

# การออกแบบหัววัดทางไฟฟ้าเคมีสำหรับการตรวจดีเอ็นเอข้าว

## Design of electrochemical sensor for rice DNA detection

สุธิษา เละเซ็น<sup>1\*</sup> ถันยพร งามชูรัตนวงศ์<sup>2</sup> และ ธิดารัตน์ หวังคำ<sup>2</sup>

Suthisa Leasen<sup>1\*</sup>, Thanyaporn Ngamchuratanawong<sup>2</sup> and Thidarat Wangkam<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

การพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เทคนิคทางไฟฟ้าในการตรวจวัด มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เทคนิคอื่นๆ อาทิเช่น การวัดมวล หรือการวัดค่าเชิงแสง เพราะใช้งานง่าย ระบบการวัดไม่ซับซ้อน และต้นทุนต่ำ ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้สารกึ่งตัวนำของอินเดียมออกไซด์เจือดีบุก (ITO) เป็นฐานรองตัวตรวจวัด โดยอาศัยความจำเพาะการเข้าคู่กันของเส้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคและฐานรองดังกล่าวสามารถลดต้นทุน และเวลา ในการตรวจวัด และพบว่าฐานรองดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวปทุมธานี 1 ได้อย่างชัดเจน

**คำสำคัญ:** ดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ ดีเอ็นเอข้าว ยีนความหอมของข้าว อินเดียมออกไซด์เจือดีบุก ไฟฟ้าเคมี

### Abstract

The biosensors which based on the electrochemical technique have several advantages than the others; gravimetric and optical technique, etc. Due to its simplicity, user friendly and low cost devices, the semiconductor thin film such an indium oxide doped tin (ITO) was utilized as substrate and associated with specific match between probe ssDNA and complemented target DNA. With those concept and materials, the devices would decrease time consume and budget for rice aromatic gene detection compared to other techniques and also substrates. In additional, this surface successfully distinguishes similar appearance of aromatic and non-aromatic rice seed such as KDML 105 and Phatumthani 1.

**Keywords:** DNA biosensors, rice DNA, aromatic gene, indium oxide doped tin, electrochemistry

<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์นนทบุรี 11000

<sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Nonthaburi 11000, Thailand

<sup>2</sup> ภาควิชาฟิสิกส์อุตสาหกรรมและอุปกรณ์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพฯ 10800

<sup>2</sup> Department of Industrial Physics and Medical Instrumentation, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok 10800, Thailand

\* Corresponding author. E-mail: suthisa.l@rmutsb.ac.th

## บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรส่วนใหญ่ของโลก รวมถึงเป็นสินค้าการเกษตรที่ประเทศไทยส่งออกเป็นอันดับต้นๆ ทางการค้าข้าวจะแบ่งได้ 2 ชนิด คือข้าวชนิดที่ไม่มีกลิ่นหอม (non-aromatic rice) และชนิดที่มีกลิ่นหอม หรือข้าวหอมมะลิ (aromatic rice) ทั้งนี้ ข้าวชนิดที่มีกลิ่นหอมจะขายได้ราคาที่สูงกว่า แต่ผลผลิตที่ได้ก็น้อยกว่าชนิดที่ไม่มีกลิ่นหอมมาก ทำให้มีการปลอมปนข้าวราคาถูกกับราคาแพงเพื่อให้ได้ปริมาณมาก เนื่องจากพันธุกรรมของข้าวมีความแปรผันมาก ทำให้ลักษณะทางกายภาพของข้าวบางสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยเฉพาะข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวปทุมธานี 1 ไม่สามารถใช้ลักษณะทางกายภาพตรวจสอบได้ ในการวิจัยนี้จึงมุ่งประเด็นไปที่ การพัฒนาชุดตรวจเพื่อจำแนกสายพันธุ์ข้าวที่ลึกลงไปในระดับ “พันธุกรรม” เพื่อจำแนกข้าวที่มีลักษณะทางกายภาพเหมือนกันมากได้อย่างชัดเจน

ปัจจุบันการจำแนกพันธุ์ข้าวมีวิธีการหลายวิธี อาทิเช่น ตรวจสอบขนาดความยาวต่อความกว้างของเมล็ด (length: breadth ratio; L/B) ความใส-ขุ่นของเมล็ด (opacity) อุณหภูมิที่เกิดเจลลาคีในเซชัน (gelatinization temperature) ปริมาณอะไมโลส (amylose content) และความหนืดของแป้งสุก (gel consistency) (Dela Cruz, 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม กระบวนการดังกล่าวสามารถแยกข้าวแต่ละสายพันธุ์ได้ในระดับกายภาพ เท่านั้น ทำให้ผู้เชี่ยวชาญไม่สามารถใช้ลักษณะทางกายภาพตรวจสอบได้ ดังนั้น ในบทความนี้ จึงมุ่งประเด็นไปที่ การพัฒนาชุดตรวจเพื่อจำแนกสายพันธุ์ข้าวในระดับพันธุกรรม โดยใช้ความจำเพาะของชุดตรวจดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น

จากอินเดียมออกไซด์เจือดีบุก ซึ่งจะใช้เวลาตรวจน้อย และราคาถูก ผลจากงานวิจัยนี้ จะเป็นการสร้างทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบการปลอมปนข้าว

กลิ่นหอมของข้าวหอมมะลินั้น ประกอบด้วยสารอินทรีย์กว่า 114 ชนิด แต่สารที่มีปริมาณมากที่สุดที่เป็นสารหลักของกลิ่นคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) การสร้างสาร 2AP มีกลไกการยับยั้งโดยสาร betaine aldehyde dehydrogenase (BADH2) (Bourgid, 2008; Chen, 2008; Rattanapoli, 2011) ซึ่งสารดังกล่าวควบคุมการสร้างโดยเอนไซม์ Badh2 ซึ่งเป็นยีนเด่นบนโครโมโซม 8 ส่วน คือเอนไซม์ Badh2-E2 และ Badh2-E7 นั้นเป็นส่วนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง 2AP

## วิธีการศึกษา

### ข้อมูลและสารเคมีที่ใช้

พื้นผิวของฐานรองที่ใช้คือ พิล์มบางอินเดียม-ออกไซด์เจือดีบุกเคลือบบนกระจก ความหนาของฟิล์มบางประมาณ 140 นาโนเมตร สภาพต้านไฟฟ้า  $10^{-4}$  โอห์ม-เซนติเมตร สังกะยาจากบริษัทลูมินอสเซ็นท์ จำกัด ประเทศไทยได้หวน ตลอดจนการทำวิจัยนี้ใช้น้ำกลั่นซึ่งมีค่าสภาพต้านทานโดยประมาณ 18.3 เมกะโอห์ม-เซนติเมตร รายละเอียดของสารเคมีที่ใช้และบริษัทผู้จัดจำหน่ายดังรายละเอียด อะซีโตน ไอโซโพรพานอล กรดไฮโดรคลอริก เอทานอล และโซเดียมคลอไรด์ จัดซื้อจากบริษัท อาร์ซีไอ แลป สแกน จำกัด โซเดียมซัลเฟต จากบริษัท ฟลูคา โซเดียมโบคาร์บอเนต จากบริษัท เมิร์ก โซเดียมไดโครเมตซัลเฟต จากบริษัท ไบโอบีลิก ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมีโนมีเทน จากบริษัท รีเสิร์ช ออร์แกนิก โซเดียมบอโรไฮเดรต จาก

บริษัท แลปอราทอรี เคมีสทรี โซเดียมอะซีเตท โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต เมทิลีนบลู และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากบริษัท ชิกมา-อัลดริช ดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจจับและดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อใช้ในการตรวจสอบพื้นผิวตรวจจับ สิ่งชื่อจากบริษัท แอปพลิเคชัน โซลาร์เซลล์ ในน้ำที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้ว และก่อนนำไปติดกับฐานรองจะละลายอยู่ในสารละลาย 2XSSC (ปรับลดค่าความเข้มข้น 10 เท่าจาก 20XSSC; 3 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ผสมกับ 300 มิลลิโมลาร์ ไตรโซเดียมซิเตรต) เพื่อคงสภาพของดีเอ็นเอและให้มีการกระจายตัวที่ดี

### ขั้นตอนการสร้างรูปร่างอินเดียมออกไซด์เจือดีบุกบนกระจก

ฟิล์มบางของอินเดียมออกไซด์เจือดีบุกหรือ ไอทีโอถูกใช้เป็นฐานรองสำหรับชั้นสารต่างๆ ตลอดกระบวนการปรับสภาพผิว พื้นที่ที่นำไฟฟ้าของไอทีโอถูกปรับแต่งด้วยวิธีการฉายแสงเพื่อสร้างแบบ ทำให้ได้พื้นผิวรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ได้พื้นที่รวมโดยประมาณ 0.2 ตารางเซนติเมตร โดยมีขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นผิวด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น และน้ำยาล้างจานเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกสองครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยอะซีโตนอีกสองครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วยไอโซโพรพานอล 10 นาที ทุกขั้นตอนในการล้างต้องแช่ในเครื่องสั่นที่สั่นด้วยคลื่นเหนือเสียง จากนั้นนำพื้นผิวที่สะอาดแล้วเข้าสู่กระบวนการโฟโตลิโทกราฟีโดยการติดฟิล์มไวแสงยูวีลงบนผิวกระจกด้านที่มีไอทีโอ จากนั้นฉายแสงยูวีผ่านหน้ากากเป็นเวลา 15 วินาที ล้างฟิล์มไวแสงส่วนที่ไม่โดนแสงยูวีออกด้วย 2 เปอร์เซนต์

น้ำหมักต่อปริมาตรของโซเดียมโบคาร์บอเนต เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างน้ำ จากนั้นนำไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเพื่อกัดเอาไอทีโอส่วนที่ไม่ต้องการออกไปล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ใน 7 เปอร์เซนต์น้ำหมักต่อปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

### ปรับสภาพผิวไอทีโอด้วยอนุภาคทองนาโน

อนุภาคทองนาโนเป็นที่รู้จักและนิยมใช้เพื่อการปรับสภาพพื้นผิวให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดีขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองโดยการติดอนุภาคทองนาโนด้วย อันตรกิริยาเชิงกายภาพโดยการหยดสารละลายอนุภาคทองนาโน 100 ไมโครลิตรต่อฐานรองไอทีโอหนึ่งแผ่น (2 นิ้วไฟฟ้า) โดยหยดให้ท่วมแค่พื้นผิวที่เป็นไอทีโอเท่านั้น แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นและเป่าให้แห้ง

### การตรวจวัดเชิงไฟฟ้าเคมี

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้เฉพาะวิธีการทางไฟฟ้าเคมีในการวิเคราะห์ลักษณะของขั้วไฟฟ้าเบื้องต้น เพื่อตรวจสอบการติดของชั้นสารในแต่ละชั้นด้วยการเปรียบเทียบสัญญาณทางไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าก่อนและหลังการสร้างชั้นสารต่างๆ การวิเคราะห์พื้นผิวจึงเริ่มจากขั้วไฟฟ้าที่เป็นฐานรองไอทีโอ (ITO) ไอทีโอที่ติดอนุภาคทองนาโนด้วยอันตรกิริยาเชิงกายภาพ (ITO/AuNPs) ฐานรองไอทีโอยึดติดดีเอ็นเอตรวจจับ (ITO/AuNPs/ssDNA) และฐานรองไอทีโอยึดติดดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันได้ (ITO/AuNPs/dsDNA) สารละลายที่ใช้ในระบบการวัดไฟฟ้าเคมีที่ใช้เป็น

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่สามารถคงสภาพการทำงานของสารชีวโมเลกุลอย่างดีเอ็นเอได้ คือ Tris-HCl pH 7.0 โดยความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ในการวัดด้วยวิธีการวัดค่ากระแสเนื่องจากความต่างศักย์แบบวน (CV) และวิธีการวัดค่าอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมี (EIS)

### กระบวนการสกัดดีเอ็นเอพืช

ดีเอ็นเอของพืชหรือข้าวที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์พืชออร์แกนิก ทำการสกัดจากต้นอ่อนของข้าว เนื่องจากจมูกข้าวเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเออยู่น้อยมาก ไม่มากพอที่ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอโดยทั่วไปได้ วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากต้นข้าวเป็นวิธีการมาตรฐาน วิธีที่เลือกใช้คือการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CTAB มีขั้นตอนดังนี้

1. นำต้นข้าวสดปริมาณ 60 มิลลิกรัมบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครขนาด 1.5 มิลลิตร จากนั้นเติม 2XCTAB 1 มิลลิตร ชวนให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องนาน 60 วินาที หรือเขย่าจนสารทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นแบ่งสารออกใส่หลอดไมโครขนาด 1.5 มิลลิตร 2 หลอด

2. ชวนสารที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อแตกเซลล์ออก แล้วนำหลอดทดลองแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเติม chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

3. เขย่าจนสารเข้ากันเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่เข้ากันแล้วไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 11,180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายที่แยกออกมาใส่ในหลอดไมโครอันใหม่ดูดสารละลายในหลอดไมโครมา 400 ไมโครลิตร แล้วเติม isopropanol 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือแช่ช่องแช่แข็ง 1 คืน

5. นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 11,180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังปั่นเสร็จจะเห็นเป็นก้อนสีขาวเล็กๆ อยู่ก้นหลอด หากไม่เห็นต้องปรับอัตราส่วนสารที่ใช้เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้น้อยเกินไป

6. ดูดสารด้านบนออก ต้องระวังอย่าให้ก้อนสีขาวเล็กๆ หลุดลอยออกมา ทำการล้างก้อนสีขาวด้วยสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

7. ละลายก้อนสีขาวในน้ำที่ใส่ RNase A 20 ไมโครกรัม/มิลลิตร เพื่อสลาย RNA ที่มีอยู่ไม่ให้ปนกับดีเอ็นเอ

8. ตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการเทียบกับตัวมาตรฐานด้วยวิธีการแยกด้วยไฟฟ้าในเจล

### สร้างชั้นดีเอ็นเอตรวจจับ

เตรียมโดยการหยดดีเอ็นเอที่ละลายใน 2XSSC (100 ไมโครลิตร) ลงไปบนพื้นผิวของไอทีโอที่ติดอนุภาคทองคำนาโนแล้ว จำนวน 2 แผ่น (4 ขั้วไฟฟ้า) และอีกแผ่นหยด 2XSSC เพียงอย่างเดียว เพื่อเปรียบเทียบสัญญาณระหว่างตัวที่มีดีเอ็นเอตรวจจับ กับตัวที่ไม่มี โดยทำการหยดให้ท่วม

ขั้วไฟฟ้า นำกระดาษทิชชูหรือสำลีชุบน้ำวางไว้โดยรอบ และปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาล้างด้วย 2XSSC ที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับล้างดีเอ็นเอที่ไม่ติดบนผิวทองออก จากนั้นล้างด้วยน้ำ DI เพื่อล้างเกลือออก ซับให้แห้งแล้วนำมาวัดสัญญาณ EIS เพื่อเปรียบเทียบการติดของดีเอ็นเอที่ผ่านการอบโดยใช้เวลา 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง

### สร้างชั้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

ทำการหดยดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการจะตรวจคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML) และข้าวปทุมธานี 1 (PT1) ก่อนทำการหดยดีเอ็นเอต้องนำไปอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วหดยไปบนขั้วที่เราต้องการตรวจสอบ ทำการหดยให้ท่วมขั้วไฟฟ้า นำกระดาษทิชชูหรือสำลีชุบน้ำวางไว้โดยรอบ และปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วทำการวัดสัญญาณ EIS ลักษณะของพื้นผิวที่ได้เป็นดังแผน (Figure 1a-c)

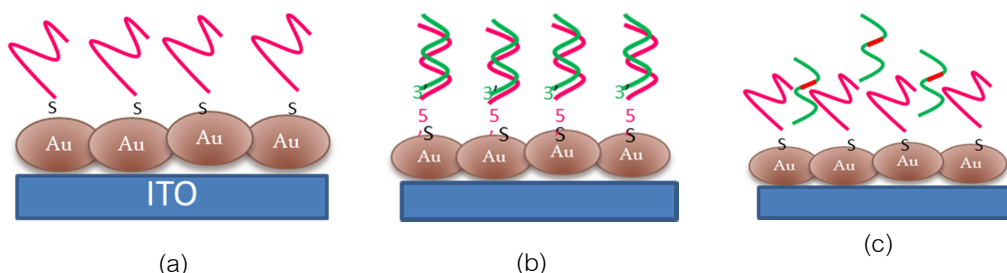


Figure 1 Diagram of (a) probe ssDNA attached on AuNPs modified ITO surface; (b) complemented target DNA surface; and (c) non-complemented target DNA surface.

### ผลการศึกษา

#### การวัดค่ากระแสเนื่องจากความต่างศักย์แบบวนของขั้วไอทีโอในสารละลาย Tris-HCl pH 7.0

การศึกษาเบื้องต้นคือการศึกษากิจกรรมของฐานรองหรือขั้วไอทีโอในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในกรณีที่ยังไม่ได้ใส่รีดอกซ์สปีชีส์ เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์และช่วงกว้างของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ได้กับขั้วไอทีโอ

จากที่ได้กล่าวมาจะเห็นว่าสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ในทุกระบบไฟฟ้าคือ สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 7.0 ผลการใช้วิธีการวัดกระแสเนื่องจาก การจ่ายความต่างศักย์แบบวนพบว่า ขั้วไอทีโอไม่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ใดๆ ในสารละลายดังกล่าว ในช่วงของความต่างศักย์ -0.7 - 1.5 โวลต์ เทียบกับ ขั้วอ้างอิง Ag/AgCl ดัง (Figure 2)

## การวัดสัญญาณทางไฟฟ้าเคมีของไอทีโอที่ปรับเปลี่ยนด้วยอนุภาคทองคำนาโน (ITO/AuNPs)

การวัดสัญญาณด้วยวิธีการวัดกระแสเนื่องจากความต่างศักย์แบบวนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์

หลังจากได้ศึกษาปฏิกิริยาของขั้วไอทีโอในสารละลายอิเล็กโทรไลต์แล้ว วิธีการวัดกระแสเนื่องจากความต่างศักย์แบบวนได้นำมาใช้ตรวจวัดปริมาณของอนุภาคทองคำนาโน บนพื้นผิวโดยประมาณจากปริมาณค่าอิเล็กตรอนที่เกิดการส่งผ่านที่ขั้วทั้งหมดต่ออนุภาคทองคำนาโน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วไอทีโอติดอนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 7.0 คือการให้และรับอิเล็กตรอนระหว่างอนุภาคทองคำนาโนและคลอไรด์ไอออน ดัง (Figure 3)

การวัดสัญญาณด้วยวิธีการวัดกระแสเนื่องจากความต่างศักย์แบบวนในสารละลายรีดอกซ์ปัสซีส์

นอกจากการวัดพื้นผิวดังกล่าวเพื่อตรวจสอบการติดของอนุภาคทองคำนาโนแล้ว ยังสามารถใช้วิธีการดังกล่าวประกอบกับการใช้รีดอกซ์ปัสซีส์ ferri/ferrocyanide เพื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ของพื้นผิวได้ จากการตรวจสอบดังกล่าวพบว่า ขั้วไฟฟ้าที่ต่างกันคือไอทีโอและไอทีโอที่ติดอนุภาคทองคำนาโน ให้ค่ากระแสไฟฟ้าเนื่องจากการรับ-ส่งอิเล็กตรอนที่ผิวแตกต่างกัน โดยอนุภาคทองคำนาโนเพิ่มความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้ดีขึ้น 3 เท่า ดัง (Figure 4)

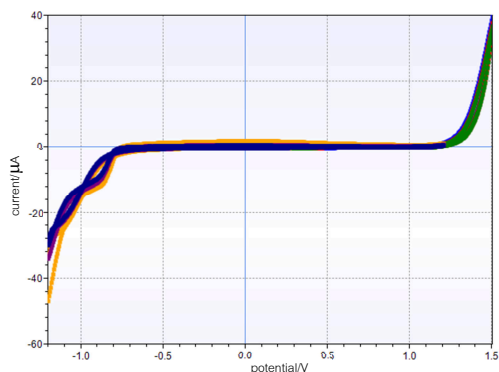


Figure 2 Cyclic voltammogram of the bare ITO in 20 mM Tris-HCl pH 7.0 solutions.

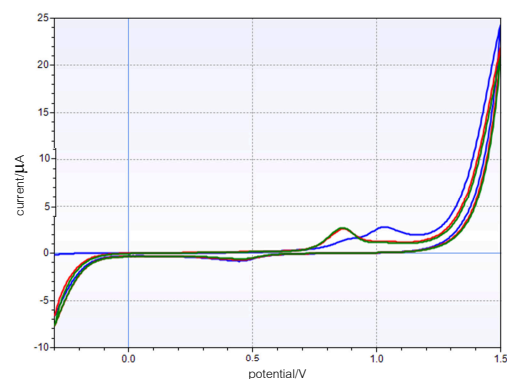


Figure 3 Cyclic voltammogram of AuNPs modified ITO in 20 mM Tris-HCl pH 7.0 solutions.

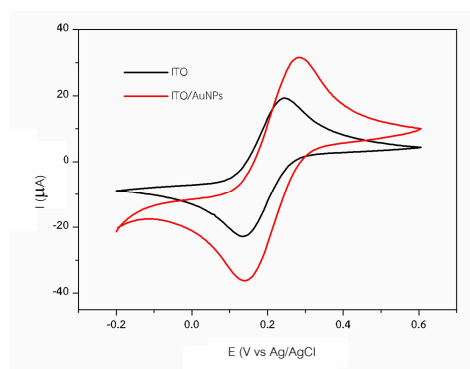


Figure 4 Cyclic voltammogram of the bare ITO (black line) and AuNPs drop cast onto ITO (red line) in 20 mM Tris-HCl pH 7.0 solutions.

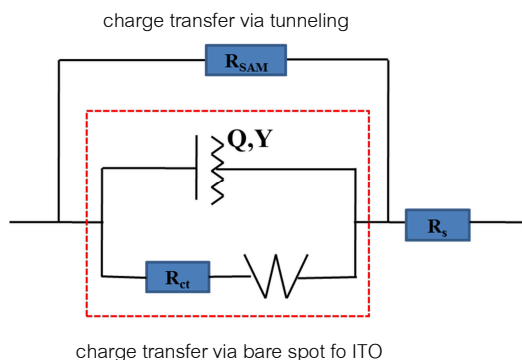


Figure 5 Schematic diagram of modified Randle equivalent circuit.

### การตรวจสอบพื้นผิวต่างๆ ด้วยวิธีการวัดค่าอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมี

การวัดค่าอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมีเป็นวิธีการที่บอกลักษณะของพื้นผิวที่เปลี่ยนไปได้ด้วยการรบกวนพื้นที่ผิวเล็กน้อยด้วยความต่างศักย์สัญญาณรูปไซน์ แล้วทำการวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่พื้นผิวดูดซับของกลับมา ค่ากระแสที่เปลี่ยนไปจะเป็นผลของพื้นที่ผิวที่เปลี่ยนไป เมื่อพิจารณาขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ดูดซับของกลับมาจะได้ค่าอิมพีแดนซ์ของพื้นผิว เฟสที่เปลี่ยนไปของกระแสไฟฟ้าจะบอกลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวซึ่งเทียบได้กับอุปกรณ์ทางไฟฟ้า อาทิเช่น ตัวต้านทาน ตัวเก็บประจุ ตัวเหนี่ยวนำ และอุปกรณ์เทียบเคียงอื่นๆ วิธีการทางอิมพีแดนซ์นั้นจะบอกลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวผ่านภาพ 2 ลักษณะซึ่งจะให้ข้อมูลที่แตกต่างกัน

จากภาพวงจรตัวแปรที่มีความสำคัญในการหาค่าอัตราส่วนของพื้นที่ที่ถูกปกคลุม (coverage) คือค่าความต้านทานการส่งผ่านอิเล็กตรอน (charge transfer resistance,  $R_{ct}$ ) และค่าของความจุไฟฟ้า

ซึ่งหาได้จากกระบวนการเลือกรูปแบบด้วยวิธีการเลขเชิงซ้อน จะได้ค่าดัง (Table 1) และจากผลการทดลองปริมาณของดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดลงไปนั้นสามารถพิจารณาได้จากค่า  $R_2$  หรือค่า  $R_{ct}$  ที่ได้จากสเปกตรัมของ EIS โดยใช้โปรแกรม EIS spectrum analyser ซึ่งเป็นโปรแกรมที่เปิดให้ใช้งานได้ฟรีพบว่าค่าของ  $R_{ct}$  มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เวลาที่ยอบ 0.5 ถึง 1.5 ชั่วโมง จากนั้นลดลงเมื่ออบนาน 2 ชั่วโมง ดังแสดงใน (Table 2) เมื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า  $R_{ct}$  ของการอบที่ระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอตรวจจับจะมีค่าปานกลางแต่ปริมาณการติดสม่าเสมอที่เวลา 0.5 ชั่วโมง ของการอบ จึงเลือกระยะเวลาดังกล่าวเพื่อใช้ในการสร้างชั้นดีเอ็นเอตรวจจับ และใช้เพื่อการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอเป้าหมาย

Table 1 Electrochemical impedance spectra parameter extracted from the equivalent circuit.

| sample    | $R_{ct}(\Omega)$ | $Q(S_n/\Omega \cdot cm^2)$ |
|-----------|------------------|----------------------------|
| ITO       | 642              | $4.88 \times 10^{-5}$      |
| AuNPs/ITO | 752              | $1.94 \times 10^{-7}$      |

### อภิปรายผล

#### การปรับพื้นผิวไอทีโอด้วยอนุภาคทองคำนาโน (ITO/AuNPs)

จากแผนภาพกระแส - ความต่างศักย์ไฟฟ้าของขั้วไอทีโอที่ปรับพื้นผิวด้วยอนุภาคทองคำนาโน (Figure 3) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับคลอไรด์ไอออนในสารละลายทำให้เกิด

แอนดิกและแคโทดิกฟีด อนุภาคทองคำนาโนสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้หลายค่า แต่เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ครั้งเดียว โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณประจุไฟฟ้าที่เกิดการส่งผ่านขั้วไอทีโอ-อนุภาคทองคำนาโนมีค่าเท่ากับ  $1.41 \times 10^{-7}$  คูลอมบ์ ต่อตารางเซนติเมตร และจากผลการวัดทางไฟฟ้าเคมีด้วยเทคนิคอื่น สามารถประมาณขนาดของ

อนุภาคทองคำนาโนได้ (ผลการวัดขนาดไม่ได้แสดงไว้ในบทความนี้) จากผลการวัดค่าอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมีพบว่าไอทีโอที่ปรับสภาพพื้นผิวด้วยอนุภาคทองคำนาโนให้ค่าการส่งผ่านอิเล็กตรอนใกล้เคียงกับไอทีโอ แต่เมื่อพิจารณาค่าการเก็บประจุหรือความสามารถชาร์จประจุที่ผิว สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวหลังปรับสภาพได้ถึง 40 เท่า

**Table 2** Charge transfer resistance for the various incubation times.

| incubation time<br>(hour) | charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) |      |        | mean | S.D. | % error |
|---------------------------|-----------------------------------------|------|--------|------|------|---------|
|                           | 1                                       | 2    | 3      |      |      |         |
| controlled                | 2115                                    | 2291 | 2504   | 2303 | 195  | 8.46    |
| 0.5                       | 5031                                    | 4414 | 4712   | 4719 | 309  | 6.54    |
| 1                         | 2522                                    | 2616 | 3869   | 3002 | 752  | 25.05   |
| 1.5                       | 5373                                    | 8322 | 11,148 | 8281 | 2888 | 34.87   |
| 2                         | 2423                                    | 3027 | 6363   | 3938 | 2122 | 53.89   |

### ชั้นสารดีเอ็นเอตรวจจับบนพื้นผิวไอทีโอที่ปรับสภาพด้วยอนุภาคทองคำนาโน (ssDNA/AuNPs/ITO)

ผลการตรวจสอบพื้นผิวด้วยวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมี พบว่า เวลาที่ใช้ในการอบเพื่อสร้างชั้นดีเอ็นเอตรวจจับดีที่สุดคือ 0.5 ชั่วโมง เนื่องจากให้ค่า  $R_{ct}$  มากที่สุด และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า  $R_{ct}$  ในแต่ละครั้งของการเตรียมพื้นผิวที่น้อยที่สุด ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแบบเดิมคือให้ชั้นสารอินทรีย์เพื่อการยึดเกาะดีเอ็นเอตรวจจับซึ่งจะได้ปริมาณดีเอ็นเอตรวจจับมากที่สุดเมื่ออบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถือว่าพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนช่วยลดเวลาการเตรียมชั้นดีเอ็นเอตรวจจับด้วยเมื่อพิจารณาค่า  $R_{ct}$  ของแต่ละช่วงการอบพบว่าอัตราส่วนของพื้นที่ผิวที่ถูกปกคลุมด้วยชั้นดีเอ็นเอ

เป้าหมาย (coverage) ของเวลาการอบ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับพื้นผิวควบคุม (controlled) ได้ค่าเท่ากับ 1.04, 0.30, 2.60 และ 0.71 ตามลำดับ ทั้งนี้เห็นว่าค่าการปกคลุมพื้นผิวดังกล่าวมีค่าที่สูงกว่า 1 เนื่องจากการติดของชั้นดีเอ็นเอบนอนุภาคทองคำนาโนน่าจะเป็นการติดในลักษณะ 3 มิติ ไม่ใช่เป็นการติดแบบชั้นเดียว (monolayer) ซึ่งสามารถใช้หลักการคำนวณดังกล่าวในการหาค่าได้

### ชั้นสารดีเอ็นเอตรวจจับบนพื้นผิวไอทีโอที่ปรับสภาพด้วยอนุภาคทองคำนาโน (ssDNA/AuNPs/ITO)

ผลการตรวจสอบพื้นผิวดีเอ็นเอตรวจจับที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอของข้าว 2 สายพันธุ์ด้วยวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมี พบว่าการเข้าคู่กับดีเอ็นเอ



ของข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งไม่ใช่ข้าวหอมมะลิ สามารถเข้าคู่กันได้ ส่งผลให้ค่าของ  $R_{ct}$  มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 68 จากค่าเดิม ส่วนการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ ข้าวสายพันธุ์ดอกมะลิ 105 มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.37 แสดงให้เห็นว่าข้าวที่มีถิ่นความหอมไม่สามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอตรวจจับบนพื้นผิวได้

### สรุป

พื้นผิวของอินเดียมออกไซด์เจือทินุก (ITO) สามารถนำมาเป็นฐานรองเพื่อใช้เป็นขั้วไฟฟ้าได้ เนื่องจากมีสภาพการนำไฟฟ้าที่ดี แต่เพื่อให้การนำไฟฟ้าดียิ่งขึ้นจึงมีการปรับพื้นผิวของขั้วไอทีโอด้วยการหยดอนุภาคทองคำนาโน เป็นอันตรกิริยาเชิงกายภาพ จะทำให้ได้ค่ากระแสในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้มากขึ้นถึง 3 เท่าจากขั้วไอทีโอปกติในการติดชั้นดีเอ็นเอ จะเริ่มด้วยการติดชั้นดีเอ็นเอตรวจจับที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกัน ผลที่ได้คือปริมาณของดีเอ็นเอตรวจจับจะมีค่าปานกลางแต่ปริมาณการติดสม่ำเสมอที่เวลา 0.5 ชั่วโมง ของการอบ จึงแนะนำว่าในการทดลองครั้งต่อไปควรรอบดีเอ็นเอตรวจจับที่เวลา 0.5 ชั่วโมง จากผลการศึกษาดังกล่าววิธีการวัดค่าอิมพีแดนซ์เชิงไฟฟ้าเคมีของข้าวปทุมธานี 1 พบว่าค่าความต้านทานการส่งผ่านอิเล็กตรอน ( $R_{ct}$ ) ของพื้นผิวดีเอ็นเอเป้าหมายมีค่าเพิ่มขึ้นจากชั้นดีเอ็นเอตรวจจับหลายเท่าอย่างเห็นได้ชัด ส่วนข้าวขาวดอกมะลิ 105 ค่าความต้านทานการส่งผ่านอิเล็กตรอน ( $R_{ct}$ ) ของพื้นผิวดีเอ็นเอเป้าหมายจะต่างจากชั้นดีเอ็นเอตรวจจับไม่มากนัก หรือแทบจะไม่เปลี่ยนแปลง จึงทำให้สามารถจำแนกข้าวสองสายพันธุ์นี้ได้

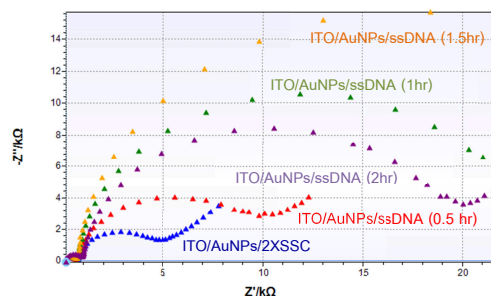


Figure 6 Nyquist plot of probe ssDNA layer as vary incubation time.

0.5 (▲), 1 (▲), 1.5 (▲) and 2 (▲) hours.

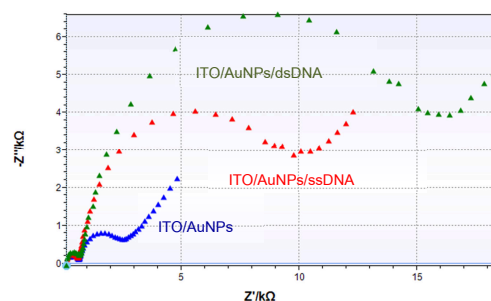


Figure 7 Comparison of Nyquist plots before and after probe ssDNA hybridized with target DNA for PCR product of Pathumtani 1.

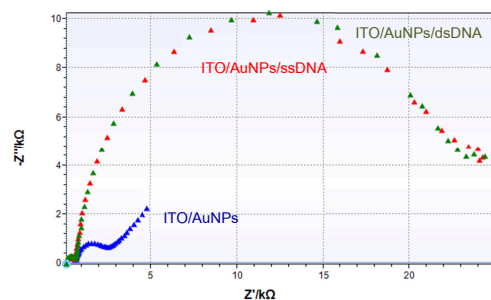


Figure 8 Comparison of Nyquist plots before and after probe ssDNA hybridized with target DNA for PCR product of Khaow Dok Mali 105.

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิงบประมาณแผ่นดิน ปี 2558 นอกจากนี้ผลงานวิจัยดังกล่าวยังได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วิษุวัต สงนวล ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการออกแบบลำดับเบสของดีเอ็นเอตรวจจับสำหรับการตรวจสอบยีนข้าว 2 สายพันธุ์นี้

### เอกสารอ้างอิง

- Bourgis, F., R. Guyot, H. Gherbi, E. Tailliez, I. Amabile, J. Salse, M. Lorieux, M. Delseny and A. Ghesquière. 2008. Characterization of the major fragrance gene from an aromatic japonica rice and analysis of its diversity in Asian cultivated rice. *Theor Appl Genet.* 117(3): 353-368.
- Chen, S., Y. Yang, W. Shi, Q. Ji, F. He, Z. Zhang, Z. Cheng, X. Liu and M. Xu. 2008. Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell.* 20(7): 1850-1861.
- Dela Cruz, N. and G.S. Khush. 2000. Aromatic rices: Chapter 3 Rice grain quality evaluation procedures. Oxford & IBH Publishing, New Deli.
- Rattanapol, P., P. Sripichitt and T. Sreewongchai. 2011. Development of functional DNA marker specific to aromatic gene in rice. pp. 574-580. *In: Proceedings of 49<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Plants*, 1-4 February 2011. Bangkok, Thailand.