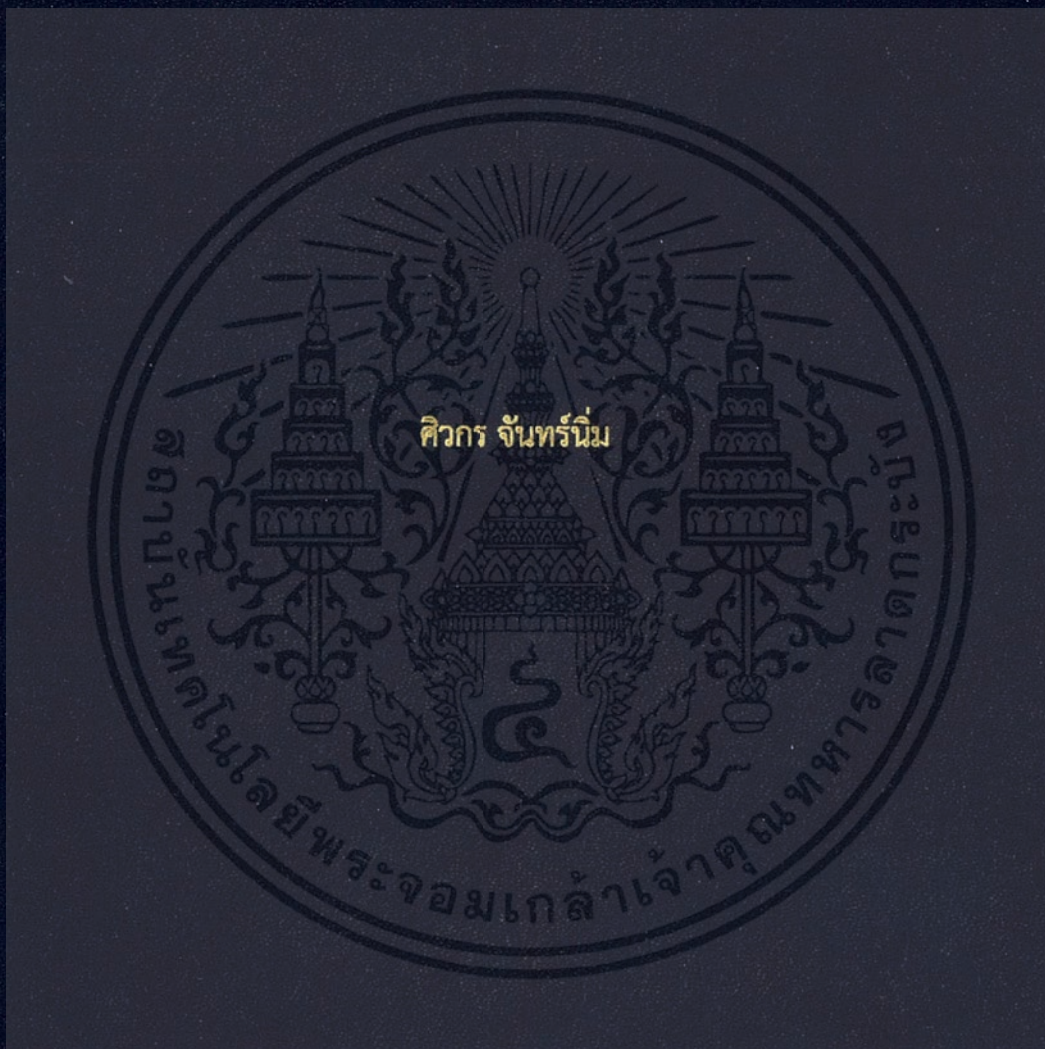


การศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนซิลิกาที่เชื่อมต่อกับแอนติเจน
ไมโคแบคทีเรียทูเบอร์คิวโลซิสต่อการกระตุ้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

การศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนซิลิกาที่เชื่อมต่อกับแอนติเจน
โมโคแบคทีเรียทูเบอร์คิวโลซิสต่อการกระตุ้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Particle Size of Silica Nanoparticles on Conjugation of Mycobacterium
Tuberculosis (*M.tb*) Antigens on Eliciting Immunoreaction *in vitro*



A REPORT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF CHEMICAL ENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์เรื่อง การศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนซิลิกาที่เชื่อมต่อกับแอนติเจนไมโค
แบคทีเรียทูปเบอร์คิวโลซิสต่อการกระตุ้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง
โดย นาย ศิวกร จันทร์น้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธีรพร สุธีวงศ์
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปริญญานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อ	การศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนซิลิกาที่เชื่อมต่อกับแอนติเจนโมโคแบคทีเรียทูเบอร์คิวโลซิสต่อการกระตุ้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง
นักศึกษา	ศิวกร จันทรนิ่ม
รหัสนักศึกษา	58011220
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ธีรพร สุธีวงศ์

บทคัดย่อ

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานว่าประชากรจำนวน 1 ใน 3 ของประชากรโลกนั้นมีพาหะของเชื้อวัณโรค ซึ่งประชากรที่มีเชื้อวัณโรคแฝงเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักในการแพร่กระจายเชื้อดังกล่าว ในปัจจุบัน การตรวจวัณโรคสามารถกระทำได้โดยวิธี Tuberculin Skin Test และ Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) Test แต่วิธีทั้งสองยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของความสะดวกในการใช้งานและค่าใช้จ่าย ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาชุดตรวจวัณโรคแฝงที่มีราคาย่อมเยา มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ IGRA Test และมีความจำเพาะกับวัคซีน BCG งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนซิลิกา (Silica, SiO₂) ที่ผ่านการปรับหมู่ฟังก์ชันต่อการนำไปคอนจูเกตกับโปรตีนไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin, PHA) และเพื่อหาขนาดอนุภาค SiO₂ ที่ดีที่สุดในการคอนจูเกตกับโปรตีน PHA นั้น โดยศึกษาอนุภาคทั้งหมด 3 ขนาด คือ 100 300 และ 450 nm จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคขนาด 100 nm สามารถดูดซับโปรตีน PHA ได้ในปริมาณมากที่สุด และการดูดซับนั้นมีลักษณะเป็นไปตามแบบจำลอง Langmuir-Freundlich adsorption isotherm ซึ่งแสดงถึงการดูดซับของ PHA แบบ monolayer เมื่อความเข้มข้นของ PHA ต่ำ และ แบบ multilayer เมื่อความเข้มข้นของ PHA สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of Particle Size of Silica Nanoparticles on Conjugation of Mycobacterium Tuberculosis (<i>M.tb</i>) Antigens on Eliciting Immunoreaction <i>in vitro</i>
Student	Sivakorn Junnim
Student ID	58011220
Degree	Bachelor of Engineering
Program	Chemical Engineering
Year	2018
Advisor	Asst. Prof. Dr. Teeraporn Suteewong

ABSTRACT

According to World Health Organization, one third of the world's population are infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*). This large population of latent tuberculosis infection (LTBI) constitutes a major source of infection and onward transmission. Current standard diagnostic tests of LTBI are the tuberculin skin test (TST) and interferon gamma release assays (IGRA). Yet they both have several limitations. There is an urgent need for a more convenient and affordable alternative detection approach. Here we aim to develop low cost latent tuberculosis test kit which is as efficient as IGRA test kit and highly specific for Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination-independent diagnosis of LTBI, using functionalized silica nanoparticles (SiO_2 NPs) as nanosensor. To maximize binding efficiency between the antigen and antibody, the effect of particle size of SiO_2 NPs on adsorption of Phytohemagglutinin (PHA) was investigated. Among 3-different sizes (100, 300 and 450 nm) studied, 100-nm SiO_2 NPs can adsorb the largest amount of antigen. Its adsorption behavior corresponds to the Langmuir-Freundlich adsorption isotherm model, suggesting the multilayer adsorption of PHA.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความอนุเคราะห์ข้อมูล ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นและแนวทางในการให้คำปรึกษาจาก ผศ.ดร.ธีรพร สุธีวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร.จิราพร ลีลาวัฒน์ชัย นักวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมถึงกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ผศ.ศิริพันธ์ มุรธาธัญลักษณ์ และ ดร.ธชนันต์ สมานมุลย์

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และโครงการสร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโนโลยี (Young Scientist and Technologist Program: YSTP) ที่ให้โอกาสและทุนการศึกษามอบทุนเพื่อการศึกษาวิจัย แลกเปลี่ยนทัศนคติในภาคการผลิตและบริการร่วมกับนักวิจัยใน สวทช. ข้าพเจ้ารู้สึกภูมิใจเป็นอย่างมากที่ครั้งหนึ่งในชีวิตได้มีโอกาสทำงานวิจัยที่ สวทช ทำงานร่วมกับคนมีความสามารถมากมายและได้เป็นส่วนหนึ่งในนามของเด็กทุน สวทช. งานวิจัยชิ้นนี้จะสำเร็จไม่ได้หากขาดคำแนะนำและคำสอนจากพี่ๆทุกท่านในห้องปฏิบัติการนาโนโมเลกุลเป้าหมาย (TDI: Nano-Molecular Target Discovery) ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้ความรู้ต่างๆ รวมถึงแนะนำอบรมด้านความปลอดภัยในการทำงานภายในห้องทดลอง ตลอดจนการทำวิจัยของข้าพเจ้าจนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณจากใจจริง

ขอขอบพระคุณคุณอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ข้อมูลด้านวิชาการ เครื่องมือ และอุปกรณ์สิ่งอำนวยความสะดวกให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องและครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ที่ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน และขอบมอบให้ไว้แก่ผู้ที่สนใจใช้เป็นแนวทางในการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยและขยายต่อยอดการวิจัยนี้ เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยให้มีราคาถูกลงและมีประสิทธิภาพ

ศิวกร จันทรนิ่ม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VII
สัญลักษณ์.....	V
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มา และความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 Mycobacterium Tuberculosis.....	4
2.2 การติดเชื้อและการตรวจวินิจฉัยวัณโรคระยะแฝง.....	5
2.3 การประยุกต์ใช้ออนุภาคซิลิกา (SiO ₂) ในการตรวจโรค.....	9
2.4 แบบจำลองสมมูลการดูดซับ.....	10
2.5 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
บทที่ 3 ขั้นตอนการทดลอง.....	14
3.1 สารเคมี.....	14
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์.....	15
3.3 ขั้นตอนการทดลอง.....	16
3.4 ตรวจวิเคราะห์สมบัติ.....	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	20
4.1 ผลของแอมโมเนียต่อขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO ₂	20
4.2 ผลของอัตราการใช้สารตั้งต้น TEOS ต่อขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO ₂	21
4.3 ผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO ₂	22
4.4 การปรับหมู่ฟังก์ชันกับอนุภาค SiO ₂ ด้วย APTES.....	23
4.5 ผลการคอนจูเกตโปรตีน PHA กับอนุภาค NH ₂ - SiO ₂ ที่มีขนาดแตกต่างกัน.....	24
4.6 ผลของการดูดซับปริมาณโปรตีนของอนุภาค NH ₂ - SiO ₂ ที่มีขนาดแตกต่างกัน.....	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก.....	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ขนาดของอนุภาค SiO_2 ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน.....	9
ตารางที่ 4.1 สรุปตัวแปรที่มีผลต่อการสังเคราะห์ขนาดอนุภาค SiO_2	20
ตารางที่ 4.2 แสดงศักยภาพยึดตัวของอนุภาคก่อนและหลังติดหมู่เอมีน.....	23
ตารางที่ 4.3 สรุปความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบ.....	25
ตารางที่ 4.4 สรุปความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบ.....	27
ตารางที่ 4.5 สรุปความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบ.....	29
ตารางที่ 4.6 สรุปความเข้มข้นของ PHA ก่อนและหลังการดูดซับด้วย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm.....	30
ตารางที่ 4.7 ข้อมูลการศึกษาแบบจำลองของการดูดซับ PHA ด้วย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm pH 7.4.....	31
ตารางที่ 4.8 ข้อมูลการศึกษาแบบจำลองของการดูดซับ PHA ด้วย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm pH 7.4.....	31
ตารางที่ 4.9 ตัวแปร ค่า R^2 และค่า RMS จากแบบจำลองการดูดซับแบบ Langmuir แบบ Freundlich แบบ Redlich - Peterson และแบบผสม Langmuir - Freundlich สำหรับการดูดซับโปรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm.....	33
ตาราง A2.1 ผลการทดลองหาความค่าการดูดกลืนแสงของ supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm.....	43
ตาราง A2.2 ผลการทดลองหาความค่าการดูดกลืนแสงของ supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 แบคทีเรียก่อโรคในสกุล Mycobacterium.....	4
รูปที่ 2.2 กระบวนการการติดเชื้อวัณโรค.....	5
รูปที่ 2.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการทดสอบด้วยวิธี TST (B) และ IGRA (A,C และ D).....	6
รูปที่ 2.4 การสอบทูเบอร์คิวลินโดยฉีด PPD เข้าใต้ชั้นผิวหนัง.....	7
รูปที่ 2.5 การตรวจด้วยวิธี IGRA ในหลอดทดสอบ QuantiFERON-TB (QFT).....	8
รูปที่ 3.1 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อระหว่างอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ กับโปรตีน PHA.....	14
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเชื่อมต่อระหว่างอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ กับโปรตีน PHA.....	18
รูปที่ 4.1 รูป SEM ของอนุภาค SiO_2 ที่เตรียมโดยใช้ปริมาณแอมโมเนียต่างกัน ก) ตัวอย่างที่ 1 ปริมาณแอมโมเนีย 2.00 M ขนาดอนุภาค 219 ± 9 nm ข) ตัวอย่างที่ 2 ปริมาณแอมโมเนีย 2.70 M ขนาดอนุภาค 266 ± 5 nm และ ค) ตัวอย่างที่ 3 ปริมาณแอมโมเนีย 3.60 M ขนาดอนุภาค 284 ± 4 nm.....	21
รูปที่ 4.2 แสดงรูป SEM ของอนุภาค SiO_2 เตรียมในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ก) ตัวอย่างที่ 4 ได้ขนาดอนุภาค 100 ± 5 nm ใช้ตัวทำละลายเมทานอลและ ข) ตัวอย่างที่ 5 ขนาดอนุภาค 203 ± 7 nm ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและเอทานอล.....	22
รูปที่ 4.3 รูป SEM ของอนุภาค SiO_2 เตรียมที่อัตราการใส่สารตั้งต้น TEOS ต่างกัน ก) ตัวอย่างที่ 6 ได้ขนาดอนุภาค 423 ± 8 nm และ ข) ตัวอย่างที่ 7 ขนาดอนุภาค 1500 ± 52 nm ในตัวทำละลายเอทานอล.....	23
รูปที่ 4.4 แสดง FTIR สเปกตรัมของอนุภาค SiO_2 และอนุภาค SiO_2 ที่ถูกปรับปรุงที่ขนาดแตกต่างกัน (ก) อนุภาค SiO_2 100 nm (ข) อนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 100 (ค) อนุภาค SiO_2 450 nm และ (ง) อนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 450 nm.....	24
รูปที่ 4.5 แสดงแผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยวิธี Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ที่ pH 7.4 (ทุกตัวอย่างผสมกับสาร reducing agent และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 6 นาที) เลนที่ 1-5 คือ standard PHA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo-NHS ตามลำดับ เลนที่ 6-8 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ เลนที่ 9 คือ Precision Plus Protein standards.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.6 แสดงแผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยวิธี Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ที่ pH 7.4 (ทุกตัวอย่างผสมกับสาร reducing agent และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 6 นาที) ก) เลนที่ 1-6 คือ standard PHA ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo -NHS ตามลำดับ เลนที่ 7-9 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ เลนที่ 10 คือ Precision Plus Protein standards ข) เลนที่ 1-6 คือ standard PHA ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo -NHS ตามลำดับ เลนที่ 11-13 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:3, 1:12 และ 1:27 ตามลำดับ เลนที่ 14 คือ Precision Plus Protein standards.....	28
รูปที่ 4.7 แสดงแผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยวิธี Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 450 nm ที่สภาวะ pH เท่ากับ 7.4 (ทุกตัวอย่างผสมกับสาร reducing agent และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 6 นาที) เลนที่ 1-6 คือ standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo -NHS ตามลำดับ เลนที่ 7-12 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 450 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:24, 1:32 ตามลำดับ เลนที่ 13 คือ Precision Plus Protein standards.....	30
รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 100 nm และแบบจำลองการดูดซับแบบ Langmuir Freundlich Redlich – Peterson และ Langmuir-Freundlich.....	32
รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 300 nm และแบบจำลองการดูดซับแบบ Langmuir Freundlich Redlich – Peterson และ Langmuir-Freundlich.....	32
รูปที่ A1.1 Microplate reader ช่องที่ 1-6 standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL และ ช่องที่ 7-9 supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8 mg/mL และกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance กับ ความเข้มข้นของ standard PHA ความเข้มข้น 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL ตามลำดับ.....	41

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ A1.2 Microplate reader ช่องที่ 1-6 standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL และ ช่องที่ 7-9 supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:3, 1:12, 1:27 mg/mL และกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance กับ ความเข้มข้นของ standard PHA ความเข้มข้น 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL ตามลำดับ.....41

รูปที่ A1.3 Microplate reader ช่องที่ 1-6 standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL และ ช่องที่ 7-9 supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 450 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8 mg/mL และกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance กับ ความเข้มข้นของ standard PHA ความเข้มข้น 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL ตามลำดับ.....42



สัญลักษณ์

q_e	คือ ความจุของการดูดซับ (adsorption capacity)	mg/mg
C_i	คือ ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย ณ สภาวะเริ่มต้น,	mg/mL
C_e	คือ ความเข้มข้นของ ที่เหลืออยู่ในสารละลาย ณ สภาวะสมดุล,	mg/mL
V	คือ ปริมาตรของสารละลายที่มีโปรตีนละลายอยู่	mL
M	คือ มวลของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$	mg
$1/n$	คือ Heterogeneous factor	
K_f	คือ ค่าคงที่ของ Freundlich	
K_L	คือ ค่าคงที่ของ Langmuir	
k_R	คือ ค่าคงที่ของ Redish-Peterson	
β	คือ ค่าอันดับปฏิกิริยา exponential ของ Redish-Peterson	



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลกเป็นอันดับสองของโรคติดเชื้อทั้งหมด โดยองค์การอนามัยโลกได้ประมาณการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2555 ประชากร 2 พันล้านคน หรือ 1 ใน 3 ของประชากรโลกจะได้รับเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* หรือ *M.tb*) [1,2] อย่างไรก็ตามผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จะได้รับเชื้อวัณโรคแบบแฝง (Latent TB Infection หรือ LTBI) ซึ่งจะไม่แสดงอาการป่วยและไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ แต่ร้อยละ 10 ของประชากรที่ได้รับเชื้อวัณโรคแบบแฝง สามารถพัฒนาเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแพร่กระจาย (Active TB disease) หรือป่วยเป็นวัณโรคได้ในภายหลัง เชื้อวัณโรคสามารถแพร่กระจายผ่านการไอหรือจาม ส่งผลให้เกิดวงจรการแพร่เชื้อวัณโรคอย่างต่อเนื่องไปทั่วทุกภูมิภาคของโลกโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาหรือประเทศที่ระบบสาธารณสุขไม่เพียงพอ ในทวีปเอเชียประเทศที่มีอัตราผู้ติดเชื้อสูง ได้แก่ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย เวียดนาม และไทย ซึ่งประเทศไทยติดอันดับในกลุ่ม 14 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคสูง ทั้งวัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) วัณโรคที่มีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วย (HIV-associated TB หรือ TB/HIV) และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant *M. tuberculosis* หรือ MDR-TB) โดยประเทศไทยได้กำหนดแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560-2564 มีเป้าประสงค์เพื่อลดอุบัติการณ์วัณโรคให้เหลือ 88 คนต่อประชากรแสนคนภายในปี พ.ศ. 2564 เครื่องมือสำคัญในการขับเคลื่อนแผนงานวัณโรคให้ได้ตามเป้าหมาย คือการพัฒนาเทคโนโลยีด้านการตรวจ วินิจฉัย การรักษา และการป้องกันตามเป้าหมายที่องค์การอนามัยโลกได้ตั้งไว้ [1]

วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง คือการทดสอบทางผิวหนัง (Tuberculin skin test หรือ TST) ซึ่งเป็นการฉีดโปรตีนที่สกัดจากเชื้อวัณโรคที่เลี้ยงไว้ (Purified protein derivative หรือ PPD) [2] ลงไปที่ผิวหนังบริเวณท้องแขนของผู้รับการทดสอบ ผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงหรือผู้ที่เคยได้รับเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายแต่ไม่ได้แสดงอาการป่วยจะเกิดปฏิกิริยาตอบสนองชนิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินแบบช้า (Delayed-type hypersensitivity) [3] ทำให้ผิวหนังในตำแหน่งที่ฉีดยานูนขึ้น โดยปฏิกิริยาตอบสนองจะเกิดมากที่สุดประมาณ 48-72 ชั่วโมงภายหลังการฉีดโปรตีนสกัด (PPD) แต่การตรวจด้วยวิธีทดสอบทางผิวหนัง นั้นมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขาดความจำเพาะต่อโรควัณโรค และมีความคลาดเคลื่อนสูง โดยเฉพาะผู้เข้ารับการทดสอบที่เคยได้รับวัคซีนบีซีจี (*Bacille Calmette-Guérin* หรือ BCG) มาก่อน ซึ่งจากสถิติ 99% ของคนไทยเคยได้รับวัคซีนดังกล่าว [1] อีกทั้งการทดสอบยังทำได้ยาก บุคลากรที่ทำการตรวจต้องผ่านการฝึกฝนจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชำนาญในเทคนิคการฉีดสารเข้าสู่ชั้นผิวหนัง อีกหนึ่งวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการ คือการตรวจทางเลือด (Immune-based blood test) หรือ Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) ซึ่งเป็นการตรวจระดับอินเทอร์เฟอรอน แกมมา (Interferon gamma) ที่เม็ดเลือดขาวปล่อยออกมาจากเซลล์ เมื่อมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเลือดของผู้เข้ารับการตรวจด้วย antigen ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค ทำให้ผู้เข้ารับการตรวจที่เคยได้รับวัคซีนบีซีจีสามารถถูกทดสอบได้ แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงหลายขั้นตอน และใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนาน เป็นอุปสรรคในพื้นที่ห่างไกลที่ขาดแคลนทรัพยากรทางสาธารณสุข ทำให้ชุดตรวจนี้ถูกใช้ในวงจำกัด

ในปัจจุบันงานวิจัยด้านการแพทย์ได้ให้ความสนใจในการศึกษาความสามารถในการดูดซับของโปรตีนหรือเปปไทด์ลงบนพื้นผิวของอนุภาคซิลิกาเพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจทางการแพทย์ [4] มีงานวิจัยที่นำวัคซีนมาเคลือบบนผิวอนุภาคนาโนซิลิกาเพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซับบนพื้นผิวและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นแนวทางในการออกแบบเครื่องมือในการตรวจจับและใช้งานด้านการแพทย์ [5] ซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการตรวจพบและรักษาโรคได้เพิ่มมากขึ้น

จากแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจทางการแพทย์ที่นำความสามารถในการดูดซับ สารของอนุภาคซิลิกาและข้อจำกัดในการวินิจฉัยโรควัณโรคในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาผลของขนาดอนุภาคซิลิกาต่อการติดโปรตีนไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin, PHA) ศึกษาพฤติกรรมดูดซับของโปรตีน PHA โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายพฤติกรรมดูดซับของโปรตีน PHA ลงบนอนุภาคซิลิกาที่มีขนาดแตกต่างกัน งานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การต่อยอดพัฒนาชุดตรวจวัณโรคระยะแฝง IGRA ให้มีประสิทธิภาพในการแสดงผลตรวจให้มีความถูกต้องแม่นยำ และราคาถูก

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin, PHA) บนอนุภาคนาโนซิลิกาที่ปรับหมู่ฟังก์ชันด้วย 3-อะมิโนโพลีฟอสเฟตไตรเอทอริกซีไลเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)
2. ศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนซิลิกาต่อการคอนจูเกต PHA

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิกาที่มีขนาด 100 300 และ 450 นาโนเมตร
2. ปรับหมู่ฟังก์ชันบนผิวของอนุภาคนาโนซิลิกาด้วย 3-อะมิโนโพลีฟอสเฟตไตรเอทอริกซีไลเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) และตรวจสอบสมบัติของอนุภาคนาโนซิลิกาก่อนและหลังการปรับปรุงหมู่ฟังก์ชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาการคอนจูเกตระหว่างอนุภาคนาโนซิลิกากับโปรตีนไฟโตฮีแมกกลูตินิน(Phytohemagglutinin, PHA) และตรวจสอบการคอนจูเกตด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส SDS-PAGE และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader
4. ศึกษาการดูดซับ PHA บนอนุภาคนาโนซิลิกาที่ขนาดแตกต่างกัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะผลที่ได้จะถูกพัฒนาไปใช้ในการสร้างชุดตรวจเชื้อวัณโรคแฝง และหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยเกี่ยวกับวัณโรคในประเทศไทยต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Mycobacterium Tuberculosis [1]

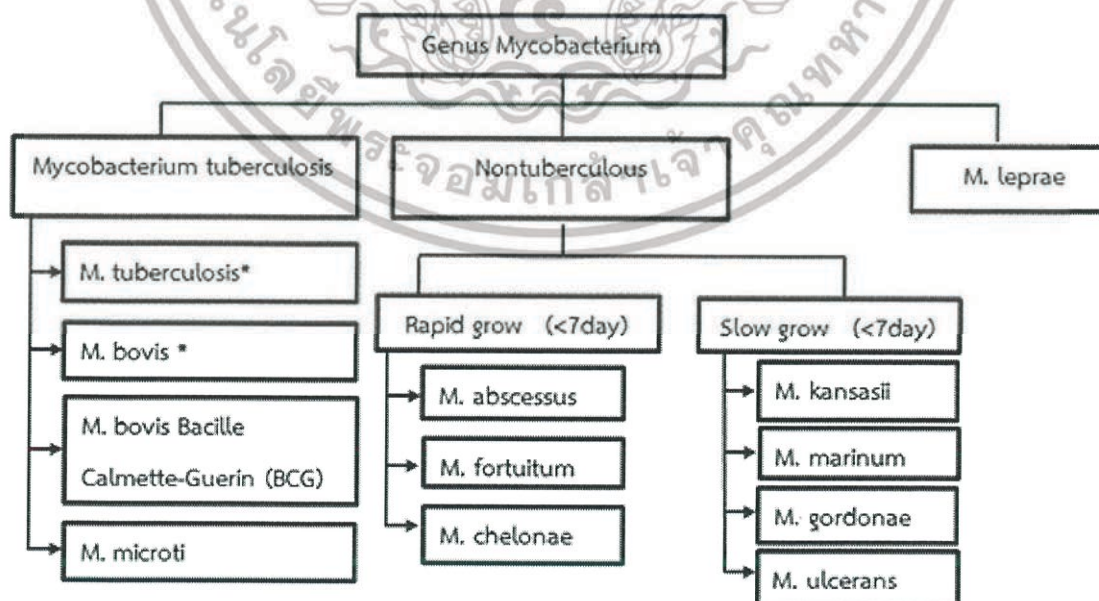
วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* หรือ *M.tb* ส่วนที่สำคัญของผนังเซลล์ประกอบไปด้วยกรด mycolic ซึ่งเป็นกรดไขมัน ต่อกันเป็นสายยาวทำให้เชื้อในจินตนี้มีคุณสมบัติติดสีและทนกรด วัณโรคเกิดได้ในทุกอวัยวะของร่างกาย ส่วนใหญ่มักเกิดที่ปอด (ร้อยละ 80) ซึ่งสามารถแพร่เชื้อได้ง่าย วัณโรคนอกปอดอาจพบได้ในอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ เยื่อหุ้ม ปอด ต่อม้ำเหลือง กระดูกสันหลัง ข้อต่อ ช่องท้อง ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์และระบบประสาท เป็นต้น

เชื้อ *Mycobacterium* แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) เป็นสาเหตุของเชื้อวัณโรคในคน และ สัตว์มี 8 สายพันธุ์แต่ที่พบบ่อยสุดคือ *Mycobacterium tuberculosis* และ *Mycobacterium bovis* มักก่อให้เกิดโรคในโค ซึ่งอาจติดต่อมาถึงคนได้ และเป็นสายพันธุ์ที่นำมาผลิตเป็นวัคซีน BCG ในเวลาต่อมา

2.1.2 Nontuberculous mycobacteria (NTM) เป็นเชื้อชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค มีจำนวนมากกว่า 140 สายพันธุ์ เช่น *Mycobacterium avium complex* พบในสิ่งแวดล้อม ดิน และน้ำ ไม่ก่อโรคในคน

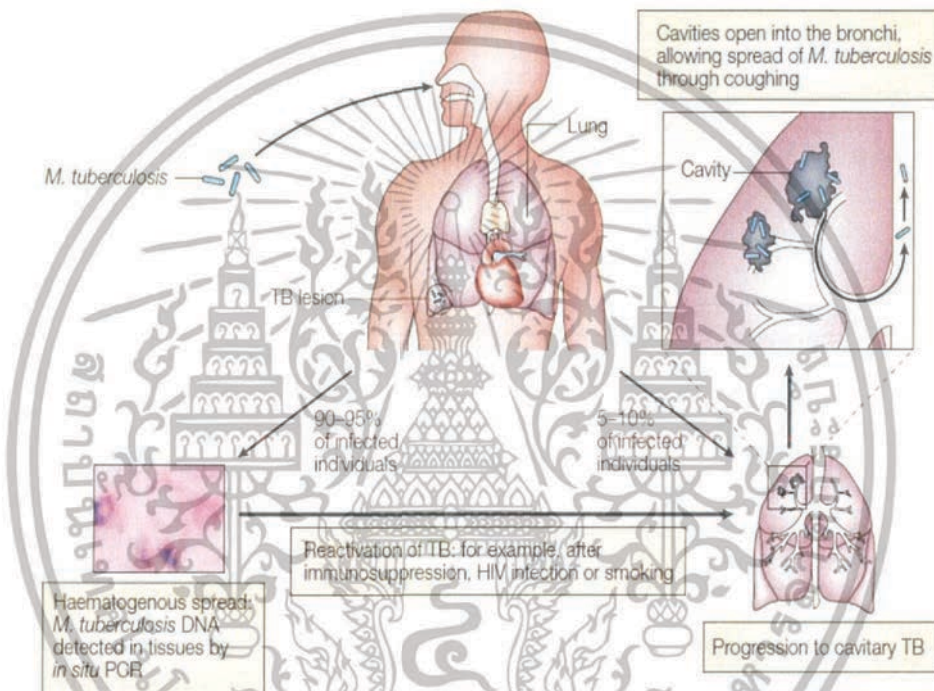
2.1.3 *Mycobacterium leprae* เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน



รูปที่ 2.1 แบคทีเรียก่อโรคในสกุล *Mycobacterium* [1]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบรรดาเชื้อ *M.tb* ทั้ง 3 ประเภท กลุ่มที่ก่อโรคในคนมีอัตราการแบ่งตัวที่ช้า และสามารถหลบอยู่ภายใน macrophage ได้ วัณโรคแพร่สู่บุคคลข้างเคียงได้โดยเชื้อวัณโรคติดไปกับละอองฝอยซึ่งเกิดจากการไอของผู้ป่วย ละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตรจะแขวนลอยอยู่ในอากาศและอาจถูกหายใจเข้าไปสู่หลอดลมส่วนปลาย ส่วนละอองฝอยขนาดใหญ่มักตกลงสู่พื้นดิน และถูกทำลายได้ด้วยแสงแดดหรือแสงอุลตราไวโอเลต หลังจากเชื้อวัณโรคเข้าสู่ปอด จะมี 2 ระยะ คือ 1) Latent phase: เชื้อมีชีวิตอยู่ภายใน granuloma ในเนื้อปอด ผู้ป่วยไม่แสดงอาการ และ 2) Active phase: เชื้อแพร่กระจายไปทั่วปอดหรือเนื้อเยื่อต่างๆ ผู้ป่วยแสดงอาการของวัณโรค ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการการติดเชื้อวัณโรค [2]

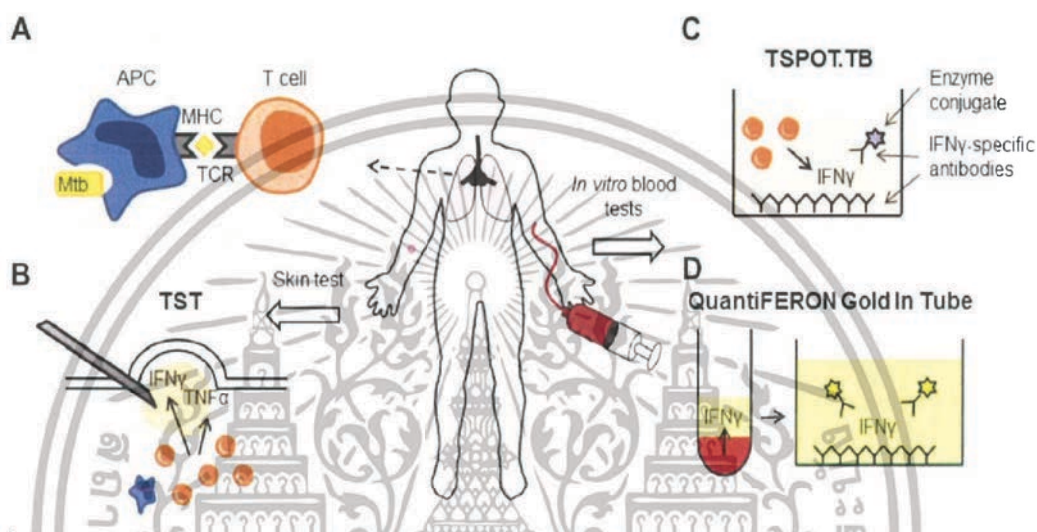
2.2 การติดเชื้อและการตรวจวินิจฉัยวัณโรคระยะแฝง (Infection and Diagnosis Latent TB infection) [1]

ผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงไม่แสดงอาการป่วย และไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ จึงไม่จัดว่าเป็นผู้ป่วยวัณโรคแต่เกิดจากร่างกายมีการติดเชื้อ *M.tb* เข้าสู่ร่างกาย รูปที่ 2.2 จะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดย macrophage และเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่นๆ จะทำลายหรือห่อหุ้มเชื้อไว้แล้วก่อตัวเป็น granuloma ซึ่งสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อวัณโรคได้ แต่หากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถกำจัดหรือควบคุมเชื้อได้ เชื้อวัณโรคจะแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ป่วยเป็นวัณโรคระยะ Active phase ได้ในภายหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคระยะแฝงในปัจจุบัน (Diagnosis of Latent TB Infection)

ปัจจุบันการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงสามารถตรวจได้ด้วยวิธีมาตรฐานทางการแพทย์ 2 วิธี คือ การทดสอบทางผิวหนัง หรือการทดสอบทูเบอร์คิวลิน Tuberculin skin test (TST) และการตรวจทางเลือด Interferon Gamma Release Assay (IGRA) ซึ่งเป็นการตรวจวัดระดับอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (Interferon gamma) ที่หลั่งออกมาจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)



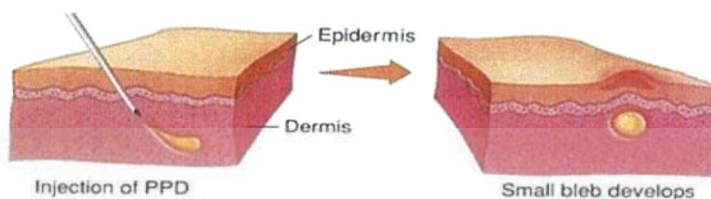
รูปที่ 2.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการทดสอบด้วยวิธี TST (B) และ IGRA (A,C และ D) [3]

1. การทดสอบทูเบอร์คิวลิน (Tuberculin Skin Test หรือ TST) [3]

ทูเบอร์คิวลินเป็นการทดสอบการติดเชื้อวัณโรคที่ใช้มานาน แม้ความจำเพาะไม่สูงนักแต่นิยมใช้เนื่องจากสะดวก ราคาถูกและใช้เวลาไม่นานในการทดสอบ ทำโดยการฉีดยาที่มีองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ *M.tb* เรียกว่า Purified protein derivative (PPD) โดยฉีด PPD ลงที่ผิวหนังบริเวณท้องแขนของผู้ได้รับการวินิจฉัย (Intradermal, Mantoux method) ดังแสดงรูปที่ 2.3 ซึ่งจะส่งผลให้ผู้ติดเชื้อวัณโรคแบบแฝงเกิดปฏิกิริยาตอบสนองชนิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินแบบช้า (delayed-type hypersensitivity) โดยเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ที่ครั้งหนึ่งเคยถูกกระตุ้นจากการติดเชื้อวัณโรคมาก่อนจะเคลื่อนมาในตำแหน่งที่ฉีดน้ำยา PPD และปล่อย lymphokines ชนิดต่างๆออกมาแสดงรูปที่ 2.4 มี fibrin มาสะสมและมี inflammatory cells ชนิดต่างๆเข้ามาสู่บริเวณนี้ ทำให้ผิวหนังในตำแหน่งที่ฉีดยานูนขึ้นมา โดยปฏิกิริยาตอบสนองจะเกิดมากที่สุดในช่วง 48-72 ชั่วโมงภายหลังการฉีด PPD

PPD เป็นสารผสมของ antigen มากกว่า 200 ชนิดซึ่งพบในเชื้อ *Mycobacterium* ชนิดอื่นๆ รวมทั้งชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Nontuberculous *Mycobacteria*) และชนิดที่ใช้เป็นวัคซีนป้องกัน BCG ดังนั้นถ้าผลของ TST เป็นบวกหมายรวมถึงผู้ถูกตรวจอาจเคยติดเชื้อ *M.tb* ชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเคยได้รับการฉีดวัคซีน BCG ป้องกันเชื้อวัณโรคมามาก่อน ยิ่งไปกว่านั้นคนที่ทำการตรวจต้องเป็นเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการฝึกฝนจนชำนาญในเทคนิคการฉีดสารเข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนัง จะเห็นได้ว่าการทดสอบ TST มีข้อจำกัดมาก ซึ่งรวมถึงคนไทย 99% ได้รับวัคซีน BCG มาตั้งแต่แรกเกิดจึงทำให้แปลผลยาก ไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่า ผลบวกของวิธีการตรวจแบบ TST นั้นเกิดจากวัคซีนป้องกันวัณโรคชนิด BCG ที่คนไทยทุกคนได้รับมาตั้งแต่เกิด หรือติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงอยู่จริง



รูปที่ 2.4 การสอบทูเบอร์คิวลินโดยฉีด PPD เข้าใต้ชั้นผิวหนัง [3]

2. การทดสอบ Interferon-gamma release Assays (IGRA) [3]

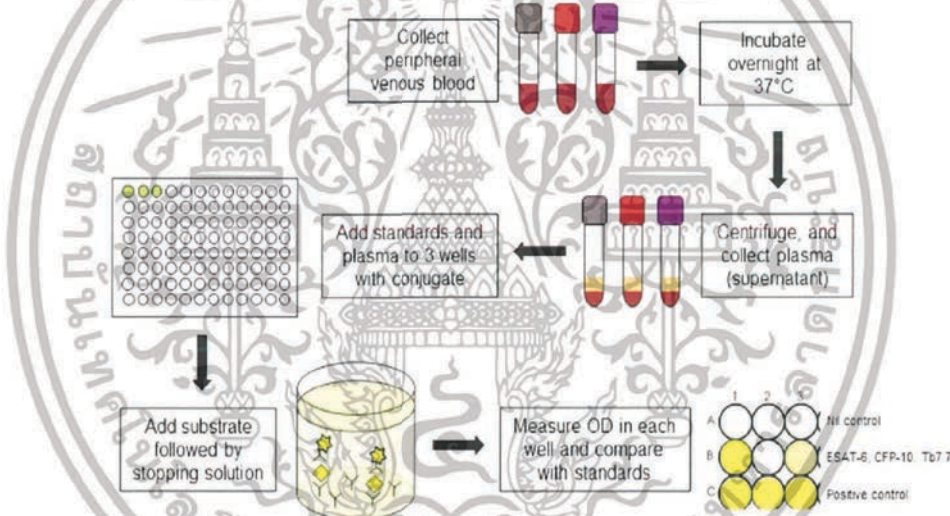
Interferon-gamma release assays (IGRA) เป็นการตรวจทางเลือด (Immune-based blood test) พัฒนาโดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and drug administration) เป็นวิธีทดสอบผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง โดยใช้ตัวอย่างเลือดของคนไข้มาแยกเม็ดเลือดขาวเพื่อทำปฏิกิริยากับ antigen ที่จำเพาะกับเชื้อ *M.tb* ในหลอดทดสอบ ติดตามผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยวัดระดับปริมาณ IFN- γ ที่หลั่งมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งชนิด CD4+, CD8+, T-cell และ lymphocyte โดย IFN- γ เป็นกลุ่มของโปรตีน cytokine ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ร่างกายเพื่อส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ให้ทำงานประสานกันอย่างสอดคล้อง และเรียกกระดุมเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เข้ามาสู่นอเยื่อที่ถูกโจมตีมากขึ้น ตามปกติ cytokine ที่หลั่งออกมาจะหลั่ง tumor necrosis factor- α (TNF- α) หรือ interleukin ชนิดต่างๆ ออกมาเช่นกัน ถ้า T-cell เคยถูกกระตุ้นโดยเชื้อวัณโรคมามาก่อนหรือคนที่เคยสัมผัสกับเชื้อ *M.tb* มาก่อนจนมีการสร้าง granuloma เกิดขึ้นในเนื้อปอดเป็นระยะแฝง (latent phase) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย antigen ที่จำเพาะกับเชื้อ *M.tb* ในชุดทดสอบ จะมีการหลั่งสาร cytokine ในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งจะบ่งชี้ว่าคนนั้นมีเชื้อวัณโรคแฝงปรากฏอยู่ในร่างกายโดยดูจากระดับ IFN- γ เป็นหลัก

จากการตรวจด้วยวิธี IGRA ในหลอด QuantiFERON-TB ดังแสดงรูปที่ 2.5 ประกอบด้วย 3 หลอด คือ หลอดควบคุม nil (ฝาสีเทา) หลอดบรรจุ antigen ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M.tb* (ฝาสีแดง) และหลอด Positive Control Mitogen (ฝาสีม่วง) (mitogen คือสารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะ สามารถกระตุ้น lymphocyte ให้แบ่งตัวโดยไม่ต้องมีความจำเพาะต่อ antigen ใดๆ สารที่นิยมใช้ได้แก่ Phytohemagglutinin (PHA)) เมื่อนำตัวอย่างเลือดของผู้ที่ติดเชื้อในหลอดทั้ง 3 หลอด ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อน centrifuge เพื่อแยกพลาสมา หรือ culture supernatant ซึ่งมี IFN- γ และ cytokine เป็นส่วนประกอบ จากนั้นวัดระดับ IFN- γ ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิค ELISA โดย IFN- γ ในพลาสมาจะถูกจับโดย antibody ที่จำเพาะต่อ IFN- γ ที่ถูกเคลือบไว้ที่ด้านล่างของ 96-well plate ไว้ก่อนแล้ว จากนั้นล้างเพื่อเอา IFN- γ ส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับ antibody ออก และเติม horse-radish peroxidase เพื่อต่อเชื่อมกับสาร IFN- γ เป็น sandwich ระหว่างโปรตีน 2 ชนิดขั้นตอนสุดท้ายเติม chromogen substrate ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีใสทำให้ทราบว่า มี IFN- γ ปรากฏอยู่ใน supernatant จริง และวัดความทึบแสง (Optical Density (OD)) ของสารผสมทั้งหมดเพื่อหาความเข้มข้นของ IFN- γ ต่อไป

วิธีการทดสอบในหลอดทดลองนี้ให้ความจำเพาะสูงกว่าการทดสอบการวัดรอยหนูที่ได้จากการทดสอบ TST โดยหลักการแล้ววิธีทดสอบ IGRA สามารถแยกได้ว่าติดเชื้อ *M.tb* หรือเป็นผลมาจากวัคซีน BCG ในอดีตหรือติดเชื้อ *M.tb* ตัวอื่นที่ไม่ใช่ *M.tb* ขึ้นกับ antigen ที่ใช้กระตุ้นเม็ดเลือดขาวในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตาม การตรวจทางเลือดนี้ต้องอาศัยกระบวนการที่มีหลายขั้นตอน ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่นาน ไม่สามารถนำไปใช้ในชุมชนหรือประเทศที่ยากจนได้ ทำให้เป็นชุดตรวจที่ถูกนำไปใช้ในวงจำกัดและไม่ค่อยแพร่หลายมาก



รูปที่ 2.5 การตรวจด้วยวิธี IGRA ในหลอดทดลอง QuantiFERON-TB (QFT) [3]

สำหรับประเทศไทย การวินิจฉัยของการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงสำหรับบุคคลทั่วไป ยังใช้การตรวจทางผิวหนังอยู่ (TST) เนื่องจากเป็นวิธีที่ราคาถูกและใช้เวลาไม่นานในการทดสอบ แต่การตรวจดังกล่าวมีความจำเพาะต่ำและไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่า ผลบวกของวิธีการตรวจแบบ TST นั้นเกิดจากวัคซีนป้องกันวัณโรคชนิด BCG ที่คนไทยทุกคนได้รับมาตั้งแต่เกิด หรือติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงอยู่จริง ดังนั้น กุญแจสำคัญที่จะสามารถป้องกันการแพร่กระจายและหยุดยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรค คือการพัฒนาวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ ทำได้ง่าย และราคาไม่แพง เพื่อให้ชุดตรวจสามารถเข้าถึงกลุ่มคนได้ทุกกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การประยุกต์ใช้อนุภาคซิลิกา (SiO₂) ในการตรวจโรค

การศึกษาผลของขนาดอนุภาคนาโนต่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจโรคถือเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักต่อการศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน อนุภาคที่มีขนาดใหญ่เข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านกระบวนการ phagocytosis ในทางกลับกันอนุภาคขนาดเล็กสามารถทำปฏิกิริยากับเซลล์และสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ด้วยกลไกหลากหลาย ยิ่งอนุภาคขนาดเล็กยิ่งมีผลต่อความสามารถในการถูกจับโดย phagocytic cell เช่น แมคโครฟาจ (Macrophage) ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ และเมื่ออนุภาคนาโนถูกจับจะกระตุ้นแมคโครฟาจผ่านระบบ signal transduction pathway และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบต่อไป [7]

ขนาดอนุภาคที่เล็กลงหมายถึงการเพิ่มสัดส่วนของพื้นผิวที่มากขึ้น เพิ่มความว่องไวในการทำปฏิกิริยามากขึ้นและง่ายต่อการเข้าไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต [9] จากการศึกษาพบว่าอนุภาคชนิดเดียวกันแต่มีขนาดแตกต่างกัน การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการกระตุ้นขึ้นกับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันทั่วไป (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันที่ปกป้องร่างกายแบบจำเพาะเจาะจง (Adaptive immunity) [10] การปรับหมู่ฟังก์ชันที่ผิว (Surface modification) นอกจากจะช่วยเพิ่มความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ยังมีผลอย่างมากต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาค SiO₂ กับเซลล์ หรือเพื่อเพิ่มการดูดซึม (Permeability) ของอนุภาคเข้าสู่เซลล์ พบว่า อนุภาค SiO₂ ที่มีประจุบวกจากเอมีนถูก macrophage จับได้มากกว่าอนุภาค SiO₂ ที่มีประจุลบและยังถูกดูดซับ (Adsorption) บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่าอนุภาคที่ถูกดัดแปลงให้มีประจุลบจากควอเตอร์บอกซิลิก [8]

ตารางที่ 2.1 ขนาดของอนุภาค SiO₂ ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

ขนาด (nm)	ตัวอย่างที่ศึกษา	ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน	เอกสารอ้างอิง
10 และ 100	เซลล์ Peripheral mononuclear (PBMCs)	จากการวิเคราะห์ Cytokine Analysis (TNF- α , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-1 β , และ IFN- γ): อนุภาคขนาด 10 และ 100 nm ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด IFN- γ ในระดับที่สามารถวัดได้	[11]
50 และ 500	Male Tuck-Ordinary mice	จากการทดลองพบว่า อนุภาค SiO ₂ ขนาด 50 nm ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์	[12]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ขนาดของอนุภาค SiO₂ ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (ต่อ)

ขนาด (nm)	ตัวอย่างที่ศึกษา	ผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน	เอกสารอ้างอิง
70, 300 และ 1000	BALB/c mice (หนูทดลอง สายพันธุ์ BALB/c)	จากการทดลองพบว่าอนุภาค SiO ₂ ขนาด 70 nm ส่งผลให้เกิดการอักเสบที่ตับของหนูทดลอง มากกว่าอนุภาค SiO ₂ ขนาด 300 กับ 1000 nm	[13]

มีงานวิจัยที่บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immunotoxicity) กับสมบัติทางกายภาพของอนุภาค SiO₂ ขนาดระดับนาโนเมตรจนถึงไมโครเมตรที่ถูกดัดแปลงสมบัติทางเคมีที่ผิว อนุภาค SiO₂ ระดับนาโนเมตรสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง tumor necrosis factor- α และ TNF- α เพิ่มขึ้น หลักจากถูกกระตุ้นด้วยอนุภาค SiO₂ พบว่าไม่ว่าอนุภาค SiO₂ จะถูกดัดแปลงพื้นผิวหรือไม่ถูกดัดแปลงล้วนมีส่วนสำคัญต่อการถูกฟาโกไซโตซิสด้วยแมคโครฟาจแทบทั้งสี่ จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงอนุภาค SiO₂ เป็นตัวช่วยเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อให้จุลินทรีย์แล้วยังเป็นตัวช่วยกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ทำลายจุลินทรีย์นั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ [14]

2.4 แบบจำลองสมดุลการดูดซับ (Adsorption Isotherm Model) [15]

แบบจำลองสมดุลการดูดซับหรือ “ไอโซเทอมการดูดซับ” สามารถอธิบายพฤติกรรมของการดูดซับและใช้คำนวณประสิทธิภาพการดูดซับของอนุภาค SiO₂ ที่มีขนาดแตกต่างกันได้ ไอโซเทอมการดูดซับนั้นเป็นการศึกษาและใช้ประโยชน์ในการคำนวณปริมาณของสารที่ถูกดูดซับที่สภาวะสมดุลของการดูดซับ การดูดซับเป็นกระบวนการที่สารที่ถูกดูดซับเคลื่อนที่จากเฟสหนึ่งไปยังขอบเขตของเฟสอื่นๆเป็นผลจากอันตรกิริยาระหว่างสารดูดซับ สารถูกดูดซับ และสารละลาย โดยมีแรงขับเคลื่อนหลังการดูดซับเป็นแรงดึงดูดระหว่างสารดูดซับและสารถูกดูดซับ ได้แก่ แรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (Electrical attraction) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waal forces) พันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonds) และพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonds) โดยสามารถหาความจุของการดูดซับ (Adsorption capacity) ของโปรตีนบนอนุภาค NH₂ - SiO₂ ได้จากความสัมพันธ์ตามสมการที่ (2.1)

$$q_e = (C_i - C_e) \times \frac{V}{M} \quad (2.1)$$

q_e คือ อัตราส่วนของปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับ (mg of protein) ต่อปริมาณของสารดูดซับ (mg of NH₂ - SiO₂) ที่สภาวะสมดุล หรือเรียกว่าความจุของการดูดซับ (Adsorption capacity), mg of protein/mg of NH₂ - SiO₂

C_i คือ ความเข้มข้นของโปรตีน (ตัวถูกดูดซับ) ในสารละลาย ณ สภาวะเริ่มต้น, mg/mL

C_e คือ ความเข้มข้นของโปรตีน (ตัวถูกดูดซับ) ที่เหลืออยู่ในสารละลาย ณ สภาวะสมดุล, mg/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

V คือ ปริมาตรของสารละลายที่มีโปรตีน (ตัวถูกดูดซับ) ละลายอยู่, mL

M คือ มวลของ $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ (ตัวดูดซับ), mg

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้วิเคราะห์ไอโซเทอมการดูดซับที่นิยมใช้คือ แบบจำลองของแลงเมียร์ (Langmuir Isotherm) แบบจำลองของฟรุนดริช (Freudlich Isotherm) และแบบจำลองของเรดลิค-เพเทอร์สัน (Redlich – Peterson Isotherm)

2.4.1 Langmuir Isotherm

แบบจำลองของแลงเมียร์ (Langmuir Isotherm) ตั้งสมมติฐานว่ากลไกการดูดซับเกิดขึ้นบนพื้นผิวของอนุภาคแบบชั้นเดียว (Monolayer) มีความสม่ำเสมอ (Homogeneous) และตำแหน่งการดูดซับของสารที่ถูกดูดซับแน่นอน การสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลของสารถูกดูดซับกับสารดูดซับใช้พลังงานเท่ากัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารถูกดูดซับในเฟสของสารละลายสูงขึ้น สารดูดซับจะสามารถดูดซับจนกระทั่งอิ่มตัวอย่างสมบูรณ์ จุดที่ความเข้มข้นของสารถูกดูดซับสูงกว่านี้จะไม่เกิดการดูดซับสารใดๆอีก คือ จุดที่มีความจุของการดูดซับสูงสุด แบบจำลองของแลงเมียร์ (Langmuir Isotherm) แสดงดังสมการที่ (2.2)

$$q_e = \frac{q_M K_L C_e}{(1 + K_L C_e)} \quad (2.2)$$

q_e คือ ปริมาณสารที่ถูกดูดซับต่อปริมาณของสารดูดซับ ณ สภาวะสมดุล หรือความจุของการดูดซับ (Adsorption capacity)

q_M คือ ความจุของการดูดซับสูงสุด (Maximum adsorption capacity), mg/ml

C_e คือ ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับที่เหลืออยู่ในสารละลาย ณ สภาวะสมดุล, mg/ml

K_L คือ ค่าคงที่ความร้อนของการดูดซับ (Heat adsorption)

2.4.2 Freundlich Isotherm

แบบจำลองของฟรุนดริช (Freudlich Isotherm) ลักษณะของไอโซเทอมนี้คือ สารที่ถูกดูดซับจะไม่เรียงตัวเป็นแบบชั้นเดียว เมื่อความเข้มข้นตัวถูกดูดซับเพิ่มขึ้น การดูดซับยังคงสามารถดำเนินต่อไปได้อย่างไม่จำกัด (Multilayer) บนพื้นผิวของสารดูดซับ ดังสมการที่ (2.3) จากสมการพบว่า สารถูกดูดซับเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้นต่ำๆ

$$q_e = K_L C_e^{1/n} \quad (2.3)$$

q_e คือ ปริมาณสารที่ถูกดูดซับต่อปริมาณของสารดูดซับ ณ สภาวะสมดุล หรือความจุของการดูดซับ (Adsorption capacity)

C_e คือ ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับที่เหลืออยู่ในสารละลาย ณ สภาวะสมดุล, mg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K_L คือ ค่าคงที่ของ Freundlich

$1/n$ คือ อันดับของปฏิกิริยา

2.4.3 Redlich-Peterson Isotherm

แบบจำลองของเรดลิค-เพเทอร์สัน (Redlich – Peterson Isotherm) เป็นแบบจำลองที่พัฒนาจากสมมติฐานของแบบจำลอง Langmuir และ Freundlich ดังสมการที่ (2.4) สมการจะเปลี่ยนเป็นแบบจำลอง Langmuir ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารถูกดูดซับต่ำ แบบจำลองจะมีพฤติกรรมเป็น Langmuir แต่ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารถูกดูดซับเพิ่มสูงขึ้น แบบจำลองจะมีพฤติกรรมแบบ Freundlich โดยค่า β มีค่าอยู่ระหว่าง 0 กับ 1 ถ้าค่า β มีค่าเท่ากับ 1 สมการจะเปลี่ยนเป็นแบบจำลอง Langmuir

$$q_e = \frac{k_R C_e}{(1 + a_R C_e^\beta)} \quad (2.4)$$

k_R, a_R คือ ค่าคงที่ของ Redish-Peterson

β คือ ค่าอันดับปฏิกิริยา exponential

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tephanie Bone และ คณะ (2018) [16] ใช้อนุภาค SiO_2 ที่มีการดัดแปลงหมู่เอมีน มาคอนจูเกตกับแบคทีเรียโอฟาหรือฟาจ โดยเปรียบเทียบการคอนจูเกตนี้ กับอนุภาคที่มีการเชื่อมต่อกัน 2 แบบคือ การดูดซับทางกายภาพด้วยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (Physisorption) กับการดูดซับทางเคมีโดยทำการคอนจูเกต 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide และ N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) (Chemisorption) บนอนุภาค SiO_2 ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ 0.5 μm และ 1.8 μm ไมครอนตามลำดับ พบว่าวิธีการดูดซับทางเคมีทำให้ฟาจติดบนอนุภาค SiO_2 ได้แข็งแรงมากกว่าการดูดซับทางกายภาพ และอนุภาคขนาดเล็กคอนจูเกตกับฟาจได้น้อยกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ Qian-Long Wang และคณะ (2017) [17] ใช้อนุภาค SiO_2 ขนาด 100 nm ที่มีการดัดแปลงหมู่เอมีน มาคอนจูเกตกับโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) และ carbodiimide (EDC/NHS) เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจทดสอบชนิด Direct competitive ELISA 96-well plate ที่มีประสิทธิภาพและความไวสูง ให้โปรตีนมีสัดส่วนปริมาตรต่อพื้นผิวที่สูงมากขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยัมพันธ์ที่จำเพาะเจาะจงระหว่างโปรตีนและ antibody ดังนั้นสรุปได้ว่าอนุภาค SiO_2 เป็น stationary phase สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองของแอนติบอดีได้ เนื่องจากความสามารถในการดูดซับทางเคมี (Chemisorption) ของอนุภาค SiO_2 กับโปรตีน BSA ซึ่งสามารถเพิ่มเสถียรภาพให้กับโปรตีน BSA ได้ อีกทั้งอนุภาค SiO_2 มีสัดส่วนพื้นผิวต่อปริมาตรที่สูงจึงสามารถดูดซับโปรตีนได้เป็นจำนวนมากบนผิว (Therapeutic) Fenglin Hu และ คณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2018) [18] อนุภาค SiO_2 ที่ดีเมื่อถูกดัดแปลงสมบัติทางเคมีพื้นผิวและนำไปใช้ในร่างกายจะต้องไม่จับโปรตีนชนิดที่ไม่ต้องการ แต่สามารถจับกับสารชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย จึงมีการออกแบบอนุภาค SiO_2 ด้วยการคอนจูเกตโมเลกุลที่เป็นมีทั้งประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุลเดียวกันรวมกับหมู่ฟังก์ชันคาบออกซิติกกลายเป็นโมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ คือ $\text{SiO}_2\text{-ZWS/COOH}$ (Bi-functionalized silica nanoparticles) พบว่าสามารถต้านทานการจับกับโปรตีนที่ไม่ต้องการและมีความสามารถในการคอนจูเกตกับสารเป้าหมาย เป็นตัวพาสารชีวโมเลกุลได้ดีกว่า $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ ที่มีหมู่ฟังก์ชันเดียว สิ่งนี้จึงเป็นแนวทางใหม่ที่นำไปสู่การพัฒนากระบวนการวินิจฉัยโรค และกระบวนการรักษาได้

อย่างไรก็ตามงานวิจัยเพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยยังมีจำนวนจำกัด ดังนั้นเพื่อพัฒนาชุดตรวจให้สามารถใช้งานได้ง่ายและมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลของขนาดอนุภาค SiO_2 ต่อการนำไปเชื่อมต่อกับโปรตีน PHA ความสามารถในการดูดซับโปรตีนบนอนุภาค SiO_2 ที่มีขนาดแตกต่างกัน เพื่อที่จะเป็นความรู้ขั้นพื้นฐานสู่การนำไปพัฒนาชุดตรวจ ก่อนนำอนุภาคไปเชื่อมต่อกับ *M.tb* ที่มีความจำเพาะ และไปทดสอบด้วยวิธี IGRA ต่อไป

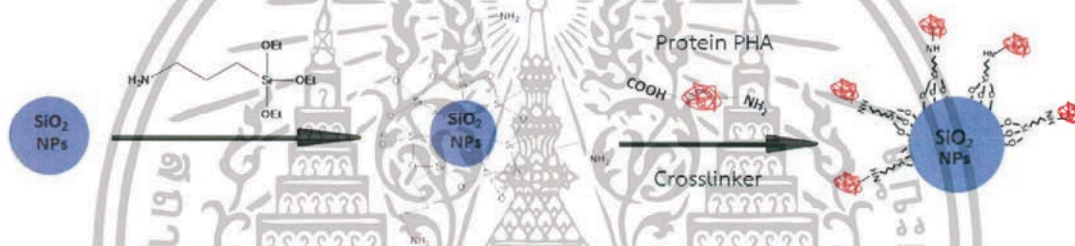


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

งานวิจัยนี้มุ่งใช้อนุภาค SiO_2 ที่ต่อกับ antigen เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคโดยช่วยให้เซลล์ร่างกายจดจำได้อย่างจำเพาะและดีขึ้น เริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาค SiO_2 ด้วยกระบวนการโซล-เจล โดยใช้ Tetraethyl orthosilicate เป็นสารตั้งต้นและ Ammonium hydroxide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยปรับปริมาณของสารตั้งต้น Tetraethyl orthosilicate เพื่อปรับขนาดของอนุภาค SiO_2 จากนั้นปรับหมู่ฟังก์ชันของอนุภาคที่เตรียมได้ด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane ก่อนนำไปติดโปรตีน PHA ผ่านปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีนบนอนุภาค SiO_2 กับหมู่คาร์บอกซิลิกบนโปรตีน แล้วศึกษาผลของขนาดอนุภาค SiO_2 ต่อการดูดซับของโปรตีน PHA



รูปที่ 3.1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ กับโปรตีน PHA

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI water)
2. เททระเอทิลออร์โทซิลิเกต (Tetraethyl orthosilicate, TEOS) 99% CAS: 78-10-4 ALDRICH Chemistry
3. 3-อะมิโนโพลีไตรเอทอโรกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) 99% CAS: 919-30-2 ALDRICH Chemistry
4. แอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide, NH_4OH) 30% CAS: 1336-21-6 PanReac AppliChem
5. เอทานอล (Ethanol, EtOH) 95%
6. เมทานอล (Methanol, MeOH)
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, KCl)
8. โทลูอีน (Toluene) 99.5%
9. Lectin from Phaseolus vulgaris (red kidney bean) 25mg Sigma-Aldrich
10. Phosphate Buffered Saline (PBS) 50TAB Sigma-Aldrich

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride EDC) 5g Thermo Scientific™
12. N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) 500 mg Thermo Scientific™
13. Tris-Glycine-SDS Buffer (TGS)
14. Precision Plus Protein Dual Color Standard 500uL Bio-Rad. U.S.A.
15. Tetramethylethylenediamine (TEMED) 99% Sigma-Aldrich
16. Ammonium persulfate (APS) Bio-Rad
17. Tris base
18. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 1kg Bio-Rad
19. Acrylamide 30% Bio-Rad
20. Coomassie blue Thermo Fisher Scientific

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ช้อนตักสาร (Spatula)
2. บีกเกอร์ (Beaker)
3. ไมโครปิเปต (Micro Pipette)
4. แท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic Bar)
5. Temperature-controlled magnetic stirrer
6. กระจกตวง (Cylinder)
7. ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask)
8. ขาตั้ง (Burette Stand) และตัวหนีบบิวเรต (Holder)
9. หลอดเหวี่ยงแยก (Centrifugal tube)
10. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Analytical balance)
11. เครื่องกระจายอนุภาค (Sonicator)
12. เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge)
13. ตู้อบ (Oven) และตู้อบสุญญากาศ (Vacuum oven)
14. กระจกสไลด์
15. Eppendorf ThermoMixer
16. Para film
17. Eppendorf Safe-Lock Tubes
18. Vortex Mixers
19. pH Meter
20. NanoDrop Spectrophotometers (ALLSHENG Model UD 2000C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส SDS-PAGE ชนิดแนวตั้ง สำหรับตรวจวิเคราะห์โปรตีน

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

ตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาค SiO_2

การสังเคราะห์อนุภาค SiO_2 ขนาด 100 nm

1. เตรียมอ่างน้ำให้ความร้อนโดยใช้เครื่อง Temperature-controlled magnetic stirrer ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C
2. เติม MeOH (11.46 mL) DI water (2.51 mL) และ NH_4OH (3.43 mL) ตามลำดับลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL ปั่นกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ขณะปั่นกวนผสมเติม TEOS (1.14 mL) ลงไปในสารละลายข้อ 2. อย่างรวดเร็ว และปั่นกวนต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำสารที่ได้มา Centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยก supernatant เพื่อล้างสารที่เหลือจากการปฏิกิริยาออก
5. ล้างด้วยตัวทำละลาย EtOH และทำการสั่นด้วยเครื่อง Sonicate เพื่อกระจายอนุภาค แล้วนำกลับไป Centrifuge ทำซ้ำ 3 ครั้ง
6. เก็บอนุภาคในตัวทำละลาย EtOH ที่อุณหภูมิ 4 °C

การสังเคราะห์อนุภาค SiO_2 ขนาด 300 nm

1. เตรียมอ่างน้ำให้ความร้อนโดยใช้เครื่อง Temperature-controlled magnetic stirrer ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C
2. เติม MeOH (3.870 mL) EtOH (0.700 mL) DI water (0.367 mL) และ NH_4OH (3.43 mL) ตามลำดับลงในขวดก้นกลมขนาด 15 mL ปั่นกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ขณะปั่นกวนเติม TEOS (0.19 mL) ลงไปในสารละลายข้อ 2. อย่างรวดเร็ว และปั่นกวนต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำสารที่ได้มา Centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยก supernatant เพื่อล้างสารที่เหลือจากการปฏิกิริยาออก
5. ล้างด้วยตัวทำละลาย EtOH และทำการสั่นด้วยเครื่อง Sonicate เพื่อกระจายอนุภาค แล้วนำกลับไป Centrifuge ทำซ้ำ 3 ครั้ง
6. เก็บอนุภาคในตัวทำละลาย EtOH ที่อุณหภูมิ 4 °C

การสังเคราะห์อนุภาค SiO_2 ขนาด 450 nm

1. ทำการเตรียมสารละลายที่ 1 โดยทำการเติมสาร EtOH (1.52 mL) DI water (0.14 mL) และ NH_4OH (0.24 mL) ใส่ใน Vial ขนาด 10 mL ปั่นกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
2. เตรียมสารละลาย KCl โดยการชั่ง KCl มา 60 mg ละลายในน้ำ 1 mL แล้วเติมลงในสารละลายที่เตรียมในข้อ 1.
3. ทำการเตรียมสารละลายที่ 2 โดยเติม TEOS (1.14 mL) และ EtOH (1.52 mL) ลงในขวดขนาด 5 mL ปั่นกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4. ทำการเติมสารละลายที่ 2 ลงในสารละลายที่ 1 ด้วยอัตรา 213.5 μL ทุก 10 นาที จนครบ 2 ชั่วโมง และปั่นกวนต่อเนื่อง 15 ชั่วโมง จากนั้น Centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกและล้างอนุภาค
5. ล้างด้วยตัวทำละลาย EtOH และทำการสั่นด้วยเครื่อง Sonicate เพื่อกระจายอนุภาค แล้วนำกลับไป Centrifuge ทำซ้ำ 3 ครั้ง
6. เก็บอนุภาคในตัวทำละลาย EtOH ที่อุณหภูมิ 4 °C

ตอนที่ 2 การปรับหมู่ฟังก์ชันที่ผิวอนุภาค SiO_2 ด้วย APTES

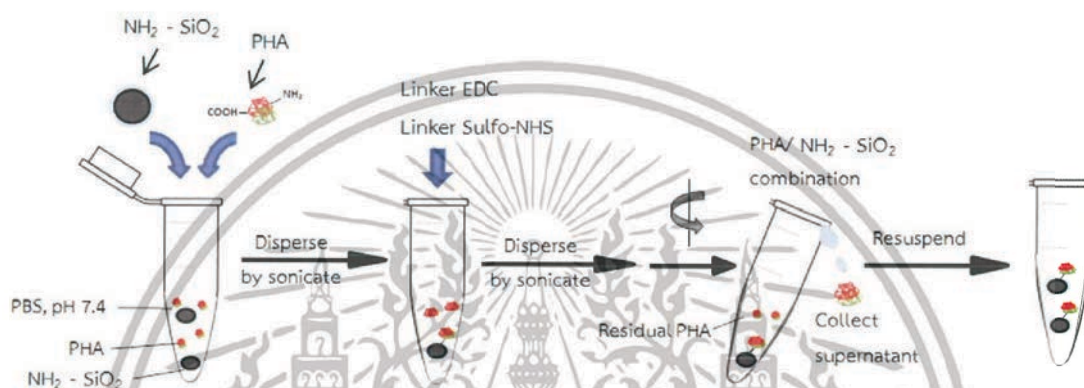
1. เตรียมอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 90 °C โดยใช้เครื่อง Temperature controlled magnetic stirrer
2. เติมสารละลาย SiO_2 ที่ได้จากการสังเคราะห์จากตอนที่ 1 ลงในขวด 5 mL และเติม APTES ตามลำดับ โดยที่สัดส่วน SiO_2 : APTES คือ 1 mg/mL : 0.23 $\mu\text{g/mL}$
3. ทำการ Reflux เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำอนุภาคที่ได้มา Centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก
5. ล้างด้วยตัวทำละลาย EtOH และทำการสั่นด้วยเครื่อง Sonicate เพื่อกระจายอนุภาค แล้วนำกลับไป Centrifuge ใหม่ ทำซ้ำ 3 ครั้ง
6. เก็บอนุภาค SiO_2 ที่มีการปรับหมู่ฟังก์ชันด้วยหมู่เอมีน ($\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$) ในเอทานอล 4 °C

ตอนที่ 3 การคอนจูเกตโปรตีนไฟโตฮีแมกกลูตินิน (PHA) บนอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$

1. เตรียมสารละลาย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่ต้องการเชื่อมต่อกับโมเลกุลโปรตีนให้มีความเข้มข้นต่างๆ 10 mg/mL ใน PBS pH 7.4
2. เตรียมสารละลายโปรตีน PHA ใน PBS ความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ pH 7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใส่สารละลายโปรตีน PHA ในข้อ 2 ลงในสารละลาย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ปรับปริมาตรด้วย PBS จากนั้นผสมใน sonicating bath
- เติม EDC ลงในสารผสมในขั้นตอนที่ 3 ให้ EDC มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 M
- เติม Sulfo-NHS ลงในปฏิกิริยาจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 mM
- ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วย sonicating bath ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- เก็บส่วนของเหลวใสออกด้วยวิธีการ Centrifuge



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเชื่อมต่อระหว่างอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ กับโปรตีน PHA

ตอนที่ 4 ศึกษาไอโซเทอมการดูดซับของ โปรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$

- เตรียมสารละลาย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่ต้องการเชื่อมต่อกับโมเลกุลโปรตีนให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL ใน PBS ที่ pH 7.4
- เตรียมสารละลายโปรตีน PHA ในบัฟเฟอร์ PBS ความเข้มข้น 10 mg/mL ที่ pH 7.4
- ใส่สารละลายโปรตีน PHA ในข้อ 2 ลงในสารละลาย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีน PHA เป็น 0.25 0.5 1 1.5 และ 2 mg/mL ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วย PBS จากนั้นผสมใน sonicating bath
- เติม EDC ลงในสารผสมในขั้นตอนที่ 3 ให้ EDC มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 M
- เติม Sulfo-NHS ลงในปฏิกิริยาจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 mM
- ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วย sonicating bath ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ เพื่อให้แน่ใจว่าระบบเข้าสู่สภาวะสมดุล
- เก็บส่วนของเหลวใสด้วยวิธีการ Centrifuge และนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ตรวจสอบวิเคราะห์สมบัติ

1. วิเคราะห์ขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO_2 โดยใช้ Scanning electron microscope (SEM, FESEM model SU8230)
2. วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันบนอนุภาค SiO_2 โดยใช้ Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR Perkin Elmer, Spectra GX)
3. วิเคราะห์ขนาดอนุภาคขณะแขวนลอยอยู่ในน้ำและค่าศักย์ไฟฟ้าบนผิวอนุภาค โดยใช้เครื่อง Dynamic light scattering (Zetasizer Pro)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน NanoDrop Spectrophotometer (ALLSHENG Model UD 2000C)
5. วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Epoch Microplate Spectrophotometer



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของขนาดอนุภาค SiO_2 ต่อประสิทธิภาพในการดูดซับโปรตีนไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin, PHA) เริ่มต้นจากการสังเคราะห์อนุภาค SiO_2 จากสารตั้งต้นเททระเอทิลออลโทซิลิเกต โดยใช้แอมโมเนียเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นทำการตรวจสอบโครงสร้างพื้นฐานและขนาดของอนุภาค SiO_2 ที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และเทคนิค Dynamic light scattering (DLS) โดยศึกษาผลของแอมโมเนีย ความเข้มข้นของตัวทำละลาย และอัตราการใส่สารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาเพื่อควบคุมขนาดอนุภาค SiO_2 ให้ได้ตามต้องการ คือ 100 300 และ 450 nm ตามลำดับ จากนั้นปรับหมู่ฟังก์ชันของอนุภาคด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) ก่อนนำไปคอนจูเกตกับโปรตีน PHA โดยใช้สารเชื่อมโยง (Crosslinking agent) คือ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride) (EDC) และ N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) ตรวจสอบการคอนจูเกตระหว่างอนุภาค SiO_2 กับ PHA ด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate Spectrophotometer ท้ายที่สุดศึกษาพฤติกรรมการดูดซับของโปรตีน PHA ลงบนพื้นผิวของอนุภาค SiO_2 ที่ขนาดแตกต่างกัน

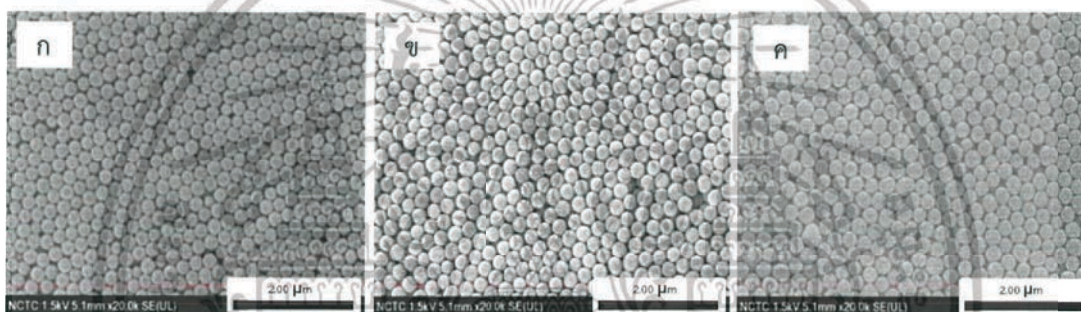
ตารางที่ 4.1 สรุปตัวแปรที่มีผลต่อการสังเคราะห์ขนาดอนุภาค SiO_2

ตัวแปรที่ศึกษา	สภาวะการทดลอง						ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (nm)	
	NH_4OH (M)	EtOH (M)	MeOH (M)	TEOS (M)	H_2O (M)	Reaction times (h)	ขนาด hydrodynamic by number	ขนาดเฉลี่ย จาก SEM by ImageJ
แอมโมเนีย	2.00						234 ± 3	219 ± 9
	2.70	3.84		0.17	8.6	2	276 ± 2	266 ± 5
	3.60						322 ± 4	284 ± 4
ปริมาณตัวทำ ละลาย	1.80	13.10					125 ± 2	100 ± 5
		6.55	6.55		0.17	8.6	-	203 ± 7
อัตราการเติม สารตั้งต้น TEOS (KCl = 80 μM)	1.80	13.10		10.67 $\mu\text{L}/\text{min}$			450 ± 2	423 ± 8
				21.35 $\mu\text{L}/\text{min}$	8.6	2	-	1500 ± 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 ผลของแอมโมเนียต่อขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO₂

จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ใช้เป็นตัวเร่งในการทำปฏิกิริยาจาก 0.70 ถึง 4.2 M ส่งผลต่อขนาดอนุภาค SiO₂ ที่สังเคราะห์ได้ ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นอนุภาคจะมีขนาดใหญ่มากขึ้น และมีการกระจายขนาดของอนุภาคที่แคบ มีความเป็นทรงกลมที่มากขึ้น เพราะปริมาณแอมโมเนียที่มากขึ้น ทำให้ pH ของสารละลายเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่างอันตรกิริยาของสารตั้งต้นให้เพิ่มสูงขึ้น จากผลการทดลองความเข้มข้นของแอมโมเนีย 3.60 M ทำให้ได้ขนาดอนุภาค SiO₂ 284 ± 4 nm ซึ่งมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ จึงเลือกขนาดอนุภาค SiO₂ 284 ± 4 nm ให้เป็นตัวแทนของอนุภาค SiO₂ ขนาด 300 nm ที่จะนำไปปรับหมูฟิงชันก์ [19]



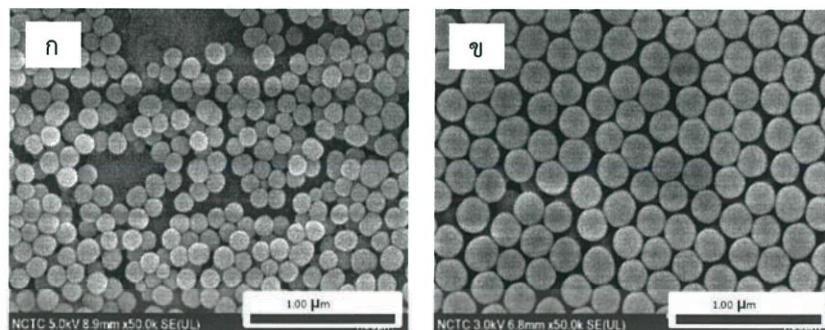
รูปที่ 4.1 รูป SEM ของอนุภาค SiO₂ ที่เตรียมโดยใช้ปริมาณแอมโมเนียต่างกัน ก) ตัวอย่างที่ 1 ปริมาณแอมโมเนีย 2.00 M ขนาดอนุภาค 219 ± 9 nm ข) ตัวอย่างที่ 2 ปริมาณแอมโมเนีย 2.70 M ขนาดอนุภาค 266 ± 5 nm และ ค) ตัวอย่างที่ 3 ปริมาณแอมโมเนีย 3.60 M ขนาดอนุภาค 284 ± 4 nm (กำลังขยาย 20,000X สเกลบาร์ 2.00 μm)

4.2 ผลของควมมีขั้วของตัวทำละลายต่อขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO₂

เพื่อที่จะสังเคราะห์อนุภาค SiO₂ ขนาด 100 nm จึงได้ทำการเปรียบเทียบผลความเป็นขั้วของตัวทำละลายต่อขนาดและโครงสร้างสัณฐานของอนุภาค SiO₂ โดยศึกษาตัวทำละลาย 2 ระบบคือ เมทานอล และตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 M พบว่าในระบบตัวทำละลายที่ใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียวซึ่งมีความเป็นขั้วสูง อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กกว่าระบบที่ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและเอทานอลซึ่งมีความเป็นขั้วน้อยกว่า เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอลมีโมเลกุลเล็กและมีความเป็นขั้วสูงกว่าสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารตั้งต้น TEOS ได้เร็ว ทำให้เกิดอนุภาคจำนวนมากในช่วงเริ่มต้น ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายเมทานอลเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลลัพธ์ที่ได้อนุภาคจะมีขนาดเล็กมากกว่า ดังรูปที่ 4.2 และเลือกขนาดอนุภาค SiO_2 100 ± 5 nm ให้เป็นตัวแทนของอนุภาค SiO_2 ขนาด 100 nm ที่จะนำไปปรับหมู่ฟังก์ชัน [19]

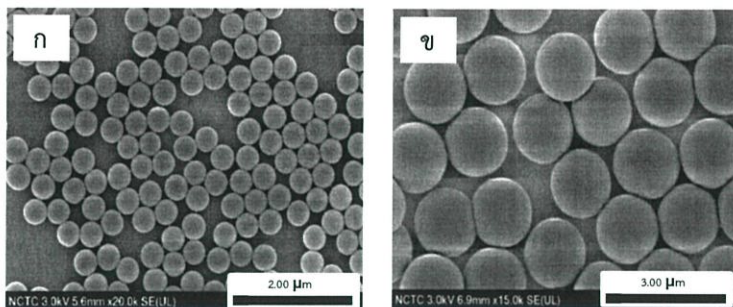


รูปที่ 4.2 แสดงรูป SEM ของอนุภาค SiO_2 เตรียมในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ก) ตัวอย่างที่ 4 ได้ขนาดอนุภาค 100 ± 5 nm ใช้ตัวทำละลายเมทานอลและ ข) ตัวอย่างที่ 5 ขนาดอนุภาค 203 ± 7 nm ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและเอทานอล

4.3 ผลของอัตราการใส่สารตั้งต้น TEOS ต่อขนาดและโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาค SiO_2

เพื่อที่จะสังเคราะห์อนุภาค SiO_2 ให้มีขนาดใหญ่ในช่วง 400 ถึง 1000 nm จึงได้ทำการเปรียบเทียบผลของอัตราการใส่สารตั้งต้น TEOS โดยศึกษาอัตราการใส่สารตั้งต้น TEOS 2 ค่าคือ $10.67 \mu\text{L}/\text{min}$ และ $21.35 \mu\text{L}/\text{min}$ ผลที่ได้แสดงรูปที่ 4.3 พบว่าการลดอัตราการใส่สารตั้งต้น TEOS ให้น้อยลงส่งผลทำให้ขนาดอนุภาค SiO_2 มีขนาดใหญ่ขึ้น สาเหตุเนื่องมาจากในช่วงเริ่มต้นสารตั้งต้น TEOS ถูกเติมลงไปในระบบซึ่งเพียงพอที่จะเกิดอนุภาคเริ่มต้น (nuclei) ในระบบ นั่นคือสารตั้งต้น TEOS ที่ถูกเติมลงไปในระบบส่วนหนึ่งจะถูกใช้ในการสร้างอนุภาคใหม่และปริมาณสารตั้งต้น TEOS ที่ถูกเติมลงไปในระบบเรื่อยๆจะถูกดูดซับไปบนพื้นผิวอนุภาคเดิมที่มีอยู่แล้วในระบบทำให้อนุภาคโตขึ้นจนกระทั่งความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ถูกเติมในระบบลดต่ำลงปฏิกิริยาการสร้างอนุภาคใหม่ก็จะหยุด ดังนั้นการเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นให้มากขึ้นจะทำให้มีปริมาณสารตั้งต้นในระบบเพียงพอที่จะทำให้อนุภาคมีการขยายขนาดให้ใหญ่มากขึ้น จากผลการทดลองเลือกขนาดอนุภาค SiO_2 423 ± 8 nm เป็นตัวแทนของอนุภาค SiO_2 ขนาด 450 nm ที่จะนำไปปรับหมู่ฟังก์ชัน [19]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 รูป SEM ของอนุภาค SiO_2 เตรียมที่อัตราการใส่สารตั้งต้น TEOS ต่างกัน ก) ตัวอย่างที่ 6 ได้ขนาดอนุภาค 423 ± 8 nm และ ข) ตัวอย่างที่ 7 ขนาดอนุภาค 1500 ± 52 nm ในตัวทำละลายเอทานอล

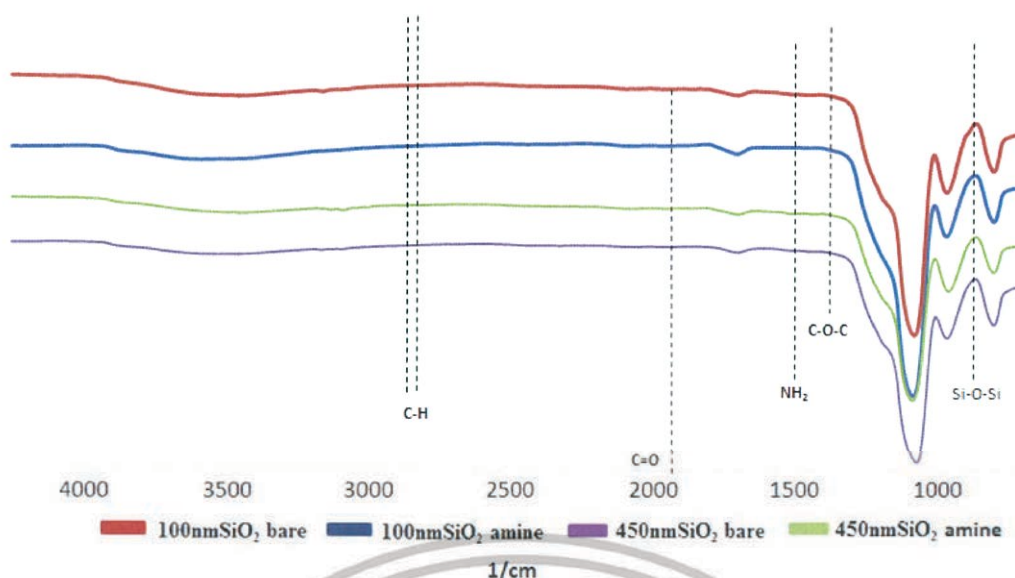
4.4 การปรับหมู่ฟังก์ชันกับอนุภาค SiO_2 ด้วย APTES

ตารางที่ 4.2 แสดงประจุผิวของอนุภาค SiO_2 ก่อนและหลังการติดหมู่เอมีนพบว่าหลังการปรับหมู่ฟังก์ชัน เนื่องจากหมู่เอมีนมีค่าคงที่การแตกตัวของกรดหรือ pKa ประมาณ 10.6 ในการตรวจสอบศักย์ゼต้าด้วยวิธี DLS อนุภาค SiO_2 ถูกเตรียมในน้ำ DI เป็นตัวทำละลาย pH เท่ากับ 8 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า pKa ของหมู่เอมีนทำให้ NH_2 รับโปรตอนจากน้ำปรากฏอยู่ในรูป $-\text{NH}_3^+$ ทำให้ศักย์ゼต้าที่ผิวมีค่าเป็นบวกแสดงให้เห็นถึงการมีหมู่เอมีนบนผิวอนุภาค [22]

ตารางที่ 4.2 แสดงศักย์ゼต้าของอนุภาคก่อนและหลังติดหมู่เอมีน

ขนาดเฉลี่ยจาก SEM (nm)	Zeta - Potential (mV)		
	SiO_2	$\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$	$\text{NH} - \text{PHA} - \text{SiO}_2$
100 ± 29	-58.4 ± 0.3	11.2 ± 0.4	-21.3 ± 0.2
284 ± 4	-46.8 ± 0.2	28.8 ± 0.2	-19.5 ± 0.3
423 ± 8	-66.2 ± 0.2	16.9 ± 0.8	-32.5 ± 1.3

เมื่อนำอนุภาค SiO_2 ทั้ง 2 ขนาดมาวิเคราะห์ด้วย FTIR ดังแสดงรูปที่ 4.4 เส้นสีแดงและสีม่วงซึ่งคืออนุภาคนาโนซิลิกา 100 และ 450 nm ก่อนปรับปรุงพื้นผิว จากนั้นเปรียบเทียบกับเส้นสีน้ำเงินและสีเขียวที่เป็นอนุภาค SiO_2 100 และ 450 nm ที่ผ่านการปรับหมู่ฟังก์ชันแล้ว $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ตามลำดับ แสดงพีคของหมู่ NH_2 และ C-O ค่าพีคอยู่ที่ 1562 และ 1296 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่ามีหมู่เอมีนบนผิวอนุภาค [20]



รูปที่ 4.4 แสดง FTIR สเปกตรัมของอนุภาค SiO_2 และอนุภาค SiO_2 ที่ถูกปรับปรุงที่ขนาดแตกต่างกัน (ก) อนุภาค SiO_2 100 nm (ข) อนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ 100 (ค) อนุภาค SiO_2 450 nm และ (ง) อนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ 450 nm

4.5 ผลของการคอนจูเกตโปรตีน PHA กับอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ที่มีขนาดแตกต่างกัน

หลังจากทำการคอนจูเกต PHA กับ อนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ผ่านปฏิกิริยาระหว่าง $-\text{COOH}$ และ $-\text{NH}_2$ แล้วนำมาตรวจตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน PHA ที่สามารถคอนจูเกตกับ อนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ โดยอาศัยการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณโปรตีน PHA ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยา ซึ่งโปรตีน PHA ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยา หรือ supernatant จะถูกนำไปตรวจสอบหาปริมาณที่เหลือด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล โดยอาศัยการเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันของโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้า โปรตีนที่ต้องการแยกด้วยวิธีดังกล่าวจะต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยการให้ความร้อน ผสมกับสีย้อมที่มีสาร reducing agent และ SDS ซึ่งโปรตีนจะสร้างพันธะกับ SDS เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประจุลบทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกัน คือเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกบนแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide gel) ซึ่งใช้เป็นตัวกลางในการแยกโปรตีนมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ และมีรูพรุน ขนาดของรูพรุนจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่ใช้เตรียม ทำให้เทคนิค SDS-PAGE สามารถแยกโปรตีนบนแผ่นเจลโดยขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของโปรตีนเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีผลของประจุและรูปร่างของโปรตีนเข้ามาเกี่ยวข้อง สามารถทราบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน PHA ได้โดยเทียบตำแหน่งของแถบโปรตีน PHA กับแถบโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker) ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน PHA ที่เหลือจากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำปฏิกิริยา อาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate Spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน PHA จากสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟมาตรฐานโปรตีน PHA (Standard PHA curve) เพื่อยืนยันการคอนจูเกตระหว่าง PHA บนผิวอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$

4.5.1 การตรวจสอบการคอนจูเกตโปรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ขนาด 100 nm ด้วยวิธี Gel electrophoresis และ Microplate Spectrophotometer

ในการคอนจูเกต PHA ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL บนอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ขนาด 100 nm ที่ความเข้มข้น 1, 4 และ 8 mg/mL ตามลำดับ ทำโดยผสมโปรตีน PHA และอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ด้วยการ sonicate จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 μL ด้วย PBS ก่อนเติม EDC และ Sulfo-NHS ลงไปตามลำดับ ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบสรุปได้ดังตารางที่ 4.3

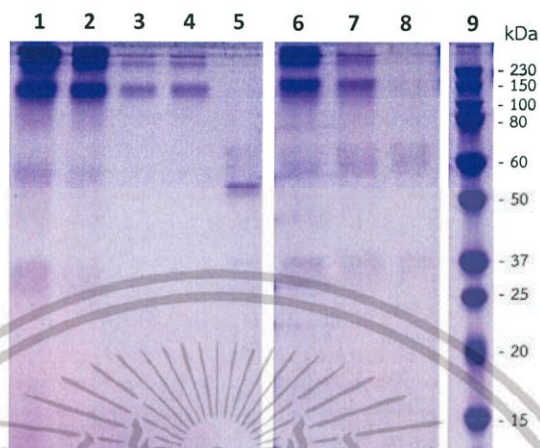
ตารางที่ 4.3 สรุปความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบ

	Standard PHA					PHA/ $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ 100 nm		
	1	2	3	4	5	6	7	8
C_{PHA} (mg/mL)	1	0.5	0.25	0.125	0.06	1	1	1
$C_{\text{NH}_2\text{-SiO}_2}$ (mg/mL)	-	-	-	-	-	1	4	8
C_{EDC} (M)	0.1					0.1		
$C_{\text{Sulfo-NHS}}$ (M)	0.005					0.005		

จากผลของการวิเคราะห์ด้วย Gel electrophoresis รูปที่ 4.5 แผ่นเจลแบ่งออกเป็น 9 เลน โดยเลนที่ 1-5 คือ สารตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC, Sulfo-NHS และ สีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ตามลำดับ ซึ่ง EDC และ Sulfo-NHS ถูกใช้เป็นตัวช่วยสร้างพันธะเชื่อมต่อเอไมด์ (Amide linkage) ระหว่างหมู่ $-\text{COOH}$ และ $-\text{NH}_2$ ของโมเลกุล PHA เข้าด้วยกัน ทำให้โมเลกุล PHA มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ส่วนสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์จะทำให้โปรตีน PHA เสียสภาพธรรมชาติโดยสลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bonds) ระหว่างโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนทำให้พันธะไดซัลไฟด์เปลี่ยนเป็นหมู่ sulfhydryl (SH) โครงสร้างโมเลกุล PHA ที่ขดกันอยู่จึงเกิดการคลายตัว (Unfolded) กลายเป็นโครงสร้างโมเลกุลเส้นตรงยาวทำให้สามารถบ่งบอกขนาดโมเลกุลที่แน่นอนของโปรตีนได้ ซึ่งเมื่อเทียบตำแหน่งแถบสีของโปรตีน PHA มาตรฐาน กับ protein marker พบว่าโปรตีน PHA มาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 230 kDa สำหรับเลนที่ 6-8 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ และผสมกับสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แถบสีของ supernatant กับแถบสีของ PHA มาตรฐาน พบว่าความเข้มของแถบสีของ supernatant มีลักษณะเจือจางลงตามสัดส่วนของ $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่เพิ่มมากขึ้น และไม่ปรากฏแถบสีของโปรตีนในเลนที่ 8 รูปที่ 4.5 สรุปได้ว่า $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่ความเข้มข้น 8 mg/mL สามารถคอนจูเกตกับโปรตีน PHA 1 mg/mL ได้ทั้งหมด



รูปที่ 4.5 แสดงแผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยวิธี Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ที่ pH 7.4 (ทุกตัวอย่างผสมกับสาร reducing agent และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 6 นาที) เลนที่ 1-5 คือ standard PHA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo -NHS ตามลำดับ เลนที่ 6-8 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ เลนที่ 9 คือ Precision Plus Protein standards

จากนั้นนำ supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 ผสมกับสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) และ DI water ในสัดส่วน 1:7:28 μL ตามลำดับ ด้วยวิธี Bradford ใน microplate reader เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย Microplate Spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน PHA ที่เหลือจากปฏิกิริยาจากสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟมาตรฐานโปรตีน PHA (Standard PHA curve) เพื่อยืนยันการคอนจูเกตระหว่างโปรตีนบนผิวอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ พบว่า supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 มีความเข้มข้น 0.844, 0.472, 0.1 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่วัดได้กับแถบสีของเจลที่เจือจางในเลนที่ 6-8 ปรากฏว่าสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มสัดส่วนของ $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm จนกระทั่งมีความเข้มข้น 8 mg/mL สามารถคอนจูเกตกับโปรตีน PHA 1 mg/mL ได้มากถึง 90 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

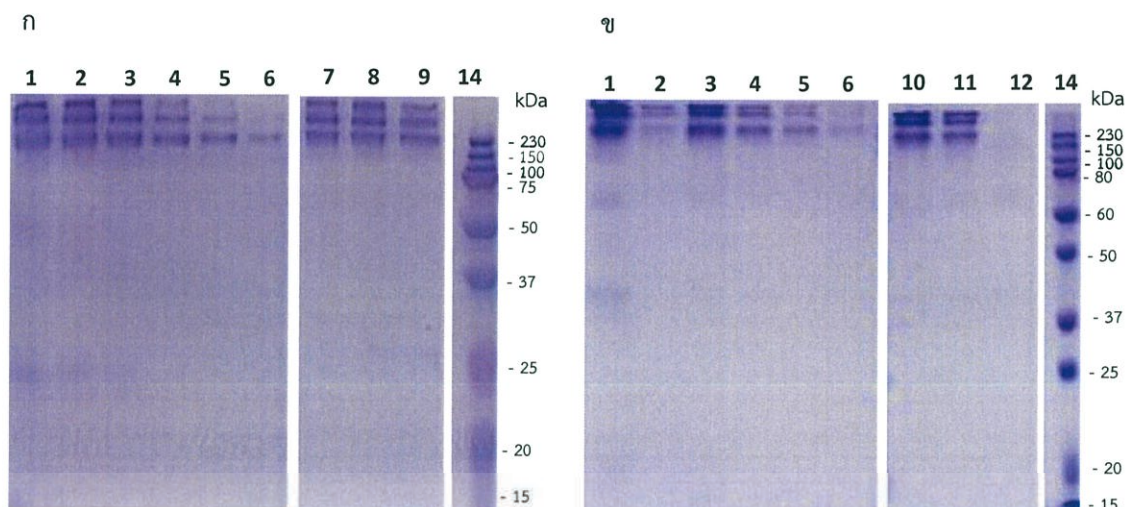
4.5.2 การตรวจสอบการคอนจูเกตโปรตีน PHA บนอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 300 nm ด้วยวิธี Gel electrophoresis และ Microplate Spectrophotometer

ในการคอนจูเกต PHA ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL บนอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 300 nm ที่ความเข้มข้น 1, 3, 4, 8, 12, 27 mg/mL ตามลำดับ ทำโดยผสมโปรตีน PHA และอนุภาค NH_2 - SiO_2 ด้วยการ sonicate จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 μL ด้วย PBS ก่อนเติม EDC และ Sulfo-NHS ลงไปตามลำดับ ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบสรุปได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สรุปความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบ

	Standard PHA						PHA/ NH_2 - SiO_2 300 nm					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13
C_{PHA} (mg/mL)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	1	1	1	1	1	1
$C_{\text{NH}_2 - \text{SiO}_2}$ (mg/mL)	-	-	-	-	-	-	1	4	8	3	12	27
C_{EDC} (M)	0.1						0.1					
$C_{\text{Sulfo-NHS}}$ (M)	0.005						0.005					

จากผลของการวิเคราะห์ด้วย Gel electrophoresis (รูปที่ 4.6 ก) เลนที่ 1-6 คือ สารตัวอย่างโปรตีน PHA มาตรฐาน ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC, Sulfo-NHS และ สีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ตามลำดับ สำหรับเลนที่ 7-9 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 และผสมกับสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบสีของ supernatant กับแถบสีของ PHA มาตรฐาน พบว่าความเข้มของแถบสีของ supernatant มีลักษณะเจือจางลงเพียงเล็กน้อยตามสัดส่วนของ NH_2 - SiO_2 ที่เพิ่มมากขึ้น และความเข้มของ NH_2 - SiO_2 ที่ 8 mg/mL ยังคงไม่สามารถคอนจูเกตกับ PHA ได้ทั้งหมด (รูปที่ 4.6 ข) เลนที่ 1-6 คือ สารตัวอย่างโปรตีน PHA มาตรฐาน ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC, Sulfo-NHS และ สีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ตามลำดับ สำหรับเลนที่ 11-13 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:3, 1:12 และ 1:27 ตามลำดับ และผสมกับสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบสีของ supernatant กับแถบสีของ PHA มาตรฐาน พบว่า supernatant ที่อัตราส่วน 1:27 ไม่ปรากฏความเข้มของแถบสีบนแผ่นเจล ดังนั้นสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ NH_2 - SiO_2 ขนาด 300 nm ที่ 27 mg/mL สามารถคอนจูเกตกับ PHA 1 mg/mL ได้ทั้งหมด



รูปที่ 4.6 แสดงแผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยวิธี Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ที่ pH 7.4 (ทุกตัวอย่างผสมกับสาร reducing agent และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 6 นาที) ก) เลนที่ 1-6 คือ standard PHA ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo-NHS ตามลำดับ เลนที่ 7-9 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ เลนที่ 10 คือ Precision Plus Protein standards ข) เลนที่ 1-6 คือ standard PHA ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo-NHS ตามลำดับ เลนที่ 11-13 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:3, 1:12 และ 1:27 ตามลำดับ เลนที่ 14 คือ Precision Plus Protein standards

จากนั้นนำ supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ที่อัตราส่วน 1:1, 1:3, 1:4, 1:8, 1:12 และ 1:27 ผสมกับสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) และ DI water ในสัดส่วน 1:7:28 μL ตามลำดับ ด้วยวิธี Bradford ใน microplate reader และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย Microplate Spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน PHA ที่เหลือจากปฏิกิริยาจากสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟมาตรฐานโปรตีน PHA (Standard PHA curve) เพื่อยืนยันการคอนจูเกตระหว่างโปรตีนบนผิวอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ พบว่า supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:3, 1:4, 1:8, 1:12 และ 1:27 มีความเข้มข้น 0.705, 0.691, 0.652, 0.483, 0.417 และ 0.01 mg/mL ตามลำดับ จากผลการทดลองอนุภาคขนาด 300 nm ต้องใช้ความเข้มข้นมากถึง 27 mg/mL ในการคอนจูเกต PHA 1 mg/mL แสดงให้เห็นความแตกต่างของความโค้งของอนุภาค (Curvature) มีอิทธิพลอย่างมากต่อการคอนจูเกตกับโมเลกุล PHA โดยอนุภาคที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงจะมีความโค้งของพื้นผิวอนุภาคต่ำทำให้โอกาสในการสัมผัสกันระหว่างอนุภาคด้วยกันเองมีมากกว่าที่จะไปสัมผัสกับโมเลกุลของโปรตีนส่งผลให้การคอนจูเกตโปรตีนเกิดขึ้นได้ยากกว่า อีกทั้งพื้นที่ผิว (Surface area) ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคที่มีขนาด 300 nm มีน้อยกว่าทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่าอนุภาคขนาด 100 nm ถึง 3 เท่า ในการคอนจูเกต PHA 1 mg/mL จนเหลือ 0.01 mg/mL

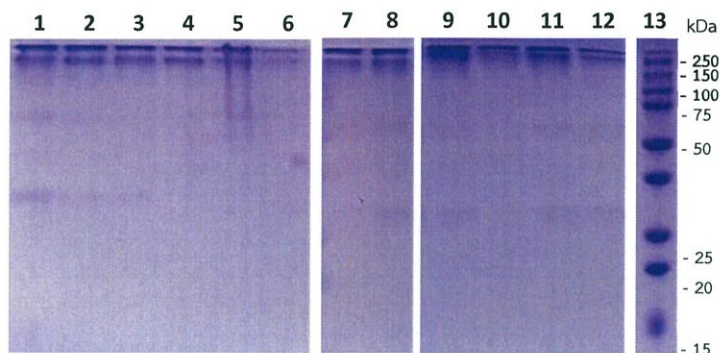
4.5.3 การตรวจสอบการคอนจูเกตโปรตีน PHA บนอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 450 nm ด้วยวิธี Gel electrophoresis และ Microplate Spectrophotometer

ในการคอนจูเกต PHA ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL บนอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 450 nm ที่ความเข้มข้น 1, 4, 8, 16, 24 และ 32 mg/mL ตามลำดับ ทำโดยผสมโปรตีน PHA และอนุภาค NH_2 - SiO_2 ด้วยการ sonicate ปรับปริมาตรด้วย PBS ก่อนเติมตัวเชื่อม (Linker) EDC และ Sulfo-NHS ลงไปตามลำดับ ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบสรุปได้ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 สรุปความเข้มข้นสุดท้ายของสารในระบบ

	Standard PHA						PHA/ NH_2 - SiO_2 450 nm					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13
C_{PHA} (mg/mL)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	1	1	1	1	1	1
$C_{\text{NH}_2 - \text{SiO}_2}$ (mg/mL)	-	-	-	-	-	-	1	4	8	16	24	32
C_{EDC} (M)	0.1						0.1					
$C_{\text{Sulfo-NHS}}$ (M)	0.005						0.005					

จากผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gel electrophoresis รูปที่ 4.7 เลนที่ 1-6 คือ สารตัวอย่างโปรตีน PHA มาตรฐาน ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC, Sulfo -NHS และ สีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ตามลำดับ สำหรับเลนที่ 7-12 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 450 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:24 และ 1:32 ผสมกับสีย้อมที่มีตัวรีดิวซ์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบสีของ supernatant กับแถบสีของ PHA มาตรฐาน พบว่าความเข้มของแถบสีของ supernatant แทบจะไม่มีลักษณะแตกต่างกันหรือแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาค NH_2 - SiO_2 ให้มากขึ้น จนถึง 32 mg/mL ต่อความเข้มข้นของโปรตีน PHA 1 mg/mL ก็ตาม ดังนั้นสรุปได้ว่าอนุภาค NH_2 - SiO_2 ขนาด 450 nm คอนจูเกตกับ PHA ได้น้อยหรือแทบจะไม่สามารถคอนจูเกตได้เนื่องจากขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่และมีพื้นที่ผิวน้อยอีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่ามีความโค้งของอนุภาคต่ำทำให้อนุภาคจะสัมผัสกับอนุภาคด้วยกันเองมากกว่า ส่งผลให้โอกาสในการคอนจูเกตกับโมเลกุล PHA เป็นไปได้ยาก



รูปที่ 4.7 แสดงแผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยวิธี Gel electrophoresis แบบ SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีน PHA ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 450 nm ที่สภาวะ pH เท่ากับ 7.4 (ทุกตัวอย่างผสมกับสาร reducing agent และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 6 นาที) เลนที่ 1-6 คือ standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL ผสมกับ EDC และ Sulfo -NHS ตามลำดับ เลนที่ 7-12 คือ supernatant ของ PHA คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 450 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:24 และ 1:32 ตามลำดับ เลนที่ 13 คือ Precision Plus Protein standards

4.6 ผลของการดูดซับปริมาณโปรตีนของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่มีขนาดแตกต่างกัน

จากการทดลองเพื่อหาความสามารถของการดูดซับโปรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm โดยใช้อนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ความเข้มข้น 1 mg/mL และความเข้มข้นของโปรตีน PHA ตั้งแต่ 0.25 ถึง 2 mg/mL ผสมโปรตีน PHA และอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ด้วยการ sonicate ปริมาตรทั้งหมด 50 μL ที่อุณหภูมิ 25 ± 3 °C และ pH เท่ากับ 7.4 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สรุปความเข้มข้นของ PHA ก่อนและหลังการดูดซับด้วย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm

ความเข้มข้น (mg/mL)	1	2	3	4	5
อนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
โปรตีน PHA เริ่มต้น	0.25	0.5	1	1.5	2
โปรตีน PHA ที่เหลือหลังการดูดซับด้วย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 100 nm	0.00	0.06	0.65	1.25	1.66
โปรตีน PHA ที่เหลือหลังการดูดซับด้วย $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 300 nm	0.00	0.17	0.74	1.13	1.48

เมื่อเติมปริมาณ $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ (ตัวดูดซับ) ลงไปในสารละลายที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของโปรตีน PHA (ตัวถูกดูดซับ) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่าในช่วงเริ่มต้นโมเลกุลของโปรตีนบางส่วนจะถูกดูดซับไปบนพื้นผิวของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ แต่เมื่อเวลาผ่านไปโมเลกุลของโปรตีน PHA เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะถูกดูดซับลงบนพื้นผิวของตัวดูดซับเพิ่มมากขึ้น กระบวนการดูดซับจะดำเนินไปจนกระทั่งระบบเข้าสู่สมดุล โดยสามารถหาความจุของการดูดซับ (adsorption capacity) ของ PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ได้จากความสัมพันธ์ตามสมการที่ (2.1)

เมื่อนำข้อมูลผลการทดลอง โดยนำ q_e อัตราส่วนของปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับ (mg of protein) ต่อปริมาณของสารดูดซับ (mg of $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$) ที่ภาวะสมดุล กับ C_e ความเข้มข้นของโปรตีน (ตัวถูกดูดซับ) ที่เหลืออยู่ในสารละลาย ณ ภาวะสมดุล, mg/mL แสดงดังตารางที่ 4.7 และ 4.8 นำมาสร้างกราฟไอโซเทอม ณ อุณหภูมิคงที่ จากนั้นใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับใช้อธิบายกระบวนการดูดซับทางเคมีและกายภาพ ซึ่งแบบจำลองการดูดซับที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 4 แบบ คือ แบบจำลองการดูดซับแบบแลงเมียร์ (Langmuir Isotherm) แบบจำลองการดูดซับแบบฟรุนดริช (Freudlich Isotherm) แบบจำลองการดูดซับแบบเรดลิค-เพเทอร์สัน (Redlich - Peterson Isotherm) และแบบจำลองการดูดซับแบบผสมแลงเมียร์-ฟรุนดริช (Langmuir-Freudlich Isotherm) [15]

ตารางที่ 4.7 ข้อมูลการศึกษาแบบจำลองของการดูดซับ PHA ด้วย $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ขนาด 100 nm pH 7.4

$\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ 100 nm (mg/mL)	C_i (mg/mL)	C_e (mg/mL)	V/M (mL/mg)	q_e (mg/mg)
1	0.25	0.00	0.0125	0.003
1	0.50	0.17	0.025	0.011
1	1.00	0.74	0.050	0.017
1	1.50	1.25	0.075	0.019
1	2.00	1.66	0.100	0.034

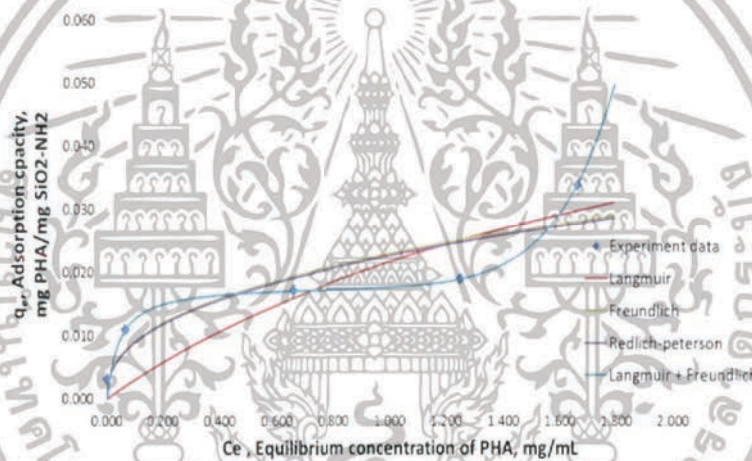
ตารางที่ 4.8 ข้อมูลการศึกษาแบบจำลองของการดูดซับ PHA ด้วย $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ขนาด 300 nm pH 7.4

$\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ 300 nm (mg/mL)	C_i (mg/mL)	C_e (mg/mL)	V/M (mL/mg)	q_e (mg/mg)
2	0.25	0.00	0.004	0.001
2	0.50	0.06	0.008	0.003
2	1.00	0.65	0.017	0.004
2	1.50	1.13	0.025	0.009
2	2.00	1.48	0.033	0.017

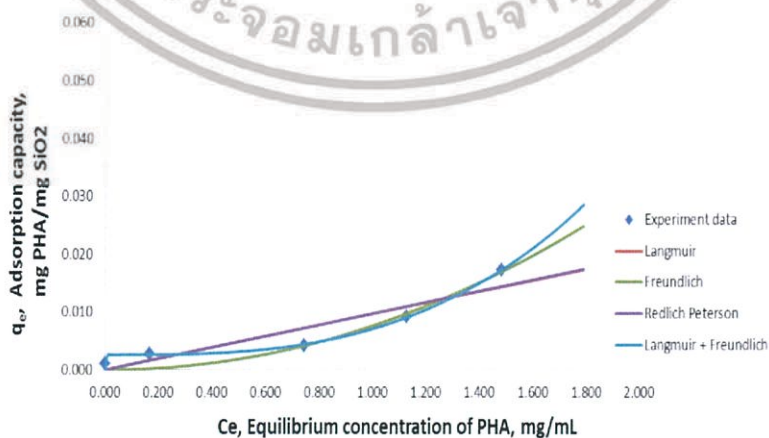
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ไอโซเทอมของการดูดซับเพื่อใช้อธิบายพฤติกรรมของการดูดซับโปรตีนลงบนพื้นผิวของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่อุณหภูมิคงที่ แสดงดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 พบว่า ข้อมูลจากการทดลองทั้งอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm มีพฤติกรรมการดูดซับใกล้เคียงกับแบบจำลองการดูดซับแบบผสมแลงเมียร์-ฟรอนดริช (Langmuir-Freundlich Isotherm) โดยพิจารณาจากค่า R^2 และค่า Root mean square error (RMS) ซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า R^2 และค่า RMS ของแบบจำลองดังกล่าวมีค่าใกล้เคียง 1 มากที่สุด และน้อยที่สุดตามลำดับ [15] แสดงไว้ในตารางที่ 4.9

แบบจำลองการดูดซับแบบผสมแลงเมียร์-ฟรอนดริช (Langmuir-Freundlich Isotherm) สามารถอธิบายได้ว่า ในช่วงที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ การดูดซับของโปรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ มีพฤติกรรมการดูดซับแบบชั้นเดียว (monolayer) ซึ่งคล้ายกับแบบจำลองของ Langmuir แต่เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น การดูดซับของโปรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ จะแสดงพฤติกรรมการดูดซับคล้ายกับแบบจำลองของ Freundlich เนื่องจากโปรตีนจะสร้างพันธะเปปไทด์เชื่อมต่อกันเป็นชั้นๆ (multilayer) [15]



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 100 nm และแบบจำลองการดูดซับแบบ Langmuir Freundlich Redlich – Peterson และ Langmuir-Freundlich



รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ 300 nm และแบบจำลองการดูดซับแบบ Langmuir Freundlich Redlich – Peterson และ Langmuir-Freundlich

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ตัวแปร ค่า R^2 และค่า RMS จากแบบจำลองการดูดซับแบบ Langmuir แบบ Freundlich แบบ Redlich – Peterson และแบบผสม Langmuir - Freundlich สำหรับการดูดซับ โพรตีน PHA บนอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm

Adsorption Isotherms		The adsorption of PHA to $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ particles	
		100 nm	300 nm
Langmuir $q_e = q_m K_L C_e / (1 + C_e K_L)$	q_m (mg/mg)	0.069	2.119
	K_L	0.453	0.005
	R^2	0.849	0.932
	RMS	0.00530	0.00210
Freundlich $q_e = K_f C_e^{1/n}$	K_f (mg/mg)	0.023	2.493
	n	2.493	0.491
	R^2	0.902	0.976
	RMS	0.00440	0.00126
Redlich – Peterson $q_e = k_R C_e / (1 + a_R C_e^\beta)$	k_R (mg/mg)	51556	2273339
	a_R	0.010	0.027
	R^2	0.902	0.933
	RMS	0.0044	0.00211
Langmuir + Freundlich $q_e = k_R C_e / (1 + a_R C_e) + K_f C_e^{1/n}$	q_m (mg/mg)	0.0182	0.0026
	n	0.114	0.331
	K_f	23.16	766221.84
	k_R	0.0002	0.0040
	R^2	0.991	0.987
	RMS	0.0014	0.00048

จากผลการวิเคราะห์ไอโซเทอมของโปรตีน PHA ที่ถูกดูดซับลงบนอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$ ทั้งขนาด 100 และ 300 nm มีพฤติกรรมการดูดซับใกล้เคียงกับแบบจำลองผสม Langmuir-Freundlich Isotherm ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวแปรต่างๆ ของสมการ พบว่า q_m ของอนุภาค $\text{NH}_2\text{-SiO}_2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 100 และ 300 nm เท่ากับ 0.0182 และ 0.0026 ตามลำดับ โดยค่า q_m แสดงถึงความจุของการดูดซับสูงสุดของโปรตีนลงบนอนุภาคชั้นแรก (monolayer) จะเห็นได้ว่า ค่า q_m ของอนุภาค 100 nm มีค่าความจุในการดูดซับมากกว่าอนุภาคขนาด 300 nm ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟไอโซเทอมพบว่าในช่วงเริ่มต้นที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ พื้นที่ผิวของอนุภาค 100 nm ที่มีมากกว่าทำให้สามารถดูดซับโปรตีนในลักษณะชั้นเดียวได้ (monolayer) มากกว่า ต่อมาเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น โปรตีนส่วนที่เหลือจะสร้างพันธะเคมีเชื่อมต่อกันเองกับโปรตีนที่ถูกดูดซับลงบนผิวของอนุภาคในช่วงเริ่มต้น ทำให้ระดับชั้นการดูดซับเพิ่มขึ้นเป็นไปอย่างไม่จำกัด (multilayer) [15], [21], [23]

จากการเปรียบเทียบค่าการดูดซับที่ทำให้เกิดชั้น monolayer หรือ q_m อนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm เมื่อเทียบกับอนุภาคขนาด 300 nm พบว่าในปริมาณอนุภาค 1 mg/mL อนุภาคขนาด 100 nm มีจำนวนอนุภาคและพื้นที่ผิวทั้งหมดมากกว่าอนุภาคขนาด 300 nm อยู่ 27 และ 3 เท่า ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดซับเพื่อสร้างชั้น monolayer สูงกว่า อนุภาคขนาด 300 nm อยู่ 7 เท่า จะเห็นได้ว่าถ้าเปรียบเทียบพื้นที่ผิวของอนุภาคทั้ง 2 ขนาดให้เท่ากัน ต้องเพิ่มปริมาณอนุภาคขนาด 300 nm ลงไปในระบบมากถึง 27 เท่า หรือเพิ่มความเข้มข้นมากถึง 27 mg/mL ซึ่งจำเป็นต้องใช้น้ำหนักมากกว่าในทำให้อนุภาคขนาด 300 nm มีพื้นที่ผิวและการดูดซับปริมาณโปรตีนเทียบเท่ากับอนุภาคขนาด 100 nm ดังนั้นสรุปได้ว่าพื้นที่ผิวของอนุภาคที่เท่ากันนั้น อนุภาคขนาดเล็กจะใช้น้ำหนักน้อยกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปสร้างชุดตรวจที่มีราคาถูกกว่า นอกจากค่า q_m แล้วตัวแปร $1/n$ ในสมการยังบ่งบอกถึงอัตราการสร้างพันธะเปปไทด์ระหว่างโปรตีนด้วยกันเองจนเป็น multilayer โดยค่าคงที่ n จากแบบจำลองผสม Langmuir-Freundlich ของอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm เท่ากับ 0.114 และ 0.331 ตามลำดับ ยิ่งค่า n น้อยก็จะทำให้ค่า $1/n$ นั้นมีค่ามาก ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ $1/n$ บ่งบอกถึงอันดับปฏิกิริยาหรืออัตราเร็วในการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง ดังนั้นอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ที่มีค่า $1/n$ มากกว่าแสดงให้เห็นว่ามีความสามารถเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเองในอัตราที่เร็วกว่าขนาดอนุภาค 300 nm [15], [21], [23]

เมื่อเปรียบเทียบผลของความโค้งของอนุภาค อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะมีความโค้งของพื้นผิวสูงกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนที่ถูกดูดซับบนพื้นผิวที่มีความโค้งมากกว่าจะสามารถสร้าง multilayer ได้เร็วกว่าแสดงได้จากค่า $1/n$ ของอนุภาค 100 nm ที่มีมากกว่าแต่เนื่องจากอนุภาคที่มีความโค้งสูงจะมีช่องว่างในการให้โปรตีนมาวางตัวต่ำลง ส่งผลให้การดูดซับของโปรตีนบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคขนาดเล็กจะเรียงต่อกันเองเป็นโปรตีนสายยาว (Long tail) เกิดการสร้างความเป็นระเบียบของโมเลกุลโปรตีนทำให้เกิดการขัดขวางระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเองส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นของโปรตีนต่ำลงเพราะเกิดการรบกวนตำแหน่งการยึดจับ (Binding site) ของโปรตีนกับเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ที่มีความโค้งต่ำมีพื้นผิวเรียบกว่าและมีช่องว่างในการให้โปรตีนมาวางตัวมากกว่าทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่ดูดซับลงบนอนุภาคขนาด 300 nm มีการวางตัวเป็นระเบียบมากกว่าและไม่เกิดการสร้างโปรตีนสายยาว (Long tail) ขัดขวางระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเองทำให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นต่ำลง อย่างไรก็ตามขนาดอนุภาคที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับโมเลกุลโปรตีนเพื่อให้ความโค้งสูง ขนาดอนุภาคไม่ควรใหญ่เกินไปเพราะผลของความโค้งของอนุภาคต่ำทำให้การกระจายตัวของโปรตีนบนพื้นผิวมีพื้นที่สัมผัสมากซึ่งมีผลรบกวนตำแหน่งการยึดจับหรือฟังก์ชันการทำงานของโปรตีนกับเซลล์ ดังนั้นอนุภาคขนาด 100 nm จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาการดูดซับโปรตีนชนิดอื่นให้มีความโค้งสูงต่อไป [21]



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบไอโซเทอมจะเห็นว่าอนุภาคขนาด $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 และ 300 nm มีพฤติกรรมการดูดซับสอดคล้องกับแบบจำลอง Langmuir-Freundlich Isotherm (R^2 เท่ากับ 0.991 และ 0.987 ตามลำดับ) และมีลักษณะการดูดซับทางเคมีที่สามารถดูดซับได้อย่างไม่จำกัด (multilayer) เหมือนกัน จากผลการทดลองอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm มีประสิทธิภาพในการดูดซับเพื่อสร้างชั้น monolayer สูงกว่า อนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm 7 เท่า โดยอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm มีความสามารถในการดูดซับสูงสุด q_m เท่ากับ 0.0182 mg (PHA)/mg ($\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$) ณ สภาวะอุณหภูมิ 25 °C pH 7.4 และจากสมการ Freundlich อนุภาคขนาด 100 nm มีค่า $1/n$ สูงกว่าอนุภาคขนาด 300 nm 3 เท่า แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสร้างชั้น multilayer ได้เร็ว ดังนั้นจะเห็นว่าอิทธิพลของความโค้งและพื้นที่ผิวของอนุภาคที่แตกต่างกันส่งผลต่อการดูดซับโปรตีน PHA เป็นอย่างมาก อนุภาคที่มีขนาดเล็กมากกว่ามีความโค้งของอนุภาคและมีพื้นที่ผิวสูงกว่า ทำให้สามารถดูดซับโปรตีน PHA ได้ในปริมาณมากแต่ในทางกลับกัน ความโค้งของผิวอนุภาคที่สูงทำให้การดูดซับของโปรตีนนั้นเป็นการสร้างชั้นของโปรตีนสายยาว (long tail) เพิ่มความไม่เป็นระเบียบของโมเลกุลโปรตีนบนผิวอนุภาคทำให้เกิดการขัดขวางระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยตัวเอง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการดูดซับการคอนจูเกตระหว่างโปรตีน PHA กับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่สัดส่วนอื่น เพื่อหาสัดส่วนการคอนจูเกตที่ดีที่สุด
2. ควรศึกษาอนุภาคขนาดเล็กมากขึ้นอีกให้ใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนหรือแอนติเจนที่สนใจ เพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการดูดซับของโปรตีน
3. ควรศึกษาช่วงความเข้มข้นของโปรตีน PHA ที่เติมลงไปแล้วสร้างพฤติกรรมการดูดซับในแบบต่างๆ
4. ควรศึกษาการกระตุ้นระหว่างเซลล์กับอนุภาคที่ขนาดแตกต่างกันเพื่อตรวจสอบผลของพฤติกรรมโปรตีนที่ดูดซับลงบนพื้นผิวอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- [1] สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค, แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย. 2561.
- [2] G. A. W. Rook, K. Dheda, and A. Zumla, “Immune responses to tuberculosis in developing countries: Implications for new vaccines,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 8, p. 661–667, 2005.
- [3] H. S. Whitworth, M. Scott, D. W. Connell, B. Dongés, and A. Lalvani, “IGRAs - The gateway to T cell based TB diagnosis,” *Methods*, vol. 61, no. 1, p. 52–62, 2013.
- [4] P. Andersen, M. E. Munk, J. M. Pollock, and T. M. Doherty, “Andersen-2000-INFTST,” vol. 356, p. 1099–1104, 2000.
- [5] Y. C. Kim, J. H. Park, and M. R. Prausnitz, “Microneedles for drug and vaccine delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 14, p. 1547–1568, 2012.
- [6] “Microneedle Techniques for DNA Transdermal Delivery.” no. March, 2015.
- [7] J. Jin, V. Reese, R. Coler, D. Carter, and M. Rolandi, “Chitin Microneedles for an Easy-to-Use Tuberculosis Skin Test,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 3, no. 3, p. 349–353, 2014.
- [8] A. Kurtz-Chalot *et al.*, “Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, p. 16–24, 2017.
- [9] M. Shahbazi, “Effect of Surface Chemistry on the Immune Responses and Cellular Interactions of Porous Silicon Nanoparticles,” 2015.
- [10] V. Kononenko, M. Narat, and D. Drobne, “Nanoparticle interaction with the immune system,” *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, vol. 66, no. 2, p. 97–108, 2015.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [11] A. Mendoza, J. A. Torres-Hernandez, J. G. Ault, J. H. Pedersen-Lane, D. Gao, and D. A. Lawrence, "Silica nanoparticles induce oxidative stress and inflammation of human peripheral blood mononuclear cells," *Cell Stress Chaperones*, vol. 19, no. 6, p. 777–790, 2014.
- [12] A. Nemmar, *et al.*, "Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, p. 2779, 2014.
- [13] H. Nishimori, M. Kondoh, K. Isoda, S. ichi Tsunoda, Y. Tsutsumi, and K. Yagi, "Silica nanoparticles as hepatotoxicants," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no. 3, p. 496–501, 2009.
- [14] E. Uemura, *et al.*, "Relationship between size and surface modification of silica particles and enhancement and suppression of inflammatory cytokine production by lipopolysaccharide- or peptidoglycan-stimulated RAW264.7 macrophages," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 18, no. 6, p. 1–8, 2016.
- [15] Fatemeh bazzaz *et al.*, "Adsorption of BSA onto hexagonal mesoporous silicate loaded by APTES and tannin: Isotherm, thermodynamic and kinetic studies," *Advanced Powder Technology.*, 2018.
- [16] S. Bone, *et al.*, "Physisorption and chemisorption of T4 bacteriophages on amino functionalized silica particles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 532, p. 68–76, 2018.
- [17] Q.-L. Wang, *et al.*, "An efficient direct competitive nano-ELISA for residual BSA determination in vaccines," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 19, p. 4607–4614, 2017.
- [18] F. Hu, K. Chen, H. Xu, and H. Gu, "Design and preparation of bi-functionalized short-chain modified zwitterionic nanoparticles," *Acta Biomater.*, vol. 72, p. 239–247, 2018.
- [19] WERNER STOBER, ARTHUR FINK, "Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range," *COLLOID AND INTERFACE*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SCIENCE., vol. 26, p. 62-69, 1968.

- [20] Panwar, K., Jassal, M., and Agrawal, A. K. "In situ synthesis of Ag-SiO₂ Janus particles with epoxy functionality for textile applications," *Particuology*, 19, p. 107-112.
- [21] M. Kurylowicz, *et al.*, "The effect of nanoscale surface curvature on the oligomerization of surface-bound proteins," *THE ROYAL SOCIETY Interface.*, 2014
- [22] Doutor José Paulo Farinha, *et al.*, "Synthesis and Characterization of pH Stimuli-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles" *Universidade Nova de Lisboa*, LISBOA, 2016
- [23] Jinku Kim "Mathematical modeling approaches to describe the dynamics of protein adsorption at solid interfaces." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 2017

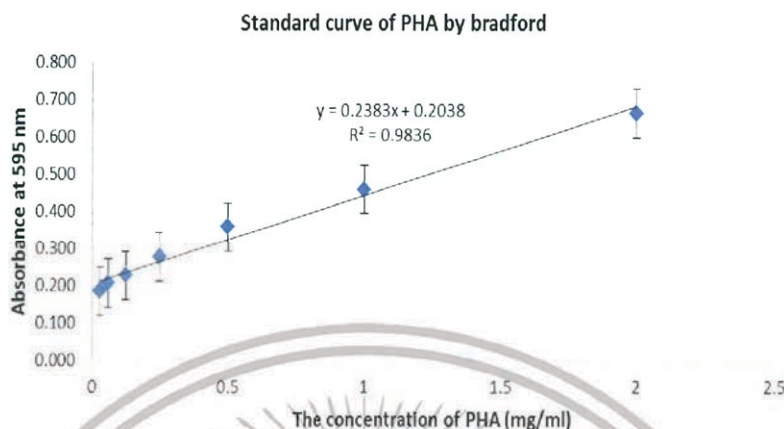


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

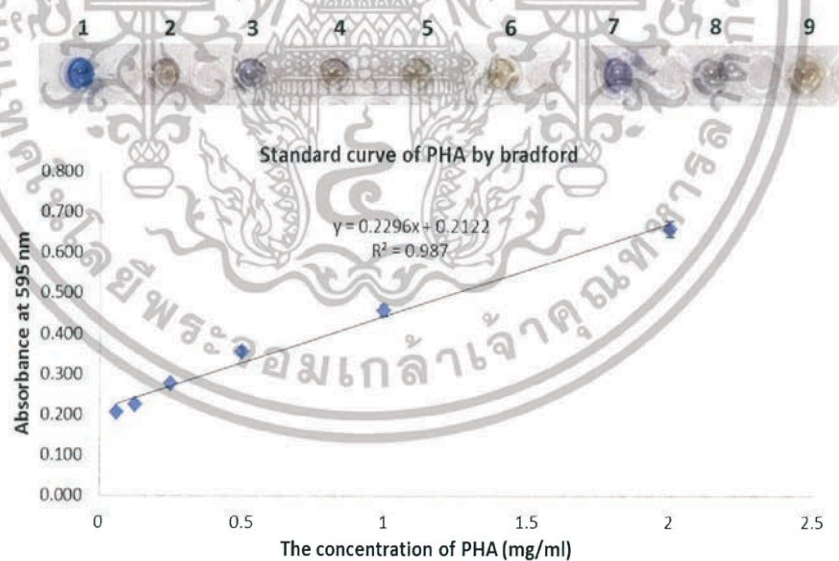


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A.1 การคอนจูเกตโปรตีน PHA กับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ที่มีขนาดแตกต่างกัน

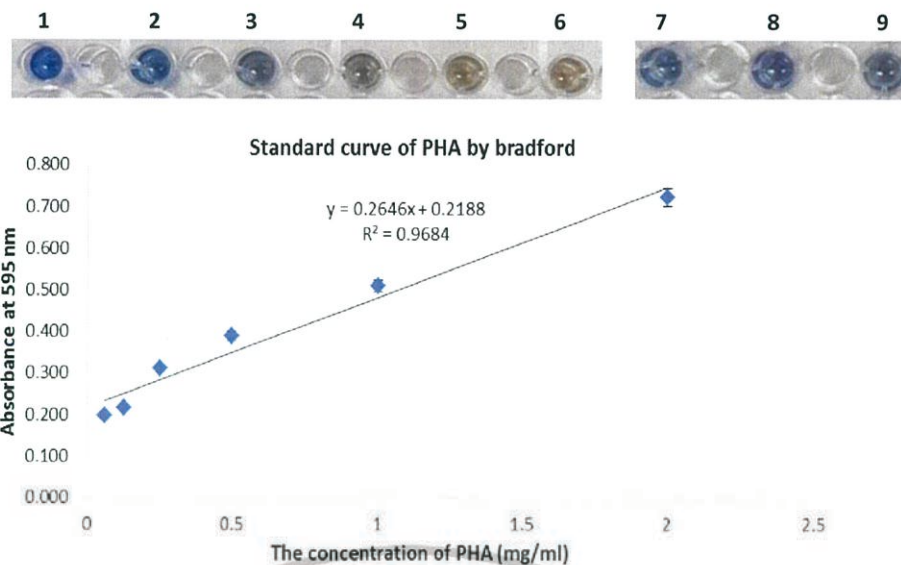


รูปที่ A1.1 Microplate reader ช่องที่ 1-6 standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL และ ช่องที่ 7-9 supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8 mg/mL และกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance และ ความเข้มข้นของ standard PHA ความเข้มข้น 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL ตามลำดับ



รูปที่ A1.2 Microplate reader ช่องที่ 1-6 standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL และ ช่องที่ 7-9 supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm ในอัตราส่วน 1:3, 1:12, 1:27 mg/mL และกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance และ ความเข้มข้นของ standard PHA ความเข้มข้น 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ A1.3 Microplate reader ช่องที่ 1-6 standard PHA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.06 mg/mL และ ช่องที่ 7-9 supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 450 nm ในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:8 mg/mL และกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance และ ความเข้มข้นของ standard PHA ความเข้มข้น 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL ตามลำดับ



A2 ตารางผลการทดลองของสร้างกราฟไอโซเทอม

ตาราง A2.1 ผลการทดลองหาความค่าการดูดกลืนแสงของ supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 100 nm

ความเข้มข้นเริ่มต้นของ PHA (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง		เฉลี่ย	SD
0.25	0.191	0.184	0.187	0.005
0.50	0.224	0.212	0.218	0.008
1.00	0.365	0.346	0.356	0.013
1.50	0.503	0.481	0.492	0.016
2.00	0.595	0.581	0.588	0.010

ตาราง A2.2 ผลการทดลองหาความค่าการดูดกลืนแสงของ supernatant ของ PHA ที่คอนจูเกตกับอนุภาค $\text{NH}_2 - \text{SiO}_2$ ขนาด 300 nm

ความเข้มข้นเริ่มต้นของ PHA (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง		เฉลี่ย	SD
0.25	0.201	0.181	0.191	0.014
0.50	0.256	0.232	0.244	0.017
1.00	0.401	0.361	0.381	0.028
1.50	0.484	0.462	0.473	0.016
2.00	0.571	0.543	0.557	0.020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้