



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การพัฒนาอนาคตของนาโนเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู

โดย อ.ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ และคณะ

มิถุนายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การพัฒนานวัตกรรมทางเทคโนโลยีเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู

อ.ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code: MRG5080239

Project Title: Development of gold nanoparticle for diagnosis of Leptospirosis

การพัฒนานอนุภาคทองคำนาโนเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู

Investigator: Rojrit Rojanathanes, Ph.D.

อ.ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ

E-mail address: rojrit@hotmail.com

Project Period: 2 years

๒ ปี

Abstract:

Leptospirosis is a serious bacterial disease caused by *Leptospira spp.* In this research, gold nanoparticle is applied in order to establish a novel detection method. The specific antibody for *Leptospira pyrogenes* was immobilised onto PEI-stabilised gold nanoparticles. The coagulation of gold nanoparticles and *Leptospira pyrogenes* was observed with the detection limit of 100 cells / mL, 1,000 times more sensitive comparing to standard dot-blot ELISA. Solid-supported antibody-modified gold nanoparticle is also developed to innovate the easy-to-use strip test prototype.

โรคฉี่หนูเป็นโรคร้ายแรงจากแบคทีเรีย เกิดขึ้นจากเชื้อ *Leptospira spp* ในงานวิจัยนี้ได้ใช้อนุภาคทองคำนาโนเพื่อจัดสร้างวิธีตรวจหาเชื้อวิธีใหม่ โดยตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Leptospira pyrogenes* ไว้บนอนุภาคทองคำนาโนที่ทำให้เสถียรด้วย PEI การตกตะกอนร่วมกันของอนุภาคทองคำนาโนและ *Leptospira pyrogenes* สามารถสังเกตพบได้ด้วยขอบเขตการตรวจวัดที่ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งไวกว่าวิธีมาตรฐาน dot-blot ELISA ถึง 1,000 เท่า และยังได้พัฒนานอนุภาคทองคำนาโนที่ถูกปรับปรุงผิวด้วยแอนติบอดีอยู่บนตัวรองรับสถานะของแข็งเพื่อพัฒนานวัตกรรมเป็นผลิตภัณฑ์แถบทดสอบต้นแบบที่ง่ายต่อการใช้งาน

Key words: gold nanoparticle, Leptospirosis, antigen-antibody, precipitation, strip test

อนุภาคนาโน, โรคฉี่หนู, แอนติเจน-แอนติบอดี, ตกตะกอน, แถบทดสอบ

สัญญาเลขที่ MRG5080239

โครงการ : การพัฒนาอนุภาคทองคำเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ ๒๔ เดือนของหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ชื่อโครงการ	การพัฒนาอนุภาคทองคำเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู		
ระยะเวลาโครงการ	๒ ปี		
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน	อ.ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ		
ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา	รศ.ดร. สนอง เอกสิทธิ์		
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่	๒ กรกฎาคม ๒๕๕๑	ถึงวันที่	๑ มกราคม ๒๕๕๒
ความสำคัญและที่มาของปัญหา			

โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown Origin, FUO) เป็นกลุ่มอาการของโรคที่มาด้วยไข้ ไม่สามารถวินิจฉัยได้ในเวลาอันสั้น ไข้ชนิดนี้มักเป็นอยู่นานและไม่หายเอง การวินิจฉัยโรคนี้ ต้องเข้าเกณฑ์ตามคำจำกัดความของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ครบทั้งสามข้อ คือ

1. วัดอุณหภูมิร่างกายได้สูงกว่า 38.3 °C หลายๆครั้ง
2. มีระยะเวลาของการมีไข้ยาวนานกว่า 3 สัปดาห์
3. ไม่สามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ทั้งๆที่อยู่ในโรงพยาบาล

ในแง่การสืบค้นทางห้องปฏิบัติการนั้น ถือเป็นหัวใจในการตรวจหาสาเหตุของไข้และการวัดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งใช้ในการติดตามผลการรักษาด้วย โดยส่วนใหญ่แล้วการตรวจที่ถือว่าเป็นมาตรฐาน(gold standard) คือการตรวจโดยการเพาะเชื้อก่อโรค ในกรณีที่เชื้อสามารถทำการเพาะเชื้อได้ การเพาะเชื้อช่วยวินิจฉัยหรือวินิจฉัยแยกโรคได้มากแต่ต้องเป็นห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพพอ การเพาะเชื้อจากเลือดต้องใช้วิธีที่ถูกต้องเหมาะสม และยังต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อที่สงสัยว่าก่อโรค ในกรณีที่การเพาะเชื้อได้ผลไม่ดี การดู standard serologic assay เป็นที่ยอมรับว่าเป็นการตรวจมาตรฐานในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคที่เพาะเชื้อยาก

โรคฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (FUO) ชนิดหนึ่งซึ่งพบระบาดมากเป็นประจำทุกปีในประเทศไทย โดยการตรวจวินิจฉัยไม่สามารถทำได้โดยเพาะเชื้อได้ง่ายนัก จึงนิยมที่จะตรวจโดยวิธี Microscopic Agglutination Assay (MAT) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leptospira interrogans* ที่ก่อโรค อย่างไรก็ตามการตรวจด้วย serodiagnosis นี้ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ บุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจสอบ และต้องรอเวลาที่จะตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ antibody titer ซึ่งส่วนใหญ่ ต้องใช้เวลาานหลังตรวจพบว่ามีผู้ป่วย ผลบวกของ antibody titer มักตรวจพบหลังการป่วยรุนแรงในระยะแรกหายไปแล้ว บางครั้งยังไม่สามารถวินิจฉัยสาเหตุของไข้แม้ผู้ป่วยจะถึงแก่กรรมแล้ว

โครงการวิจัยนี้จึงสนใจจะศึกษาและพัฒนาวิธีวินิจฉัยสาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในส่วนที่เกิดจากโรคฉี่หนู โดยนำความรู้ด้านนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคทางอนุชีววิทยา อาศัยหลักการคือ เตรียม DNA สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเหมือนกับพบในเชื้อ *Leptospira interrogans* มาทำเป็น probe เชื่อมต่อกับ อนุภาคทองคำ และอาศัยคุณสมบัติที่ว่า DNA probe ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น กับ ดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคในสิ่งส่งตรวจ จะสามารถจับกันได้ (hybridization) ถ้ามีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน (complementary) เมื่อนำสาย DNA มาต่อกับอนุภาคทองคำขนาดเล็กกระดัดนาโนเมตร อนุภาคทองคำจะเป็นเสมือน marker ช่วยบอกได้ว่ามี DNA ของเชื้อก่อโรคหรือไม่ โดยไม่ต้องตรวจโดยวิธี Microscopic Agglutination Assay (MAT) ซึ่งยุ่งยากกว่าในระดับปฏิบัติการ

อนุภาคนาโน (gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโนเมตรที่มีความเสถียรสูงสุดชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถเตรียมได้ในลักษณะของคอลลอยด์ทั้งในน้ำ และในตัวทำละลายอินทรีย์ ประโยชน์ด้านหนึ่งที่มีการนำเอา AuNPs ไปใช้กันอย่างแพร่หลายก็คือ การนำไปใช้เป็นเครื่องมือตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) และเป็นเครื่องมือตรวจวัดในระดับโมเลกุลได้ (molecular sensor) นอกจากนั้นยังมีการนำไปใช้ในการถ่ายภาพทางการแพทย์ (medical imaging) ได้อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติเชิงแสงของอนุภาค AuNPs ที่เรียกว่าปรากฏการณ์พลาสมอนเรโซแนนซ์ที่พื้นผิวของอนุภาค (surface plasmon resonance, SPR)

ที่พื้นผิวของโลหะซึ่งสัมผัสกับสารไดอิเล็กทริก เช่นอากาศ หรือน้ำ เมื่อมีแสงที่มีความยาวเหมาะสมค่าหนึ่ง ที่มีระนาบของสนามไฟฟ้าในทิศทางเดียวกับการตกกระทบในมุมที่เกิดการสะท้อนกลับหมด กระบะเข้ากับพื้นผิว จะทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่พื้นผิวเกิดการสั่นพ้อง และมีการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นนั้นๆ ไปบางส่วน ทำให้แสงที่สะท้อนออกมามีความเข้มที่ลดลง ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้เองที่เรียกว่าปรากฏการณ์พลาสมอนเรโซแนนซ์ที่พื้นผิวของอนุภาค (SPR) และด้วยปรากฏการณ์เช่นนี้เองที่ทำให้ AuNPs มีการดูดกลืนแสงในช่วงประมาณ 520 นาโนเมตร คอลลอยด์ของ AuNPs จึงมีสีแดง ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาวะแวดล้อม เช่นดัชนีหักเหของตัวกลางที่ AuNPs สัมผัสอยู่

การตรวจวัดการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารที่วิเคราะห์กับอนุภาคนาโนนั้น สามารถทำได้โดยใช้แสงเมื่อผิวหน้าของอนุภาคนาโนเกิดการเปลี่ยนแปลง จะทำให้ปรากฏการณ์ surface plasmon resonance เปลี่ยนแปลงตามไปด้วยซึ่งการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปสามารถตรวจวัดได้ง่ายด้วยสเปกโตรมิเตอร์ (UV-vis spectrometer) ซึ่งอาจจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยตาเปล่าในบางสภาวะ

AuNPs นั้น เมื่อมีสารช่วยทำให้เสถียรเข้ามาล้อมรอบ จะทำให้ AuNPs ไม่รวมตัวกันหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน เพราะสารช่วยทำให้เสถียรจะเกาะที่ผิวของ AuNPs และทำให้ผิวของ AuNPs แต่ละอนุภาคไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ อย่างไรก็ตาม สารช่วยทำให้เสถียรเหล่านี้สามารถจะทำการแลกเปลี่ยนเข้าออกจากผิวของ AuNPs ได้²⁷ ทำให้เราสามารถปรับปรุงผิวหน้าของ AuNPs ให้มีโมเลกุลที่ต้องการมาเคลือบผิวได้ด้วย ด้วยเหตุนี้เองจึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารทางชีวภาพที่มีความจำเพาะเจาะจงได้อย่าง

หลากหลาย โดยการปรับปรุงผิวหน้าของ AuNPs ด้วยสารที่มีความสามารถในการเลือกจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ตรวจหา จึงเปรียบได้ว่า AuNPs ทำหน้าที่เป็นหน่วยรายงานผล (reporter) สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดระดับโมเลกุล

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องมือตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนูจากอนุภาคทองคำนาโน

สรุปผลการดำเนินงานโดยย่อ

ได้สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาด 9 นาโนเมตรได้ และศึกษาวิธีการต่างๆ ที่จะสามารถใช้ปรับปรุงผิวหน้าของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ด้วยสารที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Leptospira interrogans* โดยได้ทดลองทำการปรับปรุงผิวหน้าของอนุภาคทองคำนาโนด้วยสาย DNA และ antibody ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Leptospira interrogans*

แต่เดิมผู้วิจัยได้ใช้สาย DNA ที่เป็นคู่สมกับสาย DNA ของเชื้อ *Leptospira interrogans* ที่พบได้ในทุกๆ สายพันธุ์ และไม่พบในเชื้อชนิดอื่น ซึ่งสาย DNA ดังกล่าวได้ทำการปรับเปลี่ยนส่วนปลายของสายด้วยหมู่ thiol โดยมี T10 เป็นสายเชื่อม เพื่อให้สาย DNA ยื่นออกมาจากผิวหน้าของอนุภาคทองคำนาโนมากพอ ที่จะพันธะของ citrate ion ที่ล้อมรอบอนุภาคทองคำอยู่ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารช่วยให้อนุภาคทองคำเสถียร การพิจารณาการยัดติดของสาย DNA เป้าหมายลงบนอนุภาคทองคำนาโนนั้น สามารถทำได้โดยอาศัยวิธีการของ UV-visible spectrometry ซึ่งใช้วัดปริมาณ DNA ในสารละลายก่อน และ หลังผสมกับอนุภาคทองคำนาโน เพื่อหาปริมาณของ DNA ที่หายไป

อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพบว่า ปริมาณของ DNA ที่ถูกตรึงไว้บนผิวของอนุภาคทองคำนาโนนั้นยังมีปริมาณไม่มาก ผู้วิจัยจึงจะได้พัฒนารูปแบบการยัดติดสาย DNA ลงบนอนุภาคทองคำนาโน โดยทำการปรับเปลี่ยน pH ของสารละลายทองคำก่อน เพื่อให้ประจุที่ผิวของอนุภาคทองคำเปลี่ยนไป และน่าจะเอื้อต่อการยัดติดกับสาย DNA ที่มีหมู่ thiol อยู่ปลายได้ดียิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการทดลองดังกล่าวก็ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

จึงได้ดำเนินการแก้ไขปัญหาการยัดติดกับ DNA บนอนุภาคทองคำนาโน ด้วยการเปลี่ยนระบบการตรวจวัดจากการตรวจวัดโดยตรงจากสาย DNA ที่ตรึงลงบนอนุภาคทองคำนาโน เป็นการตรวจวัดโดยอ้อมด้วยการตรวจการเกิด DNA สายคู่ระหว่าง target และ probe โดยใช้อนุภาคทองคำนาโนแทน จึงไม่จำเป็นต้องตรึง probe DNA ลงบนอนุภาคทองคำก่อน โดยในขั้นแรกนั้นสาย DNA ที่ศึกษายังเป็นสายทดสอบที่ไม่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Leptospira Interrogans* ซึ่งประสบผลสำเร็จสามารถตรวจหา DNA ได้เป็นผลดีจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบกับอนุภาคเงินนาโน พบว่าระบบทองคำสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่าได้ดีกว่า แต่ระบบเงินสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ได้ดีกว่า ขณะนี้อยู่ในระหว่างเตรียม manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Experimental Biology and Medicine ซึ่งคาดว่าจะแล้วเสร็จภายในเดือนกรกฎาคมนี้

นอกจากนั้น ผู้วิจัยประสบผลสำเร็จในการนำเอา antibody ของเชื้อ *Leptospira interrogans* มาตรึงที่ผิวของอนุภาคทองคำโนที่สังเคราะห์ได้ โดยได้เปลี่ยนผิวหน้าของอนุภาคทองคำโนด้วย PEI ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก จึงสามารถเกิดแรงทางไฟฟ้าจับยึดกับ antibody ของเชื้อ *Leptospira interrogans* ได้ ในเบื้องต้นนี้ เมื่อนำไปทำการวิเคราะห์กับ antigen แล้วให้ผลการทดลองที่ดี ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนของการยื่นขอจดทะเบียนสิทธิบัตรร่วมกับ NANOTEC ซึ่งอยู่ในขั้นตอนการตรวจสอบขั้นสุดท้ายซึ่งคาดว่าจะแล้วเสร็จภายในเดือนกรกฎาคมนี้ และจะได้ดำเนินการตีพิมพ์ในวารสารต่อไปภายในเดือนสิงหาคม

วิธีทดลอง

การทดสอบหาเชื้อ *Leptospira interrogans* ด้วยสารละลาย AuNPs

1. การเตรียมสารละลายทองคำเพื่อวิเคราะห์หาเชื้อ *Leptospira interrogans*
 - 1.1 นำสารละลาย AuNPs ที่มี PEI เป็นสารช่วยทำให้เสถียรมาปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH ให้มีค่า pH ประมาณ 10
 - 1.2 เติม polyclonal antibody ของ *Leptospira pyrogenes* ที่มีความเข้มข้น 5mg/μL ปริมาตร 1μL ลงในสารละลาย AuNPs 1000 ml แล้ว incubate เป็นเวลา 30 นาที
 - 1.3 ในสารละลายที่ได้ไป centrifuge ที่ 2000 G เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนออกจนเหลือสารละลาย ประมาณ 100 μL แล้วเขย่าเพื่อละลายตะกอนให้หมด
 - 1.4 เติม polyclonal antibody ของ *Leptospira pyrogenes* ที่มีความเข้มข้น 5mg/μL ปริมาตร 1μL ลงในสารละลายอีกครั้ง แล้วนำไป incubate ต่อเป็นเวลา 30 นาที
 - 1.5 ตั้งสารละลายทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ตกตะกอนลงมา
 - 1.6 ดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนออก แล้วละลายตะกอนกลับด้วยน้ำปริมาตร 180 μL
 - 1.7 เติมสารละลาย PBS ลงไปอีก 20 μL
2. การวิเคราะห์หาเชื้อ *Leptospira interrogans* ด้วยสารละลายทองคำ
 - 2.1 นำสารละลาย AuNPs–Ab ที่เตรียมได้มา 50 μL ลงในหลอดทดลองขนาด 200 μL จำนวน 3 หลอด
 - 2.2 เติมสารละลายที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 μL ลงในหลอดที่ 1 และ เติมน้ำปริมาตรเท่ากันลงในหลอดที่ 2 โดยใช้ antigen ของ *Leptospira pyrogenes* ความเข้มข้น 10^6 /μL ปริมาตร 1μL ลงในหลอดที่ 3 เพื่อเป็นสารละลายเปรียบเทียบ
 - 2.3 incubate สารละลายทั้งสามเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที หลอดที่มี antigen ของ *Leptospira pyrogenes* อยู่จะเกิดการตกตะกอนกับ AuNPs–Ab

การตรวจสอบ DNA ด้วย AuNPs และ AgNPs ที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงผิวหน้า

1. เติม 5 μM ของ DNA probe (LIR) ปริมาณ 2 μL และ 5 μM ของ DNA target [complementary(LIF) หรือ non complementary(1F)] ปริมาณ 2 μL ลงใน micro tube ขนาด 1.5 mL
2. เติม hybridisation buffer (ประกอบด้วย 2XSSC, 10% dextran sulphate, 50% formamide) ปริมาณ 20 μL ลงใน micro tube ข้อ 1.1 ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. นำ micro tube ในข้อ 2 มา centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
4. ดูดสารละลายใสทิ้ง พร้อมเติม 100 ppm AuNPs ปริมาณ 100 μL เขย่าเบาๆ ให้ผสมกันที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย
5. เติมน้ำลงในสารละลาย AuNPs ในข้อ 4 ให้ได้ปริมาณ 500 μL แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง
6. สำหรับ AgNPs ทำการทดลองเช่นเดียวกัน

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

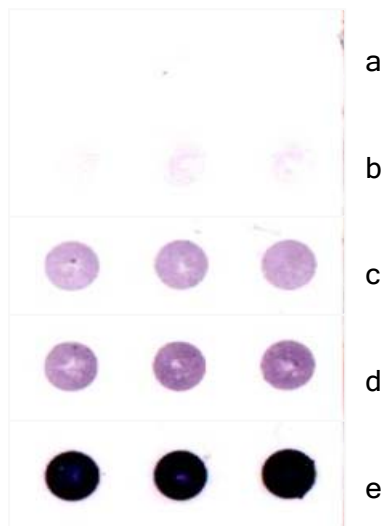
การทดสอบหาเชื้อ *Leptospira interrogans* ด้วยสารละลาย AuNPs

จากการทดลองพบว่าเมื่อผสมสารละลายของอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงแอนติบอดีไว้ที่ผิวหน้าแล้วกับสารละลายของเชื้อในสภาวะตัวทำละลายที่เหมาะสม เมื่อ centrifuge แล้วจะสามารถสังเกตพบการตกตะกอนรวมกลุ่มกันของอนุภาคทองคำนาโนเป็นจุดสีแดงเข้มที่ก้นหลอดได้ด้วยตาเปล่า แต่ถ้าไม่มีเชื้ออยู่ จะไม่สามารถสังเกตการตกตะกอนรวมกลุ่มกันของอนุภาคทองคำนาโนได้ดังแสดงในภาพที่ 1



รูปที่ 1: แสดงการตกตะกอนและเปลี่ยนสีภายหลังการ centrifuge ของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร เมื่อผสมกับแอนติเจนในปริมาณ 0, 10, 10^2 , 10^3 , 10^5 และ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

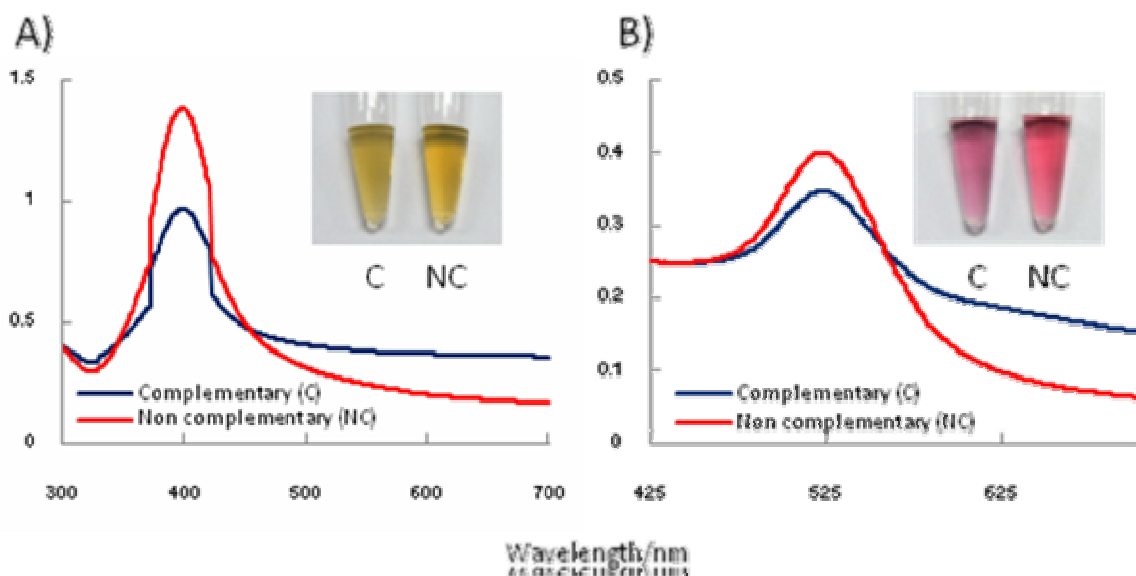
จะเห็นได้ว่า การตกตะกอนจะเห็นได้ชัดเจนเป็นจุดสีแดงเข้มที่เสถียร เมื่อมีปริมาณแอนติเจน อย่างน้อย 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี dot-blot ELISA ซึ่งเป็น วิธีมาตรฐาน พบว่า dot-blot ELISA มีความไวในการตรวจเชื้อโรคฉี่หนู เท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 2 แสดงว่าวิธีการตกตะกอนของอนุภาคทองคำที่ได้รับการพัฒนาขึ้นใหม่นี้ มีประสิทธิภาพสูงกว่า กล่าวคือมีความไวในการตรวจวิเคราะห์เพิ่มขึ้นถึง 1000 เท่า



รูปที่ 2: แสดงการเปลี่ยนสีของการวิเคราะห์แอนติเจนด้วยวิธีมาตรฐาน dot-blot ELISA โดยมีปริมาณแอนติเจนเท่ากับ 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 และ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การตรวจสอบ DNA ด้วย AuNPs และ AgNPs ที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงผิวหน้า

จากการทดลองพบว่า เมื่อเติมสาย DNA แบบคู่สมกัน และ แบบที่ไม่เป็นคู่สมกัน ผสมกับอนุภาคโลหะนาโนในสารละลายที่ปรับสถานะให้เหมาะสมแล้ว จะพบการเปลี่ยนแปลงของสี และ UV-visible spectrum ดังแสดงในภาพที่ 3



รูปที่ 3: แสดงการเปลี่ยนสีและสเปกตรัมของสารละลายอนุภาคเงินและทองคำตามลำดับ



รูปที่ 4: แสดงสีของสารละลายอนุภาคเงินและทองคำตามลำดับ

จากรูปที่ 3 และ 4 จะเห็นได้ชัดเจนว่า สาย DNA แบบไม่เป็นคู่สมกันซึ่งจะไม่เกิดเป็นเกลียวคู่สามารถรักษาเสถียรภาพของอนุภาคโลหะนาโนได้ดี ทำให้เมื่อผสมกับสารละลายอนุภาคโลหะนาโนแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาค แต่เมื่อผสม DNA ที่เป็นคู่สมกัน สาย DNA ที่อยู่ในรูปแบบเกลียวคู่จะมีความสามารถในการล้อมรอบอนุภาคโลหะนาโนได้น้อยกว่า เนื่องจากส่วนหมู่อะมิโนของนิวคลีโอเบสนั้นเกิดพันธะไฮโดรเจนซึ่งกันและกันไม่ได้อยู่ในรูปอิสระ ทำให้เข้าล้อมรอบอนุภาคโลหะนาโนได้น้อยลง จึงพบว่าเมื่อผสม DNA คู่สมลงกับสารละลายโลหะนาโนในสถานะที่ใช้ทดลองนี้ ไม่สามารถปกป้องรักษาความเสถียรของอนุภาคโลหะนาโนได้ จึงสังเกตพบการรวมกลุ่มกันของอนุภาคโลหะนาโนจนเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้อย่างชัดเจน

โดยระบบอนุภาคทองคำนาโนสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่าได้ดีกว่าเพราะสีของอนุภาคก่อนและหลังการ aggregation มีความแตกต่างกันระหว่างมีสีแดงและน้ำเงินจึงสามารถแยกแยะด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน แต่ระบบอนุภาคเงินนาโนสีเหลืองและสีน้ำตาลขุ่นที่ยากต่อการสังเกตสีมากกว่า

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบหาเชื้อ *Leptospira interrogans* ด้วยสารละลาย AuNPs

พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *Leptospira pyrogenes* ด้วยวิธี antigen-antibody precipitation ได้ ซึ่งในเบื้องต้นนี้ มีความไวน้อยกว่า 10^2 เซลล์/มล. หรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน dot-blot ELISA ที่มีความไวในการตรวจเชื้อโรคนี้หนุ่ เท่ากับ 10^5 เซลล์/มล.

การตรวจสาย DNA ด้วย AuNPs และ AgNPs ที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงผิวหน้า

ในขั้นแรกนั้นสาย DNA ที่ศึกษายังเป็นสายทดสอบที่ไม่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Leotpspira Interrogans* ซึ่งประสบผลสำเร็จสามารถตรวจหา DNA ได้เป็นผลดีจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบกับอนุภาคเงินนาโน พบว่าระบบอนุภาคทองคำนาโนสามารถตรวจวิเคราะห์สาย DNA โดยเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่าได้ดีกว่าเพราะสีของอนุภาคก่อนและหลังการ aggregation มีความแตกต่างกันโดยมีสีแดงและน้ำเงินตามลำดับ จึงสามารถแยกแยะด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน แต่ระบบอนุภาคเงินนาโนสีเหลืองและสีน้ำตาลขุ่นยากต่อการสังเกตมากกว่า

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยกำลังสนใจในการพัฒนาระบบการตรวจวัดให้ใช้งานได้ง่ายขึ้น จึงได้ติดต่อกับทางบริษัทอทเมเน เพื่อพัฒนาตัวดูดซับมาใช้ในการตรวจวัดในรูปแบบแถบตรวจวัด (strip test) ในลักษณะเดียวกับชุดทดสอบ การตั้งครรภ์ เพื่อให้ใช้งานได้ง่ายต่อไป ขณะนี้สามารถตรึง อนุภาคทองคำที่มี antibody ยึดติดที่ผิวเอาไว้บน conjugate pad ได้ และเตรียม nitrocellulose membrane บรรจุ test line และ control line ไว้ได้เรียบร้อยแล้ว กำลังอยู่ในระหว่างการปรับปรุงสภาวะที่จะใช้ในการทดลอง เพื่อให้สามารถใช้งานได้จริงอยู่

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากติดข้อกำหนดทางกฎหมาย จำเป็นต้องรอให้ยื่นจดสิทธิบัตร ก่อนจึงเผยแพร่งานวิจัยสู่สาธารณะได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการดังกล่าวน่าจะเสร็จได้ทันภายใน เดือนกรกฎาคมนี้ และได้ยื่น manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Experimental Biology and Medicine ต่อไปภายในเดือนสิงหาคม รวม 2 บทความ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะ

ได้มีนิสิตจากสถาบันบัณฑิตบริหารธุรกิจ ศศินทร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สนใจนำ งานวิจัยนี้ส่งประกวดแผนธุรกิจใน “การแข่งขันแนวความคิดทางเทคโนโลยี จากงานวิจัยไปสู่ ผลิตภัณฑ์” (Idea to Product Competition, I2P) ซึ่งได้รางวัลชนะเลิศในระดับภูมิภาคเอเชีย ที่ จัดขึ้น ณ อุทยานวิทยาศาสตร์ ระหว่างวันที่ 18 ถึง 19 ธันวาคม 2551 และจะเป็นตัวแทนไป ประกวดในระดับโลกที่ประเทศสหรัฐอเมริกาต่อไป

3. อื่นๆ

ขณะนี้อยู่ในกระบวนการตรวจสอบขั้นสุดท้ายก่อนยื่นจดสิทธิบัตรร่วมกับ NANOTEC ซึ่ง คาดว่าจะแล้วเสร็จและยื่นจดสิทธิบัตรได้ภายในเดือนกรกฎาคมนี้

ลงนาม

อ.ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

ลงนาม

รศ.ดร. สนอง เอกสิทธิ์
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

สัญญาเลขที่ MRG5080239

โครงการ : การพัฒนาอนาคตของนาโนเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู

รายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ ๒๔ เดือนของนักวิจัยที่ปรึกษา

ชื่อโครงการ	การพัฒนาอนาคตของนาโนเพื่อการวินิจฉัยโรคฉี่หนู
ระยะเวลาโครงการ	๒ ปี
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน	อ.ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ
ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา	รศ.ดร. สมอง เอกสิทธิ์
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่	๒ กรกฎาคม ๒๕๕๑ ถึงวันที่ ๑ กรกฎาคม ๒๕๕๒

1. ความถี่ในการพบปะปรึกษาระหว่างนักวิจัยที่ปรึกษากับหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

☐ มาก ☐ ปานกลาง ☐ น้อย

โดยวิธี (เช่นพบด้วยตัวเอง, e-mail หรือ อื่นๆ)
.....

2. จากผลงานที่ผ่านมา ท่านคิดว่ามีแนวโน้มที่จะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้หรือไม่

☐ ได้ ☐ ยังไม่แน่ใจ ☐ ไม่ได้

โปรดให้เหตุผล
.....
.....
.....

3. แนวโน้มที่จะนำไปเสนอในการประชุมวิชาการในระดับนานาชาติ

☐ ได้ ☐ ยังไม่แน่ใจ ☐ ไม่ได้

โปรดให้เหตุผล
.....
.....

4. ในกรณีที่ผลงานไม่สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ ท่านมีข้อเสนอแนะให้ สกว. ให้ความช่วยเหลืออย่างไร

.....

.....

.....

ลงนาม

รศ.ดร. สนอง เอกสิทธิ์
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

หมายเหตุ : หากเนื้อที่ที่เว้นไว้ไม่เพียงพอ โปรดเขียนรายละเอียดในกระดาษต่างหาก (กรุณามั่นใจก่อน แล้วให้หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุนส่งมายัง สกว. พร้อมกับรายงานความก้าวหน้าทุกครั้ง)
