# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการ

## ชุดอุปกรณ์เพื่อการตรวจสอบโปรตีนบนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ยาง

โดย

ดร. อภิชาติ เพ็งดำ และคณะ

พฤศจิกายน 2562

สัญญาเลขที่ RDG62T0003

# ร่างรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการ

## ชุดอุปกรณ์เพื่อการตรวจสอบโปรตีนบนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ยาง


โดย

| | |
|---|---|
| ดร. อภิชาติ เพ็งดำ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ |
| ผศ. ดร. พันทิพา รุณแสง | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ |
| ศ. ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ |
| ผศ. ดร. พร้อมพงศ์ เพียรพินิจธรรม | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |



สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)



(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกสว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

# บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาชุดอุปกรณ์เพื่อการตรวจสอบโปรตีนบนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ยาง ซึ่งอาศัยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน โดยมีอนุภาคเงินในระดับนาโนเมตรเป็นวัสดุรองรับตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ในงานวิจัยนี้โปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย 2 ชนิด คือ Hev b1 และ Hev b3 ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ในกลุ่มผู้มีอาการแพ้โปรตีนจากผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ เนื่องจากวิธีมาตรฐานที่อาศัยปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของแอนติบอดี้ และแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต้องถูกผลิตจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิตซึ่งมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและมีราคาแพงต้องพึ่งพาการนำเข้า คณะผู้วิจัยสามารถจำแนกโปรตีนทั้งสองชนิดจากสเปกตรัมรามานที่มีความจำเพาะ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการระบุปริมาณของสารละลายโปรตีนมาตรฐานทั้งสองชนิด รวมทั้งพบว่าวัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้นช่วยในการการขยายสัญญานรามานเพิ่มขึ้น 70 – 90% ในเบื้องต้นอนุภาคเงินในระดับนาโนเมตรที่ใช้เป็นวัสดุรองรับในงานวิจัยนี้ ยังมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไม่สามารถใช้ในการแยกชนิดของโปรตีนในกรณีที่มีโปรตีนผสมกันได้เนื่องจากมีสัญญานรบกวนจากสารที่หลงเหลือในการสังเคราะห์อนุภาคเงินที่ใช้เป็นวัสดุรองรับ ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาต่อเพื่อให้มีความสามารถในการจำแนกโปรตีนและวิเคราะห์ปริมาณให้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานต่อไป

# บทคัดย่อ

อาการแพ้ผลิตภัณฑ์ยางมีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตอันเนื่องมาจากระบบภูมิต้านทานในร่างกายของผู้ป่วยทำการต่อต้านโปรตีนบางชนิดที่ผลิตจากยางธรรมชาติ ดังนั้นการวิเคราะห์การปนเปื้อนของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยางธรรมชาติจึงมีความสำคัญที่จะช่วยลดความเสี่ยงจากการแพ้ในผู้ใช้งาน ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ยางในข้างต้นมีด้วยกันหลากหลายวิธี เช่น modified Lowry method, amino acid analysis (HPLC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) inhibition test, radio allergosorbent test (RAST) inhibition assay และ latex ELISA for antigenic protein (LEAP) แต่กระนั้นวิธีต่าง ๆ ในข้างต้น มีต้นทุนสูงในการตรวจวิเคราะห์และบางชนิดยังต้องอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้การตรวจวัดปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย โดยอาศัยสมบัติทาง plasmonic ของอนุภาคโลหะที่มีโครงสร้างอยู่ในระดับนาโนเมตรจะทำหน้าในการการขยายสัญญาณของสารบนพื้นผิวที่ต้องการตรวจวัดในเทคนิคนี้ โครงสร้างของอนุภาคโลหะในระดับนาโนเมตรจะถูกควบคุมและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี หลังจากนั้นวัสดุที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานจะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากยางธรรมชาติ

## Abstract

The latex allergy is lethal case in allergy patients due to immune system in human against proteins from natural rubber. Therefore, determination of contaminated protein in products form natural rubber is necessary that will reduce the risk from latex allergy in consumers. For determination of protein in latex, several methods were employed such as modified Lowry method, amino acid analysis (HPLC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) inhibition test, radio allergosorbent test (RAST) inhibition assay and latex ELISA for antigenic protein (LEAP). However, these methods have a high cost for test and need to import. In this work, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) will be proposed for protein determination in products from natural rubber, espectially, Hev b1 and Hev b3 are insoluble proteins. The plasmonic property depending on structure of metal nanoparticles played an importance role to enhance Raman signal in SERS technique. The type of proteins will be confirmed by the molecular information from SERS spectrum. The structures of metal nanoparticles will be controlled by wet chemical synthesis and optimized. After that, developed SERS substrates will be employed for quantitative analysis of trace proteins in latex produces.

# สารบัญ


บทสรุปสำหรับผู้บริหาร ..... i

บทคัดย่อ ..... ii

Abstract ..... iii

สารบัญรูปภาพ ..... vi

สารบัญตาราง ..... xiii

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

1. ที่มาและความสำคัญของงานวิจัยนี้ ..... 1

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ..... 4

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและบทความที่เกี่ยวข้อง ..... 5

1. โปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้จากยางธรรมชาติ ..... 5

2. วิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบปริมาณโปรตีน ..... 6

3. อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรและสมบัติพิเศษ ..... 7

4. เทคนิคราม่านและพื้นผิวขยายสัญญาณราม่าน ..... 9

5. อนุภาคทองคำที่มีรูปร่างคล้ายหอยแม่นทะเล ..... 12

6. น้ำยางสด ..... 12

6. สารละลายแอมโมเนีย ..... 13

บทที่ 3 ขั้นตอนการวิจัย ..... 15

1. การสกัดแยกโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ..... 15

2. อนุภาคของทองคำและเงินสำหรับใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณราม่าน ..... 21

3. การตรวจสอบการจับกันของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 และแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ โดยวิธี Western blot ..... 24

4. การตรวจสอบการจับกันของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 และแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ..... 25
5. การยืนยันโครงสร้างของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ..... 25
6. การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ..... 25
7. การสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยาง ..... 26
8. ความใช้ได้ของวิธีการ ..... 27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล ..... 29
1. สกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ..... 29
2. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำและเงิน ..... 55
3. การใช้วัสดุรองรับจากอนุภาคของทองคำและเงินที่พัฒนาขึ้นในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน ..... 62
4. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ELISA ..... 70
5. การเปรียบเทียบความใช้ได้ของวิธีการทั้งสองในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ..... 76
6. การเปรียบเทียบวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ..... 77
7. การสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยาง ..... 78
8. กาตรวจวิเคราะห์โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยาง ..... 85
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย ..... 88
อ้างอิง ..... 89
ภาคผนวก ..... 54
บทความสำหรับเผยแพร่ ..... 55
กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์ ..... 56
ตารางเปรียบเทียบต้นทุนวิธีการตรวจวัดทั้ง 3 วิธี ..... 62
ตารางเปรียบเทียบจุดเด่นและจุดด้อยในด้านต่าง ๆ จากวิธีการตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้ง 3 วิธี ..... 64
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้ตลอดโครงการ ..... 65

# สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำยางธรรมชาติหลังการหมุนเหวี่ยง โดยจะเกิดการแยกชั้นระหว่างส่วนที่ละลายน้ำได้ดีและอนุภาคยางที่ไม่ละลายน้ำ โดยโปรตีนหลักที่ทำให้เกิดอาการแพ้ จะอยู่บนผิวของอนุภาคยาง [20] ..... 6
รูปที่ 2 แสดงการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนจากปรากฏการณ์ localized surface plasmon resonance บนอนุภาคโลหะในระดับนาโนเมตรเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า [21] ..... 8
รูปที่ 3 สมบัติเชิงแสงของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร เมื่อ (0) อนุภาคทองคำทรงกลม ขนาด 4 นาโนเมตร และ (1-5) อนุภาคทองคำทรงแท่งที่มีความยาวเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถสังเกตุการเปลี่ยนแปลงของสีจากสารละลายและแถบการดูดกลืนแสง รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงขนาดและความยาวของอนุภาคจากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด [25] ..... 8
รูปที่ 4 แผนภาพแสดงระดับชั้นพลังงานและการเกิด infrared absorption, Rayleigh scattering, stokes Raman scattering และ anti-stokes Raman scattering [26] ..... 9
รูปที่ 5 แสดงแผนภาพการเพิ่มสัญญาณรามาน ด้วยเทคนิคเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่บนพื้นผิวของอนุโลหะภาคโลหะในระดับนาโนเมตร [9] ..... 11
รูปที่ 6 แสดงความสามารถในการขยายสัญญาณรามาณ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จากผลต่างสืบเนื่องกับเวลา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโครงของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรแบบ (A) ระหว่างอนุภาคแบบทรงกลม 2 อนุภาค และ (B) โครงสร้างแบบหนามบนพื้นผิวทองคำ ที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นให้ได้สัญญาณรามานที่ 559 และ 633 nm ตามลำดับ [15] ..... 11
รูปที่ 7 แสดงภาพของโครงสร้างอนุภาคทองคำที่มีรูปร่างคล้ายหอยแม่นทะเลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่สามารถบังคับขนาดและโครงสร้างได้จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะในการสังเคราะห์ทางเคมี [20] ..... 12
รูปที่ 8 แสดงภาพจำลองโครงสร้างของอนุภาคยางธรรมชาติที่กระจายตัวในแบบอิมัลชั่น ที่มีองค์ประกอบภายในอนุภาคต่าง ๆ [27] ..... 13
รูปที่ 9 แสดงภาพจำลองโครงสร้างของอนุภาคยางธรรมชาติที่กระจายตัวในแบบอิมัลชั่น ที่มีประจุลบภายนอกของพื้นผิว และการทำให้เกิดการรวมตัวและตกตะกอน จากการปรับสภาวะทางประจุให้เป็นกลางโดยการเติมประจุบวกลงไป [28] ..... 14
รูปที่ 8 แบบแผนโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE จากการสกัดน้ำยางพาราสด (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) น้ำยางพาราสด (3) ส่วนใส (C-serum) (4) ส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM $MgSO_4$ ) ครั้งที่ 1 (5) ส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer ครั้งที่ 2 และ (6) ส่วนใสที่สกัดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 ..... 29
รูปที่ 9 แบบแผนโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE จากการสกัดน้ำยางพาราที่ผสมแอมโมเนีย (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) น้ำยางพาราที่มีการผสมแอมโมเนีย (3) ส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วย 0.1% (w/w) Urea, 1% (w/w) SDS, 2.5% (w/w) acetone (4) ส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วย 1% (w/w) SDS และ 2.5% (w/w) acetone ครั้งที่ 1 (5) ส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วย 1% (w/w) SDS และ 2.5% (w/w) acetone ครั้งที่ 2 และ (6) ส่วนใสที่สกัดด้วย 1% (w/w) SDS ..... 30
รูปที่ 10 สเปกตรัมรามาน ของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่แยกได้จากน้ำยางพาราสด ..... 31

รูปที่ 11 แบบแผนโปรตีน Hev b1 ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการทำ preparative PAGE ซึ่งวิเคราะห์โดยการทำ 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2-3) สารสกัดยางพาราจากชั้นเนื้อครีมโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 และ (4-7) โปรตีน Hev b1 บริสุทธิ์ที่ได้จากการทำ preparative PAGE.....32
รูปที่ 12 สเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 ที่แยกได้จากน้ำยางพาราสดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative PAGE และสเปกตรัมรามานของ acrylamide และ SDS ที่ได้จากสารมาตรฐาน.....32
รูปที่ 13 แบบแผนดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ใน 1% agarose gel electrophoresis โดยที่ (1) 100 bp DNA ladder marker plus (2) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 (3) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ XhoI (4) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b3 และ (5) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ XhoI.....34
รูปที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน Hev b1 โดยที่ สีเหลือง คือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ORF ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนตัวเต็ม Hev b1 และ สีเขียว คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fusion protein (His-Tag) ของ pET28a vector.....39
รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน Hev b3 โดย สีเหลือง คือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ORF ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนตัวเต็ม Hev b3 และ สีเขียว คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fusion protein (His-Tag) ของ pET28a vector.....40
รูปที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hev b1 กับยีนอื่น ๆ ที่มีรายงานในธนาคารยีน.....41
รูปที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hev b3 กับยีนอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน.....42
รูปที่ 18 แบบแผนการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในแบคทีเรีย ที่เวลาต่าง ๆ หลังการกระตุ้นด้วย IPTG วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1 และ 6) โปรตีนจากแบคทีเรียที่ไม่มีการเติม IPTG (2 และ 7) โปรตีนจากแบคทีเรียหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (3 และ 8) โปรตีนจากแบคทีเรียหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (4 และ 9) โปรตีนจากแบคทีเรียหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (5) protein marker.....43
รูปที่ 19 แบบแผนการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ทั้งส่วนที่เป็นโปรตีนละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1 และ 6) สารละลายส่วนใสที่ได้จากการละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl และ 10 mM imidazole, pH 7.4); โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein; Sp) (2 และ 7) สารละลายส่วนใสที่ได้จากล้างตะกอนด้วย washing buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100); W1 (3 และ 8) สารละลายส่วนใสที่ได้จากล้างตะกอนด้วย washing buffer II (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 M urea); W2 (4 และ 9) สารละลายส่วนใสที่ได้จากละลายตะกอนด้วย solubilized buffer (8 M urea, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTT); โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein; Inp) และ (5) protein marker .....44
รูปที่ 20 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer I และ Elution buffer II วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1) protein marker (2) crude protein Hev b1 ที่ได้จากการสกัดน้ำยางพาราสดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 (3) unbound fraction; โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์หลังจากบ่ม crude protein Hev b1 กับ Ni-NTA agarose (4) W1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) (5) W2 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$,

300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0) (6-9) E1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0) และ (10-12) E2 fraction;โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0).....46
รูปที่ 21 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer III และ Elution buffer IV วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยที่แถว (1) protein marker (2-6) E3 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer III (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0) (7-12) E4 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer Elution buffer IV (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0).....46
รูปที่ 22 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer I และ Elution buffer II วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1) protein marker (2) crude protein Hev b3 ที่ได้จากการสกัดน้ำยางพาราสดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 (3) unbound fraction; โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์หลังจากบ่ม crude protein Hev b3 กับ Ni-NTA agarose (4) W1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) (5) W2 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0) และ (6-12) E1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0).....47
รูปที่ 23 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer III และ Elution buffer IV วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1) protein marker (2-6) E3 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0) (7-12) E4 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer III (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0).....48
รูปที่ 24 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ที่แยกได้จากแบคทีเรียที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และ imidazole ที่ได้จากสารมาตรฐาน.....48
รูปที่ 25 สเปกตรัมรามานในช่วง amide I และ amide III ของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ที่แยกได้จากแบคทีเรียที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และพีคองค์ประกอบ(composition peaks) ที่ได้จากการทำ peak deconvolution.....49
รูปที่ 26 แบบแผนโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โดยแถวที่ (1) protein marker (2) สารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราสดโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton-X100 (3) Hev b1 ที่ผ่านการทำ preparative PAGE, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ละลายตะกอนกลับด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton-X100 (4-5) Hev b1 ที่ผ่านการทำ preparative PAGE, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, ตกตะกอนด้วย acetone แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (6-7) Hev b3 ที่ผ่านการทำ preparative PAGE, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, ตกตะกอนด้วย acetone แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 .....50
รูปที่ 27 แบบแผนโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราที่ (1) protein marker (2) Hev b1 ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F9) (3) Hev b1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F10) (4) Hev b1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F12) (5) Hev b1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะ

ด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F14) (6) recombinant protein rHev b1 (E28) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA ชะด้วย 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (7) recombinant protein rHev b3 (E21-2) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA ชะด้วย 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....51
รูปที่ 28 สเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสด และ rHev b1 จากแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์.....52
รูปที่ 29 สเปกตรัมรามาน ในช่วง amide I และ amide III ของโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสด และ rHev b1 จากแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ และพีคองค์ประกอบ (composition peaks) ที่ได้จากการทำ peak deconvolution.....53
รูปที่ 30 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA เมื่อทำปฏิกิริยากับ Bradford reagent .....53
รูปที่ 31 SEM image ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 5, (C) 10 และ (D) 15 μM โดยถ่ายภาพที่กำลังขยาย (1) 10,000 เท่า และ (2) 20,000 เท่า .....55
รูปที่ 32 Histrogram แสดงการกระจายตัวของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 5, (C) 10 และ (D) 15 μM โดยแสดงขนาดเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอนุภาคเอาไว้ จากการวัดที่ 300 อนุภาคต่อ 1 ตัวอย่าง.....56
รูปที่ 33 SEM image ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ 15 μM เป็นตัวกระตุ้นและมี silver chloride (บริเวณวงกลมสีขาว) กระจายตัวปนอยู่กับโครงสร้าง โดยถ่ายภาพที่กำลังขยาย 30,000 เท่า .....57
รูปที่ 34 EDS spectrum ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ 15 μM เป็นตัวกระตุ้น โดยมีตารางสรุปร้อยละปริมาณของธาตุบนพื้นผิวที่ตรวจวัดได้ เมื่อ (A) ก่อนล้าง และ (B) หลังล้างด้วยสารละลายภายใต้แอมโมเนียภายใต้คลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 นาที.....58
รูปที่ 35 อุปกรณ์อย่างง่ายที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรึงอนุภาคทองคำเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน จะเห็นได้ว่าอุณภาคที่ได้บนวัสดุรองรับจะมีความเป็นระเบียบสูง.....58
รูปที่ 36 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 μg/μL บน ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 5, (C) 10 และ (D) 15 μM เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm .....59
รูปที่ 37 SEM image ของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM โดยถ่ายภาพที่กำลังขยาย (1) 20,000 เท่า และ (2) 10,000 เท่า.....60

รูปที่ 38 Histrogram แสดงการกระจายตัวของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM โดยแสดงขนาดเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอนุภาคเอาไว้ จากการวัดที่ 300 อนุภาคต่อ 1 ตัวอย่าง.....61
รูปที่ 39 EDS spectrum ของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM โดยมีตารางสรุปร้อยละปริมาณของธาตุบนพื้นผิวที่ตรวจวัดได้.....62
รูปที่ 40 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บนอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm .....63
รูปที่ 41 สเปกตรัมรามานของ อนุภาคเงินในระดับนาโนเมตร (AgNPs) โปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บน Aluminium foil (Hev b1) และ rHev b1 ความเข้มข้น 0.05 µg/µL บน อนุภาคเงินในระดับนาโนเมตร (Hev b1/ AgNPs) (ใช้กำลังเลเซอร์ที่ไม่เท่ากัน ที่ความยาวคลื่น 532 nm).....64
รูปที่ 42 อนุภาคเงินระดับนาโนเมตรสามารถที่ถูกตรึงกระจกขนาด 0.5 × 0.5 ซม.มีพื้นผิวคล้ายฟิลม์ของโลหะเงิน .....65
รูปที่ 43 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแสดงถึงพื้นผิวของอนุภาคเงินระดับนาโนเมตรที่ถูกตึงบนกระจก (A) จากนั้นพิจารณาความหนาโดยใช้ Line scan จากบริเวณที่มีอนุภาคไปยังบริเวณมราไม่มีอนุภาคทั้งหมดสามตำแหน่ง (B-D).....65
รูปที่ 44 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บนแผ่น Aluminium foil เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 - 10 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm.....66
รูปที่ 45 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.07, 0.05 และ 0.03 µg/µL บนแผ่น Aluminium foil เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 10 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm.....66
รูปที่ 46 สเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 ความเข้มข้น 0.03 - 0.07 µg/µL บนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm.....67
รูปที่ 47 แผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสัญญาณรามานที่ค่าพลังงาน 760 $cm^{-1}$ เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 µg/µL เปรียบเทียบทั้งบนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร (สีแดง) และ Aluminium foil (สีเทา) ที่ใช้เป็นวัสดุรองรับ เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm.....68
รูปที่ 48 สเปกตรัมรามานของโปรตีน (A) Hev b1 และ (B) Hev b1 ที่ความเข้มข้น 0.03 - 0.07 µg/µL บนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm.....69
รูปที่ 49 กราฟมาตรฐานที่พิจาราความเข้มของสัญญาณรามานที่ค่าพลังงาน 760 $cm^{-1}$ เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมรามานของโปรตีน (A) Hev b1 และ (B) Hev b2  b1 ที่ความเข้มข้น 0.03 - 0.07 µg/µL บนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm.....70
รูปที่ 50 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดน้ำยางพาราสดและโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 ที่ผลิตจากแบคทีเรียเมื่อวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE (A) และ western blot (B) (1 และ 7) โปรตีนมาตรฐาน (2 และ 8) น้ำยางพาราสด (3 และ 9) ส่วนใสที่สกัดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 (4 และ 10) ส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer (0.1

M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM $MgSO_4$ ) (5) โปรตีน Hev b1 บริสุทธิ์จากน้ำยางพาราสด (6) โปรตีนลูกผสม rHev b1 บริสุทธิ์ (11) โปรตีน Hev b3 บริสุทธิ์จากน้ำยางพาราสด (12) โปรตีนลูกผสม rHev b3 บริสุทธิ์.....72
รูปที่ 51 ปฏิกิริยาการเกิดสีของ TMB substrate โดยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จากการทำ ELISA เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อโปรตีน rHev b1 หรือ rHev b3.....73
รูปที่ 52 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ TMB substrate โดยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จากการทำ ELISA หลังการเติม 2 M $H_2SO_4$.....73
รูปที่ 53 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรและปริมาณโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 (µg).....76
รูปที่ 54 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วย PBS วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2,3,4) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (5,6,7) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ.....79
รูปที่ 55 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วย wash buffer และ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1,2,3) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ wash buffer ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (4,5,6) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (7) โปรตีนมาตรฐาน (8,9,10) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ wash buffer ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (11,12,13) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ.....79
รูปที่ 56 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของสารสกัดถุงมือยางโดยใช้สภาวะสกัดต่าง ๆ โดยใช้โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ความเข้มข้น 1 µg เป็นตัวเปรียบเทียบ.....80
รูปที่ 57 สเปกตรัมรามานของตัวอย่างที่ทำการสกัดบนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร โดยใช้เอทานอล (EtOH) ต่อน้ำปราศจากไอออน (DI) ที่อัตราส่วนโดยปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm.....81
รูปที่ 58 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วนต่าง ๆ วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่น (3) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 9:1 (4) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 8:2 (5) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 7:3 (6) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 6:4 (7) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 5:5.....82
รูปที่ 59 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของสารสกัดถุงมือยางโดยใช้เอทานอล (EtOH) ต่อน้ำปราศจากไอออน (DI) ที่อัตราส่วนโดยปริมาตรต่าง ๆ โดยใช้โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ความเข้มข้น 1 µg เป็นตัวเปรียบเทียบ.....82
รูปที่ 60 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของสารสกัดถุงมือยางโดยใช้บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิห้อง (RT: 25 °C) และ 37 °C (HT) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังทำการ dialyze ในน้ำกลั่น 48 ชั่วโมง โดยใช้โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ความเข้มข้น 1 µg เป็นตัวเปรียบเทียบ.....83

รูปที่ 61 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS หลังการ dialyze ในน้ำกลั่น 48 ชั่วโมง วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย wash buffer ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้การตกตะกอนในอะซิโตน (3) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราสดด้วย wash buffer โดยใช้การตกตะกอนในอะซิโตน (4,5,6) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (7,8,9) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (10) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้การตกตะกอนในอะซิโตน (11) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G75 (12) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ..... 84
รูปที่ 62 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของตะกอนสารสกัดถุงมือยางโดยใช้บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS โดยใช้แอนติบอดีต่อ rHev b1 หมายเหตุ: Sd 2 hr คือ ส่วนใสจากการใช้ SDS สกัดถุงมือยางที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่าน dialyze ในน้ำกลั่น ตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนและละลายโปรตีนด้วย 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, SDS 2 hr-acetone คือ สารสกัดโปรตีนจากการใช้ SDS สกัดถุงมือยางที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนและละลายโปรตีนด้วย 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, SDS 2 hr-Sep G75 คือ สารสกัดโปรตีนจากการใช้ SDS สกัดถุงมือยางที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G75 ..... 85

# สารบัญตาราง

ตาราง 1 ระดับของอาการภูมิแพ้ (Level of allergy symptoms (Sx)) และอาการที่เกิดขึ้น [19] ..... 5
ตาราง 2 วิธีการตรวจวัดโปรตีนจากยางธรรมชาติ โปรตีนแอนติเจน และ โปรตีนที่ทำเกิดอาการแพ้ [4] ..... 6
ตาราง 3 แสดงองค์ประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลเจลสำหรับงานอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ..... 16
ตาราง 4 แสดงอัตราส่วนสารละลาย ความเข้มข้นของ BSA และการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ในเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนแบบ Bradford ..... 17
ตาราง 5 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนที่หาด้วยวิธี Bradford reagent ..... 54
ตารางที่ 6 Band assignment ที่พบในสเปกตรัมรามานของโปรตีนโดยอิงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [40, 46] ..... 64
ตาราง 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ของโปรตีน-แอนติบอดีแบบต่าง ๆ ในกระบวนการ ELISA ..... 72
ตาราง 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ของโปรตีน-แอนติบอดีแบบต่าง ๆ ในกระบวนการ ELISA ..... 73
ตาราง 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm เมื่อสลับ โปรตีน-แอนติบอดีแบบต่าง ๆ ในกระบวนการ ELISA ..... 74
ตาราง 10 แสดงความใช้ได้ของวิธีจากค่าต่าง ๆ โดยพิจารณาเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี ..... 77
ตาราง 11 แสดงความเข้มของของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่หาได้จากวิธี SERS และ ELISA ..... 78
ตาราง 12 แสดงค่าทางสถิติคำนวณด้วยวิธี t-test ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่หาได้จากวิธี SERS และ ELISA ..... 78
ตาราง 13 ปริมาณ total protein ที่วัดด้วยวิธี Modified Lowry ..... 86
ตาราง 14 ปริมาณ Hev b1 ที่วัดด้วยวิธี ELISA ..... 86
ตาราง 15 ปริมาณ Hev b3 ที่วัดด้วยวิธี ELISA ..... 86

# บทที่ 1
# บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของงานวิจัยนี้

อาการแพ้ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ (Latex allergy) เกิดจากการที่ระบบภูมิต้านทานของของร่างกายทำการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม และทำให้เกิดอาการแพ้เกิดขึ้น ตั้งแต่การเกิดผื่นแดงบนผิวหนังจนถึงการหยุดหายใจกระทันหันและเสียชีวิต ซึ่งสิ่งแปลกปลอมจากตัวยางธรรมชาติที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอาการแพ้คือโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ต่ำและเป็นส่วนหนึ่งของผนังอนุภาคคอลลอยด์ในน้ำยางธรรมชาติจากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ในกรณีที่ยางธรรมชาติถูกใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการสัมผัสจากผู้ใช้บ่อยครั้งทำให้มีความเสี่ยงที่จะกระตุ้นให้เกิดกับอาการแพ้ในผู้ใช้ได้ง่ายขึ้น [1, 2] จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการกำจัดโปรตีนออกจากเนื้อยางธรรมชาติที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ในกรณีที่จะต้องใช้น้ำยางธรรมชาติในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์โดยตรง น้ำยางธรรมชาติจะต้องผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีน ซึ่งวิธีการที่แพร่หลายคือ การใช้เอมไซม์ในการย่อยโปรตีนให้เปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวอื่นที่ไม่สามารถมารถให้เกิดอาการแพ้ในมนุษย์ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงแยกเนื้อยางออกมา [3] น้ำยางหลังจากผ่านกระบวนกำจัดโปรตีนแล้วควรมีปริมาณโปรตีนที่น้อยกว่า 1% โดยน้ำหนัก จึงไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ในมนุษย์ โดยวิธีการมาตรฐานที่ใช้ยืนยันปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่นั้น ได้แก่ modified Lowry method, amino acid analysis (HPLC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) inhibition test, radioallergosorbent test (RAST) inhibition assay และ latex ELISA for antigenic protein (LEAP) เป็นต้น [1, 4] ซึ่งวิธีการเหล่านี้มีความแม่นยำและจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้จากยางพารา แต่มีข้อจำกัดคือชุดทดสอบดังกล่าวยังต้องอาศัยการนำเข้ามีราคาสูง และในบางเทคนิคอาจจะให้ค่าผิดพลาดเนื่องจากองค์ประกอบอื่น ๆ ในน้ำยางธรรมชาติที่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงไม่สามารถบอกชนิดและปริมาณของโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ได้จากการวิเคราะห์ได้ [4] หนึ่งในวิธีการที่มีความแม่นยำและให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วคือเทคนิคทาง molecular spectroscopy ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า FT-IR spectra สามารถใช้ในการแยกระหว่างน้ำยางธรรมชาติและน้ำยางที่ผ่านกระบวนการสกัดโปรตีนมาแล้ว จากหมู่ฟังก์ชันที่หายไปของ surface protein และ phospholipids [1]

FT-IR spectroscopy เป็นเทคนิคที่อาศัยการวิเคราะห์การดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงอินฟาเรดเพื่อใช้ในการสั่นระดับโมเลกุล อันเป็นลักษณะเฉพาะในแต่ละโครงสร้างและเชื่อมโยงถึงหมู่ฟังก์ชั่นอันเป็นเอกลักษณ์ของสารแต่ละชนิดได้ นอกจากนี้การใช้งานร่วมกับเทคนิค attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy ช่วยทำให้ตรวจชิ้นงานได้โดยตรงจากบนพื้นผิว [5] โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณี

ของชิ้นงานจากยางธรรมชาติ ที่มีโอกาสสัมผัสกับมนุษย์ในการใช้งานจริง สามารถระบุหมู่ฟังก์ชั่นของโปรตีนที่อยู่บนพื้นผิวของชิ้นงาน อย่างรวดเร็วและไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน แต่เทคนิคนี้ก็ยังมีข้อจำกัดในบางกรณีเมื่อใช้กับชิ้นงานจริงคือ สารเติมแต่งในน้ำยางธรรมชาติเพื่อใช้เพิ่มสมบัติต่าง ๆ ในการขึ้นรูปหลายตัวรวมถึงความชื้นหรือน้ำที่อยู่ในตัวอย่าง ที่สามารถตรวจพบบน FT-IR spectra และมีโอกาสซ้อนทับและบดบังกับโปรตีนในน้ำยาง ซึ่งหลงเหลือในปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลดลง จากข้อจำกัดในข้างต้น Raman spectroscopy เป็นอีกหนึ่งในวิธีทาง molecular spectroscopy ที่น่าสนใจและสามารถหลีกเลี่ยงข้อจำกัดในเทคนิค FT-IR spectroscopy โดยเทคนิคนี้อาศัยการวิเคราะห์การกระเจิงแสงที่มีการสูญเสียพลังงาน อันเนื่องมาจากโมเลกุลของสารมีความเป็น polarizability [5] โดยเทคนิคนี้จะมีความไวในการวิเคราะห์สูงกับโครงสร้างที่มีการสั่นในระดับโมกุลในแบบ symmetric หรือ pseudo-symmetric ซึ่งพบใน peptide backbone ที่เป็นตัวแทนของโปรตีน และไม่การรบกวนหรือซ้อนทับกับการสั่นในระดับโมเลกุลของ hydroxyl group (OH) [6] ซึ่งพบเจอได้ในสารเติมแต่งเพื่อการขึ้นรูปชิ้นงานจากน้ำยางธรรมชาติ อันเนื่องมากจากความเข้มของสัญญาณที่ต่ำเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Raman spectroscopy นอกจากนี้ยังสามารถทำการวิเคราะห์บนพื้นผิวของชิ้นงานจุดเล็ก ๆ โดยผ่านกล้องจุลทรรศน์หรือ Raman microscope อย่างไรก็ตาม สัญญาณที่ได้จากการกระเจิงแสงที่ต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์สารปริมาณมาณน้อย และโอกาสที่จะเกิดปรากฏการฟลูออเรสเซนต์จากสารเติมแต่งบางชนิดในชิ้นงานผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติเมื่อเพิ่มระดับพลังงานในการตรวจวิเคราะห์ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Raman spectroscopy ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [7]

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา การศึกษาทางด้านวัสดุนาโนและนาโนเทคโนโลยีได้รับความนิยมและแสดงถึงบทประยุกต์ในหลากหลายสาขา ในกลุ่มวัสดุนาโนของโลหะมีค่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ทองคำ และเงินพบว่าสามารถช่วยในการขยายสัญญาณรามาน ของโมเลกุลที่เกาะติดบนพื้นผิวของวัสดุ เทคนิคนี้มีชื่อว่าเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (surface enhanced Raman spectroscopy) [8] ซึ่งใช้พื้นผิวของโลหะสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นผิวที่มีโครงสร้างในระดับนาโนเมตร โดยมี 2 กลไกหลักในการขยายสัญญาณคือ กลไกทางเคมีและอิเล็กโทรนิค โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไกทางอิเล็กโทรนิค ที่เป็นกลไกหลักในการขยายสัญญาณสามารถอธิบายด้วยหลักการของ localized surface plasmon resonance สามารถเพิ่มทั้งพลังงานที่ใช้ในกระตุ้นและทำให้ได้สัญญาณรามานที่ได้จากตัวอย่างสูงขึ้นถึง $10^2$–$10^{14}$ เท่า เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์สารบนพื้นผิวปกติ [9] เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย ด้านนิติวิทยาศาสตร์ [10] อาหารปลอดภัย [11] และวิเคราะห์สารอันตรายที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม [12] ในการประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์โปรตีน โครงสร้างระดับนาโมตรได้แก่ อนุภาคเงินในระดับนาโนเมตร, อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร, อนุภาคอัลลอยด์ทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร ถูกใช้เป็นวัสดุรองรับในการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนในกลุ่ม

ของ แอนติเจน แอนติบอดี และ ไซโตโครม ซี เป็นต้น [6] จากตัวอย่างในงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการวิเคราะห์โปรตีนในกลุ่มของ แอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรเป็นวัสดุรองรับพบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน prostate specific antigen (PSA) เพื่อใช้ในการบ่งชี้ภาวะการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากในระดับที่ต่ำถึง 1 pg/mL จากซีรั่มของมนุษย์ [13] จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความว่องไวและประสิทธิภาพของเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาณในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน และมีแนวโน้มนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติได้เช่นกัน

อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร เป็นวัสดุที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในเทคนิคขยายสัญญาณรามาน เนื่องจาก ทนทานต่อการทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น และสามารถบังคับโครงสร้างได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี [14] เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาณ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าโครงสร้างโลหะในระดับนาโมเมตร มีโครงสร้างพิเศษ เช่น มีลักษณะเหลี่ยมหรือมุม ปลายแหลม หรือ ช่องว่างระหว่างอนุภาคที่เหมาะสม โครงสร้างเหล่านี้ล้วนมีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มสัญญาณรามาน ที่มากกว่าบนพื้นผิวของอนุภาคในระดับนาโนเมตรแบบปกติ (hot spots) [15] และสามารถพัฒนาเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานให้มีความว่องไวและตรวจวัดสารปริมาณน้อย ถึงแม้มีจำนวนแค่ 1 โมเลกุล (single molecµLes detection) [16] ก็สามารถให้สัญญาณรามานที่ใช้จำแนกเอกลักษณ์ทางเคมีของสารตัวอย่างได้ โครงสร้างดังกล่าวในข้างต้น เช่น ดวงดาว เดนไดร์ซ และ หอยเม่นทะเล สามารถสังเคราะห์ได้ผ่านวิธีทางเคมี หลากหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ล้วนแสดงให้เห็นว่าไอออนของโลหะเงิน มีส่วนสำคัญในเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างแบบต่างๆ มีข้อดีคือ ใช้ในปริมาณน้อย สามารถกำจัดได้ง่าย ไม่ส่งผลรบกวนต่อการนำโครงสร้างระดับนาโนเมตรของทองคำไปใช้งานต่อ [17, 18] ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำที่มีรูปร่างคล้ายหอยแม่นทะเลมีขนาดอยู่ในระดับไมโครเมตรซึ่งประกอบโครงสร้างหนามแหลมยื่นออกมาจากวัสดุซึ่งมีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตร โดยอนุภาคทองคำชนิดนี้สังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยใช้ของไอออนของโลหะเงินเป็นสารเหนี่ยวนำและควบคุมโครงสร้างหนาม และความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ใช้ในการทดสอบ ในเทคนิคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานที่ยังคงให้สัญญาณอยู่ในระดับนาโนโมลาร์ [18] ดังนั้นอนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ได้ในข้างต้นจึงมีความเป็นไปได้สูงเพื่อใช้ร่วมในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

พัฒนาการใช้อนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโมเมตร ที่ถูกใช้เป็นวัสดุรองรับในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญานรามาน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของโปรตีนปริมาณน้อยที่ทำให้เกิดอาการแพ้บนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. กระบวนการพัฒนาอนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ที่สามารถใช้ร่วมกับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ

2. ชุดทดสอบปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ จากอนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ที่ใช้ร่วมกับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและบทความที่เกี่ยวข้อง

1. โปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้จากยางธรรมชาติ

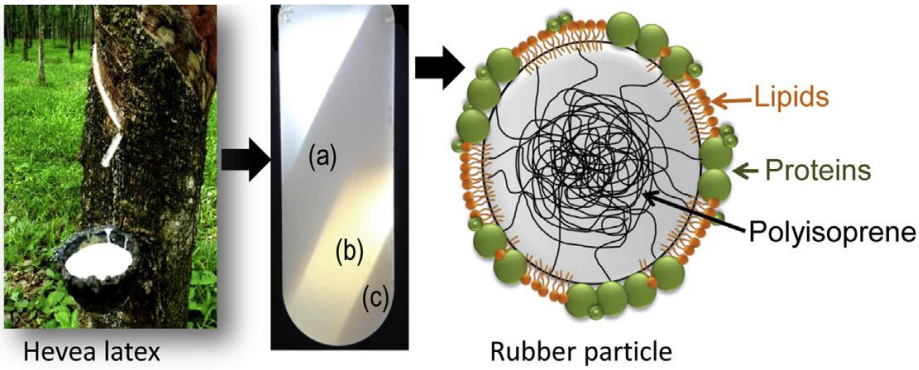
โรคภูมิแพ้เป็นอาการที่ภูมิต้านทานของมนุษย์มีความจำเพาะเจาะจงกับสารบางอย่างและพยายามกำจัดออกไปจากร่างกาย โดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะค่อยดักจับสารแปลกปลอมหรือที่เรียกว่า แอนติเจน โดยมีสารที่อยู่ในระบบภูมิต้านคือ คือ แอนติบอดี ทำหน้าที่เป็นตัวดักจับ เมื่อไหรก็ตามที่แอนติบอดีจับตัวแอนติเจนที่มีความจำเพาะเจาะจง กลไกเบื้องต้นจะมีการส่งสัญญานให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหลังสารต่อต้านซึ่งทำให้เกิดผลทางอ้อมที่ไม่พึงประสงค์คือ อาการแพ้ สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ระดับ ตั้งแต่ อาการเบื้องต้นที่ส่งผลรบกวนต่อการดำเนินชีวิตประจำวันจนถึงรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต ดังแสดงในตารางที่ 1 [19]

ตาราง 1 ระดับของอาการภูมิแพ้ (Level of allergy symptoms (Sx)) และอาการที่เกิดขึ้น [19]

| **ระดับการแพ้ (Level)** | | |
|---|---|---|
| Level 1 = None (0 Sx) | Level 2 = Low (1–2 Sx) | Level 3 = High (3–6 Sx) |
| กลุ่มอาการ | | |
| เกี่ยวกับทางเดินอาหาร | เกี่ยวกับผิวหนัง | เกี่ยวกับทางเดินหายใจ |
| ● ท้องอืด | ● ผื่นบนผิวหนัง | ● ไอหรือจาม |
| ● ปวดท้อง | ● ลมพิษ | ● น้ำมูกไหล |
| ● กรดไหลย้อน | ● ผิวแห้ง | ● ระคายเคืองหรือคันจมูก |
| ● อาเจียน | ● ปื้นบนผิวหนัง | ● คัดจมูก |
| ● ท้องเสีย | ● บวมหน้า ตา ริมฝีปาก | ● คัดจมูกและหายใจยาก |
| ● มีเลือดบนในอุจจาระ | ● ผื่นยาวรอบคอ แขน | ● หายใจลำบาก |

ในกรณีของยางธรรมชาติพบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่ทำให้เกิดอาการแพ้ และหลายกรณีมีรายงานถึงการเสียชีวิต จากอาการแพ้โปรตีนในยางธรรมชาติ [4] โดยเบื้องต้นโปรตีนที่แสดงอาการรุนแรงที่อยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย คือ Hev b1 และ Hev b3 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ทำให้อนุภาคยางมีความเสถียรเกิดเป็นสารแขวนลอยได้ ซึ่งเกาะอยู่บนผิวของอนุภาคยางดังแสดงในรูปที่ 1 [20] ดังนั้นการกำจัดโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธีการ

ต่าง ๆ เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมกับวิธีการหมุนเหวี่ยง หรือ การใช้เอมไซน์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยโปรตีน จึงมีความจำเป็นในการผลิตน้ำยางโปรตีนต่ำอันเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม และลดโอกาสการแพ้ผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติหลังการแปรรูปแล้ว โดยปริมาณของโปรตีนที่ตกค้างควรจะต่ำกว่า 1% โดยน้ำหนักของน้ำยางธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการแยกโปรตีนแล้ว [1]




รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำยางธรรมชาติหลังการหมุนเหวี่ยง โดยจะเกิดการแยกชั้นระหว่างส่วนที่ละลายน้ำได้ดีและอนุภาคยางที่ไม่ละลายน้ำ โดยโปรตีนหลักที่ทำให้เกิดอาการแพ้ จะอยู่บนผิวของอนุภาคยาง [20]

2. วิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบปริมาณโปรตีน

เพื่อเป็นการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำยางที่ผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีน รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากยางธรรมชาติ ตัวอย่างจะถูกตรวจสอบด้วยวิธีการต่างๆ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป [4] ที่สำคัญคือในวิธีการดังกล่าวไม่ได้กล่าวถึงการบ่งบอกชนิดของโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้อย่างแม่นยำรวมถึงการหาปริมาณโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ซึ่งไม่สามารถทำได้ทั้ง 2 กรณีด้วยวิธีการเดียวกัน

ตาราง 2 วิธีการตรวจวัดโปรตีนจากยางธรรมชาติ โปรตีนแอนติเจน และ โปรตีนที่ทำเกิดอาการแพ้ [4]

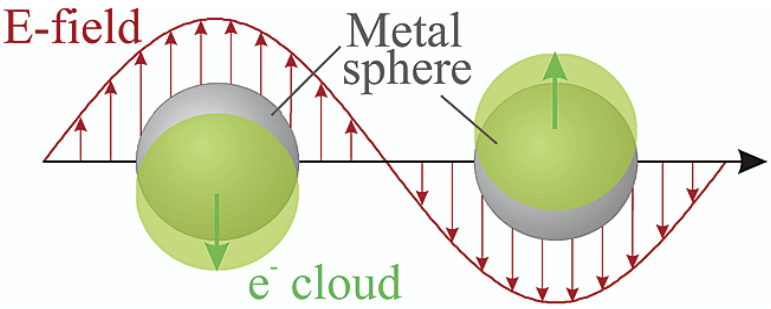
| วิธีการ | การตรวจวัด | ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|---|---|---|
| Modified Lowry method (D 5712) | วิธีทางเคมี วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด | สามารถสอบเทียบได้ มีชุดทดสอบพร้อมใช้ | มีความไววิเคราะห์ต่ำ เกิดการรบกวนทางเคมีได้ |
| Amini acid analysis (HPLC) | วิธีทางเคมี วัดปริมาณกรดอะมิโน | มีความไววิเคราะห์สูง ให้ค่าการทำซ้ำที่ดี | เครื่องมือมีราคาสูง อาศัยประสบการณ์ของผู้วิเคราะห์ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| LEAP | วิธีเคราะห์ทางภูมิคุ้มกัน วัดปริมาณโปรตีน แอนติเจน | มีความไววิเคราะห์สูง มีชุดทดสอบพร้อมใช้ | เป็นชุดทดสอบ ที่ไม่สามารถสอบเทียบได้ |
| RAST inhibition assay | วิธีเคราะห์ทางภูมิคุ้มกัน วัดปริมาณโปรตีน แอนติเจน หรือ โปรตีนที่ทำเกิดอาการแพ้ | เป็นชุดทดสอบที่ดี มีความไววิเคราะห์สูงมาก | มีสารกัมตภาพรังสี ไม่สามารถสอบเทียบได้ |
| ELISA inhibition test | วิธีเคราะห์ทางภูมิคุ้มกัน วัดปริมาณโปรตีน แอนติเจน | เป็นชุดทดสอบที่ดี สามารถดูการเปลี่ยนแปลงจากสี มีความไววิเคราะห์ที่ดี | ใช้ซีรัมของมนุษย์ในการทดสอบ ไม่สามารถสอบเทียบได้ |
| ELISA inhibition test (D 6499) | วิธีเคราะห์ทางภูมิคุ้มกัน วัดปริมาณโปรตีน แอนติเจน | สามารถสอบเทียบได้ มีความไววิเคราะห์ | เป็นวิธีการใหม่ ซึ่งยังไม่รู้เกี่ยวกับ ค่าการทำซ้ำของสารมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ |

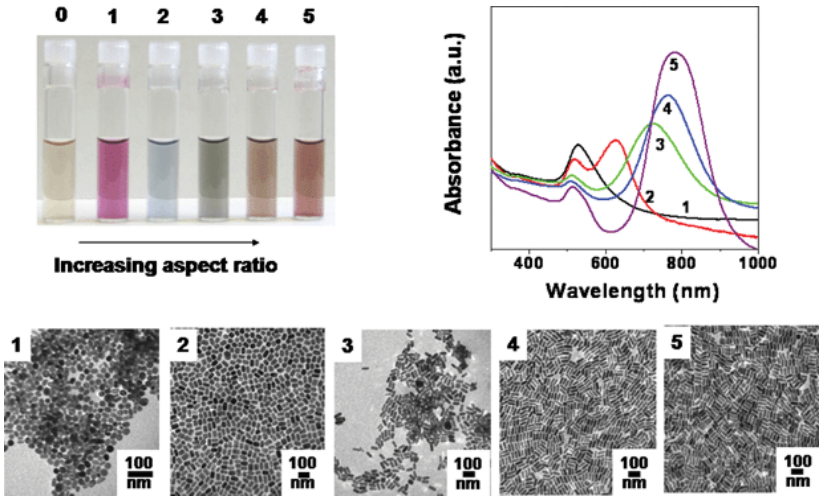
3. อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรและสมบัติพิเศษ

อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร เป็นวัสดุนาโนอีกชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเนื่องจากมีบทประยุกต์ที่หลากหลาย จากสมบัติใหม่ที่เพิ่มขึ้น เช่น การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวส่งผลต่อความไวในการเร่งปฏิกิริยา ใช้กับระบบนำส่งยาและโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถติดกับพื้นผิวของอนุภาค และความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆ ที่ต่างจากทองคำโดยปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงแสงของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร สามารถอธิบายผ่านปรากฏการณ์ localized surface plasmon resonance ซึ่งเกิดจากการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคโลหะเมื่อได้รับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าส่งผลต่อสมบัติเชิงแสงดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 [21] สมบัติในข้างต้นของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ด้านความปลอดภัยในอาหาร [22] การบำบัดรักษาโรคมะเร็ง [23] และเพิ่มประสิทธิภาพเซลล์แสงอาทิตย์ [24] เนื่องจากสมบัติ localized surface plasmon resonance ของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาค การเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างส่งผลให้สมบัติเชิงแสงมีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 3 [25] ดังนั้นความรู้ทางด้านนาโนเทคโนโลยีเกี่ยวกับการสังเคราะห์ที่สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของ

อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรที่จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้สมบัติของอนุภาคตรงกับวัตถุประสงค์การใช้งาน



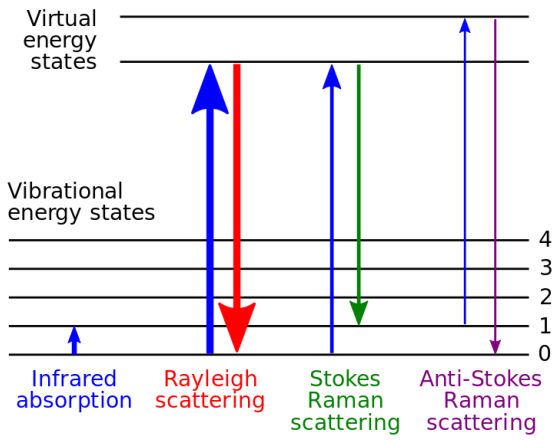

รูปที่ 2 แสดงการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนจากปรากฏการณ์ localized surface plasmon resonance บนอนุภาคโลหะในระดับนาโนเมตรเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า [21]




รูปที่ 3 สมบัติเชิงแสงของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร เมื่อ (0) อนุภาคทองคำทรงกลม ขนาด 4 นาโนเมตร และ (1-5) อนุภาคทองคำทรงแท่งที่มีความยาวเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถสังเกตุการเปลี่ยนแปลงของสีจากสารละลายและแถบการดูดกลืนแสง รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงขนาดและความยาวของอนุภาคจากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด [25]

4. เทคนิครามานและพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

เทคนิครามาน (Raman spectroscopy) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางสเปคโทรสโกปีที่ใช้ระบุเอกลักษณ์ทางโมเลกุลของสารเคมี (molecµLar spectroscopy) จากหมู่ฟังก์ชั่นและชนิดพันธะในโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากพลังงานแสงในช่วงต่างๆที่ได้จากการกระเจิงแสงแบบรามาน (Raman scattering) มีหลักการโดยย่อคือ การสั่นแบบสมสมมาตร (symmetric vibration) ที่สามารถเนี่ยวนำให้เกิดมีสภาพขั้วในโมเลกุล (polarizability) ขณะที่ได้รับพลังงานกระตุ้นจากภายนอก อิเล็กตรอนของโมเลกุลจะถูกกระตุ้นจากสภาวะพื้น (ground state) ไปสู่สภาวะสมมุติ (virtual state) หลังจากนั้นตกกลับมาสู่สภาวะพื้นในรูปแบบของการกระแจงแสง (light scattering) บางส่วนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงาน (elastic process) และตกกลับมาสู่สภาวะพื้นเช่นเดิม เรียกว่า การกระเจิงแสงในรูปแบบของเรย์ไล (Rayleigh scattering) บางส่วนเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงาน (inelastic process) และไม่ตกกลับมาสู่สภาวะพื้นเช่นเดิม เรียกว่า การกระเจิงแสงในรูปแบบของรามาน (Raman scattering) ซึ่งมีในส่วนของการกระแจงแสงแบบสูญเสียพลังงาน (stokes Raman scattering) และ มีพลังงานสูงขึ้น (anti-stokes Raman scattering) ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยปกติแล้ว stokes Raman scattering จะถูกใช้ในการวิเคราะห์เนื่องจากมีความเข้มสูงกว่า anti-stokes Raman scattering การเกิด Raman scattering สามารถโยงไปถึงรูปแบบการสั่นในโมเลกุลที่มีสมมาตร และสามารถใช้ระบุเอกลักษณ์ทางเคมีของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ [26]

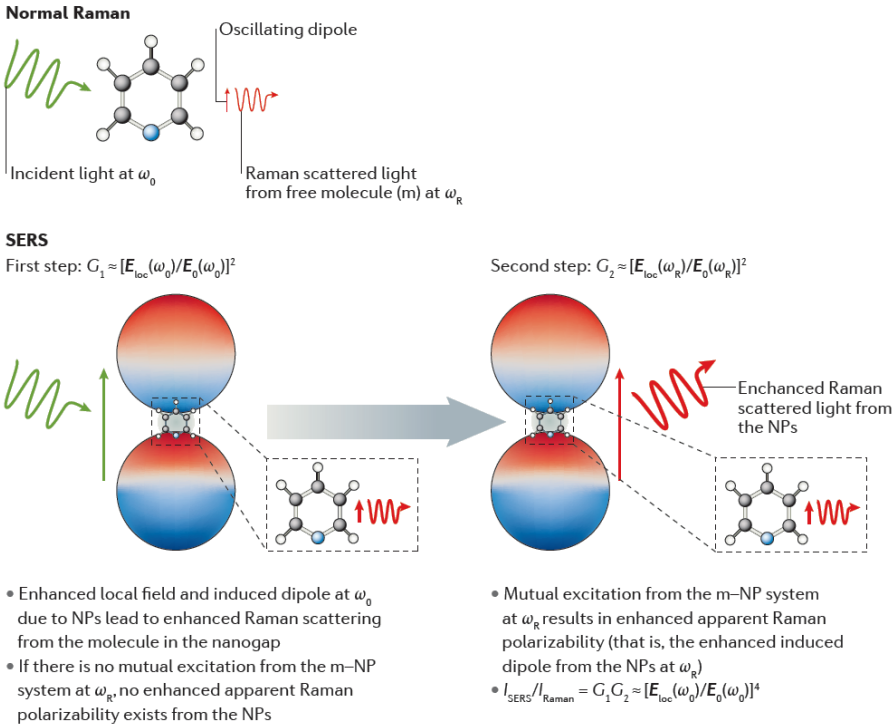



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงระดับชั้นพลังงานและการเกิด infrared absorption, Rayleigh scattering, stokes Raman scattering และ anti-stokes Raman scattering [26]

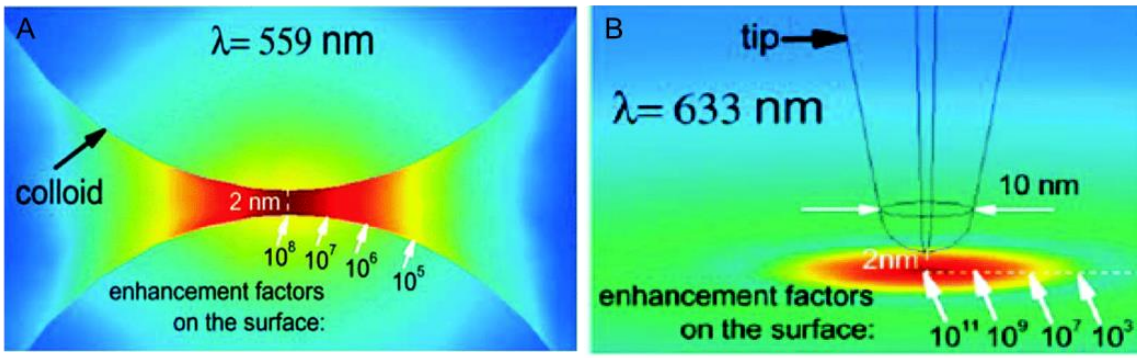
ข้อดีของเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีกับการวิเคราะห์ตัวอย่างคือ สามารถวิเคราะห์การสั่นแบบสมมาตรในโมเลกุลของสารตัวอย่าง ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (infrared spectroscopy)

นอกจากนี้สารตัวอย่างสามารถวิเคราะห์ได้ในสภาวะสารละลาย ของแข็ง ผง หรือแม้แต่อยู่ในภาชนะขวดแก้วแบบใสที่แสงสามารถผ่านได้ ทำให้เทคนิครามานถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ด้านนิติวิทยาศาสตร์ การวินิจฉัยทางการแพทย์ และวิเคราะห์สารอันตรายที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น [26] แต่ว่าข้อจำกัดที่สำคัญของเทคนิครามานและส่งให้เกิดปัญหาในการประยุกต์ใช้จริงคือ สัญญาณรามานซึ่งปกติที่มีความเข้มน้อย และยากที่จะวิเคราะห์ชนิดของสารตัวอย่างเมื่อมีความเข้มข้นต่ำ [7] ดังนั้นเพื่อเพิ่มศักยภาพในการประยุกต์ใช้เทคนิครามาน การเพิ่มสัญญาณรามานของตัวอย่างจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง หนึ่งในวิธีการที่ได้รับความนิยมและไม่มีความยุ่งยากในการใช้ขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างคือ เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)) ซึ่งใช้พื้นผิวของโลหะสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นผิวที่มีโครงสร้างในระดับนาโนเมตร ด้วย localized surface plasmon resonance สามารถเพิ่มทั้งพลังงานที่ใช้ในกระตุ้นและสัญญาณรามานที่ได้จากตัวอย่างทำให้ขยายสัญญาณ (signal enhancement (E)) สูงมากกว่าเดิมถึงกำลัง 4 เท่า ($E^4$) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5 [9]

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าโครงสร้างโลหะในระดับนาโมเมตร มีโครงสร้างพิเศษ เช่น มีลักษณะเหลี่ยมหรือมุม ปลายแหลม หรือ ช่องว่างระหว่างอนุภาคที่เหมาะสม โครสร้างเหล่านี้ล้วนมีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มสัญญาณรามาน ที่มากกว่าบนพื้นผิวของอนุภาคในระดับนาโนเมตรแบบปกติ (hot-spots) [15] ดังแสดงในรูปที่ 6 จึงสามารถพัฒนาเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน ให้มีความว่องไวและตรวจวัดสารปริมาณน้อย ถึงแม้มีจำนวนแค่ 1 โมเลกุล (single-molecuLe detection) ก็สามารถให้สัญญาณรามานที่ใช้จำแนกเอกลักษณ์ทางเคมีของสารตัวอย่างได้ [16]



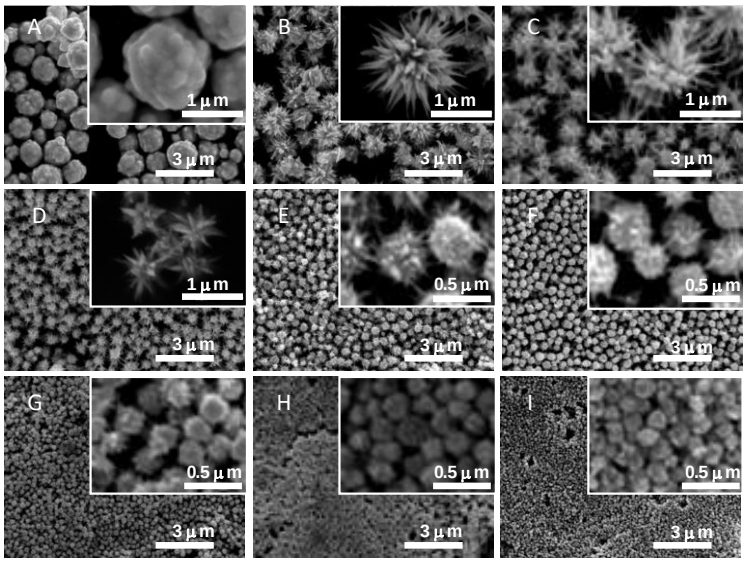

รูปที่ 5 แสดงแผนภาพการเพิ่มสัญญาณรามาน ด้วยเทคนิคเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่บนพื้นผิวของอนุโลหะภาคโลหะในระดับนาโนเมตร [9]




รูปที่ 6 แสดงความสามารถในการขยายสัญญาณรามาณ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จากผลต่างสืบเนื่องกับเวลา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโครงของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรแบบ (A) ระหว่างอนุภาคแบบทรงกลม 2 อนุภาค และ (B) โครงสร้างแบบหนามบนพื้นผิวทองคำ ที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นให้ได้สัญญาณรามานที่ 559 และ 633 nm ตามลำดับ [15]

5. อนุภาคทองคำที่มีรูปร่างคล้ายหอยแม่นทะเล

การอนุภาคทองคำที่มีรูปร่างคล้ายหอยแม่นทะเลมีขนาดอยู่ในระดับไมโครเมตรซึ่งประกอบโครงสร้างหนามแหลมยื่นออกมาจากวัสดุซึ่งมีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตร โดยอนุภาคทองคำชนิดนี้สังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยใช้ของไอออนของโลหะเงินเป็นสารเหนี่ยวนำและควบคุมโครงสร้างหนาม นอกจากนี้กลไกการโตของอนุภาคได้ถูกอธิบายผ่านการดูดซับทางกายภาพของอนุภาคซิลเวอร์คลอไรด์ที่เกิดขึ้น ที่ทำให้เกิดการรบกวนการโตในหน้า (111) และทิศทาง <211> ของการโตในโครงสร้างแบบเดนดริติก ซึ่งทำให้เกิดลักษณะหนามแหลมยาวเกิดขึ้นเมื่อเติมไอออนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่ำและจะลดความยาวของโครงสร้างหนามบนอนุภาคเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนของโลหะเงินระหว่างการสังเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งซิลเวอร์คลอไรด์ที่เกิดขึ้นสามารถกำจัดได้ง่ายด้วยสารละลายแอมโมเนีย ทำให้มีพื้นผิวที่สะอาดและง่ายต่อการเกาะติดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในกลุ่ม Raman dye ที่ยังคงให้สัญญาณรามานเมื่อถูกทดสอบบนอนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ขึ้นอยู่ที่ 1 nM [18]

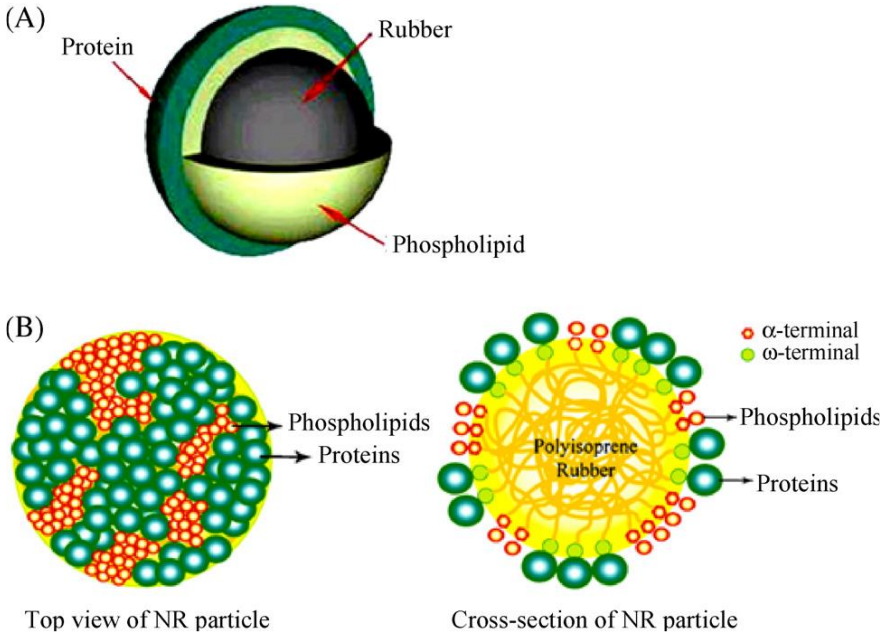



รูปที่ 7 แสดงภาพของโครงสร้างอนุภาคทองคำที่มีรูปร่างคล้ายหอยแม่นทะเลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่สามารถบังคับขนาดและโครงสร้างได้จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะในการสังเคราะห์ทางเคมี [20]

6. น้ำยางสด

น้ำยางสด (field latex) คือยางที่ผลิตได้จากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ซึ่งแหล่งที่มีการเพาะปลูกยางพาราที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดถึง 90% จะอยู่ในโซนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตน้ำยาง มีทั้งในรูปแบบของการกรีด โดยใช้ของมีคมเปิดผิวของต้นยางพารา ซึ่งมีท่อน้ำยางขนานอยู่กับต้น

และให้น้ำยางไหลลงไปในภาชนะรองรับ นอกจากนี้ยังมีวิธีการที่ใช้การเจาะลำต้นร่วมกับการใช้สารเร่งเพื่อให้น้ำยางไหลออกมา น้ำยางสดที่ได้จะเป็นของเหลวสีขาว ประกอบไปด้วย โปรตีน ลิปิด และ Polyisoprene โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Polyisoprene ซึ่งเป็นสารสำคัญ และเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมยาง ในกรณีของน้ำยางสดสามารถนำไปแปรรูปให้เป็นยางในรูปของแข็ง เช่น ยางแผ่น และ ยางแท่ง รวมถึงสามารถน้ำไปเพิ่มความเข้มข้นให้เป็นน้ำยางเข้มข้น และน้ำยางโปรตีนต่ำ ซึ่งน้ำยางสดที่แปรรูปไปในแต่ละรูปแบบก็จะมีวัตุประสงค์ในการนำไปประยุกต์ใช้งานที่แตกต่างกันออกไป ในน้ำยางสดองค์ประกอบที่ได้กล่าวมาในข้างต้นมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเป็นอนุภาคกระจายตัวในน้ำในรูปแบบของ อิมัลชั่น (emulsion) ซึ่งสามารถแบ่งองค์ประกอบต่างๆ ในรายละเอียดได้แก่ ส่วนที่เป็นเนื้อยาง 35% ส่วนที่ไม่ใช่ยาง 65% ส่วนที่เป็นน้ำ 55% ส่วนของลูทอยด์ 10% ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 8 [27]

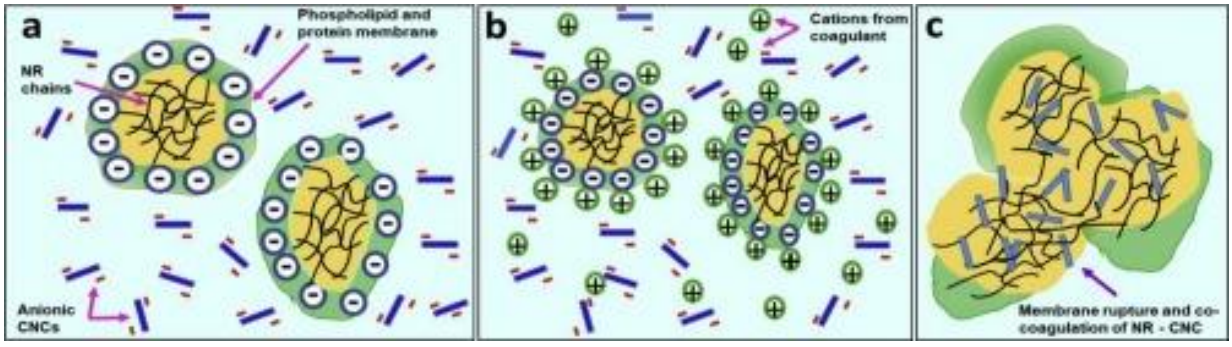



รูปที่ 8 แสดงภาพจำลองโครงสร้างของอนุภาคยางธรรมชาติที่กระจายตัวในแบบอิมัลชั่น ที่มีองค์ประกอบภายในอนุภาคต่าง ๆ [27]

6. สารละลายแอมโมเนีย

เนื่องจากโครงสร้างภายนอกของอนุภาคยางพาราที่กระจายตัวในตัวกลางที่มีพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นประจุลบ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 9 [28] เนื่องจากน้ำยางสดที่เกี่ยวเกี่ยวได้จะมีอายุการเก็บที่สั้นเนื่องจากแบคทีเรียในอากาศสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำยางสด และมีโปรตีนเป็นอาหารหลักที่ใช้ในการเจริญเติบโต โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก

แบคทีเรียจะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของกรดอินทรีย์ และทำให้ค่า pH ของน้ำยางสดมีค่าลดลง ส่งผลรบกวนประจุบนพื้นผิวของอนุภาคยางที่กระจายตัวอยู่ซึ่งในที่สุดส่งผลให้ผนังของอนุภาคยางแตกตัวออก และทำให้เกิดการรวมตัวกันของ Polyisoprene ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนและรวมตัวกันกลายเป็นยางก้อนในที่สุด เพื่อเป็นการรักษาอายุของน้ำยางสดให้นานที่สุดก่อนการนำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น หรือน้ำยางโปรตีนต่ำ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมยางอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่มถุงมือยาง ถุงยางอนามัย หรือการขึ้นรูปฟิลม์ยาง จึงจำเป็นรักษาสภาพความเป็นประจุบนอนุภาคยางให้มีความเป็นลบ นั้นคือการทำให้น้ำยางสดมีค่า pH สูงกว่า 7 หรือเป็นด่าง ซึ่งสารในกลุ่มที่มีการนิยมใช้ในกลุ่มผู้รับซื้อน้ำยางสด คือสารละลายแอมโมเนีย โดยจะเติมในปริมาณที่แตกต่างกัน ในกรณีของ High Ammonia จะมีปริมาณของ สารละลายแอมโมเนียอยู่ที่ 0.3-0.7 %w/w ของน้ำหนักน้ำยางสด และ Low Ammonia จะมีปริมาณของ สารละลายแอมโมเนียน้อยกว่า 0.29 %w/w ของน้ำหนักน้ำยางสด ในกรณีที่ปริมาณแอมโมเนียน้อยเกินไปส่งผลให้ไม่สามารถจะรักษาสภาพของน้ำยางสดได้ แต่หากมากเกินไปแอมโมเนียที่มีอยู่จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับซิงค์ไอออน ($Zn^{2+}$) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ทำให้มีค่า Gel content เพิ่มขึ้นกระกระทบกับสมบัติทางกายภาพในผลิตภัณฑ์ยางหลังจากการแปรรูปจากน้ำยางสดข้างต้น [29]




รูปที่ 9 แสดงภาพจำลองโครงสร้างของอนุภาคยางธรรมชาติที่กระจายตัวในแบบอิมัลชั่น ที่มีประจุลบภายนอกของพื้นผิว และการทำให้เกิดการรวมตัวและตกตะกอน จากการปรับสภาวะทางประจุให้เป็นกลางโดยการเติมประจุบวกลงไป [28]

# บทที่ 3
# ขั้นตอนการวิจัย

1. การสกัดแยกโปรตีน Hev b1 และ Hev b3

1.1 น้ำยางพาราสด

สกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 โดยการประยุกต์ตามวิธีของ K. Berthelot et al., 2014 [20] และ C. Sontimuang et al., 2011 [30] ดังนี้ นำน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis*, RRIM600) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เพื่อแยกชั้นเนื้อครีมและส่วนใส (C-serum) ออกจากกัน ละลายชั้นเนื้อครีมกลับด้วย wash buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM $MgSO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่สามารถละลายน้ำบางส่วนออกไป ล้างชั้นเนื้อครีมอีกครั้งด้วย wash buffer จากนั้นละลายชั้นเนื้อครีมด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.4 ที่ประกอบด้วย 1% sodium dodecylsµLfate (SDS) และ 0.1% Triton X-100 บ่มสารละลายดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เก็บส่วนใสโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ตรวจสอบโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 โดยการนำส่วนใสในแต่ละขั้นตอนวิเคราะห์ด้วยวิธี 15% sodium dodecylsµLfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ [31]

1.2 น้ำยางพาราที่ใส่แอมโมเนีย

สกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 โดยการประยุกต์ตามวิธีของ J. Jayadevan et al., 2018 [32] ดังนี้ นำน้ำยางพาราที่ผสมแอมโมเนีย ความเข้มข้น 0.3% (w/w) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม 0.1% (w/w) Urea, 1% (w/w) SDS, 2.5% (w/w) acetone บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อเก็บส่วนใส ปริมาณ 1 มิลลิลิตร สำหรับชั้นเนื้อครีม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ประกอบด้วย 1% (w/w) SDS และ 2.5% (w/w) acetone บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง และเก็บส่วนใส ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ล้างชั้นเนื้อครีมอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ประกอบด้วย 1% (w/w) SDS และ 2.5% (w/w) acetone จากนั้นละลายชั้นเนื้อครีมด้วยน้ำกลั่นที่มี 1% (w/w) SDS บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อเก็บส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ส่วนใสที่ได้ในแต่ละขั้นตอนด้วยวิธี 15% SDS-PAGE ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ [31]

1.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสตามตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ [31] เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลส่วนบน 3% โดยเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่าง 12 ช่องและเจลส่วนล่าง 15% ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังตารางที่ 3

ตาราง 3 แสดงองค์ประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลเจลสำหรับงานอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

| ส่วนประกอบ | เจลส่วนบน 3% (5 mL) | เจลส่วนบน 15% (6 mL) |
|---|---|---|
| 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide | 0.5 mL | 3.0 mL |
| 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 | 1.25 mL | - |
| 1.5 M Tris-HCl, 8.8 | - | 1.5 mL |
| 0.2 M EDTA | 50 µL | 60 µL |
| 10% SDS | 50 µL | 60 µL |
| 10% Ammonium persµLphate | 50 µL | 60 µL |
| TEMED | 4 µL | 4 µL |
| Distilled water | 3.10 mL | 1.32 mL |

เตรียมตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 40% glycerol, 4% SDS, 0.4% โบรโมฟีนอลบลู และ 4% $\beta$-mercaptoethanol ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มของโปรตีนที่เหมาะสม จากนั้นต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสไปแช่ในสารละลาย 0.02% คูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250), 50% methanol, 7.5% acetic acid นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 50% methanol-7.5% acetic acid นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วย 5% methanol-7.5% acetic acid จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

1.4 การหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยการดูดสารละลายตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสมและทำควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) โดยเจือจาง BSA ให้มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml จากนั้นเติม BSA ในแต่ละหลอดให้มีปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophptometer ดังแสดงในตารางที่ 4

ตาราง 4 แสดงอัตราส่วนสารละลาย ความเข้มข้นของ BSA และการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ในเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนแบบ Bradford

| ปริมาณ BSA (μg) | ปริมาตร 0.2 mg/ml BSA (μL) | ปริมาตรน้ำกลั่น (μL) | ปริมาตร Bradford (ml) | A595 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | #1 | #2 |
| 0 | 0 | 50 | 1.0 | 0 | 0 |
| 2 | 10 | 40 | 1.0 | 0.1 | 0.098 |
| 4 | 20 | 30 | 1.0 | 0.201 | 0.211 |
| 6 | 30 | 20 | 1.0 | 0.313 | 0.326 |
| 8 | 40 | 10 | 1.0 | 0.402 | 0.392 |
| 10 | 50 | 0 | 1.0 | 0.477 | 0.451 |

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานของ standard BSA โดยแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ($A_{595}$) และปริมาณ BSA (μg) โดยความชันของกราฟที่ได้ (m) ถูกแทนที่ในสมการสำหรับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่างสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นโปรตีน } (\mu g/\mu L) = \frac{A_{595}}{(\mu L \text{ assay})(m)}$$

1.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพารา โดยการทำ preparative PAGE

Preparative PAGE เป็น SDS-PAGE แต่มีการเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของโพลีอะครีลาไมด์เจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 15% นำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากชั้นเนื้อครีมโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างแล้วเติมลงในช่องใส่สารทุกช่อง เปิด

กระแสไฟฟ้าคงที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล จากนั้นตัดเจลตรงกลางและเจลด้านซ้าย-ขวาเป็นแถบ กว้างชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร ตามความยาวตลอดแผ่นเจล นำชิ้นเจลที่ตัดได้ไปย้อมด้วยสารละลาย Bradford (0.01% coomassie brilliant blue G-250, 4.7% ethanol, 8.5% phosphoric acid) (Bradford, 1976) นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลส่วนที่ไม่ได้ย้อมสี แล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมสีตามแนวขวางเฉพาะตรงตำแหน่งของโปรตีน Hev b1 จากนั้นทำการชะโปรตีนออกจากชิ้นเจลโดยการโฮโมจีไนซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellμLose หาปริมาณโปรตีน ทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE

1.6 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากน้ำยางพาราสดโดยการทำ preparative PAGE และตกตะกอนโปรตีนโดยวิธี acetone precipitation ให้ได้โปรตีนผง

วิธีการทำ preparative PAGE เช่นเดียวกับขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสด ดังที่ได้กล่าวในรายงานครั้งก่อนหน้านี้ โดยนำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากชั้นเนื้อครีมโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างแล้วเติมลงในช่องใส่สารทุกช่องของ SDS-PAGE ทีมีความเข้มข้นของโพลีอะครีลาไมด์เจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 15% เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล จากนั้นตัดเจลตรงกลางและเจลด้านซ้าย-ขวาเป็นแถบ กว้างชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร ตามความยาวตลอดแผ่นเจล นำชิ้นเจลที่ตัดได้ไปย้อมด้วยสารละลาย Bradford นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลส่วนที่ไม่ได้ย้อมสี แล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมสีตามแนวขวางเฉพาะตรงตำแหน่งของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 จากนั้นทำการชะโปรตีนออกจากชิ้นเจลโดยการโฮโมจีไนซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellμLose จากนั้นนำสารละลายโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 อย่างละ 1 ส่วน ผสมกับอะซิโตนแช่เย็น (-20 °C) 4 ส่วน ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ vortex เป็นเวลา 20 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 60 นาที เก็บตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนโดยใช้อะซิโตนและทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นตากตะกอนโดยการเปิดฝาทดลองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนกลับด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 หาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี 15% SDS-PAGE

1.7 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสดโดยวิธี size exclusion chromatography

การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยชั่ง Sephadex G-75 หนัก 2 กรัม แช่ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 ให้เม็ดเจลพองตัว ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ความยาว 25 เซนติเมตร ด้วยน้ำกลั่นและบรรจุสำลีให้อยู่ปลายคอลัมน์ เติมเม็ดเจล Sephadex G-75 ลงในคอลัมน์อย่างช้า ๆ จนเม็ดเจลมีความสูง 20 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารสกัด Hev b1 จากน้ำยางพาราสดลงบนผิวเจลอย่างช้า ๆ

แล้วชะต่อด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 โดยเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ค่าโปรตีนด้วยวิธี Bradford คัดเลือกหลอดที่มีค่าโปรตีนสูงเพื่อตรวจสอบโปรตีนโดยวิธี 15% SDS-PAGE

1.9 การสังเคราะห์และเตรียมพลาสมิดลูกผสมของยีน Hev b1 และ Hev b3

การโคลนยีน Hev b1 และ Hev b3 ทำโดยบริษัท GenScript (USA) โดยการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ส่วน open reading frame (ORF) ของยีนทั้งสองชนิด โดยออกแบบให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ XhoI บริเวณปลายทั้งสองข้างของชิ้นยีน จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ เชื่อมต่อเข้ากับ expression vector (pET28a(+)) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสม สกัดพลาสมิด และทำพลาสมิดให้อยู่ในรูป lyophilized plasmid เมื่อได้รับพลาสมิดลูกผสมของยีน Hev b1 และ Hev b3 ทำการเพิ่มปริมาณและ activate พลาสมิด โดยการละลายพลาสมิดด้วยน้ำปราศจากเชื้อ (sterilized water) ให้มีความเข้มข้น 100 ng/µL จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย (transformation) ดังนี้ นำ competent cells ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่สังเคราะห์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมลงไปในหลอด วางบนน้ำแข็ง 30 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำการ heat-shock เซลล์ ทำให้พลาสมิดลูกผสมสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านทางรูพรุนที่เกิดขึ้นบริเวณผนังเซลล์แบคทีเรีย เติมอาหารเหลว LB (Luria Bertani broth) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมกับมีการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อที่เลี้ยงปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (LB agar) ที่มี 100 µg/µL kanamycin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะพบว่ามี colony สีขาวขึ้นบนอาหารแข็ง pick colony เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 100 µg/µL พร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียและสกัดพลาสมิดด้วยชุด High-speed plasmid mini kit (Geneaid) ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ XhoI เปรียบเทียบกับพลาสมิดที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นวิเคราะห์ผลการตรวจสอบพลาสมิดโดยการทำ 1% agarose gel electrophoresis ส่งพลาสมิดที่มีชิ้นยีน Hev b1 และ Hev b3 แทรกอยู่ วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ T7 และ T7 terminator เป็นไพรเมอร์ และ BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing kit ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism 3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystem) ของบริษัท Biobasic Inc.

1.10 การผลิตโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในเซลล์แบคทีเรีย

นำดีเอ็นเอลูกผสม Hev b1-pET28a และ Hev b3-pET28a เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) โดยวิธี transformation ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น เมื่อปรากฏ colony เดี่ยวบนอาหารแข็ง LB ให้เลือก pick colony ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 100 µg/µL kanamycin

บ่มและเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้ทำการเจือจาง 1:100 ในอาหารเหลว LB ที่มี 100 µg/µL kanamycin ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมงเพื่อให้ค่า $A_{600}$ เป็น 0.6-0.8 จึงเติม IPTG (isopropyl ß-D-1thiogalactopyranoside) ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1 M เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน เลี้ยงต่อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C และเก็บตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่เวลา 4, 8, และ 16 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมโดยวิธี 15% SDS-PAGE เมื่อตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาใดแล้วจึงทำการเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเก็บเซลล์ที่เวลานั้น ๆ

1.11 การสกัดแยกโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในเซลล์แบคทีเรีย

นำตะกอนเซลล์มาละลายใน lysis buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl และ 10 mM imidazole, pH 7.4) และเติม 2.5 µg/mL lysozyme จากนั้นนำไป freeze-thaw เพื่อทำให้ผนังเซลล์แตก โดยการแช่สารละลายใน liquid $N_2$ นาน 30 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทันที ทำซ้ำ 3 รอบ เติม 10 µg/mL RNase A และ 5 µg/mL DNase I บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 20 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เป็นโปรตีนละลายน้ำ (soluble protein; Sp) ส่วนตะกอนนำไปล้างด้วย washing buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เป็น W1 ส่วนตะกอนละลายต่อด้วย washing buffer II (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 M urea) และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เป็น W2 สุดท้ายละลายตะกอนด้วย solubilized buffer (8 M urea, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTT) เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนนี้เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein; Inp) ทำให้โปรตีนกลับสู่สภาพธรรมชาติโดยการ dialysis ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, และ 5 mM cysteine ที่ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบหาโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ที่ผลิตได้โดยนำสารละลายทุกขั้นตอนไปทำ 15% SDS-PAGE

1.12 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรียลูกผสม Hev b1 และ Hev b3

ทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมโดยใช้คอลัมน์ Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) agarose โดยนำ Ni-NTA agarose ที่อยู่ใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับโปรตีน 1,200 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนผสมที่ได้บรรจุลงในคอลัมน์ และล้างโปรตีนที่ไม่จับกับ Ni-NTA agarose ออกด้วย washing buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และล้างต่อด้วย washing buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเริ่มชะโปรตีนที่จับกับ Ni-NTA agarose ออกด้วย Elution buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0), Elution buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0), Elution buffer III (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0) และ Elution buffer IV (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตรอย่างละ 10 มิลลิลิตร โดยเก็บสารละลาย fraction ละ 500 ไมโครลิตร นำสารละลายแต่ละ fraction วิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี Bradford และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแต่ละ fraction โดยการทำ 15% SDS-PAGE จากนั้นรวม fraction ที่มี rHev b1 หรือ rHev b3 เข้าด้วยกัน แล้วนำไป dialyze ใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1.13 สเปกตรัมรามาน ของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3

โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่ได้จากแบคทีเรียหรือน้ำยางพารา ในรูปแบบของเหลวที่ปริมาณ 5 µL บน aluminum foil จากนั้นนำไปบันทึก สเปกตรัมรามาน ด้วยเครื่อง Thermo Scientific DXR Raman microscope โดยใช้เลเซอร์กระตุ้นที่มีความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ภายใต้เลนส์ที่กำลังขยาย 100X

2. อนุภาคของทองคำและเงินสำหรับใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

2.1 การสังเคราะห์อนุภาคคำที่สามารถควบคุมความยาวโครงสร้างระดับนาโนเมตร

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรที่มีรูปร่างแบบหนามโดยวิธีทางเคมี และเลือกสภาวะที่ให้โครงสร้างเหมาะสมต่อการใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน จากงานวิจัยที่ผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ [18] โดยมีขั้นตอนโดยย่อคือ นำสารละลายเกลือของโลหะทองคำ ($HAuCl_4$) ความเข้มข้น 0.05 mM ทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ความเข้มข้น 30% w/v ที่มีไอออนของโลหะเงินผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 – 15 µM เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างแบบหนามที่มีความซับซ้อน โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดในหลอดแก้วขนาด 3 mL ภายใต้เครื่อง vortex เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นรอให้เกิดปฏิกิริยาจากสารละลายสีเหลือง เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้ม จนได้สารละลายใสไม่มีสีและมีตะกอนสีน้ำตาลของอนุภาคตกอยู่ก้นหลอด จากนั้นแยกสารละลายใสทิ้ง และได้ตะกอนอนุภาคออกมา

2.2 การกำจัดสารเคมีที่ตกค้างบนอนุภาค

นำส่วนของอนุภาคทองคำที่มีรูปร่างแบบหนามที่ปกคลุมไปด้วยอนุภาคของ ซิลเวอร์คลอไรด์ (AgCl) ไปทำความสะอาดต่อด้วยโดยกำจัดออกด้วยการใช้สารละลายแอมโนเนีย ($NH_4OH$) 5 M เพื่อให้ได้พื้นผิวที่สะอาดภายใต้คลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 นาทีและเร่งการตกของอนุภาคโดยเครื่องหมุนเหวียง ที่ 1,000 rpm หลังจากนั้น

2.3 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบของธาตุของอนุภาค

ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคความสม่ำเสมอรวมถึงขนาดและรูปร่างของอนุภาค โดยตัวอย่างจะถูกกระจายตัวในตัวทำละลายและดูดออกมาด้วย micropipette ปริมาตร 5 µL หยดบน carbon tab ที่ติดบน aluminium stab จากนั้นรอให้แห้งใน dissicator ที่มีสารดูดความชื้นเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ด้วยเครื่อง JSM-6510LV และยืนยันองค์ประกอบของธาตุบนอนุภาค ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์พลังงานที่ปลดปล่อยในช่วงรังสีเอ็กซ์ของธาตุ (EDS)

2.4 เตรียมวัสดุเพื่อใช้เป็นวัสดุรองรับในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการอย่างง่ายในการตรึงอนุภาคที่กระจายตัวอยู่ในสารละลายโดย อาศัยกระบวนการตกตะกอนและให้อนุภาคจัดเรียงตัวใหม่หลังจากการกระจายตัวด้วยคลื่นอัลตราโซนิค โดยมีรายละเอียดดังนี้ ตัดแผ่นกระจกให้มีขนาด 0.3 x 0.3 cm วางไว้บนยางรองรับที่ดัดแปลงจากกระบอกฉีดยา นำอนุภาคที่ได้จากการสังเคราะห์ในขั้นตอนข้างต้นมากระจายตัวอีกครั้งด้วยด้วยคลื่นอัลตราโซนิค จากนั้นนำอนุภาคที่กระจายตัวดีแล้วเติมลงไปในกระบอกฉีดยาที่ได้ดัดแปลงขึ้น แล้วรออนุภาคเรียงตัวบนแผ่นกระจกจนสังเกตเห็นสีน้ำตาลเกิดขึ้นและสารละลายด้านบนใสไม่มีตะกอนจึงดันก้านของหลอดฉีดยาขึ้นมาเพื่อไล่ของเหลวออกอย่างช้า ๆ และไม่ให้กระทบกับอนุภาคที่อยู่บนวัสดุรองรับ ขั้นตอนสุดท้ายนำวัสดุรองรับที่มีอนุภาคอยู่ไปอบต่อที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในภาชนะร่วมกับวัสดุดูดความชื้น เพื่อเตรียมไว้เป็นวัสดุรองรับสำหรับใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานต่อไป

2.5 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำและเงินที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ

2.5.1 การเตรียมกระจกเพื่อใช้ตรึงอนุภาคโลหะ

เตรียมกระจกด้วยน้ำยาทำความสะอาด จากนั้นนำไป sonicate ด้วยน้ำยาน้ำยาทำความสะอาดซ้ำอีก 2 ครั้ง sonicate ด้วยน้ำประปาและน้ำปราศจากไอออน (DI) อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ อบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 109° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงแช่กระจกสไลด์ใน 1 M NaOH 25 mL เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้เทปติดกระจกสไลด์ด้านที่ไม่สัมผัสกับสารไว้ เมื่อครบกำหนดแล้วจึงทำการล้างกระจกด้วยน้ำประปา จากนั้นดึงเทปออก แล้ว sonicate ด้วยน้ำประปาซ้ำอีก 3 ครั้ง และ sonicate ด้วยน้ำ DI 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที อบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 109° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาตัดกระจกสไลด์ให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 $cm^2$ โดยประมาณ แล้วนำไปแช่ใน Piranha solution ($H_2O_2$ : $H_2SO_4$ = 4:1 ) 40 มิลลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

จากนั้น sonicate ด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง และ sonicate ด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที อบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 109° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.5.2 การเตรียมกระจกที่มีอนุภาคเงินในระดับนาโนเมตรตรึงบนพื้นผิว

วิธีการสังเคราะห์ที่ได้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [33] เริ่มจากเตรียม 10% w/v NaOH 50 µL ใน 5% w/v $AgNO_3$ 2 mL เขย่าให้เข้ากันจนเกิดตะกอนสีดำ 2. จากนั้นเติม 2 % w/v $NH_4OH$ 1 mL เขย่าจนตะกอนละลายหมด จะได้ละลายใส ไม่มีสี ซึ่งสารละลายที่ได้จากขั้นตอนนี้เรียกว่า Tollen's reagent จากนั้นจึงนำ Tollen's reagent ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 µL หยดลงบนกระจกสไลด์ที่เตรียมไว้ แล้วจึงตามด้วยสารผสมระหว่าง conc. $CH_2O$ 10 µL กับ $C_2H_5OH$ 495 µL ปริมาตร 1 µL แล้ววางทิ้งไว้ในตู้ควันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างนี้จะสามารถสังเกตได้ว่า สีของสารละลายบนกระจกจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสี เป็นสีเหลือง และกลายเป็นฟิล์มเงินในที่สุด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 109° C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างทำความสะอาดด้วย น้ำ DI อีกสามรอบ แล้วถึงนำไปเก็บไว้ในภาชนะร่วมกับวัสดุดูดความชื้น เพื่อเตรียมไว้เป็นวัสดุรองรับสำหรับใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานต่อไป

2.5.3 การเตรียมกระจกที่มีอนุภาคเงินและทองคำในระดับนาโนเมตรตรึงบนพื้นผิว

คณะผู้วิจัยได้ดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์จากงานวิจัยก่อนหน้านี้นำแผ่นกระจกที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 3.2 มาหยดด้วยสารละลายเกลือของโลหะทองคำ ($HAuCl_4$) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 mM รอเวลาในการเกิดปฏิริยา 1 ชั่วโมง โดยโลหะเงินจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับไอออนของโลหะทองคำ เกิดเป็นโครงสร้างของโลหะทองคำแทนที่โลหะเงินบางส่วนทำให้ สามารถสังเคราะห์อนุภาคเงินและทองคำในระดับนาโนเมตรในอัตราส่วนต่างๆกันได้เรียกกระบวนการนี้ว่า Galvanic replacement reaction หลักจากนั้นนำอนุภาคที่ได้ทำการสังเคราะห์ทำความสะอาดด้วยน้ำ DI เป็นจำนวน 1 รอบ และกำจัด ซิลเวอร์คลอไรด์ (AgCl) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาข้างต้นด้วยการแช่ในสารละลายแอมโนเนีย ($NH_4OH$) 5 M เพื่อให้ได้พื้นผิวที่สะอาดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วย DI เป็นจำนวน 3 รอบแล้วถึงนำไปเก็บไว้ในภาชนะร่วมกับวัสดุดูดความชื้น เพื่อเตรียมไว้เป็นวัสดุรองรับสำหรับใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานต่อไป

2.5.4 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบของธาตุของอนุภาค

ทำเช่นเดียวกันกับขั้นตอนที่ 2.3 โดยอนุภาคที่อยู่บนกระจก จะถูกลอกด้วยเทปกาวจากนั้น ถึงนำมาแปะบน carbon tab ที่เตรียมไว้บน aluminium stab จากนั้นเก็บไว้ใน dissicator ที่มีสารดูดความชื้นเป็นเวลา 1 วัน ถึงจะวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ด้วยเครื่อง JSM-6510LV และยืนยันองค์ประกอบของธาตุบนอนุภาค ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์พลังงานที่ปลดปล่อยในช่วงรังสีเอ็กซ์ของธาตุ (EDS) นอกจากนี้ยังตรวจสอบความหนาของอนุภาคที่ถูกตรึงบนผิวกระจกด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ด้วยเครื่อง SPA-400/NanoNavi บนชิ้นงานที่ถูกลอกชั้นของอนุภาคออกบางส่วน และวิเคราะห์ความหนาด้วยฟังก์ชั่น Line scan

2.5.5 การทดสอบสมบัติของวัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้นใน เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

โปรตีน Hev b1 และ b3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 µL จะถูกหยดบนวัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้น จากนั้นรอให้แห้งประมาณ 5 นาที ใน dissicator ที่มีสารดูดความชื้นภายใต้อุณภูมิห้อง จากนั้นวิเคราะห์สเปกตรัมรามานด้วย สเปกตรัมรามาน ด้วยเครื่อง Thermo Scientific DXR Raman microscope โดยใช้เลเซอร์กระตุ้นที่มีความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ภายใต้เลนส์ที่กำลังขยาย 100 X และทดสอบกำลังของเลเซอร์กระตุ้นที่เหมาะสมตั้งแต่ 0.1 mW จนถึง 10 mW จากนั้นสเปกตรัมรามานที่ให้สัญญาณสูงสุดสามค่า ถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อนำไปใช้สร้างกราฟมาตรฐานที่ขึ้นกับความเข้มข้นต่อไป

3. การตรวจสอบการจับกันของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 และแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ โดยวิธี Western blot

เพื่อตรวจสอบความสามารถจับกันอย่างจำเพาะของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 จากน้ำยางพาราสดกับแอนติบอดีที่สังเคราะห์จากโปรตีนลูกผสมซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย โดยการนำโปรตีนที่สกัดได้จากน้ำยางธรรมชาติทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ไปทดสอบการจับกันเชิงคุณภาพกับแอนติบอดีโดยวิธี Western blot ดังนี้ นำน้ำยางพาราสด สารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 สารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราโดยใช้ wash buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM MgSO4) โปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 บริสุทธิ์จากยางพารา และโปรตีนลูกผสม Hev b1 หรือ Hev b3 บริสุทธิ์ ไปวิเคราะห์ด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS ที่มีความเข้มข้นเจล 15% (15% SDS-PAGE) แล้ววิเคราะห์ต่อด้วยวิธี Western blot ตามวิธีของ Auttarat และคณะ (2006) [34] ดังนี้ ขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellµLose membrane) ตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979) [35] โดยทำใน 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 10% methanol, pH8.3 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 500 mA นาน 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย TBS (50mM Tris-HCl, pH 7.4-0.9% NaCl) จากนั้นนำไปบ่มใน TBS ที่มี 10% skim milk ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ด้วย TBS ที่มี 0.05% Tween20 (TBST) นำไปบ่มต่อด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม Hev b1 หรือ Hev b3 บริสุทธิ์ (anti-rHev b1 หรือ anti-rHev b3, 1°Ab) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน TBST ที่มี 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปบ่มต่อในสารลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดอยู่กับเอนไซม์เพอรอกซิเดสหรือ 2°Ab (anti-rabbit IgG peroxidase conjµgated) ที่เจือจาง 1:25,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย TBST จำนวน 3 ครั้งแล้วล้างต่อด้วย TBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นย้อมเมมเบรนด้วย TMB (3.3',5,5'-tetramathylbenzidine) substrate kit หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

4. การตรวจสอบการจับกันของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 และแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เตรียมโปรตีนลูกผสม rHev b1 หรือ rHev b3 ปริมาณ 2 ไมโครกรัม โดยการเจือจางกับบัฟเฟอร์ 50 mM carbonate buffer, pH 9.6 ให้ได้ปริมาตรรวม 150 µL เพื่อนำไปเคลือบบนผิวเพลทโดยแต่ละหลุม จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลาข้ามคืน (24 ชั่วโมง) ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับเพลทออกโดยใช้บัฟเฟอร์ PBST (50 mM phosphate buffer pH 7.4, 0.15% NaCl, 0.05% Tween20) ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ละลาย 5% skim milk ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 0.05% Tween20 เติมลงในแต่ละหลุมบนเพลทปริมาตร 200 µL บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ℃ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นเติม primary antibody (anti-rHev b1 หรือ anti-rHev b3) โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ PBST ที่มี 0.1% skim milk อัตราส่วนต่าง ๆ ตั้งแต่ 1:1,000 ถึง 1:10,000 ปริมาตรรวม 150 µL บ่มที่อุณหภูมิ 25 ℃ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เติม secondary antibody (horseradish peroxidase conjµgated anti-rabbit IgG) ซึ่งเจือจางในบัฟเฟอร์ PBST ที่มี 0.1% skim milk อัตราส่วน 1:25,000 ปริมาตรรวม 150 µL บ่มที่อุณหภูมิ 25 ℃ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยเติมซับสเตรทของเอนไซม์เพอรอกซิเดสโดยใช้ TMB (3.3',5,5'-tetramathylbenzidine) substrate kit หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M $H_2SO_4$ ปริมาตร 50 µL และวัดค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร

5. การยืนยันโครงสร้างของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3

การยืนยันโครงสร้างของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ทำโดยวิธีการ ELISA เหมือนขั้นตอนข้างต้น โดยใช้โปรตีนลูกผสม rHev b1 หรือ rHev b3 ปริมาณ 2 ไมโครกรัม เคลือบบนผิวเพลท ทำปฏิกิริยาการจับกับแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ และใช้แอนติบอดีสลับกัน เพื่อทดสอบว่าโปรตีนทั้งสองตัวมีโครงสร้างแตกต่างกัน โดยใช้ 1° Ab anti-rHev b1 อัตราส่วน 1:8,000 หรือ 1° Ab anti-rHev b3 อัตราส่วน 1:5,000 และใช้ 2° Ab อัตราส่วน 1:25,000 ทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยใช้ TMB (3.3',5,5'-tetramathylbenzidine) substrate kit หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M $H_2SO_4$ และวัดค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร

6. การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3

เตรียมโปรตีนลูกผสม rHev b1 หรือ rHev b3 เพื่อนำไปเคลือบบนผิวเพลทโดยแต่ละหลุมจะใช้ปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน โดยการเจือจางกับบัฟเฟอร์ 50 mM carbonate buffer, pH 9.6 ให้ได้ปริมาตรรวม 150 µL จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลาข้ามคืน (24 ชั่วโมง) ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับเพลทออกโดยใช้บัฟเฟอร์ PBST (50 mM phosphate buffer pH 7.4, 0.15% NaCl, 0.05% Tween20) ปริมาตร 200 µL จำนวน 3

ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นละลาย 5% skim milk ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, , 0.05% Tween20 เติมลงในแต่ละหลุมบนเพลทปริมาตร 200 µL บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นเติม anti-rHev b1 หรือ anti-rHev b3 โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ PBST ที่มี 0.1% skim milk อัตราส่วน anti-rHev b1 คือ 1:8,000 และอัตราส่วน anti-rHev b3 คือ 1:5,000 ปริมาตรรวม 150 µL บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เติม horseradish peroxidase conjµgated anti-rabbit IgG ซึ่งเจือจางในบัฟเฟอร์ PBST ที่มี 0.1% skim milk อัตราส่วน 1:25,000 ปริมาตรรวม 150 µL บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 µL จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยเติมซับสเตรทของเอนไซม์เพอรอกซิเดสโดยใช้ TMB (3.3',5,5'-tetramathylbenzidine) substrate kit หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M $H_2SO_4$ ปริมาตร 50 µL และวัดค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 โดยพล็อตความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

7. การสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยาง

การสกัดโปรตีนจากถุงมือยางประยุกต์จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [36] โดยตัดถุงมือยางบริเวณฝ่ามือแล้วนำไปล้างแป้งออกด้วยน้ำกลั่น ตากทิ้งไว้ให้แห้งและตัดเป็นชิ้นเล็กขนาด 5x5 $mm^2$ จากนั้นนำถุงมือยางหนัก 0.5 กรัม แช่ในสารละลายต่าง ๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2, PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS, wash buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM MgSO4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และ 37 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ด้วยความเร็วรอบ 8,000xg เป็นเวลา 3 นาที เก็บสารละลายส่วนใสนำไป dialyze ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรณีหลังการ dialyze แล้วสารสกัดมีการตกตะกอน นำตะกอนล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และละลายตะกอนด้วย 50 mM carbonate buffer pH 9.6 กรณีการสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้น้ำกลั่นและน้ำกลั่นผสมเอทานอล ทำเช่นเดียวกับการสกัดโปรตีนโดยบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ข้างต้น โดยตัดถุงมือยางให้มีน้ำหนัก 0.5 กรัม แช่ในน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, และ 5:5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ด้วยความเร็วรอบ 8,000xg เป็นเวลา 3 นาที เก็บสารละลายส่วนใสนำไป dialyze ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบสารสกัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE กรณีต้องการกำจัด SDS จากสารสกัดโปรตีน ทำได้โดยการตกตะกอนในอะซิโตนหรือผ่านคอลัมน์ Sephadex G75 ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

8. ความใช้ได้ของวิธีการ

8.1 ขีดจำกัดการตรวจหา (Limit of detection (LOD))

ขีดจำกัดการตรวจหาเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระบบสามารถรับสัญญาณได้โดยมีค่าสูงกว่าค่าที่มาจากสัญญาณรบกวนจากการตรวจวัดในครั้งนั้นๆ (Signal to noise ratio) ซึ่งควรจะมีค่าสูงกว่า 3.3 เท่า จากคำแนะนำของ ICH Quality Guidelines [37] โดยมีสมการดังนี้

$$LOD = 3.3 \times \frac{SD_{intercept}}{Slope}$$

เมื่อ $SD_{intercept}$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดที่ได้จากการทำ Regression ของกราฟมาตรฐาน

Slope ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

8.1 ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation (LOQ))

ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถหาได้จากกราฟมาตรฐาน โดยมีค่าสูงกว่าค่าที่มาจากสัญญาณรบกวนจากการตรวจวัดในครั้งนั้นๆ (Signal to noise ratio) ซึ่งควรจะมีค่าสูงกว่า 10 เท่าจากคำแนะนำของ ICH Quality Guidelines [37] โดยมีสมการดังนี้

$$LOQ = 10 \times \frac{SD_{intercept}}{Slope}$$

เมื่อ $SD_{intercept}$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดที่ได้จากการทำ Regression ของกราฟมาตรฐาน

Slope ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

8.3 เปอร์เซ็นการได้กลับคืน (%Recovery)

พิจารณาจากการเตรียมสารมาตรฐาน 3 ความเข้มข้นที่ครอบคลุม กราฟมาตรฐานทั้งหมด จากนั้นจึงคำนวนเปอร์เซ็นการได้กลับคืน โดยค่าที่ได้ควรจะต้องอยู่ในช่วง 75 – 125% [38] โดยมีสมการดังนี้

$$\%recovery = 100 \times \frac{Amount_{\text{sample}}}{Amount_{\text{standard}}}$$

เมื่อ $Amount_{sample}$ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$Amount_{standard}$ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เตรียมไว้

8.4 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

พิจารณาจากการเค่าที่ได้จากสารมาตรฐาน 3 ความเข้มข้นที่ครอบคลุม กราฟมาตรฐานทั้งหมด จากนั้นจึงนำค่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) หารด้วยค่าเฉลี่ยที่ได้ ($\bar{X}$) โดยค่าที่ได้ควรจะต้องน้อยกว่า 10% [38] โดยมีสมการดังนี้

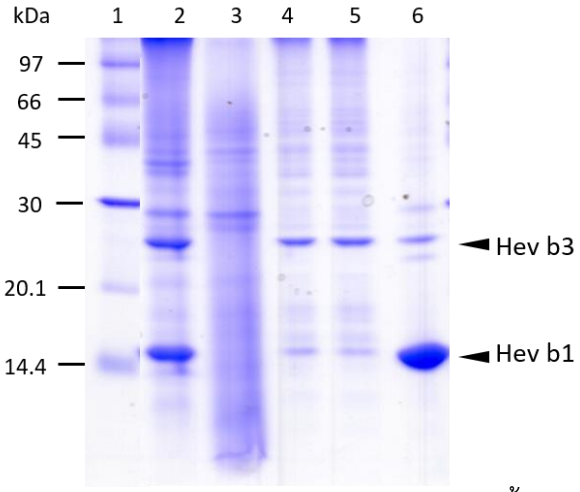
$$\%\mathrm{RSD} = 100 \times \frac{\mathrm{SD}}{\bar{\mathrm{X}}}$$

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. สกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน

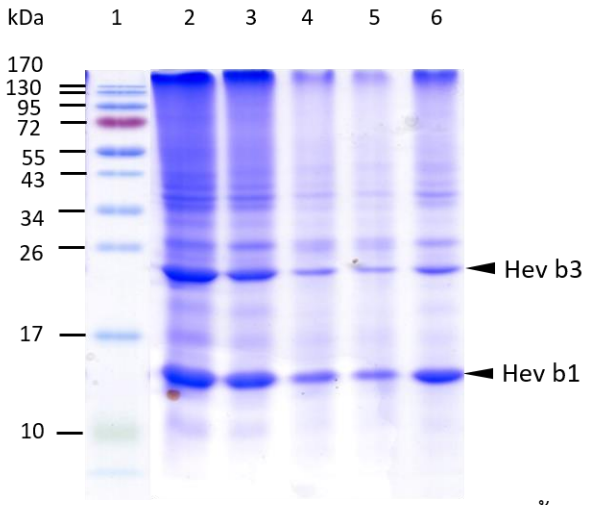
1.1 จากน้ำยางพาราสดและน้ำยางพาราที่เติมสารละลายแอมโมเนีย

จากการนำน้ำยางพาราสดมาวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนโดยวิธี 15% SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่สนใจน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14 kDa และ 25 kDa ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ซึ่งยืนยันจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [20] จึงนำน้ำยางพารามาตรวจหาแหล่งโปรตีนดังกล่าวว่าพบมากในส่วนใดของน้ำยางพารา โดยวิธีการหมุนเหวี่ยง พบยางพาราแยกออกเป็น 2 ชั้น คือชั้นเนื้อครีมและส่วนใสหรือที่เรียกว่า C-serum ไม่พบโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ในส่วนใส C-serum คาดว่าโปรตีนดังกล่าวจะอยู่ในชั้นเนื้อครีม จึงล้างชั้นเนื้อครีมด้วย wash buffer 2 ครั้ง และสกัดโปรตีนด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 พบแถบโปรตีน Hev b3 เข้มในส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer ทั้ง 2 ครั้ง แต่โปรตีน Hev b1 พบมากในส่วนที่สกัดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 ซึ่งง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 8




รูปที่ 10 แบบแผนโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE จากการสกัดน้ำยางพาราสด (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) น้ำยางพาราสด (3) ส่วนใส (C-serum) (4) ส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM $MgSO_4$ ) ครั้งที่ 1 (5) ส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer ครั้งที่ 2 และ (6) ส่วนใสที่สกัดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100

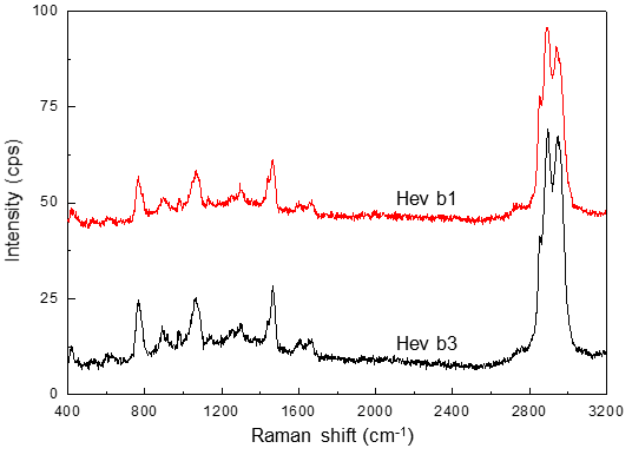
สำหรับการตรวจหาแบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ในน้ำยางพาราที่มีการผสมแอมโมเนีย คณะผู้วิจัยพบว่าในกรณีการใช้น้ำยางพาราสด ตัวน้ำยางจะมีการเสียสภาพได้ง่ายและเมื่อได้น้ำยางจากเกษตรกรแล้วจะต้องนำมากระบวนการแยกทันที ผู้วิจัยจึงสนใจใช้น้ำยางที่รักษาสภาพด้วยแอมโมเนียซึ่งจะช่วยให้น้ำยางที่ได้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวขึ้น และไม่เป็นต้องไปรับน้ำยางจากเกษตรกรหลายครั้ง รวมถึงสามารถวางแผนสกัดโปรตีนได้ต่อเนื่องจากน้ำยางที่ได้เก็บไว้ จากผลการทดลองพบว่าแถบโปรตีนที่คาดว่าน่าจะเป็น Hev b1 และ Hev b3 ในส่วนใสที่ได้จากการสกัดทุกขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 9 เนื่องจากสารละลายที่ใช้ในการสกัดทุกขั้นตอนประกอบด้วย 1% (w/w) SDS เมื่อพิจารณาแบบแผนโปรตีนดังกล่าวแล้วพบว่ามีความยุ่งยากในการนำโปรตีนทั้ง 2 ชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากส่วนใสที่ได้มีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อนสูง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราสด




รูปที่ 11 แบบแผนโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE จากการสกัดน้ำยางพาราที่ผสมแอมโมเนีย (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) น้ำยางพาราที่มีการผสมแอมโมเนีย (3) ส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วย 0.1% (w/w) Urea, 1% (w/w) SDS, 2.5% (w/w) acetone (4) ส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วย 1% (w/w) SDS และ 2.5% (w/w) acetone ครั้งที่ 1 (5) ส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วย 1% (w/w) SDS และ 2.5% (w/w) acetone ครั้งที่ 2 และ (6) ส่วนใสที่สกัดด้วย 1% (w/w) SDS

จากนั้นนำโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่ได้ในข้างต้นไปวิเคราะห์สเปกตรัมรามาน โดยงานวิจัยนี้สนใจการให้สัญญาณรามานของโครงสร้างของ amide I (1650—1680 $cm^{-1}$) และ amide IIII (1230—1280 $cm^{-1}$) ซึ่งแตกต่างกันในโปรตีนทั้ง 2 ชนิด โดยขึ้นกับโครงสร้างของโปรตีน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า Hev b1 มีโครงสร้างแบบ $\beta$-Sheet และ Hev b3 มีโครงสร้างแบบ $\alpha$-Helix [20] ในงานวิจัยนี้พบว่า สเปกตรัมรามาน ดัง

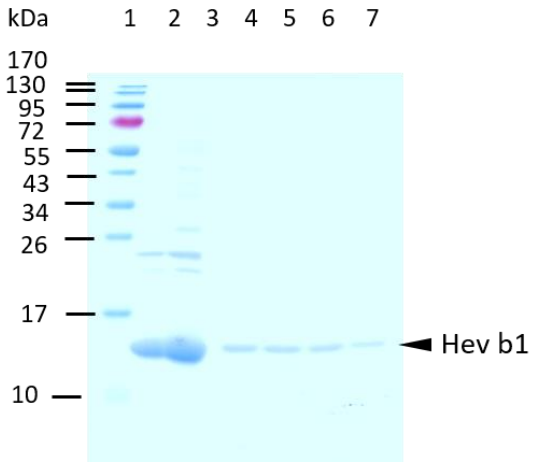
แสดงไว้ในรูปที่ 10 ตำแหน่งของสัญญาณรามาน มีความคลายคลึงกันไม่สามารถแยกจากกันได้ และไม่สอดคล้องกับทฤษฎีข้างต้นจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ คาดว่าเป็นผลจากโปรตีนและสารเคมีอื่น ๆ ที่หลงเหลือจากการสกัดแยกเจือปนอยู่ ซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองเพิ่มด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยเทคนิค preparative PAGE ต่อไป โดยเริ่มจากโปรตีน Hev b1 ซึ่งสามารถแยกออกมาได้ปริมาณที่สูงกว่าโปรตีน Hev b3




รูปที่ 12 สเปกตรัมรามาน ของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่แยกได้จากน้ำยางพาราสด

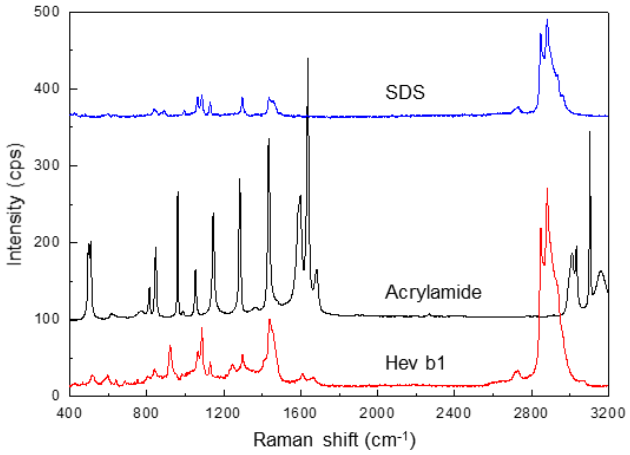
1.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพารา โดยการทำ preparative PAGE

จากการนำสารสกัดโปรตีน Hev b1 จากชั้นเนื้อครีมยางพาราที่พบแถบโปรตีนอื่นเพียงเล็กน้อยไปแยกต่อโดยการทำ preparative PAGE พบว่าปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อย้อมด้วยสีคูมาซีบลู มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14-15 kDa ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 13 แบบแผนโปรตีน Hev b1 ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการทำ preparative PAGE ซึ่งวิเคราะห์โดยการทำ 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2-3) สารสกัดยางพาราจากชั้นเนื้อครีมโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 และ (4-7) โปรตีน Hev b1 บริสุทธิ์ที่ได้จากการทำ preparative PAGE

จากนั้นนำโปรตีน Hev b1 ที่ได้จากวิธีการทำให้บริสุทธิ์ในข้างต้น นำไปวิเคราะห์ สเปกตรัมรามาน ดังแสดงในรูปที่ 12 ถึงแม้ว่าจากการยืนยันด้วยวิธี SDS-PAGE โปรตีน Hev b1 มีความบริสุทธิ์สูงและแทบจะไม่เห็นแถบโปรตีนอื่น ๆ เจือปน แต่ด้วยเทคนิครามานมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงกลับพบว่า Hev b1 มีความแตกต่างจาก Hev b1 ที่ได้จากวิธีแรก นอกจากนี้ในช่วงของ หมู่ amide I (1650—1680 $cm^{-1}$) และ amide IIII (1230—1280 $cm^{-1}$) และจุดอื่น ๆ มีค่าตรงกับ สเปกตรัมรามาน ในสารมาตรฐานของ acrylamide ที่ใช้เป็นวัสดุแยกโปรตีน และ SDS ซึ่งใช้เพื่อเพิ่มการละลายของโปรตีนในกระบวนการสกัดและมีโอกาสสูงที่จะกำจัดออกไปไม่หมด อาจจะทำให้มีสัญญาณรามาน รบกวนในช่วงเดียวกับที่ผู้วิจัยสนใจอยู่ ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ใหม่ โดยมีสารอื่น ๆ เจือจางน้อยที่สุด เพื่อไม่ไปรบกวนการวิเคราะห์สัญญาณในขั้นตอนของเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานต่อไป




รูปที่ 14 สเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 ที่แยกได้จากน้ำยางพาราสดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative PAGE และ สเปกตรัมรามานของ acrylamide และ SDS ที่ได้จากสารมาตรฐาน

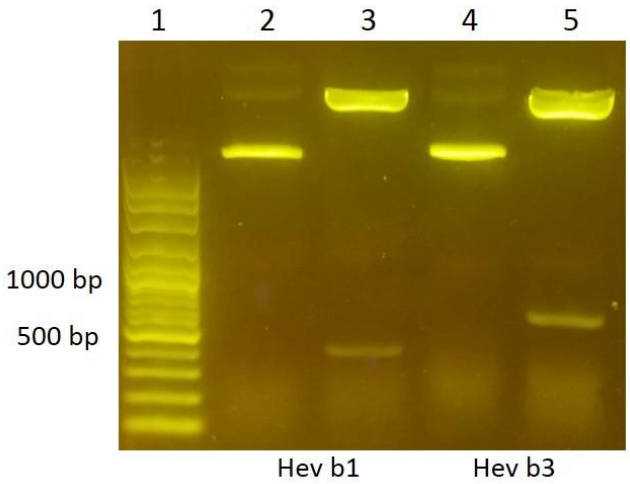
1.3 สกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากเชื้อแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรม

จากปัญหาที่เกิดขึ้นในการสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากน้ำยางพาราธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นระยะเวลาที่จำกัดในการนำน้ำยางพาราสดจากเกษตรกรเพื่อนำมาสกัดโปรตีน ขั้นตอนในการใช้สารลดแรงตึงผิวใน

การสกัดเอาโปรตีนออกผ่านกระบวนการหมุนเหวี่ยงที่มีหลายขั้นตอน และโอกาสที่สารเจือปนมาจากกระบวนการสกัดเข้ามารบกวนจากกระบวนการข้างต้น รวมถึงโปรตีนที่ได้มีปริมาณและความบริสุทธิ์น้อย ทำให้มีปัญหากับการไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนต่อไปเมื่อต้องการนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานโปรตีนกับอุปกรณ์ที่กำลังพัฒนาขึ้น ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจึงมองหาแหล่งโปรตีนทดแทน ที่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณและมีความบริสุทธิ์สูง ที่สำคัญคือมีโครงสร้างที่ตรงกับ Hev b1 และ Hev b3 จากน้ำยางพารา ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ประสบความสำเร็จในการสร้างโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากเชื้อแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรม [39] ซึ่งทางคณะผู้วิจัยมีความเชี่ยวชาญในงานวิจัยด้านการตัดต่อพันธุกรรมในแบคทีเรียและมีความพร้อมในเรื่องเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ จึงได้ดำเนินการวางแผนผลิตและสกัดโปรตีนจากแบคทีเรียซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

1.3.1 การเพิ่มจำนวนและตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 และ pET28a-Hev b3

จากการสังเคราะห์ยีน Hev b1 และ Hev b3 แล้วเชื่อมต่อเข้ากับ expression vector (pET28a) โดยอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [39] โดยบริษัท GenScript ได้พลาสมิดลูกผสมอย่างละ 4 µg จากนั้นนำพลาสมิดดังกล่าวมาทำการเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ XhoI พบแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 ขนาด 400 คู่เบส และ pET28a-Hev b3 ขนาด 600 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งเป็นขนาดใกล้เคียงกับยีน Hev b1 และ Hev b3 ที่สั่งสังเคราะห์ จึงส่งพลาสมิดลูกผสมวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสของยีน Hev b1 และ Hev b3 ต่อไป พบว่ายีน Hev b1 มีขนาด 417 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนประกอบด้วย 139 กรดอะมิโน และยีน Hev b3 มีขนาด 615 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนประกอบด้วย 205 กรดอะมิโน ดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15 ตามลำดับ เมื่อนำลำดับเบสของยีน Hev b1 และ Hev b3 มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูลธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Translated nucleotide-protein blast (blastx) ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 16 และรูปที่ 17 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hev b1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99-100% กับยีน rubber elongation factor (REF) ของยางพารา *Hevea brasiliensis* ดังแสดงในรูปที่ 4 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hev b3 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99-100% กับยีน small rubber particle protein (SRPP) ของยางพารา *Hevea brasiliensis* ดังแสดงในรูปที่ 13 จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 และ pET28a-Hev b3 มียีน Hev b1 และ Hev b3 แทรกอยู่




รูปที่ 15 แบบแผนดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ใน 1% agarose gel electrophoresis โดยที่ (1) 100 bp DNA ladder marker plus (2) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 (3) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ XhoI (4) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b3 และ (5) พลาสมิดลูกผสม pET28a-Hev b1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ XhoI

ข้อมูลการสังเคราะห์ยีน Hev b1 และ Hev b3 โดยบริษัท GenScript

GenScript

Make Research Easy
CONFIDENTIAL

# Certificate of Analysis

**Project ID:** U1229EA090-2

**Construct Information:**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Gene Name:** | Hev b1_pET-28a(+) | | |
| **Clone ID:** | M89357 | **Gene Length:** | 429 bp |
| **Cloning Vector:** | pET-28a(+) | **Cloning Strategy:** | EcoRI / XhoI |

**Growth in Bacteria:**

| | |
|---|---|
| **Plasmid resistance:** | Kanamycin |
| **Suggested competent cell:** | TOP10 |
| **Growth Temperature:** | 37℃ |

**Sequencing primer(s) *:**

T7: TAATACGACTCACTATAGGG

T7ter: TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

*: The primers are located at the 5'and/or 3'sides of MCS region.

| Default | Shipping at | Plasmid Storing at | Bacstab Storing at | Glycerol Stock Storing at |
|---|---|---|---|---|
| Lyophilized | Room Temperature | -20℃ | 4℃ | -80℃ |

| QC Items | Specifications | Results | |
|---|---|---|---|
| **Sequencing Alignment** | Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence. | Pass | Consistent |
| **Vector Sequence** | The flanking sequences of the cloning site are correct. | Pass | Correct<br>Shown in the SQD file |
| **Restriction Digests** | The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands suggesting contamination. | Pass | Correct<br>Shown in attachment 1 |
| **DNA Quality** | Miniprep: 4 μg<br>OD260/280=1.8~2.0<br>Free of contamination | Pass | ⩾ 4 μg<br>OD260/280=1.81<br>Pure |
| **Quality Grade** | Research Grade | Pass | Research Grade |
| **Appearance** | Clear and free of foreign particles. | Pass | Clear<br>Free of foreign particles |
| **Additional Test** | | N/A | |

**Certified by:** Morgan **Date:** 01/18/2019

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

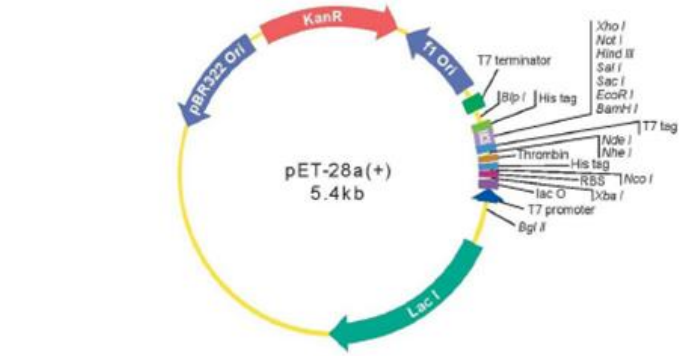
Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: order@genscript.com Web: www.genscript.com

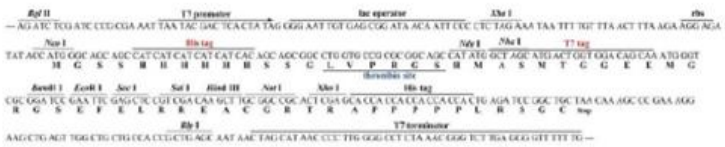
Attachment 1

## Plasmid Construct Map

**The gene was cloned in pET-28a(+) by EcoRI / XhoI.**

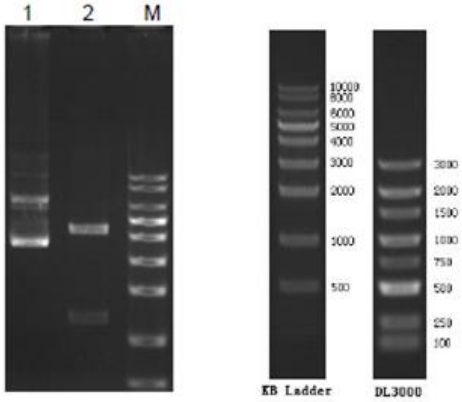
EcoRI — U1229EA090-2 — XhoI



Notes: This map is based on a commercial vector. Some of the clone sites may be lost after cloning.

## Enzyme Digestion




Lane M: KB Ladder
Lane 1:U1229EA090-2 plasmid
Lane 2:U1229EA090-2 plasmid digested by MluI and XhoI

**Digestion Conditions:**

About 300ng plasmid digested
Digestion in water-bath,37℃ for 40 minutes
1% Agarose Gel

# Certificate of Analysis

**Project ID:** U1229EA090-4

**Construct Information:**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Gene Name:** | Hev b3_pET-28a(+) | | |
| **Clone ID:** | M85860 | **Gene Length:** | 627 bp |
| **Cloning Vector:** | pET-28a(+) | **Cloning Strategy:** | EcoRI / XhoI |

**Growth in Bacteria:**

| | |
|---|---|
| **Plasmid resistance:** | Kanamycin |
| **Suggested competent cell:** | TOP10 |
| **Growth Temperature:** | 37℃ |

**Sequencing primer(s) *:**

T7: TAATACGACTCACTATAGGG

T7ter: TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

*: The primers are located at the 5'and/or 3'sides of MCS region.

| Default | Shipping at | Plasmid Storing at | Bacstab Storing at | Glycerol Stock Storing at |
|---|---|---|---|---|
| Lyophilized | Room Temperature | -20℃ | 4℃ | -80℃ |

| QC Items | Specifications | Results | |
|---|---|---|---|
| **Sequencing Alignment** | Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence. | Pass | Consistent |
| **Vector Sequence** | The flanking sequences of the cloning site are correct. | Pass | Correct<br>Shown in the SQD file |
| **Restriction Digests** | The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands suggesting contamination. | Pass | Correct<br>Shown in attachment 1 |
| **DNA Quality** | Miniprep: 4 μg<br>OD260/280=1.8~2.0<br>Free of contamination | Pass | ⩾ 4 μg<br>OD260/280=1.83<br>Pure |
| **Quality Grade** | Research Grade | Pass | Research Grade |
| **Appearance** | Clear and free of foreign particles. | Pass | Clear<br>Free of foreign particles |
| **Additional Test** | | N/A | |

**Certified by:** Morgan **Date:** 01/16/2019



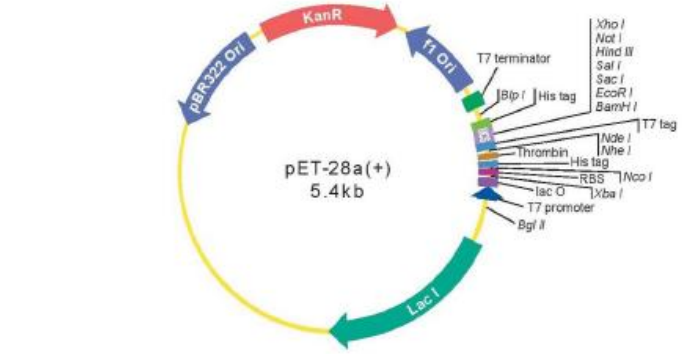
860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA
Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: order@genscript.com Web: www.genscript.com

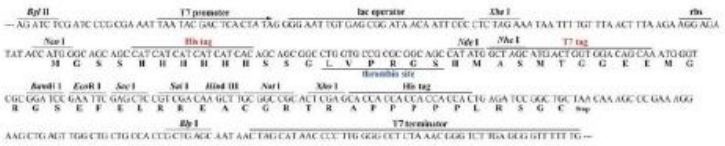
Attachment 1

## Plasmid Construct Map

**The gene was cloned in pET-28a(+) by EcoRI / XhoI.**

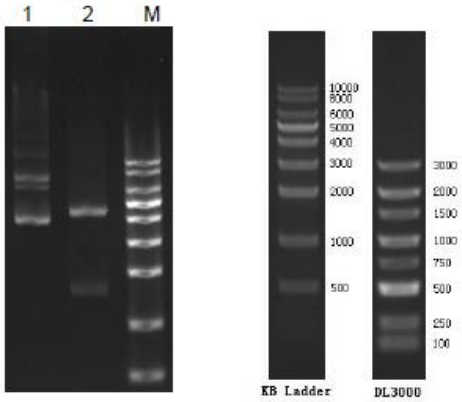
EcoRI — U1229EA090-4 — XhoI



Notes: This map is based on a commercial vector. Some of the clone sites may be lost after cloning.

## Enzyme Digestion



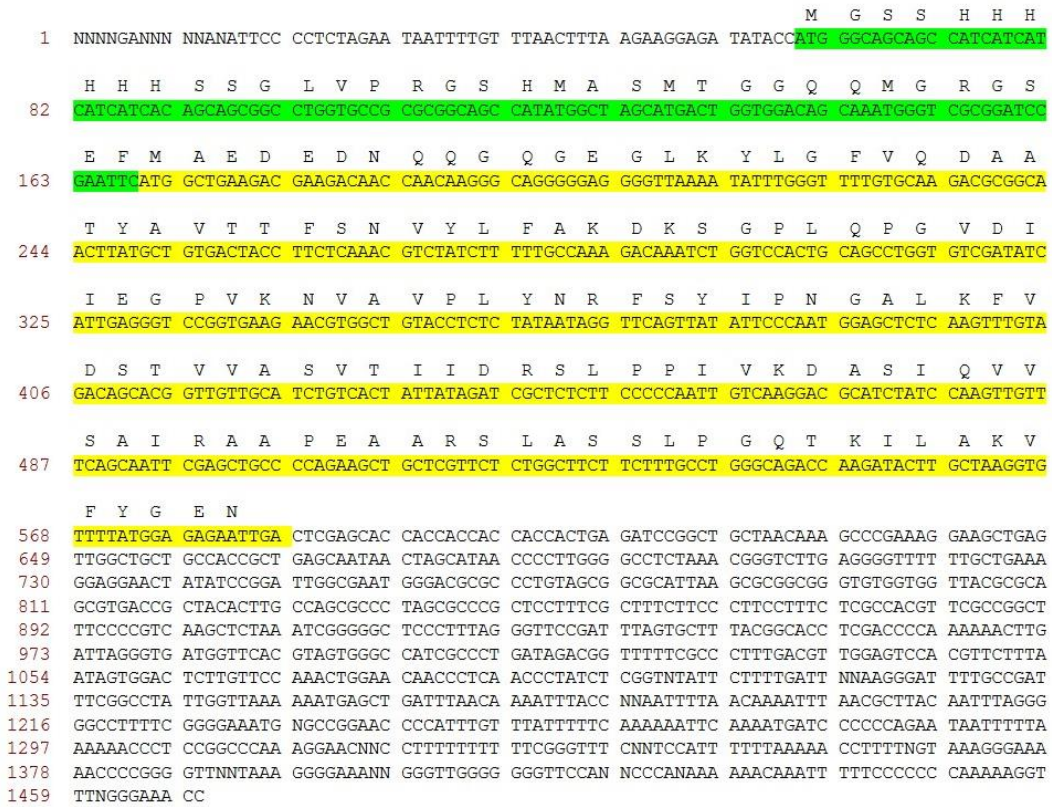

Lane M: KB Ladder
Lane 1:U1229EA090-4 plasmid
Lane 2:U1229EA090-4 plasmid digested by MluI and XhoI

**Digestion Conditions:**

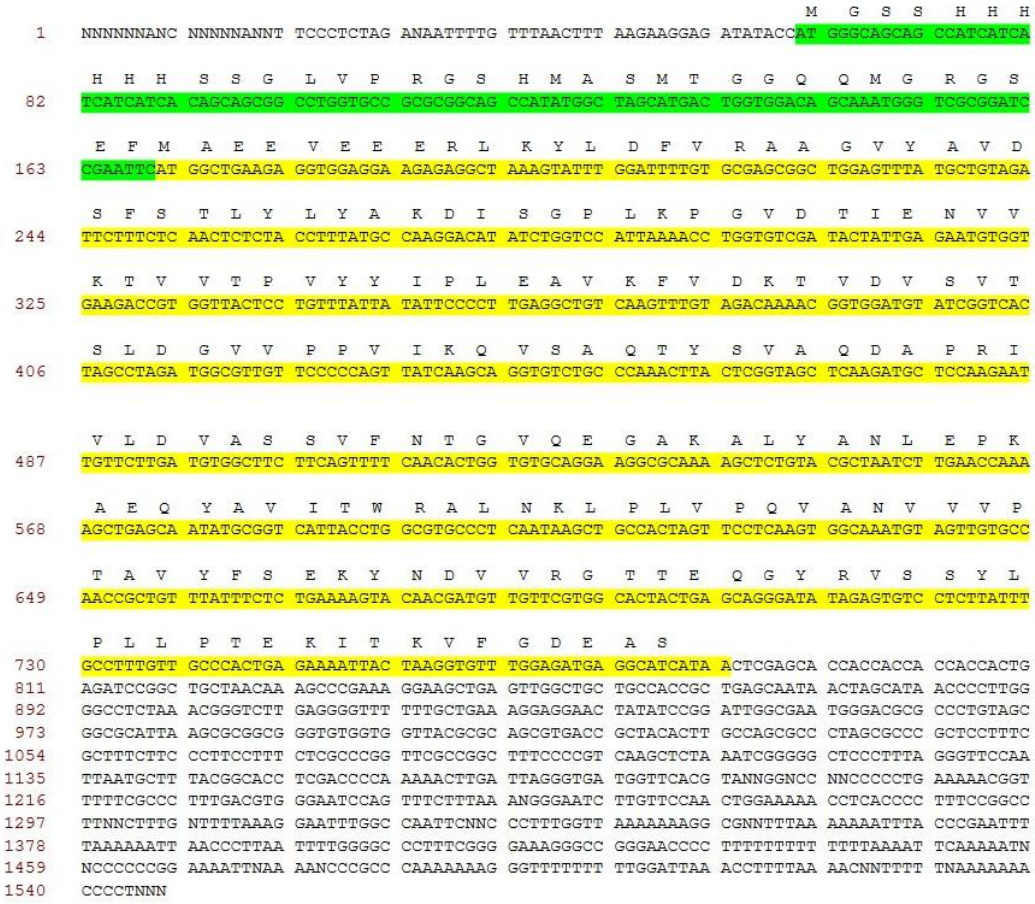
About 300ng plasmid digested
Digestion in water-bath,37℃ for 40 minutes
1% Agarose Gel



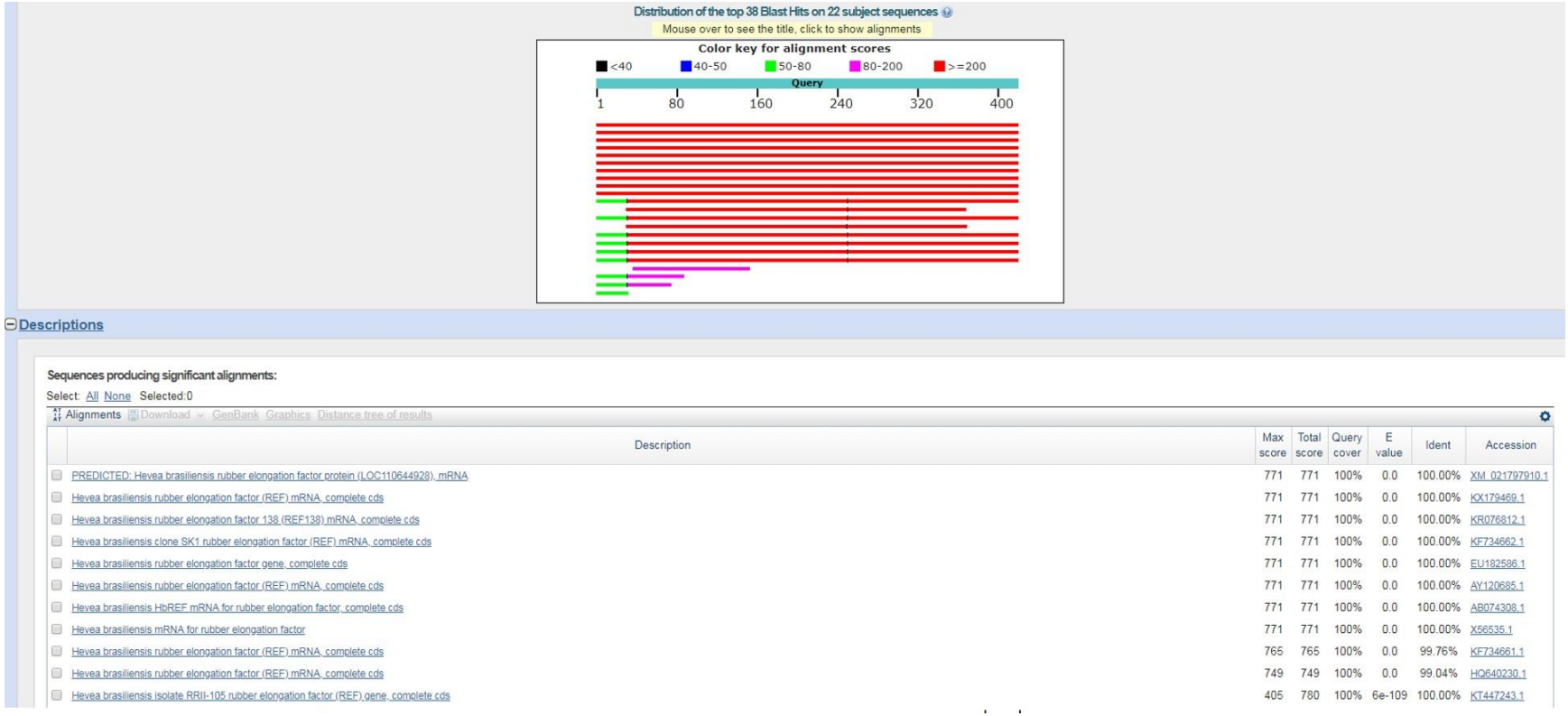
860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA
Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: order @genscript.com Web: www.genscript.com



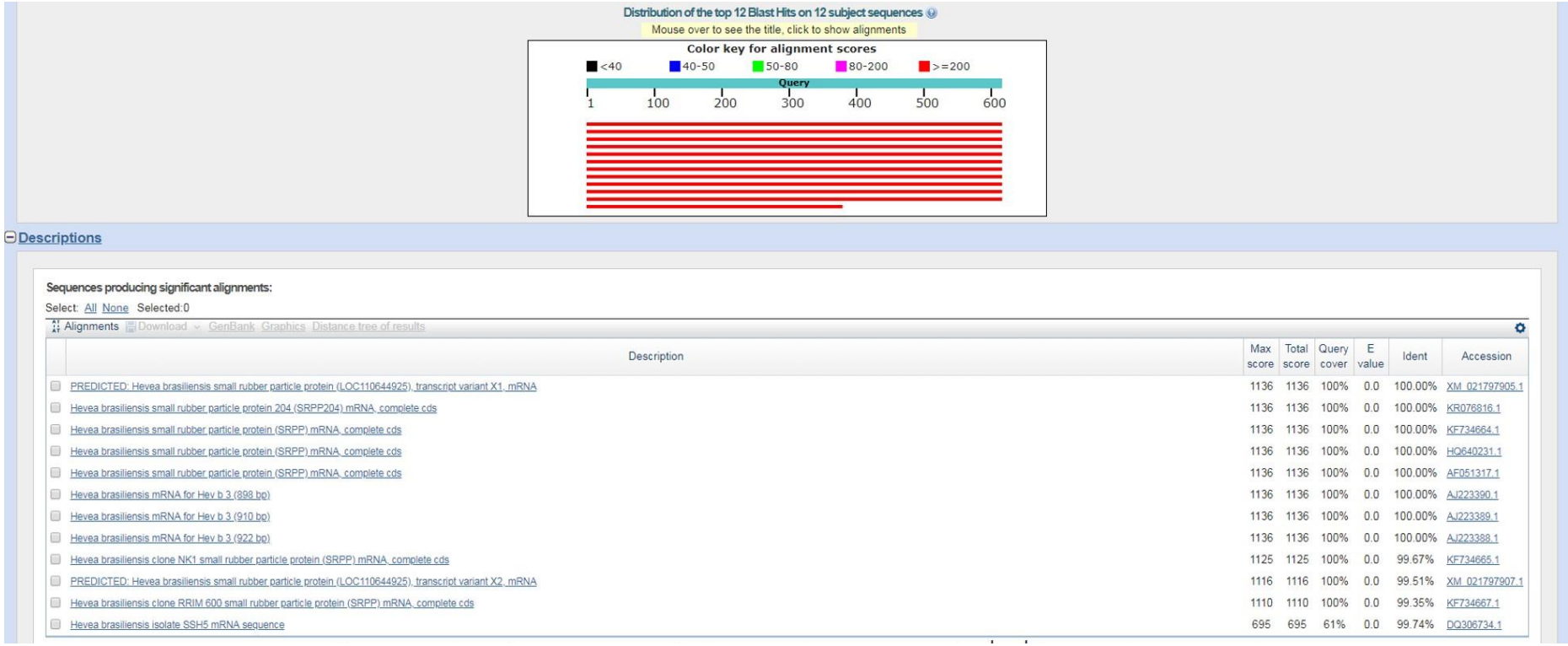

รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน Hev b1 โดยที่ สีเหลือง คือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ORF ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนตัวเต็ม Hev b1 และ สีเขียว คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fusion protein (His-Tag) ของ pET28a vector




รูปที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน Hev b3 โดย สีเหลือง คือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ORF ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนตัวเต็ม Hev b3 และ สีเขียว คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fusion protein (His-Tag) ของ pET28a vector



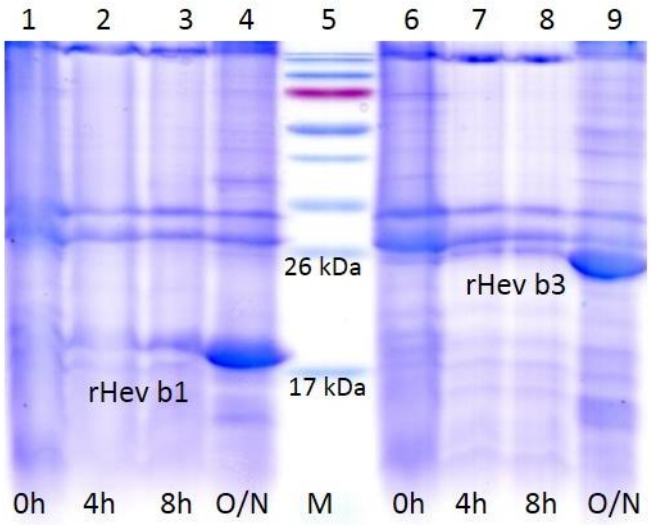

รูปที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hev b1 กับยีนอื่น ๆ ที่มีรายงานในธนาคารยีน




รูปที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hev b3 กับยีนอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน

1.3.2 การผลิตโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในเซลล์แบคทีเรีย

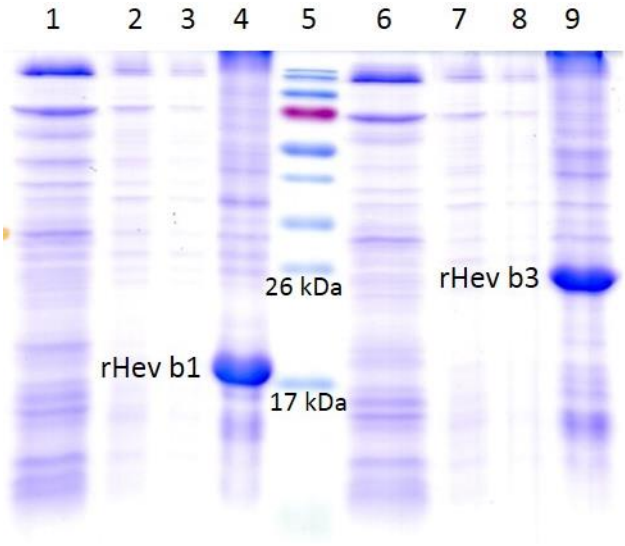
จากนำดีเอ็นเอลูกผสม pET28a-Hev b1 และ pET28a-Hev b3 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนโดยเติม 0.1 M IPTG และเก็บเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม โดยวิธี 15% SDS-PAGE พบว่าที่เวลา 4 และ 8 ชั่วโมงหลังเติม IPTG แถบโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ไม่มีการแสดงออกหรือแสดงออกน้อยมาก แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แถบโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ปรากฏเด่นชัดมาก ดังแสดงในรูปที่ 18 (แถวที่ 4 และ 9) ซึ่งโปรตีนลูกผสม Hev b1 มีขนาดประมาณ 18 kDa และโปรตีนลูกผสม Hev b3 มีขนาดประมาณ 26 kDa จะเห็นได้ว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ในแบคทีเรียมีขนาดใหญ่กว่าโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากน้ำยางสด โดยโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรียมีชื่อเรียกว่า rHev b1 และ rHev b3 ทั้งนี้เพราะในกระบวนการผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบแบคทีเรีย มีการโคลนยีนเชื่อมกับ expression vector (pET28a) ซึ่งในเวคเตอร์ดังกล่าวจะมีลำดับเบสที่สามารถแปลรหัสได้เป็น fusion protein ที่ประกอบด้วย 6xHis-tag มีขนาดประมาณ 3 kDa ซึ่งง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA ต่อไป




รูปที่ 20 แบบแผนการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในแบคทีเรีย ที่เวลาต่าง ๆ หลังการกระตุ้นด้วย IPTG วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1 และ 6) โปรตีนจากแบคทีเรียที่ไม่มีการเติม IPTG (2 และ 7) โปรตีนจากแบคทีเรียหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (3 และ 8) โปรตีนจากแบคทีเรียหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (4 และ 9) โปรตีนจากแบคทีเรียหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (5) protein marker

1.3.3 การสกัดแยกโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในเซลล์แบคทีเรีย

จากการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในเซลล์แบคทีเรีย พบว่าโปรตีนลูกผสมดังกล่าวผลิตได้มากหลังเติม 0.1 M IPTG เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบหาว่าโปรตีนลูกผสมดังกล่าวเป็นโปรตีนแบบละลายน้ำ (soluble protein) หรือแบบไม่ละลายน้ำ (inclusion body) โดยการนำตะกอนเซลล์มาละลายใน lysis buffer และ freeze-thaw เพื่อทำให้ผนังเซลล์แตก แล้วเก็บส่วนใสเป็นโปรตีนละลายน้ำ (soluble protein; Sp) ส่วนตะกอนนำไปละลายด้วย solubilized buffer ที่ประกอบด้วย 8 M urea เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนนี้เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein; Inp) จากผลการตรวจสอบหาโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ที่ผลิตได้โดยนำสารละลายทุกขั้นตอนไปทำ 15% SDS-PAGE ไม่พบโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ในส่วนที่เป็นโปรตีนละลายน้ำและในบัฟเฟอร์ล้างตะกอนทั้งสองชนิด ดังแสดงในรูปที่ 18 แถวที่ 1-3 และ 6-8 แต่พบแถบโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 แสดงออกอย่างเด่นชัดในส่วนที่เป็น inclusion body ดังแสดงในรูปที่ 19 แถวที่ 4 และ 9 ตามลำดับ บ่งชี้ได้ว่าโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเป็นโปรตีนไม่ละลายน้ำ จึงต้องละลายตะกอนด้วย solubilized buffer ที่ประกอบด้วย 8 M urea และทำให้โปรตีนกลับสู่สภาพธรรมชาติโดยการ dialysis เพื่อง่ายในการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

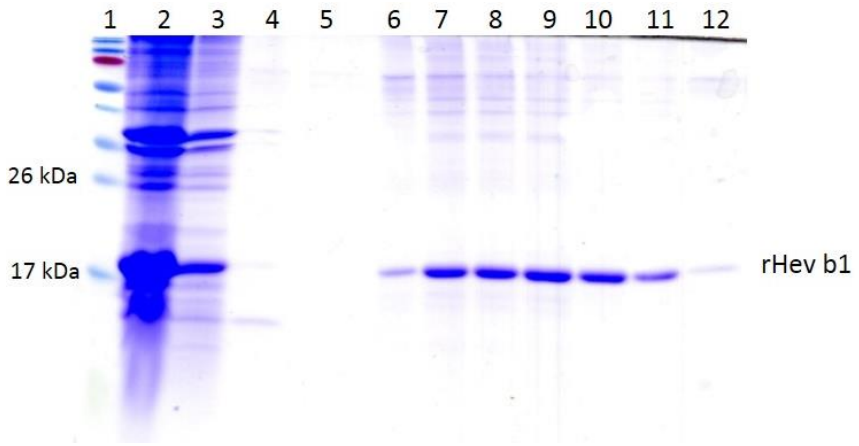



รูปที่ 21 แบบแผนการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ทั้งส่วนที่เป็นโปรตีนละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1 และ 6) สารละลายส่วนใสที่ได้จากการละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl และ 10 mM imidazole, pH 7.4); โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein; Sp) (2 และ 7) สารละลายส่วนใสที่ได้จากล้างตะกอนด้วย washing buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100); W1

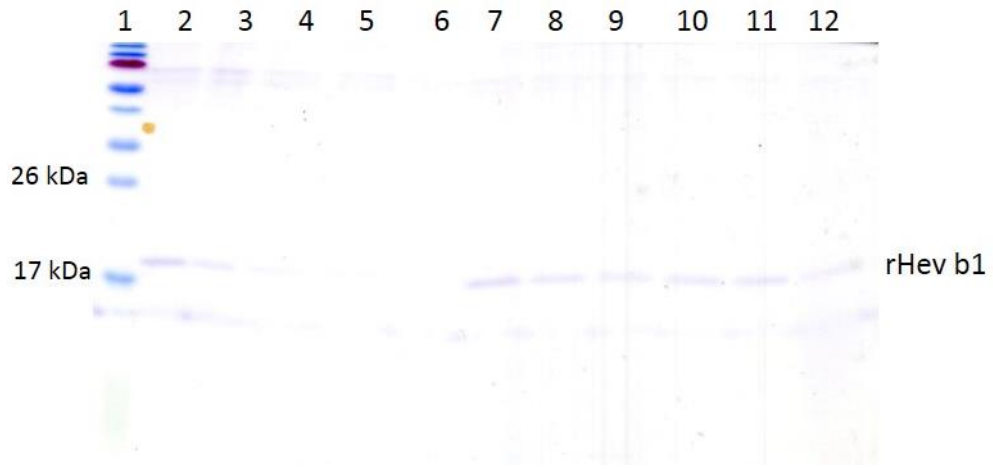
(3 และ 8) สารละลายส่วนใสที่ได้จากล้างตะกอนด้วย washing buffer II (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 M urea); W2 (4 และ 9) สารละลายส่วนใสที่ได้จากละลายตะกอนด้วย solubilized buffer (8 M urea, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTT); โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein; Inp) และ (5) protein marker

1.3.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3

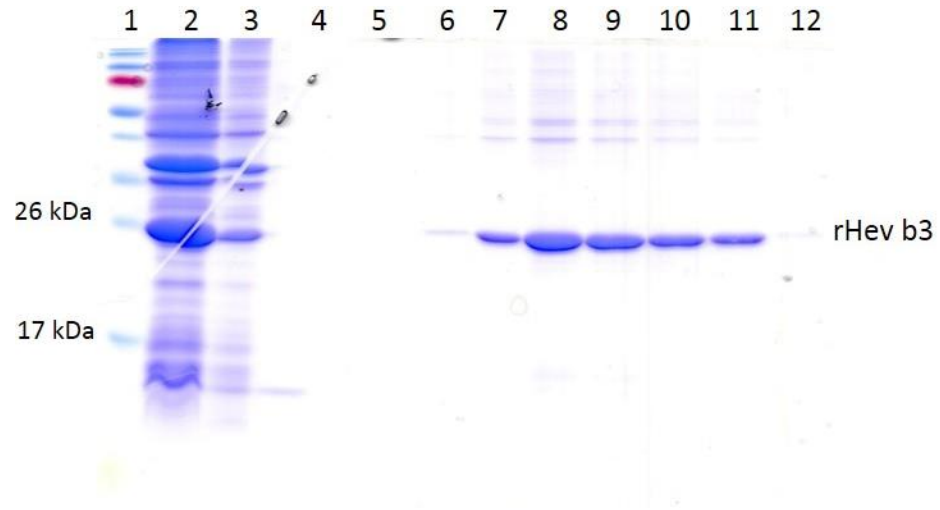
จากการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 โดยใช้คอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ Ni-NTA ออกด้วย Elution buffer I-IV ที่มีความเข้มข้นของ imidazole ตั้งแต่ 100-250 mM ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแต่ละ fraction โดยการทำ 15% SDS-PAGE พบว่าโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 จับกับคอลัมน์ Ni-NTA agarose ได้ดี อาจมีแถบโปรตีนลูกผสมปรากฏในส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (unbound fraction) บ้าง เนื่องจากโหลดปริมาณโปรตีนลูกผสมมากเกินไป ดังแสดงในรูป 20 และ 22 แถวที่ 3 แต่ไม่พบแถบโปรตีนลูกผสมทั้งสองตัวในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการล้างตะกอนด้วย washing buffer I และ washing buffer II (รูปที่ 20 และ 22 แถวที่ 4-5) เมื่อเริ่มชะโปรตีนที่จับกับ Ni-NTA agarose ออกด้วย Elution buffer I ซึ่งประกอบด้วย 100 mM imidazole พบแถบโปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ที่มีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่น ๆ (รูปที่ 20 แถวที่ 6-9 และรูปที่ 22 แถวที่ 6-12) แต่เมื่อชะด้วย Elution buffer II-III ที่มี 150-200 mM imidazole พบแถบโปรตีน Hev b1 ที่มีโปรตีนอื่นปนเปื้อนน้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 20 แถวที่ 10-12 และรูปที่ 21 แถวที่ 2-6 และเมื่อชะด้วย Elution buffer IV ที่มี 250 mM imidazole พบแถบโปรตีนบริสุทธิ์เพียงแถบเดียว สำหรับโปรตีนลูกผสม Hev b3 พบว่าเมื่อเริ่มชะด้วย Elution buffer II ปรากฏแถบโปรตีนบริสุทธิ์เพียงแถบเดียว ดังแสดงในรูปที่ 23 แถวที่ 2-6 แต่เมื่อชะด้วย Elution buffer III ที่มี 200 mM imidazole ไม่พบแถบโปรตีนลูกผสม Hev b3 จึงหยุดการการชะโปรตีนเพียงเท่านี้



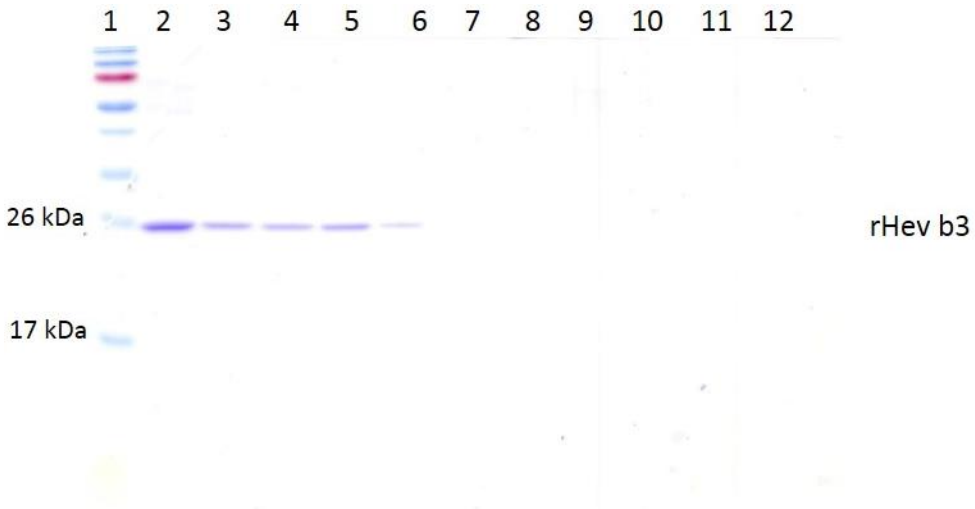
รูปที่ 22 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer I และ Elution buffer II วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1) protein marker (2) crude protein Hev b1 ที่ได้จากการสกัดน้ำยางพาราสดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 (3) unbound fraction; โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์หลังจากบ่ม crude protein Hev b1 กับ Ni-NTA agarose (4) W1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) (5) W2 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0) (6-9) E1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0) และ (10-12) E2 fraction;โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0)




รูปที่ 23 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer III และ Elution buffer IV วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยที่แถว (1) protein marker (2-6) E3 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer III (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0) (7-12) E4 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer Elution buffer IV (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)

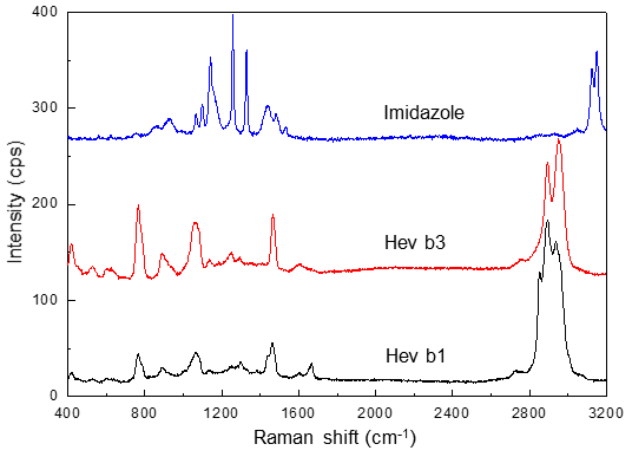



รูปที่ 24 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer I และ Elution buffer II วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1) protein marker (2) crude protein Hev b3 ที่ได้จากการสกัดน้ำยางพาราสดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 (3) unbound fraction; โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์หลังจากบ่ม crude protein Hev b3 กับ Ni-NTA agarose (4) W1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) (5) W2 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0) และ (6-12) E1 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer I (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0)

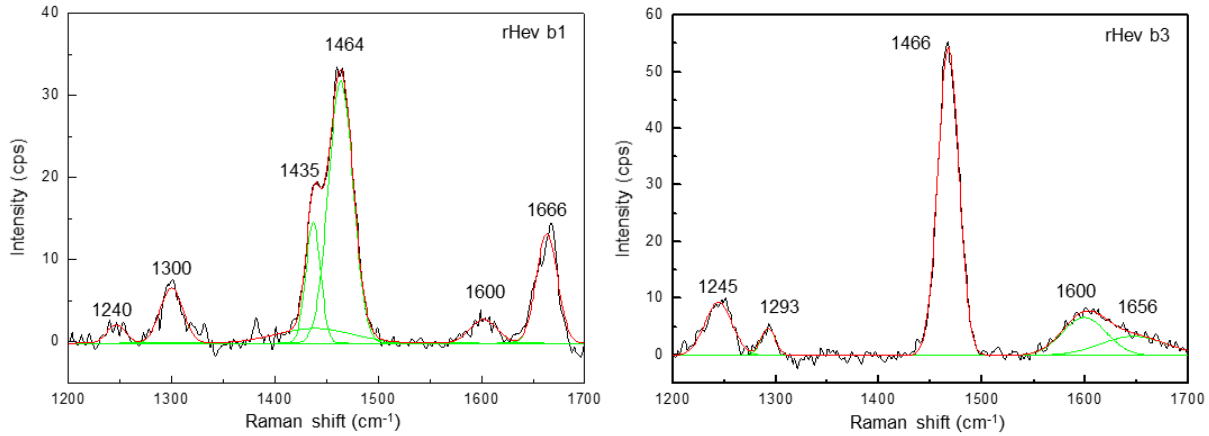


รูปที่ 25 แบบแผนโปรตีนลูกผสม Hev b3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA agarose และชะโปรตีนด้วย Elution buffer III และ Elution buffer IV วิเคราะห์โดยวิธี 15% SDS-PAGE โดยแถวที่ (1) protein marker (2-6) E3 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer II (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0) (7-12) E4 fraction; โปรตีนที่ถูกชะด้วย Elution buffer III (50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0)

โปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ที่ได้จากวิธีการทำให้บริสุทธิ์ในข้างต้นถูกนำไปวิเคราะห์ สเปกตรัมรามาน ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่า imidazole ที่ใช้เป็นสารในการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ไม่ปรากฏสัญญานรามาน ที่เกี่ยวข้องในโปรตีนทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ imidazole ไม่ให้สัญญานรามาน ในช่วงของโครงสร้าง amide I (1650—1680 $cm^{-1}$) ซึ่งเป็นช่วงที่คณะผู้วิจัยให้ความสนใจ และเมื่อพิจารณาในรายละเอียดของโครงสร้างโปรตีนจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ได้ระบุว่า Hev b1 มีโครงสร้างแบบ $\beta$-Sheet และ Hev b3 มีโครงสร้างแบบ $\alpha$-Helix ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างได้ด้วยเทคนิค vibrational spectroscopy ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้บันทึกข้อมูล IR spectrum ของ Hev b1 และ Hev b3 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว [39] แต่ในงานวิจัยนี้ถือว่าเป็นครั้งแรก ที่มีการบันทึกสเปกตรัมรามาน ของ rHev b1 และ rHev b3 ซึ่งได้จากแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรมโดยให้ผลดังแสดงในรูปที่ 25




รูปที่ 26 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ที่แยกได้จากแบคทีเรียที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และ imidazole ที่ได้จากสารมาตรฐาน

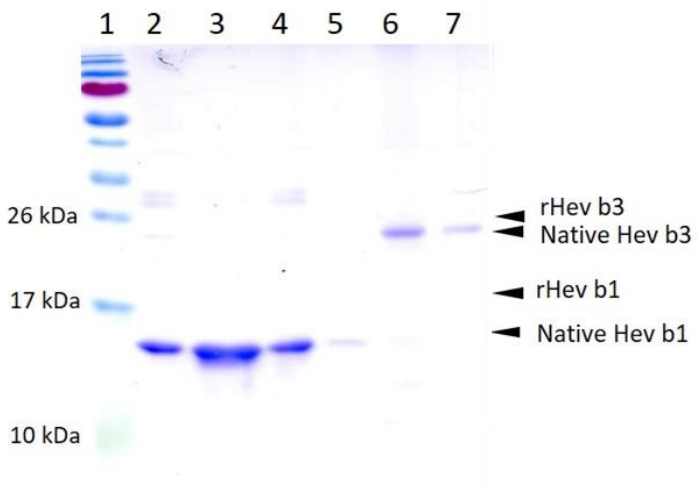



รูปที่ 27 สเปกตรัมรามานในช่วง amide I และ amide III ของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 ที่แยกได้จากแบคทีเรียที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และพีคองค์ประกอบ(composition peaks) ที่ได้จากการทำ peak deconvolution

เมื่อใช้ Gaussian function ในการหาพีคองค์ประกอบ (composition peaks) ที่ได้จากการทำ peak deconvolution เพื่อใช้ในการพิจารณาองค์ประกอบของสัญญาณย่อยที่ซ่อนอยู่ในสเปกตรัมรามาน พบว่าโปรตีน rHev b1 มีสัญญาณที่บ่งบอกถึงโครงสร้างแบบ β-sheet คือ 1666 $cm^{-1}$ ที่อยู่ในช่วงเดียวกับโครงสร้าง amide I (1650—1680 $cm^{-1}$) จากงานวิจัยเกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีนที่มี β-sheet จากโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ให้สัญญาณรามานใกล้กับตำแหน่ง 1670 $cm^{-1}$ ซึ่งถือว่าเป็นเอกลักษณ์ของโปรตีนที่มีโครงสร้างแบบ β-sheet [40] นอกจากนี้ 1230—1240 $cm^{-1}$ ซึ่งเกิดจากโครงสร้างβ-pleated sheet ที่อยู่ในช่วงเดียวกันกับโครงสร้าง amide III (1230—1280 $cm^{-1}$) เป็นเอกลักษณ์สำคัญที่เจอในสเปกตรัมรามานของโปรตีนและยืนยันว่าโปรตีนชนิดนี้มีโครงสร้างแบบ β-sheet [40] ในส่วนของโปรตีน rHev b3 นั้นพบสัญญานรามาน ในช่วง amide I ที่ 1656 $cm^{-1}$ ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนชนิดอื่นๆที่มีโครงสร้างแบบ α-Helix [40] และที่สำคัญคือ พบสัญญานรามาน ในช่วงโครงสร้างแบบ amide III ที่ 1245 $cm^{-1}$ ซึ่งไม่ตรงกับ amide III ของ β-sheet และ random coil ที่อยู่ในช่วง 1235—1240 $cm^{-1}$ และช่วงดังกล่าวไม่ควรเจอใน สเปกตรัมรามาน ของโปรตีนแบบ α-Helix [40] ดังนั้นจากข้อมูลของ สเปกตรัมรามานข้างต้นโปรตีน rHev b3 จึงควรมีโครงสร้างโปรตีนแบบ α-Helix

1.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 โดยการทำ preparative PAGE และตกตะกอนโปรตีนโดยวิธี acetone precipitation เพื่อเตรียมโปรตีนผง

จากการนำสารสกัดโปรตีนชั้นเนื้อครีมยางพาราที่พบแถบโปรตีนอื่นเพียงเล็กน้อยไปแยกต่อโดยการทำ preparative PAGE ใน 15% SDS-PAGE เพื่อตัดเฉพาะแถบโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 เมื่อสกัดโปรตีนออกจากเจลและตกตะกอนด้วยอะซิโตน ปรากฏแถบโปรตีน Hev b1 เพียงแถบเดียวเมื่อย้อมด้วยสีคูมาซีบลู มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14-15 kDa (รูปที่ 26 แถวที่ 4-5) ซึ่งเป็นแถบโปรตีนตำแหน่งเดียวกันกับการทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 ครั้งแรกโดยการทำ preparative PAGE แต่ไม่ได้ตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน และละลายโปรตีนดังกล่าวกลับด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton-X100 (รูปที่ 26 แถวที่ 3) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์สัญญาณรามาน จะปรากฏสัญญาณของ SDS เด่นชัด ดังนั้นในการทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 ครั้งนี้จึงเลือกตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเพื่อกำจัด SDS ออกจากสารละลาย เช่นเดียวกับการทำ preparative PAGE ของโปรตีน Hev b3 พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24-25 kDa (รูปที่ 26 แถวที่ 6-7)




รูปที่ 28 แบบแผนโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โดยแถวที่ (1) protein marker (2) สารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราสดโดยใช้ 1% SDS และ 0.1% Triton-X100 (3) Hev b1 ที่ผ่านการทำ preparative PAGE, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ละลายตะกอนกลับด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton-X100 (4-5) Hev b1 ที่ผ่านการทำ preparative PAGE, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, ตกตะกอนด้วย acetone แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (6-7) Hev b3 ที่ผ่านการทำ preparative PAGE, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, ตกตะกอนด้วย acetone แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0

1.5 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสดโดยวิธี size exclusion chromatography

เพื่อเป็นการยืนยันว่า โปรตีนที่ได้จากน้ำยางธรรมชาติและจากแบคทีเรียตัดต่อพันธุกรรม สามารถใช้ทดแทนกันได้ จึงต้องทำการพิสูจน์โดย คณะผู้วิจัยเลือกการทำบริสุทธิ์โปรตีน Hev b1 เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้มีปริมาณที่สูงกว่า Hev b3 จากน้ำยางพาราสดที่ โปรตีนจะถูกแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 และชะด้วย 25

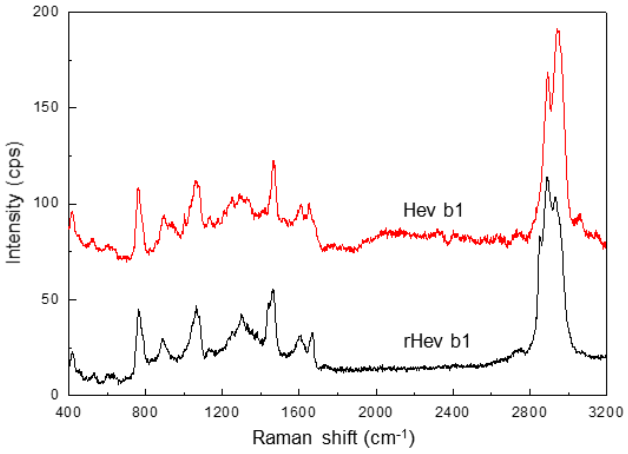
mM Tris-HCl, pH 8.0 พบแถบโปรตีน Hev b1 เริ่มหลุดออกจากคอลัมน์ตั้งแต่ fraction 10-14 ดังในรูปที่ 27 แถวที่ 3-5 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวปรากฏน้ำหนักโมเลกุลเดียวกับโปรตีน Hev b1 ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี preparative PAGE เนื่องจากวิธี size exclusion chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ดังนั้นโปรตีน Hev b1 ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในครั้งนี้ไม่มี SDS ปนเปื้อนหรืออาจจะพบในปริมารต่ำมาก

รูปที่ 29 แบบแผนโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราที่ (1) protein marker (2) Hev b1 ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F9) (3) Hev b1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F10) (4) Hev b1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F12) (5) Hev b1 ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (F14) (6) recombinant protein rHev b1 (E28) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA ชะด้วย 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (7) recombinant protein rHev b3 (E21-2) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA ชะด้วย 50 mM $NaH_2PO_4$, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 8.0, dialysis ใน 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

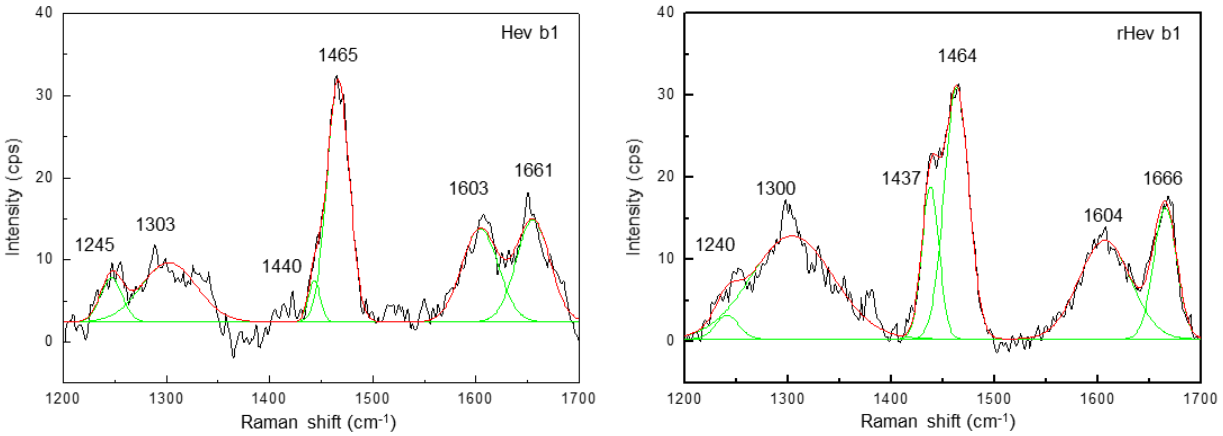
จากนั้นนำโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพารา และโปรตีน rHev b1 จากแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรม โดยที่โปรตีนทั้ง 2 ชนิดผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ แล้ววิเคราะห์ สเปกตรัมรามานดังแสดงในรูปที่ 28 พบว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิด มี vibrational mode จาก backbond structure ที่ตรงกันเมื่อพิจารณาเบื่องต้นจากตำแหน่งของสัญญานรามาน และเมื่อพิจารณาลงในรายละเอียดโดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างของ amide I และ amide III โดยใช้ Gaussian function ในการหาพีคองค์ประกอบ (composition peaks) ที่ได้จากการทำ peak deconvolution เพื่อใช้ในการพิจารณาองค์ประกอบของสัญญาณย่อยที่ซ่อนอยู่ในสเปกตรัมรามาน ดังแสดงในรูป

ที่ 29 พบว่า ทุกตำแหน่งของสัญญาณรามานที่ได้จากโปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีค่าต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาจากค่า spectral resolution ของเครื่อง Raman microscope ที่ใช้อยู่พบว่ามีค่าอยู่ที่ 5 $cm^{-1}$ นั้นแสดงว่าหากสเปกตรัมรามาน ที่มีตำแหน่งของสัญญาณรามาน แตกต่างกันน้อยกว่า 5 $cm^{-1}$ สามารถสรุปได้ว่าสารชนิดนั้นมีความเหมือนกันในทาง vibrational spectroscopy เบื้องต้นจึงสรุปว่า โปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพารา และโปรตีน rHev b1 จากแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรม มีความเหมือนกันและไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยเทคนิค Raman spectroscopy

ในกรณี Hev b3 จากน้ำยางพารา ซึ่งสกัดได้ในปริมาณที่ต่ำมากจึงไม่สามารถนำทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์และเทียบโดยตรงกับโปรตีน rHev b3 จากแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรม คณะผู้วิจัยได้นำเทคนิค ELISA ในการยืนยันซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ Hev b1 และ Hev b3 โดยจะนำมาใช้ในการเปรียบเทียบและยืนยันสมบัติของโปรตีนจากทั้งสองแหล่งอีกทางหนึ่งด้วย



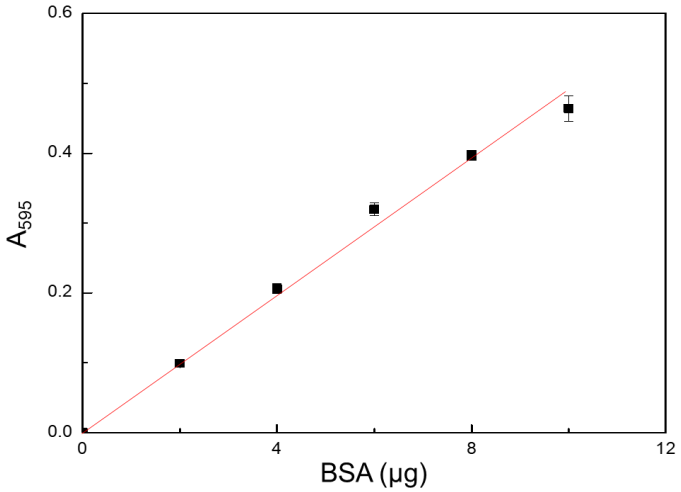

รูปที่ 30 สเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสด และ rHev b1 จากแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์




รูปที่ 31 สเปกตรัมรามาน ในช่วง amide I และ amide III ของโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสด และ rHev b1 จากแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ และพีคองค์ประกอบ (composition peaks) ที่ได้จากการทำ peak deconvolution

1.6 การหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Hev b1 และ Hev b3

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานในงานวิจัยนี้คือ bovine serum albumin (BSA) ทำปฏิกิริยากับ Bradford reagent จะได้สารละลายสีฟ้าอมเขียวที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm (A595) โดยความเข้มของการดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์ปริมาณโปรตีน BSA (µg) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานซึ่งได้ข้อมูลดังแสดงในรูปที่ 30




รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA เมื่อทำปฏิกิริยากับ Bradford reagent

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานของ standard BSA โดยแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ($A_{595}$) และปริมาณ BSA (µg) โดยความชันของกราฟที่ได้ คือ 0.0475 และปริมาตรที่ใช้ คือ 50 µL ถูกแทนที่ในสมการ โดยผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 5 สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่างสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นโปรตีน (µg/µL)} = \frac{A_{595}}{(\mu L\ assay)(m)}$$

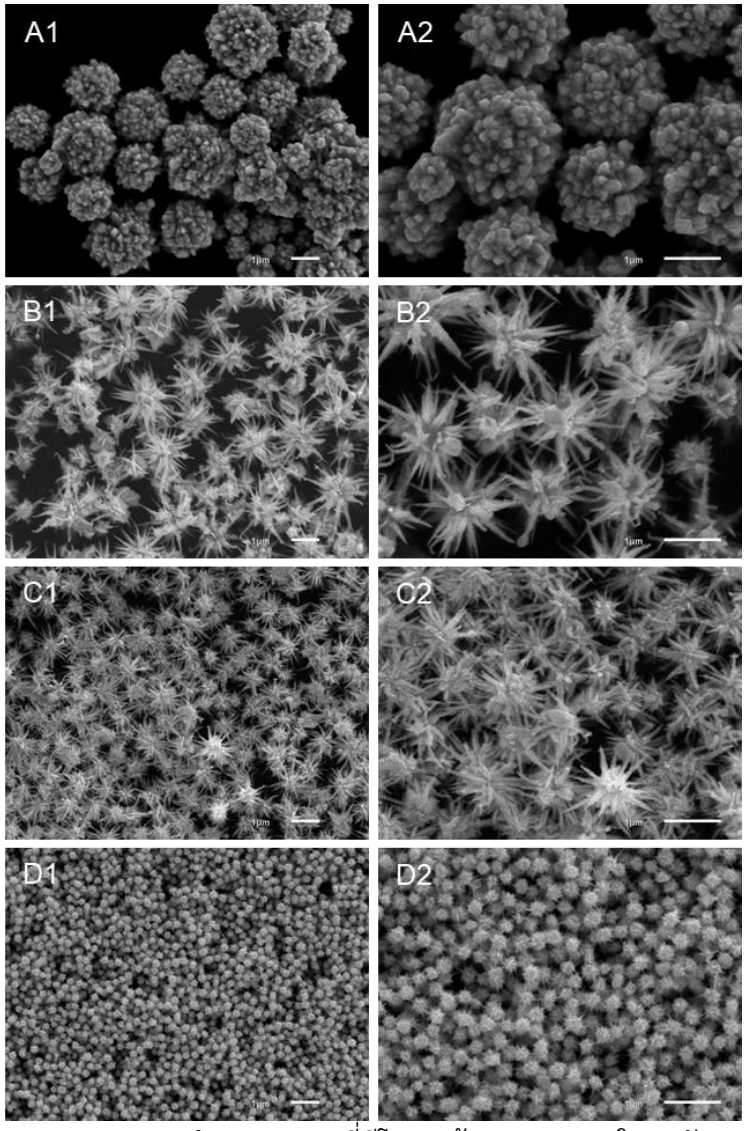
ตาราง 5 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนที่หาด้วยวิธี Bradford reagent

| Sample | ปริมาตรที่ใช้ (µL) | A595 | ความเข้มข้น (µg/µL) |
|---|---|---|---|
| Hev b1 (prep+acetone) | 50 | 0.153 | 0.064 |
| Hev b3 (prep+acetone) | 50 | 0.162 | 0.068 |
| Hev b1 (Sephadex G-75) | 50 | 0.260 | 0.109 |
| Hev b3 (Sephadex G-75) | ความเข้มข้นต่ำมากไม่สามารถแยกได้ด้วยคอลัมน์ | | |
| rHev b1 | 50 | 0.191 | 0.080 |
| rHev b3 | 50 | 0.097 | 0.040 |

2. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำและเงิน

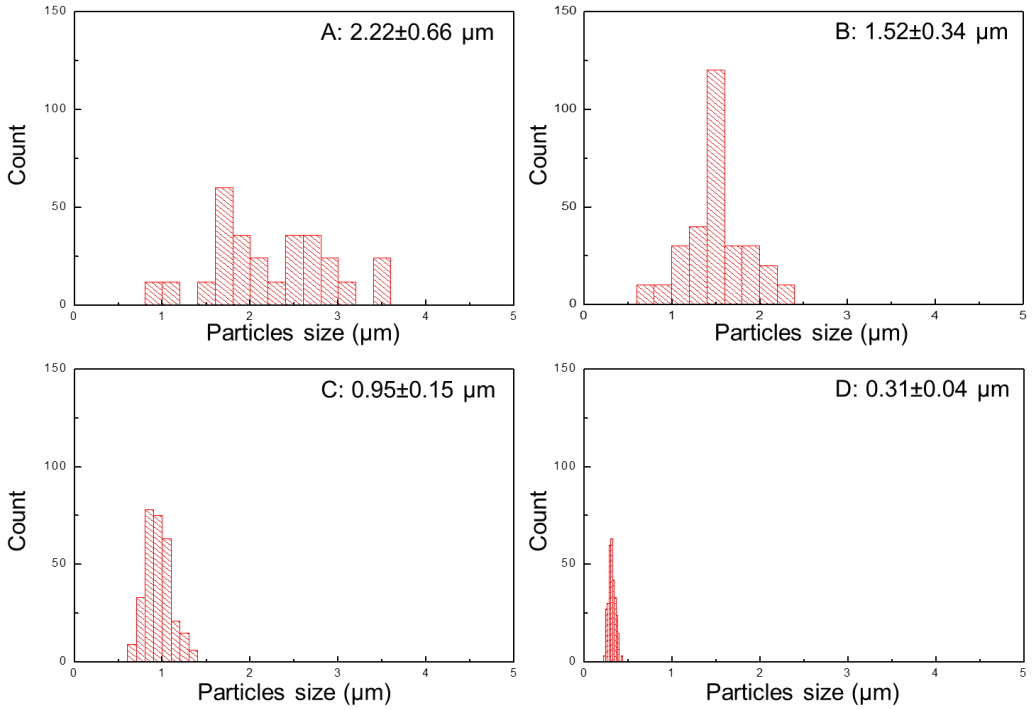
2.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำที่สามารถควบคุมความยาวโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร

ในงานวิจัยนี้ความเข้มข้นของ silver ions ในกระบวนการสังเคราะห์มีความสำคัญในการควบคุมความยาวของโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเพิ่มสัญญานรามาน ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญานรามาน โดยความเข้มข้นของ silver ions จะถูกเพิ่มจาก 0 – 15 μM โดยรูปร่างของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ ตรงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [18] โดยพิจารณาจาก SEM image ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 31




รูปที่ 33 SEM image ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 5, (C) 10 และ (D) 15 μM โดยถ่ายภาพที่กำลังขยาย (1) 10,000 เท่า และ (2) 20,000 เท่า

อนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.22±0.66 μm เมื่อใช้ความเข้มของ silver ions ที่ 0 μM และมีขนาดเฉลี่ยเล็กลงคือ 0.31±0.04 μm เมื่อใช้ความเข้มของ silver ions ที่ 15 μM ดังแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ในรูปที่ 32 ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ของ silver ions นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการกระจายตัวของอนุภาคลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ silver ions โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้อธิบายเกี่ยวกับอัตราการโตของอนุภาคที่ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ silver ions ทำให้ขนาดอนุภาคโดยรวมเล็กลงและมีความสม่ำเสมอเพิ่มสูงขึ้น [18] เบื้องต้นความยาวของโครงสร้างแบบหนามจะอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7 μm และส่วนปลายของหนามจะอยู่ขนาดประมาณ 20 nm

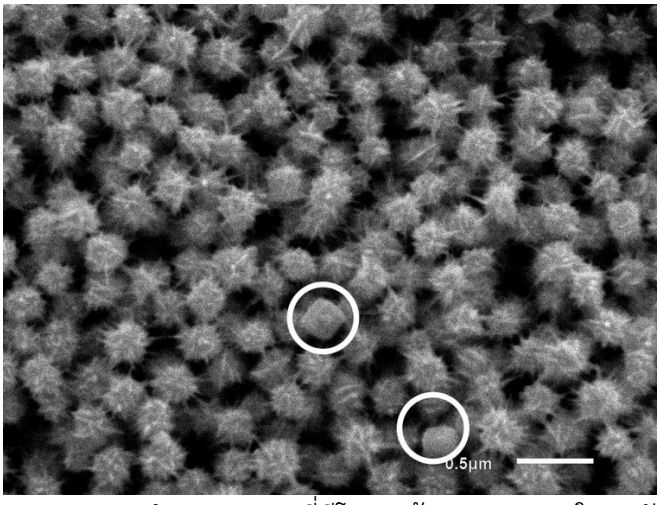



รูปที่ 34 Histrogram แสดงการกระจายตัวของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 5, (C) 10 และ (D) 15 μM โดยแสดงขนาดเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอนุภาคเอาไว้ จากการวัดที่ 300 อนุภาคต่อ 1 ตัวอย่าง

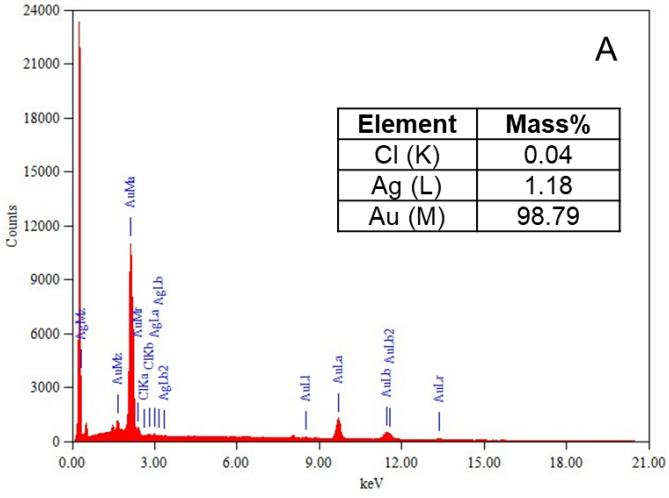
2.2 การกำจัดสารตกค้างบนอนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ได้

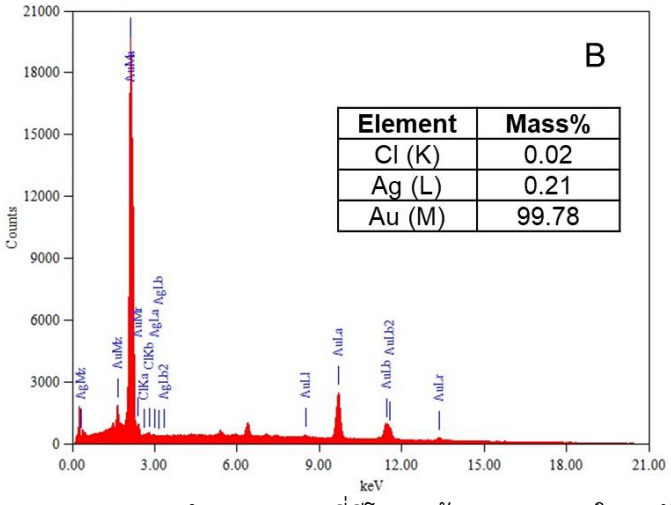
เนื่องจากอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้จะเจือปนด้วยสารเคมีที่หลงเหลือจากการสังเคราะห์คือ silver chloride มีลักษณะเป็นของแข็งไม่ละลายน้ำและปกคลุมอยู่บนผิวของอนุภาค ทำให้ลดประสิทธิภาพของอนุภาคในการนำไปใช้งานต่อในขั้นตอนถัดไป โดยอนุภาค silver chloride ที่ความเข้มข้นสูงสามารถรวมตัวเป็นผลึกมีรูปร่างแบบลูกบาศก์ สามารถสังเกตได้ชัดเจนภายใต้

scanning electron microscope เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้น 15 μM โดยแสดงไว้ในรูปที่ 33 ซึ่งวิธีการกำจัด silver chloride สามารถทำได้ง่ายโดยการใช้สารละลายแอมโมเนีย เนื่องจาก silver chloride จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป silver-amine complex ที่ละลายน้ำได้ดี [41] โดยเพิ่มประสิทธิภาพการละลายด้วยคลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 นาที และยืนยันองค์ประกอบของธาตุบนพื้นผิวด้วยเทคนิค energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) โดยคณะผู้วิจัยได้แสดง EDS spectrum ของอนุภาคทองคำก่อนและหลังล้างด้วยสารละลายแอมโมเนีย เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้น 15 μM พบว่าหลังกระบวนการทำความสะอาด ได้พื้นผิวทองคำที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99% ดังแสดงไว้ในรูปที่ 34




รูปที่ 35 SEM image ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ 15 μM เป็นตัวกระตุ้นและมี silver chloride (บริเวณวงกลมสีขาว) กระจายตัวปนอยู่กับโครงสร้าง โดยถ่ายภาพที่กำลังขยาย 30,000 เท่า

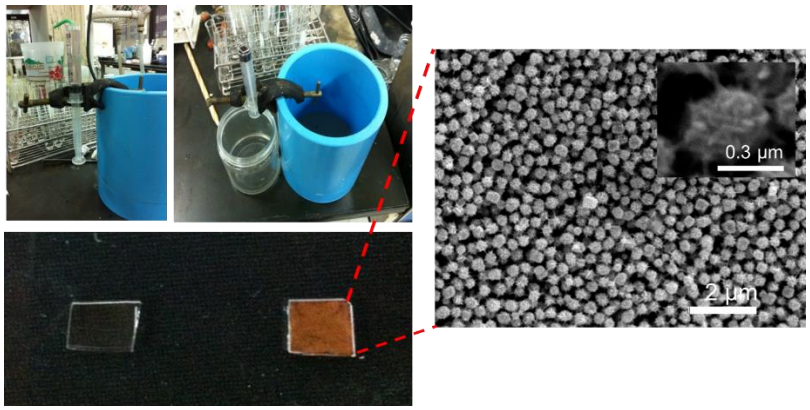





รูปที่ 36 EDS spectrum ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ 15 μM เป็นตัวกระตุ้น โดยมีตารางสรุปร้อยละปริมาณของธาตุบนพื้นผิวที่ตรวจวัดได้ เมื่อ (A) ก่อนล้าง และ (B) หลังล้างด้วยสารละลายภายใต้แอมโมเนียภายใต้คลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 นาที

2.3 การตรึงอนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ได้บนวัสดุรองรับ

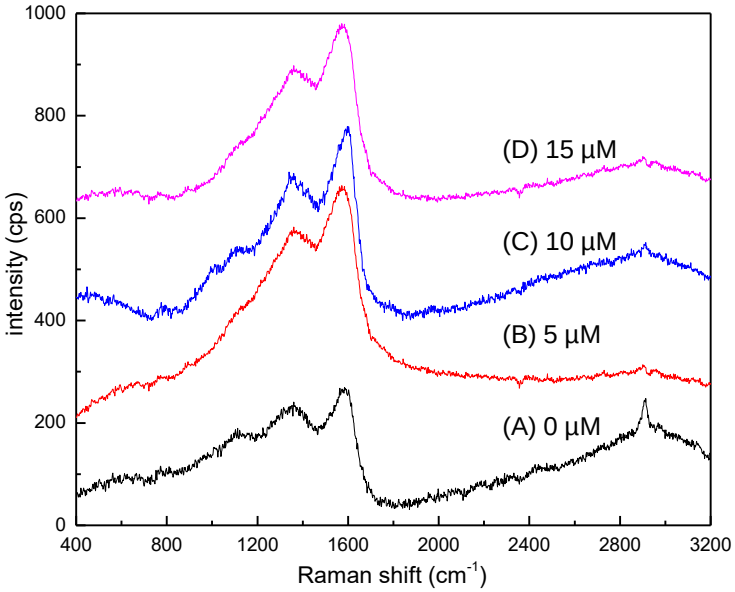
คณะผู้วิจัยอาศัยหลักการอย่างง่ายในการตรึงอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้โดยอาศัยการตกตะกอน เนื่องจากทองคำมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำถึง 19 เท่า จึงง่ายที่จะแยกอนุภาคทองคำออกคำออกมาด้วยวิธีข้างต้น นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ประยุกต์หลักการข้างต้นโดยให้อนุภาคตกบนวัสดุรองรับที่เตรียมเอาไว้ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการนำอนุภาคที่เตรียมไว้ไปใช้งานในขั้นตอนถัดไปโดยแสดงขั้นตอนและการตรึงอนุภาคทองคำบนวัสดุรองรับข้างต้นไว้ในรูปที่ 35




รูปที่ 37 อุปกรณ์อย่างง่ายที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรึงอนุภาคทองคำเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน จะเห็นได้ว่าอุณภาคที่ได้บนวัสดุรองรับจะมีความเป็นระเบียบสูง

2.4 การใช้วัสดุรองรับจากอนุภาคทองคำที่พัฒนาขึ้นในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

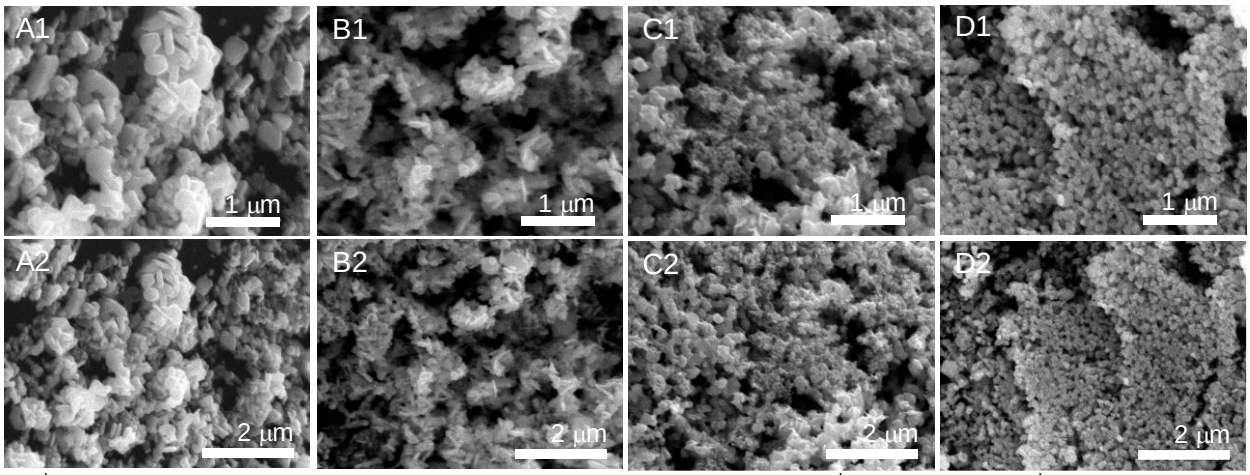
เบื้องต้นคณะผู้วิจัยได้ใช้วัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้นในการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานพบว่า ที่ความเข้มข้นของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 0.05 µg/µL ให้สัญญาณรามาณที่มีความเข้มสูง และมีแค่สองพีคหลักที่ตำแหน่ง 1350 และ 1580 $cm^{-1}$ ซึ่งแตกต่างจากรามานสเปกตรัมของ Hev b1 และ Hev b3 ในโปรตีนมาตรฐานบนพื้นแผ่นอลูมิเนียมที่ได้วิเคราะห์มาก่อนหน้านี้ เมื่อพิจารณาในรายละเอียดของพีคใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันได้ว่าโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นอนุภาคคาร์บอนและถูกยืนยันจากพีคทั้งสอง ซึ่งแสดงถึง D-band (1350 $cm^{-1}$) และ G-band (1580 $cm^{-1}$) [42] มีความเป็นไปได้ว่าพลังงานกระตุ้นของเลเซอร์ในเครื่องรามานไมโครสโครป มีค่าสูงเกินไปทำให้ตัวอย่างเกิดการเผาไหม้ ถึงแม้ก่อนหน้านี้ Hev b1 และ Hev b3 0.1 µg/µL สามารถให้รามานสเปกตรัมที่ชัดเจนที่พลังงานเลเซอร์ 10 mW แต่บนพื้นผิวได้ได้พัฒนาขึ้นพบว่าถึงแม้จะลดระดับพลังงานลงไปถึง 0.1 mW ดังแสดงในรูปที่ 36 ซึ่งเป็นระดับพลังงานต่ำสุดของเลเซอร์ในเครื่องรามานไมโครสโครป ก็ยังพบเฉพาะพีค D-band และ G-band ตลอดการทดลอง นั้นแสดงให้เห็นว่าวัสดุในข้างต้นสามารถที่จะเพิ่มสัญญาณรามานของสารที่อยู่บนพื้นผิวได้ คณะผู้วิจัยคาดว่าด้วยสมบัติของทองคำที่ยากต่อการเกิดพันธะกับสารอื่นหรือการเปียกบนพื้นผิว [43] อาจจะทำให้โปรตีนยังรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนและไม่กระจายตัว ส่งผลให้มีการสะสมพลังงานได้ง่ายและเกิดการเผาไหม้ได้อนุภาคคาร์บอนในที่สุด




รูปที่ 38 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บน ของอนุภาคทองคำแบบหนามที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ silver ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 5, (C) 10 และ (D) 15 µM เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm

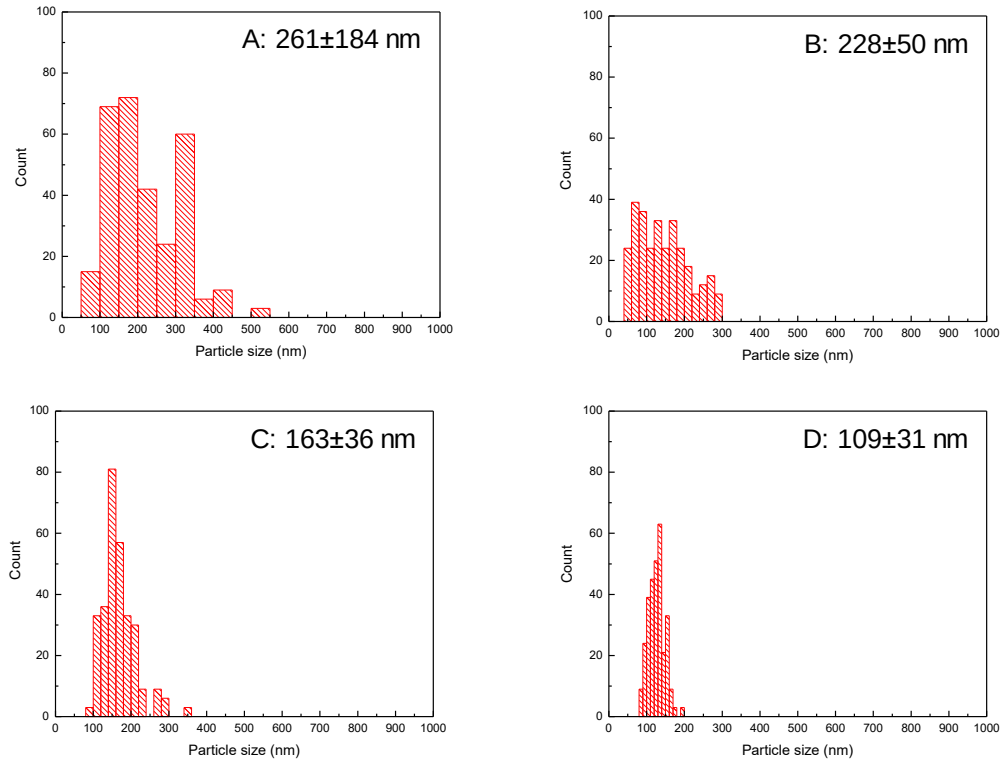
2.5 การสังเคราะห์อนุภาคของทองคำและเงิน

จากปัญหาการกระจายตัวของโปรตีนบนพื้นผิว เนื่องจากโปรตีนเป็นสารมหโลเลกุลและง่ายต่อการรวมตัวระหว่างโปรตีนด้วยกันเองจากผลของพันธะไฮโดรเจนในตัวโมเลกุล เพื่อให้ลุล่วงวัตถุประสงค์ที่ได้วางไว้ ผู้วิจัยพบว่า โลหะเงินมีประสิทธิภาพในการเกิดพันธะกับหมู่ฟังชั่นต่าง ๆ ที่พบได้บ่อยในโปรตีน เช่น ไทโอ ซัลเฟต ฟอสเฟต เอมีน และไฮดรอกซี่ [44] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้อนุภาคของทองคำและเงิน โดยสามารถควบคุมโครงสร้างให้มีความขรุขระและมีช่องว่างระหว่างอนุภาคสูง ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับการทำให้โครงสร้างมีปลายแหลม โดยโครงสร้างที่มีช่องว่างระหว่างอนุภาคหรือปลายแหลมสูงจะมีโอกาสในการขยายสัญญานรามานได้มากกว่าปกติ **[15]** ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในเทคนิคผื้นผิวขยายสัญญาณรามานมีความไวเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของ gold ions จะถูกเพิ่มจาก 0 – 0.5 mM รูปร่างของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้พบว่ามีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gold ions โดยพิจารณาจาก SEM image ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 37



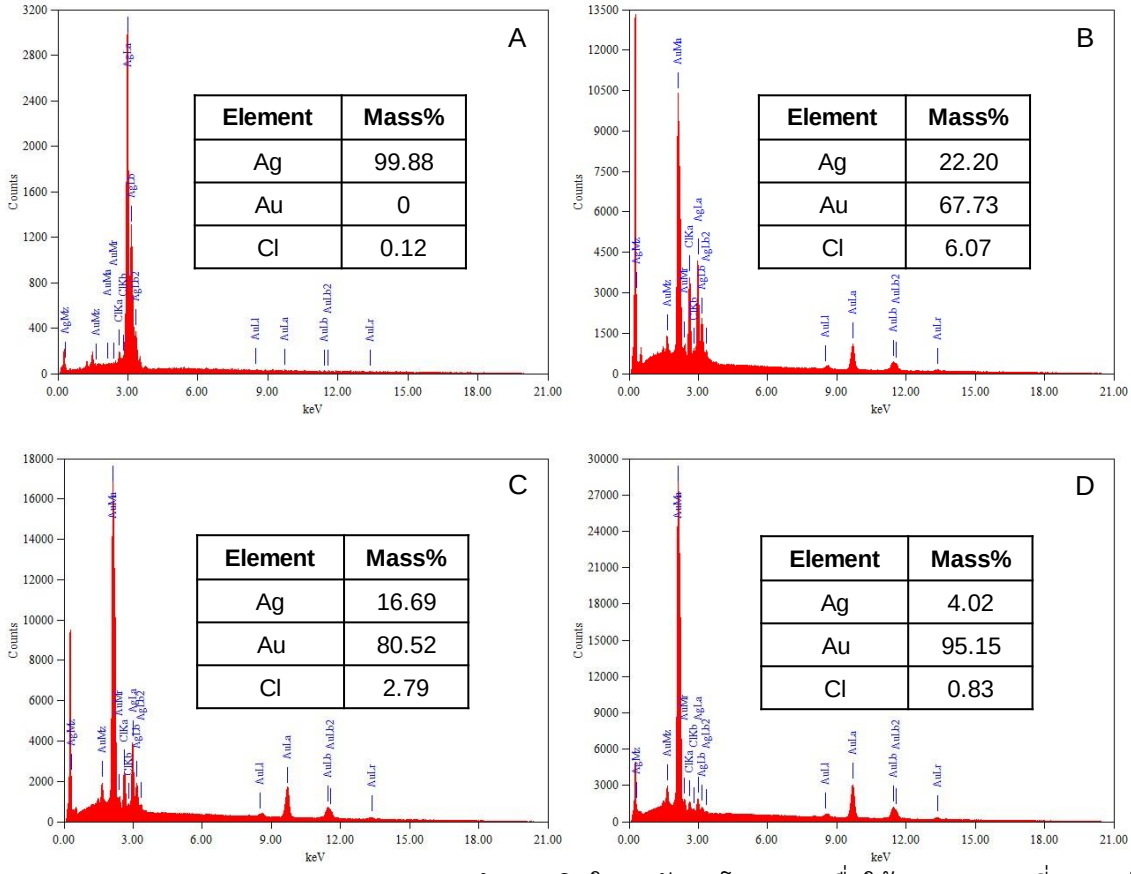

รูปที่ 39 SEM image ของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM โดยถ่ายภาพที่กำลังขยาย (1) 20,000 เท่า และ (2) 10,000 เท่า

อนุภาคของเงิน มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 261±184 nm เมื่อใช้ความเข้มของ gold ions ที่ 0.1 mM และมีขนาดเฉลี่ยเล็กลงคือ 109±31 nm เมื่อใช้ความเข้มของ gold ions ที่ 0.5 mM ดังแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ในรูปที่ 38 ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ของ gold ions นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการกระจายตัวของอนุภาคลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gold ions โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้อธิบายเกี่ยวกับอัตราการโตของอนุภาคที่ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gold ions ทำให้ขนาดอนุภาคโดยรวมเล็กลงและมีความสม่ำเสมอเพิ่มสูงขึ้น [45]




รูปที่ 40 Histrogram แสดงการกระจายตัวของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM โดยแสดงขนาดเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอนุภาคเอาไว้ จากการวัดที่ 300 อนุภาคต่อ 1 ตัวอย่าง

หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ยืนยันองค์ประกอบของธาตุบนพื้นผิวด้วยเทคนิค energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) โดยคณะผู้วิจัยได้แสดง EDS spectrum ของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร ซึ่งพบค่าสัญญาณของธาตุทองคำและเงินดังแสดงไว้ในรูปที่ 39 พบว่าทุกตัวอย่างจะมี silver chloride (AgCl) ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาและสามารถกำจัดได้ง่ายดังแสดงในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีโครงสร้างแบบหนามในผลการทดลองก่อนหน้านี้แล้วโดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูป silver-amine complex ที่ละลายน้ำได้ดีด้วยสารละลายแอมโมเนีย [41] จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้ดีบนพื้นผิวของอนุภาคเงิน สามารถสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ทองคำที่สูงกว่าอัตราส่วนของ gold ions ที่ใช้ในการทำปฏิริยา



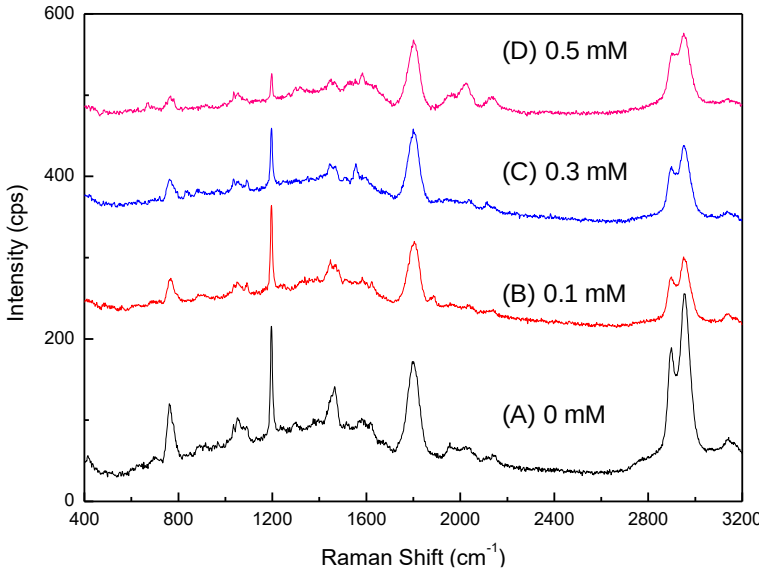

รูปที่ 41 EDS spectrum ของอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM โดยมีตารางสรุปร้อยละปริมาณของธาตุบนพื้นผิวที่ตรวจวัดได้

3. การใช้วัสดุรองรับจากอนุภาคของทองคำและเงินที่พัฒนาขึ้นในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

3.1 ประสิทธิภาพของอนุภาคของทองคำและเงินที่พัฒนาขึ้น

วัสดุที่ได้พัฒนาข้างต้นสามารถทำการสังเคราะห์ได้ทันทีบนกระจกและเกิดเป็นชั้นฟิล์มบางที่ยึดติดบนผิวกระจกได้ดี หลังจากกระบวนการล้างทำความสะอาดด้วยแอมโมเนียและน้ำปราศจากไอออนแล้วทำให้แห้งสนิท ชั้นของอนุภาคทองคำและเงินจะแสดงลักษณะคล้าวผิวกระจกเงา เบื้องต้นคณะผู้วิจัยได้ทดสอบความสามารถในการขยายสัญญาณรามานกับโปรตีน Hev b1 ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/µL พบว่าสัญญานรามานที่เกิดขึ้นแปรผกผันกับความเข้มข้นของ gold ions ที่ถูกเติมลงไปในระบบซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 40 ในกรณีที่ไม่มีการเติม gold ions หรือมีเฉพาะอนุภาคเงินเพียงอย่างเดียวกลับได้สัญญานรามานสูงสุด โดยใช้พลังงานของเลเซอร์ที่ใช้ในการกระตุ้นแค่ 0.1 mW เท่านั้น จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า โปรตีน Hev b1 สามารถเกิดพันธะกับพื้นผิว

ของโลหะเงินและมีการกระจายได้ดี ทำไม่มีการสะสมพลังงานบนวัสดุตรวจวัดและไม่ขัดขวางการให้สัญญานรามานของตัวอย่าง

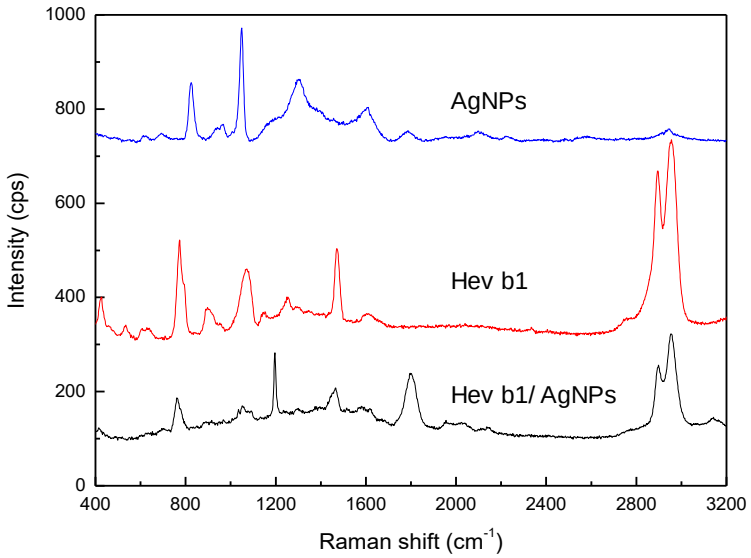



รูปที่ 42 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บนอนุภาคของทองคำและเงินในระดับนาโนเมตร เมื่อใช้ gold ions ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวกระตุ้น ได้แก่ (A) 0, (B) 0.1, (C) 0.3 และ (D) 0.5 mM เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm

เมื่อพิจารณาสเปกตรัมรามานของ โปรตีน rHev b1 บริสุทธิ์ โปรตีน rHev b1 บนพื้นผิวอนุภาคเงิน และ พื้นผิวอนุภาคเงินอย่างเดียว พบว่าตั้งแต่ช่วง 800 – 2400 $cm^{-1}$ สเปกตรัมรามานของตัวอย่างมีการซ้อนทับกัน ดังแสดงในรูปที่ 41 ส่วนหนึ่งเนื่องมากจากพื้นผิวอนุภาคเงินสามารถเกิดพันธะได้ดีกับสารเคมีที่เป็นผลิตภัณฑ์และหลงเหลือจากการสังเคราะห์ ถึงแม้ว่าจะทำการล้างทำความสะอาดหลายครั้งก็ตาม ทำให้สามารถสังเกตสเปกตรัมรามานของสารที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิวของอนุภาคเงิน ดังนั้นจึงมีแค่สเปกตรัมรามานของ ที่ 760 $cm^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคของ Proteins (Tyrosine) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 ของ Band assignment ที่พบได้ทั้ง Hev b1 และ Hev b3 [40, 46] โดยพีคข้างต้นไม่มีการรบกวนและถูกนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป จากเหตุผลในข้างต้นในช่วง 1200 – 1700 $cm^{-1}$ ซึ่งให้สเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์ของ Hev b1 และ Hev b3 ถูกบดบังด้วย สเปกตรัมจากตัววัสดุที่ได้พัฒนาขึ้น ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้วัสดุที่พัฒนาขึ้นในการแยกชนิดของโปรตีนที่ผสมกันอยู่ได้

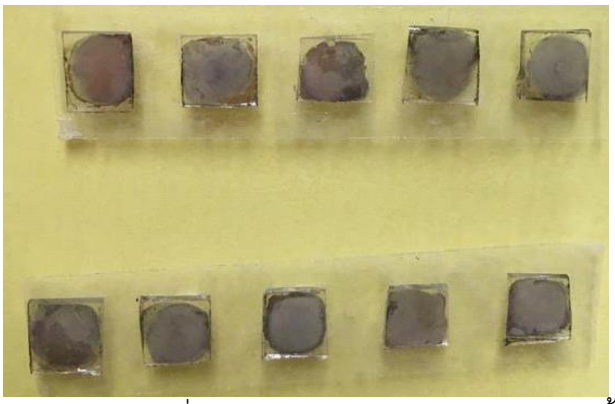
ตารางที่ 6 Band assignment ที่พบในสเปกตรัมรามานของโปรตีนโดยอิงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [40, 46]

| Wavenumber ($cm^{-1}$) | Assignment |
|---|---|
| 640-650 | Proteins (Tyrosine) |
| 750-770 | Proteins (Tryptophan) |
| 1070 | Nucleic acid ($PO_2^-$ str) |
| 1470 | Lipids and proteins (CH def) |
| 1650-1670 | Amide I |
| 1240-1280 | Amide III |
| 2800-3000 | Proteins, Lipid, fatty acid |

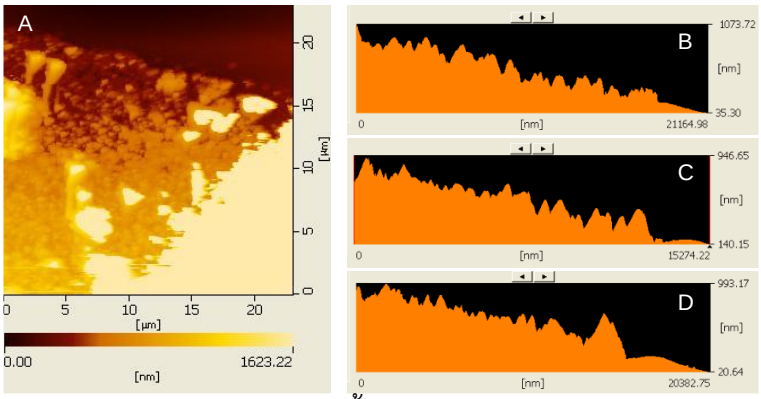



รูปที่ 43 สเปกตรัมรามานของ อนุภาคเงินในระดับนาโนเมตร (AgNPs) โปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บน Aluminium foil (Hev b1) และ rHev b1 ความเข้มข้น 0.05 µg/µL บน อนุภาคเงินในระดับนาโนเมตร (Hev b1/ AgNPs) (ใช้กำลังเลเซอร์ที่ไม่เท่ากัน ที่ความยาวคลื่น 532 nm)

อนุภาคเงินระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถตรึงกระจกได้ดี ถึงแม้ว่าจะทำการล้างทำความสะอาดก็ตาม โดยแผ่นทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นมีลักษณะคล้ายกับแผ่นกระจกเงา ดังแสดงไว้ในรูปที่ 42 ขณะที่อนุภาคเงินระดับนาโนเมตรที่ถูกตึงบนกระจกมีความหนาอยู่ประมาณ 800 – 1,000 นาโนเมตร ซึ่งวิเคราะห์ผลจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 43



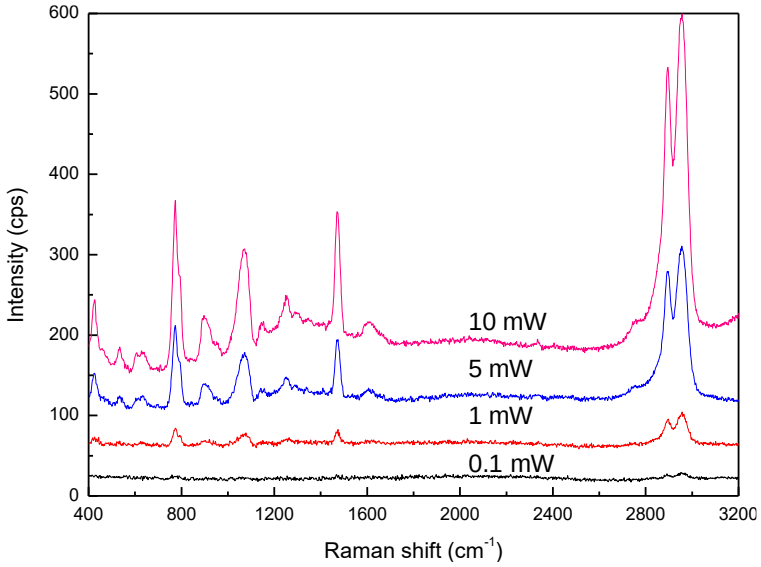
รูปที่ 44 อนุภาคเงินระดับนาโนเมตรสามารถที่ถูกตรึงกระจกขนาด 0.5 × 0.5 ซม.มีพื้นผิวคล้ายฟิลม์ของโลหะเงิน



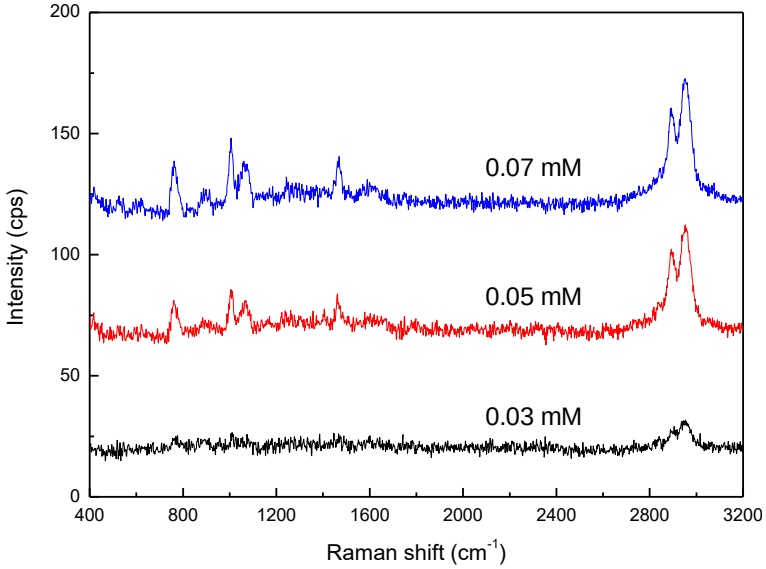

รูปที่ 45 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมแสดงถึงพื้นผิวของอนุภาคเงินระดับนาโนเมตรที่ถูกตึงบนกระจก (A) จากนั้นพิจารณาความหนาโดยใช้ Line scan จากบริเวณที่มีอนุภาคไปยังบริเวณมราไม่มีอนุภาคทั้งหมดสามตำแหน่ง (B-D)

3.2 การยืนยันประสิทธิภาพของวัสดุรองรับชนิดใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น

คณะผู้วิจัยได้นำโปรตีน Hev b1 ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/µL มาวิเคราะห์สัญญาณรามาณโดยใช้กำลังเลเซอร์ต่างกันพบว่า สัญญานรามานของโปรตีน Hev b1 มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อลดพลังงานกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 44 นอกจากนี้เมื่อลดความเข้มข้นจาก 0.07, 0.05 และ 0.03 µg/µL ค่าสัญญานรามานก็ลดลงเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 45



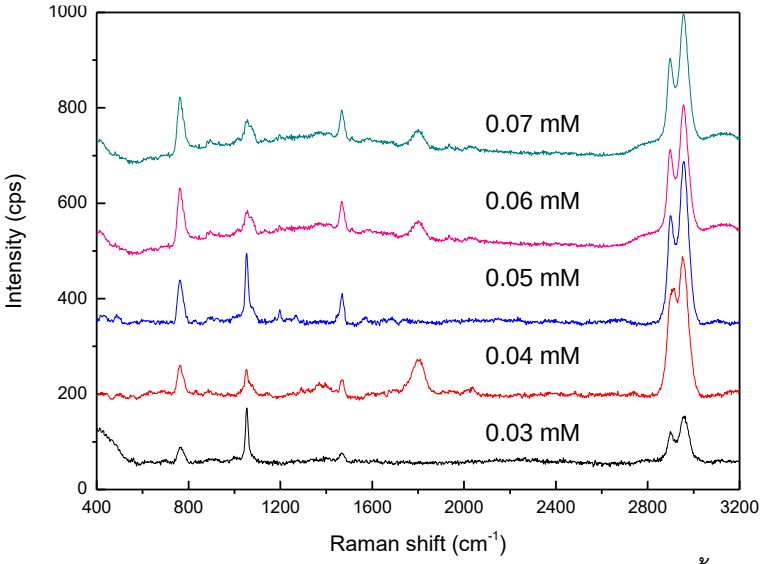

รูปที่ 46 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.1 µg/µL บนแผ่น Aluminium foil เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 - 10 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm



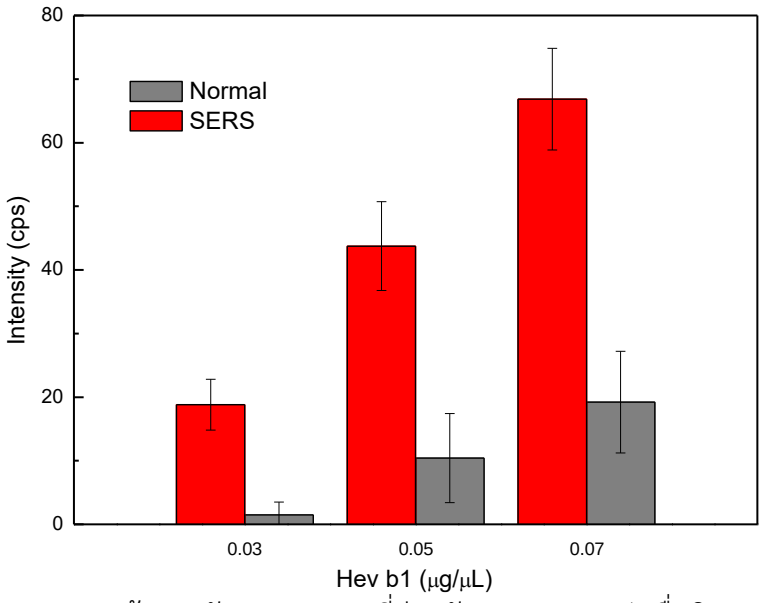

รูปที่ 47 สเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.07, 0.05 และ 0.03 µg/µL บนแผ่น Aluminium foil เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 10 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm

ขณะเดียวกันบนวัสดุที่ได้พัฒนาขึ้นพบว่าที่พลังงานกระตุ้นจากเลเซอร์ 0.1 mW สามารถให้สัญญาณรามานได้ดีกว่า เมื่อลดความเข้มข้นของโปรตีน Hev 1b จาก 0.07 ถึง 0.03 µg/µL ซึ่งเป็นผลมาจากปรากฏการ localized

surface plasmon resonance บนอนุภาคโลหะเงินที่สามารถเพิ่มสัญญาณรามานที่ได้จากตัวอย่างแม้จะใช้พลังงานกระตุ้นต่ำก็ตาม นอกจากนี้การใช้พลังงานกระตุ้นจากเลเซอร์ต่ำสามารถหลีกเลี่ยงการทำลายตัวอย่างบนวัสดุรองรับได้อีกด้วย ดังรูปที่ 46 โดยเปรียบเทียบค่าความเข้มสัญญาณดังกราฟแท่งที่แสดงในรูปที่ 47 ซึ่งให้ค่าสัญญาณรามานสูงขึ้นมากว่า 70 – 90% เมื่อพิจารณาที่ค่าพลังงาน 760 $cm^{-1}$ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าหากใช้พลังงานสูงกว่า 0.1 mW ในการกระตุ้นก็จะเกิด B band และ G band เช่นเดียวกับในกรณีของการตรวจวัดตัวอย่างบนอนุภาคทองคำซึ่งได้แสดงผลไปแล้วก่อนหน้านี้



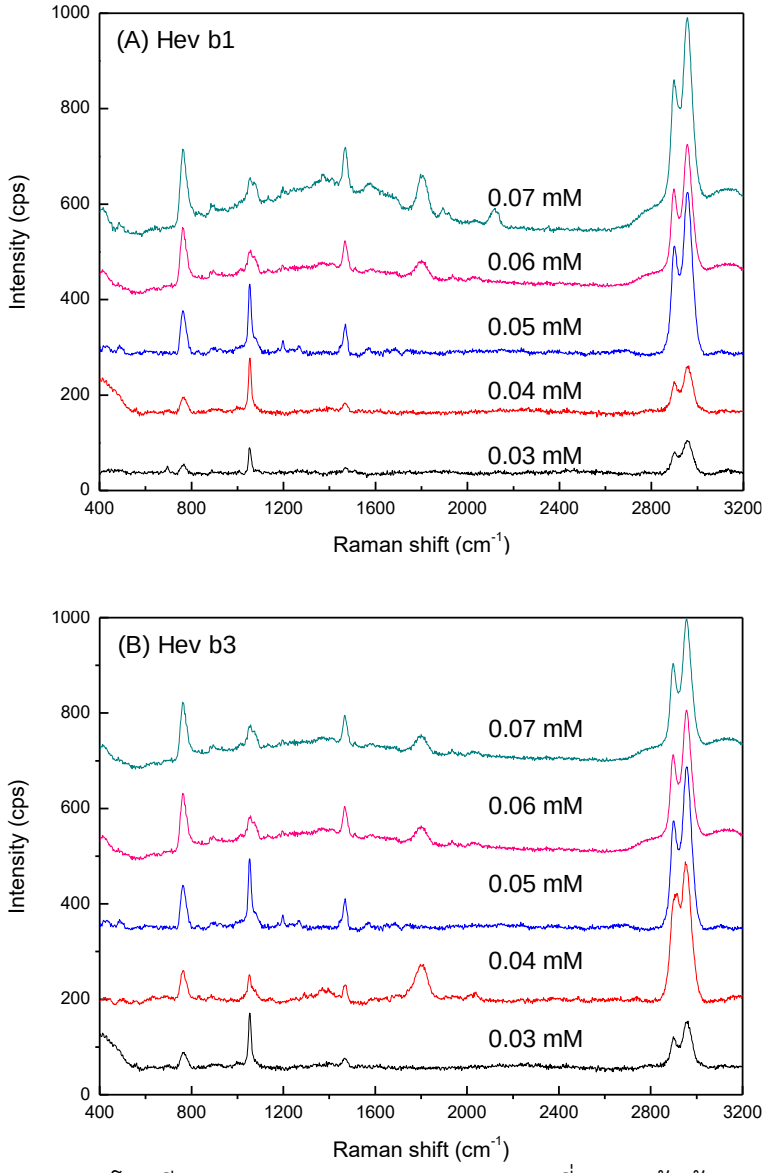

รูปที่ 48 สเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 ความเข้มข้น 0.03 - 0.07 µg/µL บนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm



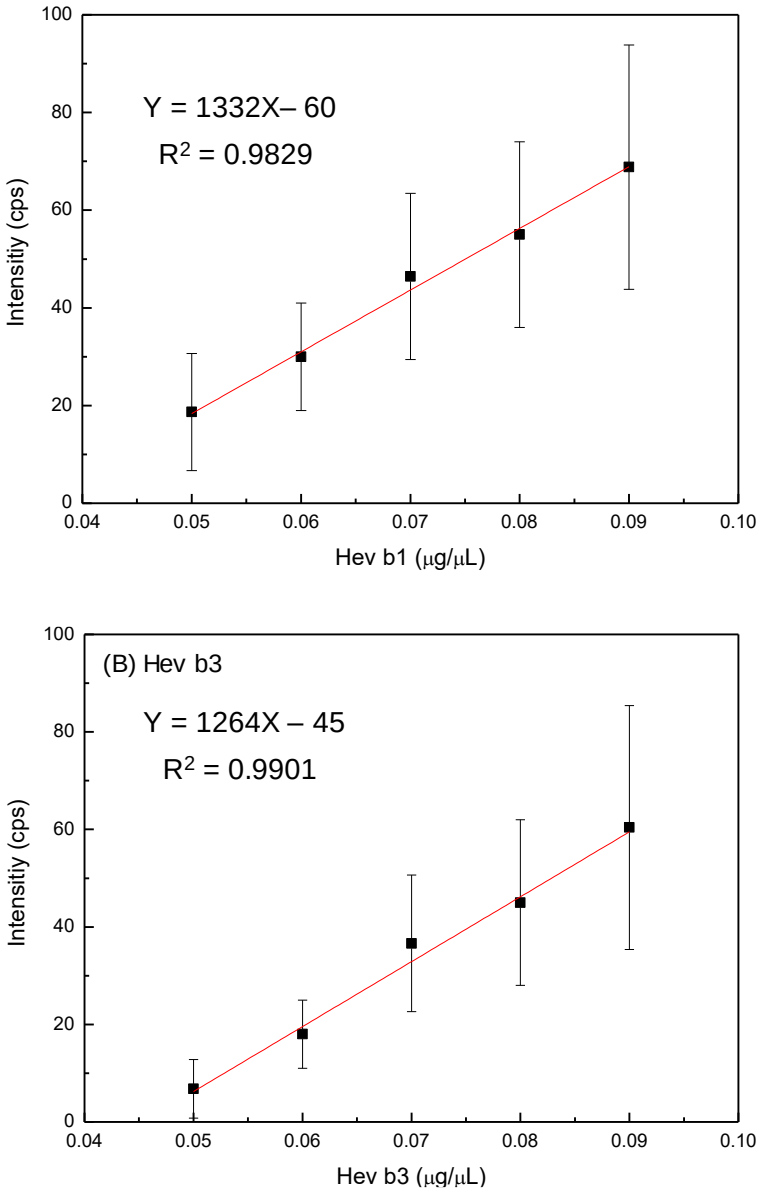

รูปที่ 49 แผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสัญญาณรามานที่ค่าพลังงาน 760 $cm^{-1}$ เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมรามานของโปรตีน rHev b1 ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 μg/μL เปรียบเทียบทั้งบนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร (สีแดง) และ Aluminium foil (สีเทา) ที่ใช้เป็นวัสดุรองรับ เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 บนวัสดุรองรับชนิดใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น

เมื่อพบว่าโครงสร้างของอนุภาคเงินระดับนาโนเมตรสามารถนำมาใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานได้แล้วคณะผู้วิจัยจึงได้สร้างกราฟมาตรฐานจากโปรตีนมาตรฐานทั้งสองชนิดคือ Hev b1 และ Hev b3 ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน เบื้องต้นพบว่า ที่ความเข้มข้นที่เริ่มให้สัญญาณจะอยู่ที่ 0.03 μg/μL จนกระทั่งที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.07 μg/μL เริ่มที่จะเกิดลักษณะของ D-band และ G-band ดังรูปที่ 36 อีกครั้ง แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนบนพื้นผิวที่มากเกินไปส่งผลให้เกิดการสะสมของพลังงานและทำให้ตัวอย่างเกิดการไหม้เสียหายได้ ซึ่งสเปกตรัมรามานของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 บนอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร ร่วมถึงกราฟมาตรฐาน ซึ่งพิจารณาจากค่าสัญญาณสูงสุดที่ได้จากตัวอย่าง 3 จุด และคำนวณค่าเบี่ยงแบนมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 48 และ 49 ตามลำดับ




รูปที่ 50 สเปกตรัมรามานของโปรตีน (A) Hev b1 และ (B) Hev b1 ที่ความเข้มข้น 0.03 - 0.07 µg/µL บนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm

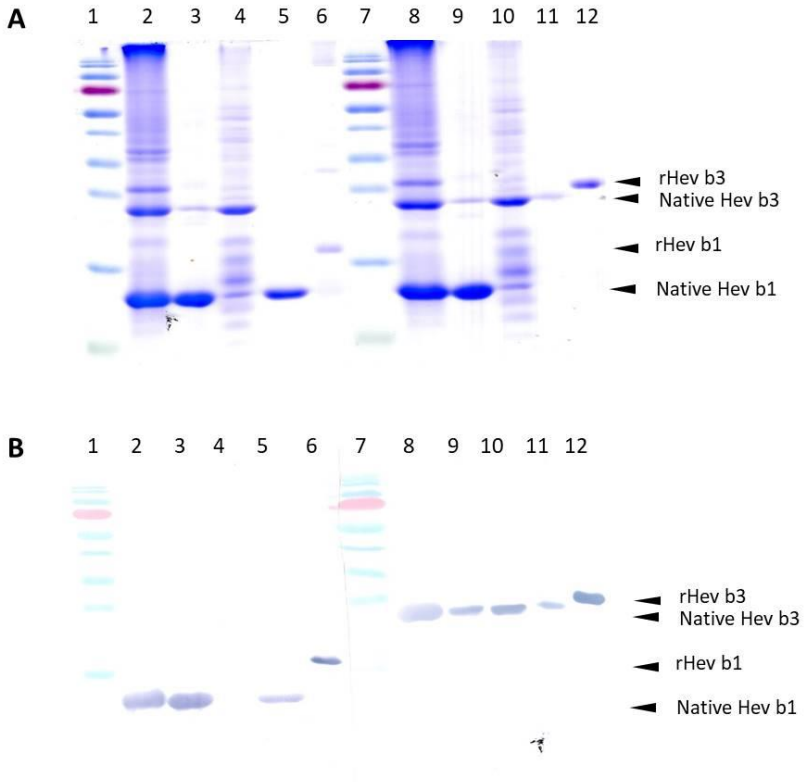



รูปที่ 51 กราฟมาตรฐานที่พิจาราความเข้มของสัญญาณรามานที่ค่าพลังงาน 760 $cm^{-1}$ เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมรามานของโปรตีน (A) Hev b1 และ (B) Hev b2  b1 ที่ความเข้มข้น 0.03 - 0.07 µg/µL บนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยางคลื่น 532 nm

4. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ELISA

4.1 การตรวจสอบการจับกันของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 และแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ โดยวิธี Western blot

จากการวิเคราะห์โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากน้ำยางพาราสดและโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 บริสุทธิ์ด้วย 15% SDS-PAGE ดังแสดงรูปที่ 50A และตรวจสอบการจับกันของโปรตีนกับแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ โดยวิธี Western blot ดังแสดงรูปที่ 50B พบว่าแอนติบอดีที่สังเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนลูกผสม rHev b1 สามารถจับจำเพาะกับโปรตีน Hev b1 จากน้ำยางพาราสดและโปรตีนลูกผสม rHev b1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในรูปที่ 50 แถวที่ 2-6 (A-B) นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน rHev b1 มีความสามารถจับจำเพาะได้เฉพาะโปรตีน Hev b1 ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก จะปรากฏแถบบาง ๆ เมื่อทำ Western blot ไม่เกิดการจับกับโปรตีน Hev b3 แม้ว่าแถบโปรตีน Hev b3 จะปรากฏเข้มในเจล SDS-PAGE ก็ตาม ดังแสดงในรูปที่ 50 A-B แถวที่ 4 เช่นเดียวกับแอนติบอดีของโปรตีน rHev b3 ซึ่งสามารถจับจำเพาะได้ทั้งโปรตีน Hev b3 จากน้ำยางพาราสดและโปรตีนลูกผสม rHev b3 ซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 50 แถวที่ 8-12 (A-B) และแอนติบอดีต่อโปรตีน rHev b3 มีความสามารถจับจำเพาะได้เฉพาะโปรตีน Hev b3 จากน้ำยางพาราสด ดังแสดงในรูปที่ 50 A-B แถวที่ 4 ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่าการจับของโปรตีนกับแอนติบอดีมีความจำเพาะสูง เมื่อใช้แอนติบอดีที่เจือจาง 1:5,000 ไม่ปรากฏแถบโปรตีนปนเปื้อนตัวอื่นหรือไม่เกิด non-specific binding กับโปรตีนอื่นในการทำ western blot แม้ว่าในรูปที่ 50 แถวที่ 2, 4, 8, และ 10 จะมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมากก็ตาม



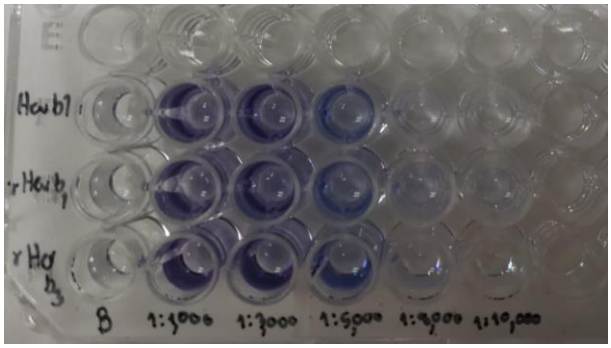
รูปที่ 52 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดน้ำยางพาราสดและโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 ที่ผลิตจากแบคทีเรียเมื่อวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE (A) และ western blot (B) (1 และ 7) โปรตีนมาตรฐาน (2 และ 8) น้ำยางพาราสด (3 และ 9) ส่วนใสที่สกัดด้วย 1% SDS และ 0.1% Triton X-100 (4 และ 10) ส่วนใสที่ล้างด้วย wash buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT, 5 mM $MgSO_4$ ) (5) โปรตีน Hev b1 บริสุทธิ์จากน้ำยางพาราสด (6) โปรตีนลูกผสม rHev b1 บริสุทธิ์ (11) โปรตีน Hev b3 บริสุทธิ์จากน้ำยางพาราสด (12) โปรตีนลูกผสม rHev b3 บริสุทธิ์

4.2 การตรวจสอบการจับกันของโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 และแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

จาการทำ Western blot ยืนยันได้ว่าโปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 สามารถจับกับแอนติบอดีต่อโปรตีนนั้น ๆ ได้ดี ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นการบ่งชี้เชิงคุณภาพที่สามารถรายงานได้ว่าโปรตีนและแอนติบอดีเกิดการจับกันได้หรือไม่ แต่ไม่สามารถระบุการจับกันเชิงปริมาณได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาการจับกันของโปรตีนและแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ซึ่งเป็นการบ่งชี้ทางปริมาณอีกทั้งวิธีการดังกล่าวนี้สามารถตรวจวัดโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่าวิธีการ western blot โดยเริ่มต้นจากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการทำ ELISA ตั้งแต่ 1:1,000 – 1:10,000 จับกับโปรตีนที่สนใจได้แก่ โปรตีน Hev b1 หรือ Hev b3 ปริมาณ 2 ไมโครกรัม ซึ่งยึดเกาะอยู่บนผิวเพลท ตรวจสอบการจับกันของโปรตีนและแอนติบอดี โดยการเติมแอนติบอดีที่สามารถจับแอนติบอดีที่สนใจได้มีซึ่งเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ติดอยู่ด้วย เมื่อเติม TMB substrate ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์เพอรอกซิเดสจะเปลี่ยน TMB substrate ซึ่งเป็นสารละลายไม่มีสี ให้เกิดเป็นสารละลายสีม่วง-คราม ดังแสดงในรูปที่ 51 สามารถวัดค่าปฏิกิริยาการเกิดสีได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 7

ตาราง 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ของโปรตีน-แอนติบอดีแบบต่าง ๆ ในกระบวนการ ELISA

| โปรตีน-แอนติบอดี | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm (A650) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1:1,000 | 1:3,000 | 1:5,000 | 1:8,000 | 1:10,000 |
| Hev b1-anti rHev b1 | 0.099 | 0.089 | 0.072 | 0.068 | 0.046 |
| rHev b1-anti rHev b1 | 0.101 | 0.096 | 0.073 | 0.069 | 0.057 |
| rHev b3-anti rHev b3 | 0.082 | 0.074 | 0.068 | 0.043 | 0.037 |

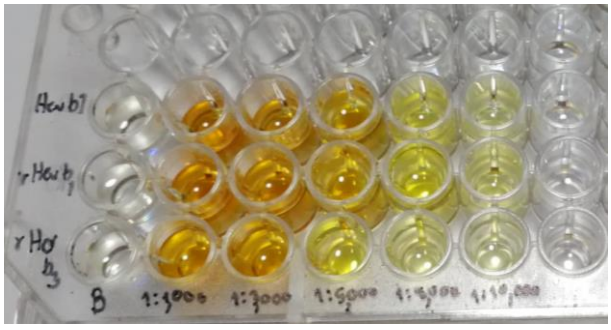


รูปที่ 53 ปฏิกิริยาการเกิดสีของ TMB substrate โดยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จากการทำ ELISA เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อโปรตีน rHev b1 หรือ rHev b3

หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย $H_2SO_4$ สารละลายจะเปลี่ยนสีจากม่วง-ครามเป็นสีเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 52 ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 8

ตาราง 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ของโปรตีน-แอนติบอดีแบบต่าง ๆ ในกระบวนการ ELISA

| โปรตีน-แอนติบอดี | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (A450) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1:1,000 | 1:3,000 | 1:5,000 | 1:8,000 | 1:10,000 |
| Hev b1-anti rHev b1 | 1.091 | 0.866 | 0.862 | 0.483 | 0.159 |
| rHev b1-anti rHev b1 | 1.133 | 1.091 | 0.841 | 0.511 | 0.179 |
| rHev b3-anti rHev b3 | 0.783 | 0.658 | 0.421 | 0.119 | 0.071 |



รูปที่ 54 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ TMB substrate โดยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จากการทำ ELISA หลังการเติม 2 M $H_2SO_4$

จากปฏิกิริยาการเข้าคู่ที่มีความจำเพาะของโปรตีน Hev b1 หรือ rHev b1 กับแอนติบอดี anti-rHev b1 พบว่า เมื่อใช้แอนติบอดีความเข้มข้นสูง 1:1,000 – 1:5,000 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร มีค่าค่อนข้างสูงซึ่งอาจเกิดจากปริมาณแอนติบอดีที่มากเกินพอ แต่เมื่อพิจารณาการเจือจางแอนติบอดีที่อัตราส่วน 1:8,000 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ประมาณ 0.4-0.5 สำหรับโปรตีน rHev b3 ไม่ทดสอบปฏิกิริยาการจับของโปรตีน Hev b3 จากน้ำยางพาราสดกับแอนติบอดี anti-rHev b3 เนื่องจากโปรตีน Hev b3 ในน้ำยางพาราสดทำบริสุทธิ์ได้ยากและจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา Hev b1-anti rHev b1 และ rHev b1-anti rHev b1 ได้ค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกศึกษาเฉพาะปฏิกิริยา rHev b3-anti rHev b3 พบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรที่เหมาะสมเมื่อใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:5,000 เท่า ดังนั้นสำหรับการทดลองการทำ ELISA ต่อไปจะใช้ความเข้มข้นแอนติบอดี anti rHev b1 อัตราส่วน 1:8,000 และ anti rHev b3 อัตราส่วน 1:5,000

4.3 การยืนยันโครงสร้างของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3 โดย ใช้แอนติบอดีสลับกัน

เนื่องจากเทคนิค Raman Spectroscopy ได้ผลของ Raman Spectrum ที่คล้ายคลึงกัน ถือว่าไม่มีความแตกต่างกันในเทคนิค Vibrational spectroscopy คณะผู้วิจัยจึงได้วางแผนยืนยันโครงสร้างของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดด้วยเทคนิค ELISA โดยการศึกษาปฏิกิริยาการจับกันของโปรตีนและแอนติบอดีต่างชนิดเพื่อใช้ในการยืนยันโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าว ผลการทดลองแสดงดังแสดงในตารางที่ 9

ตาราง 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm เมื่อสลับ โปรตีน-แอนติบอดีแบบต่าง ๆ ในกระบวนการ ELISA

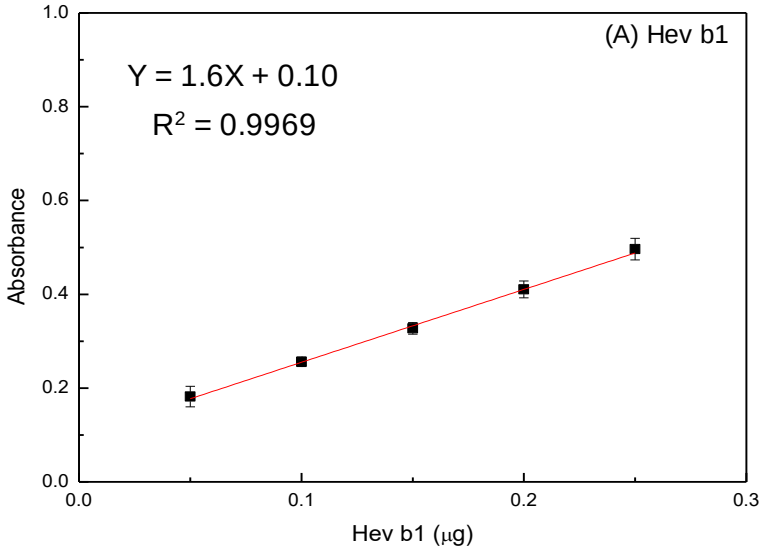
| ครั้งที่ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (A450) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | rHev b1-anti rHev b1 | rHev b1-anti rHev b3 | rHev b3-anti rHev b3 | rHev b3-anti rHev b1 |
| ค่าเฉลี่ย | 0.409 | 0.008 | 0.499 | 0.003 |
| SD | 0.014 | 0.006 | 0.064 | 0.003 |

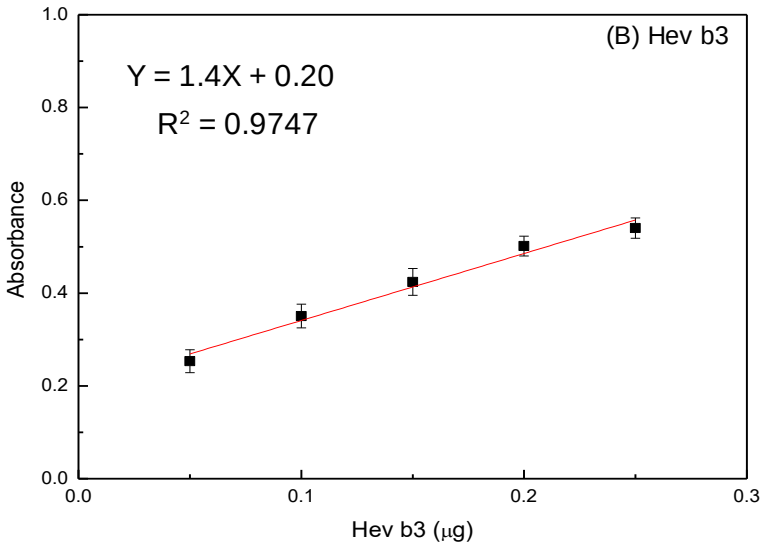
จากการทดลองพบว่าเมื่อทำปฏิกิริยา rHev b1-anti rHev b1 จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรเฉลี่ยเป็น 0.409 แต่เมื่อใช้โปรตีน rHev b1 จับกับแอนติบอดี anti rHev b3 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรลดลงอย่างมีนัยสำคัญเป็น 0.001 ทำนองเดียวกันกับการสลับแอนติบอดีในการศึกษาการจับของโปรตีน rHev b3 กับ anti rHev b1 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโน

เมตรลดลงจาก 0.499 เป็น 0.003 ผลการทดลองบ่งชี้อย่างชัดเจนว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน rHev b1 หรือ rHev b3 จับจำเพาะได้กับโปรตีนนั้น ๆ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการทำ Western blot ที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยืนยันได้ว่าโปรตีน rHev b1 มีโครงสร้างแตกต่างกับโปรตีน rHev b3 อย่างชัดเจน

4.4 การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน rHev b1 และ rHev b3

กราฟมาตรฐานของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ถูกสร้างโดยใช้โปรตีนลูกผสม Hev b1 และ Hev b3 ปริมาณต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-0.35 ไมโครกรัม เมื่อพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรและปริมาณโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 53 ซึ่งกราฟดังกล่าวนี้สามารถใช้หาความปริมาณโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากยางธรรมชาติได้






รูปที่ 55 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรและปริมาณโปรตีนลูกผสม rHev b1 และ rHev b3 (μg)

5. การเปรียบเทียบความใช้ได้ของวิธีการทั้งสองในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน Hev b1 และ Hev b3

ค่าที่แสดงความใช้ได้ของวิธีการ ได้แก่ ช่วงของความเป็นตรงของกราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดการตรวจหา ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ เปอร์เซ็นการได้กลับคืน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ซึ่งได้ถูกนำมาคำนวนและเปรียบเทียบในตารางที่ 10 และได้แปลงให้อยู่ในหน่วยเดียวกันเพื่อง่ายต่อการเปรียบเทียบ โดยค่าเหล่านี้ยืนยันความใช้ได้ของวิธีซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยเฉพาะค่าเปอร์เซ็นการได้กลับคืนต้องอยู่ในช่วง 75 – 125% และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จะต้องไม่เกิน 10% ถึงจะยอมรับได้ว่าการวิเคราะห์นั้นมีความน่าเชื่อถือ จากตารางด้านล่างโดยรวมแล้วจะเห็นได้ว่าวิธีทาง ELISA มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดโปรตีนทั้งสองชนิดได้ต่ำกว่า วิธีที่ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น (SERS) ถึง 250 – 1,000 เท่า เมื่อพิจารณาจากขีดจำกัดการตรวจหา

ตาราง 10 แสดงความใช้ได้ของวิธีจากค่าต่าง ๆ โดยพิจารณาเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี

| | SERS | | ELISA | |
|---|---|---|---|---|
| | Hev b1 | Hev b3 | Hev b1 | Hev b3 |
| 1. ช่วงของความเป็นตรงของกราฟมาตรฐาน | 90 – 50 ng/µL | 90 – 50 ng/µL | 0.05 – 0.25 µg (0.33 - 1.67 ng/µL) | 0.05 – 0.25 µg (0.33 - 1.67 ng/µL) |
| 2. ขีดจำกัดการตรวจหา (LOD) | 6 ng/µL | 5 ng/µL | 0.006 µg (0.04 ng/µL) | 0.02 µg (0.13 ng/µL) |
| 3. ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) | 20 ng/µL | 10 ng/µL | 0.02 µg (0.13 ng/µL) | 0.06 µg (0.4 ng/µL) |
| 4. เปอร์เซ็นการได้กลับคืน (%Recovery) | 116 % (0.09 µg/µL) 122% (0.07 µg/µL) 121% (0.05 µg/µL) | 116 % (0.09 µg/µL) 110% (0.07 µg/µL) 123% (0.05 µg/µL) | 115 % (0.05 µg) 120% (0.15 µg) 109% (0.25 µg) | 115 % (0.05 µg) 111% (0.15 µg) 119% (0.25 µg) |
| 5. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) | 10 % | 9 - 10 % | 4 – 6 % | 6 - 8 % |

6. การเปรียบเทียบวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน Hev b1 และ Hev b3

เนื่องจากช่วงการตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้ง Hev b1 และ Hev b3 ในวิธี ELISA ช่วงในการตรวจวัดต่ำกว่า วิธีที่ได้พัฒนาขึ้น (µg/µL) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกค่ากลางของปริมาณโปรตีนที่ได้ทดสอบคือ 0.07 µg/µL สำหรับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น และทำการเจือจาง 100 เท่า จะได้ความเข้มข้น 0.7 ng/µL สำหรับวิธี ELISA จากนั้นจึงตรวจวัดปริมาณของ โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากวิธีที่พัฒนาขึ้น (1. SERS (µg/µL)) และ (2. ELISA (µg/µL) (x 100)) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีการทั้งสองด้วยวิธีการทางสถิติคือ t-test โดยพิจารณาที่ความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางพบว่า ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นและ ELISA ไม่มีความแตกต่างอย่างมี

นัยยะสำคัญเมื่อพิจารณาค่า $t_{Stat} < t_{Critical\ two\text{-}tail}$ นั้นแสดงให้เห็นถึงวิธีที่ได้พัฒนาให้ค่าที่แม่นยำเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยแสดงในตารางที่ 11 และ 12

ตาราง 11 แสดงความเข้มของของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่หาได้จากวิธี SERS และ ELISA

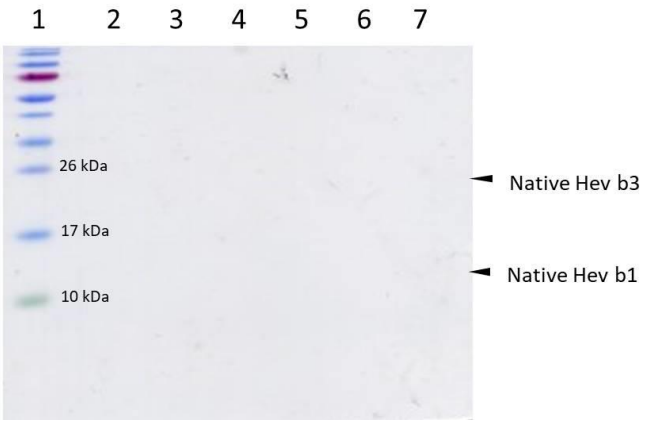
| 1. SERS (µg/µL) | | ELISA (µg) | | ELISA (ng/µL) | | 2. ELISA (µg/µL) (x 100) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hev b1 | Hev b3 | Hev b1 | Hev b3 | Hev b1 | Hev b3 | Hev b1 | Hev b3 |
| 0.095 | 0.075 | 0.110 | 0.109 | 0.733 | 0.727 | 0.073 | 0.073 |
| 0.089 | 0.085 | 0.130 | 0.121 | 0.867 | 0.807 | 0.087 | 0.081 |
| 0.072 | 0.072 | 0.120 | 0.098 | 0.800 | 0.653 | 0.080 | 0.065 |

ตาราง 12 แสดงค่าทางสถิติคำนวณด้วยวิธี t-test ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่หาได้จากวิธี SERS และ ELISA

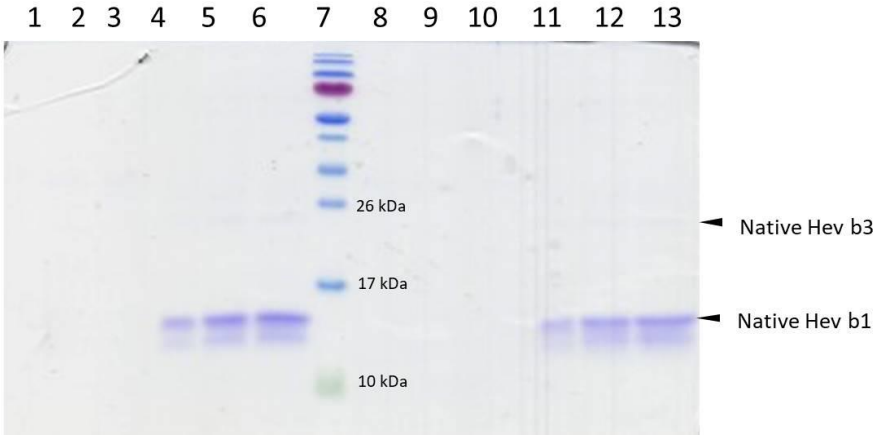
| | Hev b1 | Hev b3 | t- test |
|---|---|---|---|
| $t_{Stat}$ | 0.68 | 0.72 | No statistically significant difference ($t_{Stat} < t_{Critical\ two\text{-}tail}$) |
| $t_{Critical\ two\text{-}tail}$ | 3.18 | 2.78 | |

7. การสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยาง

ในงานวิจัยนี้เลือกทดสอบผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติคือ ถุงมือยาง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันแพร่หลายทั่วไป และเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่บริษัทที่ร่วมวิจัยในงานนี้ได้ผลิตขึ้น จากการตรวจสอบการสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยางด้วยสารละลายต่าง ๆ ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยวิธี 15% SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนใด ๆ ในสารสกัดที่ใช้ PBS pH 7.2 หรือ wash buffer ดังแสดงรูปที่ 54 แถวที่ 2-7 และ รูปที่ 55 แถวที่ 1-3,8-10 แต่เมื่อใช้สารสกัด PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS พบแถบโปรตีนที่บ่งชี้ว่าเป็นโปรตีน Hev b1 อย่างชัดเจน และแถบโปรตีน Hev b3 จาง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 55 โดยพบว่าเมื่อใช้เวลาสกัดเพิ่มขึ้นจะปรากฏแถบโปรตีนทั้งสองชัดเจนขึ้นทั้งที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และ 37 °C

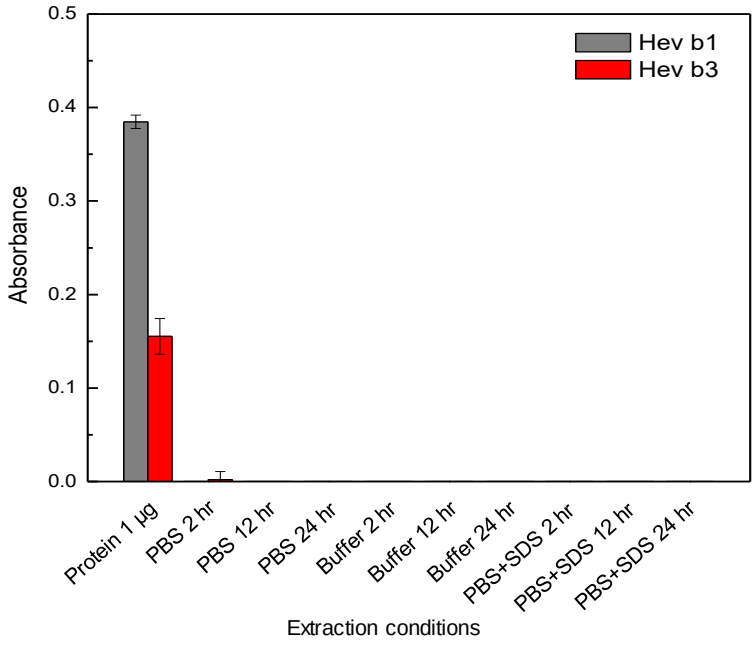



รูปที่ 56 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วย PBS วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2,3,4) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (5,6,7) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ




รูปที่ 57 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วย wash buffer และ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1,2,3) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ wash buffer ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (4,5,6) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (7) โปรตีนมาตรฐาน (8,9,10) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ wash buffer ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (11,12,13) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

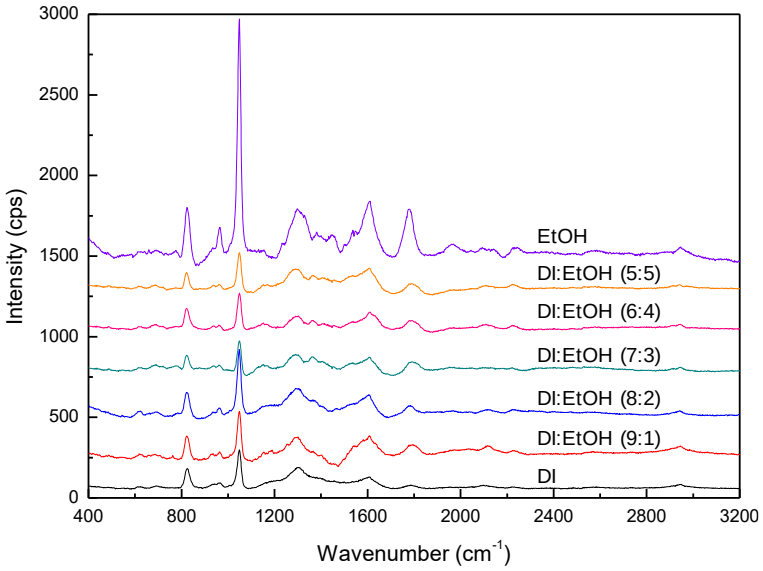
แม้ว่าผลจากการทำ 15% SDS-PAGE จะไม่ปรากฏแถบโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 แต่อาจจะมีโปรตีนเหล่านี้ปริมาณน้อยกว่าที่จะสามารถตรวจวัดได้โดยวิธี SDS-PAGE คณะผู้วิจัยจึงนำสารสกัดทั้งหมดไปทำ ELISA ปรากฏว่าไม่สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรได้ ดังแสดงในรูปที่ 56 ทั้งนี้คณะผู้วิจัยคาดว่า SDS อาจมีผลต่อการยึดเกาะของโปรตีนในวัสดุรองรับ




รูปที่ 58 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของสารสกัดถุงมือยางโดยใช้สภาวะสกัดต่าง ๆ โดยใช้โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ความเข้มข้น 1 µg เป็นตัวเปรียบเทียบ

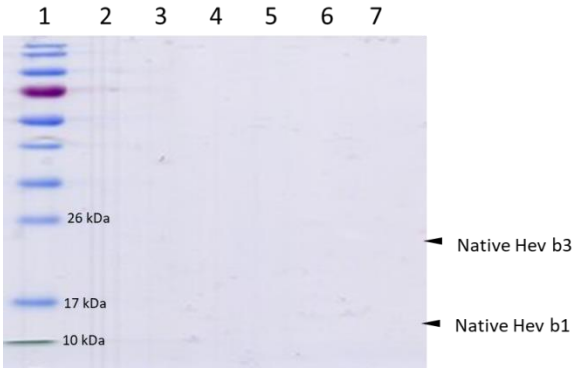
เนื่องจากสภาวะการสกัดต่าง ๆ ในข้างต้นไม่สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้สองแบบ คือ โปรตีนตกค้างมีปริมาณที่ต่ำมาก หรือ สภาวะการสกัดยังไม่เหมาะสมที่จะดึงโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ออกมา นอกจากนี้ การใช้ SDS ยังส่งผลรบกวนสัญญาณรามาน เมื่อทำการตรวจวัดตัวอย่างบนอนุภาคเงินที่มีโครงสร้างในระดับนาโนเมตร ซึ่งคณะผู้วิจัยต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารในกลุ่มนี้ตั้งแต่กระบวนการสกัดโปรตีนแล้ว คณะผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพิ่มโดยตั้งสมมุติฐานว่าให้ใช้สารกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งผู้วิจัยเลือกใช้เอทานอล (EtOH) น่าจะช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีนข้างต้นและน่าจะสกัดโปรตีนออกมากได้มากขึ้น นอกจากนี้ EtOH ยังสามารถระเหยได้ง่าย จึงไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน คณะผู้วิจัยจึงใช้ EtOH ต่อน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อใช้ในการสกัด จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์บนวัสดุที่ได้พัฒนาขึ้น ด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน เบื้องต้นพบว่าไม่ปรากฏพีคที่พลังงาน 760 $cm^{-1}$ ดังแสดงในรูป

ที่ 57 ซึ่งเป็นพีคที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ซึ่งได้แสดงผลการทดทองไปก่อนหน้านี้แล้ว

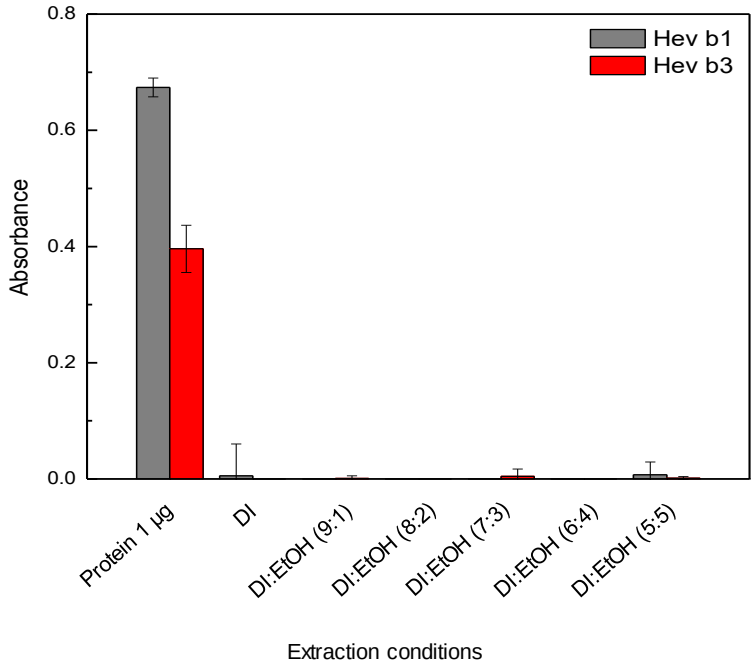



รูปที่ 59 สเปกตรัมรามานของตัวอย่างที่ทำการสกัดบนพื้นผิวอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร โดยใช้เอทานอล (EtOH) ต่อน้ำปราศจากไอออน (DI) ที่อัตราส่วนโดยปริมาตรต่าง ๆ เมื่อใช้กำลังเลเซอร์ที่ 0.1 mW ที่ความยาวคลื่น 532 nm

จากนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มด้วยการตรวจสอบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าไม่ปรากฏแถบโปรตีนใด ๆ ดังแสดงในรูปที่ 58 จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมด 5 มิลลิลิตรไปตกตะกอนด้วยอะซิโตน อีกครั้งปรากฏว่ามีตะกอนน้อยมาก แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 50 mM carbonate buffer, pH 9.6 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดังวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้างต้นแล้ว แล้วนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรมีค่าต่ำกว่าช่วงของความเป็นตรงของกราฟมาตรฐานในเทคนิคนี้ ดังแสดงในรูปที่ 59 บ่งชี้ได้ว่าในการสกัดโปรตีนบนผลิตภัณฑ์โดยใช้น้ำและเอทานอลไม่สามารถสกัดโปรตีนได้

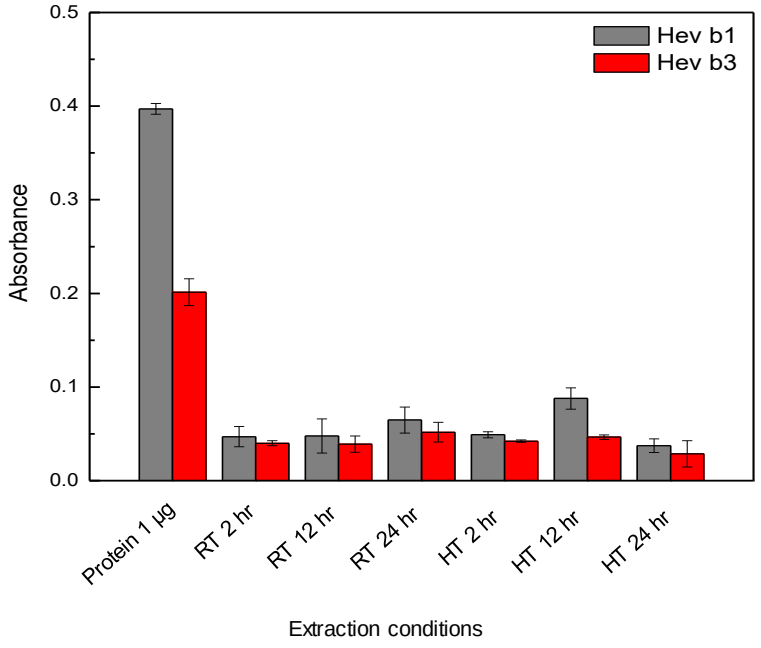



รูปที่ 60 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วนต่าง ๆ วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่น (3) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 9:1 (4) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 8:2 (5) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 7:3 (6) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 6:4 (7) สารสกัดถุงมือยางด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 5:5




รูปที่ 61 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของสารสกัดถุงมือยางโดยใช้เอทานอล (EtOH) ต่อน้ำปราศจากไอออน (DI) ที่อัตราส่วนโดยปริมาตรต่าง ๆ โดยใช้โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ความเข้มข้น 1 µg เป็นตัวเปรียบเทียบ

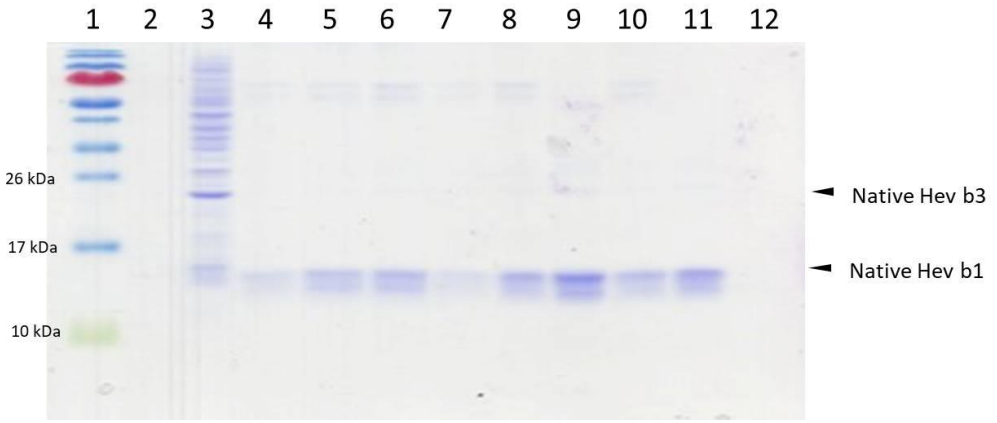
จากนั้นผู้วิจัยจึงทำการวิจัยเพิ่มโดยย้อนกลับไปในวิธีที่ใช้ SDS ที่ช่วยในการสกัดโปรตีน เนื่องจากผลการทำ 15% SDS-PAGE ปรากฏแถบโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 แต่ผลจากการทำ ELISA บ่งชี้ว่าไม่เกิดการจับกันของโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 กับแอนติบอดี คาดว่า SDS น่าจะมีผลต่อการยึดเกาะของโปรตีน อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของ SDS ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Surfactance มีสมบัติชะล้างสารอินทรีย์ได้ดี จึงชะเอาโปรตีนออกจากเพลทได้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 56 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำจัด SDS ออกจากสารสกัดก่อนนำมาทำ ELISA โดยนำสารสกัดไป dialyze ในน้ำกลั่น 48 ชั่วโมง หลังการ dialyze แม้จะสามารถกำจัด SDS ได้ แต่โปรตีนเกิดการตกตะกอน จึงทำการเก็บแยกส่วนใสและตะกอนโดยวิธีหมุนเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนใสไปทำ ELISA ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 60 ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรได้ต่ำ และค่า A450 ไม่สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่ปรากฏในเจล SDS-PAGE




รูปที่ 62 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของสารสกัดถุงมือยางโดยใช้บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิห้อง (RT: 25 °C) และ 37 °C (HT) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังทำการ dialyze ในน้ำกลั่น 48 ชั่วโมง โดยใช้โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ความเข้มข้น 1 µg เป็นตัวเปรียบเทียบ

สำหรับตะกอนที่เกิดขึ้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และละลายตะกอนกลับด้วย 50 mM carbonate buffer, pH 9.6 สำหรับสารสกัดถุงมือยางจากบัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2

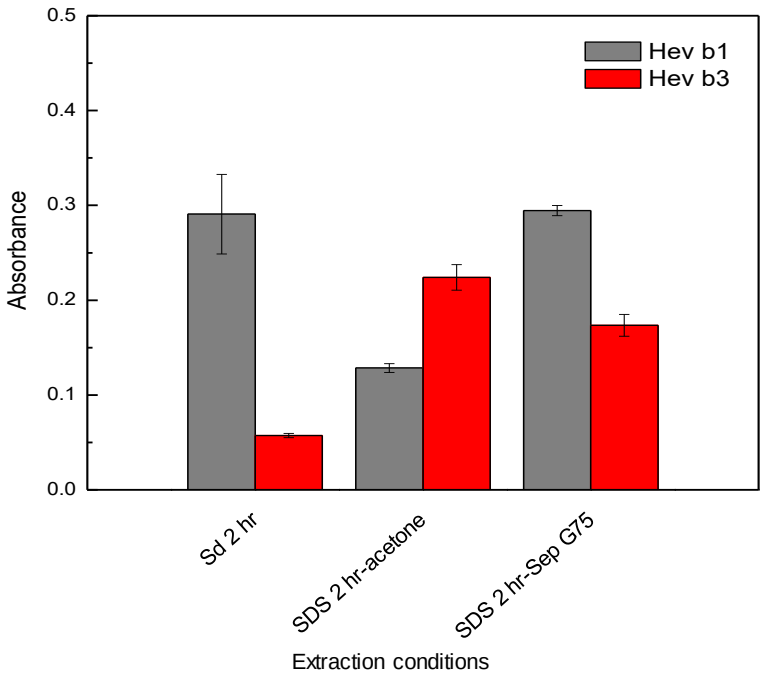
ชั่วโมง กำจัด SDS โดยนำมาตกตะกอนด้วยอะซิโตนหรือผ่านคอลัมน์ Sephadex G75 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการตกตะกอนไปวิเคราะห์ด้วยวิธี 15% SDS-PAGE และ ELISA ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE พบว่าตะกอนที่เกิดจากการนำสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ไปทำการ dialyze ในน้ำกลั่น หรือตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตน รวมถึงสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G75 ปรากฏแถบโปรตีน Hev b1 อย่างชัดเจนและมีแถบโปรตีน Hev b3 ปรากฏบาง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 61




รูปที่ 63 แบบแผนโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากการสกัดถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS หลังการ dialyze ในน้ำกลั่น 48 ชั่วโมง วิเคราะห์โดย 15% SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน (2) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย wash buffer ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้การตกตะกอนในอะซิโตน (3) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพาราสดด้วย wash buffer โดยใช้การตกตะกอนในอะซิโตน (4,5,6) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (7,8,9) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (10) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้การตกตะกอนในอะซิโตน (11) ตะกอนของสารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G75 (12) สารสกัดโปรตีนจากถุงมือยางโดยใช้ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยสามารถสกัดโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยางได้ โดยใช้ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่ 37 °C เมื่อพิจารณาการใช้ถุงมือยางในชีวิตประจำวัน อุณหภูมิผิวที่สัมผัสกับถุงมือคืออุณหภูมิร่างกาย (37 °C) และส่วนใหญ่จะใช้เวลาสัมผัสประมาณ 2

ชั่วโมง และเทียบเคียงวิธีการสกัดจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารสกัดที่อุณหภูมิ 37 ℃ นาน 2 ชั่วโมงใช้ในการศึกษา ELISA ต่อไป ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรได้ดังแสดงในรูปที่ 53




รูปที่ 64 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA ของตะกอนสารสกัดถุงมือยางโดยใช้บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 ที่มี 1% SDS โดยใช้แอนติบอดีต่อ rHev b1 หมายเหตุ: Sd 2 hr คือ ส่วนใสจากการใช้ SDS สกัดถุงมือยางที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่าน dialyze ในน้ำกลั่น ตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนและละลายโปรตีนด้วย 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, SDS 2 hr-acetone คือ สารสกัดโปรตีนจากการใช้ SDS สกัดถุงมือยางที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนและละลายโปรตีนด้วย 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, SDS 2 hr-Sep G75 คือ สารสกัดโปรตีนจากการใช้ SDS สกัดถุงมือยางที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G75

8. กาตรวจวิเคราะห์โปรตีน Hev b1 และ Hev b3 จากถุงมือยาง

เมื่อได้สภาวะในการสกัดที่คาดว่าให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดแล้ว คณะผู้วิจัยได้ทดลองในตัวอย่างถุงมือยางชนิดมีแป้งโดยใช้กระบวนการสกัดที่ได้พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบมาตรฐานที่ใช้ในการหาปริมาณรวมของโปรตีนที่ละลายน้ำจากถุงมือยางธรรมชาติด้วยวิธีลาวรีจาก (ASTM D 5712-05) โดยเปรียบเทียบปริมาณ

โปรตีนที่ละลายน้ำทั้งหมด ปริมาณโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ในหน่วย $\mu g/dm^2$ จากตัวอย่างถุงมือ 5 ชุดที่สุ่มจากการผลิตในรอบต่างๆ โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ ได้ผลตามตารางที่ 12-14 ตามลำดับดังแสดง

ตาราง 13 ปริมาณ total protein ที่วัดด้วยวิธี Modified Lowry

| ตัวอย่างถุงมือยาง | วิธีการสกัดที่ได้พัฒนาขึ้น ($\mu g/dm^2$) | วิธีการสกัดตาม ASTM D 5712-05 ($\mu g/dm^2$) |
|---|---|---|
| Lot A | 86.35±7.92 | 58.52±6.42 |
| Lot B | 146.97±22.00 | 51.87±0.23 |
| Lot C | 115.52±16.42 | 59.09±14.10 |
| Lot D | 91.53±11.05 | 42.96±20.40 |
| Lot E | 111.63±24.70 | 75.78±3.55 |

ตาราง 14 ปริมาณ Hev b1 ที่วัดด้วยวิธี ELISA

| ตัวอย่างถุงมือยาง | วิธีการสกัดที่ได้พัฒนาขึ้น ($\mu g/dm^2$) | วิธีการสกัดตาม ASTM D 5712-05 ($\mu g/dm^2$) |
|---|---|---|
| Lot A | 5.29±0.21 | 1.48±0.07 |
| Lot B | 5.20±0.22 | 1.45±0.02 |
| Lot C | 5.45±0.04 | 1.86±0.01 |
| Lot D | 5.01±0.70 | 1.48±0.25 |
| Lot E | 5.86±0.19 | 1.93±0.15 |

ตาราง 15 ปริมาณ Hev b3 ที่วัดด้วยวิธี ELISA

| ตัวอย่างถุงมือยาง | วิธีการสกัดที่ได้พัฒนาขึ้น ($\mu g/dm^2$) | วิธีการสกัดตาม ASTM D 5712-05 ($\mu g/dm^2$) |
|---|---|---|
| Lot A | N.D.* | N.D.* |
| Lot B | 0.58±0.05 | 0.42±0.05 |
| Lot C | 0.17±0.02 | 0.26±0.01 |
| Lot D | 0.39±0.16 | 0.37±0.07 |
| Lot E | 0.32±0.10 | 0.27±0.01 |

*N.D.: Not detectable

เมื่อพิจารณาเกณฑ์ปริมาณโปรตีนรวมของ U.S. Food and Drug Administration (FDA) มีการกำหนดเกณฑ์ของปริมารโปรตีนที่ควรตรวจวัดได้บนถุงมือยางแบบมีแป้งควรจะต้องมีค่าต่ำกว่า 200 ไมโครกรัมต่อตารางเดซิเมตร ($\mu g/dm^2$) ของถุงมือยางธรรมชาติ [47] จากผลการทดลองพบว่าถุงมือยางทุกกล่องที่สุ่มตรวจมีโปรตีนที่ละลายน้ำได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ ทั้งจากการสกัดด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น นอกจากนี้จะเห็นได้ชัดว่าวิธีการสกัดที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถดึงโปรตีนบนผลิตภัณฑ์ออกมาให้อยู่ในรูปของสารละลายโดยมีค่าสูงกว่าจากวิธีมาตรฐาน 1 – 1.5 เท่าโดยประมาณ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อยคือ Hev b1 และ Hev b3 ในกรณีเกณฑ์มาตรฐานในกลุ่มของโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อยในข้างต้น คณะผู้วิจัยได้พบว่าใน ASTM 7427 ได้กำหนดวิธีการทดสอบสำหรับ Hev b1, 3, 5 และ 6.02 ด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับผลการวิจัยในข้างต้น โดยพบว่ายังไม่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานที่ชัดเจนสำหรับปริมาณของโปรตีนทั้ง 4 ชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์ [48] โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Hev b1 ซึ่งมีรายงานว่าทำให้เกิดอาการได้มากกว่า 50% ในผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ [30]

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัย

คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีน Hev b1 และ b3 โดยสามารถผลิตในปริมาณมากและต่อเนื่องจากแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรม มีข้อเด่นที่สามารถลดขั้นตอนในการสกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสด ลดการปนเปื้อนจากสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในกระบวนการสกัด รวมถึงแบคที่เรียที่ได้ยังสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่องและทำได้ในห้องปฏิบัติการทำให้มีปริมาณโปรตีนสำรองทั้ง 2 ชนิดพร้อมใช้งานตลอดงานวิจัย นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้สามารถยืนยันด้วยจำนวนจากแถบสีที่สัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งในงานวิจัยนี้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดตรงกับข้อมูลของงานวิจัยที่ได้มีการรายงานในก่อนหน้านี้โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการแยกและหาน้ำหนักของโปรตีน โปรตีนดังกล่าวมีโครงสร้างทางกายภาพแบบ $\beta$-sheet ใน Hev b1 และ $\alpha$-Helix ใน Hev b3 โดยผลของสเปกตรัมรามานที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปี พบว่าสามารถสังเกตความแตกต่างของตำแหน่งสัญญาณรามานในช่วงของ amide I (1650 - 1680 $cm^{-1}$) และ amide III (1230 - 1280 $cm^{-1}$) โดยโครงสร้างของโปรตีนข้างต้นตรงกับงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบสมบัติของโปรตีน Hev b1 ที่ได้จากน้ำยางพาราสดและแบคทีเรียที่ดัดแปลงพันธุกรรมที่สังเคราะห์ได้ จากการเปลี่ยนแปลงทาง vibrational spectroscopy ด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปี ได้ผลของสเปกตรัมรามานที่คล้ายคลึงกัน ถือว่าโปรตีนจากทั้ง 2 แหล่ง ไม่มีความแตกต่างกันในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคข้างต้น

ในส่วนของการเตรียมอนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างซับซ้อนเพื่อนำไปใช้ในเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จเตรียมและควบคุมโครงสร้างด้วยวิธีทางเคมี และยืนยันความบริสุทธิ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค scanning electron microscopy และ energy dispersive X-ray spectroscopy ตามลำดับ แต่ไม่สามารถดำเนินการต่อในส่วนของเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานได้เนื่องจากข้อจำกัดของวัสดุ คณะผู้วิจัยจึงได้แก้ปัญหาโดยเปลี่ยนชนิดของวัสดุรองรับเป็นอนุภาคเงินในระดับนาโนเมตรซึ่งมีความจำเพาะกับโปรตีนและให้สัญญาณรามานสูงกว่าในกรณีที่ไม่ได้ใช้วัสดุรองรับที่พัฒนาขึ้น 70 – 90 % นอกจากนี้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมีความน่าสนใจคือมีต้นทุนในการผลิตและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการให้สัญญานรบกวนช่วงที่ใช้ในการแยกชนิดของโปรตีน รวมถึงเมื่อพิจารณาจากขีดจำกัดการตรวจหายังมีค่าสูงกว่าวิธีมาตรฐานถึง 250 – 1,000 เท่า และการหาสภาวะการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น จึงควรที่จะมีการวิจัยและพัฒนาต่อไปเพื่อให้ได้วิธีการที่ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานมากขึ้น

# อ้างอิง


[1] Pichayakorn, W.; Suksaeree, J.; Boonme, P.; Taweepreda, W.; Ritthidej, G. C. Preparation of deproteinized natural rubber latex and properties of films formed by itself and several adhesive polymer blends. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012,** *51* (41), 13393-13404.

[2] Beezhold, D.; Swanson, M.; Zehr, B. D.; Kostyal, D. Measurement of natural rubber proteins in latex glove extracts: comparison of the methods. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **1996,** *76* (6), 520-526.

[3] Perrella, F. W.; Gaspari, A. A. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* **2002,** *27* (1), 77-86.

[4] Tomazic-Jezic, V. J.; Lucas, A. D. Protein and allergen assays for natural rubber latex products. *Journal of allergy and clinical immunology* **2002,** *110* (2), S40-S46.

[5] Käppler, A.; Fischer, D.; Oberbeckmann, S.; Schernewski, G.; Labrenz, M.; Eichhorn, K.-J.; Voit, B. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016,** *408* (29), 8377-8391.

[6] Han, X. X.; Zhao, B.; Ozaki, Y. Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2009,** *394* (7), 1719-1727.

[7] Oßmann, B. E.; Sarau, G.; Schmitt, S. W.; Holtmannspötter, H.; Christiansen, S. H.; Dicke, W. Development of an optimal filter substrate for the identification of small microplastic particles in food by micro-Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017,** *409* (16), 4099-4109; Wiesheu, A. C.; Anger, P. M.; Baumann, T.; Niessner, R.; Ivleva, N. P. Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages. *Analytical Methods* **2016,** *8* (28), 5722-5725.

[8] Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; Van Duyne, R. P. SERS: Materials, applications, and the future. *Mater. Today* **2012,** *15* (1), 16-25.

[9] Ding, S.-Y.; Yi, J.; Li, J.-F.; Ren, B.; Wu, D.-Y.; Panneerselvam, R.; Tian, Z.-Q. Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials. *Nature Reviews Materials* **2016,** *1*, 16021.

[10] Demeritte, T.; Kanchanapally, R.; Fan, Z.; Singh, A. K.; Senapati, D.; Dubey, M.; Zakar, E.; Ray, P. C. Highly efficient SERS substrate for direct detection of explosive TNT using popcorn-shaped gold nanoparticle-functionalized SWCNT hybrid. *Analyst* **2012,** *137* (21), 5041-5045.

[11] Guo, P.; Sikdar, D.; Huang, X.; Si, K. J.; Xiong, W.; Gong, S.; Yap, L. W.; Premaratne, M.; Cheng, W. Plasmonic core–shell nanoparticles for SERS detection of the pesticide thiram: size-and shape-dependent Raman enhancement. *Nanoscale* **2015,** *7* (7), 2862-2868.

[12] Zhao, H.; Jin, J.; Tian, W.; Li, R.; Yu, Z.; Song, W.; Cong, Q.; Zhao, B.; Ozaki, Y. Three-dimensional superhydrophobic surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for sensitive detection of pollutants in real environments. *Journal of Materials Chemistry A* **2015,** *3* (8), 4330-4337.

[13] Grubisha, D. S.; Lipert, R. J.; Park, H.-Y.; Driskell, J.; Porter, M. D. Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Anal. Chem.* **2003,** *75* (21), 5936-5943.

[14] Cantaert, B.; Ding, D.; Rieu, C.; Petrone, L.; Hoon, S.; Kock, K. H.; Miserez, A. Stable Formation of Gold Nanoparticles onto Redox-Active Solid Biosubstrates Made of Squid Suckerin Proteins. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, n/a-n/a.

[15] Radziuk, D.; Moehwald, H. Prospects for plasmonic hot spots in single molecule SERS towards the chemical imaging of live cells. *PCCP* **2015,** *17* (33), 21072-21093.

[16] Liu, H.; Zhang, L.; Lang, X.; Yamaguchi, Y.; Iwasaki, H.; Inouye, Y.; Xue, Q.; Chen, M. Single molecule detection from a large-scale SERS-active Au79Ag21 substrate. *Scientific Reports* **2011,** *1*, 112.

[17] Yuan, H.; Khoury, C. G.; Hwang, H.; Wilson, C. M.; Grant, G. A.; Vo-Dinh, T. Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology* **2012,** *23* (7), 075102; Yuan, H.; Ma, W.; Chen, C.; Zhu, H.; Gao, X.; Zhao, J. Controllable Synthesis of 3D Thorny Plasmonic Gold Nanostructures and Their Tunable Optical Properties. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011,** *115* (47), 23256-23260.

[18] Pangdam, A.; Wongravee, K.; Nootchanat, S.; Ekgasit, S. Urchin-like gold microstructures with tunable length of nanothorns. *Materials & Design* **2017,** *130*, 140-148.

[19] Cortes, A.; Castillo, A.; Sciaraffia, A. Food allergy: Children's symptom levels are associated with mothers' psycho-socio-economic variables. *Journal of Psychosomatic Research* **2018,** *104*, 48-54.

[20] Berthelot, K.; Lecomte, S.; Estevez, Y.; Peruch, F. Hevea brasiliensis REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins. *Biochimie* **2014,** *106*, 1-9.

[21] Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003,** *107* (3), 668-677.

[22] Vantasin, S.; Pienpinijtham, P.; Wongravee, K.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S. Naked eye colorimetric quantification of protein content in milk using starch-stabilized gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013,** *177*, 131-137.

[23] Cheng, L.-C.; Huang, J.-H.; Chen, H. M.; Lai, T.-C.; Yang, K.-Y.; Liu, R.-S.; Hsiao, M.; Chen, C.-H.; Her, L.-J.; Tsai, D. P. Seedless, silver-induced synthesis of star-shaped gold/silver bimetallic nanoparticles as high efficiency photothermal therapy reagent. *J. Mater. Chem.* **2012,** *22* (5), 2244-2253.

[24] Pangdam, A.; Nootchanat, S.; Ishikawa, R.; Shinbo, K.; Kato, K.; Kaneko, F.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S.; Baba, A. Effect of urchin-like gold nanoparticles in organic thin-film solar cells. *PCCP* **2016,** *18*, 18500 - 18506.

[25] Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P. Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chem. Commun.* **2008,** (5), 544-557.

[26] Bumbrah, G. S.; Sharma, R. M. Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* **2016,** *6* (3), 209-215.

[27] Nawamawat, K.; Sakdapipanich, J. T.; Ho, C. C.; Ma, Y.; Song, J.; Vancso, J. G. Surface nanostructure of Hevea brasiliensis natural rubber latex particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011,** *390* (1), 157-166.

[28] Mekonnen, T. H.; Ah-Leung, T.; Hojabr, S.; Berry, R. Investigation of the co-coagulation of natural rubber latex and cellulose nanocrystals aqueous dispersion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2019,** *583*, 123949.

[29] Riyajan, S.-A.; Santipanusopon, S.; Yai, H. Influence of ammonia concentration and storage period on properties field NR latex and skim coagulation. *KGK. Kautschuk, Gummi, Kunststoffe* **2010,** *63* (6), 240-245.

[30] Sontimuang, C.; Suedee, R.; Dickert, F. Interdigitated capacitive biosensor based on molecularly imprinted polymer for rapid detection of Hev b1 latex allergen. *Anal. Biochem.* **2011,** *410* (2), 224-233.

[31] Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970,** *227* (5259), 680-685.

[32] Jayadevan, J.; Alex, R.; Gopalakrishnapanicker, U. Deproteinised natural rubber latex grafted poly(dimethylaminoethyl methacrylate) – poly(vinyl alcohol) blend membranes: Synthesis, properties and application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018,** *107*, 1821-1834.

[33] Chaiendoo, K.; Sooksin, S.; Kulchat, S.; Promarak, V.; Tuntulani, T.; Ngeontae, W. A new formaldehyde sensor from silver nanoclusters modified Tollens' reagent. *Food Chem.* **2018,** *255*, 41-48.

[34] Auttarat, J.; Phiriyangkul, P.; Utarabhand, P. Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp Litopenaeus merguiensis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2006,** *143* (1), 27-36.

[35] Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1979,** *76* (9), 4350-4354.

[36] von der Gathen, Y.; Sander, I.; Flagge, A.; Brüning, T.; Raulf-Heimsoth, M. Quantification of protein and latex allergen content of various natural rubber latex products. *Allergologie select* **2017,** *1* (2), 109.

[37] Guideline, I. H. T. In *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*, International conference on harmonization, Geneva, Switzerland, 2005; pp 11-12.

[38] Sokoließ, T.; Köller, G. Approach to method development and validation in capillary electrophoresis for enantiomeric purity testing of active basic pharmaceutical ingredients. *ELECTROPHORESIS* **2005,** *26* (12), 2330-2341.

[39] Berthelot, K.; Lecomte, S.; Estevez, Y.; Coulary-Salin, B.; Bentaleb, A.; Cullin, C.; Deffieux, A.; Peruch, F. Rubber Elongation Factor (REF), a Major Allergen Component in Hevea brasiliensis Latex Has Amyloid Properties. *PLOS ONE* **2012,** *7* (10), e48065.

[40] Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K. M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M. Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013,** *44* (8), 1061-1076.

[41] Gatemala, H.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S. 3D AgCl microstructures selectively fabricated via Cl--induced precipitation from [Ag(NH3)2]+. *CrystEngComm* **2014,** *16* (29), 6688-6696.

[42] Puech, P.; Anwar, A. W.; Flahaut, E.; Dunstan, D. J.; Bassil, A.; Bacsa, W. Raman $G$ and $D$ band in strongly photoexcited carbon nanotubes. *Physical Review B* **2009,** *79* (8), 085418.

[43] Athukorale, S.; Leng, X.; Xu, J. X.; Perera, Y. R.; Fitzkee, N. C.; Zhang, D. Surface Plasmon Resonance, Formation Mechanism, and Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Ag+-Stained Gold Nanoparticles. *Frontiers in Chemistry* **2019,** *7* (27).

[44] Zhou, L.; Poggesi, S.; Casari Bariani, G.; Mittapalli, R.; Adam, P.-M.; Manzano, M.; Ionescu, R. E. Robust SERS Platforms Based on Annealed Gold Nanostructures Formed on Ultrafine Glass Substrates for Various (Bio)Applications. *Biosensors (Basel)* **2019,** *9* (2), 53.

[45] Pienpinijtham, P.; Sornprasit, P.; Wongravee, K.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S. Gold microsheets having nano/microporous structures fabricated by ultrasonic-assisted cyclic galvanic replacement. *RSC Advances* **2015,** *5* (95), 78315-78323.

[46] Wu, H.; Volponi, J. V.; Oliver, A. E.; Parikh, A. N.; Simmons, B. A.; Singh, S. In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011,** *108* (9), 3809-3814.

[47] Cornish, K.; Bates, G.; Slutzky, J.; Meleshchuk, A.; Xie, W.; Sellers, K. Extractable Protein Levels in Latex Products, and Their Associated Risks, Emphasizing American Dentistry. *Biol Med (Aligarh)* **2019,** *11* (456), 2.

[48] Palosuo, T. Recent research on natural rubber latex (NRL) allergy. In *Chemistry, manufacture and applications of natural rubber*; Elsevier: 2014; pp 452-482.

# ภาคผนวก

# บทความสำหรับเผยแพร่

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาชุดอุปกรณ์เพื่อการตรวจสอบโปรตีนบนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ยาง ซึ่งอาศัยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน โดยมีอนุภาคเงินในระดับนาโนเมตรเป็นวัสดุรองรับตัวอย่างที่จากการสกัด โดยโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อย 2 ชนิด คือ Hev b1 และ Hev b3 ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ในกลุ่มผู้มีอาการแพ้โปรตีนจากผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ ถูกใช้เป็นเป้าหมายในการทดสอบ เบื้องต้นคณะผู้วิจัยพบว่าสามารถจำแนกโปรตีนทั้งสองชนิดจากสเปกตรัมรามานที่มีความจำเพาะและเป็นเอกลักษณ์ รวมทั้งพบว่าวัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้นช่วยในการการขยายสัญญานรามานเพิ่มขึ้น 70 – 90% แต่อนุภาคเงินในระดับนาโนเมตรที่ใช้เป็นวัสดุรองรับในงานวิจัยนี้ ยังมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไม่สามารถใช้ในการแยกชนิดของโปรตีนในกรณีที่มีโปรตีนผสมกันได้เนื่องจากมีสัญญานรบกวนจากสารที่หลงเหลือในการสังเคราะห์วัสดุรองรับ ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาต่อเพื่อให้มีความสามารถในการจำแนกโปรตีนและวิเคราะห์ปริมาณให้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานต่อไป

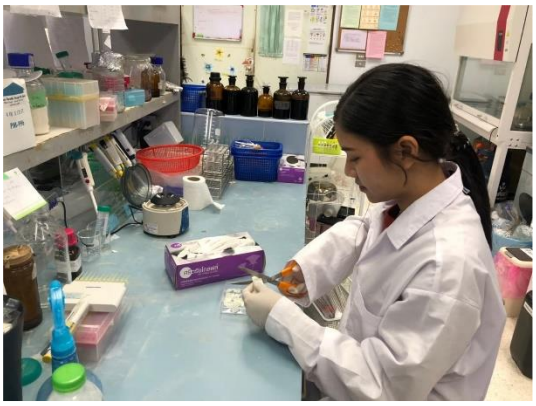
# กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

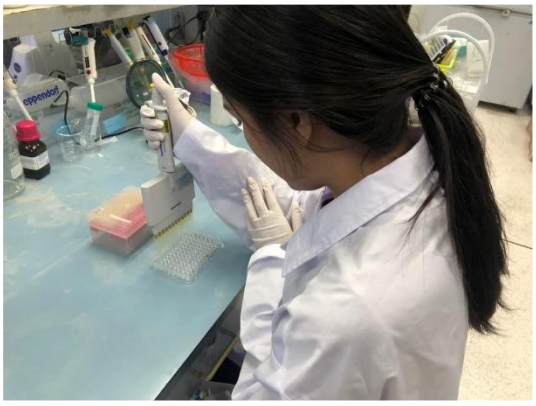
1. รวมพบปะกับผู้บริหาร บริษัท รับเบอร์แลนด์โปรดักส์ จำกัด

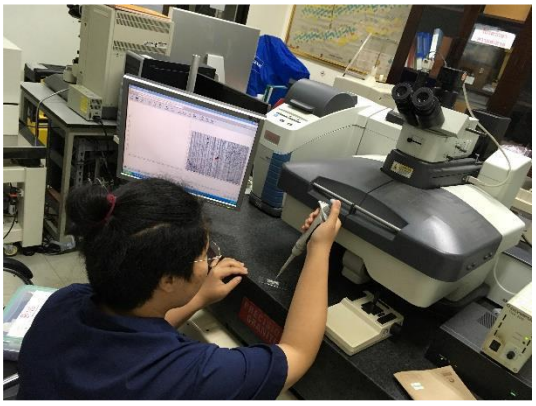
คณะผู้วิจัยได้เดินทางไปร่วมประชุม เพื่อบรรยายเกี่ยวกับวิธีการดำเนินงานวิจัย รับฟังรายละเอียดและข้อเสนอแนะอื่นๆ อันเป็นประโยชน์ในงานวิจัย รวมถึงรายงานความก้าวหน้า สาธิตการใช้ชิ้นงาน รวมถึงโครงการที่น่าจะได้มีความร่วมมือต่อในอนาคต นำโดย คุณเฉลิมภพ แก่นจันทร์ กรรมการผู้จัดการ และพนักงานสายควบคุมคุณภาพในการผลิตน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ บริษัท รับเบอร์แลนด์โปรดักส์ จำกัด พร้อมกับเยี่ยมชมโรงงานและสายการผลิตของบริษัทในเครือศรีตรังกรุ๊ฟ อำเภอเมือง จังหวัดตรัง ในวันที่ 20 กุมภาพันธ์ และ วันที่ 6 ธันวาคม พ.ศ. 2562 ที่ผ่านมา

2. การวิเคราะห์ตัวอย่างถุงมือยางระหว่างวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน

หลังจากถุงมือยางได้ถูกสกัดตามวิธีที่ได้รายงานไปในก่อนหน้านี้แล้ว สารสกัดที่ได้จากตัวอย่าง รวมถึงโปรตีนมาตรฐานจะถูกส่งไปยัง หน่วยปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์รับรู้ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญานรามานโดยวัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้น พร้อมกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน ที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

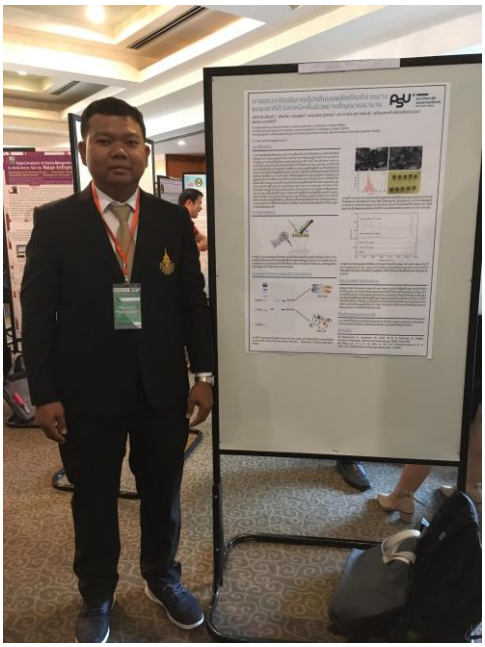


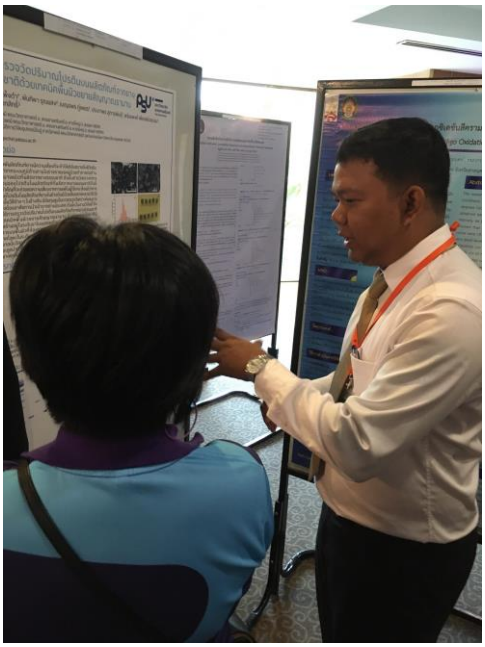




3. การนำชิ้นงานที่ได้พัฒนาขึ้นเข้าร่วมประกวดในเวทีนวัตกรรม

คณะผู้วิจัยได้ร่วมนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในการประชุมสวนสุนันทาวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 2 “วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรม เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน” วันศุกร์ที่ 8 พฤศจิกายน 2562 ณ โรงแรมเดอะรอยัลริเวอร์ กรุงเทพมหานคร โดยนำเสนอในหัวข้อ “Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) for protein determination in latex products”ซึ่งได้รับความสนใจจากอาจารย์ นักศึกษา ผู้เข้าร่วมประชุมและนำเสนอผลงาน





SCI SSRU

SsSci 2nd conference 2019

CERTIFICATE OF ATTENDANCE AND APPRECIATION

*awarded to*

**Apichat Phengdaam**

*for your valued participation in*

THE 2ND SUAN SUNANDHA NATIONAL AND INTERNATIONAL ACADEMIC CONFERENCE ON SCIENCE AND TECHNOLOGY (SsSci 2019)
"SCIENCE, TECHNOLOGY AND INNOVATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT"

The Royal River Hotel Bangkok, Thailand, 8th November 2019

Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University

(Assoc. Prof. Dr. Luedech Girdwichai)
President of Suan Sunandha Rajabhat University

4. การขอขึ้นบัญชีสิ่งประดิษฐ์ไทย

คณะผู้วิจัยได้เตรียมเอกสารและส่งยื่นขอขึ้นบัญชีสิ่งประดิษฐ์ไทย ของคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ในกรณีที่งานวิจัยยังอยู่ในช่วงของการวิจัยและพัฒนาอาจจะได้รับการสนับสนุนให้พัฒนาชิ้นงานต่อในอนาคต ซึ่งรายละเอียดแสดงในเอกสารดังนี้

*แบบคำขอ*
*ขึ้นทะเบียนบัญชีสิ่งประดิษฐ์ไทย*

*(เฉพาะเจ้าหน้าที่)*
เลขทะเบียนรับ.....
วันเดือนปีที่รับ.....
เจ้าหน้าที่ผู้รับ.....

*ด้าน* ❑ ความมั่นคง ❑ การแพทย์และสาธารณสุข ❑ คมนาคม ❑ เกษตรกรรม ☑ อื่น ๆ

*ส่วนที่ ๑ : ข้อมูลทั่วไป*

๑.๑ ชื่อบุคคลหรือหน่วยงานผู้ขอขึ้นทะเบียนสิ่งประดิษฐ์ไทย นายอภิชาติ เพ็งดำ
☑ บุคคลธรรมดา สัญชาติ ไทย เลขที่บัตรประชาชน 1809900136676
❑ หน่วยงานรัฐ สังกัดกระทรวง.....
❑ รัฐวิสาหกิจ สังกัดกระทรวง.....
❑ หน่วยงานเอกชน เลขทะเบียนการค้า..... สัดส่วนของผู้ถือหุ้นสัญชาติไทย..... %
❑ อื่นๆ (ระบุ).....

๑.๒ ที่อยู่ของหน่วยงานหรือผู้ขอขึ้นทะเบียนสิ่งประดิษฐ์ไทย
เลขที่ 424/495 ตรอก/ซอย - หมู่ที่ - ถนน กาญจนวนิชย์ แขวง/ตำบล คอหงส์
เขต/อำเภอ หาดใหญ่ จังหวัด สงขลา รหัสไปรษณีย์ 90110 โทรศัพท์ 086-2738712
โทรสาร - อีเมล apichat.p@psu.ac.th เว็บไซต์ -

๑.๓ ชื่อผู้ติดต่อ (นาย/นาง/นางสาว) นายอภิชาติ เพ็งดำ ตำแหน่ง อาจารย์
โทรศัพท์ - มือถือ 086-2738712 อีเมล apichat.p@psu.ac.th

*ส่วนที่ ๒ : รายละเอียดสิ่งประดิษฐ์ไทย*

๒.๑ ชื่อสิ่งประดิษฐ์ไทย ชุดอุปกรณ์เพื่อการตรวจสอบโปรตีนบนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ยาง
รุ่น - ขนาด (size) - กำลังการผลิต - (ถ้ามี)

๒.๒ หมวดหมู่ของสิ่งประดิษฐ์ตามการจัดประเภทของสำนักงบประมาณ *(เลือกตอบเพียง ๑ ข้อ)*

| | | | |
|---|---|---|---|
| ❑ ก่อสร้าง | ❑ การเกษตร | ❑ การแพทย์ | ❑ การศึกษา |
| ❑ โฆษณาและเผยแพร่ | ❑ งานบ้านงานครัว | ❑ ไฟฟ้าและวิทยุ | ❑ ยานพาหนะและขนส่ง |
| ❑ โรงงาน | ❑ สำนักงาน | ❑ การสำรวจ | ☑ วิทยาศาสตร์ |
| ❑ กลาโหม | ❑ อาวุธ | ❑ กีฬา | ❑ คอมพิวเตอร์ |
| ❑ เครื่องจักรกล | ❑ ครุภัณฑ์สนาม | ❑ อื่นๆ..... | |

๒.๓ ขั้นของการประดิษฐ์ *(เลือกตอบเพียง ๑ ข้อ)*
☑ อยู่ระหว่างการทำวิจัยและพัฒนาต้นแบบ
❑ อยู่ระหว่างการทดสอบเพื่อการใช้งานจริง
❑ ผลิตและพร้อมจำหน่ายเชิงพาณิชย์แล้ว แต่ยังไม่ได้ผ่านการทดสอบมาตรฐานรับรอง
❑ ผลิตและพร้อมจำหน่ายเชิงพาณิชย์ มีมาตรฐานรับรอง แต่ยังไม่มีหน่วยงานเอกชนรับไปผลิต
❑ ผลิตและจำหน่ายเชิงพานิชย์แล้ว ตั้งแต่ปี.....หน่วยงานที่ผลิตคือ.....
- ชื่อทางการค้าของผลงานสิ่งประดิษฐ์.....
- จำนวนที่มีการซื้อขายไปแล้วโดยประมาณ.....ชิ้น/ปี
❑ อื่นๆ: (ระบุ).....

๒.๔ ลักษณะการพัฒนาสิ่งประดิษฐ์ไทย *(เลือกตอบได้มากกว่า ๑ ข้อ)*

*แบบคำขอขึ้นทะเบียนบัญชีสิ่งประดิษฐ์ไทย* *หน้า*
๑
*คณะอนุกรรมการกำหนดความต้องการของภาครัฐที่ใช้นวัตกรรมไทย Rev.(13082558)*

๒.๔.๑ ❑ วิจัยเอง

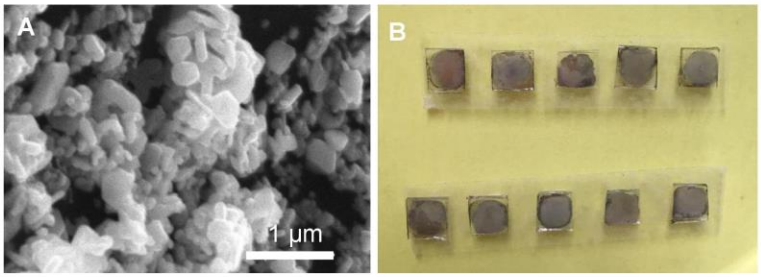
๒.๔.๒ ☑ ร่วมวิจัย กับหน่วยงาน (ระบุ) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม และ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

๒.๔.๓ ❑ จ้างวิจัย กับหน่วยงาน (ระบุ).....

๒.๔.๔ ❑ รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีจากหน่วยงาน (ระบุ).....

๒.๔.๕ ☑ อื่นๆ (ระบุ) บริษัท รับเบอร์แลนด์ โปรดักส์ จำกัด จะเป็นผู้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีเป็นรายแรก

*๒.๕ อธิบายรายละเอียดความเป็นสิ่งประดิษฐ์ที่มีนัยสำคัญ และยินยอมให้เผยแพร่ผ่านสื่อประชาสัมพันธ์ต่าง ๆ ได้*




**อุปกรณ์ที่ได้พัฒนาขึ้นใช้สำหรับการตรวจวัดปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติโดยเน้นโปรตีนในกลุ่มที่ละลายน้ำได้น้อยด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน โดยใช้อนุภาคโลหะที่มีโครงสร้างอยู่ในระดับนาโนเมตรที่แสดงไว้ในรูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A โดยเตรียมบนวัสดุรองรับพร้อมใช้งานเพื่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานไมโครสโคปที่แสดงไว้ในรูป B ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. โดยจะทำหน้าที่ในการขยายสัญญาณของสารบนพื้นผิวที่ต้องการตรวจวัด ซึ่งเทคนิคนี้ได้ถูกประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้านเพื่อวิเคราะห์สร้างปริมาณน้อย คาดว่าสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกเบื้องต้นแทนวิธีมาตราฐานที่มีความยุ่งยากและราคาแพง**

๒.๖ คุณสมบัติของสิ่งประดิษฐ์ *(เช่น ประสิทธิภาพ กำลังการผลิต ขนาด น้ำหนัก อายุการใช้งาน ฯลฯ)*

อุปกรณ์ที่ได้พัฒนาขึ้นใช้สำหรับการตรวจวัดปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ ผลิตจากอนุภาคโลหะที่มีโครงสร้างอยู่ในระดับนาโนเมตรที่ถูกตรึงบนกระจกด้วยวิธีการทางเคมี สามารถตรวจวิเคราะห์โปรตีนในกลุ่มที่ละลายน้ำได้น้อย ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดแร็ว เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์จากสารโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธี ELISA

๒.๗ มาตรฐานของสิ่งประดิษฐ์ที่ได้รับ *(เกี่ยวข้องทางด้านการใช้งาน ด้านความปลอดภัย และด้านผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม)*

๒.๗.๑ ❑ มาตรฐานบังคับ (Mandatory Standard) ได้แก่ ไม่มี

๒.๗.๒ ❑ มาตรฐานสมัครใจ (Voluntary Standard) ได้แก่ ไม่มี

๒.๗.๓ ❑ มาตรฐานเทียบเคียงในประเทศ/ต่างประเทศ (Reference Standard) ได้แก่ ไม่มี

๒.๘ ผลการรับรอง ตรวจประเมิน และผลการวิเคราะห์ทดสอบสิ่งประดิษฐ์ พร้อมหน่วยงานที่ออกเอกสาร ตามมาตรฐานที่ระบุไว้

เนื่องจากการหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อยยังไม่มีการกำหนดมาตรฐาน จึงไม่มีการขอผลรับรอง

๒.๙ การคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาของสิ่งประดิษฐ์ *(ตอบได้มากกว่า ๑ ข้อ)*

๒.๙.๑ ☑ ยังไม่ได้จดสิทธิบัตร

๒.๙.๔ ❑ สิทธิบัตร ชื่อ.....เลขที่.....ปีที่ได้รับ.....วันหมดอายุ.....

๒.๙.๕ ❑ อนุสิทธิบัตร ชื่อ.....เลขที่.....ปีที่ได้รับ.....วันหมดอายุ.....

๒.๑๐. กรณีพัฒนาร่วมกับเอกชน หรือมีผู้ประกอบการสนใจสู่การผลิต (โปรดระบุชื่อผู้ประกอบการ)
บริษัท รับเบอร์แลนด์ โปรดักส์ จำกัด

๒.๑๑. กำลังการผลิตสูงสุดต่อปีที่สามารถนำไปใช้ได้จริง : -.....หน่วย

๒.๑๒. ราคาขายปลีกต่อหน่วย: -.....บาท ราคาขายส่งต่อหน่วย: -..... บาท เมื่อสั่งซื้อปริมาณคราวละ.....-.....ชิ้น

๒.๑๓ ประมาณการความต้องการในการพัฒนาสิ่งประดิษฐ์จนสำเร็จและเป็นนวัตกรรมพร้อมใช้ในเชิงพาณิชย์ *(รวมถึงผ่านมาตรฐาน)*

๒.๑๓.๑ ประมาณการงบประมาณที่คาดว่าจะใช้ในการพัฒนาจนสำเร็จ ได้มาตรฐาน และพร้อมผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์
งบประมาณรวมทั้งโครงการ 1,500,000 บาท งบประมาณเบิกแรก จำนวน 1,000,000 บาท

๒.๑๓.๒ คาดว่าจะสำเร็จพร้อมผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ในเดือน.....-.....ปีงบประมาณ พ.ศ.....-.....

๒.๑๔ หน่วยงานภาครัฐที่สามารถนำผลงานสิ่งประดิษฐ์ไปใช้ประโยชน์
การยางแห่งประเทศไทย หรือ สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เพื่อใช้สำหรับการกำหนดคุณภาพอุตสาหกรรมที่เกี่ยวของกับผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ ซึ่งในอนาคตอาจจะมีการกำหนดมาตราฐานปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อยตกค้างในผลิตภัณฑ์

**ส่วนที่ ๓ : เอกสารประกอบแบบคำขอ (ผู้มีอำนาจลงนามโปรดรับรองสำเนาถูกต้อง)**

๓.๑ สำเนาบัตรประชาชน และสำเนาทะเบียนบ้าน (กรณีบุคคลธรรมดา) หรือสำเนาพระราชบัญญัติจัดตั้งหน่วยงานของรัฐ สถาบันการศึกษา หรือรัฐวิสาหกิจ (กรณีนิติบุคคลภาครัฐ) หรือสำเนาหนังสือรับรองการเป็นนิติบุคคล กรณีผู้ลงนามไม่ได้มีอำนาจตามหนังสือรับรองโปรดแนบหนังสือมอบอำนาจ) พร้อมสำเนาหนังสือบริคณห์สนธิ และสำเนาทะเบียนรายชื่อผู้ถือหุ้น (กรณีนิติบุคคลภาคเอกชน) (ต้องมี)

๓.๒ สำเนารายงานผลการศึกษาและงานวิจัย สัญญาจ้างวิจัย สัญญารับถ่ายทอดเทคโนโลยี และเอกสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง (ต้องมี)

๓.๓ สำเนาเอกสารคุ้มครองสิทธิทางทรัพย์สินทางปัญญาทุกฉบับ (ถ้ามี)

๓.๔ สำเนาหลักฐานที่แสดงถึงการผ่านมาตรฐานบังคับ มาตรฐานสมัครใจ มาตรฐานเทียบเคียงในประเทศ/ต่างประเทศ ได้แก่ ใบรับรองผลการวิเคราะห์ทดสอบ และผลการตรวจประเมินกระบวนการผลิต (ถ้ามี)

๓.๕ ข้อมูลประกอบอื่นๆ (ถ้ามี) เช่น รายชื่อสินค้าและบริการเทียบเคียงที่มีการจำหน่ายในประเทศ โบรชัวร์ หรือแคตตาล็อค และรางวัลต่างๆ ของผลงานสิ่งประดิษฐ์ เป็นต้น

ข้าพเจ้าขอรับรองว่ารายการที่แจ้งไว้ข้างต้นเป็นรายการที่ถูกต้อง และเป็นความจริงทุกประการ หากสิ่งประดิษฐ์มีการละเมิดทรัพย์สินทางปัญญา ข้าพเจ้ายินยอมให้สิ่งประดิษฐ์ถูกถอดถอนจากบัญชีสิ่งประดิษฐ์ไทย

ลงชื่อ.....ผู้มีอำนาจลงนาม
(นาย สุนทร วงษ์ศิริ)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ยื่นวันที่ 6/12/2562

# ตารางเปรียบเทียบต้นทุนวิธีการตรวจวัดทั้ง 3 วิธี

1. เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานด้วยอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร

| | ชื่อสารเคมี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | NaOH | $AgNO_3$ | $NH_4OH$ | $CH_2O$ | $CH_3CH_2OH$ |
| ความเข้มข้น (% w/v) | - | - | 25 | 37 | >99 |
| ปริมาตร (L) | - | - | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| น้ำหนัก (g) | 1000 | 100 | - | - | - |
| ราคา (บาท)* | 350 | 7,704 | 660 | 1,145 | 1,000 |
| ความเข้มข้นที่ใช้งาน (% w/v) | 10 | 5 | 2 | 37 | 99 |
| ปริมาตรที่ใช้งาน (µL) | 50 | 2000 | 1000 | 10 | 495 |
| คิดเป็นราคาก่อนผสม (บาท) | 0.00175 | 7.70400 | 0.02112 | 0.00458 | 0.19840 |
| สารเคมีชุด A (บาท/10 µL ) | 0.02533 | | | | |
| สารเคมีชุด B (บาท/ 1 µL ) | | | | 0.00020 | |
| ราคาสารเคมี A+B (บาท/ 1 ครั้ง)** | 0.02554 | | | | |

*อ้างอิงราคาของสารเคมีระหว่างเดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2562

**หากพิจารณาถึงการเตรียมกระจกที่เป็นวัสดุรองรับ ค่าสาธารณูปโภคและค่าผู้ช่วยนักวิจัยเป็นต้นทุนประกอบด้วย สามารถตั้งต้นทุนขั้นต่ำให้ง่ายต่อการคำนวนคือ อยู่ที่ 1 บาท ต่อชิ้นงาน

2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกลุ่มที่ละลายน้ำทั้งหมดด้วยเทคนิคของลาวรี

| | ชื่อสารเคมี/ อุปกรณ์ | |
|---|---|---|
| | Lowry Reagent | Microplate (96 wells) |
| จำนวน (ชุด) | 200 | 60 |
| ราคา (บาท)* | 12,900 | 18,000 |
| ราคาต่อการวิเคราะห์ 1 ครั้ง (บาท) | 64.5 | 3.125 |
| รวมทั้งสิ้น (บาท/ 1 ครั้ง) | 67.625 | |

*อ้างอิงราคาของสารเคมีระหว่างเดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2562

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกลุ่มที่ละลายน้ำได้น้อยด้วยเทคนิค ELISA

| | ชื่อสารเคมี/ อุปกรณ์ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | TBA Substrate kit | Microplate (96 wells) | 1° Antibody | 2° Antibody | PBS buffer |
| จำนวน (ชุด) | 1000 | 60 | 1000 | 25 | 250 |
| ราคา (บาท) | 24000 | 18000 | 70000 | 5250 | 525 |
| ราคาต่อ 1 ครั้ง (บาท)* | 24 | 3.125 | 70 | 210 | 2.1 |
| รวมทั้งสิ้น (บาท/ 1 ครั้ง) | 309.225 | | | | |

*อ้างอิงราคาของสารเคมีระหว่างเดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2562

ตารางเปรียบเทียบจุดเด่นและจุดด้อยในด้านต่าง ๆ จากวิธีการตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้ง 3 วิธี

| | ELISA | SERS | Lowry Method |
|---|---|---|---|
| 1. ต้นทุนต่อการตรวจ 1 จุด | 309 บาท | 1 บาท | 68 บาท |
| 2. เวลาที่ใช้ในการตรวจวัดต่อ 1 จุด | 10-12 ชั่วโมง | 10 - 15 นาที | 0.5 - 1 ชั่วโมง |
| 3. ความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน | มีความจำเพาะสูง | มีความจำเพาะต่ำ | มีความจำเพาะต่ำ |
| 4. แหล่งที่มาของวัสดุ | พึ่งพาการนำเข้า | ผลิตได้ในประเทศ | พึ่งพาการนำเข้า |
| 5. ชนิดของโปรตีน | ละลายน้ำได้ดี และละลายน้ำได้น้อย | ละลายน้ำได้ดี และละลายน้ำได้น้อย | ละลายน้ำได้ดี |
| 5. อุปกรณ์ที่ใช้ร่วมในการวิเคราะห์ | หาได้ทั่วไป มีราคาไม่แพง | ห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง มีราคาสูง | หาได้ทั่วไป มีราคาไม่แพง |

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้ตลอดโครงการ

| ระยะเวลา | กิจกรรม | ผลที่ได้รับ |
|---|---|---|
| 6 เดือนที่ 1 | 1. ศึกษาการสกัดโปรตีน Hev 1b และ Hev 3b จากน้ำยางพาราเพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน | ได้โปรตีนบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน |
| | 2. ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตรเพื่อใช้เป็นวัสดุรองรับโปรตีนข้างต้นด้วยเทคนิคขยายสัญญาณรามาน | เนื่องจากความจำเพาะของโปรตีนและวัสดุจึงเปลี่ยนมาใช้อนุภาคเงินแทน ซึ่งได้ศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างอนุภาคเงินที่ผสมด้วยอนุภาคทองคำกับการขยายสัญญาณรามานของโปรตีนแล้ว |
| 6 เดือนที่ 2 | 1. วิเคราะห์สัญญานรามานจากโปรตีนข้างต้น เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและปริมาณของโปรตีนบนวัสดุรองรับที่ได้พัฒนาขึ้น | การวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนบนชิ้นงาน จากสเปกตรัมรามาน โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องการจำแนกชนิดของโปรตีน |
| | 2. พัฒนานวัตกรรมชุดทดสอบปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ จากอนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ที่ใช้ร่วมกับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน | เบื้องต้นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นยังมีขีดจำกัดในการตรวจหาที่สูงอยู่เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน |
| | 3. เตรียมชุดนวัตกรรมในข้างต้นเพื่อนำไปเสนอในเวทีวิชาการ และ/หรือส่งประกวดในนิทรรศการและนวัตกรรมระดับชาติและนานาชาติ | ได้นำผลงานเข้าร่วมการประกวดในเวทีนวัตกรรมระดับชาติ 1 ครั้ง |
| | 4. ขึ้นทะเบียนสิ่งประดิษฐ์ไทย ชุดทดสอบปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ จากอนุภาคทองคำที่มีโครงสร้างแบบหนามในระดับนาโนเมตร ที่ใช้ร่วมกับเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน และถ่ายทอดให้ บริษัท รับเบอร์แลนด์ โปรดักส์ จำกัด | ได้ยื่นเอกสารขอขึ้นทะเบียนสิ่งประดิษฐ์ รวมถึงมีการบรรยายและสาธิตการใช้วิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นให้กับผู้บริหารและนักปฏิบัติการของบริษัทที่ร่วมวิจัย |
| | 5. สรุปผลและเขียนรายงานการวิจัย | รายงานสรุปกระบวนการและผลฉบับสมบูรณ์ |