



ตัวตรวจวัดทางชีวภาพสำหรับตรวจวัดไอออนโลหะ

Biosensors for metal ion detection

เชิษฐ ธิวัธนาณิชย์¹ และ ชชาติไทย แก้วทอง^{1*}

¹ หน่วยวิจัยนาโนเทคโนโลยี ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

*E-mail: Kchatthai@gmail.com

บทคัดย่อ

โลหะหนักเกือบทุกตัวเป็นอันตรายต่อพืช สัตว์และมนุษย์ ในการสร้างตัวตรวจวัดโลหะหนักที่ง่าย ว่องไว และจำเพาะเจาะจง ไบโอะเซนเซอร์ถูกเลือกมาใช้ในการตรวจวัดโลหะปริมาณต่ำ ๆ โดยในบทความนี้ จะแบ่งหัวข้อของไบโอะเซนเซอร์ตามการตรวจวัดออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางสี การวิเคราะห์ด้วยสัญญาณการเรืองแสง และการวิเคราะห์สัญญาณทางไฟฟ้าเคมี

คำสำคัญ: ไบโอะเซนเซอร์ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ แฮร์핀

Abstract

Almost all heavy metals are harmful to plants, animals and humans. To create a simple, highly sensitivity and selectivity heavy metal sensors, biosensors were chosen to detect metal in trace amount. In this review, the biosensors were divided into 3 types: colorimetric detection, fluorescence detection and electrochemical metal detection.

Keywords: Biosensor, Oligonucleotide, Hairpin

Received: January 04, 2018

Revised: March 21, 2018

Accepted: March 21, 2018

1. บทนำ

โลหะหนัก (heavy metal) ไม่ว่าจะเป็นอยู่ในรูปของสารประกอบหรือธาตุเดี่ยว ๆ สามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของโลหะหนักที่พบโดยทั่วไปในธรรมชาติ เช่น สารหนู (arsenic) แบเรียม (barium) แคดเมียม (cadmium) โครเมียม (chromium) ตะกั่ว (lead) ซีลีเนียม (selenium)ปรอท (mercury) และ เงิน (silver) โดยทั่วไปโลหะเหล่านี้มีในธรรมชาติปริมาณที่น้อยมาก ๆ แต่ถ้าปริมาณที่มีมากเกินไปจะเป็นอันตราย [1] ซึ่งโลหะหนักมักจะมาจากการปล่อยของเสียจากโรงงานต่าง ๆ รวมไปถึงการนำชิ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์ที่นำมาทิ้งรวมกับขยะทั่วไป [2] โดยโลหะหนักสามารถส่งผลกระทบต่อมนุษย์ได้ อาทิเช่น ปัญหาของระบบทางเดินหายใจที่เป็นผลมาจากการปนเปื้อนโครเมียมในน้ำ หรืออาจจะเป็นการปนเปื้อนของปรอทที่อยู่ในรูปเมทิลเมอร์คิวรีในน้ำที่ส่งผลกระทบต่อระบบประสาทที่เรียกว่า โรคมินามาตะ ที่ประเทศญี่ปุ่น [3]

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือที่ทันสมัยในการตรวจหาโลหะต่าง ๆ ในปริมาณที่น้อย ไม่ว่าจะเป็น Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [4-6] Atomic absorption spectroscopy (AAS) [7-9] X-ray absorption spectroscopy (XAS) [10-11] เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเครื่องมือที่ทันสมัยก็ต้องใช้ทรัพยากรที่เปลือง ค่าใช้จ่ายในการให้บริการเครื่องมือ รวมไปถึงค่าบำรุงรักษาที่มีราคาแพง จึงมีการนำศาสตร์ของเคมีซูปราโมเลกุล (Supramolecular Chemistry) มาพัฒนาเป็นเซนเซอร์ (sensor) ในการตรวจวัดโลหะเพื่อลดเวลา ความยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และสามารถใช้เครื่องมือทั่วไปในการตรวจวิเคราะห์เช่น UV-Vis spectrophotometer [12] Fluorescence spectroscopy

[13] หรืออาจจะใช้ Voltammetry [14] ตลอดจนการใช้สารชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการสร้างเซนเซอร์เพื่อให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเช่นการใช้ประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน [15-17] โอลิโกนิวคลีโอไทด์ [18-19] ในการตรวจวัดโลหะ ซึ่งวิธีการเหล่านี้มีราคาถูก ง่ายต่อการใช้งาน และมีความจำเพาะเจาะจงสูง บทความวิชาการนี้มีจุดประสงค์เพื่อรวบรวมข้อดีและงานวิจัยที่ใช้สารชีวโมเลกุลในการสร้างเครื่องมือระดับโมเลกุลสำหรับตรวจวัดโลหะ

2. ทำไมต้องใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ เป็นกรดนิวคลีอิกสายสั้น (short oligonucleotide) หรือ DNA, RNA สายสั้นที่มีขนาดประมาณ ไม่เกิน 50 ลำดับ แต่ถ้ามากกว่านั้นจะเรียกว่า พอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) หลายปีที่ผ่านมา DNA ถูกมองว่ามีหน้าที่แค่เป็นส่วนที่บรรจุสารทางพันธุกรรม กับความสามารถในการการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และการแปลรหัสดีเอ็นเอ (DNA translation) ได้เพียงอย่างเดียว

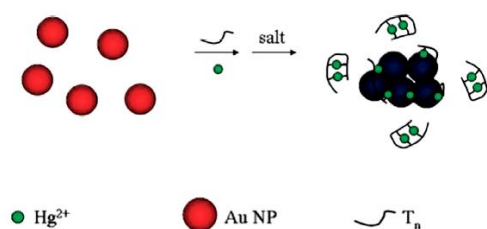
ความก้าวหน้าที่สำคัญทางสาขาเคมีและชีววิทยามีการขยายตัวขึ้นอย่างมากมาย ได้มีการนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดต่างๆ ซึ่งส่วนมากจะเป็นตัวตรวจวัดสารชีวโมเลกุลด้วยกันเองเพราะมีความจำเพาะต่อกัน ซึ่งในบทความนี้จะแสดงให้เห็นการนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดโลหะ ซึ่งในโครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์จะมีไนโตรจีนเบส (nitrogenous base) บางตัวที่สามารถจับกับโลหะได้อย่างจำเพาะเจาะจง [20] โดยจะเรียกตัวตรวจวัดที่นำสารชีวโมเลกุลมาใช้งานว่า “ตัวตรวจวัดทางชีวภาพ (Biosensor)”

3. การวิเคราะห์ด้วยสีของตัวตรวจวัดทางชีวภาพเพื่อตรวจวัดโลหะ

การวิเคราะห์ชนิดนี้จะศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายโดยใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน ร่วมกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะมีลักษณะเฉพาะเชิงแสงของแต่ละตัวแตกต่างกันไป และมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมโลหะที่มีความจำเพาะเจาะจงลงไปในระบบ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

3.1 การใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ตัดแปรร่วมกับอนุภาคนาโน

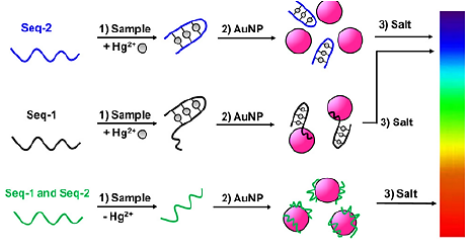
Chang และคณะ [21] ได้ตรวจวัดไอออนปรอท โดยการนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสไทมีน (Thymine base) (5'-TTTTTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3') เป็นองค์ประกอบเมื่อเติมไอออนปรอท (Hg^{2+}) ลงไป เบสไทมีนจะจับกับปรอทให้อยู่ในรูปแบบเชิงซ้อนเป็น (T-Hg-T) แสดงดังรูปที่ 1 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ทำให้ศักย์ซีตา (zeta potential) บนพื้นผิวลดลง และลดแรงผลักทางไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง ส่งผลให้เกิดการรวมกลุ่มกัน (aggregation) ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วงที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า



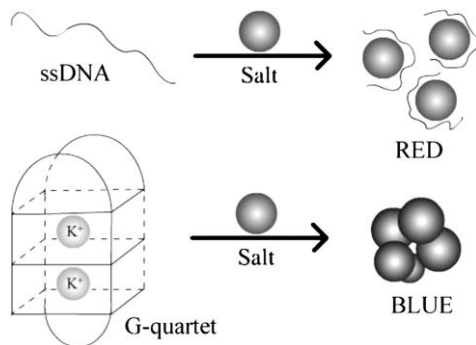
รูปที่ 1 แผนภาพแสดงตัวตรวจวัดปรอท [21]

Abdul และ คณะ [22] ได้ออกแบบสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์สองสายเปรียบเทียบกับกันเพื่อศึกษาความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท โดยมีลำดับดังนี้ สายแรก 5'-TCATGTTTGTGTTGTTGGCCCCCTTCTCTTA-3' และสายที่สอง 5'-TTTGTGTTGTTGGCCCCCTTCTTCTTA-3' ดังรูปที่ 2 ซึ่งกลไกการเกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคนาโนคล้ายกับงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นและพบว่าทั้งสองสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเติมไอออนปรอทลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกัน

นอกจากนี้ยังมีเซนเซอร์ที่ใช้ตรวจวัดไอออนโพแทสเซียม (K^+) โดยใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบส (5'-AGCAACCTCAAA CAGACACCATGG-3' และ 5'-TAGCTATGGAA TTCCTCGTAGGCA-3') ร่วมกับอนุภาคนาโนทอง [23] โดยนิวคลีโอไทด์ที่ใช้จะมีเบสกวานีน (Guanine base) เป็นองค์ประกอบหลักของสายโดยไอออนโพแทสเซียม (K^+) จะทำให้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก random coil ไปเป็น G-quartet ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างไอออนโพแทสเซียม (K^+) กับเบสกวานีน ดังรูปที่ 3 จากนั้นอนุภาคนาโนทองจะเกิดการรวมกลุ่มกัน ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เกิดจากการรวมตัว ทำให้คุณสมบัติเชิงแสงเปลี่ยนไปจากเดิม



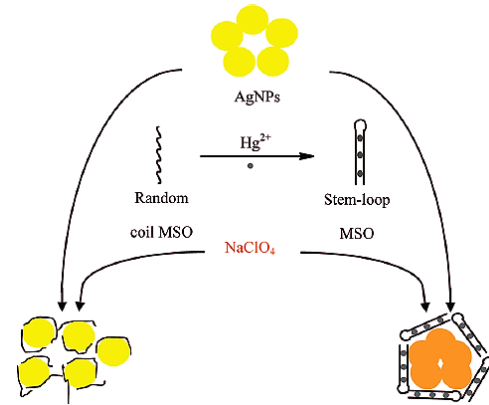
รูปที่ 2 แสดงกลไกในการตรวจวัดไอออนปรอท โดยใช้ การใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ตัดแปร ร่วมกับอนุภาคนาโนทองร่วมกับ ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิด [22]



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงตัวตรวจวัดไอออนโพแทสเซียม(K^+) และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไอออนโพแทสเซียม (K^+) [23]

นอกจากนี้ยังมีการใช้อนุภาคนาโนเงินและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ มาใช้เพื่อตรวจวัดไอออนปรอท (Hg^{2+}) [24] โดยไอออนปรอท (Hg^{2+}) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งในกรณีที่ไม่มีและไม่มีอนุภาคนาโนเงินอยู่ด้วยในระบบที่ไม่มีไอออนปรอท (Hg^{2+}) โอลิโกนิวคลีโอไทด์จะล้อมรอบอนุภาคนาโนเงินจึงไม่เกิดการรวมตัว (unaggregation) ของอนุภาคนาโนเงินแต่เมื่อมีไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในระบบจะเกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนเงิน ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปจากสีเหลืองไปเป็นสีแดง ดังรูปที่ 4

ยิ่งไปกว่านั้นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ยังสามารถจับกับไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ได้อีกด้วย แต่มีความจำเพาะเจาะจงน้อยกว่า ไอออนปรอท

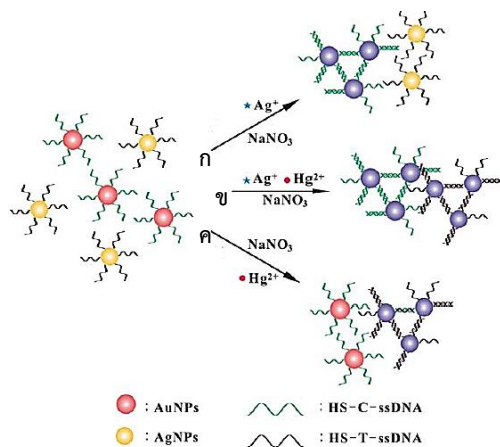


รูปที่ 4 กลไกการตรวจวัดไอออนปรอท (Hg^{2+}) โดยใช้อนุภาคนาโนเงิน(AgNPs) และmercury-specific oligonucleotides (MSO) [24]

3.2 การใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแปรร่วมกับอนุภาคนาโน (Unmodified oligonucleotide-nanoparticles)

Ye และคณะ [25] ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินและ อนุภาคนาโนทองเพื่อใช้ร่วมกับสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจวัดไอออนเงิน (Ag^+) และไอออนปรอท (Hg^{2+}) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ SH-T-ssDNA:5'-SH-(CH₂)₆-TTTGTGTTGTTGTTTTT-3' (ร่วมกับอนุภาคนาโนทอง)และ SH-C-ssDNA:5'-SH-(CH₂)₆-CCCACCCACCCACCC-3' (ร่วมกับอนุภาคนาโนเงิน)แสดงดังรูปที่ 5 เป็นการนำทั้งสองอนุภาคนาโนที่มีการใช้ร่วมกับสายนิวคลีโอไทด์มาประยุกต์ใช้ร่วมกันทำให้สามารถตรวจวัดไอออนเงิน (Ag^+) และไอออนปรอท (Hg^{2+}) และยังสามารถตรวจวัดไอออนทั้งสองพร้อมกันได้รูป 5 (ก) เป็นการเติมไอออนเงินทำให้นิวคลีโอไทด์ที่จับจำเพาะกับไอออนเงิน (Ag^+) ที่ต่อกับอนุภาคนาโนทองเกิดการจับกันส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

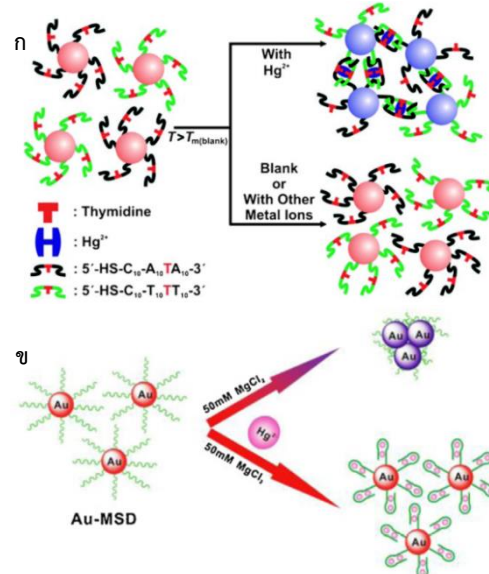
สีของสารละลายจากสีแดงเป็นสีม่วง รูป 5 (ข) เป็นการเติมไอออนโลหะสองชนิด ทำให้นิวคลีโอไทด์แต่ละสายที่จำเพาะกับไอออนแต่ละตัวเกิดการจับกันทำให้สารละลายเปลี่ยนแปลงสีจากสีส้มเป็นสีฟ้า และ รูป 5 (ค) เป็นการเติมเฉพาะไอออนปรอท จึงทำให้นิวคลีโอไทด์ที่ต่อกับอนุภาคนาโนเงินจับกันและเกิดการรวมกลุ่มส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงการตรวจวัดสำหรับ ไอออนเงินและปรอท, (ก) เมื่อเติมไอออนเงิน (ข) เมื่อเติมเงิน (Ag^+) และไอออนปรอท และ (ค) เมื่อเติมไอออนปรอท (Hg^{2+}) [25]

Lee และคณะ [26] ได้สังเคราะห์เซนเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอท(Hg^{2+}) โดยใช้อนุภาคนาโนทองกับสองลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ดังนี้ A: 5'-HS-C₁₀-A₁₀-T-A₁₀-3' และ สาย B: 5'-HS-C₁₀-T₁₀-T-T₁₀-3' เซนเซอร์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีแดง เมื่อมีการจับกันของโอลิโกนิวคลีโอไทด์กับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในขณะที่เมื่อเติมไอออนโลหะอื่น ๆ จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 6 (ก) ส่วนในรูป 6 (ข) เป็นการนำสายนิวคลีโอไทด์สายตรงไปต่อกับอนุภาคนาโนทอง ซึ่งใช้ลำดับที่สามารถเกิดรูปร่างเป็นแฮร์

핀ได้เมื่อมีไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในระบบจะทำให้สีของสารละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความเกาะของรูปร่างที่เป็นแฮร์ฟินที่ถูกรอบๆ อนุภาคนาโน จึงทำให้ไม่เกิดการเกาะกลุ่ม (unaggregation) ของอนุภาคนาโนทอง



รูปที่ 6 (ก) แสดงเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอทโดยใช้อนุภาคนาโนทอง (AuNPs) และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (mercury-specific oligonucleotides ; MSO) (ข) เซนเซอร์ที่มีสายนิวคลีโอไทด์สายตรงต่อกับอนุภาคนาโนทองจับกับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ผ่านโครงสร้าง [26]

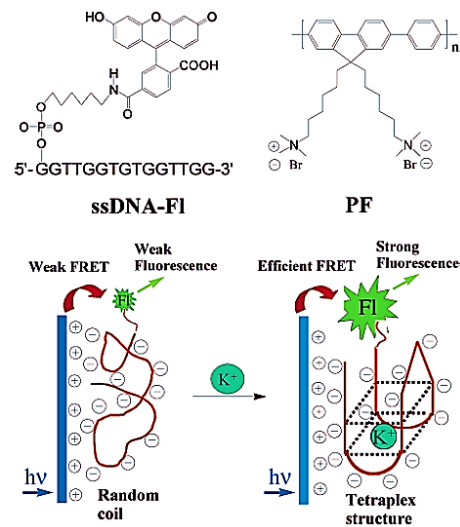
4. การวิเคราะห์ด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดโลหะ

การวิเคราะห์ชนิดนี้จะศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

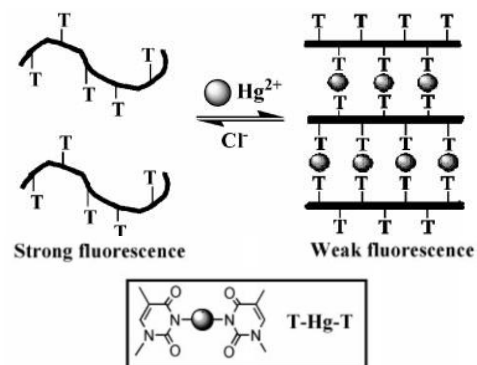
4.1 การใช้พอลิเมอร์ร่วมกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์

การใช้คอนจูเกตพอลิเมอร์ (conjugated polymers: CPs) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เต็มไปด้วยเบสกวานีน เพื่อให้จับจำเพาะกับโพแทสเซียม

และใช้ฟลูออเรสซิน (fluorescein) ค่อกับปลายเพียง
 หนึ่งด้านของสายโพลิไทโอฟีนเพื่อเป็นตัว
 ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ซึ่งแสดงดังรูปที่ 7 เมื่อมี
 ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ในระบบลักษณะของสาย
 โพลิไทโอฟีนจะเกิดการเปลี่ยนรูปร่างจาก
 random coil เป็นแบบ tetraplex และมีความ
 แน่นของประจุบเกิดขึ้นรอบ ๆ ของสายโพลิ
 ไทโอฟีน จากนั้นแรงดูดกันทางประจุกับ
 คอนจูเกตพอลิเมอร์จะทำให้สองโมเลกุลเข้ามาอยู่
 ใกล้ชิดกันมากขึ้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการ
 (Fluorescence resonance energy transfer; FRET)
 เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้น
 อย่างเห็นได้ชัด [27] และยังมีกรนำพอลิไทโอฟีน
 (polythiophene) ที่ประกอบไปด้วยส่วนของเบสไท
 มิน เพื่อเป็นตัวตรวจวัดไอออนปรอทอย่างจำเพาะ
 เจาะจง และเซนเซอร์นี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
 (reusable) ถึง 80% จากรูปที่ 8 เป็นการตรวจวัด
 ปรอท โดยใช้ส่วนของไทมินเบสเป็นตัวจับ
 โดยทั่วไป คอนจูเกตพอลิเมอร์จะให้สัญญาณฟลูออ
 เรสเซนส์ แต่เมื่อมีการเหนี่ยวนำให้เข้ามาอยู่ใกล้กัน
 ด้วยไอออนปรอท (Hg^{2+}) สายของพอลิไทโอฟีน
 (polythiophene) จะเกิดกระบวนการ self-quenching
 ซึ่งทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ค่อย ๆ ลดลงไป
 แต่เซนเซอร์นี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ด้วยเดิม
 ไอออนคลอไรด์ลงไปเพื่อไปจับกับปรอทเกิดเป็น
 $HgCl_2$ ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้อยใน
 ระบบตัวทำละลายที่ใช้งาน จึงก่อให้เกิดการ
 ตกตะกอนลงมา [28]



รูปที่ 7 แผนภาพแสดง โครงสร้าง tetraplex และการ
 ตรวจวัดไอออนโพแทสเซียม (K^+) และโครงสร้าง
 ของ ssDNA-FI และ Cationic Polyfluorene [27]

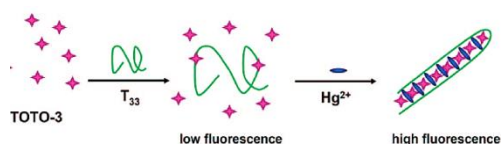


รูปที่ 8 แสดงการตรวจจับปรอทและการนำกลับมา
 ใช้ใหม่ของเซนเซอร์ [28]

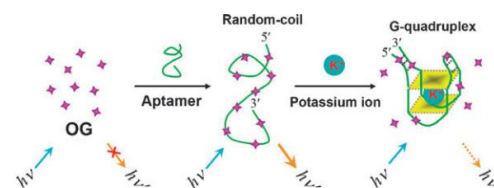
4.2 การใช้สีย้อมอินทรีย์ (organic dye) ร่วมกับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์

การใช้สีย้อม TOTO-3 ซึ่งเป็น asymmetry cyanine dye ถูกนำมาใช้ร่วมกับสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่มีเบสไทมีนจำนวน 33 ตัว (T_{33}) เพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอท (Hg^{2+}) เมื่อ TOTO-3 จะเกิดอันตรกิริยากับ T_{33} ที่มีลักษณะเป็น random coil จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ต่ำ แต่เมื่อมีไอออนปรอท (Hg^{2+}) อยู่ในระบบ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ T_{33} ที่เป็นผลมาจากการเกิดสารเชิงซ้อน T-Hg-T และทำให้จับกับสีย้อม TOTO-3 ได้ดีขึ้น ส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 9 [29]

นอกจากนั้น Chang และคณะ [30] ยังได้มีการนำสีย้อม OliGreen และสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (5'-ACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3') เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนโพแทสเซียม (K^+) ในตัวอย่างน้ำปัสสาวะ โดยทั่วไป OliGreen จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่สูงเมื่อเกิดอันตรกิริยากับสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็น random coil แต่เมื่อเติมไอออนโพแทสเซียม (K^+) ลงไปโครงสร้างของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็น G-quadruplex และจับกับ OliGreen นำไปสู่การลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 9 แผนภาพแสดงการเกิดในรูปเชิงซ้อนระหว่าง ปรอท TOTO-3 และ T_{33} [29]



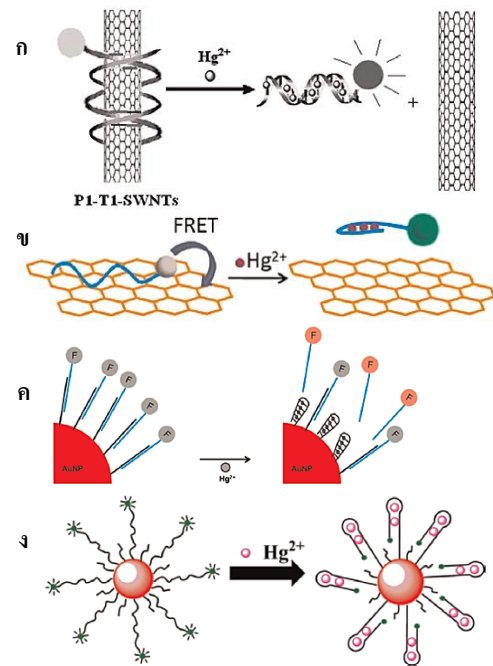
รูปที่ 10 แผนภาพแสดงตัวตรวจจับโพแทสเซียม (K^+) โดยการรวมกันระหว่างสีย้อม OliGreen และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ [29]

4.3 การใช้วัสดุนาโน (nanomaterials) ร่วมกับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์

วัสดุนาโนที่ใช้จะมีอยู่หลายชนิดแต่ส่วนมากที่นิยมใช้ได้แก่ ท่อนาโนคาร์บอน (carbon nanotubes : CNTs) แกรฟีนออกไซด์ (GO) อนุภาคนาโนทอง และ แท่งนาโนทองคำ (gold nanorods : GNRs) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนของโลหะ

การนำเอาดีเอ็นเอสายเดี่ยวสองสายมาล้อมรอบบริเวณ single wall nanotube (SWNTs) ด้วยอันตรกิริยาไพ-ไพ ระหว่างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ และ side wall โดยที่โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายแรกมีการต่อกับส่วนที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ และอีกสายเป็นสายธรรมดา เมื่อเติมปรอท ลงไปสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่พันอยู่บนผิวของ SWNTs จะหลุดออกมาจับกับปรอทและให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ เหตุผลที่ในตอนแรกไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนส์คือส่วนที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์อยู่ติดกับพื้นผิวของ SWNTs ทำให้เกิดกระบวนการ FRET แต่เมื่อทั้งสองส่วนแยกออกจากกัน จึงทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 11 (ก) ในส่วนของแกรฟีนออกไซด์ (GO) ก็ถูกนำมาเป็นตัว quencher ตัวหนึ่ง จากรูป 11 (ข)

เป็นการอาศัยกระบวนการ FRET โดยในขั้นตอนแรกที่ยังไม่มีการเติมไอออนปรอท สายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกับหมู่ที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะติดบนผิวของแกรฟีนออกไซด์ จากนั้นเมื่อมีไอออนปรอทในระบบ สายของโพลิโกนิวคลีโอไทด์จะจับกับไอออนปรอทและหลุดจากพื้นผิว ส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้นนอกจากนี้อุณหภูมิของสัญญาณก็ยังสามารถนำมาใช้เป็นตัว quencher ภาพที่ 11 (ค) เป็นการเปิดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์โดยใช้กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ เมื่อเติมไอออนปรอทลงไปในระบบสายที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับปรอทจะปล่อยอีกสายที่ต่อกันอยู่ ซึ่งสายที่หลุดไปจะเป็นสายที่มีการต่อกับตัวที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณ และอุณหภูมิของสัญญาณยังสามารถนำมาใช้เป็นตัว FRET sensor แสดงดังรูปที่ 11 (ง) การนำโพลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการให้สัญญาณมากขึ้น โดยเมื่อมีปรอทในระบบ จะมีการเปลี่ยนแปลงของสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ ส่งผลให้ระยะห่างระหว่างตัวที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เข้ามาใกล้กับพื้นผิวของอนุภาคนาโน และทำให้เกิดกระบวนการ FRET ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ลดลงตามปริมาณของไอออนปรอทที่เติมเข้าไป [26]

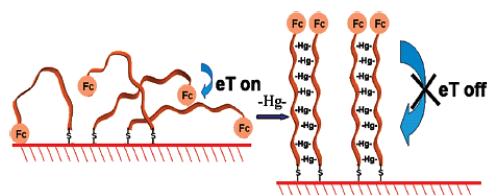


รูปที่ 11 แสดงแผนภาพของปรอทในการเหนี่ยวนำให้เกิด fluorescence quenching บนวัสดุนาโน โดยใช้การดูดซับของสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์บนพื้นผิวของ (ก) single wall nanotube (ข) แกรฟีนออกไซด์ (ค) และ (ง) อนุภาคนาโนทอง [26]

5. การวิเคราะห์สัญญาณทางไฟฟ้าเคมีของไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดโลหะ

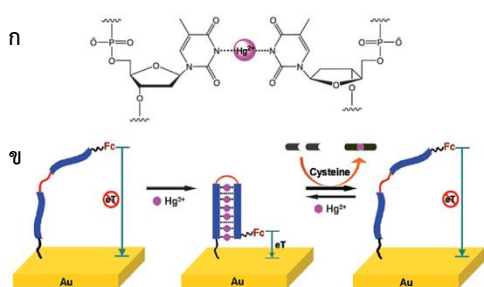
Jiang และคณะ [31] ได้สังเคราะห์พอลิไทมินที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของเฟอโรซีนตรึงอยู่บนขั้วอิเล็กโทรดทองคำใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอท (Hg^{2+}) เมื่อมีไอออนปรอท (Hg^{2+}) ใน

ระบบจะเกิดการเข้าคู่กันของสายพอลิไทมินส่งผลให้ไม่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากเฟอโรซีนไปยังขั้วอิเล็กโทรดทองคำ สัญญาณทางไฟฟ้าเคมีจึงลดลง แสดงดังรูปที่ 12



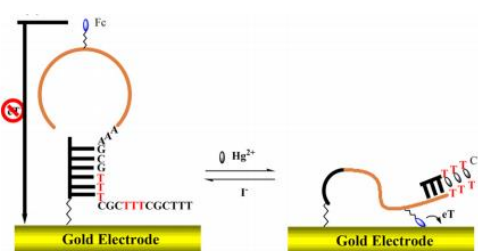
รูปที่ 12 แสดงกลไกในการตรวจวัดปรอท โดยใช้การเปลี่ยนรูปร่าง [31]

ในกรณีเดียวกัน Kim และคณะ [32] ได้นำพอลิไทมิน ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของเฟอโรซีน ซึ่งจะตรึงอยู่บนขั้วอิเล็กโทรดทองคำ แต่ลักษณะของพอลิไทมินจะมี 2 เส้นที่ต่อกันด้วยตัวเชื่อม เพื่อให้เมื่อสายพอลิไทมินถูกเหนี่ยวนำด้วยปรอทจะทำให้ส่วนที่เป็นโมเลกุลของเฟอโรซีน จะเข้าใกล้อิเล็กโทรดทองคำมากขึ้นทำให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ (electron transfer) สัญญาณทางไฟฟ้าเคมีก็จะเพิ่มสูงขึ้น และยิ่งไปกว่านั้นเซนเซอร์นี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (reusable) โดยการเติม cysteine แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 (ก) รูปแบบการจับกันของ T-Hg²⁺-T และ (ข) แผนภาพแสดง electrochemical sensor สำหรับตรวจวัดปรอท [32]

นอกจากนั้นแล้ว Tang และคณะ [33] ได้การใช้ประโยชน์ของรูปร่างแฮร์พินในการสร้างเซนเซอร์ตรวจจับไอออนปรอท (Hg²⁺) ขึ้นมา ซึ่งใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะเป็นแฮร์พินตรึงอยู่บนขั้วอิเล็กโทรดทองคำและติดโมเลกุลของเฟอโรซีน (ไว้ตรงบริเวณ loop เมื่อมีปรอท เบสไทมินที่เจอกับเบสอีกตัวก็จะหันมาจับปรอทแทน ส่งผลให้เสียรูปแบบการเป็นแฮร์พินในส่วนของเฟอโรซีนจะมีการเลื่อนเข้ามาใกล้ขั้วอิเล็กโทรดทองคำมากขึ้น ทำให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ สัญญาณทางไฟฟ้าเคมีก็จะเพิ่มขึ้น) แสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แผนภาพแสดงการทำงานของเซนเซอร์ที่ถูกปรอทเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนรูปร่างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ [32]

6. สรุป

ไบโอเซนเซอร์เป็นการใช้สารชีวโมเลกุลมาประยุกต์เป็นตัวตรวจวัด ที่มีความไวสูง จำเพาะเจาะจง รวมไปถึงการใช้งานที่ง่าย สะดวก และราคาถูก โดยที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงในการวิเคราะห์ ซึ่งในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่นำไบโอเซนเซอร์ไปประยุกต์เพื่อให้เข้ากับการใช้งานในภาคสนาม โดยในบทความนี้ได้แสดงกรอบความคิดในการสร้างไบโอเซนเซอร์ ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป

7. เอกสารอ้างอิง

- [1] Martin, S., & Griswold, W. (2009, March). Environmental Science and Technology Briefs for Citizens. *Human Health Effects of Heavy Metals.*, 15, 1-6.
- [2] Verma, R., & Dwivedi, P. (2013). Heavy metal water pollution- a case study. *Sci. Technol.*, 5, 98-99.
- [3] Inoue, K.-i. (2013). Heavy metal toxicity. *Inoue, J Clinic Toxicol.*, 3, 7
- [4] Wang, B.-S., Lee, C.-P., & Ho, T.-Y. (2014). Trace metal determination in natural waters by automated solid phase extraction system and ICP-MS: the influence of flow level Mg and Ca. *Talanta.*, 128, 337–344.
- [5] Manousakas, M., Papaefthymiou, H., Eleftheriadis, K., & Katsanou, K. (2014). Determination of water-soluble and insoluble elements in PM_{2.5} by ICP-MS. *Sci. Total Environ.*, 493, 694-700.
- [6] Filipiak-Szok, A., Kurzawa, M., & Szlyk, E. (2015). Determination of toxic metals by ICP-MS in asiatic and European determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European. *J. Trace Elem. Med Biol.*, 30, 54–58.
- [7] Stanis, E., & Zgoła-GrzeŚkowiak, A. (2013). In situ metathesis ionic liquid formation dispersive liquid–liquid microextraction for copper determination in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta.*, 115, 178–183.
- [8] Zhao, S., Chen, F., Zhang, J., Ren, S., Liang, H., & a, S. L. (2015). On-line flame AAS determination of traces Cd(II) and Pb(II) in water samples using thiol-functionalized SBA-15 as solid phase extractant. *J. Ind. Eng. Chem.*, 27, 362–367.
- [9] Koesmawatia, T. A., Bucharib, B., Sulaeman, A., & Ibrahimc, S. (2015). Sample preparation methods for organic arsenic species (arsenobetain, $(\text{CH}_3)_3\text{As}+\text{CH}_2\text{COO}^-$) in tuna fish samples followed by HG-QFAAS, GF-AAS, and ICP-MS measurements. *Procedia. Chem.*, 17, 200 – 206.
- [10] Schooneveld, M. v., & DeBeer, S. (2015). A close look at dose: Toward L-edge XAS spectral uniformity, dose A close look at dose: Toward L-edge XAS spectral uniformity, dose. *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.*, 198, 31–56.
- [11] Torchio, R., Mathon, O., & Pascarelli, S. (2014). XAS and XMCD spectroscopies to study matter at high pressure: Probing the correlation between structure and magnetism in the 3d metals. *Coord. Chem. Rev.*, 277–278, 80–94.
- [12] Benounis, M., Jaffrezic-Renault, N., Halouani, H., Lamartine, R., & Dumazet-Bonnamour, I. (2006). Detection of heavy metals by an optical fiber sensor with a sensitive cladding including a new chromogenic calix[4]arene molecule. *Mater. Sci. Eng., C*, 26, 364 – 368.

- [13] Köse, M., Purtaş, S., Güngör, S. A., Ceyhan, G., Akgün, E., & McKee, V. (2015). A novel Schiff base: Synthesis, structural characterisation and comparative sensor studies for metal ion detections. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, 136, 1388–1394.
- [14] Serrano, N., González-Calabuig, A., & Valle, M. d. (2015). Crown ether-modified electrodes for the simultaneous stripping voltammetric determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II). *Talanta*, 138, 130–137.
- [15] Bontidean, I., Berggren, C., Johansson, G., Csoregi, E., Mattiasson, B., Lloyd, J. R., Brown, N. L. (1998). Detection of heavy metal Ions at femtomolar levels Using protein-based biosensors. *Anal. Chem.*, 70, 4162–4169.
- [16] Krizkovz, S., Huska, D., Beklova, M., Hubalek, J., Adam, V., Trnkova, L., & Kizek, R. (2010). Protein-based electrochemical biosensor for detection of silver(I) ions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29, 492–496.
- [17] Cheria, S., Gupta, R. K., Mullin, B. C., & Thundat, T. (2003). Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 411–416.
- [18] Yang, X., Xu, J., Tang, X., Liu, H., & Tian, D. (2010). A novel electrochemical DNAzyme sensor for the amplified detection of Pb²⁺ ions. *Chem. Commun.*, 46, 3107–3109.
- [19] Lan, T., Furuya, & Lu, Y. (2010). A highly selective lead sensor based on a classic lead DNAzyme. *Chem. Commun.*, 46, 3896–3898.
- [20] A. L., N., L., D., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger*. New York: Worth Publishers.
- [21] Liu, C.-W., Hsieh, Y.-T., Huang, C.-C., Lina, Z.-H., & Chang, H.-T. (2008). Detection of mercury(II) based on Hg²⁺–DNA complexes inducing the aggregation of gold nanoparticles. *Chem. Commun.*, 2242–2244.
- [22] Memon, A. G., Zhou, X., Uu, J., Wang, R., Liu, L., Yu, B., Shi, H. (2017). Utilization of unmodified gold nanoparticles for label-free detection of mercury (II): Insight into rational design of mercury-specific oligonucleotides. *J. Hazard. Mater.*, 321, 417–423.
- [23] Wang, L., Liu, X., Hu, X., Song, S., & Fan, C. (2006). Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers. *Chem. Commun.*, 3780–3782.
- [24] Wang, Y., Yang, F., & Yang, X. (2010). Colorimetric detection of mercury(II) Ion using unmodified silver nanoparticles and mercury-specific oligonucleotides. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2, 339–342.

- [25] Huy, G. D., Zhang, M., Zuo, P., & Ye, B.-C. (2011). Multiplexed analysis of silver(I) and mercury(II) ions using oligonucleotide-metal nanoparticle conjugates. *Analyst*, 136, 3289–3294
- [26] Li, L., Wen, Y., Li X., Q. X., Song, S., Zuo, X., Yan, J., Liu, G. (2016). Development of mercury(II) ion biosensors based on mercury-specific oligonucleotide probes. *Biosens. Bioelectron.*, 75, 433–445.
- [27] He, F., Tang, Y., Wang, S., Li, Y., & Zhu, D. (2005). Fluorescent Amplifying Recognition for DNA G-quadruplex folding with a cationic conjugated polymer: a platform for homogeneous potassium detection. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 12343–12346.
- [28] Tang, Y., He, F., Yu, M., Feng, F., An, L., Sun, H., . . . Zhu, D. (2006). A reversible and highly selective fluorescent sensor for mercury(II) using poly(thiophene)s that contain thymine moieties. *Macromol. Rapid Commun.*, 27, 389–392.
- [29] Chiang, C.-K., Huang, C.-C., Liu, C.-W., & Chang, H.-T. (2008). Oligonucleotide-based fluorescence probe for Sensitive and selective detection of mercury(II) in aqueous solution. *Anal. Chem.*, 80, 3716–3721.
- [30] Huang, C.-C., & Chang, H.-T. (2008). Aptamer-based fluorescence sensor for rapid detection of potassium ions in urine. *Chem. Commun.*, 1461–1463.
- [31] Liu, S.-J., Nie, H.-G., Jiang, J.-H., Shen, G.-L., & Yu, R.-Q. (2009). Electrochemical sensor for mercury(II) based on conformational switch mediated by Interstrand Cooperative Coordination. *Anal. Chem.*, 81, 5724–5730.
- [32] Han, D., Kim, Y.-R., Oh, J.-W., Kim, T. H., Mahajan, R. K., Kim, J. S., & Kim, H. (2009). A regenerative electrochemical sensor based on oligonucleotide for the selective determination of mercury(II). *Analyst*, 134, 1857–1862.
- [33] Zhuang, J., Fu, L., Tang, D., Xu, M., Chen, G., & Yang, H. (2013). Target-induced structure-switching DNA hairpins for sensitive electrochemical monitoring of mercury(II). *Biosens. Bioelectron.*, 39, 315–319.