

รายงานฉบับสมบูรณ์
การวัดปริมาณน้ำตาลบนอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวาน ปีที่ 2
ข้อตกลงเลขที่ สวรส 59-006

หัวหน้าโครงการ ดร.เดือนเพ็ญ จาปรุง

สนับสนุนโดย
สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เมษายน 2560

1.1 บทคัดย่อภาษาไทย

การติดตามภาวะเบาหวานทำได้ โดยการวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด ร่วมกับการวัดปริมาณน้ำตาลที่จับอยู่บนโปรตีนฮีโมโกลบิน (HbA1c) อย่างไรก็ตามการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งสองแบบ ต่างก็มีข้อจำกัดเช่น การวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด ขึ้นอยู่กับอาหารที่รับประทานก่อนการตรวจวัด ดังนั้นต้องมีการงดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ส่วนการวัดปริมาณน้ำตาลบนโปรตีนฮีโมโกลบิน ก็ขึ้นอยู่กับการสร้าง และลักษณะของฮีโมโกลบิน ด้วย ดังนั้นผู้ที่มีการสร้างฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ (โรคธาลัสซีเมีย พาหะธาลัสซีเมีย และเลือดจาง) ก็จะทำให้ผลการตรวจวัดไม่น่าเชื่อถือด้วย การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลบนโปรตีนอัลบูมิน หรือที่เรียกว่าไกลเคเทตอัลบูมิน จึงเป็นทางเลือกที่ใช้แก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากไม่ต้องอดอาหารก่อนการตรวจวัด และใช้ตรวจวัดได้ในกลุ่มคนปกติ และผู้ที่มีปัญหาเรื่องการสร้างโปรตีนฮีโมโกลบิน ซึ่งมีมากถึง 40-50% ในกลุ่มประชากรไทย

แผนงานวิจัยการวัดปริมาณน้ำตาลบนอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวาน เป็นการพัฒนาวีธีการตรวจวัดไกลเคเทตอัลบูมินโดยการประยุกต์ใช้แอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน ร่วมกับเทคโนโลยีการตรวจวัดอื่นๆ เช่นการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า และทีมวิจัยสามารถพัฒนาชุดตรวจ และวิธีการตรวจไกลเคเทตอัลบูมินได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจหาปริมาณไกลเคเทตอัลบูมินทั้งจากตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์ และตัวอย่างซีรัม/พลาสมา ของทั้งในคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน เมื่อใช้ตัวอย่างที่เก็บใหม่ โดยวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้มี ความไว และความจำเพาะสูงกว่า ชุดตรวจทางการค้าที่ใช้เทคนิคอิมมูโนแอสซaye ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการถ่ายทอดเทคโนโลยี เพื่อนำไปผลิตเพื่อใช้งานจริงตามสถานพยาบาล

1.2 บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Measuring of blood sugar and glycated hemoglobin (HbA1c) levels is a standard protocol for screening and monitoring of diabetes mellitus progression. However, blood sugar level is depending on food uptake before taking the measurement and HbA1c life cycle 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 thalassemia carrier (40-50%)), HbA1c level is not unrealizable. Therefore, measurement of glycated albumin, which is intermediated indicator outside red blood cell, could improve the way to control diabetes progression and treatment in all populations.

The research program “Albumin glycation for diabetes mellitus monitoring” is focusing on development of aptasensor platform for detection of glycated albumin. Three platforms have been developed, which are graphene oxide-aptamer, electrochemical and nanopore sensors. In summary, we successfully developed graphene oxide aptamer and electrochemical platform to detect albumin, glycated albumin and percentage of glycated albumin in clinical samples. Both sensitivity and specificity of our graphene oxide-aptamer platform are higher than those of the commercial available (ELISA). Therefore, our platform has a potential for technology transfer and commercialization.

1.3. บทสรุปเพื่อการสื่อสารสู่สาธารณะ

การติดตามภาวะเบาหวานทำได้ โดยการวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด ร่วมกับการวัดปริมาณน้ำตาลที่จับอยู่บนโปรตีนฮีโมโกลบิน (HbA1c) อย่างไรก็ตามการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งสองแบบ ต่างก็มีข้อจำกัดเช่น การวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด ขึ้นอยู่กับอาหารที่รับประทานก่อนการตรวจวัด ดังนั้นต้องมีการงดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ส่วนการวัดปริมาณน้ำตาลบนโปรตีนฮีโมโกลบิน ก็ขึ้นอยู่กับการสร้าง และลักษณะของฮีโมโกลบินด้วย ดังนั้นผู้ที่มีการสร้างฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ (โรคธาลัสซีเมีย พาหะธาลัสซีเมีย และเลือดจาง) ก็จะได้ผลการตรวจวัดที่ไม่น่าเชื่อถือ ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลบนโปรตีนอัลบูมิน หรือที่เรียกว่าไกลเคเทตอัลบูมิน จึงเป็นทางเลือกที่ใช้แก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากไม่ต้องงดอาหาร และสามารถใช้ตรวจวัดได้ทั้งในกลุ่มคนปกติ และผู้ที่มีปัญหาเรื่องการสร้างโปรตีนฮีโมโกลบิน ซึ่งมีมากถึง 40-50% ในกลุ่มประชากรไทย

แผนงานวิจัยการวัดปริมาณน้ำตาลบนอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวาน เริ่มต้นเมื่อปี พ.ศ. 2557 จากการคัดเลือก และพัฒนาดีเอ็นเอแอปตามอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน และโปรตีนอัลบูมิน จนได้ทำการยื่นจดสิทธิบัตรในประเทศไทย และต่างประเทศ (Application no. US 20160237436 A1) จากนั้นจึงได้ทำการต่อยอดงานวิจัยดังกล่าว โดยการสนับสนุนเงินวิจัยของ สวรส และ วช เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน 3 ประเภท นั่นคือ (1) การใช้วัสดุกราฟีนร่วมกับแอปตามอร์ (2) การใช้แอปตามอร์ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า และ (3) การตรวจวัดด้วยเทคนิคนาโนพอร์

สำหรับโครงการที่ 1 ซึ่งเป็นการพัฒนาการตรวจโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธีการใช้วัสดุกราฟีน ร่วมกับแอปตามอร์ในผู้ป่วยเบาหวานนั้น ทางทีมวิจัยอาศัยหลักการยับยั้งการส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอนุภาคราฟีนออกไซด์ เมื่อจับกับแอปตามอร์ที่ติดสลากระหว่างสารฟลูออเรสเซนซ์ จากการใช้หลักการดังกล่าวข้างต้น ทีมวิจัยสามารถวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนอัลบูมิน ไกลเคเทตอัลบูมิน และเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมินเทียบกับโปรตีนอัลบูมินรวมได้ทั้งในตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์ และตัวอย่างพลาสมาของคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน ทีมวิจัยได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างพลาสมาจริงจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากคนปกติและผู้ป่วยเบาหวานอย่างละ 50% และพบว่า ผู้ป่วยเบาหวานมีปริมาณไกลเคเทตอัลบูมิน และเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมินเทียบกับอัลบูมินรวม สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจคัดกรอง และติดตามภาวะเบาหวาน เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดไกลเคเทตอัลบูมินที่พัฒนาขึ้นในโครงการนี้ กับชุดตรวจ ELISA ที่ใช้หลักการจับกันของแอนติบอดี และแอนติเจนที่มีขายตามท้องตลาด (USA) ก็พบว่า การตรวจด้วยวิธีที่ทีมวิจัยพัฒนาขึ้นนั้น ให้ค่าความไว และความจำเพาะถึง 100% ซึ่งสูงกว่าชุดตรวจที่ใช้เปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังใช้

เวลาทดสอบที่สั้นกว่า และง่ายกว่าด้วย แสดงให้เห็นว่า ชุดตรวจที่ทีมวิจัยพัฒนาขึ้นนี้ มีประสิทธิภาพดีกว่าชุดตรวจไกลเคทเตดอลูมินที่จำหน่ายตามท้องตลาด

สำหรับโครงการที่ 2 ซึ่งเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจไกลเคทเตดอลูมินเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้านั้น อาศัยหลักการวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า โดยการติดแอปตาเมอร์ไว้ที่ขั้วไฟฟ้า และเมื่อโปรตีนเป้าหมายจับกับแอปตาเมอร์ จะทำให้ระดับสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าที่วัดได้ลดลง ตามปริมาณโปรตีนเป้าหมายที่จับกับแอปตาเมอร์ วิธีการเคมีไฟฟ้าที่ทีมวิจัยพัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณไกลเคทเตดอลูมิน โปรตีนอัลบูมินรวม และเปอร์เซ็นต์ไกลเคทเตดอลูมินได้ ทั้งในตัวอย่างที่เป็นโปรตีนบริสุทธิ์ และตัวอย่างพลาสมาของคน จากผลการทดสอบวิธีดังกล่าวนี้เทียบระหว่างตัวอย่างคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน ก็พบว่าค่าโปรตีนไกลเคทเตดอลูมินจากตัวอย่างพลาสมา ของผู้ป่วยเบาหวานมีค่า สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งวิธีการเคมีไฟฟ้าที่ทางทีมวิจัยพัฒนาขึ้นนี้ยังมีความไวสูงมากถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งมีโอกาสที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนอัลบูมินระดับที่น้อยมากๆ เช่นในปัสสาวะได้อีกด้วย

สำหรับโครงการที่ 3 การตรวจภาวะไกลเคชั่นของอัลบูมินด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดนาโนพอร์นั้น อาศัยหลักการ แทนที่กระแสไอออนที่ไหลผ่านนาโนพอร์ ด้วยแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีนไกลเคทเตดอลูมิน ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมาย เทียบกับการแทนที่กระแสไอออนที่ไหลผ่านนาโนพอร์ ด้วยโปรตีนอัลบูมินรวมซึ่งไม่จับกับแอปตาเมอร์ ซึ่งหลักการดังกล่าวเป็นการตรวจวัดระดับโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้นในการตรวจวัด 1 ครั้ง ผลที่ได้จะสามารถบอกได้ทั้ง ปริมาณโปรตีนไกลเคทเตดอลูมิน โปรตีนอัลบูมิน และเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไกลเคทเตดอลูมินเทียบกับโปรตีนอัลบูมินรวม เนื่องจากเทคโนโลยีนาโนพอร์นี้ เป็นเทคโนโลยีที่ใหม่มากสำหรับประเทศไทย ทีมวิจัยยังขาดแคลนเครื่องมือ อุปกรณ์หลายๆ อย่าง จึงจำเป็นต้องสร้างขึ้นมาทีละชิ้นงานและประกอบกัน ทำให้โครงการล่าช้ากว่าเป้าหมาย และยังไม่ได้ต้นแบบการตรวจวัดไกลเคชั่นด้วยนาโนพอร์ที่สามารถใช้งานได้จริง อย่างไรก็ตามโครงการวิจัยนี้ทำให้เกิดความร่วมมือกันของกลุ่มนักวิจัยรุ่นใหม่ที่น่าสนใจ เทคโนโลยีนาโนพอร์เหมือนกัน ในหลายสถาบันวิจัย และมหาวิทยาลัย เกิดเป็นทีมวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญในหลากหลายสาขา สามารถสร้างต้นแบบ และเทคโนโลยีการผลิตนาโนพอร์ขึ้นมาจนสำเร็จ อีกทั้งยังสามารถคิดค้นวิธีการตรวจสอบสภาพความคงอยู่ของนาโนพอร์แบบง่ายจนสามารถได้ยื่นจดสิทธิบัตร และมีผลงานวิจัยที่พร้อมจะส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติอีกด้วย ถึงแม้โครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สวรส กำลังจะปิดโครงการไป ทางทีมวิจัยจะยังคงพัฒนาการตรวจวัดภาวะไกลเคชั่นในผู้ป่วยเบาหวานต่อไปจนกว่าจะประสบผลสำเร็จ และมีผู้มารับการถ่ายทอดเทคโนโลยี นอกจากนี้เทคโนโลยีการผลิตนาโนพอร์ที่ทางทีมวิจัยได้คิดค้นขึ้นมานี้ ยังสามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลชนิดอื่นๆได้ด้วย หรือแม้กระทั่งอาจนำไปประยุกต์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอได้อีกด้วย

ถึงแม้วิธีการตรวจวัดปริมาณไกลโคเตตอัลบูมินที่ทีมวิจัยพัฒนาขึ้นนั้น จะมีประสิทธิภาพที่ดี มีความไว และจำเพาะสูง และมีแนวโน้มว่าจะใช้งานได้จริง แต่ทีมวิจัยก็ค้นพบว่าความเสถียรของโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมินก็เป็นประเด็นที่ต้องศึกษา เนื่องจากสภาวะ และระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างมีผลต่อปริมาณของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้

สรุปแล้วแผนงานวิจัย การวัดปริมาณน้ำตาลบนอัลบูมินเพื่อติดตามภาวะเบาหวาน นี้สำเร็จตามเป้าหมายหลักที่ตั้งไว้ เนื่องจากทีมวิจัยได้ทั้งบทความตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติถึง 3 ผลงาน (IF 6.4 และ 2.9) และอีก 2 บทความที่กำลังจะส่งตีพิมพ์ อีกทั้งยังได้ยื่นจดสิทธิบัตร และอนุสิทธิบัตรถึง 4 ฉบับ ซึ่งได้แนบไปกับรายงานความก้าวหน้าแต่ละโครงการแล้ว

นอกจากนี้ทางทีมวิจัยยังได้รับการติดต่อจากบริษัทผลิตชุดตรวจทั้งจากต่างประเทศ และในประเทศ เพื่อรับการถ่ายทอดเทคโนโลยี (อยู่ในขั้นตอนการเจรจา) นั้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพ และประโยชน์ของงานวิจัยในระดับนานาชาติ และประเทศไทยอีกด้วย

ในส่วนของการประชาสัมพันธ์ งานวิจัยในแผนงานวิจัยนี้ได้รับคัดเลือกให้ไปแสดงในงานแถลงข่าว และงานมหกรรมวิจัยไทยปี 2016 และลงในหนังสือพิมพ์หลายฉบับ และได้ออกในรายการโทรทัศน์พลังวิทย์ คิดเพื่อคนไทยด้วย

ตัวอย่างงานด้านการประชาสัมพันธ์ผลงาน

1. ร่วมแสดงผลงานในงานแถลงข่าว งานนวัตกรรมวิจัยแห่งชาติ เมื่อวันที่ 25 ก.ค. 2559 ณ ห้อง Lotus Suite โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
2. ร่วมแสดงผลงาน งานนวัตกรรมวิจัยแห่งชาติ เมื่อวันที่ 17-21 ส.ค.2559 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
3. ผลงานวิจัยได้ถูกกล่าวถึงในสื่อหนังสือพิมพ์ 2 ฉบับ คือ หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันพฤหัสบดีที่ 28 ก.ค. 2559 และ หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวัน อังคารที่ 9 ส.ค 2559
4. ผลงานวิจัยถูกทำเป็นเรื่องสั้นเพื่อเผยแพร่ผลงานในรายการพลังวิทย์ คิดเพื่อคนไทย ทางช่อง 9 MCOT HD วันพุธที่ 17 ส.ค.2559
5. ได้จัดงานเผยแพร่ผลงานวิจัย และให้ความรู้เกี่ยวกับโรคเบาหวานแก่บุคคลทั่วไป ในวันเบาหวานโลก 14 พ.ย. 2559 ณ ลานกิจกรรม อาคารนวัตกรรม อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย โดยมีผู้เข้าร่วมกิจกรรมมากกว่า 220 คน

1.4 การวางแผนเพื่อนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์จริง

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินเพื่อวิเคราะห์เบาหวานนี้ เป็นงานวิจัยที่ใหม่ และ บุคลากรทางการแพทย์บางท่านยังไม่ทราบถึงความเป็นไปได้ของวิธีการตรวจวัดนี้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องให้ความรู้ และสร้างความน่าเชื่อถือของผลงานวิจัยแก่บุคลากรทางการแพทย์ก่อน โดยทางทีมวิจัยจะร่วมมือกับแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเกี่ยวกับโรคเบาหวานของโรงพยาบาลที่มีการศึกษาวิจัย และมีการผลิตนักศึกษาแพทย์ และบุคลากรทางการแพทย์ โดยเริ่มที่คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดีก่อน โดยจะมีการหารือแนวทางการร่วมวิจัยอย่างเป็นทางการ (MOU) ระหว่างศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ และฝ่ายวิจัยคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี จุดประสงค์หลักคือเพื่อร่วมมือในส่วนของ การทดสอบภาคสนามของชุดตรวจไกลเคตเตดอัลบูมินนี้ และเพื่อเผยแพร่ข้อมูลวิจัยให้กับนักศึกษาแพทย์ และบุคลากรทางการแพทย์อื่น ๆ ให้รู้จักและเข้าใจในหลักการ เมื่อนักศึกษาเหล่านี้จบการศึกษา และออกไปทำงานตามสถานพยาบาลทั่วประเทศไทย จะได้นำหลักการ และผลงานวิจัยดังกล่าวไปเผยแพร่ และใช้ในสถานพยาบาลนั้นๆต่อไป

ข้อจำกัดในการนำผลงานวิจัยเกี่ยวกับชุดตรวจทางการแพทย์ไปใช้ประโยชน์จริงนั้น คือชุดตรวจดังกล่าวจะต้องผ่านการตรวจมาตรฐานจาก อ.ย. เสียก่อน แต่ อ.ย. ก็ยังไม่มีระเบียบ และขั้นตอนในการขอมาตรฐานที่ชัดเจน ทีมวิจัยจึงจำเป็นต้องหาแนวทางในการยื่นขอมาตรฐานต่อไป

ในส่วนของ การถ่ายทอดเทคโนโลยีนั้น ทีมวิจัยได้ยื่นขอจดสิทธิบัตรทั้งในประเทศไทย และ ต่างประเทศเรียบร้อยแล้ว อีกทั้งยังร่วมมือกับฝ่ายการตลาดของศูนย์นาโนเทคโนโลยีเพื่อนำเสนอผลงานให้กับบริษัทในประเทศไทยที่ผลิต/นำเข้าชุดตรวจทางการแพทย์หลายบริษัท เพื่อกระตุ้นให้เกิดการถ่ายทอดเทคโนโลยีภายในประเทศ นอกจากนี้ยังร่วมมือกับฝ่ายจัดการถ่ายทอดเทคโนโลยีของ สวทช. เพื่อติดต่อกับบริษัทผลิตชุดตรวจทางการแพทย์ทั่วโลกไม่ว่าจะเป็น จากประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรปเพื่อเสนอการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับบริษัทดังกล่าว ซึ่งทั้งหมดยังอยู่ในขั้นตอนการเจรจาต่อรอง

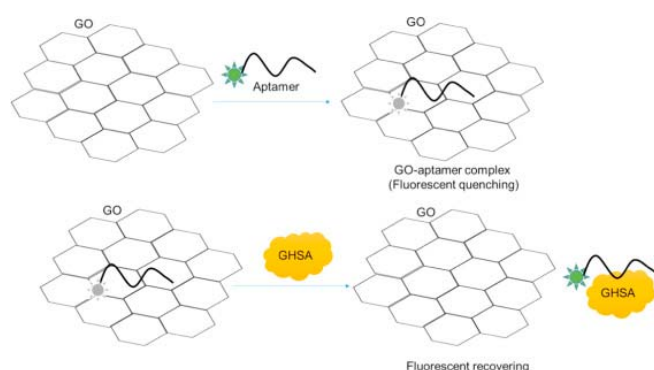
รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์ (15 ธ.ค 58-31 ธ.ค 59)

โครงการย่อยที่ 1: การพัฒนาการตรวจโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยวิธีการใช้วัสดุกราฟีนร่วมกับแอปตาเมอร์ในผู้ป่วยเบาหวาน (Development of graphene based aptasensor for glycosylated albumin detection in Diabetes Mellitus)

- ผู้ร่วมงานวิจัย:**
1. ดร. เดือนเพ็ญ จาปรุง
 2. ดร. ชุนเสก เสกขุนทด
 3. ดร. ภัทรพร ลักษณะสิริกุล
 4. ดร. ประภาศิริ พงษ์ประยูร
 5. น.ส. ชยาชล อภิวัต
 6. น.ส.วิริยา เชาจิรพันธุ์

ความก้าวหน้าในการดำเนินงาน

1. การทดสอบวิธีการตรวจไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยวิธีการใช้วัสดุกราฟีนร่วมกับแอปตาเมอร์ กับตัวอย่างจริง ในปีแรกทางทีมวิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดไกลเคตเตดอัลบูมินโดยใช้วัสดุกราฟีนร่วมกับแอปตาเมอร์ที่จับจำเพาะกับไกลเคตเตดอัลบูมิน โดยหลักการได้แสดงไว้ใน **รูปที่ 1** และพิสูจน์ได้ว่าวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจไกลเคตเตดอัลบูมินได้จริงในระดับห้องปฏิบัติการ และได้ทดสอบกับตัวอย่างจริงบางส่วนได้ผลการทดสอบเบื้องต้นเป็นที่น่าพอใจนั้น



รูปที่ 1: หลักการตรวจไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยวิธีการใช้ กราฟีนออกไซด์ร่วมกับแอปตาเมอร์ โดยเริ่มต้นด้วยการบ่มแอปตาเมอร์ที่ติดสลาด้วยฟลูออเรสเซนซ์กับกราฟีนออกไซด์เพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีโปรตีนเป้าหมายในระบบ โปรตีนจะไปแย่งจับกับแอปตาเมอร์ และมีการส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์

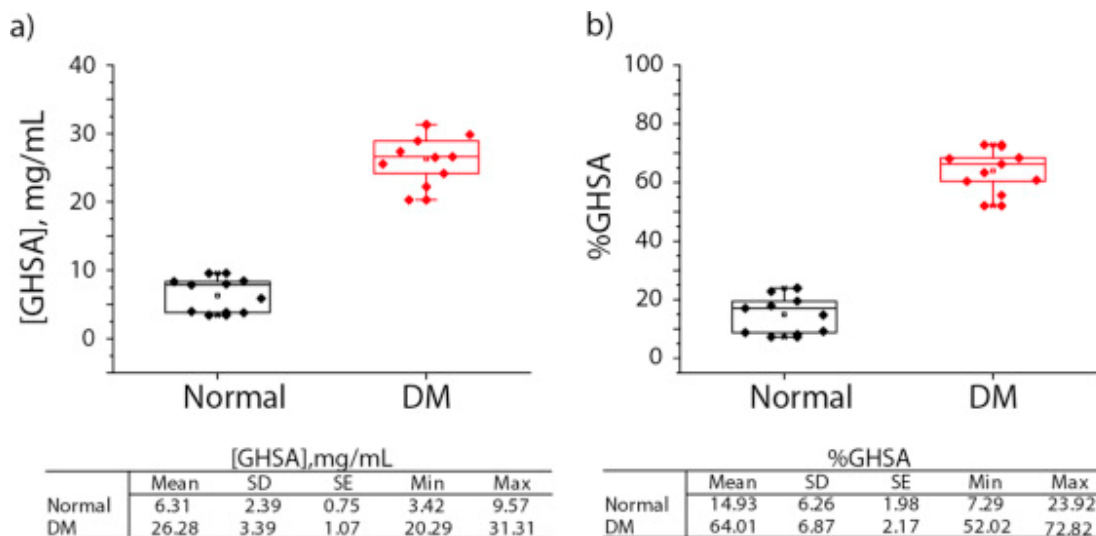
หลังจากนั้นทางคณะวิจัยได้ปรับสภาวะการทดสอบให้เหมาะสมมากขึ้นโดยการปรับสัดส่วนของสารละลาย กราฟีนออกไซด์ และแอปตาเมอร์ที่ใช้ โดยให้สารละลายกราฟีนออกไซด์มีความเข้มข้นที่ลดลงจากเดิมเป็น 2 mg/mL แล้วทำการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมจริง 2 ชุด โดยชุดที่ 1 (10 ตัวอย่าง) เป็นตัวอย่างซีรัมของคนปกติที่ไม่เป็นเบาหวาน และมีระดับ HbA1c ต่ำกว่า 4% ส่วนชุดที่ 2 (10 ตัวอย่าง) เป็นตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับ HbA1c สูงกว่า 8% โดยทำการทดสอบเพื่อวิเคราะห์ผล 2 แบบ คือ

1. ค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน ซึ่งคำนวณได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยตรง
2. ค่าเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน เทียบกับโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด โดยคำนวณได้จากสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไกลเคตเตดอัลบูมิน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด}} \times 100$$

*โดยค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด หาได้จากวิธี Enzymatic assay

หลังจากการทดสอบและวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดแล้วพบว่า ตัวอย่างทั้งสองชุดมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมดใกล้เคียงกันคืออยู่ระหว่าง 37-49 mg/mL ซึ่งอยู่ในช่วงปกติ สำหรับค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน และค่าเปอร์เซ็นต์ไกลเคตเตดอัลบูมินในผู้ป่วยเบาหวาน มีระดับที่สูงกว่าคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญ โดยคนปกติมีค่าความเข้มข้นของไกลเคตเตดอัลบูมิน 6.31 ± 2.39 mg/mL และค่าเปอร์เซ็นต์ไกลเคตเตดอัลบูมิน 14.93 ± 6.26 % สำหรับผู้ป่วยเบาหวานมีค่าความเข้มข้นของไกลเคตเตดอัลบูมิน 26.28 ± 3.39 mg/mL และค่าเปอร์เซ็นต์ไกลเคตเตดอัลบูมิน 64.01 ± 6.87 % กราฟแสดงความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองและรายละเอียดแสดงใน **รูปที่ 2**



รูปที่ 2: กราฟแสดงความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน (a) และเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (b) ในตัวอย่างซีรัมของคนปกติ และคนไข้เบาหวาน

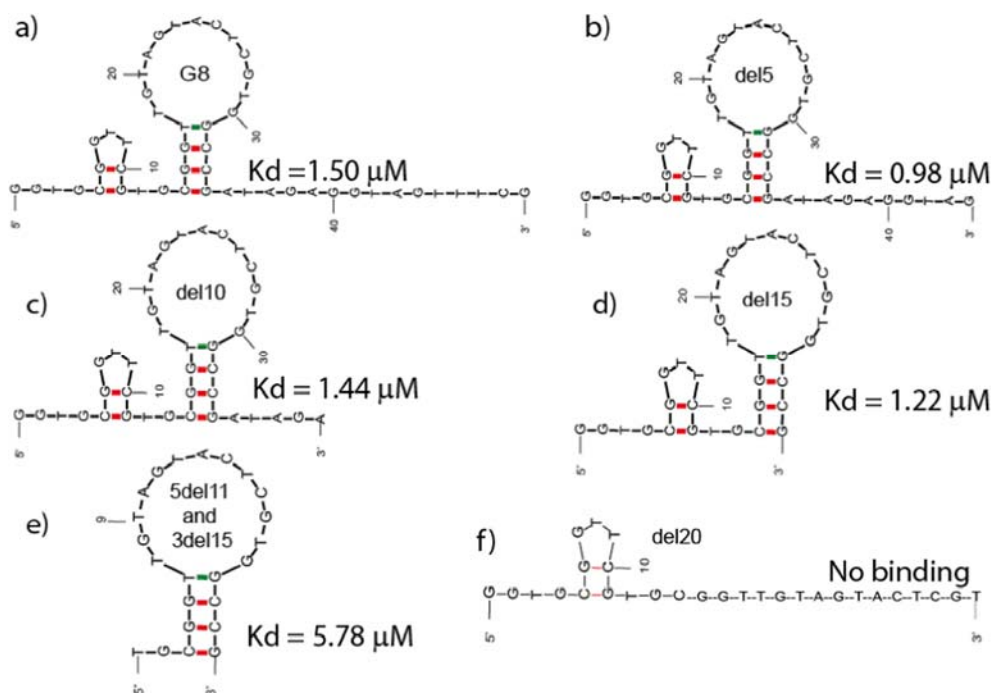
ผลการทดสอบในตัวอย่างจริงทั้งสองกลุ่ม ทำให้สรุปได้ว่าการวิเคราะห์โปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธีการพินร่วมกับแอปตาเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างคนไข้ทั้งสองกลุ่มได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์เบาหวาน รายละเอียดของผลการวิจัยข้างต้นได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี Impact factor 6.4 นอกจากนี้ คณะวิจัยยังได้ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการศึกษาการจับกันของโมเลกุลน้ำตาล กับโปรตีนอัลบูมิน เพื่อเข้าใจกลไกการเกิดโมเลกุลของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน และผลการศึกษาดังกล่าวก็ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี Impact factor 2.9 ดังแสดงในรายละเอียดด้านล่าง และผลงานวิจัยฉบับเต็มอยู่ใน เอกสารแนบหมายเลข 1 และ เอกสารหมายเลข 2 ตามลำดับ

เอกสารแนบหมายเลข 1 : Graphene based aptasensor for glycated albumin in diabetes mellitus diagnosis and monitoring. Biosens Bioelectron. 2016 Aug 15;82:140-5. 2016 Apr 7. Apiwat C, Luksirikul P, Kankla P, Pongprayoon P, Treerattrakoon K, Paiboonsukwong K, Fucharoen S, Dharakul T, Japrun D. (IF 6.4)

เอกสารแนบหมายเลข 2: Understanding the effects of two bound glucose in Sudlow site I on structure and function of human serum albumin: Theoretical studies.1. J Biomol Struct Dyn. 2016 Mar 4:1-23. Awang T, Wiriyatanakorn N, Saparpakorn P, Japrun D, Pongprayoon P. (IF 2.9)

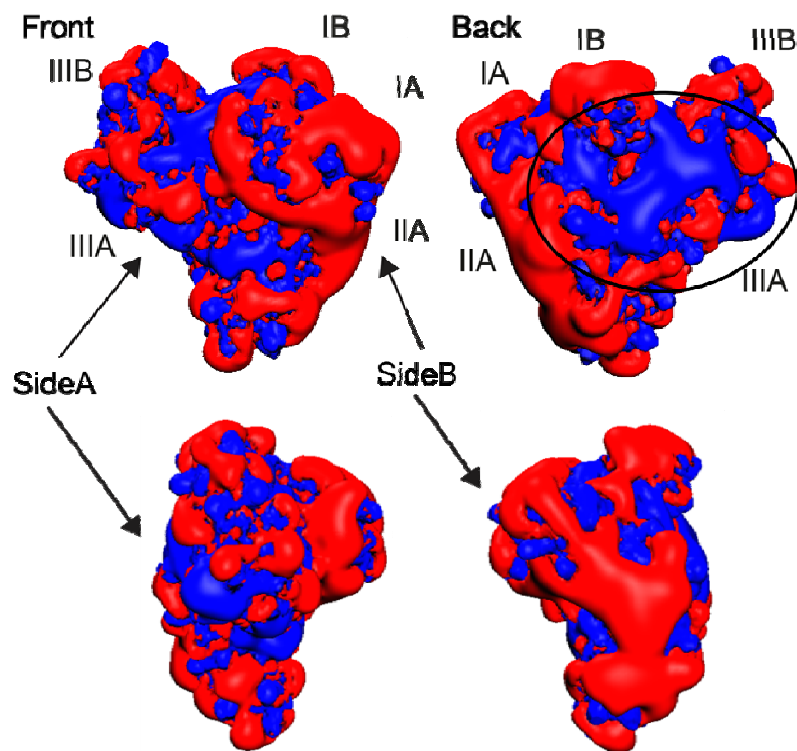
3. การศึกษาการจับกันของแอปตาเมอร์กับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เนื่องจากแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความยาวถึง 49 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จากโครงสร้างสองมิติ (Secondary structure) ที่คำนวณด้วยโปรแกรม MFold และจากการทดลองตัดปลาย 5' และ 3' ออกไปเพื่อหาส่วนที่น่าจะจับกับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน ก็พบว่าแอปตาเมอร์ที่สั้นที่สุดที่ยังคงสามารถจับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินได้มีขนาด 21 นิวคลีโอไทด์ (5del11and3del15) ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปที่ 3: โครงสร้างสองมิติของแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน ที่ใช้ในโครงการนี้

เพื่อให้เข้าใจกลไกการจับกันของแอปตาเมอร์ กับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน คณะวิจัยได้ใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ เพื่อค้นหาบริเวณ และชนิดของพันธะที่โมเลกุลทั้งสองชนิดจับกันโดยผลจากการสร้างแบบจำลองคอมพิวเตอร์ พบว่าแอปตาเมอร์ 5del11and3del15 จับกับโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินที่โดเมน 3 ปี (IIIB) ดังแสดงใน **รูปที่ 4** โดยการจับกันของแอปตาเมอร์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินทั้งบริเวณโดเมน 2 ปี (IIB) และ 1 ปี (IB) ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับกรดไขมัน



รูปที่ 4: รูปภาพแสดงบริเวณที่แอปตาเมอร์ 5del11and3del15 กับโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน

เมื่อพิจารณาดำเนินงานโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน จากผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทั้งสองชุดพบว่า ตำแหน่งที่จับกับแอปตาเมอร์คือ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ Q580, K754 K541 S579 K573 (sim1) และ K557 D562 K545 K560 K529 K402 (sim2) โดย 64% ของกรดอะมิโนทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย K545 K557 K574 K541 K573 เป็นตำแหน่งที่มีการเติมหมู่น้ำตาลบนโมเลกุลของโปรตีนอัลบูมิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอปตาเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน มากกว่าโปรตีนอัลบูมินโดยทั่วไป

ผลการศึกษาดังกล่าวได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี Impact factor 2.9 ดังแสดงในเอกสารแนบหมายเลข 3

เอกสารแนบหมายเลข 3: Exploring the interactions of a DNA aptamer with human serum albumins: simulation studies. J Biomol Struct Dyn. 2016 Sep 6:1-9. Panman W, Japrun D, Pongprayoon P. (IF 2.9)

4. การหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมาของคนโดยใช้แอปตาเมอร์ต่อซีรัมอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมิน

นอกจากการเทียบหาเปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน กับโปรตีนอัลบูมินรวมด้วยวิธีการใช้เอนไซม์แบบดั้งเดิมแล้ว ทางคณะวิจัยยังได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน เพิ่มเติมโดยการเทียบกับโปรตีนอัลบูมินรวมที่ได้จากการใช้แอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนอัลบูมินรวม ร่วมกับการใช้ออนูภาค กราฟีนออกไซด์ โดยชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

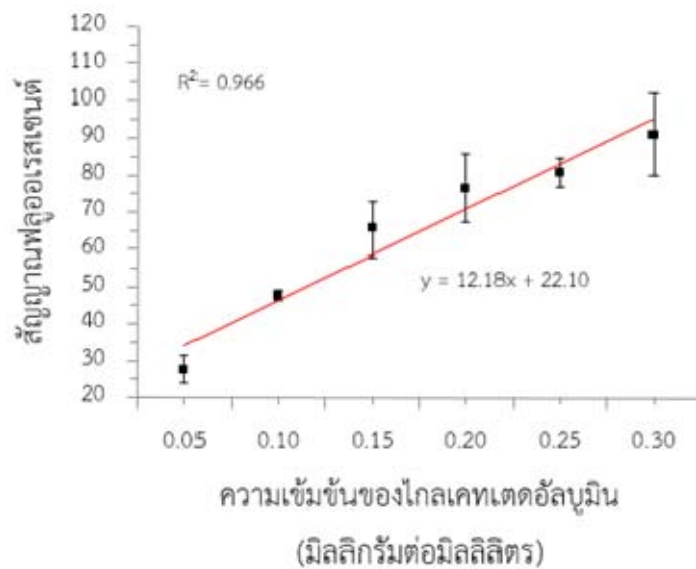
4.1 ชุดน้ำยาตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน ประกอบด้วย

- I. สารละลายแอปตาเมอร์ ชนิดที่ 1 : เป็นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินของคน ที่มีความยาว 47 เบส และมีลำดับดีเอ็นเอดังนี้คือ
5' TGC GGT TCG TGC GGT TGT AGT ACT CGT GGC CGA TAG AGG TAG TTT CG 3'
โดยดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ดังกล่าวนี้มีการติดสลาด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cy5 และละลายอยู่ในน้ำบริสุทธิ์ด้วยความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
- II. สารละลายแอปตาเมอร์ ชนิดที่ 2: เป็นดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนอัลบูมินรวมของคน ที่มีความยาว 87 เบส และมีลำดับดีเอ็นเอดังนี้คือ
5' ATA CCG GCT TAT TCA ATT CCC CCG GCT TTG GTT TAG AGG TAG TTG CTC ATT ACT TGT ACG CTC CGG ATG AGA TAG TAA GTG CAA TCT 3'
โดยดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ดังกล่าวนี้มีการติดสลาด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cy5 และละลายอยู่ในน้ำบริสุทธิ์ด้วยความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
- III. สารละลายโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินของคนชนิดมาตรฐาน: เป็นโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินของคนที่ผลิตขึ้นจากขบวนการไกลเคชั่น ซึ่งจะมีการเติมหมู่กลูโคสจำนวน 1-5 โมเลกุลต่อ 1 ต่อหนึ่งโมเลกุลของโปรตีน โปรตีนดังกล่าวละลายอยู่ในน้ำสะอาดด้วยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 90-100 เปอร์เซ็นต์
- IV. สารละลายโปรตีนอัลบูมินรวมของคนชนิดมาตรฐาน:
เป็นโปรตีนอัลบูมินรวมของคนแบบรีคอมบิแนนท์ที่แสดงออกในข้าวเพื่อป้องกันการเกิดไกลเคชั่น โดยโปรตีนดังกล่าวละลายอยู่ในน้ำสะอาดด้วยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยโปรตีนมีความบริสุทธิ์มากกว่า 96%
- V. สารละลายกราฟีนออกไซด์: เป็นกราฟีนออกไซด์ชนิดชั้นเดียวที่ละลายอยู่ในน้ำสะอาดด้วยความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 กรรมวิธีการหาปริมาณโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน

สิ่งส่งตรวจในกรรมวิธีนี้ สามารถใช้ พลาสมา ปัสสาวะ น้ำลาย น้ำตา และสารคัดหลั่งอื่นๆ โดยในรายละเอียดของกรรมวิธีที่อธิบายตามด้านล่างนี้จะใช้พลาสมาเป็นตัวอย่างของสิ่งส่งตรวจ

- I. การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน: ในการหาปริมาณไกลเคเทเตดอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมาของคน ด้วยกรรมวิธีการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์โปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน เทียบกับโปรตีนอัลบูมินรวม จำเป็นต้องทำการเปรียบเทียบค่ากับปริมาณไกลเคเทเตดอัลบูมินมาตรฐาน โดยค่าปริมาณไกลเคเทเตดอัลบูมินมาตรฐานจะถูกนำมาสร้างเป็นกราฟเส้นตรงมาตรฐาน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
 - ขั้นตอนที่ 1: เตรียมสารละลายกราฟีนออกไซด์ในน้ำบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 - ขั้นตอนที่ 2: เตรียมสารละลายแอปตาเมอร์ 1 ที่ติดสารฟลูออเรสเซนต์ Cy5 ให้มีความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
 - ขั้นตอนที่ 3: เตรียมสารละลายแอปตาเมอร์ 1-กราฟีนออกไซด์ โดยการผสมสารละลายกราฟีนในขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร กับสารละลายแอปตาเมอร์ 1 ในขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที
 - ขั้นตอนที่ 4: เตรียมสารละลายไกลเคเทเตดอัลบูมินมาตรฐานในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 - ขั้นตอนที่ 5: ผสมสารละลายที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลายไกลเคเทเตดอัลบูมินมาตรฐานจากขั้นตอนที่ 4 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ในเพลทแบบ 96 หลุมสีดำ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 10 ครั้ง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
 - ขั้นตอนที่ 6: นำสารผสมจากขั้นตอนที่ 5 ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 630/670 นาโนเมตร นำผลการทดสอบไปวิเคราะห์และเขียนกราฟดังแสดงใน **รูปที่ 5**



รูปที่ 5: กราฟเส้นตรงมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไกลเคเตดอลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0.05-0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาลีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแอมป์ตอมเมอ์-กราฟีนออกไซด์ที่พัฒนาขึ้น

หลังจากนำผลการทดสอบไปวิเคราะห์และเขียนกราฟเส้นตรงพร้อมทั้งคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรือ R square ซึ่งจากกราฟเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ได้อยู่ที่ 0.966 (ดังแสดงใน **รูปที่ 6**) ซึ่งถือว่าดีมาก และอธิบายได้ว่าตัวแปรทั้งสองคือความเข้มข้นโปรตีนไกลเคเตดอลูมิเนียมและสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มีความสัมพันธ์กันถึง 96% โดยตัวแปรทั้งสองจะเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกัน จึงสามารถสรุปได้ว่ากราฟเส้นตรงมาตรฐานของไกลเคเตดอลูมิเนียมที่ได้มีความน่าเชื่อถือในการตัดสินใจอยู่ที่ 96%

II. การหาปริมาณไกลโคเตตอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมา

ขั้นตอนที่ 1: ละลายตัวอย่างพลาสมา ที่แช่แข็งให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนที่ 2: เจือจางพลาสมาด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน อัตราส่วน 1 ต่อ 1000 ด้วยการดูดพลาสมา 1.5 ไมโครลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1500 ไมโครลิตร (เก็บไว้ใช้หาปริมาณอัลบูมินรวมในข้อต่อไป)

ขั้นตอนที่ 3: เตรียมสารละลายแอปตาเมอร์ 1 ที่มีสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cy5 ติดอยู่ที่ปลาย 5' ในน้ำบริสุทธิ์ให้ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

ขั้นตอนที่ 4: ละลายกราฟีนออกไซด์ในน้ำบริสุทธิ์ให้ความเข้มข้นที่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 5: ผสมสารละลายกราฟีนออกไซด์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้เข้ากับสารละลายแอปตาเมอร์ 1 ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรจาก ขั้นตอนที่ 3 บ่มสารผสมในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 6: นำสารละลายผสมจาก ขั้นตอนที่ 5 เติมน้ำเฟลทแบบ 96 หลุมสีดำ หลุมละ 20 ไมโครลิตร

ขั้นตอนที่ 7: นำพลาสมาที่เจือจางจาก ขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เติมน้ำในเฟลทที่มีสารละลายผสมจาก ขั้นตอนที่ 6 ทั้งหมด (20 ไมโครลิตร) และผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 10 ครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง และมืดเป็นเวลา 30 นาที

ขั้นตอนที่ 8: นำสารละลายผสมที่ได้จาก ขั้นตอนที่ 7 ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 630/670 นาโนเมตร (Excitation wavelength/Emission wavelength) และนำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มาคำนวณหาปริมาณไกลโคเตตอัลบูมิน

ขั้นตอนที่ 9: นำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จาก ขั้นตอนที่ 8 มาเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานไกลโคเตตอัลบูมิน คำนวณปริมาณไกลโคเตตอัลบูมินที่มีอยู่ในตัวอย่างพลาสมา ด้วยการแทนค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (y) จาก ขั้นตอนที่ 8 ในสูตร

$$y = 12.18x + 22.10 \quad (\text{สมการกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณไกลโคเตตอัลบูมิน})$$

III. การหาปริมาณอัลบูมินรวมในตัวอย่างพลาสมา

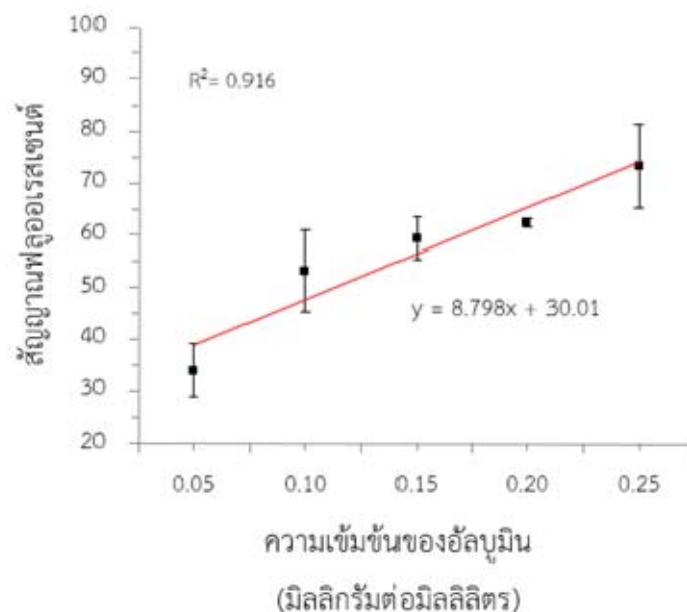
ขั้นตอนที่ 1: ใช้ตัวอย่างพลาสมาที่เจือจางแล้วจากข้อ II

ขั้นตอนที่ 2: เตรียมสารละลายแอปตาเมอร์ 2 ที่มีสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cy5 ติดอยู่ที่ปลาย 5' ในน้ำบริสุทธิ์ให้ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์

ขั้นตอนที่ 3: ใช้กราฟีนออกไซด์ในน้ำบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 4: ผสมสารละลายกราฟีนออกไซด์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้เข้ากับสารละลายแอปตาเมอร์ 2 ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรจาก ขั้นตอนที่ 2 บ่มสารผสมในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

- ขั้นตอนที่ 5: นำสารละลายผสมจาก ขั้นตอนที่ 4 เติมน้ำเฟลทแบบ 96 หลุมสีดำ หลุมละ 20 ไมโครลิตร
- ขั้นตอนที่ 6: นำพลาสมาที่เจือจางจาก ขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เติมนลงในเฟลทที่มีสารละลายผสมจาก ขั้นตอนที่ 5 ทั้งหมด (20 ไมโครลิตร) และผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 10 ครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง และมีดเป็นเวลา 30 นาที
- ขั้นตอนที่ 7: นำสารละลายผสมที่ได้จาก ขั้นตอนที่ 6 ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 630/670 นาโนเมตร (Excitation wavelength/Emission wavelength) และนำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มาคำนวณหาปริมาณอัลบูมินรวม
- ขั้นตอนที่ 8: นำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จาก ขั้นตอนที่ 7 มาเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานอัลบูมินรวม (รูปที่ 6) คำนวณปริมาณอัลบูมินรวมที่มีอยู่ในตัวอย่างพลาสมา ด้วยการแทนค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (y) จาก ขั้นตอนที่ 7 ในสูตร
- $$y = 8.798x + 30.01 \quad (\text{สมการกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณอัลบูมินรวม})$$



รูปที่ 6: กราฟเส้นตรงมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของอัลบูมิน ที่ความเข้มข้น 0.05-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ที่พัฒนาขึ้น

IV. การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน

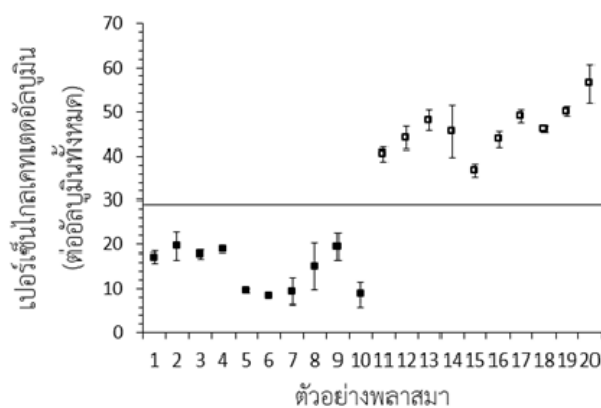
การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (%GA) สามารถทำได้ด้วยการเทียบปริมาณไกลเคเทตอัลบูมินกับปริมาณอัลบูมินรวม โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1: คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (%GA) โดยใช้สูตร

เปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (GA%) = (ปริมาณไกลเคเทตอัลบูมิน / ปริมาณอัลบูมินรวม) × 100

ขั้นตอนที่ 2: นำค่าปริมาณไกลเคเทตอัลบูมินและค่าปริมาณอัลบูมินรวมที่ได้จากข้อ 1 และข้อ 2 มาแทนค่าสูตรในขั้นตอนที่ 1

จากการทดสอบกับตัวอย่างจริงจำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งเป็นคนปกติ 10 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1-10) และคนไข้เบาหวาน 10 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 11-20) แล้วนำผลการทดสอบไปเขียนกราฟดังแสดงในรูปที่ 7 จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (ต่ออัลบูมินรวม) ในตัวอย่างพลาสมาของคนปกติ เฉลี่ยอยู่ที่ 14.4 ± 4.88 เมื่อนำค่าเฉลี่ยดังกล่าวเพิ่มขึ้น 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation หรือ SD) จะได้ค่าแบ่ง (cut off) อยู่ที่ 29.0 และเมื่อใช้ค่าแบ่งที่ 29.0 นี้พบว่าสามารถแบ่งแยกตัวอย่างของคนปกติจากผู้ป่วยเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (ต่ออัลบูมินรวม) ในวิธีแอปตาเมอร์-กราฟิน มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำไปใช้และมีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากมีการเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานดังที่ได้กล่าวในขั้นตอนข้างต้น



รูปที่ 7: ผลการทดสอบการตรวจวัดปริมาณไกลเคเทตอัลบูมินด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟินออกไซด์ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทตอัลบูมิน (ต่ออัลบูมินทั้งหมด) ในพลาสมาของคนปกติ (ตัวอย่างพลาสมา 1-10) และผู้ป่วยเบาหวาน (ตัวอย่างพลาสมา 11-20)

4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจ กับชุดตรวจทางการค้า

ในการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจทางการค้า ซึ่งเป็นชุดตรวจสำหรับหาปริมาณไกลโคเทตอัลบูมิน โดยใช้ เทคนิค อีไลซ่า (Enzyme-Linked Immunosorbent assay; ELISA) โดยได้ใช้ตัวอย่างพลาสมาทั้งหมด 20 ตัวอย่างที่ทราบค่า HbA1c มาทดสอบ โดยแบ่งเป็นกลุ่มปกติ 10 ตัวอย่างและคนไข้เบาหวาน 10 ตัวอย่าง นำผลการทดสอบไปวิเคราะห์ด้วย 2x2 Contingency Table ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% ซึ่งดีกว่าเมื่อเทียบกับชุดตรวจทางการค้าที่ใช้แอนติบอดีที่มีค่าความไวและความจำเพาะอยู่ที่ 50% และ 60% ตามลำดับเมื่อทดสอบกับตัวอย่างพลาสมาจริงจำนวน 20 ตัวอย่างที่ทราบค่า HbA1c ตารางแสดงการเปรียบเทียบระหว่างชุดตรวจทางการค้า และชุดตรวจจากการประดิษฐ์นี้แสดงในตาราง 3

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีแอปตาเมอร์-กราฟีนออกไซด์ เทียบกับวิธีมาตรฐาน (ตรวจวิเคราะห์ HbA1c) ในการตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยเบาหวาน

แอปตาเมอร์-กราฟีน ออกไซด์	HbA1C		
	ผลบวก (>6.5)	ผลลบ	ทั้งหมด
	N	N	N
ผลบวก (>29)	10	0	10
ผลลบ	0	10	10
ทั้งหมด	10	10	20
	ความไว : 100.0%	ความจำเพาะ : 100.0%	
	$p < 0.0001$		

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธี ELISA (ชุดตรวจที่มีจำหน่ายทางการค้าที่ใช้แอนติบอดี) เทียบกับวิธีมาตรฐาน (ตรวจวิเคราะห์ HbA1c) ในการตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยเบาหวาน

ชุดตรวจทางการค้า ที่ใช้แอนติบอดี	HbA1C		
	ผลบวก (>6.5)	ผลลบ	ทั้งหมด
	N	N	N
ผลบวก (>3.8)	5	4	9
ผลลบ	5	6	11
ทั้งหมด	10	10	20

ความไว : 50.0% ความจำเพาะ : 60.0%

$p = 1.0000$

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจทางการค้ากับชุดตรวจในการประดิษฐ์นี้

คุณสมบัติ	ชุดตรวจทางการค้า ที่ใช้แอนติบอดี	ชุดตรวจที่ใช้แอปตาเมอร์ ตามการประดิษฐ์นี้
ความไว	50%	100%
ความจำเพาะ	60%	100%
เวลา	3 ชั่วโมง	30 นาที

รายละเอียดการตรวจวัดดังกล่าวได้ยื่นจดสิทธิบัตรแล้ว ดัง เอกสารแนบหมายเลข 4

5. การสร้างต้นแบบเครื่องตรวจโปรตีนไกลเคตเตออลบูมินเพื่อวิเคราะห์เบาหวาน

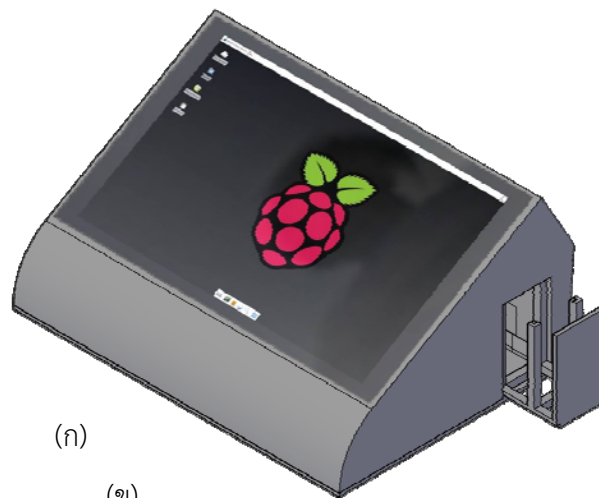
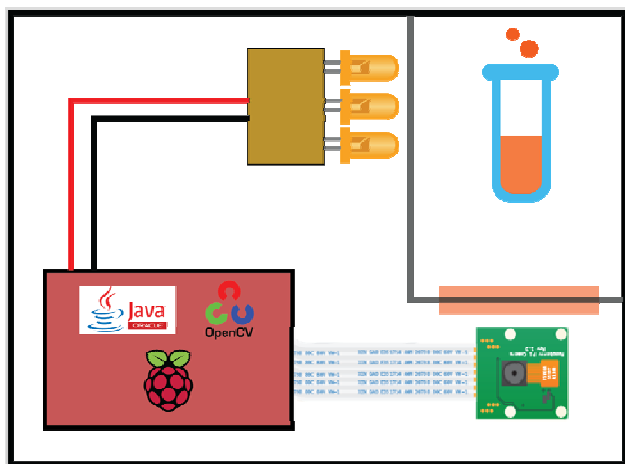
เนื่องจากคณะวิจัยมีความจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องฟลูออโรมิเตอร์ในการวัดปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไกลเคตเตออลบูมิน และเครื่องมือที่ใช้ในขั้นตอนการทดสอบในหัวข้อที่ 1 นั้นเป็นเครื่องมือขนาดใหญ่ที่สามารถวัดได้ทีละมากที่สุดคือ 96 ตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นต้องใช้เพลทสีดำ และเครื่องมือขนาดใหญ่ที่มีราคาแพง ซึ่งไม่เหมาะสม และคุ้มค่าสำหรับการตรวจวัดตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย คณะวิจัยจึงได้สร้างต้นแบบเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ขนาดเล็กและราคาถูกเพื่อใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างจำนวนไม่มาก และใช้พื้นที่น้อยลงเหมาะสมสำหรับโรงพยาบาลขนาดเล็ก หรือผู้ป่วยใช้ทดสอบเองที่บ้าน โดยเริ่มต้นจากการทดสอบกรรมวิธีในหัวข้อที่ 1 กับเครื่อง Portable fluorometer ที่มีขายทั่วไป ดังแสดงใน **รูปที่ 8**



รูปที่ 8: แสดงเครื่อง portable fluorometer ที่ใช้สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเป็นต้นแบบสภาวะของเครื่องต้นแบบที่คณะวิจัยกำลังสร้างขึ้น

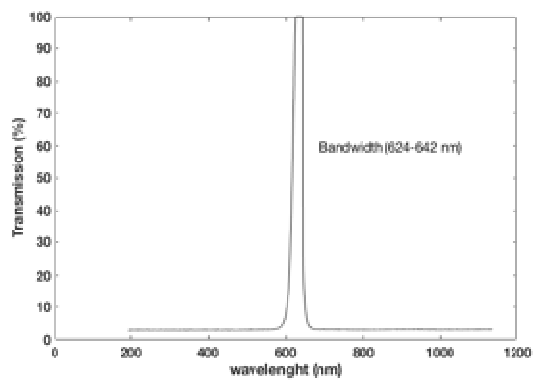
สำหรับต้นแบบที่คณะวิจัยออกแบบขึ้นมาประกอบไปด้วย 5 ส่วน ดังแสดงใน **รูปที่ 9** และ รายละเอียดด้านล่าง

1. ส่วนประมวลผลกลาง ซึ่งได้เลือกใช้เทคโนโลยี IoT (Internet Of Thing) ด้วยบอร์ด Raspberry Pi 3 Model B แล้วเขียนโปรแกรมควบคุมด้วยเทคโนโลยี Java Programming ซึ่งในส่วนของการประมวลผลภาพและแสงที่เรื่อออกมาด้วย Open Source Library ของ Intel OpenCV
2. ส่วนการแสดงผล ใช้จอแสดงผลระบบ Touch Screen Display เชื่อมต่อกับบอร์ด Raspberry Pi 2.0 เพื่อไว้ให้ผู้ได้ Interact กับตัวเครื่องและตัวโปรแกรม
3. ส่วนกล้อง ใช้กล้องของ WaveForm รุ่น Raspberry Pi Camera (B) Rev 2.0 ซึ่งสามารถปรับโฟกัสค่าต่างๆ ได้ ในตัวกล้องนี้ จำเป็นต้องติด Filter เพื่อใช้กรองสัญญาณภาพในช่วงการเรืองแสง Center of Wavelength (CWL) = 670 nm และ Full Width at Half Maximum (FWHM) 5 ± 2 nm
4. ส่วนการกระตุ้นสารเรืองแสง ใช้หลอด LED ที่ความยาวคลื่น 635-650 nm ซึ่งจะได้แสงสีแดงระเรื่อ
5. ส่วนที่เก็บสารตัวอย่าง จะต้องเป็นส่วนที่ได้รับการกระตุ้นของแสงจากหลอด LED และต้องเป็นส่วนที่กล้องสามารถจะเก็บภาพสัญญาณเพื่อใช้ในการประมวลผลต่อไปได้

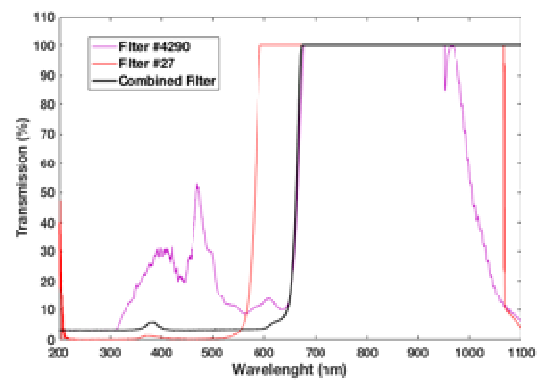


รูปที่ 9 : แสดงร่างต้นแบบเครื่องฟลูออโรมิเตอร์สำหรับการตรวจไกลเคเทเตดอัลบูมิน (ก) แผนผังการจัดวาง ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่อง และ (ข) การออกแบบตัวเครื่องเพื่อประกอบส่วนต่างๆ เข้าด้วยกัน

การสร้างต้นแบบเริ่มต้นจากการเลือก Light Source และ Filter ที่จะประกอบเป็นส่วนของ 3 และ 4 เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ตาม specification ที่ได้ออกแบบไว้ ผู้วิจัยได้ใช้เครื่อง Ocean Optics Spectrometer เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกส่วนประกอบต่าง และได้กราฟตามรูปด้านล่าง จะเห็นได้ว่า Filter แผ่นพลาสติกที่เหมาะสมกับการตรวจไกลเคเทเตดอัลบูมิน จำเป็นต้องใช้แผ่นพลาสติกกรองแสงถึง 2 เบอร์รวมกัน นั่นคือ Filter เบอร์ #4290 และ #27 ซึ่งเป็นแผ่นกรองแสงสีม่วงเข้มและแดงเข้ม



(ก)



(ข)

รูปที่ 9: Spectrum ของการวัดแสงของ (ก) หลอด LED สำหรับ Exciation Source และ (ข) ช่วยการรับแสงของ Filter จากแผ่นพลาสติกที่ใช้สำหรับกล้องถ่ายภาพ

เมื่อได้ LED เป็น Excitation Source และได้แผ่นกรองแสงมาติดหน้ากล้องแล้ว ต่อมา ก็คือการปริ้นท์ในส่วนของตัวเครื่องมือ (Body) ด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ Mantika จากวัสดุเส้นพลาสติก PLA สีดำดัง**รูปที่ 10** เพื่อให้ไม่รบกวนสัญญาณการเรืองแสงของ Sample จากนั้น ก็ทำการออกแบบและ Implement โปรแกรม Diabetes Diagnostics Tool (DDT) ด้วย Java Technology ซึ่งจะทำหน้าที่รับสัญญาณการเรืองแสงจากบอร์ด

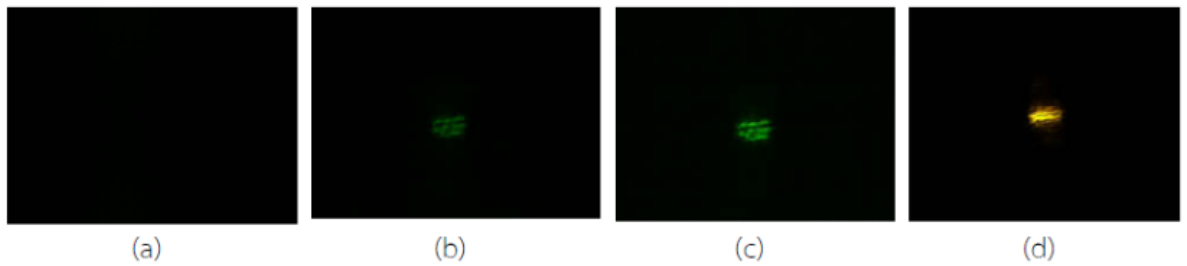


Raspberry Pi และมาประมวลผลด้วย OpenCV ต่อไป

รูปที่ 10: รูปภาพแสดงต้นแบบเครื่องตรวจไกลเคตเตดอัลบูมิน Version 1

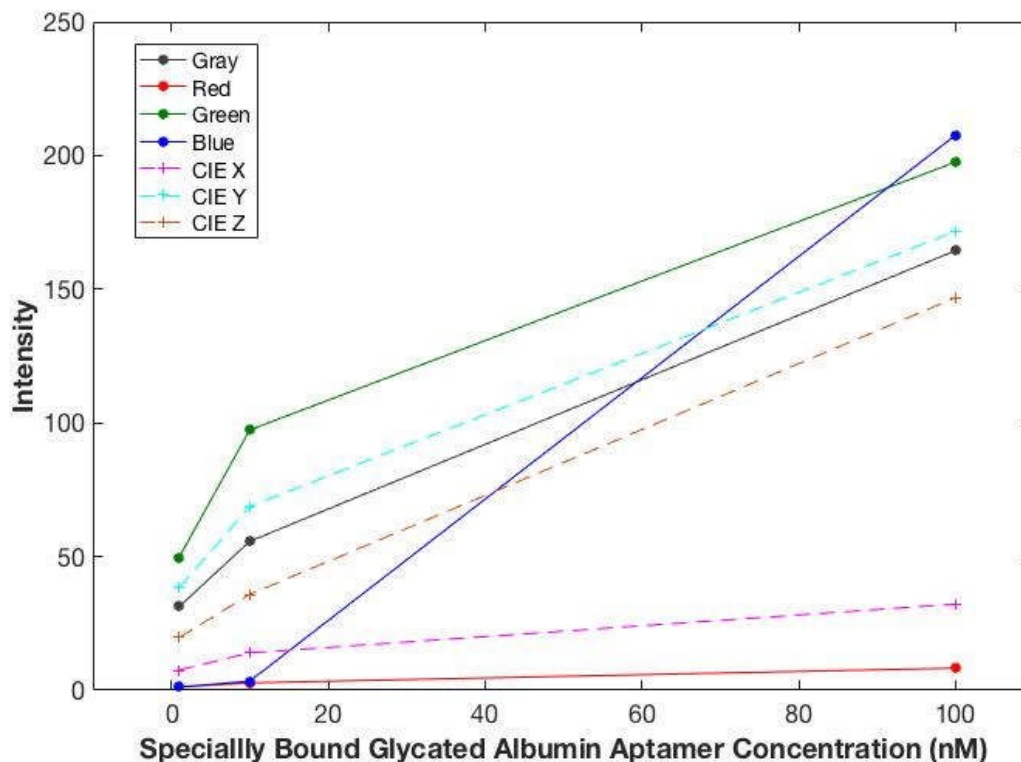
สำหรับรายละเอียดการประมวลผลของตัวโปรแกรม DDT จะเน้นการประมวลผล Intensity ของความเข้มของการเรืองแสงของภาพ ซึ่งตามองค์กรรณานาชาติที่เป็นองค์กรกำหนดมาตรฐานการส่องสว่าง หรือการจัดการภาพและสีของภาพ (International Commission on Illumination - CIE) ทำให้ผู้วิจัยสนใจ Color Space 3 แบบ ซึ่งเป็นมาตรฐานสีที่มี channel ของการวัด Luminance Component อาทิเช่น CIE XYZ, CIE $L^*a^*b^*$, CIE $L^*u^*v^*$ เป็นต้น

โดยในการทำการทดสอบเบื้องต้น เป็นการวัดความเข้มข้นของสารฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่บนแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน โดยแอปตาเมอร์มีความเข้มข้นที่ 100, 10, 1 และ 0.1 นาโนโมลาร์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง โดยภาพที่กล้อง Raspberry pi Camera กรองสัญญาณผ่านจาก Filter ทำให้ได้รับสัญญาณภาพการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์เฉพาะในช่วงความยาวคลื่น 670 nm ดังภาพด้านล่าง



รูปที่ 11: ภาพจากกล้อง Raspberry Camera หลังจากกรองสัญญาณผ่าน Filter Edmund ที่ 670 nm ที่ความเข้มข้นของแอปตามเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทดอลูมิเนียม (a) 0.1 nM (b) 1 nM (c) 10 nM และ (d) 100 nM

จากนั้น วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกมา และวิเคราะห์ความเข้มของความยาวแสงโดยใช้ Gray scale, RGB และ CIE XYZ แล้วพล็อตออกมาเป็นกราฟดัง**รูปที่ 12** จะเห็นได้ ว่า เครื่องวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพาเพื่อตรวจโปรตีนไกลเคเทดอลูมิเนียมด้วยวิธีการใช้วัสดุกราฟีน ร่วมกับแอปตามเมอร์เพื่อติดตามภาวะเบาหวานดังกล่าว ยังไม่สามารถวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของแอปตามเมอร์ ที่จำเพาะต่อโปรตีนไกลเคเทดอลูมิเนียม ที่ความเข้มข้น 0.1 nM ได้ และด้วยภาพที่กล้อง Raspberry Camera ที่ รับผิดชอบจะไม่มีส่วนผสมของ Channel สีที่เป็นสีน้ำเงินเลย จึงทำให้การวัดและวิเคราะห์ค่าในช่วง Channel สีน้ำเงินเกิดความผิดพลาดได้มาก ส่วนในการวัดและวิเคราะห์ค่าสีในระบบ Color Space CIE XYZ จะเห็นได้ว่า สามารถวัดค่าได้ตามปกติ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า จะไม่สามารถหาค่ากราฟมาตรฐานโดยใช้ Linear Regression ได้ เมื่อมีการปรับจูนและปรับสภาวะตัวเครื่องและซอฟต์แวร์แล้ว น่าจะใช้กราฟลอการิทึม หรือกราฟเอกซ์โพเนนเชียล แทนมากกว่า



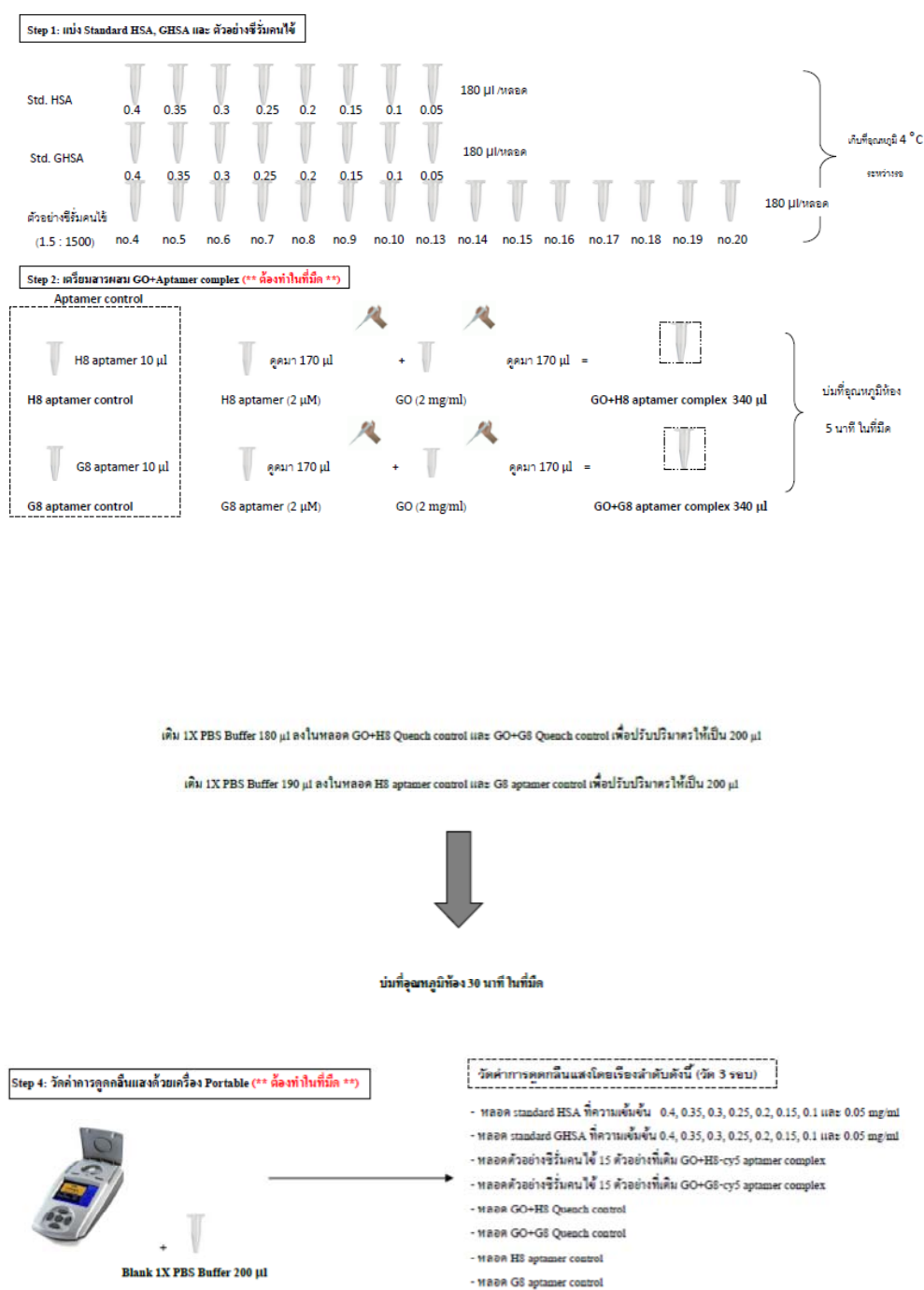
รูปที่ 12: การวิเคราะห์ค่าสีของภาพที่ถูกถ่ายจากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยระบบ Gray scale, RGB และ CIE XYZ

เอกสารต้นแบบเครื่องฟลูออโรมิเตอร์แบบพกพา นี้ ได้แสดงใน เอกสารแนบหมายเลข 5

6. ผลการทดสอบภาคสนาม

การทดสอบภาคสนามได้ดำเนินการโดยนักเทคนิคการแพทย์ งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยการใช้ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยพลาสมาของคนปกติ 10 ตัวอย่าง และผู้ป่วยเบาหวาน 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 1 ปี

ก่อนการทดสอบภาคสนามได้มีการแจกเอกสารวิธีการทดสอบ รวมทั้งฝึกสอนนักเทคนิคการแพทย์ล่วงหน้าก่อน 1 วัน และดำเนินการตามกระบวนการดังนี้ (เอกสารแนบหมายเลข 6 และ 7)



รูปที่ 13: เอกสารอธิบายขั้นตอนการตรวจวัด

ผลการทดสอบโดยนักเทคนิคการแพทย์ ในตัวอย่างคนปกติ 10 ตัวอย่างพบว่าค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน มีค่าอยู่ในช่วง 4.4-121.0 mg/ml (เฉลี่ย 90.0 mg/ml) และค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเทตอัลบูมินอยู่ในช่วง 0.3-11.2 mg/ml (เฉลี่ย 4.8 mg/ml) ส่วนค่า %ไกลโคเทตอัลบูมิน อยู่ในช่วง 3.7-6.6% (เฉลี่ย 5.2%)

ตารางที่ 4: ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเทตอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมาคนปกติ ที่ทดสอบโดยนักเทคนิคการแพทย์

คนปกติ	ค่าความเข้มข้น HSAที่ได้ (mg/ml)	ค่าความเข้มข้น GHSA ที่ได้ (mg/ml)	%GHSA
1	121.0	4.4	3.7
2	84.0	4.0	4.8
3	86.1	4.6	5.4
4	174.1	10.4	6.0
5	59.2	2.5	4.3
6	134.9	7.5	5.5
7	169.5	11.2	6.6
8	4.5	0.3	5.8
9	4.4	0.3	6.0
10	62.1	2.5	4.0
ค่าเฉลี่ย	90.0	4.8	5.2

สำหรับผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างคนไข้เบาหวานจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยนักเทคนิคการแพทย์พบว่า ค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินอยู่ในช่วง 51.7-174.8 mg/ml และความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเทตอัลบูมินอยู่ในช่วง 0.3-10.6 mg/ml ส่วนค่า %ไกลโคเทตอัลบูมินอยู่ในช่วง 4.2-6.0%

ตารางที่ 5: ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมาคนไข้เบาหวาน
ที่ทดสอบโดยนักเทคนิคการแพทย์

ผู้ป่วยเบาหวาน	ค่าความเข้มข้น HSAที่ได้ (mg/ml)	ค่าความเข้มข้น GHSA ที่ได้ (mg/ml)	%GHSA
11	125.6	7.5	6.0
12	42.5	1.8	4.2
13	113.9	6.2	5.4
14	152.0	8.6	5.6
15	5.3	0.3	5.8
16	69.7	3.1	4.4
17	51.7	2.3	4.5
18	98.5	5.3	5.4
19	174.8	10.6	6.0
20	68.6	3.0	4.4
ค่าเฉลี่ย	90.3	4.9	5.2

ในขณะเดียวกันทางคณะวิจัยได้ใช้ตัวอย่างชุดเดียวกัน ทำการทดสอบด้วยวิธีการเดียวกันในเวลา
ใกล้เคียงกัน พบว่าในตัวอย่างคนปกติจำนวน 10 ตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินอยู่ในช่วง 83.5-
129.0 mg/ml (เฉลี่ย 96.3 mg/ml) และโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินอยู่ในช่วง 2.6-4.9 mg/ml (เฉลี่ย 3.2
mg/ml) ส่วน %ไกลโคเตตอัลบูมินอยู่ในช่วง 2.6-4.9% (3.4%)

ตารางที่ 6: ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมาคนปกติ ที่ทดสอบโดยคณะวิจัย

คนปกติ	ค่าความเข้มข้น HSAที่ได้ (mg/ml)	ค่าความเข้มข้น GHSA ที่ได้ (mg/ml)	%GHSA
1	96.0	3.0	3.2
2	94.7	3.5	3.7
3	96.6	2.9	3.0
4	97.0	2.6	2.7
5	129.0	3.3	2.6
6	93.1	3.2	3.4
7	86.7	3.1	3.6
8	83.5	4.1	4.9
9	97.0	3.6	3.7
10	89.0	2.9	3.2
ค่าเฉลี่ย	96.3	3.2	3.4

ในส่วนของคนไข้เบาหวานจำนวน 10 ตัวอย่างนั้น คณะวิจัยพบว่า ค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินอยู่ในช่วง 78.4-106.2 mg/ml (เฉลี่ย 89.5 mg/ml) และค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินอยู่ในช่วง 2.0-3.8 mg/ml (เฉลี่ย 3.1 mg/ml) ส่วนค่า % ไกลโคเตตอัลบูมินอยู่ในช่วง 2.1-4.3% (เฉลี่ย 3.5%)

ตารางที่ 7: ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมินในตัวอย่างพลาสมาคนไข้เบาหวาน ที่ทดสอบ
โดยนักคณะวิจัย

ผู้ป่วยเบาหวาน	ค่าความเข้มข้น HSAที่ได้ (mg/ml)	ค่าความเข้มข้น GHSA ที่ได้ (mg/ml)	%GHSA
11	96.0	2.0	2.1
12	106.2	3.8	3.6
13	95.0	3.4	3.5
14	82.9	2.8	3.4
15	78.4	2.7	3.5
16	85.1	3.0	3.5
17	96.3	3.1	3.3
18	78.7	3.4	4.3
19	89.6	3.7	4.1
20	86.7	3.3	3.8
ค่าเฉลี่ย	89.5	3.1	3.5

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบ ที่ดำเนินการโดยนักเทคนิคการแพทย์ กับทีมวิจัยพบว่า ช่วงค่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน มีค่าใกล้เคียงกันในทั้งในคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานเอ็นไซมาติก (40 mg/ml) ประมาณ 2 เท่า

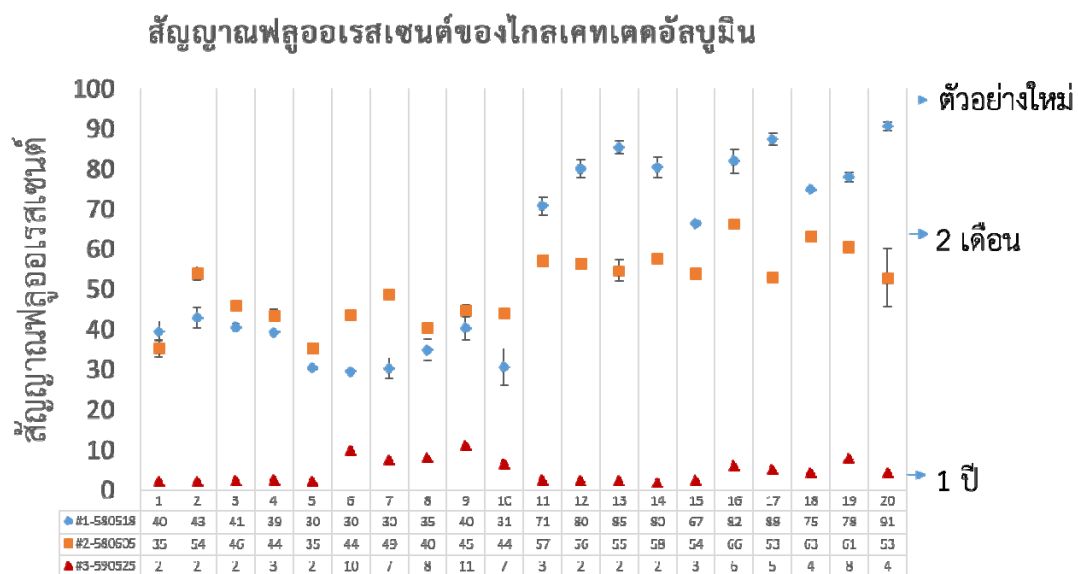
ส่วนค่าไกลโคเตตอัลบูมิน และ% ไกลโคเตตอัลบูมิน ที่วิเคราะห์โดยนักเทคนิคการแพทย์ และทีมวิจัยมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อวิเคราะห์โดยละเอียดแต่ละตัวอย่างพบว่า ค่าที่วิเคราะห์โดยทีมวิจัยมีช่วงที่แคบกว่าค่าที่วิเคราะห์โดยนักเทคนิคการแพทย์ ซึ่งอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนส่วนบุคคล (Human error)

จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมิน ไกลโคเตตอัลบูมิน และ%ไกลโคเตตอัลบูมินจากตัวอย่างคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวานชุดนี้ (เก็บไว้ที่ -20 C เป็นเวลา 1 ปี) ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้แตกต่างจากผลการวิเคราะห์ที่ใช้ตัวอย่างสดใหม่ เนื่องจากเมื่อใช้ตัวอย่างสดใหม่ จะเห็นความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน ในคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวานอย่างชัดเจน โดยค่าความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินจะมีค่ามากกว่า 10 mg/ml ในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งน่าจะเกิดจากความไม่เสถียรของ

โปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินในสภาวะที่อยู่ในพลาสมา หรือซีรัมซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลที่มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นแบบย้อนกลับได้ตลอดเวลา หรืออาจเกิดจากการเสถียรภาพของโปรตีนร่วมด้วย จึงได้ทำการศึกษาความเสถียรของโปรตีนอัลบูมิน และไกลเคเทตอัลบูมิน และรายงานในหัวข้อถัดไป

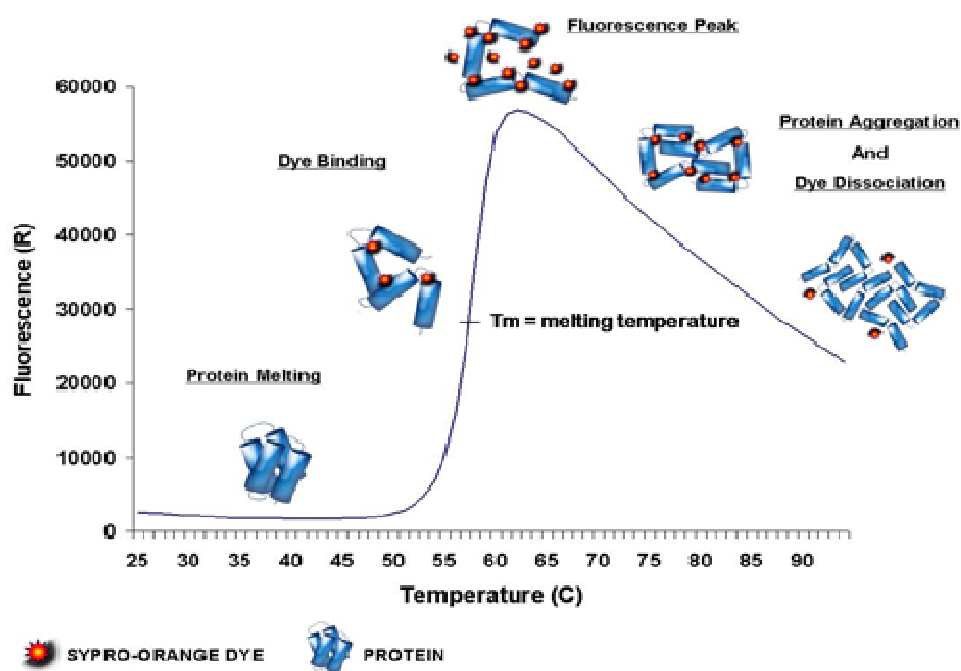
7. ความเสถียร (Stability) ของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน

เนื่องจากผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินที่ได้จากตัวอย่างคนไข้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 2 เดือน และ 1 ปี มีค่าที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างคนไข้ที่เก็บใหม่ แสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียรของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน ดังแสดงในรูปด้านล่าง ซึ่งอาจเกิดจากการเกิดไกลเคชั่นแบบย้อนกลับในสภาวะที่มีน้ำตาลอยู่ในปฏิกิริยา หรือมีการสลายตัวของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน



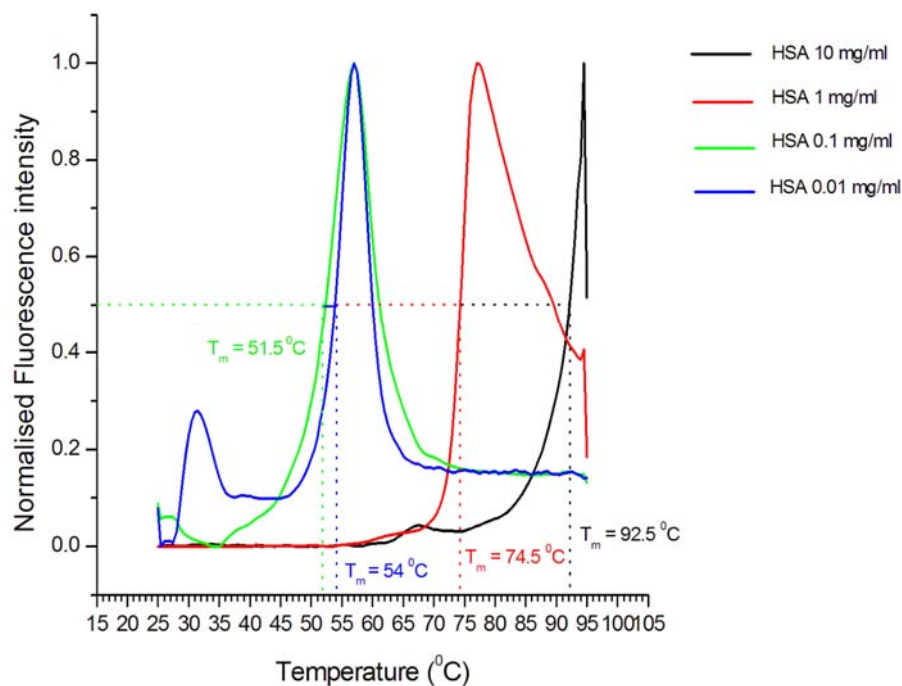
รูปที่ 14: สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงตามระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างไว้ใน -20°C ของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินจากตัวอย่างพลาสมาของคนปกติ (1-10) และ ผู้ป่วยเบาหวาน (11-20)

จากการวิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินในพลาสมา ก็พบว่ามีความเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่เก็บเช่นกัน แต่อัตราการลดลงไม่สูงเท่ากับการลดลงของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน คณะวิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยการศึกษาความคงทนของโปรตีนบริสุทธิ์อัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมิน เทียบกับโปรตีนควบคุมคืออัลบูมินของวัว (Bovine Serum Albumin) ด้วยวิธี Thermal Shift Assay โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์ชนิด SYPRO-ORANGE ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือ จะจับกับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และมักจะซ่อนตัวอยู่ในโครงสร้างด้านในของโปรตีน ซึ่งกรดอะมิโนชนิดดังกล่าวจะเคลื่อนตัวออกมาอยู่ด้านนอกเมื่อโครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลง หรือเสียหายไปซึ่งอาจเกิดจากสารเคมีรุนแรง pH ที่สูง หรือ ต่ำกว่า pKa มากๆ และในสถานะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งทำให้ SYPRO-ORANGE จับกับโปรตีนได้มากขึ้น และส่งสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้สูงขึ้นด้วย ดังนั้นการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิของโปรตีน จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เสถียรภาพของโปรตีนได้วิธีหนึ่ง ดังแสดงในรูปด้านล่าง



รูปที่ 15: แสดงหลักการวิเคราะห์ความเสถียรของโปรตีนด้วยวิธี Thermal Shift Assay โดยใช้ SYPRO-ORANGE ในการจับกับกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ และสัญญาณที่ได้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อโปรตีนเสียหายมากขึ้น โดยอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนเสียหาย 50% คือจุด Melting temperature (Tm) ของโปรตีน และถ้า Tm มีค่าสูงแสดงว่าโปรตีนชนิดนั้นมีความเสถียรสูงเช่นกัน

จากผลการทดสอบโปรตีนอัลบูมิน ไกลโคเตตอัลบูมิน และอัลบูมินของวัว ที่ความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ (0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml และ 10 mg/ml) พบค่า Melting temperature ของโปรตีนทั้งสามชนิดมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่มากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากความร้อนถูกส่งผ่านไปที่โปรตีนที่ความเข้มข้นต่ำ ได้ดีกว่าความเข้มข้นที่สูง จึงทำให้โปรตีนที่ความเข้มข้นต่ำๆ มีความเสถียรต่ำไปด้วย อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ความเข้มข้น 10 mg/ml มีค่า Melting temperature 2 จุด ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนบางส่วนเกิดการตกตะกอน และเริ่มเสียสภาพที่อุณหภูมิที่ต่ำ โดยเฉพาะโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน

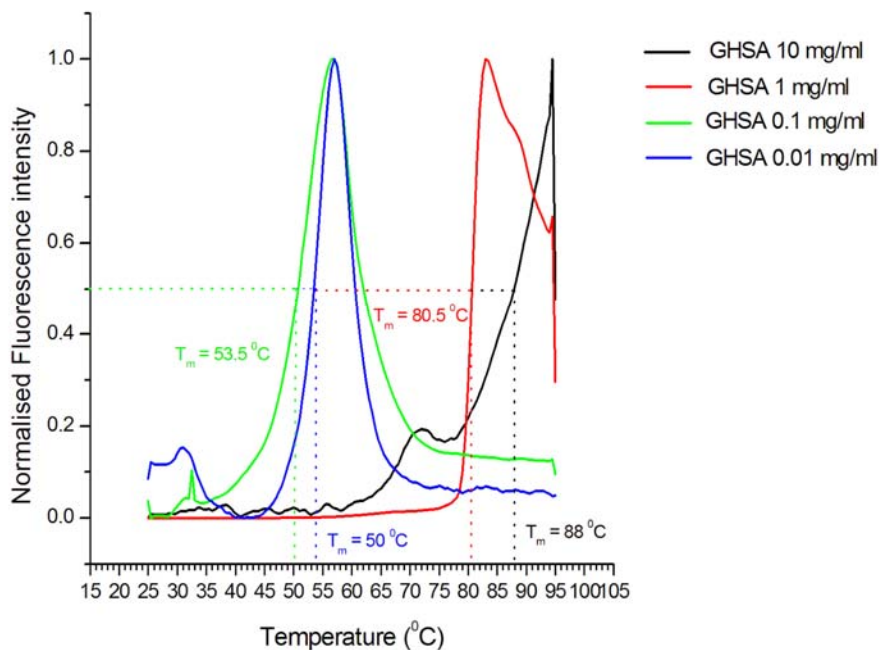


รูปที่ 16: ผลการทดสอบความเสถียรของโปรตีนอัลบูมินของคน ด้วยวิธี Thermal Shift Assay

ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินที่ใช้ในการทดสอบนี้อยู่ระหว่าง 0.01-10 mg/ml ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นในเลือดของคนปกติ (40-50 mg/ml) และพบว่า Melting temperature ของโปรตีนอัลบูมินของคนอยู่

ระหว่าง 51-74 °C ซึ่งใกล้เคียงกับ Melting temperature ของโปรตีนอัลบูมินของวัว (49.5-70.5 °C) ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกัน อาจเกิดจากโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันมาก

สำหรับโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน พบว่าค่า Melting temperature อยู่ระหว่าง 50-80.5 °C สำหรับตัวอย่างที่ใช้ความเข้มข้น 0.01-1 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นของไกลเคเทเตดอัลบูมินในเลือดของคนปกติ แต่ในตัวอย่างที่มีโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน 10 mg/ml ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่สูง และพบได้ในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าค่า Melting temperature มีสองจุด คือที่ 65 °C และ 88 °C แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไกลเคเทเตดที่ความเข้มข้นสูงอาจเกิดการตกตะกอน และเสียสภาพได้ง่ายกว่า โปรตีนที่ความเข้มข้นต่ำ



รูปที่ 17: ผลการทดสอบความเสถียรของโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมินของคน ด้วยวิธี Thermal Shift Assay

ข้อสรุปจากผลการทดสอบภาคสนามโดยใช้ตัวอย่างพลาสมา ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 C และจากการวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์คือ

1. โปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินในพลาสมาของคน มีความไม่เสถียร เนื่องจากในซีรัมมีน้ำตาลอยู่ จึงเกิดการเติมหมู่น้ำตาลแบบย้อนกลับตลอดเวลา (ปฏิกิริยาไกลเคชั่น)
2. โปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน มีความเสถียรต่ำกว่าโปรตีนอัลบูมินของคน เนื่องจากเกิดการตกตะกอนได้ง่าย โดยเฉพาะในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไกลเคเทตอัลบูมินสูง (≥ 10 mg/ml) ซึ่งเป็นระดับไกลเคเทตอัลบูมินที่พบได้ในผู้ป่วยเบาหวาน
3. เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ไกลเคเทตอัลบูมินในตัวอย่างซีรัมที่คงที่ และน่าเชื่อถือควรวิเคราะห์จากพลาสมาที่สดใหม่เท่านั้น

8. แผนการปฏิบัติงานในอนาคต

คณะวิจัยจะสร้างต้นแบบเครื่องตรวจเพิ่มขึ้น เพื่อนำไปใช้ทดสอบภาคสนาม และจะมีความร่วมมือเพิ่มเติมกับคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ในการทดสอบภาคสนามกับตัวอย่างจริงที่สดใหม่ จากคนไข้ที่เข้าร่วมโครงการ และเปรียบเทียบผลกับระดับน้ำตาลในเลือด และโปรตีน HbA1c

กำลังเจรจาเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีเรื่องแอปตาเมอร์ และชุดตรวจให้กับบริษัทผลิตชุดตรวจ ทั้งในและต่างประเทศ เช่น (Epinex Diagnostics Inc. และ Filtech Co.,LTD)

รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

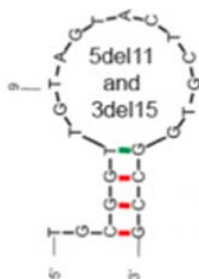
โครงการย่อยที่ 2: การพัฒนาวิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอัลบูมินเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์ (Development of Electrochemical Aptasensor for Glycated Albumin)

ผู้ร่วมงานวิจัย: 1. ดร. ศศิณี บุญยรัตพันธุ์
2. ดร. เดือนเพ็ญ จาปรุง
3. นางสาว พิมพ์ณภัทร ปริมิตร

ทีมวิจัยมุ่งเน้นเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอัลบูมินอย่างง่าย โดยใช้แอปตาเมอร์ ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยคาดหวังว่าจะได้วิธีการตรวจที่ง่าย รวดเร็ว มีความไวสูง และใช้ต้นทุนต่ำ สามารถใช้แล้วทิ้งได้ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการตรวจวินิจฉัยและบ่งชี้ภาวะทางชีวภาพของโรคเบาหวานในผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่อไป

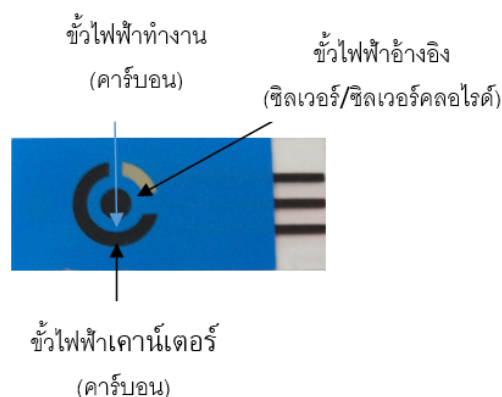
1. การพัฒนาวิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอัลบูมินเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์

ในปีแรกทีมวิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอัลบูมินด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์ ที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค SELEX หรือ Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment แล้วนำมาตัดจนเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ขนาดที่สั้นที่สุด ความยาว 23 เบส ชื่อว่า “5del11and3del15” ที่จับจำเพาะกับไกลโคเตตอัลบูมิน มีลำดับเบสดังนี้ 5’forward-Biotin-5’TGC GGT TGT AGT ACT CGT GGC CG-3’reverse มีโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ดังแสดงในรูปที่ 1 และมีค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constant, K_d) = 5.78 μM



รูปที่ 1: โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของแอปตาเมอร์ “5del11and3del15” ความยาว 23 เบส ที่จับจำเพาะกับไกลโคเตตอัลบูมิน

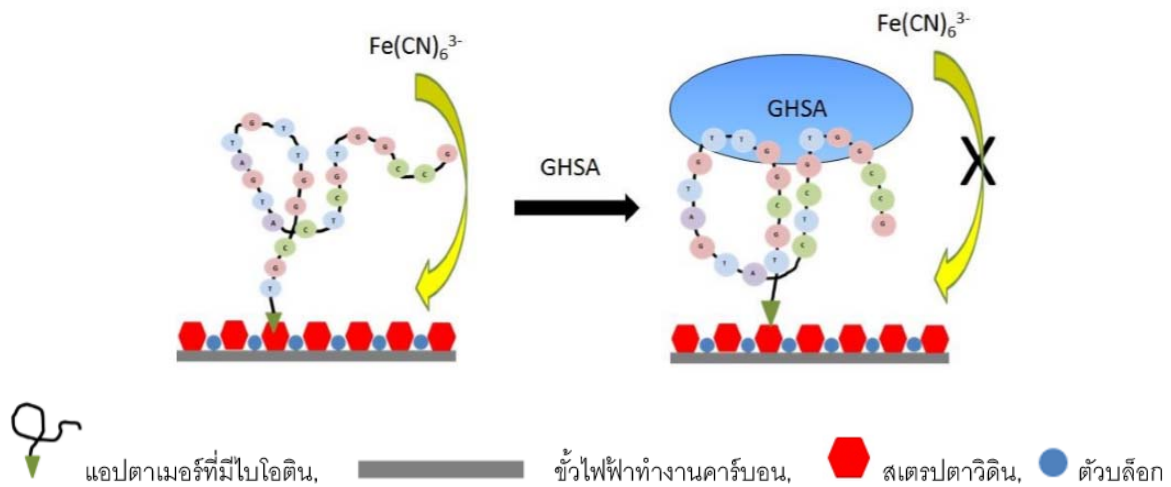
หลักการตรวจไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยแอปตะเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า เริ่มต้นด้วยการตรึงแอปตาเมอร์ลงบนพื้นผิวขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (รูปที่ 2) ที่เคลือบด้วยสเตรปตาวิดินและมีเอธานอลามีนเป็นตัวบล็อกปิดทับ ซึ่งการตรึงนี้เกิดจากการจับกันของไบโอตินบนแอปตาเมอร์กับสเตรปตาวิดินบนขั้วไฟฟ้าด้วยพันธะที่ไม่ใช่โคเวเลนต์ (non-covalent interaction) เป็นพันธะที่แข็งแรง มีความจำเพาะมากที่สุดอันหนึ่งในธรรมชาติ ด้วยค่าคงที่ในการจับมีค่าสูง ทำให้ไม่หลุดจากกันง่าย และด้วยการเรียงตัวเป็นระเบียบในทิศทางเดียวกันระหว่างพันธะที่จับยังทำให้การจับกันของไบโอตินบนแอปตาเมอร์กับสเตรปตาวิดินบนขั้วไฟฟ้ามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากนั้นใส่สารละลายอิเล็กโทรไลต์โพแทสเซียมคลอไรด์ที่ประกอบด้วยเฟอร์ริไซยาไนด์อออน $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ลงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน ซึ่งสารละลายอิเล็กโทรไลต์ดังกล่าว เป็นตัวตรวจปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox probe) และให้สัญญาณทางเคมีไฟฟ้า ที่เกิดจากการแตกตัวเป็นอิเล็กตรอนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์แล้วอมให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าด้วยเครื่องโพเทนชิโอสแตท เฟอร์ริไซยาไนด์อออนจะถูกรีดิวซ์ เป็นเฟอร์โรไซยาไนด์อออน $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ซึ่งปฏิกิริยารีดอกซ์นี้สามารถย้อนกลับได้ ดังนี้ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e^- \leftrightarrow [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$



รูปที่ 2: แสดงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน แบบสามขั้วไฟฟ้า ได้แก่ 1. ขั้วไฟฟ้าทำงาน (ทำจากคาร์บอน) 2. ขั้วไฟฟ้าเคาน์เตอร์ (ทำจากคาร์บอน) 3. ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (ทำจากซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์) มีความกว้าง 1.3 เซนติเมตร, ยาว 3.2 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางของขั้วไฟฟ้าทำงาน 2.5 มิลลิเมตร

ในกรณีที่มีโปรตีนเป้าหมายในระบบ โปรตีนที่ไปจับกับแอปตาเมอร์ จะไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ส่งผลให้สัญญาณเคมีไฟฟ้าเปลี่ยนแปลง โดยค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ลดลง

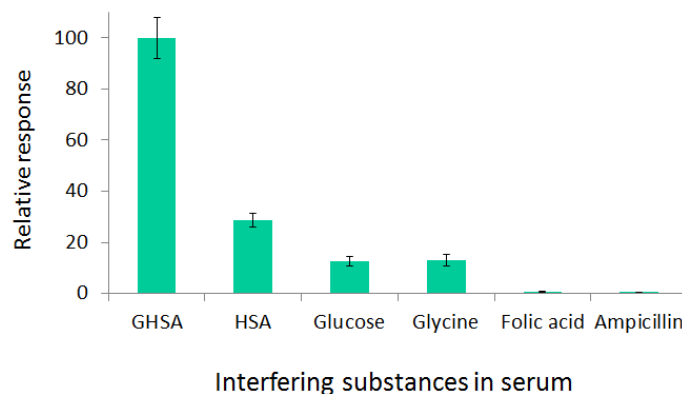
หลักการตรวจไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยแอปตะเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ถูกแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3: หลักการตรวจวัดไกลโคเตตอลูมิเนียมด้วยแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า

2. การทดสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอลูมิเนียมเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์ต่อไกลโคเตตอลูมิเนียม

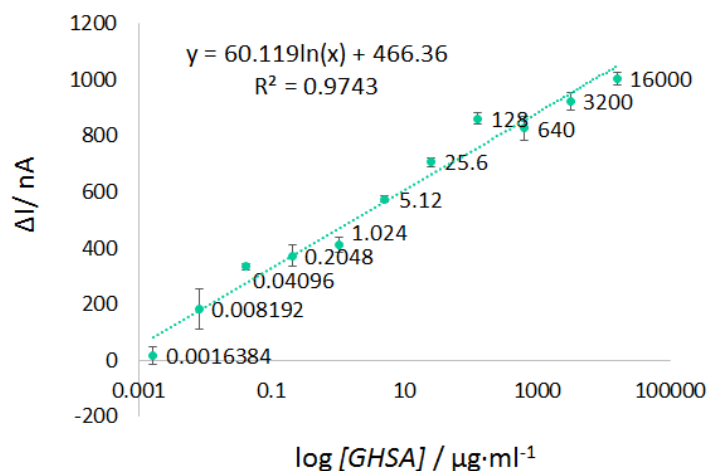
วิธีการตรวจวัดไกลโคเตตอลูมิเนียมเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์ข้างต้น ถูกนำมาทดสอบความจำเพาะระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าต่อสารชีวโมเลกุลที่มีในเลือด (ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้แก่ ยาแอมพิซิลลิน, กรดโฟลิก (วิตามินชนิดหนึ่งที่ละลายในน้ำ), กรดอะมิโนไกลซีน, น้ำตาลกลูโคส, โปรตีนไกลโคเตตอลูมิเนียม (เป้าหมาย), และโปรตีนอัลบูมิน (ที่มีโครงสร้างคล้ายโปรตีนเป้าหมาย) สำหรับผลการทดสอบความจำเพาะระหว่างดีเอ็นเอแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าต่อโมเลกุลที่มีในเลือด พบว่า ในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ค่ากระแสไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงในระดับเล็กน้อย และเมื่อใส่โปรตีนเป้าหมายบนแอปตาเซนเซอร์ พบการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ามีการจับกันของแอปตาเมอร์ที่ถูกตรึงบนขั้วไฟฟ้าและโปรตีนไกลโคเตตอลูมิเนียม (รูปที่ 4) ซึ่งทำให้สามารถสรุปได้ว่า แอปตาเซนเซอร์นี้มีความจำเพาะ และเหมาะต่อการตรวจวัดไกลโคเตตอลูมิเนียม



รูปที่ 4: กราฟแท่งแสดงการตอบสนองของสารชีวโมเลกุลที่มีในเลือดต่อดีเอ็นเอแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า วัดโดยเทคนิค SWV

3. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการตรวจวัดไกลเคตเตดอัลบูมินเชิงปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ร่วมกับแอปตาเมอร์

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินด้วยแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าก็เป็นกระบวนการที่สำคัญต่อความแม่นยำและความไวในการตรวจสอบ ดังนั้น ขั้นแรกทีมนักวิจัยจึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ควบคุมพื้นฐานต่างๆ เหล่านี้ก่อน ได้แก่ ความเข้มข้นของสเตรปตาเวดิน ความเข้มข้นของเฮรานอลามีน ความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ชนิดและความเข้มข้นของแอปตาเมอร์ ชนิดของบัฟเฟอร์ และเทคนิคที่ใช้วัด เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ทีมนักวิจัยจึงทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วยดีเอ็นเอแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวิเคราะห์โปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่างๆ ถูกวัดด้วยเทคนิค SWV จากนั้น วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงกับความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน ผลคือ พบความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ($R^2=0.9743$) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงมากขึ้น กับความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมินที่เพิ่มขึ้น (ตั้งแต่ 0.0016384 ถึง 16,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (รูปที่ 5) ขีดจำกัดของการตรวจสอบ (Limit of detection) ที่คำนวณได้ คือ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าวิธีการที่รายงานมาก่อนหน้านี้ ขีดจำกัดของการตรวจสอบนี้ ถูกคำนวณจากค่าสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดสำหรับการวัด 5 ครั้ง โดยใช้สมการจากกราฟแสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน (รูปที่ 5) ในการคำนวณ



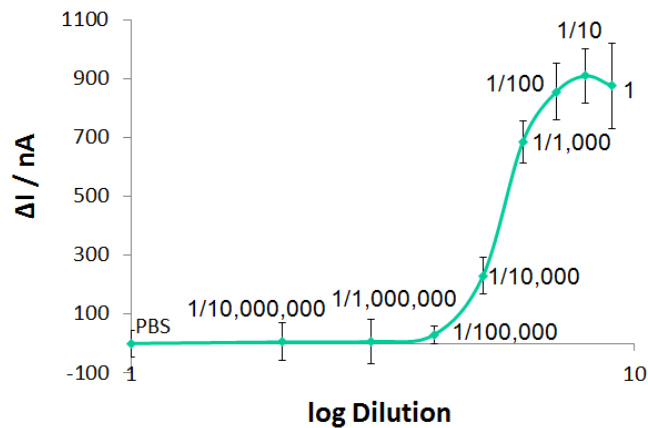
รูปที่ 5: กราฟแสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง ซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน พร้อมค่าความผันแปรของตัวแปรตอบสนอง (R^2)

ผลการวิจัยข้างต้นเหล่านี้ พิสูจน์ได้ว่าวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจวัดไกลเคเทตอัลบูมินได้จริงในระดับห้องปฏิบัติการ รายละเอียดของผลการวิจัยข้างต้นได้รับการจดอนุสิทธิบัตรแล้ว เมื่อวันที่ 1 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558

4. การทดสอบเบื้องต้น ในตรวจวัดปริมาณไกลเคเทตอัลบูมินในซีรัมของคน ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ร่วมกับแอปตาเมอร์

เนื่องจากในเลือดหรือซีรัมของคน จะมีโปรตีนไกลเคเทตอัลบูมินอยู่แล้ว ดังนั้นก่อนที่ดีเอ็นเอแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าจะถูกนำไปตรวจวัดปริมาณไกลเคเทตอัลบูมินในตัวอย่างผู้ป่วย ทีมวิจัยจึงทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณการเจือจางซีรัม ที่จะเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวัดโดยแอปตาเซนเซอร์

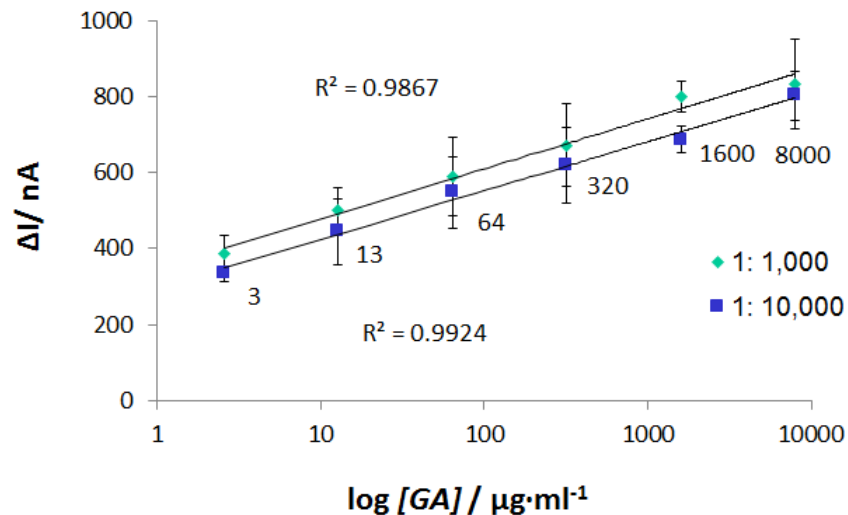
หลังจากการเจือจางซีรัมที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และวัดค่ากระแสไฟฟ้า ด้วยเทคนิค SWV พบว่า ระดับกระแสไฟฟ้าที่วัดได้มีความสัมพันธ์แบบซิกมอยดอล (sigmoidal curve) กับความเข้มข้นของซีรัมที่เจือจางลง (**รูปที่ 6**) แสดงให้เห็นว่า ระดับการเจือจางซีรัมของคนที่อัตราส่วน 1:1,000 ถึง 1:10,000 ให้ค่าความแตกต่างของกระแสไฟฟ้ามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 6: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการเจือจางซีรัมของคน และค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงซึ่งตรวจวัดจากดีเอ็นเอแอปตาเซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ด้วยเทคนิค SWV

จากนั้นปริมาณการเจือจางซีรัมของคนที่อัตราส่วน 1:1,000 และ 1:10,000 นี้ ถูกนำมาเติมโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ได้แก่ 3, 13, 64, 320, 1600, 8000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง พบว่า ค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไกลโคเตตอัลบูมินที่เติมในซีรัมของคนที่ถูกเจือจาง ที่อัตราส่วน 1:1,000 และ 1:10,000 โดยมี $R^2=0.9867$ และ $R^2=0.9924$ ตามลำดับ (รูปที่ 7)

ซึ่งบ่งชี้ว่า ปริมาณการเจือจางซีรัมของคน ที่อัตราส่วน 1:1,000 และ 1:10,000 สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณไกลโคเตตอัลบูมินโดยดีเอ็นเอแอปตาเซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ต่อไป



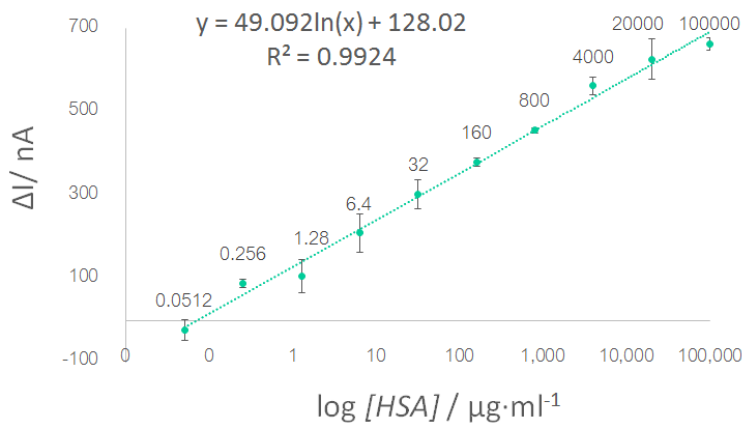
รูปที่ 7: กราฟแสดงสัดส่วนโดยตรงของปริมาณไกลโคเตตอัลบูมินที่เติมในซีรัมของคนที่ถูกเจือจางอัตราส่วน 1:1,000 และ 1:10,000 กับค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง พร้อมค่าความผันแปรของตัวแปรตอบสนอง (R^2)

5. การตรวจวัดไกลโคเตตอัลบูมินเชิงปริมาณในซีรัมของผู้ป่วยเบาหวาน ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับ แอปตาเมอร์

การตรวจวัดปริมาณไกลโคเตตอัลบูมิน โดยส่วนใหญ่จะรายงานผลการตรวจวัดเป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของไกลโคเตตอัลบูมิน ต่อความเข้มข้นของอัลบูมินทั้งหมด หรือเปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน เพื่อบ่งบอกปริมาณของไกลโคเตตอัลบูมิน โดยเทียบกับปริมาณอัลบูมินทั้งหมด ดังแสดงในสมการนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด}} \times 100$$

ดังนั้นแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ จึงใช้เปอร์เซ็นต์ไกลโคเตตอัลบูมิน ในการรายงานผล การศึกษานี้จึงได้ทำการหาเส้นมาตรฐาน เพื่อใช้สำหรับเทียบค่าของปริมาณโปรตีนอัลบูมินทั้งหมดที่มีในซีรัม โดยใช้ดีเอ็นเอแอปตาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ซึ่งถูกตรึงด้วยดีเอ็นเอสายเดี่ยว ชื่อว่า “biotin-H8” ซึ่งเป็นแอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับโปรตีนอัลบูมินทั้งหมดนี้ มีลำดับเบสคือ : 5'forward-biotin-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCC CCG GCT TTG GTT TAG AGG TAG TTG CTC ATT ACT TGT ACG CTC CGG ATG AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3' reverse และทำการตรวจวัดโปรตีนอัลบูมินทั้งหมดที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเทคนิค SWV พบว่า ค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง แสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ($R^2=0.9924$) กับความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด (ตั้งแต่ 0.0512 ถึง 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (**รูปที่ 7**) ขีดจำกัดของการตรวจสอบ (Limit of detection) ที่คำนวณได้ คือ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจสอบนี้ ถูกคำนวณจากสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุด ที่วัด 5 ครั้ง ซึ่งใช้สมการจากกราฟแสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้า และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด (**รูปที่ 8**) ในการคำนวณรวมด้วย



รูปที่ 8: กราฟแสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลง ซึ่งวัดโดยเทคนิค SWV และลอการิทึมของความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด พร้อมค่าความผันแปรของตัวแปรตอบสนอง (R^2)

ในการตรวจวัดปริมาณไกลเคตเตอัลบูมินในตัวอย่างซีรัมทางคลินิก ด้วยแอปตะเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ ทีมวิจัยได้เก็บซีรัมของคนมาจากโรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย (Ethical protocol number: 431/2557 (EC1)) ซึ่งเป็นซีรัมของคนไม่ได้เป็นเบาหวาน จำนวน 10 ตัวอย่าง และซีรัมของคนเป็นเบาหวาน จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเลือกตัวอย่างที่มีระดับ HbA1c อยู่ในช่วงน้อยกว่า 4 และมากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) เพื่อนำมาใช้ในการวัดระดับไกลเคตเตอัลบูมินโดยใช้แอปตะเซนเซอร์ในการศึกษานี้

ตารางที่ 1: แสดงเปอร์เซ็นต์ไกลเคตเตฮีโมโกลบิน (HbA1c) * ที่เป็นค่าตัดสิน (Cut-off) ของการเป็นโรคเบาหวาน และระดับไกลเคตเตฮีโมโกลบิน ของตัวอย่างซีรัมทางคลินิก คนปกติ 10 ตัวอย่าง และผู้ป่วยโรคเบาหวาน ที่เลือกมาใช้ในการศึกษานี้

ระดับฮีโมโกลบินเอวันซี (HbA1c)	ช่วง (%)	
	คนปกติ	ผู้ป่วยเบาหวาน
ค่าตัดสิน (Cut-off)	<6.5	>6.5
ระดับที่ถูกเลือกในมาใช้	<4	>8

* ระดับไกลเคตเตฮีโมโกลบิน (HbA1c) ตัวอย่างซีรัมเหล่านี้ ถูกวัดด้วยเทคนิคแคพิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) หรือ เอสพีแอลซี high pressure liquid chromatography (HPLC)

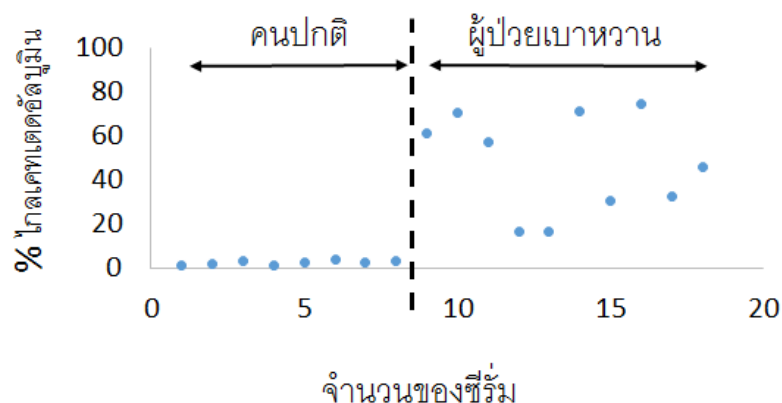
ตัวอย่างทั้งหมดถูกตรวจปริมาณไกลเคตเตอัลบูมิน และอัลบูมินทั้งหมด ด้วยเซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ที่มีดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละโปรตีนถูกตรึงอยู่ โดยวัดเป็นค่ากระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค SWV จากนั้น นำ

ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ถูกคำนวณเปลี่ยนหน่วยจากค่ากระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมป์) เป็นค่าความเข้มข้น (ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร) โดยใช้สมการความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (calibration curve) ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่ลดลงและลอกการทึบของความเข้มข้นของโปรตีนไกลเคเทเตดอัลบูมิน (รูปที่ 4) และโปรตีนอัลบูมินทั้งหมด (รูปที่ 7) ตามลำดับ

สำหรับผลของการตรวจวัดปริมาณไกลเคเทเตดอัลบูมินของตัวอย่างซีรัมทางคลินิกที่ได้เลือกมา โดยใช้เซรัมของเรานั้น ถูกแสดงใน ตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีระดับไกลเคเทเตดอัลบูมิน สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 9) ที่อยู่ในช่วง 17 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน และคนปกติมีระดับไกลเคเทเตดอัลบูมิน อยู่ในช่วง 1 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2: แสดงเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทเตดอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ในซีรัมของตัวอย่างจริง แบ่งเป็น ตัวอย่างซีรัมของคนปกติ 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคเบาหวาน 10 ตัวอย่าง

คนปกติ			ผู้ป่วยโรคเบาหวาน		
ลำดับที่	รหัสของตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ไกลเคเทเตดอัลบูมิน	ลำดับที่	รหัสของตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ไกลเคเทเตดอัลบูมิน
1	Nor 009	1	1	AP 198	61
2	Nor 021	2	2	AP 211	70
3	Nor 031	3	3	AP 302	57
4	Nor 045	1	4	AP 363	17
5	Nor 053	2	5	AP 380	17
6	Nor 055	3	6	AP 382	71
7	Nor 059	2	7	AP 386	31
8	Nor 061	4	8	AP 390	75
9	Nor 075	2	9	AP 395	32
10	Nor 087	3	10	AP 430	46



รูปที่ 9: แสดงการเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทเตดอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ในซีรัมของคนปกติ 10 ตัวอย่าง และผู้ป่วยโรคเบาหวาน 10 ตัวอย่าง

ผลที่ได้แสดงให้เห็นความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน ของระดับน้ำตาลในเลือด ระหว่างระดับ ไกลเคเทเตดอัลบูมิน โดยวิธีตรวจวัดของทีมีวิจัย และระดับไกลเคเทเตดฮีโมโกลบิน (HbA1c) โดยวิธีมาตรฐาน (gold standard method) ที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน (ตารางที่ 3) ซึ่งบ่งชี้ศักยภาพของวิธีการตรวจวัดปริมาณไกลเคเทเตดอัลบูมิน โดยใช้ดีเอ็นเอแอปตาเซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้ สำหรับการนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์และบ่งชี้ภาวะโรคเบาหวาน

ตารางที่ 3: แสดงการเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทเตดฮีโมโกลบิน (HbA1c) วิธีมาตรฐาน และเปอร์เซ็นต์ไกลเคเทเตดอัลบูมิน ที่วัดโดยแอปตาเซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าของทีมีวิจัย

วิธีการตรวจวัด	ช่วง (%)		แหล่งอ้างอิง
	คนปกติ	ผู้ป่วยเบาหวาน	
ไกลเคเตดฮีโมโกลบิน (CE / HPLC) *	<4	>8	โรงพยาบาลนครปฐม การศึกษานี้
ไกลเคเตดอัลบูมิน (Apt+E-Chem)	1 - 4	17 - 75	

* ระดับไกลเคเทเตดฮีโมโกลบิน (HbA1c) ตัวอย่างซีรัมเหล่านี้ ถูกวัดด้วยเทคนิคแคพิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) หรือ เอสพีแอลซี high pressure liquid chromatography (HPLC)

ระดับไกลเคเทเตดอัลบูมิน ที่วัดได้จากวิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคต่างๆ ที่ถูกรายงานก่อนหน้านี้ ถูกแสดงใน ตารางที่ 4 ซึ่งเห็นได้ว่า แต่ละวิธีการมีช่วงของปริมาณโปรตีนที่เฉพาะในแต่ละเทคนิค

ตารางที่ 4: แสดงการเปรียบเทียบระดับไกลเคตเตดอัลบูมิน ที่วัดได้จากวิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคต่างๆ

ไกลเคตเตดอัลบูมิน		แหล่งอ้างอิง
วิธีการตรวจวัด	ช่วงของคนปกติ (%)	
E-chem aptasensor	0.8 - 4.0	การศึกษานี้
Affinity column chromatography	0.6 - 3.0 0.8 - 1.4	Laboratory Alliance of Central New York, LLC Quest Diagnostics, Inc.
Boronate affinity chromatography	0.6 - 3.0	1. ARUP Reference Laboratory 2. Reference Laboratory at the Cleveland Clinic 3. Ohio University Medical Center Laboratory
Turbidimetric immunoassay	0.6 - 3.0	1. Reference Laboratory at the Cleveland Clinic 2. Ohio University Medical Center Laboratory
ELISA	0.4 - 2.4	Exocell Inc., 2012
Graphene aptasensor	7 - 24	Apiwat C. <i>et al.</i> , 2016
Enzyme	11 - 16	1. Pacific Biometrics, Inc. 2. Kohzuma T. <i>et al.</i> , 2011

สรุป

สำหรับผลการศึกษานี้ เราได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไกลเคตเตดอัลบูมิน โดยใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและมีความแม่นยำในการตรวจวัด โดยเทคนิคดังกล่าวนี้ อยู่บนพื้นฐานของการจับจำเพาะของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์กับโปรตีนไกลเคตเตดอัลบูมิน และปฏิกิริยาการจับกัน (binding interaction) สามารถถูกตรวจวัดด้วยเทคนิค SWV ผลการศึกษพบว่า แอปตะเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้านี้สามารถใช้ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ไกลเคตเตดอัลบูมินในตัวอย่างซีรัมทางคลินิกได้ ให้ค่ามีความสัมพันธ์สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพสำหรับนำไปใช้ตรวจคัดกรองและติดตามภาวะเบาหวาน

ผลงานดังกล่าวมาทั้งหมดนี้

1. ได้มีการนำเสนอผลงานโดยการพูด (oral presentation) ในงานสัมมนาสากล “Nanothailand 2016” ที่จัดขึ้นเมื่อวันที่ 27 – 29 พฤศจิกายน 2559 ณ กรีนเนอร์รี่สอร์ท เขาใหญ่ จ. นครราชสีมา
2. ได้ยื่นจดต้นแบบไปเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2559 ซึ่งอยู่ระหว่างรอเจ้าหน้าที่พิจารณา ในชื่อเรื่อง "ต้นแบบ แอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน และชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน โดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าร่วมกับแอปตาเมอร์" โดยมีเลขที่เอกสารความรู้ KRRN : 104169 (ต้นแบบที่ยื่นจดไปอยู่ใน เอกสารแนบหมายเลข 1)
3. ได้เขียนต้นฉบับ (manuscript) เพื่อยื่นตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ เสร็จเรียบร้อยแล้ว (ต้นฉบับที่พร้อมยื่นเสนอตีพิมพ์อยู่ใน เอกสารแนบหมายเลข 2)

รายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 3: การตรวจภาวะไกลเคชั่นของอัลบูมินด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดนาโนพอร์ (Simultaneous Detection of Albumin Glycation using Nanopore-sensor)

ผู้ร่วมงานวิจัย:

1. ดร.เดือนเพ็ญ จาปรุ่ง
2. ดร.ธิตกร บุญคุ้ม
3. ดร.ประภาศิริ พงษ์ประยูร
4. ดร.สุรศักดิ์ เนียมเจริญ
5. นาย จักรพงศ์ ศุภเดช

ความก้าวหน้าในการดำเนินงาน

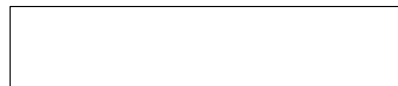
ในปีแรกทีมวิจัย ได้ทำการติดตั้งเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการผลิต และใช้นาโนพอร์ในการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมาย สำหรับเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนาโนพอร์ได้แก่ เครื่อง Focus Ion Beam ที่ต่ออยู่กับ Scanning electron microscopy (FIB-SEM) และเครื่องที่ใช้ในการวัดกระแสที่ไหลผ่านนาโนพอร์นั้นคือเครื่อง Potentiostat และชุดเครื่องมือ Electrophysiology (เครื่องขยายสัญญาณจากไมโครอิเล็กโทรด (Microelectrode Amplifier) เครื่องแปลงข้อมูล อนุลอกเป็นดิจิตอล (Digitizer) กรงฟาราเดย์ (Faraday cage) และชุดต่อคอมพิวเตอร์) ซึ่งเครื่องมือเหล่านี้เป็นงบประมาณจากหลายแหล่งทุนเช่น The Royal Society of Chemistry (RSC), TCELS และศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ นอกจากนี้ยังได้ผลิตอุปกรณ์สำหรับการประกอบชิ้นส่วนเพื่อทดสอบนาโนพอร์เช่น อ่างทดสอบ (chamber), ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และแหวนรองซีฟ เป็นต้น นอกจากนี้เรายังสามารถผลิตนาโนพอร์ต้นแบบที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 นาโนเมตร (วัดจากภาพถ่าย SEM) ได้อีกด้วย

ดังนั้นในปีที่ 2 นี้ทางคณะวิจัยจะทำการทดสอบนาโนพอร์ดังกล่าว และหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำนาโนพอร์ดังกล่าวไปวิเคราะห์โปรตีนไกลเคเทตอัลบูมิน

1. การผลิตนาโนพอร์จากวัสดุซิลิคอน

1.1 การสร้างไดอะแฟรมบางซิลิคอนไนไตรด์ (Si_3N_4)

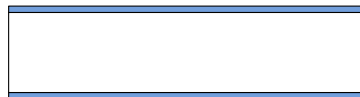
1.1.1 เตรียมแผ่นซิลิคอนขนาด 6 นิ้ว ระบาย (100), ความหนา 625 nm, สภาพต้านทาน 1-100 Ohm.cm และนำมาทำความสะอาดด้วย Standard CMOS cleaning ดัง **รูปที่ 1**



รูปที่ 1 แผ่นซิลิคอนเริ่มต้น



1.1.2. สร้างชั้น SiO_2 หนา 650 nm ด้วยกระบวนการ Wet thermal oxidation ที่อุณหภูมิ 1000 °C ดัง **รูปที่ 2**



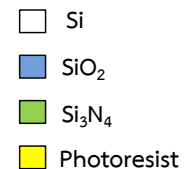
รูปที่ 2 ภาพตัดขวางแผ่นซิลิคอนหลังจากปลูกชั้น SiO_2



1.1.3. สร้างชั้น Si_3N_4 หนา 80 nm ด้วยกระบวนการ Low Pressure Chemical Vapor Deposition (LPCVD) ที่อุณหภูมิ 950 °C ดัง **รูปที่ 3**



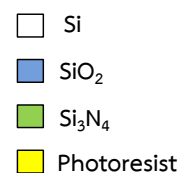
รูปที่ 3 ภาพตัดขวางแผ่นซิลิคอนหลังจากปลูกชั้น Si_3N_4



1.1.4. สร้างชั้น SiO_2 หนา 1 μm ที่ด้านหน้าของแผ่น wafer ดัง **รูปที่ 4** ด้วยเทคนิค Plasma Enhancement Chemical Vapor Deposition (PECVD)



รูปที่ 4 ภาพตัดขวางแผ่นซิลิคอนหลังจากปลูกชั้น SiO_2 (PECVD)

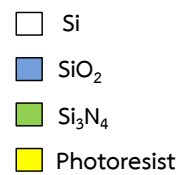
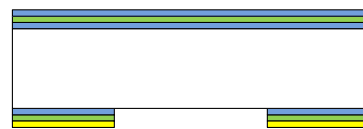


1.1.5. สร้างลวดลายน้ำยาไวแสงด้านหลังแผ่น wafer ด้วยกระบวนการ photolithography ดัง รูปที่ 5



รูปที่ 5 ภาพตัดขวางหลังสร้างลวดลายด้วยฟิล์ม photoresist

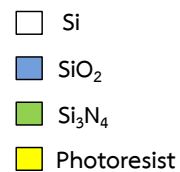
1.1.6. กัดชั้น $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ ด้วยเทคนิค Plasma etching ดัง รูปที่ 6



รูปที่ 6 ภาพตัดขวางหลังกัดฟิล์ม photoresist $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$

ด้วยเทคนิค Plasma

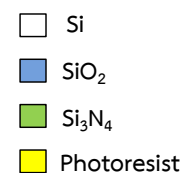
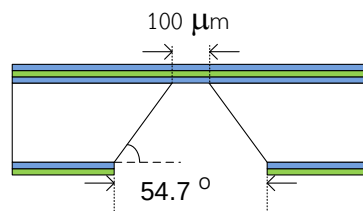
1.1.7. ลอกฟิล์มน้ำยาไวแสงออกด้วยเทคนิค Plasma etching ดัง รูปที่ 7



รูปที่ 7 ภาพตัดขวางหลังลอกชั้นฟิล์ม photoresist

1.1.8. กัดซิลิคอน wafer หนา $625\ \mu\text{m}$ ดัง รูปที่ 6 ด้วย TMAH 25% : H_2O สัดส่วน 1:1 vol./vol.

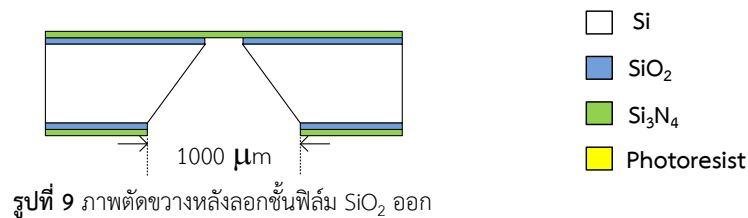
ที่อุณหภูมิ 90°C , Ster 100 rpm เป็นเวลา 11 ชั่วโมง จะได้ diaphragm $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ ดัง รูปที่ 8



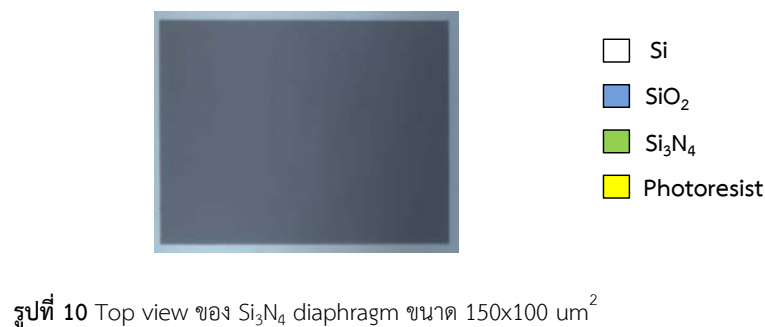
1000 μm

รูปที่ 8 ภาพตัดขวางแผ่นซิลิคอนหลังการกัดซิลิคอนหนา $625\ \mu\text{m}$

1.1.9. ลอกชั้น SiO_2 ออกด้วยสารละลาย HF 5% ดัง รูปที่ 9



1.1.10. ล้างน้ำ DI และเป่าแห้งด้วย N_2 จะได้ไดอะแฟรมของฟิล์ม Si_3N_4 ดัง รูปที่ 10

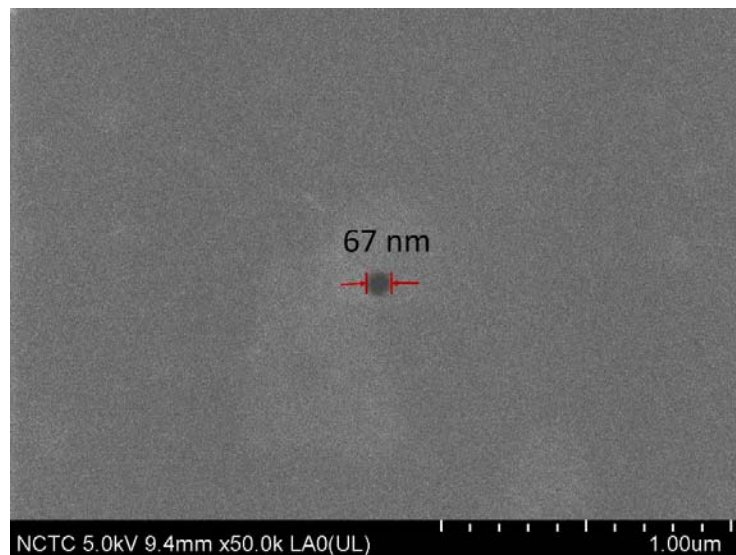


1.1 การเจาะนาโนพอร์ด้วยเครื่อง FIB-SEM

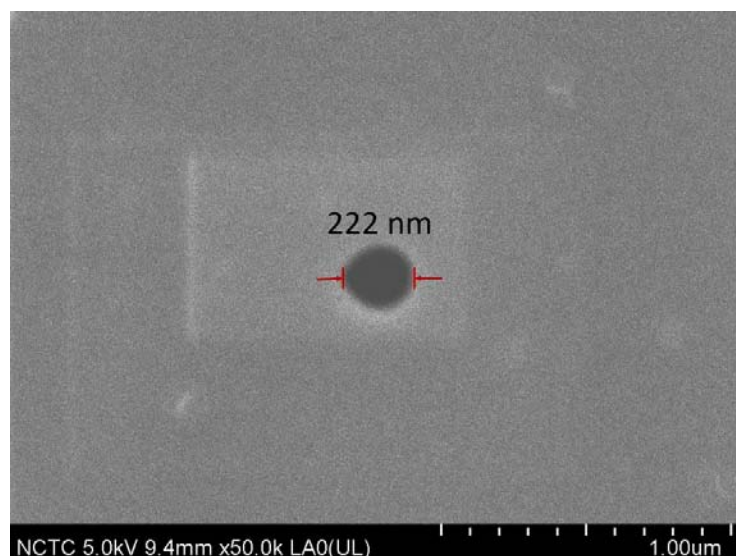
การเจาะนาโนพอร์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ 1) การเจาะนาโนพอร์บนไดอะแฟรมบางที่เตรียมได้จากหัวข้อ 1.1 โดยใช้เครื่อง Focus Ion Beam/Field Emission Scanning Electron Microscope (Versa 3D) ณ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับเงื่อนไขในการเจาะนาโนพอร์นั้น ทีมวิจัยได้ศึกษาตัวแปรต่างๆที่อาจมีผลต่อขนาดของนาโนพอร์ที่เจาะได้ ได้แก่ ขนาดของลวดลายวงกลมสำหรับการเจาะ (drill pattern) ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสของลำไอออน ความลึกของลวดลายที่ใช้เจาะ เป็นต้น ขั้นตอนที่ 2) คือการวัดขนาดของนาโนพอร์ที่เจาะได้ โดยในขั้นนี้ คณะผู้จัดทำวัดขนาดของนาโนพอร์ด้วยเครื่อง Field Emission Scanning Electron Microscope (Hitachi Su8030) ณ ศูนย์บริการวิเคราะห์ทดสอบ สวทช.

ตัวอย่างนาโนพอร์ที่เจาะด้วยเทคนิค Focused Ion Beam แสดงในรูปที่ 11 และ 12 จากรูปจะเห็นว่าเพียงแค่การกำหนดเงื่อนไขความลึกในการเจาะนาโนพอร์ สามารถเตรียมนาโนพอร์ที่มีขนาดต่างกันได้ โดยหากกำหนดขนาดความลึกมาก จะได้นาโนพอร์ที่มีขนาดใหญ่ ทั้งนี้ นอกจากการกำหนดขนาดของนาโนพอร์จากการตั้งค่าความลึกในการเจาะแล้ว ขนาดนาโนพอร์ยังสามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยการกำหนดเงื่อนไขของตัวแปรอื่นๆที่ได้

กล่าวมาแล้วข้างต้น จากผลที่เกิดขึ้นนี้ แสดงให้เห็นว่าการเตรียมนาโนพอร์ที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร สามารถเตรียมได้ด้วยเทคนิค Focused Ion Beam และหากมีการกำหนดเงื่อนไขของตัวแปรต่างๆในการเจาะให้เหมาะสมสอดคล้องกัน เทคนิคนี้มีศักยภาพที่จะสามารถเตรียมนาโนพอร์ที่มีขนาดเล็กมากๆ (เช่น เล็กกว่า 50 นาโนเมตร) ได้



รูปที่ 11: ภาพจาก Scanning Electron Microscope ของนาโนพอร์ที่เจาะด้วย Focused Ion Beam ที่ 30 kV 30 pA โดยใช้ลวดลายวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 นาโนเมตร และกำหนดความลึกที่ 500 นาโนเมตร

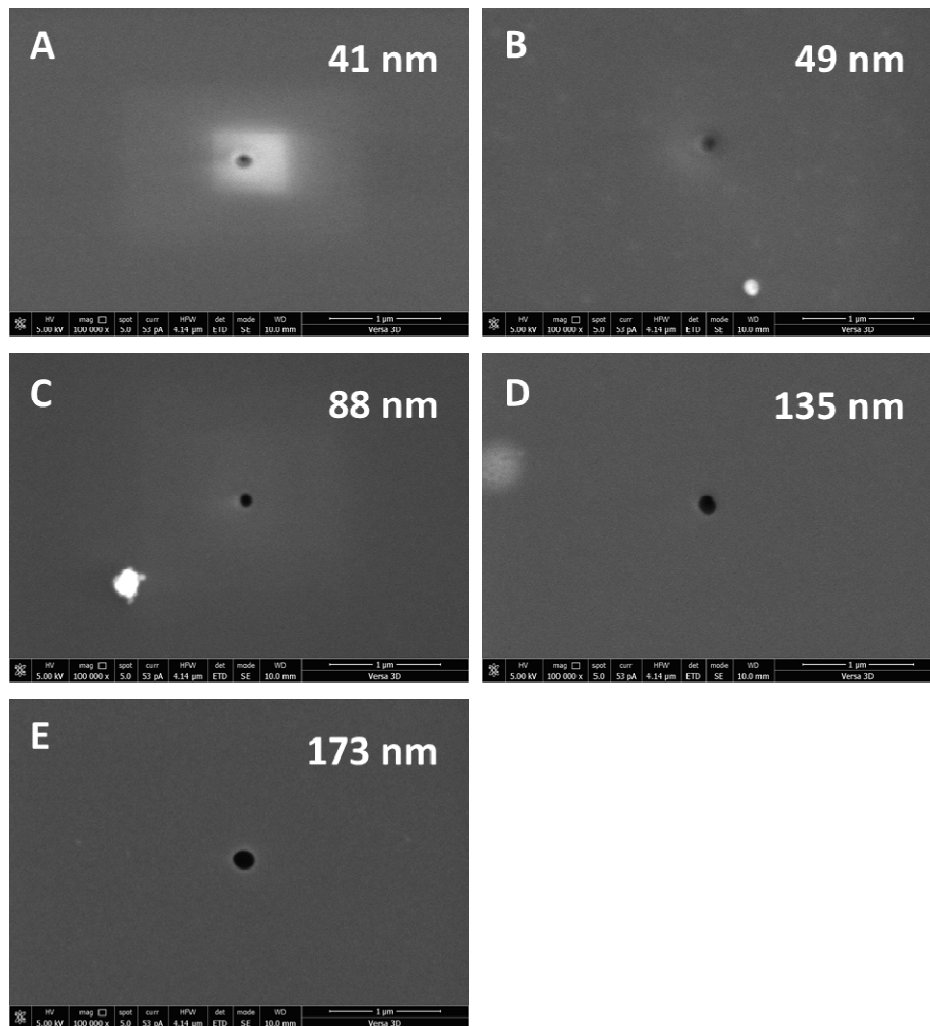


รูปที่ 12: ภาพจาก Scanning Electron Microscope ของนาโนพอร์ที่เจาะด้วย Focused Ion Beam ที่ 30 kV 30 pA โดยใช้ลวดลายวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 นาโนเมตร และกำหนดความลึกที่ 2 ไมโครเมตร

หลังจากทำการศึกษาเบื้องต้นจนสามารถเจาะนาโนพอร์ด้วยเทคนิค focused ion beam ได้แล้ว ทีมวิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการกำหนดเงื่อนไขของ focused ion beam เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้นาโนพอร์ที่มีขนาดแตกต่างกันได้ ผลจากการศึกษาในส่วนนี้จะสามารถใช้เงื่อนไขต่างๆเหล่านี้เป็นแนวทางในการเตรียมนาโนพอร์ที่มีขนาดต่างๆตามที่ต้องการได้ในช่วงราว 40-200 นาโนเมตร ทั้งนี้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ในงานอื่นที่ต้องการขนาดของนาโนพอร์แตกต่างกันได้อีกด้วย โดยเงื่อนไขที่ทำการศึกษาได้แก่ ขนาดของลวดลายวงกลม ค่าความต่างศักย์ ค่ากระแส และการกำหนดค่าความลึกของ focused ion beam ที่ใช้ในการเจาะ (Z) ดังแสดงในตารางที่ 1 ภาพถ่ายและขนาดของนาโนพอร์ที่ได้จากการกำหนดเงื่อนไขดังกล่าวได้แสดงไว้ดังรูปที่ 13 และตารางที่ 1

ตารางที่ 1: เงื่อนไข focused ion beam ที่ใช้ในการเจาะนาโนพอร์และขนาดของนาโนพอร์ที่ได้

Sample	Ion Beam condition: potential, current	Diameter of circular pattern	Z	Nanopore diameter
A	30 kV, 30 pA	25 nm	0.5 μm	41 nm
B	30 kV, 30 pA	15 nm	1.5 μm	49 nm
C	30 kV, 30 pA	20 nm	1.5 μm	88 nm
D	30 kV, 30 pA	25 nm	1.5 μm	135 nm
E	30 kV, 30 pA	25 nm	1.75 μm	173 nm

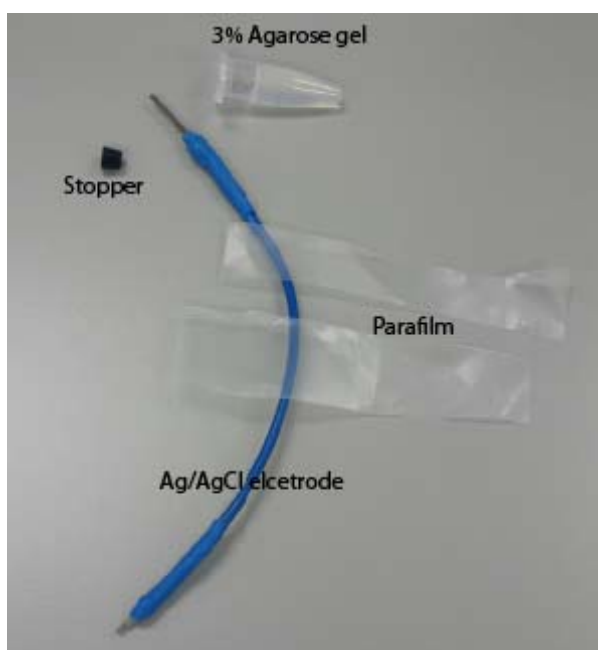


รูปที่ 13: ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope images) แสดงขนาดของนาโนพอร์ที่ได้จากการเจาะด้วย focused ion beam ด้วยเงื่อนไขดังแสดงในตารางที่ 1

1.2 Nanopore characterization

หลังจากการเจาะนาโนพอร์บนแผ่น Si_3N_4 ด้วยเครื่อง FIB-SEM แล้ว จึงได้นำแผ่นซิลิคอนมาทำความสะอาดโดยการแช่ในน้ำบริสุทธิ์ครั้งละ 5 นาที 2 รอบ และแช่ใน 95% แอลกอฮอล์จนกว่าจะใช้งานในการทดสอบการไหลผ่านของนาโนพอร์ในครั้งนี้

คณะวิจัยได้ทำการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าชนิดซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ใหม่ โดยการใช้ขั้วไฟฟ้าที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 mm และหุ้มด้วยวุ้นเหลวที่มีความเข้มข้น 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เตรียมอยู่ใน 3 M KCl เพื่อป้องกันการกัดกร่อนของขั้วไฟฟ้าด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ ซึ่งบางกรณีต้องใช้สารละลายที่มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง โดยอุปกรณ์ในการทำขั้วไฟฟ้าแสดงใน **รูปที่ 14**



รูปที่ 14: แสดงอุปกรณ์สำหรับสร้างขั้วไฟฟ้าที่ทนการกัดกร่อน ซึ่งประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl, 3% Agarose gel, Parafilm และ Stopper

หลังจากประกอบนาโนพอร์ ที่อยู่บนแผ่น Si_3N_4 เข้ากับ Chamber และเติมอิเล็กโทรไลต์ 1 M KCl, Tris pH 7.5 ปริมาตรข้างละ 1.5 mL จึงทำการกำจัดฟองอากาศขนาดเล็กด้วยการใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลง จากนั้นนำชุดทดสอบดังกล่าวไปต่อกับเครื่อง Potentiostat และเชื่อมด้วยขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl_2 เส้นที่เตรียมไว้แล้ว และวัดกระแสที่ไหลผ่านนาโนพอร์ ด้วยโปรแกรม Cyclic voltammogram โดยให้ความต่างศักย์ตั้งแต่ -0.5 V ถึง +0.5 V และนำผลการทดสอบไปคำนวณขนาดของนาโนพอร์จากสูตร

$$G = \frac{d^2}{L} \cdot \sigma$$

สมการที่ 1

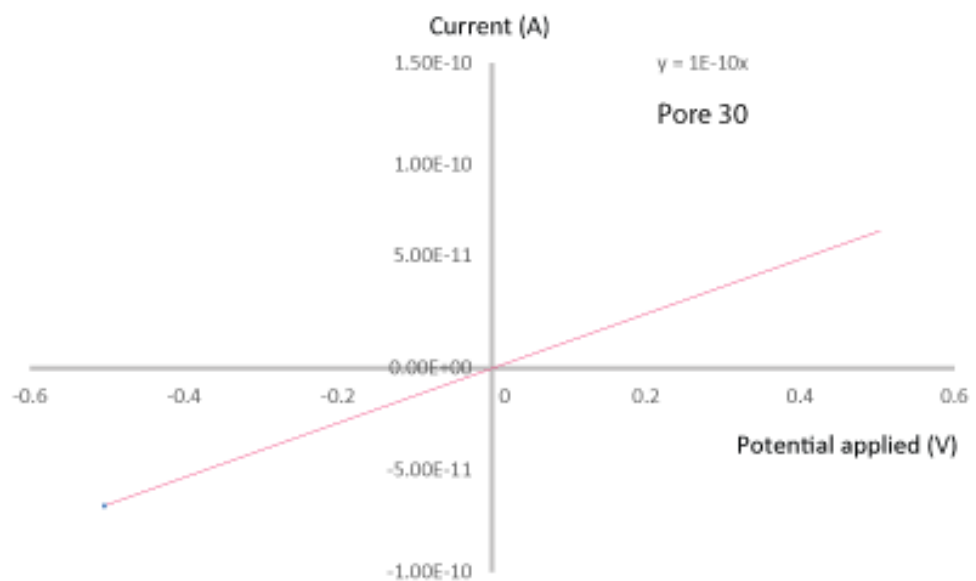
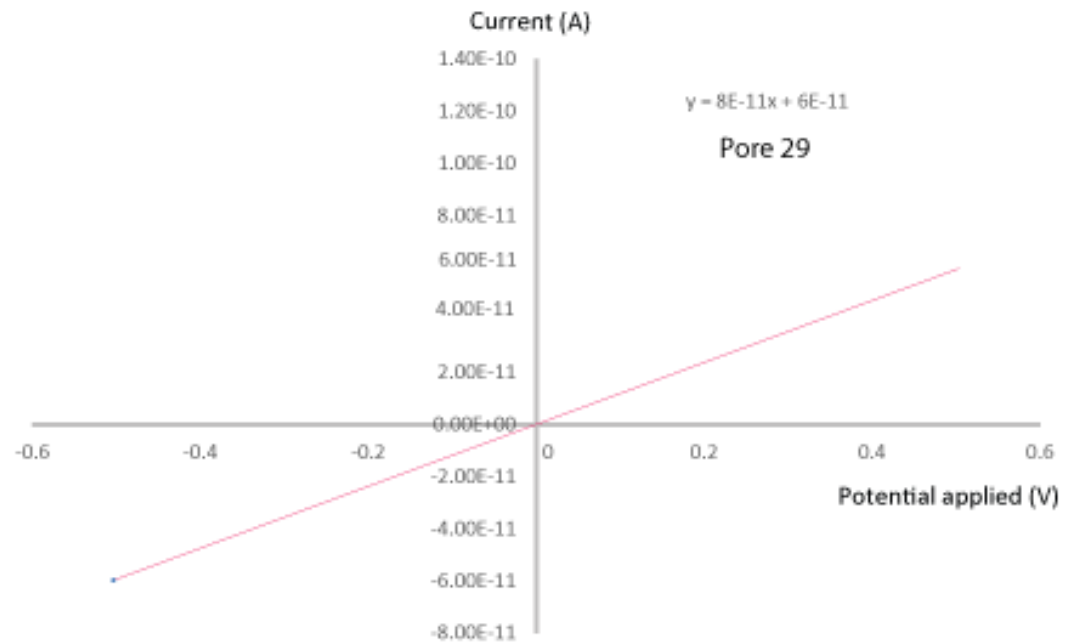
G คือ ความชันของกราฟ

d คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนพอร์

L คือ ความหนาของแผ่นซิลิคอนชิพ

σ คือ Conductivity ของสารละลาย

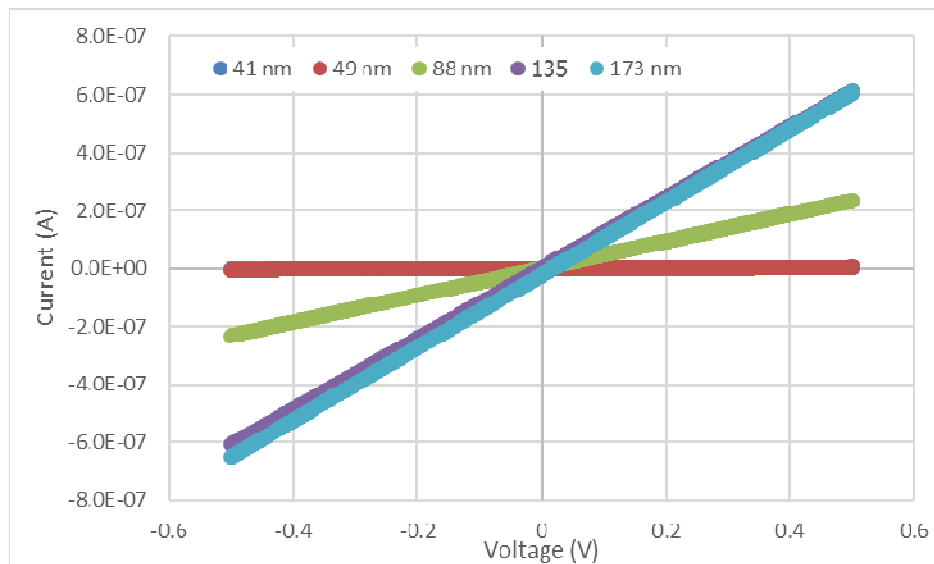
หลังจากทดสอบนาโนพอร์ 2 ชิ้นงาน ด้วย potentiostat พบว่ามีกระแสไหลผ่านนาโนพอร์ในช่วงความต่างศักย์ดังกล่าวด้วยความชันของเส้นตรงที่ 8×10^{-11} และ 1×10^{-10} ตามลำดับและเมื่อนำไปเข้าสมการเพื่อหาขนาดของนาโนพอร์พบว่า นาโนพอร์มีขนาดเล็กกว่า 10 นาโนเมตรซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนไกลโคเตตอัลบูมิน จึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินได้ สาเหตุที่นาโนพอร์มีขนาดเล็กกว่าภาพที่วิเคราะห์ได้จาก SEM อาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการเจาะนาโนพอร์ยังไม่เหมาะสม ทำให้รูปร่างของนาโนพอร์เป็นทรงกรวย และถึงแม้ด้านบนของนาโนพอร์จะมีขนาด 100 นาโนเมตร แต่ด้านล่างมีขนาดเล็กประมาณ 10 นาโนเมตร ดังนั้นทีมวิจัยจึงจะทำการหาสภาวะใหม่ที่เหมาะสมเพื่อผลิตนาโนพอร์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถวิเคราะห์โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินได้ในขั้นถัดไป



รูปที่ 15: แสดงกระแสไอออนที่ไหลผ่านนาโนพอร์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Potentiostat

ในส่วนของการวัดค่ากระแสไฟฟ้า-ความต่างศักย์ด้วยเครื่อง potentiostat หลังจากสามารถเตรียมนาโนพอร์ให้มีขนาดแตกต่างกันได้ในช่วง 40-170 นาโนเมตรดังแสดงในหัวข้อ 1.1 การเจาะนาโนพอร์ด้วยเทคนิค FIB ที่มวิจัยจึงได้เก็บข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์ที่ให้กับกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ (I-V characteristics)

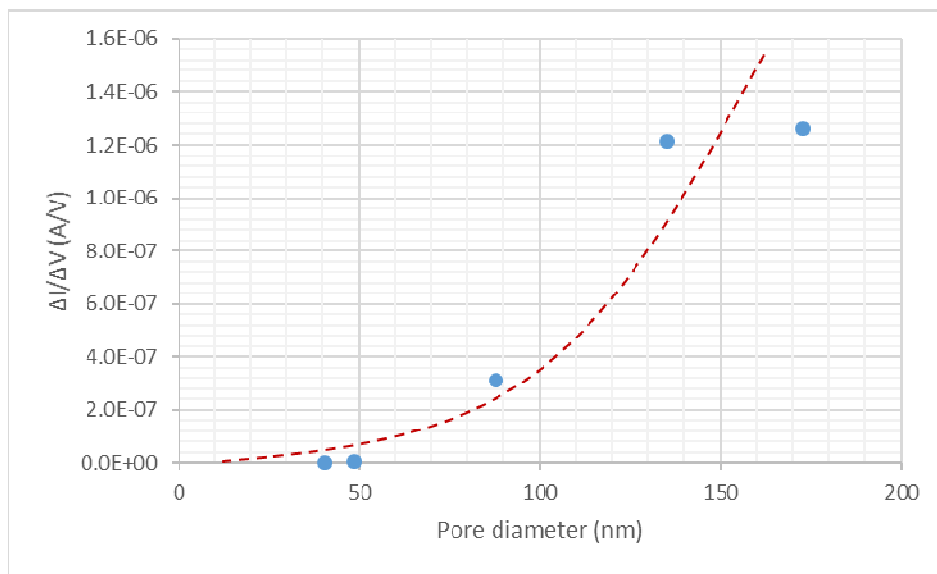
เพื่อศึกษาว่าขนาดของนาโนพอร์มีผลต่อความสัมพันธ์กระแสไฟฟ้า-ความต่างศักย์อย่างไร จากผลการศึกษาพบว่าความชันของกราฟกระแสไฟฟ้า-ความต่างศักย์เปลี่ยนไปตามขนาดของนาโนพอร์ โดยความชันของกราฟมีค่าสูงขึ้นเมื่อนาโนพอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ขึ้น ดังแสดงใน **รูปที่ 16** นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความชันของกราฟกับความชันของนาโนพอร์เป็นไปตามความสัมพันธ์ดังสมการที่ 1 ค่าความชันที่คำนวณได้ถูกแสดงไว้ดังตารางที่ 2 โดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความชันและขนาดของนาโนพอร์แสดงไว้ดัง **รูปที่ 17** การศึกษาดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าค่าความชันของกราฟกระแสไฟฟ้า-ความต่างศักย์สามารถนำมาใช้คำนวณขนาดของนาโนพอร์ได้อย่างคร่าวๆ ดังสมการที่ 1 ด้วยเหตุนี้ทีมวิจัยจึงได้นำความสัมพันธ์ดังกล่าวมาใช้เป็นกรรมวิธีในการตรวจเช็คนาโนพอร์หลังจากการเจาะด้วยเทคนิค FIB ซึ่งเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการตรวจเช็คนาโนพอร์ซึ่งเดิมต้องเช็คจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยทักษะของผู้ส่อง อีกทั้งยังอาจใช้เวลาในการหานาโนพอร์บนเมมเบรนที่เตรียมขึ้น และจากการประยุกต์ใช้ความสัมพันธ์นี้เอง ทีมวิจัยจึงได้ยื่นจดสิทธิบัตรกรรมวิธีตรวจสอบการคงอยู่ของนาโนพอร์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าดังแสดงใน เอกสารแนบหมายเลข 1



รูปที่ 16: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ วัดด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยความสัมพันธ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับขนาดนาโนพอร์ที่เปลี่ยนไป

ตารางที่ 2: แสดงค่าความชันจากกราฟกระแสไฟฟ้า-ความต่างศักย์ของนาโนพอร์ที่มีขนาดต่างๆ

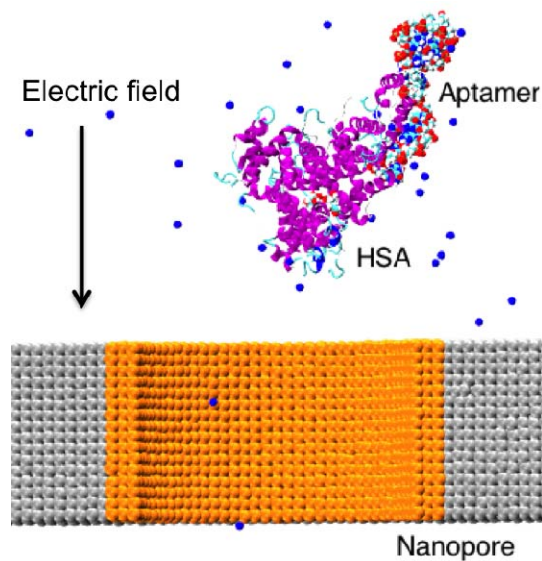
Nanopore diameter	Slope
41 nm	2.02E-09
49 nm	5.58E-09
88 nm	3.11E-07
135 nm	1.21E-06
173 nm	1.26E-06



รูปที่ 17: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความชันของกราฟกระแสไฟฟ้า-ความต่างศักย์กับขนาดของนาโนพอร์ เส้นประสีแดงเป็นเส้นนำสายตาเพื่อแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ที่เป็นไปตามสมการที่ 1

1.3 การทดสอบการไหลผ่านของโปรตีนไกลโคเตดอัลบูมินด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์

ในการทดลองนี้ได้นำเทคนิคการจำลองแบบเชิงพลวัต (Molecular Dynamics simulations) มาใช้ในการศึกษาการวิ่งผ่านนาโนพอร์ของโปรตีนอัลบูมินที่ติดกับแอมป์ตาเมอร์ โดยได้ใส่สนามไฟฟ้าลงไปในระบบ เพื่อเลียนแบบศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลองเพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรตีนลงในนาโนพอร์ โดยได้มีการปรับความแรงสนามไฟฟ้าหลายขนาดเพื่อทดสอบความสามารถในการวิ่งผ่านนาโนพอร์

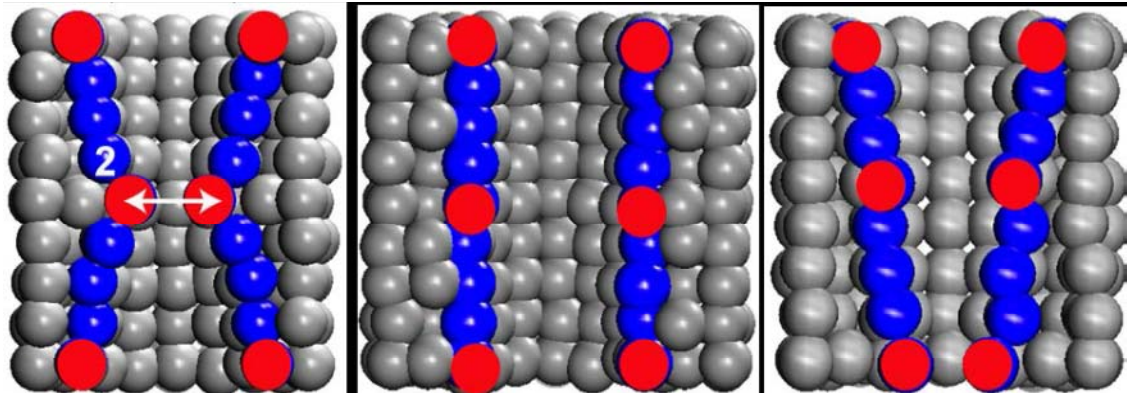


รูปที่ 18: แบบจำลองระบบที่ประกอบด้วย โปรตีนอัลบูมินที่ติดกับแอปตาเมอร์ โดยได้ใส่สนามไฟฟ้าเลียนแบบการทดลอง single channel recording เพื่อให้โปรตีนวิ่งผ่านนาโนพอร์ (สีส้ม)

จากการทดลองพบว่าแอปตาเมอร์จะเกิดการแยกตัวออกจากโปรตีนเนื่องจากการใส่สนามไฟฟ้ามากเกินไป กำลังทำการปรับขนาดสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการจำลองแบบเชิงพลวัตเพื่อนำไปศึกษากลไกการเข้าสู่นาโนพอร์ต่อไป

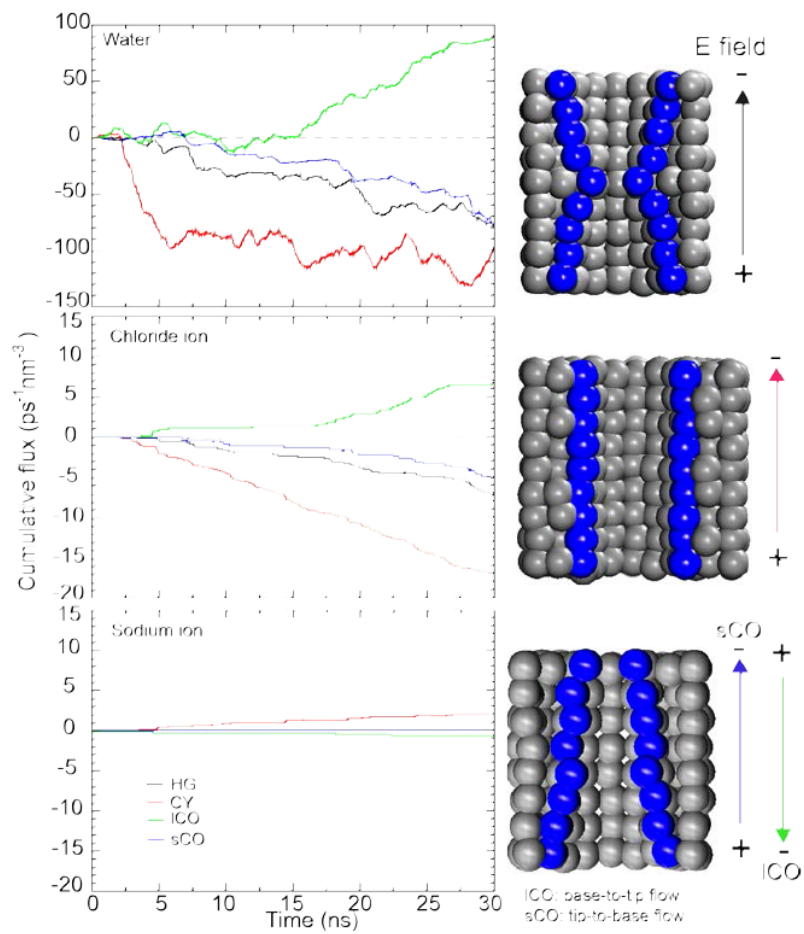
1.4 การศึกษารูปร่างของนาโนพอร์ ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์

เนื่องจากนาโนพอร์สังเคราะห์ที่ทางทีมวิจัยศึกษาอยู่นี้ มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกจากการเจาะแผ่นซิลิคอนที่สร้างขึ้นด้วยเครื่อง FIB และจากการใช้วิธีทางคอมพิวเตอร์ พบว่าอาจไม่ใช่โครงสร้างที่เหมาะสมที่จะทำให้โปรตีนไกลโคเตตอัลบูมินไหลผ่าน และตรวจวิเคราะห์ได้ดีที่สุด ทีมวิจัยจึงได้ทำการศึกษด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์เพิ่มเติม เพื่อค้นหาโครงสร้างของนาโนพอร์ที่เหมาะสมที่ น้ำ และโมเลกุลประจุบวก และประจุลบไหลผ่านได้ดี โดยเลือกโครงสร้างของนาโนพอร์มา 3 แบบ ที่มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถผลิตขึ้นมาได้ หรือมีนาโนพอร์แบบชีวภาพ (Biological Nanopore) ที่สามารถทดแทนได้ นั่นคือ โครงสร้างแบบ (1) ทรงนาฬิกาทราย (2) ทรงกระบอก (3) ทรงกรวย ดังแสดงใน **รูปที่ 19**



รูปที่ 19: โครงสร้าง 3 แบบ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์นั้นคือ โครงสร้าง ทรงนาฬิกาทราย ทรงกระบอก และ ทรงกรวย

ผลการวิเคราะห์พบว่าการไหลผ่านของไอออนที่มีประจุลบ และบวกจะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ถ้าไอออนเหล่านี้ไหลผ่านนาโนพอร์ที่เป็นทรงนาฬิกาทราย หรือทรงกรวย อีกทั้งพื้นผิวของนาโนพอร์ที่มีส่วนประกอบหลายอย่างก็ช่วยให้ไอออนที่มีประจุต่างกัน ไหลผ่านด้วยความสามารถที่ต่างกันด้วย หรือที่เรียกว่า Selectivity ซึ่งนาโนพอร์แบบนี้มีความเหมาะสม ที่จะนำไปวิเคราะห์โมเลกุลที่มีประจุแตกต่างกัน เช่น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (สายดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ) ที่มีประจุรวมเป็นลบ และโปรตีนบางชนิดที่มีประจุรวมเป็นบวก รวมทั้งโปรตีนอัลบูมิน และไกลโคเตตอัลบูมิน ที่ทางทีมวิจัยกำลังศึกษาอยู่ด้วย ดังแสดงใน รูปที่ 20 และผลการศึกษานี้ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร “Computational and Theoretical Chemistry” ดังเอกสารแนบหมายเลข 2 ขณะนี้กำลังรอผลการพิจารณา



รูปที่ 20: แสดงการไหลผ่านของโมเลกุลน้ำ และไอออน (Chloride ion และ Sodium ion) ผ่านนาโนพอร์ 3 รูปแบบ คือ นาโนพอร์ ทรงนาฬิกาทราย ทรงกระบอก และทรงกรวย

บทสรุป

คณะวิจัยได้สภาวะในการผลิตนาโนพอร์ที่สร้างจากวัสดุซิลิกอน และเจาะด้วย FIB ได้สำเร็จ ด้วยความร่วมมือของ 4 หน่วยงานหลัก คือ (1) ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (2) ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (3) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ (4) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และพบวิธีการตรวจเช็คสภาพความคงอยู่ของนาโนพอร์ด้วยวิธีที่ง่าย และรวดเร็วจนได้ยื่นจดสิทธิบัตร 1 ฉบับ

- (1) ชื่อการประดิษฐ์ กรรมวิธีการตรวจสอบความคงอยู่ ของนาโนพอร์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า เลขที่คำขอ 1601005892 วันที่ยื่นคำขอ 30 ก.ย.2559 (เอกสารแนบหมายเลข 1)

อีกทั้งผลการศึกษาดูด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์ ยังได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติอีกด้วย

- (2) Multiscale simulation studies of geometrical effects on solution transport through nanopores. Attaphon Chaimanutsakun, Deanpen Japrungrung, Prapasiri Pongprayoon (Submitted) (เอกสารแนบหมายเลข 2)

อย่างไรก็ตามผลการวิจัยในโครงการนี้ ก็ล่าช้ากว่าเป้าหมายที่วางไว้ เนื่องจากยัง ไม่ได้ต้นแบบการวิเคราะห์ภาวะไกลเคชั่นด้วยนาโนพอร์ที่สามารถใช้งานได้จริง ซึ่งเป็นเป้าหมายสูงสุด เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใหม่สำหรับประเทศไทย ทีมวิจัยจึงใช้เวลาส่วนใหญ่ ไปกับการศึกษาความรู้พื้นฐาน การสร้างวัสดุ อุปกรณ์ สำหรับการทดสอบ และทำความเข้าใจเป้าหมายของโมเลกุลที่จะใช้ในการตรวจวัด ซึ่งความรู้และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ได้มานั้น สามารถนำไปปรับใช้กับการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลได้หลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่งทางทีมวิจัยจะยังคงทำการพัฒนาต่อไป

ซึ่งแผนการศึกษาในอนาคต จะมีการสร้างความร่วมมือกับต่างประเทศที่มีความเชี่ยวชาญ (Prof. Joshua Edel, Imperial College London) เพื่อสร้างเครือข่ายงานให้แข็งแกร่ง และร่วมขอทุนวิจัย โดยเป้าหมายหลักคือเร่งให้ผลงานวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์ และนำไปใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น