

การใช้อนุภาคทองคำนาโนในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี

นางสาวประกายมาศ บุพอังกูร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช

ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HIV VIRAL LOAD DETECTION BY GOLD NANOPARTICLE APPROACHES

Miss Prakaimas Bupa-ungkool



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical

Microbiology and Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

ประกายมาส บุพอังกูร : การใช้อนุภาคทองคำนาโนในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV VIRAL LOAD DETECTION BY GOLD NANOPARTICLE APPROACHES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ปาลณี อัมรานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, 117 หน้า.

ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟล (Nucleic Acid Lateral Flow, NALF) เป็นเทคนิคทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาสารพันธุกรรม ใช้ระยะเวลาทำการทดสอบสั้น อ่านผลได้เร็ว มีความไวและต้นทุนต่ำ แต่ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง โดยเฉพาะการอ่านผลด้วยตาเปล่าที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุมซึ่งทำให้เกิดความผิดพลาดได้ ด้วยเหตุนี้ความเข้มของเส้นทดสอบจึงมีความสำคัญต่อการแปลผลซึ่งขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อชุด NALF ได้แก่ ชนิดของ oligonucleotide probe, ความยาวคลื่นและระยะเวลาที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV crosslink และขนาดอนุภาคทองคำนาโน และนำผลการศึกษามาพัฒนาชุด NALF เพื่อใช้หาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดโดย probe ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับสายนิวคลีโอไทด์เป้าหมายส่วน reverse transcriptase gene (RT gene) ของเชื้อไวรัสเอชไอวี 1 ทดสอบกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการอ่านผลด้วยตาเปล่าเพื่อให้ได้ส่วนประกอบของชุด NALF ที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นชุดตรวจ ผลการศึกษาปัจจัยด้าน probe คู่กับการใช้ UV crosslink พบว่า biotin probe และ UV crosslink ที่ 254 นาโนเมตร 60 วินาที ให้ความเข้มเฉลี่ยของเส้นทดสอบสูงกว่าที่ 302 และ 365 นาโนเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.001) ผลการทดสอบในกลุ่ม non-biotin probe และ UV crosslink ให้ความเข้มสูงสุดที่ 365 นาโนเมตร 45 วินาที แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.5839) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มเฉลี่ยของเส้นทดสอบ 2 กลุ่ม กลุ่ม biotin probe ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงกว่ากลุ่ม non-biotin probe 1.57 เท่า ปัจจัยด้านขนาดของอนุภาคทองคำนาโนพบว่าขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มสูงกว่าขนาด 20, 30 และ 50 นาโนเมตร ปัจจัยของ probe ที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนพบว่าการใช้ thiol conjugate probe ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มสูงกว่าขนาด 20 นาโนเมตร และให้ความเข้มสูงกว่าการใช้ non-thiol conjugate probe นำผลที่ให้ความเข้มสูงสุดมาเตรียมชุด NALF โดยประกอบด้วยอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ตรงด้วย thiol conjugate probe เตรียมเส้นทดสอบและเส้นควบคุมด้วย biotin probe และ UV crosslink ที่ 254 นาโนเมตร 60 วินาที ผลการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจำนวน 16 ตัวอย่างแบ่งเป็นตัวอย่างที่มีค่าไวรัสในกระแสเลือดน้อยกว่า 20 copies/mL จำนวน 5 ตัวอย่างและมากกว่า 20 copies/mL จำนวน 11 ตัวอย่าง โดยนำซีดีเอ็นเอทดสอบกับชุด NALF ให้ผลลบ 5 ตัวอย่าง ในตัวอย่างที่มีค่าไวรัสในกระแสเลือดน้อยกว่า 20 copies/mL ให้ผลบวก 5 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 6 ตัวอย่าง ในตัวอย่างที่มีค่าไวรัสในกระแสเลือดมากกว่า 20 copies/mL ผลบวกพบแถบสีแดงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบจาง อ่านผลด้วยตาเปล่ายาก ความเข้มของเส้นทดสอบไม่ขึ้นกับปริมาณไวรัสในกระแสเลือด จากการศึกษพบว่าชุด NALF มีความไวต่ำไม่เหมาะนำมาใช้ตรวจติดตามผู้ติดเชื้อเอชไอวีควรมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อนทดสอบและเพิ่มปริมาณตัวอย่างในการศึกษาเพิ่มเติม

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา ลายมือชื่อ.....
 คลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
 สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม
 ทางกายภาพและวิทยาภูมิคุ้มกัน

5576656137 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: HIV VIRAL LOAD, GOLD NANOPARTICLES, NUCLEIC ACID LATERAL FLOW STRIP TEST, UV CROSSLINK

PRAKAIMAS BUPA-UNGKOOOL: HIV VIRAL LOAD DETECTION BY GOLD NANOPARTICLE APPROACHES. ADVISOR: ASST. PROF. PALANEE AMMARANOND, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. AMORNPUN SEREEMASPUN, Ph.D., 117 pp.

Nucleic acid lateral flow strip test (NALF) is another technique for the detection of nucleic acid. This assay has been proposed as a rapid, sensitivity, easy to used and inexpensive. However, the pitfall of NALF is the interpretation by naked eye. The sensitivity of NALF depends on intensity of test line. The objective of this study is to evaluate of the NALF's factors influencing performance to obtain the optimal condition for test line's intensity by naked eye and apply for diagnostic testing. The objective of this study is to evaluate of the NALF's factors influencing performance, such as type of oligonucleotide probe, UV wavelength, exposure time and size of gold nanoparticles (AuNPs). The results showed biotin probe in combination with UV crosslink at 254 nm 60 second was significantly higher than others wavelength (p -value = 0.001). Non-biotin probe in combination with UV crosslink group showed the highest intensity at 365 nm 45 second (p -value = 0.5839). Biotin probe showed higher intensity in average when compared to non-biotin probe by 1.57 times. The 10 nm AuNPs showed the highest intensity when compared to 20, 30 and 50 nm. Thiol conjugate probe were treated with 10 nm AuNPs, that gave higher intensity than 20 nm AuNPs of thiol conjugate probe and also higher than 10 and 20 nm AuNPs of non-thiol conjugate probe. The data indicated that 10 nm AuNPs with thiol conjugate probe and biotin probe in combination with UV crosslink at 254 nm 60 second gave the highest intensity of test line. The optimal NALF was used in HIV viral load detection. 16 samples from HIV patient was divided into 5 samples of HIV viral load (VL) <20 copies/mL and 11 samples of VL >20 copies/mL. The negative results showed 5 samples in VL <20 copies/mL. In VL >20 copies/mL samples showed 5 positive results and 6 negative results. NALF had low sensitivity for HIV viral load detection. Therefore, further study should be performed in the amplification step for sensitivity enhancement.

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature

Clinical Microbiology Advisor's Signature

Field of Study: Molecular Science of Medical Co-Advisor's Signature

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความเมตตากรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาที่มีพระคุณยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ภาควิชา กายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยแนะนำชี้แนวทาง ช่วยเหลือ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุนทรี กุลกীরติยุต ประธานกรรมการสอบปกป้อง วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาวิณ ห่อทองคำ คณะกรรมการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุน 90 ปี กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ สนับสนุนเงินทุนทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณทุนค่าเล่าเรียนคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษา

ขอขอบคุณคุณสมัญ สวงวนสิทธิอนันต์ คุณบุญธิดา เสริมศักดิ์สกุล และเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการ หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพที่ให้การช่วยเหลือตลอดการทำงาน วิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการแพทย์ศิริราช อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ ขอขอบคุณน้องๆ ห้องแลป 817 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยช่วยเหลือให้อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือ และน้ำใจไมตรีที่มีให้ตลอดการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคลังเลือด โรงพยาบาลรามารวมถึงทุกท่านที่คอยให้ กำลังใจ ช่วยเหลือ และสนับสนุนการศึกษาปริญญาโทในครั้งนี้คุณความดีของการศึกษาและคุณค่า ของวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบแต่อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
3. สมมติฐาน.....	4
4. ประโยชน์ที่ได้รับ.....	4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม.....	5
1. เชื้อเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus, HIV).....	5
1.1 โครงสร้างและลักษณะพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี.....	5
1.2 สายพันธุ์เชื้อเอชไอวีและการแพร่ระบาด.....	6
1.3 วิธีการที่ใช้ตรวจการติดเชื้อเอชไอวี.....	12
1.3.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสและส่วนประกอบของไวรัส.....	12
1.3.2 การตรวจหาแอนติบอดี (Serology Test).....	13
1.4 การตรวจประเมินและติดตามการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	18
1.4.1 การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดซีดี 4 (CD4).....	18
1.4.2 การตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (HIV Viral Load).....	18
1.4.3 การตรวจหาภาวะการดื้อยา (Drug resistance).....	25

2. นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology).....	28
2.1 อนุภาคทองนาโน.....	28
3. แลเทอรัลโฟล (Lateral Flow Assay, LFA).....	35
3.1 แลเทอรัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์ (Lateral Flow Immunoassay) มีหลักการ 2 แบบ.....	37
3.1.1 แลเทอรัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์แบบแซนวิช	37
3.1.2 แลเทอรัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์แบบยับยั้ง (inhibition).....	38
3.2 นิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟล (Nucleic Acid Lateral Flow, NALF).....	42
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	48
1. เครื่องมือและอุปกรณ์	48
2. รายการน้ำยาและสารเคมี.....	50
3. การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน	51
4. ลำดับเบสที่ใช้เป็น Oligonucleotide probe และ Target Sequence	53
5. การตรึง thiol conjugate probe (conjugate probe 1) กับผิวอนุภาคทองนาโน.....	55
6. การตรึง non-thiol conjugate probe (conjugate probe 2) บนผิวอนุภาคทองนาโน	57
7. การเตรียม biotin probe สำหรับหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเพื่อทำเส้นทดสอบ (test line) และเส้นควบคุม (control line).....	58
8. การเตรียม non-biotin probe สำหรับหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเพื่อทำเส้น ทดสอบ (test line) และเส้นควบคุม (control line).....	59
8.1 การเตรียม sample pad.....	59
8.2 การเตรียม conjugate pad.....	59
8.3 การเตรียม detection membrane.....	59
8.4 การเตรียม absorbent pad.....	60
8.5 การประกอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟล	60
9. การตรึงสารพันธุกรรมบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน	60

10. การทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟลกับ RT gene ของ HIV-1 (target sequence).....	61
11. สถิติที่ใช้ในการทดลอง.....	61
12. การทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟลทดสอบกับพลาสมาของผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	63
12.1 สิ่งส่งตรวจ.....	63
12.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ.....	63
12.3 การทำ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).....	64
12.4 การทดสอบซีดีเอ็นเอด้วยชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟล.....	65
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	66
1. ลักษณะของอนุภาคทองคำนาโน.....	66
1.1 สีของอนุภาคทองคำนาโน.....	66
1.2 ผลการวิเคราะห์ขนาดรูปร่าง การเกาะกลุ่ม หรือการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM).....	67
1.2.1 ขนาดของอนุภาคทองคำนาโน.....	67
1.2.2 รูปร่างของอนุภาคทองคำนาโน.....	67
1.2.3 การกระจายตัว.....	67
1.2.4 ผลการวิเคราะห์ขนาดด้วยโปรแกรม ImageJ.....	67
1.3 ขนาดอนุภาคทองคำนาโนและค่าศักย์ประจุที่ผิว (Zeta potential) เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำนาโนด้วยเครื่อง Zetasizer.....	70
1.4 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องวิสิเบิล-สเปกโตรสโคป (UV-visible spectroscopy).....	76
2. ผลการทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟลกับ RT gene ของเชื้อ HIV-1 (Target sequence).....	77

2.1 ผลการทดลองของ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	78
2.2 ผลการทดลองของ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร	79
2.3 ผลการทดลองของ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	80
2.4 ผลการทดลองของ non-biotin probe (capture probe 2 และ control probe 2) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	80
2.5 ผลการทดลองของ non-biotin probe (capture probe 2 และ control probe 2) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร	81
2.6 ผลการทดลองของ non-biotin probe (capture probe 2 และ control probe 2) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	82
2.7 ผลการเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบในกลุ่ม biotin probe กับกลุ่ม non-biotin probe ที่ความยาวคลื่นต่างๆ	82
2.8 ผลการทดสอบความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล	84
3. ผลการเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคทองคำนาโนต่อความเข้มของเส้นทดสอบ	85
4. ผลการเปรียบเทียบชนิดของ conjugate probe ที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนต่อความเข้มของเส้นทดสอบ	85
5. ผลการทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลกับสิ่งส่งตรวจ	87
บทที่ 5 อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ และสรุปผลการทดลอง	91
อภิปรายผลการทดลอง	91
ข้อเสนอแนะ	99
สรุปผลการทดลอง	100
รายการอ้างอิง	101
ภาคผนวก	113

1. เอกสารรับรองโครงการวิจัย หมายเลขไออาร์ปี 575/57.....	113
2. การเตรียมสารเคมี.....	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	117



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	เกณฑ์ความไวและความจำเพาะของชุดตรวจชนิดต่างๆ ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ...	16
ตารางที่ 2	แสดงการเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อ	20
ตารางที่ 3	แสดงการเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดด้วยเทคนิคทางเลือก .	22
ตารางที่ 4	ประโยชน์และจุดด้อยของแลเทอร์อัลโฟล	41
ตารางที่ 5	ตัวอย่างการนำแลเทอร์อัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์มาใช้	40
ตารางที่ 6	ตัวอย่างการนำนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลมาใช้	47
ตารางที่ 7	Oligonucleotide probe ที่ใช้ในชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟล.....	54
ตารางที่ 8	ตารางสรุปขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและวิเคราะห์ขนาดด้วยโปรแกรม ImageJ	70
ตารางที่ 9	ตารางสรุปขนาดและค่า Zeta potential ของอนุภาคทองคำนาโนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer.....	76

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างเชื้อเอชไอวี	6
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างอาร์เอ็นเอของเชื้อเอชไอวี 1	6
ภาพที่ 3 ภาพแสดงสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อ HIV-1 และ HIV-2.....	7
ภาพที่ 4 การแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวี 1.....	8
ภาพที่ 5 ข้อมูลของ UNAIDS แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2015.....	9
ภาพที่ 6 ข้อมูลของ UNAIDS แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีรายใหม่ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2015	10
ภาพที่ 7 ข้อมูลของ UNAIDS แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เสียชีวิตในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2015	10
ภาพที่ 8 จากข้อมูลของ UNAIDS แสดงความชุกของเชื้อเอชไอวีในกลุ่มชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชายระหว่างปี ค.ศ. 2011-2015	11
ภาพที่ 9 จากข้อมูลของ UNAIDS แสดงความชุกของเชื้อเอชไอวีในกลุ่มชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชายระหว่างปี ค.ศ. 2011-2015	11
ภาพที่ 10 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหา HIV maker	15
ภาพที่ 11 แสดงแนวการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่และเด็กอายุ 18 เดือนขึ้นไป	17
ภาพที่ 12 แนวทางการเก็บตัวอย่างส่งตรวจการต่ออย่าต้านไวรัส	27
ภาพที่ 13 คุณสมบัติอนุภาคทองนาโนและการนำไปใช้ในการวินิจฉัยทางคลินิก	29
ภาพที่ 14 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนจากสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์และโซเดียมซิเตรทด้วยปฏิกิริยารีดักชันของ John Turkevich และคณะ	30
ภาพที่ 15 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนจากสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ด้วยโซเดียมบอโรไฮไดรด์จากวิธีของ Brust และ Schiffrin	31
ภาพที่ 16 แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาคทองนาโนเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย	32

ภาพที่ 17 แสดงการเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีม่วงเมื่ออนุภาคทองนาโนเกาะกลุ่ม	33
ภาพที่ 18 การตรึงสารชีวโมเลกุลบนผิวอนุภาคทองนาโน	34
ภาพที่ 19 ส่วนประกอบแลเทอรัลโพล	36
ภาพที่ 20 แลเทอรัลโพลอิมมูโนเอสเสย์แสดงผลเป็นบวกเมื่อเกิดแถบสีทั้ง 2 แถบที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม	37
ภาพที่ 21 แลเทอรัลโพลอิมมูโนเอสเสย์แบบแซนวิช.....	38
ภาพที่ 22 แลเทอรัลโพลอิมมูโนเอสเสย์แบบยับยั้ง (inhibition)	39
ภาพที่ 23 หลักการของนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลแบบแซนวิช	43
ภาพที่ 24 นิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล	44
ภาพที่ 25 การใช้ latex bead แทนอนุภาคทองนาโนในนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล	45
ภาพที่ 26 แสดงการตรึง probe บนเมมเบรน.....	46
ภาพที่ 27 แสดงการเปลี่ยนสีของสารละลาย 1% ไฮโดรเจนเตตระคลอโรออร์เรตในน้ำ milli Q.....	53
ภาพที่ 28 โครงสร้างของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล	60
ภาพที่ 29 แผนภาพการทดลองของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล.....	62
ภาพที่ 30 สีของอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ด้วย 1% โซเดียมซิเตรทในปริมาตรแตกต่างกัน.....	66
ภาพที่ 31 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	68
ภาพที่ 32 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	68
ภาพที่ 33 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 3 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	69
ภาพที่ 34 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 4 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	69
ภาพที่ 35 แสดงขนาดและค่า Zeta potential ของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer	72
ภาพที่ 36 แสดงขนาดและค่า Zeta potential ของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer	73
ภาพที่ 37 แสดงขนาดและค่า Zeta potential ของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 3 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer	74

ภาพที่ 38 แสดงขนาดและค่า Zeta potential ของอนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 4 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer	75
ภาพที่ 39 ภาพแสดงการดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเล็ตของอนุภาคทองคำนาโนแต่ละชนิดเมื่อวัดด้วยเครื่องวิสิเบิล-สเปกโตรสโคป	77
ภาพที่ 40 Biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	79
ภาพที่ 41 Biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร	79
ภาพที่ 42 Biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	80
ภาพที่ 43 Non-biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	81
ภาพที่ 44 Non-biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร	81
ภาพที่ 45 Non-biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	82
ภาพที่ 46 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของเส้นทดสอบแต่ละความยาวคลื่นระหว่างกลุ่ม biotin probe และ non-biotin probe	83
ภาพที่ 47 แสดงผลเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบเมื่อชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟเตรียมจากอนุภาคทองคำนาโนขนาดต่างๆ	85
ภาพที่ 48 แสดงผลเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟที่เตรียมจากอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วย thiol conjugate probe กับอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วย non-thiolconjugate probe	87
ภาพที่ 49 ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟที่ทดสอบกับสิ่งส่งตรวจ	88

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus, HIV) เป็นสาเหตุของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือโรคเอดส์ (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) โดยเชื้อเอชไอวีจะเข้าไปทำลายเม็ดเลือดขาวทำให้ระดับภูมิคุ้มกันลดลงทำให้ติดเชื้อฉวยโอกาสง่ายและเสี่ยงต่อการเสียชีวิต

จากรายงานโครงการโรคเอดส์แห่งสหประชาชาติ (UNAIDS) ในปี พ.ศ. 2558 พบว่ามีผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั่วโลกประมาณ 36,700,000 คน เป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 2,100,000 คน มีผู้เสียชีวิตประมาณ 1,100,000 คน เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2554 พบผู้ติดเชื้อทั้งหมดประมาณ 33,900,000 คน เพิ่มขึ้นร้อยละ 8.26 เป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 2,200,000 คน ลดลงร้อยละ 0.45 มีผู้เสียชีวิตทั่วโลกประมาณ 1,400,000 คน ลดลงร้อยละ 45 พบว่าทั่วโลกมีผู้ติดเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่เพิ่มขึ้นแต่มีการติดเชื้อรายใหม่และการตายลดลง จากรายงานของประเทศไทยปี พ.ศ. 2558 พบผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีชีวิตทั้งหมดจำนวนประมาณ 440,000 คน เป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 6,900 ราย มีผู้เสียชีวิตประมาณ 14,000 คน เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2554 พบผู้ติดเชื้อประมาณ 520,000 คน ลดลงร้อยละ 15.38 เป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 18,000 คน ลดลงร้อยละ 61.67 มีผู้เสียชีวิตประมาณ 34,000 คน ลดลงร้อยละ 58.82 ในประเทศไทยพบว่ามีผู้ติดเชื้อมีอัตราการลดลงทั้งจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ยังมีชีวิตอยู่ ผู้เสียชีวิตและผู้ติดเชื้อรายใหม่ (1) จากข้อมูลการเฝ้าระวังการติดเชื้อเอชไอวีในประชากรกลุ่มต่างๆ ของสำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2558 พบความชุกของการติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ร้อยละ 0.5 กลุ่มโลหิตบริจาคร้อยละ 0.2 กลุ่มพนักงานบริการตรงร้อยละ 1.1 พนักงานบริการแฝงร้อยละ 0.8 และกลุ่มชายที่มาตรวจกามโรค

ร้อยละ 3.1 นอกจากการติดเชื้อผ่านทางเพศสัมพันธ์ การใช้สารเสพติดชนิดฉีด กลุ่มแรงงานข้ามชาติแล้วเชื้อเอชไอวียังสามารถติดต่อจากแม่ที่ติดเชื้อสู่ลูกผ่านทางรกได้ (2)

ผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำเป็นต้องได้รับยาต้านไวรัสเพื่อยับยั้งการเพิ่มปริมาณไวรัสในกระแสเลือด โดยก่อนเริ่มการรักษาด้วยยาต้านไวรัสผู้ติดเชื้อจำเป็นต้องได้รับการตรวจสถานะภูมิคุ้มกันคือตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดซีดี 4 (CD4) และตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือด (HIV Viral Load) เพื่อประเมินภาวะของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและภายหลังจากได้รับยาต้านไวรัสแล้วผู้ติดเชื้อยังจำเป็นต้องได้รับการตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดต่อไป เพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค ติดตามการดำเนินของโรครวมถึงเพื่อใช้ในการประเมินการรักษาด้วยยาต้านไวรัส การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดต้องใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และน้ำยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงและมีค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเครื่องทดสอบ เจ้าหน้าที่ต้องผ่านการฝึกอบรมรวมทั้งใช้เวลาตรวจวิเคราะห์นาน ทำให้การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดมีบริการจำกัดในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย โรงพยาบาลประจำจังหวัดและโรงพยาบาลระดับอำเภอ สำหรับผู้ติดเชื้อที่อยู่ห่างไกลจะต้องเจาะเลือดที่หน่วยบริการสาธารณสุขใกล้บ้านแล้วส่งสิ่งส่งตรวจมายังโรงพยาบาล ขั้นตอนการเก็บสิ่งส่งตรวจอาจมีผลกระทบต่อขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์และปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือด หากทำไม่ถูกต้องขั้นตอน ขนส่งล่าช้าหรืออุณหภูมิที่เก็บสิ่งส่งตรวจขณะขนส่งไม่ได้ตามมาตรฐานที่กำหนด และหากสิ่งส่งตรวจนั้นไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ผู้ป่วยจะต้องถูกเจาะเลือดซ้ำทำให้ได้รับผลการตรวจซ้ำและได้รับการรักษาซ้ำ

ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟล (Nucleic Acid Lateral Flow Strip Test, NALF) เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ขั้นตอนการทดสอบประกอบไปด้วยการสกัดสารพันธุกรรม การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและการอ่านผลด้วยชุด NALF ซึ่งจะแตกต่างจากการทำ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ที่ต้องอาศัย

อุปกรณ์เครื่องมือจำเพาะ สำหรับการตรวจด้วยวิธี NALF เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีภาระงานมากและต้องการผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วโดยการตรวจด้วยวิธี NALF จะใช้เวลาการตรวจน้อยกว่า 30 นาที (3-5) ขณะที่ RT-PCR ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจประมาณ 1-2 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบราคากันทั้งสองวิธีพบว่าการใช้ NALF มีราคาน้อยกว่า 10 ดอลลาร์สหรัฐ (5) ปัจจุบันวิธีที่ใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมมีราคาอยู่ระหว่าง 5-100 ดอลลาร์สหรัฐ (6) ในประเทศไทยสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติได้มีนโยบาย ชดเชยค่าบริการสำหรับการตรวจหาปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดได้ในวงเงิน 1,350 บาทต่อครั้ง ไม่เกิน 2 ครั้งต่อปี (7, 8) และสิทธิประกันสังคมตรวจปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด CD4 ได้ในวงเงินครั้งละ 500 บาท ไม่เกิน 1,000 บาทต่อปี (9)

ในปัจจุบันการตรวจด้วยชุด NALF ยังคงมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่างโดยเฉพาะการอ่านผลด้วยตาเปล่าที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุมซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดได้ ด้วยเหตุนี้ความเข้มของเส้นทดสอบจึงมีความสำคัญต่อการแปลผลซึ่งความเข้มของเส้นทดสอบนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ขนาดของอนุภาคทองคำ การตรึงสารชีวโมเลกุลที่ผิวของอนุภาคทองคำ การใช้ biotin probe หรือ non-biotin probe สำหรับเตรียมเส้นทดสอบและเส้นควบคุม หรือการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV crosslink) ในการตรึง probe ที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวีด้วยชุด NALF เพื่อนำมาใช้ตรวจติดตามการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี โดย probe ที่ใช้ในชุด NALF จะถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับสายนิวคลีโอไทด์เป้าหมายในส่วน reverse transcriptase gene (RT gene) ของเชื้อไวรัสเอชไอวี 1 โดยชุดทดสอบที่ได้จะทำการทดสอบกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการอ่านผลด้วยตาเปล่าเพื่อให้ได้ส่วนประกอบของชุด NALF ที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นชุดตรวจและเป็นอีกทางเลือกในการเลือกในการใช้ตรวจติดตามการติดเชื้อเอชไอวีโดยมีข้อดีคือราคาของการทดสอบจะถูกลงซึ่งจะช่วยทำให้ผู้ป่วยสามารถตรวจติดตามการรักษาได้มากขึ้นและทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตในการรักษาที่ดีขึ้น

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 2.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟล
- 2.2 พัฒนาชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลเพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี

3. สมมติฐาน

- 3.1 ขนาดของอนุภาคทองคำขนาดเล็ก, biotin probe และการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตเพิ่มความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟล
- 3.2 เทคนิคนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลใช้ในการตรวจติดตามผู้ติดเชื้อเอชไอวี

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

เพื่อพัฒนาชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลให้มีความไวสูงและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีด้วยเทคนิคนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟล เพื่อลดขั้นตอนการแปลผลจากการทำ RT-PCR เป็นการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือ และมีต้นทุนต่ำทำให้ค่าตรวจวิเคราะห์ลดลง

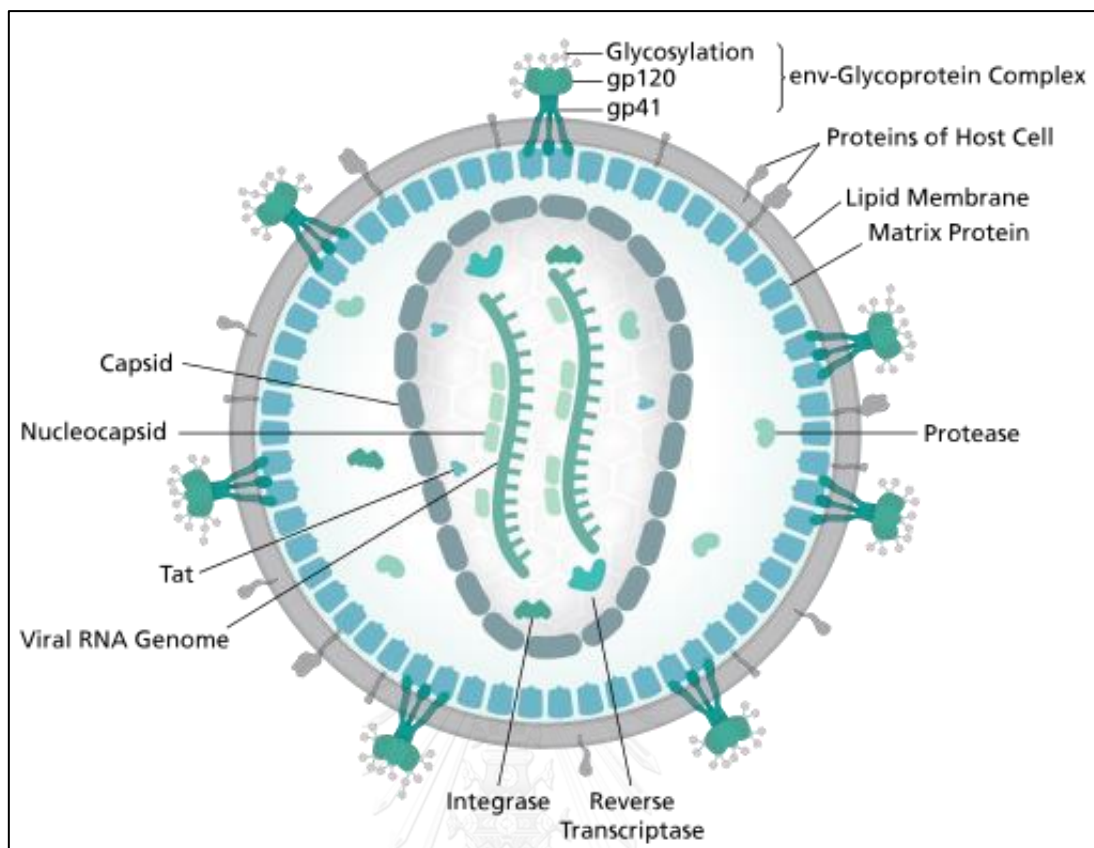
บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

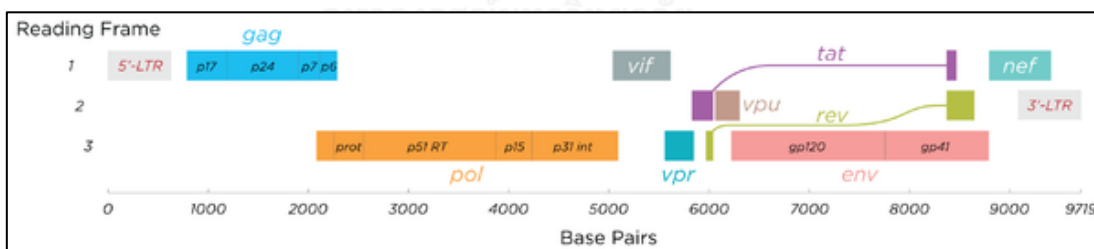
1. เชื้อเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus, HIV)

1.1 โครงสร้างและลักษณะพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี

เชื้อเอชไอวีเป็นไวรัสใน family Retroviridae มีรูปร่างเป็นทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 120 นาโนเมตร มีโครงสร้าง 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นนอกเป็นส่วน envelope มีลักษณะเป็นปุ่มยื่นออกด้านนอกโครงสร้างเป็นไกลโคโปรตีน โปรตีนที่สำคัญได้แก่ glycoprotein 120 (gp120) ทำหน้าที่จับกับ CD4 ที่ผิวของเม็ดเลือดขาวและมี glycoprotein 41 (gp41) เป็น transmembrane ชั้นถัดมาคือ matrix และชั้นในสุดเรียกว่า capsid protein โปรตีนที่สำคัญคือ p24 ภายในอนุภาคมีแกนกลาง (core) รูปทรงกระบอกภายในแกนกลางประกอบด้วยสารพันธุกรรมกรดไรโบนิวคลีอิกหรืออาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid, RNA) แบบสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) สองชุดที่เหมือนกัน มียีนสำคัญคือ *pol*, *env*, *gag* โดย *pol* gene กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส (replication) เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ reverse transcriptase (RT) ทำหน้าที่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกหรือดีเอ็นเอ เอนไซม์ integrase (IN) ทำหน้าที่รวมดีเอ็นเอของไวรัสเข้ากับดีเอ็นเอของผู้ติดเชื้อ และเอนไซม์ protease (PR) ทำหน้าที่ตัดโปรตีนสายยาวให้เป็นสายสั้นเพื่อให้ได้โปรตีนสำหรับสร้างเป็นไวรัสอนุภาคใหม่ *env* gene สร้าง envelope protein ได้แก่ gp120 และ gp41 ทำหน้าที่ช่วยให้เชื้อเอชไอวีเข้าเซลล์เม็ดเลือดขาว *gag* gene สร้าง matrix protein ได้แก่ p17, p24 และ nucleocapsid (p7 และ p9) ดังภาพที่ 1 และ 2



ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างเชื้อเอชไอวี (ภาพจาก https://en.wikipedia.org/wiki/Structure_and_genome_of_HIV)

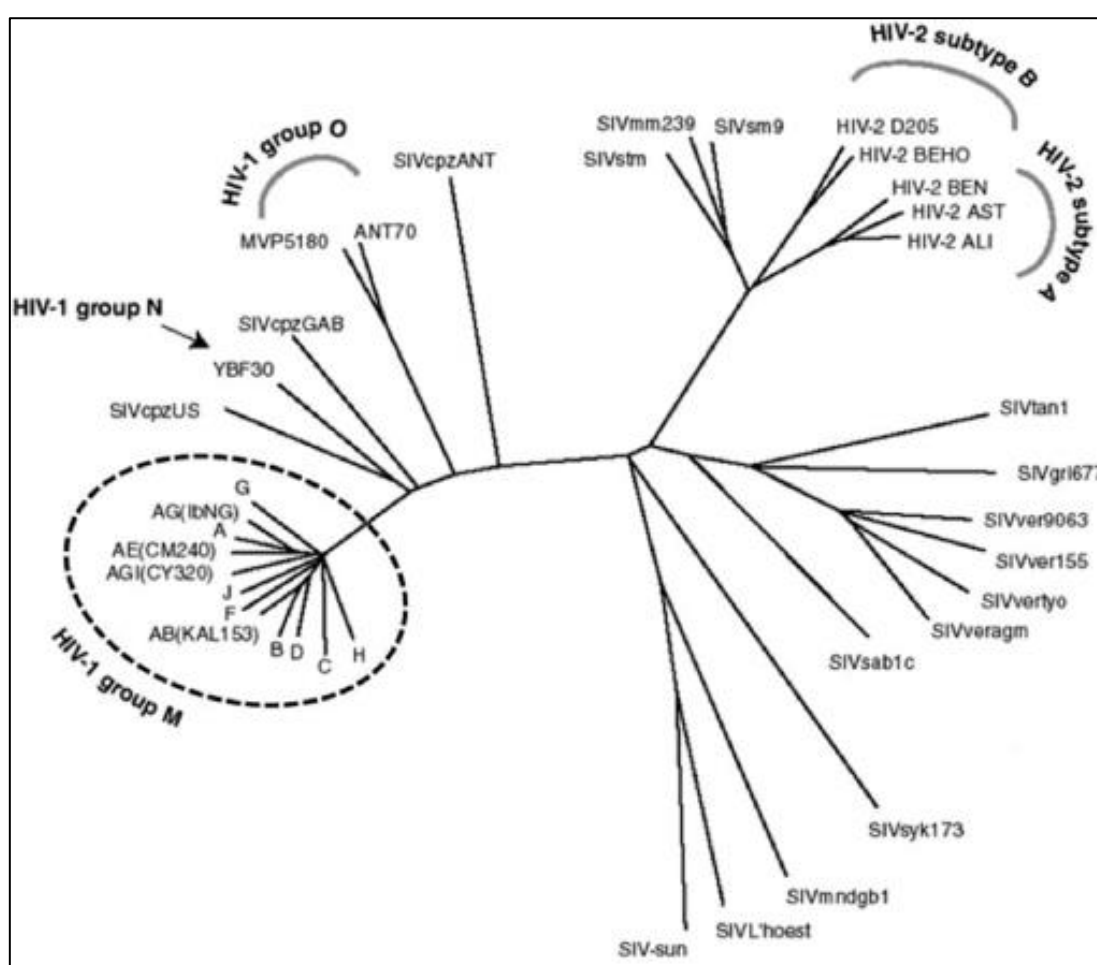


ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี 1 ประกอบด้วยยีนสำคัญ 3 ยีน คือ *gag*, *pol* และ *env* gene (ภาพจาก https://en.wikipedia.org/wiki/Structure_and_genome_of_HIV)

1.2 สายพันธุ์เชื้อเอชไอวีและการแพร่ระบาด

เชื้อเอชไอวีแบ่งเป็น 2 สายพันธุ์คือ เอชไอวี 1 (HIV-1) และเอชไอวี 2 (HIV-2) HIV-1 มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกและก่อโรครุนแรงกว่า HIV-2 HIV-1 แบ่งเป็น 4 group ได้แก่ group M

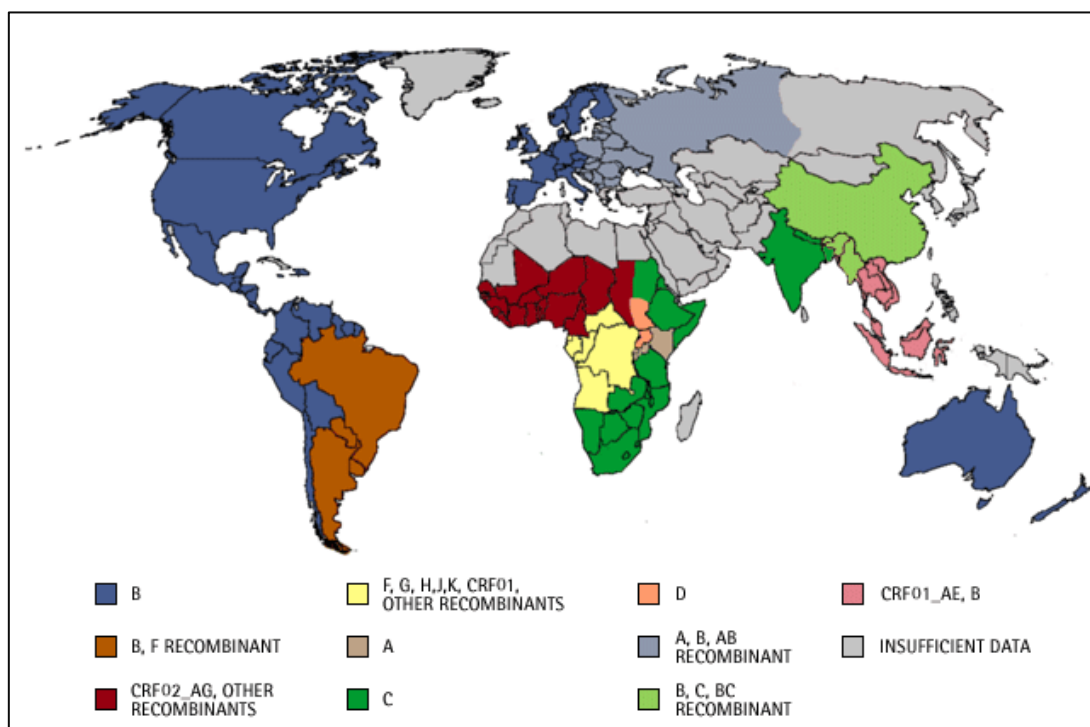
(major), group N (new), group O (outlier) และ group P HIV-1 group M, group O และ group N มีต้นกำเนิดมาจากชิมแปนซี (Simian immunodeficiency viruses from wild chimpanzees, SIVcpz) แต่ group P มีต้นกำเนิดมาจากกอริลล่า (Simian immunodeficiency viruses from wild gorilla, SIVgor) HIV-1 group M แบ่งเป็น subtype A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J และ K (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ภาพแสดงสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อ HIV-1 และ HIV-2 (10)

HIV-1 group M เป็น group ที่มีความสำคัญและมีการแพร่ระบาดมากที่สุดในโลก subtype B พบมากที่สุดพบมากในทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาและทวีปออสเตรเลีย subtype A และ D พบในทวีปแอฟริกา subtype C พบในทวีปแอฟริกาและประเทศอินเดีย subtype E พบในประเทศไทย

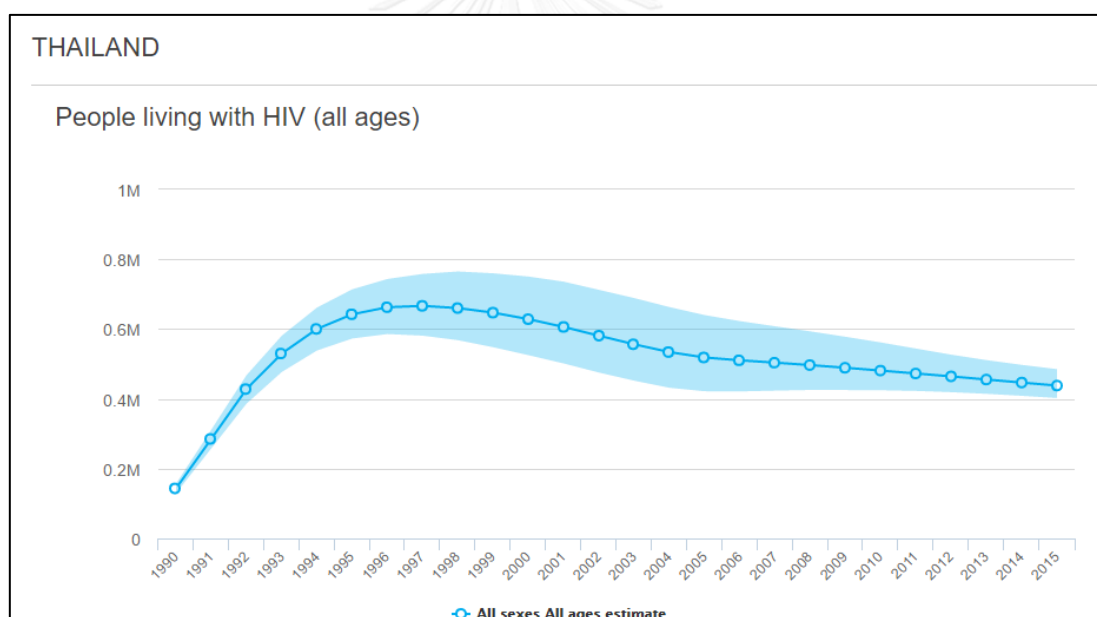
ประเทศญี่ปุ่นและทวีปแอฟริกากลาง subtype F พบในประเทศรומาเนียและประเทศบราซิล นอกจากนี้ในประเทศไทยและทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบ subtype AE ซึ่งเป็นการผสม 2 subtype คือ subtype A และ subtype E ใน group M เรียกว่า circulating recombinant forms (CRF01_AE) HIV-1 group O พบในแอฟริกาตะวันตกและแอฟริกากลาง HIV-1 group N และ HIV-1 group P พบในแคนเมอรูน HIV-2 แบ่งเป็น group A-H พบการแพร่ระบาดมากในทวีปแอฟริกา เป็นส่วนใหญ่ดังภาพที่ 4 (11-13)



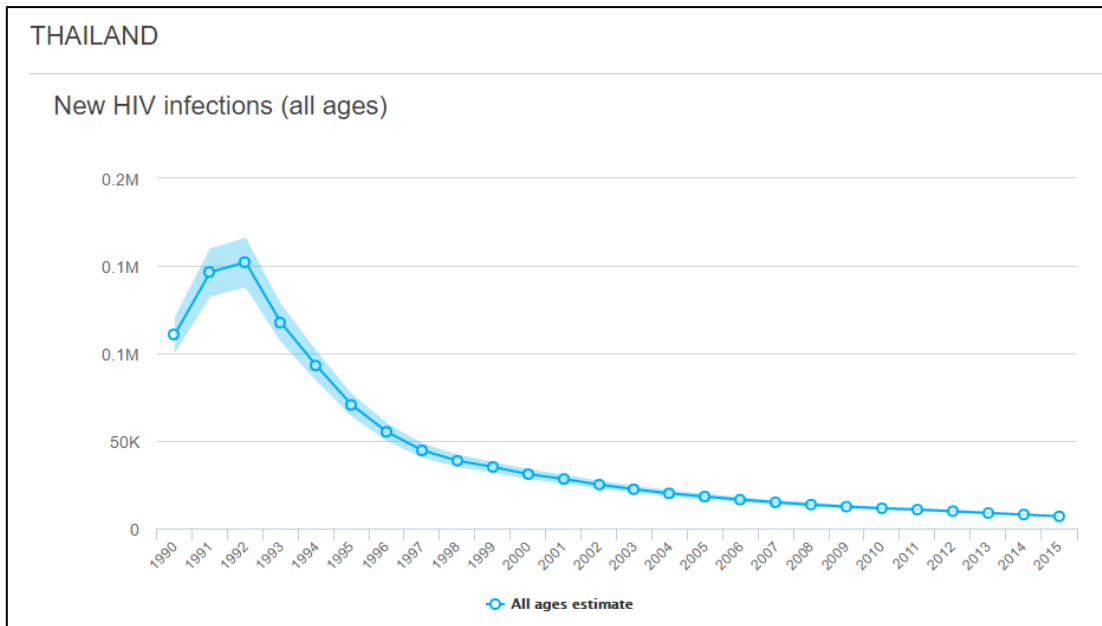
ภาพที่ 4 การแพร่ระบาดของเชื้อ HIV-1 (11)

สถานการณ์การติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยพบผู้ป่วยรายแรกในปี พ.ศ. 2528 ระยะแรกพบการระบาดในกลุ่มชายรักชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชาวต่างชาติ ปี พ.ศ. 2531 มีการระบาดในกลุ่มผู้ใช้ยาเสพติดโดยการฉีด ปี พ.ศ. 2533 มีการระบาดจากหญิงขายบริการ ปี พ.ศ. 2534 พบการระบาดในหญิงตั้งครรภ์ซึ่งเป็นภรรยาของชายนักเที่ยวและในทารกแรกคลอด (14) จากข้อมูลของ UNAIDS ปี พ.ศ. 2558 มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีประมาณ 440,000 คน (400,000-490,000) ผู้ติดเชื้อที่มีอายุระหว่าง 15-49

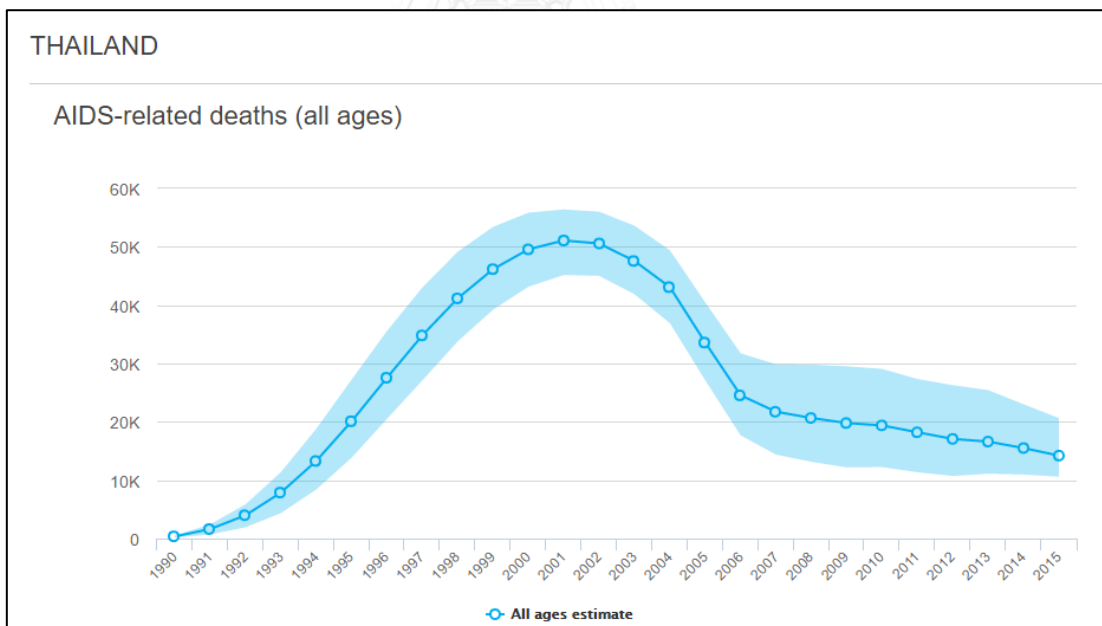
ปี มีความชุกร้อยละ 1.1 (1.0-1.3) หรือประมาณ 430,000 คน แยกเป็นผู้หญิงอายุ 15 ปีขึ้นไป จำนวน 180,000 คน ผู้ชายอายุ 15 ปีขึ้นไป จำนวน 250,000 คน เด็กแรกเกิดถึงอายุ 14 ปี จำนวน 4,100 คน เป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 6,900 คน มีผู้เสียชีวิตประมาณ 14,000 คน เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2554 พบผู้ติดเชื้อประมาณ 520,000 คน ลดลงร้อยละ 15.38 เป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 18,000 คน ลดลงร้อยละ 61.67 มีผู้เสียชีวิตประมาณ 34,000 คน ลดลงร้อยละ 58.82 โดยรวมสถานการณ์การติดเชื้อในประเทศไทยพบว่ามีผู้ติดเชื้อลดลง (1) ผู้ป่วยที่กินยาต้านไวรัสเอชไอวีภายใต้ระบบหลักประกันสุขภาพแห่งชาติสะสมจำนวน 355,123 คน โดยมีผู้ป่วยที่รับยาใหม่จำนวนเพิ่มขึ้นจาก ปี พ.ศ. 2557 จำนวน 33,837 คน (2)



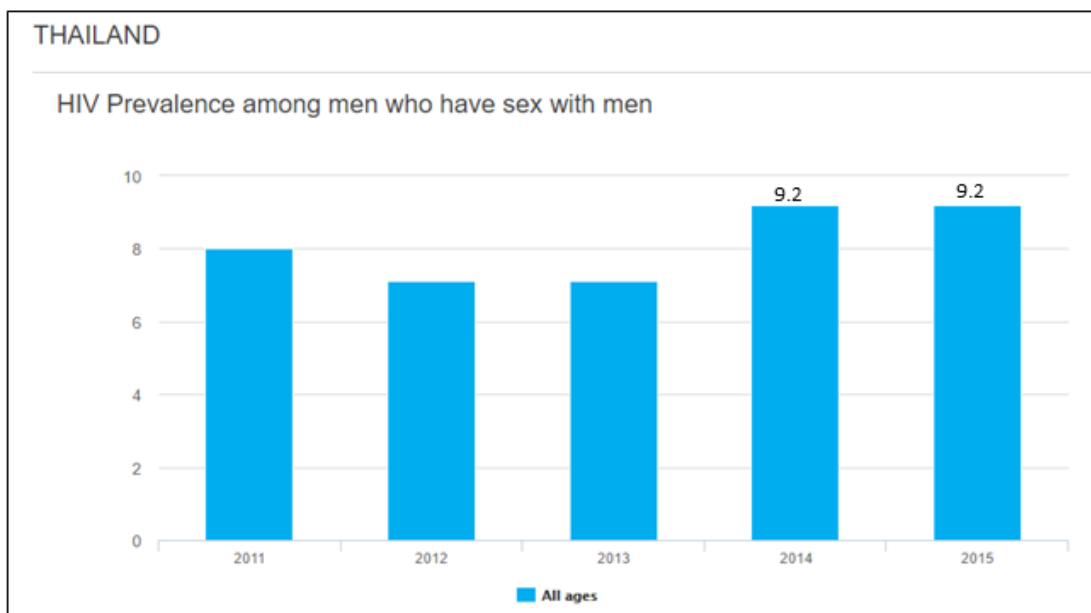
ภาพที่ 5 ข้อมูลของ UNAIDS แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2015 พบว่ามีแนวโน้มลดลง (ภาพจาก <http://aidsinfo.unaids.org/>)



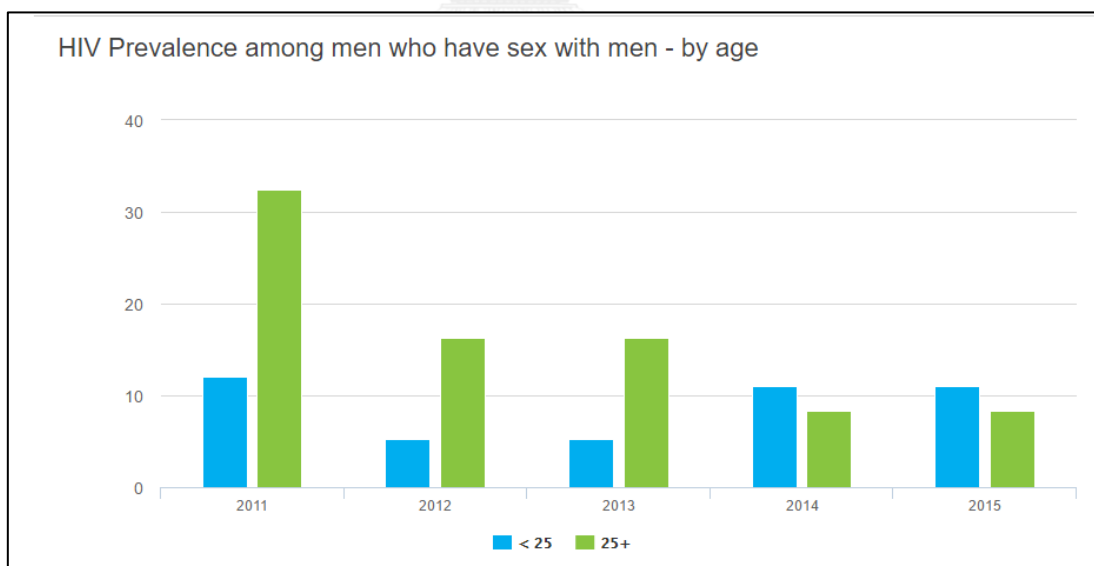
ภาพที่ 6 ข้อมูลของ UNAIDS แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีรายใหม่ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2015 พบว่ามีแนวโน้มลดลง (ภาพจาก <http://aidsinfo.unaids.org/>)



ภาพที่ 7 ข้อมูลของ UNAIDS แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เสียชีวิตในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990-2015 พบว่ามีแนวโน้มลดลง (ภาพจาก <http://aidsinfo.unaids.org/>)



ภาพที่ 8 จากข้อมูลของ UNAIDS แสดงความชุกของเชื้อเอชไอวีในกลุ่มชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชาย ระหว่างปี ค.ศ. 2011-2015 พบว่าปี ค.ศ. 2014 และ 2015 มีความชุกสูงสุดเท่ากัน (ภาพจาก <http://aidsinfo.unaids.org/>)



ภาพที่ 9 จากข้อมูลของ UNAIDS แสดงความชุกของเชื้อเอชไอวีในกลุ่มชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชาย ระหว่างปี ค.ศ. 2011-2015 แยกเป็นกลุ่มอายุน้อยกว่า 25 ปี และตั้งแต่ 25 ปีขึ้นไป พบว่าในปี ค.ศ.

2014 และ 2015 มีผู้ติดเชื้ออายุน้อยกว่า 25 ปี มากกว่าผู้ติดเชื้ออายุ 25 ปีขึ้นไป (ภาพจาก <http://aidsinfo.unaids.org/>)

1.3 วิธีการที่ใช้ตรวจการติดเชื้อเอชไอวี มีหลายวิธี ได้แก่ (15)

1.3.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสและส่วนประกอบของไวรัส

1.3.1.1 การตรวจหา p24 แอนติเจน (p24 antigen)

p24 แอนติเจนเป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนแกน (core) ของเชื้อเอชไอวีพบได้ในช่วงแรกของการติดเชื้อประมาณ 4-5 สัปดาห์แรกหลังจากติดเชื้อก่อนการสร้างแอนติบอดี เหมาะสำหรับผู้ที่เพิ่งได้รับเชื้อมาในระยะแรกที่ยังไม่มีการสร้างแอนติบอดีหรือตรวจในผู้ที่มีความเสี่ยงติดเชื้อสูงแต่ให้ผลตรวจเอชไอวีแอนติบอดีเป็นลบหรือให้ผลตรวจแอนติบอดีเป็นบวกแต่ผล western blot เป็นลบหรือแปลผลไม่ได้ (16)

1.3.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (Viral Culture)

ในร่างกายของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีเชื้อแพร่กระจายอยู่ในกระแสเลือดทั้งในพลาสมา เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ ในเนื้อเยื่อและสารคัดหลั่งต่างๆทุกชนิด แต่มีปริมาณไม่เท่ากันเปลี่ยนไปตามระยะเวลาการติดเชื้อและความรุนแรงของโรค โดยทั่วไปนิยมเพาะแยกเชื้อจากเม็ดเลือดขาวและพลาสมาเนื่องจากเก็บตัวอย่างได้ง่ายแต่นิยมเก็บจากเม็ดเลือดขาว ใช้ในผู้ที่มีความเสี่ยงแต่ให้ผลตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีเป็นลบ มีความจำเพาะร้อยละ 100 มีความไวร้อยละ 90-100 วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีความไวต่ำ ราคาแพง และใช้เวลานาน (17)

1.3.1.3 การตรวจหากรดนิวคลีอิก (Nucleic Acid Testing, NAT)

การตรวจหากรดนิวคลีอิกเป็นการตรวจหาโปรไวรัสดีเอ็นเอ (proviral DNA) ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเอชไอวีอาร์เอ็นเอ (HIV RNA) จากพลาสมาโดยอาศัยการเพิ่มของปริมาณกรด

นิวคลีอิกเหมาะสำหรับตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อในระยะแรกที่ยังตรวจไม่พบแอนติเจนหรือแอนติบอดี ในเด็กทารกที่มีอายุน้อยกว่า 18 เดือนที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อเอชไอวี ใช้ตรวจการติดเชื้อในผู้ติดเชื้อที่สรุปผลการตรวจหรือให้ผลการตรวจแตกต่างกัน เทคนิคที่ใช้ตรวจหากรดนิวคลีอิก ได้แก่ Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) สามารถตรวจได้แม้มีปริมาณอาร์เอ็นเอเล็กน้อยแต่มีความไวสูง (18, 19)

1.3.2 การตรวจหาแอนติบอดี (Serology Test)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชไอวีมีจุดประสงค์เพื่อใช้ตรวจคัดกรองหรือตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเอชไอวีภายหลังจากติดเชื้อประมาณ 4-5 สัปดาห์ โดยชุดตรวจที่ใช้ต้องมีความไวไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 และมีความจำเพาะไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.0 เทคนิคที่ใช้ตรวจแบ่งเป็นวิธีตรวจกรอง ได้แก่ เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ใช้ส่วนประกอบของของไวรัสเอชไอวีตรึงบน solid phase อ่านผลปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีคูสที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดจากเอนไซม์ย่อย substrate และวัดการเปลี่ยนแปลงด้วยเครื่องอ่าน, particle agglutination ใช้เอชไอวีแอนติเจนเคลือบบนผิวของอนุภาคอ่านผลโดยดูการเกาะกลุ่ม, strip test ใช้เอชไอวีแอนติเจนเคลือบบนผิวของอนุภาคแล้วหยดในลักษณะเป็นจุด (dot) หรือเส้น (line) อ่านผลของปฏิกิริยาโดยคูสที่เกิดขึ้นอ่านผลได้รวดเร็ว (rapid test) และเทคนิค chemiluminescent มีเทคนิคเหมือนกับเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แต่วัดการเรืองแสงแทนการเปลี่ยนสี วิธีตรวจคัดกรองเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ข้อจำกัดของการตรวจหาแอนติบอดีคือ ไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 18 เดือน เนื่องจากเอชไอวีแอนติบอดีของแม่สามารถผ่านรกมาสู่ลูกได้หากตรวจอาจให้ผลบวกปลอม และไม่เหมาะสำหรับคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากร่างกายไม่สร้างแอนติบอดีหรือ

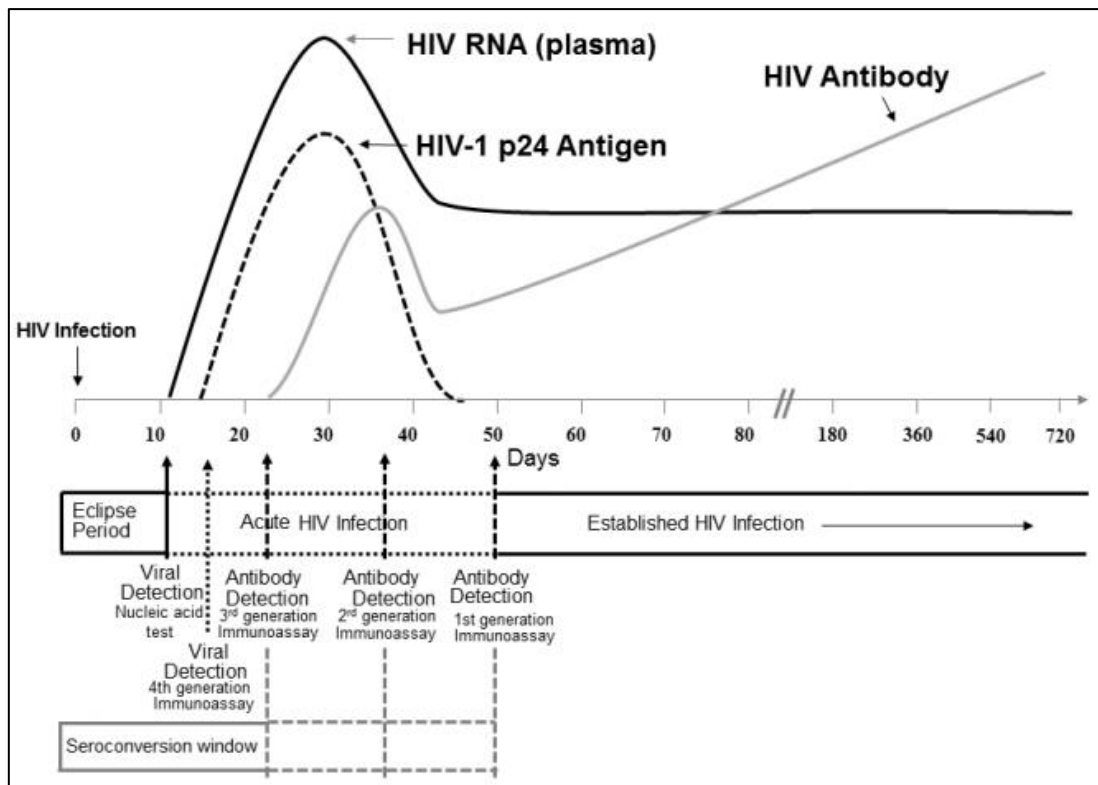
สร้างในปริมาณต่ำอาจทำให้เกิดผลลบปลอม (16) การตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชไอวีแบ่งได้ 2 ประเภท

1.3.2.1 การตรวจหาแอนติบอดี (Antibody Test)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชไอวีเป็นเทคนิคที่มีความไวและมีความจำเพาะสูง นิยมนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ chemiluminescent link immunosorbent assay (CMIA)

1.3.2.2 Western Blot Test

เป็นวิธีตรวจยืนยันการตรวจหาแอนติบอดีเมื่อเอชไอวีแอนติบอดีที่ให้ผลบวก โดยตรวจหาเอชไอวีส่วน core และ envelope ด้วยแผ่นเมมเบรนทดสอบที่มีแถบโปรตีนส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อเอชไอวีที่แยกจากกันตามขนาดด้วยวิธีการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ได้แก่ p17, p24, p31, p39, gp41, p51, p55 และ gp120/gp160 แล้วนำมาอบกับน้ำเหลืองทำปฏิกิริยาต่อด้วยวิธี indirect ELISA การแปลผลบวกต้องมี envelope protein (gp41, gp120 และ gp160) ขึ้นอย่างน้อยหนึ่ง core proteins (p17, p24 และ p55) ขึ้นอย่างน้อยหนึ่งหรือเอนไซม์ขึ้นอย่างน้อยหนึ่งหรือโปรตีนที่ถูกสร้างจาก *pol* gene ได้แก่ p66, p51 และ p31 (20, 21) วิธีนี้มีความจำเพาะสูง มีความไวต่ำและมีราคาแพง



ภาพที่ 10 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหา HIV maker หลังติดเชื้อเอชไอวีช่วงระยะเวลา 10 วันแรกจะไม่สามารถตรวจพบ HIV RNA และ p24 antigen ระยะนี้เรียกว่า window period หลังจากติดเชื้อวันที่ 11 สามารถตรวจพบ HIV RNA ได้ในพลาสมาได้ด้วยเทคนิค NAT และ HIV RNA จะมีปริมาณสูงสุดช่วงวันที่ 21-28 และจะค่อยๆ ลดปริมาณลง ประมาณวันที่ 16 หลังจากติดเชื้อจะสามารถตรวจพบ p24 antigen ในซีรัมด้วยชุดตรวจ 4th generation immunoassay หรือภายใน 4-10 วันหลังจากตรวจพบ HIV RNA แต่ยังไม่พบแอนติบอดี วันที่ 22 หลังจากติดเชื้อร่างกายจึงจะเริ่มสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีชนิด IgM สามารถตรวจได้ด้วย 3rd และ 4th generation immunoassay ระยะนี้เรียกว่า seroconversion หรือภายหลังจากตรวจพบ p24 antigen 3-4 วัน หรือภายหลังจากตรวจพบ HIV RNA 10-13 วัน จากนั้นจะเริ่มสร้างแอนติบอดีชนิด IgG ภายหลังจากตรวจพบ HIV RNA 18-38 วัน (22)

แนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการชุดตรวจเอชไอวีที่เลือกต้องผ่านการประเมินและรับรองจากสำนักงานอาหารและยาที่กำหนดให้มีความไวและความจำเพาะตามประเภทของชุดตรวจ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์ความไวและความจำเพาะของชุดตรวจชนิดต่างๆ ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย (7)

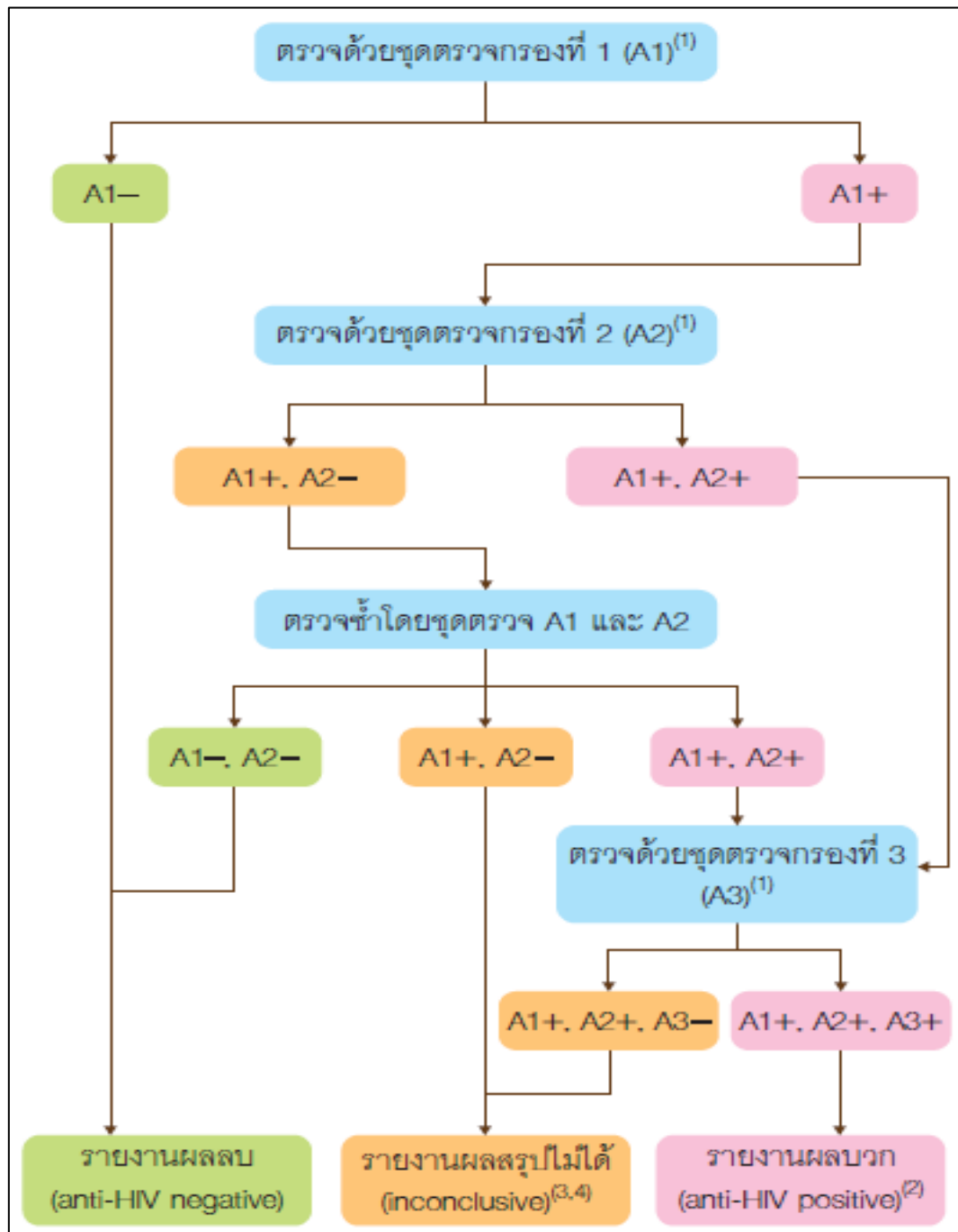
ลำดับ	ประเภทของชุดตรวจ	ความไว	ความจำเพาะ
1	การตรวจหา p24 antigen	ร้อยละ 100	ร้อยละ 99.5
2	การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี	ร้อยละ 100	ร้อยละ 99.5
3	การตรวจหา anti-HIV	ร้อยละ 99.5	ร้อยละ 99.0

ที่มา: ประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอชไอวีปี พ.ศ. 2552

(อ้างอิงมาจากหนังสือแนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการปี 2557)

ตามแนวทางของกระทรวงสาธารณสุขเรื่องการตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีโดยตรวจหาแอนติบอดี เมื่อตรวจด้วยชุดตรวจที่ 1 ที่มีความไวสูงกว่าชุดตรวจที่ 2 และ 3 โดยทั้ง 3 ชุดตรวจต้องมีหลักการแตกต่างกันหรือมีหลักการเหมือนกันแต่ต้องมีแอนติเจนแตกต่างกัน เมื่อทดสอบกับชุดตรวจที่ 1 (A1) ให้ปฏิกิริยาเป็นลบ (non-reactive) สามารถรายงานผลเป็นลบ (negative) ได้เลย หากตรวจแล้วให้ปฏิกิริยาเป็นบวก (reactive) ให้ตรวจเพิ่มด้วยชุดตรวจที่ 2 (A2) หากให้ปฏิกิริยาเป็นบวกให้ทดสอบต่อด้วยชุดตรวจที่ 3 (A3) หากทั้ง 3 ชุดตรวจให้ปฏิกิริยาบวกเหมือนกัน (A1+ A2+ A3+) ให้รายงานผลบวก (positive) หากทดสอบกับชุดตรวจที่ 2 ให้ปฏิกิริยาลบ (A1+ A2-) ให้กลับไปทดสอบกับชุดตรวจที่ 1 และ 2 ใหม่ หากได้ผล A1- A2- รายงานผลลบ หากได้ผล A1+ A2- รายงานผลสรุปไม่ได้ (inconclusive) หากได้ผล A1+ A2+ ให้ทดสอบกับชุดตรวจที่ 3 หากผลเป็น A1+ A2+ A3+ ให้รายงานผลบวก หากผลเป็น A1+ A2+ A3- ให้รายงานผลสรุปไม่ได้ (7) และให้

ติดตามผู้มารับบริการมาตรวจซ้ำที่ 2 สัปดาห์ และ/หรือ 1 เดือน และ 3 เดือน หากผลยังเป็นผลสรุป
ไม่ได้ให้สรุปผลว่าไม่ติดเชื้อได้



ภาพที่ 11 แสดงแนวการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่และเด็กอายุ
18 เดือนขึ้นไป (7)

1.4 การตรวจประเมินและติดตามการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี

ในประเทศไทยมีการตรวจประเมินภาวะการดำเนินของโรคมี 3 ชนิด ได้แก่

1.4.1 การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดซีดี 4 (CD4)

CD4 เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่เป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อเอชไอวีเข้าไปเจริญเติบโตและแบ่งตัว เนื่องจาก CD4 มี gp120 receptor และ C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) เป็น chemokine receptor ของ CD4 ปริมาณ CD4 มีความสัมพันธ์กับปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือด (HIV viral load) ถ้าค่าปริมาณไวรัสในกระแสเลือดสูงจะมีปริมาณ CD4 ต่ำทำให้ผู้ติดเชื้อมีระดับภูมิคุ้มกันลดลงและเพิ่มโอกาสติดเชื้อฉวยโอกาสง่าย ระดับของ CD4 จะลดลงตลอดระยะเวลาที่ติดเชื้อสามารถแบ่งการลดลงของ CD4 เป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะแรกลดลงจากระดับปกตินาน 6-18 เดือน ระยะที่ 2 คงที่นานหลายปี ระยะที่ 3 ลดลงอย่างรวดเร็วจนเข้าสู่โรคเอดส์เต็มขั้น และระยะที่ 4 ปริมาณ CD4 ลดลงจนผู้ป่วยถึงแก่กรรม การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด CD4 มีจุดประสงค์เพื่อใช้ประเมินสภาวะของภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อและใช้พิจารณาพร้อมกับค่าปริมาณไวรัสในกระแสเลือดร่วมกับข้อมูลทางคลินิกในการเริ่มให้ยาต้านไวรัส ใช้เพื่อพิจารณาการให้ยาสำหรับป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาสและใช้ติดตามผลการรักษา ในผู้ติดเชื้อจะตรวจหาค่าสัมบูรณ์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4 แต่ในทารกและเด็กเล็กจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4 แทน (23) การผ่าตัดใหญ่ การได้รับวัคซีน การติดเชื้อไวรัสและการได้รับยาในกลุ่ม steroid มีผลกระทบต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด CD4 (7)

1.4.2 การตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (HIV Viral Load)

HIV viral load คือปริมาณเอชไอวีอาร์เอ็นเอในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) ควรตรวจก่อนเริ่มการรักษาด้วยยาต้านไวรัสและหลังจากได้รับยาต้านไวรัสยังจำเป็นต้องตรวจเพื่อติดตาม

ผลการรักษาและผลการดำเนินของโรค นอกจากนี้ทารกแรกเกิดจนถึงอายุ 18 เดือนจำเป็นต้องตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดแทนการตรวจหาเอชไอวีแอนติบอดีเนื่องจากแอนติบอดีของแม่สามารถผ่านรกมาสู่ลูกได้ระหว่างตั้งครรภ์หรือระหว่างให้นมลูก (24) ปัจจุบันชุดการทดสอบหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดมีหลายหลักการแตกต่างกัน ได้แก่ branched DNA signal amplification (bDNA), real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real time RT-PCR) และ nucleic acid sequence base amplification (NASBA) การรายงานผลสามารถรายงานได้ 2 รูปแบบ คือ ปริมาณไวรัสต่อมิลลิลิตร (copies/mL) และค่า \log_{10} เทคนิคที่ใช้ตรวจตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดในปัจจุบันสามารถแบ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1.4.2.1 การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อ

เป็นการตรวจหาเอชไอวีอาร์เอ็นเอในพลาสมาด้วยชุดตรวจ commercial RNA viral load assays นิยมตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติมีการวัดผล 2 แบบ ได้แก่ แบบ end point คือวัดปริมาณ PCR product หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา และแบบ real time เป็นการวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น การตรวจหาเอชไอวีอาร์เอ็นเอนิยมใช้แบบ real time เนื่องจากให้ผลที่ถูกต้องมากกว่า และมีการใช้เครื่องอัตโนมัติในขั้นตอนการเตรียมสิ่งส่งตรวจเพื่อลดการปนเปื้อนสารพันธุกรรมอื่น (carryover contamination) ชุดตรวจ commercial RNA viral load assays สามารถตรวจเชื้อเอชไอวีได้หลายสายพันธุ์รวมถึง subtype non-B ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของชุดตรวจ บริษัทที่ผลิตและจำหน่ายชุดตรวจประเภทนี้ได้แก่ บริษัท Roche, Abbott และ BioMerieux แต่ละบริษัทต่างใช้หลักการและเทคนิคการตรวจแตกต่างกัน เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), nucleic acid sequence-base amplification (NASBA) และ branched DNA (bDNA) (6, 25)

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อ (26)

Assay	Company	Technology	Diagnostic markers	Sample volume (mL)	Linear range (copies/mL)	Subtype/group	Cost (\$)	Throughput (hour/test)
COBAS AmpliPrep/ TaqMan assay	Roche	RT-qPCR	RNA (gag)	0.85	40- 10,000,000	Group M: A- H	50-100	6
RealTime HIV-1 Assay	Abbott	RT-qPCR	RNA (pol)	1	40- 10,000,000	Group M: A- H Group N & O	50-100	6
NucliSENS EasyQ® HIV-1	BioMérieux	NASBA	RNA (gag)	1	40- 10,000,000	Group M:A-D	50-100	8

1.4.2.2 การตรวจหาปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดด้วยเทคนิคทางเลือก

การตรวจปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดด้วยการเพิ่มปริมาณไวรัส มักถูกตั้งอยู่ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ประจำจังหวัดหรือในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย เนื่องจากชุดตรวจส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้เครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งเครื่องอัตโนมัติต้องการอุปกรณ์หลายอย่าง เช่น ระบบไฟฟ้าที่เสถียร การควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ต้องได้รับการอบรมการใช้เครื่องอัตโนมัติ การดูแลรักษาเครื่องอัตโนมัติจากบริษัทรวมถึงต้องใช้งบประมาณในการจัดซื้อสูง ทำให้ข้อจำกัดเหล่านี้เป็นอุปสรรคการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดในพื้นที่ห่างไกล จึงมีการพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิคอื่นเพิ่มขึ้น ได้แก่ การตรวจหาปริมาณ p24 antigen ซึ่งจะพบในช่วงวันที่ 11-13 หลังจากติดเชื้อและมีปริมาณสูงสุดนานถึง 4-5 สัปดาห์ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไวรัสในกระแสเลือด ตัวอย่างชุดตรวจ ultrasensitive p24 antigen (27) หรือการตรวจแอนไอโซม reverse transcriptase ได้แก่ ExaVir™ RT assay (6)

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดด้วยเทคนิคทางเลือก (6)

Assay	Company	Technology	Diagnostic markers	Sample volume (mL)	Linear range (copies/mL)	Subtype/group	Cost (\$)	Throughput (hour/test)
Ultrasensitive p24 assay	PerkinElmer	p24 EIA	p24 antigen	0.05	5,000 upwards	All	5-19	6
ExaVir™ RT assay	Cavidi	RT assay	RT gene	1	200 upwards	All	14-23	48-72

1.4.2.3 การตรวจหาปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดสำหรับ ณ จุดดูแลผู้ป่วย

ถึงแม้เทคนิคการตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดได้รับการพัฒนามากขึ้นและมีราคาถูกลง มีขั้นตอนการทำทดสอบได้ง่ายขึ้นแต่ยังต้องใช้เวลาทำการทดสอบนาน เนื่องจากระยะเวลาตั้งแต่เก็บสิ่งส่งตรวจจนไปถึงการรายงานผลใช้ระยะเวลาหลายวันถึงหลายสัปดาห์ทำให้ยังไม่เหมาะกับงานที่เป็นการให้บริการ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (point of care testing, POCT) จึงมีการพัฒนาการตรวจที่เหมาะสมสำหรับ POCT คือ ไม่ต้องการอุปกรณ์เพิ่ม อุปกรณ์ใช้ครั้งเดียวไม่น่ากลับมาใช้ซ้ำ ทำการทดสอบนอกสถานที่ได้ มีขั้นตอนการทดสอบง่ายไม่ซับซ้อน การอ่านผลและการแปลผลง่าย สามารถทำการทดสอบเสร็จภายใน 30 นาที มีต้นทุนต่ำกว่า 10 ดอลลาร์ และชุดตรวจครอบคลุมถึง subtype non-B ทำให้มีการประยุกต์นำนาโนเทคโนโลยี (nanotechnology) มาใช้ออกแบบชุดตรวจตัวอย่างได้แก่ ชุดตรวจ amplification (BCA)-base assay ใช้ตรวจหาปริมาณ p24 antigen โดยใช้ magnetic microparticles ที่ตรึงกับ polyclonal antibody ต่อ p24 คู่กับอนุภาคของนาโนที่ตรึงกับสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์และแอนติบอดีต่อ p24 antigen แล้วเพิ่มจำนวนสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ด้วย real time PCR (28) microfluidic-based viral detection and quantification ใช้ luminescent quantum dots ตรึงกับ anti-gp120 ใช้ตรวจหาอนุภาคไวรัสเอชไอวีทำการทดสอบบนแผ่นสไลด์และอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (invert microscope) (29), POC HIV-1 amplification system การตรวจหา p24 antigen โดยเพิ่มความไวด้วยการใช้ biotinylated biobarcode DNA อนุภาคของนาโนต่อกับ streptavidin และเพิ่มจำนวน biobarcode DNA แล้ววัดด้วย microarray หรือโดยชุดตรวจ SAMBA HIV-1 ที่ทำขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค isothermal amplification และการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย strip test (30-32) ซึ่งเป็นการประยุกต์นำวัสดุนาโนและนาโนเทคโนโลยีมาใช้ทางการแพทย์

ตารางที่ 4 แนวทางการเก็บและจัดส่งสิ่งตัวอย่างสำหรับส่งตรวจส่งตรวจ (7)

การทดสอบ	หลักการ	ชนิดตัวอย่างตรวจ	ปริมาณตัวอย่าง	การนำส่งตัวอย่างตรวจ	การเก็บรักษาตัวอย่างตรวจ
Anti-HIV testing	ELISA, Agglutination test, Dot/Line test	Clotted blood	5 มิลลิลิตร	นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง	2-8 องศาเซลเซียส
		Serum หรือ plasma	1 มิลลิลิตร		
HIV viral testing	Nucleic acid amplification testing (NAT)	EDTA blood	2-3 มิลลิลิตร	นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง	2-8 องศาเซลเซียส
		EDTA plasma	1 มิลลิลิตร		
		Dried blood spot		ภายใน 1 สัปดาห์	อุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส)
CD4+ count	Flow cytometry	EDTA blood	2-3 มิลลิลิตร	นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง (อุณหภูมิ 18-25 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็ง)	อุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส)
Viral load testing	Real time nucleic acid amplification	EDTA blood	6-9 มิลลิลิตร	หากไม่สามารถปั่นแยกพลาสมาได้ให้นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง (แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส)	ปั่นแยกพลาสมาภายใน 6 ชั่วโมง เก็บที่ 4-8 องศาเซลเซียสภายใน 24 ชั่วโมง หรือแช่แข็งพลาสมาตลอดเวลาก่อนตรวจและนำส่งในน้ำแข็งแห้ง
		EDTA plasma	จำนวน 2 หลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร		
		PPT EDTA gel (หลอดชนิดเจล)	6-9 มิลลิลิตร		

1.4.3 การตรวจหาภาวะการดื้อยา (Drug resistance)

มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาการตัดสินใจของแพทย์ในการวินิจฉัย เมื่อการรักษาล้มเหลว การติดตามการระบาดของเชื้อเอชไอวีดื้อยา การเลือกใช้และปรับเปลี่ยนสูตรยา การตรวจการดื้อยามี 2 แบบ ได้แก่

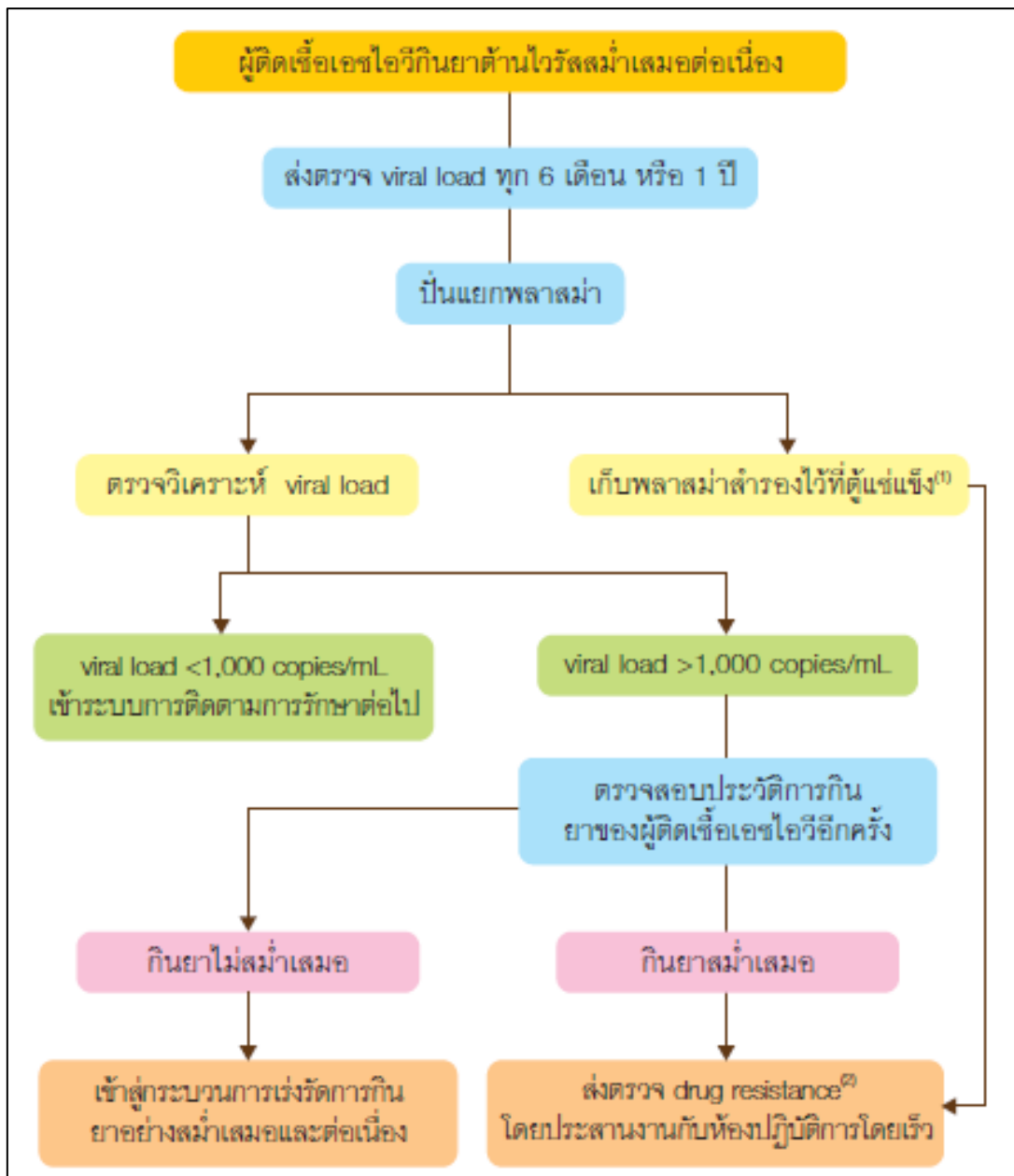
1.4.3.1 การตรวจฟีโนทัยป์ (Phenotypic Testing)

เป็นการวัดการเพิ่มจำนวน (replication rate) เชื้อเอชไอวีของผู้ป่วยในหลอดทดลองต่อยาด้านเอชไอวีแต่ละชนิดในเวลาเท่ากัน โดยค่าความไวต่อยาด้านไวรัสจะถูกคำนวณออกมาเป็นความเข้มข้นของยาด้านไวรัสที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีที่เพาะเลี้ยงในเซลล์หลอดทดลองได้ร้อยละ 50 หรือร้อยละ 90 (50% or 90% inhibitory concentration) ข้อดีของการตรวจฟีโนทัยป์ คือ เป็นตรวจการดื้อยาโดยตรง แพลผลง่าย ใช้ทดสอบกับยาด้านเอชไอวีได้ทุกชนิดทั้งยาชนิดเก่าและยาที่ผลิตขึ้นมาใหม่และให้ผลแม่นยำ ข้อจำกัดคือต้องมีห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อระดับสูงสุด (biosafety level 3) เพื่อป้องกันเชื้อเอชไอวีจากหลอดทดลองแพร่กระจาย ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 2-4 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสมีค่าใช้จ่ายสูง 30,000-40,000 บาท และไม่สามารถแสดงได้ว่าการเปลี่ยนแปลงในระดับสารพันธุกรรม (gene mutation) (33, 34)

1.4.3.2 การตรวจจีโนทัยป์ (genotypic testing)

เป็นการตรวจลำดับของเบสที่ตำแหน่ง *pol* gene ของเชื้อเอชไอวีเนื่องจากเป็นตำแหน่งที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ protease, integrase และ reverse transcriptase ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มักเกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีการสร้างกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์เปลี่ยนไป สามารถนำชนิดและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปวิเคราะห์หาระดับการดื้อยากับเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ต่างๆ การตรวจชนิดนี้เป็นการตรวจทางอ้อมมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาเมื่อ

การรักษาล้มเหลว การเลือกใช้และ/หรือปรับเปลี่ยนสูตรยาและการติดตามการระบาดของเชื้อเอชไอวี
ดื้อยา การตรวจจีโนไทป์เป็นวิธีการตรวจที่สะดวกสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ใช้เวลาตรวจ
ประมาณ 1-2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังใช้ข้อมูลจีโนไทป์เพื่อทำนายผลการดื้อยาเชิงปริมาณ มีความ
เหมาะสมในการแปลผลการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนที่มีความซับซ้อนได้ ใช้พิจารณาการเกิดการดื้อยา
ข้ามกลุ่ม (cross resistance) กับยาอื่นๆ ข้อจำกัดการตรวจจีโนไทป์คือ เป็นการตรวจทางอ้อมบอก
ได้เพียงว่าผู้ติดเชื้อน่าจะติดต่อยาต้านไวรัสเอชไอวีชนิดใดบ้าง แต่ไม่สามารถระบุระดับการดื้อยาต้าน
ไวรัสแต่ละสายพันธุ์ได้ อาจแปลผลผิดได้หากเกิดการกลายพันธุ์หลายตำแหน่ง การตรวจจีโนไทป์ผู้ติด
เชื้อต้องมีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดตั้งแต่ 2,000 copies/ml ขณะที่ผู้ป่วยทานยาอยู่หรือหยุดยาไม่
เกิน 4 อาทิตย์ จึงให้ผลการทดสอบถูกต้องแม่นยำ (33, 34) ปัจจุบันชุดการตรวจที่ได้รับการรับรอง
จากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและถูกออกแบบให้ใช้กับเชื้อเอชไอวีกลุ่ม
subtype B ได้แก่ ViroSeq[®] HIV-1 Genotyping System (35)



ภาพที่ 12 แนวทางการเก็บตัวอย่างส่งตรวจการดื้อต่อยาต้านไวรัส (7)

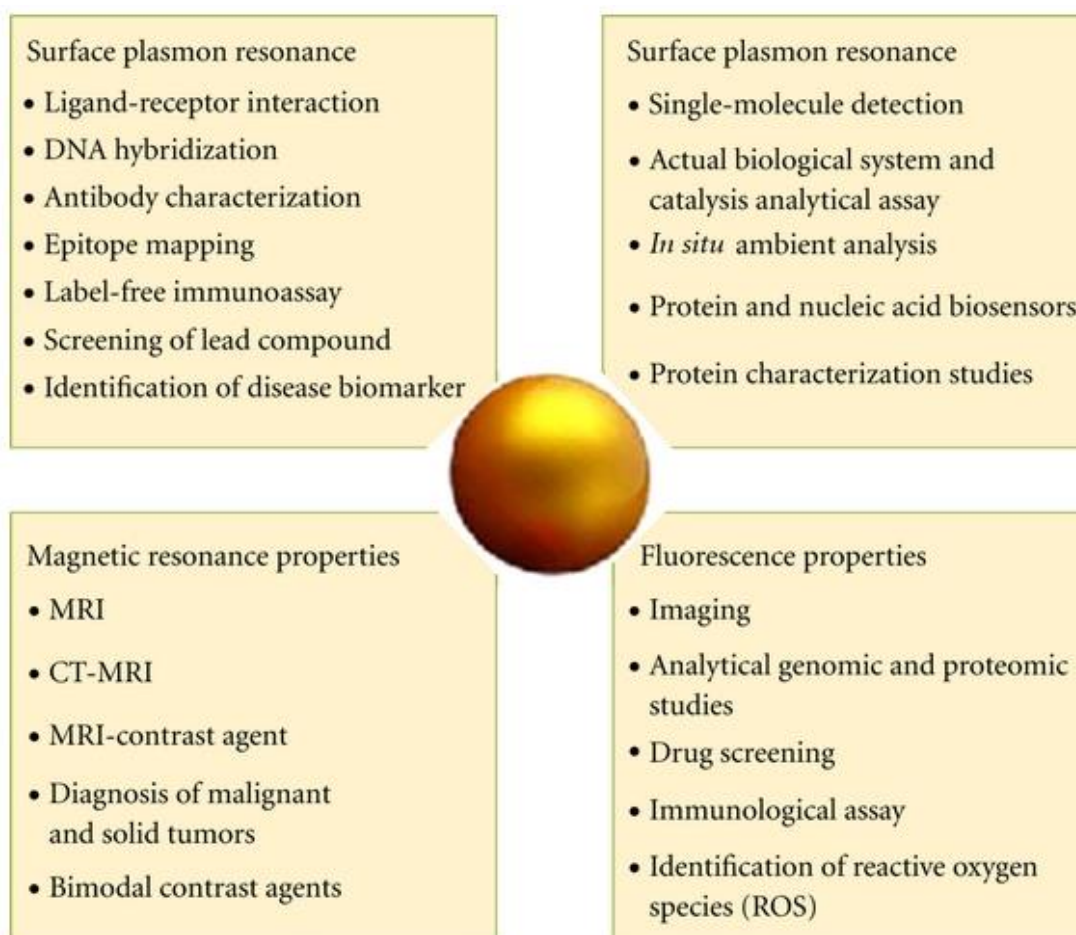
2. นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการ การสร้าง หรือการวิเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องจักร หรือผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร (1-100 นาโนเมตร) ทำให้วัสดุนั้นมีคุณสมบัติเด่นขึ้นทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมีแตกต่างไปจากเดิม รวมถึงการออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้างหรือวิเคราะห์วัสดุในระดับนาโนเมตร ตัวอย่างวัสดุนาโนเมตร ได้แก่ อนุภาคทองคำนาโน, อนุภาคนาโนของธาตุเงินหรือนาโนซิลเวอร์, อนุภาคนาโนของออกไซด์สังกะสี, ท่อนาโนคาร์บอน, บัคมินสเตอร์ฟูลเลอร์หรือบัคกิ้งบอลควอนตัมดอท (quantum dots), metallic nanoparticles ท่อนาโนคาร์บอน (carbonnanotubes), nanorods และ nanoshells เป็นต้น (36) มีการประยุกต์นำวัสดุระดับนาโนเมตรไปใช้ทางการแพทย์ เช่น การส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง การตรวจหาโปรตีน การตรวจหาเซลล์มะเร็งโดยควอนตัมดอท การใช้ magnetic nanoparticles กับเครื่องตรวจเอกซเรย์ด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic resonance imaging, MRI) การตรวจหาเชื้อก่อโรคในสิ่งแวดล้อม น้ำดื่ม หรืออาหาร การใช้ polyethylene glycol (PEG) nanoparticles ในการส่งยาปฏิชีวนะโดย PEG จะค่อยๆ ปล่อยยาออกมาทำให้ยาออกฤทธิ์นานขึ้น การใช้นาโนซิลเวอร์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (37, 38) การใช้ poly (methacrylic acid-co-ethylacrylate) copolymer หุ้มล้อมรอบยาต้านไวรัสเอชไอวีโดยใช้กับยากด HIV-1 protease inhibitor โดยอนุภาคโพลิเมอร์จะไม่ละลายในน้ำแต่จะออกฤทธิ์บริเวณที่มีพีเอช (pH) ที่เหมาะสม การทำงานของยาจะออกฤทธิ์ไม่ให้เชื้อเอนไซม์ protease ไปใช้ทำให้เชื้อไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (39)

2.1 อนุภาคทองคำนาโน

อนุภาคทองคำนาโน (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นวัสดุระดับนาโนเมตรและเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งของนาโนเทคโนโลยีสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย ไม่มีพิษต่อร่างกาย มีคุณสมบัติทางแสงจำเพาะ มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างไปจากทองปกติ ได้แก่ มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อ

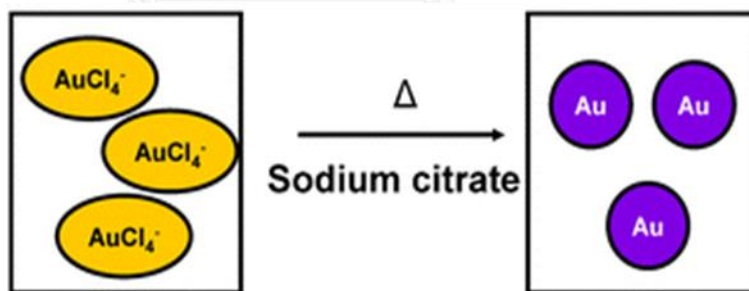
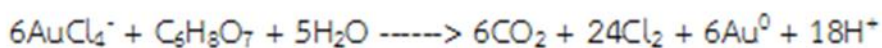
ปริมาณสูง ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไฟฟ้าได้ดี และมีสีที่เปลี่ยนตามขนาดของอนุภาค มีความสามารถนำมาต่อกับสารอื่นได้ง่ายจึงทำให้อนุภาคทองคำนาโนเป็นที่นิยมนำมาใช้ ดังภาพที่ 13 (40)



ภาพที่ 13 คุณสมบัติอนุภาคทองคำนาโนและการนำไปใช้ในการวินิจฉัยทางคลินิก (41)

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนสามารถทำได้หลายวิธีโดยนำสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรเรต (hydrogen tetrachloroauric (III) acid, $\text{H[AuCl}_4]$) ที่มีทองคำประจุ $3+$ (Au^{3+}) ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ได้อนุภาคทองคำนาโนที่มีทองคำประจุเป็น 0 (Au^0) ซึ่งเป็นรูปที่ไม่เสถียรเกิดการเกาะกลุ่มและตกตะกอนจึงต้องเติมสารที่ช่วยทำให้เสถียร (stabilizer) โดยสารนี้จะล้อมรอบอนุภาคทองคำนาโนเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มและตกตะกอนทำให้อนุภาคทองคำนาโนคงขนาด

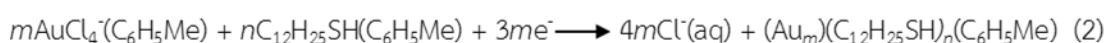
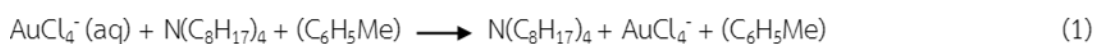
และรูปร่างให้อยู่ในระดับนาโนเมตร วิธีที่เป็นที่นิยมคือวิธีของ Turkeevih J และคณะ (42, 43) สารที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) และเป็นสารช่วยให้เสถียร (stabilizer) คือโซเดียมซิเตรท (sodium citrate) ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้มีขนาด 10-147 นาโนเมตร ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคขึ้นอยู่กับสัดส่วนระหว่างไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรตกับโซเดียมซิเตรท อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Frens G และคณะ (44) ที่พบว่าขนาดของอนุภาคทองคำนาโนขึ้นกับความเข้มข้นของโซเดียมซิเตรท การสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้อนุภาคทองคำนาโนจะมีประจุลบล้อมรอบอนุภาคสามารถดึงดูดสารที่มีประจุบวกและยึดกันด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) เช่น การตรึงกับแอนติบอดี (43) การสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางเนื่องจากใช้สารเคมีที่ราคาไม่แพง ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ขั้นตอนการสังเคราะห์ง่าย และไม่เป็นพิษ (45) ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรตและโซเดียมซิเตรทด้วยปฏิกิริยารีดักชันของ Turkeevih J และคณะ (46)

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนวิธีของ Brust M และ Schiffrin DJ เป็นการสังเคราะห์ในสารละลายออร์กานิกส์ (organic solvent) เช่น tetraoctylammonium bromide (TOAB) หรือโทลูอีน (toluene) ใช้โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride, NaBH_4) เป็นตัวรีดิวซ์และสารทำให้

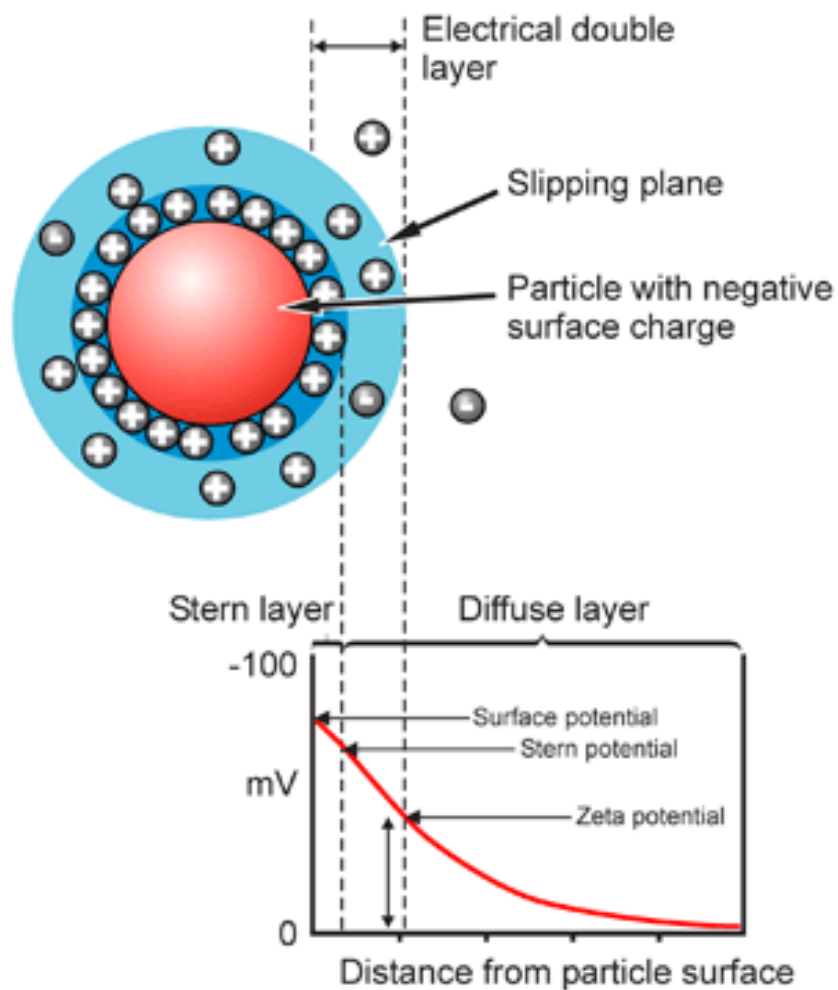
เสถียร ขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่ได้มีขนาด 5-6 นาโนเมตร การสังเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้อนุภาคทองคำนาโนจะเกาะกลุ่มและตกตะกอนง่ายภายใน 2 สัปดาห์ จึงต้องป้องกันการตกตะกอนด้วย alkanethiol และก่อนนำอนุภาคทองคำนาโนมาใช้ต้องกำจัด alkanethiol ก่อน (47, 48)



ภาพที่ 15 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรตด้วยโซเดียมบอโรไฮไดรด์จากวิธีของ Brust M และ Schiffrin DJ (49)

การที่ลักษณะพื้นผิวอนุภาคทองคำนาโนมีประจุลบจะดึงดูดประจุบวกมาล้อมรอบทำให้เกิดการผลักระหว่างประจุบวกเกิดระยะห่างระหว่างอนุภาค (ภาพที่ 16) ทำให้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียรแยกเป็นอนุภาคเดี่ยวไม่เกาะกลุ่มโดยพิจารณาจากค่าศักย์ประจุที่ผิว (zeta potential) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง -100 ถึง +100 มิลลิโวลต์ การพิจารณาความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนจะต้องมีค่าศักย์ประจุที่ผิวมากกว่า ± 30 มิลลิโวลต์ (50)

- $\pm 0-5$ มิลลิโวลต์ : อนุภาคทองคำนาโนเกิดการเกาะกลุ่ม
- $\pm 5-20$ มิลลิโวลต์ : อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียรเล็กน้อย
- $\pm 20-40$ มิลลิโวลต์ : อนุภาคทองคำนาโนค่อนข้างมีความคงตัว ไม่เกาะกลุ่ม
- มากกว่า ± 40 มิลลิโวลต์ : อนุภาคทองคำนาโนมีความคงตัวสูง ไม่เกาะกลุ่ม



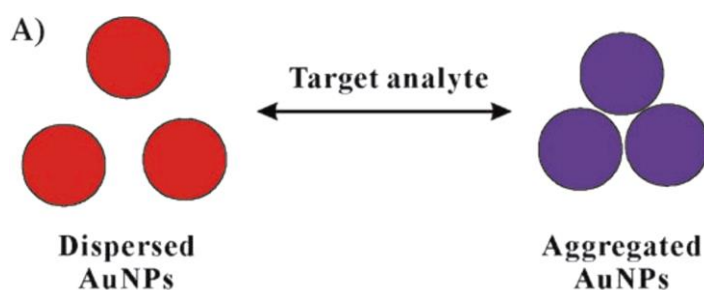
ภาพที่ 16 แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย (50)

นอกจากนี้ความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนยังสามารถพิจารณาได้จากค่าการดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเล็ตโดยถ้าอนุภาคทองคำนาโนแยกเป็นอนุภาคเดี่ยวจะดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 นาโนเมตร และดูดกลืนแสงต่ำที่สุดที่ 600 นาโนเมตร หรือคำนวณได้จาก

$$R = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร}}$$

ค่า R ควรอยู่ระหว่าง 3.5-4 (51)

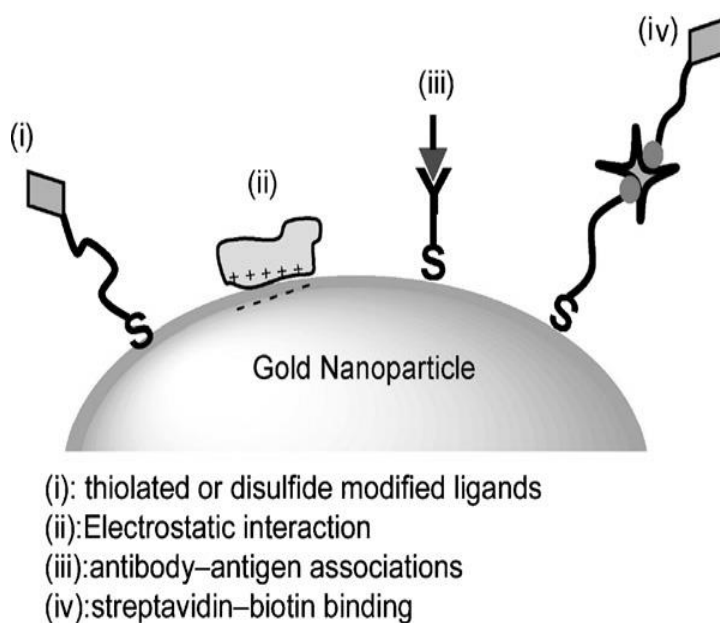
ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนมีผลกับสีที่เห็นเนื่องจากอนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติเชิงแสงเมื่ออยู่ในน้ำ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า surface plasmon resonance (SPR) สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสะท้อนแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ทำให้เห็นอนุภาคทองคำนาโนเป็นสีแดง แต่หากอนุภาคทองคำนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้แสงตกกระทบไม่เสมอทั่วทั้งอนุภาคเกิดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นสูงขึ้นทำให้เห็นสีเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง-น้ำเงิน (red-shift) สามารถเห็นปรากฏการณ์นี้ได้เมื่ออนุภาคทองคำนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือเกิดการเกาะกลุ่มดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงการเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีม่วงเมื่ออนุภาคทองคำนาโนเกาะกลุ่ม (52)

จากข้อมูลข้างต้นทำให้อนุภาคทองคำนาโนเป็นที่นิยม เนื่องจากมีความคงตัวทั้งที่เป็นของเหลว (liquid form) และเมื่อแห้ง (dried form) โดยสีไม่เปลี่ยนเมื่อถูกหยดลงบนแผ่นเมมเบรน (53) ปัจจุบันมีการนำอนุภาคทองคำนาโนมาประยุกต์ใช้ตรวจจับสารเป้าหมายหรือใช้เป็นตัวติดตามโดยตรึงบนผิวอนุภาคทองคำนาโน ได้แก่ ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ, คาร์โบไฮเดรต, เปปไทด์, โปรตีน, แอนติเจน-แอนติบอดี, aptamer-target, lectin-sugar, metal, ligand, streptavidin-biotin หรือ thiolated-Au โดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ เป็นต้น (ภาพที่ 18) (52) นอกจากนี้การใช้ single stand DNA (ssDNA) จับกับผิวอนุภาคทองคำนาโนเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีเกลือ เกลือจะกระตุ้นให้อนุภาคทองคำนาโนเกาะกลุ่มซึ่งแตกต่างจากอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วย double stand DNA (dsDNA) ที่อยู่ในสารละลายที่มีเกลือ dsDNA จะจับกันเองทำให้ไม่มี ssDNA เหลือมาจับที่ผิวอนุภาคทองระดับนาโนจึงทำให้อนุภาคทองคำนาโนเกิดการเกาะกลุ่ม (54) จากคุณสมบัติข้างต้นจึงมีการนำอนุภาคทองคำ

โนมาประยุกต์เพื่อใช้ตรวจหาสารชีวโมเลกุลเป้าหมาย เช่น ตรวจหาแอนติเจน (55), ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (56) ที่มีความจำเพาะโดยให้อนุภาคทองคำเป็นตัวรายงานผล (reporter) และสารเป้าหมายจะเป็นตัวป้องกันหรือเหนี่ยวนำให้อนุภาคทองคำเกิดการเกาะกลุ่มทำให้อนุภาคทองคำเปลี่ยนสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าไม่ต้องอาศัยเครื่องมือช่วยในการอ่านผล (52)



ภาพที่ 18 การตรึงสารชีวโมเลกุลบนผิวอนุภาคทองคำ (57)

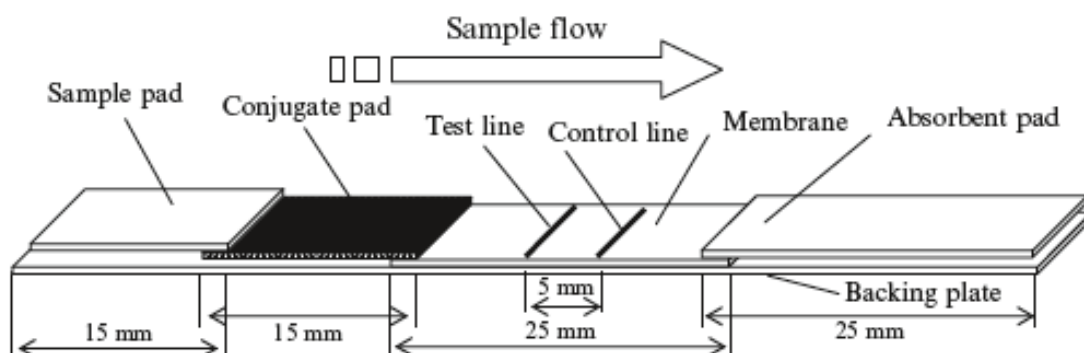
ตัวอย่างการนำอนุภาคทองคำมาใช้ในปี ค.ศ. 2003 Nam JM และคณะ ได้นำดีเอ็นเอมาตรึงกับอนุภาคทองคำขนาด 30 นาโนเมตร เรียกว่า nanoparticle-based bio-barcode ใช้ตรวจหา prostate-specific antigen (PSA) มีความไว 30 attoMolar ในซีรัมปริมาณ 10 ไมโครลิตร (58) ในปี ค.ศ. 2008 Kim EY และคณะ ใช้ Luminescent quantum dots ตรึงกับ anti-gp120 ด้วยหลักการ nanoparticle-based bio-barcode-amplification method ใช้ตรวจหาอนุภาคไวรัสเอชไอวีจากเลือดครบส่วนทำการทดสอบบนแผ่นสไลด์และอ่านผลการเรืองแสงจาก quantum dots ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ มีความคลาดเคลื่อนบวกลบร้อยละ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เช่น real time PCR (29) ในปี ค.ศ. 2009 Niikura K และคณะ ได้เสนอการตรวจหา JC

virus-like particles (VLPs) โดยดูการเปลี่ยนแปลง plasmon shift ของอนุภาคทองคำนาโนพบว่า sialic acid-linked gold nanoparticle ขนาด 15 นาโนเมตร สามารถจับกับ JC virus particles ได้ และอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (scanning transmission electron microscope, SEM) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำนาโนสามารถจับไวรัสได้แม้มีปริมาณไวรัสต่ำ (59) นอกจากนี้ อนุภาคทองคำนาโนยังถูกนำมาใช้กับชุดตรวจเร็ว (rapid test หรือ strip test) ด้วย

3. แลเทอรัลโฟล (Lateral Flow Assay, LFA)

แลเทอรัลโฟลมีพื้นฐานมาจากอิมมูโนโครมาโตกราฟีแลเทอรัลโฟล (immunochromatographic lateral flow strip test) ถูกพัฒนาครั้งแรกในการตรวจหา human chorionic gonadotropin (hCG) ในชุดตรวจการตั้งครรภ์ (60) ปัจจุบันถูกใช้กว้างขวางในการวัดเชิงคุณภาพและเชิงกึ่งปริมาณ สำหรับตรวจหาแอนติเจน, แอนติบอดี, แอสแพนและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ แลเทอรัลโฟลยังถูกนิยมนำมาใช้กับชุดตรวจการติดเชื้อ ได้แก่ Streptococcus, Chlamydia, Human Immunodeficiency Virus (HIV) และ Hepatitis C virus (HCV) (61, 62) ส่วนประกอบชุดทดสอบแลเทอรัลโฟลมีองค์ประกอบหลัก 5 ส่วน ได้แก่ 1) sample pad สำหรับหยดสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างทดสอบทำหน้าที่ช่วยส่งตัวอย่างทดสอบสู่ส่วนต่างๆของ LFA นิยมใช้ cellulose และ glass fiber 2) conjugate pad สำหรับหยด conjugate probe conjugate pad มีผลต่อการปล่อย conjugate probe และความไวของการทดสอบนิยมใช้วัสดุเป็น glass fiber cellulose หรือ polyester 3) detection membrane เป็นบริเวณที่หยดเส้นทดสอบและเส้นควบคุมสำหรับทำปฏิกิริยาและอ่านผลการทดสอบที่ประกอบด้วยเส้นทดสอบ (test line, TL) และเส้นควบคุม (control line, CL) มีผลต่อความไวของ LAF อย่างมาก วัสดุที่ใช้ได้แก่ เซลลูโลสเมมเบรน, ไนลอนเมมเบรน, polyethersulfone, polyethylene หรือ fused silica นิยมใช้เซลลูโลสเมมเบรนเนื่องจากใช้งานง่าย ราคาไม่แพง และมี

ความสามารถจับกับโปรตีนได้สูง 4) absorbent pad สำหรับดูดซับสารส่วนเกินนิยมใช้ cellulose และ cross-link silica และส่วนสุดท้ายคือ 5) backing plate เป็นส่วนยึด sample pad conjugate pad detection membrane และ absorbent pad ที่ประกอบขึ้นดังภาพที่ 19 (63)



ภาพที่ 19 ส่วนประกอบแลเทอรัลโฟล (63)

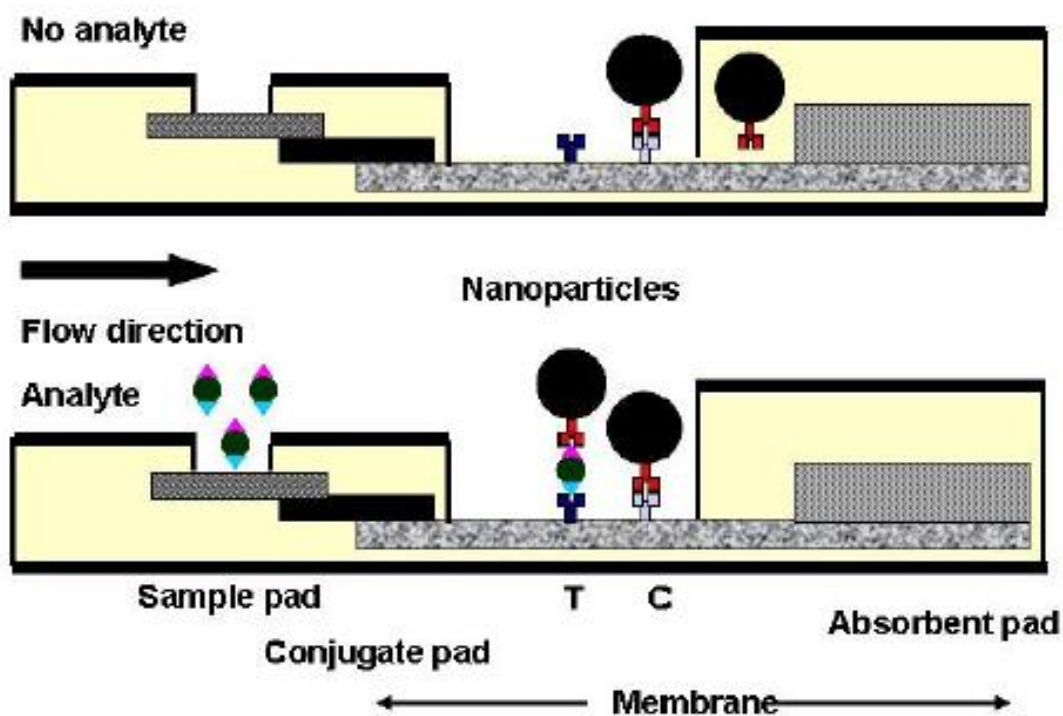
หลักการการทำงานของแลเทอรัลโฟลเมื่อนำตัวอย่างตรวจที่เป็นของเหลวและมีสารเป้าหมาย (target) อยู่หยดลงบน sample pad ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่ผ่าน conjugate pad โดยอาศัย capillary diffusion ที่มี conjugate probe ตรึงกับอนุภาคนาโนทำปฏิกิริยากับสารเป้าหมายเกิดเป็น complex จากนั้นเคลื่อนที่ไปยัง detection membrane capture probe ที่เส้นทดสอบจับกับ complex เกิดแถบสีที่เส้นทดสอบ conjugate probe ที่ตรึงกับอนุภาคนาโนเมตรส่วนที่เหลือที่ไม่ได้จับกับสารเป้าหมายเคลื่อนที่ต่อไปยังเส้นควบคุมจับกับ control probe เกิดแถบสีที่สองที่เส้นควบคุม ปัจจุบันอนุภาคนาโนเมตรที่ใช้นิยมมีสีหรือมีการเรืองแสงขนาด 15-800 นาโนเมตร ทำมาจากอนุภาคทองนาโน, latex, selenium, carbon, liposome และ quantum dot (64) ชุดทดสอบแลเทอรัลโฟลทำการทดสอบได้ผลรวดเร็ว มีขั้นตอนการทดสอบไม่มาก มีต้นทุนต่ำ ใช้เครื่องมือพื้นฐานในการทดสอบ มีความจำเพาะสูง มีความไว เคลื่อนย้ายง่าย และมีความเสถียร แม้จะเก็บที่สิ่งแวดล้อมต่างๆ (65)

ปัจจุบันแลเทอรัลโฟล แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

3.1 แลเทอร์รัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์ (Lateral Flow Immunoassay) มีหลักการ 2 แบบ

3.1.1 แลเทอร์รัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์แบบแซนวิช

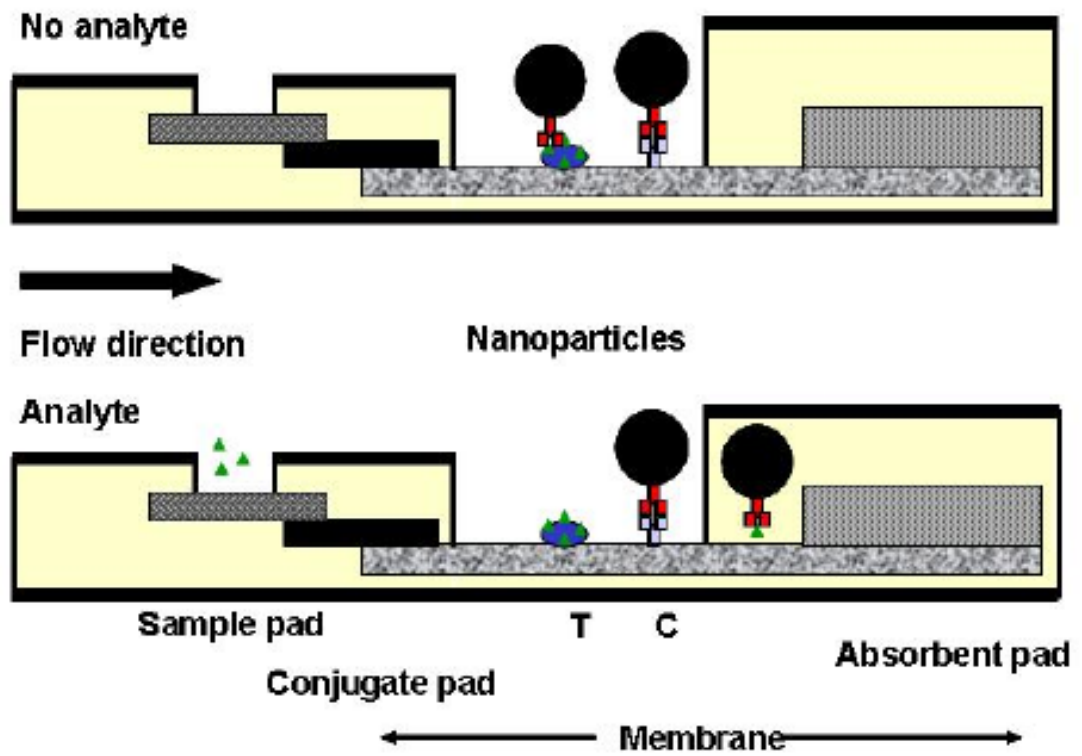
อาศัยการเกิดปฏิกิริยาแบบแซนวิชระหว่างแอนติเจนแอนติบอดีระหว่างสารเป้าหมาย (target) กับ conjugate ที่ตรึงบนอนุภาคระดับนาโนเมตร, สารเป้าหมายและ label probe (capture และ control probe) ที่อยู่บน detection membrane label probe เป็นได้ทั้งแอนติเจนหรือแอนติบอดีนิยมตรึงกับอนุภาคทองคำนาโนหรือลาเท็กซ์ไมโครสเฟียร์ การทำงานเมื่อหยดตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงบน sample pad สารตัวอย่างไหลมาที่ conjugate pad ที่มีแอนติบอดีตรึงกับอนุภาคทองคำนาโนเกิดการจับอย่างจำเพาะของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำนาโนหลังจากนั้นตัวอย่างไหลผ่านไปยัง detection membrane ที่เส้นทดสอบที่มีแอนติบอดีอีกชุดที่จำเพาะต่อแอนติเจนในตัวอย่าง เกิดการเกาะกลุ่มกันที่บริเวณเส้นทดสอบเกิดแถบสีแดงที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า อนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วยแอนติบอดีส่วนเกินจะไหลผ่านมายังเส้นควบคุมที่มีแอนติบอดีอีกชุดที่จำเพาะต่อแอนติบอดีตรึงกับอนุภาคทองคำนาโนเกิดการจับอย่างจำเพาะเกิดแถบสีแดงแถบที่สองที่เส้นควบคุม (แปลผลเป็นบวก) แต่หากไม่มีแอนติเจนเป้าหมายจะเกิดแถบสีแดงเพียงเส้นเดียวที่เส้นควบคุม (แปลผลเป็นลบ) ดังภาพที่ 20 (67, 68)



ภาพที่ 20 แลเทอร์อัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์แบบแซนวิชโดย T คือเส้นทดสอบและ C คือเส้นควบคุม (68)

3.1.2 แลเทอร์อัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์แบบยับยั้ง (inhibition)

แอนติบอดีชนิดที่หนึ่งตรึงกับอนุภาคนาโน แอนติบอดีชนิดที่สองหยุดที่ตำแหน่งเส้นควบคุมที่เส้นทดสอบมีแฮปเทน (hapten) ที่จับกับแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งได้ เมื่อไม่มีแอนติเจนแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งที่ตรึงกับอนุภาคนาโนจับกับแฮปเทนเกิดแถบสีที่เส้นทดสอบ แอนติบอดีชนิดที่หนึ่งที่ตรึงกับอนุภาคนาโนส่วนที่เหลือจับกับแอนติบอดีชนิดที่สองที่เส้นควบคุมเกิดแถบสีสองแถบ อ่านผลเป็นลบ หากมีแอนติเจนในตัวอย่างแอนติเจนจะจับกับแฮปเทนทำให้แอนติบอดีชนิดที่หนึ่งที่ตรึงกับอนุภาคนาโนไม่สามารถจับแฮปเทนได้จึงไม่เกิดแถบสีที่เส้นทดสอบ แอนติบอดีชนิดที่หนึ่งที่ตรึงกับอนุภาคนาโนส่วนที่เหลือจับกับแอนติบอดีชนิดที่สองที่เส้นควบคุมเกิดแถบสี 1 แถบอ่านผลเป็นบวก ดังภาพที่ 21 (68)



ภาพที่ 21 แลเทอรัลโฟลิมมูโนเอสเสย์แบบยับยั้งโดย T คือเส้นทดสอบและ C คือเส้นควบคุม (68)

ตารางที่ 5 ตัวอย่างการนำแลเทอร์อัลโฟลิมมูโนเอสเสย์มาใช้ (64)

Analyte	Method	Application	Sensitivity
<i>Brucella</i> -specific IgM antibodies in serum	Colloidal dye labelled monoclonal antihuman IgM antibody	Brucellosis	93% positive
Influenza A, influenza B and respiratory syncytial virus	Raman signature labelled antigen measure Raman scattering	Multianalyte detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus	
<i>Leptospira</i> -specific IgM in serum	Colloidal dye labelled monoclonal antihuman IgM antibody	leptospirosis	87% overall sensitivity
Antibody to <i>Schistosoma japonicum</i> in serum	Blue colloidal dye labelled egg antigen	schistosomiasis	97% positive in acute form, 94% in chronic
Antibody to <i>Treponema pallidum</i> and hepatitis B antigen in serum	Colloidal gold and oligonucleotide labelled antibody	<i>Treponema pallidum</i> and hepatitis B infection	5 ug/L hepatitis B antigen

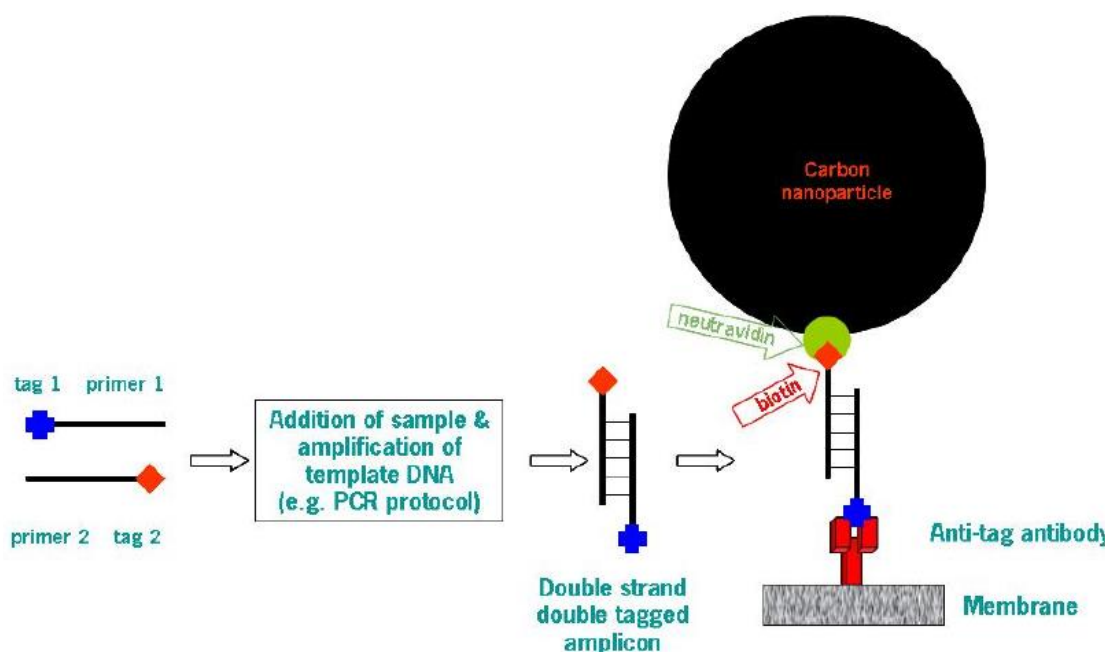
ตารางที่ 6 ประโยชน์และจุดด้อยของแลเทอรัลโฟล (66)

Advantages	Pitfalls
<ul style="list-style-type: none"> • Ease of device preparation 	<ul style="list-style-type: none"> • Mostly qualitative or
<ul style="list-style-type: none"> • Low cost 	<ul style="list-style-type: none"> semi-quantitative
<ul style="list-style-type: none"> • Stability over a wide range of environmental conditions and very long shelf life 	<ul style="list-style-type: none"> • Reproducibility varies from lot to lot
<ul style="list-style-type: none"> • Simple and user friendly operation 	<ul style="list-style-type: none"> • Most of the devices can detect more than one or two analytes simultaneously
<ul style="list-style-type: none"> • Requirement of small sample volume 	<ul style="list-style-type: none"> • Suffers from low biomolecules
<ul style="list-style-type: none"> • Most of the time, allows sample application without pretreatment 	<ul style="list-style-type: none"> affinity toward analytes and tendency of cross-reactivity
<ul style="list-style-type: none"> • Versatility of format, biorecognition molecules, labels and detection systems 	<ul style="list-style-type: none"> • Sometimes, pretreatment of sample is required which is time consuming
<ul style="list-style-type: none"> • Less time of analysis 	<ul style="list-style-type: none"> • Once sample is applied to the strip, capillary action cannot be decreased
<ul style="list-style-type: none"> • Comparable or better sensitivity and specificity than other well established methods 	<ul style="list-style-type: none"> or speeded up
<ul style="list-style-type: none"> • High potential of commercialization 	<ul style="list-style-type: none"> • Analysis time is also dependent on nature of sample itself i.e. viscosity,
<ul style="list-style-type: none"> • Easy integration with electronics 	<ul style="list-style-type: none"> surface tension
<ul style="list-style-type: none"> • Wide range of application 	
<ul style="list-style-type: none"> • No or very little energy consumption 	

3.2 นิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟล (Nucleic Acid Lateral Flow, NALF)

นิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลพัฒนามาจากแลเทอรัลโฟลอิมมูโนเอสเสย์อาศัยการเกิดไฮบริดเซชันระหว่าง conjugate probe ที่ตรึงบนอนุภาคทองคำนาโนสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย (oligonucleotide target) และ probe ที่อยู่บนเมมเบรนแบบแซนวิช สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น probe (oligonucleotide probe) มี 3 ส่วน ได้แก่ 1) conjugate probe ที่ตรึงบนอนุภาคทองคำนาโนหยดลงบนแผ่น conjugate pad โดย conjugate probe ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสคู่สมกับปลายของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายด้านหนึ่ง 2) capture probe ที่หยดตำแหน่งเส้นทดสอบ capture probe ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสคู่สมกับอีกด้านหนึ่งของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย และ 3) control probe หยดที่ตำแหน่งเส้นควบคุมโดย control probe ออกแบบให้มีเบสคู่สมกับ conjugate probe โดย probe 2 ชนิดหลังจะถูกตรึงอยู่บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เมื่อหยดตัวอย่างที่มีโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายลงบน sample pad สารตัวอย่างจะไหลมาที่ conjugate pad และเกิดไฮบริดเซชันกับ conjugate probe ที่ตรึงบนอนุภาคทองคำนาโนหลังจากนั้นจะไหลผ่านต่อไปยังเส้นทดสอบซึ่งมี capture probe อีกชุดที่จำเพาะกับอีกส่วนของเบสบนโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายและเกิดการไฮบริดเซชันขึ้น อนุภาคทองคำนาโนจะเกิดการเกาะกลุ่มกันที่บริเวณเส้นทดสอบทำให้เกิดแถบสีแดงซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า conjugate probe ที่ตรึงบนอนุภาคทองคำนาโนส่วนเกินจะไหลผ่านมายังเส้นควบคุมที่มี control probe ซึ่งมีเบสคู่สมกับ conjugate probe ที่ตรึงกับอนุภาคทองคำนาโนและเกิดการไฮบริดเซชันทำให้เกิดแถบสีแดงที่สองขึ้น ดังนั้นหากในตัวอย่างมีสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายจะเกิดแถบสีแดง 2 เส้น (แปลผลเป็นบวก) แต่หากไม่มีสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายจะเกิดแถบสีแดงเพียงเส้นเดียวที่เส้นควบคุม (แปลผลเป็นลบ) โดยแถบสีแดงที่เส้นควบคุมจะช่วยให้ทราบว่าแถบตรวจยังมีประสิทธิภาพในการทำงานดี

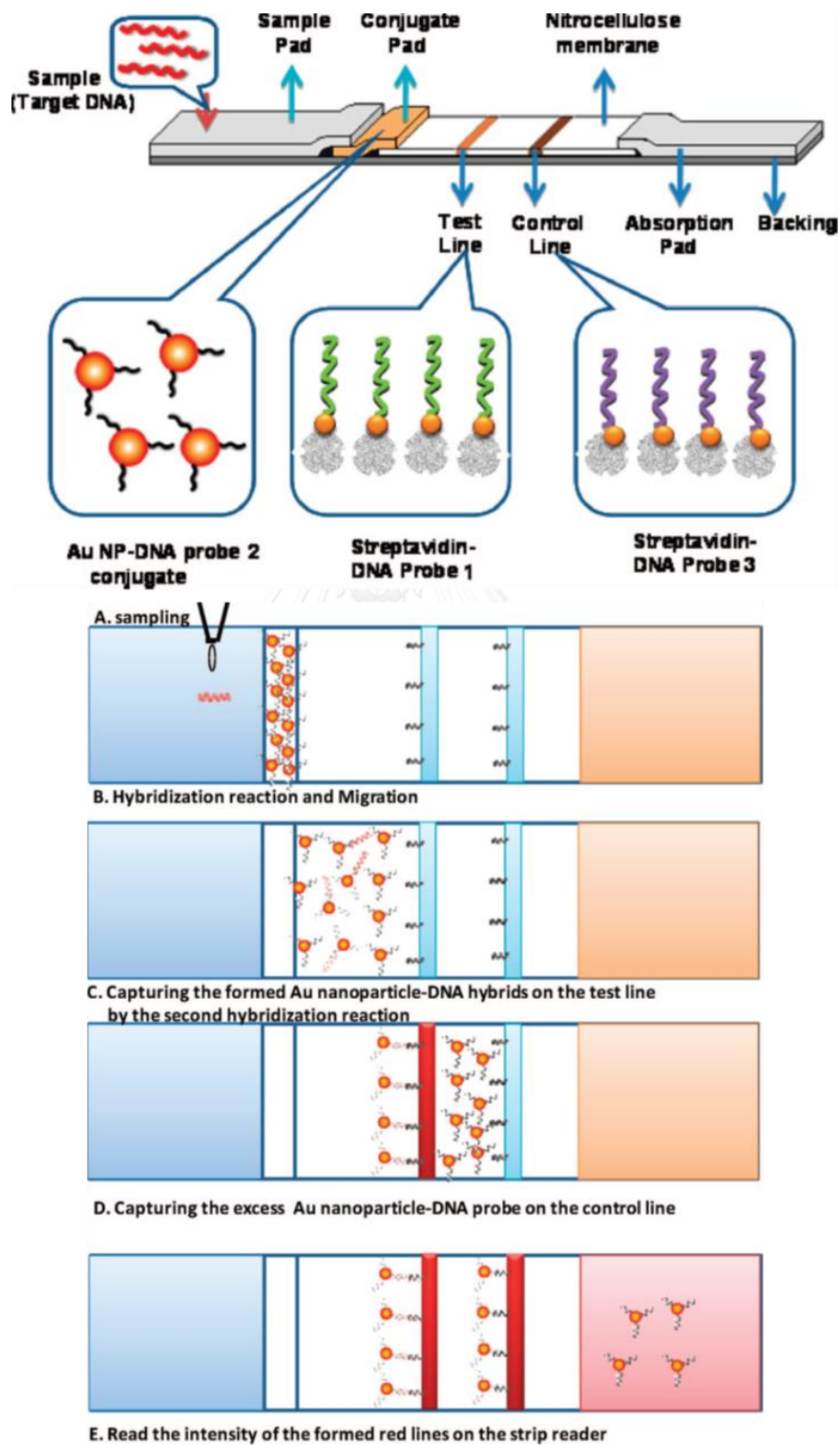
นิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลถูกใช้สำหรับตรวจหาดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอหลังจากเพิ่มจำนวนด้วย polymerase chain reaction (PCR) (69) nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) (70) หรือ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (71)



ภาพที่ 22 หลักการของนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลแบบแซนวิช (68)

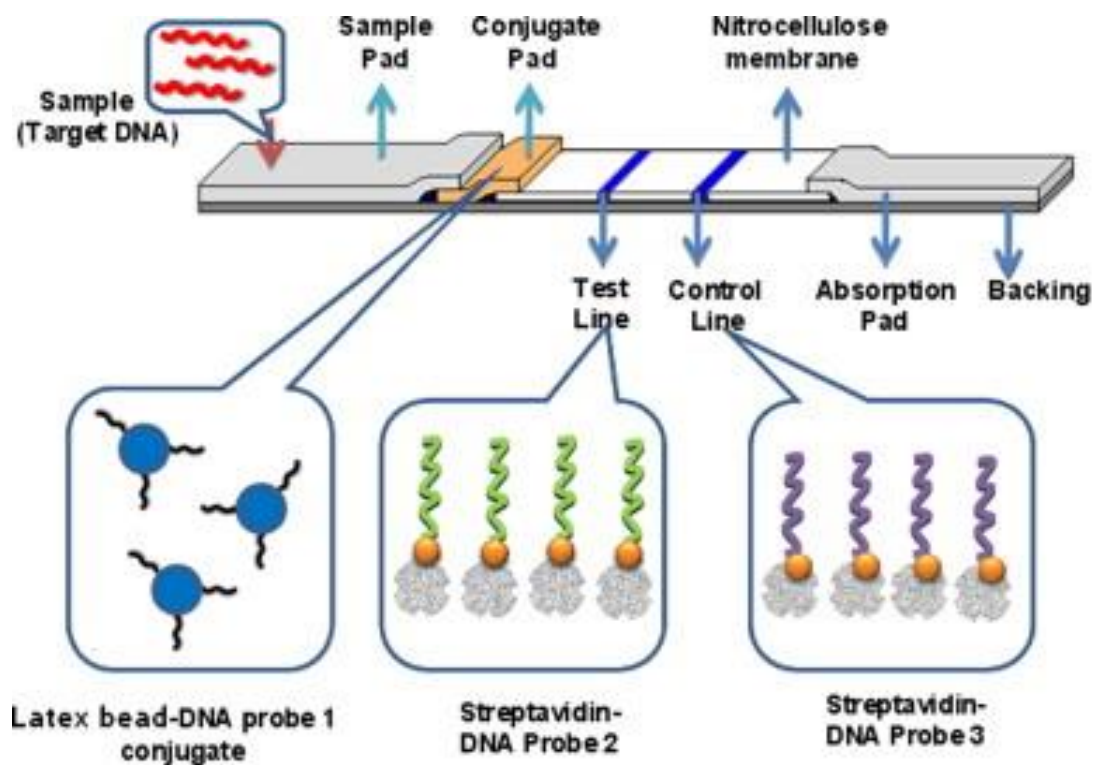
ตัวอย่างงานวิจัยนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟล ตัวอย่างได้แก่ ปี ค.ศ. 2009 Mao X และคณะ ได้พัฒนาการตรวจหา genomic DNA ด้วยเทคนิคนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลโดยไม่มีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมก่อนโดย genomic DNA (target) ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความยาว 60 เบส conjugate probe 2 ที่ตรึงกับอนุภาคของนาโนถูกไฮบริดเซชันเกิดเป็น complex จากนั้นไหลไปตำแหน่งเส้นทดสอบที่มี streptavidin-biotin DNA probe 1 (capture probe) ที่มีความจำเพาะกับ genomic DNA เกิดแถบสีที่เส้นทดสอบ จากนั้น DNA probe 2 ที่ตรึงกับอนุภาคของนาโนส่วนเกินไหลไปตำแหน่งเส้นควบคุมที่มี biotin-streptavidin DNA probe 3 (control probe) และมีความจำเพาะกับ DNA probe 2 ที่ตรึงกับอนุภาคของนาโนเกิดไฮบริดเซชันที่ตำแหน่งเส้นควบคุมที่

มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การทดสอบนี้มีความไวในการหา genomic DNA ที่ 2.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร หรือ 1.25 เฟมโตโมลาร์ ดังภาพที่ 24 (3)



ภาพที่ 23 นิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟล (3)

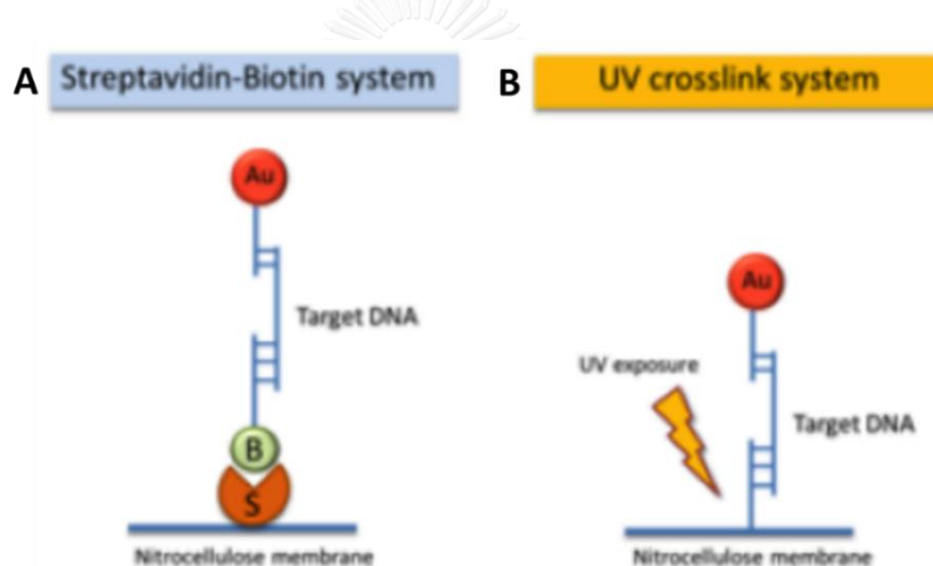
ในปี ค.ศ. 2013 Mao X และคณะ ได้พัฒนาการใช้ blue latex beads แทนอนุภาคทองคำนาโนที่มีราคาแพงเกิดแถบสีฟ้าของ blue latex beads แทนสีแดงของอนุภาคทองคำนาโนสามารถตรวจหาปริมาณ target DNA ในพลาสมาของคน มีความไว 3.75 เฟมโตโมลาร์ ดังภาพที่ 25 (72)



ภาพที่ 24 การใช้ blue latex bead แทนอนุภาคทองคำนาโนในนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟล (72)

ในปี ค.ศ. 2012 Pongsuchart M และคณะ ได้เพิ่มความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟลด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความเข้มแสงขนาด 50 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร (mJ/cm^2) เป็นเวลา 120 วินาที เชื่อม probe (capture และ control probe) ที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุมกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนช่วยลดการหลุดของ capture probe และ control probe ระหว่างทำการทดสอบทำให้เพิ่มความไวได้ร้อยละ 40 เมื่อเทียบกับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟลที่ไม่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต (4) และในปี ค.ศ. 2013 ได้ศึกษาการใช้ non-biotin probe คู่กับการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับการตรึง capture probe และ control probe ด้วยวิธีมาตรฐาน

(streptavidin-biotin probe) พบว่าการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความเข้มขนาด 125 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร 120 วินาที เชื่อมระหว่าง non-biotin oligonucleotide ที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุมกับไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนได้ผลแตกต่างกับวิธี streptavidin-biotin probe อย่างไม่นัยสำคัญ ผลการวิจัยนี้ทำให้ลดเวลาในขั้นตอนการเตรียม biotin probe และทำให้ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลมีต้นทุนต่ำลง ดังภาพที่ 26 (73) ในปี ค.ศ. 2012 Rohrman BA และคณะ ใช้นิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลคู่กับการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) ตรวจปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือด (5)



ภาพที่ 25 แสดงการตรึง probe บนเมมเบรน A. conventional streptavidin-biotin system

B. UV-based system (73)

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการนำแนวคิดอีกแปดแนวคิดเพื่อพัฒนาใช้ (75)

Detection	Detection of limit	Clinical biological targets/ sample
Naked-eye (dry-reagent diptick)	2 - 25 fmol	Hepatitis C virus (HCV)/ RNA, human plasma SNPs (mannose-binding lectin gene, MBL2) / genomic DNA, human whole blood
Naked-eye (electrostatic interactions of unmodified AuNPs)	100 fmol	SNPs associated with long QT syndrome—KCNE1 gene / genomic DNA
Light-scattering imaging (cross-linking aggregation)	33 zmol	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus epidermidis</i> , (mecA gene) / DNA, cultured bacteria
Naked-eye or UV-visible spectroscopy (non- cross-linking aggregation)	375 zmol - 4.2 pmol ; 100 nmol/ L	K-ras oncogene / genomic DNA, colorectal adenocarcinoma cell lines; β -thalassemia mutations / genomic DNA, human whole blood <i>Mycobacterium tuberculosis</i> / DNA, clinical specimens
Light-scattering imaging (sandwich hybridization)	250 zmol – 10 amol	Coagulation genes (Factor V, Factor II, and MTHFR— associated with thrombotic disease) / genomic DNA, human placenta; Gene expression in human brain / human brain total RNA; Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (mecA gene) / DNA, cultured bacteria

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส SF-C1497 (บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น)
- 1.2 เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมันนี)
- 1.3 Autoclave (บริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น)
- 1.4 Microcentrifuge (บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมันนี)
- 1.5 Cuvette (บริษัท Hellma ประเทศเยอรมันนี)
- 1.6 หลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (บริษัท Axygen Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.7 UV-VIS spectrophotometer (บริษัท Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.8 Stirrer Hot Plate (บริษัท BEC Thai ประเทศไทย)
- 1.9 Zetasizer machine (บริษัท Marvern ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.10 เครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารละลาย (nanodrop) (บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.11 เครื่องตรึงสารพันธุกรรมบนแผ่นเมมเบรน (UV crosslink) (บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.12 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (บริษัท Denver Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.13 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (บริษัท Denver Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา)

- 1.14 ตู้ดูดควัน (บริษัท Erlab ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.15 เครื่องเขย่าสารละลาย (orbital shaker) (บริษัท Gemmy Industrial ประเทศไต้หวัน)
- 1.16 Hot Air Oven (บริษัท Memmert ประเทศเยอรมันนี)
- 1.17 เครื่องผลิตน้ำ Milli Q (Double Deionized Ultra Pure Water) (บริษัท Elga ประเทศอังกฤษ)
- 1.18 Fine vortex (บริษัท LAbnet International ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.19 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านรุ่น Tecnai 20 Twin (บริษัท FEI ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.20 เครื่องวัดความปั่นกรดต่าง (pH meter) (บริษัท ESDO ประเทศ Schott)
- 1.21 Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter cutoff 30,000 (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.22 Glass fiber รุ่น GFDX103000 (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.23 Nitrocellulose membrane with backing pad รุ่น HF180MC10 (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.24 Cellulose fiber membrane รุ่น CFSP173000 (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.25 NAP-10 Column (บริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 1.26 ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety carbinet class II) (บริษัท Astec-Microflow ประเทศอังกฤษ)
- 1.27 Thermal cycle (MJ Mini Thermal Cycler) (บริษัท Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2. รายการน้ำยาและสารเคมี

2.1 Bovine serum albumin (BSA) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.2 DL-Dithiothreitol (DTT) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.3 Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.4 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.5 Potassium chloride (KCl) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.6 Sodium hydroxide (NaOH) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.7 Sodium phosphate monobasic (KH_2PO_4) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.8 Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.9 Sodium dodecyl sulfate ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.10 Sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.11 Triton X-100 ($(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$) (บริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)



2.12 Hydrochloric acid (HCl) (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.13 Nitric acid (HNO₃) (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.14 Trisodium phosphate (Na₃PO₄) (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.15 Tween 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆) (บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.16 Trisodium citrate dehydrate (C₆H₅Na₃O₇ · H₂O) (บริษัท Merck ประเทศ
สหรัฐอเมริกา)

2.17 Tris-hydrochloride (NH₂C(CH₂OH)₃ · HCl) (บริษัท Emd chemical ประเทศ
สหรัฐอเมริกา)

2.18 ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ QIAamp viral RNA mini kit (บริษัท Qiagen ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.19 น้ำยาทำ RT-PCR ได้แก่ M-MLV RT buffer, MgCl₂, dNTP, RT-PCR end primer, M-
MLV enzyme และ Rnase inhibitor (บริษัท Promega ประเทศอังกฤษ)

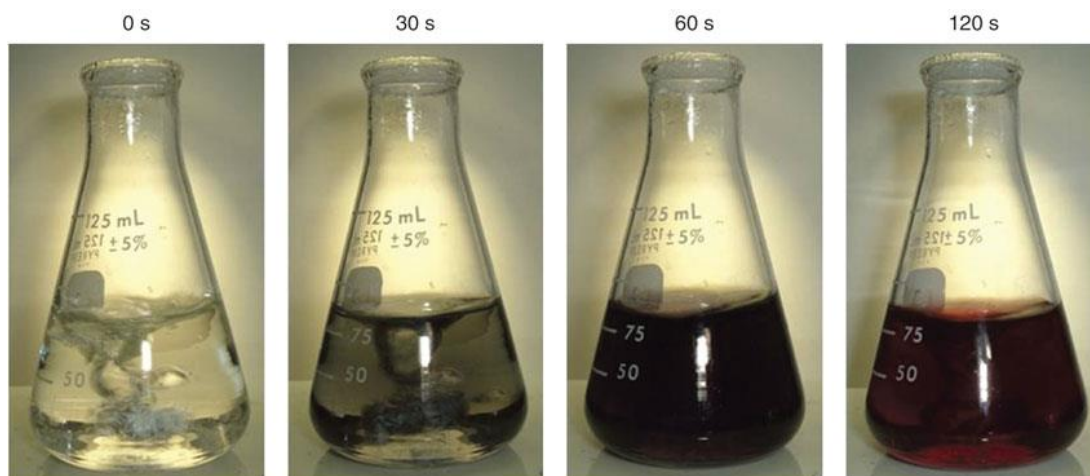
3. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนใช้หลักการ Citrate reduction ของ Turkevich J และคณะ (42) สำหรับใช้ตรึงกับ conjugate probe การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนต้องทำความสะอาดเครื่อง
เครื่องแก้วและแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) ให้ปราศจากสารตกค้างด้วย aqua regia ที่มี
ส่วนประกอบของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดไนตริก (HNO₃) ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยเตรียม
กรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 75 มิลลิลิตร ผสมกับกรดไนตริกปริมาตร 25 มิลลิลิตร แช่เครื่องแก้วนาน
15 นาทีจากนั้นล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำเครื่องแก้วเข้าอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven)

เมื่อเครื่องแก้วแห่งนำขวดรูปชมพู่ (flask) ประกอบกับ Reflux condenser สำหรับต้มสารละลายวางบนเครื่องกวนสารละลายด้วยแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน (hot plate stirrer) โดยมีแท่งแม่เหล็กกวนสารกวนตลอดเวลาเติมสารละลาย 1% ไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ (HAuCl₄ · 3H₂O) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำ milli Q ที่เตรียมจากเครื่อง Double Deionized Ultra Pure Water ปริมาตร 24.5 มิลลิลิตร ตั้งอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสและความเร็วของแท่งแม่เหล็กกวนสารเบอร์ 2 เมื่อสารละลายเดือดเติม 1% โซเดียมซิเตรท (trisodium citrate, Na₃C₆H₅O₇) อย่างรวดเร็ว การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนนี้ใช้ปริมาณของ 1% โซเดียมซิเตรทแตกต่างกันเพื่อสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนให้มีขนาดที่ต้องการดังนี้ การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 1 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 400 มิลลิลิตร, อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 2 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 600 ไมโครลิตร, อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 3 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 800 ไมโครลิตร และอนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 4 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร หลังจากเติม 1% โซเดียมซิเตรทแล้วสารละลายจะเปลี่ยนสีอย่างรวดเร็วสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงินเข้ม (deep blue) และเปลี่ยนเป็นสีแดง (wine red) ภายในเวลาประมาณ 2 นาที หลังจากเติม 1% โซเดียมซิเตรทแล้วให้ความร้อนต่ออีก 15 นาที จึงปิดเตาให้ความร้อนแต่เปิดเครื่องให้แท่งแม่เหล็กกวนสารละลายไว้ตลอดเวลาอีก 2 ชั่วโมงหรือข้ามคืน ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง เก็บอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสงและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้ ตรวจสอบขนาด รูปร่าง การเกาะกลุ่มหรือการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงช่วงแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องวิสิเบิลสเปกโทรสโคป (UV-Visible spectroscopy) ที่ความยาวคลื่น 400-

800 นาโนเมตร และตรวจสอบขนาดของอนุภาคทองคำนาโนและค่าศักย์ประจุที่ผิว (Zeta potential)

เพื่อดูประจุบนผิวอนุภาคทองคำนาโนด้วยเครื่อง Zetasizer



ภาพที่ 26 แสดงการเปลี่ยนสีของสารละลาย 1% ไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ในน้ำ milli Q หลังจากเติม 1% โซเดียมซิเตรทที่ 0 วินาที สารละลายมีสีใส ที่ 30 วินาที สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ที่ 60 วินาที สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม และที่ 120 วินาที สารละลายมีสีแดงไวน์ (76)

4. ลำดับเบสที่ใช้เป็น Oligonucleotide probe และ Target Sequence

Oligonucleotide probe ถูกออกแบบให้จำเพาะกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ส่วน RT gene ของ HIV-1 โดยใช้ลำดับเบสเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pongsuchart M และคณะ (4, 73) RT gene of HIV-1 virus, non-thiol conjugate probe, test line non-biotin probe และ control line non-biotin probe สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Bidesign ประเทศไทย Thiol conjugate probe, test line biotin probe และ control line biotin probe สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 8 Oligonucleotide probe ที่ใช้ในชุดวินิจฉัยแอสิดแลเทอรัลโฟล

Probe	Sequence
RT gene of HIV-1 virus (Target sequence)	5'-TCT TCT GTC AAT GGC CAC TGT TTA ACC TTT GGT CCA TCC ATT CCT GGC TTT AAT GTT ACT GGT ACA G-3'
Thiol conjugate probe (conjugate probe1)	5'-thiol-CTG TAC CAG TAA CAT TAA AGC CAG G-3'
Non-thiol conjugate probe (conjugate probe 2)	5'-CTG TAC CAG TAA CAT TAA AGC CAG G-3'
Test line biotin probe (capture probe 1)	5'- GTT AAA CAG TGG CCA TTG ACA GAA GA- biotin-3'
Control line biotin probe (control probe 1)	5'-biotin-CCT GGC TTT AAT GTT ACT GGT ACA G-3'
Test line non-biotin probe (capture probe 2)	5'- GTT AAA CAG TGG CCA TTG ACA GAA GA- 3'
Control line non-biotin probe (control probe 2)	5'-CCT GGC TTT AAT GTT ACT GGT ACA G-3'

5. การตรึง thiol conjugate probe (conjugate probe 1) กับผิวอนุภาคทองนาโน

นำ conjugate probe 1 ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสส่วน RT gene ของ HIV-1 มาตรึงกับผิวอนุภาคทองนาโนด้วยเทคนิคของ Hill HD และ Mirkin CA (76) เตรียม conjugate probe 1 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แต่เนื่องจาก conjugate probe 1 มีหมู่ thiol ต่อที่ตำแหน่ง 5' ทำให้หมู่ thiol อยู่ในรูปแบบ protected form เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ของพันธะไดซัลไฟด์ (–SH) ทำให้ conjugate probe 1 อยู่ในรูป dimer formation ก่อนนำมาใช้ต้องเตรียมให้อยู่ในรูป free thiol ก่อนโดยซึ่ง dithiothreitol (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$) 7.7 มิลลิกรัม ผสมกับ conjugate probe 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เกิดปฏิกิริยา



วางบนเครื่องเขย่าสารละลาย (orbital shaker) ตั้งความเร็ว 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เตรียม NAP-10 column ขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อกำจัด DTT ส่วนเกิน โดยล้าง NAP-10 column ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำ 3 รอบ เพื่อล้างสารที่หล่อเรซินซึ่งมีส่วนประกอบของ 0.15% Kathon CG/ICP Biocide ออกเมื่อครบ 30 นาที เติม conjugate probe 1 ลงใน NAP-10 column และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปล่อยให้ไหลผ่าน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงใน NAP-10 column เก็บหยดที่ 9 จนถึงหยดสุดท้ายลงในหลอดไมโครเซนติพิวีก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำ conjugate probe 1 ที่เก็บลงในหลอดไมโครเซนติพิวีก์แต่ละหลอดไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารละลาย (Nanodrop) เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของ conjugate probe 1 และเลือกหลอดที่มีความเข้มข้นสูงสุดเพื่อให้ได้ conjugate probe 1 ที่มีความเข้มข้นสูงสุดนำ conjugate probe 1 มาผสมกับอนุภาคทองนาโนปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปวางบนเครื่องเขย่าสารละลายความเร็ว 120 รอบต่อ

นาที่ ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เติม phosphate adjustment buffer ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 9 มิลลิโมลาร์ (mM) โดยคำนวณ

total volume 1 (ไมโครลิตร) = อนุภาคทองคำนาโน 1,000 ไมโครลิตร + conjugate probe 1 x (ไมโครลิตร)

phosphate adjustment buffer y (ไมโครลิตร) = total volume 1 (ไมโครลิตร) / 10

และเติม 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1% (wt/vol) เพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคทองคำนาโน โดยคำนวณ

Total volume 2 (ไมโครลิตร) = อนุภาคทองคำนาโน 1,000 ไมโครลิตร + conjugate probe 1 x (ไมโครลิตร) + phosphate adjustment buffer y (ไมโครลิตร)

10% SDS (wt/vol) ที่เติม = (total volume 2 x 0.1) / 10

ห่อ foil ให้พ้นแสงนำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าสารละลายที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม salting buffer ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เท่ากับ 0.3 โมลาร์ (M) โดยคำนวณ

salting buffer (ไมโครลิตร) = (total volume 2 x 0.3 โมลาร์) / (2 โมลาร์)

เมื่อเติม salting buffer นำไปวางบนเครื่องเขย่าสารละลายตั้งความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิตั้งอุณหภูมิปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที ก่อนปั่นให้ตรวจสอบว่า conjugate probe 1 ตรงกับผิวอนุภาคทองคำนาโนโดยสังเกตดูสีของอนุภาคทองคำนาโนว่าไม่มีการเปลี่ยนสีและตกตะกอนเมื่อปั่นเสร็จจุดสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนมาละลายด้วย eluent buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้อนุภาคทองคำที่ตรงกับ conjugate probe 1 เสถียรโดย eluent buffer มีส่วนประกอบของ Na_3PO_4 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, 5% BSA, 0.25% Tween และ 10% sucrose โดย BSA,

Tween 20 และ sucrose จะช่วยให้อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียรไม่เกาะกลุ่ม ช่วยให้อนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงกับ conjugate probe 1 หลุดออกจาก conjugate pad ได้ง่ายขณะทำการทดสอบ ลดการจับแบบไม่จำเพาะของอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงกับ conjugate probe 1 กับไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและลดขั้นตอนการทำ blocking ที่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เก็บ conjugate probe 1 ที่ตรึงกับอนุภาคทองคำนาโนในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การตรึง non-thiol conjugate probe (conjugate probe 2) บนผิวอนุภาคทองคำนาโน

นำ conjugate probe 2 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ผสมกับอนุภาคทองคำนาโนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าสารละลายความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเติม phosphate adjustment buffer ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 9 มิลลิโมลาร์ (mM) โดยคำนวณ

total volume 1 (ไมโครลิตร) = อนุภาคทองคำนาโน 1,000 ไมโครลิตร + conjugate probe 2 x (ไมโครลิตร)

phosphate adjustment buffer y (ไมโครลิตร) = total volume 1 (ไมโครลิตร) / 10

เติม 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1% (wt/vol) เพื่อป้องกันอนุภาคทองคำนาโนเกาะกลุ่ม โดยคำนวณ

total volume 2 (ไมโครลิตร) = อนุภาคทองคำนาโน 1,000 ไมโครลิตร + conjugate probe 2 x (ไมโครลิตร) + phosphate adjustment buffer y (ไมโครลิตร)

10% SDS (wt/vol) ที่เติม = (total volume 2 x 0.1) / 10

ห่อ foil ให้พ้นแสง วางทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าสารละลายความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติม salting buffer ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.3 โมลาร์ โดยคำนวณ

salting buffer (ไมโครลิตร) = (total volume 2 x 0.3 โมลาร์) / (2 โมลาร์)

เมื่อเติม salting buffer และตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิตั้งอุณหภูมิปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที ก่อนปั่น ให้ตรวจสอบว่า conjugate probe 2 ตรงกับผิวอนุภาคทองคำนาโนโดยสังเกตสีของอนุภาคทองคำนาโน ว่าไม่มีการเปลี่ยนสีและตกตะกอน เมื่อปั่นเสร็จดูดสารละลายด้านบนทิ้งนำตะกอนมาละลายด้วย eluent buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษา conjugate probe 2 ที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนแล้ว ในภาชนะป้องกันแสงและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การเตรียม biotin probe สำหรับหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเพื่อทำเส้นทดสอบ (test line) และเส้นควบคุม (control line)

นำ biotin probe มาทำปฏิกิริยากับ streptavidin โดยเตรียม test line biotin probe (capture probe 1) และ control line biotin probe (control probe 1) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใช้ ปริมาตรอย่างละ 30 ไมโครลิตร นำ capture probe 1 และ control probe 1 ผสมกับ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และ streptavidin ความเข้มข้น 1.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และกำจัด streptavidin ส่วนเกินด้วย Amicon centrifugal filter (cutoff 30,000) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ปั่นล้างด้วย PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 3 ครั้ง และละลาย capture probe 1 และ control probe 1 ด้วย สารละลาย PBS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

8. การเตรียม non-biotin probe สำหรับหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเพื่อทำเส้นทดสอบ (test line) และเส้นควบคุม (control line)

การเตรียม test line non-biotin probe (capture probe 2) และ control line non-biotin probe (control probe 2) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศา

9. การเตรียมและประกอบชุดวินิจฉัยอิมมูโนโครมาโทกราฟี

8.1 การเตรียม sample pad

การเตรียม sample pad นำ glass fiber membrane แฉ่งลงในสารละลาย Buffer pH 8.0 ที่มี ส่วนประกอบ 0.25% Triton X-100 ($(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ นาน 30 นาที วางให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและตัดแบ่งขนาด 4x15 มิลลิเมตร เก็บที่อุณหภูมิห้องและปราศจากความชื้น

8.2 การเตรียม conjugate pad

การเตรียม conjugate pad ใช้ glass fiber membrane ขนาด 4x10 มิลลิเมตร หยด conjugate probe 1 และ conjugate probe 2 ที่ตรงกับอนุภาคทองนาโนแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน glass fiber membrane จากนั้นปล่อยให้แห้งในกล่องที่มีสารดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.3 การเตรียม detection membrane

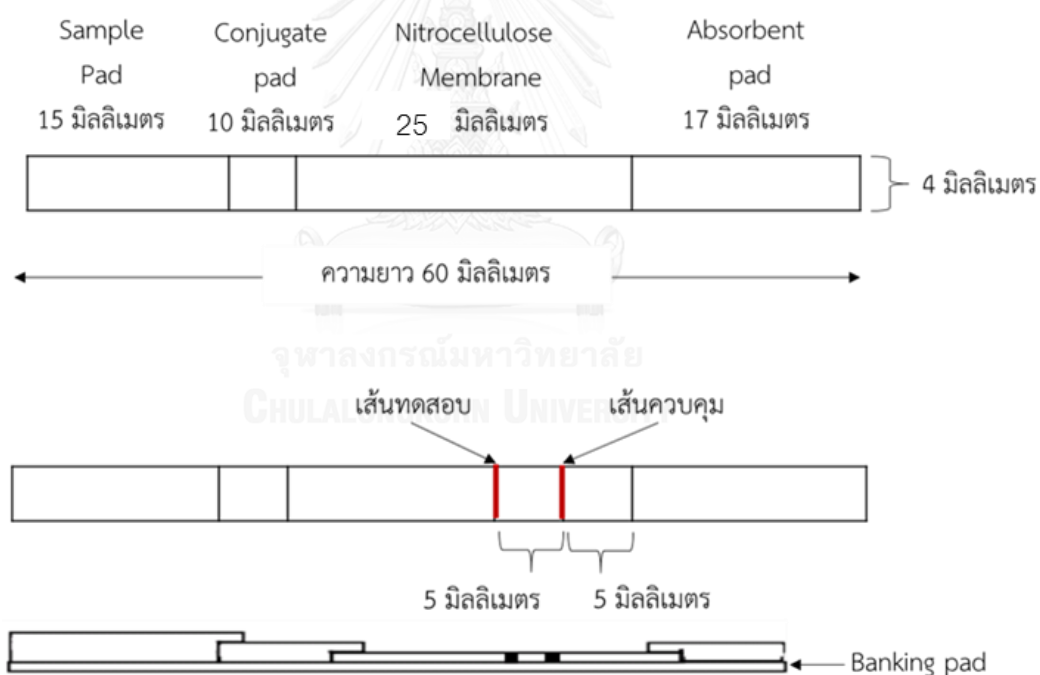
การเตรียม detection membrane ใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ติดบนแผ่นรองขนาด 4X60 มิลลิเมตร นำ capture probe 1 หยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยหยดที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และหยด control probe ที่ตำแหน่งเส้นควบคุมปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยมี

ระยะห่างระหว่างเส้นทดสอบกับเส้นควบคุม 5 มิลลิเมตร นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนวางให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เก็บไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนในที่แห้งและปราศจากความชื้น

8.4 การเตรียม absorbent pad

การเตรียม absorbent pad ใช้ cellulose membrane ขนาด 4x17 มิลลิเมตร เก็บที่ อุณหภูมิห้องและปราศจากความชื้น

8.5 การประกอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล ประกอบโครงสร้างทั้ง 4 ส่วน โดยทุกส่วนจะมี ส่วนที่ซ้อนทับกัน 2 มิลลิเมตร ส่วนประกอบทุกส่วนถูกติดลงบน backing pad (4x60 มิลลิเมตร) ตามภาพที่ 28



ภาพที่ 27 โครงสร้างของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล

9. การตรึงสารพันธุกรรมบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่หยด capture probe และ control probe แล้วไปผ่านแสง อัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องตรึงสารพันธุกรรมบนเมมเบรน (UV crosslink machine) รุ่น 3UV Lamp

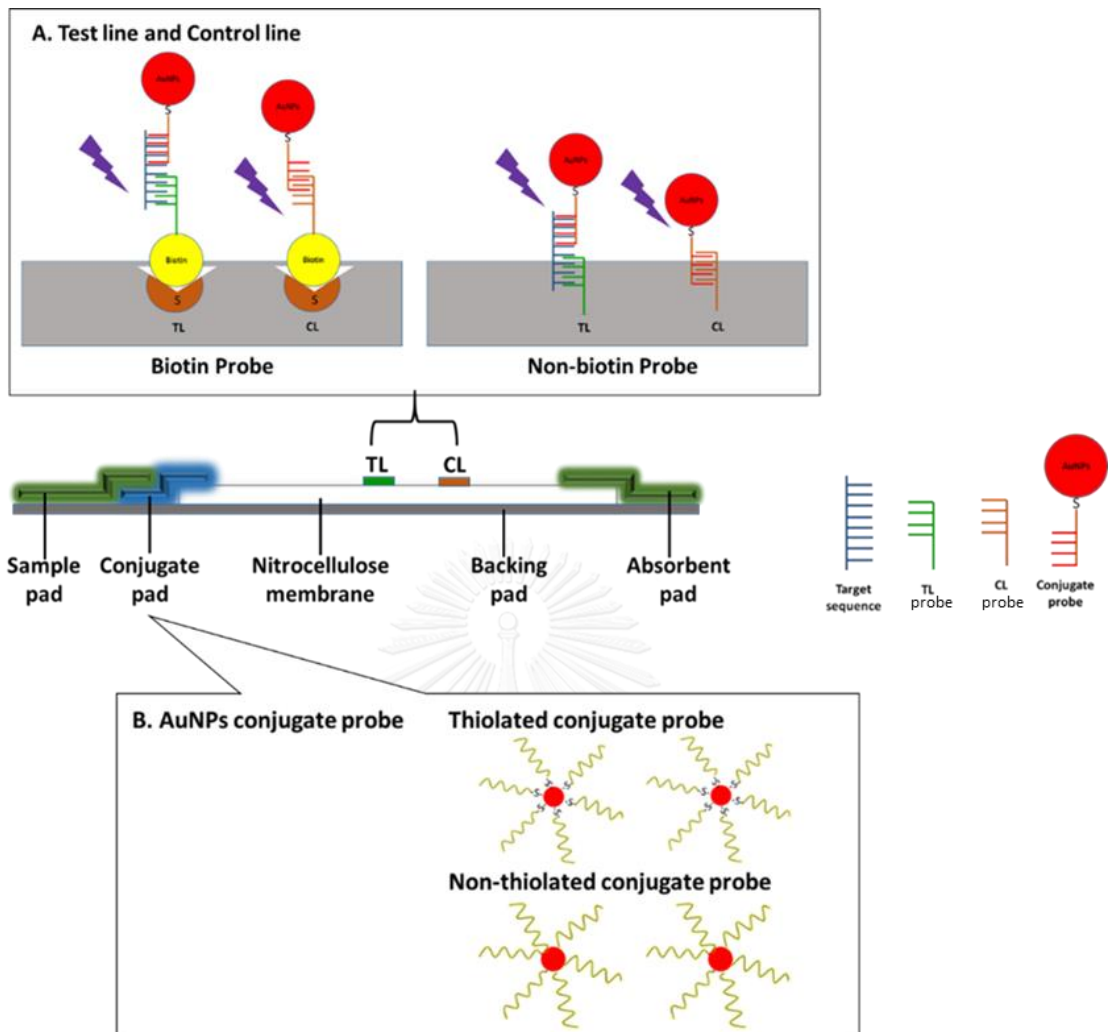
(115V, 60Hz) เครื่องตรึงสารพันธุกรรมบนเมมเบรนมี 3 ความยาวคลื่น ได้แก่ shortwave UV 254 นาโนเมตร, midrange UV 302 นาโนเมตร และ longwave UV 365 นาโนเมตร นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนถูกแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาทีของแต่ละความยาวคลื่นเพื่อเลือกระยะเวลาที่จุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลให้ผลดีที่สุดโดยพิจารณาจากความเข้มของเส้นทดสอบ

10. การทดสอบจุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลกับ RT gene ของ HIV-1 (target sequence)

เตรียม target sequence ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ running buffer (4X SSC buffer ที่ผสม 0.5% SDS) pH 7.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบน sample pad ทุกๆ 10 นาที หยด running buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังครบเวลา 30 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่าและวัดความเข้มของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ การแปลผลการทดสอบหากมีแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุมอ่านผลเป็นบวก หากไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ และมีแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมอ่านผลเป็นลบ และถ้าไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมให้แปลผลว่า สรุปลผลไม่ได้ (invalid)

11. สถิติที่ใช้ในการทดลอง

ใช้สถิติ one way ANOVA เปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบในกลุ่ม biotin probe และกลุ่ม non-biotin probe ทั้ง 3 ความยาวคลื่น คือ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร, 302 นาโนเมตร และ 365 นาโนเมตร โดยค่า p -value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 28 แผนภาพการทดลองของชุดนวัตลิิกแอซดแลเทอร์ลโฟลกับ target sequence ที่ปัจจัย
 ต่างๆ ภาพที่ 28A เป็นแผนการทดลองสำหรับ biotin probe และ non-biotin probe ที่ตั้งบนไน
 โตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ภาพที่ 28B เป็นแผนการทดลองสำหรับ
 thiol conjugate probe และ non-thiol conjugate probe ที่ตั้งกับอนุภาคทองคำนาโน
 (TL probe คือ capture probe และ CL probe คือ control probe)

12. การทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลทดสอบกับพลาสมาของผู้ติดเชื้อเอชไอวี

12.1 สิ่งส่งตรวจ

การทดลองใช้สิ่งส่งตรวจชนิดพลาสมาซึ่งได้จากกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มาตรวจติดตามผลการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และส่งตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (HIV viral load) หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การทดลองนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขไออาร์บี 575/57 (ตุลาคมพจนก) โดยอาสาสมัครได้รับทราบข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยและยินดีเข้าร่วมงานวิจัยในครั้งนี้ ตัวอย่างพลาสมาที่นำมาทดลองได้มาจากการเจาะเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ส่งตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดโดยเจาะเลือดเพิ่ม 1 หลอด จากเดิมเจาะเลือด 1 หลอด รวมเป็น 2 หลอด ใช้หลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิดอีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ปริมาตรหลอดละ 6 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด รวมปริมาตรทั้งหมด 12 มิลลิลิตร นำเลือดหลอดที่ 1 ตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติ COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan assay และนำเลือดหลอดที่ 2 มาปั่นแยกนำพลาสมาทดสอบด้วยชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลที่พัฒนาขึ้นโดยเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบจากชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลกับปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือด

12.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ

นำพลาสมาที่ทราบค่าปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp viral RNA mini kit ใส่น้ำยา AVL buffer ที่ผสม carrier RNA ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวร์กขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมพลาสมาปริมาตร 140 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมเอทานอล (96–100%) ปริมาตร 560 ไมโครลิตร แบ่งพลาสมาปริมาตร 630 ไมโครลิตร ใส่

ใน QIAamp Mini column นำมาปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube อันใหม่ นำพลาสมาที่เหลือทั้งหมดใส่ใน QIAamp Mini column และปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที เติม AW buffer1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม Buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ และปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม AVE buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที และปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบ

12.3 การทำ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

การทำ RT-PCR เพื่อเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอ (cDNA) นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำ denature RNA เพื่อให้อาร์เอ็นเอที่มีโครงสร้าง secondary structure เป็น primary structure โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ด้วย thermal cycle เมื่อครบเวลานำหลอดไมโครเซนติฟิวจ์วางบนน้ำแข็งทันทีเพื่อป้องกันการกลับมาเป็น secondary structure และทำขั้นตอนเปลี่ยน อาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอด้วยการทำ RT-PCR ใช้ primer RT-PCR-end 5'-GCT CCC CTG AGG AGT TTA CAC A-3' และเตรียมส่วนผสมของ RT-PCR ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 5X M-MLV RT buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP (2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, RT-PCR end primer (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นปริมาตร 4.25 ไมโครลิตร, M-MLV RT enzyme (200 U ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Rnase inhibitor (40 U ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ขั้นตอนการเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอประกอบด้วย 42 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที 1 รอบ

และที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จจะได้ซีดีเอ็นเอความยาวขนาด 2,980 เบส

12.4 การทดสอบซีดีเอ็นเอด้วยชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพล

ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลเตรียมจากอนุภาคทองนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ตรึงด้วย thiol conjugate probe และ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุมนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องตรึงสารพันธุกรรม (UV crosslink) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 60 วินาที ขั้นตอนการทดสอบอ่านซีดีเอ็นเอ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในน้ำเดือดนาน 5 นาที และแช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดซีดีเอ็นเอลงบนชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลและหยุด running buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกๆ 10 นาที หยุด running buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากครบ 30 นาทีอ่านผลด้วยตาเปล่า

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ลักษณะของอนุภาคทองคำนาโน

1.1 สีของอนุภาคทองคำนาโน

ผลการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยการเพิ่มปริมาตร 1% โซเดียมซิเตรท (trisodium citrate) การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 1 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 400 ไมโครลิตร ได้สารละลายอนุภาคทองคำนาโนสีม่วง อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 2 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 600 ไมโครลิตร ได้สารละลายอนุภาคทองคำนาโนสีม่วงอ่อน อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 พบตะกอนสีดำเล็กน้อยสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าในสารละลาย อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 3 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 800 ไมโครลิตร ได้สารละลายอนุภาคทองคำนาโนสีแดง และอนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 4 เติม 1% โซเดียมซิเตรทปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ได้สารละลายอนุภาคทองคำนาโนสีแดงชมพู อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 ไม่พบการตกตะกอน อนุภาคทองคำนาโนทั้ง 4 ชนิดที่สังเคราะห์สามารถนำมาใช้ตรึงสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ได้ ก่อนนำไปทำการทดสอบให้นำอนุภาคทองคำนาโนทั้ง 4 ชนิดไปวัดขนาด ค่าศักย์ประจุที่ผิว และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังภาพที่

30



ภาพที่ 29 สีของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วย 1% โซเดียมซิเตรทในอัตราส่วนต่างๆ

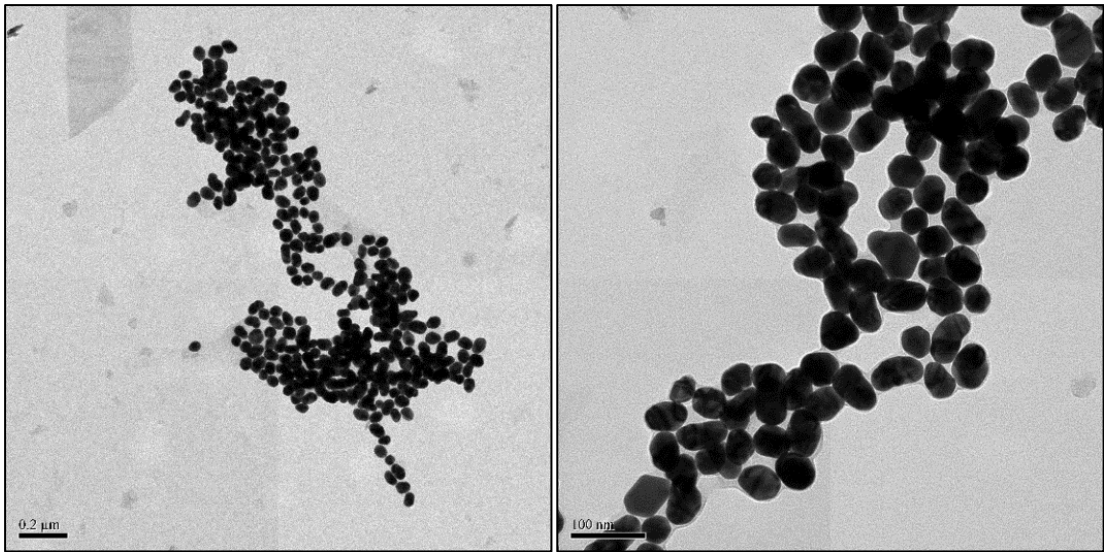
1.2 ผลการวิเคราะห์ขนาดรูปร่าง การเกาะกลุ่ม หรือการกระจายตัวของอนุภาคทองนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) ผลการวิเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน พบดังนี้

1.2.1 ขนาดของอนุภาคทองนาโน พบว่าขนาดของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 มีขนาดใหญ่ที่สุด และมีขนาดเรียงจากขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็ก คือ อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 ชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 ที่มีขนาดเล็กสุดตามลำดับ

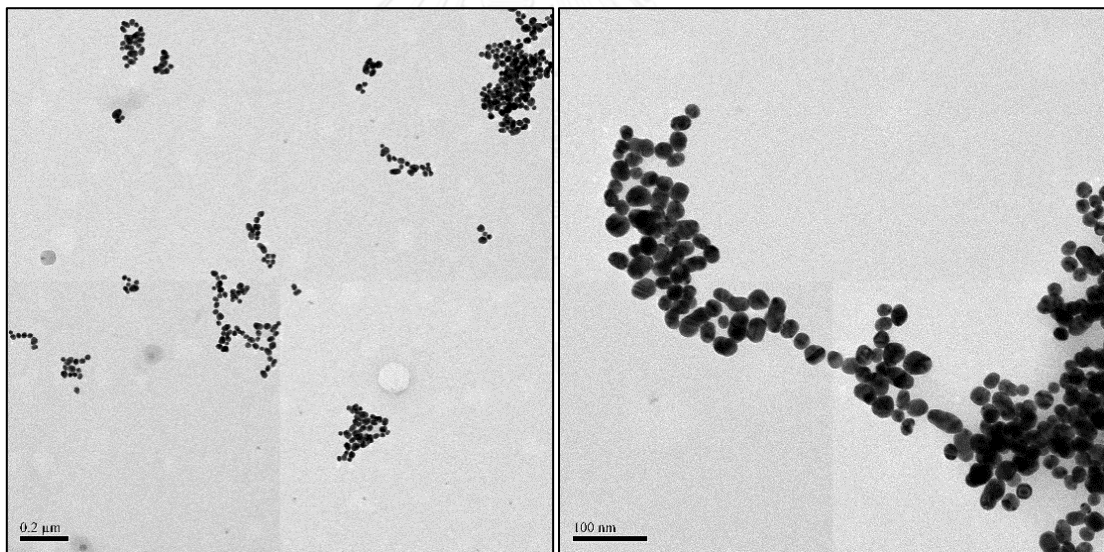
1.2.2 รูปร่างของอนุภาคทองนาโน พบว่าอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มีรูปร่างกลม เป็นส่วนใหญ่มีบางอนุภาคที่เป็นรูปทรงรี อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 มีรูปร่างกลม

1.2.3 การกระจายตัว พบว่าอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 พบการเกาะกลุ่มให้เห็นเพียงเล็กน้อย อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 มีการกระจายตัวดีไม่พบการเกาะกลุ่ม

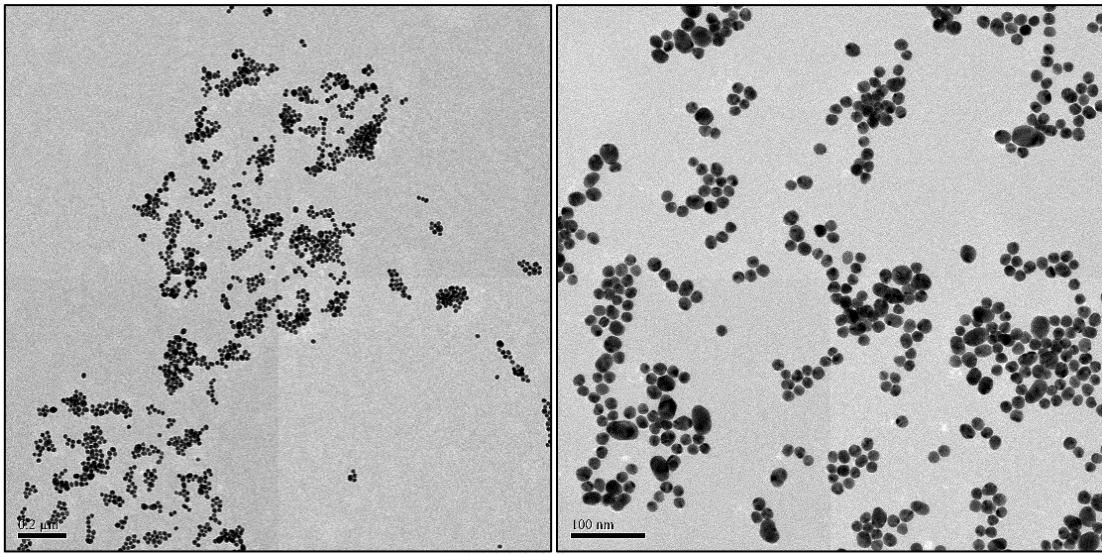
1.2.4 ผลการวิเคราะห์ขนาดด้วยโปรแกรม ImageJ ได้ขนาดของอนุภาคทองนาโนดังนี้ อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1, ชนิดที่ 2, ชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 มีขนาดประมาณ 50, 30, 20 และ 10 นาโนเมตร ตามลำดับ



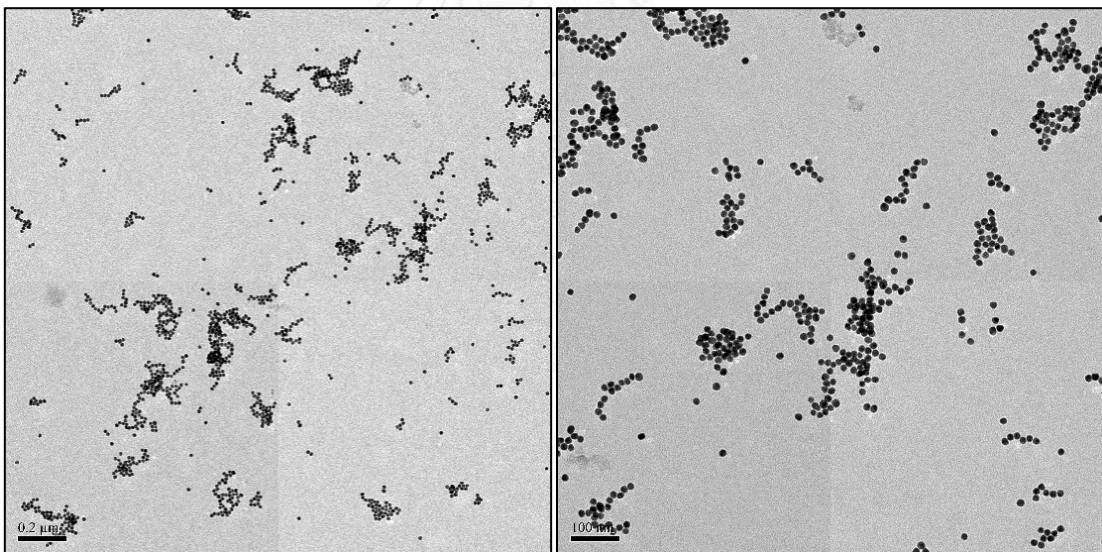
ภาพที่ 30 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านมีรูปร่างทรงกลมและทรงรีขนาดใหญ่ พบการเกาะกลุ่มบางส่วน



ภาพที่ 31 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านมีรูปร่างทรงกลมและทรงรีขนาดเล็กกว่าชนิดที่ 1 มีการกระจายตัวดีและพบการเกาะกลุ่มเล็กน้อย



ภาพที่ 32 อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 3 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านมีรูปร่างทรงกลมขนาดเล็ก มีการกระจายตัวดีและไม่พบการเกาะกลุ่ม



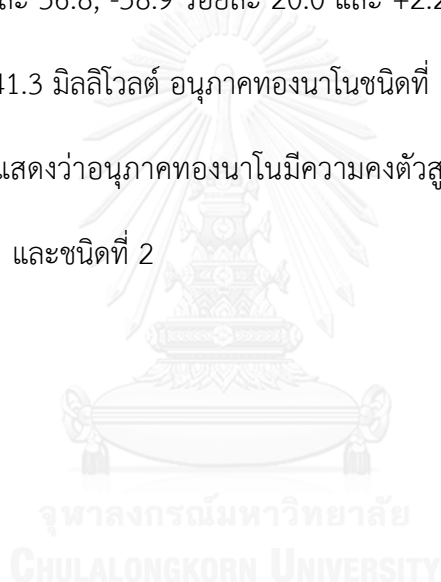
ภาพที่ 33 อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 4 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านมีรูปร่างทรงกลมขนาดเล็กที่สุด การกระจายตัวดีและไม่พบการเกาะกลุ่ม

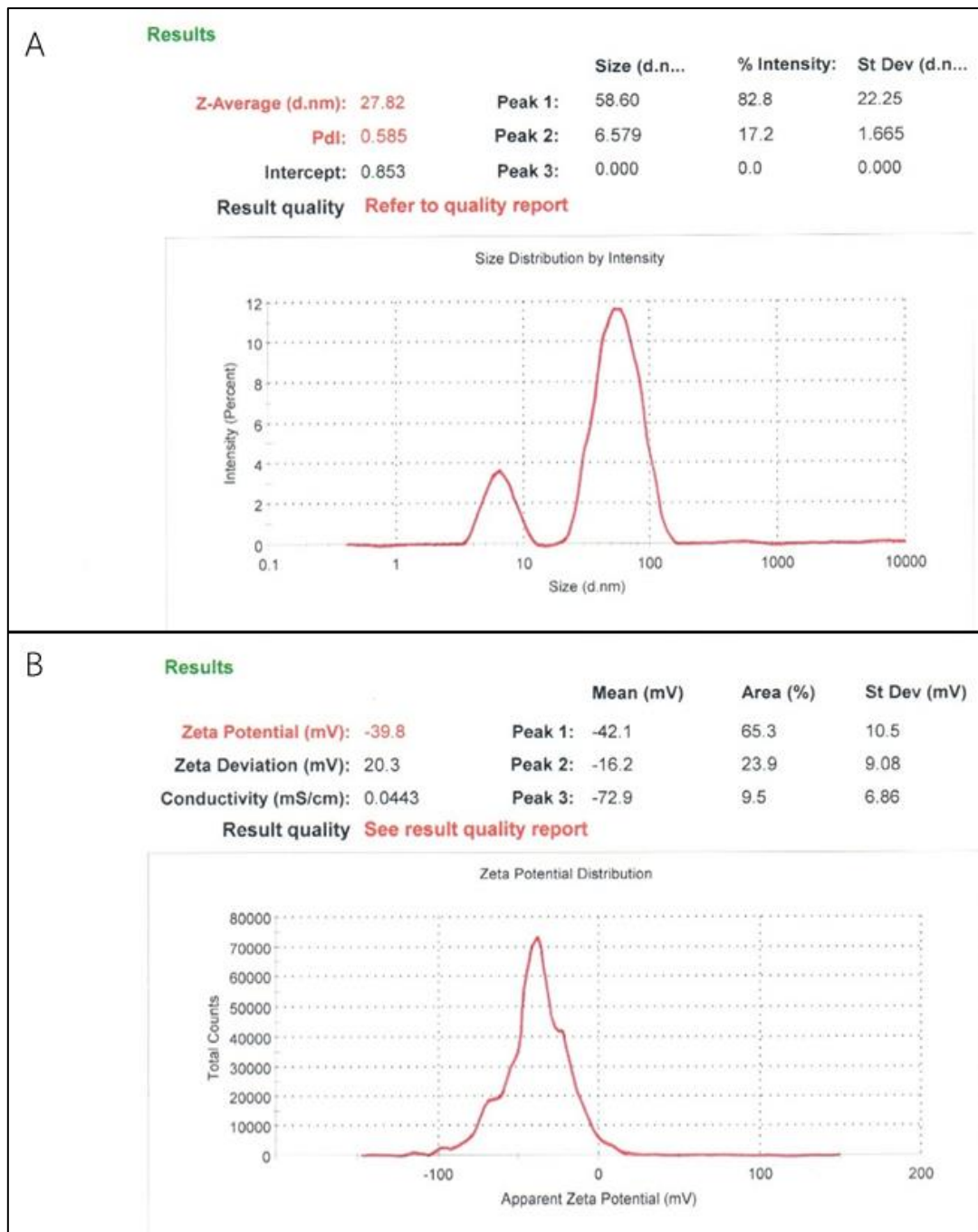
ตารางที่ 9 ตารางสรุปขนาดของอนุภาคทองนาโนที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านและวิเคราะห์ขนาดด้วยโปรแกรม ImageJ

อนุภาคทองนาโน	ขนาดโดยประมาณ (นาโนเมตร)	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบน (นาโนเมตร)
ชนิดที่ 1	50	53.98 \pm 15.15
ชนิดที่ 2	30	28.54 \pm 14.29
ชนิดที่ 3	20	18.73 \pm 11.21
ชนิดที่ 4	10	11.33 \pm 18.27

1.3 ขนาดอนุภาคทองนาโนและค่าศักย์ประจุที่ผิว (Zeta potential) เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองนาโนด้วยเครื่อง Zetasizer ทำการวัดซ้ำอย่างละ 3 ซ้ำต่อการวัดแต่ละประเภทแต่ละชนิดของอนุภาคทองนาโน พบว่าอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 มีขนาด 58.60 นาโนเมตร ร้อยละ 82.8 และขนาด 6.579 นาโนเมตร ร้อยละ 17.2 ผลเฉลี่ยมีขนาด 27.82 นาโนเมตร มีค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค (polydispersion index, Pdi) เท่ากับ 0.585 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 มีขนาด 51.91 นาโนเมตร ร้อยละ 91.9 และขนาด 2.243 นาโนเมตร ร้อยละ 18.1 ผลเฉลี่ยมีขนาด 29.85 นาโนเมตร มีค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคเท่ากับ 0.475 อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 3 มีขนาด 32.82 นาโนเมตร ร้อยละ 91.4 และขนาด 1.704 นาโนเมตร ร้อยละ 8.6 ผลเฉลี่ยมีขนาด 22.03 นาโนเมตร มีค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคเท่ากับ 0.320 และอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 4 มีขนาด 22.70 นาโนเมตร ร้อยละ 98.3 และขนาด 4,481 นาโนเมตร ร้อยละ 1.7 ผลเฉลี่ยมีขนาด 18.89 นาโนเมตร มีค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคเท่ากับ 0.221 พบว่าขนาดของอนุภาคทองนาโนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer ไม่เท่าและไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ขนาดด้วยโปรแกรม ImageJ ค่าศักย์ประจุที่ผิวของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 มีค่า -42.1 มิลลิโวลต์ ร้อยละ 65.3, -16.2 ร้อยละ

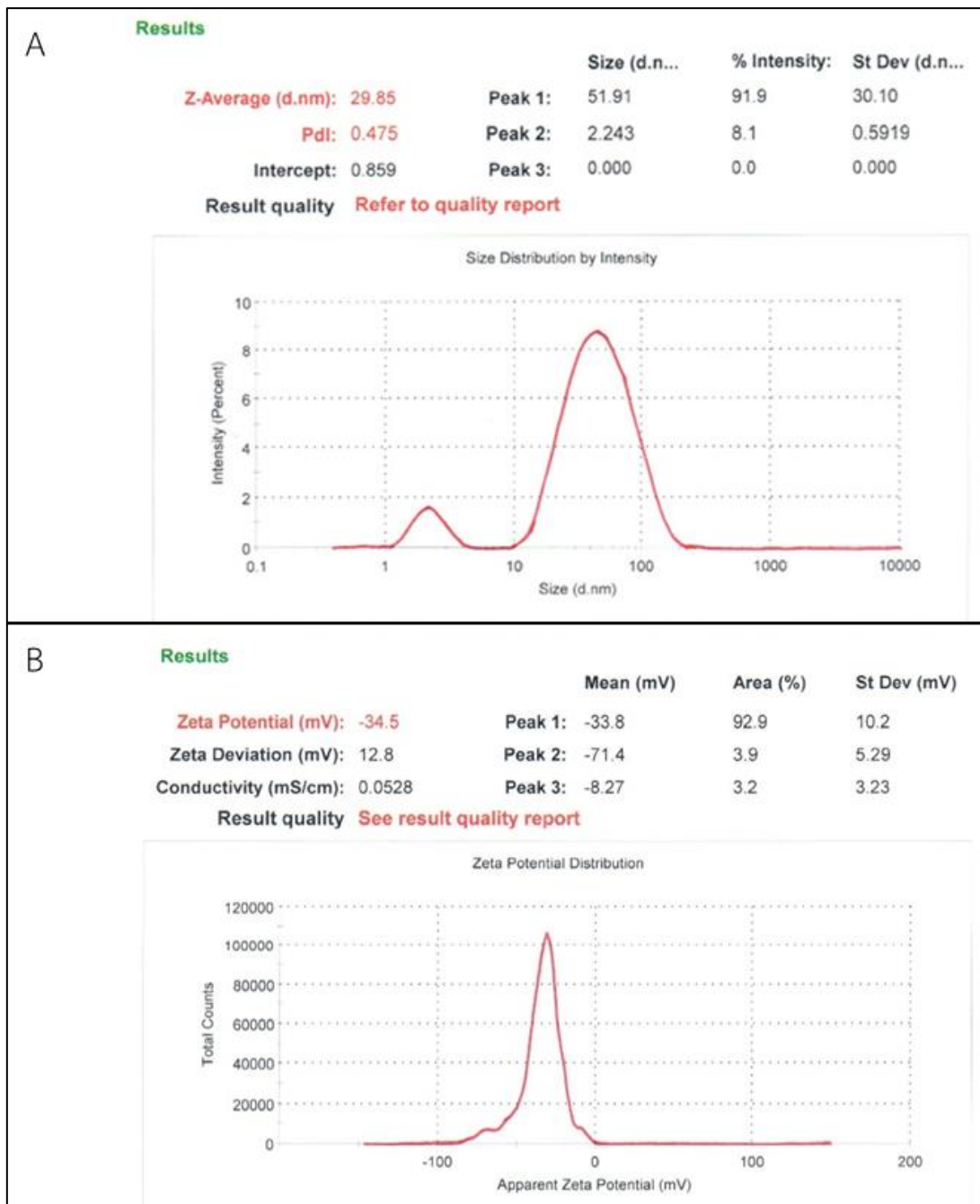
23.9 และ -72.9 มิลลิโวลต์ ร้อยละ 9.5 มีค่าศักย์ประจุที่ผิวเฉลี่ยเท่ากับ -39.8 มิลลิโวลต์ อนุภาค
ทองคำโนชนิดที่ 2 มีค่า -33.8 มิลลิโวลต์ ร้อยละ 92.9, -71.4 ร้อยละ 3.9 และ -8.27 มิลลิโวลต์ ร้อย
ละ 3.2 มีค่าศักย์ประจุที่ผิวเฉลี่ยเท่ากับ -34.5 มิลลิโวลต์ อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มี
ค่าอยู่ระหว่าง -30 ถึง -40 มิลลิโวลต์ แสดงว่าอนุภาคทองคำโนค่อนข้างมีความคงตัวไม่เกาะกลุ่ม
อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 3 มีค่า -38.1 มิลลิโวลต์ ร้อยละ 87.4, -76.5 ร้อยละ 6.3 และ -89.9
มิลลิโวลต์ ร้อยละ 3.5 มีค่าศักย์ประจุที่ผิวเฉลี่ยเท่ากับ -42.5 มิลลิโวลต์ อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 4 มี
ค่า -28.3 มิลลิโวลต์ ร้อยละ 56.8, -58.9 ร้อยละ 20.0 และ +2.28 มิลลิโวลต์ ร้อยละ 8.5 มีค่าศักย์
ประจุที่ผิวเฉลี่ยเท่ากับ -41.3 มิลลิโวลต์ อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 มีค่าศักย์ประจุที่ผิว
มากกว่า -40 มิลลิโวลต์ แสดงว่าอนุภาคทองคำโนมีความคงตัวสูงและไม่เกิดการเกาะกลุ่มมากกว่า
อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2



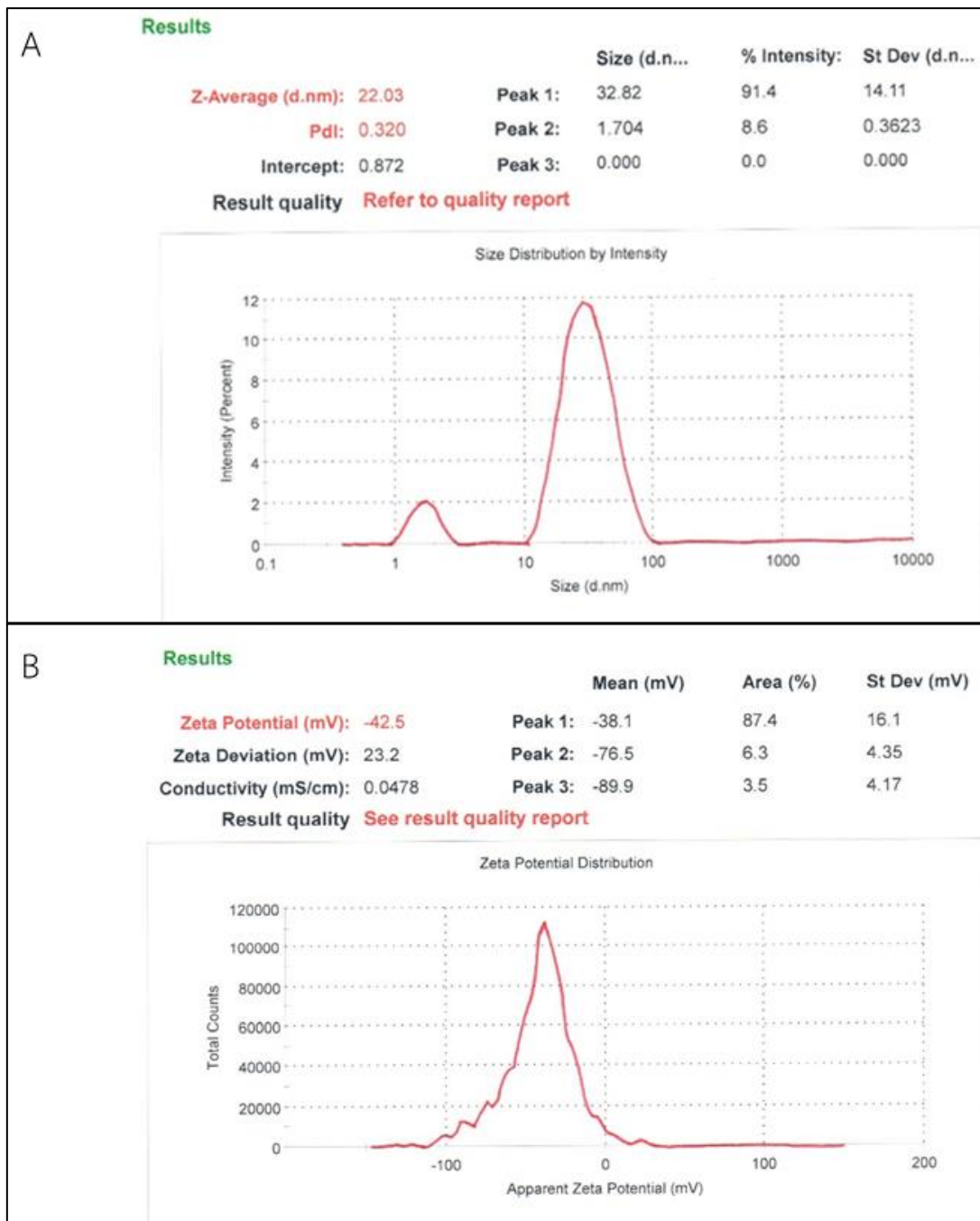


ภาพที่ 34 แสดงขนาด (ภาพ A) และค่าศักย์ประจุที่ผิว (ภาพ B) ของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ที่

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer

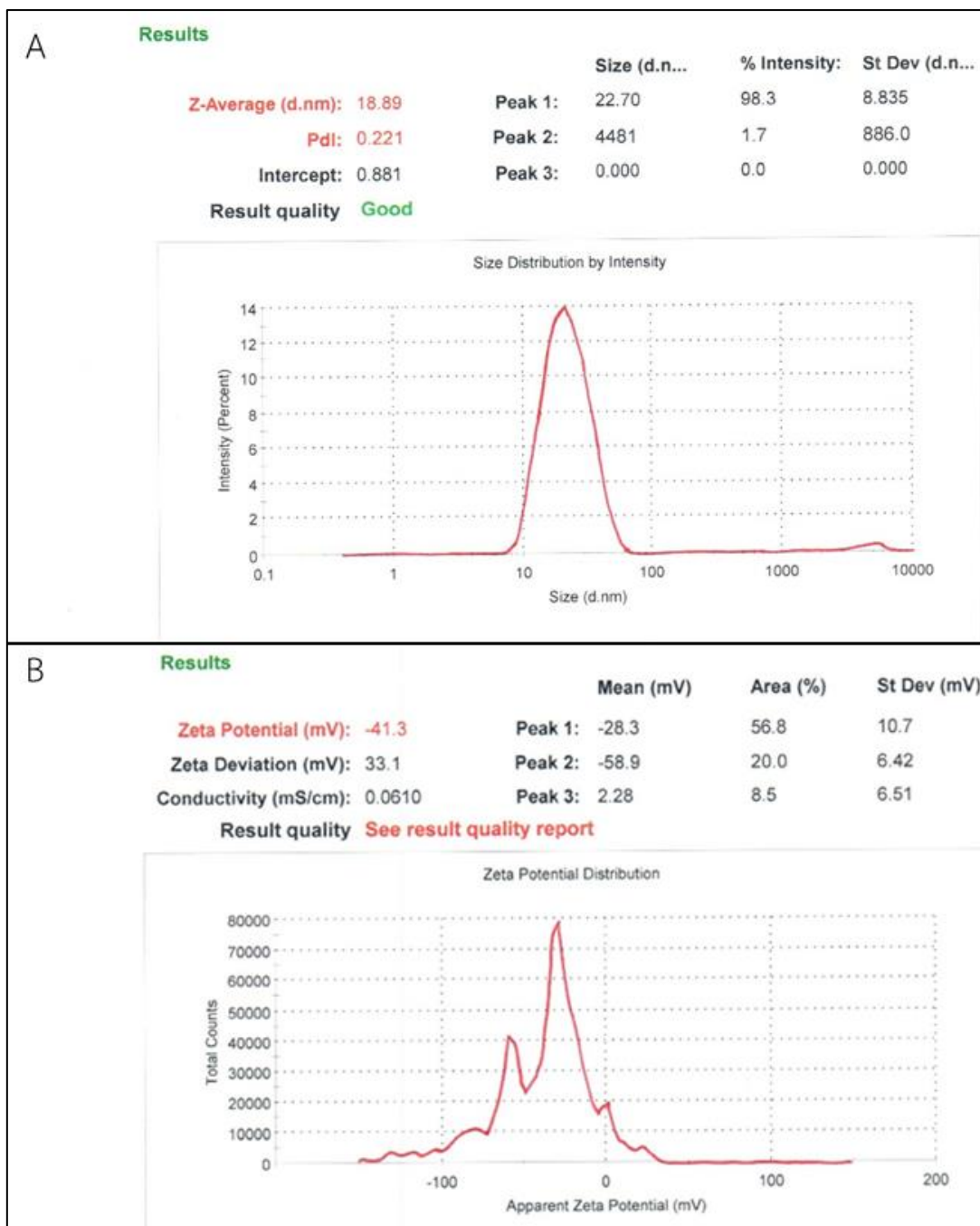


ภาพที่ 35 แสดงขนาด (ภาพ A) และค่าศักย์ประจุที่ผิว (ภาพ B) ของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer



ภาพที่ 36 แสดงขนาด (ภาพ A) และค่าศักย์ประจุที่ผิว (ภาพ B) ของอนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 3 ที่

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer

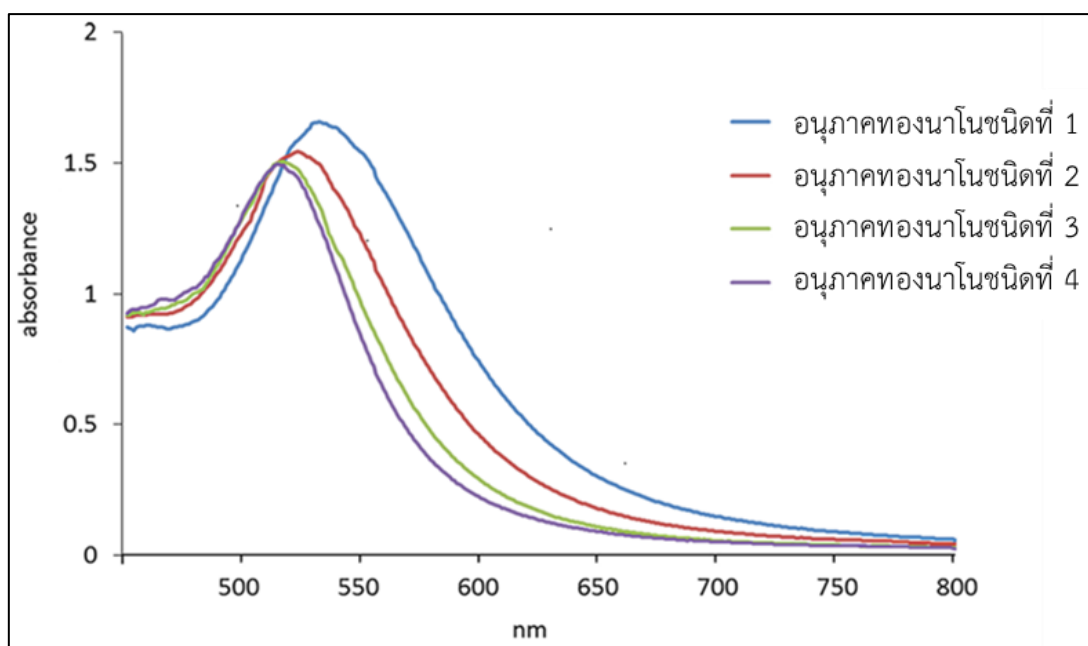


ภาพที่ 37 แสดงขนาด (ภาพ A) และค่าศักย์ประจุที่ผิว (ภาพ B) ของอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 4 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer

ตารางที่ 10 ตารางสรุปขนาดและค่าศักย์ประจุที่ผิวโดยเฉลี่ยของอนุภาคทองนาโนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer

อนุภาคทองนาโน	ขนาด (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ประจุที่ผิว (มิลลิโวลต์)
ชนิดที่ 1	27.82	-39.8
ชนิดที่ 2	29.85	-33.8
ชนิดที่ 3	22.03	-42.5
ชนิดที่ 4	18.89	-41.3

1.4 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องวิสิเบิล-สเปกโตรสโคป (UV-visible spectroscopy) ที่ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร พบอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 523 นาโนเมตร อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 3 ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 4 ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร สรุปได้ดังนี้ อนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้มีคุณสมบัติเป็นอนุภาคนาโนที่จะดูดกลืนแสงสูงสุดช่วง 520-530 นาโนเมตร และอนุภาคทองนาโนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะดูดกลืนแสงไปทางช่วงความยาวคลื่น 800 นาโนเมตร ดังภาพที่ 39



ภาพที่ 38 ภาพแสดงการดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเล็ตของอนุภาคทองคำโนแต่ละชนิดเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิสิเบิล-สเปกโตรสโคป

สรุปการสังเคราะห์อนุภาคทองคำโนด้วยไซเดียมซีเตรทผลการพิจารณาขนาดของอนุภาคทองคำโนยึดผลจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านและโปรแกรม ImageJ เป็นหลักสรุปขนาดของอนุภาคทองคำโนชนิดที่ 1 มีขนาด 50 นาโนเมตร, อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 2 มีขนาด 30 นาโนเมตร, อนุภาคทองคำโนชนิดที่ 3 มีขนาด 20 นาโนเมตร และอนุภาคทองคำโนชนิดที่ 4 มีขนาด 10 นาโนเมตร อนุภาคทองคำโนที่สังเคราะห์ได้มีความเสถียรและคงตัวแยกเป็นอนุภาคเดี่ยวสูง

2. ผลการทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลกับ RT gene ของเชื้อ HIV-1 (Target sequence)

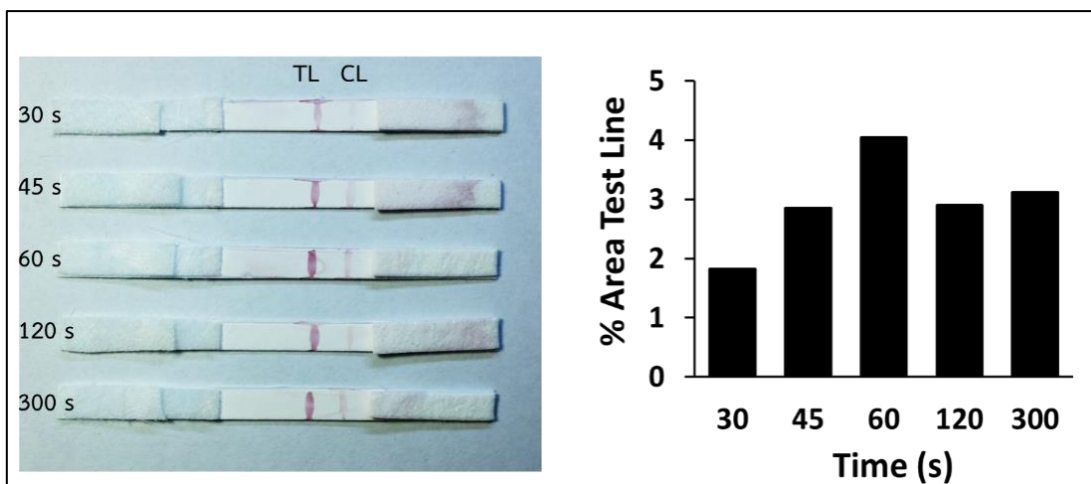
การทดสอบจะพิจารณาความเข้มของเส้นทดสอบ (test Line, TL) เพียงเส้นเดียวและไม่เปรียบเทียบกับความเข้มของเส้นควบคุม (control Line, CL) โดยชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลจะต้องมีแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมเพื่อระบุว่าชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลมีประสิทธิภาพดี ในการทดลองนี้ใช้

อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 2 ขนาดประมาณ 20 นาโนเมตร ตรึงกับ thiol conjugate probe ทดสอบกับ target sequence ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และศึกษาปัจจัยดังนี้

- 1) ชนิดของ capture probe และ control probe (biotin probe/ non-biotin probe)
- 2) การตรึงสารพันธะกรรมบนแผ่นเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV crosslink) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร, 302 นาโนเมตร และ 365 นาโนเมตร
- 3) ระยะเวลาที่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตนาน 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที

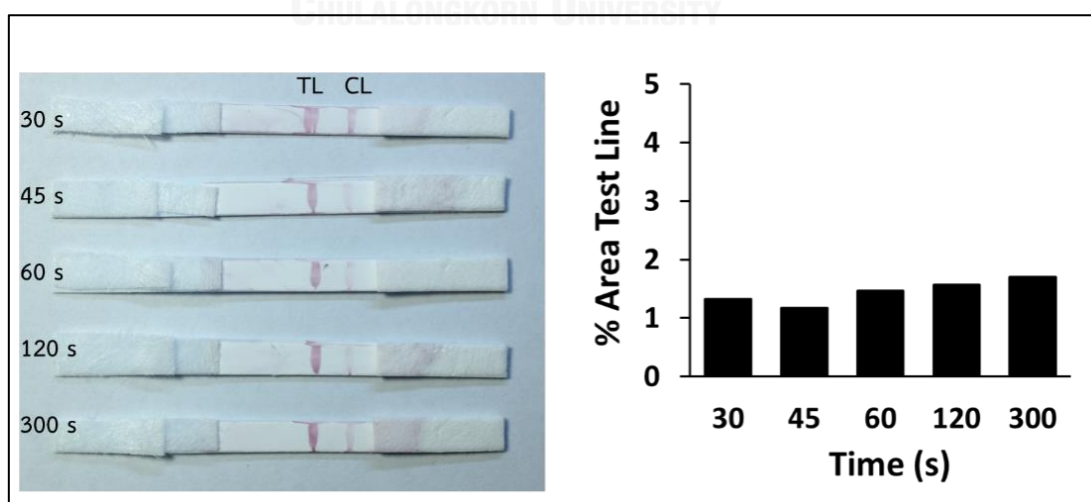
การพิจารณาความเข้มของเส้นทดสอบได้จากการวัดสีของเส้นทดสอบด้วยโปรแกรม ImageJ และประมวลผลคิดสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟเป็นร้อยละ ถ้าแถบสีของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโฟลมีพื้นที่ใต้กราฟสูงแสดงว่ามีความเข้มของเส้นทดสอบสูง

2.1 ผลการทดลองของ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะเวลา 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที พบความเข้มของเส้นทดสอบ (TL) สูงสุดที่เวลา 60 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 4.05 รองลงมาที่เวลา 300 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 3.13, ที่ 120 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 2.90, ที่ 45 พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 2.86 และให้ความเข้มน้อยที่สุดที่เวลา 30 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.83 ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดของ biotin probe ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คือ 60 วินาที ดังภาพที่ 39



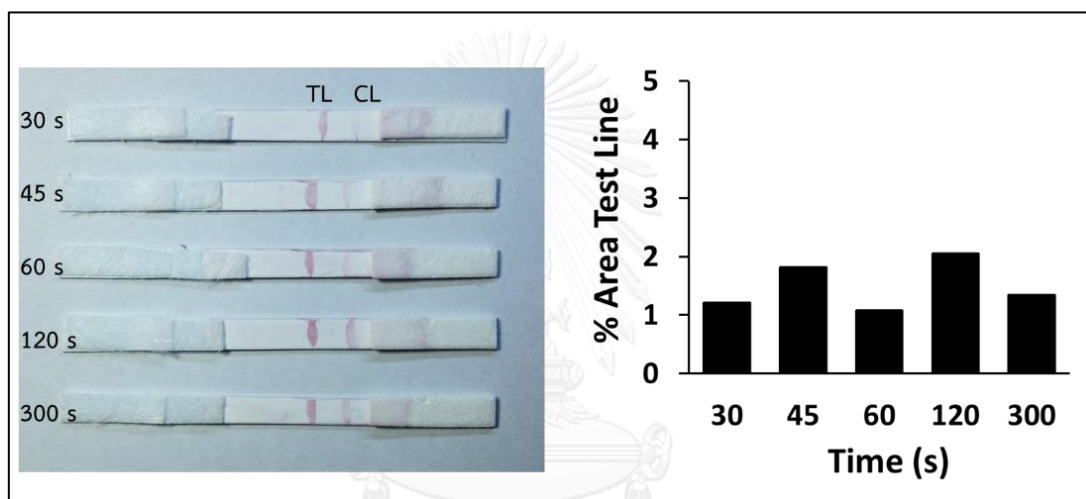
ภาพที่ 39 Biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

2.2 ผลการทดลองของ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ระยะเวลา 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที พบความเข้มของเส้นทดสอบ (TL) สูงสุดที่เวลา 300 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.71 รองลงมาที่เวลา 120 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.57, ที่ 60 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.47, ที่ 30 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.32 และให้ความเข้มน้อยที่สุดที่เวลา 45 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.17 ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดของ biotin probe ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร คือ 300 วินาที ดังภาพที่ 40



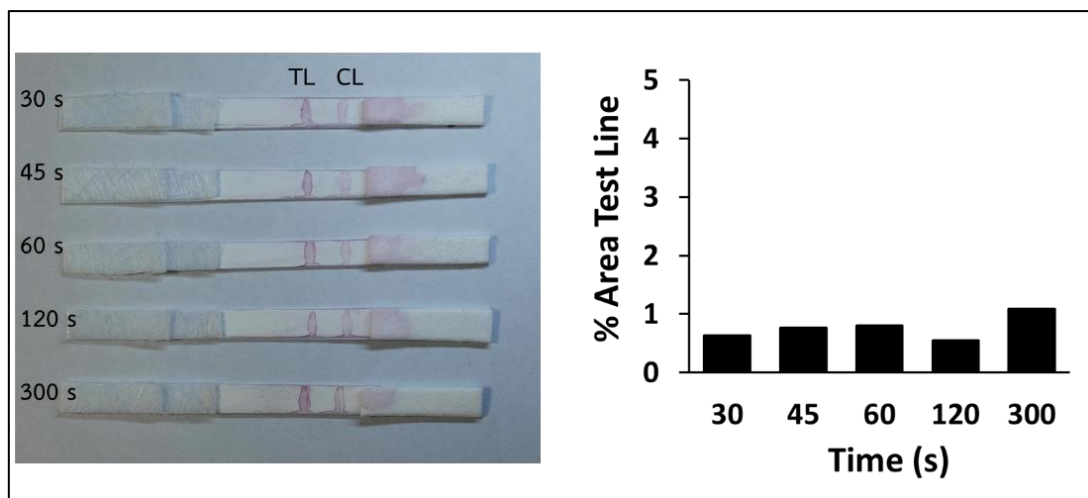
ภาพที่ 40 Biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร

2.3 ผลการทดลองของ biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ระยะเวลา 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที พบความเข้มของเส้นทดสอบ (TL) สูงสุดที่เวลา 120 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 2.05 รองลงมาที่เวลา 45 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.82, ที่ 300 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.34, ที่ 30 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.21 และให้ความเข้มน้อยที่สุดที่เวลา 60 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.08 ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดของ biotin probe ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร คือ 120 วินาที ดังภาพที่ 41



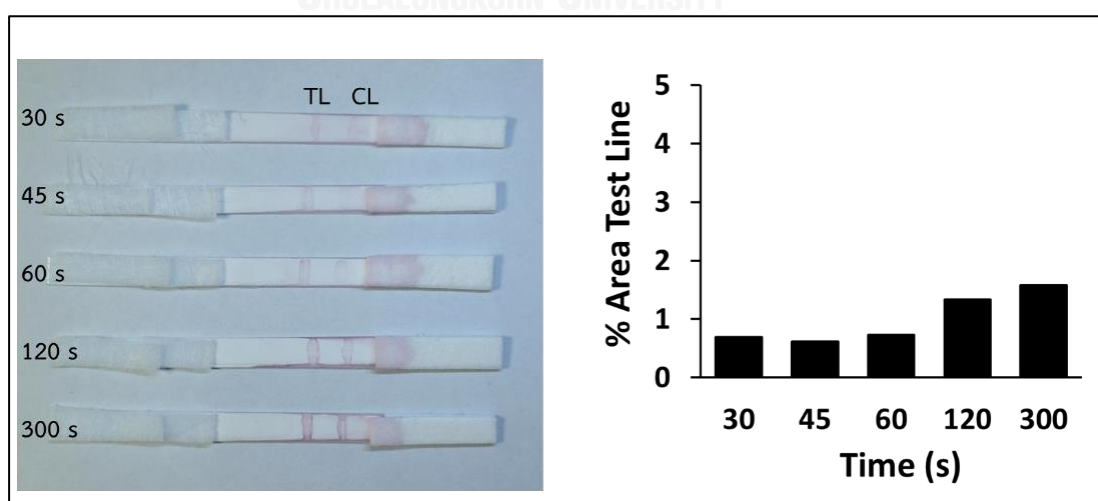
ภาพที่ 41 Biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.4 ผลการทดลองของ non-biotin probe (capture probe 2 และ control probe 2) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะเวลา 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที พบความเข้มของเส้นทดสอบ (TL) สูงสุดที่เวลา 300 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.09 รองลงมาที่เวลา 60 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.80, ที่ 45 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.77, ที่ 30 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.63 และให้ความเข้มน้อยที่สุดที่เวลา 120 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.55 ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดของ non-biotin probe ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คือ 300 วินาที ดังภาพที่ 42



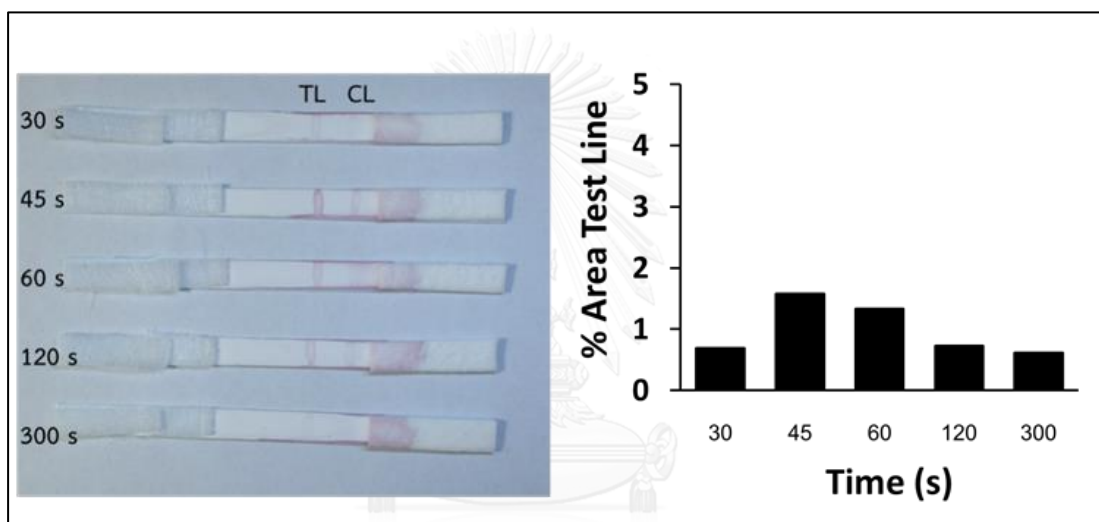
ภาพที่ 42 Non-biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

2.5 ผลการทดลองของ non-biotin probe (capture probe 2 และ control probe 2) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ระยะเวลา 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที พบความเข้มของเส้นทดสอบ (TL) สูงสุดที่เวลา 300 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.58 รองลงมาที่เวลา 120 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.33, ที่ 60 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.73, ที่ 30 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.69 และให้ความเข้มน้อยที่สุดที่เวลา 45 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.61 ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดของ non-biotin probe ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร คือ 300 วินาที ดังภาพที่ 43



ภาพที่ 43 Non-biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร

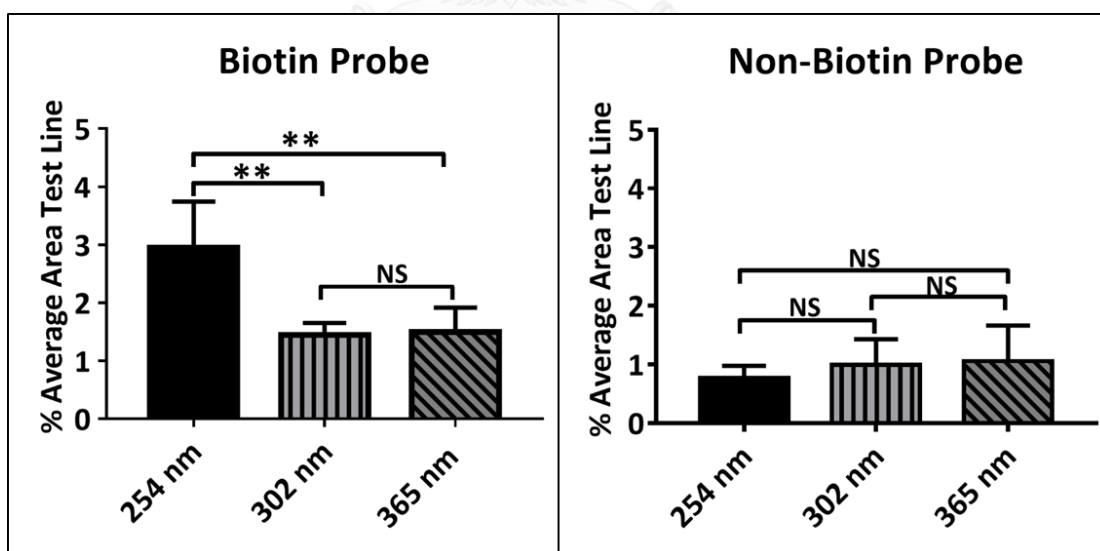
2.6 ผลการทดลองของ non-biotin probe (capture probe 2 และ control probe 2) ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ระยะเวลา 30, 45, 60, 120 และ 300 วินาที พบความเข้มของเส้นทดสอบ (TL) สูงสุดที่เวลา 45 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.78 รองลงมาที่เวลา 60 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.60, ที่ 120 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.91, ที่ 30 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.85 และให้ความเข้มน้อยที่สุดที่เวลา 300 วินาที พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 0.69 ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดของ non-biotin probe ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร คือ 45 วินาที ดังภาพที่ 44



ภาพที่ 44 Non-biotin probe และ UV crosslink ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.7 ผลการเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบในกลุ่ม biotin probe กับกลุ่ม non-biotin probe ที่ความยาวคลื่นต่างๆ โดยใช้สถิติ one way ANOVA โดยพิจารณาจากค่า p -value หากค่า p -value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่ากลุ่ม biotin probe ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงกว่ากลุ่ม non-biotin probe ทั้ง 3 ความยาวคลื่น เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่ม biotin probe ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรให้ผลเฉลี่ยความเข้มสูงที่สุดและสูงกว่าที่ความยาวคลื่น 302 และ 365 นาโนเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.001) ผลการเปรียบเทียบระหว่างความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กับ 302 นาโนเมตร พบว่าแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.0022) ผลการเปรียบเทียบระหว่างความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กับ 365 นาโนเมตร พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.0029) และผลการเปรียบเทียบระหว่างความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร กับ 365 นาโนเมตร พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.9981) ผลการเปรียบเทียบในกลุ่ม non-biotin probe พบว่าที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ให้ผลเฉลี่ยความเข้มของเส้นทดสอบสูงที่สุดแต่ทั้ง 3 ความยาวคลื่น ความเข้มของเส้นทดสอบแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.5839) ผลการเปรียบเทียบความยาวคลื่นระหว่าง 254 นาโนเมตร กับ 302 นาโนเมตร พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.8327) ผลการเปรียบเทียบระหว่างความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กับ 365 นาโนเมตร พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.7015) และผลการเปรียบเทียบระหว่างความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร กับ 365 นาโนเมตร พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values = 0.9944) ดังภาพที่ 45

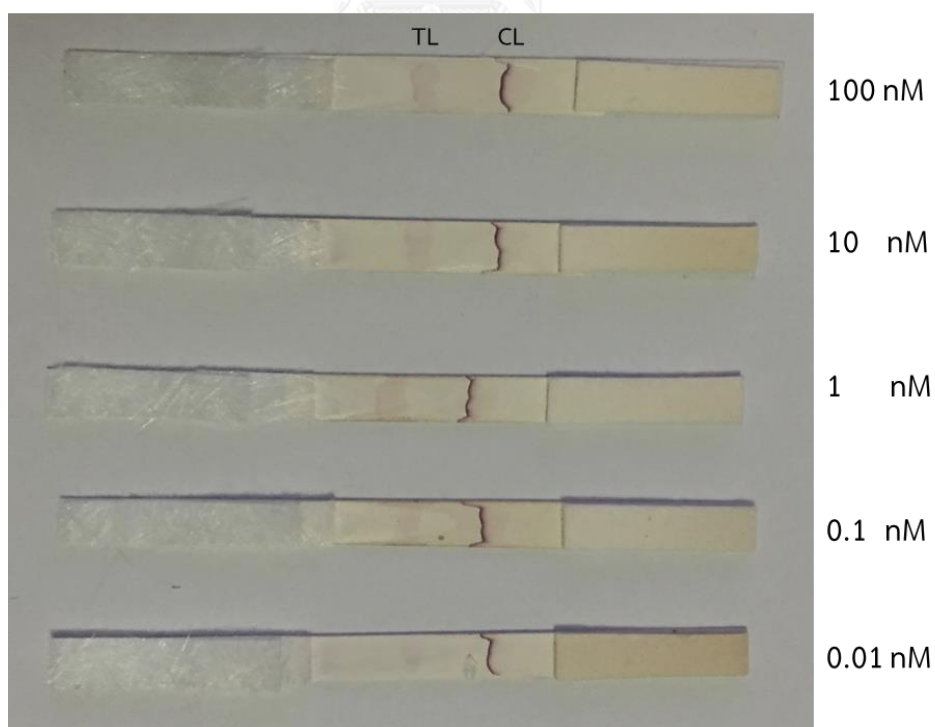


ภาพที่ 45 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มของเส้นทดสอบแต่ละความยาวคลื่นในกลุ่ม biotin probe และกลุ่ม non-biotin probe (** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ, NS แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ)

ดังนั้นสรุปปัจจัยที่ทำให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงสุด คือ อนุภาคทองคำนาโนตรึงกับ thiol conjugate probe, ใช้ biotin probe เตรียมเส้นทดสอบและเส้นควบคุมและการตรึงสารพันธุกรรมบนเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร นาน 60 วินาที

2.8 ผลการทดสอบความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดเลอเทอร์อัลโฟล

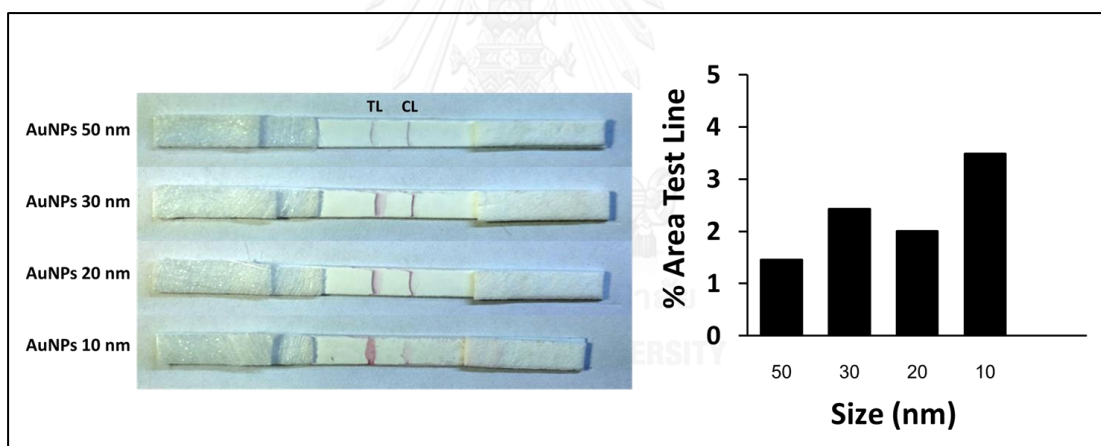
ชุดนิวคลีอิกแอซิดเลอเทอร์อัลโฟลเตรียมจากอนุภาคทองคำนาโนขนาด 20 นาโนเมตร ตรึงกับ thiol conjugate probe, capture probe 1, control probe 1 และผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร นาน 60 วินาที ทดสอบกับ target sequence ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 นาโนโมล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร พบเส้นทดสอบทุกความเข้มข้นโดยความเข้มของเส้นทดสอบมีความเข้มลดลงตามความเข้มข้นที่ทดสอบและพบเส้นควบคุมทุกชุด ดังนั้นชุดนิวคลีอิกแอซิดเลอเทอร์อัลโฟลมีความไว 0.01 นาโนโมล



ภาพที่ 46 ภาพแสดงความเข้มของเส้นทดสอบของชุดนิวคลีอิกแอซิดเลอเทอร์อัลโฟลเมื่อทดสอบกับ target sequence ที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 นาโนโมล

3. ผลการเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคทองคำโนต่อความเข้มของเส้นทดสอบ

การทดสอบใช้ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโพลที่เตรียมจากอนุภาคทองคำโนขนาด 50, 30, 20 และ 10 นาโนเมตร ตรึงกับ thiol conjugate probe, capture probe 1, control probe 1 UV crosslink ที่ 254 นาโนเมตร นาน 60 วินาที และ target sequence ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร พบว่าอนุภาคทองคำโนขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงที่สุดมีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 3.49 รองลงมาคือขนาด 30 นาโนเมตร พื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 2.43, ขนาด 20 นาโนเมตร มีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 2.01 และขนาด 50 นาโนเมตร มีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.453 ตามลำดับ ดังนั้นขนาดของอนุภาคทองคำโนที่เหมาะสมสำหรับเตรียมชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโพลคือขนาด 10 นาโนเมตร ดังภาพที่ 47

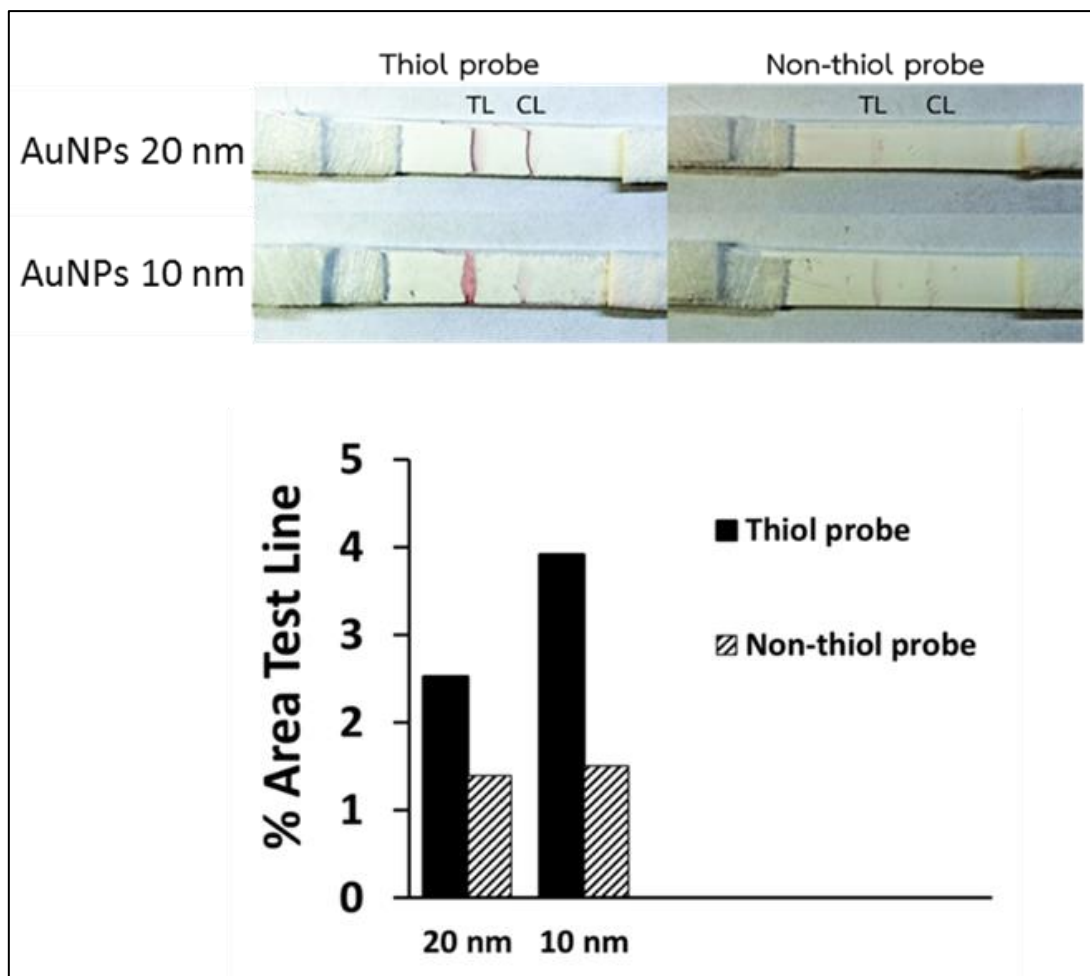


ภาพที่ 47 แสดงผลเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบเมื่อชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโพลเตรียมจากอนุภาคทองคำโนขนาดต่างๆ

4. ผลการเปรียบเทียบชนิดของ conjugate probe ที่ตรึงกับอนุภาคทองคำโนต่อความเข้มของเส้นทดสอบ

Conjugate probe สำหรับตรึงกับอนุภาคทองคำโนที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบ thiol conjugate probe (conjugate probe 1) กับ non-thiol conjugate probe (conjugate probe 2) ชุดนิวคลีอิกแอซิด

แลเทอรัลโฟลเตรียมด้วย biotin probe (capture probe 1 และ control probe 1) UV crosslink ที่ 254 นาโนเมตร นาน 60 วินาที อนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร และขนาด 20 นาโนเมตร ทดสอบกับ target sequence ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร พบว่า conjugate probe 1 ให้ความเข้มของเส้นทดสอบชัดกว่า conjugate probe 2 กับอนุภาคทองคำนาโน ทั้ง 2 ขนาด ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลที่ใช้ conjugate probe 1 ตรงกับอนุภาคทองคำนาโน ขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงกว่าขนาด 20 นาโนเมตร โดยอนุภาคทองคำนาโน ขนาด 10 นาโนเมตร มีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 3.91 และขนาด 20 นาโนเมตร มีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 2.519 ส่วนชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลที่ใช้ conjugate probe 2 ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงกว่าขนาด 20 นาโนเมตร โดยอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร มีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.50 และขนาด 20 นาโนเมตร มีพื้นที่ใต้กราฟร้อยละ 1.39 ดังนั้น การใช้ thiol conjugate probe ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มของเส้น ทดสอบสูงสุด ดังภาพที่ 48



ภาพที่ 48 ผลการเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลเตรียมด้วยอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วย thiol conjugate probe กับอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วย non-thiol conjugate probe

5. ผลการทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลกับสิ่งส่งตรวจ

จากผลการทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มของเส้นทดสอบข้างต้นนำมาประกอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลและทดสอบกับสิ่งส่งตรวจ ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลประกอบด้วยอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ตรึงกับ thiol conjugate probe, biotin probe เตรียมเส้นทดสอบและเส้นควบคุม และใช้ UV crosslink ที่ 254 นาโนเมตร 60 วินาที ทดสอบกับซีดีเอ็นเอ ผลการทดสอบกับชุดตรวจนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลครั้งที่ 1 ใช้น้ำ Milli Q เป็นตัวควบคุมลบไม่พบแถบ

สีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ ผลการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร สิ่งส่งตรวจ
 หมายเลข 5803032, 5803034, 5803084, 5803086 และ 5803087 ที่มีปริมาณ HIV viral load
 น้อยกว่า 20 copies/mL ไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ ผลการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจหมายเลข
 5803077, 5803088 และ 5803089 ที่มีค่า HIV viral load มากกว่า 20 copies/mL ไม่พบแถบสีที่
 ตำแหน่งเส้นทดสอบและทุกชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมขึ้นทุกชุด ดัง
 ภาพที่ 49

สิ่งส่งตรวจ หมายเลข	HIV viral load (copies/mL)
Milli Q	
5803032	< 20
5803034	< 20
5803084	< 20
5803086	< 20
5803087	< 20
5803077	100
5803088	9,270
5803089	20,300

ภาพที่ 49 ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลที่ทดสอบกับสิ่งส่งตรวจครั้งที่ 1

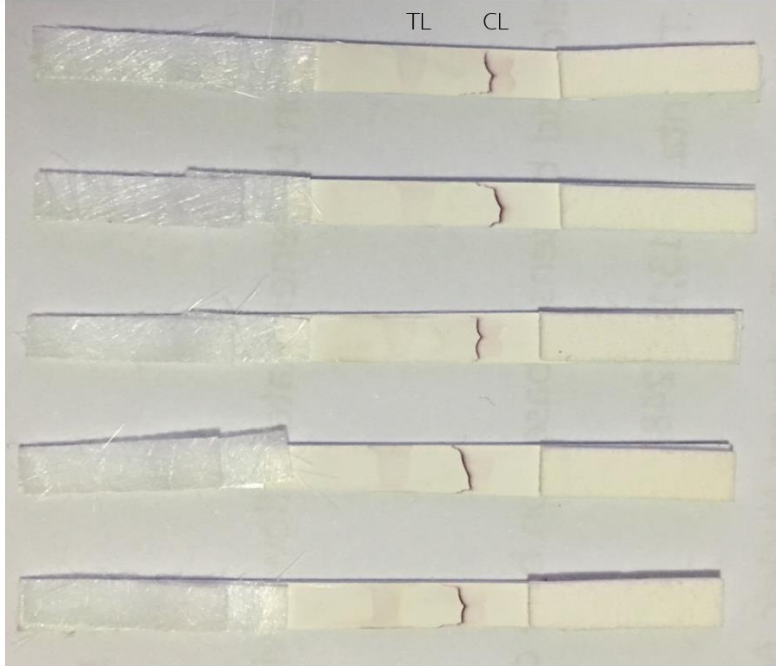
ผลการทดสอบครั้งที่ 2 ใช้น้ำ Milli Q เป็นตัวควบคุมลบไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ ผลการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร สิ่งส่งตรวจหมายเลข 5803224, 5803025, 5803153, 5803156 และ 5803049 ที่มีปริมาณ HIV viral load ต่ำกว่า 100,000 copies/mL ไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ ผลการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจหมายเลข 5803210, 5803185 และ 5803235 ที่มีค่า HIV viral load มากกว่า 100,000 copies/mL ไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและทุกชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลพบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมขึ้นทุกชุด ดังภาพที่ 50



สิ่งส่งตรวจ หมายเลข	HIV viral load (copies/mL)
Milli Q	
5803224	5,600
5803025	15,300
5803153	59,600
5803156	71,000
5803049	82,400
5803210	110,000
5803185	237,000
5803235	237,000

ภาพที่ 50 ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลที่ทดสอบกับสิ่งส่งตรวจครั้งที่ 2

ผลการทดสอบครั้งที่ 3 การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยเพิ่มสัดส่วนของน้ำยา RT-PCR master mix และอาร์เอ็นเอที่สกัดเป็นสองเท่าในขั้นตอนการทำ RT-PCR ผลการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจหมายเลข 5803088, 5803025, 5803089, 5803185 และ 5803235 ที่มีค่า HIV viral load มากกว่า 20 copies/mL พบแถบสีแดงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและพบว่าความเข้มของเส้นทดสอบไม่ขึ้นกับปริมาณ HIV viral load และทุกชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีมีแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมขึ้นทุกชุดดังภาพที่ 51 ดังนั้นการนำซีดีเอ็นเอมาทดสอบกับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีควรใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร



สิ่งส่งตรวจ หมายเลข	HIV viral load (copies/mL)
5803088	9,270
5803025	15,300
5803089	20,300
5803185	237,000
5803235	237,000

ภาพที่ 51 ชุดตรวจนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีที่ทดสอบกับสิ่งส่งตรวจครั้งที่ 3

บทที่ 5

อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ และสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

ในการทดลองนี้พบว่าปริมาณโซเดียมซิเตรทมีผลต่อขนาดของอนุภาคทองนาโนโดยใช้ 1% โซเดียมซิเตรทความเข้มข้นคงที่ โซเดียมซิเตรทถูกใช้เป็นตัวรีดิวซ์และเป็นสารช่วยให้เสถียร การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์กับโซเดียมซิเตรทแทนพบว่าเมื่ออัตราส่วนของโซเดียมซิเตรทเพิ่มขึ้นอนุภาคทองนาโนมีขนาดลดลง เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านพบอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 ที่มีอัตราส่วนของโซเดียมซิเตรทลดลงเมื่อสังเคราะห์ได้อนุภาคทองนาโนที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 50 นาโนเมตร แต่อนุภาคทองนาโนชนิดที่ 2 ชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 ที่มีอัตราส่วนของโซเดียมซิเตรทสูงขึ้นได้อนุภาคทองนาโนขนาดเล็กลงตามลำดับ การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยเทคนิคของ Turkevich J และคณะ (42) สามารถปรับสัดส่วนระหว่างความเข้มข้นและปริมาณของสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์กับโซเดียมซิเตรททำให้ได้อนุภาคทองนาโนหลายขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xiaohui Ji และคณะ ที่พบว่าขนาดอนุภาคทองนาโนมีขนาดลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมซิเตรท เนื่องจากเกิดปฏิกิริยารีดักชันเกิดได้เร็วและสมบูรณ์แต่เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมซิเตรทลดลงอัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันลดลงและเกิดซ้ำทำให้อะตอมทองรวมตัวกันอนุภาคทองนาโนที่ได้จึงมีขนาดใหญ่ (45) รูปร่างและการกระจายตัวของอนุภาคทองนาโนเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่านพบว่าอนุภาคทองนาโนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มีรูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงกลมพบทรงรีเล็กน้อยและพบการเกาะกลุ่มบางส่วน ส่วนอนุภาคทอง นาโนชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 มีรูปร่างเป็นทรงกลมมีการกระจายตัวได้ดีสอดคล้องกับสีของอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้ เมื่อ

พิจารณาขนาดของอนุภาคทองคำนาโนจากเครื่อง Zetasizer พบว่าอนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 1 มีขนาดใกล้เคียงกับชนิดที่ 2 อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 3 มีขนาดเฉลี่ยใกล้เคียงกับชนิดที่ 4 โดยขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่วัดจาก 2 วิธีได้ขนาดไม่เท่ากัน เนื่องจากการวัดขนาดด้วยเครื่อง Zetasizer ใช้หลักการการกระเจิงของแสงโดยอนุภาคเมื่ออยู่ในสารละลายจะเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน (Brownian movement) อนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้าเกิดการกระเจิงของแสงน้อยอนุภาคที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่เร็วเกิดการกระเจิงของแสงมาก นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer ต้องเตรียมสารละลายให้เจือจางอย่างเหมาะสม และอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ต้องสะอาดเพื่อป้องกันการรบกวนการกระเจิงแสงด้วยฝุ่นหรือสิ่งสกปรก ดังนั้นการพิจารณาขนาดของอนุภาคทองคำนาโนจะยึดค่าจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน และเมื่อพิจารณาจากค่าศักย์ประจุผิวจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer แล้วพบว่าอนุภาคทองคำนาโนมีความคงตัวและไม่เกาะกลุ่ม อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดใหญ่อยู่ในรูปสารละลายจะเห็นสารละลายเป็นสีม่วงแต่ถ้าอนุภาคทองคำนาโนมีขนาดเล็กจะเห็นสารละลายเป็นสีแดง (76) อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดเล็กประมาณ 10 นาโนเมตร ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นสั้นกว่าอนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดใหญ่เมื่อดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสั้นประมาณ 520 นาโนเมตร จะสะท้อนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร จึงเห็นอนุภาคทองคำนาโนเป็นสีแดงเช่นเดียวกับอนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 4 ที่มีขนาดเล็กสุดดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ได้เป็นสารละลายสีแดงแต่อนุภาคทองคำนาโนชนิดที่ 1 มีขนาดใหญ่ที่สุดแสงตกกระทบไม่สม่ำเสมอทั้งอนุภาคและมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น (ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร) ทำให้เห็นสารละลายสีม่วงน้ำเงินแทนสีแดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Link S. และคณะ อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดเล็กดูดกลืนความยาวแสงช่วงคลื่นสั้นประมาณ 500 นาโนเมตร (แสงสีเขียว) ทำให้เห็นอนุภาคทองคำนาโนเป็นสีแดงเข้มแต่เมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นจะดูดกลืนความยาวแสงช่วงความยาวคลื่นที่ยาวขึ้นจึงเห็นเป็นสีม่วงน้ำเงินตามขนาดอนุภาคที่เพิ่มขึ้น (77)

ชุดตรวจนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีถูกพัฒนาโดย Mao X และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 ใช้ อนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจหานิวคลีอิกแอซิดโดยพัฒนาให้มีความไว เพิ่มขึ้นด้วยการใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) กับอนุภาคทองคำนาโนที่ตรึงด้วยโอลิโก นิวคลีโอไทด์แล้ว งานวิจัยนำชุดตรวจนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีทดสอบกับ human genomic DNA ความยาว 60 เบส ทำการทดสอบและอ่านผลภายใน 20 นาที มีความไวที่ 2.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรหรือ 1.25 พิโตโมลลาร์ (3) ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีนิยมเตรียมจากไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนและ streptavidin-biotin probe สำหรับเส้นทดสอบและเส้นควบคุมเพราะให้แถบสีที่ ตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุมชัดเจนและอ่านผลง่าย แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนมีราคาถูก มีความสามารถในการจับกับโปรตีนหรือสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ได้สูง สามารถจับกับสารที่นำมาทำเป็น capture probe ที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและ control probe ที่ตำแหน่งเส้นควบคุมได้ดี Pongsuchart M และคณะ ได้วิจัยเพิ่มความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีโดยใช้ biotin probe คู่กับการใช้ UV crosslink ที่ความเข้มแสง 50 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร นาน 120 วินาที ในขั้นตอนการตรึง capture probe และ control probe พบว่าการใช้ UV crosslink ทำให้ความ เข้มของเส้นทดสอบเพิ่มขึ้นร้อยละ 40 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลีที่ใช้ biotin probe เพียงอย่างเดียว (4) ถึงแม้ biotin probe จะช่วยตรึงโอลิโกนิวคลีโอไทด์กับไนโตร เซลลูโลสเมมเบรนได้ดีแต่ก็จับกันด้วยพันธะ non-covalent ซึ่งเป็นพันธะที่มีความเสถียรน้อยแต่ทำ ให้ปลายสายนิวคลีโอไทด์อีกด้านหนึ่งพร้อมจับกับสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สม ได้ดีกว่า non-biotin probe การใช้ biotin probe ต้องสังเคราะห์จากต่างประเทศ ใช้ระยะเวลา สังเคราะห์นาน มีราคาสูง และก่อนนำมาหยดลงไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนต้องใช้เวลาเตรียมนาน ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้ biotin ทำปฏิกิริยากับ streptavidin และต้องใช้ Amicon centrifuge filter เพื่อกำจัด streptavidin ส่วนเกินและจากจุดด้อยของการใช้ biotin probe จึงทำให้

Pongsuchart M และคณะ ศึกษาการใช้ biotin probe ที่เป็นเทคนิคส่วนใหญ่ที่นิยมใช้เปรียบเทียบกับการใช้ non-biotin probe คู่กับการใช้ UV crosslink ความเข้มแสงที่ 125 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร งานวิจัยมีการเลือกระยะเวลาที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตระยะเวลา 30, 60, 120 และ 300 วินาที พบว่าที่เวลา 120 วินาที ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงสุดและเมื่อเวลา 300 วินาที ความเข้มของเส้นทดสอบไม่เพิ่มขึ้นจึงเลือกระยะเวลา 120 วินาที มาใช้พบว่าความเข้มของเส้นทดสอบจากเทคนิคการใช้ non-biotin probe คู่กับการใช้ UV crosslink สูงกว่าเทคนิคที่ใช้ biotin probe แต่ผลความเข้มของทั้ง 2 เทคนิค มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (paired t-test, p -value > 0.05)

(73) ผลการทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพลที่เตรียมจาก biotin probe เปรียบเทียบกับ non-biotin probe และ UV crosslink ที่ 3 ความยาวคลื่น (254, 302 และ 365 นาโนเมตร) เมื่อทดสอบสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายพบว่า biotin probe ให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงสุดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 60 วินาที และผลการทดสอบในกลุ่ม non-biotin probe ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร 45 วินาที เมื่อเปรียบเทียบความเข้มเฉลี่ยของเส้นทดสอบระหว่างกลุ่ม biotin probe กับกลุ่ม non-biotin probe พบว่าชุดทดสอบที่เตรียมจาก biotin probe ให้ความเข้มสูงกว่าชุดทดสอบที่เตรียมจาก non-biotin probe 1.57 เท่า ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการใช้ biotin probe คู่กับการใช้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่นสั้น 254 นาโนเมตร เหมาะสมกับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพล นอกจากงานวิจัยที่กล่าวมายังพบการนำ UV crosslink มาใช้ก่อนถูกนำมาใช้กับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์รัลโพล ได้แก่ งานวิจัยของ Mansfield MA และคณะที่ใช้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ในขั้นตอนทำ nucleic blotting หลังจากทำ alkaline transfer พบว่าสามารถเพิ่มความไวถึง 4.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้แสงอัลตราไวโอเลต (78)

นอกจากนี้ในการทำเซาเทิร์นบลอตไฮบริดเซชัน (Southern Blot Hybridization) เทคนิค UV crosslink ถูกแนะนำให้ใช้ในขั้นตอน DNA immobilize หลังการย้ายดีเอ็นเอที่อยู่ใน agarose gel

ให้ไปอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (79) กลไกการเกิด UV crosslink ระหว่าง capture probe หรือ control probe กับไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนคือเบสไทมีน (thymine) หรือยูราซิล (uracil) เมื่อถูกแสงอัลตราไวโอเล็ตจะสร้างพันธะโควาเลนต์กับกลุ่มเอมีน (amine) ที่ผิวไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (73)

จากการทดลองนี้พบว่าขนาดของอนุภาคทองคำนาโนมีผลต่อความเข้มของเส้นทดสอบโดยอนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดเล็ก 10 นาโนเมตร เส้นทดสอบมีความเข้มสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบจากอนุภาคทองคำนาโนขนาดอื่นๆ (ขนาด 50, 30 และ 20 นาโนเมตร) เนื่องจากอนุภาคทองระดับนาโนขนาดเล็กมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากกว่าอนุภาคทองคำนาโนขนาดใหญ่จึงตรึง thiol probe ได้มากกว่าและจับกับโอลลิโกนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีเบสคู่สมได้มากกว่า ทำให้มีความเข้มของเส้นทดสอบสูงกว่า จากงานวิจัยอื่นๆ พบว่าขนาดของอนุภาคทองคำนาโนมีผลต่อความไวของชุดตรวจแลเทอรัลโฟล ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Safenkova I และคณะ พบว่าเมื่อขนาดอนุภาคทองคำนาโนเพิ่มขึ้นจากขนาด 6.4 นาโนเมตร ถึงขนาด 33.4 นาโนเมตร ในชุดตรวจอิมมูโนโครมาโตกราฟีแบบแซนวิชใช้ตรวจหา potato virus X ที่พบในใบพืชพบว่าชุดตรวจมีความไวลดลงจาก 3 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร เป็น 80 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร (80) งานวิจัยของ Mao X และคณะ ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลที่ใช้อนุภาคทองคำนาโนขนาด 15, 50, 100 และ 200 นาโนเมตร พบว่าอนุภาคทองคำนาโนขนาด 15 นาโนเมตร ให้ความเข้มสูงสุดรองลงมาคือขนาด 50, 100 และ 200 นาโนเมตร ตามลำดับ (3)

การใช้ Thiol conjugate probe ตรึงกับผิวอนุภาคทองคำนาโนเป็นเทคนิคมาตรฐานแต่ thiol probe มีราคาแพงจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มของเส้นทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโฟลระหว่างการใช้ thiol conjugate probe กับ non-thiol conjugate probe ตรึงบนผิวอนุภาคทองคำนาโนขนาด 20 นาโนเมตรและขนาด 10 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่าชุดทดสอบที่

เตรียมจาก thiol conjugate probe ให้ความเข้มข้นของเส้นทดสอบสูงกว่าชุดทดสอบที่เตรียมจาก non-thiol conjugate probe ทั้ง 2 ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนและอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ที่ตรงกับ thiol conjugate probe ให้ความเข้มข้นของเส้นทดสอบสูงกว่าขนาด 20 นาโนเมตร สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่เปรียบเทียบความเข้มข้นของเส้นทดสอบเมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโนขนาดต่างๆ ส่วน non-thiol conjugate probe ที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร และขนาด 20 นาโนเมตร พบว่า non-thiol conjugate probe ที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร ให้ความเข้มข้นของเส้นทดสอบสูงกว่าขนาด 20 นาโนเมตร ดังนั้นการใช้ thiol conjugate probe ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนขนาด 10 นาโนเมตร เหมาะสำหรับเตรียมชุดนิวคลีอิก แอซิดแลเทอรัลโพลเนื่องจากหมู่ thiol หรือ disulfide group ที่ตรงกับผิวของอนุภาคทองคำนาโนเป็น พันธะโควาเลนต์ยึดระหว่างผิวอนุภาคทองคำนาโนกับสายโพลิเมอร์นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียม thiol conjugate probe ก่อนตรงกับอนุภาคทองคำนาโนใช้ dithiothreitol (DTT) เพื่อให้ thiol conjugate probe อยู่ในรูป free thiol คู่กับการใช้ gel filtration เพื่อกำจัด DTT ส่วนเกิน จากงานวิจัยของ Udomthongsuk N และคณะ ศึกษาภาวะที่มีผลต่อความเสถียรของ thiol conjugate probe ที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนโดยศึกษาเทคนิคการใช้ DL-dithiothreitol (DTT) คู่กับการใช้ NAP-5 gel filtration เปรียบเทียบกับเทคนิค tris (2-carboxy ethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) ในขั้นตอนเตรียมหมู่ thiol จาก dimer formation ให้อยู่ในรูป free thiol พบว่าการใช้ DTT คู่กับการใช้ NAP-5 gel filtration ลดการสูญเสีย thiol conjugate probe ได้ ดีกว่าการใช้ TCEP เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาเตรียม thiol conjugate probe ในชุดนิวคลีอิกแอซิด แลเทอรัลโพลและตรวจหาสายนิวคลีโอไทด์เป้าหมายพบว่าชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลมีความไว 1.25 เฟมโตโมลาร์ (81)

ผลการทดสอบชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลกับซีดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมาที่ทราบค่า HIV viral load และนำมาสกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอด้วย RT-PCR ขนาดของซีดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 2,980 เบส การทดสอบใช้สิ่งส่งตรวจทั้งหมด 16 ตัวอย่าง สิ่งส่งตรวจที่มีค่า HIV viral load น้อยกว่า 20 copies/mL จำนวน 5 ตัวอย่าง สิ่งส่งตรวจที่มีค่า HIV viral load มากกว่า 20 copies/mL จำนวน 11 ตัวอย่างพบว่าปริมาณซีดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบมีผลต่อการทดสอบโดยการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไม่พบแถบสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบทั้งในสิ่งส่งตรวจที่มีค่า HIV viral load น้อยกว่า 20 copies/mL และมากกว่า 20 copies/mL แต่การทดสอบครั้งที่ 3 ทำการทดสอบในสิ่งส่งตรวจที่มีค่า HIV viral load มากกว่า 20 copies/mL และเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอเป็นปริมาตร 50 ไมโครลิตร พบแถบสีแดงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบแต่จางมากจนอ่านผลด้วยตาเปล่าได้ยากทุกชุด โดยความเข้มของเส้นทดสอบไม่ขึ้นกับปริมาณ HIV viral load และทุกชุดทดสอบเกิดแถบสีที่ตำแหน่งเส้นควบคุมแสดงว่าชุดตรวจนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลทำงานได้ปกติ จากการทดลองนำชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลทดสอบกับสิ่งส่งตรวจโดยไม่ผ่านการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมีผลทำให้ความไวของชุดตรวจลดลงสังเกตได้จากเส้นทดสอบเกิดแถบสีแดงจางอ่านผลด้วยตาเปล่ายากและปริมาณซีดีเอ็นเอพบว่าการใช้ซีดีเอ็นเอปริมาณสูงจะเพิ่มความไวได้มากกว่าการใช้ซีดีเอ็นเอปริมาณน้อย การที่มีความไวลดลงอาจมีสาเหตุจากขนาดของซีดีเอ็นเอที่มีความยาว 2,980 เบส อาจเกิดการซ้อนทับกันทำให้ส่วนของ probe ที่ออกแบบเกิดไฮบริดเซชันระหว่างเบสคู่สมได้ไม่ดีไม่ได้และขั้นตอนการตรึง thiol conjugate probe ที่ใช้ความเข้มข้นสูงเกินพอโดยใช้ 5 OD ต่ออนุภาคทองคำนาโน 1 มิลลิลิตร จากงานวิจัยของ Mao X และคณะ พบว่าปริมาณซีดีเอ็นเอที่ตรงกับอนุภาคทองคำนาโนที่ให้ผลดีที่สุด คือ ความเข้มข้นที่ 1 OD ต่อมิลลิลิตร และไม่มีขั้นตอนการปั่นล้างเพื่อกำจัด thiol conjugate probe ส่วนเกินก่อนเติม eluent buffer อาจมี probe ส่วนเกินเหลือออกเมื่อทดสอบกับซีดีเอ็นเอ probe ส่วนเกินอาจจับกับ

ซิติเอ็นเอแทน probe ที่ตรงกับอนุภาคของนาโนทำให้ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลมีความไวลดลง หรือเกิดผลบลอไม่ได้ ดังนั้นจึงควรมีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อนนำมาทดสอบกับชุด นิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ใช้อุณหภูมิเดียวทำ ปฏิกริยา ตัวอย่างได้แก่ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), rolling circle amplification (RCA), Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) หรือ Helicase Dependent Isothermal Amplification (HDA) หรือใช้ชุดน้ำยาที่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซิติเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในขั้นตอนเดียวเพื่อลดระยะเวลาทำการทดสอบลง การทดสอบนี้ยังใช้ จำนวนสิ่งส่งตรวจมาทดสอบกับชุดตรวจน้อยเกินไปจึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณ HIV viral load หลากหลายและพิจารณาผลความเข้มของเส้นทดสอบที่มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดระดับ ต่างๆ

นอกจากปัจจัยที่ศึกษาแล้วยังมีปัจจัยเพิ่มเติมที่มีผลต่อความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแล เทอร์อัลโฟล ได้แก่ ความเข้มข้นของ running buffer ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 4X SSC buffer (เปรียบเทียบ ความเข้มข้นระหว่าง 4X, 5X, 10X และ 20X) ชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ใช้ระหว่างรู้น HF18004 กับรู้น HF24004 และความเร็วในการไหลของ running buffer ตลอดจนความยาวของ ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนยาว 4 เซนติเมตร คือ 3 นาที และ 4 นาที ตามลำดับ เนื่องจากขนาดรู (pore size) ของเมมเบรนรู้น HF24004 มีขนาดเล็กกว่ารู้น HF18004 พบว่าไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน รู้น HF24004 มีอัตราการไหลช้ากว่าจึงให้ความเข้มของเส้นทดสอบสูงกว่ารู้น HF18004 อย่างมี นัยสำคัญ (3) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสชนิดเดียวคือ รู้น HF180MC10 ที่มีขนาดรู เท่ากับรู้น HF18004 และไม่ได้ทำการทดลองกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสรู้น HF24004 เนื่องจากบริษัท Merck Millipore ยกเลิกการผลิตรู้น HF24004 และความหนืดของสิ่งส่งตรวจมีผลต่ออัตราการไหล เช่นกัน ดังนั้นผลการทดลองที่ได้อาจมีผลต่อความเข้มของเส้นทดสอบทำให้ความเข้มลดลง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการหาปริมาณ thiol conjugate probe ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรึงอนุภาคทองคำนาโนแต่ละขนาด
2. ควรเพิ่มขั้นตอนการปั่นล้าง probe ส่วนเกินและตรวจสอบว่า probe ตรึงอนุภาคทองคำนาโนได้ดี หากไม่มีขั้นตอนการหาปริมาณ thiol conjugate probe ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรึงอนุภาคทองคำนาโน
3. ควรมีขั้นตอนเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อนนำมาทดสอบกับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพล
4. ความไวของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอรัลโพลด้วยการใช้เอนไซม์ HRP หรือเทคนิคอื่นๆ
5. เพิ่มปริมาณตัวอย่างที่นำมาทดสอบเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีปริมาณน้อยเกินไปอาจทำให้สรุปผลผิดได้และเลือกสิ่งส่งตรวจที่มีค่า HIV viral load หลากหลายเพื่อช่วยให้สรุปผลได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น



สรุปผลการทดลอง

ถึงแม้ชุดตรวจนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลจะถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้นในการตรวจหาดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม สามารถอ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ช่วย แต่ผลการทดสอบยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มของเส้นทดสอบของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลพบว่าการใช้อนุภาคทองคำนาโนขนาดเล็กประมาณ 10 นาโนเมตร ตรึงด้วย thiol conjugate probe เพราะหมู่ thiol จะยึดกับผิวของอนุภาคนาโนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์แบบหนึ่งที่ยึดแน่นและหันปลายของ conjugate probe ด้านที่ต้องการออก แผ่นเมมเบรนที่นำมาทดสอบควรมีรู (pore size) ขนาดเล็กทำให้ของเหลวไหลช้าช่วยเพิ่มความไวหรือความเข้มของเส้นทดสอบมากกว่าแผ่นเมมเบรนที่มีรูขนาดใหญ่ oligonucleotide probe ที่นำมาเตรียมเป็นเส้นทดสอบและเส้นควบคุมควรถือ oligonucleotide probe ที่ปลายด้านหนึ่งต่อกับ biotin เพื่อช่วยยึดกับแผ่นเมมเบรนได้ดีขึ้นและให้ปลายอีกด้านหนึ่งจับกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย นอกจากนี้ขั้นตอนการยึด oligonucleotide probe กับแผ่นเมมเบรนด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่นสั้นจะช่วยให้ความเข้มของเส้นทดสอบเพิ่มมากขึ้นเนื่องจาก probe จะยึดกับแผ่นเมมเบรนด้วยพันธะโควาเลนต์ลดการหลุดของ oligonucleotide probe เมื่อเติม running buffer ขณะทำการทดสอบ แต่ข้อจำกัดของชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลที่มีความไวต่ำเมื่อทดสอบกับสิ่งส่งตรวจทำให้ไม่เหมาะกับการนำมาตรวจติดตามการติดเชื้อหรือติดตามผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัสและขั้นตอนก่อนนำสิ่งส่งตรวจมาทดสอบกับชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลต้องมีขั้นการสกัดสารพันธุกรรมและการทำ RT-PCR จึงทำให้ชุดนิวคลีอิกแอซิดแลเทอร์อัลโฟลยังไม่เหมาะกับการใช้ตรวจติดตามในผู้ติดเชื้อเอชไอวี

รายการอ้างอิง

1. UNAIDS. AIDSinfo: people living in HIV [Online]. 2016. Available from: <http://www.aidsinfo.unaids.org> [cited 01, May 2016]
2. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สรุปสถานการณ์ผู้ป่วยเอดส์และการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทยปี พ.ศ. 2558.[ออนไลน์].2559.แหล่งที่มา: http://www.boe.moph.go.th/files/report/20151126_87903337.pdf [1 พฤษภาคม 2559].
3. Mao X, Ma Y, Zhang A, Zhang L, Zeng L, Liu G. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Analytical Chemistry*. 2009;81(4):1660-8.
4. Pongsuchart M, Sereemasun A, Ruxrungtham K. Sensitivity enhancement of nucleic acid detection by lateral flow strip test using UV crosslink method. *Asian Biomedicine*. 2012;6(3):459-63.
5. Rohrman BA, Leautaud V, Molyneux E, Richards-Kortum RR. A lateral flow assay for quantitative detection of amplified HIV-1 RNA. *PloS one*. 2012;7(9):e45611.
6. Wang S, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *Biotechnology advances*. 2010;28(6):770-81.
7. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจรักษาและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2557.[ออนไลน์].2559.แหล่งที่มา: <http://www.nhso.go.th> [27 มิถุนายน 2559].

8. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจรักษาและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2557.[ออนไลน์].2559. แหล่งที่มา: <http://www.nhso.go.th> [27 มิถุนายน 2559].
9. สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. สิทธิประโยชน์การบริการผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ในหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า.[ออนไลน์].2559. แหล่งที่มา: <http://www.aidssti.ddc.moph.go.th>. [27 มิถุนายน 2559].
10. Rotta I, Almeida SM. Genotypical diversity of HIV clades and central nervous system impairment. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2011;69(6):964-72.
11. World Health Organization. Technical Brief on HIV Viral Load Technologies (June 2010).[Online]. Available from: http://who.int/hiv/topics/treatment/tech_brief_2010060. [cited 2014 April 1]
12. Peeters M, Aghokeng AF, Delaporte E. Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(10):1525-31.
13. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*.18(3):182-92.
14. ประพันธ์ ภาณุภาค. สถานการณ์โรคเอดส์ในปัจจุบัน ศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย: ออนไลน์. 2559. แหล่งที่มา: <http://www.th.trcarc.org/>; 2557 [3 กรกฎาคม 2559].
15. Fearon M. The laboratory diagnosis of HIV infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2005;16(1):5.

16. กองโรคเอดส์ กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ เอชไอวี/เอดส์, 2542.
17. Luft S, Seme K, Poljak M. Laboratory diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Acta Dermatovenerologica Alpina Pannonica et Adriatica*. 2004;13(2):43-9.
18. สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. เชื้อเอชไอวี: ไวรัสวิทยา และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2552.
19. World Health Organization. Technical Brief on HIV Viral Load Technologies (June 2010).[Online]. Available from: http://who.int/hiv/topics/treatment/tech_brief_2010060. [cited 2014 April 1]
20. Kong W, Li Y, Cheng S, Yan C, An S, Dong Z, et al. Luminex xMAP combined with Western blot improves HIV diagnostic sensitivity. *Journal of Virological Methods*. 2016;227:1-5.
21. Guan M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in Western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(6):649-59.
22. Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM. The detection of acute HIV infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202 Suppl 2:S270-7.

23. วาริพินทุ ประเสริฐศิลป์. เทคโนโลยีการตรวจหาปริมาณ CD4 T-lymphocyte ในผู้ติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยโรคเอดส์. [ออนไลน์].2557.แหล่งที่มา: <http://www.gpo.or.th/rdi/html/cd4.html>. [1 กุมภาพันธ์ 2557]
24. Chantry CJ, Cooper ER, Pelton SI, Zorilla C, Hillyer GV, Diaz C. Seroreversion in human immunodeficiency virus-exposed but uninfected infants. *The Pediatric infectious disease journal*. 1995;14(5):382-7.
25. Vajpayee M, Mohan T. Current practices in laboratory monitoring of HIV infection. *The Indian journal of medical research*. 2011;134(6):801-22.
26. Wang S, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *Biotechnology advances*. 2010;28(6):770-81.
27. Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal Mdel C, Garcia F. Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. *The open virology journal*. 2012;6:135-43.
28. Kim EY, Stanton J, Korber BT, Krebs K, Bogdan D, Kunstman K, et al. Detection of HIV-1 p24 Gag in plasma by a nanoparticle-based bio-barcode-amplification method. *Nanomedicine*. 2008;3(3):293-303.
29. Kim YG, Moon S, Kuritzkes DR, Demirci U. Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel. *Biosensors & bioelectronics*. 2009;25(1):253-8.
30. Lee HH, Dineva MA, Chua YL, Ritchie AV, Ushiro-Lumb I, Wisniewski CA. Simple amplification-based assay: a nucleic acid-based point-of-care platform for HIV-1 testing. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201 Suppl 1:S65-72.

31. Tang S, Hewlett I. Nanoparticle-based immunoassays for sensitive and early detection of HIV-1 capsid (p24) antigen. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201 Suppl 1:S59-64.
32. Ritchie AV, Ushiro-Lumb I, Edemaga D, Joshi HA, De Ruiter A, Szumilin E, et al. SAMBA HIV semiquantitative test, a new point-of-care viral-load-monitoring assay for resource-limited settings. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(9):3377-83.
33. S. N. Clinical Use of Molecular Diagnostics for Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Vajira Medical Journal*. 2004;57(2):115-24.
34. Wilson LE, Gallant JE. HIV/AIDS: the management of treatment-experienced HIV-infected patients: new drugs and drug combinations. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;48(2):214-21.
35. Fontaine E, Riva C, Peeters M, Schmit JC, Delaporte E, Van Laethem K, et al. Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2001;28(3):254-8.
36. Hayat A, Yang C, Rhouati A, Marty JL. Recent Advances and Achievements in Nanomaterial-Based, and Structure Switchable Aptasensing Platforms for Ochratoxin A Detection. *Sensors*. 2013;13(11):15187-208.
37. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*. 2004;2:1-6.

38. Saini R, Saini S, Sharma S. Nanotechnology: The Future Medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2010;3(1):32-3.
39. De Jaeghere F, Allemann E, Kubel F, Galli B, Cozens R, Doelker E, et al. Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2000;68(2):291-8.
40. ศศิธร ตี๊ภู. อนุภาคนาโนทอง: การสังเคราะห์และการประยุกต์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications for Chemical Analysis. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*. 2013;Sect. 237-45.
41. Kumar A, Boruah BM, Xing-Jie L. Gold Nanoparticles: Promising Nanomaterials for the Diagnosis of Cancer and HIV/AIDS. *Journal of Nanomaterials*. 2011;2011:1-17.
42. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;11(0):55-75.
43. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(32):15700-7.
44. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*. 1973;241:20-2.

45. Ji X, Song X, Li J, Bai Y, Yang W, Peng X. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(45):13939-48.
46. Hu M, Chen J, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 2006;35(11):1084-94.
47. Brust M, Fink J, Bethell D, Schiffrin DJ, Kiely C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1995(16):1655-6.
48. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1994(7):801-2.
49. Primo A, Corma A, Garcia H. Titania supported gold nanoparticles as photocatalyst. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011;13(3):886-910.
50. Zeta Potential [Online]. 2014. Available from: <http://nanocomposix.com/kb/general/characterization-techniques>. [cited 9, Mar 2014]
51. Ivanov MR, Bednar HR, Haes AJ. Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis. *American Chemical Society nano*. 2009;3(2):386-94.

52. Zhao W, Brook MA, Li Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 2008;9(15):2363-71.
53. Chua A, Yean CY, Ravichandran M, Lim B, Lalitha P. A rapid DNA biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease. *Biosensors & bioelectronics*. 2011.
54. Xia F, Zuo X, Yang R, Xiao Y, Kang D, Vallée-Bélisle A, et al. Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(24):10837-41.
55. Yeh CH, Hung CY, Chang T, Lin HP, Lin YC. An immunoassay using antibody-gold nanoparticle conjugate, silver enhancement and flatbed scanner. *Microfluid Nanofluid*. 2009;6(1):85-91.
56. Thaxton CS, Georganopoulou DG, Mirkin CA. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;363(1-2):120-6.
57. Wang Z, Ma L. Gold nanoparticle probes. *Coordination Chemistry Reviews*. 2009;253(11-12):1607-18.
58. Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. 2003;301(5641):1884-6.
59. Niikura K, Nagakawa K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, et al. Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: a

- non-cross-linking approach to optical virus detection. *Bioconjugate chemistry*. 2009;20(10):1848-52.
60. Beams M, Novotny H, Sampedro S, DeVore J, Gordon J, Osikowicz G. A Self-Performing Chromatographic Immunoassay for the Qualitative Determination of Human chorionic Gonadotrophin (HcG) in Urine and Serum. *Clinical Chemistry*. 1990;36(6):1084-5.
61. Leuvering JH, Thal PJ, van der Waart M, Schuurs AH. Sol particle immunoassay (SPIA). *Journal of immunoassay*. 1980;1(1):77-91.
62. Van AA, Van LD, Berendsen LB, Wichers JH. Quantitative computer image analysis of a human chorionic gonadotropin colloidal carbon dipstick assay. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1994;229(1-2):67-75.
63. Zhang G, Guo J, Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip tests. *Methods in molecular biology*. 2009;504:169-83.
64. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Van AA. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;393(2):569-82.
65. Li Z, Wang Y, Wang J, Tang Z, Pounds JG, Lin Y. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip. *Analytical Chemistry*. 2010;82(16):7008-14.
66. Sajid M, Kawde A-N, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015;19(6):689-705.

67. Mark D, Haeberle S, Roth G, von Stetten F, Zengerle R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*. 2010;39(3):1153-82.
68. Posthuma-Trumpie GA, Amerongen Av. *Antibodies Applications and New Developments 2012* [cited 2015 June 15].
69. Mens PF, van Amerongen A, Sawa P, Kager PA, Schallig HD. Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium* spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008;61(4):421-7.
70. Zaytseva NV, Montagna RA, Lee EM, Baeumner AJ. Multi-analyte single-membrane biosensor for the serotype-specific detection of Dengue virus. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2004;380(1):46-53.
71. Tomlinson JA, Dickinson MJ, Boonham N. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. *Phytopathology*. 2010;100(2):143-9.
72. Mao X, Wang W, Du TE. Dry-reagent nucleic acid biosensor based on blue dye doped latex beads and lateral flow strip. *Talanta*. 2013;114:248-53.
73. Pongsuchart M, Sereemasapun A, Ruxrungtham K. UV Treatment Nucleic Acid Probe Without Biotin-Labeling Is Sensitive and Sufficient For The Fabrication of

- Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) Strip Test. *Journal of Life Sciences and Technologies*. 2013 21; 1(3):172-5.
74. Baptista P, Pereira E, Eaton P, Doria G, Miranda A, Gomes I, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2008;391(3):943-50.
75. Kumar S, Aaron J, Sokolov K. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat Protocols*. 2008;3(2):314-20.
76. Hill HD, Mirkin CA. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature protocols*. 2006;1(1):324-36.
77. Link S, El-Sayed MA. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *Journal of Physical Chemistry B*. 1999;103.
78. Mansfield MA, Mabuchi M, MacDonald CG, Pluskal MG. Immobilon-Ny+ nucleic acid blotting membrane: an advanced nylon membrane optimized for superior fixation and reprobing. *BioTechniques*. 1999;27(6):1253-7.
79. Brown T. Southern Blotting. *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2003. p. 268-88.

80. Safenkova I, Zherdev A, Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(6):1595-605.
81. Udomthongsuk N, Sereemasapun A, Korkiatsakul V, Ngambenjawong C, Supaphol P. Optimization of influencing parameters for fabrication of gold nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test. 2011 International Conference on Biomedical Engineering and Technology IPCBEE. 2011;11:65-9.



ภาคผนวก

1. เอกสารรับรองโครงการวิจัย หมายเลขไออาร์บี 575/57



COA No. 116/2015

IRB No. 575/57

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4493

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : การใช้อุณหภูมิของนาโนในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี

เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : นางสาวประกายมาศ บุพองกุล

สังกัดหน่วยงาน : ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทบทวน : คณะกรรมการเต็มชุด

รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

เอกสารรับรอง

1. โครงร่างการวิจัย Version 2.0 Dated 2 February 2015
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ Version 2.0 Dated 2 February 2015
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 2 February 2015
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 2 February 2015
5. Principal investigator's CV Version 1.0 Dated 20 November 2014

ลงนาม
(ศาสตราจารย์กิตติคุณแพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์)

ลงนาม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญ.ประภาพรพรณ รัชตะปิติ)

ประธาน

กรรมการและเลขานุการ

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

วันที่รับรอง : 19 กุมภาพันธ์ 2558

วันหมดอายุ : 18 กุมภาพันธ์ 2559

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 1% ไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรต (hydrogen tetrachloroaurate) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

hydrogen tetrachloroaurate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
Milli Q water	100	มิลลิลิตร

2.2 1% โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

sodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
Deionized water	100	มิลลิลิตร

2.3 Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร pH 7.33

Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
Sodium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	8.0	กรัม
Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม

ปรับให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อโดยการ autoclave นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 psi.

และปรับความเป็นกรดต่างให้อยู่ในช่วง 7.0-7.4

2.4 20X Saline-sodium citrate buffer (SSC) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร pH 7.3

Sodium chloride (NaCl)	175.3	กรัม
Trisodium citrate dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	88.2	กรัม

ปรับให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อโดยการ autoclave นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 psi.

และปรับความเป็นกรดต่างให้อยู่ในช่วง 7.0-7.4

2.5 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) (wt/vol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

SDS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)	10	กรัม
Deionized water	90	มิลลิลิตร

2.6 Running Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

20X SSC buffer	20	มิลลิลิตร
Deionized water	75	มิลลิลิตร
10% SDS	5	มิลลิลิตร

2.7 0.1 โมลาร์ Phosphate Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร pH 7.0

1 โมลาร์ Potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4)	61.5	มิลลิลิตร
1 โมลาร์ Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	38.5	มิลลิลิตร

2.8 Salting buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร pH 7.0

Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	0.0562	กรัม
Sodium phosphate monobasic monohydrate (NaH_2PO_4)	0.0125	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.844	กรัม
Deionized water	100	มิลลิลิตร

2.9 Eluent buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Trisodium phosphate (Na_3PO_4)	0.0327	กรัม
Bovine serum albumin (BSA)	0.5	กรัม
Sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	1	กรัม
Tween 20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	0.025	มิลลิลิตร
Deionized water	10	มิลลิลิตร

2.10 Buffer pH 8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร pH 8.03

0.25% Triton X-100 ((C ₂ H ₄ O) _n C ₁₄ H ₂₂ O)	125	ไมโครลิตร
0.05 โมลาร์ Tris-HCl (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ .HCl)	2.5	มิลลิลิตร
0.15 โมลาร์ Sodium chloride (NaCl)	0.438	กรัม



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวประกายมาศ บุพอังกูร เกิดเมื่อวันที่ 20 เดือนพฤษภาคม พุทธศักราช 2525 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปีพุทธศักราช 2548 ปัจจุบันทำงานตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ห้องปฏิบัติการคลังเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพุทธศักราช 2555

