

การสังเคราะห์ควอนตัมดอทติดประจุบวกที่ละลายน้ำได้
เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางการแพทย์

Synthesis of positively charged water soluble quantum dots
for medical sensing applications

โดย

นายนิพัทธ์พันธ์ เส้นเศษ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

เรื่อง การสังเคราะห์ควอนตัมต่อทฤษฎีประจุวงที่ละลายน้ำได้เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางการแพทย์

โดย นายนิพัทธ์พนธ์ เส้นเศษ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

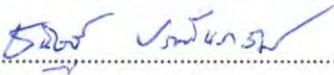
คณะกรรมการสอบโครงการ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิมย้ม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ ดร. ชีรุต วิไลวัลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรรัตน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ศูนย์พัฒนาระบบสารสนเทศ มจร วิทยาเขตสุโขทัย

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ควอนตัมดอทติดประจุบวกที่ละลายน้ำได้เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ทาง
การแพทย์

ชื่อนิสิตในโครงการ นายนิพัทธ์พนธ์ เส้นเศษ เลขประจำตัว 5533106223

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร.ธนิชฐ์ ปราณินรรัตน์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

ควอนตัมดอทเป็นผลึกขนาดนาโนของสารกึ่งตัวนำที่มีคุณสมบัติเฉพาะคือให้การเรืองแสงในช่วงคลื่นเฉพาะที่ขึ้นกับขนาดของอนุภาค ด้วยความง่ายในการเตรียมของควอนตัมดอทประกอบกับความสามารถในการควบคุมขนาดและช่วงความยาวคลื่นที่เรืองแสงโดยรวมถึงมีความเสถียรเชิงแสงดีมากและความสามารถในการปรับเปลี่ยนพื้นผิวของควอนตัมดอทได้ทำให้เป็นฟลูออโรฟออร์ (fluorophore) ที่น่าสนใจนำไปใช้ในการประยุกต์ที่หลากหลายเช่น เป็นฉลากเรืองแสงของสารชีวโมเลกุลและไบโอเซนเซอร์ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์ควอนตัมดอทที่อาศัยระบบ CdTe ที่ละลายน้ำโดยมีลิแกนด์ที่มีประจุเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ เริ่มจากการสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ด้วย CdCl_2 , Na_2TeO_3 , NaBH_4 , $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ และลิแกนด์ได้แก่ cysteamine, L-cysteine, thiosalicylic acid, L-histidine และ 2-mercaptoethanol ซึ่งค้นพบโดยบังเอิญว่าการฉายแสงยูวีทำให้ควอนตัมดอทเปลี่ยนสีที่เรืองแสงไปทางสีแดงซึ่งยืนยันโดยเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ ควอนตัมดอท CdTe ที่มี cysteamine เป็นลิแกนด์เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีแดงภายใต้แสงยูวีที่ 365 nm ที่ 10 นาทีการค้นพบนี้ทำให้พบวิธีใหม่ในการควบคุมสีจากการเรืองแสงของควอนตัมดอทโดยกระตุ้นด้วยรังสียูวี นอกจากนั้นจากการทดลองเบื้องต้นได้พิสูจน์การใช้ควอนตัมดอทเป็นสีย้อมสำหรับตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผูกตรึงกระดาษเซลลูโลส และการใช้ควอนตัมประจุลบที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic acid ในการจับกับฉลากเรืองแสง Nile red ที่ติดอยู่บนพีโรลิดีนลิฟิเอ็นเอซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (เอซีพีซีพีเอ็นเอ) สำหรับใช้ในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอในสารละลาย ในขณะที่การใช้งานเพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอบนกระดาษยังไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากข้อจำกัดในเสถียรของควอนตัมดอท แต่การทดลองส่วนหลังได้พิสูจน์ความสามารถการประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทในการตรวจวัดดีเอ็นเอในสารละลายได้

คำสำคัญ :ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ, ไบโอเซนเซอร์, ฟลูออเรสเซนซ์

Title Synthesis of positively charged water soluble quantum dots for medical sensing applications

Student name Mr. Niphitphon Senses ID 5533106223

Advisor name Professor Dr. Tirayut Vilaivan

Co-advisor name Dr. Thanit Praneenararat

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic Year 2015

Abstract

Quantum dots are nanocrystals of semiconductors possessing unique fluorescence properties that depend on the size of the particles. The ease of synthesis of quantum dots with controllable size and emission wavelength together with the excellent photostability and the ability to functionalize the surface of quantum dots make them an attractive fluorophore to be used in various applications such as labeling of biological molecules and biosensors. In this work, we synthesized water soluble CdTe quantum dots carrying charged ligands for DNA detection applications. First, CdTe quantum dots were synthesized from CdCl_2 , Na_2TeO_3 , NaBH_4 and $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and cysteamine, L-cysteine, thiosalicylic acid, L-histidine and 2-mercaptoethanol as ligands. It was accidentally discovered that exposure to UV radiation caused a cysteamine-capped CdTe quantum dot changed its color from green to red upon UV irradiation at 365 nm for 10 minutes, which was confirmed by fluorescence spectroscopy. This discovery provided a new way for controlling the emission color of the quantum dots by UV irradiation. In addition, some preliminary experiments were carried out to demonstrate the use of quantum dots as a stain for detection of DNA immobilized on cellulose paper and the use of negatively-charged quantum dots with 3-mercaptopropionic acid ligand in combination with Nile red labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) for DNA sequence determination in a solution. While the former was not yet successful due to the limited stability of the synthesized quantum dots, the latter experiment clearly demonstrated the applicability of quantum dots for DNA sensing in solution.

Keywords: quantum dots, PNA, DNA, biosensor, fluorescence

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง การสังเคราะห์ควอนตัมต่อทิตติประจุบวกที่ละลายน้ำได้เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางการแพทย์ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการและอาจารย์ ดร.ธนินทร์ ปราณินรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิด ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดี ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัย จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิ่มยิ้ม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์ ที่ให้เกียรติสละเวลามาเป็นกรรมการประเมินโครงการนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่างๆ ขอขอบคุณทุกๆ กำลังใจจากพ่อ แม่ และเพื่อนๆ และที่สำคัญ ขอขอบคุณสำหรับความอบอุ่น ความใส่ใจเหมือนคนในครอบครัว ที่อาจารย์และพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการได้มอบให้เสมอมา

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	ค
Abstract.....	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ทฤษฎีที่สำคัญ	1
1.1.1 ควอนตัมดอท.....	1
1.1.2 Fluorescence resonance energy transfer (FRET).....	3
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1.2.1 การสังเคราะห์ควอนตัมดอท.....	4
1.2.1.1 Organometallic precursor	4
1.2.1.2 Biosynthesis.....	5
1.2.1.3 Direct aqueous synthesis	6
1.2.2 เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ).....	8
1.2.3 การประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทในการตรวจวัดดีเอ็นเอ	9
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ	13
บทที่ 2 การทดลอง.....	14
2.1 วิธีการทดลองทั่วไป.....	14
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
2.1.2 สารเคมี.....	15
2.2 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ควอนตัมดอทชนิด CdTe.....	16

2.2.1 การสังเคราะห์ควอนตัมดอทในระบบ CdTe ที่มีลิแกนด์ชนิดต่างๆ	16
2.2.2 การเปลี่ยนการเรืองแสงของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้แสงยูวี	17
2.3 การทดสอบการคุมสีของควอนตัมดอทจากการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสาร	17
2.4 การทดสอบความคงตัวและสภาวะที่เหมาะสมในการทำควอนตัมดอท CdTe ให้บริสุทธิ์	18
2.4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการกระจายตะกอนควอนตัมดอทที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการเซนทรีฟิวจ์	18
2.5 การทดสอบการติดกระดาษกรองของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น	18
2.6 การใช้ควอนตัมดอทเป็นตัวให้สัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอในสารละลาย	19
2.6.1 การหาความเข้มข้นของควอนตัมดอทด้วยเครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	19
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	22
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็นCysteamine.....	22
3.2 การเปลี่ยนการเรืองแสงของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์ชนิดต่างๆ ภายใต้แสงยูวี	22
3.3 การคำนวณหาขนาดอนุภาคของควอนตัมดอท	36
3.4 การทดสอบการคุมสีของควอนตัมดอทจากการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสาร	39
3.4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการกระจายตะกอนควอนตัมดอทที่ผ่านการเซนทรีฟิวจ์	40
3.5 การใช้ควอนตัมดอทเป็นตัวให้สัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอในสภาวะสารละลาย	44
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	49
อ้างอิง.....	51
ประวัติผู้วิจัย.....	55

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1.1 การเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุล.....	1
รูปที่ 1.2 ผลของขนาดอนุภาคต่อระดับความต่างของพลังงานและช่วงคลื่นของแสงที่เปล่งออกมาของอนุภาคควอนตัมดอท.....	2
รูปที่ 1.3 a)แผนภาพ Jablonski แสดงกระบวนการ FRET ¹⁰	3
b)การซ้อนทับของฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมระหว่างโมเลกุลตัวให้และโมเลกุลตัวรับ ¹⁰	3
รูปที่ 1.4 การเกิดควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น tri-n-octylphosphinoxide	4
รูปที่ 1.5 ภาพถ่าย TEM ของ CdSe และสารตั้งต้นที่ใช้ ¹²	5
รูปที่ 1.6 ผังการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวโดยใช้ ligand exchange และ encapsulation ¹³	5
รูปที่ 1.7 การเกิดควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น 2-mercaptoethanol.....	6
รูปที่ 1.8 การสังเคราะห์ควอนตัมดอทในระบบ CdTe-CdS-ZnS ที่มีลิแกนด์เป็น GSH ¹⁶	7
รูปที่ 1.9 สมการการเกิดควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic acid.....	7
รูปที่ 1.10 เปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง DNA, Nielsen's PNA และ acpcPNA.....	8
รูปที่ 1.11 การสังเคราะห์ควอนตัมดอท pegylated ประจุบวก ²¹	9
รูปที่ 1.12 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยควอนตัมดอท CdS ²⁶	10
รูปที่ 1.13 a)แสดงควอนตัมดอทที่มีพื้นผิวเป็น DSPE-PEG(2000)Maleimide ²⁷	11
b) แสดงการติดควอนตัมดอทกับพีเอ็นเอ ²⁷	11
รูปที่ 1.14 a) การเปลี่ยนพื้นผิวกระดาษเซลลูโลสเป็นหมู่ imidazole ²⁸	12
b) กลไกการ FRETระหว่างควอนตัมดอทกับฉลากเรืองแสง Cy3 ²⁸	12
รูปที่ 1.15 แสดงการตรึง acpcPNA บนกระดาษเซลลูโลสโดยใช้สีย้อมประจุบวก ²⁹	12
รูปที่ 2.1 สมการการสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe เมื่อใช้ลิแกนด์ที่ต่างกัน	16

รูปที่ 2.2 ขั้นตอนในการล้างควอนตัมดอทที่หยดบนกระดาษกรอง18

รูปที่ 3.1 รูปถ่าย cysteamine-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ.....23

รูปที่ 3.2 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ cysteamine-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบน เครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED.....24

รูปที่ 3.3 รูปถ่าย L-cysteine-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ25

รูปที่ 3.4 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ L-cysteine capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบน เครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED.....26

รูปที่ 3.5 รูปถ่าย thiosalicylic acid-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ.....26

รูปที่ 3.6 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ thiosalicylic acid-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมด วัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED.....27

รูปที่ 3.7 รูปถ่าย 2-mercaptoethanol-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ..28

รูปที่ 3.8 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ 2-mercaptoethanol-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัม ทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED.....29

รูปที่ 3.9 รูปถ่าย L-histidine-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ.....30

รูปที่ 3.10 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ L-histidine-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบน เครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED.....31

รูปที่ 3.11 รูปถ่าย cysteamine-capped CdTe quantum dot ที่มีความเข้มข้นสองเท่า a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ33

รูปที่ 3.12 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ cysteamine-capped CdTe quantum dot ความเข้มข้นสองเท่าเมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED.....	34
รูปที่ 3.13 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของ cysteamine-capped quantum dot ที่ผ่านการให้ความร้อน	35
รูปที่ 3.14 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของ cysteamine-capped CdTe quantum dot เมื่อนำไปฉายแสงยูวี โดยไม่สัมผัสกับความร้อนจากหลอดยูวี.....	36
รูปที่ 3.15 การเรืองแสงของควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น L-cysteine.....	40
รูปที่ 3.16 การศึกษาความคงตัวของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine เมื่อนำไปเซนตริฟิวจ์ และเติมตัวทำละลายแทนสารละลายเริ่มต้น	41
รูปที่ 3.17 แสดงหลักการตรวจหาดีเอ็นเอโดยใช้ควอนตัมดอทและพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรอง	42
รูปที่ 3.18 ภาพถ่ายของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine จากสารละลายเริ่มต้นที่หยดบนกระดาษกรอง ก่อนและหลังล้าง	43
รูปที่ 3.19 ภาพถ่ายของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine ที่ผ่านการเซนตริฟิวจ์และนำกลับมาแขวนลอยใหม่ในน้ำ ที่หยดบนกระดาษกรอง ก่อนและหลังล้าง	43
รูปที่ 3.20 กราฟแสดงช่วงการดูดกลืนและเรืองแสงของ Nile red ³⁹	44
รูปที่ 3.21 หลักการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจาก Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ระหว่างควอนตัมดอทประจุลบกับฉลากเรืองแสงที่ติดบนพีเอ็นเอโพรบ	45
รูปที่ 3.22 หลักการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจาก Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ระหว่างควอนตัมดอทประจุบวกกับฉลากเรืองแสงที่ติดบนพีเอ็นเอโพรบ	46
รูปที่ 3.23 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมการประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic กับ พีเอ็นเอโพรบ Nr 10 ลำดับเบสเมื่อใส่ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอ ตามลำดับ (สภาวะ: 0.3 μ M พีเอ็นเอ	

เอ, 3.6 μM ดีเอ็นเอ, 74 nM ควอนตัมดอท (3.0 nm) ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$ สำหรับควอนตัมดอทและพีเอ็นเอสายเดี่ยว, PMT voltage = high).....47

รูปที่ 3.24 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมการประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic กับ พีเอ็นเอโพรบ Nr 10 ลำดับเบสเมื่อใส่ควอนตัมดอท ดีเอ็นเอ และ ควอนตัมดอท ตามลำดับ (สภาวะ: 0.3 μM พีเอ็นเอ, 3.6 μM ดีเอ็นเอ, 74 nM ควอนตัมดอท (3.0 nm) ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$ สำหรับควอนตัมดอทและพีเอ็นเอสายเดี่ยว, PMT voltage = high).....48



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงอัตราส่วน NaBH_4 , $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่ใช้	17
ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงสภาวะและปริมาณความเข้มข้นของพีเอ็นเอ, ควอนตัมดอท และดีเอ็นเอ	21
ตารางที่ 3.1 แสดงสีและการเปลี่ยนของ λ_{max} กับค่าความสว่างของควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้เมื่อฉายแสงยูวีที่เวลา 10 วินาทีถึง 10 นาที	1
ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มข้นสุดท้ายและอัตราส่วนโดยโมล $\text{Cd}^{2+}:\text{NaBH}_4:\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	39



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

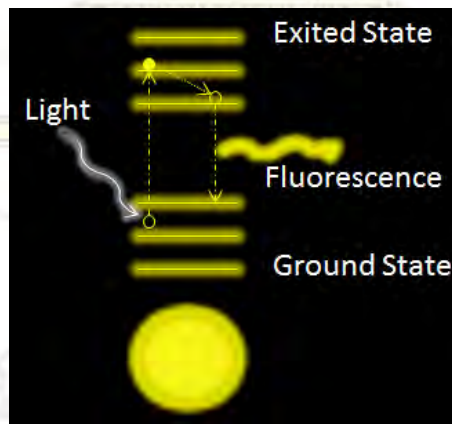
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ทฤษฎีที่สำคัญ

1.1.1 ควอนตัมดอท

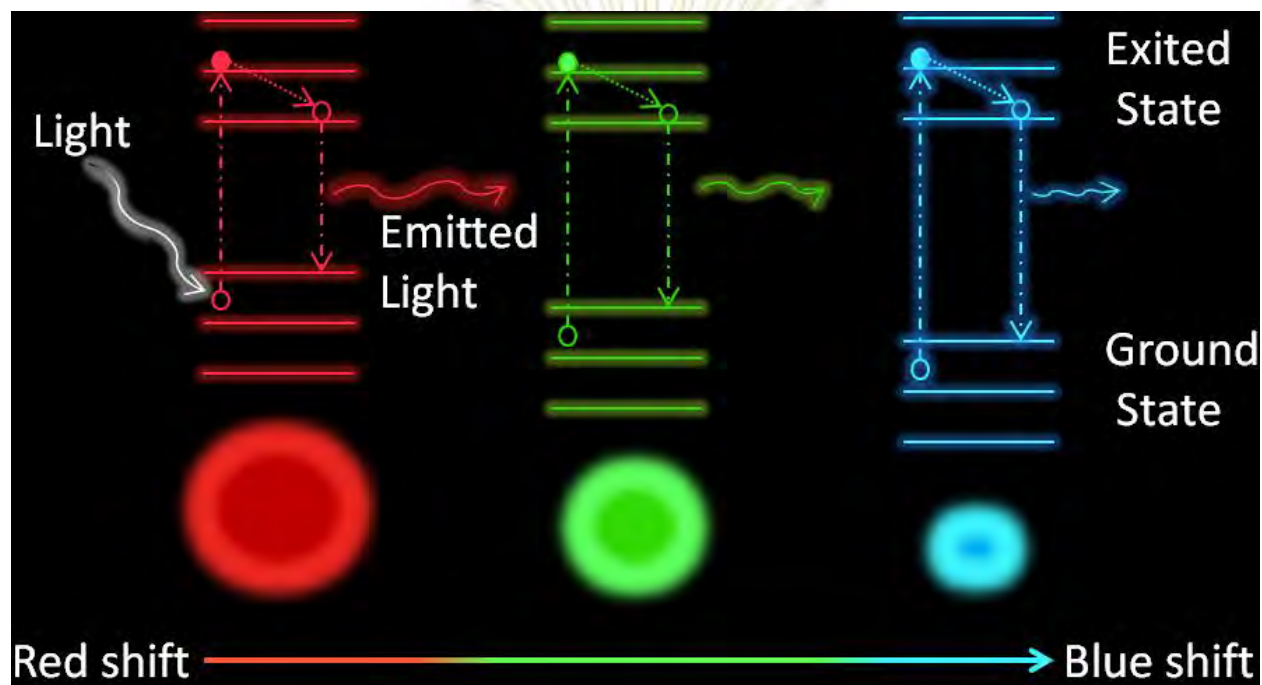
ควอนตัมดอท (quantum dot) คือผลึกขนาดนาโนของสารกึ่งตัวนำขนาด $2-10 \text{ nm}^{1,2}$ ซึ่งเมื่อมองโครงสร้างในระดับนาโนจะพบเป็นลักษณะของจุด (dot) และมีพฤติกรรมการเปล่งแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะเมื่อถูกกระตุ้นสอดคล้องกับหลักการควอนตัม (quantum) ทางฟิสิกส์จึงเป็นที่มาของชื่อควอนตัมดอท โดยการเปล่งแสงนั้นเกิดจากการที่อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลโดยปกติแล้วจะอยู่ที่สถานะพื้น (ground state) ซึ่งจะมีพลังงานคงที่ แต่เมื่ออิเล็กตรอนดังกล่าวถูกกระตุ้นโดยรังสีวิทยหรือช่วงแสงที่มองเห็นจะทำให้อิเล็กตรอนขึ้นไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงขึ้นซึ่งเรียกว่าสถานะกระตุ้น (excited state) อิเล็กตรอนในสถานะนี้จะไม่เสถียรจึงพยายามที่จะกลับมาอยู่ที่สถานะพื้นโดยคายพลังงานออกมามีทั้งในรูปความร้อน และในรูปของแสง โดยการคายพลังงานรูปของแสงเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence)” ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 การเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุล

การเปล่งแสงของควอนตัมดอทยังมีลักษณะเฉพาะที่สำคัญ คือมีความยาวคลื่นที่ขึ้นกับขนาดของอนุภาคควอนตัมดอท เมื่อควอนตัมดอทถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีพลังงานสูงก็จะปลดปล่อยแสงที่มีพลังงานต่ำกว่าออกมา โดยเมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ ระดับความต่างของพลังงาน (band gap) จะมัน้อย ทำให้สีที่ได้ออกมาในช่วงคลื่นค่อนข้างแคบ

ทางสีแดง (ความยาวคลื่นมีค่ามาก) และในทางตรงกันข้ามอนุภาคที่มีขนาดเล็กจะมีความต่างพลังงานมาก และเปล่งแสงในช่วงคลื่นก่อนไปทางสีน้ำเงิน (ความยาวคลื่นต่ำ) ดังรูปที่ 1.2



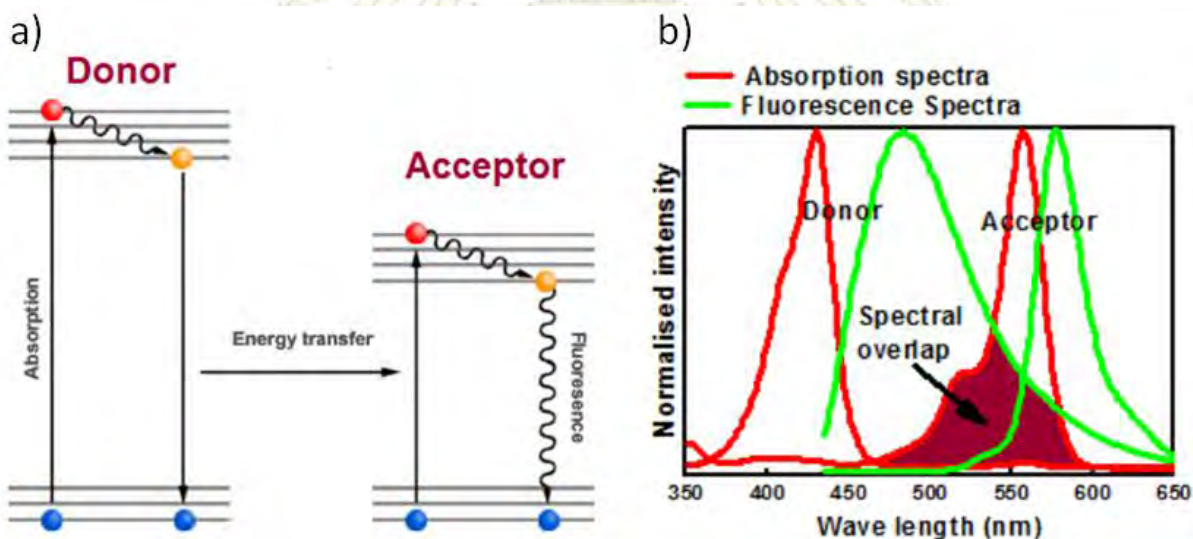
รูปที่ 1.2 ผลของขนาดอนุภาคต่อระดับความต่างของพลังงานและช่วงคลื่นของแสงที่เปล่งออกมาของอนุภาคควอนตัมดอท

ควอนตัมดอทที่มีการศึกษากันมากในปัจจุบันจะเป็นสารอนินทรีย์ในกลุ่มซัลโคจีไนด์ (chalcogenide) ของธาตุในหมู่ 2 ของตารางธาตุ เช่น cadmium telluride (CdTe), cadmium selenide (CdSe), และ zinc selenide (ZnSe) แต่ก็อาจเป็นธาตุหมู่อื่นได้ เช่น lead sulfide (PbS)^{3,4,5} ซึ่งส่วนใหญ่อนุภาคควอนตัมดอทจำเป็นต้องมีโมเลกุลของสารอินทรีย์หรือลิแกนด์ห่อหุ้มล้อมรอบแกนกลางที่เป็นผลึกของสารกึ่งตัวนำเอาไว้เพื่อช่วยให้ควอนตัมดอทเสถียร ตัวอย่างของลิแกนด์เช่น 3-mercaptopropionic acid, L-cysteine และ cysteamine^{6,7} โดยจะสังเกตว่าลิแกนด์ส่วนใหญ่จะมีหมู่ไทออลอยู่ด้วย และลิแกนด์ที่แตกต่างกันก็จะส่งผลต่อสมบัติเชิงแสงที่ต่างกันของอนุภาคควอนตัมดอท

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

FRET (Fluorescence resonance energy transfer หรือ Förster resonance energy transfer) เป็นปรากฏการณ์ถ่ายโอนพลังงานซึ่งเกิดจากการที่สองโมเลกุล โดยเมื่อโมเลกุลหนึ่งถูกกระตุ้นแล้วจะเกิดการถ่ายเทพลังงานจากสภาวะกระตุ้นของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ให้พลังงาน (donor molecule) ไปสู่มอเลกุลตัวรับ (acceptor molecule) ที่อยู่ในสถานะพื้น ซึ่งจะส่งผลให้การคายแสงของโมเลกุลที่เป็นตัวให้พลังงานลดลง และการคายแสงจะไปที่โมเลกุลตัวรับแทนซึ่งสามารถแสดงผ่านแผนภาพ Jablonski ดังรูปที่ 1.3 a การ FRET จะเกิดขึ้นได้ภายใต้เงื่อนไขสำคัญ 3 ประการคือ 1. ระยะห่างระหว่างโมเลกุลที่ทำหน้าที่ให้และโมเลกุลที่ทำหน้าที่รับต้องอยู่ใกล้กันแต่ไม่ติดกันโดยระยะทางที่เกิด FRET ได้คือตั้งแต่ 10-100 Å^o 2. การซ้อนทับของฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมระหว่างสเปกตรัมการคายแสงของโมเลกุลตัวให้และสเปกตรัมการกระตุ้นของโมเลกุลตัวรับ ดังรูปที่ 1.3 b 3. การจัดเรียงตัวของโมเลกุลตัวให้และตัวรับที่เหมาะสม ปัจจุบันการ FRET ถูกนำมาประยุกต์ใช้มากในงานทางด้านชีวการแพทย์เช่น การค้นพบยาหรือเป้าหมายใหม่ๆ^{8,9}



รูปที่ 1.3 a) แผนภาพ Jablonski แสดงกระบวนการ FRET¹⁰

b) การซ้อนทับของฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมระหว่างโมเลกุลตัวให้และโมเลกุลตัวรับ¹⁰

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

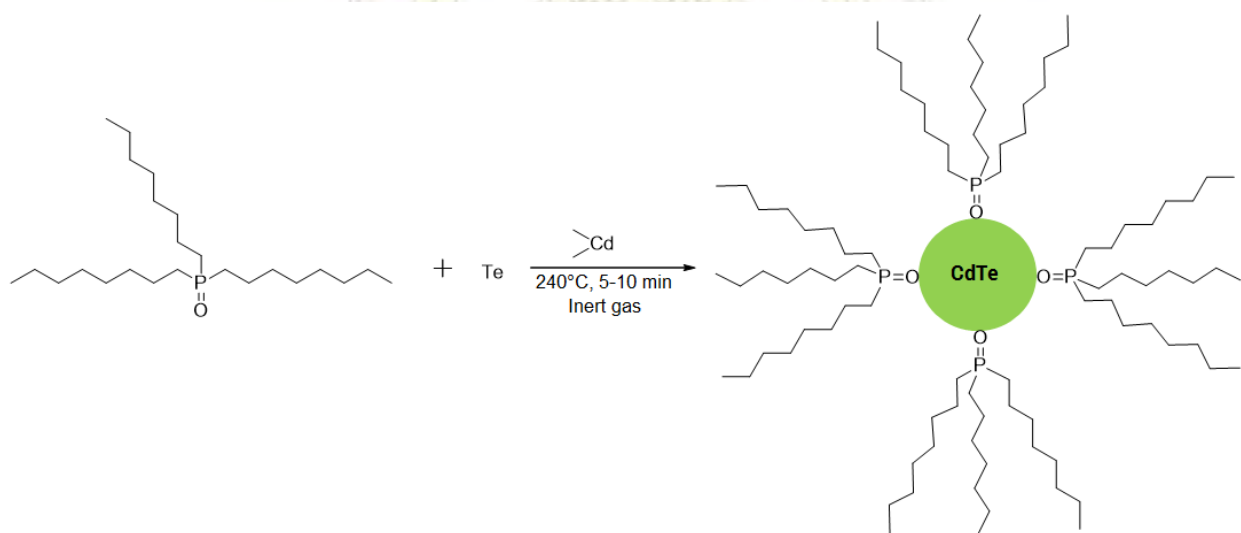
1.2.1 การสังเคราะห์ควอนตัมดอท

การสังเคราะห์ควอนตัมดอทเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ทางชีวภาพและทางการแพทย์นั้นนิยมนำมาใช้ในรูปแบบที่สามารถละลายน้ำและใช้ในบัฟเฟอร์ได้ โดยในการสังเคราะห์ควอนตัมดอทแบ่งเป็น 3 วิธีหลักๆ

1.2.1.1 Organometallic precursor

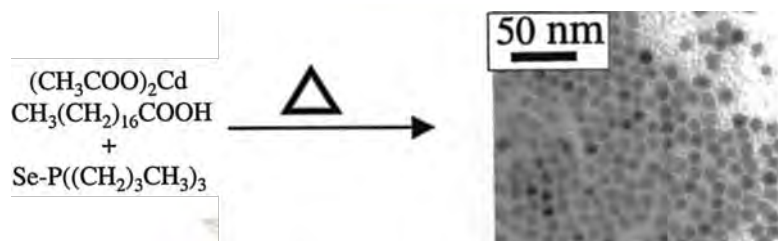
วิธีดังกล่าวจะอาศัยการรวมตัวของผลึกโดยการสังเคราะห์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิสูงซึ่งขนาดของควอนตัมดอทก็จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวจะได้ควอนตัมดอทในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำ เช่น

งานวิจัยของ Murray และคณะ¹¹ ได้ทำการสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น tri-n-octylphosphineoxide (TOPO) ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วโดยใช้สารตั้งต้นได้แก่ TOPO, tellurium และ dimethylcadmium (Me_2Cd) โดยทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศแก๊สเฉื่อยที่อุณหภูมิ 240 °C ดังรูปที่ 1.4



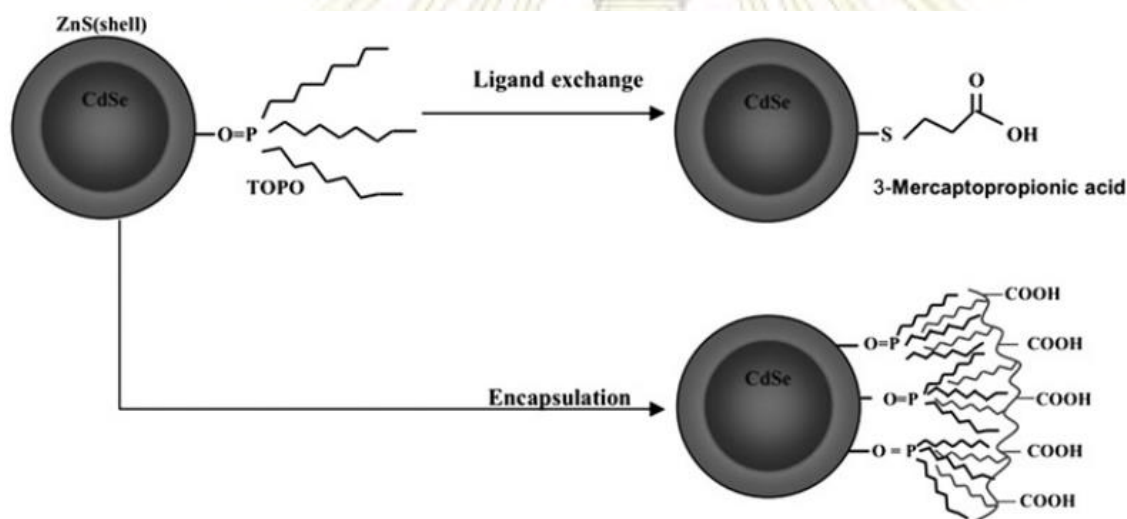
รูปที่ 1.4 การเกิดควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น tri-n-octylphosphineoxide

Qu และคณะ¹² ได้ทำการสังเคราะห์ควอนตัมดอทระบบ CdSe โดยใช้ลิแกนด์ที่ไม่มีขั้วอย่าง lauric acid โดยใช้ $\text{Cd}(\text{Ac})_2$ และ TOP-Se เป็นแหล่งในการเกิดผลึกโดยใช้ตัวทำละลายเป็น TOPO โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250-360 °C พร้อมกับผ่านแก๊ส Ar ดังรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 ภาพถ่าย TEM ของ CdSe และสารตั้งต้นที่ใช้¹²

การจะทำให้ควอนตัมดอทละลายน้ำได้จะมีด้วยกันสองวิธี ได้แก่ 1. Ligand exchange จะเป็นการเปลี่ยนลิแกนด์จากที่ไม่มีขั้วให้เป็นลิแกนด์ที่มีขั้วแทน และ 2. Encapsulation โดยวิธีดังกล่าวจะทำการหุ้มหรือสร้างพันธะของส่วนที่ไม่มีขั้วด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วสูงดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 ผังการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวโดยใช้ ligand exchange และ encapsulation¹³

อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือควอนตัมดอทที่ได้จะสูญเสียความสว่างไปมากและมีโอกาสที่จะเกิดการตกตะกอนเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับบัพเฟอร์

1.2.1.2 Biosynthesis

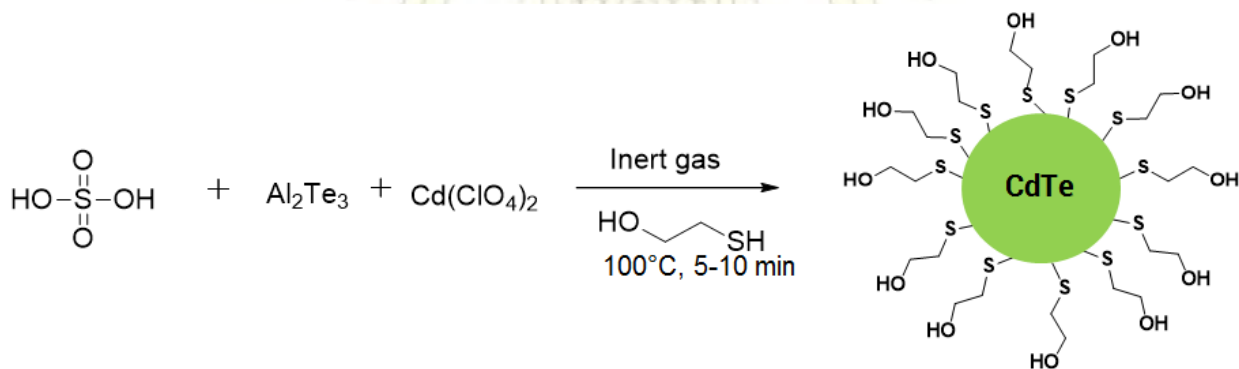
เป็นวิธีการสังเคราะห์โดยใช้สิ่งมีชีวิตทำให้ได้ควอนตัมดอทที่มีความเป็นพิษต่ำแต่ก็แลกมาด้วยความสว่างที่น้อยและใช้เวลาในการสังเคราะห์ที่นาน เช่น

Pérez-Donoso และ คณะ¹⁴ ได้ทำการสังเคราะห์ควอนตัมดอทระบบ CdTe โดยใช้ CdCl_2 , K_2TeO_3 และ GSH โดยบ่มกับจุลินทรีย์ M9 minimal ซึ่งเอนไซม์ภายในจุลินทรีย์จะช่วยในการรีดิวซ์และทำให้เกิดควอนตัมดอท

1.2.1.3 Direct aqueous synthesis

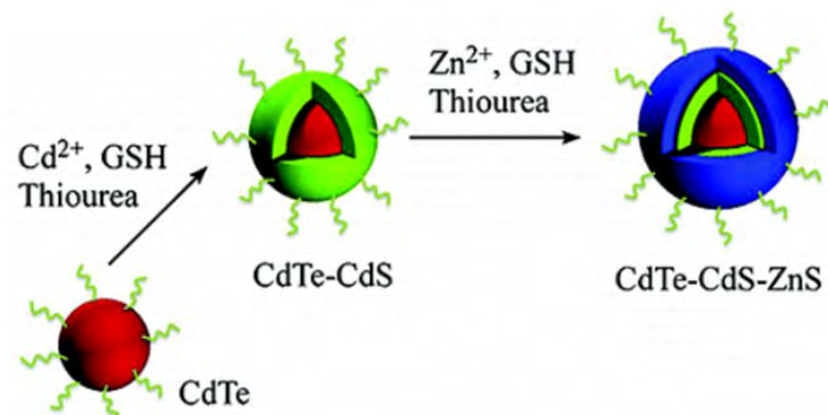
วิธีดังกล่าวเป็นการสังเคราะห์ในน้ำโดยตรง ซึ่งลิแกนด์ที่นิยมนำมาใช้มักมีหมู่ thiol เนื่องจากให้ความเสถียรที่ค่อนข้างดี และเนื่องจากวิธีดังกล่าวสามารถตกตะกอน, ล้าง และทำให้แห้งได้จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับสังเคราะห์เพื่อใช้ในงานทางชีววิทยาเช่น

งานวิจัยของ Gaponik และคณะ¹⁵ ได้สังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ที่กระจายตัวในน้ำได้โดยใช้ลิแกนด์เป็น 2-mercaptoethanol ซึ่งสมบัติการละลายน้ำเป็นที่ต้องการเนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับระบบทางชีวภาพได้ โดยมีสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เป็น $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$, Al_2Te_3 , H_2SO_4 และ 2-mercaptoethanol โดยทำปฏิกิริยาที่ 100°C ภายใต้บรรยากาศแก๊สเฉื่อยและใช้เวลาอย่างน้อย 5-10 นาที ซึ่งเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคที่ต้องการโดยเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 1.7



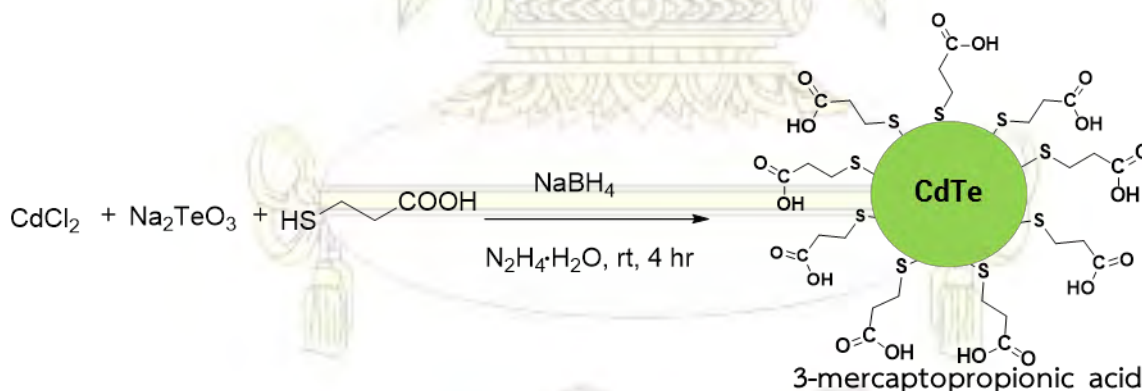
รูปที่ 1.7 การเกิดควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น 2-mercaptoethanol

Liu และคณะ¹⁶ ได้สังเคราะห์ควอนตัมดอทที่ละลายในน้ำได้ในระบบ CdTe ที่ห่อหุ้มด้วย CdS/ZnS เพื่อลดความเป็นพิษที่เกิดสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลิแกนด์เป็น glutathione (GSH) ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสามตัวที่พบได้ในสิ่งมีชีวิต สังเคราะห์โดยนำควอนตัมดอทระบบ CdTe มาเคลือบด้วย CdS shell โดยใช้ GSH, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ และ thiourea นำไปให้ความร้อนที่ 90°C เพื่อให้เกิด CdTe-CdS จากนั้นใส่ Zn^{2+} ละลายใน $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ก่อนนำไปให้ความร้อนที่ 90°C เพื่อให้เกิดเป็น CdTe-CdS-ZnS ดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 การสังเคราะห์ควอนตัมดอทในระบบ CdTe-CdS-ZnS ที่มีลิแกนด์เป็น GSH¹⁶

Zhou. D. และคณะ¹⁷ ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ควอนตัมดอทในกลุ่ม CdTe ที่ทำได้ง่ายเนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยบรรยากาศแก๊สเฉื่อย และสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยควอนตัมดอทที่ได้อาจมีความสามารถกระจายตัวได้ในน้ำ โดยมีสารตั้งต้นเป็น CdCl₂, Na₂TeO₃, NaBH₄ และ N₂H₄·H₂O และมี 3-mercaptopropionic acid เป็นลิแกนด์ โดยเกิดปฏิกิริยาได้ดังรูปที่ 1.9



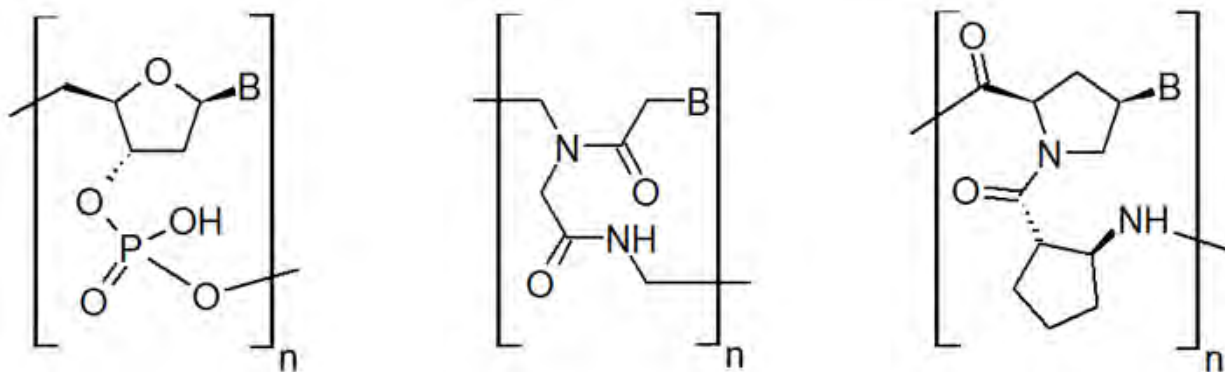
รูปที่ 1.9 สมการการเกิดควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic acid

ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคจากปริมาณอัตราส่วนของ NaBH₄ และ N₂H₄·H₂O โดย NaBH₄ มากจะทำให้การก่อตัวเป็นนิวเคลียสเกิดไว้มากจึงเกิดเป็นอนุภาคควอนตัมดอทขนาดเล็ก และสัดส่วนของ NaBH₄ ที่น้อยก็จะให้ผลตรงข้ามกันคือได้ควอนตัมดอทขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นวิธีที่น่าสนใจในการนำมาสังเคราะห์

ควอนตัมดอทเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบ (PNA probe) เพื่อการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้

1.2.2 เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ)

พีเอ็นเอ (peptide nucleic acid, PNA) เป็นโมเลกุลสังเคราะห์ที่เลียนแบบดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) ที่แสดงความสามารถในการยึดจับกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงกว่าการจับกันของดีเอ็นเอด้วยตัวเอง เนื่องจากการจับกันของดีเอ็นเอด้วยตัวเองจะมีแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ ส่วนพีเอ็นเอ นั้นไม่มีประจุจึงเป็นข้อได้เปรียบในการจับกับดีเอ็นเอ นอกจากนี้พีเอ็นเอยังแสดงความจำเพาะเจาะจงของการจับยึดที่ดีกว่าดีเอ็นเอจับกันเอง จึงเป็นจุดเด่นที่ทำให้พีเอ็นเอถูกนำมาใช้แทนดีเอ็นเอในวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการนำมาใช้เป็นโพรบ สำหรับตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอ พีเอ็นเอถูกสังเคราะห์ครั้งแรกโดย Nielsen และคณะเมื่อกว่า 20 ปีมาแล้ว¹⁸ โดยมีโครงสร้างหลักเป็นโอลิโกเมอร์ของ N-(2-aminoethyl)glycine ที่แต่ละหน่วยเชื่อมต่อกับนิวคลีโอเบส (nucleobase) ผ่านตัวเชื่อมเมทิลีนคาร์บอนิล (methylene carbonyl) ต่อมา มีการพัฒนาพีเอ็นเอให้มีสมบัติในการยึดจับที่ดีขึ้นกว่าพีเอ็นเอดั้งเดิม ตัวอย่างเช่น เอซีพีซีพีเอ็นเอ (2-aminocyclopentanecarboxylic acid PNA, acpcPNA) ซึ่งถูกพัฒนาโดยธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ^{19,20} มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.10

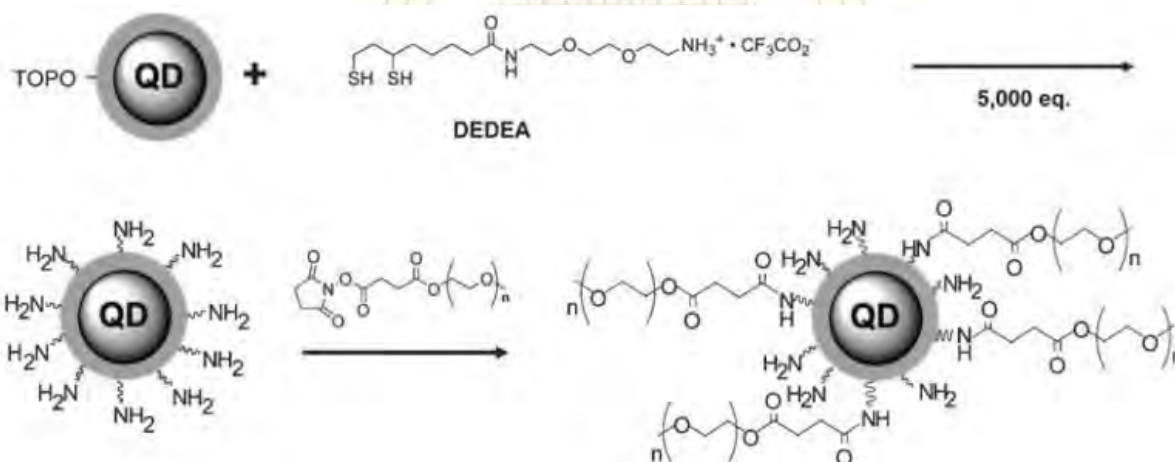


รูปที่ 1.10 เปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง DNA, Nielsen's PNA และ acpcPNA

1.2.3 การประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทในการตรวจวัดดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA/RNA sequence determination) มีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากถูกนำมาใช้ในการตรวจหาโรคทั้งในพืชและสัตว์^{21,22} การตรวจหาดีเอ็นเอแปลกปลอมในอาหารส่งออก²³ และการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์²⁴ ซึ่งวิธีที่นำมาใช้มีหลากหลาย เช่น การอ่านลำดับเบสโดยตรง (sequencing), การทำพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) ร่วมกับเทคนิคทางอิเล็กทรอนิกส์ที่เหมาะสม หรือการใช้โพรบเป็นตัวตรวจอ่านลำดับเบส เป็นต้น ปัญหาของวิธีการเหล่านี้คือมีขั้นตอนที่ซับซ้อนต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะเฉพาะ ใช้เวลานาน และไม่สะดวกในการนำมาใช้ในภาคสนาม ด้วยคุณสมบัติที่ควอนตัมดอทสามารถเรืองแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะ มีความสว่างสูง และมีความคงทนต่อการเกิดการฟอกสีด้วยแสงที่ดี จึงถูกนำมาใช้เป็นฉลากเรืองแสงในวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย โดยหนึ่งในนั้นคือการใช้เป็นฉลากเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยมันถูกใช้ร่วมกับดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe)

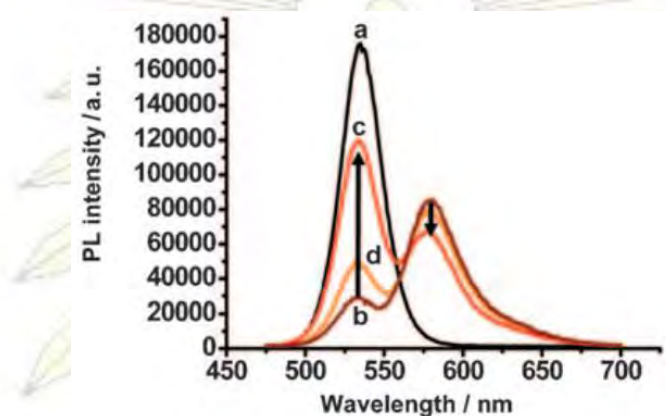
Sing และคณะ²⁵ ได้พัฒนาวิธีในการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยควอนตัมดอทที่มีพื้นผิวประจุบวกในระบบ CdSe/ZnS โดยที่ใช้ลิแกนด์เป็น dihydrolipoic acid-2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) (DEDEA) conjugate ซึ่งมีพื้นผิวเป็นหมู่อะมิโน จากนั้นนำอนุภาคไปปรับปรุงพื้นผิวให้มีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำ และลดการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงลงด้วย polyethylene glycol (PEG) ดังรูปที่ 1.11



รูปที่ 1.11 การสังเคราะห์ควอนตัมดอท pegylated ประจุบวก²¹

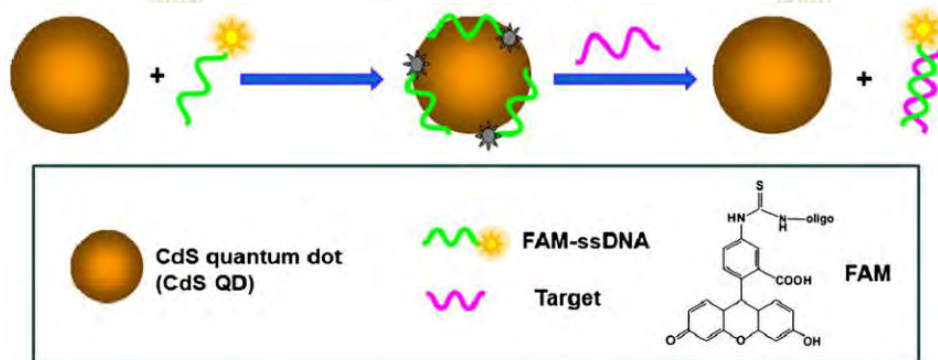
ควอนตัมดอทดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง 5-carboxytetramethylrhodamine, TAMRA ไว้โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อใส่ควอนตัมดอทและดีเอ็นเอโพรบลงไปด้วยกัน จะทำให้เกิดการ FRET สัญญาณการเรืองแสงของ TAMRA จะสูงขึ้น

และของควอนตัมดอทจะต่ำลงดังรูป 1.11 b แต่เมื่อใส่ดีเอ็นเอคู่สมลงไปจะไปแย่งจับกับดีเอ็นเอโพรบทำให้จากที่ห่อหุ้มควอนตัมดอทไว้อยู่จะหลุดออกกลายเป็นโครงสร้างแบบเกลียวทำให้ระยะห่างของ TAMRA กับควอนตัมดอทที่เพิ่มขึ้นทำให้การ FRET หายไป เมื่อถูกกระตุ้น และจะเห็นสัญญาณของควอนตัมดอทสูงขึ้นและของ TAMRA ต่ำลง ดังรูป 1.11 c โดยสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สมและดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมได้



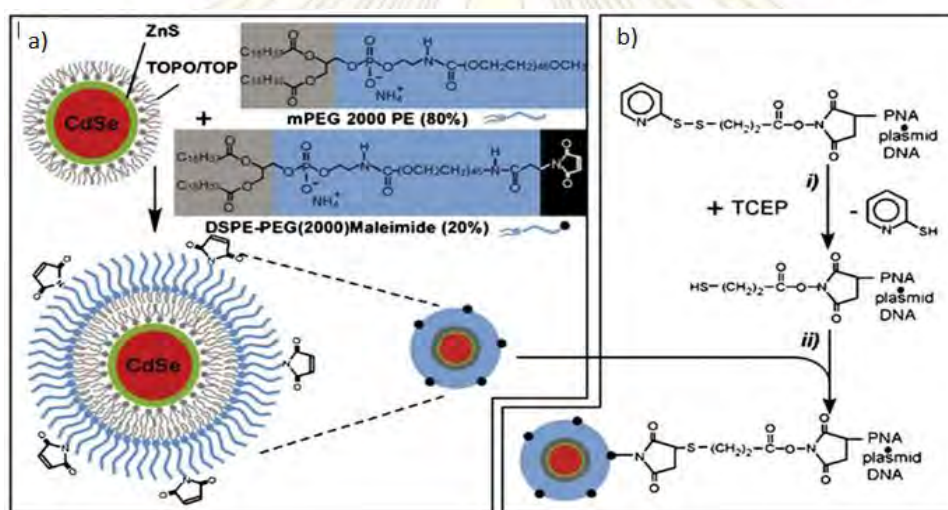
รูปที่ 1.11 สมการสังเคราะห์ควอนตัมดอท pegylated ประจวบ²¹

Sun และคณะ²⁶ ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยควอนตัมดอทในระบบ CdS ที่มีตัวทำให้เสถียรเป็น sodium hexametaphosphate ทำให้ได้ควอนตัมดอทที่มีพื้นผิวประจุลบ และนำมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอโพรบที่มีฉลากเรืองแสงเป็น fluorescein (FAM) โดยใช้หลักการที่ว่าควอนตัมดอทประจุลบดังกล่าวจะสามารถจับกับดีเอ็นเอโพรบได้ถึงแม้จะมีแรงผลัก เนื่องจากการเกิดพันธะโคออดิเนชันของหมู่ไนโตรเจนของดีเอ็นเอเบสกับควอนตัมดอทที่มีค่าสูงกว่าโดยเมื่อควอนตัมดอทจับกับดีเอ็นเอโพรบจะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ลดลงแต่เมื่อใส่ดีเอ็นเอคู่สมลงไปดีเอ็นเอโพรบจะไปจับกับดีเอ็นเอคู่สมแทนทำให้กลับมาสว่างดังรูปที่ 1.12



รูปที่ 1.12 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยควอนตัมดอท CdS²⁶

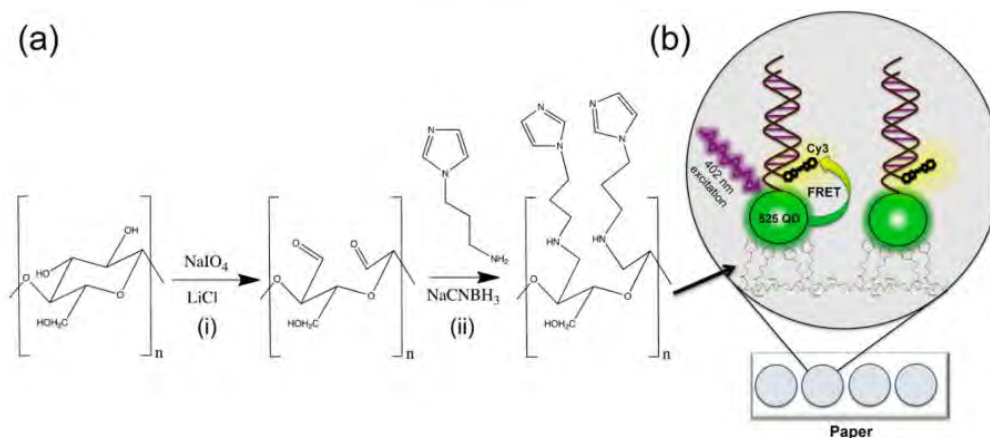
Burgess และคณะ²⁷ ได้นำพีเอ็นเอที่มีปลายเชื่อมเป็น N-succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionate มาติดกับดีเอ็นเอก่อนนำไปติดที่พื้นผิวของควอนตัมดอทในระบบ CdSe/ZnS ที่มีพื้นผิวเป็น polyethylene glycol และนำไปปรับพื้นผิวด้วย phospholipid ได้เป็น 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene)-2000], DSPE-PEG(2000) ก่อนนำไปติดด้วย maleimide ได้เป็น 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] ดังรูปที่ 1.13 a เพื่อใช้ในการจับกับพีเอ็นเอที่มีปลายเชื่อมเป็น N-succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionate ดังรูปที่ 1.13 b ซึ่งในงานนี้จะนำไปควอนตัมดอทดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการแสดงออกของยีนทางชีววิทยา



รูปที่ 1.13 a) แสดงควอนตัมดอทที่มีพื้นผิวเป็น DSPE-PEG(2000)Maleimide²⁷

b) แสดงการติดควอนตัมดอทกับพีเอ็นเอ²⁷

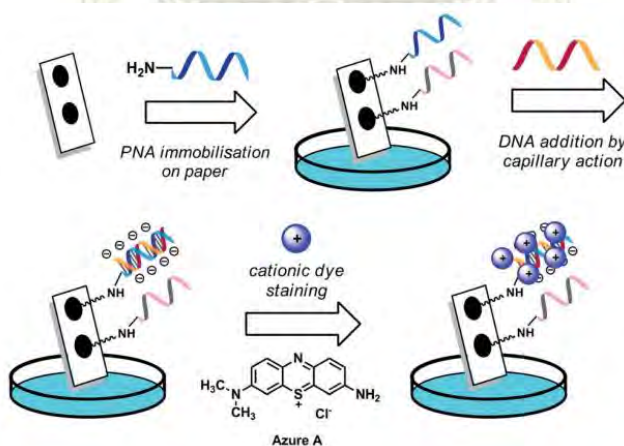
Krull และคณะ²⁸ ได้ทำการตรึงควอนตัมดอทระบบ CdS_xSe_{1-x}/ZnS ที่มีลิแกนด์เป็น oleic acid โดยปรับปรุงพื้นผิวด้วย glutathione (GSH) เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophilic เพื่อให้ละลายในน้ำได้ดีและนำไปติดกับดีเอ็นเอโพรบที่มีปลายเป็นหมู่ dithiol ซึ่งจะไปจับกับไอออนบวกบนควอนตัมดอท ส่วนกระดาษเซลลูโลสที่ใช้ตรึงควอนตัมดอทจะถูกปรับเปลี่ยนพื้นผิวโดยใช้ $NaIO_4$ และ $LiCl$ เพื่อให้กลายเป็นหมู่แอลดีไฮด์ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้นเติม $NaCNBH_3$ และ 1-(3-aminopropyl)imidazole ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา imine ตรึงหมู่ imidazole ไว้ดังรูปที่ 1.14 a ซึ่งหลังจากตรึงควอนตัมดอทลงบนกระดาษที่ดัดแปลงพื้นผิวแล้วในงานนี้จะใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมที่ติดฉลากเรืองแสง Cy3 ไว้ซึ่งเมื่อเกิดการไฮบริดซ์ของดีเอ็นเอโดยจะอาศัยกลไกการ FRET ในการให้สี ดังรูปที่ 1.14 b



รูปที่ 1.14 a) การเปลี่ยนพื้นผิวกระดาษเซลลูโลสเป็นหมู่ imidazole²⁸

b) กลไกการ FRETระหว่างควอนตัมดอทกับฉลากเรืองแสง Cy3²⁸

ในปี 2015 ธนิชัฐ ปราณินรารัตน์ และคณะ²⁹ ได้ตรึงพีเอ็นเอโพรบลงบนกระดาษเซลลูโลส เพื่อใช้ในการ ดูดจับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ตรงกับโพรบนั้นโดยการเข้าคู่เบสแบบวัตสันคริกและทำให้เกิดประจุลบบนพื้นผิวของ กระดาษ จากนั้นจึงใช้สีย้อม Azure A ซึ่งมีประจุบวก ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอทำให้เกิดสีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ตรงบริเวณที่มีดีเอ็นเออยู่ดังรูปที่ 1.15 อย่างไรก็ตามสีย้อมดังกล่าวให้ความไวที่ไม่สูงนัก³⁰ จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนา ควอนตัมดอทมาใช้แทนสีย้อมดังกล่าวเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



รูปที่ 1.15 แสดงการตรึง acpcPNA บนกระดาษเซลลูโลสโดยใช้สีย้อมประจุบวก²⁹

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจสังเคราะห์ควอนตัมดอทที่มีประจุบวกหรือลบที่สามารถกระจายตัวได้ในน้ำ เพื่อนำไปใช้แทนสีย้อมประจุบวกสำหรับตรวจวัดดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนกระดาษ หรือนำไปใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสงเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอ



บทที่ 2

การทดลอง

2.1 วิธีการทดลองทั่วไป

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- การชั่งน้ำหนักสาร: เครื่องชั่งของ A&D Company Limited รุ่น GR-200

- การปิเปตสาร:

ไมโครปิเปต

ยี่ห้อ HTL Lab solution รุ่น Discovery comfort ขนาด 0.5-10 μL ประเทศโปแลนด์,

ยี่ห้อ HTL Lab solution รุ่น Discovery comfort ขนาด 10-100 μL ประเทศโปแลนด์,

ยี่ห้อ HTL Lab solution รุ่น Optipepette ขนาด 0.1-2 μL ประเทศโปแลนด์,

ยี่ห้อ HTL Lab solution รุ่น Discovery comfort ขนาด 100-1000 μL ประเทศโปแลนด์,

- การเซนทริฟิวจ์: เครื่องเซนทริฟิวจ์ ยี่ห้อ Hettich Centrifuge รุ่น D-78532 Tuttlingen

- การหาฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม: เครื่องฟลูออโรสเปกโตรมิเตอร์ของบริษัท Thermo Scientific รุ่น Nanodrop 3300 หรือเครื่องฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโตรฟลูออริมิเตอร์ของบริษัท Agilent Technologies รุ่น Cary Eclipse ประเทศสหรัฐอเมริกา

- การถ่ายรูปภายใต้แสงยูวี: เครื่องฉายแสงยูวี (UV transilluminator) Vilber Lourmat (254 nm และ 365 nm), กล้องถ่ายรูป Canon EOS M เลนส์ EF-M 18-55 IS STM ติดฟิลเตอร์กรองแสงสีเหลือง (บริษัท Citiwide ประเทศจีน)

- การวัดยูวี-วิซิเบิลสเปกตรัม: ยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บริษัท Varian รุ่น Cary 100 UV-Vis ประเทศ สหรัฐอเมริกา

2.1.2 สารเคมี

- การสังเคราะห์ควอนตัมดอทในระบบ CdTe ใช้ $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.5%) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. ประเทศอินเดีย, Na_2TeO_3 (99.5%) Alfa Aesar ประเทศสหราชอาณาจักร, cysteamine·HCl (95.0%) บริษัท Tokyo Chemical Industry (TCI) ประเทศญี่ปุ่น, L-histidine·HCl·H₂O (98%) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, L-cysteine (99.0%) จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, thiosalicylic acid (98%) จากบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, 2-mercaptoethanol (99.5%) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, Hydrazine hydrate 80% in water (synthesis grade) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี, (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES (96%) บริษัท Sigma-Aldrich, ควอนตัมดอทชนิด CdTe ขนาด 3.0 nm ที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic acid ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.โอภาส บุญเกิด มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

- พีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Nr-GTAGTCACT-LysNH₂ ได้รับความอนุเคราะห์จากนิตินธิต ปริญญาโท-เอกในกลุ่มวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

- ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 5'-CGCGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG-3', 5'-AGTGATCTAC-3', 5'-GTAGTCACT-3' สั่งซื้อจากบริษัท Bio Basic (Canada)

- น้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายได้แก่ น้ำ Milli-Q จากเครื่อง Millipak® 40 Express Filter Millipore (USA)

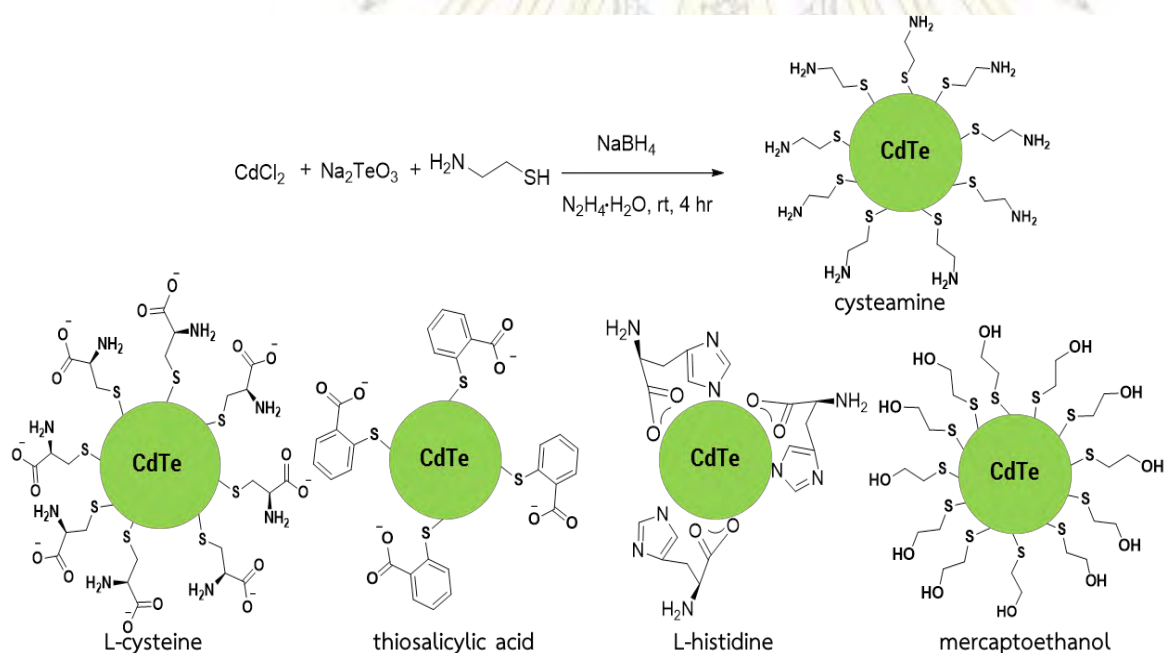
สารละลายบัฟเฟอร์ระบบต่างๆ มีวิธีการเตรียมดังนี้

- เตรียมบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 0.1 M เตรียม HEPES 1.191 g ในน้ำ 35 mL ปรับ pH ให้เป็น 5, 6, 7, 8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วเติมน้ำจนได้ 50 mL
- เตรียมสารละลาย CdCl_2 เข้มข้น 100 mM โดยละลาย $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 41 mg ในน้ำ milli-Q ปริมาตร 2 mL
- เตรียมสารละลาย Na_2TeO_3 เข้มข้น 4 mM โดยละลาย Na_2TeO_3 4 mg ในน้ำ milli-Q ปริมาตร 5 mL
- เตรียมสารละลาย L-cysteine เข้มข้น 10 mM โดยผสม L-cysteine 6 mg ในน้ำ milli-Q แล้วทำให้ละลายโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเนื่องจากสารไม่ค่อยละลาย

2.2 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ควอนตัมดอทชนิด CdTe

การสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ทำตามวิธีของ Zhou และคณะ¹⁷ โดยการใส่สารละลาย CdCl₂, Milli-Q water, ligand, Na₂TeO₃, NaBH₄ และ N₂H₄·H₂O ตามลำดับในอัตราส่วน 1: 3.3: 0.2: 67: 4,385 โดยปริมาณความเข้มข้น (mM) สุดท้ายคือ 0.94: 3.08: 0.19: 62.8: 4,111 ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 8 ml โดยลิแกนด์ที่ใช้ได้แก่ cysteamine·HCl, L-cysteine, thiosalicylic acid, 2-mercaptoethanol และ L-histidine·HCl·H₂O โดยเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.1 และทำการสังเคราะห์ในอัตราส่วนเดิมกับลิแกนด์ cysteamine.HCl โดยเพิ่มความเข้มข้นสองเท่า (mM) ดังนี้ 1.88: 6.16: 0.38: 125.6: 8,222

2.2.1 การสังเคราะห์ควอนตัมดอทในระบบ CdTe ที่มีลิแกนด์ชนิดต่างๆ



รูปที่ 2.1 สมการการสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe เมื่อใช้ลิแกนด์ที่ต่างกัน

2.2.2 การเปลี่ยนการเรืองแสงของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้แสงยูวี

ปิเปตสารละลายควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้ในข้อ 2.2.1 มาใส่ในหลอดฟลูออโรสโตร์หลอดละ 50 μL นำไปฉายแสงภายใต้รังสียูวี (ใช้เครื่อง UV transilluminator) ที่ 365 nm คิดเป็นความเข้มแสง 5,200 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิตเป็นเวลา 10, 30, 60, 180, 300, 600 วินาที ตามลำดับ แล้วบันทึกภาพโดยกล้อง Canon EOS M ภายใต้แสงยูวีที่ 365 nm ในโหมด Manual โดยตั้งค่ารูรับแสงเป็น 4, shutter speed 1/6 sec และ ISO 100) และใช้ฟิลเตอร์สีเหลืองเพื่อตัดแสงยูวี จากนั้นต่อแต่ละหลอดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงแล้วนำไปวัดฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมโดยใช้เครื่องนาโนทรอป โดย excite ที่ช่วงคลื่นแสงยูวี (UV LED)

2.3 การทดสอบการคุมสีของควอนตัมดอทจากการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสาร

โดยทำการทดลองโดยใช้ลิแกนด์คือ L-cysteine เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของสีน้อยกว่า cysteamine โดยใส่ 100 mM CdCl_2 75 μL , 10mM L-cysteine 2.44 mL, 4 mM Na_2TeO_3 380 μL และ NaBH_4 กับ 80% $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ปริมาณดังตารางที่ 2.1 โดยใส่ตามลำดับ แล้วจึงนำไปฉายแสงที่ 365 nm กำลังของหลอดไฟหลอดละ 8 วัตต์ จำนวน 5 หลอด คิดเป็นความเข้มแสง 5,200 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิตและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงอัตราส่วน NaBH_4 , $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่ใช้

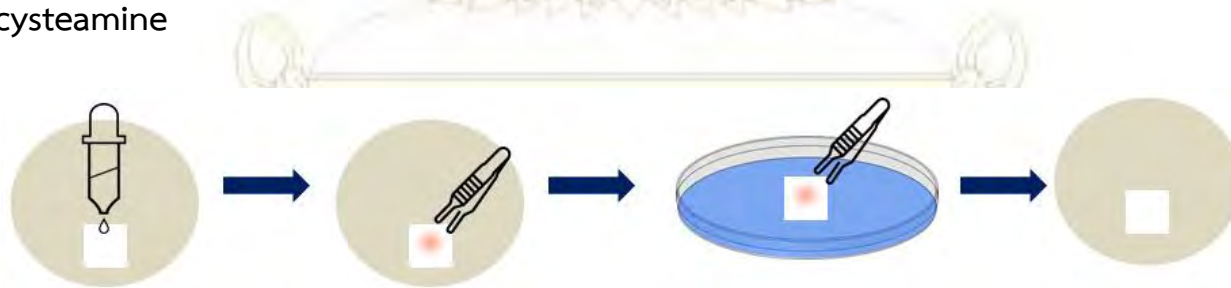
Entry	Milli-Q water (mL)	NaBH_4 (mg)	$\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 80% (mL)
1	3.10	19	2.00
2	1.10	10	4.00
3	4.10	38	1.00

2.4 การทดสอบความคงตัวและสภาวะที่เหมาะสมในการทำควอนตัมดอท CdTe ให้บริสุทธิ์

2.4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการกระจายตะกอนควอนตัมดอทที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการเซนทริฟิวจ์

นำสารละลายเริ่มต้นจากที่สังเคราะห์ควอนตัมดอทมาปิเปตต์ใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 1.5 mL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยในกรณีของลิแกนด์ L-cysteine จำเป็นต้องเติมเอทานอล 0.5 mL และเขย่าด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์ก่อนปั่นเหวี่ยง เพื่อช่วยในการตกตะกอน จากนั้นดูดสารละลายเริ่มต้นออกแล้วเติมตัวทำละลายลงในแต่ละหลอดดังนี้ น้ำ milli-Q, บัฟเฟอร์ HEPES pH 5, 6, 7 และ 8 จำนวน 100 μL จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์จนตะกอนกระจายตัวหมดแล้วจึงแบ่งไปใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 100 μL หลอดละ 50 μL ก่อนนำไปฉายแสงด้วยรังสียูวีที่ 365 nm นำไปฉายแสงที่ 365 nm กำลังของหลอดไฟหลอดละ 8 วัตต์ จำนวน 5 หลอด คิดเป็นความเข้มแสง 5,200 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิตแล้วบันทึกภาพด้วยกล้อง Canon EOS M แล้วจึงนำไปห่อลুমินัมฟอยล์และเก็บไว้ในตู้เย็นและนำไปบันทึกข้อมูลซ้ำในวันที่ 2

2.5 การทดสอบการติดกระดาษกรองของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนในการล้างควอนตัมดอทที่หยดบนกระดาษกรอง

ทดสอบความสามารถในการเรืองแสงของควอนตัมดอทที่หยดลงไปบนกระดาษดังรูปที่ 2.2 โดยใช้ควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine ที่สังเคราะห์โดยวิธีเดียวกับตอนที่ 2.1 โดยทำภายใต้ 2 สภาวะคือควอนตัมดอทจากสารละลายเริ่มต้น กับควอนตัมดอทที่ผ่านการเซนทริฟิวจ์และนำมากระจายตัวในน้ำ milli-Q โดยนำควอนตัมดอทดังกล่าวมาหยดลงบนกระดาษกรอง ภายใต้ 4 สภาวะของการทดลอง ดังนี้

1.สภาวะแรกคือนำควอนตัมดอทมาหยดลงบนกระดาษกรองแล้วนำไปส่องดูด้วยแสงยูวีที่ 365 nm กำลังของหลอดไฟหลอดละ 8 วัตต์ จำนวน 5 หลอด คิดเป็นความเข้มแสง $5,200 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิต โดยไม่รอให้แห้งก่อน

2.สภาวะที่สองคือปล่อยให้ควอนตัมดอทที่หยดลงบนกระดาษกรองแห้งก่อนนำไปส่องดูด้วยแสงยูวี

3.สภาวะที่สามคือนำควอนตัมดอทที่หยดบนกระดาษกรองมาล้างด้วยน้ำโดยการนำกระดาษไปแช่น้ำในจานเพาะเชื้อ และเขย่าในแนวราบเป็นเวลา 3 นาที

4.สภาวะที่สี่จะทำเหมือนกันแต่จะใช้กระดาษที่แห้งแล้วจากสภาวะที่สองมาเขย่าเช่นเดียวกัน โดยใช้เวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำไปส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ 365 nm กำลังของหลอดไฟหลอดละ 8 วัตต์ จำนวน 5 หลอด คิดเป็นความเข้มแสง $5,200 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิตและบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพภายใต้ภาวะเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น

2.6 การใช้ควอนตัมดอทเป็นตัวให้สัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอในสารละลาย

2.6.1 การหาความเข้มข้นของควอนตัมดอทด้วยเครื่องยูวี-วิชิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ในการทดลองนี้จะใช้ควอนตัมดอทขนาด 3.0 nm ที่มีพื้นผิวประจุลบที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic acid หาความเข้มข้นของ stock solution โดยใช้เครื่องยูวี-วิชิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากสูตร $A = \epsilon bC$ เมื่อ

A คือค่าการดูดกลืนแสง

b คือความยาวของเซลล์ (cm) = 1 cm

C ความเข้มข้นของควอนตัมดอท CdTe ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

$\epsilon = 10,043 (D)^{2.12}$ (อ้างอิงจากงานวิจัย)³¹

D= ขนาดของควอนตัมดอท (nm)

แทนค่า D = 3.00 nm, OD (optical density) = $A/b = 1.27 \text{ cm}^{-1}$ ที่ $\lambda_{\text{max}} = 486 \text{ nm}$

$$\epsilon = 10,043 (3.00)^{2.12}$$

$$= 103,124 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{แทนค่าในสมการ } 1.27 = (103,124 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) C$$

ความเข้มข้นของ QD stock solution เท่ากับ $1.23 \times 10^{-5} \text{ M}$

ความเข้มข้นของควอนตัมดอทในสารละลาย 1 mL

$$\text{จาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$\text{ได้ว่า } (1.23 \times 10^{-5} \text{ M})(0.6 \mu\text{L}) = C_2(1000 \mu\text{L}); \text{ ความเข้มข้นในสารละลายมีค่า } 74 \text{ nM}$$

ลำดับเบสของพีเอ็นเอที่ใช้มีดังนี้

1. ลำดับเบส Nr พีเอ็นเอ (10 ลำดับเบส):

Nr-GTAGATCACT-LysNH₂

ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้มีดังนี้

1. ลำดับเบสคู่สมสายสั้น (10 ลำดับเบส):

5'-AGTGATCTAC-3'

2. ลำดับเบสไม่เป็นคู่สมสายสั้น (10 ลำดับเบส):

5'-GTAGATCACT-3'

3. ลำดับเบสคู่สมสายยาว (30 ลำดับเบส):

5'-CGCGGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG-3'

ภาวะที่เลือกใช้คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0 โดยมีลำดับการผสมสองแบบแบ่งเป็น

1. ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอ ตามลำดับ

2. พีเอ็นเอ, ดีเอ็นเอ และ ควอนตัมดอท ตามลำดับ

โดยใช้ควอนตัมดอท 74 nM, ดีเอ็นเอ 0.36 μM , พีเอ็นเอ 0.30 μM โดยมีปริมาตรสุดท้าย 1.000 mL ใส่ใน cuvette ดังตารางที่ 2.2 จากนั้นนำไปวัดฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยตั้งค่า excitation ที่ 400 หรือ 580 nm โดย emission slit เป็น 410 กับ 590 nm ตามลำดับ PMT voltage = high

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงสภาวะและปริมาณความเข้มข้นของพีเอ็นเอ, ควอนตัมดอท และดีเอ็นเอ

สภาวะที่/ความเข้มข้นในสารละลาย	กระตุ้นแสงที่ (nm)	100 μ M ไนล์เรด-พีเอ็นเอ (μ M)	ควอนตัมดอท (nM)	ดีเอ็นเอ (μ M)
1 (ควอนตัมดอท)	400	-	74	-
2 (พีเอ็นเอ)	400	0.3	-	-
3 (พีเอ็นเอ)	580	0.3	-	-
4 (ควอนตัมดอทกับพีเอ็นเอ)	400	0.3	74	-
5 (ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอลำดับเบสคู่สมสายสั้น)	400	0.3	74	0.36
6 (ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอลำดับเบสคู่สมสายยาว)	400	0.3	74	0.36
7 (ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอลำดับเบสไม่คู่สมสายสั้น)	400	0.3	74	0.36

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

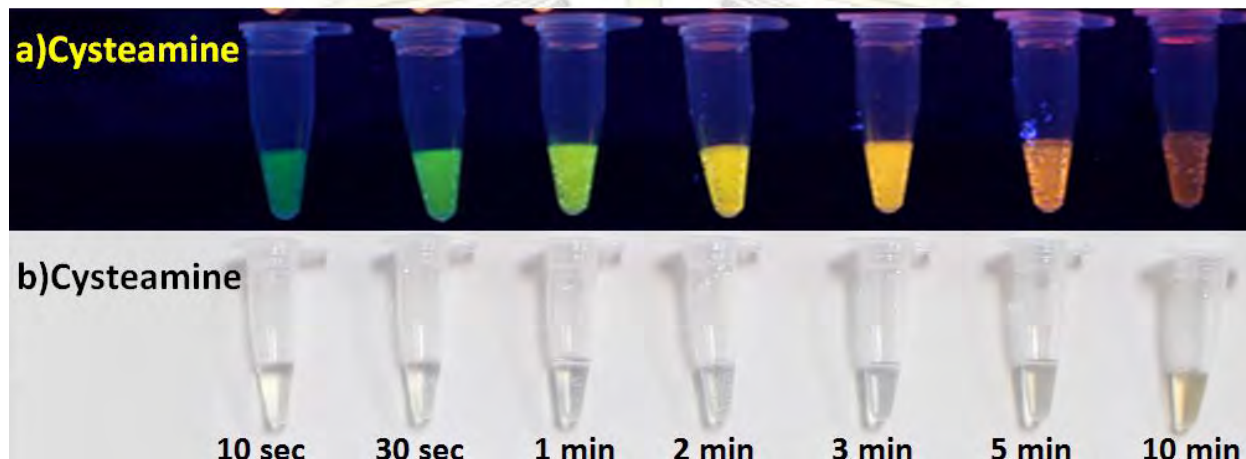
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น Cysteamine

ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะสังเคราะห์ควอนตัมดอทในระบบ CdTe ที่มีพื้นผิวเป็นประจุบวกหรือลบ เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัด DNA ที่ผ่านวิธีสังเคราะห์ควอนตัมดอทชนิด CdTe ที่ผ่านมาส่วนใหญ่มีขั้นตอนที่ยังยาก ต้องใช้ความร้อน เวลา และ ควบคุมให้อยู่ในบรรยากาศของแก๊สเฉื่อย²⁵ จากปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ โดยใช้ขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อนและรวดเร็ว Zhou และคณะ¹⁷ ได้เสนอแนะวิธีการสังเคราะห์ QDs ในระบบ CdTe ที่ทำได้ง่ายในขั้นตอนเดียว และเกิดที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศปกติ โดยการผสมสารละลายของ Cd^{2+} ลิแกนด์ที่มีหมู่ไทออล และ Na_2TeO_3 จากนั้นจึงเติม NaBH_4 ซึ่งจะรีดิวซ์ TeO_3^{2-} เป็น Te^{2-} และจะจับตัวกับ Cd^{2+} เกิดเป็นการรวมตัวเป็นอนุภาคควอนตัมดอท โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจำเป็นต้องใส่ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ เพื่อป้องกันการออกซิเดชันของ Te^0 กลับไปเป็น TeO_3^{2-} ซึ่งจะทำให้เกิดตะกอนดำของ CdTeO_3 แทน โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ NaBH_4 และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ จะทำให้สามารถควบคุมขนาดอนุภาค ซึ่งส่งผลต่อการเรืองแสงได้ โดยอัตราส่วนที่สูงจะทำให้การก่อตัวของอนุภาคเกิดเร็วมากจึงได้ควอนตัมดอทที่มีอนุภาคขนาดเล็ก ในขณะที่อัตราส่วนที่ต่ำก็จะให้ผลตรงข้ามกันคือได้ควอนตัมดอทขนาดใหญ่ งานวิจัยนี้ได้เริ่มต้นจากการสังเคราะห์ CdTe ควอนตัมดอทตามวิธีการเดียวกันนี้ แต่กลับพบปรากฏการณ์ที่น่าสนใจโดยบังเอิญคือการทำควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงภายใต้แสงยูวี ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.2 การเปลี่ยนการเรืองแสงของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์ชนิดต่างๆ ภายใต้แสงยูวี

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าลิแกนด์ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ควอนตัมดอทจะมีหมู่ไทออล จากการทดลองสังเคราะห์ควอนตัมดอทชนิด CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine ซึ่งสังเคราะห์ตามวิธีการของ Zhou¹⁷ โดยใช้สารตั้งต้นได้แก่ CdCl_2 , Na_2TeO_3 , cysteamine, NaBH_4 และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วนโดยโมลเป็น 1:0.2:3.3:67:4,385 และมีความเข้มข้นของ CdCl_2 เป็น 0.94 mM, Na_2TeO_3 0.19 mM, ligand 3.08 mM,

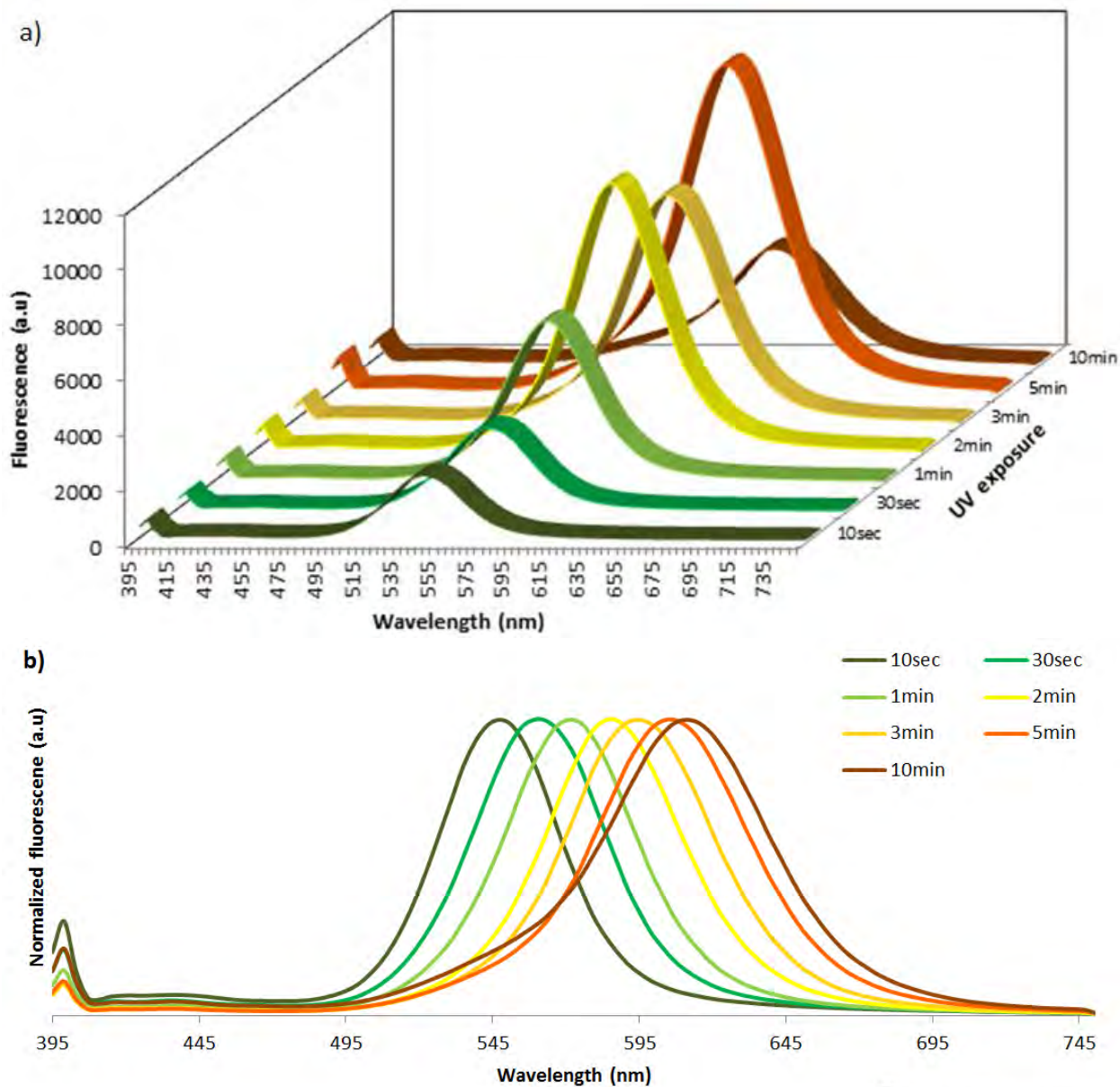
NaBH_4 62.78 mM และ 80% $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 4,111 mM โดยนำไปฉายแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 nm และกำลังของหลอดไฟหลอดละ 8 วัตต์ จำนวน 5 หลอด คิดเป็นความเข้มแสง $5,200 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิต พบว่าสารละลายมีการเรืองแสงที่สามารถสังเกตเห็นด้วยตาเปล่า โดยในตอนแรกสารละลายจะเรืองแสงเป็นสีออกเขียว-ฟ้า แต่เมื่อระยะเวลาในการฉายแสงนานขึ้น ควอนตัมดอตดังกล่าวจะให้การเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปจากสีเขียวไปทางช่วงสีแดงอย่างชัดเจนดังรูปที่ 3.1 a



รูปที่ 3.1 รูปถ่าย cysteamine-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ

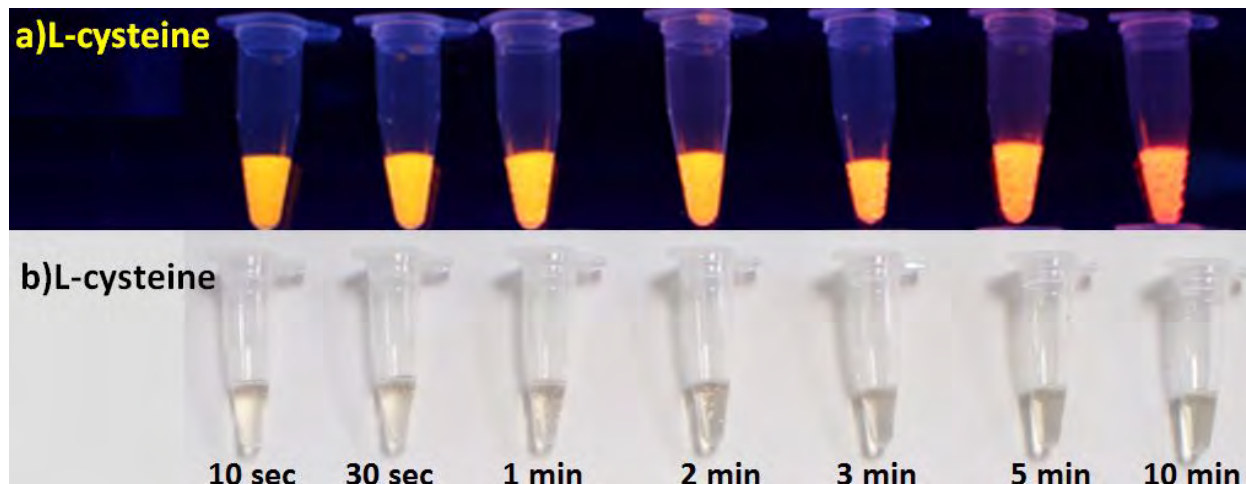
เมื่อนำไปวัดการเรืองแสงโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมมีแนวโน้มไปในทางเดียวกับการสังเกตด้วยตาเปล่า กล่าวคือเมื่อฉายแสงเป็นระยะเวลานานขึ้น อนุภาคจะแสดงการคายแสงที่เลื่อนไปในทางช่วงแสงสีแดง นอกจากนี้ความเข้มของการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการคายแสงที่เลื่อนไปในช่วงแสงสีแดงนั้นเกิดจากการที่ขนาดของควอนตัมดอตที่มีขนาดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อฉายแสงเป็นเวลา 10 นาทีพบว่าสัญญาณลดต่ำลง และจะเห็นว่าหลังฉายแสง 10 นาทีสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเมื่อดูภายใต้แสงขาวซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการที่อนุภาครวมกลุ่มกันจนเกิดการตกตะกอนขึ้น ดังรูปที่ 3.2

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



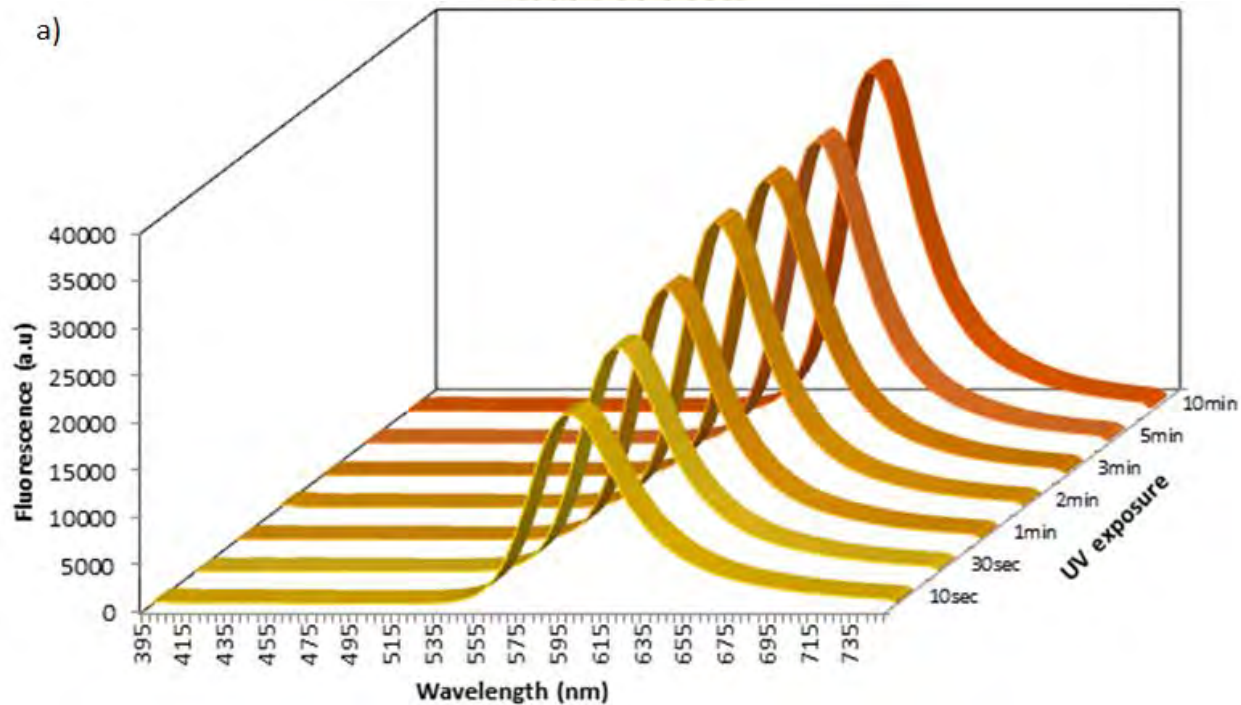
รูปที่ 3.2 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ cysteamine-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED

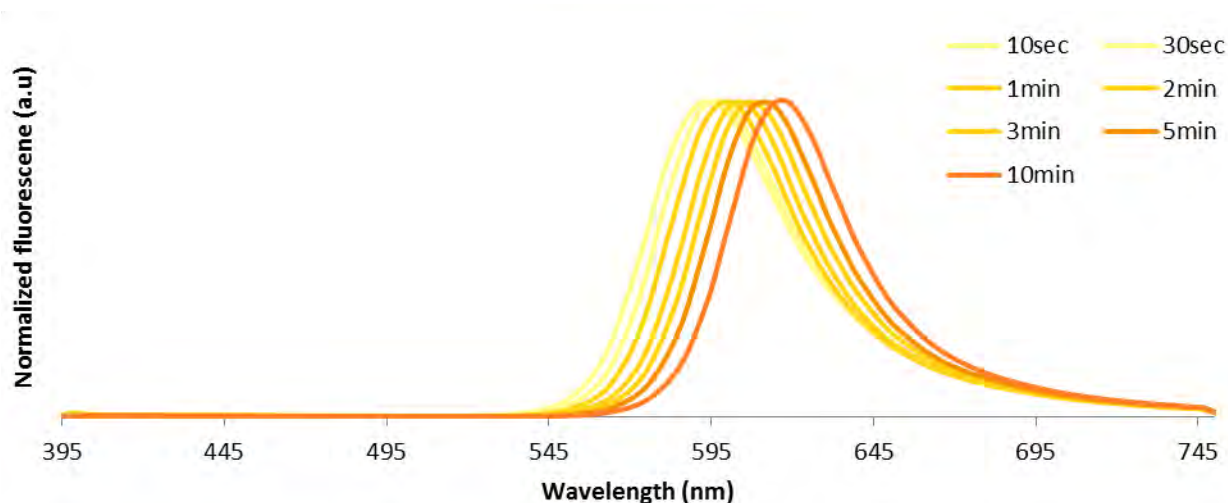
เมื่อทดลองสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์อีกชนิดหนึ่งคือ L-cysteine พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อฉายแสงยูวีด้วยเช่นกัน แต่ไม่ชัดเจนเท่ากรณีของ cysteamine อาจเนื่องมาจากเมื่อเริ่มต้นการเรืองแสงก็ค่อนข้างสีเหลืองอยู่แล้ว โดยการเรืองแสงจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นส้ม ในช่วงระยะเวลาการฉายแสงยูวี 10 นาที ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 รูปถ่าย L-cysteine-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ

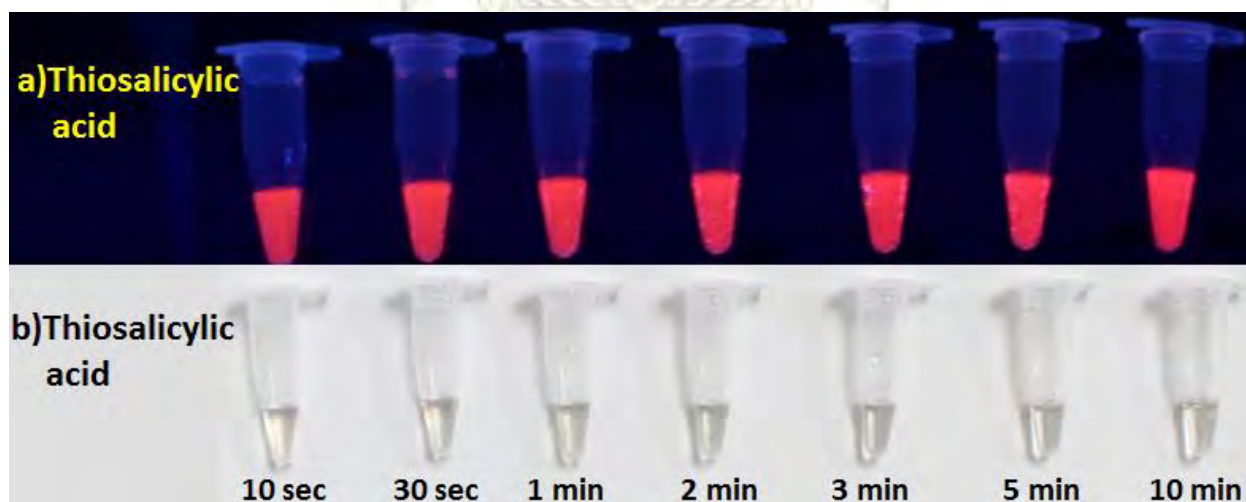
จากฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมพบว่ามีแนวโน้มค่าการคายแสงที่เลื่อนไปทางช่วงแสงสีแดงเช่นกัน โดยการคายแสงที่เลื่อนไปในช่วงแสงสีแดงนั้นคาดว่าเกิดจากการที่ขนาดของควอนตัมดอทมีขนาดเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แต่การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นและความเข้มของการเรืองแสงไม่ชัดเจนเท่ากรณีที่ใช้ cysteamine เป็นลิแกนด์ ดังรูปที่ 3.4





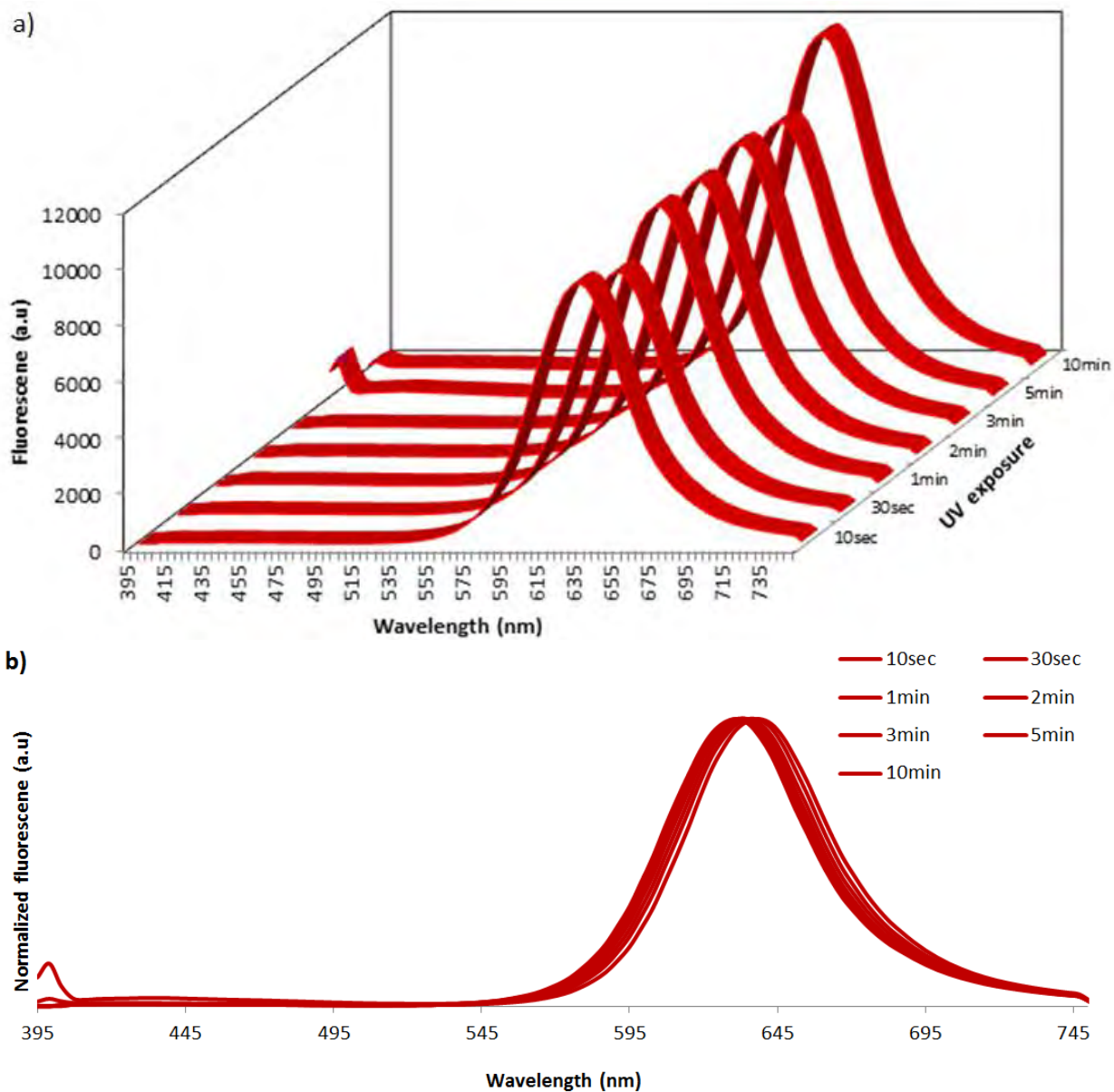
รูปที่ 3.4 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ L-cysteine capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED

แต่เมื่อเปลี่ยนลิแกนด์เป็น thiosalicylic acid พบว่าได้การเรืองแสงเป็นสีแดงตั้งแต่เริ่มต้น ดังนั้นการฉายแสงยูวีจึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าดังรูปที่ 3.5



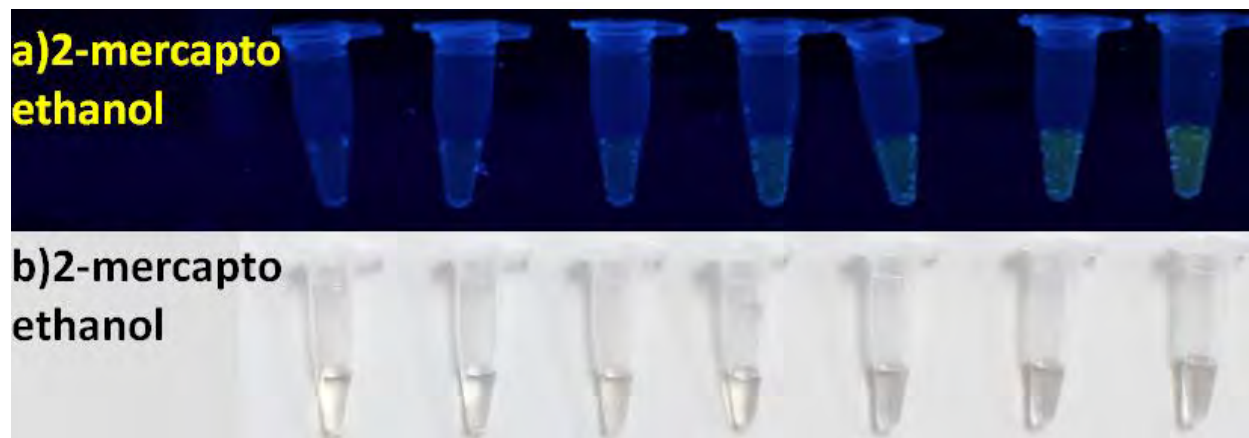
รูปที่ 3.5 รูปถ่าย thiosalicylic acid-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ

แต่เมื่อพิจารณาจากฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม จะพบการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงในทิศทางเดียวกันกับลิแกนด์อีกสองชนิดก่อนหน้านี้ กล่าวคือความยาวคลื่นและความเข้มของการเรืองแสงมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ไม่เด่นชัดเท่าในสองกรณีก่อนหน้านี้ อาจเนื่องจากการที่อนุภาคควอนตัมดอทเรืองแสงเป็นสีแดงอยู่แล้วตั้งแต่เริ่ม ดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ thiosalicylic acid-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED

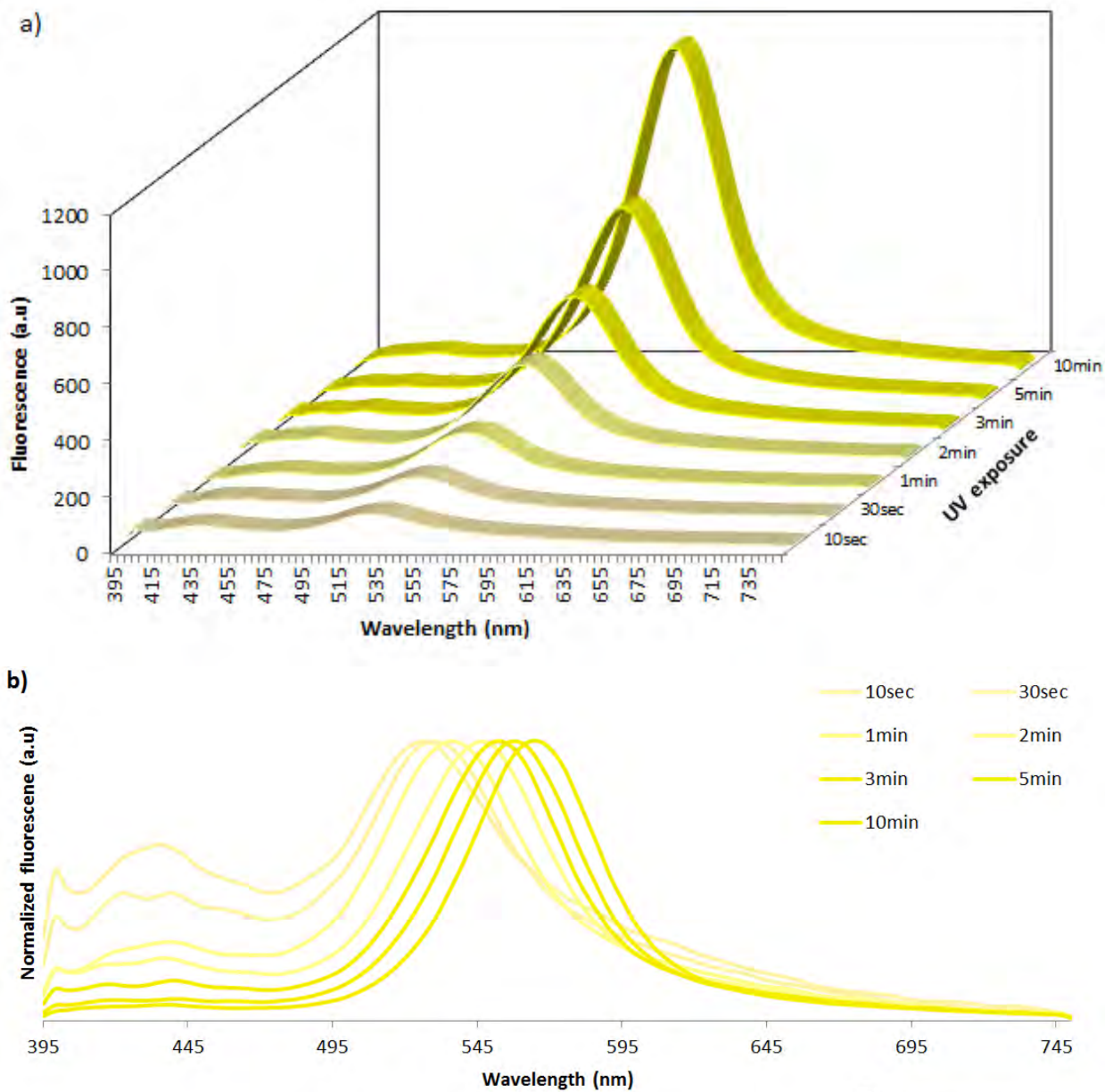
จากการทดลองการฉายของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น 2-mercaptoethanol พบว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้จะมีความความสว่างที่ต่ำกว่าลิแกนด์อื่น และจะมีความสว่างเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 รูปถ่าย 2-mercaptoethanol-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ

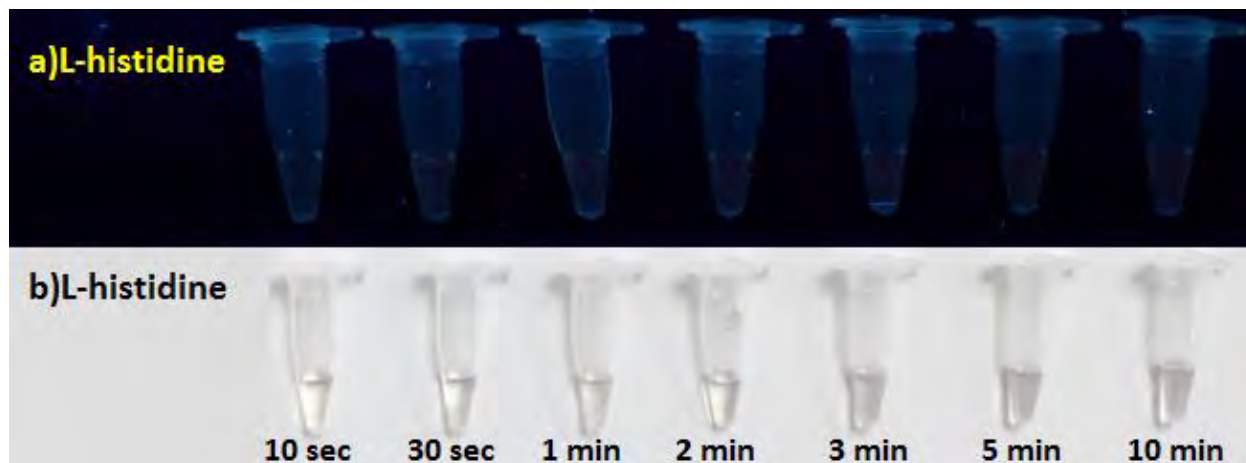
จากฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมพบว่ามีความเข้มแสงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและค่าความยาวคลื่นเลื่อนขึ้นไปทางช่วงแสงสีแดง โดยที่ 10 นาทีสารละลายจะมี λ_{\max} ที่ 560 nm จึงเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียว-เหลือง ดังรูปที่ 3.8

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



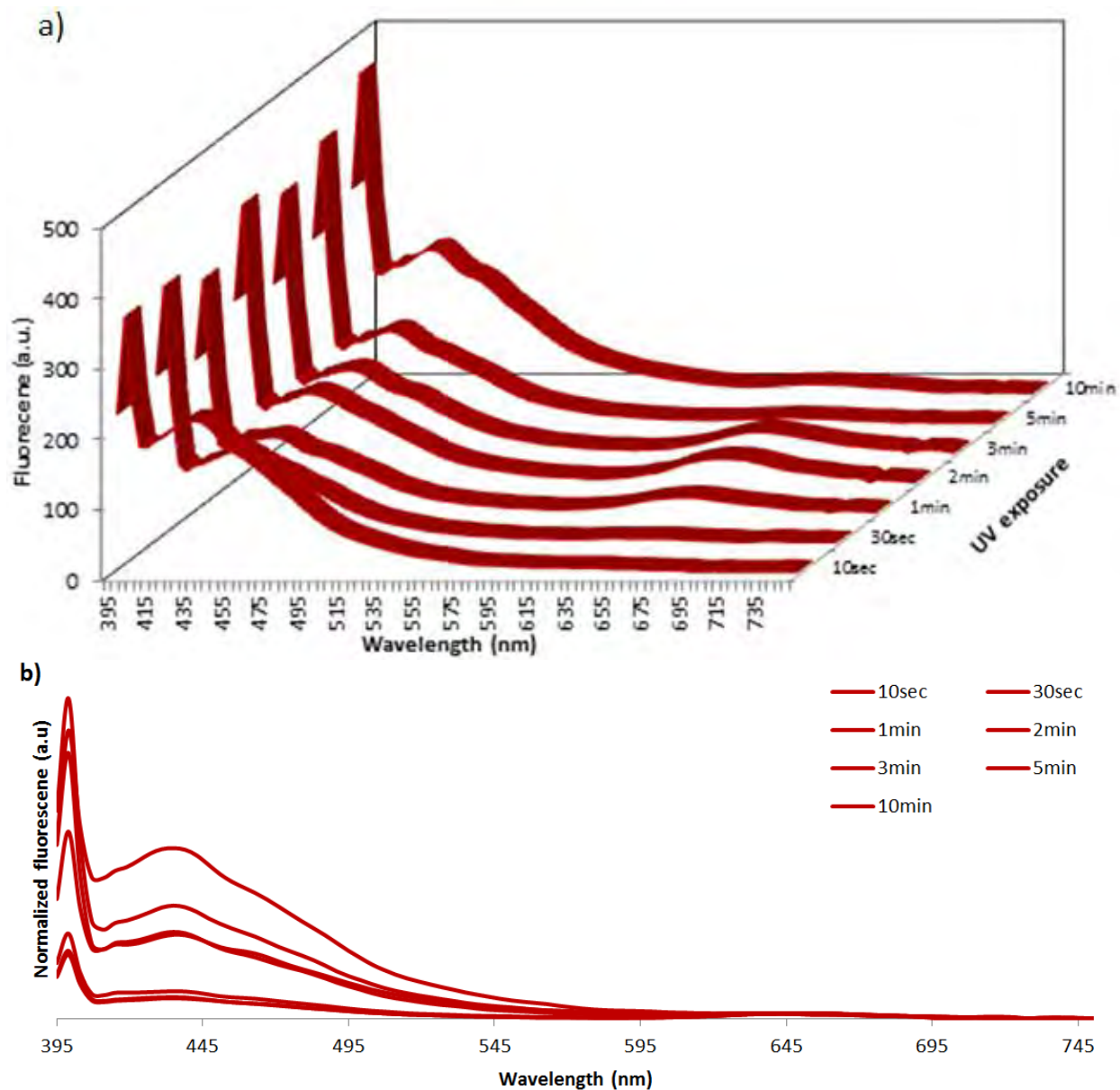
รูปที่ 3.8 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ 2-mercaptoethanol-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED

นอกจากลิแกนด์ในกลุ่มไทออลแล้ว ลิแกนด์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีผู้ใช้กับควอนตัมดอทชนิด CdX คือลิแกนด์ที่มีหมู่อิมิดาโซล³² การทดลองนำควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น L-histidine ไปฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าควอนตัมดอทดังกล่าวจะให้ความสว่างค่อนข้างต่ำ และไม่เกิดการเปลี่ยนสีที่ชัดเจน ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 รูปถ่าย L-histidine-capped CdTe quantum dot a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ

จากฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมพบว่ามีการเปล่งแสงในช่วง 400-500 nm และ 600-700 nm โดยในช่วง 600-700nm ซึ่งเป็นสีที่สังเกตเห็นด้วยตาเปล่าเห็นเป็นสีแดง มีความเข้มที่ค่อนข้างต่ำและไม่เห็นทิศทางการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ L-histidine-capped CdTe quantum dot เมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED

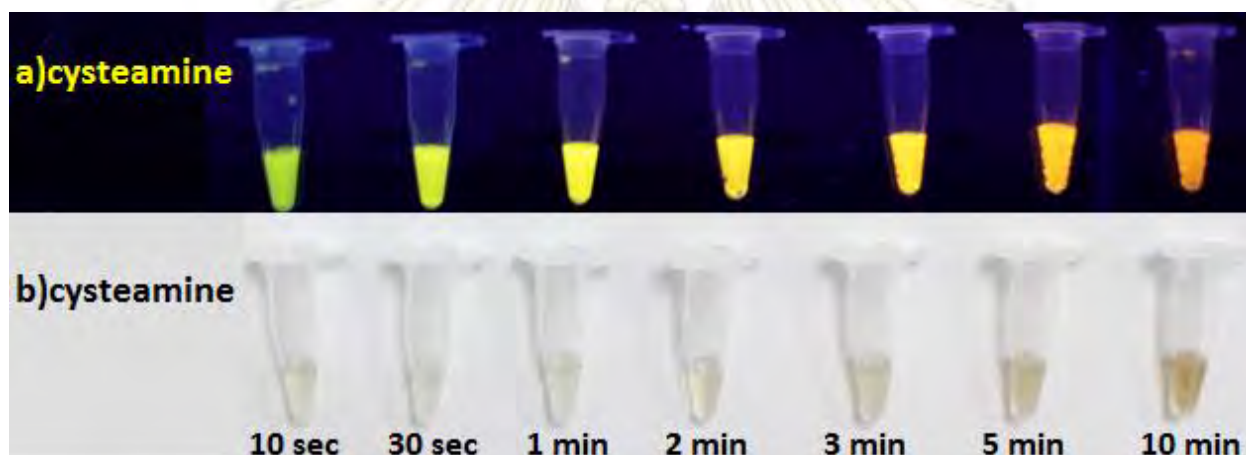
สรุปผลการทดลองกับลิแกนด์ทั้ง 5 ชนิดได้ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงสีและการเปลี่ยนของ λ_{max} กับค่าความสว่างของควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้เมื่อฉายแสงยูวีที่เวลา 10 วินาทีถึง 10 นาที

ลิแกนด์	Cysteamine•HCl				L-cysteine				Thiosalicylic			
เวลาที่ใช้	สี	$\Delta\lambda_{max}$ (nm) from 10 sec	Maximum intensity (a.u)	% ความแตกต่างคิดเทียบจาก λ_{max} ที่ 10 sec	สี	$\Delta\lambda_{max}$ (nm) from 10 sec	Maximum intensity (a.u)	% ความแตกต่างคิดเทียบจาก λ_{max} ที่ 10 sec	สี	$\Delta\lambda_{max}$ (nm) from 10 sec	Maximum intensity (a.u)	% ความแตกต่างคิดเทียบจาก λ_{max} ที่ 10 sec
10 sec	เขียวออกฟ้า		2,331		เหลือง		20,075		แดง		9,255	
30 sec	เขียว	+12	2,985	+28	เหลือง	0	23,662	+18	แดง	0	8,621	-7
1 min	เขียวอ่อน	+24	5,782	+148	เหลือง	+4	26,596	+32	แดง	0	9,919	+7
2 min	เหลือง	+40	9,658	+314	เหลือง	+8	30,206	+50	แดง	+4	9,796	+6
3 min	เหลืองส้ม	+48	8,209	+252	เหลืองออกส้ม	+12	31,286	+56	แดง	+4	10,094	+9
5 min	ส้ม	+60	11,836	+408	เหลืองออกส้ม	+16	31,980	+59	แดง	+4	9,810	+6
10 min	น้ำตาล	+64	4,184	+79	ส้ม	+20	35,790	+78	แดง	+8	11,886	+28

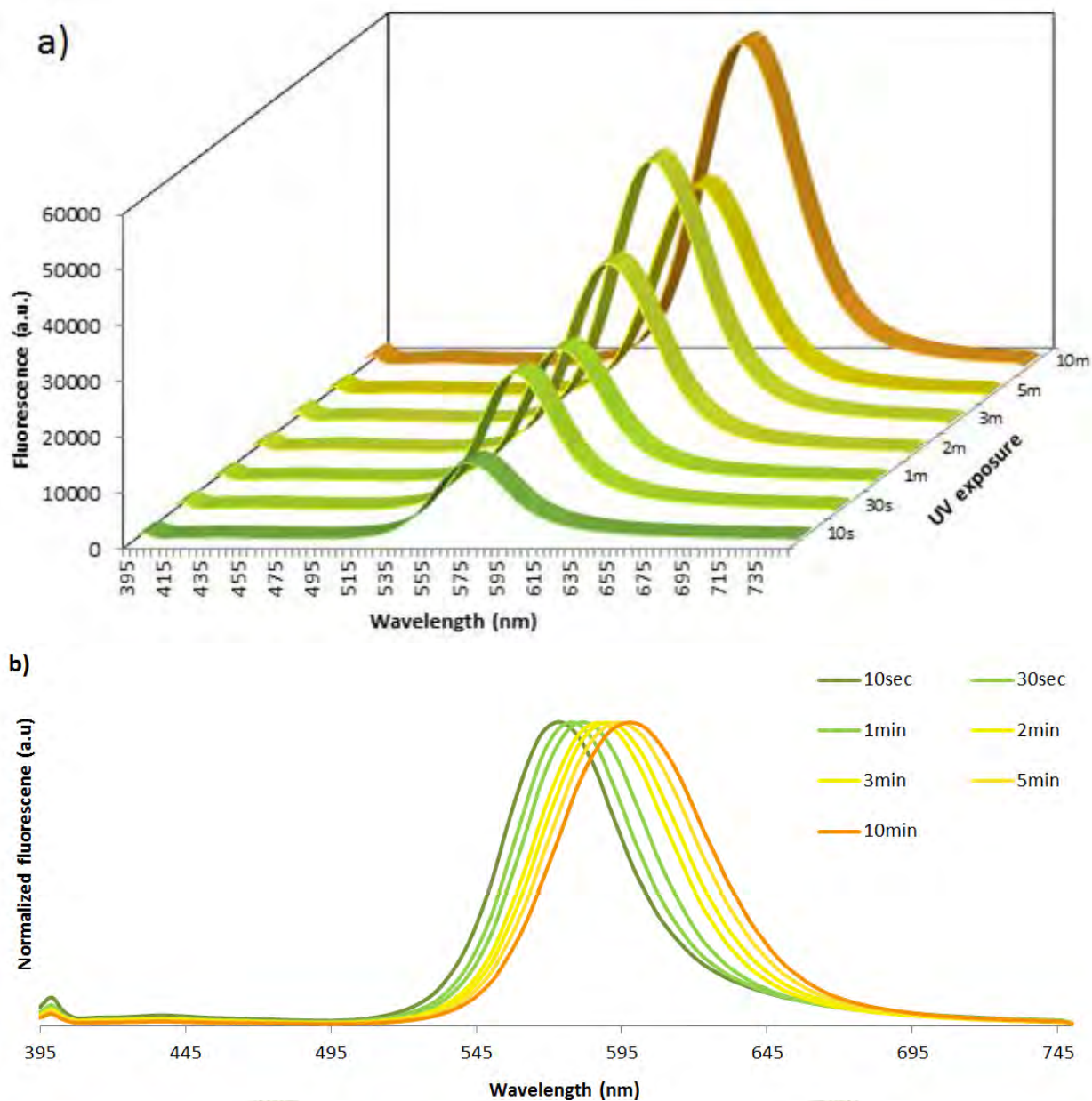
ลิแกนด์	2-mercaptoethanol				L-histidine			
เวลาที่ใช้	สี	$\Delta\lambda_{max}$ (nm) from 10 sec	Maximum intensity (a.u)	% ความแตกต่างคิดเทียบจาก λ_{max} ที่ 10 sec	สี	$\Delta\lambda_{max}$ (nm) from 10 sec	Maximum intensity (a.u)	% ความแตกต่างคิดเทียบจาก λ_{max} ที่ 10 sec
10 sec	เขียวอ่อน		113		แดงอ่อน		427	7
30 sec	เขียวอ่อน	+4	139	+23	แดงอ่อน	0 +6	392	6 -8 -10
1 min	เขียวอ่อน	+8	194	+72	แดงอ่อน	0 +24	394	22 -8 +208
2 min	เขียวเหลือง	+20	332	+194	แดงอ่อน	0 +20	398	35 -9 +389
3 min	เขียวเหลือง	+24	470	+316	แดงอ่อน	0 +22	323	31 -24 +330
5 min	เขียวเหลือง	+32	580	+413	แดงอ่อน	0 +14	449	9 +5 +20
10 min	เขียวเหลือง	+36	1042	+922	แดงอ่อน	0 +10	413	14 -3 +93

โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลิแกนด์ทั้งห้าชนิด จะพบว่าลิแกนด์ cysteamine มีลักษณะเฉพาะตัวที่น่าสนใจ เนื่องจากเมื่อเริ่มต้นจะได้ควอนตัมดอทที่เรืองแสงสีเขียว และสามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงจากสีเขียวไปเป็นสีส้มเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการฉายแสง ซึ่งจะไม่สามารถสังเกตได้เมื่อใช้ลิแกนด์อื่น นอกจากนั้นจากตารางที่ 3.1 จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่า λ_{\max} ของ cysteamine มีค่าสูงกว่าลิแกนด์อื่นๆ ในการทดลองต่อมาได้สังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine โดยเพิ่มความเข้มข้นเป็นสองเท่าคือ CdCl_2 เป็น 1.88 mM, Na_2TeO_3 0.38 mM, ligand 6.16 mM, NaBH_4 125.56 mM และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8,222 mM จากผลการทดลองฉายด้วยแสงยูวีเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะพบว่ายังคงเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวไปส้มแดง และความสว่างของการเรืองแสงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับความเข้มข้นปกติดังรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 รูปถ่าย cysteamine-capped CdTe quantum dot ที่มีความเข้มข้นสองเท่า a) ภายใต้แสงยูวี b) ภายใต้แสงปกติ

และจากฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมพบว่ามีความโน้มไปทางเดียวกับการสังเกตด้วยตาเปล่าคือมีการคายแสงที่เลื่อนจากสีเขียวไปทางช่วงแสงสีแดงดังรูปที่ 3.12a และภายใต้แสงปกติจะเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นแสงสีน้ำตาลชัดเจนขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากขนาดที่ใหญ่ขึ้นของอนุภาค

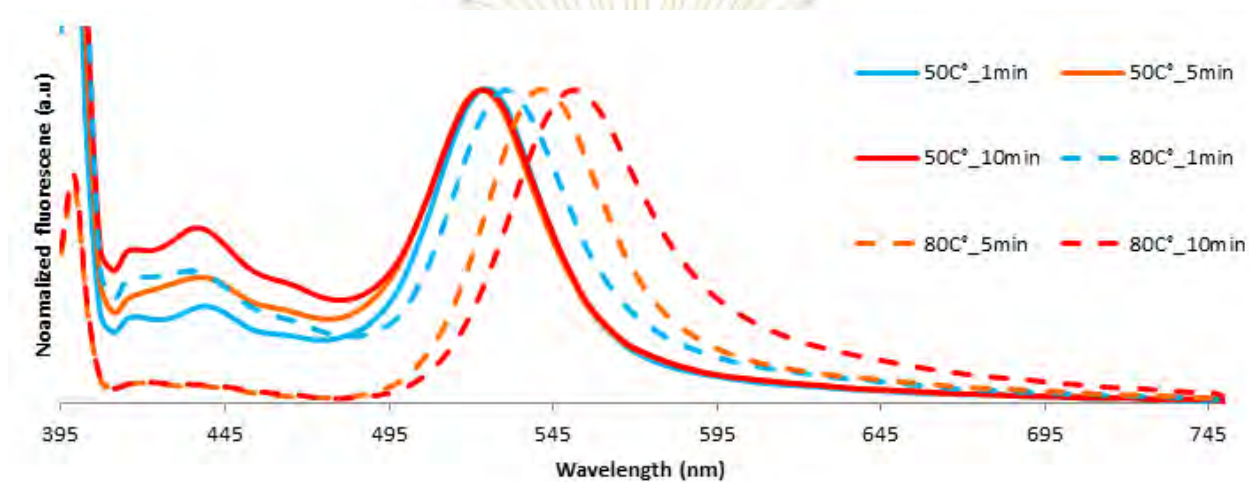


รูปที่ 3.12 a) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม และ b) นอร์มัลไลซ์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเพื่อแสดงค่า λ_{em} ของ cysteamine-capped CdTe quantum dot ความเข้มข้นสองเท่าเมื่อผ่านการฉายแสงยูวีที่เวลาต่างๆ กัน สเปกตรัมทั้งหมดวัดบนเครื่อง Nanodrop โดยกระตุ้นด้วยหลอด UV LED

เนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงยูวีอาจให้ความร้อนด้วย เพื่อยืนยันให้แน่ใจว่าการเปลี่ยนการเรืองแสงของควอนตัมดอทนั้นเกิดจากแสงยูวีจริงหรือเกิดจากความร้อนที่มาจากหลอดยูวีจึงได้ทำการทดลองโดยนำ

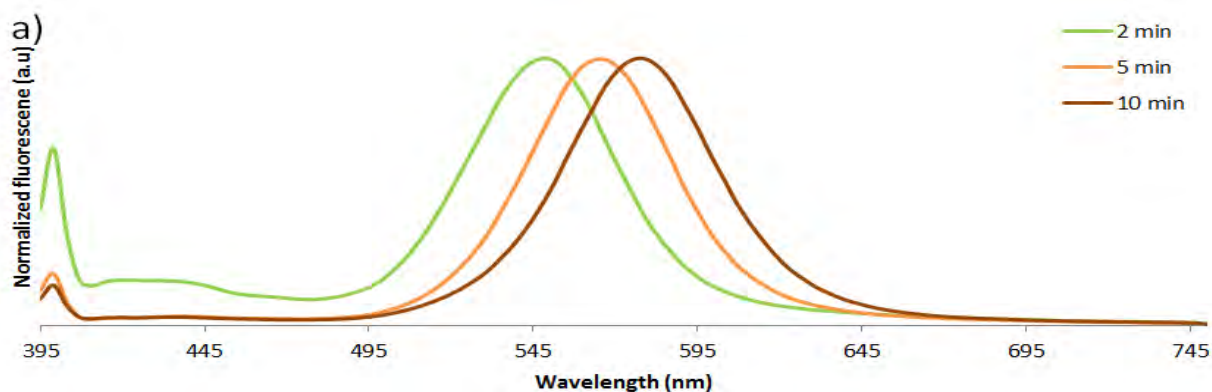
ควอนตัมดอทไปให้ความร้อนในที่มีดเพื่อดูผลของความร้อนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสง ผลที่ได้เป็นดังรูปที่

3.13



รูปที่ 3.13 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของ cysteamine-capped quantum dot ที่ผ่านการให้ความร้อน

โดยจากรูปที่ 3.13 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 50 °C ไม่มีการเปลี่ยนช่วงแสงแต่อย่างใดแต่ที่ 80 °C พบว่าการเปลี่ยนไปในช่วงแสงสีแดง ซึ่งน่าจะเกิดจากที่ความร้อน 80 °C จะทำให้ควอนตัมดอทรวมตัวกันจึงมีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งเมื่อดูจากอุณหภูมิที่ให้นั้นจำเป็นต้องมากถึง 80 °C ถึงจะเกิดการเปลี่ยนช่วงคลื่นของการเรืองแสง จึงเป็นการยืนยันว่าความร้อนจากหลอดยิวไม่น่าจะเกี่ยวกับการทำให้ควอนตัมดอทเกิดการเปลี่ยนช่วงแสง อย่างไรก็ตามเพื่อทำการยืนยันเพิ่มเติมจึงได้ทำการทดลองเพิ่มโดยได้นำควอนตัมดอทไปแขวนไว้ห่างจากหลอดยิวเพื่อให้โดนแต่แสงยิวโดยไม่สัมผัสกับความร้อนจากหลอดยิวโดยตรง พบว่าได้ผลดังรูปที่ 3.14



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.14 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของ cysteamine-capped CdTe quantum dot เมื่อนำไปฉายแสงยูวีโดยไม่สัมผัสกับความร้อนจากหลอดยูวี

จากรูปที่ 3.14 จะยืนยันได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการเรืองแสงของ cysteamine-capped CdTe quantum dot นั้นเกิดจากการแสงยูวีไม่ได้เกิดจากความร้อนแต่อย่างใด

จากการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมพบว่ามีกรรายงานถึงปรากฏการณ์ที่ควอนตัมดอทชนิด CdTe แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อฉายแสงยูวีเมื่อเร็ว ๆ นี้ (หลังจากที่ได้เริ่มทำงานวิจัยชิ้นนี้แล้ว)³³ โดยงานดังกล่าวได้ศึกษาโดยใช้ลิแกนด์เป็น mercaptosuccinic acid โดยงานวิจัยดังกล่าวพบว่าสามารถฉายแสงยูวีทำให้ควอนตัมดอทเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีแดงได้ภายใน 60 นาที ซึ่งการเปลี่ยนสีเกิดจากการที่แสงยูวีสามารถเร่งให้เกิดการรวมตัวนิวเคลียสทำให้เกิดผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นของควอนตัมดอท ปรากฏการณ์ดังกล่าวน่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการที่จะควบคุมขนาดของควอนตัมดอท ซึ่งในงานของผู้วิจัยพบว่าสามารถควบคุมได้ตั้งแต่สีเขียวถึงสีแดงภายใน 10 นาทีเมื่อใช้ลิแกนด์เป็น cysteamine โดยเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน, รวดเร็ว และยังมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำมากจึงอาจเป็นประโยชน์ต่อในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่อ่างเช่นการผลิต แอลอีดี (LED) แต่ทั้งนี้ปรากฏการณ์นี้เป็นการค้นพบโดยบังเอิญกับเฉพาะควอนตัมดอทบางตัวเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องทดสอบกับควอนตัมดอทชนิดอื่นและลิแกนด์อื่นๆ อีก

3.3 การคำนวณหาขนาดอนุภาคของควอนตัมดอท

ในการคำนวณขนาดของควอนตัมดอทจะใช้สมการ Brus equation โดยอาศัยหลักการของอนุภาคทรงกลมในกล่อง (particle in a box) ซึ่งถูกนำมาปรับปรุงใหม่โดย Kayaruma³⁴ ได้ตั้งสมการที่ 1 โดยสามารถนำสมการของ planck ($E = hc/\lambda$) แทนเข้าไปเพื่อให้ขนาดของรัศมีจะมีความสัมพันธ์กับพลังงานที่ถูกปล่อยออกมาดังสมการที่ 2 จึงสามารถใช้ความยาวคลื่นสูงสุดที่คายออกมาของควอนตัมดอทนำมาคำนวณหาขนาดได้ โดยงานนี้จะคำนวณขนาดของ CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine, L-cysteine·HCl และ thiosalicylic acid เนื่องจากจะเห็นความสว่างชัดเจนโดยแทนค่าลงในสมการเมื่อแถบพลังงาน(E_g) มีของควอนตัมดอท CdTe มีค่า 1.606 eV, น้ำหนักของอิเล็กตรอนในสภาวะกระตุ้นของ CdTe (m_e^*) = 1.002×10^{-31} kg), น้ำหนักอิเล็กตรอนในหลุมพลังงานของควอนตัมดอท CdTe (m_h^*) มีค่า 9.109×10^{-32} kg (อ้างอิงงานวิจัย³⁵) และค่าคงที่ต่างๆดังนี้ ความเร็วของแสง 3.0×10^8 m/s และค่าคงที่ของ planck = 6.63×10^{-34} J.s จะใช้ความยาวคลื่นสูงสุดที่คายออกมาของ

ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine เนื่องจากจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนโดยนำไปแทนค่าในสมการคำนวณอนุภาคในทรงกลมดังนี้

$$\Delta E(R) = E_g(R) + \frac{h^2}{8R^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \dots \dots \dots \text{สมการที่ 3.1}$$

$$r = \sqrt{\frac{h^2 \left(\frac{1}{m_e^*} - \frac{1}{m_h^*} \right)}{8 \left(\frac{hc}{\lambda} - E_{\text{gap}} \right)}} \dots \dots \dots \text{สมการที่ 3.2}$$

โดยเมื่อ λ_{max} คือ 547 nm

$$r = \sqrt{\frac{(6.63 \times 10^{-34} \text{ J/s})^2 \left(\frac{1}{8.745 \times 10^{-32} \text{ kg}} - \frac{1}{3.644 \times 10^{-31} \text{ kg}} \right)}{8 \left(\frac{(6.63 \times 10^{-34} \text{ J/s})(3.0 \times 10^8 \text{ m/s})}{(547 \times 10^{-9} \text{ m})} - 2.57 \times 10^{-19} \text{ J} \right)}}$$

จะได้ค่า r คือ 2.11 nm แสดงว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค CdTe มีค่า 4.22 nm ซึ่งค่าอื่นๆ ที่ได้จากการคำนวณจะแสดงอยู่ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่คำนวณได้ของควอนตัมดอท CdTe เวลาฉายแสง 10 วินาที-10 นาที

ลิแกนด์	เวลาที่ใช้	10 sec	30 sec	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
Cysteamine•HCl	λ_{\max} (nm)	547	559	571	587	595	607	611
	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (nm)	4.22	4.40	4.57	4.83	4.97	5.20	5.28
L-cysteine	λ_{\max} (nm)	595	595	599	603	607	611	615
	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (nm)	4.97	4.97	5.04	5.12	5.20	5.28	5.36
thiosalicylic acid	λ_{\max} (nm)	631	631	631	635	635	635	639
	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (nm)	5.72	5.72	5.72	5.83	5.83	5.83	5.93

จะเห็นว่าการคายแสงในช่วงสีแดงมีความสัมพันธ์กับขนาดที่เพิ่มขึ้น ควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine•HCl, L-cysteine และ thiosalicylic acid ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 4.22-5.28 nm, 4.97-5.36 และ 5.72-5.93 ตามลำดับซึ่งเป็นช่วงขนาดของควอนตัมดอทจึงช่วยยืนยันว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นควอนตัมดอทจริง อย่างไรก็ตาม ตัวเลขที่ได้นี้เป็นเพียงค่าประมาณการเท่านั้น และเป็นค่าเฉลี่ย การที่จะยืนยัน

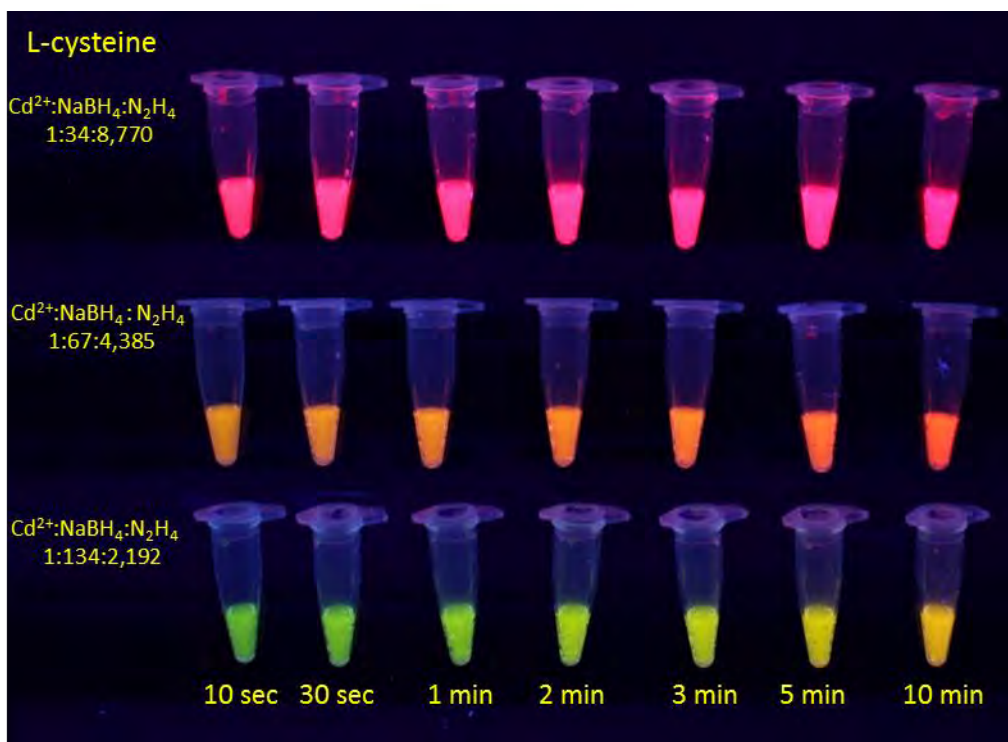
ขนาดอนุภาคที่แท้จริงและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคต้องใช้เทคนิคการวัดขนาดโดยตรงเช่น transmission electron microscopy (TEM) หรือ dynamic light scattering (DLS)³⁶

3.4 การทดสอบการคุมสีของควอนตัมดอทจากการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสาร

เนื่องจากในงานวิจัยของ Zhou และคณะ¹⁷ มีการควบคุมขนาดของ 3-mercaptopropionic acid-capped quantum dot โดยการปรับอัตราส่วนของ NaBH_4 และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ เพื่อให้ได้สีต่างๆ ทางผู้วิจัยจึงทำการปรับอัตราส่วนของควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น L-cysteine เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงสีน้อยกว่า cysteamine โดยใช้อัตราส่วนและความเข้มข้นดัง ตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มข้นสุดท้ายและอัตราส่วนโดยโมล $\text{Cd}^{2+}:\text{NaBH}_4:\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

		100 mM Cd^{2+} (mM)	NaBH_4 (mg/mL)	$\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (M)
Red	ความเข้มข้น	0.938	1.250	8.22
	อัตราส่วน	1	34	8,770
Orange	ความเข้มข้น	0.938	2.375	4.11
	อัตราส่วน	1	67	4,385
Green	ความเข้มข้น	0.938	4.750	2.06
	อัตราส่วน	1	134	2,193



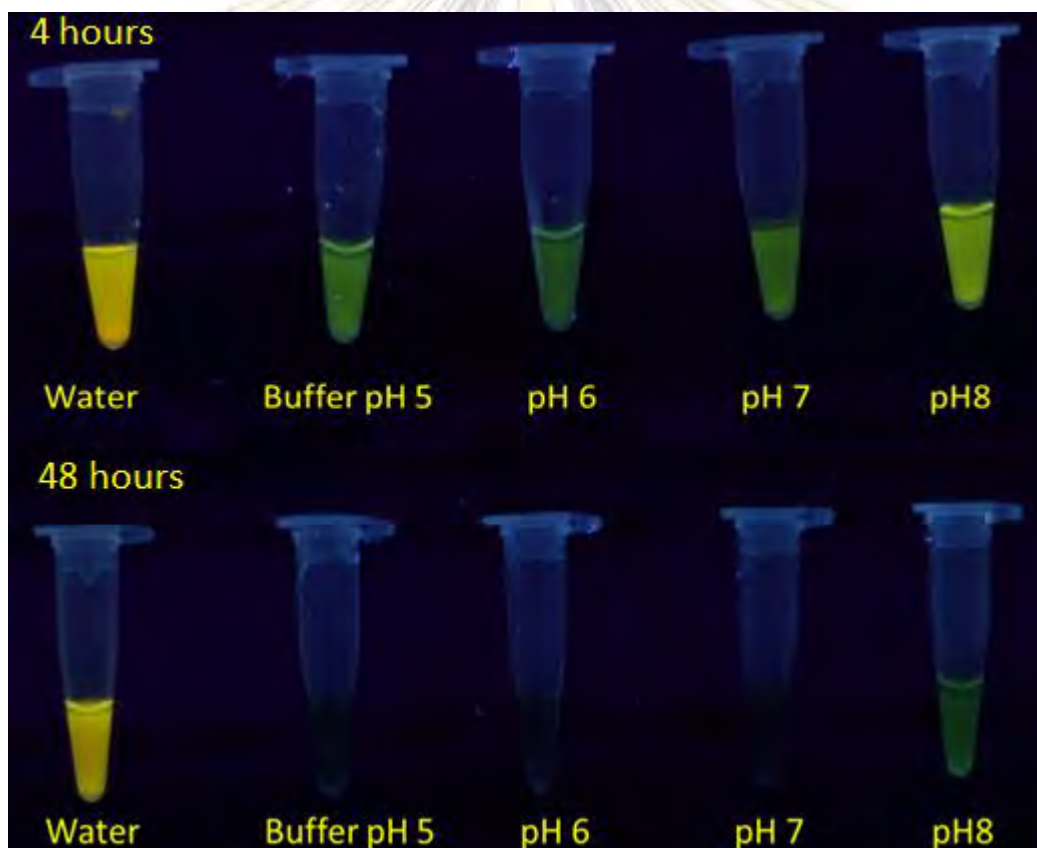
รูปที่ 3.15 การเรืองแสงของควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น L-cysteine

ซึ่งเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นที่ใช้ในตารางที่ 3.3 กับสีของการเรืองแสงที่สังเกตเห็นได้ภายใต้แสงยูวีดังรูปที่ 3.15 จะเห็นว่าสามารถคุมสีที่เกิดได้จากอัตราส่วนของ $\text{Cd}^{2+} : \text{NaBH}_4 : \text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ โดยเมื่อเพิ่ม N_2H_4 2 เท่า และลด NaBH_4 ลง 2 เท่าก็จะให้สีแดงเนื่องจากจะเกิดการรวมตัวที่เร็วขึ้นและเมื่อลด NaBH_4 แล้วเพิ่ม NaBH_4 จะได้สีเขียวจากการที่เกิดการรวมตัวเป็นควอนตัมดอทได้ช้า ดังนั้นในการควบคุมอัตราส่วนที่สังเคราะห์จะพบว่าไม่ตรงกับในเอกสารอ้างอิง¹⁷ ต้องปรับอัตราส่วนเองซึ่งขึ้นอยู่กับลิแกนด์ที่ใช้ด้วย เพราะจากการทดลองเปรียบเทียบกับลิแกนด์ต่างชนิดกันก็ยังคงให้ความยาวคลื่นเริ่มต้นที่แตกต่างกันแม้จะใช้อัตราส่วนของสารต่างๆ เท่ากันก็ตาม

3.4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการกระจายตะกอนควอนตัมดอทที่ผ่านการเซนทรีฟิวจ์

เนื่องจากควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้จะอยู่ในสารละลายเริ่มต้นซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือสูง และมีความเป็นเบส นอกจากนี้ยังอาจจะมี ลิแกนด์, Cd^{2+} , N_2H_4 และ NaBH_4 ที่มากเกินไปอยู่ด้วย ซึ่งจะไปรบกวนการนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสารชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ จึงจำเป็นต้องทำควอนตัมดอทให้บริสุทธิ์ก่อนการนำไปใช้งานจริง โดยการนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์ควอนตัมดอทที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมงโดยไม่ฉาย

แสงออกโดยการเซนตริฟิวจ์ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และเติมตัวทำละลายอื่นลงไปแทน โดยในที่นี้ได้ศึกษากับควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine โดยมีอัตราส่วนของ CdCl_2 , Na_2TeO_3 , cysteamine, NaBH_4 และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ เป็น 1:0.2:3.3:67:4,385 และเปรียบเทียบกับตัวทำละลายได้แก่น้ำและบัฟเฟอร์ โดยบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้คือ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES) เนื่องจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้โดยทั่วไปกับงานทางด้านดีเอ็นเออาจมีผลต่อการจับกับ Cd^{2+} ทำให้เกิดการตกตะกอนได้จึงใช้บัฟเฟอร์ดังกล่าวแทน 0.1 M HEPES pH 5, 6, 7 และ 8 และศึกษาความเสถียรโดยการถ่ายภาพภายใต้แสงยูวีที่ 365 nm



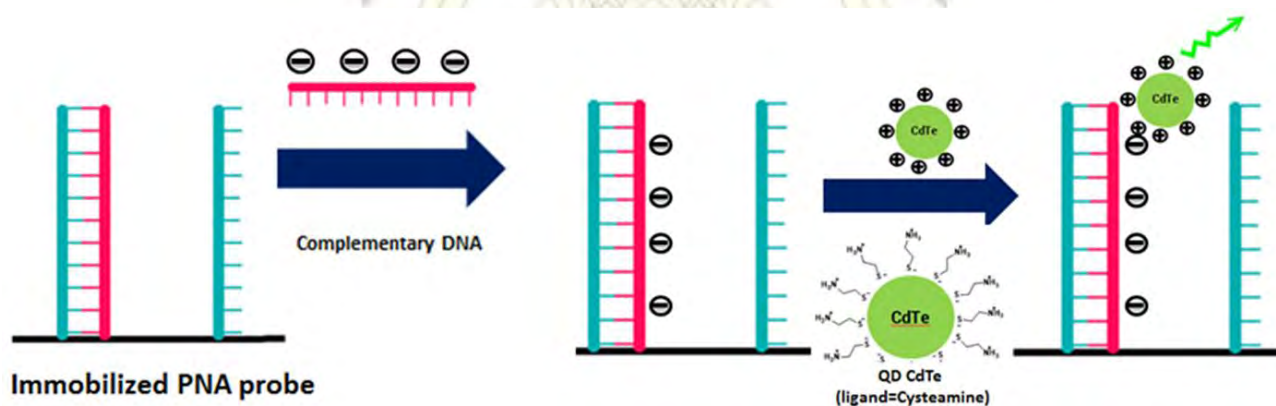
รูปที่ 3.16 การศึกษาความคงตัวของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine เมื่อนำไปเซนตริฟิวจ์และเติมตัวทำละลายแทนสารละลายเริ่มต้น

จากผลการทดลองพบว่าในน้ำและในบัฟเฟอร์ การเรืองแสงของควอนตัมดอทจะแตกต่างกัน คือในน้ำจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเหลือง และในบัฟเฟอร์สีจะออกเขียว เมื่อเก็บไว้ 48 ชั่วโมงหลังสังเคราะห์อุณหภูมิห้องโดยไม่โดนแสง พบว่าที่ pH 5, 6 และ 7 ความสว่างจะลดลง อาจเกิดจากการหลุดออกของลิแกนด์ cysteamine หลุดออกทำสูญเสียสภาพความเป็นควอนตัมดอทไป ในขณะที่บัฟเฟอร์ pH 8 แม้ในวันที่สองจะยังคงเห็นการเรืองแสงสี

เขียวอยู่แต่ความสว่างก็ลดลงอย่างชัดเจน ส่วนควอนตัมดอทที่กระจายตัวในน้ำมีความสว่างที่เปลี่ยนแปลงน้อยมาก ดังนั้นน้ำจึงน่าจะเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการเก็บควอนตัมดอท ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารละลายที่มีเกลืออยู่จะไปรบกวนหรือทำลายประจุที่อยู่บนพื้นผิวของควอนตัมดอท ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเป็นอนุภาคใหญ่และตกตะกอนออกจากสารละลาย

3.5 การทดสอบการติดกระดาษกรองของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine

หลังจากสังเคราะห์ควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine ได้ และหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการกระจายตะกอนควอนตัมดอทที่ผ่านการเซนทริฟิวจ์เพื่อเอาสารละลายเริ่มต้นออกได้แล้ว จึงได้นำสารละลายของควอนตัมดอทดังกล่าวทั้งจากสารละลายเริ่มต้นและที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการเซนทริฟิวจ์แล้ว นำมากระจายตัวใหม่ในน้ำมาทดสอบการเกาะติดบนกระดาษกรองเพื่อเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงความเหมาะสมในการใช้ควอนตัมดอทเพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอแทนสีย้อมเช่น Azure A³⁷ โดยเป็นที่คาดหวังว่าควอนตัมดอทจะเกิดการจับกับประจุลบบนดีเอ็นเอที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง ในขณะที่บริเวณที่ไม่มีดีเอ็นเออยู่ก็ควรจะยังสามารถล้างควอนตัมดอทออกจากกระดาษได้เพื่อให้สามารถแยกแยะผลได้ดังรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 แสดงหลักการตรวจหาดีเอ็นเอโดยใช้ควอนตัมดอทและดีเอ็นเอโพรบบนกระดาษกรอง

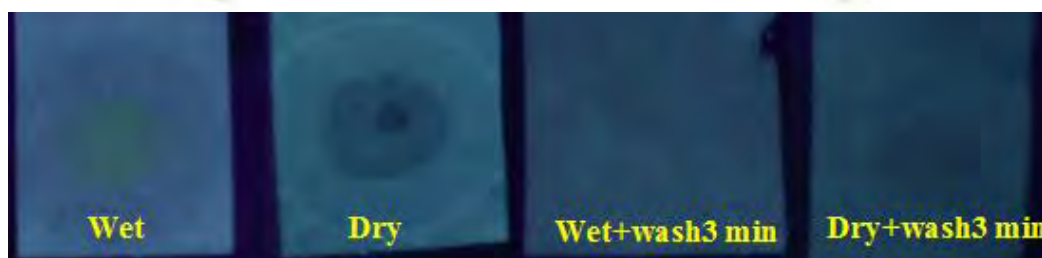
ในส่วนของการติดบนกระดาษกรองของควอนตัมดอทจากสารละลายเริ่มต้นโดยได้นำมาฉายมากกว่า 2 นาทีเพื่อให้เห็นการเรืองแสงชัดเจนขึ้นจึงมีสีส้มจากขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อนำควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine ที่ได้โดยตรงจากสารละลายเริ่มต้นมาหยดลงบนกระดาษกรอง พบว่าสังเกตเห็นการเรืองแสงได้แม้กระดาษกรองยังเปียก แต่เมื่อแห้งแล้วจะไม่เห็นการเรืองแสงเนื่องจากจะเกิดการเสียสภาพของควอนตัมดอท และเมื่อนำกระดาษที่หยดควอนตัมดอทไปแล้วยังเปียกอยู่ไปล้างด้วยน้ำ milli-Q เป็นเวลา 3 นาทีพบว่ามีการเรืองแสง

ลดลงอย่างเห็นได้ชัดดัง **รูปที่ 3.18** ส่วนกระดาษกรองที่แห้งแล้ว เมื่อนำไปล้างด้วยน้ำใหม่พบว่าไม่มีการเรืองแสง แต่อย่างไรก็ตามจะพบเป็นรอยตะกอนสีดำ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ควอนตัมดอทมารวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ที่ไม่เรืองแสง การที่สามารถล้างควอนตัมดอทออกไปจากกระดาษกรองได้เป็นผลเบื้องต้นที่จะช่วยยืนยันยืนยันความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ถูกดุดจับบนกระดาษกรอง อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาอยู่ตรงที่เมื่อแห้งแล้วการเรืองแสงของควอนตัมดอทจะหายไป แสดงว่าควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้ยังไม่เสถียรเท่าที่ควร จึงยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป



รูปที่ 3.18 ภาพถ่ายของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine จากสารละลายเริ่มต้นที่หยดบนกระดาษกรอง ก่อนและหลังล้าง

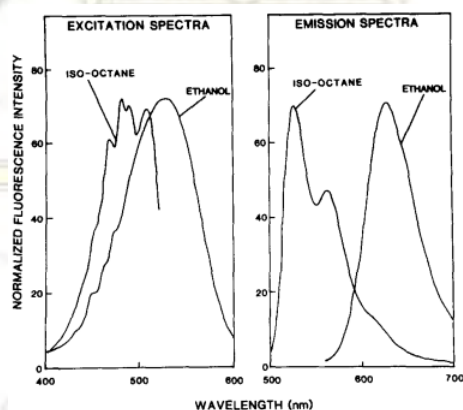
เมื่อเอาควอนตัมดอทที่เซนทรีฟิวจ์เอาสารละลายเริ่มต้นออกแล้วกระจายในน้ำมาฉายแสงก่อนเพื่อเพิ่มความสว่างจะได้สีเขียวซึ่งผู้วิจัยคาดว่ากรณีที่สีไม่เปลี่ยนเนื่องจากขนาดที่ไม่ใหญ่ขึ้นอาจเป็นเพราะสารตั้งต้นที่จะทำให้อนุภาคควอนตัมดอทก่อตัวเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นนั้นถูกชะล้างออกไปแล้ว พบว่าในขณะที่กระดาษยังเปียกอยู่เห็นการเรืองแสงอยู่ และหลังสารละลายแห้งแล้วไม่พบการเรืองแสงเช่นกันโดยพบว่าหลังจากนำไปล้างทั้งในขณะที่แห้งและขณะเปียกพบว่าไม่เหลือการเรืองแสงแต่อย่างใดดัง**รูปที่ 3.19** ซึ่งก็ให้ผลสอดคล้องกับควอนตัมดอทที่ไม่ได้ผ่านการเซนทรีฟิวจ์



รูปที่ 3.19 ภาพถ่ายของควอนตัมดอท CdTe ที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine ที่ผ่านการเซนทรีฟิวจ์และนำกลับมาแขวนลอยใหม่ในน้ำ ที่หยดบนกระดาษกรอง ก่อนและหลังล้าง

3.5 การใช้ควอนตัมดอทเป็นตัวให้สัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอในสถานะสารละลาย

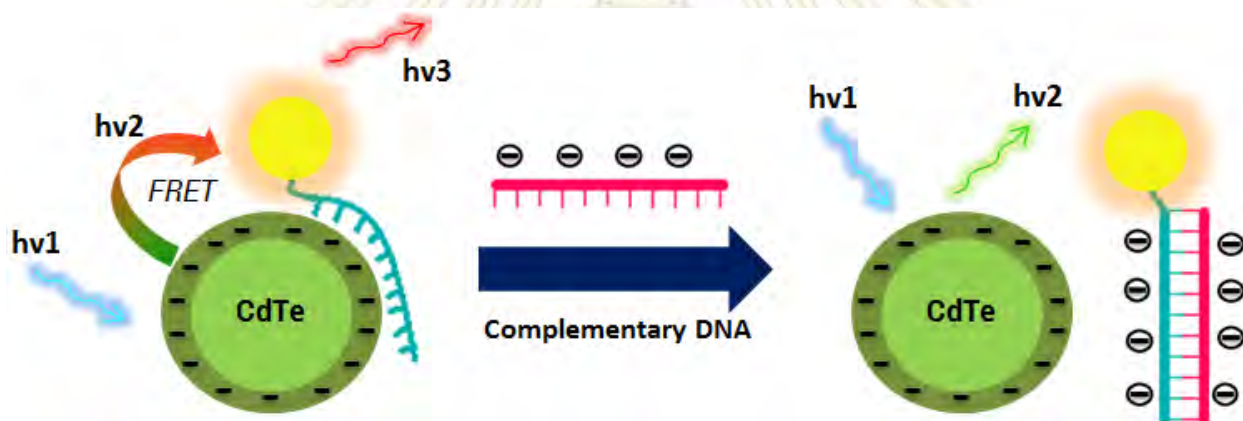
จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าปัญหาหนึ่งในการใช้ควอนตัมดอทเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ถูกตรึงบนกระดาษกรองคือแม้ควอนตัมดอทจะไม่แสดงการจับกับกระดาษกรองแบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่การเรืองแสงของควอนตัมดอทไม่ค่อยเสถียรนัก กล่าวคือเมื่อหยดทิ้งไว้บนกระดาษกรองและปล่อยให้แห้งการเรืองแสงจะลดลง ซึ่งยังเป็นประเด็นที่ต้องปรับปรุงคุณสมบัติของควอนตัมดอทต่อไป แต่ในขณะเดียวกัน ผู้วิจัยก็มีแนวคิดที่จะใช้ควอนตัมดอทเพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอในสถานะสารละลาย ซึ่งจะเป็นการแก้ปัญหาเรื่องความเสถียรของควอนตัมดอทด้วย โดยมีแนวคิดที่จะใช้ควอนตัมดอทร่วมกับพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างจำเพาะเจาะจงที่ขึ้นกับการจับกันของพีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอคู่สมโดยจะอาศัยปรากฏการณ์ที่เมื่อควอนตัมดอทถูกกระตุ้นจะคายแสงออกมาในช่วงที่สามารถจะไปกระตุ้นฉลากเรืองแสง Nile red ที่อยู่บนพีเอ็นเอ จึงทำให้เกิดการคายแสงออกมาในช่วงคลื่นของ Nile red แทน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Fluorescence resonance energy transfer (FRET) เมื่อพิจารณาจาก absorption และ emission spectra ของ Nile red ถ้าต้องการให้การคายแสงของควอนตัมดอทตรงกับการดูดกลืนของ Nile red พอดีเพื่อให้เกิด FRET อย่างมีประสิทธิภาพควรเลือกใช้ควอนตัมดอทที่มีความยาวคลื่นของการเรืองแสงใกล้เคียงกับ 550 nm ซึ่งที่ผ่านมามีการใช้ควอนตัมดอทที่มีพื้นผิวประจุบวกมาใช้ในการตรวจลำดับเบสดีเอ็นเอด้วยหลักการดังกล่าวอยู่บ้างแล้ว³⁸



รูปที่ 3.20 กราฟแสดงช่วงการดูดกลืนและเรืองแสงของ Nile red³⁹

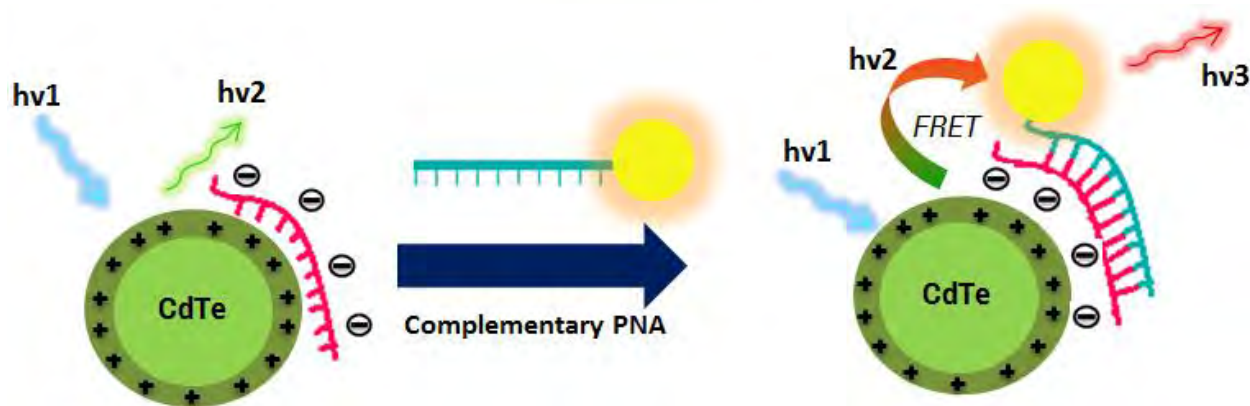
โดยปกติแล้วหลักการใช้ควอนตัมมาประยุกต์ในการตรวจจับดีเอ็นเออาจทำได้สองแบบคือการปรับปรุงพื้นผิวให้เป็นประจุบวกและปรับปรุงพื้นผิวให้เป็นประจุลบ ซึ่งหลักการแรกที่จะกล่าวถึงคือการปรับปรุงพื้นผิวควอนตัมดอทให้เป็นประจุลบ ส่วนโมเลกุลของพีเอ็นเอจะไม่มีประจุลบเหมือนดีเอ็นเอ แต่สามารถปรับปรุงให้มี

ประจวบไรก็ได้ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบดีเอ็นเอ นอกจากนี้พีเอ็นเอยังมีการจับยึดกับดีเอ็นเอที่แข็งแรงและจำเพาะเจาะจงกว่าดีเอ็นเอด้วยกันเองอีกด้วย โดยในส่วนของ การนำมาประยุกต์ใช้กับควอนตัมดอทประจุลบนั้น จะทำการติดหมู่อะมิโนของ lysine ลงไปเพื่อให้พีเอ็นเอมีประจุบวกและสามารถติดกับควอนตัมดอทได้ตามหลักการที่แสดงในรูป 3.21 คือเมื่อใส่พีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงและควอนตัมดอทประจุลบลงไปพีเอ็นเอจะจับกับควอนตัมดอทด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิต ทำให้เกิดการ FRET การคายแสงของควอนตัมดอทจะถูกดูดกลืน และเกิดการคายแสงในช่วงคลื่นของฉลากที่ติดอยู่กับพีเอ็นเอแทน แต่เมื่อใส่ดีเอ็นเอคู่สมลงไปดีเอ็นเอดังกล่าวจะเข้าจับกับพีเอ็นเอเกิดเป็นไฮบริดที่มีประจุลบซึ่งจะผลักรบกวนกับประจุลบบนผิวของควอนตัมดอท ทำให้ไม่เกิดการ FRET เมื่อกระตุ้นจึงมีการคายแสงจากควอนตัมดอทเพียงอย่างเดียว ทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมและไม่คู่สมได้



รูปที่ 3.21 หลักการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจาก Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ระหว่างควอนตัมดอทประจุลบกับฉลากเรืองแสงที่ติดบนพีเอ็นเอโพรบ

ในส่วนของหลักการที่สองนั้นจะใช้ควอนตัมดอทประจุบวก โดยธรรมชาติจากประจุลบของดีเอ็นเอจะทำให้ดีเอ็นเอถูกดูดเกาะติดกับควอนตัมดอท ถ้าดีเอ็นเอไม่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอ ตัวพีเอ็นเอจะอยู่เป็นอิสระไม่ถูกดูดจับไว้ ทำให้เห็นการคายแสงจากควอนตัมดอทและของพีเอ็นเอที่ติดฉลากแยกกัน แต่ถ้าพีเอ็นเอและดีเอ็นเอมีลำดับเบสเป็นคู่สมกันจะทำให้เกิดการเข้าคู่กัน ฉลากเรืองแสงจากพีเอ็นเอจึงเข้าใกล้กับควอนตัมดอทและเกิดการ FRET ขึ้นดังรูปที่ 3.22

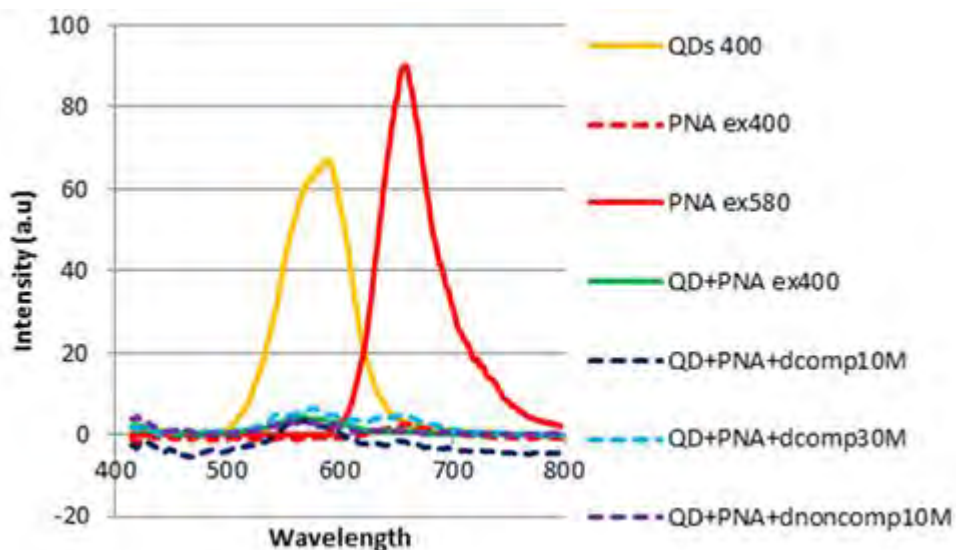


รูปที่ 3.22 หลักการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจาก Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ระหว่างควอนตัมดอทประจุบวกกับฉลากเรืองแสงที่ติดบนพีเอ็นเอโพรบ

เนื่องจากควอนตัมดอทที่สังเคราะห์เองในงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดคือไม่ค่อยเสถียร และมีความยาวคลื่นของการเรืองแสงที่ไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการ FRET กับพีเอ็นเอโพรบที่จะใช้ จึงได้ทดลองเพื่อพิสูจน์หลักการเบื้องต้นก่อนโดยใช้ควอนตัมดอทในระบบ CdTe ที่มีลิแกนด์ 3-mercaptopropionic acid ซึ่งทำให้พื้นผิวมีประจุลบ (สังเคราะห์โดย ผศ.ดร.โอภาส บุญเกิด มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ขนาดอนุภาคของควอนตัมดอทดังกล่าวคือ 3.0 nm และเมื่อกระตุ้นที่ 400 nm จะแสดงการคายแสงที่ 589 nm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นฉลาก Nile red (Nr) ที่อยู่บน PNA (580 nm) โดยในการทดลองนี้ได้ใช้ พีเอ็นเอโพรบชนิด acpcPNA คือ Nr-GTAGTCACT-LysNH₂ และใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมที่ได้ทดสอบทั้งแบบสายสั้นคือ 5'-AGTGATCTAC-3' (ความยาวพอดีกับโพรบ) และแบบสายยาว ซึ่งจะใกล้เคียงกับตัวอย่างจริงมากกว่า คือ 5'-CGCGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG-3' (บริเวณที่จับยึดกับโพรบแสดงด้วยการขีดเส้นใต้) และมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมคือ 5'-GTAGTCACT-3' เป็นการทดลองควบคุม

ในการทดลองจะใส่ ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอ ตามลำดับ ผลการทดลองเป็นดังแสดงในรูปที่ 3.23

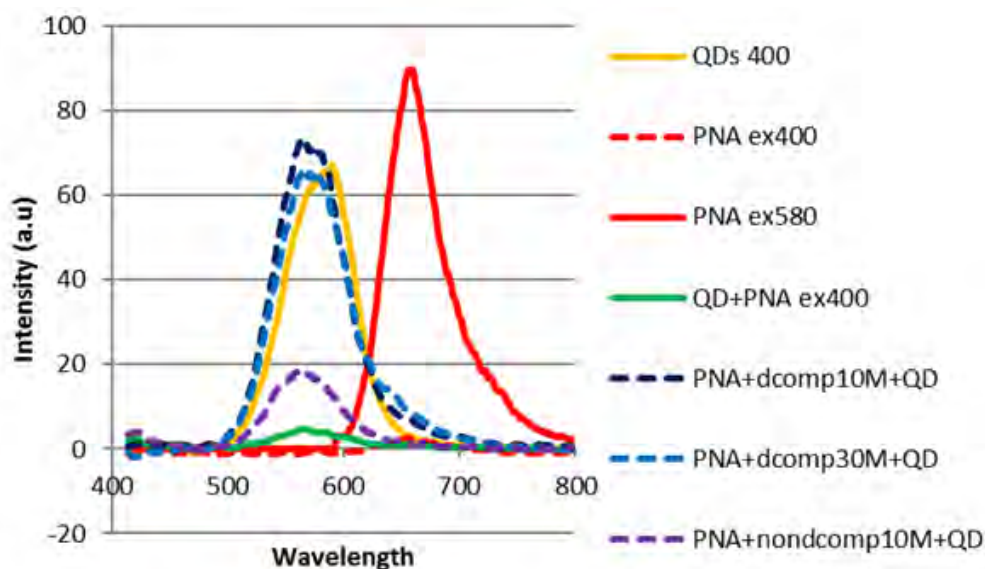
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.23 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมการประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic กับพีเอ็นเอโพรบ Nr 10 ลำดับเบสเมื่อใส่ควอนตัมดอท, พีเอ็นเอ และ ดีเอ็นเอ ตามลำดับ (สภาวะ: 0.3 μM พีเอ็นเอ, 3.6 μM ดีเอ็นเอ, 74 nM ควอนตัมดอท (3.0 nm) ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm and $\lambda_{\text{ex}} = 580$ nm สำหรับควอนตัมดอทและพีเอ็นเอสายเดี่ยว, PMT voltage = high)

โดยพบว่าหลังใส่ควอนตัมดอท และ พีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากด้วย Nr ลงไปพบว่าสัญญาณการเรืองแสงของควอนตัมดอทที่ 589 nm จะลดลงมากแต่ไม่พบการ FRET ไปยัง Nr ดังที่คาดไว้ ดังจะเห็นได้จากสัญญาณเรืองแสงที่ 659 nm ของ Nr ไม่ได้เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่ควอนตัมดอทดังกล่าวอยู่ใกล้กับฉลากเรืองแสงมากเกินไป จึงทำให้เกิดการ quench โดยกลไก contact quenching แทนที่จะเกิดการ FRET และเมื่อใส่ดีเอ็นเอที่มีคู่ลำดับเบสสมลงไปไม่ว่าจะสายสั้นหรือสายยาวและเป็นคู่สมหรือไม่เป็นคู่สมพบว่าจะยังคงเกิดการ quench ของสัญญาณ แสดงว่าพีเอ็นเอจะเกาะกับควอนตัมดอทอย่างถาวร และประจุลบจากควอนตัมดอทและดีเอ็นเอจะผลักรัน ทำให้ไม่สามารถเกิดการจับกันของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอได้

ในอีกการทดลองหนึ่งจะผสมพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอก่อน แล้วจึงเติมควอนตัมดอท ตามลำดับ ผลการทดลองเป็นดังแสดงในรูปที่ 3.24



รูปที่ 3.24 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมการประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic กับพีเอ็นเอโพรบ Nr 10 ลำดับเบสเมื่อใส่ควอนตีเอ็นเอ, ดีเอ็นเอ และ ควอนตัมดอท ตามลำดับ (สภาวะ: 0.3 μM พีเอ็นเอ, 3.6 μM ดีเอ็นเอ, 74 nM ควอนตัมดอท (3.0 nm) ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm and $\lambda_{\text{ex}} = 580$ nm สำหรับควอนตัมดอทและพีเอ็นเอสายเดี่ยว, PMT voltage = high)

แต่เมื่อใส่ดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมให้เข้าไปจับกับพีเอ็นเอก่อน การเรืองแสงของควอนตัมดอทจะยังคงเหมือนควอนตัมดอทที่ไม่ได้เติมพีเอ็นเอทั้งในกรณีที่เป็นสายสั้นและสายยาว แสดงว่าดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมเข้าไปจับกับพีเอ็นเอ และทำให้ไม่สามารถจับกับควอนตัมดอทต่อไปได้เนื่องจากเกิดการผลักรันของประจุลบ จึงไม่เกิดการ quench ของควอนตัมดอทส่วนในกรณีที่มีดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมซึ่งไม่เกิดการจับกับพีเอ็นเอ จะทำให้เกิดการ quench ของควอนตัมดอทเช่นเดียวกับในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเออยู่ด้วย ซึ่งเกือบสอดคล้องกับหลักการในรูปที่ 3.22 เว้นแต่เกิดการ quench ระหว่างควอนตัมดอทกับฉลากเรืองแสงบนพีเอ็นเอแทนที่จะเป็นการ FRET ตามที่ต้องการ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการ quench จะไม่สมบูรณ์เท่าในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอเลย ซึ่งต้องศึกษาต่อไปว่าเป็นเพราะสาเหตุใด ส่วนการกระตุ้นพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย Nr โดยไม่มีควอนตัมดอทและดีเอ็นเออยู่ด้วยที่มีความยาวคลื่น 400 nm จะเกิดการเรืองแสงที่มีความยาวคลื่นของ Nr น้อยมาก ในขณะที่การกระตุ้นที่มีความยาวคลื่น 580 nm จะเห็นการเรืองแสงของ Nr ตามปกติ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สรุปได้ว่าสามารถใช้ QD ประจุลบร่วมกับ PNA ที่ติดฉลากด้วย Nr เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกรณีที่มีและไม่มี DNA คู่สมอยู่ด้วยได้ โดยพิจารณาจากการ quench ของตัว QD อย่างไรก็ตาม หากสามารถพัฒนาให้การตรวจวัดเกิดในรูปแบบการ FRET ได้น่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่า จึงยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อไป

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ควอนตัมดอทชนิด CdTe ที่ที่กระจายตัวในน้ำได้ และมีประจุบวกและประจุลบเพื่อนำไปใช้เป็นตัวให้สัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ตรึงอยู่บนกระดาษกรอง และในสภาวะสารละลาย โดยการทดลองเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ควอนตัมดอทชนิด CdTe จาก CdCl_2 , Na_2TeO_3 , ligand, NaBH_4 และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง¹⁷ ในอัตราส่วน 1:0.2:3.3:67:4,385 โดยใช้ลิแกนด์ต่างๆ กันได้แก่ cysteamine, L-cysteine, thiosalicylic acid, 2-mercaptoethanol และ L-histidine และสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของควอนตัมดอทที่ได้โดยการนำไปส่องภายใต้แสงยูวีที่ 365 nm ซึ่งจะเกิดการเปล่งแสงขึ้น ซึ่งการส่องดูด้วยแสงยูวีนี้ทำให้ค้นพบโดยบังเอิญว่าการฉายแสงยูวีมีผลต่อการเปล่งแสงของควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้ กล่าวคือทำให้การเรืองแสงมีความเข้มสูงขึ้นและมีความยาวคลื่นเลื่อนไปทางสีแดง โดยควอนตัมดอทที่มีลิแกนด์เป็น cysteamine สามารถเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีแดงเมื่อฉายด้วยแสงยูวีเป็นเวลา 10 นาที ควอนตัมดอทที่สังเคราะห์โดยใช้ลิแกนด์อื่นก็ให้การเปลี่ยนแปลงการเปล่งแสงเมื่อฉายด้วยแสงยูวีเช่นกัน แต่เห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนเท่า อาจเนื่องจากเมื่อเริ่มต้นควอนตัมดอทที่ได้ก็ให้การเปล่งแสงในช่วงสีส้มหรือแดงอยู่แล้ว โดยได้พิสูจน์ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงการนี้เกิดจากการฉายแสงยูวีจริงๆ ไม่ใช่มาจากปัจจัยอื่นเช่นอุณหภูมิหรือเวลา สิ่งที่ค้นพบอีกอย่างก็คือการใช้ลิแกนด์ต่างชนิดกันมีผลต่อความยาวคลื่นของการเปล่งแสงด้วยกล่าวคือที่อัตราส่วนเดียวกันลิแกนด์ L-cysteine, thiosalicylic acid, 2-mercaptoethanol และ L-histidine จะให้สีออกไปช่วงแสงสีแดงเมื่อเทียบลิแกนด์ cysteamine ซึ่งเป็นความรู้ใหม่ที่ได้เพิ่มเติมจากเอกสารอ้างอิง¹⁷ และได้รับการยืนยันในงานวิจัยนี้ที่สามารถควบคุมสีของการเปล่งแสงของควอนตัมดอทโดยการปรับสัดส่วนของ NaBH_4 และ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ โดยสัดส่วนที่มากจะทำให้สีออกไปทางช่วงแสงสีน้ำเงิน และสัดส่วนที่น้อยจะทำให้สีออกไปทางช่วงแสงสีแดง โดยสามารถคำนวณขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเมื่อแทนค่าในสมการของ Brus equation พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดตั้งแต่ 4.22 ถึง 5.93 nm ซึ่งอยู่ในช่วงขนาดของควอนตัมดอทจริง นอกจากนี้ยังสามารถทำควอนตัมดอทให้บริสุทธิ์โดยการนำไปเซนทริฟิวจ์แล้วนำตะกอนมากระจายตัวในน้ำเปรียบเทียบกับ HEPES buffer 0.1 mM พบว่าควอนตัมดอทที่การกระจายตัวในน้ำจะมีความคงตัวมากกว่าในบัฟเฟอร์ โดยสามารถเก็บไว้ได้โดยไม่มีการตกตะกอนเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C

ในส่วนการทดสอบการใช้ควอนตัมดอทเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอบนกระดาษกรอง พบว่าสามารถชะล้างควอนตัมดอทออกจากกระดาษได้เช่นเดียวกับสีย้อมที่ละลายน้ำได้ต่างๆ ไป จึงอาจนำควอนตัมดอทมาใช้ทดแทนสีย้อมอื่นๆ ได้ แต่ยังพบปัญหาที่สำคัญคือควอนตัมดอทที่สังเคราะห์ได้ยังไม่ค่อยเสถียร และเมื่อทิ้งให้แห้งการเรืองแสงจะลดลง จึงได้ทดสอบการประยุกต์ใช้ควอนตัมดอทในการตรวจวัดดีเอ็นเอในสภาวะสารละลายแทน โดยพบว่าเมื่อใช้ควอนตัมดอทชนิด CdTe ประจุลบที่มีลิแกนด์เป็น 3-mercaptopropionic acid ขนาด 3.0 nm (ไม่ได้สังเคราะห์เองในงานวิจัยนี้) มาใช้ร่วมกับพีเอ็นเอที่ติดฉลากฉลากเรืองแสง Nile red พบว่าเมื่อผสมพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอก่อนและตามด้วยควอนตัมดอทจะสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ขึ้นอยู่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน กล่าวคือเมื่อไม่มีดีเอ็นเออยู่ด้วยการเปล่งแสงของควอนตัมดอทจะลดลง แต่ไม่พบการเรืองแสงของฉลาก Nile red แสดงว่าเกิดการลดสัญญาณของควอนตัมดอทแทนที่จะเป็นการ FRET จากควอนตัมดอทไปยัง Nile red ตามที่คาดหมายไว้ อย่างไรก็ตาม เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมอยู่ด้วยจะเห็นสัญญาณการเรืองแสงของควอนตัมดอทกลับคืนมา เนื่องจากการจับกันของดีเอ็นเอกับพีเอ็นเอ จะทำให้ควอนตัมดอทและ Nile red อยู่ห่างกัน ไม่ว่าจะป็นกรณีที่ดีเอ็นเอมีความยาวเท่ากับพีเอ็นเอโพรบหรือยาวกว่า ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่คู่สมจะทำให้เกิดการลดสัญญาณของสัญญาณของควอนตัมดอทคล้ายกับในกรณีที่ไม่ดีเอ็นเอ

อ้างอิง

1. Mutlugün, E.; Nizamoğlu, S.; Demir, H. V. Highly efficient nonradiative energy transfer using charged CdSe/ZnS nanocrystals for light-harvesting in solution. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95*, 033106.
2. Morello, G.; Anni, M.; Cozzoli, P. D.; Manna, L.; Cingolani, R.; De Giorgi, M. Picosecond photoluminescence decay time in colloidal nanocrystals: The role of intrinsic and surface states. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *111*, 10541-10545.
3. Kim, S.; Fisher, B.; Eisler, H.-J.; Bawendi, M. Type-II quantum dots: CdTe/CdSe(Core/Shell) and CdSe/ZnTe(Core/Shell) heterostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11466-11467.
4. Jiao, Y.; Gao, X.; Lu, J.; Chen, Y.; Zhou, J.; Li, X. A novel method for PbS quantum dot synthesis. *Mater. Lett.* **2012**, *72*, 116-118.
5. Chen, Z.; Li, X. X.; Du, G.; Chen, N.; Suen, A. Y. M. A sol-gel method for preparing ZnO quantum dots with strong blue emission. *J. Lumin.* **2011**, *131*, 2072-2077.
6. Reinhart, C. C.; Johansson, E. Colloidally Prepared 3-Mercaptopropionic Acid Capped Lead Sulfide Quantum Dots. *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 7313-7320.
7. Li, M.; Zhou, H.; Zhang, H.; Sun, P.; Yi, K.; Wang, M.; Dong, Z.; Xu, S. Preparation and purification of l-cysteine capped CdTe quantum dots and its self-recovery of degenerate fluorescence. *J. Lumin.* **2010**, *130*, 1935-1940.
8. Tian, H.; Ip, L.; Luo, H.; Chang, D. C.; Luo, K. Q. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 321-334.
9. Kumar, S.; Alibhai, D.; Margineanu, A.; Laine, R.; Kennedy, G.; McGinty, J.; Warren, S.; Kelly, D.; Alexandrov, Y.; Munro, I.; Talbot, C.; Stuckey, D. W.; Kimberly, C.; Viellerobe, B.; Lacombe, F.; Lam, E. W. F.; Taylor, H.; Dallman, M. J.; Stamp, G.; Murray, E. J.; Stuhmeier, F.; Sardini, A.; Katan, M.; Elson, D. S.; Neil, M. A. A.; Dunsby, C.; French, P. M. W. Flim FRET technology for drug discovery: Automated multiwell-plate high-content analysis, multiplexed readouts and application in situ. *Chemphyschem.* **2011**, *12*, 609-626.
10. Rahman, M. M. An introduction to fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Sci. J. Phys.* **2012**.

11. Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706-8715.
12. Qu, L.; Peng, Z. A.; Peng, X. Alternative routes toward high quality CdSe nanocrystals. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 333-337.
13. Farkhani, S. M. V., A. Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots. *IET Nanobiotechnol.* **2012**, *8*, 59-76.
14. Donoso, P. J., M.; Monrás, J. P.; Bravo, D.; Aguirre, A.; Quest, A. F.; Osorio-Román, I. O.; Aroca, R. F.; Chasteen, T. G.; Vásquez, C. C. Biomimetic, mild chemical synthesis of CdTe-GSH quantum dots with improved biocompatibility. *PLoS ONE.* **2012**, *7*, e30741.
15. Gaponik, N.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Hoppe, K.; Shevchenko, E. V.; Kornowski, A.; Eychmüller, A.; Weller, H. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *106*, 7177-7185.
16. Samanta, A.; Deng, Z.; Liu, Y. Aqueous synthesis of glutathione-capped CdTe/CdS/ZnS and CdTe/CdSe/ZnS Core/Shell/Shell nanocrystal heterostructures. *Langmuir.* **2012**, *28*, 8205-8215.
17. Zhou, D.; Lin, M.; Chen, Z.; Sun, H.; Zhang, H.; Sun, H.; Yang, B. Simple synthesis of highly luminescent water-soluble CdTe quantum dots with controllable surface functionality. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 4857-4862.
18. Nielsen, P. E. E., M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by standard displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* **1991**, *254*, 1497-1500.
19. Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.
20. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with alpha/beta-peptide backbone: A conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties. *Artif DNA PNA XNA.* **2011**, *2*, 50-59.
21. Initiative, T. A. Analysis of the genome sequence of the flowering plant arabidopsis thaliana. *Nature.* **2000**, *408*, 796-815.
22. Morlan, J. B., J.; Sinicropi, D. Mutation detection by real-time PCR: A simple, robust and highly selective method. *Spectrochim. Acta. Part A.* **2009**, *4*, 28-35.

23. Lee, D. L. M., M.; Allnut, T. R. Powell, W. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using Isothermal amplification of target DNA sequences. *Bmc Biotechnol.* **2009**, *9*, 7-7.
24. Weber-Lehmann, J. E.; Gradl, G. Richter, D. C.; Wiehler, J.; Rolf, B. Finding the needle in the haystack: differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int-Gen.* **2014**, *9*, 42-46.
25. Lee, J.; Choi, Y.; Kim, J.; Park, E.; Song, R. Positively charged compact quantum dot-DNA complexes for detection of nucleic acids. *ChemPhysChem.* **2009**, *10*, 806-811.
26. Lu, W.; Qin, X.; Luo, Y.; Chang, G.; Sun, X. CdS quantum dots as a fluorescent sensing platform for nucleic acid detection. *Microchimica Acta.* **2011**, *175*, 355-359.
27. Srinivasan, C.; Lee, J.; Papadimitrakopoulos, F.; Silbart, L. K.; Zhao, M.; Burgess, D. J. Labeling and Intracellular tracking of functionally active plasmid DNA with semiconductor quantum dots. *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 192-201.
28. Noor, M. O.; Shahmuradyan, A.; Krull, U. J. Paper-based solid-phase nucleic acid hybridization assay using immobilized quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer. *Anal Chem.* **2013**, *85*, 1860-1867.
29. Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenarat, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acids immobilised on cellulose paper as a DNA sensor. *RSC. Advances.* **2015**, *5*, 24110-24114.
30. Laopa, P. S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Positively charged polymer brush-functionalized filter paper for DNA sequence determination following Dot blot hybridization employing a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe. *Analyst.* **2013**, *138*, 269-277.
31. Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854-2860.
32. Liu, W.; Greytak, A. B.; Lee, J.; Wong, C. R.; Park, J.; Marshall, L. F.; Jiang, W.; Curtin, P. N.; Ting, A. Y.; Nocera, D. G.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G. Compact biocompatible quantum dots via RAFT-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 472-483.
33. Nejd, L. R., L.; Xhaxhiu, k.; Kensova, R.; Kudr, J. UV tuning of cadmium telluride quantum dots (CdTe QDs) – assessed by spectroscopy and electrochemistry. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2016**, *11*, 175-188.

34. Kayanuma, Y. Quantum-size effects of interacting electrons and holes in semiconductor microcrystals with spherical shape. *Phys. Rev. B.* **1988**, *38*, 9797-9805.
35. Masumoto, Y.; Sonobe, K. Size-dependent energy levels of CdTe quantum dots. *Phys. Rev. B.* **1997**, *56*, 9734-9737.
36. Rempel', S. V.; Razvodov, A. A.; Nebogatikov, M. S.; Shishkina, E. V.; Shur, V. Y.; Rempel', A. A. Sizes and fluorescence of cadmium sulfide quantum dots. *Phys. of the Solid State.* **2013**, *55*, 624-628.
37. Green, M. R. S., J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press: **2012**; Vol. 4th edition.
38. Gaponik, N.; Rogach, A. L. Thiol-capped CdTe nanocrystals: progress and perspectives of the related research fields. *Phys. Chem.* **2010**, *12* , 8685-8693.
39. Gereenspan, P. F., S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipos. Res.* **1985**, *26*, 781-789.



ประวัติผู้วิจัย

นายนิพัทธ์พงษ์ เส้นเศษ เกิดเมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษา
ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสารสาสน์วิเทศร่มเกล้า
จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 7/281 ซอยรามคำแหง 152
ถนนรามคำแหง เขตสะพานสูง แขวงสะพานสูง กรุงเทพมหานคร 10240 โทร 0875035336 e-mail:
Lucso.9999@gmail.com

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย