

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวัดปริมาณน้ำตาลบนอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวาน

Albumin Glycation for Diabetes Mellitus Monitoring

ดร.เดือนเพ็ญ จาปรุ่ง

สนับสนุนโดย สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)

บทสรุปเพื่อการสื่อสารสู่สาธารณะ

ปัจจุบันประชากรไทยเป็นโรคเบาหวานสูงถึง 6.9 % หรือประมาณ 4.2 ล้านคน โดยในกลุ่มประชากรที่เป็นเบาหวานนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจติดตามการดำเนินไปของโรค เพื่อวางแผนการรักษาและปฏิบัติตนที่ถูกต้อง โดยการตรวจติดตามการรักษาทำได้โดยการวัดระดับ HbA1c (น้ำตาลที่จับอยู่บนโปรตีนในเม็ดเลือดแดง) ซึ่งเป็นการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดแบบระยะยาว และสามารถตรวจวัดได้ทุก 2-3 เดือน

ข้อจำกัดในการตรวจวัดระดับ HbA1c มีสองประเด็นหลักๆคือ (1) ระยะเวลาที่สามารถตรวจได้นั้นยาวนานเกินไป ไม่เหมาะกับการวางแผนการรักษาในคนไข้บางกลุ่มที่มีอาการรุนแรง และรวดเร็ว และ (2) ระดับ HbA1c จะมีระดับต่ำกว่าปกติ และไม่น่าเชื่อถือในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการสร้างเม็ดเลือดแดงเช่นผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และพาหะธาลัสซีเมีย ซึ่งมีมากถึง 30-40% ของประชากรไทย ดังนั้นกลุ่มประชากรเหล่านี้จำเป็นต้องมีการวัดระดับตัวบ่งชี้ และติดตามเบาหวานตัวใหม่นั้นคือ โปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน หรือน้ำตาลที่เกาะอยู่บนโปรตีนอัลบูมิน ซึ่งโปรตีนชนิดนี้สามารถตรวจวัดได้ทุกสองอาทิตย์ และใช้ได้ในกลุ่มผู้ป่วยทั่วไป และผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ด้วย

แผนงานวิจัยเรื่อง “การวัดปริมาณน้ำตาลบนอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวาน” ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) และสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) ประจำปี 2557 นี้ เป็นการทำงานวิจัยร่วมกันระหว่างนักวิจัย และอาจารย์จากมหาวิทยาลัย ได้แก่ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยมหิดล โดยมีศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติเป็นหน่วยงานหลัก โดยคณะวิจัยได้ต่อยอดงานวิจัย จากสิทธิบัตรที่เกี่ยวกับแอปตาเมอร์ที่จับจำเพาะกับโปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน และอัลบูมิน ศึกษาคุณสมบัติแอปตาเมอร์ดังกล่าวเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และนำแอปตาเมอร์ดังกล่าวไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจ 3 รูปแบบ คือ (1) แบบการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้สควนาโนร่วมด้วย (2) แบบเคมีไฟฟ้า และ (3) แบบวัดโมเลกุลเดี่ยวด้วยนาโนพอร์

ภาพรวมของผลงานดำเนินงานในปีที่ 1 เป็นไปตามแผนงานที่วางไว้ โดยคณะวิจัยสามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดไกลเคทเตดอัลบูมิน ในระดับห้องปฏิบัติการสำเร็จแล้ว 2 แบบ และดำเนินการยื่นขออนุสิทธิบัตรเรียบร้อยแล้วนั้นคือ

(1). กรรมวิธีการตรวจไกลเคทเตดอัลบูมินโดยใช้แอปตาเมอร์ ร่วมกับสารละลายกราฟีนออกไซด์ (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 1403001740 ยื่นเมื่อวันที่ 23 ธ.ค.2557) โดยวิธีการนี้อาศัยหลักการยับยั้งการ

ส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของกราฟีนออกไซด์ เมื่อจับกับดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดสลาด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ ในสภาวะที่มีโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน แอปตาเมอร์จะถูกปล่อยออกมาจากกราฟีนออกไซด์ แล้วมาจับกับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน และส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อีกครั้ง วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปวิเคราะห์โปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินจากซีรัมของคนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ อยู่ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความไวกว่าชุดตรวจทางการค้าที่ใช้หลักการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีนถึง 2 เท่า นอกจากนี้วิธีการที่พัฒนาขึ้นในโครงการนี้ยังมีขั้นตอน และวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก สามารถอ่านผลได้ภายใน 30 นาที จึงสามารถที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้สำหรับติดตามภาวะแทรกซ้อน และวิวัฒนาการของโรคเบาหวานในผู้ป่วยจริงตามโรงพยาบาลทั่วไปได้ โดยได้มีการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมจริง ในกลุ่มที่เป็นเบาหวาน และกลุ่มคนปกติจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการที่คณะวิจัยพัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน ออกจากกลุ่มคนปกติได้อย่างชัดเจน

(2). **กรรมวิธีการตรวจวัดไกลเคเทเตดอัลบูมินโดยการใช้แอปตาเมอร์ ร่วมกับวิธีทางเคมีไฟฟ้า** (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 1503000656 ยื่นเมื่อวันที่ 1 พ.ค 2558) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาชุดตรวจหาโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ร่วมกับแอปตาเมอร์ ซึ่งมีขั้นตอนในการวัดปริมาณโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ ใช้ปริมาณสารที่ใช้วัดน้อย และยังสามารถตรวจวัดได้ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเป้าหมายต่ำถึงระดับไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการยึดติดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน ลงบนพื้นผิวขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วยแรงดึงดูดจำเพาะของสเตรปตาविटिन - ไบโอติน โดยกรรมวิธีนี้ สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคเทเตด อัลบูมิน ที่ถูกจับโดยแอปตาเมอร์ ผ่านการวัดสัญญาณเคมีไฟฟ้าที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนผ่านขั้วไฟฟ้า โดยกรรมวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินได้ในซีรัมจริงในห้องปฏิบัติการ โดยในการดำเนินงานในปีที่ 2 นี้ จะทำการพัฒนาให้วิธีดังกล่าวสามารถตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ของไกลเคเทเตดอัลบูมินในซีรัม และจะทำการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยเบาหวานในระดับห้องปฏิบัติการด้วย

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ได้ผลดีในระดับห้องปฏิบัติการ และกำลังถูกพัฒนาต่อไปเพื่อให้สามารถใช้ได้ผลดีในระดับภาคสนามที่เป็นกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยเบาหวาน และพร้อมกันนั้นทางกลุ่มนักวิจัยจะทำการเผยแพร่ข้อมูลข่าวสารต่างๆของผลงานวิจัยเหล่านี้สู่สาธารณชน โดยเน้นกลุ่มเป้าหมายหลักในเบื้องต้น ได้แก่ โรงพยาบาล, องค์กรเภสัชกรรม เพื่อให้หน่วยงานเหล่านี้รับทราบ และทดลองนำผลผลิตวิจัยไปใช้ โดยจะมี

การสาธิตการใช้ และการติดตามประเมินผลและปรับปรุง ลำดับต่อไปจะทำการสื่อสารให้ประชาชนทั่วไป
เข้าใจรับทราบโดยทาง Website เป็นต้น

Abstract

Albumin Glycation for Diabetes Mellitus Monitoring

Measuring combination of blood sugar and glycated hemoglobin (HbA1c) is a way to monitor the diabetes progression. However, HbA1c level in the red blood cell keeps constant during its life cycle (120 days), which is somehow too long to be monitored in severe cases. In addition, in condition effecting red blood cell structure or hemoglobin production (hemolytic anemia, thalassemia, and etc.), HbA1c level can be unreliable. Therefore, monitoring the intermediate indicator outside the red blood cell could improve the way to control diabetes progression and treatment.

The percentage of GHSA in normal serum is 0.6-3.0% whereas in diabetic patient serum has been found to be 2-5 folds higher than normal level. It has become clear that GHSA can be a marker of intermediate glycation and also a causative agent of the damage of diabetes complications, such as atherosclerosis, coronary artery disease and kidney failure. GHSA testing has been strongly recommended for monitor glycemic control for diabetes mellitus in hemodialysis patient and a test for complications associated with diabetes, which can also serve as a monthly report card for type 1 diabetes in the USA. Several GHSA detection platforms have been developed, which include enzymatic assay, colorimetric assay, high performance liquid chromatography, affinity chromatography and immunoassay. Enzymatic and chromatography based assay have demonstrated higher %GHSA due to nonspecific enzymes and imprecise of the binding site on the resin bead. The lower %GHSA has been observed in the immunoassay using antibody that specifically bind GHSA however using antibody are high cost and easily to be denatured

This research program are focusing on development of aptasensor platform for detection of glycated albumin for diabetes mellitus detection and monitoring. Three platforms, which are graphene oxide-aptamer, electrochemical and nanopore sensors, have been developed.

Considering the graphene oxide-aptamer approach, the fluorescence aptamer was fluorescence labeled and incubated with the graphene oxide (GO) and fluorescence signal was quenched. The fluorescence signal was recovered in the presence of GHSA protein. We tested the approach with three known proteins, which were GHSA, HSA, and streptavidin. HSA structure is similar as GHSA structure but streptavidin structure is totally different from the GHSA structure. These results indicated that GO-aptamer approach is specific method for *in vitro* GHSA detection. After optimization of the serum dilution, we investigated LOD of the

GO-aptamer approach at serum dilution 1:5000. We found the LOD of 50 $\mu\text{g/ml}$ at serum dilution 1:5000 with the linear correlation between 0.05 $\mu\text{g/ml}$ and 3 $\mu\text{g/ml}$

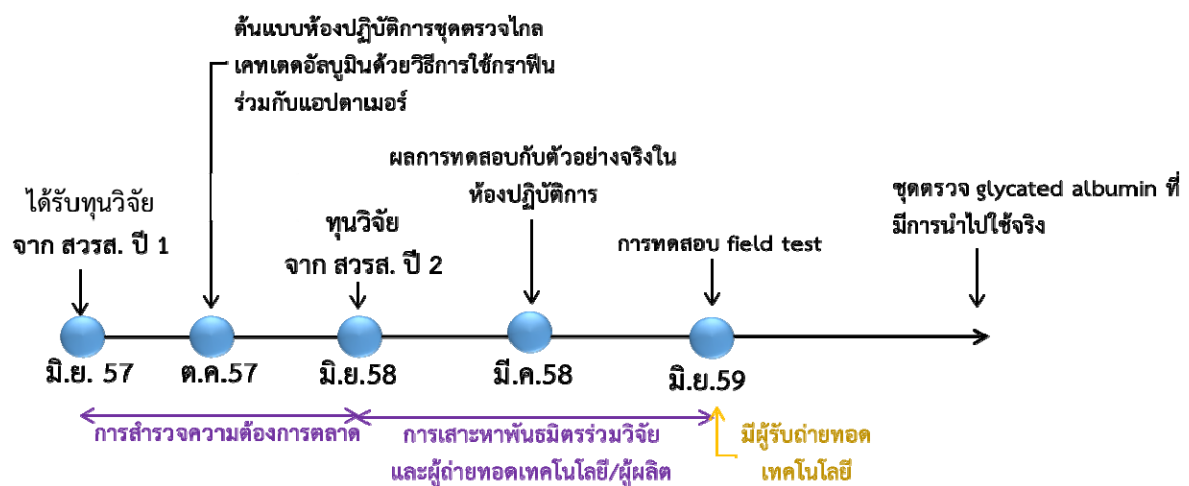
For the electrochemical sensor development, the aptamer was coated on carbon electrodes and electrochemical signal was detected when the aptamer bind glycated albumin. By using this approach, we could detect glycated albumin in PBS buffer and also in serum with the LOD of 30 $\mu\text{g/ml}$

For the nanopore analysis, we have set nanopore measurement and prepared all components for the analysis. Next study, all components will be assembled and the sensitivity and specificity of the system will be tested.

These results demonstrated that our GO-aptamer and electrochemical approach could potentially be used for simple and sensitive detection and monitoring of GHSA in human, which is an intermediate protein marker for diabetes mellitus. Next study, we will do field test for both GO-aptamer and electrochemical approach.

การวางแผนเพื่อนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์จริง

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในแผนงานวิจัยนี้ทั้งแบบที่ใช้วัสดุกราฟีนร่วมด้วย และแบบเคมีไฟฟ้ากำลังถูกพัฒนาต่อไปเพื่อให้สามารถใช้ได้ผลดีในระดับภาคสนามที่เป็นกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยเบาหวาน โดยแบบที่ใช้กราฟีนร่วมด้วยจะมีการทดสอบในระดับภาคสนามในปีงบประมาณหน้า และพร้อมกันนั้นทางกลุ่มนักวิจัยจะทำการเผยแพร่ข้อมูลข่าวสารต่างๆของผลงานวิจัยเหล่านี้สู่สาธารณชน โดยเน้นกลุ่มเป้าหมายหลักในเบื้องต้น ได้แก่ โรงพยาบาล, องค์กรเภสัชกรรม เพื่อให้หน่วยงานเหล่านี้รับทราบ และทดลองนำผลผลิตวิจัยไปใช้ โดยจะมีการสาธิตการใช้ และการติดตามประเมินผลและปรับปรุง ลำดับต่อไปจะทำการสื่อสารให้ประชาชนทั่วไปเข้าใจรับทราบโดยทาง Website เป็นต้น แผนงานเพื่อนำผลงานไปใช้ประโยชน์จริงได้แสดงในรูปแบบด้านล่าง



รูปภาพ: แสดงแผนการดำเนินงาน และถ่ายทอดเทคโนโลยีของกรรมวิธีการตรวจไกลเซเทดอัลบูมินด้วยวิธีการใช้กราฟีนร่วมกับแอปตาเมอร์

รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 1: การวิเคราะห์คุณสมบัติของแอปตาเมอร์ต่อไกลเคตเตดอัลบูมินสำหรับพัฒนาวิธีการตรวจชนิดต่างๆ (Analysis of Selected Aptamers against glycated albumin for Aptasensor)

ผู้ร่วมงานวิจัย:

1. ดร. เดือนเพ็ญ จาปรุง
2. ดร. ประภาศิริ พงษ์ประยูร
3. ดร. ภัทรพร ลักษณะสิริกุล
4. น.ส ชยาชล อภิวัต
5. น.ส เกียรติธิดา ตรีรัตน์ตระกูล

ความก้าวหน้าในการดำเนินงาน

1. การศึกษาคุณสมบัติของแอปตาเมอร์

จากผลการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนสองชนิดคือโปรตีนซีรัมอัลบูมิน และโปรตีนไกลเคตเตดซีรัมอัลบูมิน ด้วยวิธี SELEX ทำให้ได้แอปตาเมอร์มาสองกลุ่ม คือ (1) แอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนซีรัมอัลบูมิน และ (2) แอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน และได้ทำการยื่นจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับแอปตาเมอร์ดังกล่าวในประเทศไทย 2 ฉบับ (เลขที่คำขอ 1301003784 ยื่นเมื่อวันที่ 5 ก.ค. 2556 และเลขที่คำขอ 1301005956 ยื่นเมื่อวันที่ 17 ต.ค.2556) และได้ดำเนินการยื่นสิทธิบัตรในต่างประเทศด้วยอีก 1 ฉบับ

(International application number PCT/TH2014/000048 International filling date 15 October 2014) โดยลำดับดีเอ็นเอของแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนซีรัมอัลบูมิน และโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน ได้แสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1: ลำดับดีเอ็นเอของแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนซีรัมอัลบูมิน

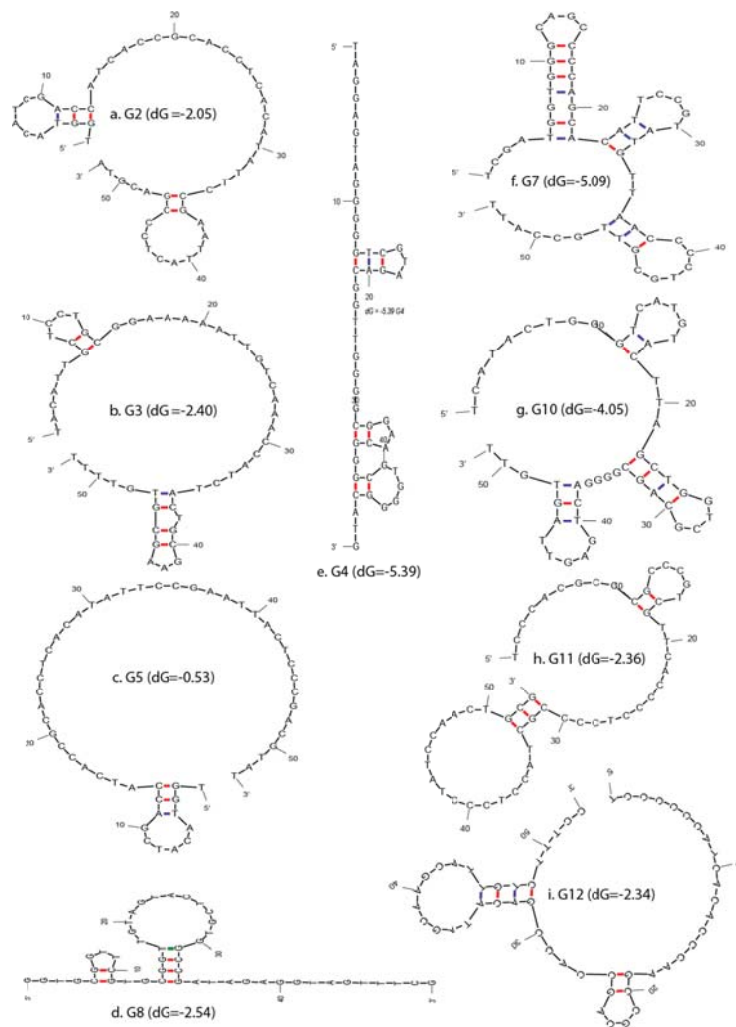
ชื่อแอปตาเมอร์	จำนวนลำดับเบส	ลำดับเบส
H1	88	AGATTGCACTTACTATCTCCAGGTCTCCCTGACCACAATAAAAGATAGCGTCCTGCTTGGATGAAGGGC AATTGAATAAGCTGGTAT
H2	88	AGATTGCACTTACTATCTCCAACACACCCGACCGGGCCCTTATTGCTGACCACCAAACTATGAACAACGG AATTG AATAAGCTGGTAT
H3	46	AGATTGCACTTACTATCT CCACCCATATG AATTGAATACCCTGGTTT
H4	106	AGATTGCACTTACTATCTATCCCACCACAGAACCCAGCCATGCAACCCACAACAAGACCTCAACCACC AATTGAATAAGCTGGTAT AATTGAATAAGCTGGTAT
H8	87	ATACCAGCTTATTCAATTCCTCCCGGCTTTGGTTTAGAGGTAGTTGCTCATTACTTGTACGCTCCGGAT GAGATAGTAAGTGCAATCT

ชื่อแอป ตาเมอร์	จำนวน ลำดับเบส	ลำดับเบส
H10	88	ATACCAGCTTATTCAATTGTTAACCGGTATGTATAGGATTATGAAAATGCCGCCCATCGAC CCTGTTCC GAGATAGTAAGTGCAATCT
H11	87	ATACCAGCTTATTCAATTCCCGTACTGAGGGGGTCCTACCCCGTCTCGGCCCAGCATGTG GTTGATG GAGATAGTAAGTGCAATCT
H12	106	AGATTGCACTTACTATCTATCCCACCACAGAACCCCAGCCATGCAACCCCAACAAGACC TCAACCACCAATTGAATAAGCTGGTAT AATTG AATAAGCTGGTAT
H13	88	AGATTGCACTTACTATCTTTGCGCTTGCAAGACTAGAAACAAACGCGCAACATTATTCGTA CACCCCCC AATTGAATAAGCTGGTAT
H14	88	ATACCAGCTTATTCAATTGCGGCACATATACAGGGCTTTACCAGCGGGGAAGGTTAGCGA CGCGAGGGG GAGATAGTAAGTGCAATCT
H16	87	ATACCAGCTTATTCAATTAAGATCCGGATAGCAATCTGCCGTAGTAGGTCAACGTGTCTGG GGGGTTA TAGATAGTAAGTGCAATCT
H17	88	AGATTGCACTTACTATCTCGCGAAGCCAACAAAATCAACCACCCCACTCTTTAATACATCC CGGGCGCCC AATTGAATAAGCTGGTAT
H18	88	AGATTGCACTTACTATCTCCAAACCACTACACCCTTCTAACCCCCCTGTCTTCTCGCTCT GACCACCTT AATTGAATAAGCTGGTAT
H20	88	ATACCAGCTTATTCAATTGTCGTGTCTGGGCCATTGATGAGTCGTAGTGGGGTTTCGCTCT ATCGGGTG TAGATAGTAAGTGCAATCT
H23	106	ATACCAGCTTATTCAATTATACCAGCTTATTCAATTGTAGAACAATACTCTGGTTAACT CGTTACACGTTTATTTCCCTGACACT GAGATAGTAAGTGCAATCT
H24	88	AGATTGCACTTACTATCTATGCCAACATCCCCCCCCTATTCACTAACCATCCTACTAACGT CCTCCGGGT AATTGAATAAGCTGGTAT
H25	105	ATACCAGCTTATTCAATTATACCAGCTTATTCAATTCGCACTTGTTTAATGCGCAAGTATC TTGGGTGTAGTTGGTCGGTGTGATA GAGATAGTAAGTGCAATCT
H26	89	AGATTGCACTTACTATCTGCACACTACTAACTACATATGTCCCCACTCCAACCTACTTGA ATCGGGTTC AATTGAATAAGCTGGTATA

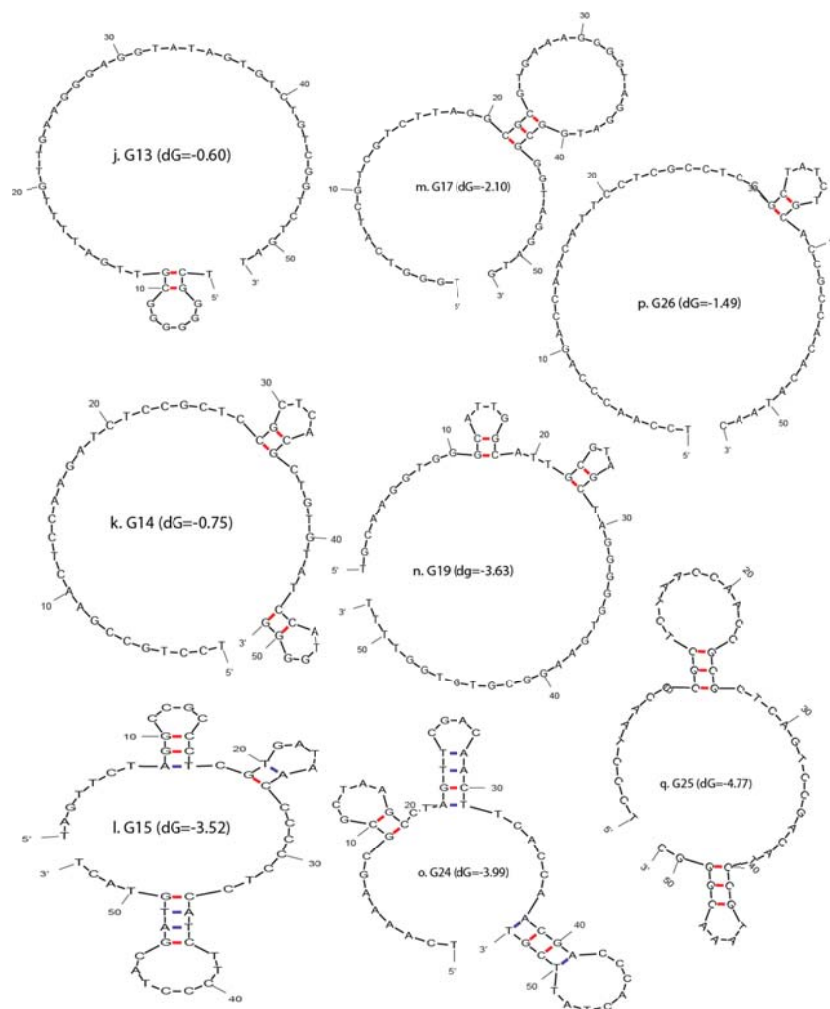
ตารางที่ 2: ลำดับดีเอ็นเอของแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทคเตดซีรัมอัลบูมิน

ชื่อแอปตาเมอร์	จำนวนลำดับเบส	ลำดับเบส
G1	71	TCTATCCCCCAGCCTTCCCCTCAACCTGCCGGGCGCTGCATATAACTGAATTGAATAAGCTGGTAT
G2	52	TGGTACATCGACCATCACCGCACCTCACATATTCCGAATTACTCCCGACGTA
G3	52	TACATTGCTCCTGCGGAAAAATTGTCAAACCATCTACTGCGAAGCGTGTTTT
G4	49	TAGGAGTAGGGGGTCGTAGACGGTTGGGGCGGAACGGGCGTGGGGCATG
G5	53	TGGTACATCGACCATCACCGCACCTCACATATTCCGAATTACTCCCGACGTAT
G7	53	TCGATGGTGGGCAGCCCCAGCACATTCCGTATGTTAACCCCTGCGTTGCCATT
G8	49	GGTGCGGTTCTGTGCGGTTGTAGTACTCGTGGCCGATAGAGGTAGTTTCG
G10	51	TCATACTGGGTCATGTACTTAGCTGGTCGCAGCGGGACTGAGTTAGTGTT
G11	53	TCCCACGCCCCGCGCTCGTTCACCCCTCCCCGCTACCTCCCTATCCAAGTGGC
G12	53	TCCCCCATCACACCAAGCCGCAGCCACCGACATAGCAAGCATTGTCTTTCC
G13	52	TCGGGGGGCGTTGATTTTGTGAAGGGAGGTATAGTGTCTGTGCGTCTGAT
G14	51	TCCTGCCGAAGTCCAAGATCTCCGCTCCGCTCACGCTGTGTATCCATGGGG
G15	53	TAGTTCTAGGCCGCCCTCGTGATAACCCCTCCATCTTCCCTACGATGTACT
G17	52	TGGGTCATCGTCGTCTTAGGCGCGTGAAAGGGTAGGATGGCGGGTAGGATG
G19	52	TGCAAGGTGGGCATTGGCATTGCGTAGCTAGGGGGTGAAGGCGTGTGTTTTT
G23	71	TCAGGCAAACACAATATACGCAATATCACGGTGGAATTTCAAGGCCTTTTCATCAATTGAATAAGCTGGTAT
G24	53	TCAAAAGCGCGCTAAGCCTAGTTCGACAACTTCACCAACGACCCACTATTCGT
G25	51	TCCCTAACCCGCTCTAACCAACCGCGCTCAGTCCGACATCCGTAAACGGGC
G26	53	TCCAACCCAGACCAACATTCTCGCCTCCGCTATCTGCACCGCCACACATAAC

ในโครงการย่อยที่ 1 นี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางจุลศาสตร์ของแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทคเตดอัลบูมินบางตัวที่คัดเลือกมาได้ โดยใช้โปรแกรม Mfold จากผลการวิเคราะห์พบว่าแอปตาเมอร์ที่เลือกมาศึกษานั้นมีโครงสร้างที่เกิดจากการจับกันเองของลำดับดีเอ็นเอภายในสายเดียวกัน (Secondary structure) และมีพลังงาน (ΔG) ในการเกิดโครงสร้างดังกล่าวที่อยู่ระหว่าง (-5.09) – (-0.53) ดังแสดงในรูปที่ 1 และรูปที่ 2 โดยดีเอ็นเอแอปตาเมอร์จากรูปที่ 1 และรูปที่ 2 สามารถจับกับโปรตีนไกลเคเทคเตดอัลบูมิน เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Electromobility Shift Assay (EMSA)



รูปที่ 1: แสดงโครงสร้างของทีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mfold ซึ่งค่าพลังงาน ΔG และโครงสร้างของทีเอ็นเอ G2, G3, G4, G5, G8, G7, G10, G11 และ G12 ได้แสดงไว้ในรูป a, b, c, d, e, f, g, h และ i ตามลำดับ

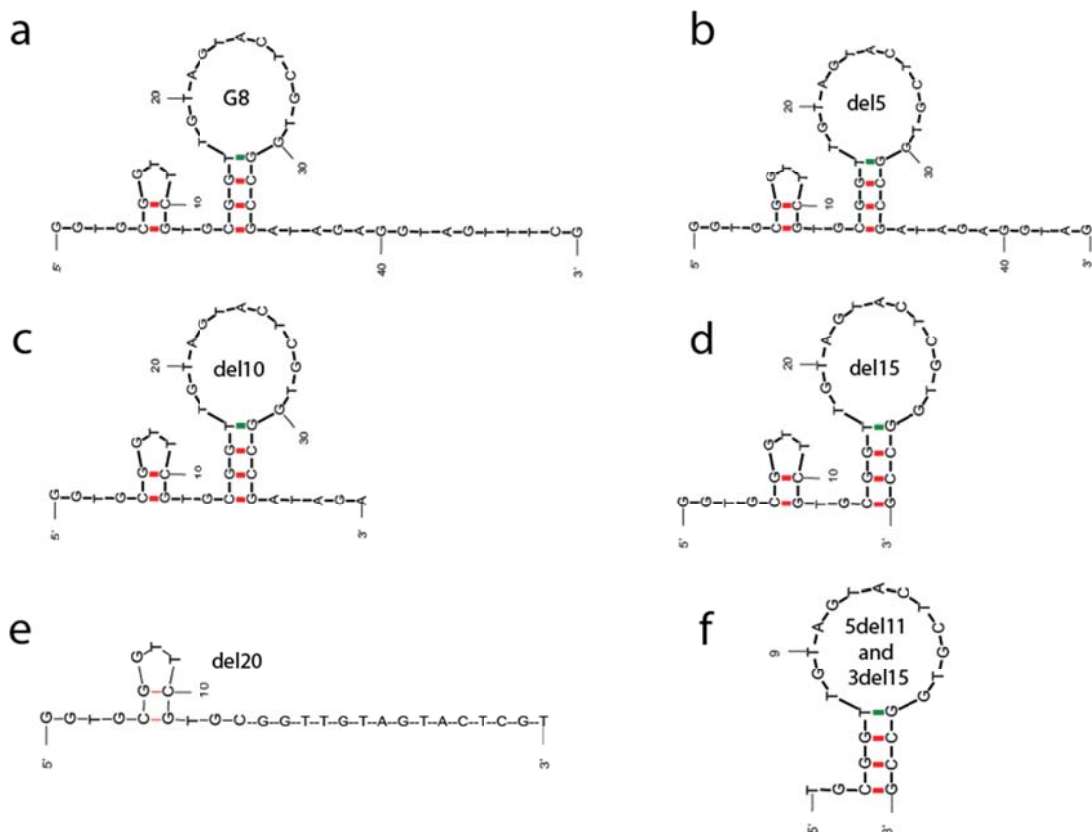


รูปที่ 2: แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mfold ซึ่งค่าพลังงาน ΔG และโครงสร้างของดีเอ็นเอ G13, G14, G15, G17, G19, G24, G26 และ G25 ได้แสดงไว้ในรูป j, k, l, m, n, o, p และ q ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ค่าพลังงาน ΔG พบว่าดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่คัดเลือกมาทั้งหมดมีค่า ΔG เป็นลบ ซึ่งแสดงว่า การเกิดโครงสร้างดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติ และไม่ต้องใช้พลังงานจากภายนอก ในขณะเดียวกันการทำลายโครงสร้างดังกล่าวจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 40 °C

2. การหาตำแหน่งของแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย

เนื่องจากดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ G8 มีโครงสร้างคล้ายกับติดผม ซึ่งเอื้อต่อการจับกับโมเลกุลเป้าหมาย การศึกษานี้จึงเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ชนิด G8 มาทำการศึกษาต่อไปในเชิงลึก โดยการตัดให้มีขนาดสั้นลงทีละ 5 เบสทั้งปลาย 5' และ 3' เกิดเป็นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ชนิดใหม่อีก 6 ตัว ดังแสดงใน **รูปที่ 3**



รูปที่ 3: แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ชนิด G8 ซึ่งทำการตัดให้สั้นลงทั้งปลาย 5' และ 3' โดยโครงสร้างของแอปตาเมอร์ G8, del5, del10, del15, del20 และ 5del11and3del15 ได้แสดงในรูปที่ a, b, c, d, e และ f ตามลำดับ

หลังจากทำการทดสอบคุณสมบัติการจับกับของแอปตาเมอร์ทั้ง 6 ตัวกับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธี EMSA และหาค่าความสามารถในการจับโดยใช้แอปตาเมอร์ร่วมกับกราฟีนออกไซด์ ผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีได้แสดงใน **ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3: แสดงผลการทดสอบการจับกันของแอปตาเมอร์กับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน

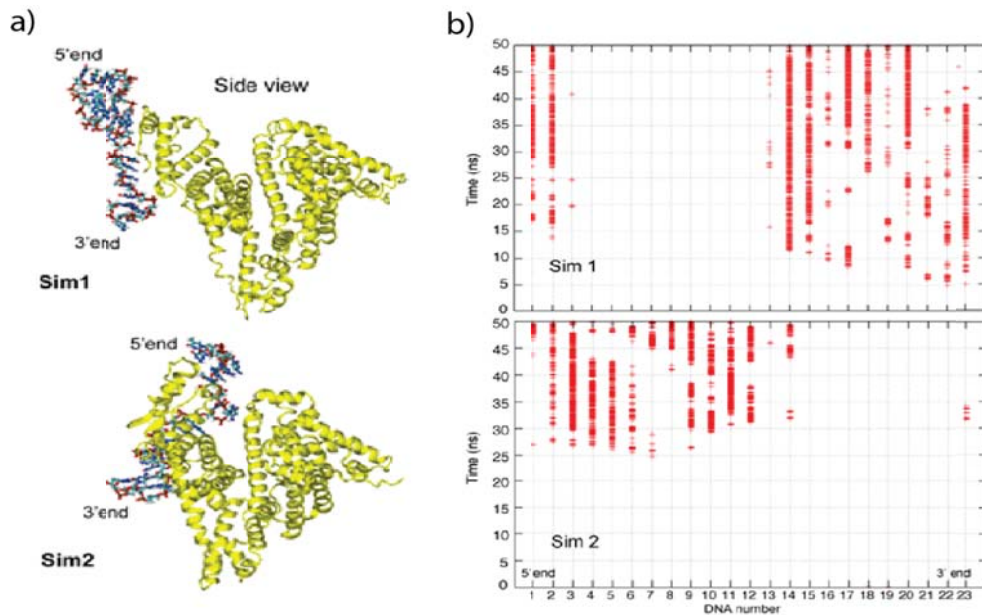
Name	DNA sequence	Kd, $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{mole/L}$)	EMSA
G8	5'GGTGCGGTTCTGCGGTTGTAGTACTCGTGGCCGATAGAGGTAGTTTCG3'	0.100 ± 0.007 (1.50)	+
Del5	5'GGTGCGGTTCTGCGGTTGTAGTACTCGTGGCCGATAGAGGTAG3'	0.065 ± 0.018 (0.98)	+
Del10	5'GGTGCGGTTCTGCGGTTGTAGTACTCGTGGCCGATAGA3'	0.096 ± 0.009 (1.44)	+
Del15	5'GGTGC GGTTCTG TCGGTTGTAGTACTCGTGGCCG3'	0.081 ± 0.022 (1.22)	+
Del20	5'GGTGCGGTTCTGCGGTTGTAGTACTCGT.3'	0.121 ± 0.031 (1.82)	+
5del11 and 3del15	5'TGCGGTTGTAGTACTCGTGGCCG3'	0.385 ± 0.097 (5.78)	+
5del16 and 3del15	5'TTGTAGTACTCGTGGCCG3'	-	-
5del11 and 3del20	5'TGCGGTTGTAGTACTCGT3'	-	-
3GT-loop	5'TGCGGTTTTCCG3'	-	-

จากผลการทดสอบในตารางที่ 3 สรุปได้ว่าแอปตาเมอร์ 5del11and3del15 ซึ่งมีความยาว 23 เบส ซึ่งคือแอปตาเมอร์ G8 ที่ตัดเบสด้านปลาย 5' ออก 11 ตัว และปลายด้าน 3' ออก 15 ตัว เป็นแอปตาเมอร์ที่มีขนาดสั้นที่สุดที่สามารถจับได้กับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน และเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในขั้นถัดไป

3. การใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ในการศึกษาตำแหน่งของโปรตีนที่จับกับแอปตาเมอร์

หลังจากพบว่าแอปตาเมอร์ที่มีขนาดสั้น 23 เบสที่ชื่อว่า 5del11and3del15 ยังสามารถจับแบบจำเพาะกับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน โดยการทดสอบด้วยวิธี EMSA และการใช้กราฟีนออกไซด์ ในการทดลองต่อมาที่มวิจัยได้ใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์เพื่อศึกษาตำแหน่งของโปรตีนที่จับกับแอปตาเมอร์ โดยผลจากการสร้างแบบจำลองคอมพิวเตอร์ 2 ชุดพบว่าแอปตาเมอร์ 5del11and3del15 จับกับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินที่โดเมน 3 บี (IIIB) แต่คนละบริเวณ ดังแสดงใน รูปที่ 4 โดยผลการทดลองจากแบบจำลองคอมพิวเตอร์ชุดที่ 1 แสดงให้เห็นว่าแอปตาเมอร์ตำแหน่งที่ 21-23 เริ่มจับกับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินก่อน ตามด้วยการจับของแอปตาเมอร์ตำแหน่งที่ 14-20 โดยส่วนกลางของแอปตาเมอร์ ซึ่งคือตำแหน่งที่ 4-13 เกิดการรวมกลุ่มกัน และอยู่ห่างจากบริเวณที่แอปตาเมอร์จับกับโปรตีน สำหรับผลการทดลองชุดที่ 2 พบว่าแอปตาเมอร์ 5del11and3del15 จับกับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน ที่ตำแหน่ง 2-5 ก่อน ตามด้วยแอปตาเมอร์ที่ตำแหน่ง 9-13 ที่โดเมน 3 บี โดยการจับ

กันของแอปตาเมอร์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินทั้งบริเวณโดเมน 2 บี (IIB) และ 1 บี (IB) ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับกรดไขมัน



รูปที่ 4: รูปภาพแสดงข้อมูลการจับกันของแอปตาเมอร์ 5del11and3del15 กับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สองชุด (sim1 และ sim2)

เมื่อพิจารณาตำแหน่งบนโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน จากผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทั้งสองชุดพบว่า ตำแหน่งที่จับกับแอปตาเมอร์คือ กรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3: แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนของโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินที่จับกับแอปตาเมอร์ 5del11and3del15 โดยแบบจำลองคอมพิวเตอร์ชุดที่ 1(sim1) และแบบจำลองคอมพิวเตอร์ชุดที่ 2(sim2)

แบบจำลองคอมพิวเตอร์ชุดที่ 1 แบบจำลองคอมพิวเตอร์ชุดที่ 2

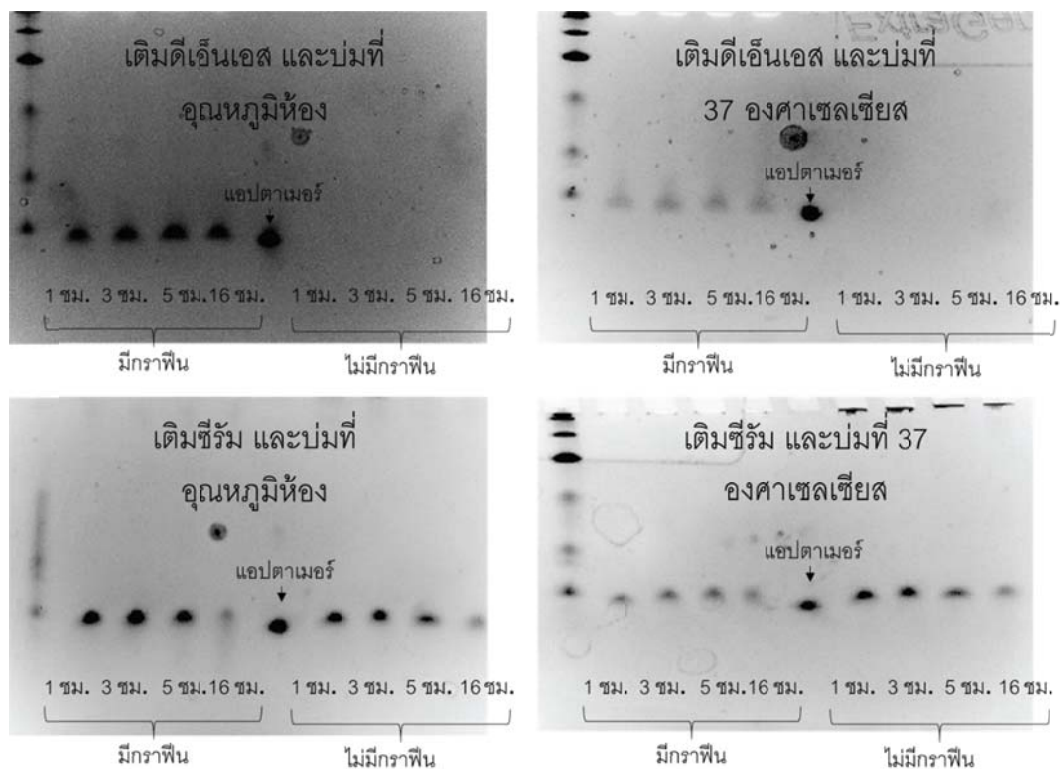
Q580	K557
K754	D562
K541	K545
S579	K560
K573	K529
	K402

โดย 64% ของกรดอะมิโนทั้งหมดใน ตารางที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย K545 K557 K574 K541 K573 เป็นตำแหน่งที่มีการเติมหมู่น้ำตาลบนโมเลกุลของโปรตีนอัลบูมิน (Zoellner และคณะ วารสาร Biochem Biophys Res Commun. Volume 281 หน้า 83-89 ปี 2001, Frolov และคณะ วารสาร Anal Bioanal Chem, Volume 397 หน้า 2349-2356 ปี 2010, Gadgil และคณะ วารสาร Anal Chem, Volume 79 หน้า 5991-5999 ปี 2007, Lapolla และคณะ วารสาร J Am Soc Mass Spectrom, Volume 15 หน้า 496-509 ปี 2004, Priego-Capote และคณะ วารสาร Mol Cell Proteomics Volume 9 หน้า 579-592 ปี 2010, Stefanowicz และคณะ วารสาร Anal Biochem, Volume 400 หน้า 237-243 ปี 2010, Barnaby และคณะ วารสาร Clin Chim Acta, Volume 411 หน้า 1102-1110 ปี 2010, Anguizola และคณะ วารสาร Anal Chem, Volume 85 หน้า 4453-4460 ปี 2013) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอปตาเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน มากกว่าโปรตีนอัลบูมินโดยทั่วไป

4. การพัฒนาแอปตาเมอร์ให้มีคุณภาพเหมาะสม และมีขนาดสั้นลง

ในการพัฒนาให้แอปตาเมอร์มีขนาดสั้นลง ได้ศึกษาและอธิบายไว้แล้วในหัวข้อที่เกี่ยวกับการหาตำแหน่งของแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย ดังนั้นในการศึกษาต่อมาคือการพัฒนาแอปตาเมอร์ให้มีคุณภาพที่เหมาะสม เนื่องจากแอปตาเมอร์ในโครงการนี้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งสามารถที่จะถูกทำลาย หรือถูกตัดได้ง่ายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอสที่ปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ซึ่งการพัฒนาแอปตาเมอร์ให้มีคุณภาพจะต้องทำให้แอปตาเมอร์มีความทนต่อเอนไซม์ดีเอ็นเอส ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการเก็บรักษา หรือในขั้นตอนการใช้แอปตาเมอร์ก็ตาม ในการพัฒนานี้ทีมวิจัยได้เลือกเอกราฟีนออกไซด์มาเป็นตัวคงสภาพของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เนื่องจากมีรายงานวิจัยหลายฉบับพบว่าเมื่อกราฟีนจับกับดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แล้ว จะป้องกันไม่ให้เอนไซม์ดีเอ็นเอสเข้าไปทำลายดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบว่าระบบแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความคงทนต่อสภาวะที่มีนิวคลีเอสได้เป็นระยะเวลานานเท่าใด โดยทำการทดสอบในสภาวะที่เติมเอนไซม์นิวคลีเอสความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสภาวะที่เติมซีรีมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

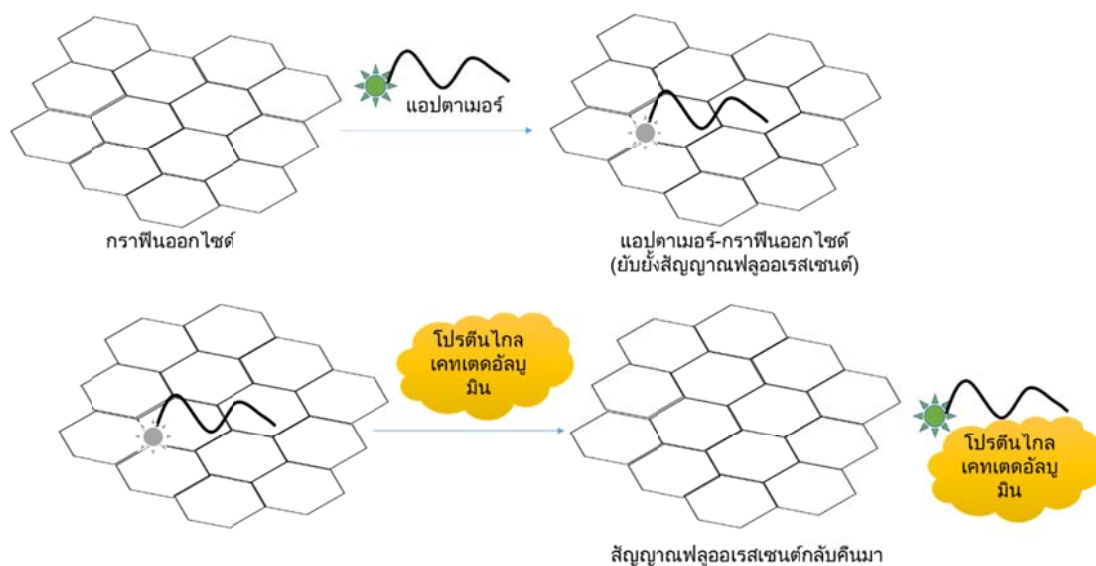
ผลการทดสอบได้แสดงในรูปที่ 5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อบ่มแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ ร่วมกับดีเอ็นเอสที่อุณหภูมิห้องหรือ อุณหภูมิ 37 °C จะป้องกันการย่อยของดีเอ็นเอสได้ถึง 16 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับแอปตาเมอร์ที่ไม่มีกราฟีน



รูปที่ 5: ผลการวิเคราะห์ความคงทนของแอปตาเมอร์ในสภาวะที่เติมเอนไซม์ดีเอ็นเอส และซีรัมของคน

5. การพัฒนากรรมวิธีในการตรวจวัดไกลเคตเตดอัลบูมินโดยใช้แอปตาเมอร์ ร่วมกับกราฟีนออกไซด์

เนื่องจากกราฟีนออกไซด์มีความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวและสามารถที่จะยับยั้งการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอนั้นๆได้ (Varghese และคณะ วารสาร Chemphyschem, Vol. 10, หน้า 206-210 ปี 2009, Liu และคณะ วารสาร ACS Nano, Vol. 8 หน้า 5564-5573 ปี 2014) ในการศึกษานี้ได้ใช้คุณสมบัติดังกล่าวของกราฟีนมาประยุกต์ใช้ โดยมีหลักการคือ การยับยั้งการส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของกราฟีนออกไซด์ เมื่อจับกับดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดสลากระหว่างฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน แอปตาเมอร์จะถูกปล่อยออกมาจากกราฟีนออกไซด์ แล้วมาจับกับโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน และส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อีกครั้ง (รูปที่ 6)

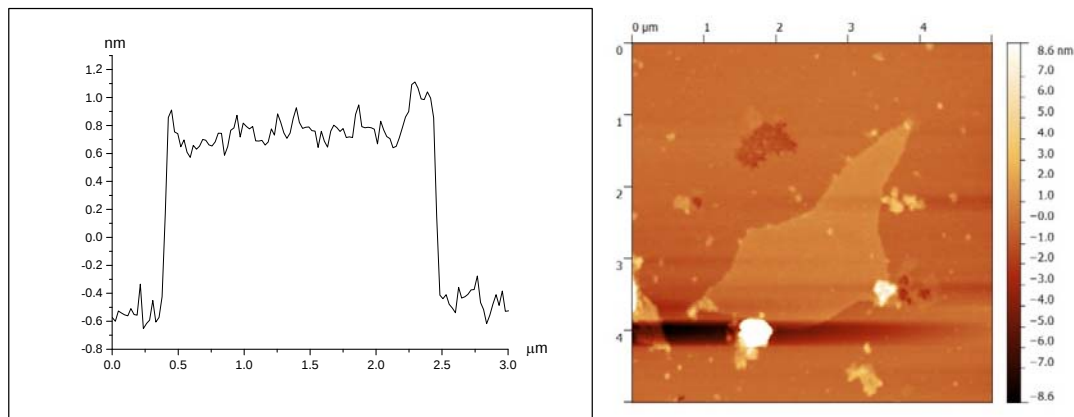


รูปที่ 6: หลักการวิเคราะห์โพรตีนไกลเคตเดอัลบูมินโดยใช้วิธี แอปตาเมอร์-กราไฟท์ออกไซด์

5.1 การสังเคราะห์ และวิเคราะห์กราไฟท์ออกไซด์

กราไฟท์ออกไซด์สังเคราะห์ได้จากขบวนการกัดและลอกโดยวิธีของ ฮัมเมอร์ (Hummer's method) ซึ่งเป็นขบวนการที่ลดแรงของพันธะแวนเดอร์วาลส์ (Van de Waals) ในระหว่างชั้นของกราฟไฟท์ จากนั้นนำกราไฟท์ออกไซด์ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีการกระเจิงแสงเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction หรือ XRD) โดยผลการทดสอบได้เส้นของ $2\theta = 10.2$ ซึ่งเป็นเส้นสะท้อนกลับ (Reflection) ที่ 001 และสามารถตีความได้ว่าช่องว่างขนาด 0.8 นาโนเมตรที่พบนั้นเป็นสัญญาณของหมู่ออกซิเจนที่อยู่ระหว่างช่องของกราไฟท์ออกไซด์และโมเลกุลของน้ำ

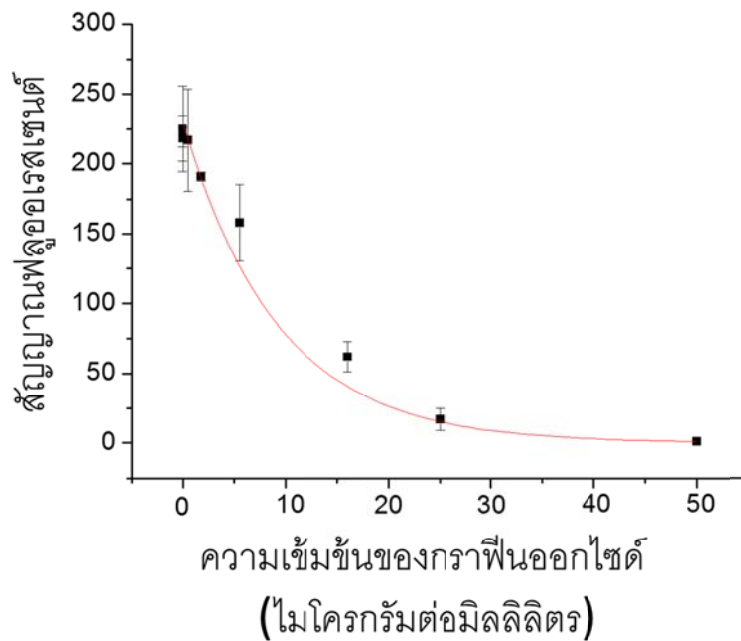
หลังจากนั้นได้นำกราไฟท์ออกไซด์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี FT-IR ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เส้นการสั่นสะเทือน โดยพบสัญญาณ (Broad peak) ที่ 3400 ต่อเซนติเมตร ซึ่งตรงกับผลของหมู่ O-H และความเข้มที่ 1712 ต่อเซนติเมตร ซึ่งตรงกับพันธะ C=O ซึ่งอยู่ในหมู่ของกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) และกลุ่มของคาร์บอนิล (Carbonyl group) อีกทั้งยังพบเส้นของพันธะ C-OH ที่ 1365 ต่อเซนติเมตร และเส้นของพันธะ C-O ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 1065 ต่อเซนติเมตร และเส้นที่อยู่ระหว่าง 1590-1620 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลกราไฟท์ออกไซด์มีการดูดซับโมเลกุลของน้ำด้วย นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์กราไฟท์ออกไซด์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscopy; AFM) โดยการเตรียมตัวอย่างในน้ำ และนำไปเคลือบบนแผ่นไมกา (mica) แล้ววิเคราะห์ขนาดของกราฟไฟท์ พบว่าโมเลกุลของกราไฟท์ออกไซด์มีความหนาอยู่ที่ 1.20 ± 0.20 นาโนเมตร และกว้าง 2 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งเป็นคุณสมบัติของกราไฟท์ออกไซด์แบบหนึ่งชั้น จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทั้งหมดที่กล่าวมาทำให้มั่นใจได้ว่า กราไฟท์ออกไซด์ที่ได้เป็นแบบชั้นเดียว และมีประสิทธิภาพดีเพียงพอในการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 7: ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AFM แสดงให้เห็นการเกิดกราฟีนออกไซด์แบบชั้นเดียว

5.2 การทดสอบการยับยั้งการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกราฟีนออกไซด์

การยับยั้งการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกราฟีนออกไซด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ในหัวข้อก่อนหน้านี้ ทดสอบโดยการติดสารฟลูออเรสเซนต์บนแอปตาเมอร์ที่ทำการปรับปรุงโครงสร้างแล้ว (G8 ที่ตัดนิวคลีโอไทด์ G ที่ปลาย 5' ออกไป 2 ตัว) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'./5Cy5/ TGC GGT TCG TGC GGT TGT AGT ACT CGT GGC CGA TAG AGG TAG TTT CG.3' จากนั้นนำไปบ่มรวมกับกราฟีนออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ ผลการทดสอบพบว่าแอปตาเมอร์ที่ติดด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Cy5 ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 219 ± 7.06 และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงเรื่อยๆเมื่อบ่มแอปตาเมอร์กับกราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.005-50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของแอปตาเมอร์เมื่อบ่มกับกราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรลดลงเหลือ 1.0 ± 0.07 ซึ่งมีค่าเท่ากับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของกราฟีนออกไซด์อย่างเดียว (1.0 ± 0.14) ซึ่งสามารถตีความได้ว่ากราฟีนออกไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของแอปตาเมอร์ที่ติดด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ได้ 100% ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป (รูปที่ 8)

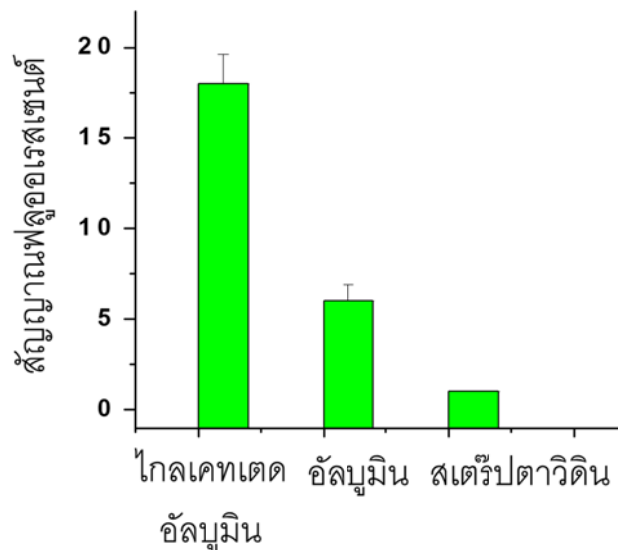


รูปที่ 8: กราฟแสดงการยับยั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ติดด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายกราฟีนออกไซด์ความเข้มข้น 0-50 $\mu\text{g/mL}$

5.3 การทดสอบความจำเพาะในการใช้ระบบแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ในการวิเคราะห์โปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน

เพื่อทดสอบว่าระบบแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ที่กำลังพัฒนาอยู่นี้ มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายจริงๆ จึงทำการทดสอบกับโปรตีน 3 ชนิดคือ ไกลเคทเตดอัลบูมิน อัลบูมิน และ สเตรีปตาวิดิน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการบ่มรวมโปรตีน 3 ชนิดนี้ร่วมกับสารละลายกราฟีนออกไซด์ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาลันที่ปริมาตรโดยรวม 200 μL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีก่อนการวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 630/670 nm (รูปที่ 9)

จากผลการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการทดสอบโปรตีน 3 ชนิดข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากไกลเคทเตดอัลบูมินมีระดับสูงกว่า โปรตีนอัลบูมินและสเตรีปตาวิดิน อย่างมีนัยสำคัญ นั่นแสดงให้เห็นว่าวิธี แอปตาเมอร์-กราฟีน ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน และมีโอกาสพัฒนาต่อเพื่อเป็นวิธีการตรวจไกลเคทเตดอัลบูมินแบบใหม่ที่สะดวก และรวดเร็ว



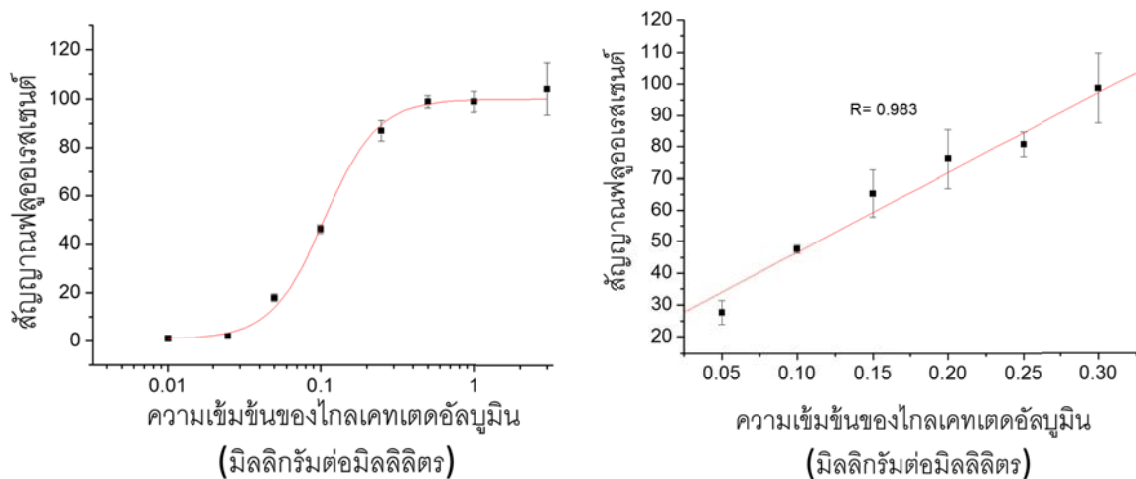
รูปที่ 9: ความจำเพาะของวิธี แอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ ที่พัฒนาขึ้นในคำขอนี้ ซึ่งมีความจำเพาะต่อไกลเคเทเตดอัลบูมิน และไม่จำเพาะต่อโปรตีนอัลบูมิน และสเตรปตาวิดิน

5.4 การวิเคราะห์โปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาลีน

หลังจากวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีน ได้ผ่านการทดสอบความจำเพาะจากที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อข้างต้น ลำดับถัดมาเป็นการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของไกลเคเทเตดอัลบูมินในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาลีน โดยความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินที่นำมาทดสอบคือ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.50, 1.0 และ 3.0 mg/mL จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มีค่าสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินมีค่าสูงขึ้น และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มีค่าสูงคงที่ ที่ความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินอยู่ระหว่าง 0.5-3.0 mg/mL และเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ ซึ่งให้ค่าฟลูออเรสเซนซ์อยู่ที่ 1.0 ± 0.14 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ค่ามากกว่าค่าที่ได้จากตัวควบคุม 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation หรือ SD) หรือที่เรียกว่า Limit of detection คือความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินที่ 0.05 mg/mL หรือ 50 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นค่าที่ดีกว่าชุดตรวจทางการค้า (Exocell) ที่พัฒนาโดยใช้แอนติบอดีถึง 2 เท่า จากผลการทดสอบยังพบอีกว่า ช่วงความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินที่เป็นไปได้ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วงประมาณ 0.05-0.30 mg/mL

เพื่อยืนยันช่วงความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ ตามคำขอนี้ จึงได้ทำการทดสอบเหมือนข้างต้นอีกครั้ง โดยทดสอบกับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน 7 ความเข้มข้นดังนี้ 0.0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 mg/mL หลังจากนั้นนำผลการทดสอบไปวิเคราะห์และเขียนกราฟเส้นตรงพร้อมทั้งคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ หรือ R square ซึ่งจากกราฟเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจที่ได้อยู่ที่ 0.983 (ดังแสดงในรูปที่ 10) ซึ่งถือว่าดีมาก

จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีแอปตามอร์-กราฟีนออกไซด์ ที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินในพอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินได้จริงโดยช่วงความเข้มข้นที่น่าเชื่อถือต้องอยู่ในช่วง 0.05-0.3 mg/mL

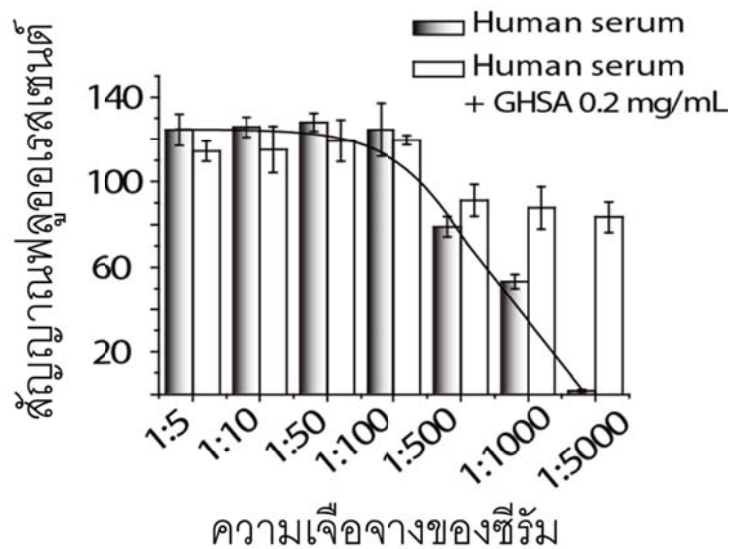


รูปที่ 10: รูปซ้ายเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไกลเคตเตดอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0.01-3 mg/mL ในสารละลายพอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน และรูปขวา เป็นกราฟเส้นตรงมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไกลเคตเตดอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0.05-0.30 mg/mL

5.5 การวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินในซีรัมของคนด้วยวิธีแอปตามอร์-กราฟีน

เนื่องจากโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินสามารถพบได้ในซีรัมของคนปกติทั่วไปด้วย ซึ่งอาจจะเกินค่ามาตรฐานที่จะสามารถวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเจือจางซีรัมเพื่อวิเคราะห์ว่าระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการตรวจวัดโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินในซีรัมของคนโดยใช้วิธีกราฟีนออกไซด์ ร่วมกับแอปตามอร์อยู่ที่ระดับใด

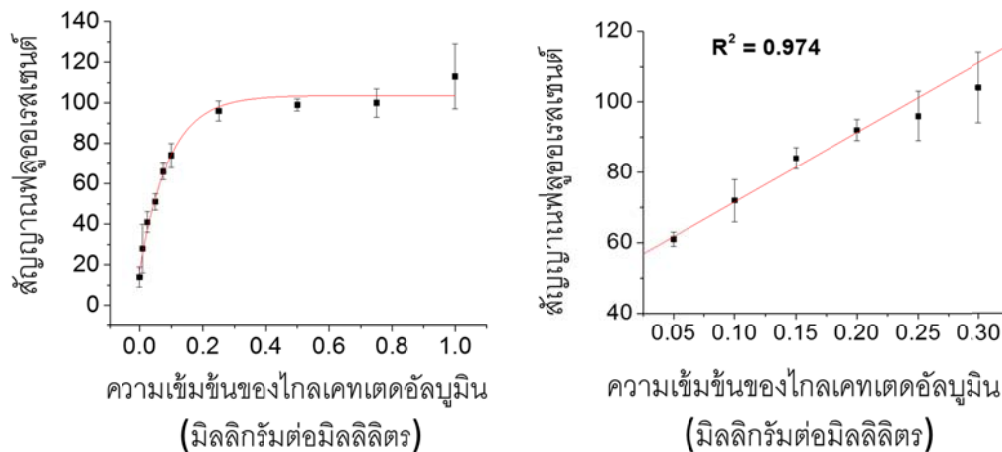
จากการวิเคราะห์ไกลเคตเตดอัลบูมินในซีรัมที่เจือจาง 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 และ 1:5000 พบว่าซีรัมเจือจาง 1:5, 1:10, 1:50 และ 1:100 ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในระดับที่สูงใกล้เคียงกัน ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐาน และที่ซีรัมเจือจาง 1:500, 1:1000 และ 1:5000 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เริ่มลดลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับความเจือจางของซีรัมที่สูงขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้จากการเติมไกลเคตเตดอัลบูมินเพิ่มลงไปในซีรัม ผลการทดสอบพบว่าระดับฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้นไปในซีรัมความเจือจาง 1:500, 1:1000 และ 1:5000 โดยที่ซีรัมเจือจาง 1:5000 ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการเติมโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน สูงกว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินเพิ่มเข้าไปอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นที่ซีรัมเจือจาง 1:5000 จึงมีความเหมาะสมในการนำไปทดสอบในขั้นถัดไป



รูปที่ 11: ผลการทดสอบการตรวจวัดโปรตีนไกลเคตเตดอลูมิเนียมในซีรัมที่มีการเติม และไม่เติมโปรตีนไกลเคตเตดอลูมิเนียม ในซีรัมเจือจางระดับต่างๆ

หลังจากการทดสอบหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมของซีรัมของคน จึงได้เลือกซีรัมเจือจาง 1:5000 มาทำการทดสอบต่อ เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Limit of detection) ของไกลเคตเตดอลูมิเนียม ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟิน จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มีค่าสูงขึ้นในซีรัมที่มีความเข้มข้นของ ไกลเคตเตดอลูมิเนียม อยู่ระหว่าง 0-0.3 mg/mL และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เริ่มจะสูงคงที่ ที่ความเข้มข้นของไกลเคตเตดอลูมิเนียม มากกว่า 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.3-1.0 mg/mL) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไกลเคตเตดอลูมิเนียม ที่ยังสามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.05 mg/mL

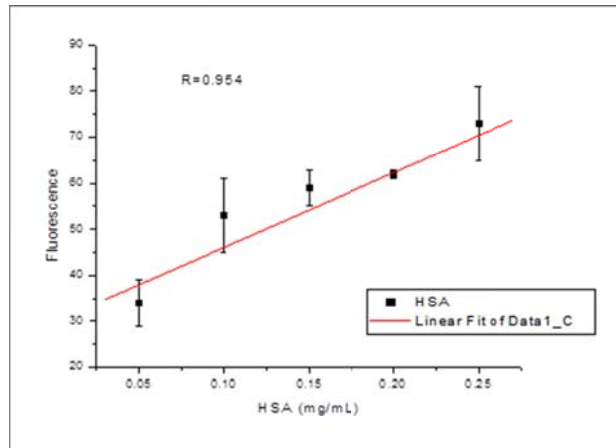
จากนั้นจึงได้ทำการทดสอบต่อ เพื่อหาช่วงค่ามาตรฐานความเข้มข้นของไกลเคตเตดอลูมิเนียมในซีรัม ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟิน จากผลการทดสอบพบว่า สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ กับความเข้มข้นของไกลเคตเตดอลูมิเนียมมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (โดยมีค่า R square เท่ากับ 0.974) โดยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอลูมิเนียมในซีรัมสูงขึ้น ดังแสดงใน **รูปที่ 12** ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจวัดไกลเคตเตดอลูมิเนียมในซีรัมได้ ในช่วง 0.05-0.3 mg/mL และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ที่ 0.05 mg/ml



รูปที่ 12: รูปซ้ายคือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไกลโคเตตอลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0.01-1 mg/mL ในตัวอย่างซีรัมของคน และ**รูปขวา** คือกราฟเส้นตรงมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไกลโคเตตอลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0.05-0.30 mg/mL

วิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอลูมิเนียมที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ ได้นำไปยื่นเป็นคำขออนุสิทธิบัตร หมายเลข 1403001740 ยื่นเมื่อวันที่ 23 ธันวาคม 2557 ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์คือ "กรรมวิธีการวัดปริมาณโปรตีนไกลโคเตตอลูมิเนียมโดยใช้สารละลายกราฟีนร่วมกับแอปตาเมอร์" ดังแสดงในเอกสารแนบหมายเลข 2

เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ไกลโคเตตอลูมิเนียมสามารถนำไปเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ HbA1C ซึ่งเป็นตัวติดตามภาวะเบาหวานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ทางคณะวิจัยจึงได้ประยุกต์ใช้เทคนิคแอปตาเมอร์-กราฟีน ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปตรวจวิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินปกติด้วย โดยการติดสลากรแอปตาเมอร์ H8 ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีนซีรัมอัลบูมินของคนด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Cy5 และนำไปบ่มรวมกับสารละลายกราฟีนออกไซด์เพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และนำคอมเพล็กซ์ดังกล่าวไปวิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินในตัวอย่างที่สนใจ ผลการทดสอบพบว่าวิธีดังกล่าวนี้สามารถวิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินได้ในช่วง 0.05-0.25 mg/mL ในซีรัมเจือจาง 1:5000 โดยผลการวิเคราะห์ได้แสดงในรูปที่ 13



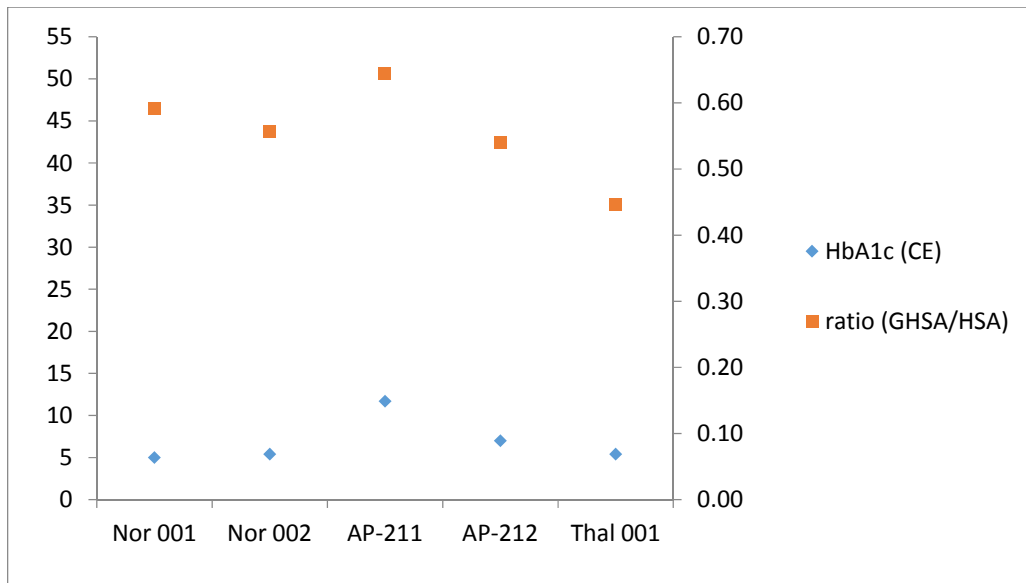
รูปที่ 13: กราฟเส้นตรงมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของ โปรตีนอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0.05-0.25 mg/mL ในซีรัมของคน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีแอปตาเมอร์ (H8)- กราฟีน

5.6 การวิเคราะห์โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยเบาหวาน

เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน ด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีนที่ พัฒนาขึ้นนี้ กับผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ HbA1C ในการศึกษาได้ทำการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นทั้ง โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน และโปรตีนอัลบูมิน เพื่อนำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน ดังนี้

$$\% \text{ไกลโคเตตอัลบูมิน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน}} \times 100$$

โดย %HbA1C ในคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวานที่นำมาทดสอบอยู่ระหว่าง 5.4-11.7 % หลังจากการ วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน และโปรตีนอัลบูมินด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีน ออกไซด์แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์ค่า %ไกลโคเตตอัลบูมินด้วยสมการข้างต้น



รูปที่ 14: กราฟแสดงค่า %ไกลเคเทตอัลบูมิน เทียบกับ %HbA1C ในซีรัมของคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 6 ตัวอย่าง

จากผลการทดสอบพบว่า %ไกลเคเทตอัลบูมินมีค่าอยู่ระหว่าง 35-54 % และ %ไกลเคเทตอัลบูมินมีค่าสูง ในตัวอย่างซีรัมที่มีค่า %HbA1C สูงดังแสดงในรูปที่ 14 นั้นแสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวัดไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟิน นี้มีโอกาสพัฒนาเป็นชุดตรวจไกลเคเทตอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวานได้ในอนาคต

5.7 เปรียบเทียบกรรมวิธีการตรวจไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธีที่พัฒนาในโครงการนี้ กับชุดตรวจจากบริษัท Exocell

เนื่องจากบริษัท Exocell ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาชุดตรวจไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธี ELISA และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไกลเคเทตอัลบูมินเป็นตัวตรวจจับ โดยระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบประมาณ 1-2 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากกรรมวิธีการตรวจวัดไกลเคเทตอัลบูมินที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาทีเท่านั้น โดยต้นแบบที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการในโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย (1) สารละลายกราฟีนออกไซด์ (2) สารละลายแอปตาเมอร์ที่ติดด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ (3) เพลทสีดำ (4) เครื่องฟลูออโรมิเตอร์ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15: รูปภาพแสดงต้นแบบกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์โลหะเตดอลูมิเนียมที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการในโครงการวิจัยนี้ซึ่งประกอบด้วย (1) สารละลายกราฟีนออกไซด์ (2) สารละลายแอปตาเมอร์ที่ติดด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ (3) เพลทสีดำ (4) เครื่องฟลูออโรมิเตอร์

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของกรรมวิธีการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ กับชุดตรวจจากบริษัท Exocell พบว่ากรรมวิธีการตรวจวัดจากโครงการนี้ มีความไวมากกว่าชุดตรวจจากบริษัท Exocell ถึง 2 เท่า และระยะเวลาในการตรวจวัดก็สั้นกว่าประมาณ 12-24 เท่า อีกทั้งยังมีความแม่นยำ (CV) มากกว่าด้วย ดังแสดงในตารางที่ 5 อย่างไรก็ตามช่วงที่วิเคราะห์ได้ของกรรมวิธีที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ยังอยู่ในช่วงที่สั้นกว่า จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเพื่อให้ได้ช่วงที่กว้างขึ้นต่อไป

ตารางที่ 5: เปรียบเทียบคุณสมบัติของชุดตรวจ Exocell กับ แอปตาเมอร์-กราฟีน

	Exocell	แอปตาเมอร์-กราฟีน
ตัวอย่าง	พลาสมา หรือ ซีรัม	พลาสมา หรือ ซีรัม
ช่วงที่วิเคราะห์ได้	0.1-3 mg/mL	0.05-0.3 mg/mL
ความไว	0.1 mg/ml	0.05 mg/mL
ความแม่นยำ (CV)	<10	<8
ระยะเวลาในการทดสอบ	1-2 ชม	30 นาที

แผนการปฏิบัติงานในอนาคต

เนื่องจากกรรมวิธีการตรวจวัดไกลเคเทดอัลบูมินที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ ให้ผลการทดสอบที่ดี และน่าเชื่อถือในระดับห้องปฏิบัติการ (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 1403001740 ยื่นเมื่อวันที่ 23 ธันวาคม 2557) และสามารถทดสอบได้ทั้งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน และตัวอย่างซีรัมจริงของคน อีกทั้งยังใช้เวลาในการทดสอบน้อยแค่ 5 นาที วิธีการทดสอบดังกล่าวนี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อให้มีความเหมาะสมที่จะทดสอบภาคสนาม ตามโรงพยาบาล หรือสถาบันสาธารณสุขต่างๆ ในแผนงานวิจัยในปีที่ 2 นี้ ทางคณะผู้วิจัยจึงจะทำการพัฒนากรรมวิธีการตรวจวัดไกลเคเทดอัลบูมินแบบแอปตาเมอร์-กราฟิน นี้ให้เป็นแบบชนิดพกพา (Portable glycated albumin detection) ซึ่งในเครื่องตรวจไกลเคเทดอัลบูมินนี้ จะมีการรวมส่วนของการเจือจางซีรัม และโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณค่า %ไกลเคเทดอัลบูมิน เพื่อแสดงผลเป็นตัวเลขบนหน้าจอสัมผัสด้วย ในขณะเดียวกันจะมีการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือดังกล่าวในภาคสนามด้วย

รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 2: การพัฒนาการวัดโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน โดยวิธี Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และติดตามผู้ป่วยเบาหวาน (Development of Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay for Glycated Albumin detection for diabetes monitoring)

ผู้ร่วมงานวิจัย: 1. ศ.ดร.พญ. ชารารัตน์ ชารากุล
2. นางสาว ไอริน กาญจนทวี

ความก้าวหน้าในการดำเนินงาน:

1. สังเคราะห์แอปตาเมอร์และเตรียมแอนติบอดีบริสุทธิ์

การศึกษาในช่วง 6 เดือนหลังนี้ได้ปรับปรุงแอปตาเมอร์ G8 ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินต่อเนื่องในการพัฒนาวิธีการทดสอบ เพื่อให้มีความสามารถดีขึ้นในการจับกับเป้าหมายที่ต้องการโดยการสังเคราะห์แอปตาเมอร์รูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบบที่ติดฉลากปลายด้าน 5' ด้วย biotin และแบบที่เพิ่มตัวเชื่อม(spacer) ระหว่าง แอปตาเมอร์ที่ปลายด้าน 5' กับ biotin โดยได้เปรียบเทียบตัวเชื่อม 2 ชนิดคือ แบบที่มี T 20 หน่วย และแบบที่มี T 5 ตัวต่อด้วย Ethylene Glycol อีก 6 หน่วย (G8-20T-5'Biotin และ G8-5T-6EG-5'Biotin) นอกจากนั้นได้ทำการศึกษารูปแบบเดียวกันกับแอปตาเมอร์ H8 ที่มี ความจำเพาะต่ออัลบูมิน ซึ่งได้จากโครงการย่อยที่หนึ่งควบคู่กันไปด้วย

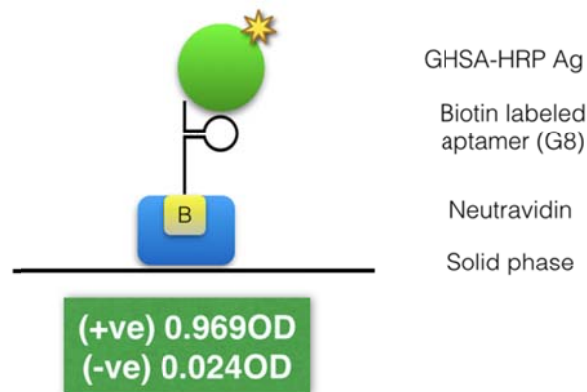
ส่วนแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษา ได้ซื้อแอนติบอดี A717 มาเพื่อทำการทดลองเปรียบเทียบในปฏิกิริยา ELISA

2. พัฒนารูปแบบของการทดสอบ (assay format) โดยใช้แอปตาเมอร์ต่อไกลเคตเตดอัลบูมินเป็นตัว capture ร่วมกับการใช้แอปตาเมอร์หรือแอนติบอดีต่ออัลบูมินเป็นตัว detect และทดสอบโดยใช้สารอัลบูมินและไกลเคตเตดอัลบูมินมาตรฐาน จะคัดเลือกคู่ที่เหมาะสมที่สุด อย่างน้อย 1 คู่สำหรับไกลเคตเตดอัลบูมิน และอีก 1 คู่สำหรับอัลบูมิน

กิจกรรมข้อนี้เป็นกิจกรรมหลักของโครงการวิจัยโครงการย่อยที่ 2 โดยในช่วง 6 เดือนหลังของโครงการได้ทำการการ พัฒนารูปแบบของการทดสอบแบบ ALISA อย่างต่อเนื่องโดยได้ทำการศึกษาดังนี้คือ

2.1 ทดสอบใช้ Neutravidin เป็นตัว capture ก่อนเติมแอปตาเมอร์ ที่มี biotin ที่ปลาย 5' แล้ว detect ด้วย แอนติเจนที่ติดฉลากเอนไซม์ HRP

ในการทดลองนี้ทำให้แอปตาเมอร์อยู่บน solid phase แบบมี orientation โดยอาศัยคุณสมบัติของ biotin ที่ปลายด้าน 5' ของแอปตาเมอร์ จับกับ Neutravidin และเมื่อเติม แอนติเจนคือโปรตีนไกลเคทเตดซีรัมอัลบูมินที่ติดฉลากเอนไซม์ HRP พบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณได้ (ดังรูป)

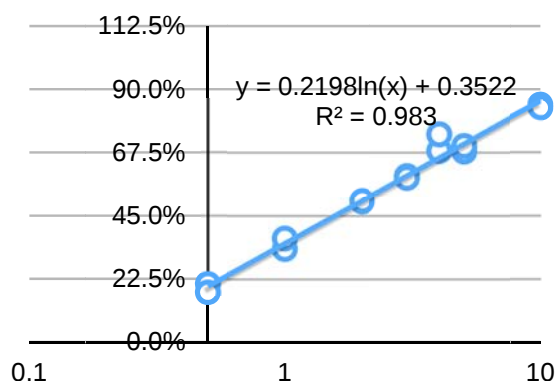


ต่อมาจึงปรับปรุงให้แอปตาเมอร์มีความยาวเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่ม spacer พบว่าแอปตาเมอร์ที่มี 20T spacer ให้ผลดีที่สุด จึงได้เลือกใช้ spacer แบบนี้ในการศึกษาต่อ โดยได้ทำการ optimization ส่วนประกอบแต่ละส่วน จนได้สภาวะที่เป็นที่น่าพอใจ

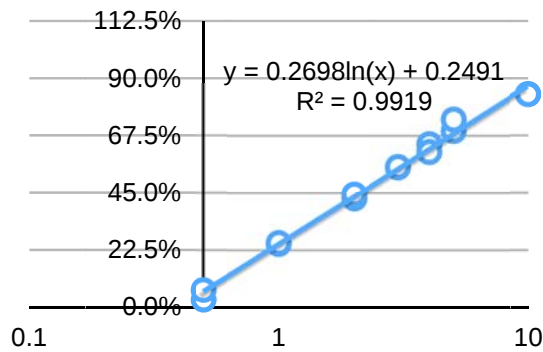
2.2 พัฒนาการตรวจวัดปริมาณไกลเคทเตดอัลบูมินโดยใช้แอปตาเมอร์ G8 ด้วยวิธี competitive assay

หลักการคือใช้ไกลเคทเตดอัลบูมินมาตรฐานที่ทราบปริมาณ (mg/ml) แข่งจับกับไกลเคทเตดอัลบูมินที่ติดฉลาก HRP สัญญาณที่ได้จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณตัวแย่งจับโดยได้ค่าที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังรูป พบว่า assay format ที่ได้นี้สามารถวัดปริมาณไกลเคทเตดอัลบูมินมาตรฐานได้ในช่วง 0.05-10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

G8



H8



หลังจากนั้นเมื่อแทนที่สารมาตรฐานด้วยซีรัมที่เจือจาง แล้วคำนวณค่าเป็นปริมาณโปรตีนไกลโคเตตเตดอัลบูมิน จากสูตร จะได้เป็นค่าไกลโคเตตเตดอัลบูมินในซีรัม

วิธีแบบเดียวกัน ทดสอบโดยใช้แอปตาเมอร์ H8 จะได้ค่าของอัลบูมินรวม สามารถนำมาคำนวณเป็นสัดส่วนของไกลโคเตตเตดอัลบูมินต่ออัลบูมินรวมได้

จากการทดสอบในตัวอย่างซีรัมจำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าได้ผลดังนี้

1. HbA1c 8.2 % G8=4.6mg/ml H8=7.5mg/ml
2. HbA1c 8.2% G8=4.5 mg/ml H8=9.4mg/ml
3. HbA1c 4.4% G8=1.1 mg/ml H8=3.8mg/ml
4. HbA1c 4.4% G8=2.4 mg/ml H8=9.0mg/ml

สรุป ผลการดำเนินงานของโครงการวิจัยย่อยนี้ สามารถพัฒนารูปแบบของวิธีตรวจวัดปริมาณไกลโคเตตเตดอัลบูมินในซีรัมได้ โดยใช้แอปตาเมอร์ G8 และ H8 ตามลำดับ และได้แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นว่าสามารถใช้ตรวจหาปริมาณไกลโคเตตเตดอัลบูมินในซีรัมได้ อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องปรับสภาวะในการทดสอบให้นิ่งมากกว่านี้ก่อนจะนำไปทดสอบในซีรัมผู้ป่วยจำนวนมาก

3. เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อใช้ในการศึกษา หลังจากได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในคน

โครงการนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน เมื่อวันที่ 13 สิงหาคม พ.ศ.2557 และคณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างซีรัมจำนวน 200 ตัวอย่างครบตามที่ระบุในข้อเสนอโครงการแล้ว

ตัวอย่างดังกล่าวประกอบด้วย ซีรัมจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จำนวน 38 ผู้ที่เป็นพาหะ จำนวน 18 และผู้ที่มีฮีโมโกลบินปกติ จำนวน 86 และผู้ป่วยเบาหวาน 58 คน ตัวอย่างทั้งหมดได้ทราบผลการศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินและผลการตรวจวัด HbA1c แล้ว

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากโครงการนี้มีความล่าช้ากว่าแผน ดังนั้นในรายงานฉบับนี้จึงยังไม่ได้ทำการตรวจวัดไกลเซตเตดอัลบูมินในกลุ่มคนไข้เบาหวาน เทียบกับกลุ่มควบคุม รวมทั้งกลุ่มที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับฮีโมโกลบินด้วย ตามที่เสนอไว้

รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 3: การพัฒนาวิธีการตรวจโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า
(Development of Electrochemical Aptasensor for Glycated Albumin)

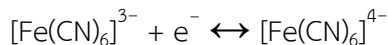
ผู้ร่วมงานวิจัย: 1. ดร. ศศิณี บุญยรัตพันธุ์
2. ดร. เดือนเพ็ญ จาปรุง
3. นางสาว ลลิตา มรุเศรษฐ์

ความก้าวหน้าในการดำเนินงาน

1. ศึกษาความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติของข้อเสนอ

ผลการศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีการตรวจโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์ พบว่าสามารถตรวจวัดโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินได้ ในส่วนของแอปตาเมอร์ ได้ใช้แอปตาเมอร์ที่มีขนาด 23 เบส ที่ชื่อว่า 5del11and3del15 ซึ่งพัฒนามาจากโครงการวิจัยย่อยที่1 ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าสามารถจับได้แบบจำเพาะกับโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และยืนยันโดยการใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ โดยมีการออกแบบวิธีการตรวจดังนี้ การติดแอปตาเมอร์ลงบนพื้นผิวขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่เคลือบด้วยสเตรปตาวิดินและมีเอธานอลามีนปิดทับ ซึ่งใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมเพอร์ไอโธไซยาไนด์ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และให้สัญญาณในการตรวจวัดปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า

รูปที่ 1 แสดงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน แบบ 3 ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการประดิษฐ์นี้ มีขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าเคาน์เตอร์ ทำจากคาร์บอน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงทำจากซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ การออกแบบการสร้างแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้าที่ใช้ตรวจจับโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน นี้ถูกแสดงในรูปที่ 2 ที่ประกอบด้วยการตรึงแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนที่เคลือบด้วยสเตรปตาวิดิน การจับของไบโอตินบนแอปตาเมอร์ และสเตรปตาวิตินบนขั้วไฟฟ้า ถือเป็นหนึ่งในปฏิสัมพันธ์ชนิดที่ไม่ใช่โคเวเลนต์ (non-covalent interaction) ที่แข็งแกร่งที่สุดที่รู้จักกันในธรรมชาติ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง ทำให้แอปตาเมอร์สามารถติดอยู่บนขั้วไฟฟ้าไม่หลุดง่าย มีการเรียงตัวเป็นระเบียบในทิศทางเดียวกัน ทำให้สามารถเอื้อต่อการทำงานของแอปตาเมอร์ในการจับโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ในขั้นตอนการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ของการประดิษฐ์นี้ เป็นการใช้เพอร์ไอโธไซยาไนด์อ็อกซิไดซ์ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ เป็นตัวที่ให้สัญญาณในการตรวจวัดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox probe) ที่เกิดจากการแตกตัวเป็นอิเล็กตรอนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และยอมให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านขั้วไฟฟ้าได้ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าด้วยเครื่องโพเทนชิโอสแตต เพอร์ไอโธไซยาไนด์อ็อกซิไดซ์จะถูกรีดิวซ์ เป็น เพอร์ไอโธไซยาไนด์รีดิวซ์ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ซึ่งปฏิกิริยารีดอกซ์คู่นี้สามารถย้อนกลับได้ ดังนี้

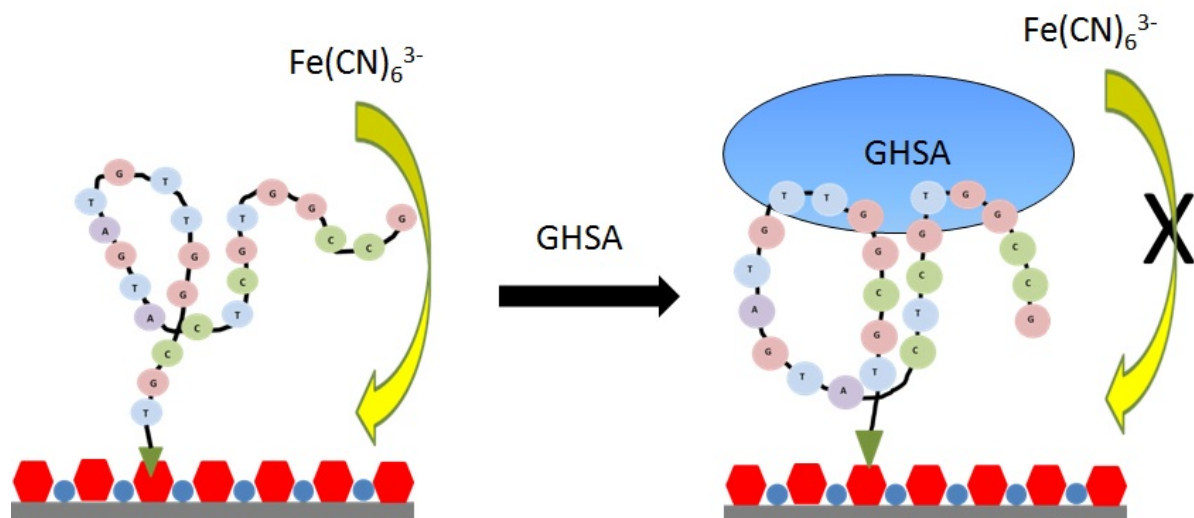


วิธีการตรวจวัดสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน ที่ถูกจับโดยแอนติบอดี ผ่านการวัดสัญญาณเคมีไฟฟ้าที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนผ่านขั้วไฟฟ้า ได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า 2 เทคนิค คือ 1). เทคนิคสแควเวฟ โวลแทมเมทรี (Square Wave Voltametry; SWV) เป็นการวัดกระแสไฟฟ้า เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าแกว่งจร โดยสัญญาณจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าลดลงเมื่อมีการจับโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน และ 2). เทคนิควิเคราะห์สเปกตรัมของอิมพีแดนซ์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) เป็นการวัดความต้านทาน ในวงจรกระแสสลับ (AC) หลังจากการให้ความต่างศักย์แกว่งจรไฟฟ้า ซึ่งสัญญาณจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการจับกับโปรตีนเป้าหมาย สัญญาณที่วัดได้จากทั้งสองเทคนิคนี้ อยู่ในรูปแบบตัวเลข ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผล

เมื่อนำชุดตรวจนี้มาทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน พบว่า ค่ากระแสไฟฟ้าลดลง เมื่อวัดด้วยเทคนิค SWV และค่าอิมพีแดนซ์เพิ่มขึ้น เมื่อวัดด้วยเทคนิค EIS ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่เป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งให้ค่ากระแสไฟฟ้าและค่าอิมพีแดนซ์คงที่ดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6 เมื่อวัดด้วยเทคนิค SWV และ EIS ตามลำดับ

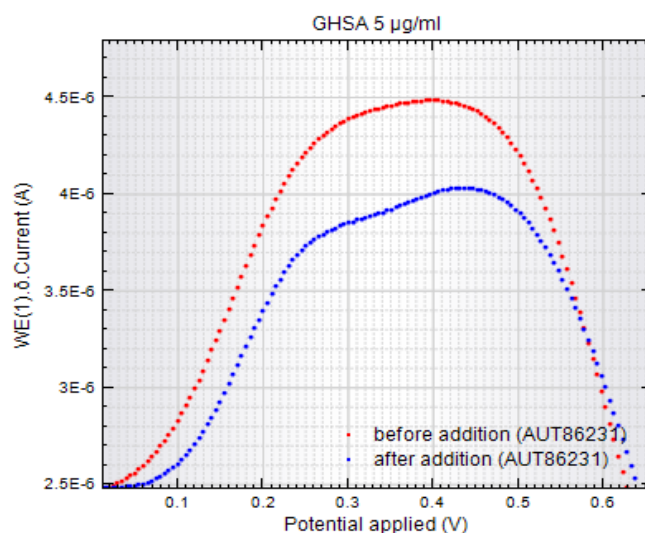


รูปที่ 1 แสดงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแบบ 3 ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการประดิษฐ์นี้. ขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าแคโทด ทำจากคาร์บอน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงทำจากซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ มีขนาดกว้าง 1.3 เซนติเมตร, ยาว 3.2 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางของขั้วไฟฟ้าทำงาน 2.5 มิลลิเมตร

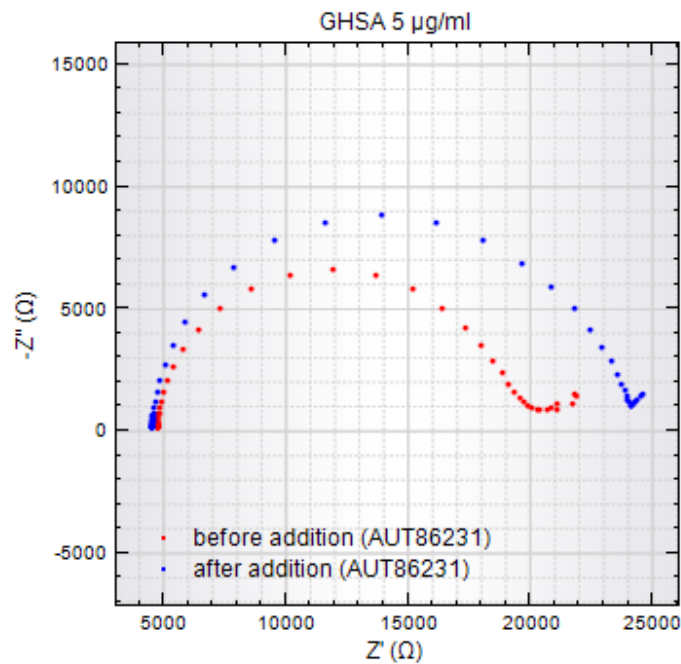


รูปที่ 2 แสดงการออกแบบการสร้างแอปตะเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้ตรวจจับไกลเคทเตด อัลบูมิน ในการ ประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยการตรึงแอปตาเมอร์บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนที่ถูกเคลือบด้วยสเตรปตาวิดิน

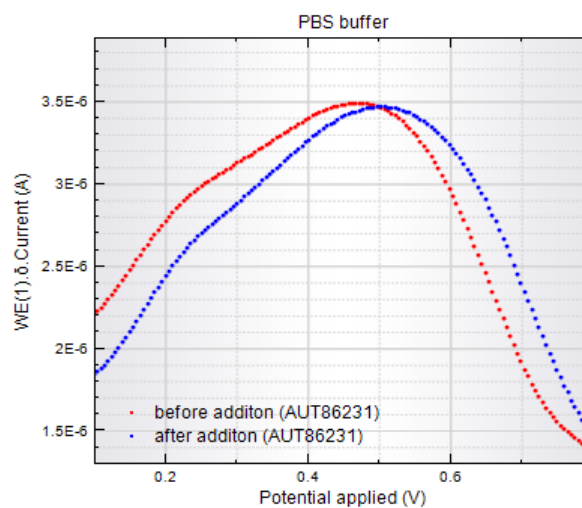
 แอปตาเมอร์ที่มีไบโอติน,
  ขั้วไฟฟ้าทำงานคาร์บอน,
  สเตรปตาวิดิน,
  ตัวบล็อก



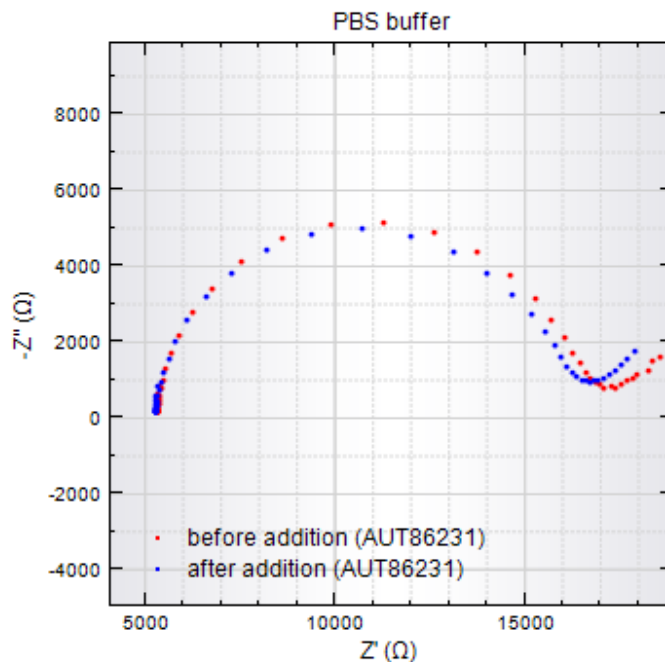
รูปที่ 3 กราฟแสดงการตอบสนองของชุดตรวจ ปริมาณโปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมินโดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าร่วมกับ แอปตาเมอร์ โดยการวัดด้วยเทคนิค SWV สำหรับการตรวจวัดที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมินใน 1x PBS บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)



รูปที่ 4 กราฟแสดงการตอบสนองของชุดตรวจ ปริมาณโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินโดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าร่วมกับ แอปตาเมอร์ โดยการวัดด้วยเทคนิค EIS สำหรับการตรวจวัดที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีน ไกลเคเทเตดอัลบูมินใน 1x PBS บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)



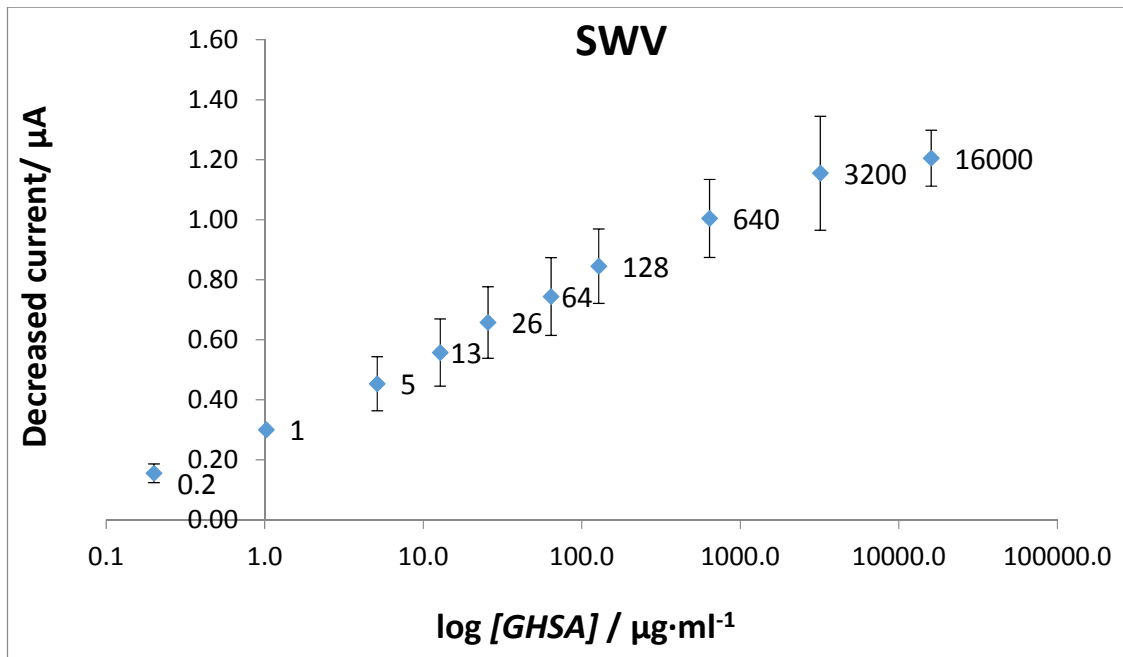
รูปที่ 5 กราฟแสดงการตอบสนองของชุดตรวจ ปริมาณโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินโดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าร่วมกับ แอปตาเมอร์ โดยการวัดด้วยเทคนิค SWV สำหรับการตรวจวัด 1x PBS บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)



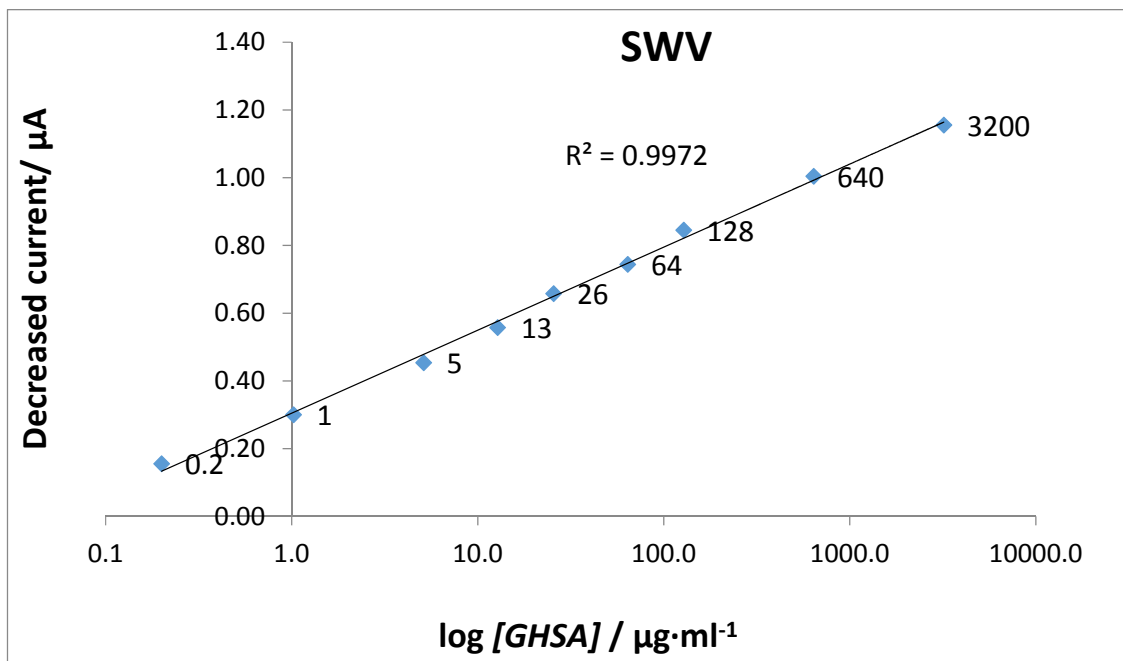
รูปที่ 6 กราฟแสดงการตอบสนองของชุดตรวจ ปริมาณโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินโดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าร่วมกับ แอปตาเมอร์ โดยการวัดด้วยเทคนิค EIS สำหรับการตรวจวัด 1x PBS บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนควมคุม ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

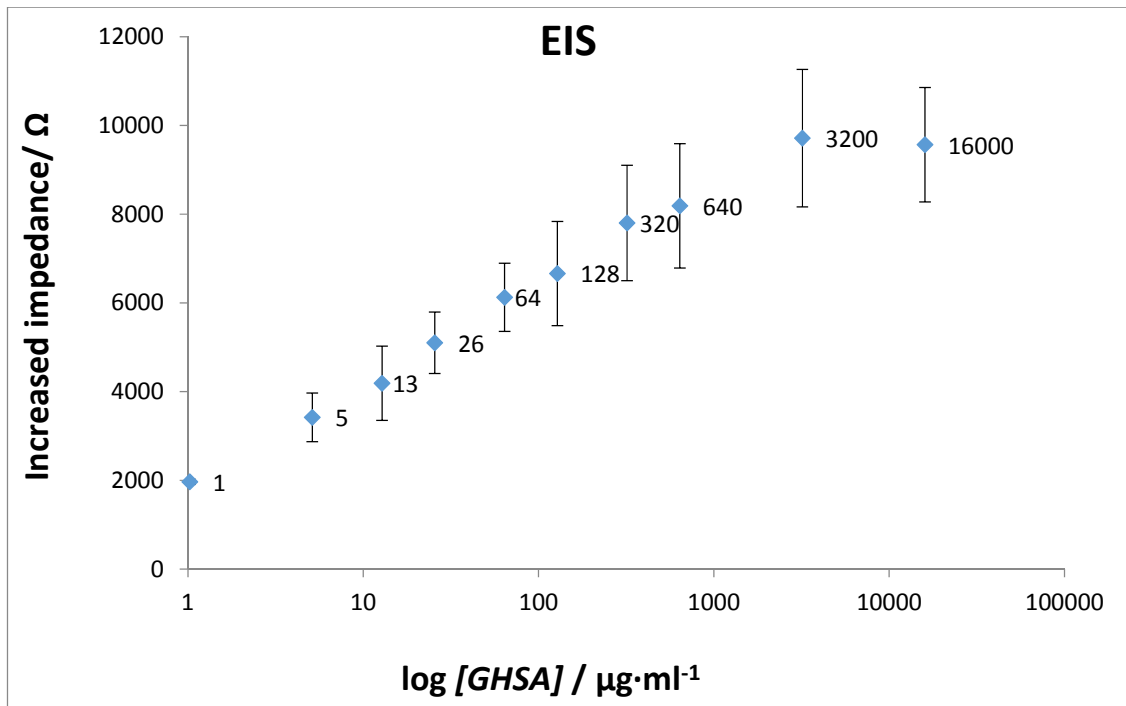
มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนควมคุม ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้านี้ เพื่อให้มีความไวที่เพิ่มขึ้นโดยได้ทำการปรับค่าพารามิเตอร์ต่างๆเหล่านี้ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอธานอลามีน, ชนิดและความเข้มข้นของแอปตาเมอร์, ชนิดของบัฟเฟอร์, และเทคนิคที่ใช้วัด หลังจากนั้น ได้ใช้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆเหล่านี้ ในตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน ที่ความเข้มข้นต่างๆและนำค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง และค่าอิมพีแดนซ์ที่เพิ่มขึ้น นี้มาวิเคราะห์ผล โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน กับค่าที่วัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า SWV และ EIS พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินเพิ่มขึ้น ค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงจากการวัดด้วยเทคนิค SWV จะมากขึ้น ค่าอิมพีแดนซ์ที่เพิ่มขึ้นจากการวัดด้วยเทคนิค EIS ก็จะมีมากขึ้นด้วย ซึ่งการวัดด้วยทั้งสองเทคนิค ให้ค่าทางไฟฟ้าที่แสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรง โดยการตรวจวัดด้วยเทคนิค SWV ค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง กับโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8 และการตรวจวัดด้วยเทคนิค EIS ค่าอิมพีแดนซ์ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง กับโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน ตั้งแต่ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10. ขีด จำกัด ของการตรวจสอบ (Limit of detection) ที่คำนวณได้คือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สัญญาณที่วัดได้ / สัญญาณพื้นหลัง = 3) ซึ่งดีกว่า วิธีการที่ได้รายงานมาก่อนหน้านี้



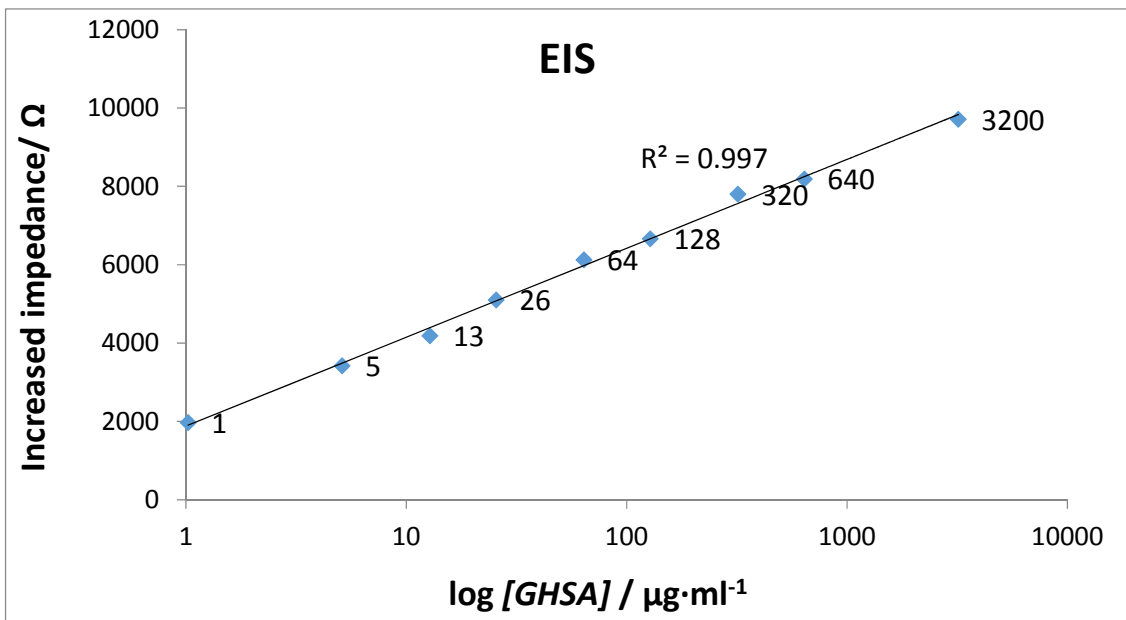
รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคทเตด อัลบูมิน พร้อมค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคทเตด อัลบูมิน พร้อมค่าความผันแปรของตัวแปรตอบสนอง (R^2)

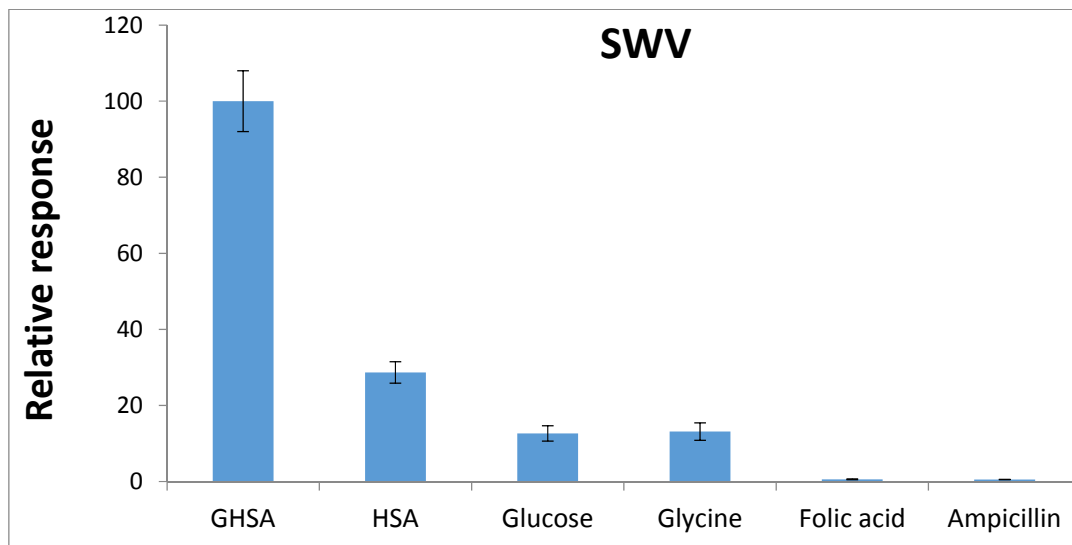


รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอิมพีแดนซ์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งวัดโดยเทคนิค EIS และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน พร้อมค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

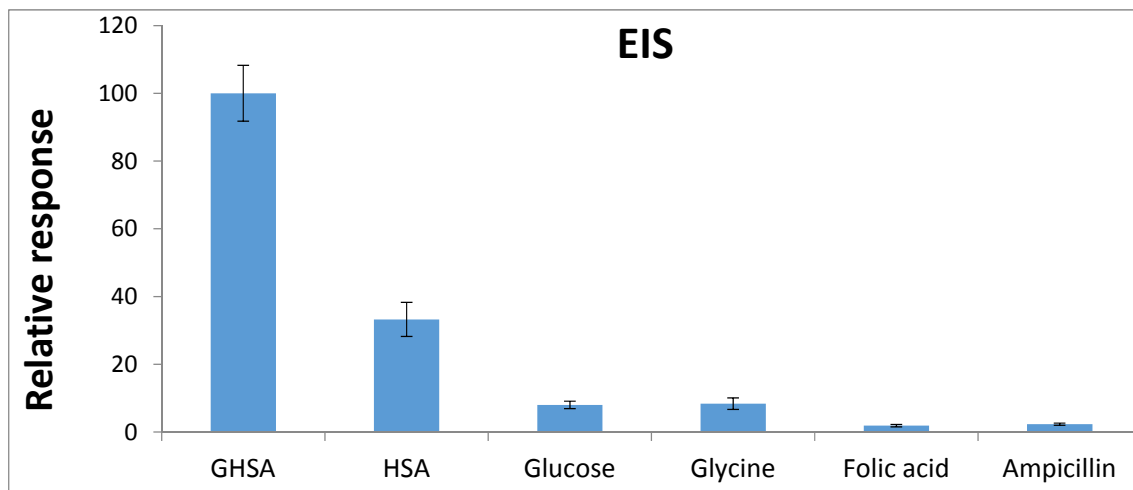


รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่าอิมพีแดนซ์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งวัดโดยเทคนิค EIS และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตต อัลบูมิน พร้อมค่าความผันแปรของตัวแปรตอบสนอง (R^2)

หลังจากทดสอบความจำเพาะของ ดีเอ็นเอแอสเทเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่ออกแบบนี้ กับโมเลกุลที่มีในเลือด ได้แก่ โปรตีนอัลบูมิน, กรดอะมิโนไกลซีน, น้ำตาลกลูโคส, กรดโฟลิก (วิตามินชนิดหนึ่งในกลุ่มที่ละลายในน้ำ), ยาแอมพิซิลลิน พบว่า สัญญาณเคมีไฟฟ้าจากไกลโคเตทอัลบูมิน มีระดับสูงกว่าโปรตีนอัลบูมิน (ซึ่งเป็นโปรตีน ที่ถูกพบมากที่สุดในเลือด โดยคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 60% ของโปรตีนทั้งหมด) และกรดอะมิโนไกลซีน, น้ำตาลกลูโคส, กรดโฟลิก, ยาแอมพิซิลลิน อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12 จากผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแอสตาเมอร์ที่ตรึงอยู่บนขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปลงนี้ มีการจับที่จำเพาะกับโปรตีนไกลโคเตท อัลบูมิน



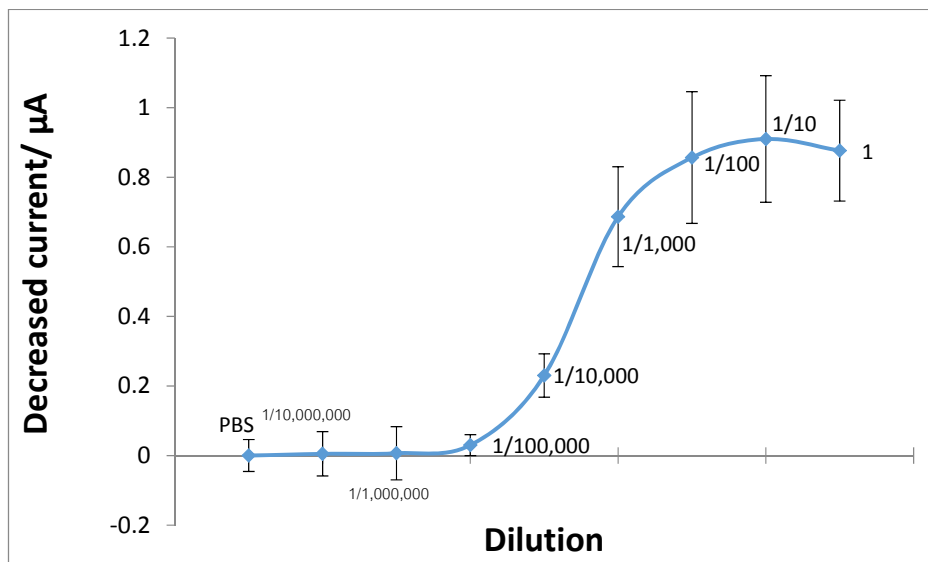
รูปที่ 11 กราฟแท่งแสดงการตอบสนองต่อชีวโมเลกุลอื่นๆที่มีในเลือดของ แอสเตเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV



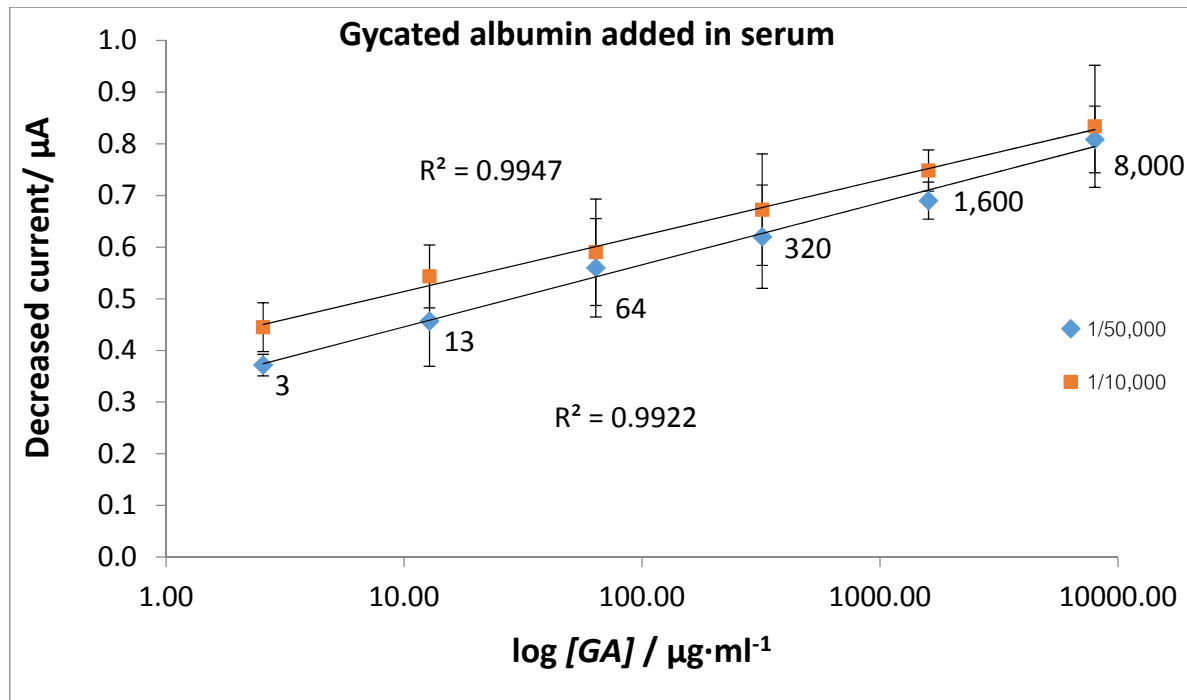
รูปที่ 12 กราฟแท่งแสดงการตอบสนองต่อชีวโมเลกุลอื่นๆที่มีในเลือดของ แอสเตเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ซึ่งวัดโดยเทคนิค EIS

3. ทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ในการวิเคราะห์โปรตีนไกลโคเตตซีรัมอัลบูมิน

เพื่อประเมินความสามารถในการนำแอปตะเซนเซอร์เคมีไฟฟ้าไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพ แอปตะเซนเซอร์นี้จึงถูกใช้ตรวจวัดโปรตีนไกลโคเตตซีรัมอัลบูมินในตัวอย่างซีรัมของคนโดยเทคนิค SWV การศึกษาเบื้องต้นถูกทำเพื่อหาการเจือจางซีรัมของคนที่เหมาะสมในการใช้ตรวจวัดโปรตีนไกลโคเตตซีรัมอัลบูมิน โดยวัดค่ากระแสไฟฟ้าของตัวอย่างซีรัมของคนที่ถูกเจือจาง ซึ่งพบว่าค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงและระดับการเจือจางซีรัมของคน มีความสัมพันธ์กันแบบซิกมอยดอล (sigmoidal curve, รูปที่ 13) ดังนั้นระดับการเจือจางของซีรัมในช่วงที่ให้ค่าความแตกต่างของกระแสไฟฟ้า (1:5,000, 1:10,000, 1:50,000, และ 1:100,000) ถูกนำมาเติมโปรตีนไกลโคเตตซีรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้นต่างกัน (3, 13, 64, 320, 1600, 8000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้า ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเจือจางตัวอย่างซีรัมของคน 1:10,000 และ 1:50,000 ให้ความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนโดยตรง ($R^2 = 0.99$) ของปริมาณโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินที่เติมในซีรัม และค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางซีรัมของคน และค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง ของแอปตะเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนไกลเคตเตดซีรัมอัลบูมินที่เติมลงในซีรัมของคน และค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง ของแอมป์เตเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV

- ความระดับการเจือจางซีรัมของคนที่ 1:10,000
- ◆ ความระดับการเจือจางซีรัมของคนที่ 1:50,000

ผลการศึกษาดังที่กล่าวมานี้ได้ถูกจดอนุสิทธิบัตรเมื่อวันที่ 1 พฤษภาคม 2558 โดยมีเลขที่คำขอ 1503000656 (คำขอรับอนุสิทธิบัตร แสดงในเอกสารแนบ) ในชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ “แอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน และชุดตรวจวัดโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน โดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์” (รายละเอียดการประดิษฐ์ แสดงในเอกสารแนบ)

แผนการปฏิบัติงานในอนาคต

1. จะทำการเขียนและตีพิมพ์บทความในวารสารนานาชาติเกี่ยวข้องกับการใช้แอปตาเมอร์ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าในการตรวจวัดโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน
2. จะทำการตรวจวัดไกลเคตเตดอัลบูมินในกลุ่มคนไข้เบาหวาน เทียบกับกลุ่มควบคุม รวมทั้งกลุ่มที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับฮีโมโกลบินด้วย เพื่อเตรียมความพร้อมสู่การทดสอบภาคสนาม

2. รายงานผลของกรรมวิธีการวัดไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การตรวจหาโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน

การจับกันของโปรตีนเป้าหมายกับแอปตาเมอร์ จะขัดขวางการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของเฟอริไซยาไนด์ อีออนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ที่เคลื่อนที่ไปยังพื้นผิวขั้วไฟฟ้าส่งผลต่อค่ากระแสไฟฟ้าที่จะลดลงหรือค่าความต้านทานบนผิวสัมผัสเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้าดังกล่าวนี้ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีนเป้าหมายที่ถูกจับไว้โดยแอปตาเมอร์นี้

- หยด 10 ไมโครลิตรของสารละลายโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินที่มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายใน 1x พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ลงบนแอปตะเซนเซอร์นี้ และทิ้งไว้ 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- ล้างขั้วไฟฟ้าด้วย 1x พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม
- วัดสัญญาณที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า หลังการเติมสารวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโพเทนชิโอสแตท

การวัดและวิเคราะห์สัญญาณทางเคมีไฟฟ้า

- ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสาม เข้ากับเครื่องโพเทนชิโอสแตท
- ใส่สารละลายอิเล็กโทรไลต์ ที่ประกอบด้วย 3 มิลลิโมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ ที่มี 1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ลงบนแผ่นอิเล็กโทรด จำนวน 120 ไมโครลิตร ให้ทั่วทั้งสามขั้วไฟฟ้า
- บันทึกสัญญาณที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า

- เมื่อวัดด้วยเทคนิคสแควเวฟ โวลแทมเมทรี (SWV), โวลแทมโมแกรมถูกบันทึกจาก -0.5 โวลต์ ถึง 1.0 โวลต์ และวิเคราะห์ข้อมูลที่ลดลงของกระแสไฟฟ้าก่อนและหลังการใส่สารวิเคราะห์ ทดสอบค่าพารามิเตอร์ของการวัดสแควเวฟ โวลแทมเมทรี (SWV) มีดังนี้

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ตั้งไว้	=	-0.5	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น	=	-0.5	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าสุดท้าย	=	1.0	โวลต์
ช่วงของศักย์ไฟฟ้า	=	0.005	โวลต์
ค่ากระแสไฟฟ้า	=	0.02	แอมแปร์
ค่าความถี่	=	25	เฮิรตซ์

- เมื่อวัดด้วยเทคนิค EIS, ไนควิสต์ พล็อต (Nyquist plot) ถูกบันทึกจาก -0.500 โวลต์ ถึง 1.0 โวลต์ ภายใต้ศักย์ไฟฟ้า 0.213 โวลต์ และวิเคราะห์ข้อมูลที่เพิ่มขึ้นของความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้าสลับก่อนและหลังการใส่โปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน

รายงานผลของกรรมวิธีการเคลือบแอปตาเมอร์บนอิเล็กโทรด และกรรมวิธีการวัดไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า (โครงการย่อยที่ 3)

2. รายงานผลของกรรมวิธีการเคลือบแอปตาเมอร์บนอิเล็กโทรด

การเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

ทำการล้างขั้วไฟฟ้าก่อนที่จะใช้ โดยมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงความไวและความแม่นยำของค่าที่ได้จากการวัด โดยมีขั้นตอนการล้างดังนี้

- ต่อขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าช่วย กับเครื่องโพเทนชิโอสแตท
- ใส่กรดซัลฟุริก ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 60 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าช่วย
- ให้ศักย์กับวงจรไฟฟ้าด้วยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมทรี (Cyclic Voltammetry; CV) จำนวน 2 รอบ ที่มี การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของการทำไซคลิก โวลแทมเมทรี (CV) ดังนี้

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ตั้งไว้	=	1.29	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เริ่มต้น	=	1.29	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงสุด	=	1.3	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำสุด	=	-0.2	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าสุดท้าย	=	1.29	โวลต์
จำนวนรอบ	=	2	
ช่วงของศักย์ไฟฟ้า	=	-0.00244	โวลต์
อัตราเร็วในการสแกน	=	0.1	โวลต์ต่อวินาที

- ตรวจสอบขั้วไฟฟ้าที่ล้างปรับสภาพแล้วด้วยเทคนิคสแควเวฟ โวลแทมเมทรี (SWV) โดยใส่ 120 ไมโครลิตร ของ 3 มิลลิโมลาร์ของ สารละลายโพแทสเซียม เพอร์โรซายาไนต์ ที่มี 1 โมลาร์โพแทสเซียม คลอไรด์ บนขั้วไฟฟ้าทั้งสาม ภายใต้ศักย์ไฟฟ้า -0.5 ถึง 1.0 โวลต์ ด้วยการตั้งค่าพารามิเตอร์ของการ วัด

สแควเวฟ โวลแทมเมทรี (SWV) ดังนี้

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ตั้งไว้	=	-0.5	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น	=	-0.5	โวลต์
ค่าศักย์ไฟฟ้าสุดท้าย	=	1.0	โวลต์
ช่วงของศักย์ไฟฟ้า	=	0.005	โวลต์
ค่ากระแสไฟฟ้า	=	0.02	แอมแปร์
ค่าความถี่	=	25	เฮิร์ตซ์

- ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม

การเคลือบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วยสเตรปตาวิดิน โดยวิธีการดูดซับ (adsorption)

- หยดสารละลายสเตรปตาวิดิน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยละลายใน 1x พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวขั้วไฟฟ้าทำงาน และทิ้งไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ล้างขั้วไฟฟ้าทำงานด้วย 1 X พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เพื่อที่จะชะล้างส่วนเกินของโปรตีนที่ไม่ได้ถูกดูดซับ แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม
- พื้นผิวขั้วไฟฟ้าทำงานตำแหน่งที่ไม่ได้ดูดซับสเตรปตาวิตินจะถูกปิด เพื่อป้องกันการจับของโมเลกุลอื่นที่ไม่จำเพาะกับขั้วไฟฟ้าโดยการหยด สารละลายเอทานอลลามีน ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 10 ไมโครลิตร บนขั้วไฟฟ้าทำงาน ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที
- ล้างขั้วไฟฟ้าด้วย 1 X พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม

การยิดติดดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อโปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ถูกดัดแปลงด้วยสเตรปตาวิติน

- หยด สารละลายดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ต่อโปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน ที่มีหมู่ไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยละลายใน 1x พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวขั้วไฟฟ้าทำงานคาร์บอนที่ถูกดัดแปลงด้วยสเตรปตาวิติน และทิ้งไว้ 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- ล้างขั้วไฟฟ้าด้วย 1x พีบีเอส บัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม (แอปตะเซนเซอร์นี้ สามารถถูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสได้ เป็นเวลา 5 เดือน เพื่อรอการตรวจหาโปรตีนไกลเคทเตดอัลบูมิน)
- วัดสัญญาณที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า ก่อนการเติมสารวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโพเทนชิโอสแตท

รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 4: การตรวจภาวะไกลเคชั่นของอัลบูมินด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดนาโนพอร์ (Simultaneous Detection of Albumin Glycation using Nanopore-sensor)

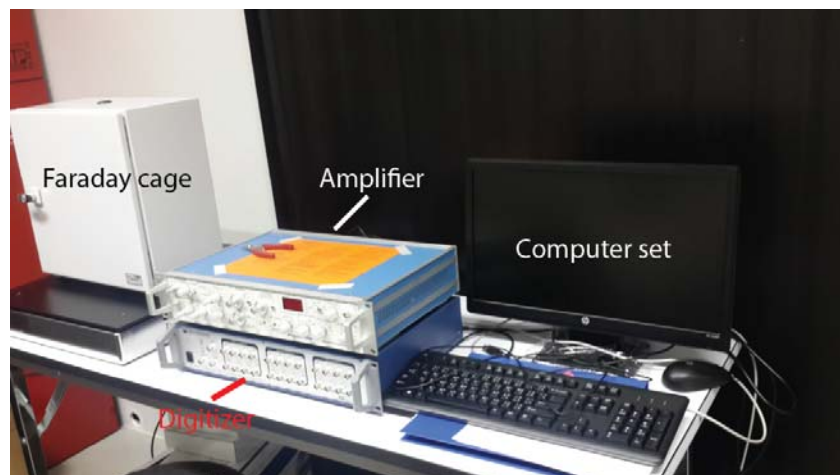
ผู้ร่วมงานวิจัย:

1. ดร.เดือนเพ็ญ จาปรุ่ง
2. ดร.ประภาศิริ พงษ์ประยูร
3. ดร.ธิดิกร บุญคุ้ม
4. น.ส. เกียรติธิดา ตรีรัตน์ตระกูล
5. น.ส. ลลิตา มรุเศรษฐ์

ความก้าวหน้าในการดำเนินงาน

1. การติดตั้งเครื่องมือวิเคราะห์นาโนพอร์ (Nanopore Analysis)

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีเครื่องมือวิเคราะห์แบบนาโนพอร์ (Nanopore Analysis System) จึงได้ทำเรื่องขอจัดซื้อด้วยงบประมาณจาก ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และ TCELS ซึ่งเครื่องมือวิเคราะห์นาโนพอร์ประกอบไปด้วย เครื่องขยายสัญญาณจากไมโครอิเล็กโทรด (Microelectrode Amplifier) เครื่องแปลงข้อมูล อนุาลอคเป็นดิจิตอล (Digitizer) กรงฟาราเดย์ (Faraday cage) และชุดต่อคอมพิวเตอร์ โดยสถานะปัจจุบันที่วิจัยได้ทำการรับเครื่องมือ และเชื่อมต่อระบบเรียบร้อยแล้ว ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1: แสดงเครื่องมือวิเคราะห์แบบนาโนพอร์ ซึ่งติดตั้งที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

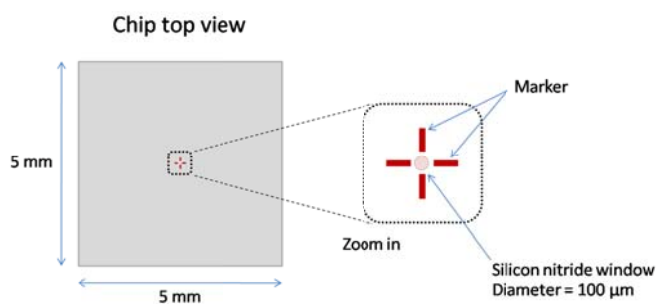
2. การเตรียมโปรตีนนาโนพอร์ และนาโนพอร์สังเคราะห์

เนื่องจากนาโนพอร์ที่สามารถนำมาทำเป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินมีอยู่ 2 ประเภทคือ นาโนพอร์สังเคราะห์ และนาโนพอร์ที่เป็นโปรตีน แต่ทั้งสองชนิดมีทั้งข้อดี และข้อเสียที่แตกต่างกันไป โดยสรุปคือ นาโนพอร์สังเคราะห์ จะเตรียมได้ขนาดที่แตกต่างกันในแต่ละครั้ง ดังนั้นจึงสามารถนำมาวิเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายได้หลากหลายขนาด แต่ก็ยากที่จะเตรียมให้มีขนาดเล็กกว่า 10 นาโนเมตร เนื่องจากเครื่องมือในการเจาะและวิเคราะห์รูบนานาพอร์ ยังไม่มีความละเอียดเพียงพอ ทำให้อาจไม่สามารถวิเคราะห์โมเลกุลที่มีขนาดเล็กระดับ 1-5 นาโนเมตรได้ อย่างไรก็ตามนาโนพอร์แบบสังเคราะห์ก็มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อม และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้อีกหลายครั้ง

สำหรับนาโนพอร์ที่เป็นโปรตีนนั้นข้อดีคือสามารถเตรียมได้ขนาดที่เท่ากันในทุกครั้ง และมีความไวในการใช้ตรวจวิเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย แต่โมเลกุลเป้าหมายต้องมีขนาดที่เหมาะสมด้วย ข้อด้อยที่สำคัญของนาโนพอร์ที่เป็นโปรตีนคือสามารถนำมาใช้ได้ครั้งเดียว และไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมรวมทั้งสารเคมีเท่ากับนาโนพอร์แบบสังเคราะห์ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงต้องมีการเตรียมและทดสอบนาโนพอร์ทั้งแบบสังเคราะห์ และนาโนพอร์ที่เป็นโปรตีนเพื่อคัดเลือกชนิดที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน

2.1 นาโนพอร์สังเคราะห์

ทางทีมวิจัยร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) ได้ผลิตชิปที่ทำมาจากวัสดุซิลิคอนไนไตรด์ที่ประกอบด้วยวัสดุซิลิคอนทั้งสองด้าน ตัวชิปเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่มีความกว้าง 5 มิลลิเมตร เมื่อมองจากด้านบนของชิป (Top view) บริเวณตรงกลางชิปมีหน้าต่างซิลิคอนไนไตรด์ (Silicon nitride window) วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 ไมโครเมตร หนา 70 นาโนเมตร และมีเส้นตรงสี่ด้านเพื่อชี้ตำแหน่งของหน้าต่างวงกลมดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2: รูปภาพแสดงโครงร่างของชิปที่ประกอบด้วยหน้าต่างซิลิคอนไนไตรด์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 ไมโครเมตร และเส้นตรง 4 เส้นที่บอกบริเวณที่มีหน้าต่างซิลิคอนไนไตรด์

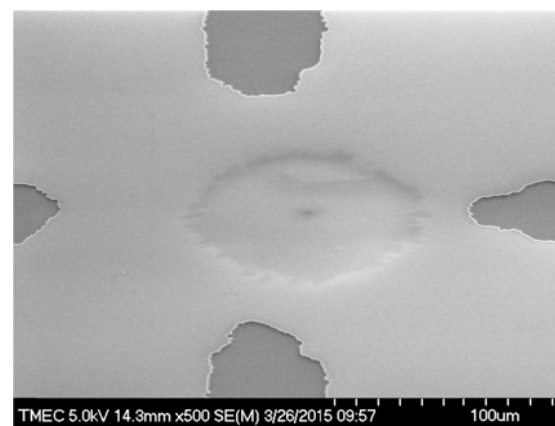
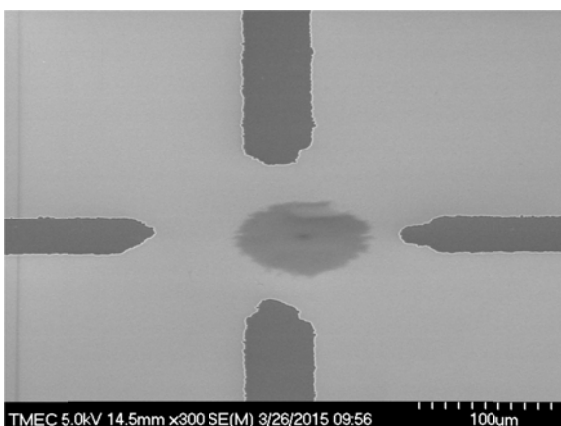
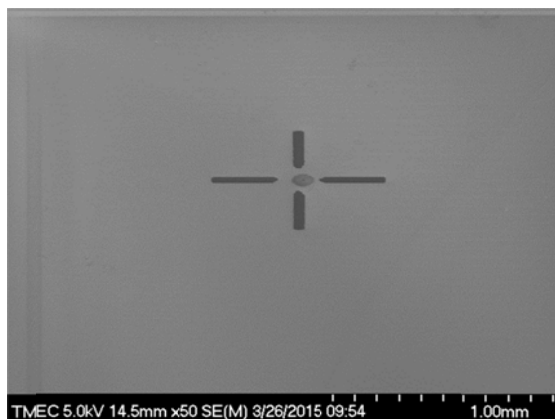
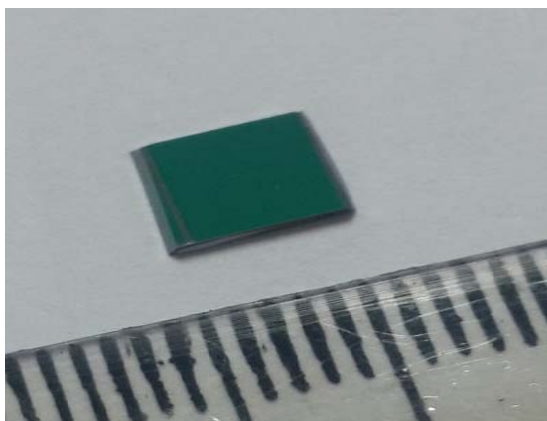
โดยชิพดังกล่าวประกอบด้วยโครงสร้างดังนี้ ชั้นล่างสุดเป็นชั้นที่ใช้ซิลิคอนเป็นฐานรองรับ เพื่อปลูกฟิล์มบางซิลิคอนไนไตรด์ (Si_3N_4) ที่มีความหนาประมาณ 70 นาโนเมตรลงบนแผ่นซิลิคอน หลังจากนั้นจึงปลูกชั้นซิลิคอนหนา 200 นาโนเมตรลงบนฟิล์มซิลิคอนไนไตรด์อีกชั้นหนึ่งเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ฟิล์มซิลิคอนไนไตรด์ หลังจากเตรียมฟิล์มทั้งสองชั้นแล้ว ชิพที่ได้ถูกนำไปกัดเพื่อให้ได้ช่องหน้าต่างรูวงกลมของฟิล์มซิลิคอนไนไตรด์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพตัดขวางรูปที่ 3

ส่วนชั้นที่สามด้านล่างจะเป็นชั้นของ ซิลิคอนตั้งต้น (Silicon substrate) โดยหน้าต่างบริเวณนี้จะมีความกว้างและยาว 2 ไมโครเมตร นาโนพอร์จะถูกเจาะในชั้นของ ซิลิคอนไนไตรด์ ด้วยเครื่อง FIB-SEM ให้มีขนาดไม่เกิน 100 นาโนเมตร รูปภาพแสดงชั้นของซิลิคอนได้แสดงไว้ใน รูปที่ 4



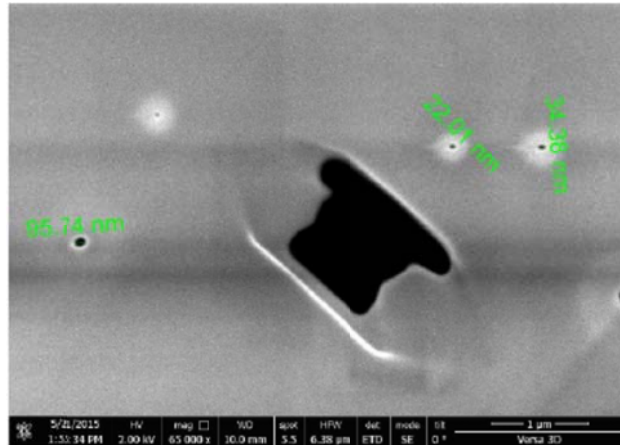
รูปที่ 3: ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างของชิพซิลิคอนและซิลิคอนไนไตรด์เพื่อใช้ในการเจาะนาโนพอร์

หลังจากนำชิพที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยกล้องอิเล็กตรอนไมโครสโคปแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) เพื่อตรวจสอบภาพ และความสะอาดพบว่า ชิพที่นำมาใช้ไม่มีการแตกเสีย และมีความสะอาดเพียงพอที่จะนำมาทดสอบหาสภาวะในการเจาะนาโนพอร์ รูปภาพของชิพภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 50x, 300 และ 500x ได้แสดงในรูปที่ 4



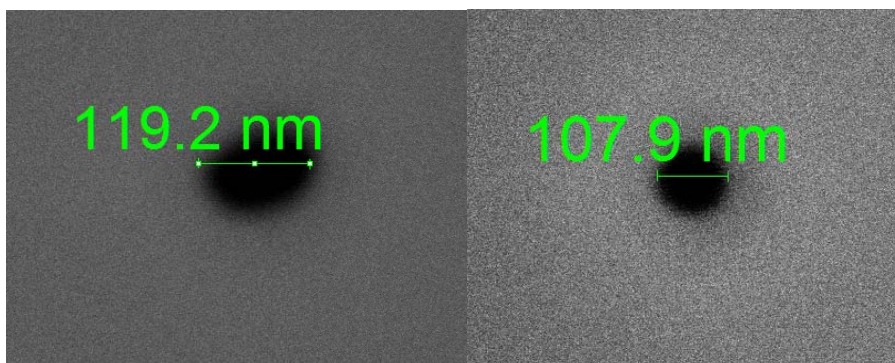
รูปที่ 4: แสดงชิพที่ทำมาจากซิลิคอนไนไตรด์ที่มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร (รูปซ้ายบน) และรูปภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 50X (รูปขวาบน) 300X (รูปซ้ายล่าง) และ 500X (รูปขวาล่าง)

ในการเจาะนาโนพอร์นั้น ดำเนินการโดยใช้เครื่อง FIB-SEM (Focus Ion Beam และ Scanning Electron Microscope) ซึ่งนาโนพอร์ จะถูกเจาะด้วยกระแส 5pA และค่า Z 4-6 ไมโครเมตร และนาโนพอร์ที่ได้มีขนาด 22-95 นาโนเมตรดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงนาโนพอร์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22.01 นาโนเมตร 34.38 นาโนเมตร และ 95.74 นาโนเมตร ซึ่งได้จากการเจาะด้วยเครื่อง FIB และถ่ายภาพด้วยเครื่อง SEM

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในการเจาะนาโนพอร์แล้ว จึงได้ทำการเจาะนาโนพอร์จำนวน 1 นาโนพอร์ ต่อแผ่นชิพ 1 แผ่น (single nanopore) โดยตัวอย่างนาโนพอร์ที่เจาะได้แสดงไว้ในรูปที่ 6



รูปที่ 6: แสดงตัวอย่างนาโนพอร์ที่เจาะด้วยเครื่อง FIB และถ่ายรูปด้วยเครื่อง SEM บนแผ่นซิลิคอนไนไตรด์ชิพ จำนวน 2 แผ่น โดยรูปซ้ายเป็นนาโนพอร์ขนาด 109.2 นาโนเมตร ที่กำลังขยาย 240,000 เท่า และพลังงาน 10 kV (รูปซ้าย) และรูปขวาคือนาโนพอร์ขนาด 107.9 นาโนเมตร ที่กำลังขยาย 160,000 เท่า และพลังงาน 10 kV

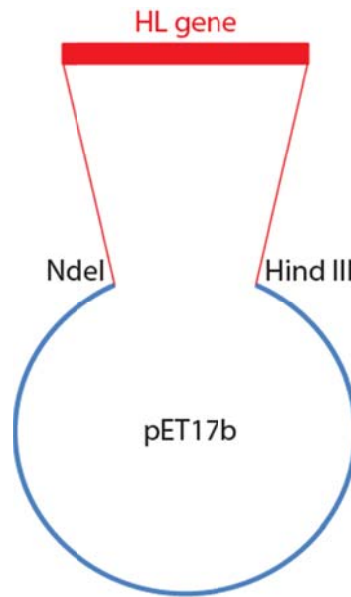
2.2 โปรตีนนาโนพอร์

ในโครงการนี้ได้เลือกที่จะใช้โปรตีนที่ชื่อว่า แอลฟาฮีโมไลซิน (α -Hemolysin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ในเยื่อหุ้มของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เนื่องจาก *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่ต้องทำการทดลองในห้องปฏิบัติการที่มี Biosafety Level 2 ซึ่งสถานะปัจจุบันของห้องปฏิบัติการแบคทีเรียของศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ยังคงเป็นแค่ Biosafety Level 1 จึงมีความจำเป็นต้องทำการเตรียมโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธีอื่น โดยได้วางแผนไว้ว่าจะทำการเตรียมโปรตีนดังกล่าวในหลอดทดลอง ด้วยวิธี *In vitro* Transcription and Translation (IVTT)

เริ่มต้นได้ทำการออกแบบ และสังเคราะห์ยีน α -Hemolysin ให้อยู่ในพลาสมิดที่สามารถนำมาผลิตโปรตีนได้ โดยในการทดลองนี้ได้เลือกพลาสมิด pET17b ซึ่งสามารถจะใช้ในการผลิตโปรตีนได้ โดยลำดับของยีนมีดังนี้

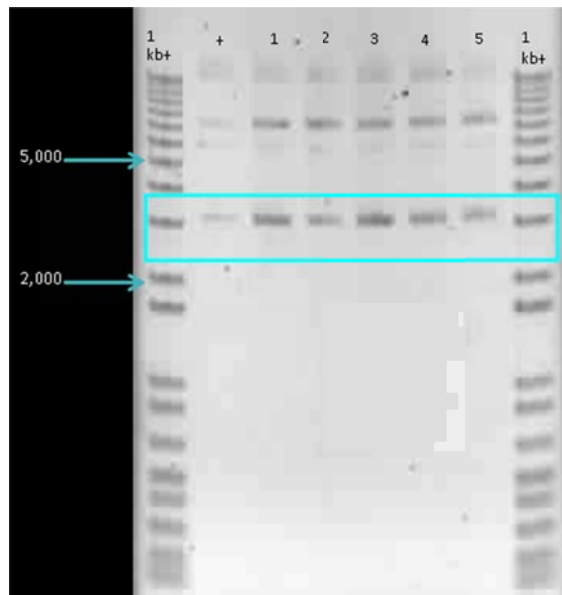
```
ATGGCAGATTCTGATATTAATATTTAAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAAAAACAG
GTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTTTATCGATGATAA
AAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGTCAATATAGAGTTTATAGC
GAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTAAGGTACAGTTGCAACTACCTGAT
AATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTGATACAAAAGAGTATATGAGTACTT
TAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGATGATACAGGAAAAATTGGCGGCCTTATTGGTGCAAA
TGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATGTTCAACCTGATTTCAAACAATTTTAGAGAGCCCCAACTGAT
AAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTTAACAAATATGGTGAATCAAAATTGGGGACCATACGATCGAGATT
CTTGGAACCCGGTATATGGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAAAGTGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAA
CTTCCTTGATCCTAACAAAGCAAGTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACGACTTCGCTACAGTTATT
ACTATGGATAGAAAAGCATCCAAACAACAAACAAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGATT
ACCAATTGCATTGGACTTCAACAAATTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATCGTTCCTC
AGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAGAAATGACAAATTAA
```

ลำดับดีเอ็นเอดังกล่าว ได้ถูกสังเคราะห์ให้อยู่ในพลาสมิด pET 17b ที่ตำแหน่ง NdeI และ HindIII ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7: แสดงตำแหน่งของยีนฮีโมโกลินในพลาสมิด pET17b

หลังจากได้ยีนสังเคราะห์แล้ว ก็นำมาเพิ่มจำนวนและตรวจสอบโดยวิธี Gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 8

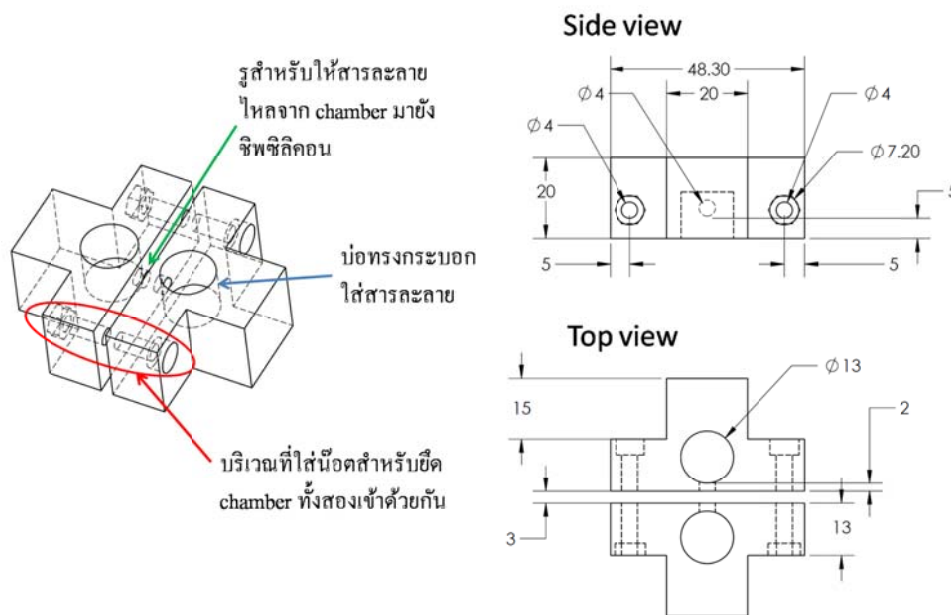


รูปที่ 8: แสดงพลาสมิด pET17b ที่มียีนฮีโมโกลิน

สถานะปัจจุบันกำลังทำการเตรียมโปรตีนในหลอดทดลอง ทั้งชนิดดั้งเดิม และชนิดกลายพันธุ์ ด้วยวิธี *in vitro* Transcription and Translation (IVTT)

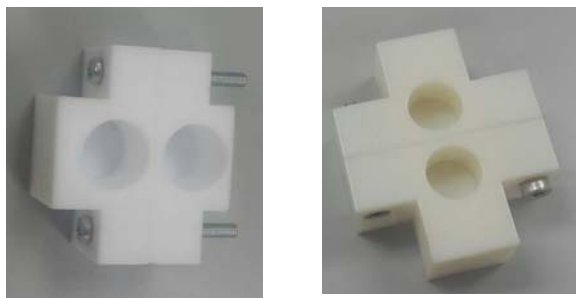
2.3 การเตรียม Chamber สำหรับการวิเคราะห์ด้วยนาโนพอร์

Chamber นี้เตรียมขึ้นสำหรับบรรจุสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ โดยออกแบบให้ตัวอุปกรณ์มีสองชั้น แต่ละชั้นมีบ่อทรงกระบอกสำหรับใส่สารละลายที่จะใช้ทดสอบ เนื่องจากในการทดลองนั้นจะต้องมีการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่ต้องการวัดผ่านนาโนพอร์ ตัวชิ้นงานจึงถูกออกแบบให้มีด้านเรียบด้านหนึ่งสำหรับประกบกับชิ้นงานอีกชั้นหนึ่งโดยมีแผ่นซีพินาโนพอร์อยู่ตรงกลาง และที่ผนังของด้านเรียบนี้จะเจาะรูทะลุไปจนถึงบ่อทรงกระบอก สำหรับเป็นช่องเปิดให้สารละลายจากบ่อไหลผ่านไปถึงนาโนพอร์และผ่านไปยังบ่อทรงกระบอกอีกด้านหนึ่งได้ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9: ร่างแบบ chamber สำหรับการทดลอง โดยภาพ side view แสดงถึงแบบของ chamber บริเวณด้านเรียบที่ใช้สำหรับประกบกับซีพชีลิกอน (ในภาพเป็นช่องของ chamber ตัวบนในภาพ top view ตัวแบบจึงถูกแสดงเป็นภาพกลับหัว)

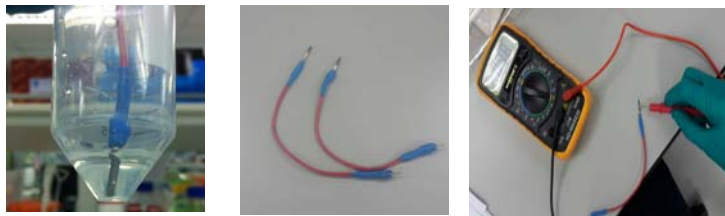
Chamber สำหรับงานนี้นั้น เตรียมขึ้นด้วย 2 วิธีที่แตกต่างกันคือ 1) เตรียมขึ้นจากการใช้เครื่อง computer numerical control (CNC) สกัดแท่งเทฟลอนให้ได้ตามรูปร่างที่ต้องการ และ 2) เตรียมขึ้นจากการพิมพ์ 3 มิติ (3D printing) โดยใช้เครื่องพิมพ์ 3 มิติโมเดล Objet260 Connex โดย chamber ที่สร้างขึ้นจากทั้งสองวิธีจะมีความแตกต่างกันในส่วนขนาดของตัว chamber (ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในภายหลัง) และวัสดุที่ใช้ทำ เนื่องจาก chamber ที่เตรียมได้จากวิธี CNC จะสามารถใช้เทฟลอนซึ่งมีความคงทนต่อการกัดกร่อนและสารเคมีได้สูง ในขณะที่วัสดุที่ใช้เตรียมจากเครื่องพิมพ์ 3 มิติ จะใช้หมึกที่เป็นพอลิเมอร์ (ส่วนประกอบไม่เปิดเผยเนื่องจากเป็นความลับทางการค้า) ดังนั้นจึงต้องมีการนำมาทดสอบต่อไปว่าสามารถใช้กับสารละลายที่ใช้ในการทดสอบได้หรือไม่อย่างไร สำหรับภาพ chamber ที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธีนั้นได้แสดงไว้ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10: แสดง Chamber ที่เตรียมจากการใช้เครื่อง computer numerical control (CNC) (รูปซ้าย) และเครื่องพิมพ์ 3 มิติ โมเดล Objet260 Connex (รูปขวา)

2.4 การผลิตชีวไฟฟ้า สำหรับการวิเคราะห์ด้วยนาโนพอร์

ชีวไฟฟ้าในการวิเคราะห์ด้วยนาโนพอร์ คือชีวซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ ซึ่งเตรียมได้จากวัสดุซิลเวอร์เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 mm ยาว 10 mm ที่มีความบริสุทธิ์ 99.99% ต่อเข้ากับสายไฟความยาว 20 cm โดยปลายอีกด้านต่อกับฟืนเปลือก แล้วจุ่มปลายด้านซิลเวอร์ลงในสารละลายไฮโปคลอไรต์ (NaClO ในน้ำ) ความเข้มข้น 5% เกิดเป็นชีวไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ ที่มีสีเทาหยาบดังแสดงในรูปที่ 11



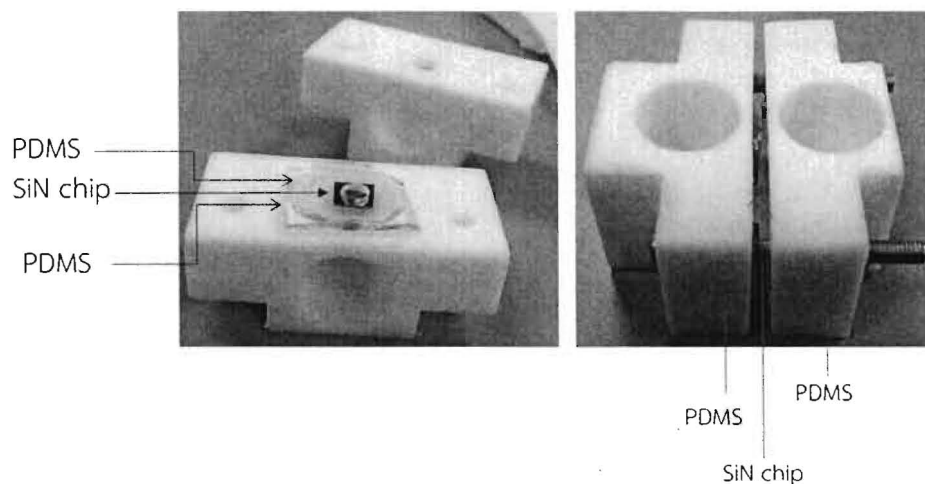
รูปที่ 11: แสดงการสร้างชีวไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์ด้วยนาโนพอร์ **รูปซ้าย** แสดงถึงชีวไฟฟ้าที่จุ่มอยู่ในสารละลายไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 5% **รูปกลาง** แสดงชีวไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ ที่พร้อมใช้งาน **รูปขวา** แสดง การทดสอบชีวไฟฟ้าด้วยเครื่องมัลติมิเตอร์

จากนั้นนำชีวไฟฟ้าที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพ ด้วยเครื่องมัลติมิเตอร์ (รูปที่ 11) พบว่าชีวไฟฟ้าที่ผลิตขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพดี ไม่มีการรั่วไหล

2.5 การทดสอบนาโนพอร์ ด้วยเครื่อง Potentiostat

แผ่นซีพซิลิคอนที่ทำการเจาะรูแล้วจะต้องมีการทดสอบก่อนการใช้งานจริง ดดยการนำไปวัดการไหลผ่านของไอออนโดยใช้เครื่อง Potentiostat ก่อน ซึ่งก่อนการทดสอบจริงต้องทำความสะอาดแผ่นซิลิคอนไนไตรต์ด้วยสารละลายปิรันฮาที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยแอลกอฮอล์ 70% และเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนก่อน แล้วจึงนำแผ่นซิลิคอนไนไตรต์ไปเพิ่ม

ความสามารถในการชอบน้ำ โดยการเข้าสู่ O_2 Plasma ช้างละ 5 นาที และประกอบแผ่นซิลิคอนไนไตรด์เข้ากับ Chamber โดยให้นาโนพอร์อยู่ในส่วนที่ทะลุระหว่างอ่างสองข้าง และกันกระแทกด้วยวัสดุ PDMS แบบอ่อนดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12: รูปภาพแสดงการประกอบแผ่นซิลิคอนไนไตรด์เข้ากับ Chamber

แล้วทดสอบการไหลผ่านของไอออน โดยการเติม 1 M KCl 10 mM Tris.HCl pH 8.0 ช้างละ 1 mL และต่อเข้ากับอิเล็กโทรด 2 เส้นที่ทำมาจาก Ag/AgCl (รูปที่ 11) โดยตั้งค่าการวัด ให้เป็นแบบ Cyclic voltammetry และ คำนวณขนาดของนาโนพอร์จากสูตร $G = \frac{d^2}{L} \sigma$

G คือ ความชันของกราฟ

d คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนพอร์

L คือ ความหนาของแผ่นซิลิคอนชิพ

σ คือ Conductivity ของสารละลาย

โดยผลการทดสอบพบว่านาโนพอร์ในบางชิพ ไอออนไม่สามารถวิ่งผ่านได้ นั้นแสดงว่ากระบวนการเจาะนาโนพอร์อาจไม่ทะลุไปถึงด้านตรงข้าม ซึ่งต้องมีการตรวจสอบต่อไป ส่วนนาโนพอร์ที่มีไอออนทะลุผ่านก็จะนำไปวิเคราะห์หาโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมินต่อไป

แผนการปฏิบัติงานในอนาคต

1. วิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินทั้งสองชนิด นั่นคือโปรตีนอัลบูมินปกติ และไกลโคเตตอัลบูมิน
2. เเคราะห์การไหลผ่าน ของโปรตีนอัลบูมินผ่านนาโนพอร์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์
3. เตรียมจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรเกี่ยวกับการเตรียมนาโนพอร์

รายงานผลของกรรมวิธีการวิเคราะห์โกลเดตอัลบูมินโดยการใช้นาโนพอร์ (ในโครงการย่อยที่ 4 การตรวจภาวะโกลเดตด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดนาโนพอร์)

เนื่องจากสถานะปัจจุบันของ โครงการวิเคราะห์โกลเดตอัลบูมินโดยนาโนพอร์ ถึงขั้นตอนการเตรียมนาโนพอร์แบบสังเคราะห์ และติดตั้งเครื่องมือได้สำเร็จ ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญส่วนหนึ่งในการวิเคราะห์โกลเดตอัลบูมิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมแผ่นซิลิคอนไนไตรด์ขนาด 5×5 มิลลิเมตร ที่มีความหนา 70 นาโนเมตร
2. เจาะรูบนแผ่นซิลิคอนไนไตรด์ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-100 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง AFM-SEM (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน)
3. ทำความสะอาดแผ่นซิลิคอนไนไตรด์ด้วยสารละลายปิรันฮาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยแอลกอฮอล์ 70% และเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน (สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้งาน)
4. นำแผ่นซิลิคอนไนไตรด์ไปเพิ่มความสามารถในการชอบน้ำ โดยการเข้าสู่ O_2 Plasma ช้างละ 5 นาที
5. ประกอบแผ่นซิลิคอนไนไตรด์เข้ากับ Chamber โดยให้นาโนพอร์อยู่ในส่วนที่ทะลุระหว่างอ่างสองข้าง และกันกระแทกด้วยวัสดุ PDMS แบบอ่อน
6. ทดสอบการไหลผ่านของไอออน ก่อนใช้งานจริงด้วยเครื่อง Potentiostat โดยการเติม 1 M KCl 10 mM Tris.HCl pH 8.0 ช้างละ 1 mL และต่อเข้ากับอิเล็กโทรด 2 เส้นที่ทำมาจาก Ag/AgCl
7. ตั้งค่าการวัดด้วยเครื่อง Potentiostat ให้เป็นแบบ Cyclic voltammetry

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ตั้งไว้ = 0 โวลต์ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เริ่มต้น = 0 โวลต์

ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงสุด = 0.5 โวลต์ ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำสุด = -0.5 โวลต์

ค่าศักย์ไฟฟ้าสุดท้าย = 0 โวลต์ จำนวนรอบ = 3

ช่วงของศักย์ไฟฟ้า = 0.00244 โวลต์ อัตราเร็วในการสแกน = 0.05 โวลต์ต่อวินาที

8. คำนวณขนาดของนาโนพอร์จากสูตร $G = \frac{d^2}{L} \sigma$

G คือ ความชันของกราฟ

d คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนพอร์

L คือ ความหนาของแผ่นซิลิคอนชิพ

σ คือ Conductivity ของสารละลาย

9. นำนานาโนพอร์ที่ทดสอบด้วยเครื่อง Potentiostat แล้ว ไปเชื่อมต่อกับเครื่องวิเคราะห์นาโนพอร์ และทดสอบ หา IV curve เพื่อยืนยันการคงอยู่ของนาโนพอร์
10. วิเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย โดยการเติมตัวอย่างปริมาณความเข้มข้นน้อยๆก่อน
11. วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยโปรแกรม Clampfit

รายงานผลของกรรมวิธีในการทำให้แอปตาเมอร์ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส และซีรัม Serum resistance ซึ่งสำคัญต่อการพัฒนา biosensor

เนื่องจากแอปตาเมอร์ในโครงการนี้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งสามารถที่จะถูกทำลาย หรือถูกตัดได้ง่ายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอสที่ปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ซึ่งการพัฒนาแอปตาเมอร์ให้มีคุณภาพจะต้องทำให้แอปตาเมอร์มีความทนต่อเอนไซม์ดีเอ็นเอส ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการเก็บรักษา หรือในขั้นตอนการใช้แอปตาเมอร์ก็ตาม ในการพัฒนานี้ทีมวิจัยได้เลือกเอกราฟีนออกไซด์มาเป็นตัวคงสภาพของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เนื่องจากมีรายงานวิจัยหลายฉบับพบว่าเมื่อกราฟีนจับกับดีเอ็นเอแอปตาเมอร์แล้ว จะป้องกันไม่ให้เอนไซม์ดีเอ็นเอสเข้าไปทำลายดีเอ็นเอได้ และทางทีมวิจัยได้พิสูจน์แล้วแล้ว วิธีการดังกล่าวสามารถทำให้แอปตาเมอร์ทนต่อดีเอ็นเอส และมีคุณสมบัติเป็น Serum Resistance จริง โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

1. ละลายแอปตาเมอร์ให้มีความเข้มข้น 10 μM ในน้ำที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ หรือ 1xฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน
2. ละลายกราฟีนออกไซด์ (แบบชั้นเดียว) ให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL ในน้ำที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ
3. นำสารละลายแอปตาเมอร์จากข้อ 1 ผสมรวมกับสารละลายกราฟีนออกไซด์จากข้อ 2 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรรวมไม่เกิน 20 μL) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
4. นำสารละลายผสมจากข้อ 3 ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง SpeedVac และมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะแห้งสนิท
5. ผงแอปตาเมอร์ที่แห้งสนิทดังกล่าวจะทนต่อดีเอ็นเอส และสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานเกิน 1 เดือน