic cell (รูปที่ 1.2) ต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกมากระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี และเมื่อปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นเกิดการให้หรือรับอิเล็กตรอน ซึ่งตัวทำปฏิกิริยาอาจเป็นไอออนหรือโมเลกุลที่เกิดขึ้นในระบบการวัดผ่านขั้วไฟฟ้าด้วยสมบัติดังนี้

- ปฏิกิริยารีดอกซ์(redox reaction)

คือปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชัน ดังสมการ (1)



โดย O คือสารออกซิไดซ์ที่เกิดปฏิกิริยารีดักชัน และ R เป็นสารรีดิวซ์ที่เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชัน

- ปฏิกิริยา heterogeneous คือปฏิกิริยาเกิดขึ้นระหว่างผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากับสารละลายด้วยกระบวนการถ่ายเทมวล อิเล็กตรอนดังสมการที่ (2-4)



- กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวหรือกระแสไฟฟ้าที่ให้เพื่อเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีการส่งผ่านสู่เซลล์เคมีไฟฟ้า
- ปริมาณกระแสไฟฟ้าจะถูกควบคุมด้วยกระบวนการของการถ่ายเทมวล ซึ่งมีด้วยกัน 3 ลักษณะ คือการเคลื่อนที่(migration) การแพร่(diffusion) และ การพา(convection) รวมถึงจลศาสตร์ของปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน

### **Potentiostat**

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กระบวนการทำปฏิกิริยาทางเคมีหรืออิเล็กโทรเคมีด้วย ซึ่งจะใช้หลักการเคลื่อนที่ของตัวอิเล็กตรอน และเป็นเครื่องมือวัดที่สามารถจะรับสัญญาณที่อยู่ในรูปคลื่นได้ผ่านตัว Working Electrode สัมพันธ์กับ Reference Electrode โดยที่จะวัดผลของกระแสที่ตัวเซลล์ของ Working 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 เพราะตัวอิเล็กโทรดนี้จะมีความต่างศักย์อ้างอิงที่ค่อนข้างคงที่ และมีเสถียรภาพสูง ซึ่งจะใช้เทียบกับความต่างศักย์ของ Working Electrode จะทำให้คำนวณค่าออกมาได้อย่างแม่นยำ เพราะช่วงการเปลี่ยนของศักย์จะมีขนาดเล็กมากๆ ประมาณ 1 mV ซึ่งตรงจุดนี้มีความสำคัญต่อความแม่นยำในการวัดของหลักการทางเคมีไฟฟ้า สมบัติของ RE จะมีความสำคัญมากในเรื่องของความต่างศักย์อ้างอิง โดยที่ตัว potentiostat จะถูกออกแบบมาให้สามารถวัดกระแสที่ผ่าน RE ที่มีค่าต่ำ เพราะว่ากระแสของสัญญาณจะทำให้อินพุตมีค่าความต้านทานสูงมาก ดังนั้นจะต้องมั่นใจว่าเงื่อนไขของศักย์ไฟฟ้าต้องคงที่

**Working Electrode (WE)** จะเป็นส่วนที่เกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน การเลือกชนิดของ WE มีความสำคัญมาก เพราะชนิดของวัสดุที่ใช้จะให้ผลการวัดสารแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ความเหมาะสมของชนิด WE ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสิ่งที่จะต้องเลือกเป็นกรณีเฉพาะไป โดยมีเหตุผลในการเลือกที่แตกต่างกันไป

**Counter Electrode (CE)** ทำหน้าที่ถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่มาจากภายนอกให้กลับเข้าสู่สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte solution) โดยที่แคโทดอิเล็กโทรดต้องมีสมบัติดังนี้คือ มีค่าการนำไฟฟ้าที่ดี มีความเป็นรูพรุนสูงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา และจะต้องเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดีด้วย วัสดุที่นิยมใช้ทำเป็นแคโทดอิเล็กโทรดคือ โลหะแพลทินัม (Pt) แต่ในหลายกรณีจะพบว่าโลหะชนิดนี้ไม่เหมาะสมมาใช้ทำ counter electrode เช่นในกรณีที่พื้นที่ผิวของ working electrode มีค่าสูง ตามหลักทางเคมีไฟฟ้าพื้นที่ผิวของ counter electrode จะต้องมีความมากกว่า อาจจะเป็นต้องใช้โลหะชนิดอื่นทดแทนเช่น แสตนเลส เพื่อลดต้นทุน

เทคนิควิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้านั้นมีหลายวิธี เช่น โปเทนชิโอเมทรี (potentiometry) โวลแทมเมทรี (voltammetry) และคูลอมเมทรี (coulometry) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีค่าสัญญาณไฟฟ้า และค่าศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนหรือวัดจะแตกต่างกัน โดยแต่ละวิธีที่กล่าวมาจะสามารถแยกย่อยเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอีกมาก โดยในงานวิจัยนี้จะได้ใช้เทคนิค anodic stripping voltammetry ซึ่งเป็นวิธีทางโวลแทมเมทรีวิธีหนึ่งเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของไอออนได้อย่างจำเพาะเจาะจง

### 1.4.3 Anodic stripping voltammetry

เทคนิคนี้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือ (1) การสะสมอออนของโลหะบนผิวหน้าอิเล็กโทรดผ่านกระบวนการ electroplate และ(2) ขั้นตอนการ strip คือการออกซิไดซ์โลหะที่สะสมอยู่ออกจากผิวหน้าหัววัด ซึ่งกระแสที่ได้จะเป็นกระแสที่วัดในระหว่างขั้นตอนที่ 2 โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่สนใจจะแสดงออกในรูปของพีคระหว่างค่ากระแสที่วัดได้และศักย์ไฟฟ้าที่จำเพาะต่ออออนของโลหะนั้น ๆ ซึ่งเทคนิคที่ใช้สำหรับขั้นตอนการทำ stripping สามารถใช้โวลแทมโมแกรมหลายวิธีเช่น 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) ในสารละลายที่มีอิเล็กโทรไลต์ที่ช่วยทำให้สภาพการนำไฟฟ้าในสารละลายมีเสถียรภาพ ซึ่งในทางเคมีไฟฟ้าขั้วไฟฟ้าทำงานจะเป็นขั้วสำหรับศึกษาปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ส่วนขั้วไฟฟ้าอ้างอิงจะเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการควบคุมศักย์ไฟฟ้าในระบบเซลล์วัดให้คงที่ และขั้วไฟฟ้าช่วยจะทำหน้าที่เพิ่มเสถียรภาพในการควบคุมศักย์ไฟฟ้า และสามารถแบ่งขั้นตอนการวัดเป็น 4 ขั้นตอนคือ โดยขั้นที่ (1 และ 2) ต้องทำการกวนสารละลาย

(1) เป็นการทำความสะอาดผิวหน้าขั้วทำงาน โดยจะทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่สูงกว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่สนใจศึกษา ณ ช่วงขณะหนึ่งเพื่อทำให้เกิดการผลึกสารต่าง ๆ ที่อาจติดอยู่ที่ผิวหน้าหัววัดให้หลุดออก

(2) เป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำพอให้เกิดการรีดิวซ์สารที่สนใจเพื่อให้เกิดการสะสมที่ผิวหน้าบนหัววัด

(3) ทำการหยุดการกวนสารละลาย แต่ยังคงป้อนศักย์ไฟฟ้าเช่นเดียวกับในขั้นที่ (2) เพื่อให้ยังคงให้เกิดการสะสมสารที่ผิวหน้าหัววัดให้เกิดการจัดเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอมากขึ้น

(4) ในขั้นนี้จะเป็นการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าให้ศักย์ไฟฟ้าสูง (anodic) และเกิดการผลึกสารที่สนใจ (stripping เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน) โดยค่ากระแสที่ได้รับจะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่สนใจตรวจวัด

เทคนิคการวัดแบบ stripping เกี่ยวเนื่องกับขั้นตอนการ preconcentrate โลหะบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเมื่อป้อนศักย์ไฟฟ้าทางลบ และสามารถเลือกให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสำหรับแต่ละโลหะที่สนใจในระหว่างการป้อนศักย์ไฟฟ้าทางบวก ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่นิยมสำหรับการตรวจวัดปริมาณอออนของโลหะที่ปริมาณน้อย ดังนั้นขั้นตอนการทำ preconcentration จะช่วยทำให้สามารถวัดสารในปริมาณต่ำ และนำไปสู่การวัดที่มีค่าจำกัดในการวัด(limit of detection)ที่ต่ำได้

## บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

### 2.1 เครื่องมือ

2.1.1 Potentiostat (Autolab รุ่น PGSTAT 12, EcoChemie, ประเทศเนเธอร์แลนด์)

ทำหน้าที่ป้อนศักย์และแสดงผลสัญญาณไฟฟ้าด้วยโปรแกรมควบคุม 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, เยอรมัน)

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<sup>TM</sup> 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. (เทกซัส, 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 <sup>o</sup> 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' ด้วยหมู่เอมีน 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' ด้วยหมู่เอมีน 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' ด้วยหมู่เอมีน ซึ่งใช้สำหรับ ตรึงบนอนุภาคลาเทค (ดีเอ็นเอบาร์โคด)
single mismatched DNA	5'-TAT TCA CTC AGG AAG TTA TTA CTC <u>ACG</u> 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 โมลาร์ฟอสเฟต  
บัฟเฟอร์พีเอช 6 และเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง โดยจะทำการเจือจางโดยใช้อะซิเตดบัฟเฟอร์ความ  
เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 4.8 ในขณะที่ดีเอ็นเอตั้งต้นเตรียมที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในน้ำ  
มีลลิคว์ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองจะทำการเจือจาง  
ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 โดยสารละลายทั้งหมดจะเตรียม  
ด้วยน้ำมีลลิคว์ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ

## 2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

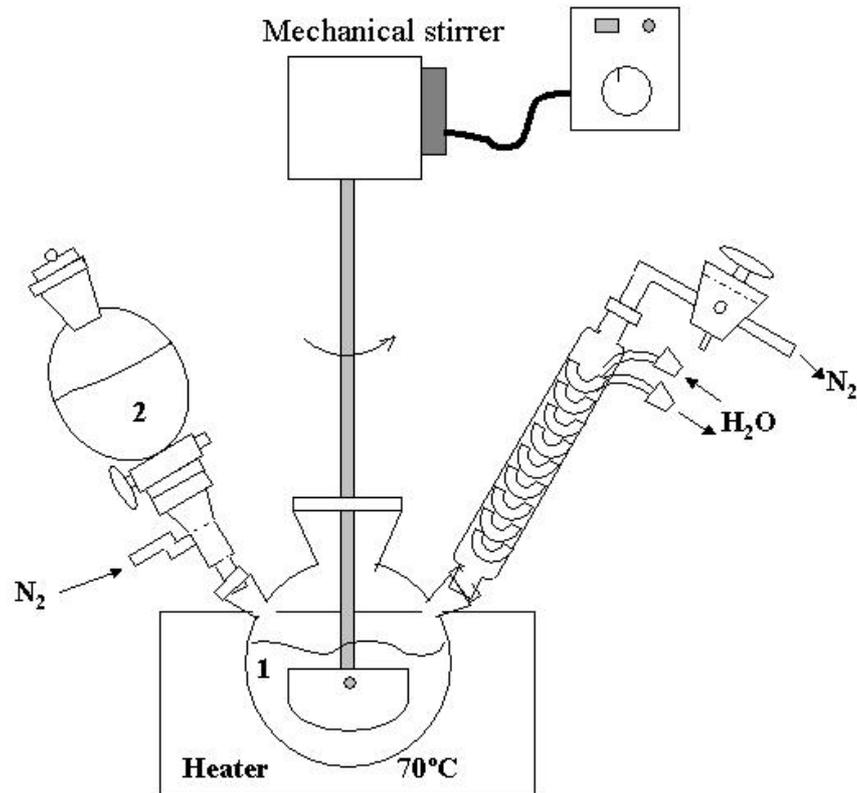
### 2.3.1 การเตรียมอิเล็กโทรด

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

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

### 2.3.2 การเตรียมอนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก

อนุภาคโพลีสไตรีนสังเคราะห์ร่วมกับกรดอะคริลิก (polystyrene-co-acrylic acid; PSA) สามารถสังเคราะห์ได้ดัดแปลงจากวิธีในบทความวิจัยก่อนหน้านี้<sup>39</sup> ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 330 นาโนเมตร สังเคราะห์ขึ้นโดยใส่น้ำกลั่น 190 กรัม ในขวดก้นกลมสามคอที่ต่อกับเครื่องกวนสาร และควบคุมอุณหภูมิโดยใส่อ่างควบคุมอุณหภูมิตั้งแสดงในรูปที่ 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 ชั่วโมงจะได้สารละลายสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมในส่วนของการสังเคราะห์อนุภาคขนาดอื่น 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 การเตรียมผลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทค

ซึ่งอนุภาค 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 โดยจะแขวนลอยในน้ำมิลลิลิตร ซึ่งสามารถหาน้ำหนักต่อปริมาตรได้โดยการชั่งน้ำหนักก่อนและหลังอบแห้ง

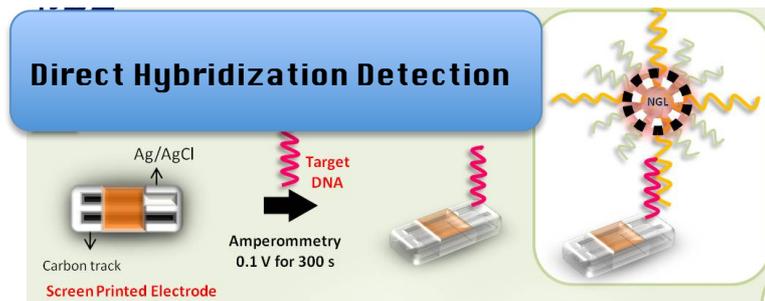
จากนั้นนำ PAA-latex (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมกับ 50% glutaraldehyde ในสัดส่วนปริมาตรที่เท่ากัน และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเหวี่ยงเท่ากับ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำการล้างสาร glutaraldehyde ที่มากเกินไปออกโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง และล้างด้วยน้ำกลั่น 4 รอบ จะได้เป็น G-latex ซึ่งแขวนลอยในน้ำมิลลิลิตรปริมาตรเดียวกับปริมาตร 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 แขนงลอยในน้ำมิลลิคิวปริมาตร 800 ไมโครลิตร

ดีเอ็นเอบาร์โคดสามารถสร้างได้โดยใช้ NGL ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ที่เตรียมทันทีผสมกับ 100 ไมโครลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมอยู่ และเติม 99 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอบาร์โคดความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 1 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอไพรบ์ที่ดัดแปลงปลายสายด้วยหมู่เอมีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (pDNA1 ใช้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยตรง และ pDNA2 ใช้สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบ sandwich) โดยได้ทำการบ่มสารผสมที่ 37 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำการล้างดีเอ็นเอที่มากเกินไปออกโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำมิลลิคิว (จะได้ทำการเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงรอบแรกเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร) จะทำให้ได้ฉลากบาร์โคดดีเอ็นเอลาเทคซึ่งแขวนลอยในน้ำมิลลิคิวหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 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 และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จึงทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ในการตรึงดีเอ็นเอบนหัวคาร์บอนทำงานทำได้โดยการหยดสารละลายดีเอ็นเอเป้าหมาย 20 ไมโครลิตรบนหัวทำงานทั้งคาร์บอนและหัวอ้างอิง จากนั้นทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ 0.1 โวลท์ 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  $\text{NaNO}_3$  ผสมกับ 0.02% tween 20 และ 0.01% SDS) 3 ครั้ง ตามด้วย washing buffer B (= 0.5 โมลาร์  $\text{NaNO}_3$ ) เพื่อทำการล้างดีเอ็นเอที่ไม่ถูกไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอเป้าหมายบนหัวทำงานออก รวมถึงล้างคลอไรด์ที่ปนเปื้อนบนหัววัดออก ทั้งนี้คลอไรด์สามารถทำปฏิกิริยากับซิลเวอร์ไอออนในขั้นตอนการทำการก่อรูปซิลเวอร์ และทำให้เกิดการตกตะกอนของซิลเวอร์ได้ ลำดับขั้นตอนการตรวจวัดได้แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันโดยตรงบนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน

### 2.3.5 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันแบบ sandwich

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

(ก) การตรึงด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า ; หยดสารละลาย 1 ไมโครโมลาร์ พีเอ็นเอในอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พีเอช 4.8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ -0.5 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที จึงทำการล้างเอาดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่ถูกตรึงบนขั้วทำงานออกโดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 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 จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำมิลลิคิวหนึ่งฆ่าเชื้อ 5 รอบ(รอบละประมาณ 1 มิลลิลิตร) และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน หลังจากบ่ม และล้างด้วยกรดแล้วจะได้ทำการตรึงพีเอ็นเอทันทีโดยหยดสารละลายผสม (45 มิลลิโมลาร์ EDC 15.75 มิลลิโมลาร์ NHS และ 1 ไมโครโมลาร์ พีเอ็นเอในอะซิเตตบัฟเฟอร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรบนขั้วคาร์บอนทำงาน และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการล้างพีเอ็นเอที่ไม่ถูกตรึงบนขั้วไฟฟ้าออกด้วย 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 2-3 ครั้งจึงทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันสามารถทำได้โดยการบ่มดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณ 20 ไมโครลิตรความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์บนขั้วไฟฟ้าทำงาน และทำการบ่ม 30 นาทีเพื่อให้เกิดการไฮบริไดซ์กันระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย 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



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงลำดับขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันแบบ sandwich บนขั้วอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน โดยใช้ พีเอ็นเอโพรบ

ในการศึกษาสภาวะต่างๆ (เช่นความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบ เวลาและอุณหภูมิในการเกิดไฮบริดเซชัน และระยะเวลาที่ใช้ในการก่อรูปเงิน เป็นต้น) ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเซชัน แบบ sandwich ทำโดยควบคุมสภาวะต่างๆ คือ

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

### 2.3.6 การก่อรูปเงิน และการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

หลังจากทำการติดฉลากไปโอบาร์โคดลาเทคและล้างทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว ในขั้นตอนการตรวจวัดการเกิดดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยตรงจะต้องทำการตัดขั้ว ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ แบบพิมพ์สกรีนออกก่อนและทำการตัดส่วนพลาสติกพีวีซีที่ใกล้กับขั้วทำงานออก เพื่อลดการเกิดการตกตะกอนเงินบนผิวพลาสติก จากนั้นจึงทำการผสมสารก่อรูปเงิน (A และ B ผสมในสัดส่วนปริมาตรเท่ากัน) และหยดลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานปริมาตร 10 ไมโครลิตร และทำการบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จึงทำการล้างทันทีด้วยน้ำมิลลิคิว 5 ครั้ง และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ทำการละลายโลหะเงินโดยใช้กรดไนตริกเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำอ็อกไซด์เงินที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ที่มี 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร และนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิค DPASV

การตรวจวัดอ็อกไซด์เงินด้วยเทคนิค DPASV สามารถทำได้โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ -0.4 โวลต์ เป็นเวลา 300 วินาที โดยช่วง 290 วินาทีแรกจะต้องทำการกวานสารเพื่อให้เกิดการสะสมโลหะเงินที่ขั้วอิเล็กโทรดให้มากที่สุด (ขั้นตอน preconcentration) จากนั้นทำการหยุดการกวานสารเพื่อให้สารละลาย ในระบบหยุดนิ่งซึ่งเหมาะต่อการตรวจวัดด้วยเทคนิค differential pulse voltammetry คือเป็น

ขั้นตอนการผลักโลหะเงินที่สะสมอยู่บนขั้วทำงานออก ทำได้โดยการตรวจวัดกระแสที่ตกัยไฟฟ้าต่าง ๆ ช่วง 0.05 ถึง 0.3 โวลท์ ที่ความเร็วในการวัด 0.5 มิลลิโวลท์ต่อวินาที

### 2.3.7 การตรวจวัดจีโนมคติเอ็นเอ

เชื้ออีโคไลสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (สายพันธุ์ BL2(DE3)) และเชื้อซัลโมเนลลา ไชฟิมูเรียม สามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ทั้งแบบเหลวและแบบวุ้นแข็ง เชื้อทั้ง 2 ชนิดเริ่มแรกจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วจะแบ่งเชื้อที่ได้ส่วนหนึ่ง เพื่อทำการหาปริมาณเชื้อที่มีอยู่โดยการบ่มเชื้อที่เจือจางสัดส่วนต่างๆ บนอาหารวุ้นแข็ง เพื่อทำการตรวจหาปริมาณเชื้อในรูปโคโลนี ต่อมิลลิลิตร (colony forming unit; CFU) เชื้อส่วนที่เหลือจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก และไม่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเชื้อจะถูกล้างและเก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 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

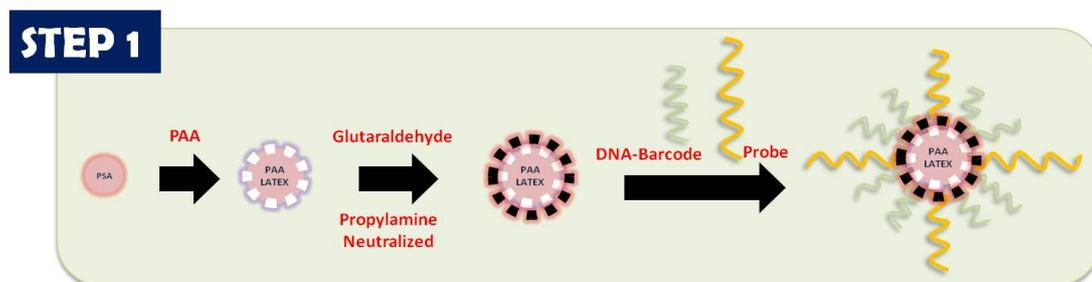
การนำจีโนมคติเอ็นเอเข้มข้นมาทำการเจือจางเป็นลำดับทำโดยการใช้ Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 มาใช้ เพื่อใช้ในการตรวจวัดกราฟมาตรฐานของจีโนมคติเอ็นเอโดยใช้ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค ก่อนการตรวจวัดไฮบริดเซชันได้ทำการต้มจีโนมคติเอ็นเอที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและใส่แซ่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อให้เกิดการแยกสายกันของจีโนมคติเอ็นเอ ในการตรวจวัดจีโนมคติเอ็นเอจะได้ทำการผสมจีโนมคติเอ็นเอที่ผ่านการแยกสายออกกับฉลากไบโอบาร์โคดแซ่เย็นในสัดส่วน 1ต่อ1 (ปริมาตร) และหยดสารผสมที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงพีเอ็นเอไว้จึงทำการบ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการล้าง และเพิ่มสัญญาณด้วยการก่อรูปโลหะเงิน ต่อด้วยการละลายโลหะเงินในรูปไอออนเงินด้วยกรดเข้มข้น จึงทำการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า DPASV

### บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์

เทคนิคไบโอบาร์โคดเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาให้เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดในงานทางด้านดีเอ็นเอ<sup>32-33, 35, 40-44</sup> และอิมมูโนเซนเซอร์<sup>34, 45-49</sup> นอกจากนี้ยังรวมถึงการตรวจวัดสารโลหะไอออนโดยการใส่ดีเอ็นเอไฮบริด ในระบบการตรวจวัดดีเอ็นเอส่วนใหญ่ได้ถูกพัฒนาเพื่อลดขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเทคนิคไบโอบาร์โคดเป็นอีกเทคนิคที่สามารถทำได้ แต่อย่างไรก็ตามอนุภาคทองนาโนที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวบรรจุดีเอ็นเอบาร์โคด และดีเอ็นเอโพรบมีข้อจำกัดในเรื่องขนาด ซึ่งส่งผลต่อปริมาณของดีเอ็นเอที่สามารถบรรจุได้เพียงระดับร้อยเส้นดีเอ็นเอ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการบรรจุดีเอ็นเอให้มากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้อนุภาคลาเทคทรงแทงกลขนาดต่างๆ เพื่อใช้ในการบรรจุดีเอ็นเอปริมาณมากซึ่งเมื่อมีปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้นจะส่งผลให้ความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอสูงขึ้นเช่นกัน

#### 3.1 การสร้างไบโอบาร์โคดลาเทค

ในงานวิจัยได้ทำการดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคลาเทคด้วยดีเอ็นเอ โดยอาศัยวิธีเชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์ ขั้นตอนการดัดแปลงดังแสดงในรูปที่ 3.1 อนุภาคลาเทคที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้คืออนุภาคพอลิสไตรีน-โค-อะคริลิกแอซิด (Polystyrene-co-acrylic acid; PSA) ที่พื้นผิวของอนุภาคลาเทค PSA ชนิดนี้มีหมู่คาร์บอกซิลิกซึ่งแสดงความเป็นประจุลบได้ ดังนั้นสามารถดัดแปลงประจุบนผิวของอนุภาคได้โดยใช้สารพอลิเอทิลอีนไตรโกล (แคทไอออนนิค และ แอนไอออนนิค) โดยสารแคทไอออนนิคที่เลือกใช้ในงานนี้คือสารพอลิเอทิลเอมีนซึ่งมีประจุบวกจากหมู่เอมีน ดังนั้นจึงสามารถเคลือบทับบนอนุภาค PSA ได้เป็น PAA-latex ที่มีประจุบวก จากนั้นได้ทำการเคลือบทับด้วยสารกลูตาอัลดีไฮด์ เพื่อให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างหมู่อัลดีไฮด์ของสารกลูตาอัลดีไฮด์ และหมู่เอมีนของPAA-latex รวมทั้งหมู่เอมีนที่ดัดแปลงที่ปลายสาย 5' ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ โดยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่อัลดีไฮด์และหมู่เอมีนนี้จะทำให้โพรบติดบนอนุภาคได้ดี จากงานวิจัยก่อนหน้านี้<sup>50</sup> พบว่าการใช้สารโพลีเอมีนจะช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตรึงบนพื้นผิวได้มากขึ้น โดยในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการใช้สารโพลีเอมีนด้วยเช่นกัน และพบว่าโพลีเอมีนช่วยทำให้สามารถตรึงโพรบบนอนุภาคลาเทคได้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโพลีเอมีนจะช่วยกำจัดสารกลูตาอัลดีไฮด์ที่จับแบบไม่เสถียรบนผิวหน้าอนุภาคลาเทคออกไปได้ โดยจะเรียนอนุภาคลาเทคที่เคลือบสารกลูตาอัลดีไฮด์ และบ่มสารโพลีเอมีนเป็น NGL

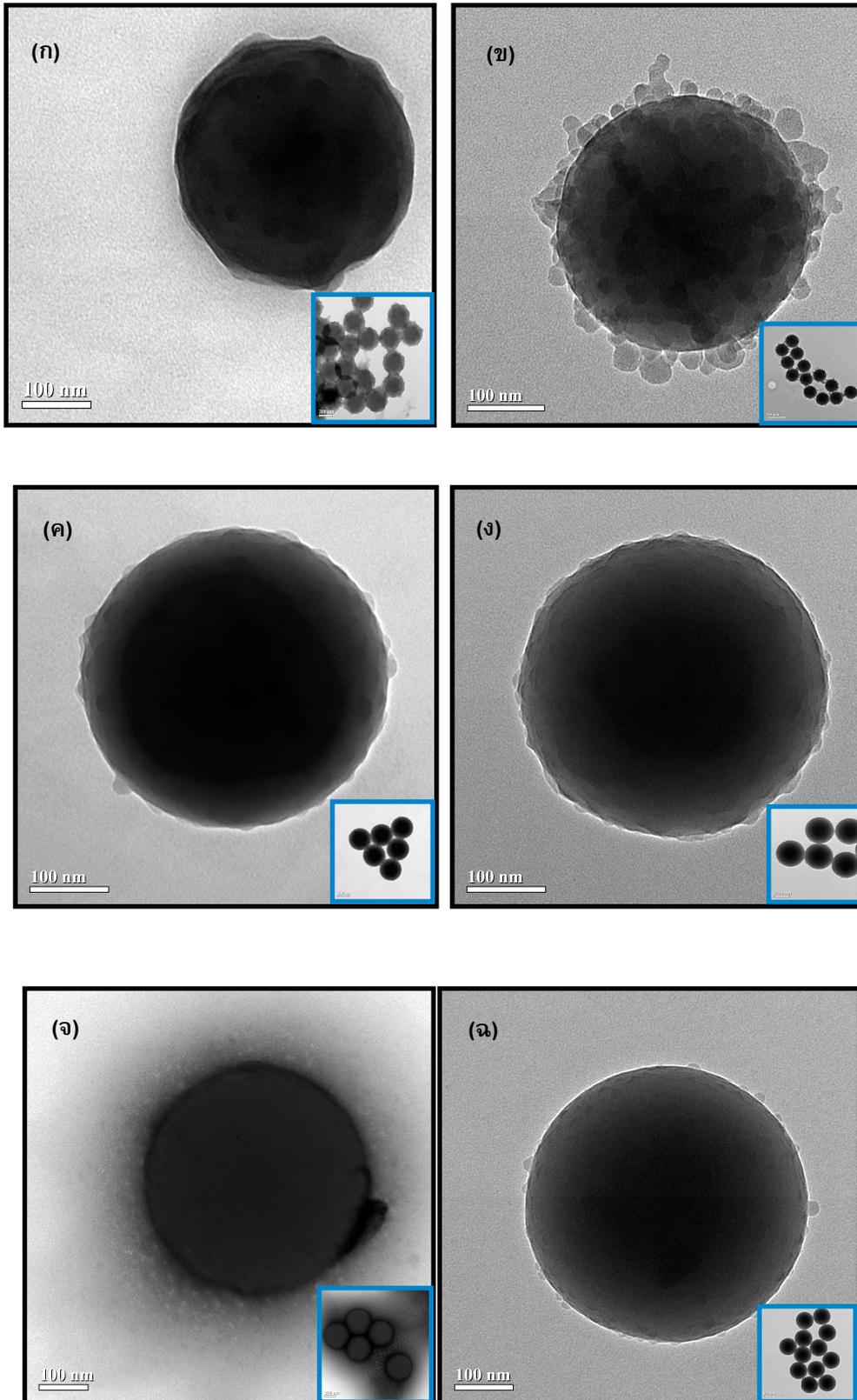


รูปที่ 3.1 แผนภาพการขั้นตอนการสร้างฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค

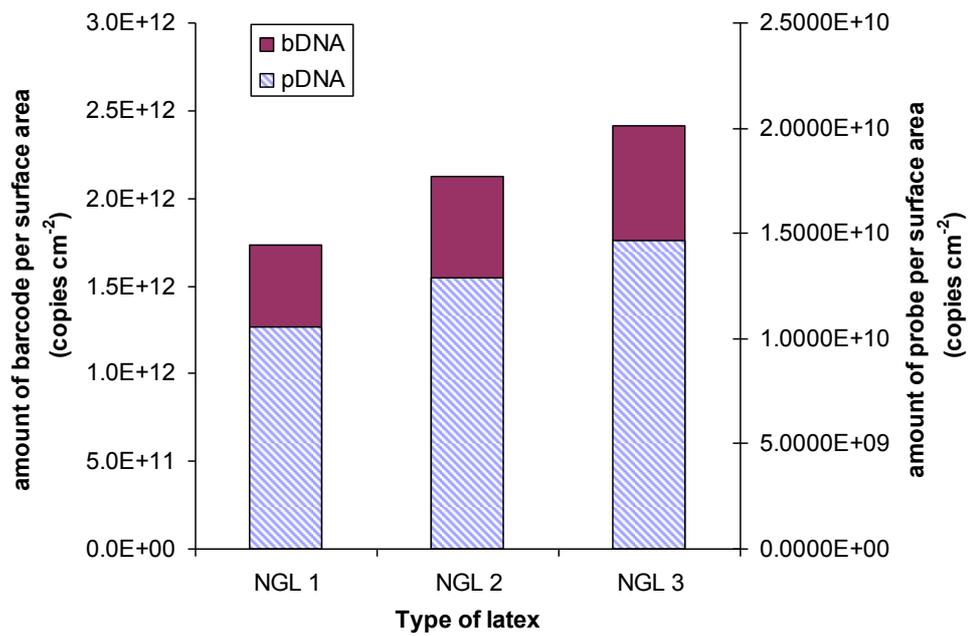
ขนาดของอนุภาคลาเทคส่งผลให้มีพื้นผิวในการตรึงดีเอ็นเอที่ต่างกัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา การตรึงดีเอ็นเอบาร์โคดบนอนุภาค NGL ที่ขนาดต่างๆ กันคือ 330 นาโนเมตร (NGL1), 395 นาโนเมตร (NGL2) และ 468 นาโนเมตร (NGL3) ในรูปที่ 3.2 แสดงภาพจาก TEM ของ GL และ NGL ขนาด ต่างๆ จากรูปแสดงให้เห็นว่าลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของอนุภาคลาเทคจะยังคงเป็นทรงกลม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

ข้อดีของการใช้อนุภาคลาเทคแทนอนุภาคทองคำสำหรับการสร้างฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดโพรบ คือ (1) อนุภาคลาเทคสามารถแขวนลอยได้ดีในน้ำ และมีความเสถียรสูงกว่า, (2) อนุภาคลาเทคสามารถ ทำการสังเคราะห์ได้เองในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถสังเคราะห์ให้มีขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ระดับ นาโนเมตรจนถึงไมโครเมตร, (3) สามารถดัดแปลงพื้นผิวของอนุภาคลาเทคได้ง่าย

ทั้งนี้บนฉลากจะมีดีเอ็นเอ 2 ชนิดคือดีเอ็นเอโพรบซึ่งเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ และดีเอ็นเอบาร์โคดซึ่งทำหน้าที่เสมือนตัวเพิ่มสัญญาณ ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอโพรบบนฉลากไม่จำเป็นต้องมีปริมาณมากเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอบาร์โคดที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัดได้ โดยในงาน วิจัยนี้จึงได้เลือกใช้สัดส่วนความเข้มข้นของดีเอ็นเอโพรบ และดีเอ็นเอ บาร์โคดเท่ากับ 1:99 และเมื่อทำ การตรึงดีเอ็นเอบนอนุภาค NGL ในช่วงเวลาที่กำหนด จากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ถูกตรึง ให้ออกมาโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่ติดอยู่บนฉลากสามารถคำนวณได้ จากการตรวจวัดดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ในสารละลายหลังจากทำการปั่นเหวี่ยงแล้ว โดยใช้เทคนิคยูวีสเปค- โตรโฟโตเมทรีเพื่อทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ( $1 \text{ OD} = 33$  ไมโครกรัมดีเอ็นเอ สายเดี่ยวต่อปริมาตรระดับไมโครลิตร) รูปที่ 3.3 แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถบรรจุบนฉลาก NGL1 ถึง NGL3 ได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบนฉลาก NGL3 สามารถบรรจุดีเอ็นเอได้มากที่สุด ดังนั้นจึงมี ความเป็นไปได้ที่จะสามารถเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอได้สูงสุดเช่นกัน เนื่องจากในระบบวัด จะได้ใช้สารโลหะเงินออรูเวอร์เพิ่มสัญญาณการตรวจวัด โดยโลหะออรูเวอร์สามารถจับกับหมู่ฟอสเฟตที่ เป็นโครงสร้างหลักของดีเอ็นเอได้ ดังนั้นเมื่อมีปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้นส่งผลให้ออรูเวอร์เงินเข้าไปจับได้ มากขึ้นเช่นกัน และจากรูปที่ 3 แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรึงบนอนุภาค NGL1 ถึง NGL3 ได้ ซึ่งปริมาณที่ได้สูงกว่าการตรึงบนอนุภาคทองคำ(รายงานโดย Hu และคณะ<sup>32</sup>) ถึง 3700 แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่าการตรึงบนอนุภาคแก้ว (เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 3.53 ไมโครเมตร) เพียง 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคแก้วมีขนาดพื้นที่ผิวแบบรูปทรงจึงทำให้มีพื้นผิวสำหรับ ตรึงดีเอ็นเอมาก



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



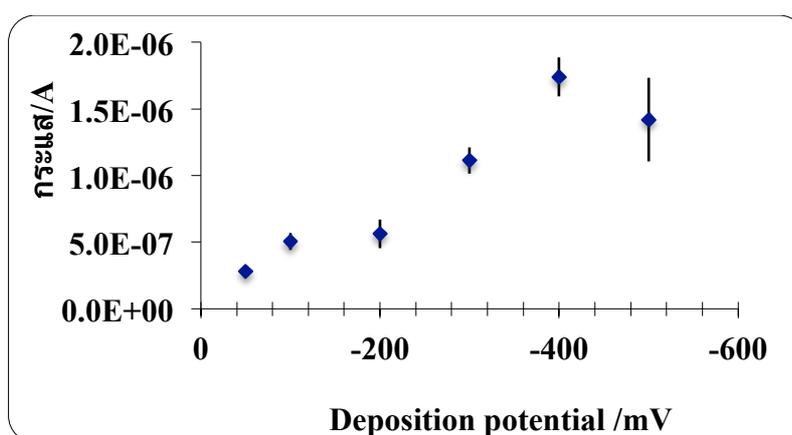
รูปที่ 3.3 กราฟแสดงปริมาณจำนวนดีเอ็นเอบาร์โคด และดีเอ็นเอโพรบที่สามารถตรึงอยู่บนอนุภาคลาเทคแบบต่างๆ

### 3.2 การศึกษาการตรวจวัดอโลหะเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

ในงานวิจัยได้ใช้สารก่อรูปเงินเพื่อช่วยในการเพิ่มสัญญาณในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าด้วยเทคนิคสตริปปีงโวลแทมเมตรี (ASV) เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถวัดปริมาณอโลหะเงินของโลหะที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอท้ายสุดได้ ดังนั้นก่อนที่จะทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารก่อรูปเงิน จะได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดอโลหะเงินโดยวิธี 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

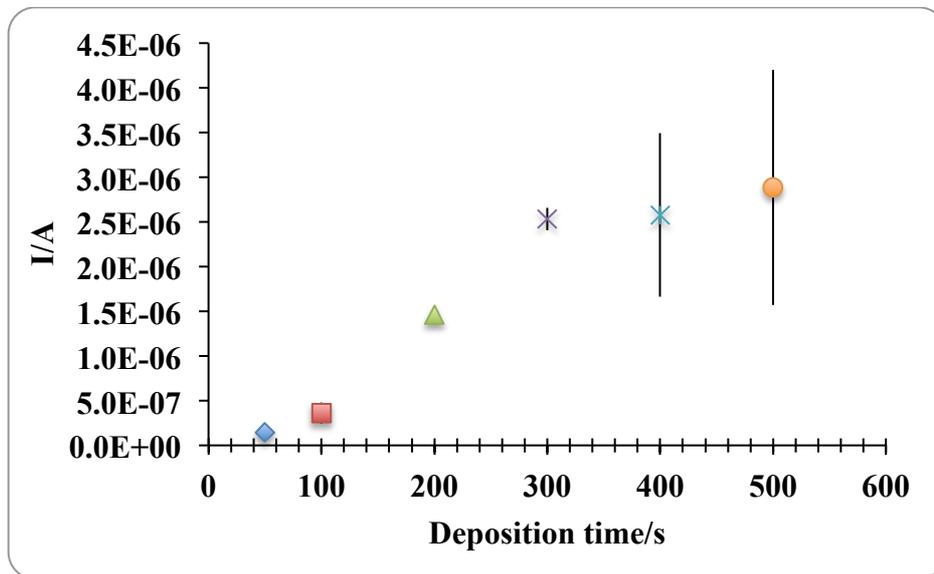
ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้สำหรับการสะสมอโลหะเงินที่อยู่ในสารละลายให้เป็นโลหะเงินที่บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนทำงานสามารถทำได้โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าลบเนื่องจากโลหะเงินมีประจุบวก ( $Ag^+$ ) โดยการทดลองนี้จะใช้สารโซเดียมไนเตรทเป็นสารมาตรฐานเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ สำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิค ASV ต่ออโลหะเงิน ช่วง  $E_{dep}$  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 ทั้งนี้เนื่องจากที่พื้นผิวของขั้วคาร์บอนทำงานแบบพิมพ์สกรีนถูกปกคลุมด้วยประจุลบซึ่งทำให้เกิดการสะสมของอโลหะเงินที่มีประจุบวกได้เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่า -0.4 โวลท์ นั้นจะส่งผลให้ที่พื้นผิวของขั้วไฟฟ้าไม่มีพลังงานมากพอที่จะทำให้เกิดการสะสมอโลหะเงินได้ แต่เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าที่มากกว่า -0.5 โวลท์ แสดงถึงสภาวะที่อิ่มตัวของการสะสมอโลหะเงินที่ขั้วไฟฟ้า 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

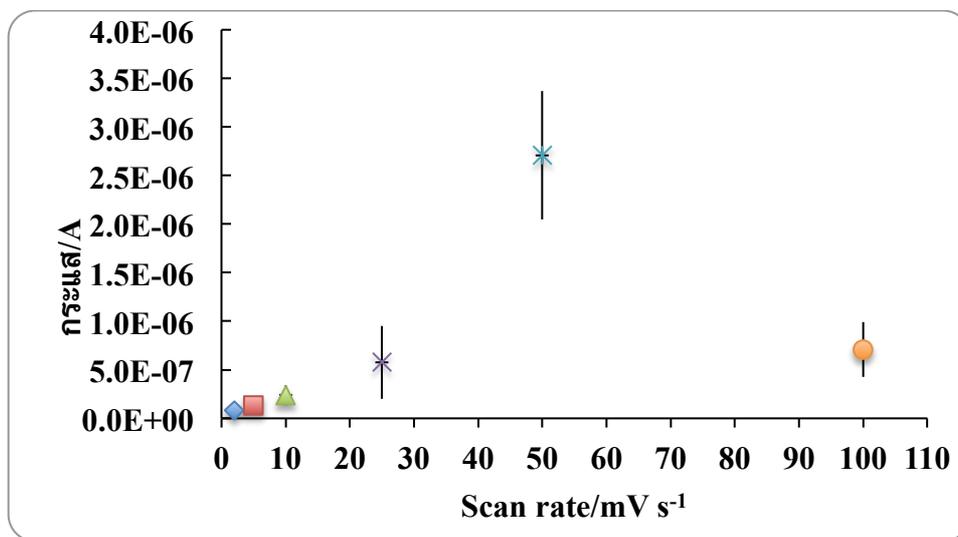
ระยะเวลาที่ใช้เพื่อโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าทำงานเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งต่อการตรวจวัดไอออนเงินทั้งหมดที่ละลายในสารละลาย โดยในระหว่างการสะสมจะมีการกวนสารละลายไอออนเงินเพื่อให้เกิดการสะสมมากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยได้ทำการศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการสะสมที่เหมาะสมในช่วงตั้งแต่ 50 ถึง 500 วินาที ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่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



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

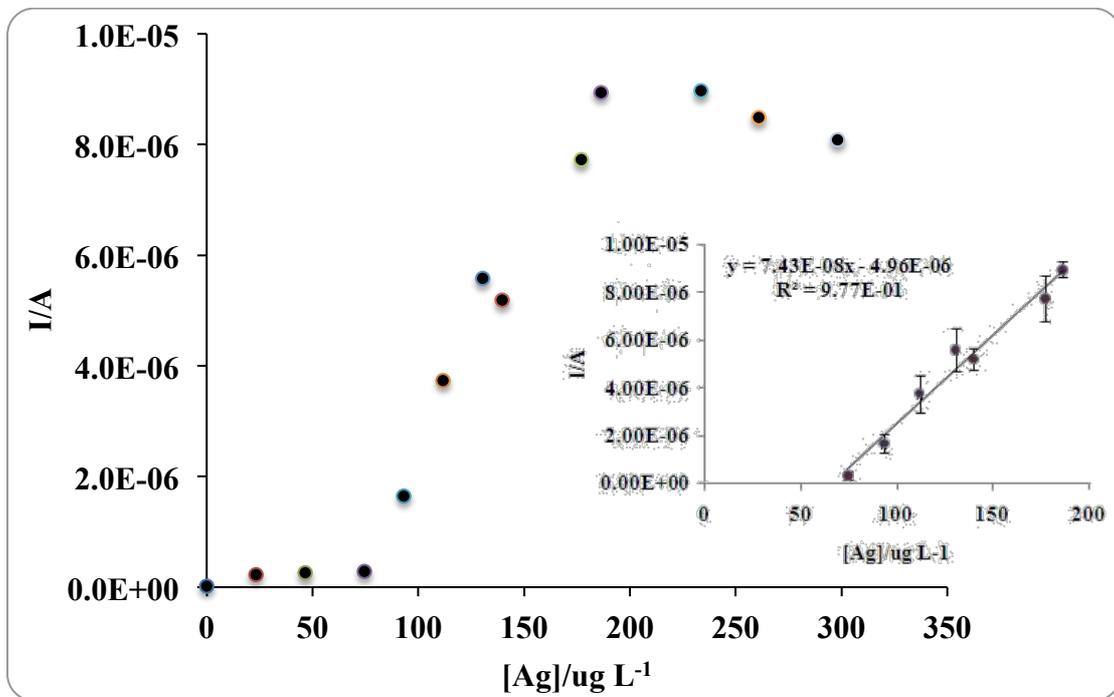
### 3.2.3 การศึกษาหาอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด

ปัจจัยที่สำคัญต่อการตรวจวัดไอออนเงินคือ อัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัด (scan rate;  $\text{mV s}^{-1}$ ) ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากทำการสะสมโลหะเงินบนขั้วไฟฟ้าได้แล้ว จะต้องทำการกราดศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้โลหะเงินที่สะสมอยู่หลุดออก และกลับมาละลายในสารละลายเหมือนเดิม โดยในระหว่างการกราดศักย์ไฟฟ้าอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าจะต้องคงที่ และส่งผลต่อค่ากระแสจำกัด (limiting current) ที่เกิดขึ้น ดังนั้นค่า scan rate ที่ใช้ศึกษาจะอยู่ในช่วง 2 ถึง  $100 \text{ mV s}^{-1}$  ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6 ผลแสดงให้เห็นว่าที่ scan rate เท่ากับ  $50 \text{ mV s}^{-1}$  ให้ค่ากระแสสัญญาณสูงที่สุดซึ่งเป็นไปได้ว่าที่อัตรานี้จะส่งผลให้สามารถผลึกโลหะเงินออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานได้มากที่สุด



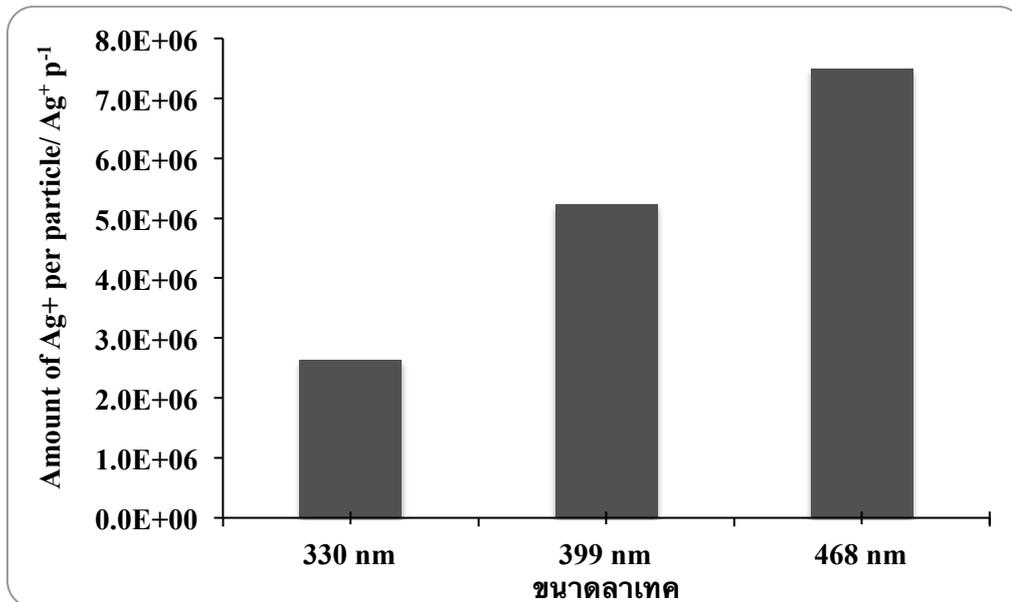
รูปที่ 3.6 กระแสความสูงของพีคที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค ASV และอัตราการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้า (scan rate) ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ คือวัดซิลเวอร์ในเตรต ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ  $E_{\text{dep}} = -0.4$  โวลท์  $t_{\text{dep}} = 300$  วินาที

จากสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ คือ  $E_{dep} = -0.4$  โวลท์  $t_{dep} = 300$  วินาที scan rate =  $50 \text{ mV s}^{-1}$  ได้ใช้เพื่อทำการศึกษากากราฟมาตรฐานการตรวจวัดไอออนเงินจากการใช้ซิลเวอร์ในเตรท ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้สามารถใช้หาปริมาณไอออนเงินในสารละลายที่ไม่ทราบปริมาณได้ แต่มีข้อจำกัดคือค่ากระแสที่วัดได้ต้องอยู่ในช่วงกราฟเชิงเส้น ในการทดลองนี้ได้ใช้สารซิลเวอร์ในเตรท 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ตรวจวัดในอะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ค่ากระแสสัมพันธ์กับความเข้มข้นแสดงในรูปที่ 3.7 แสดงค่ากระแสเชิงเส้นสำหรับความเข้มข้นของซิลเวอร์ในเตรทในช่วง 74.5 ถึง 186.3 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยค่าสมการเชิงเส้นคือ  $y = (7.43 \times 10^{-8})x - 4.96 \times 10^{-6}$  ซึ่ง  $x$  เป็นค่าความเข้มข้นของซิลเวอร์ในเตรทในถ้วยวัด (ไมโครกรัมต่อลิตร) และ  $y$  เป็นค่าความสูงของพีคที่วัดได้จากเทคนิค ASV (ไมโครแอมแปร์) และมีค่า  $r^2 = 0.977$  ดังนั้นในการตรวจวัดปริมาณซิลเวอร์ในตัวอย่างสามารถตรวจวัดและใช้สมการดังกล่าวข้างต้นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณไอออนเงินที่สามารถบรรจุอยู่บนฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคโนโลยี



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

ได้ทำการศึกษาผลของสารก่อรูปเงินที่ใช้กับฉลากทั้ง 3 ชนิด ซึ่งทำโดยการผสมระหว่างสารก่อรูปเงิน A และ B ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ร่วมกับฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคทั้ง 3 ชนิด (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตัวอย่างละ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที โลหะเงินจะสามารถเกาะบนดีเอ็นเอบาร์โคดได้จากไอออนเงินที่มีประจุบวกเข้ากับจับกับประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยแรง electrostatic จากนั้นไอออนเงินจะถูกเร่งปฏิกิริยาทางเคมี(สารก่อรูปเงิน:B) ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนโลหะเงิน ต่อมาจึงได้ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 14000 รอบต่อนาที เพื่อล้างเอาสารก่อรูปเงินที่เกินพอออก ปริมาณโลหะเงินที่ก่อรูปบนดีเอ็นเอบาร์โคดสามารถตรวจวัดได้โดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า กล่าวคือทำการละลายโลหะเงินด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 50% ให้เป็นไอออนเงิน ทำยสุดสามารถทำการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า“แอนออดอนิกสตริบปีง์โวลแทมเมทรี” (anodic stripping voltammetry) ซึ่งค่ากระแสที่วัดได้สามารถคำนวณหาปริมาณไอออนเงินได้โดยใช้สมการเชิงเส้นที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้านี้ โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.8 เมื่อปริมาณดีเอ็นเอบาร์โคดเพิ่มขึ้น ปริมาณโลหะเงินที่สามารถก่อรูปบนฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ NGL3 เป็นตัวติด ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไฮเซนซ์ต่อไป



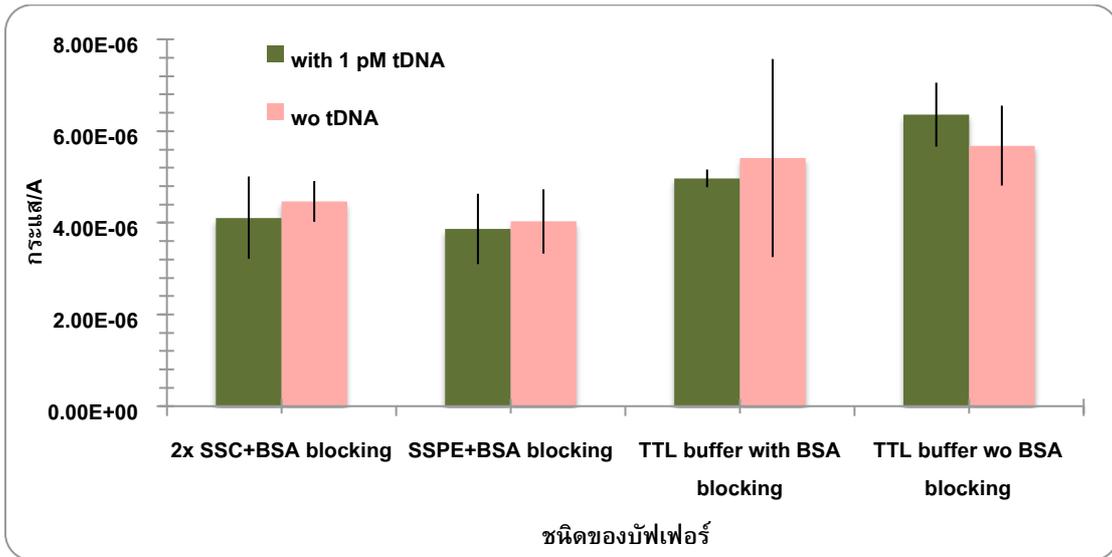
รูปที่ 3.8 ปริมาณไอออนเงินที่วัดได้จากเทคนิค ASV ต่ออนุภาคลาเทค ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัดใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ  $E_{dep} = -0.4$  โวลท์  $t_{dep} = 300$  วินาที และ scan rate =  $50 \text{ mV s}^{-1}$

### 3.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันโดยตรง (direct DNA hybridization)

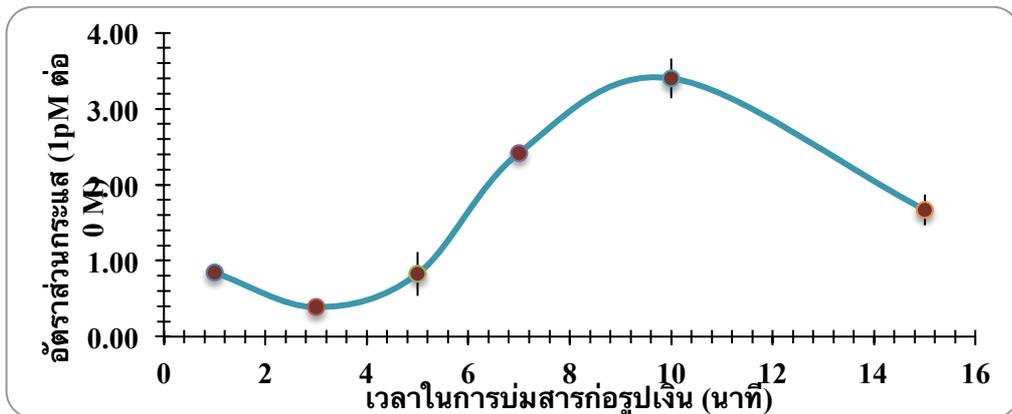
ได้ทำการศึกษาหาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันโดยตรง เช่น สภาวะการตรวจวัดอ็อกซิเจนด้วยเทคนิค differential pulse anodic stripping voltammetry ชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเกิดไฮบริไดเซชัน และระยะเวลาในการบ่มสารก่อรูปเงิน เป็นต้น ขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันสามารถทำได้โดยการตรึงดีเอ็นเอเป้าหมาย(tDNA) บนพื้นผิวขั้วทำงานแบบคาร์บอนพิมพ์สกรีนโดยการบ่อนักยไฟฟ้าที่ 0.1 โวลท์ เป็นเวลา 5 นาที วิธีนี้จะสามารถตรึงดีเอ็นเอบนขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีนได้โดยอาศัยวิธี electrostatic ระหว่างประจุบวกของขั้วไฟฟ้าที่เกิดจากการบ่อนักยไฟฟ้า และประจุลบจากดีเอ็นเอ จากนั้นจึงทำการบ่มกับฉลากดีเอ็นเอบาร์โคดลาเทคเป็นเวลา 20 นาที และบ่มกับสารก่อรูปเงิน ซึ่งกระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดอ็อกซิเจนจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย

ชนิดของบัฟเฟอร์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการเกิดไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอ โดยทั่วไปได้มีการใช้บัฟเฟอร์ SSC และ SSPE ในการเกิดไฮบริไดเซชันของดีเอ็นเอ แต่ทว่าในการตรวจวัดดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ให้ผลที่ไม่เป็นไปตามปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีอยู่ ดังนั้นจึงได้เลือกบัฟเฟอร์ TTL เข้ามาศึกษาเพิ่มเติม โดยจะได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ หลังจากทำการบ่มกับฉลากไบโอบาร์โคดลาเทค(ที่ได้จากการใช้ NGL3) ที่ละลายในไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.9 โดยสภาวะควบคุมอื่นๆ คือทำการบ่มฉลาก 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 ร่วมในการเกิดไฮบริไดเซชัน

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 นาทีจะทำให้ค่าสัดส่วนของกระแสสัญญาณสูงสุด ดังนั้นจึงได้เลือกบ่มสารก่อรูปเงิน 10 นาที



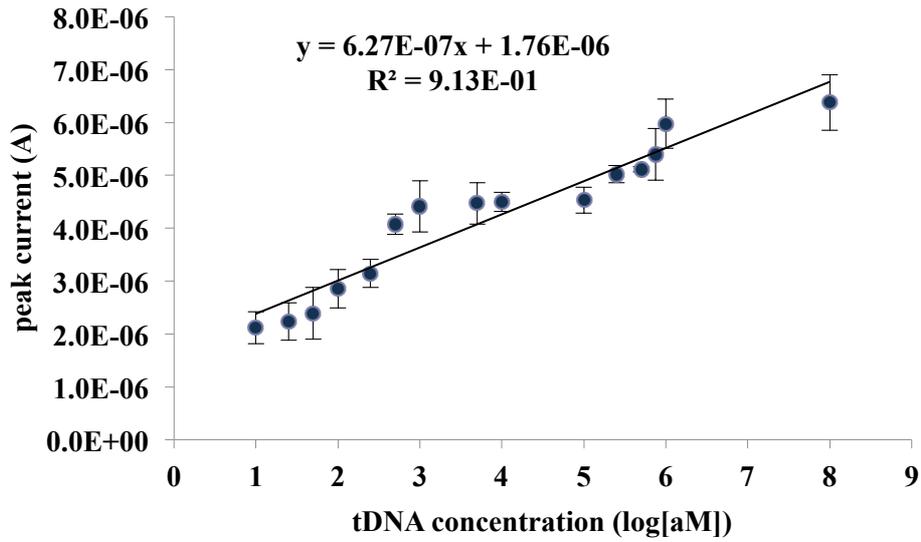
รูปที่ 3.9 ชนิดของบัฟเฟอร์สำหรับการเกิดไฮบริดเซชัน ภายใต้สภาวะความเข้มข้น วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ  $E_{dep} = -0.4$  โวลท์  $t_{dep} = 300$  วินาที และ scan rate = 50  $mV s^{-1}$



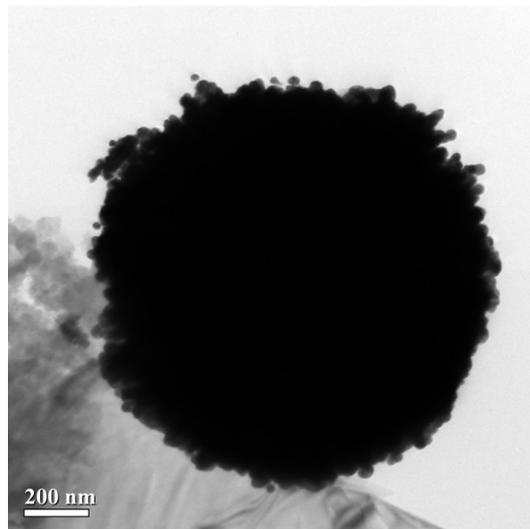
รูปที่ 3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนกระแสสัญญาณที่วัดได้ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโตโมลาร์และ 0 โมลาร์ และ เวลาที่ใช้ในการบ่มสารก่อรูปเงิน (นาที) ภายใต้สภาวะความเข้มข้น วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ  $E_{dep} = -0.4$  โวลท์  $t_{dep} = 300$  วินาที และ scan rate = 50 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

จากสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดเคชันโดยตรงดังกล่าวข้างต้น สามารถนำมาใช้เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้นต่างๆ รูปที่ 3.11 แสดงค่ากระแสสัญญาณที่ตรวจวัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ tDNA ที่เพิ่มขึ้น ช่วงความเข้มข้น 100 พิโคโมลาร์ ถึง 10 แอตโตโมลาร์ เป็นช่วงพหุเชิงเส้นตรงที่มีค่าสมการเชิงเส้นเป็น  $y = 6.27 \times 10^{-7} x + 1.76 \times 10^{-6}$  ( $y$  เป็นค่ากระแสสัญญาณมีหน่วยเป็นแอมแปร์ และ  $x$  เป็นค่าความเข้มข้นของ tDNA ในหน่วย log ของความเข้มข้นในหน่วยแอตโตโมลาร์) และมีค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.91 โดยมีค่าความสามารถในการวัดต่ำสุด (limit of detection) เท่ากับ  $1.82 \times 10^{-16}$  โมลาร์ (182 แอตโตโมลาร์) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการโดยใช้กระแสที่วัดได้จากการตรวจวัด noncomplementary DNA รวมกับค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน 3 เท่า ทั้งนี้ค่าความไวในการตรวจวัดสูงเนื่องจากสามารถบรรจุดีเอ็นเอปริมาณมากบนฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคได้ (ประมาณ 1010 ก๊อปปี้ดีเอ็นเอต่อตารางเซนติเมตร สำหรับดีเอ็นเอโพรบ และ 1012 ก๊อปปี้ต่อตารางเซนติเมตร สำหรับบาร์โคดดีเอ็นเอ) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจวัดจากวิธีนี้ดีกว่าจากผลงานตีพิมพ์ต่างๆ ก่อนหน้านี้ที่ได้ใช้ไบโอบาร์โคดแอสเสร่วมกับวิธีการตรวจวัดเทคนิคต่างๆ คือ แคปพิราลดีเอ็นเออะนาไลซิส<sup>42</sup> การตรวจวัดโดยใช้สแกนโนเมตริ<sup>51-53</sup> และเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า<sup>21, 32-33, 36-37</sup>

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

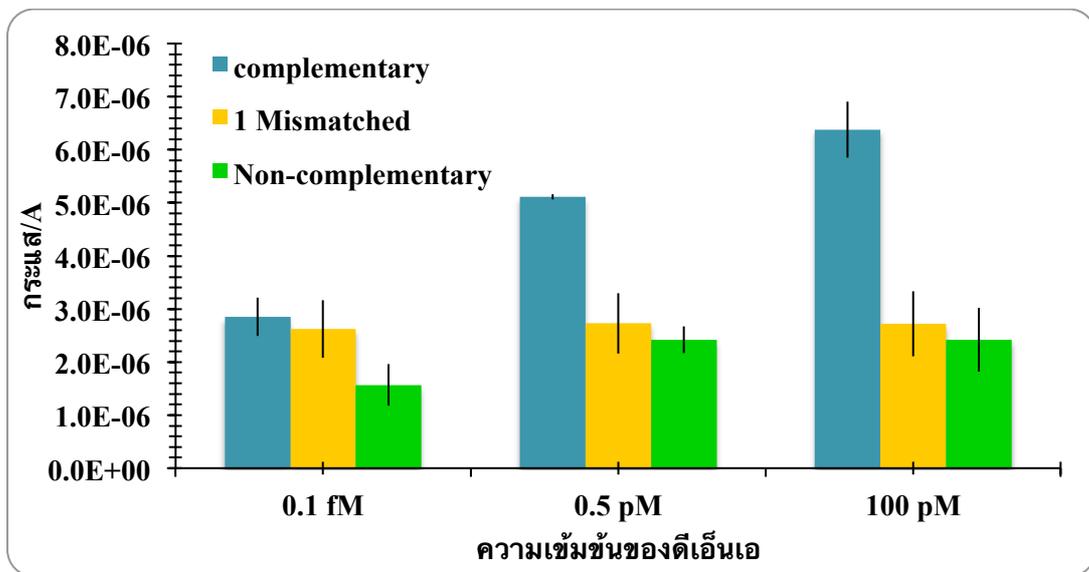


รูปที่ 3.11 กราฟเชิงเส้นมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (ลือกของความเข้มข้นระดับแอตโตโมลาร์) และ กระแสสัญญาณที่วัดได้ด้วยเทคนิค ASV ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ  $E_{dep} = -0.4$  โวลท์  $t_{dep} = 300$  วินาที และ scan rate =  $50 \text{ mV s}^{-1}$



รูปที่ 3.12 ภาพ TEM ของไบโอบาร์โคดลาเทร่รวมกับสารก่อรูปเงินหลังจากทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 50 แอตโตโมลาร์

นอกจากนี้ความจำเพาะต่อการตรวจวัดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ได้ทำการศึกษาเช่นกัน โดยจะทำการเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สม(complementary DNA) ที่ไม่เป็นคู่สม(non-complementary DNA) และ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 ค่า(mismatched-DNA) ที่ 3 ค่าความเข้มข้นคือ 0.1 เฟมโตโมลาร์ 0.5 พิโคโมลาร์ และ 100 พิโคโมลาร์ 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 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<sup>-1</sup>

### 3.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไอโซริโดเซชันโดย sandwich (Sandwich DNA hybridization)

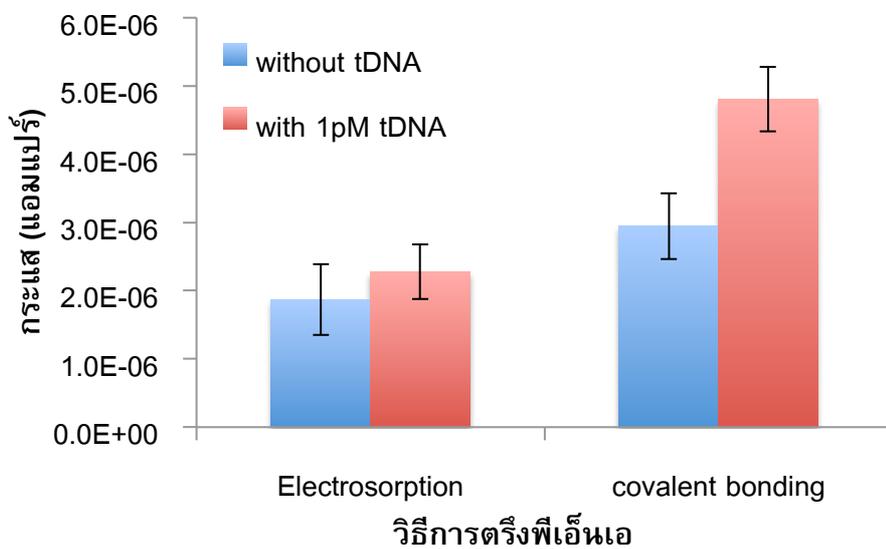
เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดโพรบ (หรือ พีเอ็นเอ โพรบ) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรบบนขั้วไฟฟ้าทำงานได้ ทั้งนี้เพราะพีเอ็นเอเป็นโมเลกุลสังเคราะห์ที่มีโครงสร้าง และมีสมบัติคล้ายดีเอ็นเอแต่ดีกว่าดีเอ็นเอคือสามารถจับกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงกว่า และเสถียรกว่าดีเอ็นเอธรรมชาติ เนื่องจากพีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นสายพอลิเพปไทด์ที่ไม่มีประจุ ดังนั้นเมื่อใช้ พีเอ็นเอเป็นโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงานจะสามารถลดการก่อรูปโลหะเงินแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ ซึ่งจะช่วยลดสัญญาณพื้นฐานได้ และทำให้ความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายสูงขึ้นได้ ดังนั้นในงานวิจัยส่วนนี้จึงได้เลือกใช้พีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไอโซริโดเซชันแบบ sandwich ร่วมกับการใช้ฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคและการก่อรูปโลหะเงิน เพื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าแบบ ASV

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

#### 3.4.1 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีน

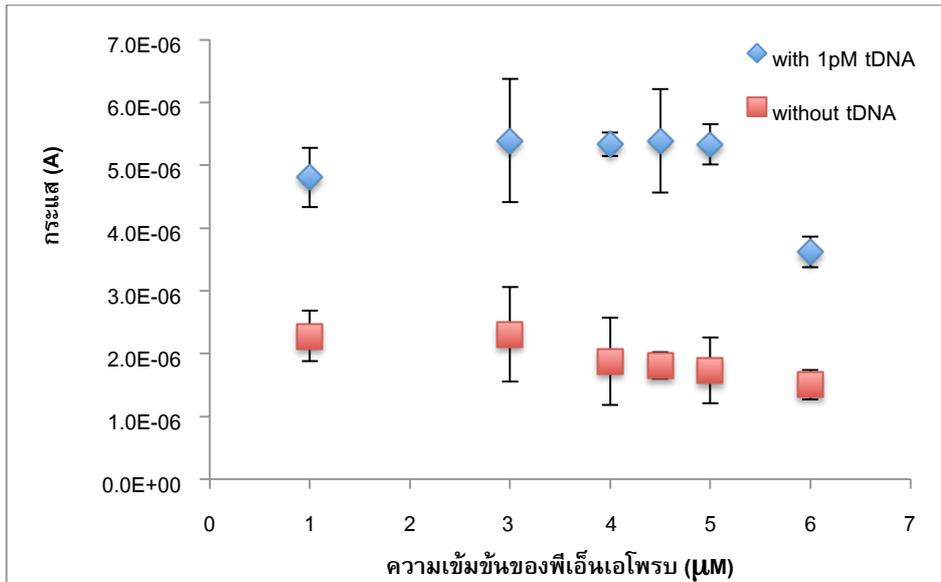
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีน 2 วิธีคือ (1)การตรึงโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าทางลบเพื่อให้หมู่เอมีนของพีเอ็นเอโพรบตรึงบนขั้วไฟฟ้า (เรียกว่าวิธี electrosorption) (2)การตรึงโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีผ่านพันธะโควาเลนต์(เรียกว่าวิธี covalent bonding) วิธีแรก electrosorption จะทำโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าเช่นเดียวกับวิธีการตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายในขั้นตอนการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไอโซริโดเซชันโดยตรง 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 เพื่อทำให้เกิดไฮบริดไอโซริโดเซชันแบบ sandwich ของ PNA/tDNA/BBL ขึ้น จากนั้นจึงทำการบ่มสารก่อรูปเงินเพื่อเพิ่มสัญญาณการตรวจวัดและทำการละลายเงินเพื่อตรวจวัดปริมาณอ็อกซิเจนที่สัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ด้วยเทคนิค ASV โดยจะได้ทำการเปรียบเทียบค่ากระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์

รูปที่ 3.14 แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรึงพีเอ็นเอบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีนแบบ covalent bonding จะให้ค่าความแตกต่างระหว่างกระแสที่วัดจากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ความเข้มข้นต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าวิธี electrosorption ทำให้พีเอ็นเอตรึงบนขั้วคาร์บอนได้มากกว่าวิธี covalent bonding จึงทำให้ค่ากระแสพื้นฐานที่ได้จากวิธี electrosorption ต่ำกว่าวิธี covalent bonding นอกจากนี้ค่ากระแสที่ได้จากการวัดดีเอ็นเอจากวิธี electrosorption น้อยกว่าจากวิธี covalent bonding ซึ่งเป็นไปได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบมากเกินไปจะสามารถลดปริมาณการเกิดไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ถึงแม้ว่าค่ากระแสพื้นฐานที่ได้จากวิธี covalent bonding จะสูงกว่า electrosorption ก็ตาม แต่ทั้งนี้ความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบอาจจะไม่มากเพียงพอที่จะทำให้ปกคลุมทั่วพื้นผิวทั้งหมดของขั้วคาร์บอนพิมพ์สกรีน ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกวิธี covalent bonding สำหรับการตรึงพีเอ็นเอบนขั้วไฟฟ้าทำงาน และจะได้ศึกษาหาความเข้มข้นของพีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อไป



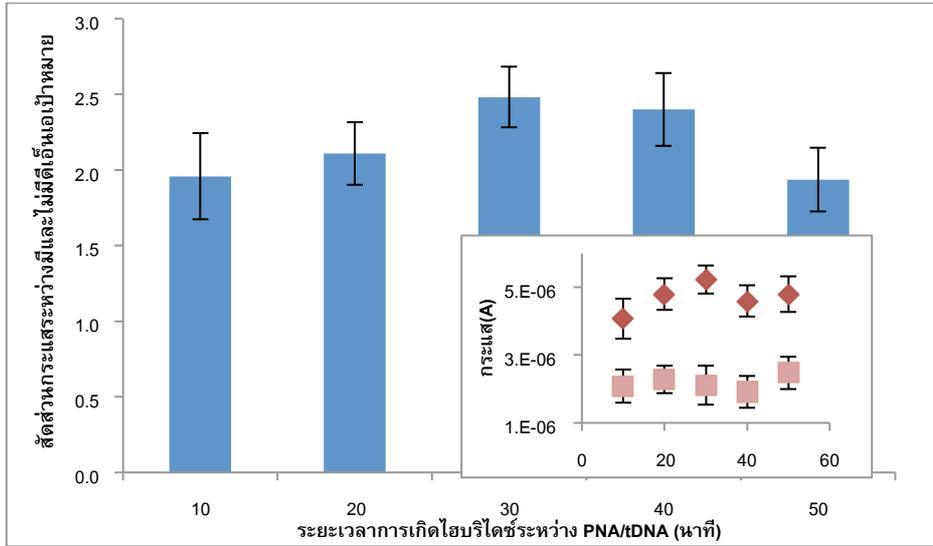
รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่ได้รับการตรึงพีเอ็นเอด้วยวิธี electrosorption และ covalent bonding ต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1 พิคโคโมลาร์ เทียบกับ 0 โมลาร์

ในการศึกษาหาปริมาณพีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนโดยวิธี covalent bonding ได้ทำโดยการศึกษาหาผลของความเข้มข้นของพีเอ็นเอที่ใช้ในการตรึงและทำการเปรียบเทียบผลของกระแสที่ได้จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 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

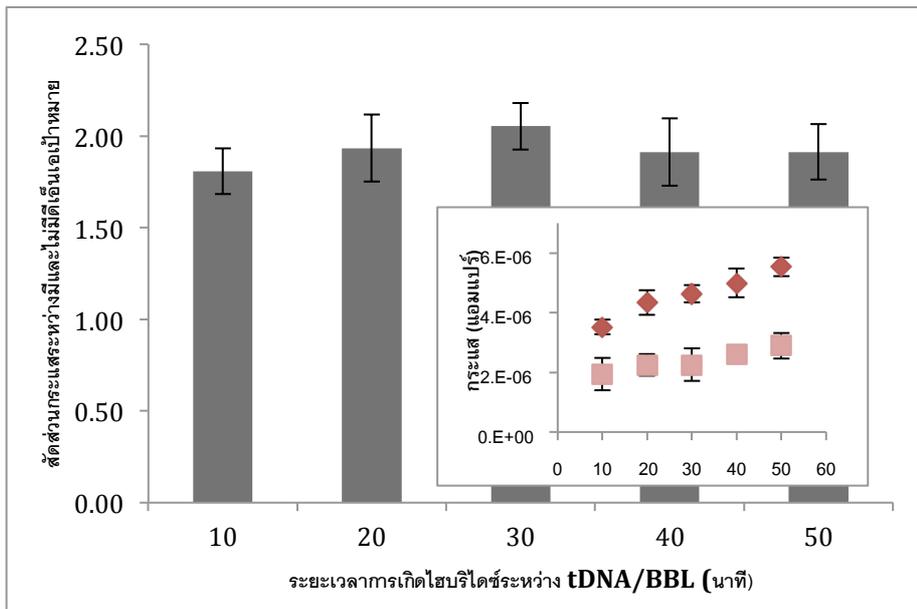


**รูปที่ 3.15** กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสที่ได้ต่อความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบ เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิคโตโมลาร์ และ 0 โมลาร์

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 พิคโตโมลาร์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาในการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง 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

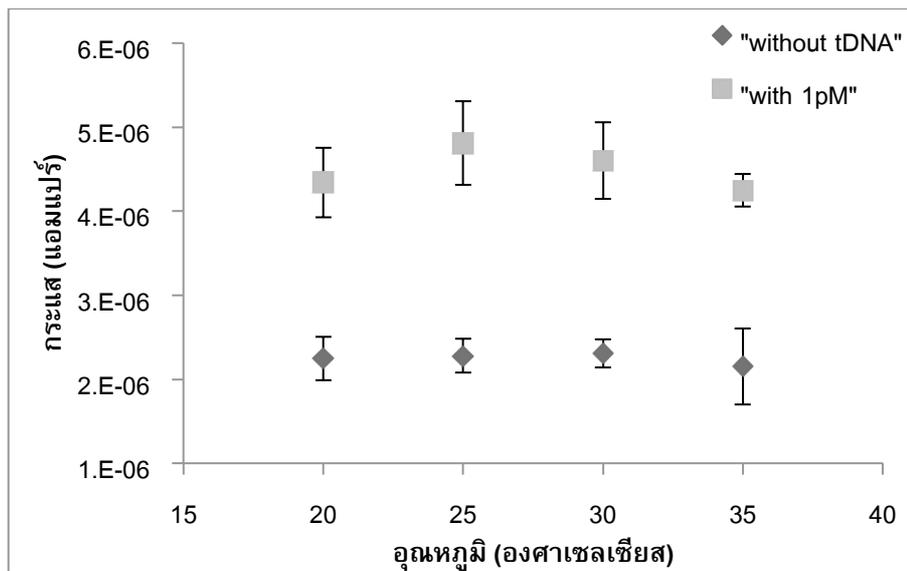


รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ได้รับความไว้วางใจจากตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิกโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริดของ PNA/tDNA ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที



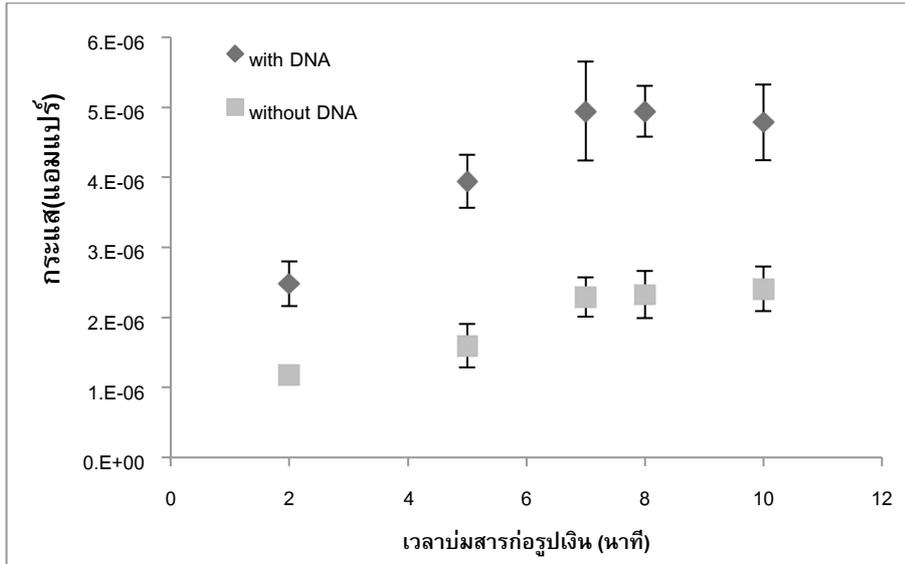
รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนกระแสที่ได้รับความไว้วางใจจากตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิกโคโมลาร์เทียบกับ 0 โมลาร์ ที่เวลาในการเกิดไฮบริดของ tDNA/BBL ระหว่าง 10 ถึง 50 นาที

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



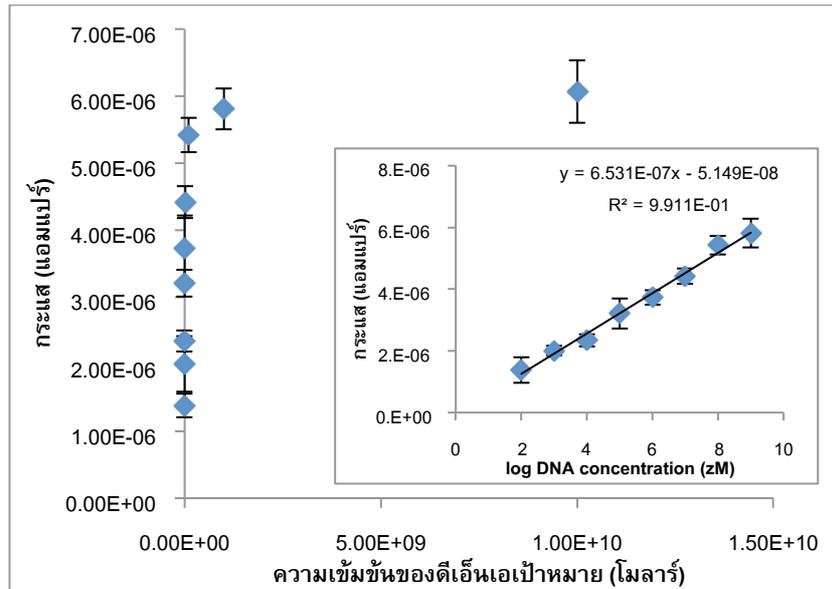
รูปที่ 3.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสสัญญาณที่วัดได้เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส

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

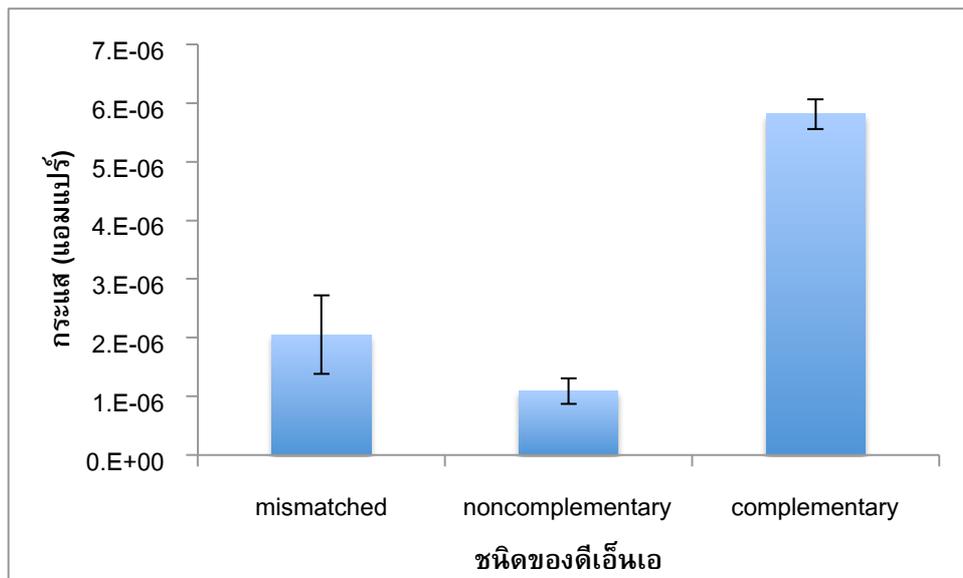


รูปที่ 3.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสสัญญาณที่วัดได้เมื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ และ 0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันแบบ Sandwich คือใช้พีเอ็นเอโพรบ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยทำการตรึงด้วยวิธี covalent bonding ใช้เวลาในการเกิด hybridization ระหว่าง PNA/iDNA = 30 นาที ระหว่าง iDNA/BBL = 30 นาที ทำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการบ่มด้วยสารก่อรูปเงินเป็นเวลา 5 นาที จึงทำการล้าง และ ละลายอออนเงินด้วยกรดจึงทำการ วัดปริมาณอออนเงินด้วยเทคนิค 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 คือค่าล็อกของความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วยแซตโตโมลาร์) จากการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมกับโพรบที่ใช้ทำให้ได้ กระแสพื้นฐานที่แท้จริงเท่ากับ 1.09 ไมโครแอมแปร์ และมีค่าความคลาดเคลื่อนเท่ากับ  $2.18e-7$  ดังนั้นสามารถคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดที่วัดได้(limit of detection; LOD) จาก 3 เท่าของค่าความคลาดเคลื่อนรวมกับค่ากระแสพื้นฐาน จากนั้นนำเข้าสู่สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานเชิงเส้นเพื่อคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.56 แอดโตโมลาร์ หรือเทียบได้กับดีเอ็นเอ 3 โมเลกุลในสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมาย 10 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ใช้เทคนิคไบโอบาร์โคด เป็นฉลากสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น scanometric electrochemiluminescence capillary electrophoresis และ electrochemical (ดังแสดงในตารางที่ 2) พบว่างานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอได้ด้วยควมไว และ LOD ดีที่สุด ดังนั้นฐานเทคโนโลยีการวัดโดยใช้ไบโอบาร์โคดลาเทคร่วมกับการก่อรูปเงินจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ และโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ รวมถึงการตรวจวัดในตัวอย่างจริงเพราะว่าวิธีนี้ให้ความไวในการวัดสูง



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



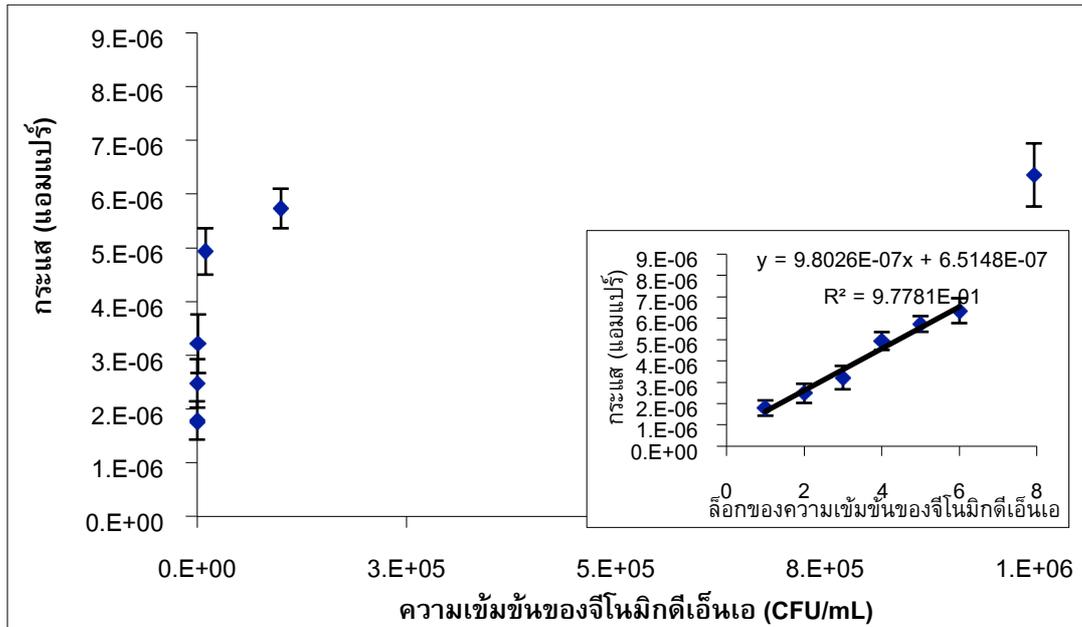
รูปที่ 3.21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสสัญญาณที่วัดได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายชนิดต่างๆ คือ ดีเอ็นเอคู่สม ดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สม และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดพลาด 1 เบส ที่ความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ ภายใต้สภาวะความคุมต่างๆ วัด ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ  $E_{dep} = -0.4$  โวลท์  $t_{dep} =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

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอไฮบริดไอโซบริดไอเซนด้วยวิธีต่างๆ โดยใช้ฉลากดีเอ็นเอบาร์โคด

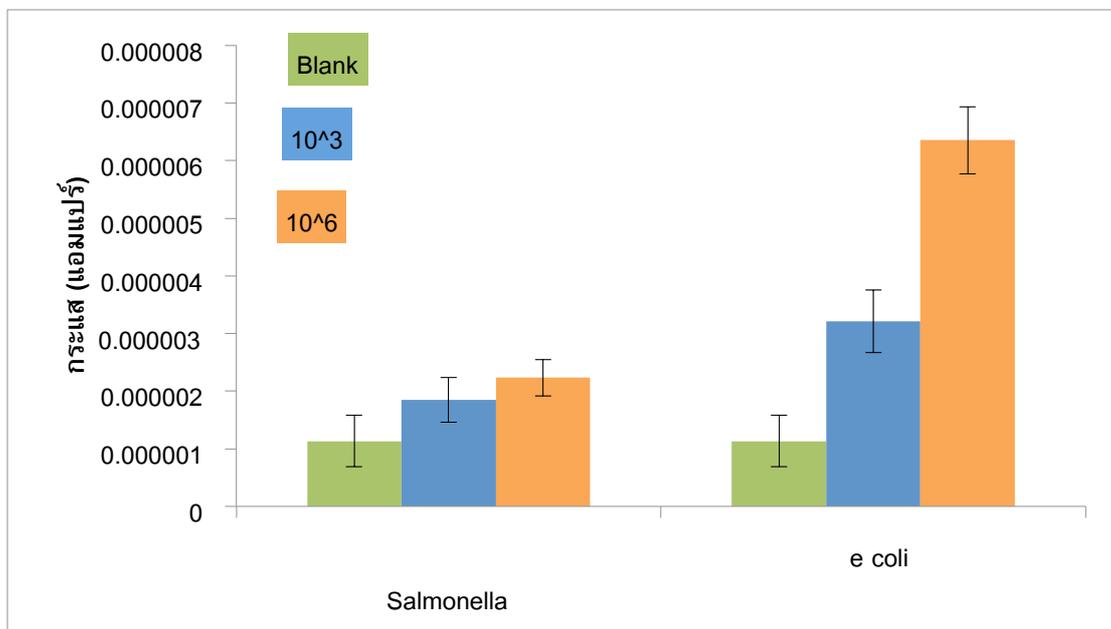
เทคนิคการวัด	การเพิ่มสัญญาณ	LOD	อ้างอิง
Scanometric	หลังจากเกิดไฮบริดไอเซนจึงทำการ dehybridized barcode DNA ให้ไปตรึงบนแผ่นแก้ว จากนั้นนำโพรบดีเอ็นเอติดอนุภาคทองคำนาโนที่เป็นคู่สมกับบาร์โคดดีเอ็นเอที่อยู่แผ่นแก้ว และปมด้วยสารก่อรูปเงินทำให้เกิดสีเทา	500 zM	Nam และคณะ (2004) <sup>35</sup>
	หลังจากเกิดไฮบริดไอเซนจึงทำการ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

### 3.5 การตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

ในการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้เลือกใช้วิธีสกัดแบบง่าย คือการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิจุดเดือดซึ่งวิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยความร้อนนี้เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้เวลาาน รวมถึงไม่มีสารเคมีอันตรายเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยในการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้เลือกใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียอีโคไลนที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการวิจัย จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้วิธีตรวจวัดแบบ Sandwich ไฮบริไดเซชันและใช้วิธีการผสมดีเอ็นเอเป้าหมายร่วมกับฉลากไบโอบาร์โคด เพื่อให้เกิดการไฮบริไดเซชันร่วมกัน 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 ไมโครลิตร พบว่าฐานเทคโนโลยีการวัดนี้สามารถตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้ต่ำกว่างานของ Hill และคณะ<sup>53</sup>ที่ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์บล็อกระหว่างการแยกสาย dsDNA เพื่อป้องกันคู่ดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกสายและสามารถตรวจวัดได้ความเข้มข้นต่ำถึงระดับ 2.5 เฟมโตโมลาร์ ( $7.5 \times 10^4$  ก๊อบป์) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษากระแสสัญญาณพื้นฐานจากการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้เชื้อซัลโมเนลล่าที่ความเข้มข้น  $10^3$  และ  $10^6$  CFU/mL เปรียบเทียบกับการใช้อีโคไลน และบัพเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อดังแสดงในรูปที่ 3.23 พบว่ากระแสสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดเชื้ออีโคไลนสูงกว่ากระแสพื้นฐานที่ได้จากการตรวจวัดเชื้อซัลโมเนลล่า และบัพเฟอร์ ถึงแม้ว่าเมื่อความเข้มข้นของซัลโมเนลล่าเพิ่มขึ้นค่ากระแสสัญญาณพื้นฐานจะสูงขึ้นเล็กน้อยก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีปริมาณชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอขนาดเล็กติดบนขั้วไฟฟ้าแบบไม่จำเพาะเจาะจงจึงทำให้เกิดสัญญาณจากโลหะเงินที่เข้าไปจับได้



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



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

#### บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้สามารถสร้างฉลากไบโอบาร์โคดลาเทคที่ช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โคด และเพิ่มสัญญาณการตรวจวัดด้วยสารก่อรูปเงิน เพื่อทำการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งแบบโดยตรงและแบบ sandwich ร่วมกับเทคนิคการตรวจวัดโลหะเงินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า anodic stripping voltammetry โดยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีน ในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอแบบ sandwich ได้ใช้พีเอ็นเอ เป็นโพรบที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้าซึ่งสามารถลดสัญญาณพื้นฐาน และการตรวจวัดแบบ sandwich แสดงความไว ในการตรวจวัดดีเอ็นเอได้ดีกว่าวิธีการวัดดีเอ็นเอโดยตรง นอกจากนี้วิธีการตรวจวัดแบบ sandwich โดยใช้พีเอ็นเอโพรบสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดด้วยความร้อนจากเชื้ออีโคไลน์

## เอกสารอ้างอิง

1. Palecek, E., Oscillographic Polarography of Highly Polymerized deoxyribnucleic acid. *Nature* **1960**, *188*, 656-657.
2. Palecek, E., From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid-Modified Electrodes. *Electroanalysis* **1996**, *8*, 7-14.
3. Kelley, S. O.; Barton, J. K.; Jackson, N. M.; Hill, M. G., Electrochemistry of methylene blue bond to a DNA-modified electrode. *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 31-37.
4. Boon, E. M.; Barton, J. K., Charge Transport in DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320-329.
5. Armistead, P. M.; Throp, H. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *117*, 8933.
6. Kelley, S. O.; Jackson, N. M.; Hill, M. G.; Barton, J. K., Long-range electron transfer through DNA films. *Angew. Chem. Int. Edn.* **1999**, *38*, 941-945.
7. Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I., Higly Sensitive Amplified Electronic Detection of DNA by Biocatalyzed Precipitation of an insoluble Product onto electrodes. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1137-1145.
8. Cai, H.; Xu, Y.; Zhu, N.; He, P.; Fang, Y., An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label. *The Analyst* **2002**, *127*, 803-808.
9. Cai, H.; Wang, Y.; He, P.; Fang, Y., Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label *Analytica Chimica Acta* **2002**, *469* (2,3), 165-172.
10. Rochelet-Dequaire, M.; Limoges, B.; Brossier, P., *Analyst* **2006**, *131*, 923-929.
11. Liu, S. F.; Li, Y.-F.; Li, J.-R.; Jiang, L., *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 789-795.
12. Kawde, A.-N.; Wang, J., Amplified Electrical Tranduction of DNA Hybridization Based on Polymeric Beads Loaded with Multiple Gold Nanoparticle Tags. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 101-107.
13. Ozsoz, M.; Erdem, A.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Tugrul, B.; Topcuoglu, N.; Ekren, H.; Taylan, M., Electrochemical Genosensor Based on Colloidal Gold Nanoparticles for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2181-2187.
14. Authier, L.; Grossiord, C.; Brossier, P.; Limoges, B., Gold Nanoparticle-Based Quantitative Electrochemical Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA Using Disposable Microband Electrodes *Anal. Chem.* **2001**, *73* (18), 4450-4456.
15. Costa-Fernandez, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A., The Use of Luminescent Quantum Dots for Optical Sensing. *Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 207-218.
16. Mikkelsen, S. R., Electrochemical Biosensors for DNA Sequence Detection. *Electroanalysis* **1996**, *8*, 15-24.
17. Shim, S. Y.; Lim, D. K.; Nam, J. M., Ultrasensitive optical biodiagnostic methods using metallic nanoparticles. *Nanomedicine* **2008**, *3* (2), 215-232.
18. Willner, I.; Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, B., Amplified detection of single-base mismatches in DNA using microgravimetric quartz-crystal-microbalance transduction. *Talanta* **2002**, *56*, 847-856.

19. Pinijsuwan, S.; Rijiravanich, P.; Somasundrum, M.; Surareungchai, W., Sub-femtomolar electrochemical detection of DNA hybridization based on latex/gold nanoparticle-assisted signal amplification. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (17), 6779-6784.
20. Rijiravanich, P.; Somasundrum, M.; Surareungchai, W., Femtomolar electrochemical detection of DNA hybridization using hollow polyelectrolyte shells bearing silver nanoparticles. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (10), 3904-3909.
21. Ding, C.; Zhang, Q.; Lin, J. M.; Zhang, S. S., Electrochemical Detection of DNA Hybridization Based on Biobarcode Method. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (10), 3140-3143.
22. Ding, C.; Zhang, Q.; Zhang, Z., An Electrochemical Immunoassay for Protein Based on Bio Barcode Method. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2434-2440.
23. Gehring, A. G.; Crawford, C. G.; Mazenko, R. S.; Van Houten, L. J.; Brewster, J. D., Enzyme-linked Immunomagnetic Electrochemical Detection of *Salmonella* typhimurium. *Journal of Immunology Methods* **1996**, *195*, 15-25.
24. K'OWino, I. O.; Agarwal, R.; Sadik, O. A., Novel Electrochemical Detection Scheme for DNA Binding Interactions Using Monodispersed Reactivity of Silver Ions. *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4344-4350.
25. Liébanaa, S.; Lermoa, A.; Campoyb, S.; Cortésb, M.; Alegreta, S.; Pividori, M., Rapid Detection of *Salmonella* in Milk by Electrochemical Magneto-Immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *25*, 510-513.
26. Pinijsuwan, S.; Rijiravanich, P.; Somasundrum, M.; Surareungchai, W., Attomolar Electrochemical Detection of DNA Hybridization Based on Enhanced Latex / Gold Nanoparticles. *Advanced Biomaterials* **2010**, *12*, B649-B653.
27. Salam, F.; Tothill, I. E., Detection of *Salmonella* typhimurium Using an Electrochemical Immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2630-2636.
28. Wang, J.; Polsky, R.; Xu, D., Silver-Enhanced Colloidal Gold Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization. *Langmuir* **2001**, *17*, 5739-5741.
29. Wang, J.; Rinc, O.; Polsky, R.; Dominguez, E., Electrochemical Detection of DNA Hybridization Based on DNA-Templated Assembly of Silver Cluster. *Electrochemistry Communications* **2003**, *5*, 83-86.
30. Yang, G.-J.; Huang, J.-L.; Meng, W.-J.; Shen, M.; Jiao, X.-A., A Reusable Capacitive Immunosensor for Detection of *Salmonella* spp. based on Grafted Ethylene Diamine and Self-Assembled Gold Nanoparticle Monolayers. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *647* (2), 159-166.
31. Zhu, N.; Zang, A.; He, P.; Fang, Y., DNA Hybridization at Magnetic Nanoparticle with Electrochemical Stripping Detection. *Electroanalysis* **2004**, *13*, 1925-1930.
32. Hu, K.; Lan, D.; Li, X.; Zhang, S., Electrochemical DNA Biosensor Based on Nanoporous Gold Electrode and Multifunctional Encoded DNA Au Bio Barcodes. *Analytical Chemistry* **2008**, *23*, 9124-9130.
33. Zhang, X.; Su, H.; Bi, S.; Li, S.; Zhang, S., DNA-based amplified electrical bio-barcode assay for one-pot detection of two target DNAs. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (8), 2730-2734.

34. Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A., Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins. *Science* **2003**, *301*, 1884-1886.
35. Nam, J. M.; Stoeva, S.; Mirkin, C. A., Bio-Bar-Code-Based DNA Detection with PCR-like Sensitivity. *Journal of American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.
36. Du, P.; Li, H.; Cao, W., Construction of DNA sandwich electrochemical biosensor with nanoPbS and nanoAu tags on magnetic microbeads. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 3223-3228.
37. Kim, J.; Seo, K.; Wang, J. In *Multiplexed electrochemical protein coding based on Quantum Dot (QD)-bioconjugates for a clinical barcode system*, Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings, 2004; pp 137-140.
38. Uhlmann, E.; Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D. W., PNA: Synthesis Polyamide Nucleic acids with Unusual Binding Properties. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2796-2823.
39. Polpanich, D.; Tangboriboonrat, P.; Elaissari, A., The Effect of Acrylic Acid Amount on the Colloidal Properties of Polystyrene Latex. *Colloid and Polymer Science* **2005**, *284* (2), 183-191.
40. Zhang, D.; Carr, D. J.; Alocilja, E. C., Fluorescent Bio-Barcode DNA Assay for the Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (5), 1377-1381.
41. Thaxton, C. S.; Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Optically and chemically encoded nanoparticle materials for DNA and protein detection. *MRS Bulletin* **2005**, *30* (5), 376-380.
42. He, M.; Li, K.; Xiao, J.; Zhou, Y., Rapid bio-barcode assay for multiplex DNA detection based on capillary DNA Analyzer. *Journal of Virological Methods* **2008**, *151* (1), 126-131.
43. Trevisan, M.; Schawaller, M.; Quapil, G.; Souteyrand, E.; Merieux, Y.; Cloarec, J.-P., Evanescent Wave Fluorescence Biosensor Combined with DNA Bio-barcode Assay for Platelet Genotyping. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *Article in Press*.
44. Xiansong, W.; Yi, S.; Shan, J.; Xuemet, M.; Yi, Z. In *Combining gold nanoparticles with real-time immuno-PCR for analysis of HIV p24 antigens*, 2007 1st International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE, 2007; pp 1198-1201.
45. Brakmann, S., DNA-based Barcodes, Nanoparticle and Nanostructure for the Ultraamplification Detection and Quantification of Protein. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5851-5855.
46. Chang, T. L.; Tsai, C. Y.; Sun, C. C.; Chen, C. C.; Kuo, L. S.; Chen, P. H., Ultrasensitive electrical detection of protein using nanogap electrodes and nanoparticle-based DNA amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22* (12), 3139-3145.
47. Goluch, E. D.; Georganopoulou, D. G.; Stoeva, S.; Nam, J. M.; Shaikh, K. A.; Ryu, K. S.; Chiesl, T. N.; Barron, A. E.; Mirkin, C. A.; Liu, C. In *Development and optimization of a lab-on-a-chip device for multiplexed ultra-sensitive detection of proteins*, AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings, 2005; p 5327.
48. Goluch, E. D.; Nam, J. M.; Georganopoulou, D. G.; Chiesl, T. N.; Shaikh, K. A.; Ryu, K. S.; Barron, A. E.; Mirkin, C. A.; Liu, C., A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* **2006**, *6* (10), 1293-1299.
49. Hill, H. D.; Mirkin, C. A., The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature Protocols* **2006**, *1* (1), 324-336.

50. Vlassiuk, I.; Kransnoslobodtsev, A.; Smirnov, S.; Germann, M., "Direct" Detection and Separation of DNA Using Nanoporous Alumina Filters. *Langmuir* **2004**, *20*, 9913-9915.
51. Nie, L. B.; Wang, X. L.; Li, S.; Chen, H., Amplification of Fluorescence Detection of DNA Based on Magnetic Separation. *Analytical Chemistry* **2009**, *25* (11), 1327-1331.
52. Thaxton, C. S.; Hill, H. D.; Georganopoulou, D. G.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A., A Bio-Bar-Code Assay Based Upon Dithiothreitol-Induced Oligonucleotide Release. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (24), 8174-8178.
53. Hill, H. D.; Vega, R. A.; Mirkin, C. A., Nonenzymatic Detection of Bacterial Genomic DNA Using the Bio Bar code Assay. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 9218-9223.
54. Stoeva, S. I.; Lee, J.-S.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A., Multiplexed DNA Detection with Biobarcode Nanoparticle probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3303-3306.
55. Zhu, D.; Tang, Y.; Xing, D.; Chen, W. R., PCR-Free Quantitative Detection of Genetically Modified Organism from Raw Materials. An Electrochemiluminescence-Based Bio Bar Code Method. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 3566-3571.
56. Zhang, D.; Huang, M. C.; Alocilja, E. C., A multiplex nanoparticle-based bio-barcode DNA sensor for the simultaneous detection of multiple pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26*, 1736-1742.