

จีโนเซนเซอร์ด้วยการตรวจสอบสีของอนุภาคเงินนาโนเพื่อใช้ในการสอบวิเคราะห์
โรคซิคุนคุนยา

นางสาวนุสรดา ดลระหมาน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

GENOSENSOR BASED ON COLORIMETRIC DETECTION USING SILVER
NANOPARTICLE FOR CHIKUNGUNYA DISEASE ASSAY

Miss Nussara Donraman

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

จีโนมเซนเซอร์ด้วยการตรวจสอบสีของอนุภาคเงินนาโนเพื่อใช้
ในการสอบวิเคราะห์โรคซิกา

โดย

นางสาวนุสรดา ดลระหมาน

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญธิดา โฆษิตทรัพย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สนั่น เอกสิทธิ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์นัยจิต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

นุสรดา ดลระหมาน : จีโนเซนเซอร์ด้วยการตรวจสอบสีของอนุภาคเงินนาโนเพื่อใช้ในการสอบ
วิเคราะห์โรคชิคุนกุนยา. (GENOSENSOR BASED ON COLORIMETRIC DETECTION
USING SILVER NANOPARTICLE FOR CHIKUNGUNYA DISEASE ASSAY)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ, 55 หน้า.

โรคชิคุนกุนยาเป็นโรคอุบัติซ้ำ สำคัญพบพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เกิดจากไวรัส
ชิคุนกุนยา(Chikungunya virus) โดยมียุงลายบ้าน(Aedes aegypti) และยุงลายสวน
(Aedes albopictus) เป็นพาหะ โรคนี้จะมีอาการ ปวดข้อ ใช้สูงเฉียบพลัน มีผื่นแดงขึ้นตาม
ร่างกายและมีลักษณะอาการ ของโรคคล้าย ไข้เลือดออก จึงจำเป็นต้องมีการวินิจฉัยโรค ที่
แม่นยำ

งานวิจัยนี้ได้ ประยุกต์เทคนิคการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายที่อุณหภูมิเดียวมาใช้ในการ
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ให้ง่ายและรวดเร็ว เพื่อลดข้อจำกัด ในการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ โดย
ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน E1 ที่มีขนาด 205 นิวคลีโอไทด์ ร่วมกับการใช้ฮาล็อกดี
เอ็นเอโพรบที่เป็นคู่สมและสามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย วิธีเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอนี้
สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ ไวรัสในระดับจำกัด หา LOD ได้ที่ 100 copies ให้
ความจำเพาะต่อ ชิคุนกุนยาไวรัสและ สามารถแยกความแตกต่างของผลการทดลองจากไวรัส
ชนิดอื่นได้แก่เดงกีไวรัส serotype 1-4, *Plasmodium falsifarum*, ไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1
การพัฒนา การตรวจสอบสัญญาณโดยใช้อนุภาคนาโนเงิน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงสี
(colorimetric detection) เกิดขึ้นเมื่อโพรบจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย การตรวจใช้เวลาทั้งหมด
1 ชั่วโมง แบ่งเป็นการเพิ่มปริมาณ 30 นาที และการตรวจสอบสัญญาณการเปลี่ยนแปลงสี
30 นาที เป็นวิธีที่ได้มีประสิทธิภาพ สามารถตอบสนอง หลักการ point of care ได้ตาม
วัตถุประสงค์

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2554.....

5172343623 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : Biosensor / Chikungunya / Silver nanoparticle / Virus

NUSSARA DONRAMAN : GENOSENSOR BASED ON COLORIMETRIC
DETECTION USING SILVER NANOPARTICLE FOR CHIKUNGUNYA DISEASE
ASSAY. ADVISOR: ASST. PROF. PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 55 pp.

Chikungunya disease is one of the important reemerging disease found in the Southern region of Thailand. It causes by Chikungunya virus which its transmission route is carried by mosquito *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* as vector. Patients having this virus showed arthrodynia symptoms, high fever suddenly, and roseola on their bodies, which similar to dengue fever. Thus it needs to be diagnosed accurately.

In this research which the technique for the amplification of E1 gene had been applied at a single temperature to increase the amount of DNA E1 instantly, and to avoid the limitations of DNA amplification in reciprocity on laboratory. Primers and probe were designed specifically to 205 nucleotide of E1 gene and used as DNA analog probes. The developed method amplified target E1 gene of Chikugunya virus at 100 copies of LOD (limit of detection) level and differentiated Chikungunya virus from other dengue viruses (DEN strain 1-4), *Plasmodium falsifarum*, and H1N1. The development of signal detection by using silver nanoparticles for colorimetric detection was based on target DNA analog DNA probe hybridization. The overall steps of detection was completed within 1 hour by nucleic acid amplification for 30 minutes and colorimetric detection for another 30 minutes. This method ensuring the need for accurate detection and the point of care principle conforming to the purposes.

Department :Botany..... Student's Signature

Field of Study :Genetics..... Advisor's Signature

Academic Year :2011.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจจะนำมากล่าวได้ทั้งหมด ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไขและดูแลเป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจตลอดการศึกษาที่ผ่านมา ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญธิดา โสมิตทรัพย์ ประธานสอบวิทยานิพนธ์และกรรมสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สมอง เอกสิทธิ์, อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนียจิต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิระศักดิ์ นายประสพ กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ และพี่น้อง ในภาควิชาและโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมาชิกห้องปฏิบัติการแพลนท์ทรานจินิก เทคโนโลยีและไบโอเซ็นเซอร์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สมอง เอกสิทธิ์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์รับรู้ภาควิชาเคมี ที่ให้การสนับสนุน ซิลเวอร์นาโน และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือในการปฏิบัติการทดลอง

สุดท้ายวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จได้เลยต้องขอขอบพระคุณครอบครัว ดลระหมาน ที่เป็นกำลังใจในทุกด้านในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.4 คำจำกัดความในการวิจัย.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	13
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	13
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	20
4.1 การศึกษารวบรวมยีนเป้าหมายของโรคชิคุนกุนยาเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์.....	20
4.2 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลการทดลอง.....	25
4.3 การเพิ่มปริมาณยีน E1 ด้วยเทคนิครีเวิร์สทรานสคริปชันร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชักนำด้วยลูปอุณหภูมิต่ำ (RT-LAMP) และด้วยปฏิกิริยาลูบโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR).....	26
4.4 การประเมินศักยภาพของชุดไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีชักนำด้วยลูปอุณหภูมิต่ำ (LAMP)	28
4.5 การตรวจสอบสัญญาณโดยใช้อุปกรณ์นาโนเงินและเปรียบเทียบผลการทดลองกับเทคนิคมาตรฐานลูบโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR) และลูปอุณหภูมิต่ำ	

	หน้า
เดี่ยว (RT-LAMP).....	32
4.6 ตรวจสอบผลการตกตะกอนของเงิน.....	35
- วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง UV-visible spectrophotometer...	35
- การตกตะกอนของอนุภาคเงินขนาดนาโนกล้องจุลทรรศน์.....	
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopeหรือ SEM).....	37
- Sodium borohydride test (NaBH ₄).....	38
4.7 ทำการทดลองกับตัวอย่างทางการแพทย์.....	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	41
สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	41
สรุปผลการทดลอง.....	47
รายการอ้างอิง.....	48
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องของยีน E1 ที่ใช้ในการอ้างอิง.....	20
2	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย สำหรับปฏิกิริยารีเวสทรานสคริปชันแบบอุณหภูมิเดียว (RT-LAMP) ปฏิกิริยาลูโซพริเมอร์เรส (RT-PCR) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โพรบชนิด Beta-pyrolidiny analog DNA probe สำหรับใช้ในการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอ ยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา.....	23
3	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา.....	24
4	ตัวอย่างทางการแพทย์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง.....	40
5	การเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างอนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำนาโน....	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การจัดลำดับของอาร์เอ็นเอไวรัส.....	6
2	แสดงการติดเชื้อไวรัสและเป็นสาเหตุของอาการปวดข้อ.....	8
3	ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ LAMP ต่างๆ ได้แก่ F3 F2 F1 และ B3 B2 B1 กับสายดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่.....	12
4	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสชิคุนกุนยา.....	21
5	แสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่จากการสังเคราะห์.....	25
6	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากงานวิจัย (CKK) สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย สายพันธุ์ที่พบในเอเชีย.....	25
7	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน และความจำเพาะของ E1 ด้วยเทคนิคลูปอูณภูมิเดี่ยว (RT-LAMP)	26
8	ความจำเพาะของปฏิกิริยาการทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยชุดไพรเมอร์ด้วยเทคนิครีเวอร์สทรานสคริปชันร่วมกับการเพิ่มปริมาณโดยการชักนำด้วยลูปอูณภูมิเดี่ยว พีซีอาร์ การเปลี่ยนแปลงทางสีของแสง.....	29
9	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน E1 กับแม่แบบดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณในรูปจำนวนชุดหรือ ก็อปปีจาก 10^6 - 10^2 ก็อปปีด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูปอูณภูมิเดี่ยวเปรียบเทียบกับวิธีอาร์ทีพีซีอาร์.....	31
10	ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของตะกอนอนุภาคเงินนาโนเปรียบเทียบกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูปอูณภูมิเดี่ยวเปรียบเทียบกับวิธีอาร์ทีพีซีอาร์.....	33
11	แสดงการทดสอบการใช้งานและปรับเปลี่ยนสถานะของโพรบและเกลื่อให้เหมาะสม.....	34
12	การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีทางแสงโดยค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคเงินนาโนสีน้ำเงิน.....	35
13	ภาพถ่ายจากกล้องอีเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	37
14	ผลการทดสอบด้วยไฮเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4).....	38
15	ผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำไดโนนำตัวอย่างเชื้อที่เป็นชุดควบคุมบวกมาทดลอง 10 ซ้ำ.....	39

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคชิคุนกุนยา (Chikungunya) หรือไข้ปวดข้อยุ่งกลายเป็นโรคที่อุบัติซ้ำพบมากในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ที่ผ่าน มามีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจากโรคชิคุนกุนยากว่า 20,000 รายและมีการระบาดต่อไปยังพื้นที่ภาคอื่น Chikungunya มาจากภาษา Makonde ซึ่งเป็นภาษาท้องถิ่นของแอฟริกา อธิบายถึงลักษณะบิดเบี้ยวหรือบิดงอตัว (contorted) จากอาการปวดข้ออย่างรุนแรง (วรุฒิ เจริญศิริ, 2552: ออนไลน์)

โรคชิคุนกุนยาเกิดขึ้นครั้งแรกที่ทวีปแอฟริกาบริเวณพรมแดนระหว่างประเทศแทนซาเนีย และโมแซมบิกในปี ค.ศ. 1952-1953 และได้แพร่ระบาดไปยังทวีปอื่น ๆ รวมทั้งทวีปเอเชีย โดยพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 ที่กรุงเทพฯ หลังจากนั้นมียุทธศาสตร์ผู้ป่วยในบางปีคือ ที่จังหวัดปราจีนบุรี (พ.ศ. 2519) จังหวัดสุรินทร์ (พ.ศ. 2531) จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดปราจีนบุรี (พ.ศ. 2534) จังหวัดเลยและจังหวัดพะเยา (พ.ศ. 2536) จังหวัดนครศรีธรรมราชและจังหวัดเลย ซึ่งพบผู้ป่วย 576 ราย และจังหวัดหนองคาย 94 ราย (พ.ศ. 2538) และการระบาดที่พบครั้งล่าสุดในเดือนกันยายน พ.ศ. 2551 ที่ จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดปัตตานี จำนวน 2,494 ราย ในปี 2552 จำนวน 22,248 ราย(ข้อมูล ณ วันที่ 26 พฤษภาคม 2552) ส่วนใหญ่พบที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดสงขลา จังหวัดปัตตานี และจังหวัดยะลา และโรคมีการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่อื่น ๆ ทางตอนบนของประเทศอย่างต่อเนื่อง ซึ่งทิ้งช่วงห่าง 13 ปีจากการระบาดครั้งก่อน (กระทรวงสาธารณสุข, 2552: ออนไลน์)

โรคนี้มีเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค มียุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) เป็นพาหะนำโรค โดยทั่วไปเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจะมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เอเชียและสายพันธุ์แอฟริกา โดยพบว่าที่มีการระบาดอยู่ในเมืองไทยเป็นสายพันธุ์ แอฟริกาที่มีการกลายพันธุ์จาก ที่เคยจำเพาะสำหรับยุงลายบ้านสามารถมาอยู่ในยุงลายสวนซึ่งคนไทยส่วนใหญ่จะไม่มีภูมิคุ้มกันจากโรคนี้ เพราะเป็นโรคที่ไม่มีการระบาดมานาน เมื่อมีการระบาดจึงมีผู้ป่วยที่ ได้รับเชื้อจำนวนมาก (ยง ภู่วรรณ, 2552)

ลักษณะการระบาดของโรคไข้ชิคุนคุนยา มีการแพร่ 2 วงจร ได้แก่

1. Primate cycle (ลิง-ยุง-คน) เป็นวงจรการแพร่เชื้อที่พบในทวีปแอฟริกา โดยมีลิงเป็น Amplifier host คือ เชื้อไวรัสชิคุนคุนยาจะเพิ่มจำนวนในลิงและเมื่อมียุงลายมากัดลิงที่มีเชื้อโรค ยุงจะเป็นพาหะนำเชื้อจากลิงสู่คน และคนจะนำเชื้อสู่ชุมชนเมือง

2. Urban cycle (คน-ยุง-คน) สำหรับวงจรการแพร่เชื้อลักษณะนี้พบในทวีปเอเชีย ซึ่งการเกิดโรคจะพบในเมือง จากคนไปสู่มนุษย์โดยมียุงลายเป็นพาหะที่สำคัญ สำหรับการระบาดของชนิดนี้มีรูปแบบการระบาดคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้อที่นำโดยยุงลายอื่น ๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับการแพร่กระจายและความชุกชุมของยุงลาย (โครงการพัฒนาศูนย์ความรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สวทช, 2552: ออนไลน์)

โรคชิคุนคุนยาเป็นโรคที่ติดต่อโดยยุงที่คล้ายกันกับโรคไข้เลือดออก หลังจากยุงลายกัดผู้ป่วยที่อยู่ในระยะไข้สูง ซึ่งเป็นระยะที่มีไวรัสอยู่ในกระแสเลือดสูง เชื้อไวรัสจะเข้าสู่กระเพาะของยุงและเพิ่มปริมาณในกระเพาะของยุง แล้วจะเคลื่อนที่เข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง เชื้อไวรัสจะอยู่ในตัวยุงได้ตลอดอายุขัยของยุง (ประมาณ 8 วัน) และเมื่อยุงมากัดคนปกติ ก็จะถ่ายทอดเชื้อไวรัส มาสู่คนทำให้คนนั้นเกิดอาการของโรคได้ (สวทช, 2552: ออนไลน์)

การติดเชื้อก่อให้เกิดอาการไข้สูงอย่างเฉียบพลัน มีผื่นแดงขึ้นตามร่างกายและอาจมีอาการคัน พบว่าบางคนมีอาการตาแดง ส่วนใหญ่อาการในเด็กจะไม่รุนแรง เท่ากับในผู้ใหญ่ สำหรับในผู้ใหญ่อาการที่เด่นชัดคืออาการปวดข้อจะมีอาการข้ออักเสบโดยเฉพาะกับข้อที่มีขนาดเล็กๆ ได้แก่ ข้อมือ ข้อเท้า อาการปวดข้อจะมีการเปลี่ยนตำแหน่งในการปวดไปเรื่อยๆ (migratory polyarthritis)(Staples *et al.*, 2009) ในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการรุนแรงมากจนบางครั้งขยับข้อไม่ได้ อาการปวดข้อจะค่อยๆหายไปภายใน 1-2 สัปดาห์แต่ในผู้ป่วยบางรายอาการปวดข้อจะอยู่ได้นานเป็นปี ไม่พบประวัติผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงถึงช็อกและเสียชีวิต โรคชิคุนคุนยาก็คือโรคที่ไม่มีการรักษาที่จำเพาะเจาะจง การรักษาเป็นไปตามอาการที่เกิดขึ้น (วรวิมล เจริญศิริ, 2552:ออนไลน์) อย่างไรก็ตาม อาการที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายกับโรคที่มียุงลายเป็นพาหะ ได้แก่ โรคไข้เลือดออก เพียงแต่มีอาการไม่รุนแรงเท่า ดังนั้นจึงควรมีวิธีการวินิจฉัยที่ถูกแม่นยำและรวดเร็วสำหรับ วิธีการตรวจโรคชิคุนคุนยาในปัจจุบันได้แก่ แยกเชื้อไวรัสจากเลือดผู้ป่วยระยะเริ่มมีอาการในช่วง 2-3 วันได้ โดยการเพาะเชื้อในลูกหนูไม่ซีแรกเกิด ในยุง หรือในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสได้อย่างแม่นยำ (Sudeep and Parashar, 2008) แต่วิธีการนี้ใช้เวลาในการวินิจฉัยนานจึงจะทราบผลการตรวจ นอกจากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจทางเซรัมวิทยา ได้แก่ Haemagglutination Inhibition assay และ enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

ทั้งสองเป็นการตรวจทางด้านเซรั่มวิทยาเพื่อหาโปรตีนที่ถูกกระตุ้นให้สร้างที่จำเพาะต่อเชื้อโดยจะ
ใช้หลังการจับตัวของแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจโดยจะฉาบผิวหน้าที
เป็นของแข็งด้วยแอนติบอดีแล้วจึงเติมเซรั่มที่ต้องการทำการตรวจ จากนั้นทำการเติมแอนติบอดีที่
ติดฉลากด้วยเอมไซม์ลงไปทำการเติมขั้นสุดตรงลงไปจะสามารถแปลผลได้จากการเปลี่ยนแปลงสี
ของชั้นสเตรด เป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือและมีความไวสูง แต่ไม่สามารถตรวจได้ในระยะแรกของการ
ติดเชื้อ (Gadkari and Sheikh, 1984)

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคทางด้าน อดนูชีววิทยา ได้แก่การตรวจด้วย เทคนิคอาร์ทีพีซี
อาร์ เป็นเทคนิคที่ง่ายสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย
การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (Dash *et al.*, 2008) สำหรับเทคนิคนี้มีข้อจำกัดที่จะต้องทำการวินิจฉัย
ในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะการตรวจด้วย Real-time PCR ที่ช่วยให้การวินิจฉัยโรคซิกนุญยาสา
สามารถใช้งานได้อย่างรวดเร็วและทราบจำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (Edwards *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม
ก็วิธีพีซีอาร์ดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและอาศัยนักวิจัยที่มีความชำนาญ

งานวิจัยชิ้นนี้จึงต้องการพัฒนาการตรวจสอบบนพื้นฐานไบโอเซ็นเซอร์ที่สามารถ
ใช้งานได้ง่ายรวดเร็วแม่นยำ ที่สำคัญสามารถใช้ทดสอบในภาคสนามได้โดยนำความรู้ที่พัฒนาขึ้น
ก่อนหน้านี้นี้มาประยุกต์ (ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ, 2549) เทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ (biosensor) หรือยีน
เซ็นเซอร์ (genosensor) เป็นเทคนิคที่มีการนำเอาความรู้ทางด้านฟิสิกส์เป็นพื้นฐานในการ
ประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเครื่องมืออุปกรณ์ หรือวิธีการ โดยอาศัยคุณสมบัติของการตรวจจับ
สัญญาณ โดยอาศัยตัวรับสัญญาณ (receptor) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ดังนั้น
หลักการตรวจวิเคราะห์ ดีเอ็นเอด้วยไบโอเซ็นเซอร์จะมีความจำเพาะของสัญญาณดีเอ็นเอซึ่งได้
จากคุณสมบัติจับตัวจำเพาะของคู่สม (complementary) ทั้งในรูปโพรบ ในปฏิกิริยา ไฮบริดเซชัน
หรือในรูป ไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยสัญญาณดังกล่าวจะสอดคล้องกับปริมาณดีเอ็นเอใน
ระบบขณะที่ตัวแปลงสัญญาณอาจเป็นได้ทั้งการแปลงในรูปไฟฟ้า เช่นการเปลี่ยนแปลงของความ
ต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้า และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแสง การวัดค่า resonance ที่ทำให้
เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงเป็นต้น การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางฟิสิกส์ดังกล่าวสามารถ
ตรวจวัดพร้อมกับแสดงค่าที่ได้จากการตรวจวัดให้ออกมาในรูปแบบเดียวกับตัวเลขที่สอดคล้องกับ
ปริมาณสัญญาณจริงที่ได้รับ หรือความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอย่างง่าย และในหลายกรณียัง
สามารถ ตรวจวัดได้อย่างต่อเนื่อง และด้วยความจำเพาะ ของดีเอ็นเอคู่สมที่ช่วยให้เกิด
ความจำเพาะอย่างสูง ความง่ายและควมไวในการตรวจวัดจึงทำให้ไบโอเซ็นเซอร์สำหรับตรวจดี
เอ็นเอสามารถตอบสนอง point of care ได้ดี

ไบโอเซ็นเซอร์บนการวัดทางแสงเป็นที่ได้รับความสนใจกันอยู่ในขณะนี้ ได้แก่การใช้อนุภาคนาโนของโลหะโดยเฉพาะ ทองคำ นาโนในการตรวจสอบอาศัยหลักการ surface plasmon resonance ซึ่งขึ้นกับการ resonance ของอนุภาคทองคำ จากปรากฏการณ์ที่การสั่นสะเทือนกลุ่มหมอกอีเล็กตรอนจะเกิดสูงกว่าโปรตรอนของอนุภาคเมื่อได้รับแสง (photon) เป็นตัวกระตุ้น หากบนอนุภาคทองคำนั้นมีโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ติด องค์การวัดปรากฏอยู่ก็จะส่งผลไปถึงอัตราการสั่นสะเทือนนี้ให้เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลต่อไปยังการเปลี่ยนแปลงของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของแสงทำให้แสงสะท้อนและหักเหด้วยระนาบและความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไปจากเดิม เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า พลาสมอน (plasmon) ดังนั้นหากสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงไปของแสงในรูปการกระเจิงแสงที่เปลี่ยนไปได้ก็จะตรวจวัดได้ว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบอยู่หรือไม่ สำหรับอนุภาคทองคำนอกจากเกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบ resonance แล้ว อนุภาคทองคำที่แขวนลอยในรูปสารละลาย ยังสามารถจับตัวและตกตะกอนในสภาวะที่มีดีเอ็นเอได้ การกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของอนุภาคโดยดีเอ็นเอก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี ของแสงที่สะท้อนออกมาจากอนุภาคในรูปของพลาสมอน การเปลี่ยนสีสามารถวัดได้ในรูปของ colorimetric detection ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวของคลื่นแสงและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้น (Chaumpluk *et al.*, 2006)

วิทยานิพนธ์นี้มุ่งพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสซิกาคุณภาพโดยนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอ (cDNA) อย่างจำเพาะและเหมาะสมแล้วนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางด้านไบโอเซ็นเซอร์บนการวัดทางแสงโดยใช้อนุภาคนาโนเพื่อช่วยให้การวิเคราะห์สัญญาณดีเอ็นเอทำได้ง่ายและรวดเร็วซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการทางฟิสิกส์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับสัญญาณ สามารถตรวจสอบสัญญาณได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวของคลื่นแสงและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไป โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อโรคซิกาคุณภาพได้ให้สอดคล้องกับหลักการ point of care ในอนาคตได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาจีโนเซ็นเซอร์ด้วยการตรวจสอบสีของอนุภาคนาโนเพื่อใช้ในการตรวจสอบโรคซิกาคุณภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา ออกแบบไพรเมอร์บนพื้นฐานลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของยีนของไวรัสชิคุนกุนยา ที่ปรากฏจัดให้อยู่ในรูปแบบ FASTA format แล้วตรวจสอบหาความจำเพาะเจาะจงด้วยโปรแกรม Blastn เพื่อใช้เป็นโมเดลอ้างอิง สังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โคลนยีนและตรวจสอบยีนที่ได้เพื่อใช้เป็นโมเดลควบคุมบวก พัฒนาวิธีการตรวจสอบโดยอาศัยการประยุกต์วิธีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ปนอยู่และตรวจสอบด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ โดยใช้อนุภาคเงินนาโนสีฟ้า

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

จีโนเซ็นเซอร์ ไบโอเซ็นเซอร์ ชิคุนกุนยาไวรัส อนุภาคเงินนาโน RT-LAMP

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีตรวจสอบโรคชิคุนกุนยาที่สามารถนำไปใช้ทดสอบอย่างรวดเร็วและได้ผลการวิจัยที่ใช้เป็นพื้นฐานร่วมในการวินิจฉัยโรคได้

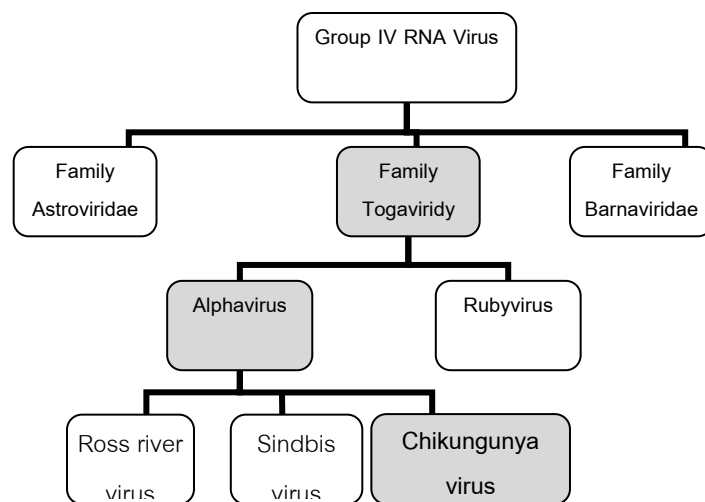
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคชิคุนกุนยาหรือไข้ปวดข้อยุ่งลาย (Chikungunya fever) เป็นโรคที่ผู้ป่วยจะมีอาการปวดข้อ โรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์เอเซียและสายพันธุ์แอฟริกา โดยมียุ่งลายบ้านและยุ่งลายสวนเป็นพาหะนำโรค โรคดังกล่าวมีถิ่นกำเนิดที่ทวีปแอฟริกาก่อนจะแพร่ระบาดไปยังหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย โดยในปลายปี พ.ศ.2551 พบมีการระบาดในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ยะลา สงขลา ปัตตานี และสตูล ส่งผลให้ปี พ.ศ.2552 มีผู้ป่วยกว่า 20,000 รายที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดนี้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้หายไปจากประเทศไทยเป็นเวลานานเมื่อมีการแพร่ระบาดของโรค อีกทั้งทำให้ติดต่อดีง่าย เพราะยังไม่มีภูมิคุ้มกันโรคในประชากรมาก่อน

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus) เป็นอาร์เอ็นเอไวรัสกล่าวคือไวรัสที่มีสารพันธุกรรม ribonucleic acid เป็น RNA จากแผนผังการจัดลำดับของอาร์เอ็นเอไวรัส (รูปที่ 1) ไวรัสนี้จัดอยู่ในวงศ์ Togaviridae และสกุล Alphavirus ต้องอาศัยแมลงเป็นพาหะนำโรค ซึ่งในกรณีโรคไข้ชิคุนกุนยามียุ่งลายเป็นพาหะ



ที่มา : Anand, 2009: online

รูปที่1 แสดงแผนผังการจัดลำดับของอาร์เอ็นเอไวรัสอยู่ในวงศ์ Togaviridae และสกุล Alphavirus

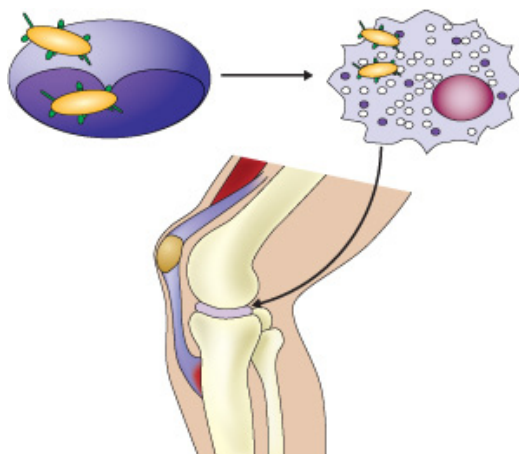
สำหรับโรคชิคุนคุนยาที่ระบาดในประเทศไทยปี พ.ศ. 2552 (กระทรวงสาธารณสุข, 2552: ออนไลน์) นั้นเป็นไวรัสสายพันธุ์แอฟริกาที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 226 ของยีน E1 โดยการแทนที่จากเบสอะลานีน (alanine) เป็น วาลีน (valine) (E1: A226V) (Kumar et al., 2008) การกลายพันธุ์ ส่งผลกับการระบาดผ่านพาหะ จากยุงลายบ้านมาอยู่ในยุงลายสวนหรือที่เรียกว่า ยุงลายเสือ ที่อาศัยอยู่ตามสวน (ยง ภูววรรณ, 2552) การแพร่เชื้อจากยุงลายสู่คนเกิดจากเมื่อ ยุงลายตัวเมียกัดและดูดเลือดผู้ป่วยที่อยู่ในระยะมีไข้สูงซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่ผู้ป่วยมีเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือด เชื้อไวรัสจะเข้าสู่ กระเพาะยุงและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นจากนั้นจะเดินทางเข้าสู่ต่อมน้ำลาย เมื่อยุงที่มีเชื้อไวรัสอยู่ไปกัดคนอื่นก็จะปล่อยเชื้อไปยังคนที่ถูกกัดทำให้คนนั้นได้รับเชื้อ โรคชิคุนคุนยาจะพบมากในช่วงฤดูฝนเมื่อประชากรของยุงมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและมียุงลายที่มีเชื้อเพิ่มขึ้น สามารถพบได้ในทุกกลุ่มอายุแต่ในผู้ใหญ่จะมีอาการรุนแรงกว่าในเด็ก

สำหรับอาการของคนที่ติดเชื้อไวรัสชิคุนคุนยาจะมีอาการไข้สูงอย่างเฉียบพลัน มีผื่นแดงขึ้นตามร่างกาย มีอาการคันร่วมด้วยในผู้ป่วยบางราย พบมีอาการตาแดง (conjunctival injection) แต่ไม่พบจุดเลือดออกในตาขาว สำหรับอาการปวดที่พบเจอในผู้ใหญ่ได้แก่อาการปวดข้อที่เป็นอาการที่เด่นชัดและจะพบข้ออักเสบได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไวรัสไปทำลายบริเวณข้อ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อเล็กๆ เช่น ข้อมือ ข้อเท้า อาการปวดจะรุนแรงมากจนในบางครั้งไม่สามารถขยับข้อได้ ในผู้ป่วยบางรายอาการปวดข้อจะหายภายใน 1-2 สัปดาห์ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดข้อเกิดขึ้นได้อีกภายใน 2-3 สัปดาห์ต่อมาและบางรายอาการดังกล่าวจะอยู่ได้นานเป็นปี แต่จะไม่พบผู้ป่วยที่มีอาการข้ออักเสบที่แตกต่างจากผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออก โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างไข้ชิคุนคุนยากับโรคไข้เลือดออกได้ (World Health Organization, 2008) ดังนี้

1. ไข้ชิคุนคุนยาจะมีอาการไข้สูงอย่างฉับพลันกว่าในโรคไข้เลือดออกแต่มีระยะไข้สั้นกว่า
2. ไข้ชิคุนคุนยาจะพบอาการปวดกล้ามเนื้อ (myalgia) และปวดข้อ (arthralgia) ได้บ่อยกว่าไข้เลือดออก
3. ไข้ชิคุนคุนยามักมีอาการช้ำได้มากกว่าไข้เลือดออกเพราะสาเหตุเนื่องมาจากมีไข้สูงอย่างฉับพลัน
4. ไม่พบภาวะเกล็ดเลือดต่ำในผู้ป่วยไข้ชิคุนคุนยา
5. ไม่พบผู้ป่วยรุนแรงมากจนต้องมีอาการช็อกจากการเป็นไข้ชิคุนคุนยา

ดังนั้นจากกรณีดังกล่าวจะพบว่าอาการของโรคซิคุนกุนยาจะไม่ต่างจากอาการของผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกแต่อย่างใด การวินิจฉัยโรคจึงจำเป็นต้อง ดำเนินการในลักษณะที่ระบุชนิดของไวรัสได้อย่างถูกต้อง

Singapore Immunology Network, 2010 (ออนไลน์) ได้ประสบความสำเร็จในการอธิบายกลไกการติดเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส เชื่อมโยงกับอาการเริ่มจาก เชื้อไวรัสติดเชื้อภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocytes) ในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อไวรัสซิคุนกุนยาจะแพร่กระจายภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งปกติน้ำที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้คือทำลายเชื้อโรคที่เข้าไปยังร่างกายโดยอาศัยวิธี ฟาโกไซโทซิส อย่างไรก็ตาม เซลล์ชนิดนี้ไม่เพียงแต่จะเพิ่มปริมาณการติดเชื้อแต่ยังสามารถควบคุมระดับเชื้อไวรัสในเลือดได้อีกด้วย โดยแหล่งกำเนิดเม็ดเลือดขาวอยู่ที่ไขกระดูก เมื่อ เม็ดเลือดขาวติดเชื้อเป็นสาเหตุให้เกิดอาการปวดข้อ (รูปที่ 2) อาการปวดข้อที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสซิคุนกุนยา เกิดจากการแพร่กระจายเชื้อของไวรัสไปยังข้อต่อซึ่งเป็นบริเวณที่มีเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก โดยโมโนไซต์ที่ติดเชื้ออาจนำไปสู่การแพร่กระจายเชื้อไวรัสไปยังส่วนต่างๆของร่างกายอย่างต่อเนื่อง โดยปกติร่างกายมนุษย์สามารถลดระดับไวรัสในเลือดได้ภายใน 2-3 วันของการติดเชื้อไวรัส



ที่มา: International research team led by Lisa Fong Poh Ng from A*STAR's Singapore Immunology Network, 2010: online

รูปที่ 2 แสดงการติดเชื้อไวรัสและเป็นสาเหตุของอาการปวดข้อ

ในส่วนของกรการรักษาพบว่า ในปัจจุบันยังไม่มีกรรักษาที่จำเพาะเจาะจงสำหรับโรคนี้ ส่วนใหญ่เป็นการรักษาตามอาการ เช่น รักษาอาการปวดข้อ การให้รับประทานยาลดไข้ และ พักผ่อน (สำนักกระบาดวิทยา, 2552) การวินิจฉัยเบื้องต้นสามารถทำได้โดยวินิจฉัยจาก ลักษณะอาการภายนอกได้แก่ ไข้สูง ผื่น ปวดกล้ามเนื้อ ปวดกระดูกหรือข้อ ปวดศีรษะ ปวดกระบอกตา เลือดออกตามผิวหนัง อาการดังกล่าวมีลักษณะใกล้เคียงกับอาการของโรคที่มีไวรัสชนิดเดงกีที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีวินิจฉัยที่ให้ผลแม่นยำ

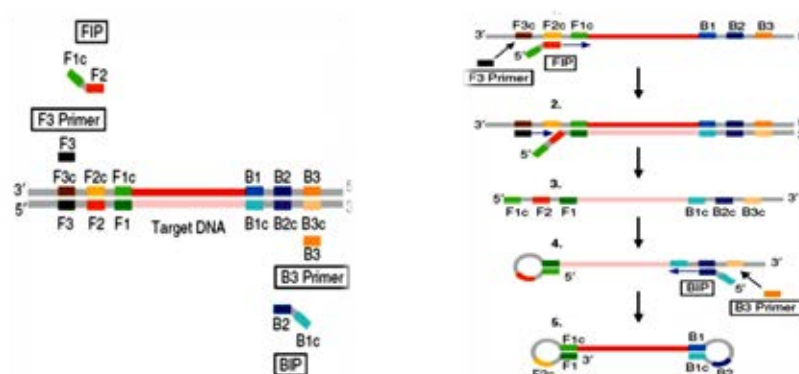
ที่ผ่านมาการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเพาะเชื้อไวรัสในลูกหนู การตรวจทางเซรัมวิทยาและการตรวจด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในลูกหนูเป็นวิธีที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ ไวรัสและดูลักษณะของเชื้อได้อย่างแม่นยำแต่ ตัววิธีการ มีข้อจำกัด ที่จำเป็นต้องทำภายใต้การควบคุมด้านความปลอดภัยทางชีวภาพและใช้เวลานานกว่าจะทราบผล นอกจากนี้วิธีนี้แล้วยังมีวิธีการทางเซรัมวิทยา เช่นวิธี ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดี IgM หรือ IgG ต่อเชื้อ Alphavirus เป็นเทคนิคที่ใช้งานได้ง่ายและรวดเร็วสำหรับการตรวจโรคไวรัสที่มีแมลงเป็นพาหะนำโรค (Clarke and Cassals, 1958) แต่วิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบในระยะแรกของการติดเชื้อได้ (Laurent *et al.*, 2007) และการตรวจด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา ที่นิยมได้แก่วิธี RT-PCR วิธีดังกล่าวใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอาไว้ 1 คู่ คือ forward และ reverse โดยจะออกแบบคร่อมยื่นเป้าหมายที่เหมาะสมแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ร่วมกับ DNA polymerase ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่เป็นจำนวนมาก วิธี RT-PCR เป็นวิธีตรวจสอบที่ให้ผลรวดเร็วและจำเพาะเจาะจง สามารถตรวจสอบได้ถึงระดับจีโนมได้ อย่างแม่นยำ (Dash *et al.*, 2008) สำหรับเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลอีกเทคนิคคือ real-time RT-PCR เป็นเทคนิคที่สามารถ คำนวณ ความเข้มข้นและจำนวนของดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณได้ (Edwards *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้จำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือที่มีราคาแพงและต้องอาศัยนักวิจัยที่มีความชำนาญ

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ในปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่กำลังได้รับการพัฒนาอย่างแพร่หลายอีกเทคนิคหนึ่งคือเทคนิคทางด้านไบโอเซ็นเซอร์ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้งานได้ง่ายรวดเร็วสามารถตอบสนอง หลักการ point of care หรือการตรวจได้ทุกที่ทุกเวลาและสถานที่ที่ต้องการ โดยจะมีกระบวนการอยู่ 3 ขั้นตอน คือ การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ (DNA, RNA extraction) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้จำนวนมาก (amplification) และ การตรวจวิเคราะห์สัญญาณ ดีเอ็นเอ

(detection) ไบโอดีเอ็นเอในปัจจุบันแบ่งเป็นกลุ่มของเทคโนโลยีได้เป็น ไบโอดีเอ็นเอเซนเซอร์บนการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมี ได้แก่การวัดค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า หรือการวัดกระแส ไบโอดีเอ็นเอเซนเซอร์บนหลักการ สั่นสะเทือนทางเสียง และ ไบโอดีเอ็นเอเซนเซอร์บนการวัดทางแสง (ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ , 2551) สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้สนใจไบโอดีเอ็นเอเซนเซอร์ที่วัดการเปลี่ยนแปลงทางแสงเช่น การวัดค่า resonance การเปลี่ยนแปลงของสีของแสง (colorimetry) โดยเฉพาะการนำอนุภาคนาโนเงินของโลหะมาใช้ประกอบ ที่ผ่านมางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ ไบโอดีเอ็นเอเซนเซอร์ด้านดังกล่าวกำลังเป็นที่สนใจโดยที่ผ่านมา Li and Rothberg (2004) ประสบความสำเร็จในการใช้อุณหภูมิของค่านาโน ในการตรวจสอบเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางสี โดยเขาค้นพบว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) สายเดี่ยว (single stand DNA; ssDNA) และสายคู่ (double stand DNA; dsDNA) มีความสามารถในการดูดซับบนผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนคอลลอยด์ได้แตกต่างกัน เนื่องจาก dsDNA จะไม่ถูกดูดซับบนผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโน (AuNPs) ทำให้ทองคำตกตะกอนแต่ในขณะที่ ssDNA สามารถดูดซับบนผิวของอนุภาคทองคำได้จึงตรึงอนุภาคทองคำเอาไว้ทำให้อนุภาคไม่ตกตะกอน ในสถานะที่มีความเข้มข้นเกลือในปริมาณที่เหมาะสม โดยจะเห็นความแตกต่างของคอลลอยด์ได้ภายในเวลา 2-5 นาที อย่างไรก็ตามเทคนิคที่ Li and Rothberg นำเสนอนี้เป็นเทคนิคที่ไม่ให้ความจำเพาะต่อดีเอ็นเอแม่แบบจึงไม่สามารถแยกความแตกต่าง ดีเอ็นเอแม่แบบออกจากเป้าหมายที่ไม่ใช่แม่แบบได้ Kanjanawarut and Su ได้เลือกวิธีการใช้โพรบที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิด analog DNA ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกสายเดี่ยว (ssDNA) ที่มีความคล้ายกับดีเอ็นเอเช่นเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ แต่ จะมีความแตกต่างกันตรงที่แกนของดีเอ็นเอที่เป็นน้ำตาลและเชื่อมกับฟอสเฟต (sugar-phosphate backbone) ได้ถูกแทนที่โดยแกนโพลีเอไมด์ที่เป็นกลาง เมื่อออกแบบ analog DNA ให้มีลักษณะเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาการ ไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอได้ จากการทดลองพบว่าหากมีเพียง analog DNA อย่างเดียวในปฏิกิริยาโดยปราศจากดีเอ็นเอเป้าหมายก็จะทำให้อนุภาคทองคำตกตะกอน แต่ถ้ามีดีเอ็นเอเป้าหมายและ analog DNA ที่เป็นคู่สมกันแล้วก็จะสามารถตรึงอนุภาคทองคำไม่ให้เกิดตะกอนได้ จะสามารถเห็นความแตกต่าง ของผลการทดลอง จากการเปลี่ยนแปลงทางสีของอนุภาคทองคำนาโนได้ แต่งานวิจัยดังกล่าวทำการทดลองเฉพาะแม่แบบที่เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ไม่ได้ทดลองกับดีเอ็นเอจริง ที่มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อน นอกจากอนุภาคทองคำนาโนแล้วปัจจุบันมีการนำอนุภาคนาโนมาประยุกต์ใช้กับ colorimetric detection

เนื่องจากเงิน มีค่าการดูดกลืนแสง สูงกว่าทองคำ เมื่อวิเคราะห์ทาง colorimetric detection จึงตอบสนองในรูปสัญญาณได้ดี และเงินมีต้นทุนต่ำกว่าทองคำ Thompson *et al.*, (2008) ใช้อนุภาคเงินชนิดอนุภาคนาโนเงินสีเหลือง (yellow silver nanoparticle) กับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสง (colorimetric) ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบโพลิโกนิวคลีโอไทด์ เพื่อสามารถแยกแยะความผิดปกติของเบสระดับ 1 ตำแหน่ง ได้ (single base mismatch) โดยจะมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคนาโนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู การเปลี่ยนแปลงของสีของอนุภาคนาโนปกติมีสีเหลืองเมื่อเกิด ปฏิกริยาจะ แยกความแตกต่างออกจากกันได้ ไม่ชัดเจน สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ต้องการ พัฒนาระบบไบโอเซน เซอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยไวรัส โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน E1 ให้ได้จำนวนมาก ด้วยอาศัย เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ ลูปชักนำด้วยอุณหภูมิเดียว (Loop-mediated isothermal Amplification of DNA; LAMP) เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดทางเทคนิคของอาร์ทีพีซีอาร์ ในส่วนของ ลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการและ ผู้ชำนาญการเฉพาะทาง ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี LAMP นี้ลดการพึ่งพา เครื่องมือโดยเฉพาะเครื่อง thermocycler เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการใช้อุณหภูมิคงที่ค่า เดียวในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นอก ห้องปฏิบัติการได้

วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปอุณหภูมิเดียว (LAMP) อยู่บนหลักการที่ดีเอ็นเอ สายคู่จะแยกสายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้ หลักการ การขจัดสายดีเอ็นเอ (strand displacement synthesis) ดีเอ็นเอแม่แบบจำเป็นจะต้องมีการรักษาเสถียรภาพโครงสร้างดีเอ็นเอ ให้อยู่ในรูปดีเอ็นเอสายเดี่ยว (linear) ตลอดเวลาจะต้องไม่จับกันเป็นสายคู่ (helix) ซึ่งทำได้โดยการเติมสารเคมีที่มีคุณสมบัติทำลายความเป็นสายคู่ของดีเอ็นเอ (helix destabilizing agent) ได้แก่ betain หรือ L-proline สารเหล่านี้จะช่วยลดแรงดึงในโครงสร้างส่วนที่เป็น base stacking ทำให้ไพรมอร์ตัวแรกสามารถ เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบโดยปราศจากการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ สูงในการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ ในขั้นตอน denaturation เหมือนวิธีพีซีอาร์ โดยการสังเคราะห์ สายดีเอ็นเอสายใหม่ เกิดจาก การขจัดสายแม่แบบเดิมให้หลุดออกและ อาศัยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ร่วมกับไพรมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณของยีน 6 บริเวณ ได้แก่ F1 F2 F3 B1 B2 และ B3 (Notomi *et al.*, 2000)



รูปที่ 3 ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ LAMP ต่างๆ ได้แก่ F3 F2 F1 และ B3 B2 B1 กับสายดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Tomita *et al.*, 2008)

โดยไพรเมอร์หลักด้านนอก (F3, B3) ทำหน้าที่เหมือน forward และ reverse ในปฏิกิริยา พีซีอาร์ (รูปที่ 3) และไพรเมอร์ด้านใน ไพรเมอร์คู่สมของ F1 และ F2 และเป็น ไพรเมอร์คู่สมของ B1 และ B2 โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุดมีค่า T_m ต่างกัน และความเข้มข้นด้านนอกมากกว่าไพรเมอร์ด้านใน กลไกของปฏิกิริยาเริ่มที่อุณหภูมิ 63-65 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเออยู่ในสภาพ กึ่งคลายตัว ไพรเมอร์บริเวณ F2 จะจับกับแม่แบบและเริ่มสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่พร้อมกับ มีการขจัดสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ ในระหว่างนั้นไพรเมอร์ F3 จะจับดีเอ็นเอแม่แบบเช่นเดียวกัน และเกิดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในด้าน 3' ทิศทางการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่นี้จะไปขจัดกับสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น ใหม่จากไพรเมอร์ F2 ผลิตรหัสที่ได้ออกของ F2 เมื่อหลุดออกจะจับตัวเป็น โครงสร้างรูป (loop) ที่ปลายและหากพิจารณาดีเอ็นเอทั้งระบบจะพบว่าปฏิกิริยาสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นทั้ง 2 ด้าน ผลดังกล่าวจึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้างดีเอ็นเอเป็น dumb-bell shape สำหรับใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณต่อเนื่องจนทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นสายจาก 2 ทบ 3 ทบและมากกว่าจนเกิดทบต่อเนื่องที่อุณหภูมิเดียวจนกว่าจะสิ้นสุดปฏิกิริยา ได้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะ ซิกแซก (zig zag) ขนาดต่างกันเป็นจำนวนมาก เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาสามารถนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะได้ผลการทดลองในรูปแบบดีเอ็นเอ ที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างเชื้อไวรัส

สารพันธุกรรม เชื้อไวรัส โรคชิคุนกุนยา และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก (dengue) 4 สายพันธุ์ ได้จากพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทยโดยการสุ่มกลุ่มที่มีการแสดงอาการภายนอกของโรค โดยได้รับความอนุเคราะห์สารพันธุกรรม ใช้เชื้อไวรัส จากโรงพยาบาลควนโดน จังหวัดสตูล

สารพันธุกรรมเชื้อ ไวรัส ของเชื้อที่ก่อให้เกิดไข้มาเลเรีย (*Plasmodium falciparum*) ได้รับความอนุเคราะห์สารพันธุกรรมจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ หาดบุญทรนากร ศูนย์วิจัย มาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารพันธุกรรมเชื้อไวรัสก่อให้เกิดโรคไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ห้องปฏิบัติการ แพลนท์ทรวานเจนิคและไบโอเซนเซอร์เทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- เครื่องปั่นแห้ง (evaporator) (Eyela, Japan)
- เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen, Germany)
- เครื่องส่องดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต UV Transilluminator (Ultra Lum Electronic Dual Light™ Transilluminator, USA)
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ-20 และ -80 องศาเซลเซียส
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) (BIO RAD Gene Cyclor TM, USA)
- เครื่องเขย่า (Vortex Geni, USA)
- เครื่องเจลแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (Mupid Advance, Japan)
- เครื่องซังไฟฟ้า Libror EL-120HA (Shimadzu, Japan)
- ตู้เชื้อเชื้อ Augusta Safty Cabinet (Lio Lab, Thailand)

- ไมโครเวฟ (Sharp EMS) (Sharp Co, Ltd, Japan)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ -20 (Sanyo, Japan)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Axygen, India)
- ทิปขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร (Axygen, India)
- ไมโครปิเปต (Gibson, France)
- Heater (BIOER technology)
- แอลกอฮอล์ 95% (Merck, Germany)
- อะกาโรส (Promega, USA)
- ไดโซเดียม เอทิลีนไดอะไมน์ เตตราอิก เอซิด: EDTA (Merck, Germany)
- เซลล์เดียมโบรไมด์ (Gibco BRL)
- 100 bp ดีเอ็นเอแลคเคอร์ (New England Biolabs, USA)
- MgCl₂
- mixed dNTP
- Primer คู่ forward และ reverse (Biobasic, Canada)
- DTT
- Betaine (Sigma, USA)
- dNTP (Pharmacia Amershim, USA)
- ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) (Sigma, USA)
- อาหาร LB (Sambrook *et al.*, 1989)
- อาหาร SOC (Sambrook *et al.*, 1989)
- Silver nanoparticle (blue silver) (Pakdeenard *et al.*, 2010) หน่วยปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์รับรู้ ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- Phosphate buffer solution (Nippongene, Japan)
- DNA analog สังเคราะห์ตามวิธี Suparpprom *et al.*, 2005, Vilaivan and Srisuwannaket, 2006
- T4 DNA ligase (Promega, USA)
- kit pGEM[®] - T Easy vector system I (Promega, USA)
- SuerScript[®] II (Invitrogen, USA)
- ชุดสกัด Nucleospin RNA virus[®] (RBC, USA)

- AMV reverse transcriptase (Pacific Science Company, Finland)
- *i-Taq* DNA polymerase (Intron biotechnology, Korea)
- Bst DNA polymerase (New England Biolabs, USA)
- *RnaseA* (Sigma, USA)
- ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (Biobasic, Canada)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสกัดแยกอาร์เอ็นเอของไวรัส

สกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสโดยใช้ปริมาณตัวอย่างละ 150 ไมโครลิตร ดำเนินการด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอ Nucleospin RNA virus[®] (RBC, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้งาน ละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วย nuclease free water 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ

รวบรวมข้อมูลของยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยาจากฐานข้อมูลใน GenBank การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ เริ่มจากการตรวจสอบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ บนพื้นฐานของข้อมูลของยีน E1 เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏในฐานข้อมูล DNA Data bank (GenBank) (Benson *et al.*, 2004) ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thomsons *et al.*, 1994) ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer4 (Fujitsu, Japan) (ตารางที่ 2) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแบบลูบด้วยอุณหภูมิเดียว ตรวจสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้โดยการเทียบกับ ข้อมูลที่ปรากฏในฐานข้อมูลโดยการทำ local alignment กับข้อมูลในฐานข้อมูลดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Blastn (Altschul, *et al.*, 1990) ตรวจสอบและคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมจากค่าคะแนนและความจำเพาะของไพรเมอร์ เมื่อคัด เลือกได้แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี

3.2.3 การตรวจสอบไวรัสด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วย เทคนิค ลูกโซ่พหุริเมอเรส (RT-PCR) โดยใช้วิธีที่รายงานโดย (Dash *et al.*, 2008) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ forward และ reverse ตามรายงาน และทำปฏิกิริยาด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาโดยการบ่มปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที และ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีตามคู่มือการใช้งานของ SuerScript[®] II (Invitrogen, USA) ต่อด้วยการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน E1 ขนาด 205 นิวคลีโอไทด์ ที่ได้ให้มีปริมาณมากด้วยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส โดยปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติการของ *i*-Taq[™] DNA Polymerase kit (Intron biotechnology, Korea) โดยบ่มปฏิกิริยา denature ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส 40 วินาที annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือ extensions ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ และบ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส 1.5 % ในสารละลาย TAE

3.2.4 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อสร้างโมเลกุลอ้างอิง

โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี TA cloning (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่รายงานในเอกสารประกอบชุด kit pGEM[®] - T Easy vector system I (Promega, USA) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ถ่ายสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E-coli* สายพันธุ์ TOP 10 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) คัดเลือกโคลนที่ได้โดยการทำ direct PCR (Grunenwald, 2001) ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ (Sambrook *et al.*, 1989) และนำพลาสมิด ที่ได้ ไปตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการ ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์เบสของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่มีอยู่

3.2.5 การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรีเวิร์สทรานสคริปชันและการชักนำด้วยลูปอุณหภูมิเดียว (RT-LAMP)

นำ RNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.2.1 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคดีเอ็นเอแบบลูบด้วยอุณหภูมิเดียว โดยใช้ชุดไพรเมอร์สัมพันธ์กับบริเวณ F1 F2 F3 B1 B2 และ B3 ที่ออกแบบไว้

ข้างต้น โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20mM KCl 16mM MgSO₄ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase (Notomi *et al.*, 2000; Parida *et al.*, 2008) และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยการแยกดีเอ็นเอที่ได้ด้วย การแยกด้วยสนามไฟฟ้าโดยใช้อะกาโรสเจล 3 % ใน TAE บัฟเฟอร์ ประเมินศักยภาพของวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบชักนำด้วยอุณหภูมิเดี่ยวในครั้งนี้อยู่เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน อาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR) ที่รายงานโดย Dash *et al.*, (2008) โดยตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในแง่ของผลต่าง ๆ ดังนี้

3.2.5.1 ตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) การตรวจสอบความจำเพาะ ของปฏิกิริยาเมื่อใช้ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในยุคนั้นเดียวกับชนิดของยาได้แก่ ไวรัสเดงกีสายพันธุ์ 1-4 และ *plasmodium falsifarum* และไวรัสชนิดอื่น ได้แก่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 (Human influenza virus; H1N1) และนำผลที่ได้ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับผลของการดำเนินการ โดยวิธี อาร์ทีพีซีอาร์ที่รายงานโดย Dash *et al.*, (2008)

3.2.5.2 ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากพลาสมิดที่ทราบจำนวนชุดของดีเอ็นเอ โดยแปรผันแปรความเข้มข้นของดีเอ็นเอในรูปของจำนวนก็อปปี้จากมากไปหาน้อย ตามวิธีที่ได้รายงานไว้ (Anthony, 2000) ประกอบปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามที่อธิบายไว้ก่อนหน้าและนำผลที่ได้ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับผลของการดำเนินการโดยวิธี อาร์ทีพีซีอาร์ที่รายงานโดย Dash *et al.*, (2008)

3.2.6 การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยวัดการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงด้วยอนุภาคเงินนาโน

อนุภาคเงินนาโนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีการสังเคราะห์โดยวิธี การสังเคราะห์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Green synthesis) ตามที่มีการรายงานของ (Pukdeenard *et al.*, 2012) โดยได้รับการอนุเคราะห์ หน่วย ปฏิบัติการ วิจัยอุปกรณ์รับรู้ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับโพรบสังเคราะห์ในรูป β -pyrrolidinyl DNA analog probe (เบต้าไพโรลิดินิล ดีเอ็นเออนุภาค โพรบ) สังเคราะห์ตามวิธีของ Suparpprom และคณะ ในปี 2005 โดยรองศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยการเลือกตำแหน่งที่จะใช้ออกแบบ เบต้าไพโรลิดีนิลดีเอ็นเออนุภาค ออกโพรบที่ใช้เป็นโพรบในระหว่างบริเวณที่ไพรมอร์ซ้างต้น ครอบมอยู่ ออกแบบและสังเคราะห์ โพรบที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ATCACTGTAACT การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเออยู่บนพื้นฐานของการจับตัวแบบไฮบริโดเซชันระหว่างดีเอ็นเอและเบต้าไพโรลิดีนิลดีเอ็นเออนุภาคออกตามที่ยางงาน (Kanjanawarut and Su, 2009) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วยอนุภาคเงินนาโนสีฟ้า (blue silver nanoparticles) ความเข้มข้น 1200 ppm 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอุปคณภูมิเดียวในข้อ 3.2.5 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เบต้าไพโรลิดีนิลดีเอ็นเออนุภาคออกโพรบ 25 พิโคโมล ภายใต้การควบคุมปริมาณเกลือความเข้มข้น 5-15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แปรผันความเข้มข้นเป็นลบและความเข้มข้นของเกลืออย่างละ 3 ระดับ สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโน พร้อมทั้งดำเนินการโดยหาความจำเพาะของปฏิกิริยา ความไวของปฏิกิริยา และการทำซ้ำเพื่อใช้ร่วมในการยืนยันผลการทดลอง

การตรวจสอบตกตะกอนของเงินนาโน

นำผลที่ได้ไปตรวจกับตัวอย่างที่ได้จากการตรวจ วัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Cary 100 Bio UV- visible spectrophotometer (Li and Rothberg, 2004) โดยเจือจางตัวอย่าง 300 เท่า ดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากปรากฏการณ์ลาสมอนของอนุภาค เงินนาโนในรูปการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสง ตรวจสอบการตกตะกอนของเงินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ด้วยวิธีที่ยางงานไว้ในคู่มือการทำงานของกล้อง เน้นความแตกต่างของผลที่ได้จากชุดควบคุมที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ชุดควบคุมที่มีดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย และชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ (non-template control) โดยใช้กล้อง JEOL JSM-6510A Analytical scanning Electron microscope (Thompson *et al.*, 2008)

ทดสอบตะกอนเงินด้วย Sodium borohydride test (NaBH_4) เพื่อตรวจสอบยืนยันการเปลี่ยนสีของอนุภาคเงินนาโนที่เกิดจากการตกตะกอน (aggregation) ที่ไม่ได้เกิดจากการถูกรีดิวซ์ให้หายไปของอนุภาคเงินนาโนตามสมการ $\text{AgNO}_3 + \text{NaBH}_4 \rightarrow \text{Ag} + 1/2\text{H}_2 + 1/2\text{B}_2\text{H}_6 + \text{NaNO}_3$ อนุภาคเงินนาโนถูกรีดิวซ์โดยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ก็จะได้อนุภาค เงินนาโนซึ่งจะเปลี่ยนสีปฏิกิริยาเป็นสีเหลือง และถ้าเงินนาโนเกิดจากการตกตะกอนรวมกันไม่ผ่านปฏิกิริยารีดักชันจะไม่เปลี่ยนสีทดสอบตะกอนทั้ง ชุดควบคุมที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย และ ชุด

ควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ แม่แบบ โดยทำการทดสอบด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ตามวิธีที่ได้รายงานไว้ (Hyning and Zukoski, 1998)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษา และรวบรวม ยีนเป้าหมายของโรคชิคุนกุนยาเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

ผลการศึกษาและรวบรวมข้อมูลของยีน ที่เกี่ยวข้องกับโรคชิคุนกุนยา พบว่านอกจากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยยีน rephicase แล้วชิคุนกุนยาไวรัสยังประกอบไปด้วยยีน nsP1 nsP2 nsP3 nsP4 C 6K E1 E2 และ E3 การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ยีน E1 โดยอาศัยข้อมูลจากที่อยู่ในฐานข้อมูลจีโนม (Gen Bank) และรายงานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ไวรัสนี้จาก ผู้ป่วยในจังหวัดนราธิวาส โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ E1 ยีนของไวรัสชิคุนกุนยามีขนาดประมาณ 205 นิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกันในระดับที่สูงและพบว่า บางตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการระบวคในขณะนี้อาจต่างจากสายพันธุ์ที่เคยระบวคในประเทศไทยแล้ว (ยง ภู่วรวรรณ, 2552) โดยพบการกลายพันธุ์ในบางตำแหน่งแต่ยังคงมีตำแหน่งที่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกันมากพอที่จะใช้ออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจสอบได้ รายละเอียดของรายการข้อมูลของยีน E1 ของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ เป็น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องของยีน E1 ที่ใช้ในการอ้างอิง

หมายเลข	รายละเอียด	แหล่งที่พบ	ขนาดนิวคลีโอไทด์
FJ457640	Chikungunya virus strain CU10 E1 gene	Thailand	266
FJ457639	Chikungunya virus strain CU10 E1 gene	Thailand	266
FJ457636	Chikungunya virus strain CU10 E1 gene	Thailand	266
AY253733	Chikungunya virus structural polyprotein (E1) gene	Thailand	199
AY253730	Chikungunya virus structural polyprotein (E1) gene	India	199
AM397006	Chikungunya virus (E1 gene), isolate MY/0306/BP37352, genomic RNA.	Malaysia	294
AM397005	Chikungunya virus partial mRNA for structural protein E1 (E1 gene), isolate MY/0306/BP37348	Malaysia	294
AM397007	Chikungunya virus partial mRNA for structural protein E1 (E1 gene), isolate MY/0306/BP34198	Malaysia	294
AM397009	Chikungunya virus partial mRNA for structural protein E1 (E1 gene), isolate MY/0306/BP37437	Malaysia	294
AM397008	Chikungunya virus partial mRNA for structural protein E1 (E1 gene), isolate MY/0306/BP37350,	Malaysia	294
AY549579	Chikungunya virus isolate chik DRC1719 structural protein E1	Congo	1124


```

FJ457640 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTCATACCGCATCTGCATCA GCTAAGCTC 120
FJ457639 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTCATACCGCATCTGCATCA GCTAAGCTC 120
FJ457638 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTCATACCGCATCTGCATCA GCTAAGCTC 120
FJ457637 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTCATACCGCATCTGCATCA GCTAAGCTC 120
AY549581 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTCATACAGCATCCGCATCA GCTAAGCTC 120
AY549582 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTCATACAGCATCCGCATCA GCTAAGCTC 120
EF051584 TGC AAAACAGAATTTGCATCAGCGTAC AGGGCTAATACAGCATCCGCATCA GCTAAGCTC 120
*****

B1
AMB97006 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AMB97005 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AMB97007 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AMB97009 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AMB97008 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF394211 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF394210 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
EU192143 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
DQ520746 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
DQ520748 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
DQ520754 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF192899 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF192900 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF192897 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF192895 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AF192894 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
FJ457636 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
FJ882922 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
FJ457640 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
FJ457639 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
FJ457638 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
FJ457637 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AY549581 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
AY549582 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
EF051584 CGCGTCCTTTACCAAGGATAAATATCAC TGTAGCTGCTTATCAAACGGCGACCATGCC 180
*****

B2 B3
AMB97006 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AMB97005 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AMB97007 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AMB97009 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AMB97008 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF394211 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF394210 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
EU192143 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
DQ520746 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
DQ520748 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
DQ520754 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF192899 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF192900 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF192897 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF192895 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AF192894 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
FJ457636 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
FJ882922 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
FJ457640 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
FJ457639 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
FJ457638 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
FJ457637 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AY549581 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
AY549582 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
EF051584 GTCACAGTTAAGGACGCCAAA TTCATAGTGGGGCCAATGCTTTCAGCCTGGACACCTTTC 240
*****

```

รูปที่ 4 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสซิคุนกุญา 25 สายพันธุ์ (Thomsons *et al.*, 1994) ของข้อมูลยีน E1 ที่มาจาก accession number ต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank database และแสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของไพรเมอร์ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สีนํ้าตาลคือ บริเวณไพรเมอร์ F1 สีเขียวอ่อนคือไพรเมอร์ F2 สีแดงคือไพรเมอร์ F1 สีฟ้าคือไพรเมอร์ B1 สีชมพูคือไพรเมอร์ B2 และ สีเขียวเข้มคือไพรเมอร์ B3 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากตารางพบว่า ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ไวรัส 25 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์หลัก 3 บริเวณ (ในกรอบสี่เหลี่ยม) ได้แก่ ที่ตำแหน่ง 4-27 นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 84-

105 นิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งที่ 140-160 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตามก็ดีเนื่องจากสายพันธุ์ที่ระบาดในปัจจุบันทั้งหมดสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ FJ457636 โดยที่สายพันธุ์ที่ระบาดในอดีตไม่พบระบาดอีกในปัจจุบัน (ยง ภู่วรวรรณ, 2552) จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์สายพันธุ์ FJ457636 เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์ โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Primer Explorer V4 ได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายสำหรับปฏิกิริยาริเวสทรานสคริปชันลูบอุณหภูมิต่ำ (RT-LAMP) ปฏิกิริยาลูกโซ่พหุรีเมอร์เลส (RT-PCR) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โพรบชนิด analog DNA probe สำหรับใช้ในการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอของไวรัสชิคุนกุนยา

ไพรเมอร์	5' ไป 3'	ตำแหน่งในจีโนม
RT-LAMP		
F1	CAGATGCGGTATGAGCCCTGTA	เริ่มที่ตำแหน่ง 22-41
F2	GGAGAAGTCCGAATCATGC	เริ่มที่ตำแหน่ง 44-63
F3	ACGCAATTGAGCGAAGCAC	เริ่มที่ตำแหน่ง 88-109
B1	TCCGCGTCCTTTACCAAGGAAA	เริ่มที่ตำแหน่ง 119-141
B2	TTTGCGTCCTTAAGTGTGAC	เริ่มที่ตำแหน่ง 181-198
B3	CTGAAGACATTGGCCCCAC	เริ่มที่ตำแหน่ง 208-227
RT-PCR		
Forward *	ACGCAGTTGAGCGAAGCAC	เริ่มที่ตำแหน่ง 88-109
Reverse*	CTGAAGACATTGGCCCCAC	เริ่มที่ตำแหน่ง 208-227
Probe		
Analog DNA probe**	ATCACTGTAAGT	เริ่มที่ตำแหน่ง 148-157

* ได้จากการรายงานของ Dash *et al.*, 2004

** สั่งเคราะห์ตามวิธี Suparpprom *et al.*, 2005, Vilaivan and Srisuwannaket, 2006

จากตาราง ที่ 2 สำหรับ ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ (F1 F2 F3 B1 B2 และ B3) และวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานที่เป็นไปตามการรายงานด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ (Dash *et al.*, 2008) โดยไพรเมอร์คู่ Forward และ Reverse ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของชิคุนกุนยาไวรัสบริเวณของยีน E1 ขนาด 205 นิวคลีโอไทด์ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่คมชัดโดยไม่มีแถบดีเอ็นเอชนิดอื่นปะปน

ในการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อปฏิกิริยาของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นด้วยหลักการ basic local alignment ซึ่งเป็นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลออนไลน์ (Altschul *et al.*, 1997) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ F1, F2, F3 และ B1, B2, B3 ซึ่งถูกออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณ ยีน E1 ในปฏิกิริยา RT-LAMP และ อาร์ทีพีซีอาร์ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา

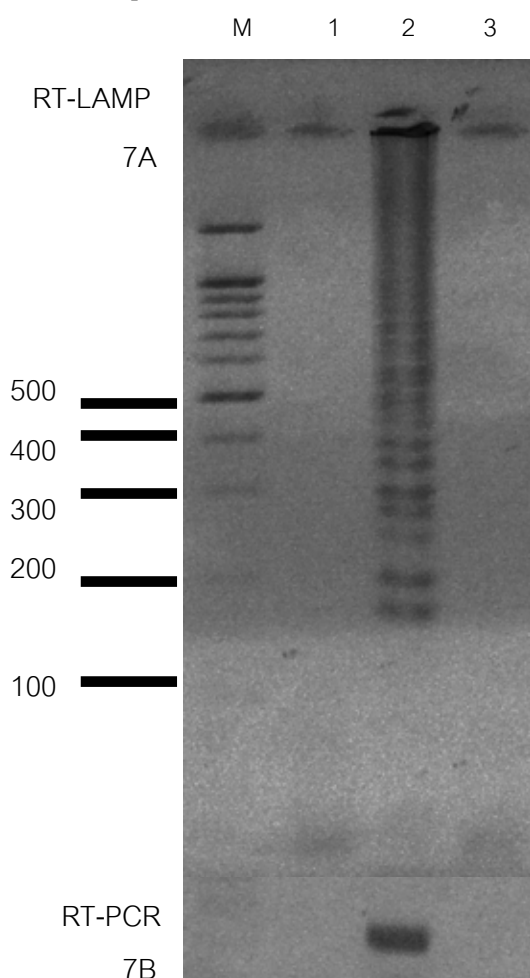
ไพรเมอร์	รายละเอียด	Score (bits)	Identities	E value
F1	Chikungunya virus isolate AP0109 polyprotien gene	44.1	100%	0.06
	Chikungunya virus strain ECSA glycoprotein envelope1 gene	44.1	100%	0.06
	Chikungunya virus coat protein (E1) gene	44.1	100%	0.06
F2	Chikungunya virus isolate 21/RMRC/ Ganjam envelope glycoprotein	40.1	100%	0.066
	Chikungunya virus strain ECSA glycoprotein envelope1 gene	40.1	100%	0.066
	Chikungunya virus coat protein (E1) gene	40.1	100%	0.066
F3	Chikungunya virus isolate 1088vi E1 protein gene	38.2	100%	0.26
	Chikungunya virus isolate EG641 E1 protein gene	38.2	100%	0.26
	Chikungunya virus partial gene for structural polyprotein envelop	38.2	100%	0.26
B1	Chikungunya virus isolate 21/RMRC/ Ganjam envelope glycoprotein	46.1	100%	0.002
	Chikungunya virus isolate IND-10-DEL75 E1 protein gene	46.1	100%	0.002
	Chikungunya virus isolate 16/RMRC/ envelope glycoprotein	46.1	100%	0.002
B2	Chikungunya virus isolate IND-10-DEL75 E1 protein gene	36.2	100%	1.0
	Chikungunya virus isolate 21/RMRC/ Ganjam envelope glycoprotein	36.2	100%	1.0
	Chikungunya virus 12/RMRC/Jagatsinghpur envelope glycoprotein	36.2	100%	1.0
B3	Chikungunya virus isolate IND-10-DEL75 E1 protein gene	38.2	100%	0.26
	Chikungunya virus 12/RMRC/Jagatsinghpur envelope glycoprotein	38.2	100%	0.26
	Chikungunya virus isolate 21/RMRC/ Ganjam envelope glycoprotein	38.2	100%	0.26

จากตารางที่ 3 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ F1 F2 F3 B1 B2 และ B3 ที่เกี่ยวข้องกับ ยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา ด้วยโปรแกรม blastn พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว มีความจำเพาะต่อไวรัส ชิคุนกุนยาเท่านั้น โดยดูจากค่า E-value ที่ต่ำมากและผนวกกับที่ผลการรายงานทุกตัวเป็นชิคุนกุน ยาไวรัส

และเมื่อนำคู่ไพรเมอร์คู่ด้านนอกได้แก่ F3 และ B3 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้ขนาดเป็นไป ตามทฤษฎี นั้นทำการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพื่อสร้างเป็นโมเลกุลอ้างอิงด้วยหลักการ

4.3 การเพิ่มปริมาณยีน E1 ด้วยเทคนิครีเวิร์สทรานสคริปชันร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชักนำด้วยลูปอุณหภูมิเดียว (RT-LAMP) และด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.1 มาเพิ่มปริมาณบริเวณของยีน E1 ด้วยเทคนิค RT-LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ ที่ออกแบบไว้ข้างต้น พบว่าเมื่อป่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 63 องศา เป็นเวลา 60 นาที ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป็นชั้นบันได ขนาดเท่ากับผลคูณของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 170/200 นิวคลีโอไทด์ ไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในรูป แบบดังกล่าวในตัวอย่างที่มีสารพันธุกรรม ชุดควบคุมลบ (อาร์เอ็นเอของไวรัสไข้เลือดออก) และชุดควบคุมที่ไม่มีสารพันธุกรรม (รูปที่ 7A) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี RT-PCR ของไวรัสซิกงูญาของ Dash *et al.*, (2008) รูปที่ 7B



รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน และความจำเพาะของ E1 ด้วยเทคนิค ลูปอุณหภูมิเดียว (RT-LAMP) ที่อุณหภูมิ 63 °C และแยกแถบ DNA ด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน 3% agarose ในสารละลาย 1X TAE buffer รูปที่ 7A และผลิตภัณฑ์

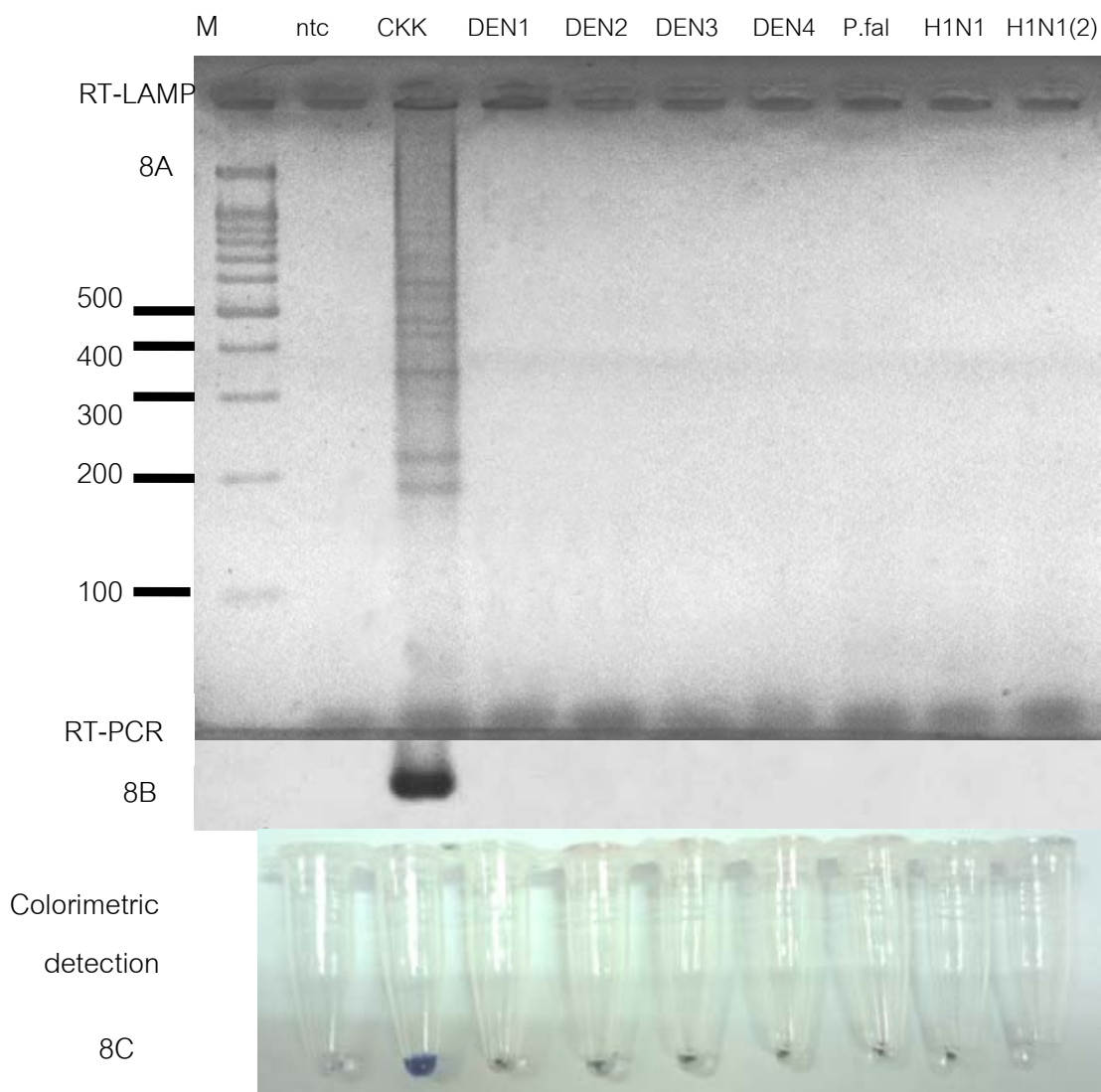
ดีเอ็นเอที่ได้จากเพิ่มปริมาณด้วย อาร์ทีพีซีอาร์ รูปที่ 7B และแยกแถบ DNA ด้วยเทคนิคเจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ใน 1.5% agarose ในสารละลาย 1X TAE buffer ที่ความเข้มข้น 10^6 copies

M	=	1 Kb DNA ladder
1	=	ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ntc (non-template control)
2	=	สารพันธุกรรมของไวรัสซิกุนงุนยา
3	=	ชุดควบคุมลบ (Negative control) เป็นสารพันธุกรรมของไวรัส ไข้เลือดออก

โดยผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด ประมาณ 200 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับขนาด
คาดหวังทางทฤษฎีของยีนและผลการทดลองของ Dash *et al.*, 2008 แถบดีเอ็นเอดังกล่าวใช้เป็น
แม่แบบในการโคลนยีนเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวกดังรายงานในหน้า 24

4.4 การประเมินศักยภาพของ ชุดไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธีชักนำด้วยลูปอณภูมิเดียว (LAMP)

4.4.1 ตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์เมื่อใช้สารพันธุกรรมของซิคูนกุนยาไวรัส เปรียบเทียบกับเมื่อใช้สารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่น ได้แก่ เดงกีไวรัส เชื้อพลาสโมเดียม และไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยสามารถแยกความแตกต่างให้เห็นได้ โดยเฉพาะการไม่เกิดปฏิกิริยากับ ไวรัสที่ก่อให้เกิด โดยโรคในยุง อื่นได้แก่ เชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดไข้เลือดออกสายพันธุ์ (dengue virus) 1-4 เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย *plasmodium falsifarum* ที่แสดงอาการคล้ายอาการของซิคูนกุนยา และไวรัส ชนิดอื่น ได้แก่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 ที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัด 2009 ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ความจำเพาะของปฏิกิริยาการทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยชุดไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค รีเวอร์สทรานสคริปชันร่วมกับการเพิ่มปริมาณโดยการ ชักนำด้วยลูบอลลูมิเดียว (RT-LAMP) ดังรูป 8A สามารถแยกความแตกต่างให้เห็น โดยชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะต่อไวรัสชิคุนกุนยา แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับอาร์เอ็นเอของไวรัสชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้นมีความจำเพาะ สำหรับเชื้อเป้าหมาย ด้านล่างเปรียบเทียบกับอาร์ทีพีซีอาร์ ดังรูป 8B ตามวิธีของ Dash *et al.*, 2008 และการตกตะกอนของเงินนาโน 8C ให้ผลที่สอดคล้องกัน

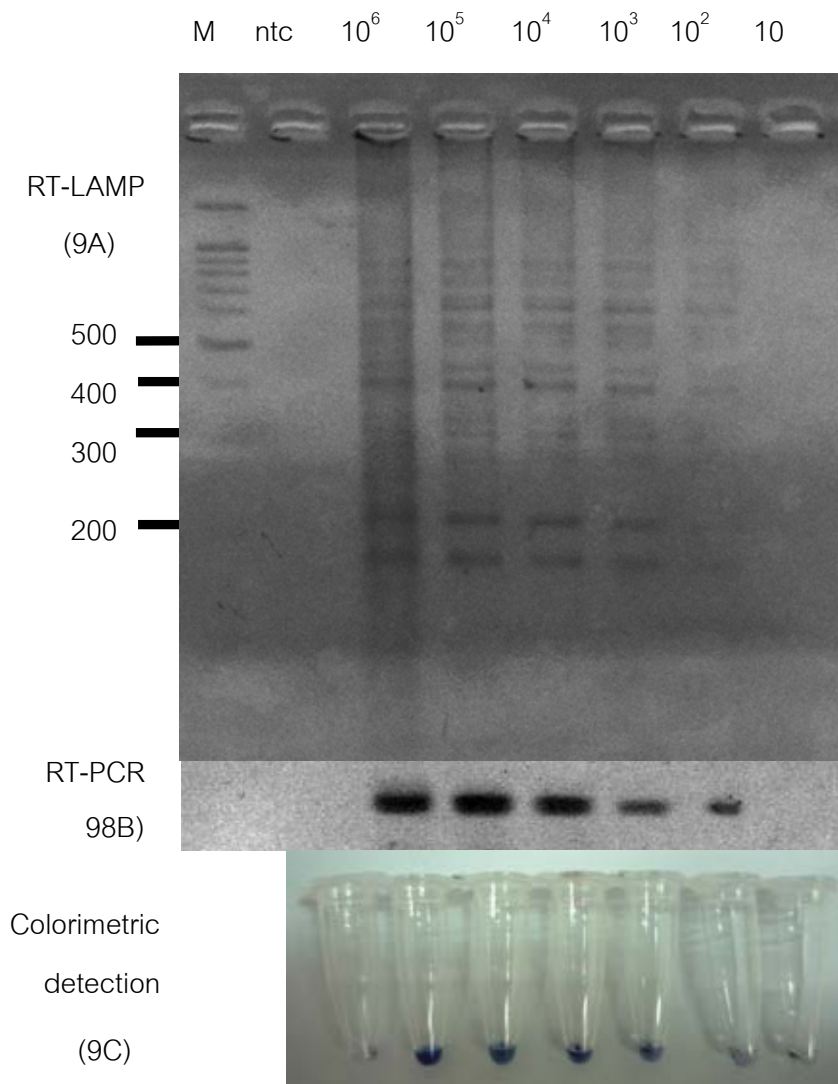
ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง ntc = ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

ช่อง ckk	=	ไวรัสชิคุนกุนยา
ช่อง 4-10	=	ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก มาลาเรีย ไข้หวัดใหญ่ 2009 (dengue 1-4), <i>plasmodium falsifarum</i> , H1N1, H1N1(2)

4.4.2 ความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยาเมื่อตรวจสอบ ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียว

การทดสอบ ความไวของปฏิกิริยาได้จากการทดลองเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรม ด้วยแม่แบบที่มีความเข้มข้นที่ต่างกัน 1 ระดับจากมากที่สุด 10^6 ถึงน้อยที่สุด 10 เพื่อหา Limit of Detection (LOD) โดยใช้องค์ประกอบของ ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย อุณหภูมิระนาบเดียวเป็นดัง รูปที่ 9



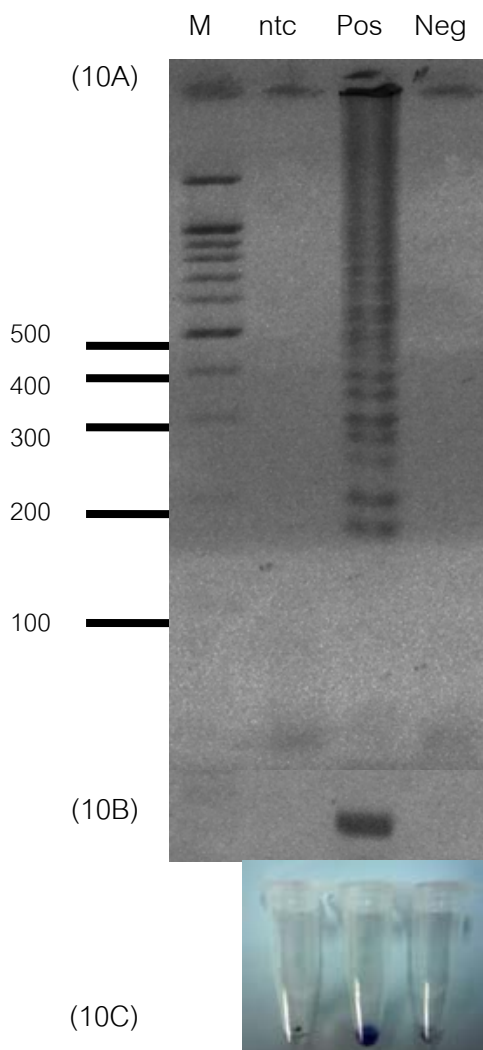
รูปที่ 9 ผลิตรหัสดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน E1 กับแม่แบบดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณในรูปจำนวนชุดหรือ ก๊อปปี้จาก 10^6 - 10^2 ก๊อปปี้ ด้วยเทคนิค RT-LAMP และแยกแถบดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน 3% agarose ในสารละลาย 1X TAE buffer พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน E1 ได้แม้ระดับความเข้มข้นของแม่แบบต่ำเพียง 100 copies หรือสรุปได้ว่ามี Limit of Detection (LOD) ที่ 100 copies ด้านล่างเป็นผลเปรียบเทียบเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค อาร์ทีพีซีอาร์ และการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโนให้ผลที่สอดคล้องกัน

ช่อง M	=	ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์
ช่อง ntc	=	ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ
ช่อง 3-8	=	ผลการทดสอบความไวด้วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสชิคุนกุนยาด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอนุภาคนาโน

พบว่าชุดไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แม้สารพันธุกรรมแม่แบบจะลดปริมาณถึง 10^6 ถึงระดับ 100 ชุดของดีเอ็นเอ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR) ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานและผลการทดลองของการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโน

4.5 การตรวจสอบสัญญาณการโดยใช้อนุภาคเงินนาโนและเปรียบเทียบผลการทดลองกับเทคนิคมาตรฐานลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR) และลูปอณภูมิเดี่ยว (RT-LAMP)

การพัฒนาระบบตรวจสอบสัญญาณบนพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสง (colorimetric detection) โดยอนุภาคนาโนเงินสีฟ้าโดยใช้เงื่อนไขของปฏิกิริยา เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ พบว่าเฉพาะ ตัวอย่าง ที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อจะสามารถเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคลูปอณภูมิเดี่ยวใช้ปฏิกิริยาดังที่ระบุไว้ข้างต้น และทำปฏิกิริยากับโลหะเงินนาโนเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณสารพันธุกรรมสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับเทคนิคมาตรฐานได้แก่ RT-LAMP, RT-PCR ให้ผลการทดลองดัง รูปที่ 10

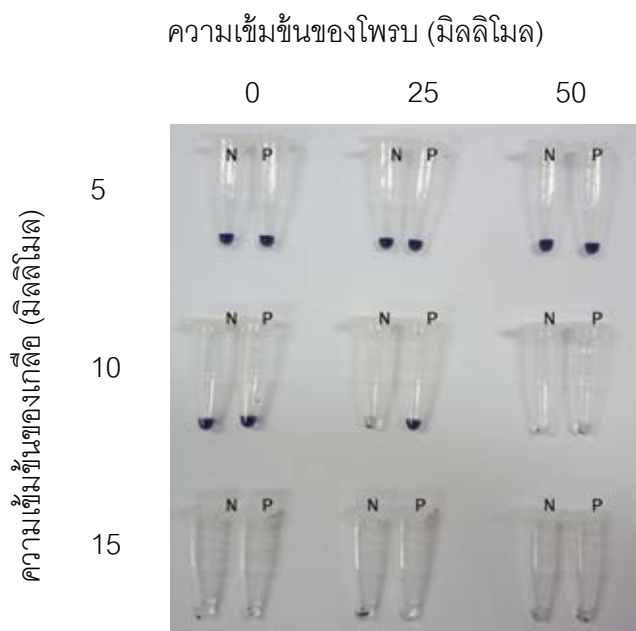


รูปที่ 10 ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของตะกอนอนุภาคเงินนาโน (10C) พบการตกตะกอนในชุดควบคุมลบ (Neg) และในชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ ต้นแบบ (ntc) ขณะที่อนุภาคเงินนาโนจะไม่ตกตะกอนในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (Pos) สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบผลการทดลองกับ เทคนิคมาตรฐาน RT-LAMP (10A) และ RT-PCR (10B) แล้วให้ผลสอดคล้องกัน

ช่อง M	=	ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์
ช่อง ntc	=	ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ
ช่อง Pos	=	ดีเอ็นเอของไวรัสชิคุนกุนยา
ช่อง Neg	=	ดีเอ็นเอของไวรัสไข้เลือดออก สายพันธุ์ 1 (Negative control)

จากการพัฒนาระบบการตรวจหาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสีของตะกอนของอนุภาคเงินนาโนใช้ทดสอบยีน E1 พบว่าหลอดที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ (ntc) และหลอดที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (Neg) จะเกิดการตกตะกอนของดีเอ็นเอและหลอดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (Pos) จะไม่เกิดการตกตะกอน มองเห็นสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคเงินแ ขวณลอยอยู่ ทำการทดลองกับเทคนิคมาตรฐานพบว่าให้ผลสอดคล้องกันกับผลที่ได้จากการทำ RT-PCR และ RT-LAMP

ทดสอบการใช้งานและการปรับเปลี่ยนสภาวะของ β -pyrolydinyl DNA analog probe (เบต้าไพโรลิดินิวดีเอ็นเอแอลลอกโพรบ) และเกลือให้เหมาะสม ดังรูปที่ 11

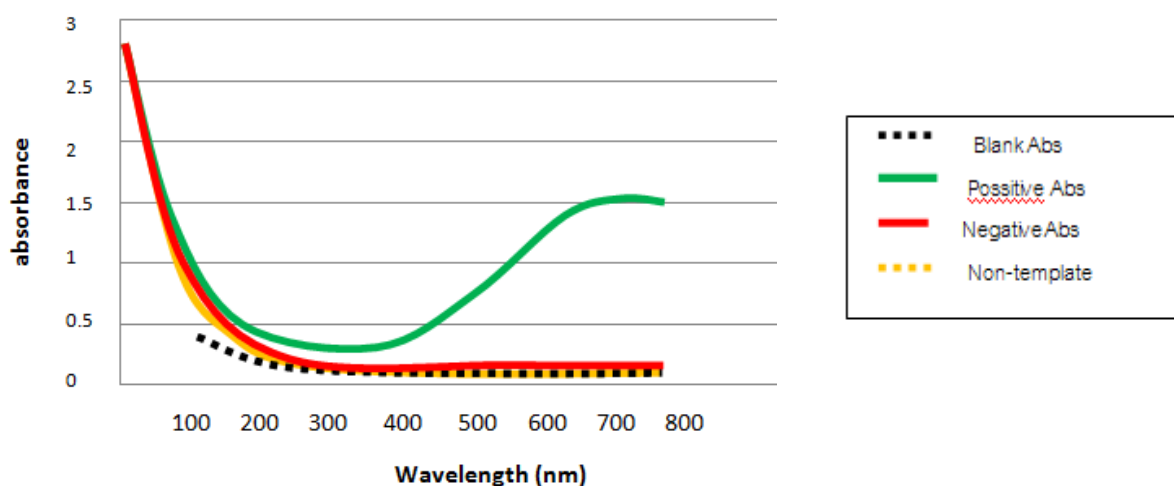


รูปที่ 11 แสดงการทดสอบการใช้งานและปรับเปลี่ยนสภาวะของ โพรบและเกลือให้เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือ ที่ 5 10 15 มิลลิโมล และความเข้มข้นของโพรบที่ 0 25 และ 50 มิลลิโมล

จากรูปที่ 11 การปรับเปลี่ยนสภาวะของ โพรบและเกลือให้เหมาะสมพบว่า เมื่อมีโพรบความเข้มข้นมากขึ้นขณะเดียวกันเกลือมีความเข้มข้นมากขึ้นตามจะทำให้ อนุภาคเงินนาโนตกตะกอน ขณะที่หากความเข้มข้นของเกลือต่ำและความเข้มข้นของโพรบที่ต่ำจะพบว่าภาวะดังกล่าวอนุภาคนาโนเงินนาโนจะไม่ตกตะกอน ความเหมาะสมของเกลือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลและความเหมาะสมของโพรบที่ 25 มิลลิโมลเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในปฏิกิริยาที่ไม่ทำให้อนุภาคนาโนเงินนาโนตกตะกอน ในชุดการทดลองที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายแต่จะตกตะกอนในชุดการควบคุมลบ

4.6 ตรวจสอบผลการตกตะกอนของเงินนาโน

สามารถวัด การดูดกลืนแสงโดยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เพื่อตรวจสอบการดูดกลืนแสงของอนุภาค เงินนาโนที่ต่างกัน ผลิตกัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน E1 กระตุ้นให้เกิดการปกป้องชั้นผิวของอนุภาค นาโนของเงินจึงทำให้ไม่พบการตกตะกอน เมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่ การดูดกลืนสูงสุดมีค่า $\lambda = 700-800$ nm ขณะที่ในหลอดที่ไม่ปรากฏดีเอ็นเอเป้าหมายหรือมีดีเอ็นเอแต่ไม่ใส่เป้าหมายหรือไม่ดีเอ็นเอเลย อนุภาคเงินนาโนตกตะกอน เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจึงไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วง $\lambda = 700-800$ nm แต่อย่างใด ดังรูปที่ 12

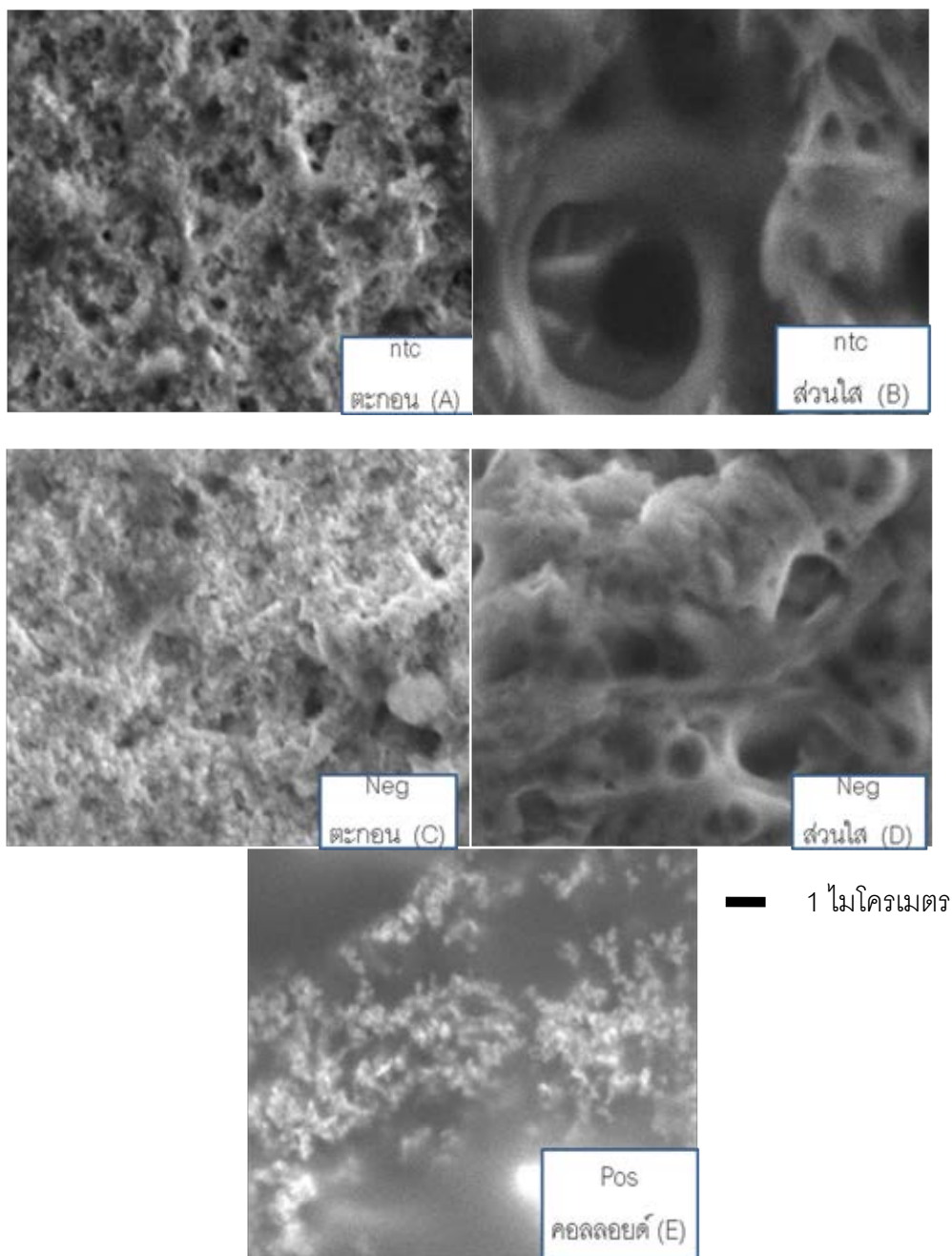


รูปที่ 12 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีทางแสงโดย ค่าการดูดกลืนแสง ของอนุภาคเงินนาโน สีฟ้าเปรียบเทียบกับระหว่าง (เส้นสีดำ) คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย blank (เส้นสีเขียว) ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีดีเอ็นเอ แม่แบบ (เส้นสีเหลือง) คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมลบ และ (เส้นสีแดง) คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (เส้นสีเขียวย)

ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคเงินนาโนที่ตกตะกอนทั้งหมด มีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ 0 ที่ความยาวคลื่น ระหว่าง 200- 300 nm พบการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของค่าการดูดกลืน แต่จะต่างไปจากชุดการทดลองที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายของ ไวรัลซิคูนกุนยาที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า ขณะที่มีความยาวคลื่นสูงกว่าขณะที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 350 nm พบว่าชุดการทดลองที่เงิน

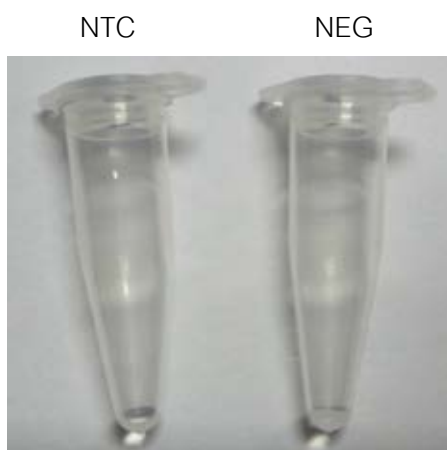
นาโนตกตะกอน (ชุดควบคุมลบ ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ) อย่างไรก็ตามก็ดีสำหรับชุดการทดลองที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายของไวรัสซึ่งอนุภาคนาโนเงินไม่ตกตะกอนจะพบค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นเรื่อยๆตามความยาวคลื่นแสงที่เพิ่มมากขึ้นจนถึงสิ้นสุดที่การวัดซึ่งค่าความยาว คลื่น 800 nm (รูปที่ 12)

เพื่อการตรวจสอบยืนยันผลการตกตะกอนของอนุภาคเงินนาโนจึงได้ดำเนินการตรวจสอบตะกอนที่พบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope หรือ SEM) ผลการตรวจสอบพบว่าในส่วนของตะกอนของตัวอย่างที่ได้จากชุดควบคุมลบและชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ แม่แบบ พบการสะสมของอนุภาค เงินนาโนเป็นผลึกที่เกาะตัวอยู่บนผลึกตะกอนไพโรฟอสเฟต อย่างเห็นได้ชัดขณะที่ในส่วนของส่วนใสจากชุดการทดลองที่ได้จากชุดควบคุมลบและชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ แม่แบบ ไม่พบการเกาะตัวของตะกอนผลึก เงินนาโนแต่อย่างใด ขณะที่ในชุดการทดลองที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ไม่พบการตกตะกอนของอนุภาค เงินนาโน การตรวจสอบไปที่คอลลอยด์พบผลึกของตะกอนอนุภาค เงินนาโนในระดับความเข้มข้นต่ำกว่าอนุภาคเงินที่เกาะ บนผลึกของไพโรฟอสเฟต ในชุด ควบคุมลบและชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบชัดเจน (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (A) ตะกอนของเงินนาโนจากหลอดการทดลองที่ไม่มีดีเอ็นเอ ต้นแบบ (non-template) (B) ส่วนใสของหลอดที่ไม่มีดีเอ็นเอ ต้นแบบ (C) ตะกอนของเงินนาโนจากหลอดที่มีดีเอ็นเอ แต่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (Negative control) (D) ส่วนใสของหลอดที่มีดีเอ็นเอแต่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (E) ผลการทดลองที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

เพื่อยืนยันผลการทดลองว่าการตกตะกอนไม่ได้เกิดจากการเข้าทำลายอันเนื่องมาจากปฏิกิริยารีดักชัน จึงนำตะกอนที่ได้มาทดสอบกับสารละลาย โซเดียมโบโรไฮไดรด์ ผลการทดสอบไม่พบว่าเกิดการเปลี่ยนสีของโบโรไฮไดรด์เป็นสีเหลืองแต่อย่างใด ซึ่งเป็นการยืนยันว่า การตกตะกอนไม่เกี่ยวข้องกับ ปฏิกิริยารีดักชันจากเกลือของเงิน ผลการทดลองการ นำหลอดที่มีการตกตะกอนของอนุภาคนาโนเงินมาทดสอบ ทั้ง ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (ntc) และ ชุดควบคุมลบ (Neg) เป็นดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ผลการทดสอบด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) ผลการทดสอบที่ได้พบว่าทั้ง 2 หลอดไม่ปรากฏสีเหลือง แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนเงินเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนไม่ได้เกิดจากการรีดิวซ์อนุภาคนาโนเงิน

หลอด ntc = ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ
 หลอด Neg = ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

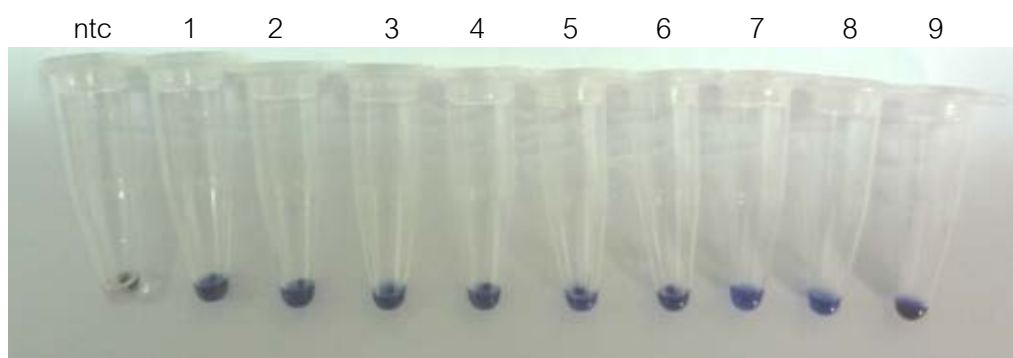
การหาความจำเพาะของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคไปโอเซ็นเซอร์ที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี โดยใช้อนุภาคนาโนสีฟ้าเป็นดังรูปที่ 8C ที่ได้แสดงมาก่อนหน้า

การทดลองเพื่อหาจำเพาะของเทคนิคไปโอเซ็นเซอร์สำหรับไวรัสซิกุนกุนยาบริเวณของยีน E1 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคลูบอุณหภูมิตีเดียวโดยสามารถแยกความแตกต่างให้เห็นได้ในไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในยูงได้แก่ เชื้อไข้เลือดออกสายพันธุ์ (DEN) 1-4, *Plasmodium falsifarum* และเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคอื่น ๆ คือ H1N1 เป็นดังรูปที่ 8C ข้างต้น โดยพบว่าผลการทดลองการหาความจำเพาะของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคการเปลี่ยนแปลงทางสี ของอนุภาคนาโน

พบว่าสามารถแยกความแตกต่างให้เห็นได้ กล่าวคือหลอดที่จะเป็นชุดการทดลองบวกหรือมีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา จะเป็นหลอดที่ไม่ตกตะกอน (เห็นสารละลายแขวนลอย) ของอนุภาคเงินนาโน แต่สำหรับหลอดที่มีดีเอ็นเอตัวอื่นๆ จะเห็นการตกตะกอน แม้แต่ไวรัสไข้เลือดออก (DEN1-4) ที่เมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อจะแสดงอาการใกล้เคียงกับไวรัสซิกุนกุนยา แต่แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้นมีความจำเพาะสำหรับเชื้อเป้าหมาย (รูปที่ 8C)

การตรวจสอบความไว (Sensitivity) ของปฏิกิริยา ด้วยเทคนิค ไบโอะเซนเซอร์ที่วัดการเปลี่ยนแปลงทางสีของอนุภาคเงินนาโน สีฟ้า ดังรูปที่ 9C ข้างต้น หากความไวของปฏิกิริยาได้จากการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอ ที่พบความเข้มข้นที่ต่างกันจากมากที่สุดไปน้อยที่สุด เป็นแม่แบบและด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูบด้วยอุณหภูมิต่ำ เพื่อหา Limit of detection โดยเมื่อเติมสารในปฏิกิริยาให้ครบดังที่ระบุไว้ข้างต้น รอเวลาผ่านไป 30 นาที จะให้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 9C ข้างต้น ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้นที่ต่างกันจากมากที่สุดไปน้อยที่สุดแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ลูบอุณหภูมิต่ำ และเติมสารในปฏิกิริยาให้ครบดังที่ระบุไว้ข้างต้น รอเวลาผ่านไป 30 นาที พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่าที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบต่ำเพียง 100 copies และสามารถหา Limit of detection ได้ที่ 100 copies (รูปที่ 9C)

การตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) ทดสอบกับตัวอย่างจริงไม่น้อยกว่า 10 ครั้ง ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ โดยนำตัวอย่างเชื้อที่เป็นชุดควบคุมบวกมาทดลองซ้ำ 10 ครั้งจะให้ผลการทดลองเหมือนกันทั้ง 10 ครั้ง กล่าวคือ ไม่เกิดการตกตะกอนของเงินนาโน

หลอด ntc	=	ชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบ
หลอด 2-10	=	ไวรัสชิคุนกุนยา

4.7 การศึกษาการทดสอบกับตัวอย่างทางการแพทย์

นำวิธีตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นเสร็จแล้วมาใช้ตรวจสอบกับตัวอย่างทางการแพทย์ โดยตัวอย่างที่เป็นชุดควบคุมบวกจำนวน 16 ตัวอย่าง ชุดควบคุมลบจำนวน 43 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐานอาร์ทีพีซีอาร์ที่รายงานโดย Dash *et al.*, 2008

ตารางที่ 4 แสดงถึงตัวอย่างทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบของยีน E1 ในปฏิกิริยา อาร์ทีพีซีอาร์ และปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงของอนุภาคเงินนาโน

ตัวอย่าง	RT-PCR	RT-LAMP with DNA/PNAs hybridization
Positive	16	16
Negative	43	42
False positive	-	1
False negative	-	-
sensitivity		100
specificity		97.68

$N = 59$ Sensitivity = true positive / (true positive + false negative)

Specificity = true negative / (false pose + true negative)

ตารางที่ 4 ผลการทดลองพบว่า แสดงตัวอย่างทางการแพทย์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง โดยมีชุดตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก จำนวน 16 ตัวอย่าง ในปฏิกิริยาอาร์ทีพีซีอาร์ และให้ผลเป็นลบจำนวน 43 ตัวอย่าง และปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงของอนุภาคเงินนาโน ให้ผลการทดลองที่เป็นบวกจำนวน 16 ตัวอย่าง และให้ผลการทดลองที่เป็นลบ 42 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับความผิดพลาด (false positive) 1 ตัวอย่าง และไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลลบกับความผิดพลาด (false negative) และสามารถหาค่าความไวของปฏิกิริยา (Sensitivity) ได้ เท่ากับ 100 และสามารถหาค่าความจำเพาะของปฏิกิริยา (Specificity) ได้เท่ากับ 97.68

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

โรคชิคุนกุนยาหรือไข้ปวดข้ออยู่กลายเป็นโรคที่อุบัติซ้ำในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย เมื่อปลายปี พ.ศ. 2551 ที่ผ่านมีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจากโรคชิคุนกุนยากว่า 20,000 รายและมีการระบาดไปยังภาคต่างๆในประเทศไทย มี ผู้ป่วยติดเชื้อมันอย่างรวดเร็วเนื่องจากคนไทยไม่มีภูมิคุ้มกันจากโรคนี้

แม้การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ ที่อ้างอิง ของ กระทรวงสาธารณสุข ที่ใช้เทคนิคในการตรวจทางเซรั่มวิทยา และ real-time PCR โดยการตรวจวินิจฉัยทางเซรั่มวิทยาที่ใช้ นั้นมีข้อจำกัด ที่ไม่สามารถตรวจ ได้ในระยะแรกของการเกิดโรค 9 วันแรกหลังจากการได้รับเชื้อ (Laurent *et al.*, 2007) และรายงานการศึกษาโดย Dash *et al.*, (2008) ได้ดำเนินการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบโรคชิคุนกุนยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ E1 (Edwards *et al.*, 2007) ได้พัฒนาเทคนิคและ real-time PCR อย่างไรก็ดีเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือที่มีราคาแพงของ พีซีอาร์และ real-time PCR ความจำเป็นต้องพึ่งพาบุคลากรชำนาญการเฉพาะทาง งานวิจัยชิ้นนี้ต้องการพัฒนาเทคนิคเพื่อให้สามารถตอบสนองการใช้งานที่รวดเร็วลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ สามารถใช้งานในภาคสนามได้ (point of care) การพัฒนาระบบการตรวจสอบแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่การเพิ่มปริมาณ สัญญาณดีเอ็นเอ (amplification) และการตรวจสอบสัญญาณ ดีเอ็นเอ (detection) ทำการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอบริเวณของ ยีน E1 เนื่องจากเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่ระบาดอยู่ในประเทศไทย ในขณะนี้ เป็นสายพันธุ์แอฟริกาที่มีการกลายพันธุ์ในส่วนของยีน E1 ในตำแหน่งที่ 226 กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก อะลานีน ไปเป็นวาลีน ทำให้เชื้อไวรัสพัฒนาให้มีความเหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ในยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) มากกว่ายุงลายบ้านดังที่เคยเป็นมา (Konstantin *et al.*, 2007) เป็นเหตุผลให้ประชากรไทยส่วนใหญ่ไม่มีภูมิคุ้มกัน และในภาคใต้ของประเทศไทยที่เป็นพื้นที่หลักในการระบาดของโรคนี้ นั้นมี ยุงลายสวนที่อยู่ในสวนยางพาราเป็นจำนวนมาก จึงเป็นแหล่งแพร่กระจายของเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี ก่อให้เกิดการระบาดเป็นจำนวนมาก (สวทช, 2552: ออนไลน์) จึงใช้ยีน E1 ในการตรวจสอบโรคชิคุนกุนยา โดยใช้ไพรเมอร์จาก ผลการออกแบบได้ไพรเมอร์ 4 ชุด ผลการตรวจสอบชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ เปรียบเทียบกับข้อมูลใน DNA data bank พบว่าแม้ยีน E1 มีความแปรผันแต่ยังมี ส่วนที่เหมือนกันมากพอให้นำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอ โดยชุดไพรเมอร์ได้แก่ F1 F2 F3 B1 B2 และ B3 ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 21-227 และเมื่อนำชุดไพรเมอร์มา

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าได้ภาวะเหมาะสมที่ 63 °C บ่มปฏิกิริยา 40 นาที ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ เป็นขั้นบันไดสอดคล้องกับความเป็นเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก ปฏิกิริยา เป็นอย่างดี ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากการเปลี่ยน นอเอาเอ็นเอของ ยีน E1 ไปเป็น cDNA ในรอบแรกด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ B2 และ B3 ยังผลให้ได้ cDNA แม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคลูปอุณหภูมิต่ำๆ ได้ต่อไป ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธี อาร์ทีพีซีอาร์มาตรฐาน โดย Dash *et al.*, (2008) เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ผลการทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ต่อ ปฏิกิริยา และความไวของ ปฏิกิริยา พบว่าชุดไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน E1 ของไวรัสชิคุนกุนยา เท่านั้นและไม่พบการทำ ปฏิกิริยา ของชุดไพรเมอร์กับสารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่นหรือ non specific specimen แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะที่อยู่ในระดับที่เชื่อถือได้ ขณะที่ความไวของปฏิกิริยาให้ค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ในรูป Limit of detection (LOD) ที่ 100 ชุดของดีเอ็นเอ หรือเทียบกับสารพันธุกรรมจากไวรัส 100 อนุภาค

โดยปกติการติดเชื้อไวรัสในเซลล์จะเกิดการแสดงออกของยีนเพื่อเข้าสู่วงจรสร้างไวรัสลูกหลานโดยมักพบว่า การเพิ่มปริมาณอาจสูงถึงระดับ บิลลิยอนและพันอนุภาค /เซลล์ สำหรับไวรัสชิคุนกุนยา Hahn and Hankins, 1970 ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค immunofluorescent ใน BHK21/C13 เซลล์ โมโนเลเยอร์พบการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนของไวรัส ในระดับ 5.2×10^8 ถึง 6.3×10^8 หน่วย / ml โดยใน 1 ml จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 3×10^5 เซลล์ นั้นหมายถึงมีการเพิ่มปริมาณไวรัสใน ระดับประมาณ 5×10^3 อนุภาค/เซลล์ เหนือกว่าระดับ limit of detection ที่ได้ในการทดลองในครั้งนี้มาก ผลดังกล่าวยืนยันทั้งความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยาของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจชิคุนกุนยาไวรัส นอกจากนี้ผลการทดสอบในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับผลที่ดำเนินการโดยวิธี RT-PCR ที่รายงานโดย Dash *et al.*, 2008 จึงเป็นข้อมูลยืนยันถึงความมีประสิทธิภาพของชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาตรวจยีน E1 ได้เป็นอย่างดี

เทคนิคลูปอุณหภูมิต่ำๆ เป็นที่ยอมรับในการนำไปใช้ในการตรวจเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งไวรัสต่างชนิด เชื้อแบคทีเรีย แม้กระทั่งการตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิต (Parida *et al.*, 2008) (Chaumpluk *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสจำเป็นต้องนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาแยกด้วยสนามไฟฟ้าซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีความซับซ้อนมีขั้นตอนเพิ่มขึ้น จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและบุคลากรเฉพาะทางและเกี่ยวข้องกับสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (เช่น เอทิลดีเอ็มโบลอ) ดังนั้นการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ทางเลือกอื่นที่ช่วยให้การตรวจสอบผลทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จึงเป็นโจทย์ปัญหาที่สำคัญ

Chaumpluk *et al.*, 2010, 2012 ได้รายงานการพัฒนากระบวนการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยไบโอเซ็นเซอร์ ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสใช้หัตถ์ใหญ่ ายพันธุ์ใหม่ วินิจฉัยไวรัสที่ดื้อยา โอเซลทามิเวียซึ่งมีความแม่นยำและทำได้รวดเร็ว และการตรวจการปนของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร อย่างไรก็ตามเนื่องจากการ ตรวจสัญญาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ ยังไม่เคยมีรายงานการประยุกต์เพื่อใช้ตรวจซิกนัลไวรัส มาก่อน ดังนั้นในครั้งนี้นี้จึงได้นำหลักการทางไบโอเซ็นเซอร์ โดยเฉพาะเทคนิคการตรวจสอบสัญญาณการเปลี่ยนสีของอนุภาคนาโนของโลหะ

การวัดด้วยไบโอเซ็นเซอร์เป็นการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเปลี่ยนสีทางแสง อาศัยหลักการ resonance หรือการสั่นสะเทือนของอนุภาคอิเล็กทรอนิกส์ตรอนของอนุภาคนาโนของโลหะ เมื่อได้รับแสงเป็นตัวกระตุ้น และเมื่อมีโมเลกุลดีเอ็นเอมาจับตัวกันบนระนาบของโลหะนาโน จะส่งผลให้การสั่นสะเทือนของโมเลกุลเปลี่ยนแปลง และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของแสงทำให้แสง สะท้อนและหักเหด้วยแนวระนาบและความยาวคลื่นที่เปลี่ยนแปลงไป เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า plasmon ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางแสงที่เปลี่ยนไปได้ ทำให้ในที่สุดสามารถเชื่อมโยงกับระดับปริมาณดีเอ็นเอได้ Mirkin *et al.*, 1996 ได้รายงานการนำดีเอ็นเอไปจับตัวกับอนุภาคนาโนทองคำ โดยหลักการได้ใช้นาโนทองคำ 2 ชุด จับตัวกับดีเอ็นเอ โพรบ 2 ชนิด และนำ โพรบที่ได้ไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย หากดีเอ็นเอเป้าหมายสามารถจับกับ โพรบทั้งสอง จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ sandwich hybridization ยังผลให้เกิดการตกตะกอน (aggregation) ของอนุภาคนาโนของโลหะ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ plasmon ในกรณีอนุภาคทองคำนาโนเปลี่ยนสีอนุภาคจากแดงเป็นม่วง หลักการเดียวกันนี้ได้รับการนำมาใช้กับ Ag/Au core shell และ Ag/SiO₂ core shell ทำให้เกิดรูปแบบทางนาโนเซ็นเซอร์ในการตรวจวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามการนำเอาดีเอ็นเอมาจับตัวบนอนุภาคนาโนมีความยุ่งยากและจำเป็นต้องควบคุมความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอกับผิวอนุภาคเพื่อให้เกิดความเสถียรต้องมีขั้นตอน fictionalization ดังนั้นจึงมีความพยายามใช้อนุภาคนาโนของโลหะในรูปแบบที่ไม่จำเป็นต้องดัดแปลง Li and Rothberg, 2004 ได้ใช้คุณสมบัติที่ต่างกันระหว่างดีเอ็นเอสายเดียวกับสายคู่ในการจับตัวกับอนุภาคได้ใช้เกลือเป็นตัวกระตุ้นเพื่อแสดงผล ที่สำคัญไม่ต้องทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ทำให้ขั้นตอนมีความซับซ้อนน้อยลงมาก ในครั้งนี้ได้นำหลักการที่ Li and Rothberg (2004) รายงานร่วมกับการใช้ โมเลกุลของ เบต้าไพโรลิดีนดีเอ็นเออนุภาค โพรบ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของแสงเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาของการจับตัวของโพรบที่ซับซ้อนและหลีกเลี่ยงปัญหาความไม่จำเพาะตามหลักการ nucleic acid hybridization ที่เทคนิคของ Li and Rothberg ไม่สามารถทำได้

ในครั้งนี้อยู่ในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification) ได้ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบลูปอุนทุมิเดียว เป็นการเพิ่มปริมาณอย่างจำเพาะมากกว่าเทคนิคพีซีอาร์ เนื่องจากจะต้องใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะถึง 6 บริเวณ ความรวดเร็วของปฏิกิริยาและปริมาณของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ที่มีสูงมากกว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพีซีอาร์ 1000 เท่าขึ้นไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ (detection) โดยดูการเปลี่ยนแปลงสีของแสงของอนุภาคเงินนาโน เลือกใช้อนุภาคเงินนาโนสีฟ้า เนื่องจากอนุภาคเงินนาโนมีค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงของสารละลาย (molar extinction coefficient) สูงกว่าของทองคำ 100 เท่า ผลดังกล่าวทำให้ช่วยเพิ่มความไวและความสามารถในการมองเห็นการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้เงินยังมีคุณสมบัติที่เร่งปรากฏการณ์กระเจิงแสงแบบรามาน (Raman Scattering) ได้ดีกว่าของทองคำ ที่สำคัญการใช้อนุภาคเงินนาโนยังมีข้อดีเหนืออนุภาคทองคำนาโนในแง่ของเสถียรภาพของอนุภาคนาโนเงินที่สูงกว่ามากข้อดี ดังกล่าวจะช่วยให้การตรวจสัญญาณดีเอ็นเอทำได้อย่างรวดเร็วแม่นยำรวดเร็ว ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างอนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำนาโน

คุณสมบัติ	อนุภาคทองคำนาโน	อนุภาคเงินนาโน
ความเสถียร	น้อยกว่า เงินนาโน (3 เดือน)	เสถียรมากกว่าทองคำนาโน (1 ปี)
ราคา	24,700 (ประมาณค่า ณ วันที่ 11 เมษายน 2555)	ถูกกว่าทองคำ 50 เท่า
การเปลี่ยนแปลงสี	แดง → ม่วง	ฟ้า → ใสไม่มีสี
extinction coefficient	-	สูงกว่าทองคำ 100 เท่า

จากตารางที่ 5 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนเงินเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนทองคำที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าอนุภาคนาโนเงินมีความเสถียรมากกว่าอนุภาคนาโนทองคำประมาณ 1 ปี โดยไม่ตกตะกอนด้วยตัวเองขณะที่อนุภาคนาโนทองคำมีเสถียรภาพประมาณ 3 เดือนเท่านั้น ด้านราคาอนุภาคนาโนเงินจะถูกกว่าอนุภาคนาโนทองคำ 50 เท่า (เปรียบเทียบจากราคาในท้องตลาด) แต่เมื่อนำมาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนแล้ว เงินจะสังเคราะห์ง่ายกว่าทองคำ ทำให้ราคาต้นทุนของเงินจะถูกกว่าทองคำประมาณ 100 เท่า ที่สำคัญด้านการเปลี่ยนแปลงทางสีเมื่อมีการตกตะกอนอนุภาคทองคำนาโนจะเปลี่ยนจากสีแดง (ruby) ไปเป็นสีม่วง (violet) แต่สำหรับอนุภาคนาโนเงินสีฟ้าจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นใสไม่มีสีมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายหรือ extinction coefficient อนุภาคเงินนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าอนุภาคทองคำถึง 100 เท่า

การตรวจสอบสัญญาณอยู่บนพื้นฐานของโมเลกุล β -pyrrolidiny DNA analog probe ที่ทำหน้าที่เป็น ช่วยในการตกตะกอน (coagulant) ของอนุภาคนาโนของโลหะ โดยโพรบ จะจับตัวบนผิวอนุภาคผ่านทางบริเวณหมู่ nitrogen/oxygen และโครงสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ในโมเลกุลของโพรบ ทำให้โพรบจับตัวกับอนุภาคได้ อย่างไรก็ตามที่เมื่อมีดีเอ็นเอ เป้าหมาย (ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูบอนุภาคเดี่ยว) จะเกิดจากการจับตัวของโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายทำให้เกิด complex ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอที่เสถียรในรูปที่เป็น ดีเอ็นเอสายคู่หรือ double stand DNA (dsDNA) ขึ้น โพรบจะสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เนื่องจาก คุณสมบัติของโพรบที่เป็น PNA analog ไม่มีประจุโดย ค่างกล่าวช่วยให้การจับตัวของโพรบยังคงเป็นไปตาม Watson & Click rule แต่กลับไม่มีแรงผลัก ภายในโมเลกุลจึงทำให้โพรบจับตัวกันแน่นกว่าในรูปที่เป็นดีเอ็นเอด้วยกัน โพรบจึงสามารถเข้าจับกับสายดีเอ็นเอดังกล่าวได้ ภาวะที่ทำให้คุณสมบัติ coagulant หายไป ขณะเดียวกันก็จะป้องกันไม่ให้อนุภาคตกตะกอนได้ (Li and Rothberg, 2004, Mirkin, 1996) โดยปฏิริยาดังกล่าวขึ้นอยู่กับระดับปริมาณดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามในปฏิริยา การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูบอนุภาคเดี่ยวระดับปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์มีมากกว่าของ พีซีอาร์ มากเห็นได้จากแม่ดีเอ็นเอแม่แบบอยู่ในระดับ LOD ที่ 100 โมเลกุล ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอยังคงมีมากพอที่จะทำให้การตอบสนองการตรวจโดยวิธีการเปลี่ยนแปลงทางสี (colorimetric detection) ด้วยอนุภาคนาโนเงิน ยังคงเกิดอย่างมีประสิทธิภาพที่สำคัญการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับหลักการ จับกันระหว่างคู่สมของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleic acid hybridization) ที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง ดังนั้นผลที่ได้จากการนำเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์นี้ไปประยุกต์ร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชักนำแบบลูบอนุภาคเดี่ยว จึงช่วยทำให้สามารถตรวจโรคซิกนุญยาได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ เหตุผลของความล้มเหลวของวิธีตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้จึงขึ้นกับข้อดีของวิธีการเพิ่มปริมาณที่ให้ความจำเพาะสูง ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจำนวนมาก แม้ในยามที่แม่แบบมีปริมาณน้อย ปฏิริยาสิ้นสุดภายใน 30-60 นาที และที่สำคัญไม่ต้องพึ่งพาเครื่อง thermocycler จึงทำให้สามารถได้สัญญาณดีเอ็นเอจำนวนมาก จากตัวอย่างที่มีไวรัสปนอยู่ขณะ เดียวกันการตรวจสอบสัญญาณโดยการใช้คุณสมบัติ plasmon ของอนุภาคนาโนเงินทำให้การตรวจสัญญาณมีความแม่นยำและมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องพึ่งพาเครื่องมือตรวจวัดใดๆ ด้วยเหตุนี้จึงนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูบมาประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสีของอนุภาคเงินนาโนกับตัวอย่างทางการแพทย์ ใช้ตัวอย่างทั้งหมด 59 ตัวอย่างผลการทดลองที่ได้ทำการเปรียบเทียบผลการทดลอง ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางสีของแสงของอนุภาคเงินนาโนและวิธีมาตรฐานอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่า ผลการทดลองทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันแม้ว่า วิธีการเปลี่ยนแปลงทางสีของอนุภาคเงินนาโน

จะให้ผลบวกกับความผิดพลาด (false positive) 1 ตัวอย่างซึ่งจากการเตรียมตัวอย่าง ดีเอ็นเอที่ผิดพลาดอาจเกิดจากการปนเปื้อนของโมเลกุลดีเอ็นเอระหว่างการทดลอง เมื่อหาค่าความจำเพาะของปฏิกิริยา (Specificity) ได้เท่ากับ 97.68 และหาค่าความไวของปฏิกิริยา (Sensitivity) ได้เท่ากับ 100 ซึ่งถือว่าวิธีการทดลองดังกล่าวให้ผลที่น่าเชื่อถือ

สรุปผลการทดลอง

ได้พัฒนา จีโนเซนเซอร์ที่ ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การเพิ่มปริมาณ สัญญาณดีเอ็นเอ (amplification) และ การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ (detection) ที่สามารถ ตรวจสอบโรคซิคุนคุนยา ได้ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้เทคนิคลูปอุนหมูมเดี่ยว โดยเพิ่ม ปริมาณในส่วนของยีน E1 โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับ ยีนสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ซึ่งมีบริเวณของยีน E1 แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีประสิทธิภาพ เทียบเท่าผลการดำเนินการ ตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ ตามการรายงานของ (Dash *et al.*, 2008) และการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอจากการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคเงินนาโน โดยจะ สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากสีฟ้าเป็นสารละลายใสไม่มีสี

เทคนิคที่พัฒนาได้นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนเป้าหมายเฉพาะของไวรัสชนิดนี้ และสามารถตรวจสอบได้ที่มีดีเอ็นเป้าหมายน้อยที่ LOD ระดับ 100 copies โดยใช้เวลา เพียง 1 ชั่วโมง โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermocycler

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- โครงการพัฒนาศูนย์ความรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. โรคชิคุนคุนยา(Chikungunya fever) [ออนไลน์]. 2552.
แหล่งที่มา: [http://www.nstda.or.th/sci2pub/thaismc/factsheet/hot news/FS-059.pdf](http://www.nstda.or.th/sci2pub/thaismc/factsheet/hot%20news/FS-059.pdf)
[2553, มกราคม 12]
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ. ดีเอ็นเอกับ point of care test ในอุตสาหกรรมอาหาร. ในสัมมนาเชิงปฏิบัติการดีเอ็นเอกับ point of care test ในอุตสาหกรรมอาหาร โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2551).
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ. ไปโอเซนเซอร์กับการตรวจวิเคราะห์อาหารด้วยไมโครลูดีเอ็นเอ. ใน สัมมนาเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ดีเอ็นเอกับการเสริมศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหาร, หน้า 1-7. หน่วยปฏิบัติการชีววิทยาไมเลกุล ห้องปฏิบัติการการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2549)
- ยง ภู่วรรณ. แพทย์จุฬาลงกรณ์การระบาดของโรคชิคุนคุนยาในไทย [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://www.research.chula.ac.th/cu_online/2552/vol_20_1.htm[2552, ตุลาคม 20]
- วรวิมล เจริญศิริ. โรคไข้ปวดข้อยุงลาย [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: <http://www.vachiraphuket.go.th> [2552, มีนาคม 6]
- สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท). ชิคุนคุนยา ชื่อนี้แปลกหู [ออนไลน์] 2554. แหล่งที่มา: <http://biology.ipst.ac.th/index.php/article-2552/195--52.html>
[2554, มกราคม 12]

สาธารณสุข, กระทรวง. คู่มือแนวทางการดำเนินงาน ฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรค ไข้ปวดข้อยุงลาย (CHIKUNGUNYA FEVER) [ออนไลน์]. ม.ป.ป. แหล่งที่มา: <http://www.aksorn.comcs>. [2552, กันยายน 8]

สำนักโรคระบาดวิทยา.Chikungunya [ออนไลน์] 2552. แหล่งที่มา: [http://203.157.15.4/fact/Chikungunya .htm](http://203.157.15.4/fact/Chikungunya.htm) [2552, ธันวาคม 15]

ภาษาอังกฤษ

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.. Basic local alignment search tool. Jornal Molecular Biology: 215(1990): 403-410.

Anand. Chikungunya guide [online]. 2007. Available from: <http://www.chikungunia.com/chikungunya-treatment-symptoms-prevention/chikungunia-is-much-deadlier-than-you-imagined/> [2009, October 10]

Anthony, P. F. Biosensors-Sense and Sensitivity. Biochemistry 290 (2000):1315-1317.

Chaumpluk, P. and Chaiprasart, P. Electrochemical biosensor for a simple and rapid detection of canker (*Xanthomonas axonopodis* pv citri) in pomelo for export. Acta Horticulture 880 (2010): 423-430.

Chaumpluk, P. and Chaiprasart. Fluorescence biosensor based on N-(2-Aminoethyl) glycine peptide nucleic acid for a simple and rapid detection of Escherichia coli in fresh-cut mango. Acta Horticulture in press. (2012).

Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y. and Tamiya, E. Novel electrochemical identification and semi quantification of bovine constituents in feedstuff. Science and Technology of Advance Materials (2006) : 263-269.

Chaumpluk, P., Ekgasit, S., T., Poovorawan, Y. and Donravan, N. Rapid detection of oseltamivir resistant mutation at amino acid residue 274 of novel 2009 human

influenza A virus (H1N1) base on blue silver nanoparticle. Pure and Applied Chemistry International Conference Abstracts (2010): 288.

Clarke, D. H. and Casals, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 7(1958): 561–573 cited in Sudeep, A. B and Parashar, D Chikungunya: an overvie Journal of Biosciences 33,4(2008): 446.

Dash, P. K, Paridaa, M., Santhosha,S. R., Saxenaa, P., Srivastavaa, A., Neerajab, M., Lakshmib, V. and Rao, P.V. L,. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 62(2008): 52–57.

Edwards, C. J., Welch, S. R., Chamberlain, J, Hewson, R., Tolley, H., Cane, P. A., Lloyd, G. G. Molecular diagnosis and analysis of chikungunya virus. Journal of Clinical Virology 39 (2007): 271–275.

Gadkari, D. A., and Sheikh, B. H. IgM antibody capture ELISA in the diagnosis of japanese encephalitis, westNile and dengue virus infections .*Indian J. Med. Res.* 80.1984.p613–619 cited in Sudeep and Parashar. Chikungunya: an overvie. Journal of Biosciences 33(2008): 446.

Grunenwald, H. Direct PCR from a single bacterial colony without DNA extraction

Hahon, N. and Hankins, W. Assay of Chikungunya Virus in Cell Monolayers by Immunofluorescence. Applied and Environmental Microbiology 20(2012) :1315-1317.

Hyning, D. V. and Zukoski, C. F. Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. American Chemical Society 14(1998): 7034-7046.

- Kanjanawarut, R and Su, X. Colorimetric detection of DNA using unmodified metallic nanoparticles and peptide nucleic acid probes. Analytical Chemistry 81(2009): 6122–6129.
- Konstantin, A. Tsetsarkin, D. L. Vanlandingham, C. E. McGee, S. H. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. Plos Pathogens 3(2007): 1985-1906.
- Kumar, N. P., Joseph, R., Kamaraj, T and Jambulingam, P. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. Journal of General Virology 89 (2008): 1945–1948.
- Laurent, P., Roux, K. L., Grivard, P., Bertil, G., Naze, F., Picard, M., Staikowsky, F., Barau, G. Schuffenecker, I and Michault, A. development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. Clinical Chemistry 53, 8(2007): 1408–1414.
- Li, H., and Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) 101, 39 (2004): 14036–14039.
- Mirkin, C. A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C., Storhoff, J.J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature journal 382:(1996) 607–609.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28(2000) E63.

- Pakdeenard, S. Thammacharoen, C. and Ekgasit, S. Synthesis of silver nanoparticles using a biopolymer as reducing agent stabilizer. Pure and Applied Chemistry International Conference Abstracts (2010): 363.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V. and Morita, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Reviews in Medical Virology 18(2008): 407–421.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. (1989).
- Singapore Immunology Network. Success in deciphering the mechanisms of infection and spread of Chikungunya virus within humans points the way to control strategies [Online]. 2010. Available from: <http://www.research.a-star.edu.sg/research/6184> [2010, December 10]
- Staples, J.E., Breiman, R.F. and Powers, A. M. Chikungunya Fever: An epidemiological review of a re-emerging infectious disease. Clinical Infectious Diseases 49 (2009): 942–948.
- Sudeep, A. B. and Parashar, D. Chikungunya: an overview. Journal of Biosciences 33:4 (2008): 443-449.
- Suporpprom, C., Srisuwannaket, C., Sangvanich, P., Vilaivan, T. Synthesis and oligodeoxynucleotide binding properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids bearing prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones. Tetrahedron Letters 46(2005): 2833- 2837.

Thompson, D. G., Enright, A., Faulds, K., Smith, W. E and Graham, D. Ultrasensitive DNA detection using oligonucleotide silver nanoparticle conjugates. Analytical Chemistry 80, 8(2008): 2805-2810.

Thompson, J.D., Higgins, D. G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22(1994): 4673-80. Using the FailSafe™ PCR System. [Online]. 2009. Available from: http://www.epibio.com/newsletter/8_3fail_safe.pdf [2010, May 15]

Vilaivan, T. and Srisuwannaket, C. 2006. Hybridization of pyrrolidiny peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. Organic Letters 8(2006): 1897-1900.

World Health Organization. Guidelines on clinical management of chikungunya fever. Indraprastha Estate : Regional office for South-East Asia, October 2008.

ภาคผนวก

วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด Nucleospin RNA virus®

Lysis

1. ย้ายตัวอย่าง 200 µl (serum, plasma, body fluids, cell culture supernatant) ใส่ลงใน microcentrifuge tube ถ้าตัวอย่างน้อยกว่า 200 µl ให้เติม PBS จนได้ปริมาตร 200 µl
2. เติม VB buffer 400 µl ลงในตัวอย่าง mix by vortexing
3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

Binding

4. เตรียมวาง VB column บน 2 ml collection tube
5. เติม 95% ethanol ลงในตัวอย่าง 500 µl mix โดย vortex
6. ดูด 600 µl จาก ethanol นำไปเติมใน ข้อ 4 (VB column ที่เตรียมไว้)
7. centrifuge at 10,000x (13,000 rpm) 1 นาที
8. ทิ้งส่วนล่าง และนำส่วนที่เหลือจากข้อ 5 มาทำซ้ำ
9. centrifuge at 10,000x (13,000 rpm) 1 นาที
10. ทิ้งส่วนใสที่อยู่ด้านบนแล้วนำ VB column กลับมาใส่ collection tube

Wash

11. เติม W1 buffer 400 µl ลงใน VB column
12. centrifuge at 10000x (13,000 rpm) 30 วินาที
13. ทิ้งส่วนล่างแล้วนำ VB column กลับมาใส่ใน collection tube
14. เติม wash buffer 600 µl (ที่เติม ethanol แล้ว) ลงใน column
15. centrifuge at 10,000x (13,000 rpm) 30 วินาที
16. ทิ้งส่วนล่างแล้วนำ VB column กลับมาใส่ใน collection tube
17. centrifuge at 10,000x (13,000 rpm) 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง

Nucleic Acid Elution

18. วาง VB column บน microcentrifuge tube ที่สะอาด
19. เติม RNase-free water 50 µl ลงตรงกลาง column
20. ทิ้งไว้ 3 นาที จนกระทั่งน้ำซึมลงหมด
21. centrifuge เต็มกำลัง 1 นาที เพื่อชะล้างกรดนิวคลีอิก

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ผู้เขียนวิทยานิพนธ์	นางสาวนุสรรา ดลระหมาน
เกิดเมื่อวันที่	12 มกราคม 2528
ภูมิลำเนา	จังหวัดสตูล
การศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต :คณะ ศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปีการศึกษา 2550 ประกาศนียบัตรบัณฑิตวิชาชีพอครุ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม ในโครงการ ส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) สำเร็จการศึกษาปีการศึกษา 2554 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต :คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปีการศึกษา 2554
ทุนการศึกษา	ทุนอุดหนุนการศึกษาจากมูลนิธินิธิสิตเกล้าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2552

การนำเสนอผลงาน

Oral Presentation : Rapid detection of oseltamivir resistant mutation at amino acid residue 274 of novel 2009 human influenza A virus (H1N1) based on blue silver nanoparticle. *Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2010)* January 21-22, 2010, Ubonratchathani, Thailand.

Oral Presentation : Lab-on-a-paper chip for Chikungunya Virus assay. *Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2012)*. January 11-13, 2012, Chiang Mai, Thailand.