# การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์ เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากโคลน mpd ลูกผสม

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดย

นายอนิรุทธ เอกคุณธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

# การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์ เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากโคลน mpd ลูกผสม

โดย

นายอนิรุทธ เอกคุณธรรม

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

# DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR PESTICIDE DETECTION USING METHYL PARATHION HYDROLASE FROM RECOMBINANT MPD CLONE

**By**

**Anirut Ekkhuntham**

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of**

**MASTER OF SCIENCE**

**Department of Biotechnology**

**Graduate School**

**SILPAKORN UNIVERSITY**

**2009**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากโคลน mpd ลูกผสม” เสนอโดย นายอนิรุทธ เอกคุณธรรม เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

…….....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริชัย ชินะตังกูร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ
2. อาจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา หลิวเสรี

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ผิวนิ่ม)
...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ)
...../...../.....

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา หลิวเสรี)
...../...../.....

50401207 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คำสำคัญ : เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส/แอมเพอร์โรเมทตริก/ไบโอเซนเวอร์

อนิรุทธ เอกคุณธรรม: การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากโคลน mpd ลูกผสม. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, อ. ดร.วนิดา วัฒนการุณ. และ ผศ. ดร. พิทยา หลิวเสรี. 170 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดยาฆ่าแมลงในกลุ่มออการ์โนฟอสเฟต โดยการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ซึ่งสามารถย่อยสลายสารในกลุ่มนี้ ได้เป็นพาราไนโตรฟีนอล มาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์นี้ถูกแยกบริสุทธ์จาก *Escherichia coli* ที่มียีน *mpd* โคลนอยู่ในพลาสมิด pGEX 4T-2 จากนั้นศึกษาคุณลักษณะโดยทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดคือ 25 °C โดยที่กิจกรรมเอนไซม์ยังคงเสถียร แม้เวลาจะผ่านไป 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 50 และ 45 % เมื่อเวลาผ่านไป 5 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดคือ 9 โดยที่กิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างเสถียร คือยังมีกิจกรรมคงอยู่ถึง 80-90 % เมื่อเวลาผ่านไป 8-15 ชั่วโมง ที่พีเอช 6-7 เมื่อทำการศึกษาผลของไอออนโลหะและสารเคมีต่อกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า $Cd^{2+}$, $Co^{2+}$, and $Zn^{2+}$ ที่ความเข้มข้น 1 mM จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 226, 131 และ 128 % ตามลำดับ ส่วน SDS, DTT และ EDTA มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์โดยอาศัยแรงระหว่างประจุ ซึ่งสามารถใช้ตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยการตรวจหาปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไตรฟีนอลที่เป็นผลผลิตจากการย่อยสลายของเอนไซม์ด้วยวิธีแอมเพอร์โรเมทตริก ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ไบโอเซนเซอร์นี้สามารถตรวจวัดปริมาณเมทธิลพาราไธออน, พาราไธออน, และพาราออกซอนในช่วง 10-90, 20-240, และ 3.3-40 nM โดยให้ค่า detection limits เท่ากับ 10, 20, และ 3.3 nM ตามลำดับ ไบโอเซนเซอร์นี้ให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูงสำหรับเมทธิลพาราไธออน, พาราไธออน, และพาราออกซอน คือ 616, 301, และ 1547 nA/uM ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการวัดซ้ำของไบโอเซนเซอร์โดยทำการวัดเมทธิลพาราไธออนทั้งหมด 15 ครั้ง ได้ค่า RSD เท่ากับ 9.19 % ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถวัดซ้ำได้ โดยสามารถตอบสนองได้ไวภายในเวลา 10 วินาที

---

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. ..... 3. .....

50401207 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY
KEY WORDS : METHYL PARATHION HYDROLASE/AMPEROMETRIC/BIOSENSOR
ANIRUT EKKHUNTHAM : DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR PESTICIDE DETECTION USING METHYL PARATHION HYDROLASE FROM RECOMBINANT MPD CLONE. THESIS ADVISORS: ASST. PROF. JESDAWAN WICHITWECHKARN, Ph.D., WANIDA WATTANAKAROON, Ph.D., AND ASST. PROF. PITTAYA LIEWSAREE, Ph.D. 170 pp.

A highly sensitive detection of organophosphate (OP) compounds was developed. Recombinant methyl parathion hydrolase (MPH) capable of hydrolyzing OP to *p*-nitrophenol (PNP) was used to develop a biosensor. This recombinant enzyme was purified from *Escherichia coli* harboring *mpdB* gene cloned into expression plasmid pGEX-4T-2, and characterized. The effects of temperature and pH on the enzyme activity and stability were analyzed. Its optimum temperature was 25$^{o}$C. The enzyme activity was unchanged for 48 h at 4$^{o}$C, and remained above 50% within 5 h and about 45% throughout 48 h at 25$^{o}$C. Its optimum pH was 9.0, and the enzyme was stable at pH 6-7, with 80-90% activity remaining for 8-15 h. The effects of metal ions and certain reagents on enzyme activity were also investigated. It was found that $Cd^{2+}$, $Co^{2+}$, and $Zn^{2+}$ ions at the concentration of 1 mM enhanced the activity to about 226 %, 131 %, and 128 %, respectively. Sodium dodecyl sulfate (SDS) dramatically reduced the enzyme activity, while dithiothreitol (DTT) and ethylenediaminetetraacetate (EDTA) had slight negative effect. After that the MPH was immobilized on multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) via electrostatic self-assembly, and the detection was performed by direct oxidation of biocatalytically liberated PNP using amperometry. Under the optimized conditions, the biosensor exhibited responses to methyl parathion (MP), parathion, and paraoxon with the linear ranges of 10-90 nM, 20-240 nM, and 3.3-40 nM, and the detection limits of 10 nM, 20 nM, and 3.3 nM, respectively. The biosensor also provided high sensitivities to MP, parathion, and paraoxon at 616 nA/μM, 301 nA/μM, and 1547 nA/μM, respectively. Reproducibility assay using repetitive standards (n=15) of 200 nM showed the RSD of 9.19%, indicating high reproducibility. The response time was 10 s.

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

---

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2009
Student's signature .....
Thesis Advisors' signatures 1. ..... 2. ..... 3. .....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, รศ. ดร. วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ Dr. Mithran Somasundrum ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำต่างๆ และช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. ธนิต ผิวนิ่ม, ผศ. ดร. พิทยา หลิวเสรี, และอาจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการทำงานวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่มอบวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ และนักวิทยาศาสตร์ ในสำนักงานภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ตลอดการทำวิจัยในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และนักวิจัย ที่สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ หน่วยวิจัย sensor technology มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ตลอดการทำวิจัยในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณยงยุทธ ไผ่แก้ว นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร สำหรับความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงจากน้ำตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี

ขอขอบพระคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, สำนักงานโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ภาคเทคโนโลยีชีวภาพ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ได้ให้ให้ทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยและการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโทที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในหลายๆ เรื่องรวมทั้งน้องๆ ในห้องแลบทุกคนที่ทำให้เกิดบรรยากาศในการทำงานวิจัยที่ดี

และที่สำคัญยิ่งขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณย่า และทุกคนในครอบครัว รวมทั้งเพื่อนๆ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในด้านต่างๆจนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

**สารบัญ**


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1

วัตถุประสงค์การวิจัย ..... 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 6

ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ..... 6

เมทธิลพาราไธออน ..... 18

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน ..... 30

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง ..... 30

การตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลง ..... 36

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลง ..... 48

3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย ..... 55

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ..... 55

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย ..... 55

ดีเอ็นเอพาหะ ..... 56

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย ..... 60


มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า
ดีเอ็นเอมาตรฐาน 60
โปรตีนมาตรฐาน 60
เอนไซม์ 60
ชุดทดสอบสำเร็จรูป 61
อิเลคโทรด 61
สารเคมี 62
เครื่องมือ 64
อุปกรณ์อื่นๆ 65
วิธีดำเนินการวิจัย 66
การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนใน expression vecter pGEX-4T-2 66
การทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ (transformants) 73
การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 74
การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 74
การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค
SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 77
การหาค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส
ด้วยวิธี spectrophotometry 78
การหาค่าปริมาณโปรตีนโดย Bio-Rad Bradford Protein Assay 79
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 80
การศึกษาหาคุณลักษณะของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 82
การนำรีคอมบิแนนส์เอนไซม์มาประยุกต์ใช้โดยการทำไบโอเซนเซอร์ 84
การหาปริมาณยาฆ่าแมลงในน้ำตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี 95
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 97
5 สรุปผลการวิจัย 135
บรรณานุกรม 146
ภาคผนวก 154

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

บทที่ หน้า
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ..... 154
ภาคผนวก ข สารเคมี ..... 157
ภาคผนวก ค การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ..... 163
ภาคผนวก ง คำย่อ ..... 166
ประวัติผู้วิจัย ..... 169

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**สารบัญตาราง**


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ระดับอันตรายของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต | 8 |
| 2 | รายชื่อสารกำจัดแมลงนำเข้าในปี พ.ศ. 2530 ที่มีปริมาณสูงสุด 10 ชนิดแรก | 15 |
| 3 | ระดับสารพิษตกค้างประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในดินเป็น ppm (mg/kg) จากแหล่งเกษตรกรรมทั่วประเทศสำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531 | 16 |
| 4 | ระดับสารพิษตกค้างประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป และแหล่งเกษตรกรรมเป็น ppb สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531 | 17 |
| 5 | ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้ | 26 |
| 6 | จำนวนตัวอย่างของผักและผลไม้ที่ตรวจพบสารพิษตกค้าง | 28 |
| 7 | ชนิดและปริมาณของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบในผักและผลไม้ | 29 |
| 8 | เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด | 55 |
| 9 | ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย | 60 |
| 10 | การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ | 106 |
| 11 | การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสภายหลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ | 112 |
| 12 | สรุปผลของไอออนของโลหะและสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ | 138 |
| 13 | สรุปผลของการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ | 140 |
| 14 | สรุปผลของการหาค่าลักษณะเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด | 143 |
| 15 | เปรียบผลการหาค่าลักษณะเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ | 144 |


มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

**สารบัญภาพ**


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | โครงสร้างของสารออร์กาโนฟอสเฟต | 1 |
| 2 | ปฏิกิริยาในการย่อยสลายเมทธิลลพาราไธออนโดย เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 3 |
| 3 | หลักการโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ | 3 |
| 4 | หลักการออปติคอลไบโอเซนเซอร์ | 4 |
| 5 | หลักการแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ | 4 |
| 6 | สูตรโครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต | 6 |
| 7 | ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต | 7 |
| 8 | การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงฟอสฟอโรไธโอเนทส์เป็นสาร ในรูปที่ออกฤทธิ์ | 10 |
| 9 | การสลายตัวของยาฆ่าแมลงฟอสฟามิดอนและไดเมโธเอท | 10 |
| 10 | การสลายตัวของยาฆ่าแมลงโฟเรต | 11 |
| 11 | ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของยาฆ่าแมลงพาราไธออน | 11 |
| 12 | การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสโดยสารประกอบออร์กาโนฟอสเฟต | 13 |
| 13 | สูตรโครงสร้าง (structure formula) ของเมทธิลพาราไธออน | 19 |
| 14 | กระบวนการเมตาบอลิซึมของเมทธิลพาราไธออนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม | 20 |
| 15 | proposed pathways ของเมทธิลพาราไธออนในจุลินทรีย์โดยทั่วไป | 23 |
| 16 | การกระตุ้น (activation) ของเมทธิลพาราไธออนให้เปลี่ยนเป็น active metabolite ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ acetylcholinesterase และยับยั้งการทำงาน ของเอนไซม์ | 25 |
| 17 | โครงสร้างและการทำงานของไบโอเซนเซอร์ | 37 |
| 18 | แสดงชนิดของสารชีวภาพที่นำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์และลักษณะของสัญญาณ ชี้นำ | 38 |
| 19 | การจับกันระหว่างสารชีวภาพที่อยู่บนทรานส์ดิวเซอร์ กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เกิดเป็นสัญญาณที่จับได้โดยทรานดิวเซอร์ | 38 |


มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ หน้า


20 ลำดับขั้นตอนของการส่งผ่านอิเลคตรอนจากซับสเตรทเข้าสู่อิเลคโทรดโดยการทำปฏิกิริยาทางเอนไซม์และสารตัวกลาง ..... 42

21 ออกซิเดชั่นของกลูโครสโดยกลูโครสออกซิเดส โดยแสดงสัญญาณชี้นำต่างๆ ที่สามารถตรวจจับได้เพื่อใช้หาปริมาณกลูโครส ..... 43

22 โครงสร้างดีเอ็นเอพาหะ pCR®-Blunt แสดง multiple cloning sites ..... 57

23 โครงสร้างดีเอ็นเอพาหะ pGEX-4T-2 ..... 58

24 โครงสร้างดีเอ็นเอพาหะ pGEX-6P-1 ..... 59

25 glassy carbon electrode และ Ag/AgCl electrode ..... 61

26 การตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส โดยอาศัยแรงระหว่างประจุในลักษณะชั้นต่อชั้น ..... 85

27 การต่อขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิด เข้ากับเครื่องควบคุมกระแสไฟฟ้า ..... 87

28 GC-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด ..... 89

29 GC-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด ..... 90

30 GC-PAA-CNT-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด ..... 90

31 GC-PAA-CNT-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด ..... 91

32 การแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิด pGEX-4T-2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ..... 98

33 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ..... 99

34 การทำ restriction analysis ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I ..... 100

35 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในรีคอมบิแนนท์โคลนต่างๆ ..... 101

36 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ..... 102


มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 37 | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่แสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในรีคอมบิแนนส์พลาสมิด pGEX-4T-2 | 103 |
| 38 | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของโปรตีนที่แสดงออกจากรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ในส่วนของเหลวและส่วนของตะกอน และแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ | 104 |
| 39 | กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมของรีคิมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 105 |
| 40 | ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 107 |
| 41 | ผลของความเข้นข้นของ IPTG ที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 108 |
| 42 | ผลระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเหนี่ยวนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ด้วย IPTG ในการผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 109 |
| 43 | ผลของไอออนโลหะและสารเคมีที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 110 |
| 44 | ผลของความเข้มข้นของโคบอลท์คลอไรด์ที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส | 111 |
| 45 | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 | 112 |
| 46 | อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด | 113 |
| 47 | พีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด | 114 |
| 48 | อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด | 115 |
| 49 | pH ที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด | 116 |
| 50 | ผลของไอออนของโลหะและสารเคมีที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ | 117 |
| 51 | Lineweaver-Burk plot ของเมทธิลพาราไธออน | 118 |


มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ภาพที่ หน้า


52 Lineweaver-Burk plot ของพาราออกซอน ..... 118
53 Lineweaver-Burk plot ของพาราไธออน ..... 119
54 Lineweaver-Burk ของเฟนิโทรไทออน ..... 119
55 Lineweaver-Burk plot ของคูมาฟอส ..... 120
56 Lineweaver-Burk plot ของคลอร์ไพริฟอส ..... 120
57 Lineweaver-Burk plot ของมาลาไธออน ..... 121
58 ไซคลิกโวลแทมเมตรีสำหรับการออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอลโดยใช้อิเลคโทรดหัวเปล่า ..... 122
59 ไซคลิกโวลแทมเมตรีสำหรับการออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอลโดยใช้โมดิฟายด์อิเล็กโทรด ..... 122
60 กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) จากการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของ MPH-immobilized CNT บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ที่ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ ..... 124
61 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly immersion technique ..... 125
62 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly drop dry technique ..... 126
63 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี drop dry ..... 127
64 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี electrostatic drop dry technique, วิธี electrostatic self assembly immersion techniques และวิธี drop dry ..... 128


มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ภาพที่ หน้า


65 กราฟไฮโดรไดนามิกโวลแทมโมแกรมสำหรับวัดการเกิดออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล ..... 129

66 แสดงผลการวัดความเสถียรของเมทธิลพาไธออนไอโดรเลสอิเลคโทรด ..... 130

67 แสดงความสามารถในการตรวจวัดซ้ำได้อย่างต่อเนื่องของเมทธิลพาไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด ..... 130

68 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้าและกราฟมาตรฐานของเมทธิลพาราไธออน ..... 131

69 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้าและกราฟมาตรฐานของพาราออกซอน ..... 132

70 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้าและกราฟมาตรฐานของพาราไธออน ..... 132

71 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้าในการนำเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดวัดตัวอย่างจริง ..... 133

72 กราฟโครมาโตรแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี ..... 134

73 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ..... 163

74 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ..... 163

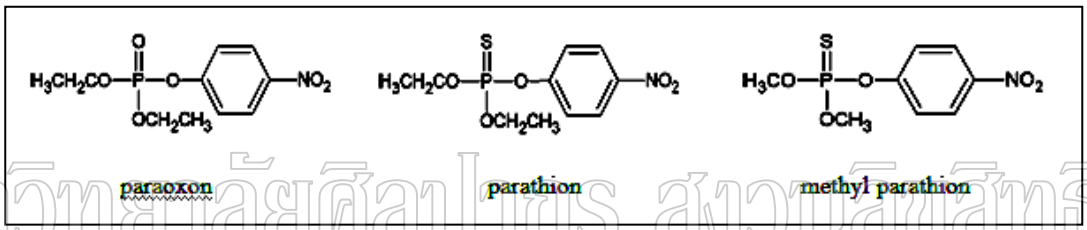

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารประกอบประเภทออร์กาโนฟอสเฟอรัส (organophosphorus compound; OP) ตัวอย่างเช่น พาราออกซอน (paraoxon), พาราไธออน (parathion), และเมทธิลพาราไธออน (methyl parathion) ถูกนำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลง (insecticide) และสารกำจัดศัตรูพืช (pesticide) อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเกษตร รวมไปถึงใช้เป็นอาวุธเคมีด้วย (chemical warfare agent) โครงสร้างทางเคมีของสารออร์กาโนฟอสเฟต แสดงในภาพที่ 1




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารออร์กาโนฟอสเฟต

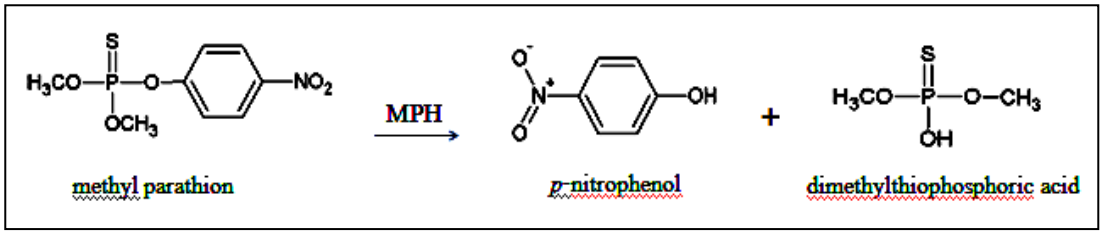
สารออร์กาโนฟอสเฟตเหล่านี้เป็นสารที่เป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxic compound) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase; AChE) ที่เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของสารสื่อประสาท (neurotransmitter) อะซิติลโคลีน (acetylcholine) ในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) และระบบประสาทรอบนอก (peripheral nervous system; PNS) ซึ่งโดยปกติเมื่อมีการส่งสัญญาณประสาทเรียบร้อยแล้ว จะต้องมีการย่อยสลายอะซิติลโคลีนด้วยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในทันที การที่สารออร์กาโนฟอสเฟตไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติล-โคลีนเอสเทอเรสทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนที่ปลายประสาททำให้กล้ามเนื้อเกิดการตอบสนองตลอดเวลา เกิดผลเสียต่อระบบประสาท กล้ามเนื้อ และอวัยวะที่เกี่ยวข้อง สารเคมีเหล่านี้ฆ่าแมลงได้โดยการออกฤทธิ์ทางการสัมผัส ทางระบบทางเดินอาหาร และทางระบบทางเดินหายใจ ซึ่งมีผลต่อทั้ง muscarinic receptors, motor nerve ending, และ central nervous system การตายเกิดขึ้นจากการล้มเหลวของระบบหายใจ (Vale *et al*., 1998; Abou-Donia *et al*., 2003; Schöning *et al*., 2003)

ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาได้มีการนำสารออร์กาโนฟอสเฟตมาใช้อย่างกว้างขวางในบริเวณที่เป็นแหล่งเกษตรกรรม โดยเฉพาะยาฆ่าแมลงและสารกำจัดศัตรูพืช การใช้ยาฆ่าแมลงในภาคเกษตรกรรมมีปริมาณมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ และยังสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั้งแหล่งดิน แหล่งน้ำ นำมาซึ่งการปนเปื้อนเข้าไปในห่วงโซ่อาหาร เช่น สัตว์น้ำด้วย สารเคมีที่ตกค้างเหล่านี้เป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของประชาชน ทั้งต่อเกษตรกรผู้ใช้สารเคมีเองและต่อผู้บริโภค ซึ่งในระยะยาวจะเป็นปัญหาทางสังคมและมีผลกระทบไปถึงด้านเศรษฐกิจและการส่งออกสินค้าเกษตร รวมถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมด้วย (Konstantinou *et al*., 2006) ดังนั้นวิธีการตรวจจับที่มีประสิทธิภาพสูง รวดเร็ว แม่นยำ และสามารถใช้งานซ้ำได้หลายครั้ง รวมทั้งสามารถเข้าถึงแหล่งวัดได้โดยตรง เพื่อสะดวกสำหรับการใช้งานในภาคสนาม จึงเป็นที่ต้องการมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อนำมาใช้แทนวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม organophosphate ดั้งเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือแก๊ส (gas) และลิควิดโครมาโตรกราฟฟี่ (liquid chromatography) (Serrano *et al*., 1999; Nakagawa *et al*., 2001; Tethgatuk *et al*., 2001) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ราคาแพง ใช้นักวิเคราะห์ที่มีความชำนาญ ค่าใช้จ่ายสูง และไม่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ภายนอกห้องปฏิบัติการได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

การผลิตตัวตรวจวัดชีวภาพ (biosensor) สำหรับยาฆ่าแมลงจึงเป็นทางออกที่ดีต่อปัญหาดังกล่าว โดยนอกจากจะทำให้การตรวจวัดมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว (sensitivity) แล้ว ยังทำให้การตรวจวัดทำได้อย่างสะดวก ง่ายดาย รวดเร็ว และที่สำคัญคือสามารถนำไปใช้ตรวจวัด ณ บริเวณที่มีการปนเปื้อนได้โดยตรง การผลิตไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตที่ผ่านมา มักอาศัยการยับยั้งการทำงานของอะซิติลโคลีน-เอสเทอเรส (Choi *et al*., 1998; Simon *et al*., 2006; Du *et al*., 2007) แต่วิธีนี้ก็มีข้อเสีย คือมีความจำเพาะต่ำ เพราะนอกเหนือจากสารออร์กาโนฟอสเฟตแล้ว ยังมีสารอื่น เช่น สารจำพวกคาร์บาเมท (carbamate) และโลหะหนัก (heavy metal) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ด้วย จากการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟตได้ เช่น เชื้อ *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Plesiomonas* sp. strain M6 และ *Pseudomonas* sp. strain WBC-3 เป็นต้น (Zhongli *et al*., 2001; Fu *et al*., 2004; Liu *et al*., 2005) ทำให้สามารถนำเอนไซม์จากเชื้อเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอเซนเซอร์ที่มีความจำเพาะสูงได้ สำหรับในประเทศไทยมีการพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* (Keprasertsup, 2001) ที่มีเอนไซม์ย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนได้เช่นกัน และได้มีการโคลนยีนเมทธิล-พาราไธออนดีดราเดชั่น (methyl parathion degradation; *mpd*) ที่สามารถผลิตเอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลส (methyl parathion hydrolase; MPH) (เสาวลักษณ์, 2547; วิรุฬ, 2549) โดย

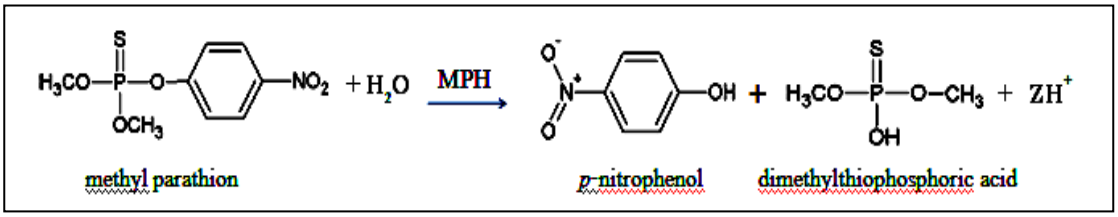
เอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้เป็นพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) และกรดไดเมทธิลไธโอฟอสฟอริค (dimethylthiophosphoric acid) ดังแสดงในภาพที่ 2




ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาในการย่อยสลายเมทธิลลพาราไธออนโดยเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

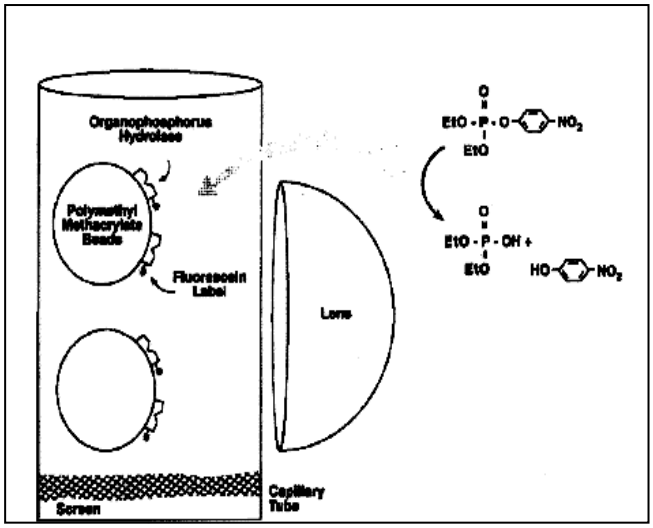
ซึ่งสามารถใช้ปฏิกิริยาการย่อยสลายยาฆ่าแมลงดังกล่าวนี้มาใช้ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ได้ (Mulchandani *et al*., 2001) ซึ่งจะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ทั้งยังมีความจำเพาะ และความแม่นยำสูง โดยการนำเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสมาเชื่อมต่อกับโพเทนชิโอเมตริกทรานดิวเซอร์ (potentiometric transducer) เช่น พีเอชอิเลคโทรด (pH electrode) แล้ววัดความเข้มข้นของโปรตอน (proton) ที่เกิดขึ้นในขณะที่เกิดการย่อยสลายสาร MP เรียกวิธีการนี้ว่าโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ (potentiometric biosensor) ดังแสดงในภาพที่ 3

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่งวนลิขสิทธิ์




ภาพที่ 3 หลักการโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์

หรือการนำเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมาเชื่อมต่อกับออปติคอลทรานดิวเซอร์ (optical transducer) โดยการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารจำพวกโครโมฟอร์ (chromophoric product) ที่ถูกสร้างขึ้น ได้แก่ พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนหรือในบางกรณีอาจจะนำเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสมาเชื่อมติดกับสารเรืองแสงแล้วทำการตรึงกับวัสดุช่วยตรึง (support material) ในขณะที่เมทธิลพาราไธออนถูกย่อยสลายจะเกิดการปลดปล่อยโปรตอนออกมาเป็นผลให้พีเอชของสารละลายเกิดการเปลี่ยนแปลง สามารถวัดความเข้มแสงที่ลดลงที่ได้จากการปลดปล่อยแสงของสารเรืองแสง วิธีการนี้เรียกว่าออปติคอลไบโอเซนเซอร์ (optical biosensor) ดังภาพที่ 4

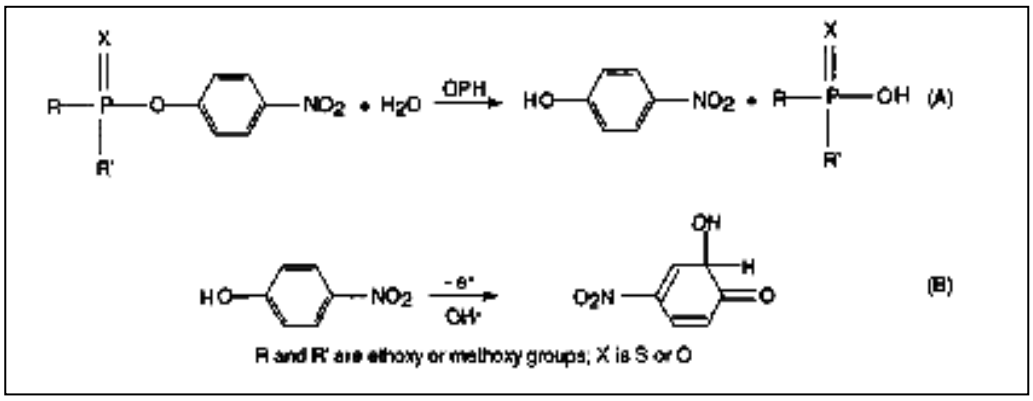



ภาพที่ 4 หลักการออปติคอลไบโอเซนเซอร์

ที่มา : Mulchandani *et al.*, 2001

ในทำนองเดียวกันอาจนำเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมาเชื่อมต่อกับแอมเพอโรเมตริกทรานดิวเซอร์ (amperometric transducer) แล้วทำการวัดสัญญาณไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นรีดักชั่น (oxidation/reduction) ของเมทธิลพาราไธออนขณะถูกย่อยสลาย วิธีการนี้เรียกว่าแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ (amperometric biosensor) ดังภาพที่ 5

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร




ภาพที่ 5 หลักการแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์

ที่มา : Mulchandani *et al.*, 2001

**2. วัตถุประสงค์**

2.1 เพื่อทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส แล้วถ่ายเทยีนดังกล่าวเข้าไปใน *E. coli* BL21

2.2 เพื่อทำการผลิตและแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส จากรีคอมบิแนนท์โคลน รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติบางประการของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้

2.3 เพื่อนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่แยกบริสุทธิ์ได้มาพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์ สำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน

2.4 เพื่อทดลองนำไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาได้มาใช้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไทออนและยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

**3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

3.1 สามารถทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส แล้วถ่ายเทยีนดังกล่าวเข้าไปใน *E. coli* BL21

3.2 สามารถผลิตและแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

3.3 ทราบคุณลักษณะและคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสลูกผสม

3.4 สามารถผลิตไบโอเซ็นเซอร์ที่ใช้ตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงเมทธิลพารา-ไทออนและยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

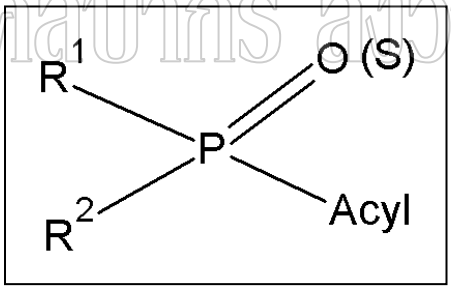
## 1. ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate Insecticides)

ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต เป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ใช้ในปัจจุบัน แทนที่ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน (organochlorine insecticides) เนื่องจากมีความสามารถในการฆ่าแมลงได้อย่างกว้างขวางมากกว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน และไม่มีความคงทน อย่างไรก็ตามยาฆ่าแมลงประเภทนี้มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลังสูงกว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2527; Perry *et al*.,1998)

### 1.1 สูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตมีสารอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญโดยมีสูตรโครงสร้างทั่วไป (general structure) ดังนี้

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์




ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

### 1.2 คุณสมบัติของสารฟอสเฟตซึ่งจะมีฤทธิ์ฆ่าแมลงได้

1.2.1 ซัลเฟอร์หรือออกซิเจนต้องเชื่อมโดยตรงกับฟอสฟอรัส ซึ่งมีวาเลนซีเป็นห้า (pentavalent phosphorus)

1.2.2 $R^1$ และ $R^2$ ต้องเป็นกลุ่มอัลคอกซี (alkoxy), อัลคิล (alkyl), หรืออะมิโน (amino)

1.2.3 กลุ่มเอซิล (acyl) ต้องเป็นกลุ่มที่มีประจุลบในกรดอินทรีย์หรืออนินทรีย์ เช่น ฟลูโอรีน (fluorine), ไซยาเนท (cyanate), ไธโอไซยาเนท (thiocyanate) หรือต้องเป็นส่วนหนึ่งของกรด เช่น ส่วนอีนอล (enol), เมอแคบโต (mercapto) เป็นต้น

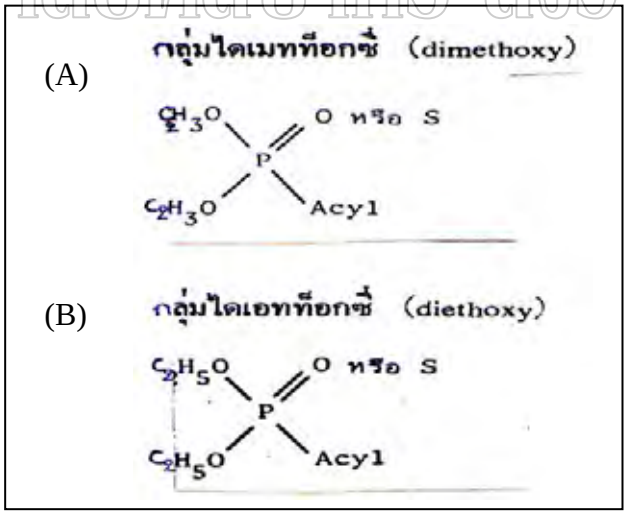
**1.3 ประเภทของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต**

ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.3.1 กลุ่มไดเมทท็อกซี (dimethoxy) ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตกลุ่มนี้เป็นสารแปร (derivative) ง่ายๆ ของกรดฟอสฟอริกที่ประกอบด้วยโซ่คาร์บอนสั้นๆต่อเนื่องกันในทางตรง โดยมีสูตรโครงสร้างหลักดังแสดงในภาพที่ 7(A) ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้คือ มาลาไธออน (malathion), ไตรคลอร์ฟอน (trichlorfon), โมโนโครฟอส (monochlophos), คาร์โบฟีโนไธออน (carbophenothion), คูมาฟอส (coumaphos), ครูฟอเมต (crufomate), ไดคลอร์วอส (dichlorvos), เฟนไธออน (fenthion), เมวินฟอส (mevinphos), รอนเนล (runnel) และฟอสฟามิดอน (phosphamidon) มีการนำมาลาไธออนมาใช้ในครัวเรือนและสัตว์เลี้ยง ไตรคลอร์ฟอนใช้ในทางการเกษตรกับพืชและการควบคุมแมลงวันในฟาร์ม ยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้มีสารดูดซึมมาก เช่น ไดเมโธเอท (dimethoate), ไดโครโตฟอส (dicrotophos), และไดซัลโฟตอน (dicylphoton)

1.3.2 กลุ่มไดเอทท็อกซี (diethoxy) ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างหลักดังแสดงในภาพที่ 7(B) ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้จะมีความคงทนสูงกว่าและมีพิษตกค้างนานกว่ายาฆ่าแมลงในกลุ่มไดเมทท็อกซี ตัวอย่างยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้คือดีมีตอน (demeton), ไดอาซีนอน (diazinon), โฟเรต (phorate) และทีอีพีพี (TEPP)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สงวนลิขสิทธิ์




ภาพที่ 7 ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

(A) ไดเมทท็อกซี (dimethoxy)

(B) ไดเอทท็อกซี (diethoxy)

### 1.4 ระดับอันตรายของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

ปัจจุบันนี้มีการผลิตยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในภาพแบบการค้าประมาณ 100 ชนิด แบ่งตามระดับอันตรายโดยใช้ค่า $LD_{50}$ เป็นเกณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับอันตรายของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต
ที่มา : ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2527

| ประเภท | ระดับอันตราย | ค่าแอลดี 50 สำหรับหนู (mg/kg) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | พิษทางปาก | | พิษทางผิวหนัง | |
| | | ยาผง | ยาน้ำ | ยาผง | ยาน้ำ |
| Ia | อันตรายร้ายแรงที่สุด | <5 | <20 | <10 | <40 |
| Ib | อันตรายร้ายแรงสูง | 5-50 | 20-200 | 10-100 | 40-400 |
| II | อันตรายร้ายแรงปานกลาง | 50-500 | 200-2,000 | 100-1,000 | 400-4,000 |
| III | อันตรายต่ำ | >500 | >2,000 | >1,000 | >4,000 |

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลงวันลิขสิทธิ์

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายร้ายแรงที่สุด** ได้แก่

- ออลลิคาร์บ เช่น เทมิค
- เดมีตอน เช่น ซิสต๊อกซ์, โซลวิเร็กซ์
- ไดซัลโฟตอน เช่น ไดซีสตอน, โซลิวเร็กซ์, ไธโอเดมิตอน
- เมวินฟอส เช่น ฟอสดริน, ฟีนิฟอส, ฟอสฟีน
- พาราไธออน เช่น โฟลิดอล อี 605, พาราดอล, พาราท็อกซ์
- ฟอเรท เช่น ไธเมท, แกรนนูท็อกซ์
- ชราดาน หรือ โอเอมพีเอ เช่น ไดแพค, เพสต๊อกซ์ 3, ไซแตม
- เทพพ์ เช่น ฟ๊อสเวกซ์, นีฟอส, คิลเลกซ์
- ไธโอนาซีน เช่น ไซเนม, นีมาฟอส, ซีโนฟอส

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายร้ายแรงสูง** ได้แก่

- ออลดริน เช่น ออลเดร็กซ์, ออลไดร้ท์, อโกรดิน
- ไดโครโตฟอส เช่น ไบดริน, คาร์บีครอน, เอคตาฟอส
- คาร์โบฟีโนไธออน เช่น ไตรไธออน
- ไดโคลวอส หรือ ดีดีวีพี เช่น แอ๊ทการ์ด, เดเดวับ, โนโกส์
- ดีลดริน เช่น ดีลเดร็กซ์, ดีลไดร้ท์, เอนโดซีน

- เอนดริน เช่น ไดรน่าฟ๊อก, เอนเดร็กซ์, เฮกซาดริน
- เมทธิลพาราไธออน เช่น อรามูล, มาลิโซล, โฟลิดอล-เอ็ม

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายปานกลาง** ได้แก่

- อซินฟอสเมธิล เช่น เบนไธออน, กูซาไธออน, กูไธออน
- บีเอชซี และลินเดน
- คลอร์เดน เช่น คลอร์เดน, คลอร์ดิลล์
- คูมาฟอส เช่น โค-ราล, เบย์เออร์ 21/199
- ไดอาร์ซีโนน เช่น แอลฟาท็อกซ์, บาซูดิน, สเปคตราไซด์
- ไดเมโธเอท เช่น ไซกอน, ริดไม๊ท์, โรเกอร์
- เอนโดซัลเฟน เช่น ไธโอดาน, เบโอสิท, โอเน็กซ์
- เฟนไธออน เช่น เบย์โท๊กซ์, เลเบซิด, เมอร์แคปโตฟอส

**ตัวอย่างของยาฆ่าแมลงประเภทที่มีอันตรายต่ำ** ได้แก่

- เทมีฟอส เช่น อะเบท
- อราไม๊ท์ เช่น อราไซด์
- คาร์บาริล เช่น เซวิน, เอส-85
- คลอโรเบนซิเลท เช่น อคาราแบน, คอพไม้ท์
- ดีดีดี
- ไดโคฟอล เช่น เคลเธน
- มาลาไธออน

(ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2527)

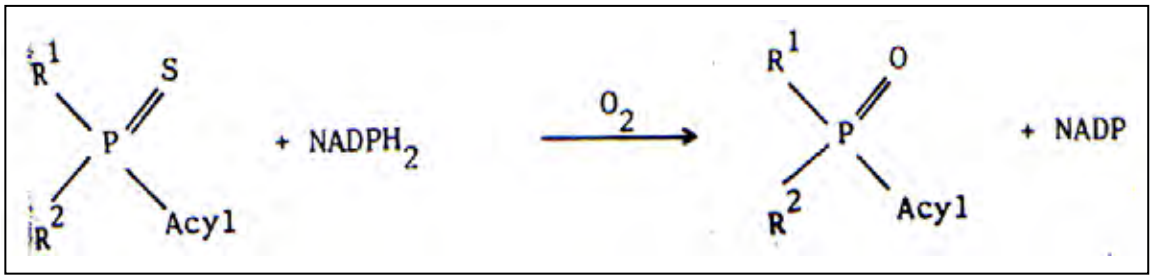
**1.5 การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในพืชและสัตว์**

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกายโดยทำให้อยู่ในภาพซึ่งมีประจุมากขึ้น จึงละลายน้ำได้ดีขึ้น และถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะในภาพดังกล่าว หรือในภาพของคอนจูเกตส์ (conjugates) ส่วนพืชมักจะเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมให้อยู่ในภาพซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเปปไทด์ (peptides) โปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรต

การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับ ซึ่งมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) อยู่เป็นจำนวนมากปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสูตร โครงสร้างของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตที่สำคัญ ได้แก่

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.5.1 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลุ่มไธโอโน (thiono) เป็นกลุ่มออกโซ (oxo) ซึ่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของซัลเฟอร์จะเปลี่ยนสารฟอสฟอโรไธโอเนทส์ (phosphorothionates) เป็นฟอสเฟต (phosphate) ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาซึ่งทำให้ได้สารมีฤทธิ์เกิดขึ้นที่ส่วนไมโครโซม (microsome) ของตับโดยมี $NADPH_2$ และออกซิเจน ดังภาพที่ 8

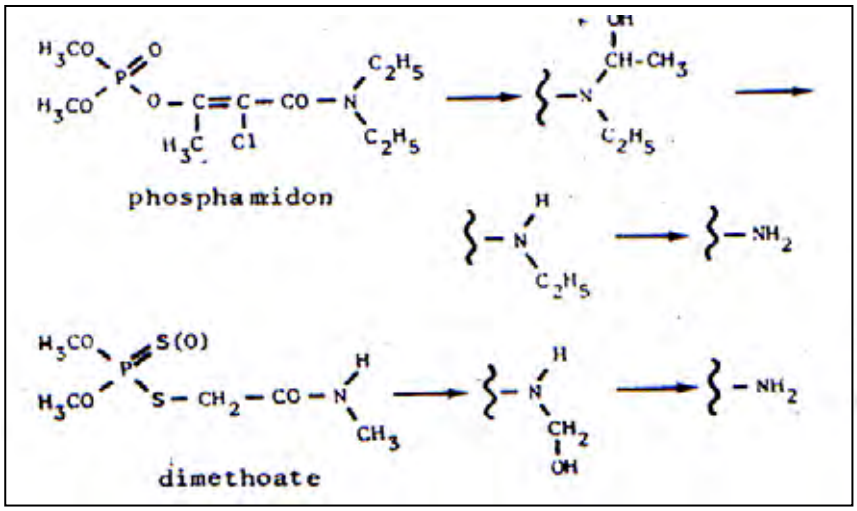



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของยาฆ่าแมลงฟอสฟอโรไธโอเนทส์เป็นสารในรูปที่ออกฤทธิ์ (ฟอสเฟต)

ที่มา : พาลาภ สิงหเสนี, 2531

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

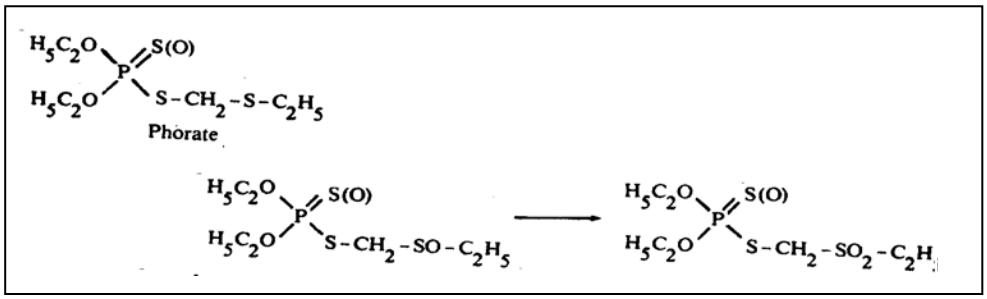
1.5.2 ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีอัลคิเลชัน (oxidative dealkylation) เป็นปฏิกิริยาซึ่งกลุ่มอัลคิลเชื่อมกับไนโตรเจน จะถูกกำจัดออกโดยปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีอัลคิลเลชัน เช่น การที่ยาฆ่าแมลงไดเมโธเอท (dimethoate) และฟอสฟามิดอน (phosphamidon) ดังแสดงในภาพที่ 9 และยาฆ่าแมลง เช่น ไดโครโทฟอส (dicrotophos), โอเอ็มพีเอ (OMPA) และเอโซดริน (azodrin®) สลายตัวได้เอไมด์ที่ไม่มีการแทนที่




ภาพที่ 9 การสลายตัวของยาฆ่าแมลง ฟอสฟามิดอนและไดเมโธเอท

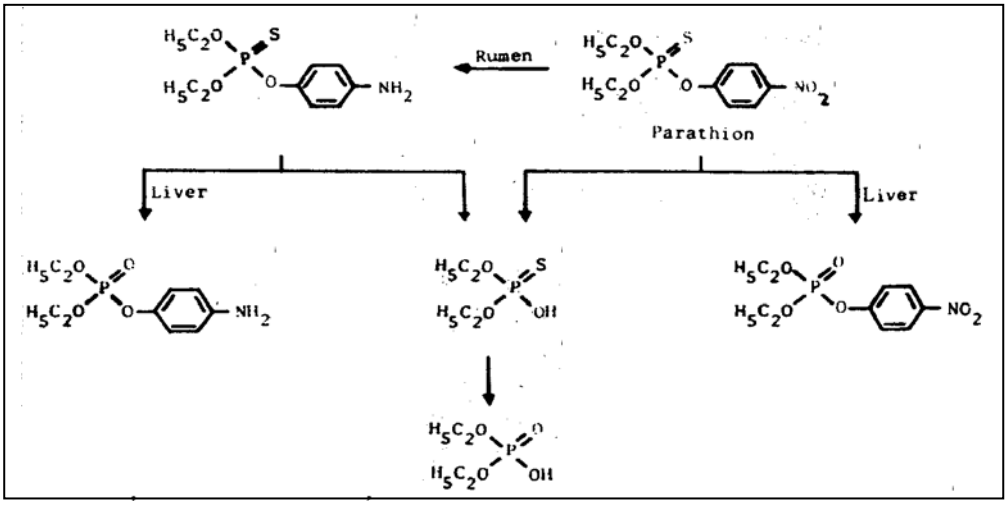
ที่มา : พาลาภ สิงหเสนี, 2531

1.5.3 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไธโออีเธอร์ส (oxidation of thioethers) เป็นปฏิกิริยาการสลายตัวที่มีความสำคัญปฏิกิริยาหนึ่ง ซึ่งเป็นการเปลี่ยนยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตที่เป็นไธโออีเธอร์ให้เป็นสารซัลฟอกไซด์ (sulfoxides) และซัลโฟน (sulfones) เช่น การสลายตัวของยาฆ่าแมลงโฟเรต (phorate) ดังแสดงในภาพที่ 10




ภาพที่ 10 การสลายตัวของยาฆ่าแมลงโฟเรต
ที่มา : พาลาภ สิงหเสนี, 2531

1.5.4 ปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพร้อมๆ กับปฏิกิริยาออกซิเดชันของไธโอโนซัลเฟอร์และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตัวอย่างเช่น การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยใช้เอนไซม์ซึ่งเปลี่ยนแปลงกลุ่มไนโตรของพาราไธออน (parathion) เป็นกลุ่มอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 11




ภาพที่ 11 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยาฆ่าแมลงพาราไธออน
ที่มา : พาลาภ สิงหเสนี, 2531

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์วิทยทรัพยากร

1.5.5 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดร่วมกับปฏิกิริยาการสลายตัวอื่นแทบทุกแบบ เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้มักเรียกว่าฟอสฟาเทส (phosphatase) หรืออาจเรียกตามชื่อของสารที่ถูกเปลี่ยนแปลง เช่น พาราออกซอนเนส (paraoxonase) เป็นต้น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโดยเอนไซม์ เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญที่สุดในการทำให้ออร์กาโนฟอสเฟตหมดฤทธิ์ ขณะที่ในปฏิกิริยาการเกิดพิษจะเกิดขึ้น เมื่อกลุ่มฟอสฟอริลถูกย้ายไปให้แก่กลุ่มซีรีน-แอลกอฮอล์ (serine-alcohol group) ในเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (cholinesterase) ปฏิกิริยาทั้งสองจะแข่งขันกัน ฤทธิ์ของยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟตจะสูงสุดเมื่อยาฆ่าแมลงเข้าสู่ร่างกาย และขนส่งภายในร่างกายในภาพที่ไม่ไวต่อการเกิดไฮโดรไลซิสที่ทำให้หมดฤทธิ์ และยาฆ่าแมลงในภาพที่ถูกขนส่งควรถูกเปลี่ยนแปลงเป็นภาพที่ออกฤทธิ์ที่จุดออกฤทธิ์ (site of action)

1.5.6 ปฏิกิริยาคอนจูเกชัน (conjugation) เป็นปฏิกิริยาที่นำไปสู่การเกิดสารไร้พิษซึ่งละลายน้ำได้และจะถูกกำจัดออกจากสัตว์หรือสะสมไว้ในพืช

**1.6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต**

ระบบประสาทโดยสังเขปของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) ระบบประสาทส่วนกลางประกอบด้วยสมองและไขสันหลัง ทำหน้าที่เป็นระบบกลางในการผสมผสาน (integration) โดยใช้เซลล์ประสาทจำนวนล้านๆเซลล์ ส่วนระบบประสาทส่วนปลายประกอบด้วยระบบย่อย คือ ระบบโซมาติค (somatic system) ซึ่งเป็นระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนไหว โดยมีการทำงานของกล้ามเนื้อสนองตอบการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม และระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ซึ่งควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้ออวัยวะภายในและต่อมต่างๆ ระบบนี้ถูกควบคุมโดยระบบย่อยสองระบบซึ่งออกฤทธิ์ตรงข้ามกันและสิ่งมีชีวิตไม่สามารถบังคับได้ (involuntary) ระบบย่อยดังกล่าวได้แก่ ระบบประสาทซิมปาเธติค (sympathetic nervous system) และระบบพาราซิมปาเธติค (parasympathetic nervous system)

ระบบซิมปาเธติคประกอบด้วยปุ่มประสาท (ganglia) ขนาดใหญ่ต่อกันอยู่นอกระบบประสาทส่วนกลาง แบ่งออกเป็นช่วงๆ โดยสัญญาณจะส่งผ่านช่องว่างซินแนปส์ที่อยู่บริเวณปุ่มประสาท (synaptic gaps) โดยสื่อเคมีอะซิติลโคลีน เส้นประสาทในช่วงที่ต่อจากสมองส่วนกลางมายังปุ่มประสาทซึ่งเราเรียกว่าเส้นประสาทแอคซอนก่อนปุ่มประสาท (preganglionic axon) เส้นประสาทในช่วงที่ต่อจากปุ่มประสาทไปยังอวัยวะ เช่น กล้ามเนื้อหรือต่อม เราเรียกว่าเส้นประสาทแอคซอนหลังปุ่มประสาท (postganglionic axon) ซึ่งสื่อเคมีแอดรีนะลิน (adrenaline) หรือนอร์แอดรีนะลิน (noradenaline) เป็นสารสื่อสัญญาณส่งผ่านช่องว่างซินแนปส์ไปยังกล้ามเนื้อหรือต่อม (ยกเว้นต่อมเหงื่อและต่อมแอดรีนัล (adrenals) ซึ่งใช้สื่อเคมีอะซิติลคอลีน) ส่วนระบบ

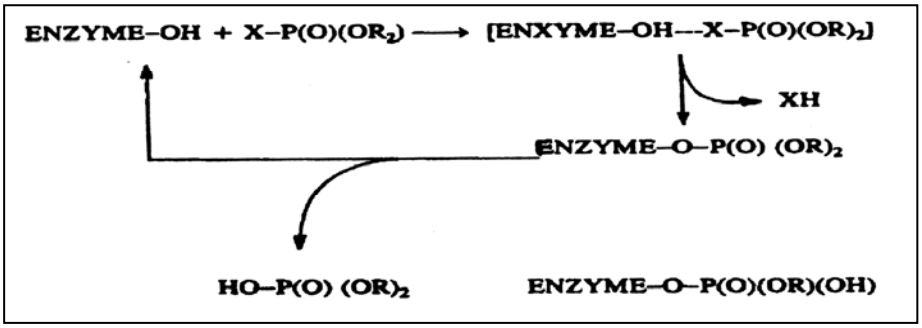
มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

พาราซิมปาเธติคจะมีขนาดของปุ่มประสาทเล็กกว่ากระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ส่วนมากมักพบทางด้านขวาของอวัยวะต่างๆ จึงทำให้เส้นประสาทแอคซอนหลังปุ่มประสาทสั้นกว่า ระบบพาราซิมปาเธติคมีสารสื่อประสาททั้งก่อนและหลังปุ่มประสาทเป็นอะซิติลคอลีน

ตัวอย่างการควบคุมซึ่งตรงกันข้ามกับระบบซิมปาเธติคและพาราซิมปาเธติค เช่น ระบบซิมปาเธติคทำให้เกิดการเร่งการเต้นของหัวใจ การลดการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร การหรี่ม่านตา การหยุดยั้งการหลั่งน้ำลาย ในขณะที่ระบบพาราซิมปาเธติคทำให้การเต้นของหัวใจช้าลง เพิ่มการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร เป็นต้น ในการที่สื่อเคมีอะซิติลคอลีนจะทำหน้าที่ในการสื่อสัญญาณได้นั้น สื่อเคมีอะซิติลคอลีนซึ่งจัดทางเคมีอยู่ในพวกเอสเทอร์จะต้องถูกย้ายไปที่อื่นหรือถูกทำให้หมดฤทธิ์ลงภายในเวลาอันรวดเร็วระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของแหล่งออกฤทธิ์ ในส่วนของเหลวและเนื้อเยื่อของร่างกาย มีเอนไซม์ซึ่งเรียกว่าเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase หรือ AChE) สามารถไฮโดรไลส์อะซิติลคอลีนให้เป็นคอลีนและกรดอะซิติคพบว่าสารซึ่งมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสเกือบทั้งหมดออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสนี้

ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตจะออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรส ดังแสดงในภาพที่ 12 โดยในขั้นแรกเอนไซม์จะจับกับสารประกอบออร์กาโนฟอสเฟตในภาพของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible complex) จากนั้นเอนไซม์จะถูกฟอสฟอรีเลท (phosphorylated) แล้วปล่อย (leaving group) สารประกอบออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้ระยะเวลานาน และในขั้นสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้เอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสและฟอสเฟต เนื่องจากในขั้นตอนเหล่านี้ใช้ระยะเวลานานในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลคอลีนที่ซินแนปส์ของเส้นประสาท ดังนั้นจึงทำให้เกิดการกระตุ้นปลายประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมากในกรณีรุนแรงจะทำให้สิ่งมีชีวิตถึงแก่ชีวิตได้ (Perry et *al*., 1998)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์




ภาพที่ 12 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสโดยสารประกอบออร์กาโนฟอสเฟต

ที่มา : Perry et *al*., 1998

**1.7 อาการพิษของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต**

1.7.1 อาการแบบมัสคารินิค (muscarinic signs and symptoms) จุดรับสัมผัสมัสคารินิค (muscarinic receptors) สำหรับอะซิติลคอลีนพบส่วนใหญ่ที่กล้ามเนื้อเรียบ หัวใจและต่อมมีท่ออาการที่เกิดขึ้นในระยะแรกคือ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน น้ำตาไหล เหงื่อออก ม่านตาหดตัว ถ่ายอุจจาระและปัสสาวะโดยกลั้นไม่อยู่ การเกร็งของหลอดลม หลอดลมมีเมือกและเสมหะมาก เป็นต้น

1.7.2 อาการแบบนิโคตินิค (nicotinic signs and symptoms) อาการแบบนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการสะสมของอะซิติลคอลีนที่ปลายประสาทมอเตอร์และที่ซินแนปส์ของระบบประสาทอัตโนมัติ อาการที่เกิดขึ้นคือกล้ามเนื้อถูกกระตุ้นมากกว่าปกติ มีการกระตุกของกล้ามเนื้อที่หน้าหนังตา ลิ้น ถ้าอาการรุนแรงขึ้นจะพบว่ากระตุกมากขึ้นทั่วร่างกาย ต่อมาจึงจะมีอาการอ่อนเพลียตามกล้ามเนื้อทั่วไป และเกิดเป็นอัมพาตของกล้ามเนื้อในที่สุด

1.7.3 อาการทางสมอง เนื่องจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง อาการที่พบได้แก่ มึนศีรษะ ปวดศีรษะ งง และกระสับกระส่าย ตื่นตกใจง่าย อารมณ์พลุ่งพล่าน ถ้าอาการมากอาจชักและหมดสติได้ ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากอาจถึงตายได้เนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว (respiratory failure) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากหลอดลมตีบตัน กล้ามเนื้อของระบบหายใจเป็นอัมพาต และศูนย์การควบคุมการหายใจในสมองหยุดทำงาน ในรายที่มีอาการไม่รุนแรงนักอาการจะดีขึ้นใน 2-3 วัน แต่จะอ่อนเพลีย ไม่มีแรงเป็นเวลานาน (พาลาภ สิงหเสนี, 2531)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**1.8 ผลกระทบของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตต่อสิ่งแวดล้อม**

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 320 ล้านไร่ ประชากรประมาณร้อยละ 70 มีอาชีพทางการเกษตร และมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 128 ล้านไร่ เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์สูตร ภูมิอากาศร้อนชื้น ฝนตกชุก มีความเหมาะสมสำหรับโรคและแมลงที่จะแพร่ขยายพันธุ์ได้อย่างดี ทั้งชนิดและปริมาณ การแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่ปฏิบัติกันอยู่อย่างแพร่หลายในปัจจุบันของเกษตรกร คือ การใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในการป้องกันและกำจัดโรค แมลงและวัชพืช ทำให้มีแนวโน้มการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชสูงขึ้นทุกปี สารกำจัดแมลงที่นิยมใช้กันมากในประเทศไทย โดยมีปริมาณนำเข้าสูงสุด 10 ชนิดแรกในปี พ.ศ. 2530 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อสารกำจัดแมลงนำเข้าในปี พ.ศ. 2530 ที่มีปริมาณสูงสุด 10 ชนิดแรก
ที่มา : นวลศรี ทยาพัชร, 2533

| Type of Insecticide | Quantity (kg) | Value (Bath) |
|---|---|---|
| 1. Methyl parathion | 1 538 599 | 83 927 568 |
| 2. Monocrotophos | 951 043 | 96 042 709 |
| 3. Methamidophos | 417 452 | 45 273 444 |
| 4. Dimethoate | 415 650 | 34 131 532 |
| 5. Methomyl | 358 296 | 130 693 483 |
| 6. Malathion | 309 354 | 17 965 900 |
| 7. Carbaryl | 242 150 | 25 006 268 |
| 8. Mevinphos | 240 691 | 18 803 315 |
| 9. Carbofuran | 204 661 | 71 077 271 |
| 10. Ethyl parathion | 174 038 | 34 131 532 |
| Other (58 types) | 1 821 361 | 207 920 359 |
| Total | 6 673 295 | 764 937 381 |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ปัญหาเกี่ยวกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในสิ่งแวดล้อมนั้นมิได้เกิดขึ้นเฉพาะพื้นที่ที่มีการใช้สารเหล่านี้เท่านั้น แต่สามารถแพร่กระจายและตกค้างในบริเวณกว้างได้ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาเริ่มจากสารพิษตกค้างในดินและลำต้นพืชหลังจากการฉีดพ่นจะเกิดการสะสมส่วนหนึ่ง บางส่วนฟุ้งกระจายในบรรยากาศ และบางส่วนซึมลงไปในดิน ส่วนใหญ่จะถูกฝนชะแล้วพัดพาไปกับน้ำหน้าดินไหลลงสู่แหล่งน้ำ จากนั้นจะเกิดการถ่ายทอดสารเหล่านี้ผ่านห่วงโซ่อาหารเข้าสู่สิ่งมีชีวิตต่างๆต่อไป

1.8.1 การแพร่กระจายของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในดิน

ในการเพาะปลูกพืชนั้น เกษตรกรส่วนใหญ่ต้องใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้งก่อนปลูก ขณะที่พืชกำลังเติบโตและก่อนการเก็บเกี่ยว ดินจึงเป็นแหล่งรองรับสารเหล่านี้โดยตรง นอกจากนี้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชบางชนิดยังนิยมใช้ในอาคารบ้านเรือนด้วยทำให้โอกาสที่สารเหล่านี้จะสะสมในดินจึงมีมากยิ่งขึ้น สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างอยู่ในดินอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปในหลายลักษณะได้แก่

1.8.1.1 การสลายตัวโดยปฏิกิริยาทางเคมี (chemical decomposition)

1.8.1.2 การสลายตัวโดยแสง (photodegradation)

1.8.1.3 การสลายตัวโดยถูกจุลินทรีย์ย่อยสลาย (microbial degradation)

1.8.1.4 การระเหยจากดินสู่บรรยากาศ (volatilization)

1.8.1.5 การเคลื่อนย้ายไปสู่แหล่งน้ำ (movement into water)

1.8.1.6 การเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (plant or organism uptake)

จากการศึกษาปริมาณสารตกค้างของสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย ตรวจพบสารตกค้างในดินอยู่มากทั้งชนิดและปริมาณ กระจายไปตามดินเกษตรกรรมต่างๆ ทั่วประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระดับสารพิษตกค้างประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในดินเป็น ppm (mg/kg) จากแหล่งเกษตรกรรมทั่วประเทศ สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531
ที่มา : นวลศรี ทยาพัชร, 2533

| Organophosphate pesticide | No. of positive sample | % of positive sample | Concentration (ppm) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Range | Average |
| Dimethoate | 31 | 10.26 | tr – 0.051 | 0.016 |
| Diazinon | 49 | 63.64 | tr – 0.054 | 0.010 |
| Methyl parathion | 59 | 76.62 | tr – 0.475 | 0.023 |
| Malathion | 10 | 12.99 | tr – 0.009 | 0.004 |
| Parathion | 26 | 33.77 | tr – 0.018 | 0.005 |

Total 77 samples; tr = trace (less than 0.001 ppm)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

1.8.2 การแพร่กระจายของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำนั้นมาจากหลายสาเหตุดังต่อไปนี้

1.8.2.1 การฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง

1.8.2.2 การกัดชะดินของฝนและน้ำไหลบ่าหน้าดินผ่านพื้นที่ที่มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนลงสู่แหล่งน้ำ

1.8.2.3 การระบายน้ำทิ้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำโดยมิได้มีวิธีกำจัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

1.8.2.4 การทิ้งหรือล้างภาชนะที่บรรจุสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำ

1.8.2.5 การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในบริเวณพื้นที่การเกษตรใกล้กับแหล่งน้ำ

สำหรับประเทศไทย มีการตรวจสอบชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในแหล่งน้ำทั่วไปและแหล่งน้ำในแปลงเกษตรกรรมทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2530-2531 จำนวน 149 ตัวอย่าง พบสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 3 ชนิด โดยสารในกลุ่มนี้ที่พบมากที่สุดคือ เมทธิลพาราไธออนความเข้มข้น 0.68 ppb ดังแสดงในตารางที่ 4

นอกจากนี้ยังมีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินตะกอนจากแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ จำนวน 71 ตัวอย่าง ตรวจพบสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 5 ชนิด ได้แก่ ไดเมทโธเอท, ไดอะซีนอน, เมทธิลพาราไธออน, มาลาไธออนและพาราไธออน

ตารางที่ 4 ระดับสารพิษตกค้างประเภทออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป และแหล่งเกษตรกรรมเป็น ppb (μg/l) สำรวจและวิเคราะห์ผลระหว่างปี พ.ศ. 2530-2531
ที่มา : นวลศรี ทยาพัชร, 2533

| Organophosphate pesticide | No. of positive sample | % of positive sample | ppb (μg/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Range | Average |
| Dimethoate | 1 | 0.67 | tr-0.06 | 0.06 |
| Diazinon | 4 | 2.68 | tr-0.28 | 0.15 |
| Methyl parathion | 5 | 3.36 | tr-068 | ND |
| Matathion | 0 | 0 | ND | ND |
| Parathion | 0 | 0 | ND | ND |

Total 149 samples ND = Non detectable tr = trace (less than 0.01 ppb)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.8.3 การตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในพืชอาหาร

พืชสามารถรับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้หลายทาง เช่น การฉีดพ่นลงบนพืชโดยตรง พืชอาจดูดซึมจากดินหรือมากับน้ำ หรือจากสารพิษที่ปลิวอยู่ในอากาศ โดยส่วนใหญ่เกษตรกรมักใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินความจำเป็นจนเป็นอันตรายต่อพืชหรือเกิดการสะสมในพืชทำให้เกิดสารตกค้างในพืช

1.8.4 การตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสัตว์

สาเหตุที่สัตว์ได้รับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องจาก

1.8.4.1 สัตว์ได้รับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยตรงจากการฉีดพ่นเพื่อป้องกันหรือทำลายแมลงที่เป็นศัตรูพืช สัตว์สามารถรับสารเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ทางอาหาร ทางการหายใจและทางผิวหนัง ปริมาณสารที่สัตว์ได้รับเข้าไปนั้นอาจไม่มากพอที่จะทำอันตรายกับสัตว์ แต่ก็อาจเกิดการสะสมในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของสัตว์ได้

1.8.4.2 สัตว์ได้รับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยทางอ้อม กล่าวคือสัตว์กินอาหารตามลำดับขั้นในห่วงโซ่อาหาร ถ้าผู้ผลิตหรือพืชมีสารพิษตกค้างอยู่สัตว์จะได้รับสารพิษและสะสมในร่างกายได้ โดยเฉพาะในสัตว์น้ำที่มีการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจะสามารถสะสมสารพิษได้จากห่วงโซ่อาหารของแหล่งน้ำนั้น ได้มีผู้รายงานถึงความเป็นพิษเฉียบพลันของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตต่อปลา ได้แก่ อาการว่ายน้ำรวดเร็วอย่างผิดปกติ อาการชักกระตุก เป็นต้น ปลาบลูกิล (bluegill, *Lepomis macrochirus*) ที่ได้รับยาฆ่าแมลงมาลาไธออน จะมีลักษณะกางครีบจนสุดก่อนตาย และปลาที่ได้รับยาฆ่าแมลงชนิดนี้ขนาดต่ำเพียง 10 ppm เป็นเวลานานๆ อาจให้กำเนิดลูกที่มีความผิดปกติทางโครงสร้างของกระดูกสันหลังได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตมีพิษต่อผึ้งโดยทำให้น้ำและน้ำหวานซึ่งเป็นอาหารของผึ้งปะปนด้วยสารพิษ

1.8.5 การตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในมนุษย์

มนุษย์ก็เช่นเดียวกันกับสัตว์ทั้งหลายที่สามารถรับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ 2 ทาง คือ โดยทางตรงจากการฉีดพ่น ได้แก่ ผู้ที่เกี่ยวข้องกับสาร เช่น เกษตรกร ประชาชนที่ใช้สารเหล่านี้ตามบ้านเรือน หรือคนงานในโรงงานที่เกี่ยวข้องกับสารพิษ เมื่อได้รับสารเข้าไปในปริมาณมากพอก็จะแสดงอาการพิษได้อีกทางหนึ่งคือ โดยทางอ้อมจากการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีสารพิษเจือปนอยู่ เช่น บริโภคข้าว ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ ไข่ เป็นต้น (พาลาภ สิงหเสนี, 2531; นวลศรี ทยาพัชร, 2533)

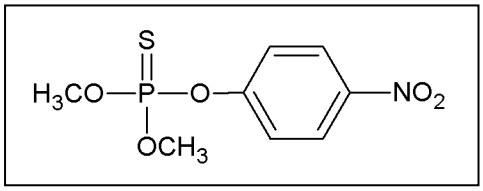
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

**2. เมทธิลพาราไธออน (Methyl Parathion)**

**2.1 การบ่งชี้ลักษณะและคุณสมบัติ (Identification and Properties)**

เมทธิลพาราไธออนเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ชนิดหนึ่งมีชื่อทางเคมี (chemical name) หลายชื่อได้แก่ *o,o*-dimethyl-*o*-(4-nitrophenyl) ester หรือ *o,o*-dimethyl-*o*-*p*-nitrophenyl phosphorothiate หรือ phosphorothioic acid หรือ *o,o*-dimethyl-*o*-4-nitrophenyl phosphorothiate (IUPAC systematic name) นอกจากนี้ยังมีชื่ออื่นๆ (synonyms) อีก เช่น alenthione, Bayer E-601, carthion M, demethylfenitrothion dimethyl parathiofolidol-M, malatyr, demethylfenitrothion dimethyl parathion, folidol-M, metacid, methaphos, methylfolidol, nitrox, vofatox และชื่อทางการค้า (trade name) เช่น A-Gro, Folidol M, Metacide, Methyl-E 605, Metron, M-Parathion, Nitrox, Paratox, Paridol, Vofatox, Wofatox

สูตรโมเลกุลของเมทธิลพาราไธออน คือ $C_8H_{10}O_5NSP$ และมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 13




ภาพที่ 13 สูตรโครงสร้างของเมทธิลพาราไธออน

เมทธิลพาราไธออนที่บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกไม่มีสี มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 263.22 มีจุดหลอมเหลว (melting point) ที่อุณหภูมิ 35-36 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด (boiling point) ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 1 มิลลิเมตรของปรอท สามารถละลายได้ดีในสารอินทรีย์ทุกชนิด เสถียร (stability) ในสภาพสารละลายที่เป็นกลางและกรดที่อุณหภูมิปกติ แต่จะถูกไฮโดรไลส์ (hydrolyze) โดยด่างและสลายตัวเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (พรพิมล เจริญส่ง, 2533)

**2.2 กรรมวิธีการผลิตและการนำไปใช้ (Production Processes and Uses)**

ในวงการอุตสาหกรรมเมทธิลพาราไธออนได้จากปฏิกิริยาของ dimethyl chlorothiophos-phate กับ *p*-nitrophenol โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา คือ hydrogen chloride หรือ sodium *p*-nitrophenolate ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในน้ำในภาพของสารที่จับตัวกับน้ำและน้ำมันได้ดี (emulsifier) ตัวอย่างเช่น ammonium naphthenate หรือ amines หรือสารละลายอินทรีย์

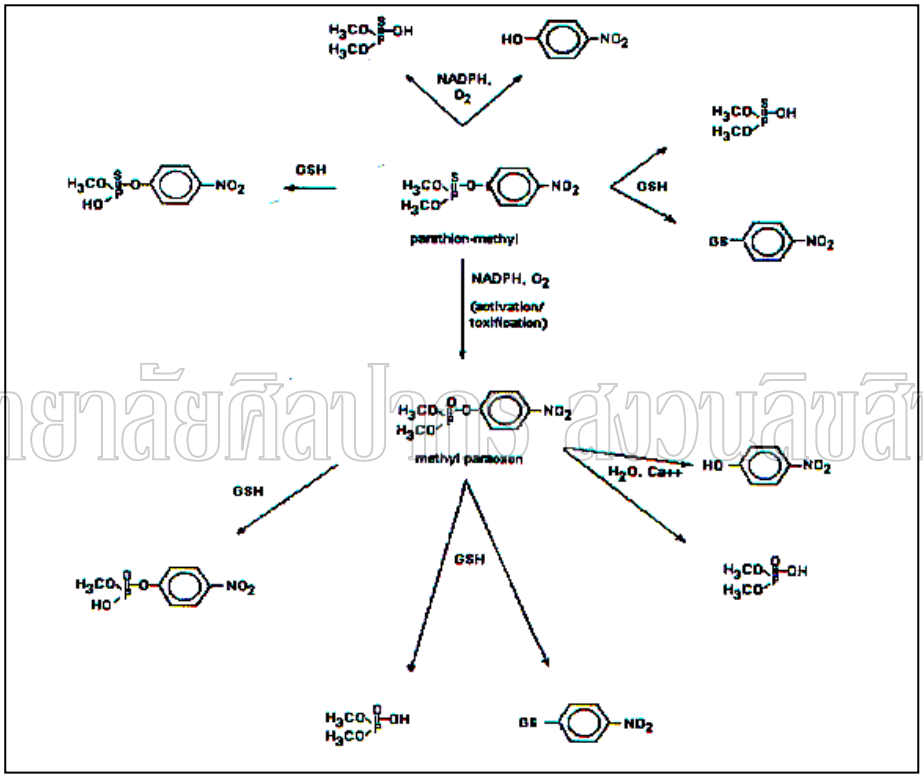
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สงวนลิขสิทธิ์

เมทธิลพาราไธออนเป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้ในทางการเกษตรได้อย่างกว้างขวาง โดยมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดทั้งประเภทปากดูดหรือปากกัด (sucking and biting) โดยเฉพาะด้วงงวงเจาะสมอฝ้าย (cotton bollweevil) นอกจากนี้ยังใช้กำจัดแมลง หมัด ไร หนอนผีเสื้อ หนอนกอชนิดต่างๆ หนอนม้วนใบ หนอนกระทู้ หนอนใยผัก หนอนคืบ หนอนกัดกินใบ แมลงชนิดที่มีปากดูด ได้แก่ เพลี้ยชนิดต่างๆ แมลงชนิดอื่นๆ เช่น บั่ว ด้วงดีด มวนต่างๆ และแมลงหวี่ขาว เมทธิลพาราไธออนถูกนำไปใช้ในพืชสวน ส้ม กาแฟ ชา องุ่น พืชไร่ แตงโม ยาสูบ อ้อย ฝ้าย สับปะรด ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ธัญพืช สตรอเบอรี่ มันฝรั่ง พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วลิสง พืชผักและไม้ดอก ไม้ประดับทั่วไป (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

**2.2 กระบวนการเมตาบอลิซึม และการขับถ่ายในสิ่งมีชีวิต (Metabolism and Excretion)**

สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึมเมทธิลพาราไธออนผ่านปาก ผิวหนังและการหายใจ โดยจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปตามเนื้อเยื่อของร่างกาย ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง หลังจากได้รับสาร การเปลี่ยนเมทธิลพาราไธออนเป็นเมทธิลพาราออกซอน (methylparaoxon) เกิดขึ้นภายในเวลาไม่กี่นาทีหลังจากได้รับสาร และกระบวนการกำจัดพิษ (metabolism and

detoxification) จากเมทธิลพาราไธออนและเมทธิลพาราออกซอนจะเกิดขึ้นที่ตับเป็นส่วนใหญ่ โดยปฏิกิริยา oxidation, hydrolysis และ demethylation หรือ dealkylation ด้วยการรีดิวซ์ (reduce) glutathione (GSH) ได้เป็น *o*-methyl-*o*-*p*-nitrophenyl phosphorothioate หรือ dimethyl phosphorothioic และพาราไนโตรฟีนอล ดังแสดงในภาพที่ 14 ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบปริมาณเมทธิลพาราไธออนที่ได้รับ จากปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ถูกขับออกมากับปัสสาวะ โดยพบว่าพาราไนโตรฟีนอลจะถูกขับออกมาร้อยละ 60 ภายใน 4 ชั่วโมง และขับออกมาทั้งหมดภายใน 24 ชั่วโมง




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 14 กระบวนการเมตาบอลิซึมของเมทธิลพาราไธออนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
ที่มา : พรพิมล เจริญส่ง, 2533

### 2.3 ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian Toxicity)

ฝุ่นผงเมทธิลพาราไธออนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์โดยการสูดดมเข้าไปในปริมาณความเข้มข้นของเมทธิลพาราไธออนเท่ากับ 0.4-11 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งจะมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ลดลงหลายวัน

2.3.1 อาการได้รับพิษอย่างเฉียบพลันจากเมทธิลพาราไธออน แยกได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ ตามกลไกการออกฤทธิ์ที่เกิดขึ้นดังนี้

2.3.2.1 ฤทธิ์มัสคารินิค มีผลมาจากการกระตุ้น M-cholinergic receptor เป็นการกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาเธติค มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัวที่ระบบทางเดินอาหาร มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งในท้องและท้องเดิน น้ำลายออกมากผิดปกติ เหงื่อออก สำหรับระบบการหายใจมีอาการแน่นในอก หายใจมีเสียงหวีด มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจทำให้เต้นช้าลง ความดันโลหิตต่ำ และรูม่านตาหด

2.3.2.2 ฤทธิ์นิโคตินิค มีผลมาจากการกระตุ้น N-cholinergic receptor เป็นการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเธติคและกล้ามเนื้อลาย ทำให้มีฤทธิ์ตรงข้ามกับการกระตุ้นระบบพาราซิมพาเธติค ซึ่งอาการของผู้ได้รับพิษที่แสดงอาการซิมพาเธติค จะมีอาการหัวใจเต้นเร็ว รูม่านตาขยาย ความดันโลหิตสูงมีการกระตุกของกล้ามเนื้อบริเวณเปลือกตา ใบหน้าและคอ กล้ามเนื้ออ่อนแอ โดยในระยะแรกจะแสดงอาการเด่นทางซิมพาเธติค แต่ต่อมาจะแสดงอาการเด่นทางพาราซิมพาเธติค ส่วนการกระตุ้นกล้ามเนื้อที่บริเวณ motor end plate ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนกำลังในที่สุดจะเกิดอัมพาตโดยเฉพาะกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจ

2.3.2.3 ฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง อาจมีผลมาจากการกระตุ้นระบบ central M-cholinergic ทำให้มีอาการวิงเวียน ความคิดฟุ้งซ่าน การเคลื่อนไหวเปะปะ พูดไม่ชัด การหายใจผิดปกติ ไม่มีปฏิกิริยาโต้ตอบต่อสิ่งกระตุ้น มีการกระตุกของกล้ามเนื้อ การชักเกร็งของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง มีการสับสนทางจิต ชัก อาการโคม่า และหมดสติ

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สงวนลิขสิทธิ์

2.3.2 ส่วนอาการที่ได้รับพิษจากเมทธิลพาราไธออน อาจแยกประเภทตามความรุนแรงของอาการได้ 3 ประเภท คือ

2.3.2.1 อาการขั้นเล็กน้อย ผู้ป่วยยังพอที่จะเคลื่อนไหวได้โดยไม่ต้องรับความช่วยเหลือมักแสดงอาการคลื่นเหียน น้ำลายออกมากผิดปกติ น้ำตาไหล อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง ไม่อยากรับประทานอาหาร อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ทรงตัวลำบาก ในทางตรงกันข้ามอาจมีอาการง่วงนอน กล้ามเนื้อบิด เหงื่อออกมาก การหายใจผิดปกติ หัวใจเต้นช้าสลับกับเต้นเร็ว หายใจมีเสียงหวีด เนื่องจากเมทธิลพาราไธออนมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรส ในเม็ดเลือดแดงและการทำงานของเอนไซม์คอลีนเอสเทอเรส (cholinesterase) ในซีรั่มของเลือดลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวสามารถกลับสู่สภาวะปกติได้อย่างรวดเร็วในกรณีที่การได้รับพิษอยู่ในขั้นเล็กน้อย

2.3.2.2 อาการขั้นปานกลาง ผู้ป่วยไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจะแสดงลักษณะต่างๆ ที่บริเวณระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติ อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบหายใจ ระบบที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด และระบบทางเดินอาหาร ผู้ป่วยมักแสดงอาการน้ำลายออกมากผิดปกติ อาเจียนมีอาการเสียดท้อง (โดยเฉพาะ

บริเวณสะดือ) ท้องร่วงและเหงื่อออกมาก กล้ามเนื้อบิด มือสั่น ตากระตุก กล้ามเนื้อไม่ประสานงานกัน การหายใจลำบาก ความดันโลหิตสูง อุณหภูมิของร่างกายอยู่ในช่วง 37.2-38.8 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงและการทำงานของเอนไซม์คอลีนเอสเทอเรสในซีรั่มของเลือดมีเพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์

2.3.2.3 อาการขั้นรุนแรง ผู้ป่วยไม่สามารถเคลื่อนไหวและมีความสับสนทางจิตใจเกิดขึ้น จะแสดงอาการชักและเกิดความผิดปกติของระบบหายใจ กล้ามเนื้อบิดทั่วร่างกาย อัตราการหายใจมากกว่า 40 ครั้งต่อนาที บริเวณปลายแขนขาเขียวเนื่องจากการขาดออกซิเจน ปฏิกิริยาโต้ตอบต่อสิ่งกระตุ้นเกิดขึ้นอย่างแผ่วเบา อุณหภูมิในร่างกายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 39 องศาเซลเซียส การถ่ายอุจจาระและปัสสาวะเกิดขึ้นโดยไม่รู้ตัว ม่านตาหรี่ การทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดง และการทำงานของเอนไซม์คอลีนเอสเทอเรสในซีรั่มของเลือดจะลดลงหรือถูกยับยั้งอย่างสิ้นเชิง การได้รับพิษอย่างเฉียบพลันของเมทธิลพาราไธออนเป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้งการทำงานของอะซิติลคอลีนเอสเทอเรสตรงบริเวณปลายประสาท ซึ่งจะทำให้การสะสมของอะซิติลคอลีน อาการที่ปรากฏได้แก่ เหงื่อออก มีน้ำลายไหล ท้องร่วง อาการโคม่าและตายเนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

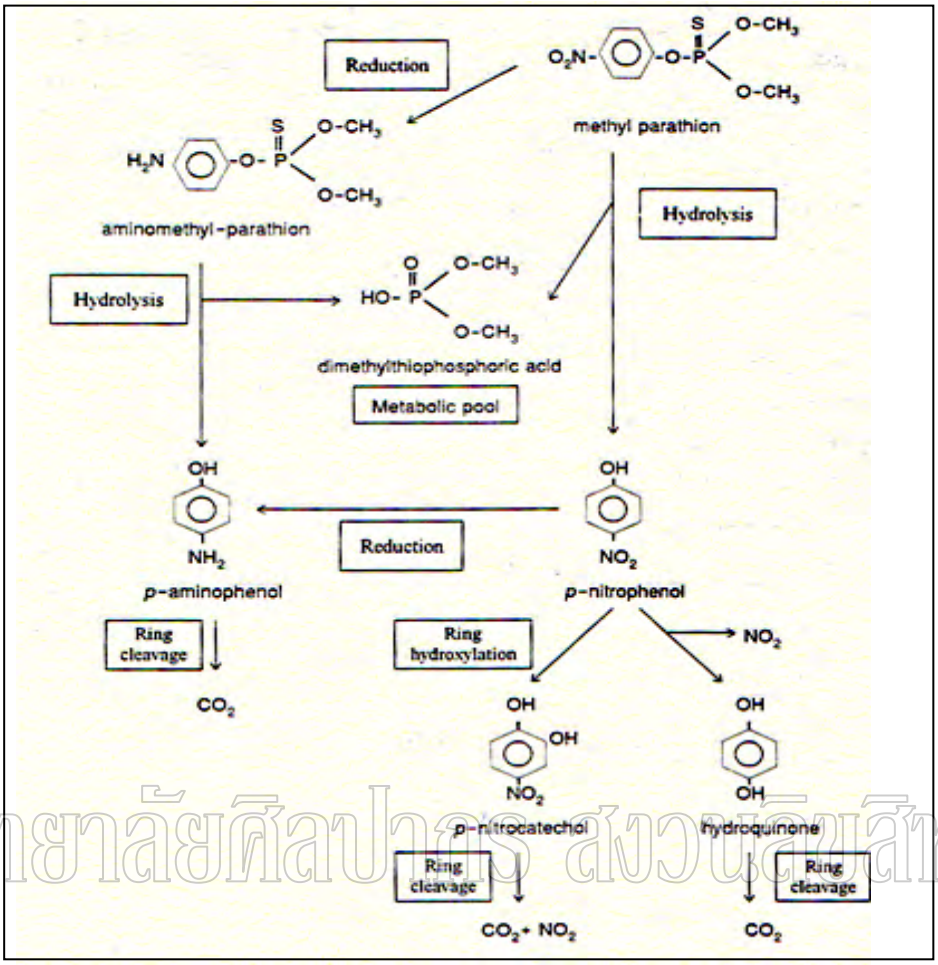
**2.4 การทดสอบความเป็นไปในสิ่งแวดล้อม (Environmental Fate Tests)**

2.4.1 การย่อยสลายโดยชีววิธีและการเปลี่ยนภาพโดยชีววิธี (Biodegradation and Biotransformation)

เมทธิลพาราไธออนสามารถสลายตัวได้ด้วยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน ซึ่ง pathway ในการย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนของจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ดังแสดงในภาพที่ 15

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเมทธิลพาราไธออนเกิดที่พันธะ nitrophenyl (C-O-P) แล้วได้ผลผลิตเป็นพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) และกรดไดเมทธิลไธโอฟอสฟอริค (dimethyl thiophosphoric acid) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของพาราไนโตรฟีนอลได้เป็นไนไตรท์ (nitrite) และไฮโดรควิโนน (hydroquinone) หรือพาราไนโตรเคทิคอล (*p*-nitrocatechol)

ปฏิกิริยารีดักชั่นของเมทธิลพาราไธออนเกิดที่กลุ่มไนโตร (nitro group) ได้เป็นอะมิโนเมทธิลพาราไธออน (aminomethyl-parathion) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลส์ต่อไปได้พาราอะมิโนฟีนอล (*p*-aminophenol) และกรดไดเมทธิลไธโอฟอสฟอริค แต่อย่างไรก็ตาม พาราไนโตรฟีนอลซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ (metabolite) ของเมทธิลพาราไธออนในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถถูกรีดิวซ์เป็นพาราอะมิโนฟีนอลในสภาวะไร้อากาศ (Keprasertsup, 1995)




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 15 proposed pathways ของเมทธิลพาราไธออนในจุลินทรีย์โดยทั่วไป

ที่มา: Keprasertsup, 1995

2.4.2 การย่อยสลายโดยแสง (Photodegradation)

เมทธิลพาราไธออนถูกย่อยสลายเป็นกรดไดเมทธิลไธโอฟอสฟอริค พาราไนโตรฟีนอล และเมทธิลพาราออกซอนในสภาพแวดล้อม หลังจาก 8 ชั่วโมงไปแล้ว กระบวนการเกิดเมทธิลพาราออกซอนโดยอาศัยแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดเพิ่มขึ้น

2.4.3 การแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำ (Hydrolysis)

การแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำของเมทธิลพาราไธออนขึ้นกับค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ณ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 175 วัน ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 1-5 ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 5 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ และเมื่อพีเอชเท่ากับ 12 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาเพียง

12 ชั่วโมงเท่านั้น ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 6-7 และ 9 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำเพียง 6.9 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ

อัตราการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำโดยด่าง (alkali) ของเมทธิลพาราไธออนเท่ากับ 4.3 ซึ่งสูงกว่าพาราไธออน ครึ่งชีวิต (half-life) ของเมทธิลพาราไธออนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในเอทานอลซึ่งมีพีเอชเท่ากับ 6.0 และในสารละลายบัฟเฟอร์ (1:4) มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 8.4 ชั่วโมง

จากการศึกษาของ Douglas M. Munnecke (1980) พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้จากแบคทีเรียทำให้เกิดการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำได้อย่างรวดเร็วกว่าการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำด้วยสารเคมีโดยที่ครึ่งชีวิตของสารละลายสูตรผสมเจือจางของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ อยู่ในช่วง 27-80 ชั่วโมง และการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวไม่ถูกขัดขวางโดยผงซักฟอกและองค์ประกอบตัวทำละลายที่เป็นสูตรผสมทางการค้า

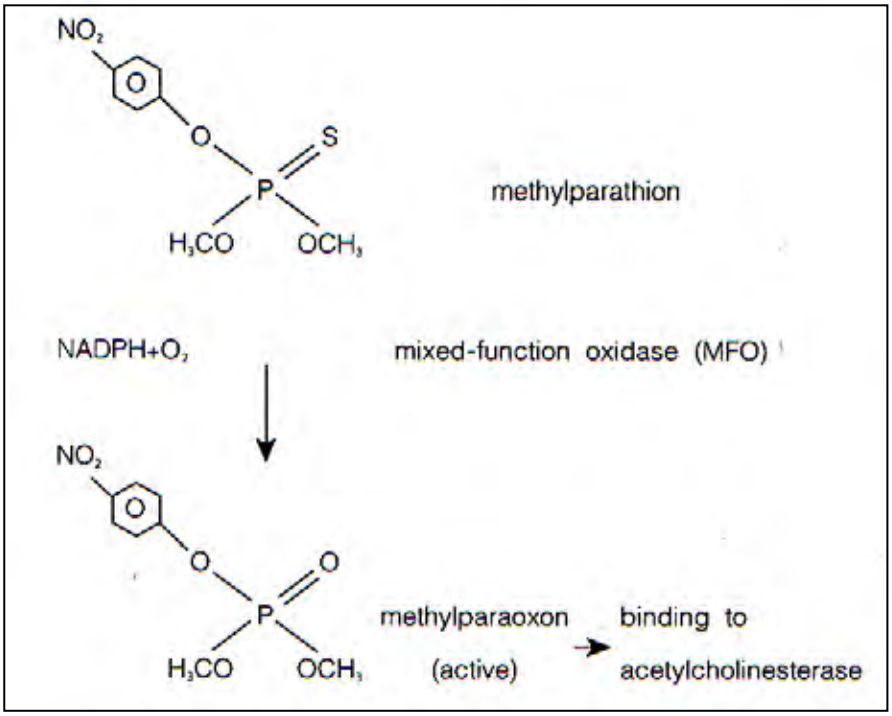
2.4.4 การกลายเป็นไอ (Evaporation)

การกลายเป็นไอจากพื้นผิวดินของเมทธิลพาราไธออนขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของเมทธิลพาราไธออนในดิน และอัตราการเคลื่อนย้ายอากาศเหนือผิวดิน ดัชนีการกลายเป็นไอเท่ากับ 4 หรืออัตราการกลายเป็นไอเท่ากับ 7-14 กิโลกรัมต่อพื้นที่ 1 เฮคตาร์ต่อปี

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

2.4.5 การเกิดการออกซิเดชั่น (Oxidation)

การเกิดการออกซิเดชั่นเป็นการลดกำมะถันที่รวมตัวอยู่ในเมทธิลพาราไธออน โดยลำพังแล้วเมทธิลพาราไธออนไม่สามารถกระตุ้นฤทธิ์ (active) ได้ ต้องอาศัยการกระตุ้นฤทธิ์จากระบบเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนเป็นออกซิไดส์ (mixed-function oxidases: MFO) ซึ่งปรากฏในร่างกายของแมลง สัตว์ทดลองและคน ระบบเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ในไมโครโซม (microsome) และต้องอาศัย NADPH และออกซิเจน ($O_2$) ในการทำงานด้วย ดังภาพที่ 16




ภาพที่ 16 การกระตุ้น (activation) ของเมทธิลพาราไธออนให้เปลี่ยนเป็น active metabolite ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ acetylcholinesterase และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
ที่มา: พรพิมล เจริญส่ง, 2533

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลงวันลิขสิทธิ์

**2.5 การแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม (Environmental Exposure)**

การกระจายของเมทธิลพาราไธออนในอากาศ น้ำ ดิน และสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม มักเกิดขึ้นจากปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ การแพร่กระจายของเมทธิลพาราไธออนในอากาศส่วนใหญ่เกิดจากการฉีดพ่น ทำให้ละอองฟุ้งกระจาย และการระเหยของน้ำจากใบไม้และผิวดิน พบว่าระดับเมทธิลพาราไธออนในชั้นบรรยากาศบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรมีค่าสูงสุดประมาณ 70 นาโนกรัมต่อตารางเมตร และลดลงสู่ระดับปกติเมื่อผ่านไป 9 วัน

จากการศึกษาระดับเมทธิลพาราไธออนในดิน พบว่าเมทธิลพาราไธออนสามารถคงสภาพในดินได้นานกว่าในอากาศหรือในน้ำ โดยระยะเวลาที่อยู่ในดินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของดิน เช่น เมทธิลพาราไธออนในดินทรายจะสลายได้เร็วกว่าในดินเหนียว การย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนในสัตว์และการขับถ่ายของเสียเกิดขึ้นภายในเวลาสั้นๆ อย่างไรก็ตามกระบวนการเหล่านี้จะเกิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีกได้รวดเร็วกว่าสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แนวทางการย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนในสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดคือการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถ

ย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้ โดยมีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้
ที่มา : ดัดแปลงจาก Chaudhry, 1994

| Compound | Microorganism |
|---|---|
| parathion | *Bacillus*<br>*Arthrobacter*<br>*Flavobacterium* sp. ATCC 27551<br>*Pseudomonas* sp. ATCC 29353<br>*Pseudomonas* spp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Pseudomonas* strain CTP-01<br>*Pseudomonas diminuta* MG<br>*Pseudomonas* sp.<br>Strain SC |
| Methyl parathion | *Pseudomonas* sp.<br>*Pseudomonas* sp. isolate 50541<br>*Flavobacterium* sp. ATCC 27551<br>*Plesiomonas* sp. M6<br>*Burkholderia cepacia*<br>Aufwuchs |
| *p*-Nitrophenol | *Flavobacterium* sp.<br>*Pseudomonas* spp. PNP-1, 2, and 3<br>*Pseudomonas* sp. isolate 50445<br>*Moraxella* sp.<br>*Pseudomonas* strain 24 |

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

| | |
|---|---|
| Diazinon | *Flavobacterium* sp. ATCC 27551<br>*Pseudomonas* sp. ATCC 29353<br>*Pseudomonas* spp.<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Arthrobacter* sp. SB3 and SB4 |
| Isofenphos | *Arthrobacter* sp.<br>*Pseudomonas* sp. |
| Fenetrothion | *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 |
| Dichlorovos | *Pseudomonas aeruginosa* sp.<br>*Pseudomonas* sp. |
| Coumaphos | Isolates B-1, B-2, and B-3 |
| Mathidathion | *Bacillus coagulans* |

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

**2.6 ผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม (Effects on Organisms in the Environment)**

เมทธิลพาราไธออนเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่ใช้ป้องกันและกำจัดแมลง ซึ่งเกษตรกรนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยในปี พ.ศ. 2536 มีสถิติการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยสูงเป็นอันดับที่ 3 ของสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มเดียวกัน คิดเป็นปริมาณที่นำเข้า 1,117 ตัน หรือเป็นมูลค่ากว่า 70 ล้านบาท จากการที่มีการใช้เมทธิลพาราไธออนอย่างแพร่หลายเป็นเหตุให้ตรวจพบการปนเปื้อนและตกค้างอยู่ในผลิตผลทางการเกษตร เช่น พืช ผัก และผลไม้ชนิดต่างๆ รวมทั้งแหล่งในพื้นที่เพาะปลูก แหล่งน้ำธรรมชาติและดินเกษตรกรรมอยู่เสมอ (กรมวิชาการเกษตร, 2537)

สำหรับผลกระทบของเมทธิลพาราไธออนต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำพบว่าในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในน้ำ มีค่าความเป็นพิษของเมทธิลพาราไธออนในภาพของค่า $LC_{50}$ (lethal concentration คือ ความเข้มข้นของสารที่ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ศึกษาลดลง 50 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในช่วงน้อยกว่า 1-40 ไมโครกรัมต่อลิตร สัตว์จำพวกหอยมีค่า $LC_{50}$ อยู่ในช่วง 12-25 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ปลาทะเลและปลาน้ำจืดส่วนใหญ่ มีค่า $LC_{50}$ อยู่ในช่วง 6-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการฉีดพ่นเมทธิลพาราไธออนใกล้แหล่งน้ำ เช่น หนองน้ำ แม่น้ำ และทะเลสาบในสภาวะที่มีลมแรง สำหรับผลกระทบของเมทธิลพาราไธออนต่อสัตว์ปีก มีการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่าเมทธิลพาราไธออนมีค่าความเป็นพิษต่อนกในภาพของค่า $LD_{50}$ (lethal dose คือ ปริมาณสารพิษที่ใช้ต่อน้ำหนักของสิ่งมีชีวิตที่ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ศึกษาลดลง 50 เปอร์เซ็นต์) ที่ให้ทางปากอยู่ในช่วง 3-8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว สำหรับประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรได้ศึกษาสารพิษตกค้างในผักและผลไม้ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างผักและผลไม้ในท้องที่จังหวัดต่างๆ เช่น นครปฐม อ่างทอง นนทบุรี ปทุมธานีและชลบุรี เป็นต้น มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารตกค้างในผลิตผลเหล่านั้นพบว่าตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมดมีสารพิษตกค้างของยาฆ่าแมลงปนเปื้อนอยู่ประมาณร้อยละ 75 ของตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่าในตัวอย่างส้มที่นำมาวิเคราะห์ร้อยละ 12.8 ของตัวอย่างทั้งหมด มีปริมาณเมทธิลพาราไธออนเกินค่าความปลอดภัยที่กำหนดไว้ (ที่ปริมาณ 0.2 ppm) คิดเป็นร้อยละ 1.4 ของตัวอย่างทั้งหมด (กรมวิชาการเกษตร, 2538)

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างของผักและผลไม้ที่ตรวจพบสารพิษตกค้าง
ที่มา : กรมวิชาการเกษตร, 2538

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

| Commodity | No. of samples analysed | Samples found | |
|---|---|---|---|
| | | No. | (%) |
| Grape | 156 | 139 | 89.1 |
| Tangerine | 70 | 51 | 72.8 |
| Brassica | 15 | 5 | 33.3 |
| Cabbage | 123 | 51 | 41.5 |
| Cauliflower | 12 | 4 | 33.3 |
| Corn, baby | 26 | 5 | 19.2 |
| Cowpea | 30 | 8 | 26.7 |
| Cucumber | 20 | 8 | 40 |
| Ipomoea (morning glory) | 16 | 5 | 31.2 |
| Kale | 76 | 40 | 52.6 |
| Mushroom | 21 | 3 | 14.3 |
| Tomato | 26 | 6 | 23.1 |

ตารางที่ **7** ชนิดและปริมาณของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบในผักและผลไม้
ที่มา : กรมวิชาการเกษตร, 2538

| Commodity (No. of samples analyzed) | Pesticide | Range of residue (ppm) | Total found | Total violations | Codex MRL (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|
| Grape (156) | captan | <0.01-1.91 | 47 | | |
| | dimethoate | 0.01-0.07 | 26 | | |
| | methomyl | 0.01-1.07 | 29 | | |
| | monocrotophos | 0.02-1.58 | 117 | 40 | 0.2 |
| Tangerine (70) | dimethoate | 0.01-1.31 | 33 | | |
| | malathion | 0.03-1.07 | 10 | | 4 |
| | monocrotophos | 0.01-1.72 | | 7 | 0.2 |
| | parathion-methyl | 0.01-0.99 | 9 | 1 | 0.2 |

จากรายงานการวิจัยในแง่ต่างๆ ของเมทธิลพาราไธออน จะเห็นได้ว่าเมทธิลพาราไธออนเป็นยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตชนิดหนึ่งที่มีความเป็นพิษสูง สามารถซึมผ่านปากผิว หนังและการหายใจ หากได้รับในปริมาณมากอาจทำให้เสียชีวิตได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปได้ประกาศห้ามใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้ในพื้นที่การเกษตรแล้วก็ตามแต่ในประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทยยังมีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้อย่างแพร่หลาย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาหาวิธีย่อยสลายและลดการปนเปื้อนของเมทธิลพาราไธออนที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีการย่อยสลายยาฆ่าแมลงด้วยจุลินทรีย์ก็เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ราคาถูกที่สุดและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Munnecke *et al*., 1974) ดังนั้นในการศึกษาการแสดงออกและการผลิตแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ของยีนที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน และยาฆ่าแมลงชนิดอื่นๆ ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารพิษจากยาฆ่าแมลงใสิ่งแวดล้อมต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

### 3. เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (Keprasertsup *et al*., 2001)

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบมีภาพร่างเป็นท่อน โคโลนีมีลักษณะสีขาว ทึบแสง ขนาดเล็ก ต้องการอากาศในการเจริญ เติบโต

(aerobic bacteria) และให้ผลบวกกับปฏิกิริยาออกซิเดสและคะตาเลส (oxidase-positive and catalase-positive)

เชื้อแบคทีเรียตัวนี้แยกได้จากพื้นที่เกษตรกรรมในเขตตลิ่งชัน แขวงบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิห้อง (26±2 องศาเซลเซียส) และมีคุณสมบัติในการย่อยสลายและใช้ยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโต โดยเชื้อแบคทีเรียตัวนี้จะย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนเป็นพาราไนโตรฟีนอล นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลต่อไปได้อีกด้วย การเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็น (basal mineral medium, BMM) ที่มีเมทธิลพาราไธออนความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียจะสามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงได้หมดภายในเวลา 12-18 ชั่วโมง สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนจากสีเขียวปนเหลืองเป็นสีขาวขุ่นโดยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนเป็น membrane bound และมีการแสดงออกแบบเหนี่ยวนำ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียตัวนี้ยังสามารถย่อยสลายมาลาไธออนและไดเมโธเอทซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้อีกด้วย เนื่องจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ตัวนี้ยังสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาฆ่าแมลงเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และคณะ, 2543)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

**4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง**

ปัจจุบันมีการใช้ยาฆ่าแมลงในพื้นที่เกษตรกรรมอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการตกค้างของยาฆ่าแมลงซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีการศึกษาวิธีการย่อยสลายยาฆ่าแมลงด้วยจุลินทรีย์ (microbial degradation) เนื่องจากจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ มากมาย เพราะมันมีความหลากหลายในกระบวนการเมตาบอลิซึมและมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างออกไปได้

ในปี ค.ศ. 1973 มีรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. จากดินที่น้ำท่วมที่มียาฆ่าแมลงพาราไธออน ซึ่งเชื้อทั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยสลายพาราไธออนได้ โดยพบว่า *Bacillus* sp. จะย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลซึ่งเป็นผลที่ได้จากการย่อยสลายพาราไธออนได้เป็นไนเตรต ส่วนแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จะย่อยสลายพาราไธออนได้เป็น พาราไนโตรฟีนอล จากนั้นจะย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้เป็นไนเตรต (Siddaramappa *et al.*, 1973)

ในปี ค.ศ. 1974 มีการศึกษาการย่อยสลายยาฆ่าแมลงพาราไธออนและพาราไนโตรฟีนอลในอาหารเหลวโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีพาราไธออนตกค้างอยู่ จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายพาราไธออนได้ดี แต่ไม่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลซึ่งเป็นเมตาโบไลท์ของพาราไธออนต่อไปได้ (Munnecke *et al*., 1974)

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1977 มีรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่สามารถย่อยสลายพาราไธออนและพาราไนโตรฟีนอลจากพื้นที่เกษตรกรรมในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้คือ *Pseudomonas stutzeri* ซึ่งสามารถย่อยสลายพาราไธออนด้วยเอนไซม์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลแต่ไม่สามารถย่อยสลายพาราไธออนได้ (Daughton and Hsieh, 1977)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1982 ได้มีผู้นำเชื้อแบคทีเรียข้างต้นมาศึกษาพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas diminuta* และการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพาราไธออน (parathion hydrolase) นี้จะถูกสร้างจากพลาสมิดที่ชื่อว่า pCS1 (Serdar *et al*., 1982)

ในปี ค.ศ. 1986 มีรายงานการศึกษายีนที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงประเภทออร์การโนฟอสเฟตที่ชื่อว่ายีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่น (organophosphate-degrading gene; opd) ที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลส (organophosphate hydrolase; OPH) ในเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 โดยยีนนี้ตั้งอยู่บนพลาสมิดขนาด 43 kb พบว่ามีส่วนที่มีความเหมือนกัน (homology) กับยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นใน *Pseudomonas diminuta* ที่ตั้งอยู่บนพลาสมิดขนาด 66 kb (Mulbry et al., 1986) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ของเชื้อทั้งสองชนิดมีความเหมือนกัน (Harper *et al*., 1988)

ในปี ค.ศ. 1987 มีรายงานการเปรียบเทียบลักษณะของพลาสมิดที่กำหนดรหัสให้ยีนที่สร้างเอนไซม์พาราไธออนไฮโดรเลสจากเชื้อ *Pseudomonas diminuta* และ *Flavobacterium* sp. โดยการใช้ restriction maps ของพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยเชื้อ *Pseudomonas diminuta* มีพลาสมิด pPDL2 ขนาด 39 กิโลเบสและเชื้อ *Flavobacterium* sp. มีพลาสมิด pCMS1 ขนาด 70 กิโลเบส โดยพลาสมิดทั้ง 2 มีส่วนที่มีความเหมือนกันในช่วง upstream ของส่วนอนุรักษ์ประมาณ 2.6 กิโลเบสและในช่วง downstream 1.7 กิโลเบส แต่ในส่วนที่นอกเหนือจากนี้ไม่มีส่วนที่มีความเหมือนกัน (Mulbry *et al*., 1987)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ในปี ค.ศ. 1988 มีรายงานการแยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทิลพาราไธออนจากอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็น โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้แต่ไม่สามารถใช้เมทธิลพาราไธออนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. ตัวนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นของ *Pseudomonas diminuta* และ *Flavobacterium* sp. ที่มีการศึกษามาแล้ว (Chaudhry et *al*., 1988)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1989 มีการศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพาราไธออนจากเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ ATCC 27551, B1 และ SC พบว่าเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีคุณลักษณะทั่วไปเหมือนกัน แต่เมื่อนำมาทดสอบความเหมือนกันกับยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นจาก ATCC 27551 เป็นตัวตรวจ (probe) พบว่ายีนออร์การโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ไม่มีความเหมือนกัน (Mulbry and Karns, 1989)

ในปี ค.ศ. 1991 มีการศึกษา pathway การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลของเชื้อแบคทีเรีย *Moraxella* sp. พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้พาราไนโตรฟีนอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโต และสามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลได้เป็นไนไตรท์และไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ด้วยเอนไซม์ *p*-nitrophenol oxidizing enzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิด membrane bound (Spain and Gibson, 1991)

นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 1993 มีรายงานการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงในกลุ่มอื่น เช่น ยาฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมท (carbamate) โดยพบว่าเอนไซม์ carbamyl hydrolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอสเทอเรส (esterase) ของเชื้อแบคทีเรีย *Blastobactor* sp. M501 สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมทได้ และการย่อยสลายยาฆ่าแมลงคาร์บาริล (carbaryl) ซึ่งอยู่ในกลุ่มคาร์บาเมทของเชื้อ *Arthobacter* sp. RC100 นั้นเกี่ยวข้องกับพลาสมิด 2 ชนิดคือ pRC1 และ pRC2 (Hayatsu *et al.*, 1993)

ในปี ค.ศ. 1996 มีรายงานการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *opa*A ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. JD6.5 ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบประเภทออร์กาโนฟอสเฟตแล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *opa*A กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของออร์กาโนฟอสเฟต-ดีกราเดชั่นของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas diminuta* MG และ *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองไม่มีความเหมือนกัน (Cheng *et al.*, 1996)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

ปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการโคลนยีน *phn*E และ *glp*T ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่าน (transport) ยาฆ่าแมลงไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (diisopropyl fluorophosphate) ของเชื้อ *Eschericia coli* K-12 โดยพบว่ายีนทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้เชื้อ *Eschericia coli* K-12 สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟตได้ดีขึ้น (Elashvili et al., 1998) และยีน *phn* ของเชื้อ *Burkholderia* sp. RP007 ที่สามารถย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากยีนอื่นที่สามารถย่อยสลาย PAH ได้ (Laurie and Jones, 1999)

ในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน และการศึกษา *Pseudomonas* sp. A3 จากดิน พบว่า *Pseudomonas* sp. A3 สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออน, มาลาไธออน, monocrotophos และ diazinon ซึ่ง *Pseudomonas* sp. A3 จะเปลี่ยนเมทธิลพาราไธออนไปเป็นแหล่งของคาร์บอนและฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Ramanathan and Lalithakumari, 1999)

ในปี ค.ศ. 2000 มีรายงานการค้นพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* sp. NF100 มีความสามารถในการย่อยสลายยาฆ่าแมลงเฟนิโตรไธออน (fenitrothion) ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงชนิดหนึ่งในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตนั้นเกี่ยวข้องกับพลาสมิด 2 ชนิดคือ pNF1 และ pNF2 (Hayatsu *et al*., 2000)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 มีรายงานการแยกเชื้อ *Plesiomonas* sp. M6 ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนได้เป็นพาราไนโตรฟีนอล และทำการบ่งชี้ยีนที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนด้วยเทคนิค shotgun cloning ให้ชื่อยีนนี้ว่าเมทธิลพาราไธออนดีกราเดชั่น (methyl parathion degradation; mpd) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียตัวนี้ไม่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลต่อไปได้ (Zhongli et *al*., 2001)

ในปีเดียวกันนี้มีรายงานการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งเกษตรกรรมในประเทศไทย โดยการนำดินจากการเกษตรไปเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็นที่มีกลูโคสและไม่มีกลูโคส และอาหารทั้งสองชนิดจะมีเมทธิลพาราไธออนเป็นส่วนประกอบ จากการทดลองสามารถคัดแยก *Burkholderia cepacia* ออกมาจากอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็นที่ไม่มีกลูโคส พบว่า *Burkholderia cepacia* เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้ดี และเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็นที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-8 และความเข้มข้นของเกลือ 0-3.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดลองเพิ่มปริมาณกลูโคสลงในอาหารพบว่าการเพิ่มปริมาณกลูโคสไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถในการย่อยเมทธิลพาราไธออน (Keprasertsup *et al*., 2001)

ในปี ค.ศ. 2002 มีรายงานว่ายีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นเอ (*opd*A) ของเชื้อ *Agrobacterium radiobactor* P230 ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นของเชื้อแบคทีเรีย *Brevundimonas diminuta* MG (*Pseudomonas diminuta* MG) และเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 แต่เอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสเอ (OpdA) ที่ถูกสร้างโดยยีนออร์กาโนฟอสเฟต-ดีกราเดชั่นเอสามารถไฮไดรไลซ์ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตได้หลายชนิดกว่าเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสที่ถูกถอดรหัสจากยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่น (Horne *et al.*, 2002)

ในปี ค.ศ. 2002 มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียชนิดหนึ่งออกจากดินสกปรกรอบๆ โรงงานผลิตยาฆ่าแมลง โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียชนิดนี้พบว่าอยู่ในจำพวก *Pseudomonas* sp.WBC-3 แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนในความเข้มข้นสูงถึง 800 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารพื้นฐานและสามารถเพิ่มความต้านทานได้ถึง 2000 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารทีมีกลูโคสปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงอื่นๆ ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) (Chen Y *et al.*, 2002)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ในปี ค.ศ. 2002 มีรายงานการใช้กระบวนการ DNA shuffling เพื่อสร้างเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสที่สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้ดีขึ้น โดยการนำยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นมาทำ DNA shuffling แล้วโคลนเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue และคัดเลือกโคโลนีที่มีความสามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้เพิ่มขึ้น จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสนี้สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้เพิ่มขึ้น 25 เท่า (Cui *et al*., 2002)

ปี ค.ศ. 2003 ได้มีรายงานการศึกษาส่วนของพลาสมิด pPDL2 ของเชื้อ *Flovobacterium* sp. และพลาสมิด pCMS1 จากเชื้อ *Pseudomonas diminuta* ซึ่งทั้งสองพลาสมิดมีส่วนดีเอ็นเอขนาด 5.1 กิโลเบส ซึ่งมียีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นโดยพบว่ายีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นอยู่บนพลาสมิด pPDL2 ระหว่างยีน *ISFl*sp1 และ *Tn*-3 และมี open reading frame (*orf*243) ซึ่งถอดรหัสให้โพลีเปปไทด์ขนาด 27 กิโลดาลตัน ที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล (Siddavattam *et al.*, 2003)

ในปี ค.ศ. 2004 มีรายงานการศึกษาการแสดงออก การแยกบริสุทธิ์ และการหาคุณลักษณะของยีนเมทธิลพาราไธออนดีกราเดชั่นโดยการทำพีซีอาร์ (polemerase chain reaction; PCR) แล้วถ่ายยีนเพื่อให้แสดงออกใน *E. coli* ในรูปแบบของฟิวชั่นโปรตีนฮิสทิดีน (hexa-His C-terminal fusion protein) ทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยใช้ metal-affinity column chromatography ซึ่งจากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์และศึกษาไซโมแกรม (zymogram) ของเอนไซม์ที่แยกได้ พบว่าเอนไซม์ที่อยู่ในรูปแบบที่ทำงานได้ (active form) นั้นเกิดจากการตัด precursor protein ที่มีขนาดใหญ่กว่าโดยตัด signal peptide ที่บริเวณ N-terminal ของสายโปรตีนออกไป และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมีโครงสร้างเป็นโมโนเมอร์ (Guoping *et al.*, 2004)

ในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการพัฒนาการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลสใน *E. coli* โดยการโคลนยีนภายใต้การควบคุมของโปรเมอร์เตอร์ P43 และเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal peptide จากยีน *npr*B ของ *Bacillus subtilis* ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับสูง และมีการหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ โดยเอนไซม์ที่ได้ยังมีความสามารถในการย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Xiao-Zhou Zhang et *al.*, 2004)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สำหรับในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 มีรายงานการแยกเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนและพาราไนโตรฟีนอลจากดินที่ทำการเกษตรในประเทศไทยโดยพบว่าเชื้อตัวนี้สามารถใช้เมทธิลพาราไธออนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโต (Keprasertsup *et al.*, 2001) และในปีเดียวกันนี้ได้มีการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากเชื้อตัวนี้ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน และเมื่อทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลายด้าน N-terminus พบว่ามีกรดอะมิโนจำนวน 40 อะมิโน (เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และบุญศรี จงเสรีจิตต์, 2544)

ปี พ.ศ. 2547 มีรายงานการบ่งชี้และศึกษาลักษณะของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากเชื้อ *Burkholderia cepacia* โดยพบว่าเมื่อนำยีนนี้ไปโคลนและนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่สมบูรณ์มีขนาด 996 เบส โดยสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 331 ตัว นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสจากเชื้อจุลินทรีย์นี้และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้มาวิเคราะห์ พบว่ามีความเหมือนกันกับยีนเมทธิลพาราไธออนดีกราเดชั่น (*mpd* gene) ของเชื้อ *Plesiomonas* sp. M6 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนคิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ และ 98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความเหมือนกันกับยีน *organophosphate pesticide hydrolase* ของ

*Ochrobactrum* sp. Mp-3 คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างจากยีนออร์กาโนฟอสเฟตดีกราเดชั่นของเชื้อ *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่ายีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดเลสที่ได้อยู่ในกลุ่มของยีนเมทธิลพาราไอออนดีกราเดชั่นซึ่งมีความแตกต่างจากยีนในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต-ดีกราเดชั่น (เสาวลักษณ์ วงเทียนหลาย, 2547)

**5. การตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลง**

การตรวจวัดปริมาณสารมีจุดมุ่งหมายสำคัญ เพื่อการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หรือตัวแปรต่างๆ ทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตและเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ หลักการวัดและรูปแบบมีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นการวัดตัวแปรทางกายภาพ หรือทางเคมี ตัวอย่างการวัดทางกายภาพ เช่น การวัดทางปริมาตร มวล ความหนาแน่น อัตราการไหล การกวน ความดัน และอุณหภูมิ เป็นต้น ในการตรวจวัดตัวแปรทางเคมีอาศัยเครื่องมือต่างๆ เช่น ก๊าซและลิควิดโครมาโตรกราฟฟี พีเอชมิเตอร์ อิออนซีเลคทีฟอิเลคโทรดและสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นต้น เครื่องมือวัดเหล่านี้ทำงานได้ดี ทั้งการวัดตัวแปรหรือสารตัวอย่างโดยตรง หรือมีการทำให้ตัวอย่างเปลี่ยนสภาพ ที่ทำให้เครื่องมือวัดหรือเซนเซอร์ตอบสนองได้ ตัวอย่างเช่น การหาปริมาณกลูโคสมีการทำให้เกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีวัดปริมาณความเข้มของสีด้วยเครื่องมือวัดประเภทโฟโตมิเตอร์ ในการวิเคราะห์ทางเคมีนี้จึงมีขั้นตอน ใช้เวลาในการตรวจวัด สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และสารตัวอย่างมักถูกทำลาย ผู้ปฏิบัติต้องมีความรู้ความชำนาญสมควร ทั้งการเตรียมตัวอย่าง การวัดและวิเคราะห์ด้วย

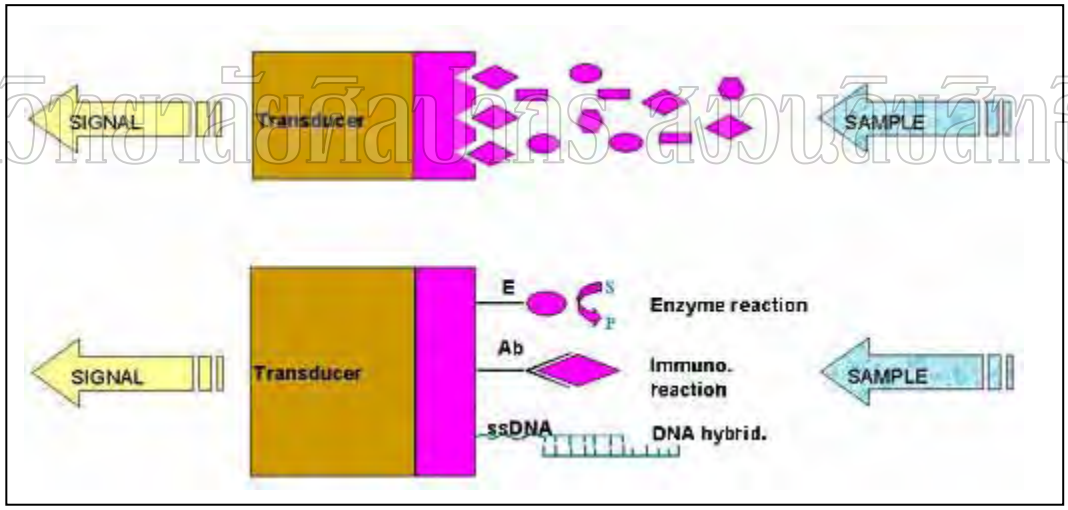
การใช้สิ่งมีชีวิตในการวิเคราะห์ปริมาณสาร โดยวิธีที่เรียกว่า biological assay มักใช้เวลานาน เช่น การใช้วิธี ELISA ในการวิเคราะห์หาแอนติเจนหรือแอนติบอดี ปัจจุบันมีการนำสารชีวโมเลกุลหรือสารทางชีวภาพไปติดเข้ากับเครื่องมือทางไฟฟ้า เพื่อใช้ในการหาปริมาณสารตัวอย่างได้ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว เครื่องมือวัดแบบนี้ เรียกว่า ไบโอเซนเซอร์ (biosensors) ไบโอเซนเซอร์ เป็นเครื่องมือวัดปริมาณแบบใหม่ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมการหมัก ทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อมและทางทหาร แม้วิธีการใช้ไบโอเซนเซอร์ จะมีความรวดเร็ว สะดวก ไม่ต้องการผู้ชำนาญการ มีความจำเพาะเจาะจงสูงและสามารถนำมาใช้ในงานที่ต้องการอ่านผลอย่างต่อเนื่อง ให้ข้อมูลได้ในขณะนั้น (real time) และนำไปใช้ในระบบควบคุมแบบ on-line ได้ แต่การที่จะให้ไบโอเซนเซอร์เป็นที่ยอมรับมากขึ้น และสามารถแข่งขันในด้านการตลาดได้ วิธีที่ใช้ไบโอเซนเซอร์จะต้องง่ายกว่า ใช้เวลาสั้นกว่า และราคาต่อการวัดแต่ละตัวอย่างต้องต่ำกว่า (สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### 5.1 ไบโอเซนเซอร์

การวิเคราะห์ปริมาณสารโดยอาศัยหลักการทางชีวเคมี เป็นการนำสารทางชีวภาพ (biological substances) ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการการวิเคราะห์ ผลของปฏิกิริยาก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือผลิตภัณฑ์ซึ่งอยู่ในภาพของสัญญาณทางเคมีหรือฟิสิกส์ สัญญาณเหล่านี้นำมาใช้เป็นดัชนีบ่งบอกปริมาณสารตัวอย่างได้ โดยการตรวจจับปริมาณของสัญญาณดังกล่าว

จากหลักการข้างต้น จึงมีการนำสารทางชีวภาพมาตรึงกับตัวตรวจจับหรือทรานดิวเซอร์ (transducer) ที่เหมาะสมกับชนิดและภาพแบบของสัญญาณจากผลของปฏิกิริยาหรือการจับกันระหว่างสารทางชีวภาพกับสารตัวอย่าง ลักษณะของสัญญาณจากปฏิกิริยาอาจเป็นโปรตอน อิเลคตรอน อิออน แก๊ส ความร้อน และแสง เครื่องมือที่อาศัยวิธีการดังกล่าวเรียกรวมๆ ว่าไบโอเซนเซอร์ ภาพที่ 17 แสดงโครงสร้าง และหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ (สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535)

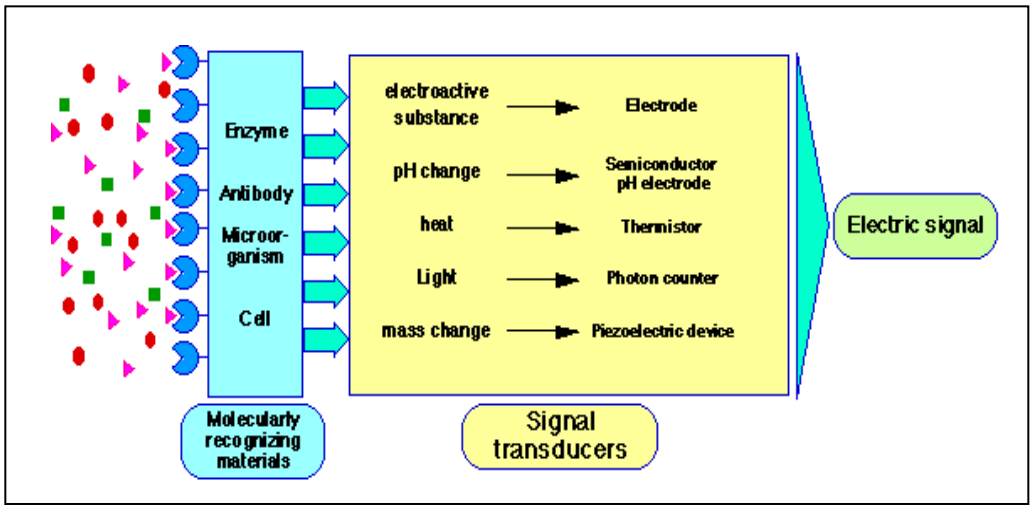



มหาวิทยาลัยศิลปากร ลงวันที่

ภาพที่ 17 โครงสร้างและการทำงานของไบโอเซนเซอร์
ที่มา : สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535

จากภาพ 17 จะเห็นว่าโครงสร้างไบโอเซนเซอร์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ส่วนแรก คือ ส่วนที่ทำให้เกิดสัญญาณและตรวจจับสัญญาณ ซึ่งประกอบด้วยสารทางชีวภาพที่ติดอยู่กับทรานดิวเซอร์ ส่วนนี้อาจจะเรียกว่า detector หรือ probe อีกส่วนหนึ่งจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ขยายสัญญาณและอ่านสัญญาณ หรือเรียกว่า read out ภาพที่ 18 แสดงชนิดของสารชีวภาพที่นำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์และลักษณะของสัญญาณชี้นำ จากลักษณะของสัญญาณชี้นำที่เกิดขึ้นนี้

สามารถนำมาใช้ในการเลือกทรานดิวเซอร์ให้เหมาะสมกับสัญญาณชี้นำที่ต้องการตรวจจับ ตัวอย่างเช่น ถ้าสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นความร้อน ก็จะใช้ทรานดิวเซอร์ที่เรียกว่า Thermistor เป็นต้น

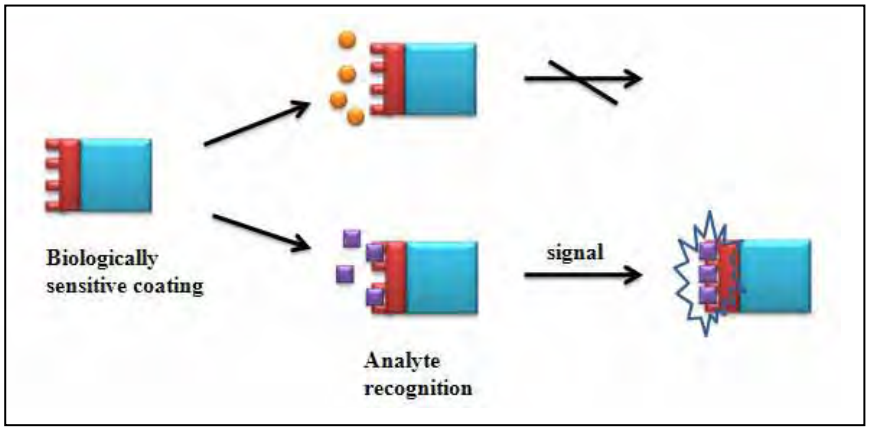



ภาพที่ 18 แสดงชนิดของสารชีวภาพที่นำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์และลักษณะของสัญญาณชี้นำ
ที่มา : สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**5.2 สารทางชีวภาพ**

สารทางชีวภาพที่นำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ต้องเป็นวัสดุที่มีความไวในทางชีวภาพ (biologically sensitive element) ทำหน้าที่จับหรือทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ได้เท่านั้น ทำให้เกิดสัญญาณชี้นำ (indicated signal) ที่สามารถแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าโดยทรานดิวเซอร์ได้ ดังภาพ 19




ภาพที่ 19 การจับกันระหว่างสารชีวภาพที่อยู่บนทรานส์ดิวเซอร์ กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เกิดเป็นสัญญาณที่จับได้โดยทรานดิวเซอร์
ที่มา : สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535

มีสารชีวภาพหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ได้ ถ้าจะแบ่งชนิดของไบโอเซนเซอร์ได้ ถ้าจะแบ่งชนิดของไบโอเซนเซอร์ ออกตามชนิดของสารทางชีวภาพที่นำมาใช้สามารถแบ่งได้ดังนี้

5.2.1 เอนไซม์ไบโอเซนเซอร์ (Enzyme Biosensor)

ใช้เอนไซม์เป็นสารทางชีวภาพ ทั้งนี้อาจใช้เอนไซม์ชนิดเดียว หรือมากกว่า 1 ชนิด ตัวอย่างเช่น การใช้กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) ในการปริมาณน้ำตาลกลูโคส การใช้คลอเรสเตอรอล ออกซิเดส (cholesterol oxidase) เพื่อหาปริมาณคลอเรสเตอรอล การใช้ออกซาเลท ออกซิเดส (oxalate oxidase) หาปริมาณ oxalic acid ในปัสสาวะ และการใช้เอนไซม์ penicillinase หาปริมาณเพ็นนิซิลลิน

ตัวอย่างการใช้เอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด ในไบโอเซนเซอร์ เช่น การใช้กลูโคสออกซิเดสร่วมกับ mutarotase และ invertase ในการปริมาณน้ำตาลซูโครส การใช้ glutamate dehydrogenase ร่วมกับ alanine aminotransferase หาปริมาณกลูตาเมท เป็นต้น

ในการใช้เอนไซม์เป็นสารชีวภาพนี้ เอนไซม์อาจถูกตรึงอยู่บนทรานดิวเซอร์ ได้แก่ พีเอชอิเลคโทรดหรือออกซิเจนอิเลคโทรดได้โดยตรง เช่น การตรึงเอนไซม์ penicillinase บนพีเอชอิเลคโทรดที่ทำจากแก้วโดยการเชื่อม (cross-linking) กับกลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) อีกวิธีหนึ่งเอนไซม์อาจถูกตรึงอยู่บน supporting material เช่นแผ่นเมมเบรน (membrane) โดยการดูดซับหรือการเชื่อมแล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนนี้ไปเกาะยึดกับทรานดิวเซอร์อีกครั้งหนึ่ง

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลิขสิทธิ์

5.2.2 จุลินทรีย์ไบโอเซนเซอร์ (Microbial Biosensor)

ใช้เซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์เป็นสารชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การใช้ *E. coli* หาปริมาณของยาปฏิชีวนะ tetracycline hydrochloride, streptomycin และ neomycin การใช้ยีสต์ *Hansenula fanomala* หรือ *Trichosporon cutaneum* เป็นต้น

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารที่ต้องการหาปริมาณ เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ในเซลล์จุลินทรีย์กับสารที่ต้องการหาปริมาณนั่นเอง การใช้จุลินทรีย์ทั้งเซลล์อาจมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ ในข้อที่ว่าไม่ต้องเสียเวลาในการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้เอนไซม์บางชนิดยังต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor) ซึ่งในกรณีของเอนไซม์ที่แยกออกมาจำเป็นต้องเติมโคแฟกเตอร์ลงไปด้วย แต่ถ้าใช้จุลินทรีย์ โคแฟกเตอร์จะมีอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์นั้น อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์อาจมีข้อได้เปรียบในแง่ของความจำเพาะ

นอกเหนือจากการใช้เซลล์จุลินทรีย์แล้ว เนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ สามารถนำมาใช้เป็นสารทางชีวภาพได้ ตัวอย่างเช่น การใช้เนื้อเยื่อของ yellow squash หาปริมาณกลูตาเมท (เอนไซม์ glutamate decarboxylase ใน squash) การใช้ bovine liver ร่วมกับ เอนไซม์ urease หาปริมาณ arginine เป็นต้น

5.2.3 ไบโอแอฟฟินิตีเซนเซอร์ (Bioaffinity Sensors)

เป็นการใช้แอนติบอดี (antibody-based biosensors) หรือรีเซพเตอร์ (receptor-based biosensors) เป็นสารทางชีวภาพ bioaffinity sensors แตกต่างจาก enzyme electrode-based biosensors ในแง่ที่ว่าในกรณีของ enzyme biosensor อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น ส่วน bioaffinity sensors อาศัยการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนและรีเซพเตอร์กับ ligands (คือ analyte) การจับกันนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในมวลหรือความถี่ที่สามารถตรวจจับโดยทรานดิวเซอร์ได้

สารทางชีวภาพที่ใช้เป็นรีเซพเตอร์เป็นโปรตีนหรือสารประกอบของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไอเดรต ที่จะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับ ligand ของมัน ส่วน ligand ในที่นี้ เป็นได้ทั้งสารโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน สเตอรอยด์ หรือพวกสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เปปไทด์ และโปรตีน หรือไวรัส หรือเซลล์จุลินทรีย์ ตัวอย่างของรีเซพเตอร์ เช่น acetycholine receptor ที่จับกับ acetylcholine (ligand)
(สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535)

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ลิขสิทธิ์

**5.3 ทรานดิวเซอร์**

ทรานดิวเซอร์เป็นส่วนสำคัญที่ทำหน้าที่แปลงสัญญาณชี้นำที่เกิดจากปฏิกิริยาหรือการจับกับระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ทรานดิวเซอร์ต้องมีความจำเพาะ หรือสามารถคัดเลือกชนิดของสัญญาณชี้นำได้ดี และมีความว่องไว รวมถึงสามารถตอบสนองได้ในช่วงปริมาณของสัญญาณชี้นำที่เกิดขึ้นได้อย่างเหมาะสม ชนิดของทรานดิวเซอร์ที่นิยมนำมาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์มีดังนี้

5.3.1 โพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ (Potentiometric Biosensor)

ทรานส์ดิวเซอร์แบบโพเทนชิโอเมตริก ทำงานภายใต้สภาวะสมดุลโดยวัดความหนาแน่นของประจุที่ใช้เป็นสัญญาณชี้นำที่สะสมบนผิวหน้าอิเลคโทรด จึงต้องมีกระบวนการคัดเลือกเฉพาะอิออนหรือแก๊สที่ต้องการวัด ทรานดิวเซอร์ที่รู้จักกันดีและนำมาใช้งานด้านไบโอเซนเซอร์คืออิออนอิเลคโทรด (Ion selection electrode; ISE) ซึ่งเป็นอิเลคโทรดที่ไวและคัดเลือกหรือเจาะจงเฉพาะอิออนเท่านั้น โดยมีเยื่อแผ่นทำหน้าที่ในการคัดเลือกเฉพาะสารชี้นำชนิด

หนึ่งๆ เท่านั้น เช่น พีเอชอิเลคโทรดมีชิ้นเยื่อที่เป็นเยื่อแก้ว (glass membrane) คัดเลือกเฉพาะโปรตอน ($H^+$) ประจุของอิออนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่อิเลคโทรดใช้งานเมื่อเปรียบเทียบอิเลคโทรดอ้างอิง โดยที่ศักย์ไฟฟ้าสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอิออนในสภาวะสมดุลที่เป็นไปตามความสัมพันธ์ของเนินสต์ (Nernst)

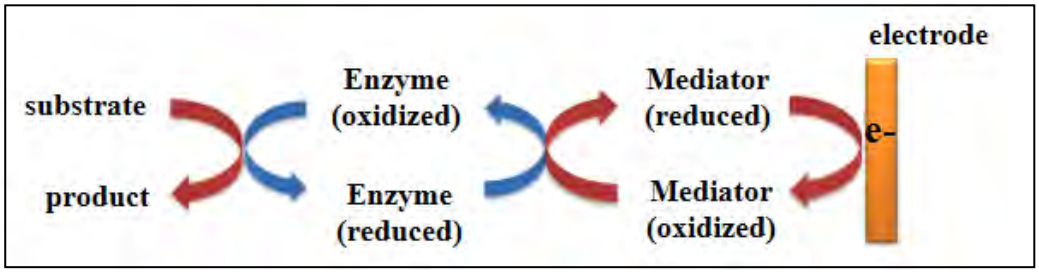
ปัจจุบันมีอิออนอิเลคโทรดที่วัดปริมาณอิออนได้หลายชนิด ซึ่งเป็นผลมาจากการพัฒนาชิ้นเยื่อที่จะคัดเลือกอิออนชนิดต่างๆ ตัวอย่างของอิออนที่ใช้วัดได้ เช่น $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$, $Li^+$, $NH^+$ รวมทั้งอิออนลบ (anion) ต่างๆ ทำให้สามารถนำอิออนอิเลคโทรดไปใช้ในงานทางด้านไบโอเซนเซอร์ได้กว้างยิ่งขึ้น นอกจากอิออนอิเลคโทรดแล้วยังมีแก๊สอิเลคโทรด (gas selection electrode; GSE) ที่อาศัยหลักการเดียวกัน โดยใช้ชิ้นเนื้อเยื่อที่สามารถคัดเลือกแก๊สที่ต้องการ เช่น ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย เป็นต้น

สารทางชีวภาพที่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง แล้วทำให้เกิดอิออนหรือแก๊สเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม dehydrogenase, decarboxylase ตัวอย่างเช่น เซนเซอร์ที่ใช้วัดกลูตาเมทเป็นการตรึงเอนไซม์ glutamate decarboxylase กับ $CO_2$ gas sensor (วัด $CO_2$) หรือตรึง glutamate decarboxylase กับ $NH_3$ gas sensor (วัด $NH_3$ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม) ในปฏิกิริยาที่มีการเปลี่ยนแปลงของพีเอช สามารถใช้โปรตอนเป็นสัญญาณชี้นำโดยใช้พีเอชอิเลคโทรดเป็นทรานดิวเซอร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

5.3.2 แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ (Amperometric Biosensor)

แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์อาศัยกระแสอิเลคตรอนที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณชี้นำ โดยการวัดในภาพของกระแสไฟฟ้า แหล่งที่มาของกระแสไฟฟ้าเป็นผลมาจากการถ่ายเทอิเลคตรอนจากสารตัวอย่างเข้าสู่อิเลคโทรด การถ่ายทอดอิเลคตรอนเกิดจากผลของปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพออกซิไดซ์ เมื่อเอนไซม์กลายสภาพไปอยู่ในรูปรีดิวซ์จึงต้องมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนต่อไปอีกเพื่อให้เอนไซม์กลับไปอยู่ในสภาพออกซิไดซ์ตามเดิม หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในสภาพรีดิวซ์อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งโดยทั่วไปทำได้ 2 รูปแบบคือ การออกซิไดซ์โดยใช้ศักซ์ไฟฟ้าโดยตรงในขนาดที่เหมาะสมผ่านขั้วอิเลคโทรดหรือการออกซิไดส์สารตัวกลาง (mediator) ที่ทำหน้าที่รับอิเลคตรอนจากเอนไซม์ในสภาพรีดิวซ์ให้เอนไซม์กลับสู่สภาพออกซิไดส์ ส่วนสารตัวกลางก็จะกลายสภาพรีดิวซ์ และเมื่อป้อนศักย์ไฟฟ้าขนาดที่เหมาะสมผ่านเข้าขั้วอิเลคโทรดใช้งาน เมื่อเทียบกับขั้วอิเลคโทรดอ้างอิง สารตัวกลางในสภาพรีดิวซ์จะถูกออกซิไดซ์ เกิดการถ่ายทอดกระแสอิเลคตรอนเข้าสู่อิเลคโทรด ดังภาพที่ 20 ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารตัวอย่าง




ภาพที่ 20 ลำดับขั้นตอนของการส่งผ่านอิเลคตรอนจากซับสเตรทเข้าสู่อิเลคโทรดโดยการทำปฏิกิริยาทางเอนไซม์ และสารตัวกลาง
ที่มา : สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535

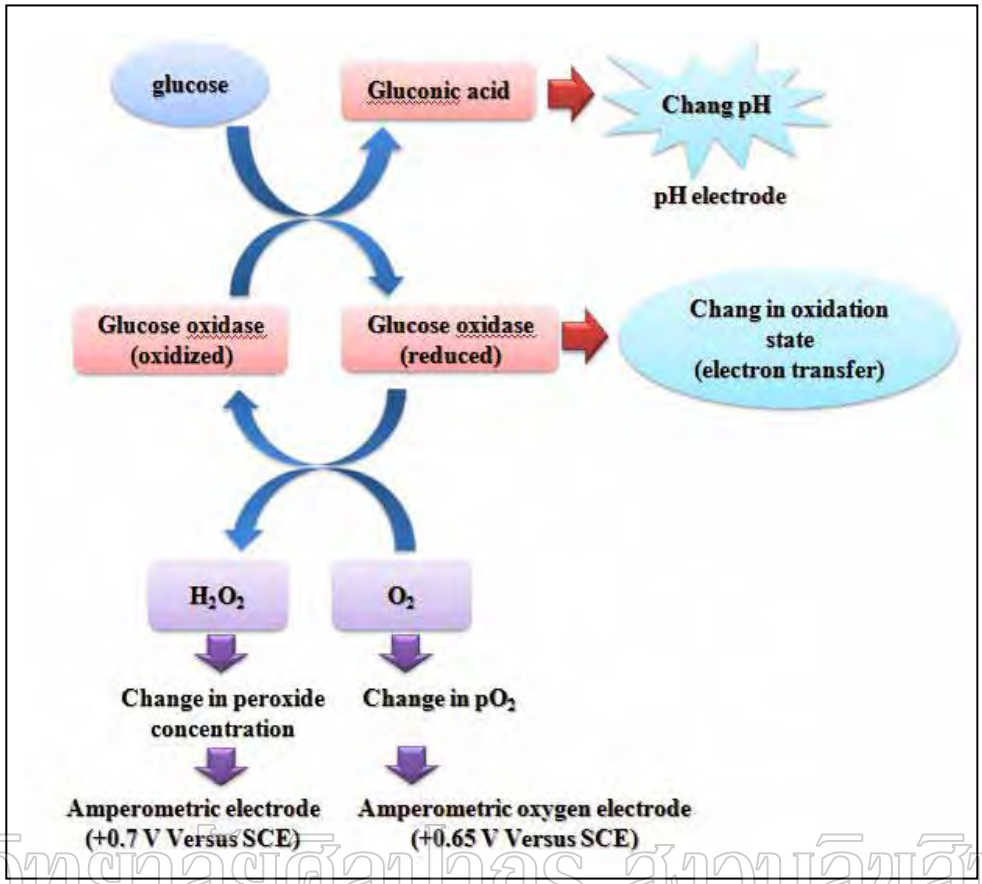
สารทางชีวภาพที่นิยมใช้กับแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฟลโวเอนไซม์ (flavor-enzyme) ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น ตัวอย่างการใช้แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ เช่น การใช้หาปริมาณกลูโคส โดยมีกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase, GOD) เป็นสารชีวภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาดังสมการ

$$\text{Glucose} + O_2 \longrightarrow \text{Gluconolactone} + H_2O_2$$

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสจะสัมพันธ์กับกระแสที่เกิดขึ้น โดยกระแสที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอีกครั้ง (reoxidation) ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แพลตตินัมอิเลคโทรด เมื่ออิเลคโทรดนี้ถูกตั้งศักย์ไฟฟ้าเป็น +700 มิลลิโวลต์ เทียบกับอิเลคโทรดอ้างอิงแบบคาโลเมลอิ่มตัว (saturated calomel electrode)

นอกเหนือจากการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น การหาปริมาณกลูโคสโดยการใช้กลูโคสออกซิเดสอาจวัดการเปลี่ยนแปลงพีเอช (พีเอชอิเลคโทรด) หรือการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจน (ออกซิเจนอิเลคโทรด) ดังแสดงในภาพที่ 21




มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ภาพที่ 21 ออกซิเดชั่นของกลูโคสโดยกลูโคสออกซิเดส โดยแสดงสัญญาณชี้นำต่างๆ ที่สามารถตรวจจับได้เพื่อใช้หาปริมาณกลูโคส

ที่มา : สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535

การหาปริมาณกลูโคสโดยใช้ออกซิเจนที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนตามธรรมชาติเป็นสารตัวกลางไม่ค่อยดีนัก เพราะมีผลกระทบต่อออกซิเจนในสารละลายที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยากับกลูโคสด้วย ในการศึกษาต่อมาจึงใช้สารรีดอกซ์พวกอินทรีย์ อนินทรีย์ และออแกนอเมตัลลิค (organometallic) เป็นสารตัวกลางแทน สารเหล่านี้ถูกรีดิวซ์ได้เร็วกว่าปฏิกิริยารีดักชั่นของออกซิเจน และหลายชนิดมีความสามารถในการละลายในตัวกลางที่เป็นน้ำได้ต่ำ ทำให้นำมาตรึงกับอิเลคโทรดได้ ตัวอย่างสารสารตัวกลางนี้ ได้แก่ เบนโซควิโนน (benzoquinone) โพลีไวโอโลเจน (polyviologen) คลอรานิน (chloranil) เมทไธลีนบลู (methylene bule) และสารอนุพันธ์เฟอโรซีน (ferrocene derivertives)

ไม่ว่าจะเป็นออกซิเจนหรือสารตัวกลางตัวอื่นๆ อิเลคโทรดที่ใช้เป็นทองหรือกราไฟท์ (graphite) หรือแพรตตินัม ต่อมามีการพัฒนาใช้สารพวกเกลืออินทรีย์ (organic salt)

เป็นอิเลคโทรด โดยไม่ต้องมีการใช้สารตัวกลาง ทำให้มีการตอบสนองได้เร็ว มีความคงตัวสูง โดยพบว่าเมื่อใช้งานติดต่อเป็นเวลานานหนึ่งเดือนมีการสูญเสียความไว (sensitivity) น้อยมาก

ได้มีการนำเอนไซม์ในกลุ่ม oxidase มาวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น lactate oxidase และ galactose oxidase ในการวัดปริมาณ lactate และ galactose ตามลำดับ ในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์ มีการสร้าง hypoxanthine sensor โดยใช้ xanthine oxidase ซึ่ง hypoxanthine นี้ใช้เป็นดัชนีในการบอกความสดของเนื้อปลา

นอกจากกลุ่ม oxidase แล้ว dehydrogenase ก็เป็นเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้กับแอมเพอโรเมตริก เอนไซม์อิเลคโทรด ได้โดยการเลือกสรรสารตัวกลางที่เหมาะสมในการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NAD ($H^+$) ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น lactate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase และ malate dehydrogenase เป็นต้น

5.3.3 ออปติคอลไบโอเซนเซอร์ (Optical Biosensor)

ในทศวรรษนี้เทคโนโลยีด้านออปติกส์ (optics) และออปโตอิเลคโทรนิคส์ (optoelectronics) มีความก้าวหน้าไปมาก เทคโนโลยีเหล่านี้มีข้อดีหลายประการทั้งทางด้านความปลอดภัย มีการรบกวนจากสัญญาณภายนอกน้อยมาก ตลอดจนเครื่องมือมีขนาดเล็ก และน้ำหนักเบา มีราคาถูก จึงได้มีการนำมาใช้งานด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพอย่างกว้างขวาง โดยอาศัยคุณสมบัติทางแสง คือ การดูดกลืนแสง (absorption) การผ่านของแสง (transmission) การสะท้อน (reflection) และการเรืองแสง (fluorescence) ตัวอย่างของเครื่องมือที่ใช้เทคโนโลยีทางด้านออปโตอิเลคโทรนิกส์ เช่น pH sensitive dye ซึ่งเป็นเครื่องมือวัดพีเอชที่มีหัววัดที่เป็นออปติกไฟเบอร์ (optic fiber) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชขึ้น สารเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีทำให้คุณสมบัติทางแสงจากแหล่งกำเนิดแสงเปลี่ยนไป สามารถตรวจจับได้โดยตัวตรวจจับ (detector) ซึ่งจะนำไปหาค่าพีเอชต่อไป นอกจาก pH sensitive dye ก็มีเครื่องมือที่ใช้ในการหาปริมาณแก๊สพิษ แก๊สคาร์บอนไดออกไซม์ แก๊สออกซิเจน และอิออนโลหะหนัก

ออปติกไฟเบอร์มีหลายชนิดด้วยกันขึ้นอยู่กับราคา และคุณสมบัติในการสร้างเป็นเซนเซอร์ เช่น ถ้าใช้พลาสติกจะมีราคาถูกที่สุด และปลอดภัยที่สุด แต่ก็มีข้อจำกัดที่ต้องทำการวัดความยาวคลื่นที่มากกว่า 450 นาโนเมตร ถ้าใช้พวกแก้วจะมีราคาแพง แต่เหมาะสมกับการวัดที่ความยาวคลื่นได้ลงมาถึง 380 นาโนเมตร ในการสร้างเป็นเซนเซอร์จากออปติกไฟเบอร์มักใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ถึง 200 ไมคอน ตัวอย่างออปติคอลไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์การปนเปื้อนของแบคทีเรียในเนื้อสัตว์ โดยใช้หลักการที่ว่าแบคทีเรียที่มีชีวิตมีการสร้าง ATP จึงมีการสร้าง ATP sensor โดยใช้เอนไซม์ luciferase ตรึงที่ผิวหน้าท่อนำแสงหรือออปติกไฟเบอร์ ผลของปฏิกิริยาจะมีแสงเกิดขึ้นโดยสามารถวัดปริมาณแสงที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ด้วยเครื่อง photodetection ตัวอย่างอีกตัวอย่างหนึ่งคือการหาปริมาณของแลคโตส ในกรณีนี้สารชีวภาพที่ใช้ คือ lipid bilayer ที่มาจาก cytoplasmic membrance ของ *E. coli* สิ่งที่ทำปฏิกิริยากับแลคโตส คือ เอนไซม์ $H^+$ : lactose cotranspoter lactose permease โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะนำ lactose/$H^+$ ผ่านเข้า cell membrane ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในสารละลาย ทำการวัดพีเอชโดยใช้ pH sensitive dye เช่น pyranine ปริมาณสารเรืองแสงที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับปริมาณของแลคโตสโดยสามารถหาปริมาณของแลคโตสได้ในช่วง 100 ไมโครโมลาร์ถึง 100 มิลลิโมลาร์

เซนเซอร์ที่ใช้เอนไซม์ dehydrogenase จะมี NAD ($P^+$) เป็นโคแฟกเตอร์ ผลจากปฏิกิริยาจะผลิตสาร NAD(P)H ขึ้น โดยที่ NAD(P)H สามารถปลดปล่อยแสง fluorescence ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ซึ่งสามารถตรวจวัดโดยอาศัยคุณสมบัติทางแสงได้เช่นกัน

5.3.4 ไพโซอิเลคตริคริสตัลไบโอเซนเซอร์ (Piezoelectric Crystal Biosensor)

ไพโซอิเลคตริคคริสตัล ทำงานโดยอาศัยคุณสมบัติที่เป็น piezoelectricity ของผลึก กล่าวคือเมื่อมีแรงกลมากระทำต่อผลึก จะทำให้เกิด electric dipoles เป็นผลให้เกิดความแตกต่างของศักย์ หรือ dipole moment ขึ้น ผลสุดท้ายที่เกิดขึ้นคือ การสั่น (oscillate) ทำให้เกิดความถี่ที่ตรวจจับได้โดย frequency counter ตัวอย่างของผลึกที่เป็น piezoelectricity เช่น ควอทซ์ ทัวร์มาลีน (tourmaline) โรเซลซอลล์ (rochella salt) และโพลีเมอร์บางชนิด

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

เมื่อนำสารชีวภาพ ที่มีความจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเคลือบบนผิวหน้าของไพโซอิเลคตริคคริสตัน เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารตัวอย่างจะเกิดผลิตภัณฑ์หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงมวล (จากการจับกันระหว่างสารชีวภาพกับสารตัวอย่างบนผิวหน้าผลึก) ทำให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลงไป จากหลักการนี้จึงนำเอาไพโซอิเลคตริคริสตันมาสร้างไบโอเซนเซอร์ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารได้ ไบโอเซนเซอร์แบบนี้ มีข้อดีอยู่หลายประการ คือ

- ราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับตัววัด หรือทรานดิวเซอร์อื่นๆ
- ขนาดกระทัดรัด นำไปใช้งานในภาคสนามได้
- มีความไวและความจำเพาะสูง วิเคราะห์สารได้ในระดับ ppb
- ใช้เวลาวิเคราะห์สั้น

สารชีวภาพที่ใช้เคลือบผลึกเพื่อหาปริมาณยาฆ่าแมลง ฮอร์โมน ยาปฏิชีวนะ ตกค้าง หรือสารพิษ มีเอนไซม์ แอนติบอดี้ โปรตีนรีเซปเตอร์ ตัวอย่างเช่น การเคลือบเอนไซม์ acetylcholinestersae เพื่อหาปริมาณของยาปราบศัตรูพืชประเภทสารออร์กาโนฟอสเฟต เมื่อไม่มีสารออร์กาโนฟอสเฟตเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ acetylchorine ให้ค่าความถี่หนึ่ง แต่เมื่อมีสารออร์กาโนฟอสเฟตอยู่ เอนไซม์จะจับกับสารออร์กาโนฟอสเฟตได้สารประกอบ phopharyl ทำ

ให้เอนไซม์ไม่สามารถไปทำปฏิกิริยากับ acetylcholine ได้ค่าความเปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างอีกตัวอย่างหนึ่ง เป็นการเคลือบแอนติบอดีต่อพาราไธออนบนผลึก เพื่อวิเคราะห์ปริมาณพาราไธออน พบว่าระยะเวลาตอบสนอง เพียง 40-60 วินาที และสามารถนำมาใช้วัดตัวอย่างใหม่ได้ ภายใน 5-10 นาที มีอายุการใช้งาน 18 วัน

5.3.5 ไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยการวัดแบบอื่นๆ

ในการพิจารณาเลือกชนิดของทรานส์ดิวเซอร์ที่มาใช้กับไบโอคะตะลิสต์ ต้องดูชนิดของผลิตภัณฑ์หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพที่เป็นไบโอคะตะลิสต์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ นอกเหนือจากอิออน แก๊ส อิเลคตรอนหรือคุณสมบัติทางแสงที่สามารถตรวจสอบโดยทรานส์ดิวเซอร์แบบต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์ เช่น ความร้อนที่เกิดจากปกิกิริยาชีวเคมี ในกรณีดังกล่าวทรานส์ดิวเซอร์ที่ใช้จะเป็นเทอร์มิสเตอร์ (thermistor) ซึ่งใช้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือความร้อนเป็นตัววัดถึงปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เทอร์มิสเตอร์นี้มีทั้งที่ใช้เอนไซม์เป็นสารชีวภาพ (enzyme thermistor) กับที่ใช้เซลล์จุลินทรีย์เป็นสารชีวภาพ (microbe thermistor)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารหลายชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะปกติมีสภาพการนำไฟฟ้าเป็นกลาง เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นตัวนำไฟฟ้า เช่น ยูเรีย เมื่อนำยูเรียไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ urease ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารอิออนิค ($NH^+$, $HCO^-$) ที่สามารถนำไฟฟ้าได้ การเปลี่ยนแปลงการนำไฟฟ้าขึ้นกับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ จึงใช้การนำไฟฟ้าเป็นตัวชี้นำปริมาณสารที่ต้องการวัดได้ ทรานส์ดิวเซอร์ที่ใช้เรียกว่าคอนดักติมิเตอร์ (conductimeter)
(สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2535)

**5.4 ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้**

ปัจจุบันไบโอเซนเซอร์เป็นงานวิจัยชั้นนำในด้านการวิจัยเทคโนโลยีเซนเซอร์ จนถึงขณะนี้มีการวิจัยพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่สามารถใช้วัดสารต่างๆ ได้มากกว่า 100 ชนิด ไม่ว่าจะเป็นกรดอะมิโน แก๊ส amines แอลกอฮอล์ ตลอดจนสารอินทรีย์ ในภาพของอิออน

จากการที่ไบโอเซนเซอร์สามารถใช้ในการหาปริมาณของสารต่างๆ ได้อย่างมากมาย จึงมีศักยภาพสูงที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาในตอนต้นๆ แสดงให้เห็นการประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ในงานด้านการแพทย์ การทหาร และทางด้านเทคโนโลยีการหมัก เพื่อการติดตามผลและควบคุมกระบวนการ รายละเอียดของการวิจัยและพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อการประยุกต์ใช้ในขอบข่ายงานด้านต่างๆ ดังนี้

5.4.1 ทางด้านการแพทย์และตรวจวินิจฉัยโรค

งานวิจัยและพัฒนาไบโอเซนเซอร์ส่วนใหญ่จะเน้นเพื่อใช้งานในทางการแพทย์และการวินิจฉัยโรค เนื่องจากขอบข่ายทางด้านนี้มีศักยภาพมากที่สุด และเป็นตลาดที่ใหญ่ที่สุดของของการวิจัยและพัฒนาไบโอเซนเซอร์ อีกทั้งจะเป็นที่ต้องการมากยิ่งขึ้นในอนาคต เอนไซม์ไบโอเซนเซอร์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เป็นส่วนมาก และพัฒนาออกสู่ตลาดการค้าเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารทางชีวภาพที่มีความสำคัญในด้านการแพทย์ เช่น ไบโอเซนเซอร์สำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสิ่งมีชีวิต (*in vivo* measurement) ที่สามารถติดตามระดับน้ำตาลในเลือดอย่างต่อเนื่องให้ข้อมูลอย่าง real time ซึ่งทราบผลการวัดได้ทันทีในกรณีที่แพทย์ต้องการวินิจฉัยโรคและต้องการตัดสินใจอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องเจาะเลือดผู้ป่วย นอกจากเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์แล้ว แอนติบอดีไบโอเซนเซอร์หรือที่เรียกว่าอิมมูโนเซนเซอร์ ก็มีการนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์เช่นกัน เช่น การตรวจวัดสารก่อมะเร็ง สัญญาณแรกในการบ่งบอกโรคมะเร็ง คือ การถูกทำลายของดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อสารก่อมะเร็งเข้าสู่ร่างกาย มันจะทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอส่วนนี้เกิดการเสียหายหรือถูกทำลายไป ถ้าหากร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมส่วนนี้ได้ เซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจเกิดการเพิ่มจำนวนที่ระบบการป้องกันตามธรรมชาติของร่างกายไม่อาจควบคุมได้ ในที่สุดก็จะกลายเป็นเนื้อร้ายหรือเซลล์มะเร็ง ไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยแอนติบอดีเป็นสารชีวภาพสามารถพัฒนาในลักษณะที่เป็นชิพ (chip) ซึ่งสามารถใช้ทำการตรวจสอบส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายได้อย่างง่ายดาย โดยการจุ่มชิพ (ที่มีสารแอนดิบอดีตรึงบนผิวหน้า) ลงในน้ำปัสสาวะของผู้ป่วย โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารแอนติบอดีจะทำหน้าที่เสมือนเป็นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการจับกับสารแปลกปลอมอย่างจำเพาะ ส่วนของดีเอ็นเอที่จับกับแอนติบอดีนี้จะเกิดการเรืองแสงเมื่อนำไปสแกนด้วยเลเซอร์ ข้อมูลที่ได้จากการสแกนจะบ่งบอกหรือประเมินได้ถึงอันตรายที่เกิดจากมะเร็ง นอกเหนือจากนี้การวัดปริมาณสารส่งสัญญาณทางระบบประสาทฮอร์โมนและสารเมตาบอไลท์อื่นๆ ซึ่งมีความสำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิตก็สามารถตรวจวัดหรือติดตามผลได้เช่นเดียวกัน

5.4.2 ทางด้านอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมด้านอาหารหรืออุตสาหกรรมการหมัก จะมีความต้องการระบบตรวจวัดและควบคุมอย่างอัตโนมัติเพื่อติดตามข้อมูลที่ได้อย่างทันท่วงทีในระหว่างการผลิต รวมทั้งควบคุมกระบวนการให้ดำเนินไปในทิศทางที่ต้องการเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ การตรวจวัดทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การวัดสารปนเปื้อน สารพิษ สารปรุงแต่งในอาหาร เป็นต้น ในปัจจุบันสามารถพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดการปนเปื้อนในอาหารที่นำมาใช้งานในภาคสนามได้ ซึ่งสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หลายๆ สปีชีส์พร้อมกันในเวลาเดียวกันได้ (จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่แตกกต่างกัน 12 สปีชีส์) ภายในเวลาน้อยกว่า 1-2 ชั่วโมง (การตรวจวัดโดยวิธีทั่วๆ ไปใช้เวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมงหรือมากกว่า) และจากรายงานการวิจัยในปัจจุบันพบว่าการประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารจำพวกเนื้อให้ความไวในการวัดถึง 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระดับเวลาเป็นนาที (การตรวจวัดด้วยวิธีทั่วๆ ไปในห้องทดลองให้ความไวในการตรวจวัดเพียง 5000 เซลล์ต่อมิลลิตร ภายในเวลา 8-24 ชั่วโมง) นอกจากนี้สำหรับการตรวจวัดในอุตสาหกรรมทางด้านอาหาร เช่น ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดความสดของเนื้อ ไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดปริมาณแลคเตทในการควบคุมคุณภาพของไวน์และโยเกิร์ต เป็นต้น ในด้านอุตสาหกรรมการหมัก เช่น ตรวจวัดกรดอะมิโน เพนนิซิลิน หรือใช้ไบโอเซนเซอร์ในการควบคุมปริมาณน้ำตาลซูโครสในการผลิตน้ำเชื่อม ควบคุมปริมาณของเอทธานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอร์ เป็นต้น

5.4.3 ทางด้านสิ่งแวดล้อม

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ทางด้านนี้ในทางการค้าจะเป็นการพัฒนาสำหรับการวัดในภาคสนามซึ่งต้องการไบโอเซนเซอร์ที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ อีกทั้งมีความทนทานต่อสภาพของการวัดได้ดี ในปัจจุบันจะมีการพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์ขนาดเล็กที่สามารถวัดแบบออนไลน์ (on-line) ได้ด้วย เช่น การตรวจวัดปริมาณของไนเตรท/ไนไตรท์ในแอคทิเวทเตดสลัดจ์ (activated sludge) โดยมีการตรึงเซลล์ของแบคทีเรียไว้ภายในหัววัดแล้วปิดผิวหน้าของหัววัดไว้ด้วยเมมเบรนเมื่ออิออนของไนเตรท/ไนไตรท์ แพร่ผ่านเมมเบรนเข้าไปแบคทีเรียที่อยู่ภายในหัววัดจะเปลี่ยนอิออนดังกล่าวนี้ให้เป็นไนตรัสออกไซด์ (nitrous oxide) ที่สามารถตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าได้ นอกจากนี้การประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ชนิดอื่นๆ ทางด้านนี้ เช่น บีโอดีเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดของเสียจำพวกสารอินทรีย์ ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารพิษ เช่น ยาฆ่าแมลงพวกออร์กาโน-ฟอสเฟตและคาร์บาเมต เป็นต้น

(โสภา กลินจันทร์, 2554)

**6. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลง**

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ให้ผลที่รวดเร็วและแม่นยำมาก ดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์ โดยวิธีไฟเบอร์ออฟติกไบโอเซนเซอร์ (fiber optic biosensor) เพื่อใช้ตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลง โดยอาศัยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน จากการนำเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสมาตรึงบน viologen langmuir-biodgett (LB) film โดยอาศัยแรงระหว่างประจุ (electrostatic force)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

พบว่าสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนของสารออร์กาโนฟอสเฟตในน้ำตัวอย่างได้ โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ (detection limit) ในช่วง 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการตรวจวัดเพียง 5 นาที (Choi *et al*., 1998)

ในปีต่อมาได้มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ตรวจวัดสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตโดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงบน screen-printed carbon electrode โดยใช้ nafion วิธีนี้ให้ผลการตรวจวัดที่แม่นยำ รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายถูก โดยอาศัยการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล ในการย่อยสลายพาราออกซอนและเมทธิลพาราไธออนโดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ เท่ากับ 90 และ 70 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยวิธีอื่น เช่น โพเทนชิโอเมตริกและไฟเบอร์ออฟติกไบโอเซนเซอร์จะให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ในช่วง 20-50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งวิธีแอมเพอโรเมตริกนี้ให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ที่ต่ำกว่า และให้ค่าไวในการตรวจวัด (sensitivity) สำหรับพาราออกซอนและเมทธิลพาราไธออน เท่ากับ 1.67 และ 2.83 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ไบโอเซนเซอร์นี้สามารถทำการวัดซ้ำได้ โดยเมื่อทำการวัดตัวอย่างซ้ำจำนวณ 12 ครั้ง ให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.9 เปอร์เซ็นต์ (Mulchandani *et al*., 1999)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

ในปีเดียวกัน ได้มีการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟต โดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงบนพีเอชอิเลคโทรดด้วยวิธีการเชื่อม (cross-linking) เอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสกับ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งมีกลูตารอลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม วิธีจะทำการวัดความเข้มข้นของโปรตอน (proton) ที่เกิดขึ้นในขณะเกิดการย่อยสลายสารออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งสามารถตรวจวัดพาราออกซอน เอทธิลพาราไธออนและเมทธิลพาราไธออน โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ เท่ากับ 2 ไมโครโมลาร์ ไบโอเซนเซอร์นี้มีความเสถียรสามารถเก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 1 เดือน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ยังคงเหลือ 95 เปอร์เซ็นต์ (Mulchandani *et al*., 1999)

ในปี ค.ศ. 2001 ได้มีการศึกษาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดสารที่เป็นสารพิษต่อระบบประสาท (neurotoxin) โดยการนำสารออร์กาโนฟอสเฟต เช่น พาราออกซอน, diisopropyl fluorophosphate (DFP) และสารจำพวกคาร์บาเมท เช่น คาร์บาริล (carbaryl) มาผสมรวมกันแล้วทำการตรวจวัด พบว่าสามารถแยกแยะแต่ละปฏิกิริยาที่เกิดพร้อมกันได้โดยอาศัยการแข่งขันในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสโดยสารพิษต่อระบบประสาททั้ง 3 ชนิด สารจำพวกคาร์บาเมทจะเป็นสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสชนิดทวนกลับได้ (reversible inhibitor) ซึ่งทำให้เอนไซม์ชนิดนี้ยังคงสามารถย่อยสลายสาร

อะซิติลโคลีนซึ่งเป็นซับสเตรทได้ โดยสารจำพวกคาร์บาเมทนี้จะแย่งซับเสตรทจับกับเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน; competitive inhibitor) ในขณะที่สารออร์กาโนฟอสเฟตจะเป็นสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสชนิดทวนกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor) ซึ่งทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายอะซิติลโคลีนได้ จากการนำเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสและเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงบนซิลิก้าเจล (silica gel) พบว่าสามารถตรวจวัดพาราออกซอนและ DFP ในระดับความเข้มข้นเท่ากับ $10^{-9}$ ถึง $10^{-5}$ โมลาร์ ส่วนคาร์บาริลสามารถวัดที่ความเข้มข้น $5 \times 10^{-8}$ ถึง $1 \times 10^{-5}$ โมลาร์ นอกจากนี้สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของคาร์บาริลในระดับที่ต่ำกว่า $5 \times 10^{-5}$ โมลาร์ ได้หากใช้พาราออกซอนและ DFP ที่ความเข้มข้นสูงกว่า $10^{-5}$ โมลาร์ (Simonian *et al*., 2001)

ในปี ค.ศ. 2002 ได้มีการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดการปนเปื้อนของสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในอาหารตัวอย่าง อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน จากการนำเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสตรึงบน sceen-printed electrode แล้วตรวจวัดการลดลงของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดจากการย่อยสลายอะซิติลโคลีน-คลอไรด์ (acetylthiocholine chloride) โดยเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเทอเรสซึ่งถูกสารออร์กาโนฟอสเฟตยับยั้งการทำงาน พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณพาราออกซอนให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (หรือประมาณ 3.6 นาโนโมลาร์) ไบโอเซนเซอร์นี้สามารถทำการวัดซ้ำโดยให้ค่า %RSD เท่ากับ 7 เปอร์เซ็นต์ (Schulze *et al*., 2002)

ในปีต่อมาได้มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ด้วยระบบ flow injection เพื่อใช้ตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟต-ไฮโดรเลสตรึงบนโกลด์อิเลคโทรด (gold electrode) โดยการเชื่อม (cross-linking) เอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสกับ cystamine และมีกลูตารอลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม วิธี flow injection นี้ให้ผลการตรวจวัดที่แม่นยำ รวดเร็ว และมีความเสถียรโดยสามารถตรวจวัดพาราออกซอนและเมทธิลพาราไธออนให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ในช่วง 1-10 ไมโคโมลาร์ และมีค่าไวในการตรวจวัดเท่ากับ 2.29 และ 1.04 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ตามลำดับ ไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้สามารถทำการวัดซ้ำได้ เมื่อทำการวัดด้วยพาราออกซอนที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จำนวน 20 ครั้ง ให้ค่า %RSD เท่ากับ 3.6 เปอร์เซ็นต์ (Wang *et al*., 2003)

ในปีเดียวกัน ได้มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ร่วมกับวิธีโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ด้วยระบบ flow injection

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศิลปากร

ในการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟต โดยวิธีแอมเพอโรเมตริกนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟต-ไฮโดรเลสตรึงบนโกลด์อิเลคโทรด (gold electrode) โดยการสร้างพันธะโควาเลสท์กับ cystamine ที่ผิวหน้าของอิเลคโทรด และมีกลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม จากนั้นนำอิเลคโทรดฝังลงบนซิลิคอนไดออกไซด์ (silicon dioxide layer) ในขณะที่วิธีโพเทนชิโอเมตริกนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงลงบนพีเอช ทรานดิวเซอร์ (pH transducer) โดยการเชื่อมเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสกับอิเลคโทรด และมีกลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม เมื่อนำไบโอเซนเซอร์นี้ทำการตรวจวัดพาราออกซอน ซึ่งวิธีแอมเพอโรเมตริกและวิธีโพเทนชิโอเมตริกให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ เท่ากับ 0.1 และ 2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้มีข้อดี คือสามารถตรวจวัดยาฆ่าแมลงหลายชนิดพร้อมๆ กันได้ในเวลาเดียวกันได้ (simultaneous) ซึ่งในกรณีวิธีแอมเพอโรเมตริกมีข้อจำกัดตรงที่สามารถทำการตรวจวัดเฉพาะสารออร์กาโนฟอสเฟตที่ถูกเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสย่อยสลายแล้วให้พาราไนโตรฟีนอลเป็นผลิตภัณฑ์เท่านั้น โดยวิธีนี้อาศัยการตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของผลิตภัณฑ์ จึงสามารถวัดได้เฉพาะพาราออกซอนเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถตรวจวัดไดคลอวอส (dichlorvos) และไดอะซินอน (diazinon) เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้ เมื่อถูกเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสย่อยสลายแล้ว จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่พาราไนโตรฟีนอล แต่วิธีโพเทนชิโอเมตริกสามารถตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตได้ทุกชนิด เนื่องจากวิธีนี้อาศัยการตรวจวัดโปรตอนที่เกิดขึ้น ในขณะที่ยาฆ่าแมลงถูกเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสย่อยสลาย ไบโอเซนเซอร์นี้สามารถทำการวัดซ้ำได้ เมื่อทำการวัดพาราออกซอนและไดคลอวอสที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จำนวน 20 ครั้ง ซึ่งวิธีแอมเพอโรเมตริกให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพาราออกซอน แต่วิธีโพเทนชิโอเมตริกให้ค่า %RSD เท่ากับ 3.8 และ 8 เปอร์เซ็นต์สำหรับพาราออกซอนและไดคลอวอสตามลำดับ โดยทั้ง 2 วิธีนี้ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยกว่า 1 นาที (Schoning *et al*., 2003)

ในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ด้วยระบบ flow injection เพื่อใช้ตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube; CNT) แล้วติดลงบนกลาสซีคาร์บอน (glassy carbon electrode; GC) อิเลคโทรด โดยใช้ nafion สำหรับการใช้คาร์บอน-นาโนทิวป์สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดกับกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดที่ใช้โดยทั่วไป ซึ่งมักเกิดการสะสมของพาราไนโตรฟีนอลที่เป็นผลิตภัณฑ์บริเวณผิวหน้าของอิเลคโทรด (surface fouling) ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณทางไฟฟ้าได้ เมื่อนำไบโอเซนเซอร์นี้มาตรวจวัดพาราออกซอนและเมทธิลพาราไธออนให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้เท่ากับ 150 และ 800

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

นาโนโมลาร์ตามลำดับ และให้ค่าความจำเพาะสำหรับพาราออกซอนและเมทธิลพาราไธออน เท่ากับ 25 และ 6 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Deo *et al*., 2005)

ในปีเดียวกัน ได้มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีไฟเบอร์ออฟติกไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้ตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงระหว่างอนุภาคของทองที่เล็กในระดับนาโน (gold nanoparticle) โดยการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ระหว่างหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl groups) ของซีสตีนโมเลกุล (cysteine residues) ที่อยู่บนเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลส หรืออาจจะสร้างพันธะโควาเลนต์ของโมเลกุลไลซีน (lysine residues) บนเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลส นอกจากนี้อาจจะติดมาลิอิไมด์ (maleimide) ที่ผิวของอนุภาคทอง ซึ่งจะสามารถทำการเชื่อมติดกับเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสได้ด้วยพันธะโควาเลนต์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกเชื่อมติดกับอนุภาคทองมาจับกับสาร fluorophore decoy แล้วทำการวัดความเข้นของการเรืองแสงของสาร fluorophore decoy เนื่องจากสาร fluorophore decoy นี้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงสามารถจับกับเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ (เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน; competitive inhibitor) ส่งผลให้อนุภาคทองที่เชื่อมติดอยู่กับเอนไซม์อยู่ใกล้กับ fluorophore decoy เกิดกระบวนการ fluorescence resonance energy transfer (FRET) โดยอนุภาคทองทำหน้าที่เป็นตัวให้พลังงานแสง (donor) แก่สาร fluorophore decoy ซึ่งเป็นตัวรับพลังงานแสง (acceptor) ทำให้ค่าความเข้มของการเรืองแสงของสาร fluorophore decoy นี้เพิ่มสูงขึ้น แต่ในกรณีที่มียาฆ่าแมลง ยาฆ่าแมลงจะเข้าจับเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองแทนที่สาร fluorophore decoy เนื่องจากยาฆ่าแมลงจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่าสาร fluorophore decoy ทำให้สาร fluorophore decoy ไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ จึงอยู่ห่างจากอนุภาคทอง ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของการเรืองแสงของสาร fluorophore decoy ลดลง ดังนั้นความเข้มแสงที่วัดได้จากสาร fluorophore decoy สามารถบ่งบอกถึงปริมาณของสารออร์กาโนฟอสเฟตที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟต-ไฮโดรเลส ซึ่งพบว่าได้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ของพาราออกซอนเท่ากับ 5 ไมโครโมลาร์ (Simonian *et al*., 2005)

ในปี ค.ศ. 2006 มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยโดยวิธีไฟเบอร์ออฟติกไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้ในการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟต โดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟต-ไฮโดรเลสเชื่อมติดกับสารเรืองแสง (fluorescene) คือ carboxy naphthofluorescein (CNF) ด้วยไบโอติน (biotin) กลายเป็น OPH-CNF-biotin conjugate โดยสามารถจับกับ avidin ที่ถูกตรึงอยู่กับอิเลคโทรด polystyrene waveguide ในขณะที่ reference waveguide จะใช้ BSA เมื่อสารออร์กาโนฟอสเฟตถูกเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสย่อยสลายเป็นพาราไนโตรฟีนอล

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

จะเกิดการปลดปล่อยโปรตอน ทำให้พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เกิดการเปลี่ยนแปลง และสาร CNF ซึ่งเป็นสารที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (pH-sensitive fluorophore) จะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 598 นาโนเมตร และปลดปล่อยแสงที่ความยาวคลื่น 668 นาโนเมตร ทำให้สามารถวัดความเข้มข้นของพาราออกซอนและ diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) ให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้ เท่ากับ 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Viveros *et al*., 2005)

ในปี ค.ศ. 2008 มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริก ไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้ตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลส ในรูปสกัดหยาบ (crude enzyme) และรูปผลึก (crystal enzyme) ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด โดยเชื่อมติดกับคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotubes; CNTs) และ BSA ซึ่งมีกลูตารอลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม เมื่อทำการวัดพาราออกซอนให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้เท่ากับ 314 และ 500 นาโนโมลาร์ สำหรับเอนไซม์ในรูปผลึก และรูปสกัดหยาบตามลำดับ ไบโอเซนเซอร์นี้ให้ค่าไวในการตรวจวัดเท่ากับ 25.95 และ 17.29 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ สำหรับเอนไซม์ในภาพผลึก และภาพสกัดหยาบตามลำดับ (Laothanachareon *et al*., 2008)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ในปี ค.ศ. 2009 มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริก ไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยใช้ mesoporous carbon (MC) และ carbon black (CB) เป็นตัวช่วยในการส่งอิเลคตรอนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล ไปยังอิเลคโทรด ซึ่งพาราไนโตรฟีนอลเป็นผลิตผลที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลส ทำการเคลือบกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วย MC จากนั้นเคลือบอิเลคโทรดต่อด้วย CB และนำมาตรึงกับเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสด้วย nafion ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถตรวจวัดพาราออกซอนให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้เท่ากับ 120 นาโนโมลาร์ และให้ค่าไวในการตรวจวัดเท่ากับ 198 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ โดยใช้เวลาในการตรวจวัดประมาณ 10 วินาที (Lee *et al*., 2009)

ในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานการศึกษาไบโอเซนเซอร์โดยวิธีแอมเพอโรเมตริก ไบโอเซนเซอร์ด้วยระบบ flow injection เพื่อตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสเฟต โดยนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์แบบชั้นเดียว (single wall carbon nanotube; SWNTs) และแบบหลายชั้น (multiwall carbon nanotubes; MWNTs) ด้วยพันธะโคเวเลนต์ จากนั้นติดเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ทั้ง 2 ชนิด ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด (glassy carbon electrode; GC) ด้วยใช้ nafion พบว่าเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟต-ไฮโดรเลสที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์แบบชั้นเดียวจะให้ประสิทธิภาพดีกว่าเอนไซม์

ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์แบบหลายชั้น โดยเมื่อทำการวัดพาราออกซอนให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำการวัดได้เท่ากับ 10 นาโนโมลาร์ และ 6.4 ไมโครโมลาร์ สำหรับเอนไซม์ที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์แบบชั้นเดียว และเอนไซม์ที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์แบบหลายชั้นตามลำดับ จากนั้นนำเอนไซม์ออร์กาโนฟอสเฟตไฮโดรเลสที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์แบบชั้นเดียวทำการวัดพาราออกซอนจำนวน 18 ครั้ง ให้ค่า %RSD เท่ากับ 3.2 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 เดือน การตอบสนองต่อสัญญาณจะลดลงเหลือ 75 เปอร์เซ็นต์ (Pedrosa *et al*., 2010)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

### 1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียตัวนี้ได้มาจากการคัดแยก (isolate) เชื้อแบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม เขตตลิ่งชัน แขวงบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร (Keprasertsup *et al*., 2001)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

| Bacteria | Genotype | Source |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* DH5α | F$^-$ *lend* A1 *hsd* R17 ($r^-_k m^+_k$) *supE44 thi-1* *rec*A1 *gyr* A ($Nal^r$) relA1 $\Delta$*(lac*IZYA-*arg*F *)* U169*deo*R *(*$\phi$*80dlac*$\Delta$*(lacZ)*M15*)* | Ausubel, 1997 |
| *Escherichia coli* BL21 | F$^-$ *omp*T *gal dcm lon hsd*$S_B$($r_B^-$ $m_B^-$) $\lambda$(DE3 [*lacI lac*UV5-T7 gene 1 *ind*1 *sam*7 *nin*5]) | Invitrogen, USA |
| *Escherichia coli* One Shot® TOP10 Chemically Competent | F$^-$ *mcrA*$\Delta$ (*mrr-hsd*RMS-*mcr* BC) $\phi$80lacZ$\Delta$M15 $\Delta$*lac*X*74rec*A1 *ara*D139 $\Delta$*(ara-leu)*7697 *gal*U *gal*K *end*A1 *nup*G | Invitrogen, USA |

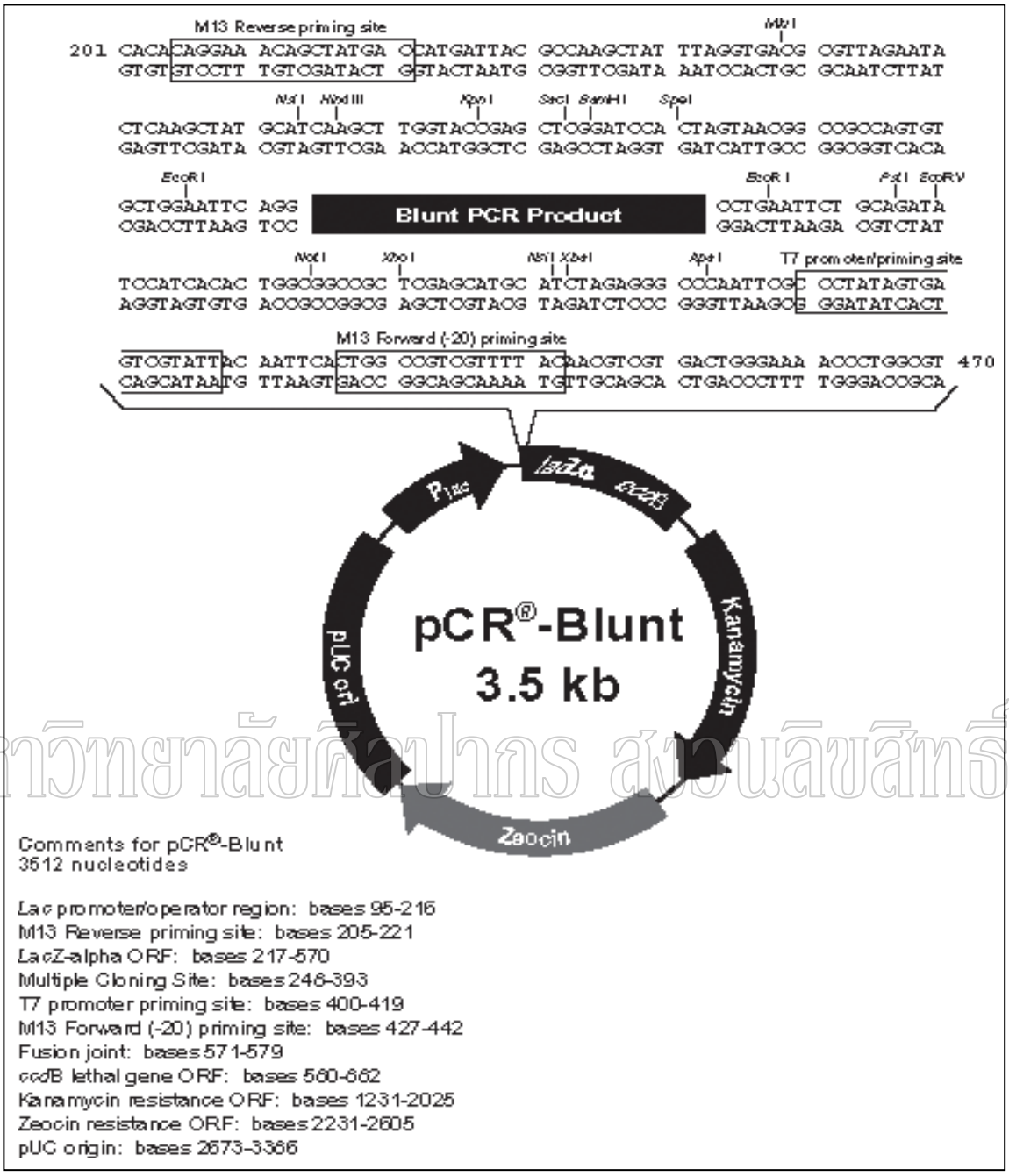
**2. ดีเอ็นเอพาหะ (vectors)**

2.1 พลาสมิด pCR®-Blunt (Invitrogen, USA) เป็นดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end) ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์ proofreading DNA polymerase (Platinum Pfx DNA polymerase) pCR®-Blunt มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin resistance gene) และยีน lacZα-ccdB ทำหน้าที่เป็น positive selective gene ทำให้สามารถคัดเลือกรีคอมบิแนนท์เซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้ง่ายยิ่งขึ้น นอกจากนี้พลาสมิดชนิดนี้ยังมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI คร่อมระหว่างตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในภาพที่ 22

2.2 พลาสมิด pGEX-4T-2 (Amersham Biosciences, UK) มีส่วนที่เป็น multiple cloning sites อยู่ติดกับยีนที่สร้าง glutathione-S-transferase ทำให้เกิด fusion protein จากการแสดงออกของยีนที่โคลน ซึ่งช่วยให้การแยกโปรตีนที่ได้จากยีนที่ต้องการในกระบวนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ พลาสมิดนี้ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (promoter) ซึ่งมีการแสดงออกของยีนได้ในระดับสูงและสามารถเหนี่ยวนำได้ คือ tac promoter ที่ควบคุมส่วนของ lac operator, ribosome binding site, start codon (ATG) และมีส่วนที่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทรอมบิน (thrombin) ในตำแหน่งระหว่างยีนที่สร้าง glutathione-S-transferase และส่วน multiple cloning sites ซึ่งทำให้สามารถใช้ตัดส่วนที่เป็น fusion protein ออกจากโปรตีนที่ต้องการในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้เวคเตอร์ pGEX-4T-2 ยังมียีนส่วนที่ผลิตเอนไซม์ beta-lactamase ที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) โดยถูกควบคุมด้วยยีน *lac*I$^{q}$ ที่สามารถแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E.coli* อีกทั้งสภาวะที่ใช้ในการชะเอา fusion protein ออกจาก affinity matrix นั้นเป็นสภาวะที่นุ่มนวลจึงมีผลกระทบกับ antigenicity และ functional activity ของโปรตีนน้อยมากดังแสดงในภาพที่ 23

2.3 พลาสมิด pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, UK) เป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติเหมือนกับพลาสมิด pGEX-4T-2 แต่แตกต่างกันตรงบริเวณตำแหน่งระหว่างยีนที่สร้าง glutathione-S-transferase และส่วน multiple cloning sites ซึ่งในพลาสมิด pGEX-6P-1 จะเป็นตำแหน่งที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ PreScission Protease ดังแสดงในภาพที่ 24

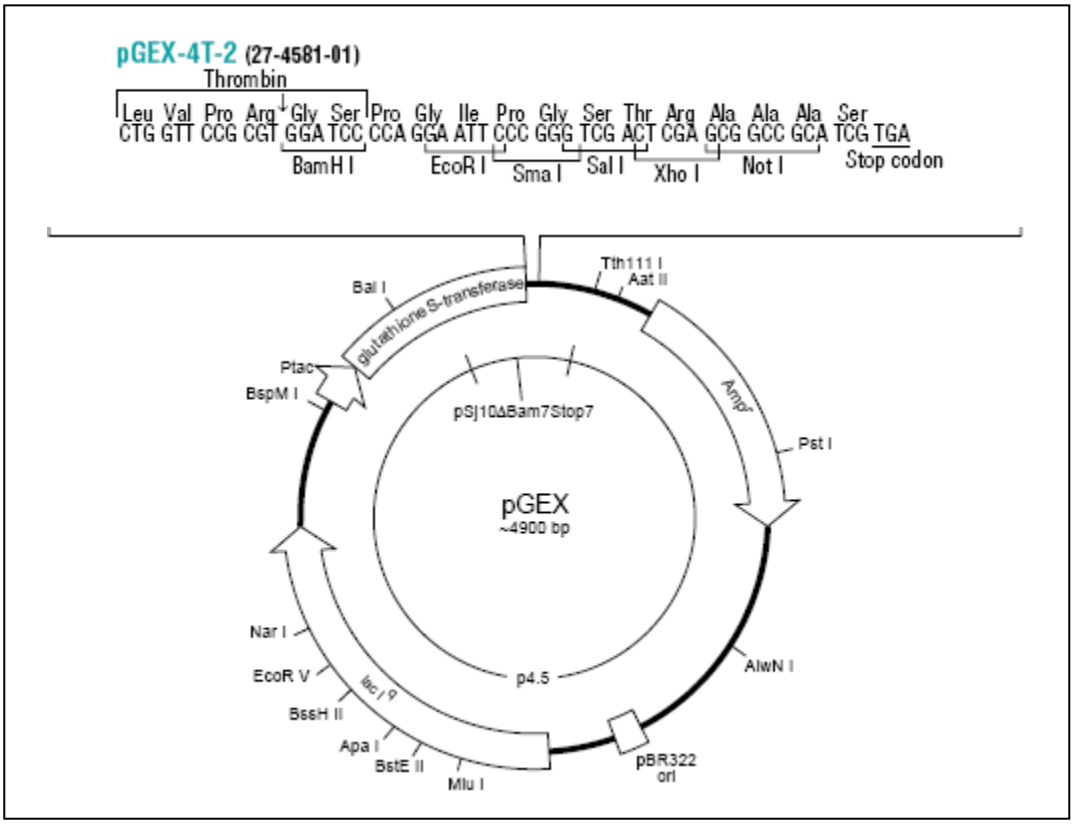
มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร




มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

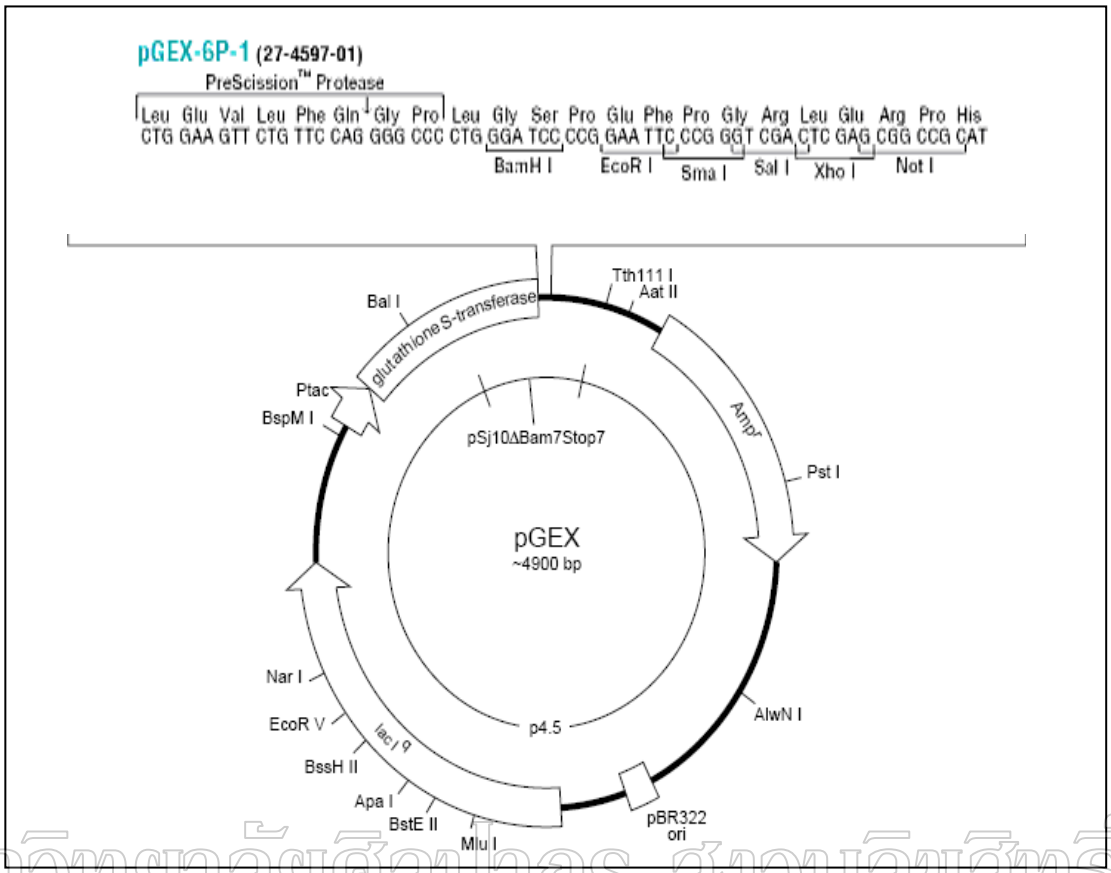
ภาพที่ 22 โครงสร้างดีเอ็นเอพาหะ pCR® -Blunt แสดง multiple cloning sites

ที่มา: Invitrogen, USA




มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 23 โครงสร้างดีเอ็นเอพาหะ pGEX-4T-2 แสดง multiple cloning sites
ที่มา: Amersham Biosciences, UK




มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 24 โครงสร้างดีเอ็นเอพาหะ pGEX-6P-1 แสดง multiple cloning sites

ที่มา: Amersham Biosciences, UK

**3. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย**

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

| ชุดที่ | ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|---|
| 1 | Exp1 | CGG GAT CCA TGC CCC TGA AGA ACC |
| | Exp2 | CGC TCG AGT CAC TTG GGG TTG ACG AC |

**4. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA marker)**

4.1 DNA ladder ขนาด 1 กิโลเบส (Biolabs, USA)

4.2 DNA ladder ขนาด 1 กิโลเยส (Fermentas, USA)

**5. โปรตีนมาตรฐาน (standard protein marker)**

5.1 PRO-STAIN (II) Prestained Protein Marker (Intron Biotechnology, Korea)

5.2 Kalaidoscope Marker (BIO-RAD, USA)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

5.3 Perfect Protein Ladder (Vivantis, USA)

5.4 BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, USA)

**6. เอนไซม์ (enzymes)**

6.1 Rnase A (Amresco, USA)

6.2 T4 DNA ligase (Invitrogen, USA)

6.3 *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

6.4 Platinum *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen, USA)

6.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้การวิจัย ได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Xho*I (GibcoBRL, USA)

6.6 เอนไซม์ทรอมบิน (Amersham Biosciences, UK)

**7. ชุดทดสอบสำเร็จภาพ**

7.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Germany)

7.2 ชุดโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ QIAGEN PCR Cloning kit (Qiagen, Germany)

7.3 ชุดโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ Zero Blunt® PCR Cloning kit (Invitrogen, USA)

7.4 ชุดแยกบริสุทธิ์โปรตีน HisTrap FF (Amersham Biosciences, UK)

7.5 ชุดแยกบริสุทธิ์โปรตีน GSTPrep FF 16/10 (Amersham Biosciences, UK)

7.6 ชุดตรวจวัดโปรตีน Bio-RAD Bradford Protein Assay (BIO-RAD; USA)

**8. อิเลคโทรด**

8.1 glassy carbon electrode (BAS; Japan) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 6 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร

8.2 Pt electrode ขนาด 3 mm diameter (home made)

8.3 Ag/AgCl electrode (BAS; Japan) มีความยาวประมาณ 40 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลงวันลิขสิทธิ์

ภาพที่ 25 glassy carbon electrode (ภาพซ้าย) และ Ag/AgCl electrode (ภาพขวา)
ที่มา: BAS, Japan

**9. สารเคมี**

| | ชื่อสารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| 9.1 | acetic acid | Lab Scan |
| 9.2 | acrylamide | Fluka |
| 9.3 | agar | Merck |
| 9.4 | agarose | Gibco BRL |
| 9.5 | aluminium oxide | BDH |
| 9.6 | ammonium persulfate | Fluka |
| 9.7 | ampicillin | Fluka |
| 9.8 | bacto tryptone | Fluka |
| 9.9 | bacto yeast extract | Scharlau Chemie |
| 9.10 | bromophenol blue | Scharlau Chemie |
| 9.11 | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside | Promega |
| 9.12 | bovine serum albumin | PAA |
| 9.13 | calcium chloride | Fluka |
| 9.14 | chloroform | merck |
| 9.15 | chorpyriphos | Fluka |
| 9.16 | coomassie brilliant blue | Fluka |
| 9.17 | coumaphos | Fluka |
| 9.18 | dipotassium hydrogen phosphate | Fluka |
| 9.19 | 1,4-Dithiothreitol | Fluka |
| 9.20 | dNTPs | Promega |
| 9.21 | ethanol | BHD Analar |
| 9.22 | ethidium bromide | Sigma |
| 9.23 | ethylene diamine tetraacetic | Fluka |
| 9.24 | fenitrothion | Fluka |
| 9.25 | glacial acetic acid | BHD Analar |
| 9.26 | glycerol | Boehringer Mannheim |
| 9.27 | guanidine hydrochloride | Sigma |
| 9.28 | hydrocloric acid | Fluka |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

| | ชื่อสารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| 9.29 | isoamyl alcohol | Merck |
| 9.30 | isopropanol | Lab Scan |
| 9.31 | isopropyl thiogalactosidase (IPTG) | Amresco |
| 9.32 | kanamycin | Sigma |
| 9.33 | magnesium chloride | Promega |
| 9.34 | magnesium sulfate heptahydrate | Fluka |
| 9.35 | marathion | Fluka |
| 9.36 | methanol | LAB SCAN |
| 9.37 | methyl parathion | Fluka |
| 9.38 | methyl parathion (FOLIDOL-E605 M50) | Bayer |
| 9.39 | multiwall carbon nanotubes | Cheap Tubes Inc. |
| 9.40 | N-N'-methylene- bisacrylamide | Fluka |
| 9.41 | paraoxon | Fluka |
| 9.42 | parathion | Fluka |
| 9.43 | phenol | Fluka |
| 9.44 | *p*-nitrophenol | Fluka |
| 9.45 | poly (allylamine hydrochloride) | Aldrich |
| 9.46 | potassium dihydrogen phosphate | Fluka |
| 9.47 | potassium hydrogen phosphate | Riedel-deHaën® |
| 9.48 | sodium acetate | Fluka |
| 9.49 | sodium chloride | Fluka |
| 9.50 | sodium dodecyl sulfate | Fluka |
| 9.51 | sodium hydroxide | Akzo Nobel |
| 9.52 | TE saturated phenol | Invitrogen |
| 9.53 | 99% tritonX-100 | Amresco |
| 9.54 | Tris (hydroxylmethyl) aminomethane | GibcoBRL |
| 9.55 | Tryptone | Schalau |
| 9.56 | Yeast extract | Schalau |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**10. เครื่องมือ**

10.1 autoclave Model ss-325 (Tomy, Korea)

10.2 biological safety cabinet class II Type AlB3 (Nuaire, USA)

10.3 centrifuge รุ่น GS-15R centrifuge (Beckman Coulter, USA)

10.4 centrifuge รุ่น Universal 12 (Hettich, England)

10.5 deionizer pure UV ultrapure water system (Thermo Fisher Scientific, USA)

10.6 desiccator catalog NO. 5311 (Nalgene labware, USA)

10.7 fast protein in liquid chromatography (FPLC) รุ่น ÄKTAFPLC (Amersham biosciences, UK)

10.8 gel chamber (BIO-RAD, USA)

10.9 French® Pressure Cells Press (Spectronics, UK)

10.10 microcentrifuge MPW 52 Model 11374 Angle Rotor (MPW Med. Instruments, Poland)

10.11 microplate reader (Spectronic, UK)

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงวนลิขสิทธิ์

10.12 oven Model ULM 500 (Memmert, UK)

10.13 power supply (BIO-RAD; USA)

10.14 spectrophotometer รุ่น Genesys 8 (Spectronic, UK)

10.15 water bath Model WB 29 Gable cover (Memmert, UK)

10.16 TPGSTAT 12 และ GPES software (Eco Chemie; The Netherlands)

**11. อุปกรณ์อื่นๆ**

11.1 aluminum foil

11.2 autopipette

11.3 beaker

11.4 centrifuge tube

11.5 cylinder

11.6 microtube

11.7 erlenmeyer flask

11.8 forcep

11.9 glass pipette

11.10 parafilm

11.11 loop

11.12 pasture pipette

11.13 petridish

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

11.14 rack

11.15 spreader

11.16 wrap

11.17 ตะเกียงแอลกอฮอล์

11.18 ถุงพลาสติก

11.19 ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ

11.20 สำลี

11.21 ผ้าสักหลาด

11.22 Amicon Ultra-4 ขนาด 10 kda (Millipore; USA)

10.23 Amicon Ultra-4 ขนาด 30 kda (Millipore; USA)

10.24 Amicon Ultra-4 ขนาด 50 kda (Millipore; USA)

10.25 syringe filter ขนาด 0.45 micrometers (Corning; USA)

10.26 SnakeSkin® Pleated Dialysis Tubing (Pierce, USA)

10.27 syringe

## วิธีดำเนินการวิจัย

**1. การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนใน expression vecter pGEX-4T-2**

**1.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

1.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไทออนไฮโดร-เลสโดยเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณหัวและท้ายของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไทออนไฮโดรเลสจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (เสาวลักษณ์ วงเทียนหลาย, 2547) โดยให้มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I

ไพรเมอร์ Exp1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CGG GAT CCA TGC CCC TGA AGA ACC

ไพรเมอร์ Exp2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น CGC TCG AGT CAC TTG GGG TTG ACG AC

โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ในไพรเมอร์ Exp1 และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ในไพรเมอร์ Exp2

1.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจีโนม (Sambrook *et al.*, 1989)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

ทำการสกัดดีเอ็นเอจีโนมจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็นที่มีเมทธิลพาราไอออน ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์โดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 567 ไมโครลิตร เติมสารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย CTAB/โซเดียมคลอไรด์ (CTAB ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล อัลกอฮอล์ (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม :

ไอโซเอมิล อัลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ดูดมา ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนลงในหลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลายที่ดูดมา ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหัวท้ายหลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสออก แล้วทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยใช้เครื่องดูดความชื้นระบบสุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 8.0 ที่มี DNase free pancreatic RNase ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.1.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

หลังจากที่ทำการสกัดดีเอ็นเอจีโนมจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* นำมาทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ *Pfx* amplification ความเข้มข้น 1X, dNTPs ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์, magnesium sulfate ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ Exp1 และ Exp2 ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นเอแม่แบบ (ดีเอ็นเอจีโนมที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ในข้อ 1.1.2) ความเข้มข้น 19 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเอนไซม์ Platinum *Pfx* DNA polymerase 2.5 ยูนิต ในปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| เริ่มต้นที่ | 95 องศาเซลเซียส | 5 นาที | |
| - deuaturation | 95 องศาเซลเซียส | 1 นาที | 30 รอบ |
| - annealing | 55 องศาเซลเซียส | 1 นาที | |
| - extension | 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที | |
| - post extension | 72 องศาเซลเซียส | 10 นาที | |

1.1.4 การแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

หลังจากที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว นำมาทำการแยกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วละลายเจลอะกาโรสในบัฟเฟอร์ TAE pH 8.0 ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เทเจลอะกาโรสลงในถาดเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading buffer ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 หยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ loading buffer ในหลุมของเจลอะกาโรส และใช้ 100 bp DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

ทำอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 80-90 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและเอนไซม์ DNase นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.1.5 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Germany)

หลังจากที่ทำการแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโตร-โฟเรซิสแล้ว ทำการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธ์โดยทำการสกัดออกจากเจลอะกาโรส โดยตรวจดูแถบดีเอ็นเอในแผ่นเจลอะกาโรสภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นใช้ใบมีดที่สะอาดปราศจากเชื้อและเอนไซม์ DNase ตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ทราบน้ำหนัก นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเจล ทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอตามวิธีในคู่มือของ QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) โดยเติมบัฟเฟอร์ QG ในปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมด แล้วดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column ที่อยู่ในหลอดเก็บสารละลายขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทของเหลวในหลอดทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทของเหลวทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง เทของเหลวทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นย้าย QIAquick spin column ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.1.6 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะโดยวิธีสำเร็จรูปโดยใช้ Zero Blunt PCR Cloning (Invitrogen, USA) สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเอนไซม์ Platinum *Pfx* DNA polymerase

หลังจากที่ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธ์แล้ว ทำการเชื่อมต่อชิ้นเข้ากับดีเอ็นเอพาหะสำเร็จรูป เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์นั้นจะใช้เอนไซม์ Platinum *Pfx* DNA polymerase ในการเพิ่มจำนวณ ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะปลายทู่ จึงต้องทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะที่มีลักษณะปลายทู่ด้วย ดังนั้นจึงใช้พลาสมิด pCR Blunt เป็นดีเอ็นเอพาหะ โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวมาเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pCR Blunt ตามวิธีในคู่มือของ Zero Blunt PCR Cloning kit (Invitrogen, USA) โดยในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อประกอบด้วยพลาสมิด pCR Blunt ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนดีเอ็นเอปลายทู่ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์สำหรับเชื่อมต่อที่มีอะดินีนนิวคลีโอไทด์-

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ไตรฟอสเฟต (ligation buffer with ATP) ความเข้มข้น 1X, น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและเอนไซม์ DNase ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase 4 ยูนิต ในปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

1.1.7 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยใช้ One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, USA)

หลังจากที่ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด pCR Blunt แล้วทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยใช้เชื้อ *E. coli* stain TOP10 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อทำการเพิ่มจำนวณของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยละลายเซลล์เจ้าบ้าน One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* ปริมาตร 50 ไมโครลิตรบนน้ำแข็ง จากนั้นเติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 1.1.5 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตคนเบาๆ นำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.1.8 การสกัดพลาสมิดจากรีคอมบิแนนท์โคลนโดยวิธี Rapid Alkaline Extraction (Sambrook *et al.*, 1989)

หลังจากที่ทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli* stain TOP10 เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว จากนั้นทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากเชื้อ *E. coli* stain TOP10 เพื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ไปใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEX 4T-2 โดยนำทรานส์ฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR Blunt ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์โดยแบ่งเชื้อใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติมเซลล์ที่ยังเหลืออยู่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์จนกระทั่งเซลล์หมด จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย GTE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวณ 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย GTE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำให้เซลล์แตกโดยเติมสารละลาย alkaline SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย

การกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที เติมสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วแช่น้ำแข็งต่ออีก 5 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ ทำการกำจัดโปรตีนและเศษเซลล์โดยเติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบา นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ทำการกำจัด phenol ส่วนเกินโดยเติม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหัวท้ายหลอดอย่างเบา นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตรที่เป็น 2 เท่าของสารละลาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งด้วยเครื่องดูดความชื้นสุญญากาศ ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

1.1.9 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

หลังจากที่ทำการเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากเชื้อ *E. coli* stain TOP10 แล้ว ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ออกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มาตัดอีกครั้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I โดยผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทำการแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ 1 kb DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

1.1.10 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Germany)

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I แล้วมาทำการแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นสกัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.1.4 และข้อ 1.1.5

**1.2 การเตรียมพลาสมิด pGEX-4T-2**

1.2.1 การสกัดพลาสมิด pGEX-4T-2

หลังจากที่ทำการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้ในการโคลนแล้ว จะต้องทำการเตรียมพลาสมิดที่จะใช้ในการโคลนด้วย โดยทำการสกัดพลาสมิด pGEX-4T-2 ออกจากเชื้อ *E. coli* DH5α ที่ใช้เพิ่มปริมาณของพลาสมิด โดยนำเชื้อ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-2 ที่สามารถเจริญอยู่บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 12-18 ชั่วโมง และทำการสกัดพลาสมิดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.8

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

1.2.2 การตัดพลาสมิด pGEX-4T-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

หลังจากที่ทำการสกัดพลาสมิด pGEX-4T-2 นำมาแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เพื่อตรวจสอบพลาสมิด pGEX-4T-2 ที่สกัดได้ จากนั้นทำการตัด พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.9

1.2.3 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction

ชิ้นส่วนของพลาสมิด pGEX-4T-2 หลังจากที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I แล้ว นำมาแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทร-โฟเรซิส จากนั้นทำการสกัดชิ้นส่วนของพลาสมิดออกจากเจลอะกาโรส โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.4 และข้อ 1.1.5

**1.3 การเตรียมรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ**

หลังจากที่เตรียมชิ้นส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสและชิ้นส่วนของพลาสมิด pGEX-4T-2 แล้ว ทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 2 เข้าด้วยกัน โดยทำการผสมสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Insert : vector (10:1) | 11.0 | ไมโครลิตร |
| buffer (10x) | 2.0 | ไมโครลิตร |
| เอนไซม์ T4 DNA ligase | 2.0 | ไมโครลิตร |
| Sterile DDW | 5.0 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรรวม | 20.0 | ไมโครลิตร |

ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

**1.4 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α (Sambrook *et al.*, 1989)**

หลังจากที่ทำการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสแล้ว ทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยนำเชื้อ *E. coli* DH5α ที่สามารถเจริญอยู่บนอาหารแข็ง LB มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน ทำการตกตะกอนเซลล์โดยการถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำการเตรียม competent cell โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปริมาตรหลอดละ 200 ไมโครลิตร เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ปริมาตรหลอดละ 10 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเกลี่ยเซลล์ที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ KASETSART UNIVERSITY

**1.5 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน (Expression host)**

หลังจากทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว จากนั้นทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้โดยวิธี restriction enzyme analysis ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I และวิธีทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยวิธี microtiter plate activity assay ที่สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้ จากนั้นทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ทำการตรวจสอบแล้วตามวิธีเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.8 แล้วทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21

**2. การทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ (transformants)**

หลังจากทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้ว ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้โดยวิธีดังต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**2.1 การตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วยวิธี Restriction Enzyme Analysis**

ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ด้วยวิธี restriction enzyme analysis โดยทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสจากทรานส์ฟอร์แมนท์ โดยการดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.8 แล้วทำการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.1.9

**2.2 การตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วยการทดสอบกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ด้วยวิธี Microtiter Plate Activity Assay**

ทำการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ด้วยวิธีทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยวิธี microtiter plate activity assay ที่สามารถย่อยสลายเมทธิล-พาราไธออนได้ โดยนำสารละลายที่ต้องการทดสอบใส่ใน substrate mixture (เมทธิลพาราไธออน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, Tris-HCl pH 8.5 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และ tritonX-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate แล้วใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เขี่ยโคโลนีของเชื้อรีคอมบิแนนท์ที่ต้องการทดสอบใส่ลงใน microtiter plate แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader

(Spectronic, UK) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ซึ่งจะวัด substrate mixture ที่เปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนๆ เป็นสีเหลืองเข้ม โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control คือ microtiter plate ที่มีเฉพาะ substrate mixture เพียงอย่างเดียว และ positive control คือ microtiter plate ที่มี substrate mixture และโคโลนีของเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลง เมทธิลพารา-ไธออน) พร้อมทั้งทำการตั้งชื่อให้รีคอมบิแนนท์โคลนที่ทดสอบแล้วโดยให้ DpGT คือ *E. coli* DH5α :: pGEX-4T-2 ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลส และ BpGT คือ *E. coli* BL21 :: pGEX-4T-2 ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลส

**3. การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

หลังจากที่ทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส เข้าสู่ *E. coli* BL21 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนแล้ว จากนั้นทำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โดยวิธีตามคู่มือพลาสมิด pGEX (Amersham Biosciences, UK) โดยนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น (start culture) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1 OD ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3-4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.3-0.4 OD จากนั้นทำการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงต่ออีก 5-6 ชั่วโมง

**4. การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

**4.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส จากโคลน BpGT**

หลังจากที่ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลสแล้ว ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที (JR 25.5, BECKMAN) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ที่พีเอช 8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแตกเซลล์ด้วย frence pressure cell ให้มีอัตราการไหลของตัวอย่าง 15-20 หยดต่อนาที และควบคุมให้มีแรงดันภายในเครื่องคงที่ที่ 1,500 ปอนด์ นำเซลล์ที่ผ่านการแตกเซลล์แล้วไปปั่นแยก

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ส่วนตะกอนกับส่วนของเหลวที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (JR 25.5, BECKMAN) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในกรณีที่ยังไม่ทดลองต่อทันทีให้แยกเก็บส่วนใสและส่วนตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำโปรตีนทั้งส่วนตะกอนและส่วนของเหลวไปแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

**4.2 การละลายโปรตีนด้วยยูเรีย**

หลังจากที่ทำการแตกเซลล์ และปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนแล้ว หลังจากที่นำตัวอย่างของโปรตีนทั้งส่วนใส และส่วนตะกอนไปแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปตะกอน จึงนำโปรตีนในส่วนตะกอนมาทำการละลายด้วย PBS buffer pH 7.4 ที่มียูเรีย (urea) ความเข้มข้น 8 โมลาร์ (8 M urea, 50 mM PBS buffer pH 7.4, 1 mM DTT) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ปลายปิเปตคนเบาๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นตกตะกอนเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (JR 25.5, BECKMAN) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในกรณีที่ยังไม่ทดลองต่อทันทีให้แยกเก็บส่วนใสไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นำโปรตีนส่วนของเหลวที่ได้ไปแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ลิขสิทธิ์

**4.3 การทำไดอะไลซิส**

หลังจากที่ทำการละลายตะกอนของโปรตีนด้วยยูเรีย และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกเศษเซลล์ที่ไม่ละลายออกแล้ว นำโปรตีนส่วนของเหลวที่ได้มาทำไดอะไลซิส (dialysis) เพื่อกำจัดยูเรียออก ทำให้โปรตีนเกิดการ refold โดยเทส่วนของเหลวใส่ลงในถุงสำหรับทำไดอะไลซิส จากนั้นแช่ถุงสำหรับทำไดอะไลซิสที่ภายในบรรจุโปรตีนลงใน PBS buffer pH 7.4 ที่มียูเรียความเข้มข้น 6 โมลาร์ (8 M urea, 50 mM PBS buffer pH 7.4, 1 mM DTT, 50 μM $ZnSO_4$) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทำการกวนด้วยแม่เหล็กตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยน PBS buffer ทุกๆ ชั่วโมงโดยลดความเข้มข้นของยูเรียใน PBS buffer ลงจาก PBS buffer ที่มียูเรียความเข้มข้น 6 โมลาร์ เป็น PBS buffer ที่มียูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง, จาก PBS buffer ที่มียูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็น PBS buffer ที่มียูเรียความเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง, จาก PBS buffer ที่มียูเรียความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็น PBS buffer ที่ไม่มี urea จากนั้นทำการ dialsis ด้วย PBS buffer ที่ไม่มี urea ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน นำโปรตีนที่ทำการไดอะไลซิสแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที

(JR 25.5, BECKMAN) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในกรณีที่ยังไม่ทดลองต่อทันทีให้แยกเก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำโปรตีนที่ผ่านการทำไดอะไลซิสไปแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

**4.4 การแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วย GSTPrep FF16/10 column (GE Healthcare, USA)**

หลังจากที่ทำการไดอะไลซิสโปรตีนเพื่อเอายูเรียออกแล้ว นำโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซิสมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที หรือนำมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้แอฟฟินิตี้คอลัมน์ (affinity column) คือ GSTPrep FF 16/10 column โดยคอลัมน์นี้สามารถจับกับ GST-tag protein ที่เชื่อมติดกับรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสได้ โดยทำการต่อคอลัมน์เข้ากับเครื่อง FPLC (fast protein in liquid chromatography) โดยเชื่อมคอลัมน์ด้วยตัวเชื่อม (adaptor supplied) ทั้งหัวและท้ายของคอลัมน์เข้ากับปั๊ม (pump) ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศภายในคอลัมน์ จากนั้นทำให้คอลัมน์อิ่มตัวด้วย binding buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ประมาณ 5 เท่าของความจุคอลัมน์) ควบคุมการไหลของ binding buffer ให้มีอัตราเร็วประมาณ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการฉีดสารละลายโปรตีนเข้าไปในคอลัมน์โดยใช้เข็มฉีดยาที่มีตัวกรอง โดยควบคุมการไหลของสารละลายโปรตีนให้มีอัตราเร็วประมาณ 0.2-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer ปริมาตร 5.0-10.0 มิลลิลิตร ควบคุมอัตราการไหลของ binding buffer ให้มีอัตรเร็วประมาณ 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ซึ่งสามรถทำได้ 2 วิธี ดังต่อไปนี้

4.4.1 ทำการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีนยังถูกเชื่อมติดกับ GST-tag protein โดยชะคอลัมน์ด้วย elution buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีอัตราการไหลประมาณ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์แล้วในหลอดทดลองขนาด 1.0 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5-1.0 มิลลิลิตร ในกรณีที่ยังไม่ทดลองต่อทันทีให้แยกเก็บโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บคอลัมน์โดยการแช่ในเอทธานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการชะด้วยวิธีนี้จะถูกนำไปใช้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์ต่อไป

4.4.2 ทำการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีนถูกตัดออกจาก GST-tag protein ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน (thrombin) โดยนำเอนไซม์ทรอมบินเติมลงในคอลัมน์ แล้วทำการปิดจุกหัวท้ายของคอลัมน์ บ่มคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ทำการชะคอลัมน์ด้วย binding buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีอัตราการไหลประมาณ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์แล้วในหลอดขนาด 1.0 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5-1.0 มิลลิลิตร ในกรณีที่ยังไม่ทดลองต่อทันทีให้แยกเก็บโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ลิขสิทธิ์

จากนั้นทำการชะคอลัมน์เพื่อเอา GST-tag protein ออก ด้วย elution buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีอัตราการไหลประมาณ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บคอลัมน์โดยการแช่ในเอทธานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการชะด้วยวิธีนี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ต่อไป

นำโปรตีนที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยการชะทั้ง 2 วิธี มาทำให้เข้มข้น (concentrated) ด้วย amicon ultra-4 (millipore; USA) ขนาด 10 กิโลดาลตัน แล้วนำไปแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ทำการเก็บโปรตีนที่ได้หลังจากแยกบริสุทธิ์และทำให้เข้มข้นแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**5. การแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Sambrook et al., 1989)**

นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาแยกแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis โดยดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

**5.1 การเตรียมแผ่นเจลสำหรับแยกวิเคราะห์โปรตีน**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สังวนลิขสิทธิ์

สำหรับแผ่นเจลแบบ 10% (ชั้น separating gel)

ผสมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| สารละลาย acrylamide | 6.6 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย 1.5 โมลาร์ Tris HCL, pH 8.8 | 5.0 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย 10 % SDS | 200.0 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น | 8.0 | มิลลิลิตร |
| จากนั้นเติม | | |
| สารละลาย 10% ammonium persulfate | 100.0 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 20.0 | ไมโครลิตร |

ผสมให้เข้ากันและเทลงในแผ่นกระจกหล่อเจลที่ได้ประกอบไว้แล้ว เติมสารละลายอิ่มตัวของ isobutanol ทับลงบนผิวเจล ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีจนเจลแข็งตัว ล้างสารละลาย isobutanol ออกด้วยน้ำกลั่น

สำหรับแผ่นเจลแบบ 6% (ชั้น stacking gel)

ผสมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| สารละลาย acrylamide | 1.2 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย 1.5 โมลาร์ Tris HCL, pH 8.8 | 1.5 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย 10 % SDS | 60.0 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น | 3.2 | มิลลิลิตร |
| จากนั้นเติม | | |
| สารละลาย 10% ammonium persulfate | 40.0 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 20.0 | ไมโครลิตร |

ผสมให้เข้ากันและเททับลงบนเจลชั้นแรกที่แข็งตัวแล้ว สอดแผ่นกำหนดร่องเจลลงบนเจลที่ยังไม่แข็งตัว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีจนเจลแข็งตัว ดึงแผ่นกำหนดร่องเจลออก ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น และตรียมประกอบชุดวิเคราะห์

**5.2 การเตรียมโปรตีนเพื่อวิเคราะห์**

นำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ มา 50 ไมโครลิตร ผสมกับสีสังเคราะห์ (4X gel loading dye) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลาย ที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ แช่น้ำแข็งเพื่อรอการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**5.2 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า**

หยอดโปรตีนที่เตรียมได้จากข้อ 5.2 และโปรตีนบอกขนาด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในช่องเจล ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 90 นาที หรือจนสีของโปรตีนบอกขนาดวิ่งจนสุดแผ่นเจล ถอดขั้วไฟฟ้าออก แกะแผ่นเจลออกจากกระจก และย้อมเจลด้วยสารละลาย coomassie blue เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แช่เจลในสารละลาย destain I ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่เจลในสารละลาย destain II ทิ้งไว้ข้ามคืน ทำการตรวจดูผล

**6. การหาค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ด้วยวิธี Spectrophotometry (ดัดแปลงจากวิธีของ Guoping *et al.*, 1989)**

นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลส โดยดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

**6.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล**

เตรียมพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เพียงอย่างเดียว)

**6.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

นำสารละลายที่ต้องการทดสอบใส่ใน substrate mixture ที่มีเมทธิลพาราไธออน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, โซเดียมครอไรด์ความเข้นข้น 0.1 โมลาร์ และ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 960 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด ไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอนไซม์ 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ซึ่งจะวัดสีเหลืองของพาราไนโตรฟีนอลได้ โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control ที่มี substrate mixture เพียงอย่างเดียว) คำนวนค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

**7. การหาค่าปริมาณโปรตีนโดย Bio-Rad Bradford Protein Assay (BIO-RAD; USA)**

นำโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่างๆ มาค่าปริมาณโปรตีนโดยใช้ชุดตรวจวัดดปรตีนสำเร็จรูป Bio-Rad bradford protein assay (BIO-RAD; USA) โดยดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

**7.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน**

เตรียม BSA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ BSA ที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม bradford dry reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผมสให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control ที่มี Bradford dry reagent เพียงอย่างเดียว)

**7.2 การวัดปริมาณของโปรตีน**

นำโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม bradford dry reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative control ที่มี Bradford dry reagent เพียงอย่างเดียว)

**8. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

เชื้อ *E. coli* BL21 ภายหลังที่ถูกถ่ายยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสสำหรับย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน ถูกนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ให้มีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด โดยศึกษาปัจจัยดังนี้

**8.1 ผลของอุณหภูมิ**

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ที่ทำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ให้กิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด โดยการนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1 OD ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3-4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3-0.4 OD จากนั้นทำการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงต่ออีก 5-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 18, 25, 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ แตกเซลล์ หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

**8.2 ผลของความเข้มข้นของ IPTG**

ทำการศึกษาความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมที่สุด ที่เหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ให้กิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด โดยการนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1 OD ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3-4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3-0.4 OD แล้วทำการเติม IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 และ 5.00 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ที่ไม่ทำการเติม IPTG จากนั้น

เลี้ยงเชื้อต่ออีก 5-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.1) ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ แตกเซลล์ หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

**8.3 ผลของระยะเวลาที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG**

ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ทำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ที่ให้กิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด โดยนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1 OD ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3-4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3-0.4 OD แล้วทำการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.2) จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ชั่วโมง และเลี้ยงไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.1) ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ แตกเซลล์ หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

**8.4 ผลของไอออนของโลหะและสารเคมี**

ทำการศึกษาผลของไอออนของโลหะและสารเคมี ในการกระตุ้นให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ที่ให้กิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด โดยนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1 OD ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3-4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3-0.4 OD แล้วทำการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.2) พร้อมกับเติมไอออนของโลหะและสารเคมีต่างๆ ได้แก่ $CoCl_2$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, LiCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ และ $Pb(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิที่

เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.1) เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.3) ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ แตกเซลล์ หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

**8.5 ผลความเข้มข้นของไอออนโลหะและสารเคมี**

ทำการศึกษาความเข้มข้นของไอออนของโลหะและสารคมีที่เหมาะสมที่กระตุ้นให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ที่ให้กิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด โดยนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1 OD ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3-4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3-0.4 OD แล้วทำการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.2) และเติมไอออนของโลหะและสารเคมีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 มิลลิโมลาร์ โดยเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ที่ไม่ทำการเติมไอออนของโลหะและสารเคมี จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.1) เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 8.3) ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ แตกเซลล์ หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**9. การศึกษาหาคุณลักษณะของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลส**

หลังจากที่ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสแล้ว นำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเพาะเลี้ยงตามสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยปั่นตกตะกอนเซลล์ แตกเซลล์ และแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โดยวิธีในข้อที่ 4 จากนั้นนำเอนไซม์รีคอมบิแนนท์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ได้หลังจากที่ผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์แล้วนำมาศึกษาหาคุณลักษณะของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

**9.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะที่สุด ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยนำเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

**9.2 พีเอชที่เหมาะที่สุด**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุด ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยนำเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนในบัฟเฟอร์ต่างๆ ได้แก่ critrate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 5.0 และ 5.5; phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0; Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 8.5, 9.0 และ 9.5; carbonate-bicarbonate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 10.0 และ 10.5; $Na_2HPO_4$-NaOH ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 11.0, 11.5 และ 12.0 โดยหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

**9.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด โดยนำเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 25, 37, 50 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**9.4 ความเสถียรต่อพีเอช**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด โดยนำเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนในบัฟเฟอร์ต่างๆ ได้แก่ critrate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 5.0 และ 5.5; phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0; Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 8.5, 9.0 และ 9.5; carbonate-bicarbonate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 10.0 และ 10.5; $Na_2HPO_4$-NaOH ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 11.0, 11.5 และ 12.0 จากนั้นนำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง

**9.5 ผลของไอออนของโลหะและสารเคมี**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาหาผลของไอออนของโลหะและสารเคมีที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนในบัฟเฟอร์ที่มีไอออนของโลหะและสารเคมีต่างๆ ได้แก่ $CoCl_2$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$, $CdCl_2$, $CuSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, DTT, EDTA และ SDS โดย

เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนของโลหะและสารเคมี คือ 0.25, 0.5, 1.0, และ 2.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

**9.6 ศึกษาหาพารามิเตอร์ทางจลศาสตร์ของเอนไซม์**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาหาค่าทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity), อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ($V_{max}$), ค่าคงที่ Michaelis-Menten ($K_m$), ค่า turnover number ($k_{cat}$) และค่า catalytic efficiency ($k_{cat}/K_m$) โดยนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมาทำปฏิกิริยากับสารออร์กาโนฟอสเฟต ได้แก่ เมทธิลพาราไธออน (methyl parathion), พาราออกซอน (paraoxon), พาราไธออน (parathion), คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos), เฟนิโทร-ไทออน (fenitrothion), มาลาไธออน (malathion) และคูมาฟอส (coumaphos) ใน Tris-HCl buffer พีเอช 9.0 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6 และ 7 ตามลำดับ

**10. การนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาประยุกต์ใช้โดยการทำไบโอเซนเซอร์**

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสหลังจากที่ถูกแยกบริสุทธิ์ และศึกษาหาคุณลักษณะของเอนไซม์แล้ว นำมาใช้สร้างไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยวิธีแอมเพอโรเมตริกซึ่งต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทางเคมีไฟฟ้านั้น มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

**10.1 การเตรียมขั้วอิเลคโทรด**

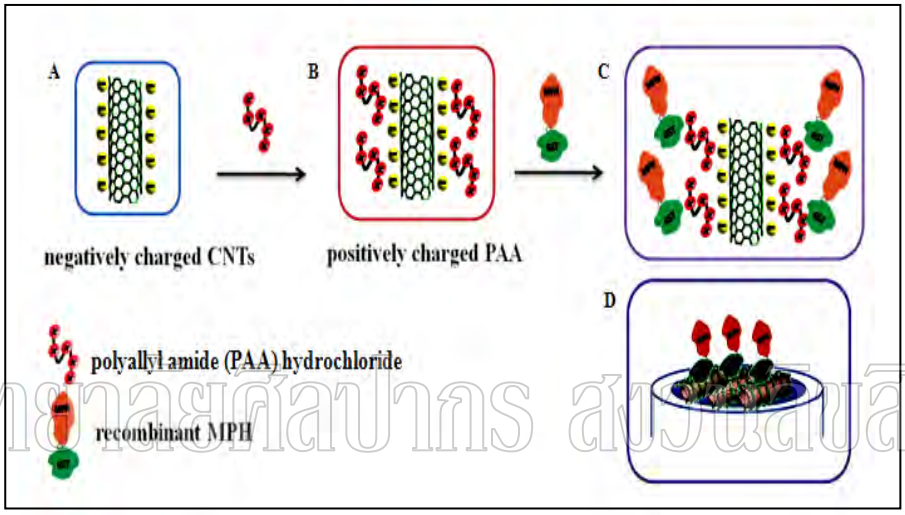
นำขั้วอิเลคโทรดที่ใช้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์ 3 ชนิด คือ ขั้วกลาสซีคาร์บอน (glassy carbon; GC) ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode; WE), ขั้วแพตตินัม (platinum; Pt) ทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าร่วม (counter electrode; CE) และขั้วซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) ทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode; RE) โดยทำการขัดขั้วอิเลคโทรดด้วยอะลูมิเนียมออกไซด์บนผ้าสักหลาด จากนั้นนำขั้วอิเลคโทรดไปเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicated) เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

**10.2 การสร้างโมดิฟายด์อิเลคโทรด (modified electrode)**

หลังจากที่ทำการเตรียมขั้วอิเลคโทรดแล้ว นำขั้วกลาสซีคาร์บอนมาทำการสร้างเป็นโมดิฟายด์อิเลคโทรด โดยมีขั้วโมดิฟายด์อิเลคโทรดที่ถูกสร้างสำหรับเป็นไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ตรวจวัดยาฆ่าแมลง 2 วิธี คือ

10.2.1 โมดิฟายด์อิเลคโทรดที่ใช้ตรวจจวัดยาฆ่าแมลงด้วยวิธีโวลแทมเมตรีแบบรอบ โดยทำการหยดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวป์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนขั้วกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด แล้วทิ้งไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง เพื่อระเหยให้แห้ง

10.2.2 โมดิฟายด์อิเลคโทรดที่ใช้ตรวจจวัดยาฆ่าแมลงโดยวิธีแอมเพอโรเมตริก โดยทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสลงบนคาร์บอนนาโนทิวป์โดยอาศัยแรงระหว่างประจุ ในลักษณะชั้นต่อชั้น (layer by layer electrostatic technique) (ดัดแปลงจากวิธีของ Munge *et al.*, 1989) ดังภาพที่ 26




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 26 การตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยอาศัยแรงระหว่างประจุในลักษณะชั้นต่อชั้น

จากภาพที่ 26 คาร์บอนนาโนทิวป์ที่ถูกทำให้มีประจุลบโดยหมู่ carboxylate ($COO^-$) ด้วยกรดไนตริกและกรดซัลฟูริคเข้มข้น (ภาพ 26, A) สามารถจับกับ PAA ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่มีประจุบวก (ภาพ 26, B) โดยใส่คาร์บอนนาโนทิวป์ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นเติมสารละลาย PAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมตร 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที แล้วเขย่าเบาๆ โดยกลับหลอดหัวท้ายไปมาทิ้งไว้นาน 20 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ระยะเวลานาน 15 นาที ซึ่งจะทำให้ได้สารละลาย 2 ส่วน คือ ส่วนของเหลวและส่วนตะกอน ซึ่งสารละลาย PAA ที่ติดอยู่บนคาร์บอนนาโนทิวป์ทั้งหมดจะอยู่ในส่วนตะกอน จึงทำการทิ้งส่วนใสแล้วล้างตะกอน เพื่อเอาสารละลาย PAA ที่ไม่ติดอยู่กับคาร์บอนนาโนทิวป์ออกด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (DI water) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ โดยกลับหลอดหัวท้ายไปมา เป็นเวลา 20

นาที ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส แล้วทำการล้างตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นเอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลสที่ถูกเชื่อมด้วย GST-tag protein จะสามารถจับกับประจุบวกของ PAA ซึ่งติดอยู่บนคาร์บอนนาโนทิวป์ (ภาพ 26, C) โดยที่ส่วนของ GST-tag protein มีประจุลบจึงเป็นส่วนที่อยู่ติดกับ PAA (เนื่องจาก GST-tag protein มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.8 ดังนั้นเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอชเท่ากับ 7 จึงมีประจุเป็นลบ) ในขณะที่เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมีประจุเป็นบวก จึงถูกพลักโดยประจุบวกของ PAA ให้หันออกมาด้านนอก (เนื่องจากเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 8.5 ดังนั้นเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอชเท่ากับ 7 จึงมีประจุเป็นบวก) โดยทำการใส่รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลสลงในสารละลายที่มีคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มี PAA ติดอยู่ แล้วปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ โดยกลับหลอดหัวท้ายไปมา ทิ้งไว้นาน 20 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส แล้วล้างตะกอนเพื่อเอาเอนไซม์ที่ไม่จับกับคาร์บอนนาโนทิวป์ออก ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ โดยกลับหลอดหัวท้ายไปมา เป็นระยะเวลานาน 20 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส แล้วทำการล้างซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายที่ได้ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด (รูป 26, D) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

**10.3 การต่อขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิด เข้ากับเครื่องควบคุมกระแสไฟฟ้า**

นำขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิด แช่ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 พร้อมกับทำการกวนด้วยแม่เหล็กตลอดเวลา แล้วต่อเข้ากับเครื่องควบคุมการให้กระแสไฟฟ้า potentiostat/galvanostat (Autolab Module PGSTAT30) โดยทำการวิเคราะห์ผลทางเคมีไฟฟ้าด้วยโปรแกรม GPES software (Eco Chemie; The Netherlands) ดังภาพที่ 27

ภาพที่ 27 การต่อขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิด เข้ากับเครื่องควบคุมกระแสไฟฟ้า

**10.4 การทำโวลแทมเมตรีแบบรอบสำหรับการออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล**

โวลแทมเมตรีแบบรอบ (cyclic voltammetry) เป็นการสแกนศักย์ไฟฟ้าเชิงเส้นตรงแบบคลื่นรูปสามเหลี่ยม ให้กับระบบที่ใช้อิเลคโทรดแบบนิ่งขนาดเล็กในสารละลายที่ไม่มีการกวน ซึ่งจะอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอลที่เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิสของเมทธิลพาราไธออนด้วยเอนไซม์รีคอมบิแนนท์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนขั้วกลาสซีคาร์บอน โดยจะศึกษาปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอลบนขั้วอิเลคโทรด 2 แบบ คือ

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

10.4.1 อิเลคโทรดหัวเปล่า (bare electrode)

ใช้กลาสซีคาร์บอนเป็นอิเลคโทรดทำงานโดยไม่ได้ตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสและคาร์บอนนาโนทิวป์ลงบนอิเลคโทรด จากนั้นต่อขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิด เข้ากับเครื่องควบคุมการให้กระแสไฟฟ้า ตามวิธีในข้อ 10.3 แล้วทำการตั้งค่าดังต่อไปนี้

| | |
|---|---|
| number of scans | 3 |
| start potential (V) | 0 |
| first vertex potential (V) | 1.2 |
| second vertex potential (V) | 0 |
| step potential (V) | 0.00105 |
| scan rate (V/s) | 0.05 |

จากนั้นเติมพาราไนโตรฟีนอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต แล้วทำการกวนด้วยแม่เหล็ก นานประมาณ 30 วินาที จากนั้นกด start เพื่อเริ่มต้นทำงาน

10.4.2 โมดิฟายด์อิเลคโทรด (modified electrode)

ทำการสร้างโมดิฟายด์อิเลคโทรด ตามวิธีในข้อ 10.2.1 จากนั้นต่อขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิด เข้ากับเครื่องควบคุมการให้กระแสไฟฟ้า ตามวิธีในข้อ 10.3 แล้วทำการตั้งค่าต่างๆ ตามวิธีในข้อ 10.4.1 จากนั้นเติมพาราไนโตรฟีนอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต แล้วทำการกวนด้วยแม่เหล็ก นานประมาณ 30 วินาที จากนั้นกด start เพื่อเริ่มต้นทำงาน

**10.5 การศึกษาการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลงด้วยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยวิธีแอมเพอโรเมตริก**

ทำการตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยศึกษาการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลงด้วยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยวิธีแอมเพอโรเมตริก โดยต่อขั้วอิเลคโทรดทั้ง 3 ชนิดเข้ากับเครื่องควบคุมการให้กระแสไฟฟ้า ตามวิธีในข้อ 10.3 แล้วตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential) คงที่ ให้เท่ากับ 0.93 โวลต์ และตั้งค่าเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (duration time) เท่ากับ 10000 วินาที จากนั้นกด start เพื่อเริ่มต้นทำงาน รอจนกระทั่งสัญญาณไฟฟ้าคงที่ แล้วทำการเติมยาฆ่าแมลงลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ซึ่งจะทำให้สัญญาณไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้น รอจนกระทั่งสัญญาณไฟฟ้าคงที่ แล้วเติมยาฆ่าแมลงลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟตเรื่อยๆ จนกระทั่งทำให้สัญญาณไฟฟ้าไม่เปลี่ยนแปลง หรือสัญญาณที่เพิ่มขึ้นมีค่าน้อยกว่า 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise)

**10.6 การศึกษาหาสภาะที่เหมาะสมของเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด**

หลังจากที่นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ โดยทำการตรึงลงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ และหยดลงบนอิเลคโทรดแล้ว ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด เพื่อทำให้ได้ค่าไวในการตรวจวัด (sensivity) สูงที่สุด โดยศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

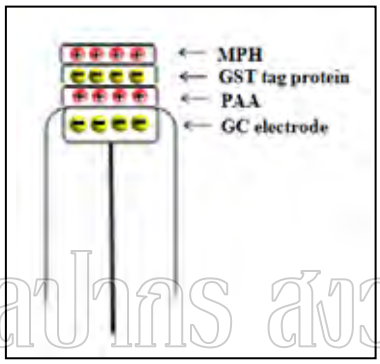
10.6.1 การหาปริมาณของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่เหมาะสมที่สุด สำหรับตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ให้ค่าความไวในการตรวจวัดสูงที่สุด โดยทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสลงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ตามวิธีในข้อ 10.2.2 โดยใช้เอนไซม์ที่ปริมาณต่างๆ คือ 0.894, 1.260, 1.788 และ 2.235 มิลลิกรัม แล้วหยดลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยทำการหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้ง

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ไว้ให้แห้ง เก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.2 การเปรียบเทียบวิธีการตรึงเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ที่ทำให้ได้ค่าไวในการตรวจวัดสูงที่สุด

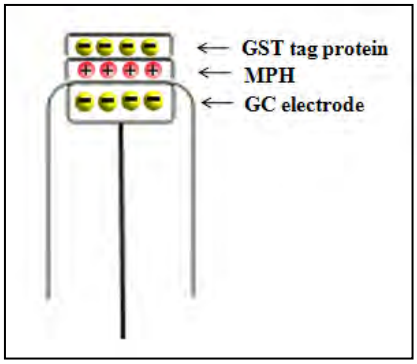
10.6.2.1 ทำการตรึงเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly immersion technique (ดัดแปลงจากวิธีของ Galan-Vidal *et al.*, 1989) โดยการแช่ (immersed) อิเลคโทรดลงในชั้นของสารละลายต่างๆ โดยอาศัยแรงระหว่างประจุทำให้เกิดการประกอบตัวของโมเลกุลต่างๆ ด้วยตัวเองอย่างมีระเบียบ (self assembly) ซึ่งจะได้โมดิฟายด์กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด 4 ชนิด ดังต่อไปนี้




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 28 GC-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด

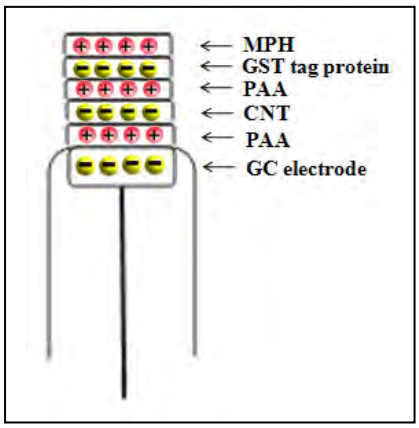
10.6.2.1.1 GC-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด ดังภาพที่ 28 โดยแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลาย PAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมตร 1000 ไมโครลิตร ทำการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง ทำการแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลายที่มีรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5




ภาพที่ 29 GC-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด

10.6.2.1.2 GC-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด ดังในภาพที่ 29 โดยแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลายที่มีรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลส ในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง เก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

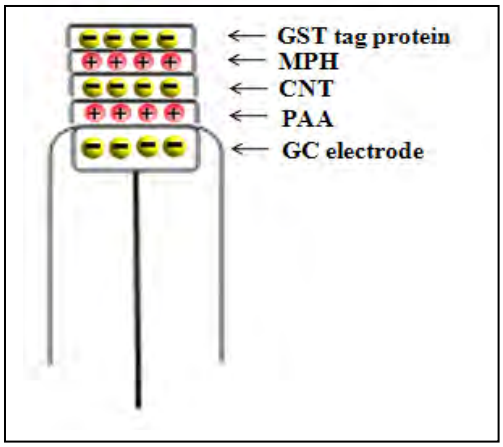



ภาพที่ 30 GC-PAA-CNT-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด

10.6.2.1.3 GC-PAA-CNT-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด ดังในภาพที่ 30 โดยแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลาย PAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมตร 1000

ไมโครลิตร ทำการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลายคาร์บอนนาโนทิวป์ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่อิเลคโทรดลงในสารละลาย PAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมตร 1000 ไมโครลิตร ทำการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่อิเลคโทรดลงในสารละลายที่มีรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง ทำการเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ลิขสิทธิ์




ภาพที่ 31 GC-PAA-CNT-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด

10.6.2.1.4 GC-PAA-CNT-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด ดังในภาพที่ 31 โดยแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลาย PAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ทำการ

กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก นาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วแช่กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดลงในสารละลายคาร์บอนนาโนทิวป์ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง ทำการล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง ทำการแช่อิเลคโทรดลงในสารละลายที่มีรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน โดยแช่อิเลคโทรดลงในน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 20 นาที ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง ทำการเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.2.2 ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly drop dry technique โดยตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวป์โดยอาศัยแรงระหว่างประจุในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ทำให้เกิดการประกอบตัวของโมเลกุลต่างๆ ด้วยตัวเองอย่างมีระเบียบ (self assembly) ซึ่งจะได้โมดิฟายด์กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด (modified glassy carbon electrode) 2 ชนิด ดังต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ลิขสิทธิ์

10.6.2.2.1 GC-CNT-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเลคโทรด (ดัดแปลงจากวิธีของ Munge *et al.*, 1989) โดยทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ลงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ตามวิธีในข้อ 10.2.2 แล้วหยดเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.2.2.2 GC-CNT-MPH-GST โมดิฟายด์อิเลคโทรด โดยทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลสบนคาร์บอนนาโนทิวป์ โดยใส่คาร์บอนนาโนทิวป์ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วใส่รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ทำการปรับปริมาตร

ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้เป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเบาๆ ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส แล้วทำการล้างตะกอนเพื่อเอาเอนไซม์ที่ไม่จับกับคาร์บอน- นาโนทิวป์ออกด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลานาน 20 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส แล้วทำการล้างตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหยดลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ ยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.2.3 ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธีการหยดลงบนอิเลคโทรด (drop dry) ซึ่งจะได้โมดิฟายด์กลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด 2 ชนิด ดังต่อไปนี้

10.6.2.3.1 GC-enzyme โมดิฟายด์อิเลคโทรด โดยทำการหยดรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยทำการหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.2.3.2 GC-CNT-enzyme โมดิฟายด์อิเลคโทรด โดยทำการหยดคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลค-โทรด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยทำการหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง จากนั้นล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วทำการหยดรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสม (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.1) ลงบนกลาสซีคาร์บอน-อิเลคโทรด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยทำการหยดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งอิเลคโทรดไว้ให้แห้ง แล้วเก็บอิเลคโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.3 การศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะที่สุดสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไรโตรฟีนอล โดยทำการศึกษาไฮโดรไดนามิกโวลแทมโมแกรม (hydrodynamic voltrammogram; HDV) สำหรับทำการวัดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไนโตร-ฟีนอล เพื่อที่จะให้ค่าความไวในการตรวจวัดยาฆ่าแมลงของเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสไบโอเซนเซอร์สูงที่สุด โดยทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.2) จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5 โดยทำการเปรียบเทียบค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ ต่างๆ ดังนี้ 0.80, 0.90, 0.93, 0.95, 0.98 และ 1.00 โวลต์

**10.6 การศึกษาคุณลักษณะของเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด**

หลังจากที่นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ โดยทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างไบโอเซนเซอร์แล้ว ทำการศึกษาหาคุณลักษณะเมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด โดยศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

10.6.1 การศึกษาหาค่าความเสถียรของอิเลคโทรด

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.2) จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5 โดยทำการวัดที่ระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่วันที่ 1, 2, 3,…, 30 ตามลำดับ

10.6.2 การศึกษาหาค่าความสามารถในการวัดซ้ำอย่างต่อเนื่องของอิเลคโทรด

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.2) จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง โดยทำการวัดซ้ำจำนวน 15 ครั้ง ด้วยอิเลคโทรดเดิมตามวิธีในข้อ 10.5

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

10.6.3 การศึกษาหาค่าพิสัยเชิงเส้น (linear range) ของการวัด

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.2) จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.4 การศึกษาหาค่าความไว (sensitivity) ของอิเลคโทรด

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.2) จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

10.6.5 การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (limit of detection) ที่สามาถวัดได้

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ตามผลที่ได้ในข้อ 10.6.2) จากนั้นทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5

**10.7 นำไบโอเซนเซอร์ที่ได้มาทดสอบตัวอย่างจริง**

หลังจากที่นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์ และทำการศึกษาหาคุณลักษณะหาของเมทธิล-พาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดที่ได้แล้ว นำไบโอเซนเซอร์นี้มาทดสอบกับตัวอย่างจริง โดยใช้เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดนี้วัดยาฆ่าแมลงที่อยู่ในน้ำตัวอย่าง โดยทำการเก็บนำตัวอย่างมาจากแหล่งน้ำที่บริเวณบางขุนเทียนมาใส่ยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (spike) ให้มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางน้ำตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ โดยใช้น้ำตัวอย่างในการทำการเจือจาง นำน้ำตัวอย่างที่มียาฆ่าแมลงใส่ลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟตโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 76.84 นาโนโมลาร์ ทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลง ตามวิธีในข้อ 10.5 แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

**11. การหาปริมาณยาฆ่าแมลงในน้ำตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี**

ทำการตรวจวัดปริมาณยาฆ่าแมลงในน้ำตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี ด้วยเครื่องวิเคราะห์แก๊สโครโมโทรกราฟ (agilent technologies, USA) รุ่น agilent 6890N ที่ประกอบด้วย ช่องสำหรับฉีดสารทำด้วยแก้ว (glass – lined injection port), เครื่องตววจวิเคราะห์เฟลมโฟโตเมตริก ดีเทคเตอร์ (flam photometric detector) และคอลัมน์สำหรับแยกวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง (capillary column for organophosphate pesticides) รุ่น DB-1701P นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์อื่นๆ อีก ดังนี้ เครื่องสำหรับทำการระเหยตัวอย่าง (rotary vacumn evaporator), กรวยแยก (separatory funnels), กระบอกตวง (graduate cylinders), กรวยกรอง (funnel), กระดาษกรอง (cotton wool for filtration), กระบอกฉีดยาขนาด 10 ไมโครลิตร (microsyringe, 10 microliter), ตู้อบควบคุมอุณหภูมิในช่วง 120 ถึง 250 องศาเซลเซียส แล้วนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้นำไปเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวัดยาฆ่าแมลงในน้ำตัวอย่างด้วยไบโอเซนเซอร์ ซึ่งการตรวจวัดปริมาณยาฆ่าแมลงในน้ำตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี มีขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

**11.1 การเตรียมตัวอย่างที่จะทำการวัด**

นำน้ำตัวอย่างซึ่งเก็บจากแหล่งน้ำที่บริเวณบางขุนเทียนมาใส่ยาฆ่าแมลงเมทธิล-พาราไธออน (spike) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นทำการสกัดยาฆ่าแมลงจากน้ำตัวอย่าง โดยใส่น้ำตัวอย่างปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในกรวยแยกขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอทธิลอะซิเตรท ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในกรวยกรองที่มีน้ำตัวอย่างอยู่ ทำการเขย่ากรวยแยกเป็นเวลาประมาณ 2 นาที แล้วตั้งกรวยแยกทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้นกัน จากนั้นไขก๊อกของกรวยแยกเพื่อทำการแยกตัวอย่างน้ำออกจากสารละลายเอทธิล-

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อะซิเตรท ทำการเติมโซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate, $Na_2SO_4$) 1 ช้อน (ประมาณ 20 กรัม) ลงในสารละลายเอทธิลอะซิเตรทแล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรอง นำตัวอย่างน้ำใส่เข้าไปในกรวยแยกอีกครั้ง แล้วเติมจากนั้นเติมสารละลายเอทธิลอะซิเตรท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดซ้ำ เติมโซเดียมซัลเฟต และกรองด้วยกระดาษกรอง ทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง ด้วยสารละลายเอทธิล-อะซิเตรทปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมซัลเฟต และกรองด้วยกระดาษกรอง

**11.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี**

หลังจากที่ทำการเตรียมตัวอย่างแล้ว จึงนำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี โดยทำการฉีดสารละลายเอทธิลอะซิเตรท ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าไปในคอลัมน์ DB-1701P จากนั้นทำการฉีดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 11.1 เข้าไปในคอลัมน์ ใช้แก๊สฮีเลียม (helium) เป็นส่วนที่เคลื่อนที่ (mobile phase) โดยให้อัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 60 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งภายในทำการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส และกำหนดให้ระยะเวลาที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง (retention time) เท่ากับ 26 นาที สำหรับส่วนที่ทำการตรวจวัด ทำการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส โดยให้มีอัตราการไหลของฮีเลียมเท่ากับ 150 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของออกซิไดซ์เซอร์แก๊ส (oxidizer gas) เท่ากับ 110 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งออกซิไดซ์เซอร์แก๊สที่ใช้เป็นอากาศ โดยทำการควบคุมให้อัตราการไหลของแก๊สทั้ง 2 ชนิดหลังจากที่ผสมกันแล้วเท่ากับ 60 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เฟลมโฟโตเมตริก ดีเทคเตอร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

**11.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานเมทธิลพาราไธออน**

ทำการฉีดสารละลายเอทธิลอะซิเตรท ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าไปในคอลัมน์ DB-1701P จากนั้นทำการฉีดสารละลายมาตรฐานเมทธิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อไมโครโมลิตร เข้าไปในคอลัมน์ ทำการการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเมทธิลพาราไธออนด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี ตามวิธีการในข้อ 11.2

# บทที่ 4

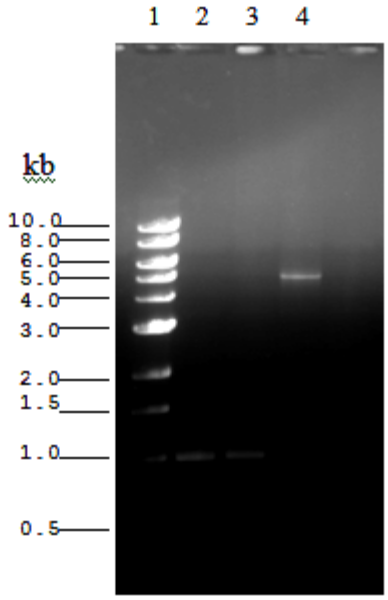
## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การสร้างรีคอมบิแนนท์โคลนใน expression vecter pGEX-4T-2

นำดีเอ็นเอจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Exp1 และ Exp2 ซึ่งออกแบบมาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณหัวและท้ายของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไทออนไฮโดรเลสจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (เสาวลักษณ์ วงเทียนหลาย, 2547) โดยเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I เพื่อให้ง่ายต่อการโคลนในพลาสมิด pGEX-4T-2 จากการทดลองพบว่า เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส และเมื่อนำดีเอ็นเอนี้มาทำบริสุทธิ์ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 32 ซึ่งพบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (989 bp) ที่ใช้เป็นแม่แบบ และดีเอ็นเอที่แยกได้ค่อนข้างสะอาดมาก ภายหลังจากทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์แล้วนี้เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pCR Blunt และถ่ายโอนเข้าไปใน One Shot TOP10 chemically competent *E. coli* พบว่ามีโคโลนีสีขาวเกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอในการสร้าง expression clone ทำโดยเลือกโคโลนีมาสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี

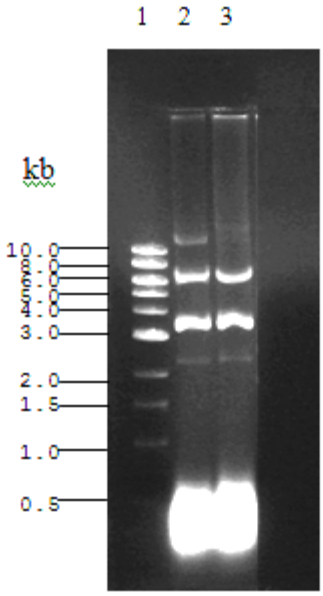
ในการเตรียมพลาสมิด pGEX-4T-2 จะเริ่มจากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดด้วยการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α (transformation) แล้วทำการสกัดและตัดพลาสมิด pGEX-4T-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เช่นเดียวกับการตัดชิ้นดีเอ็นเอ (*mpd* gene) จากนั้นทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอและ พลาสมิดที่ตัดแล้วนี้ให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จรูป QIAquick gel extraction ได้ผลดังภาพที่ 32 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5 กิโลเบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด pGEX-4T-2 ทำให้แน่ใจได้ว่าพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีความถูกต้อง




ภาพที่ 32 การแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิด pGEX-4T-2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI และ XhoI* จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จรูป QIAquick gel extraction, เลน 1: แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.0 kb DNA ladder, เลน 2-3: ชิ้นดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส, เลน 4: พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่แยกบริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

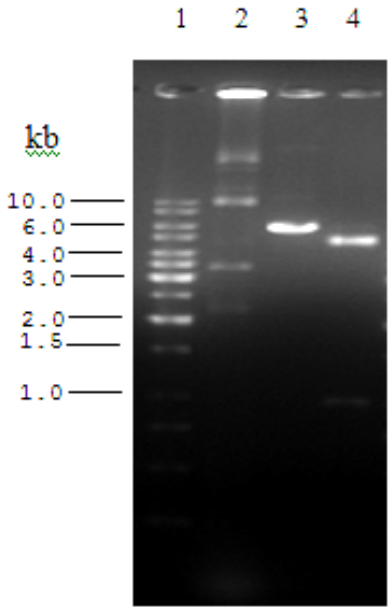
เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ตัด และแยกบริสุทธิ์แล้ว ทำการเชื่อมต่อกันแล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α (transformation) และทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) พบว่ามีแบนของพลาสมิดเกิดขึ้น 3 แบน เนื่องจากพลาสมิดอยู่ในภาพต่างๆ ได้แก่ linear, nicked circle และ supercoil ดังแสดงในภาพที่ 33




ภาพที่ 33 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส, เลน 1: 1.0 kb DNA ladder, เลน: 2-3: ผลการสกัด pGEX-4T-2

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

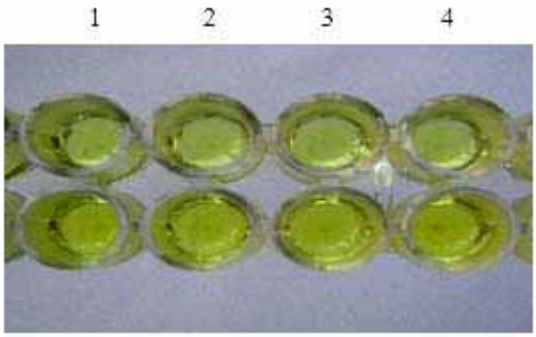
จากนั้นทำการวิเคราะห์หาโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี restriction analysis โดยทำการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I แล้วทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอและ พลาสมิดให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยวิธีสำเร็จภาพ QIAquick Gel Extraction ได้ผลดังภาพที่ 34 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และขนาด 5 กิโลเบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด pGEX-4T-2 ทำให้แน่ใจได้ว่าพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีความถูกต้อง




ภาพที่ 34 การทำ restriction analysis ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I: เลน 1, 1.0 kb DNA ladder; เลน 2, พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพารา-ไอออนไฮโดรเลส; เลน 3; รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพารา-ไอออนไฮโดรเลสที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI; เลน 4, รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลสที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

จากการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนท์ (transformants) ด้วยการทดสอบกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยวิธี microtiter plate activity assay ดังภาพที่ 35 พบว่า ทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้สามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้โดยเปลี่ยนสีของ substrate mixture ที่มีเมทธิลพาราไธออนเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้มีการแสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์โคลนนี้ว่า DpGT ซึ่งคือ *E. coli* DH5α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 :: *mpd* gene




ภาพที่ 35 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในรีคอมบิแนนท์โคลนต่างๆ, แถวบนหลุม 1-4 คือ microtiter well ที่มี substrate mixture เพียงอย่างเดียว (negative control), แถวล่างหลุม 1: microtiter well ที่มี substrate mixture และเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (positive control), แถวล่างหลุม 2-4: microtiter well ที่มี substrate mixture และ *E. coli* DH5α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2 :: *mpd* gene

**2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสใน expression clone ด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ลิขสิทธิ์

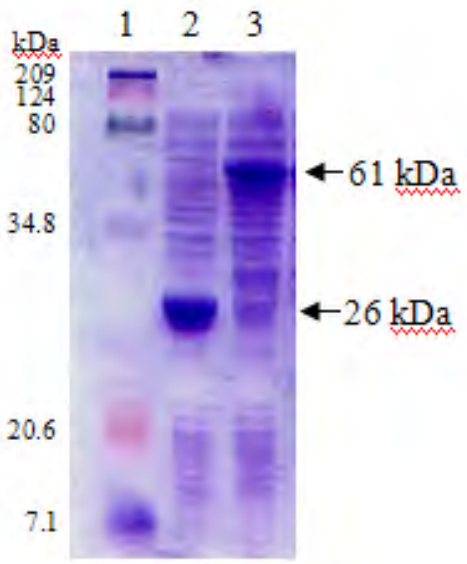
หลังจากทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) ต่างๆ จากโคลน DpGT ที่มียีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส และทำการถ่ายโอน (transformation) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* BL21 แล้ว พบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนหลายโคโลนี จากภาพที่ 36 เป็นการนำรีคอมบิแนนท์โคลนต่างๆ มาตรวจสอบด้วยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิล-พาราไธออนไฮโดรเลสโดยวิธี microtiter plate activity assay พร้อมทั้งทำการตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลืองเข้มว่า BpGT ซึ่งคือ *E.coli* BL21 ที่มี pGEX-4T-2 :: *mpd* gene

ภาพที่ 36 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT โดยวิธี microtiter plate activity assay ซึ่งหลุม 1: microtiter well ที่มี substrate mixture เพียงอย่างเดียว (negative control), หลุม 2: microtiter well ที่มี substrate mixture และเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน (positive control), หลุม 3: microtiter well ที่มี substrate mixture และรีคอมบิแนนท์ BpGT, หลุม 4: microtiter well ที่มี substrate mixture และ *E.coli* BL21 ที่มี pGEX-4T-2

เหตุที่นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากการเชื่อมต่อกัน (ligation) มาถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* BL21 โดยตรงนั้น การถ่ายโอนจะมีประสิทธิภาพต่ำและไม่ค่อยประสบความสำเร็จ สาเหตุเนื่องจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลังจากที่ถูกเชื่อมต่อแล้ว ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบ nicked circle ดังนั้นจึงทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เข้าสู่ *E. coli* DH5α ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับใช้ในการโคลนยีน (cloning host) เพื่อจำลอง (replicated) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีปริมาณมากและอยู่ในรูปแบบ supercoil จากนั้นจึงทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จาก *E. coli* DH5α ถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* BL21 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับใช้ในการแสดงออกของยีน (expression host)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis จากภาพที่ 37 พบว่ามีการแสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอย่างชัดเจนใน expression clone BpGT โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากพลาสมิด pGEX-4T-2 ที่ไม่มียีนเมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสพบว่ามีแถบของโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน (เลนที่ 2) ซึ่งเป็นกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอร์เลส (glutathione-s-transferase; GST) ที่เป็นโปรตีนเชื่อมต่อ (tag protein) ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากพลาสมิด pGEX-4T-2 ที่มียีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสพบว่ามีแถบของโปรตีนขนาด 61 กิโลดาลตัน (เลนที่ 3) ประกอบด้วยกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอร์เลส ที่มีขนาด 26 กิโลดาลตัน และเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่มีขนาด 35 กิโลดาลตัน



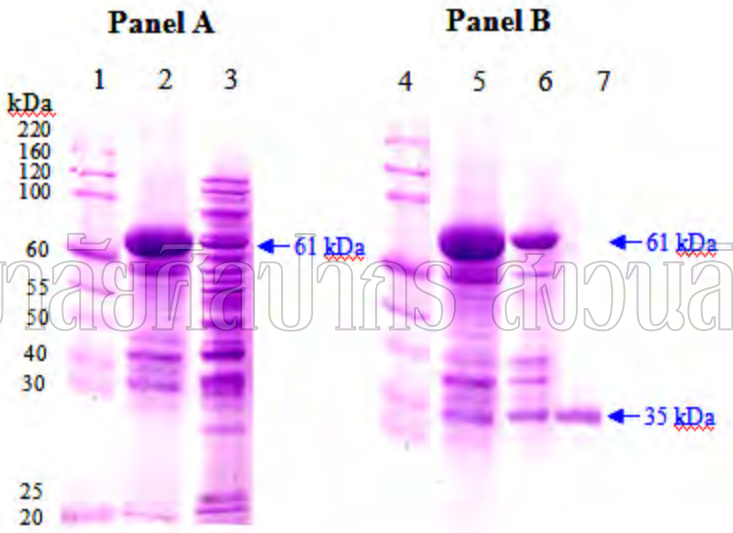

ภาพที่ 37 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่แสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2, เลน 1: Kaleidoscope prestained protein standard marker, เลน 2: *E. coli* BL 21 ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-2 (ไม่มียีนเมทธิลพาราไอออนไฮโดรเลส), เลน 3: BpGT (*E. coli* BL 21:: pGEX-4T-2 ที่มียีนเมทธิลพาราไอออน-ไฮโดรเลส)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

**3. การผลิตและการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

ในการผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสเริ่มจากการนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ แล้วกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนตามวิธีของคู่มือปฏิบัติการของพลาสมิด pGEX (pGEX plasmid protocal) จากนั้นทำการแตกเซลล์และตกตะกอนเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลว (supernate) และส่วนตะกอน เมื่อทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ดังแสดงในภาพที่ 38 ใน panel A นั้น พบแถบของโปรตีนขนาด 61 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งน่าจะเป็น inclusion body เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนนี้ถูกผลิตขึ้นในเซลล์ของ *E. coli* เป็นจำนวนมาก จึงเกิดการรวมตัวกันแล้วตกตะกอน นอกจากนี้โปรตีนบางส่วนอาจติดอยู่ที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* ภายหลังจากที่ทำการแตกเซลล์ จึงตกตะกอนลงมาพร้อมกับเศษของผนังเซลล์ (เลน 2) แต่ในส่วนที่เป็นของเหลว พบแถบของโปรตีนขนาดดังกล่าวมีปริมาณน้อยมาก แสดงว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่ในภาพส่วนที่เป็นของเหลว (เลน 3) สำหรับ panel B เป็นส่วนของตะกอนที่ถูกนำมาละลายด้วยยูเรีย (urea) โดยพบแถบของโปรตีนขนาด 61 กิโลดาลตัน (เลน 5) และยังคงพบแถบของโปรตีนดังกล่าว เมื่อทำการไดอะไลซิส

(dialysis) โดยการเอายูเรียออกช้าๆ จนหมด เพื่อทำให้โปรตีน refold (เลน 6) จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาผ่าน GSTPrep FF 16/10 column ซึ่งสามารถจับกับ GST-tag protein ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสได้ การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์สามารถทำได้โดยการตัด GST-tag protein ออกจากเอนไซม์ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน ทำให้หลังจากชะคอลัมน์แล้วจะมีเฉพาะส่วนของเอนไซม์เท่านั้นที่หลุดออกมา โดยจะเห็นได้ว่าแถบของโปรตีนที่ได้ค่อนข้างสะอาดและเป็นแบนเดียวมีขนาด 35 กิโลดาลตัน (เลน 7) แต่จะพบแบนจางๆ เหนือแถบของเอนไซม์ซึ่งน่าจะเป็นแถบของเอนไซม์ทรอมบิน เนื่องจากไม่ได้ทำการกำจัดเอนไซม์ทรอมบินออก หลังจากการชะคอลัมน์และเมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้มาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี spectrophotometry พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้นั้นสามารถย่อยสลายเมทธิลพาราไธออนได้

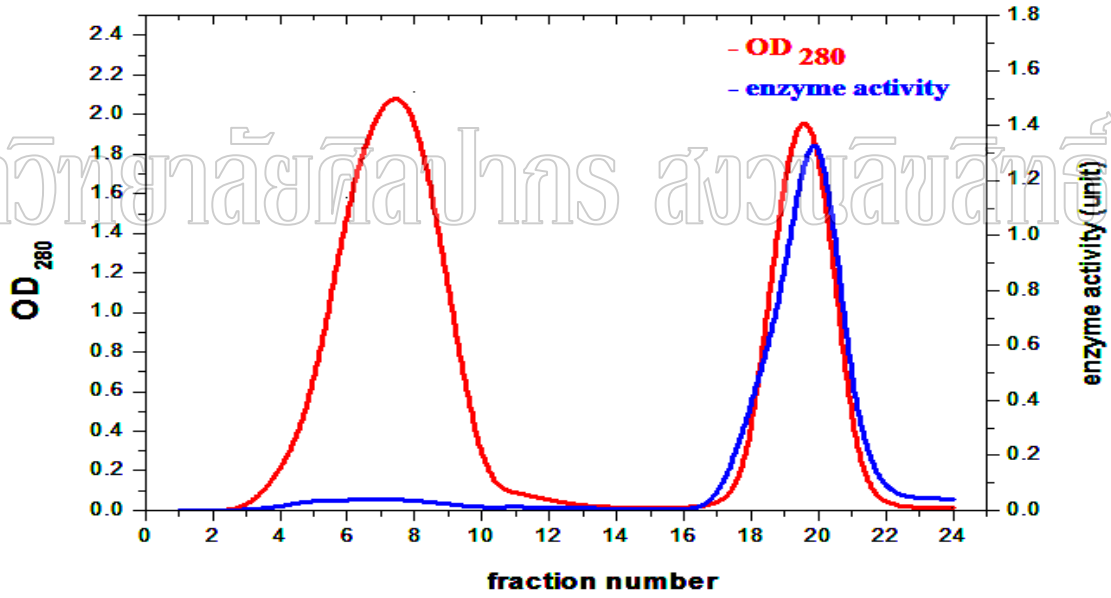



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 38 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของโปรตีนที่แสดงออกจากรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ในส่วนของเหลวและส่วนของตะกอน (panel A) และแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ (panel B), เลน 1, 4: โปรตีนมาตรฐาน BenchMark Protein Ladder, เลน 2: ส่วนตะกอนที่ไม่ละลาย, เลน 3: ส่วนของเหลว, เลน 5: ส่วนของตะกอนที่ละลายด้วย urea, เลน 6: โปรตีนที่ refold โดยการไดอะไลซิส, เลน 7: เอนไซม์ MPH หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ทรอมบินและผ่าน GSTPrep FF column

ในระหว่างที่ทำการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสด้วย GSTPrep FF 16/10 column ทำการเก็บตัวอย่างที่ผ่านออกจากคอลัมน์ที่ระยะเวลาต่างๆ จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาในแต่ละส่วน (fraction) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ aromatic ring ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ($OD_{280}$) และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากภาพที่ 39

พบว่าหลังจากผ่านตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์และทำการชะคอลัมน์ด้วย binding buffer ปรากฏกราฟของค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (กราฟสีแดง) แต่กราฟของกิจกรรมของเอนไซม์ (กราฟสีฟ้า) ไม่ปรากฏ (fraction 2-12) แสดงว่าโปรตีนที่ได้ในส่วนนี้เป็นโปรตีน ที่ถูกผลิตขึ้นในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์โคลน แต่ไม่ใช่รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลส จากนั้นเมื่อทำการบ่มคอลัมน์ด้วยเอนไซม์ทรอมบินเพื่อตัด GST-tag protein ออกจากเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส แล้วทำการชะคอลัมน์ด้วย binding buffer วัดค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ aromatic ring ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากภาพที่ 39 พบว่าปรากฏกราฟของค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (กราฟสีแดง) และกราฟของกิจกรรมของเอนไซม์ (กราฟสีฟ้า) อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 39, fraction 16-24) แสดงว่าโปรตีนที่ได้เป็นเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลส ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 39 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (กราฟสีแดง) และค่ากิจกรรมของรีคิมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (กราฟสีน้ำเงิน) แต่ละ fraction ในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วย GSTPrep FF

จากนั้นนำตัวอย่างส่วนของตะกอนที่ถูกละลายด้วยยูเรีย ตัวอย่างของโปรตีนที่ถูก refold โดยการทำไดอะไลซิส และตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์มาทำการหากิจกรรมเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี bradford คำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ จากตารางที่ 10 พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์แล้วมีค่า 189.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดย

มีค่าความบริสุทธิ์เป็น 4 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างตะกอนที่ถูกละลายด้วยยูเรียในขั้นตอนเริ่มต้น และมีเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่ได้เป็น 70.6 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

| Purification Fraction | Total Protein (mg) | Total Activity (U) | Specific Activity (U/mg) | Fold Purification | % Yield |
|---|---|---|---|---|---|
| Urea Solubilization | 0.119 | 5.64 | 47.50 | 1 | 100 |
| Dialysis | 0.075 | 4.25 | 56.60 | 1.19 | 75.1 |
| GSTPrep FF | 0.021 | 3.99 | 189.90 | 3.99 | 70.6 |

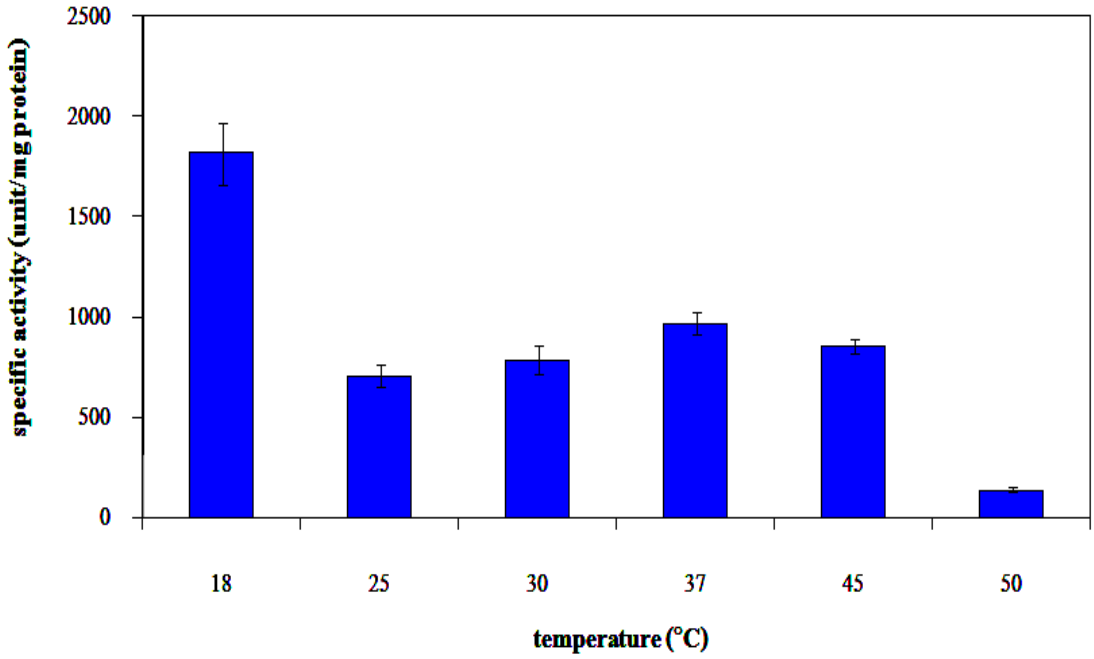
**4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรีคอมบิแนนส์โคลน BpGT เพื่อผลิตเอนไซม์เมทธิล-พาราไธออนไฮโดรเลส ให้ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด**

นำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ซึ่งคือ เชื้อ *E. coli* BL21 ภายหลังจากถูกถ่ายยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส มาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ให้มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด โดยศึกษาปัจจัยดังนี้

**4.1 ผลของอุณหภูมิ**

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลสที่จะให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG แล้วมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิต่างๆ จากภาพที่ 40 พบว่าที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนท์โคลนนี้ โดยจะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิอื่นๆ ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ต่ำกว่ามาก โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ต่ำที่สุด

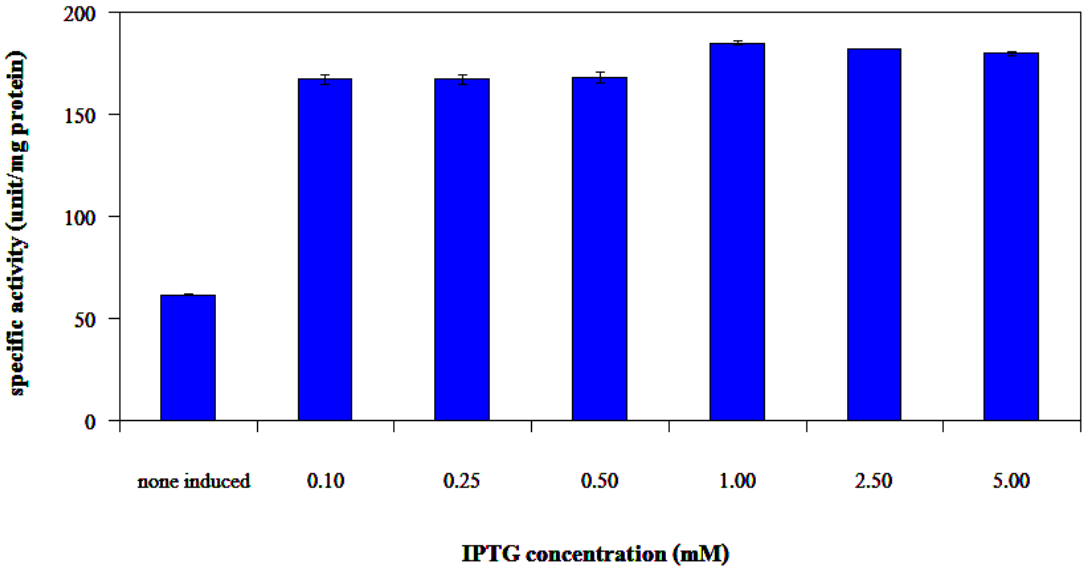



ภาพที่ 40 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**4.2 ผลของความเข้มข้นของ IPTG**

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด โดยการนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาเติม IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากภาพที่ 41 พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าโคลนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ IPTG สำหรับใช้ในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลนผลิตเอนไซม์ที่ให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 1 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีของคู่มือปฏิบัติการของพลาสมิด pGEX

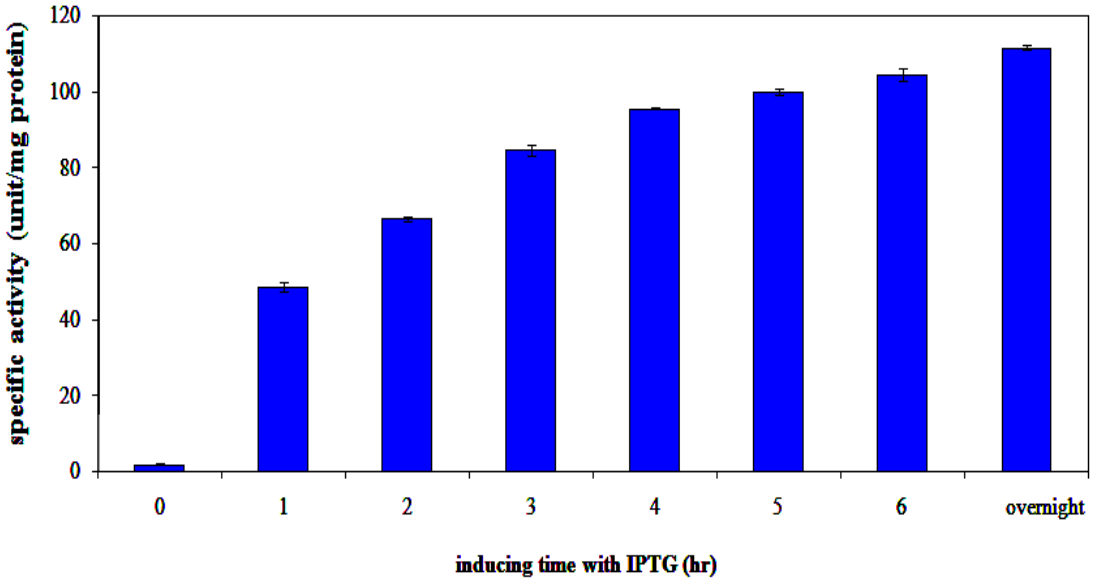



ภาพที่ 41 ผลของความเข้นข้นของ IPTG ที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

### 3.3 ผลของระยะเวลาที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เพื่อให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด โดยการนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเหนี่ยวนำด้วย IPTG แล้วเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ จากภาพที่ 42 พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปหลังจากที่เหนี่ยวนำรีคอมบิแนนท์โคลนด้วย IPTG ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด โดยที่ระยะเวลาข้ามคืน (overnight) ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด แต่ที่ระยะเวลาข้ามคืนเป็นระยะเวลาที่นานเกินไป ดังนั้นที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำรีคอม-บิแนนท์โคลนด้วย IPTG ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

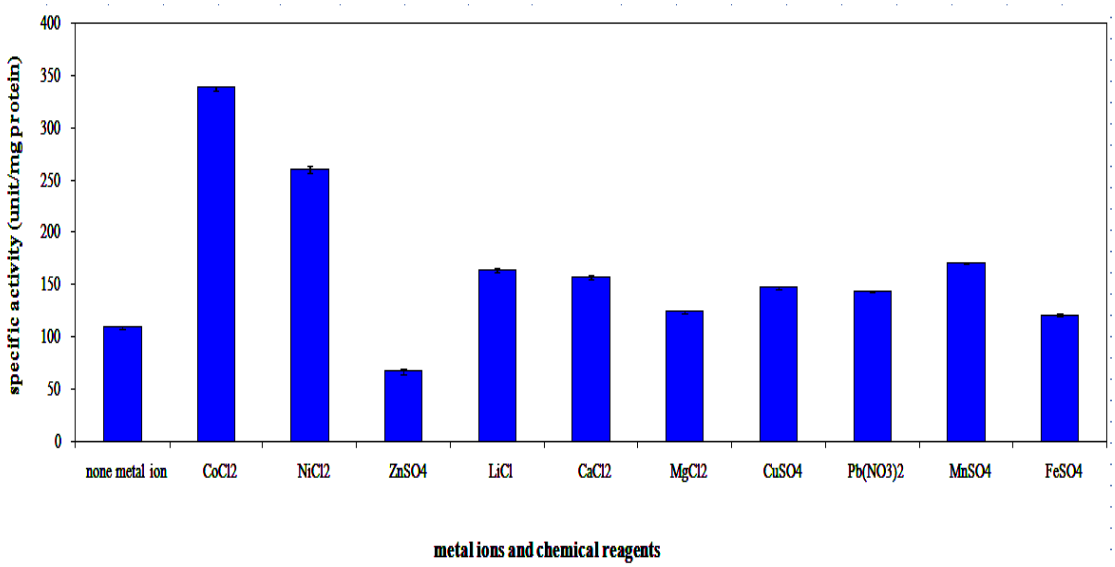



ภาพที่ 42 ผลระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเหนี่ยวนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ด้วย IPTG ในการผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

### 3.4 ผลของไอออนของโลหะและสารเคมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

จากการศึกษาผลของไอออนโลหะและสารเคมี ที่เหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนโฮโดรเลสที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด โดยการนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเหนี่ยวนำด้วย IPTG แล้วเติมไอออนโลหะและสารเคมีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากภาพที่ 43 พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่เติมไอออนของโลหะและสารเคมี ยกเว้นรีคอมบิแนนท์โคลนที่เติมซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ไม่ทำการเติมไอออนของโลหะและสารเคมี ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โคลนที่เติมโคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2$) จะให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด

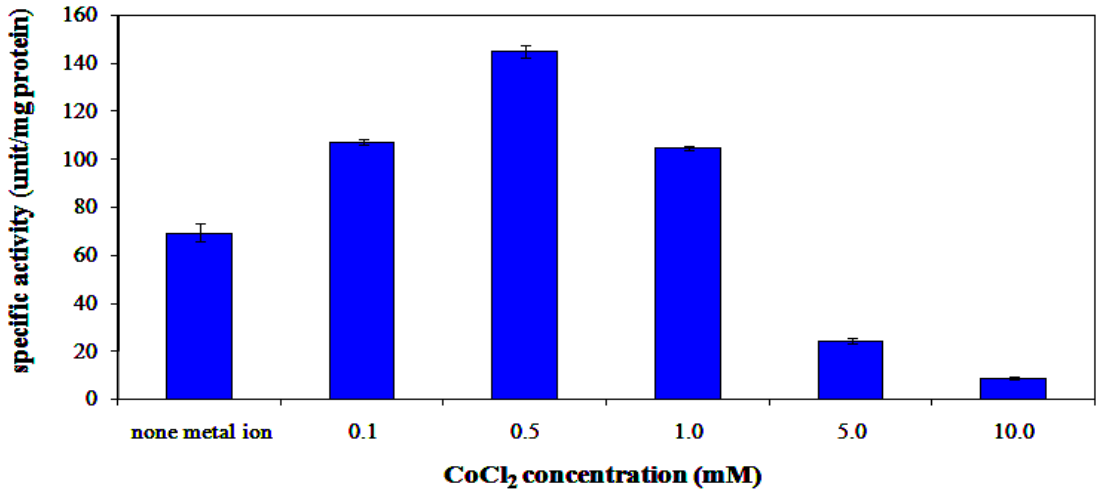



ภาพที่ 43 ผลของไอออนโลหะและสารเคมีที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

### 3.5 ผลความเข้มข้นของไอออนโลหะและสารเคมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

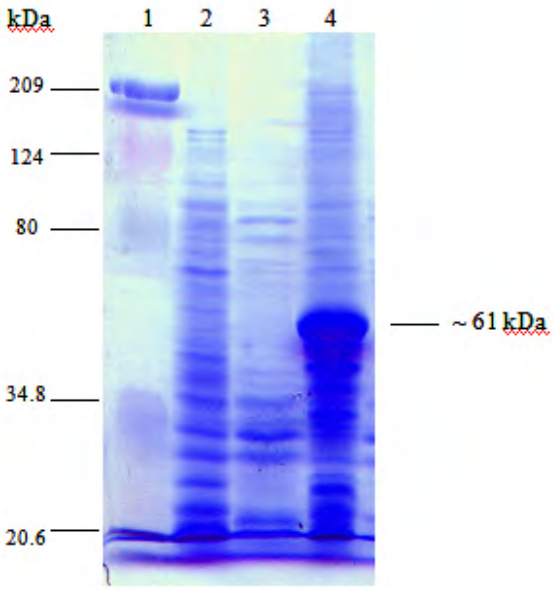
จากการทดลองในข้อ 3.4 พบว่ารีบิแนนท์โคลน BpGT ที่ทำการเติมโคบอลท์-คลอไรด์ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด จึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นของโคบอลท์-คลอไรด์ที่ทำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด โดยการนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG แล้วมาเติมโคบอลท์คลอไรด์ที่ความเข้นข้นต่างๆ จากภาพที่ 44 พบว่าโคบอลท์คลอไรด์ที่ความเข้นข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด ในขณะที่โคบอลท์-คลอไรด์ความเข้นข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ จะทำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ต่ำกว่ารีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ที่ไม่ทำการเติมโคบอลท์คลอไรด์




ภาพที่ 44 ผลของความเข้มข้นของโคบอลท์คลอไรด์ที่เหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โคลน BpGT ผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส

หลังจากที่ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรีคอมบิแนนส์โคลน BpGT เพื่อผลิตเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสให้ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดแล้ว จึงทำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสโดยนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์แล้วกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น ทำการแตกเซลล์และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ จากนั้นนำมาแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis จากภาพที่ 45 พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสขนาด 61 กิโลดาลตัน จากเดิมที่รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนตะกอน และมีเพียงส่วนน้อยที่อยู่ในรูปของเหลว (เลน 2) แต่ภายหลังจากที่หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ รีคอมคอมบิแนนท์เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนมาอยู่ในส่วนของเหลว (เลน 4) ในขณะที่เอนไซม์เพียงส่วนน้อยที่อยู่ในส่วนตะกอน (เลน 3) จากนั้นทำการเก็บส่วนของเหลวมาแยกบริสุทธิ์โดยผ่าน GSTPrep FF 16/10 column ทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ จากตารางที่ 11 พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 189.9 เป็น 1998.64 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีค่าความบริสุทธิ์เป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์สกัดหยาบ (crude extract) เริ่มต้น และมีเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่เหลืออยู่เพิ่มขึ้นเป็น 75.26 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ลิขสิทธิ์สงวน




ภาพที่ 45 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของยีนเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-2, เลน 1: Kaleidoscope prestained protein standard marker, เลน 2: ส่วนของของเหลวก่อนหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์, เลน 3: ส่วนตะกอนที่ไม่ละลายภายหลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เลน 4: ส่วนของของเหลวภายหลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลองแลนด์

ตารางที่ 11 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสภายหลังจากหาสภาวะการผลิตเอนไซม์

| Purification Fraction | Total Protein (mg) | Total Activity (U) | Specific Activity (U/mg) | Fold Purification | % Yield |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude enzyme | 5.063 | 2655.56 | 524.50 | 1 | 100 |
| Supernatant | 2.320 | 2390.91 | 1030.56 | 1.97 | 90.03 |
| GSTPrep FF | 1.240 | 1998.64 | 1611.81 | 3.07 | 75.26 |

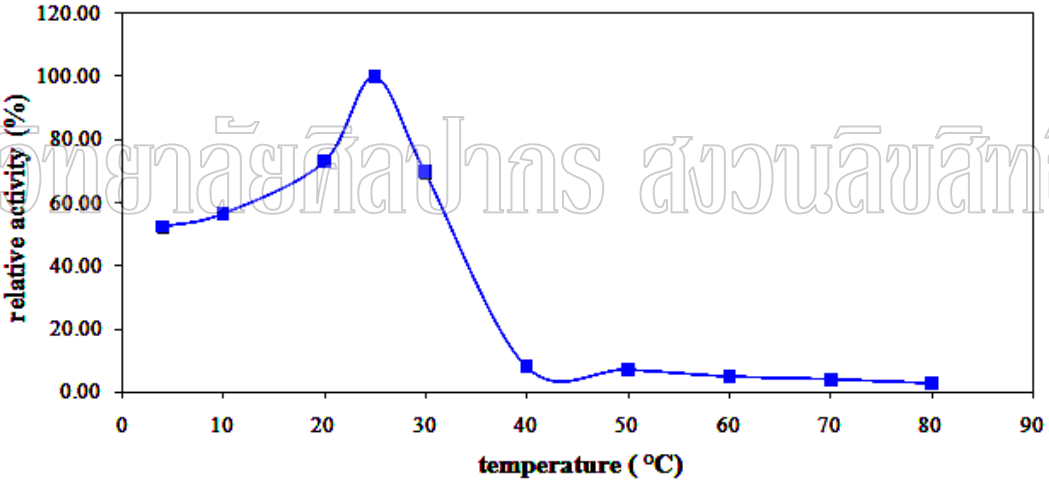
จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนโดยนำรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ ในปริมาตร 2 ลิตร กระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนตามสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น ทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ แล้วนำตัวอย่างที่ถูกเก็บในขณะที่ทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Amicon Ultra-4 ขนาด 10 กิโลดาลตัน โดยเมื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พบว่ามีค่าเท่ากับ 5250 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**5. การศึกษาหาคุณลักษณะของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้วมาศึกษาหาคุณลักษณะของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

**5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature)**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนที่อุณหภูมิต่างๆ จากนั้นนำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากภาพที่ 46 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในขณะที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 25 องศาเซลเซียสขึ้นไป จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งมีสาเหตุอันเนื่องมาจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียโครงสร้าง 3 มิติ จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง



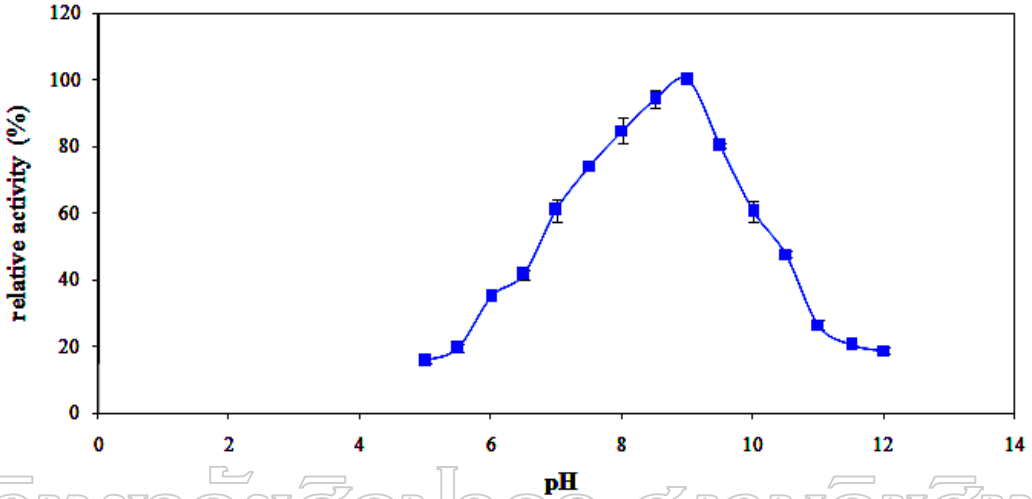

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 46 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

**5.2 พีเอชที่เหมาะสมที่สูด (optimum pH)**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์มาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออนในบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากภาพที่ 47 พบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น โดยที่พีเอช 9 จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ในขณะที่พีเอชที่สูงกว่าพีเอช 9 จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งมีสาเหตุเนื่องจากพีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไปอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียโครงสร้าง 3 ชนิด จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้อาจมีสาเหตุจากในขณะที่ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยจะทำการวัดปริมาณของ

พาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสของยาฆ่าแมลงโดยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส จากการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีเหลืองด้วยวิธี spectophotometry ในสภาวะกรด (พีเอชต่ำ) จะไม่สามารถทำการวัดปริมาณของพาราไนโตรฟีนอลได้ เนื่องจากสารละลายอยู่ในรูปที่ไม่มีสี เพราะพาราไนโตรฟีนอลจะเปลี่ยนสีของสารละลายจากไม่มีสี เป็นสีเหลืองในสภาวะที่เป็นเบสเท่านั้น

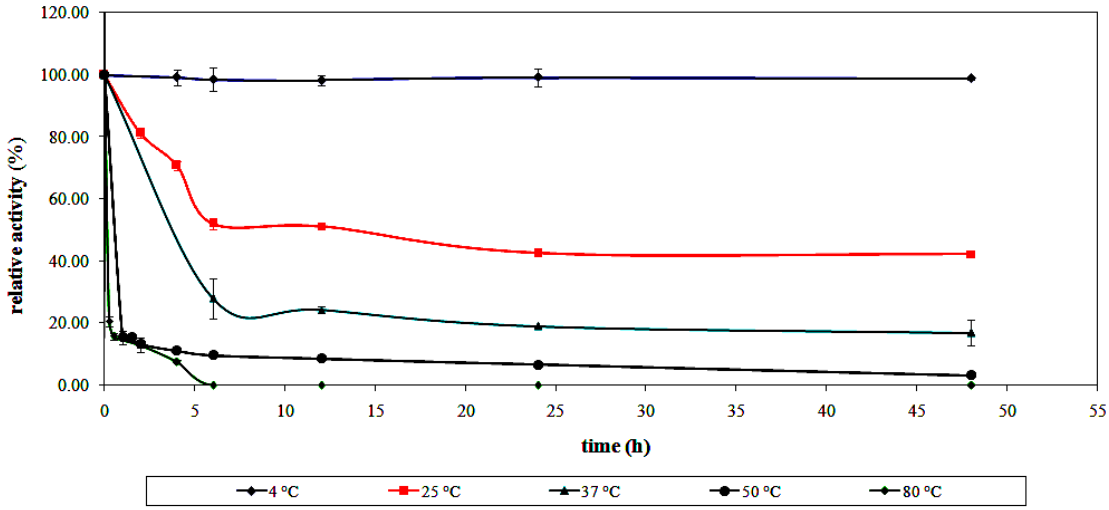



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 47 พีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

**5.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (thermal stability)**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด โดยนำเอนไซม์มาบ่มในบัฟเฟอร์ในแต่ละอุณหภูมิ แล้วหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างๆ จากภาพที่ 48 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์เสถียรที่สุด และกิจกรรมของเอนไซม์จะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง และเหลือ 45 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 37 และ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 25 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

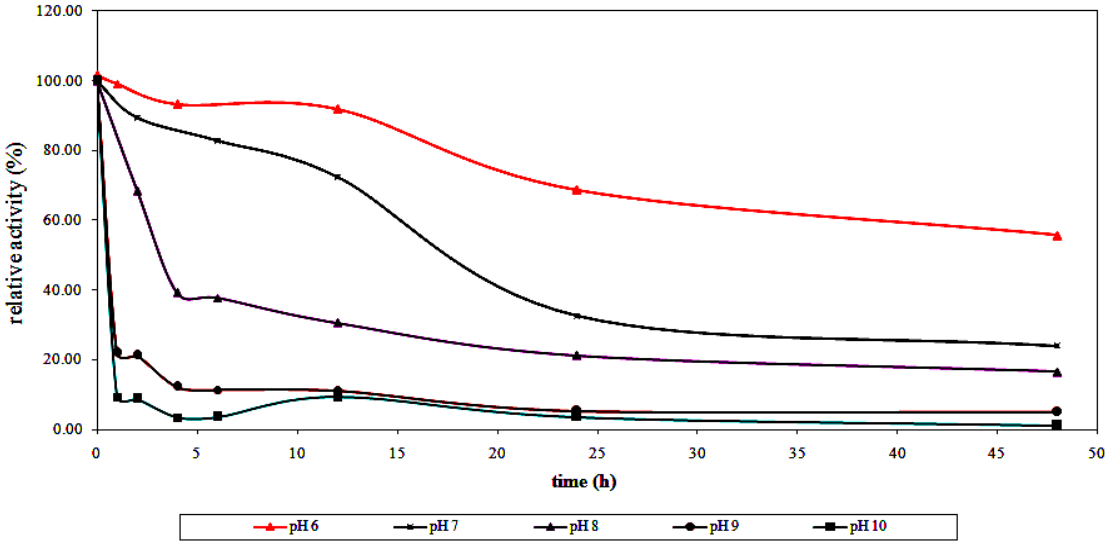



ภาพที่ 48 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด

**4.4 ความเสถียรต่อพีเอช (pH stability)**

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์มาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุด ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด โดยนำเอนไซม์บ่มในบัฟเฟอร์ในแต่ละพีเอช แล้วนำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างๆ จากภาพที่ 49 พบว่าที่พีเอช 6 จะทำให้เอนไซม์เสถียรที่สุด โดยเมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ และจะเหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามที่พีเอช 7 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง และเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ในขณะที่พีเอช 8 และ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 40 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 4 ชั่วโมง และที่พีเอช 10 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

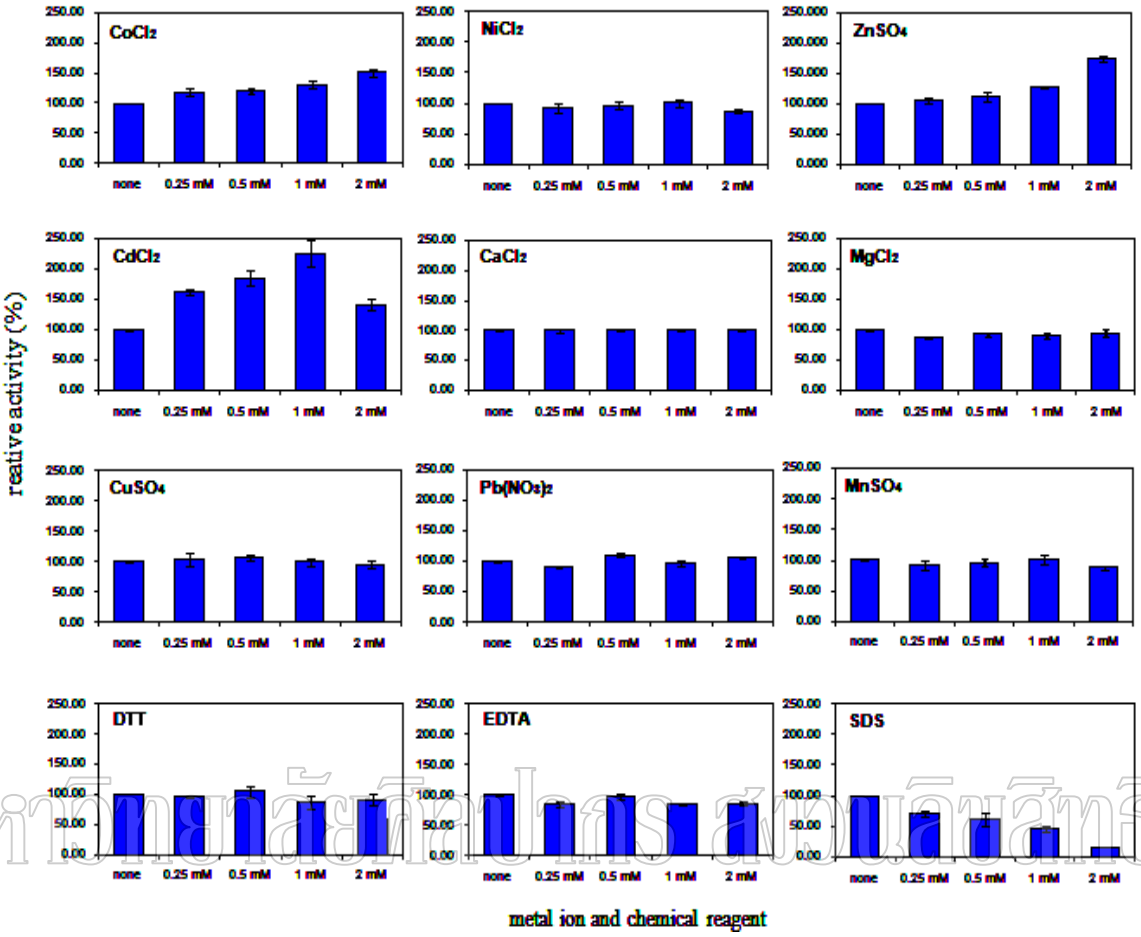



ภาพที่ 49 พีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เสถียรที่สุด

### 4.5 ผลของไอออนโลหะและสารเคมี

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์มาศึกษาหาผลของไอออนโลหะและสารเคมีที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับเมทธิลพาราไธออน ในบัฟเฟอร์ที่มีไอออนโลหะและสารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆ จากภาพที่ 50 พบว่าสำหรับ $CoCl_2$, $ZnSO_4$ และ $CdCl_2$ เมื่อความเข้นข้นสูงขึ้นส่งผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น โดยที่ $CoCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงที่สุด โดยเพิ่มขึ้นเป็น 226 เปอร์เซ็นต์ ส่วน $NiCl_2$, $CuSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ DTT, EDTA และ SDS มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเฉพาะ SDS เมื่อความเข้มข้นของ SDS เพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ซึ่ง SDS ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศรีราชา

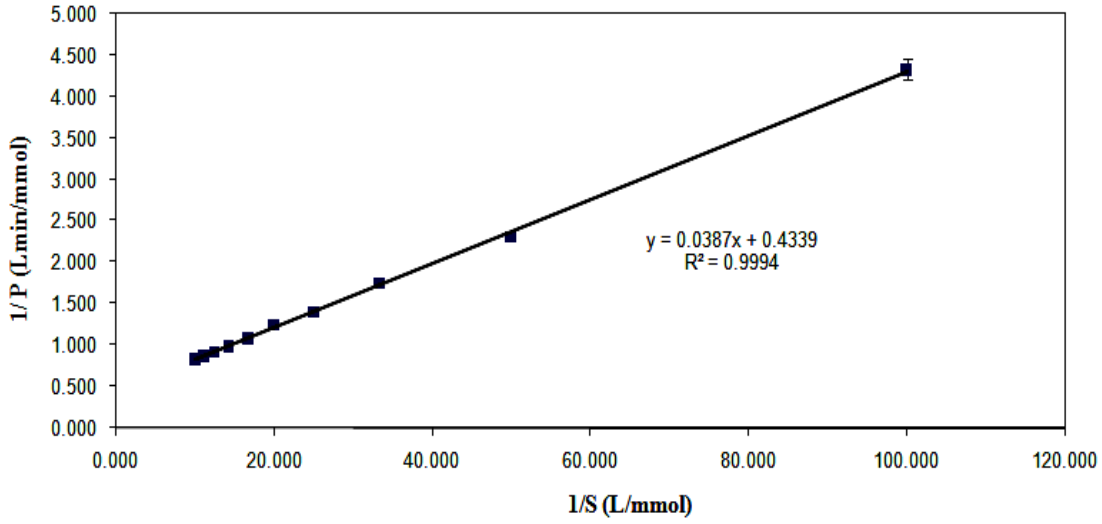



ภาพที่ 50 ผลของไอออนของโลหะและสารเคมีที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

### 4.6 การศึกษาหาพารามิเตอร์ทางจลศาสตร์ของเอนไซม์

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ถูกแยกบริสุทธิ์มาศึกษาหาจลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับสารออร์กาโนฟอสเฟต แล้วหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และค่าพารามิเตอร์ทางจนศาสตร์ของเอนไซม์ ได้แก่ ค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ($V_{max}$), ค่าคงที่ Michaelis-Menten ($K_m$), ค่า turnover number ($k_{cat}$) และค่า catalytic efficiency โดยค่าพารามิเตอร์ทางจนศาสตร์ของเอนไซม์หาได้จากกราฟ Lineweaver-Burk plot จากภาพที่ 51 พบว่าค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของเมทธิลพาราไธออนเท่ากับ 2.305 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.089 มิลลิโมลาร์, 76.31 ต่อนาที, 855.54 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับเมทธิลพาราไธออน

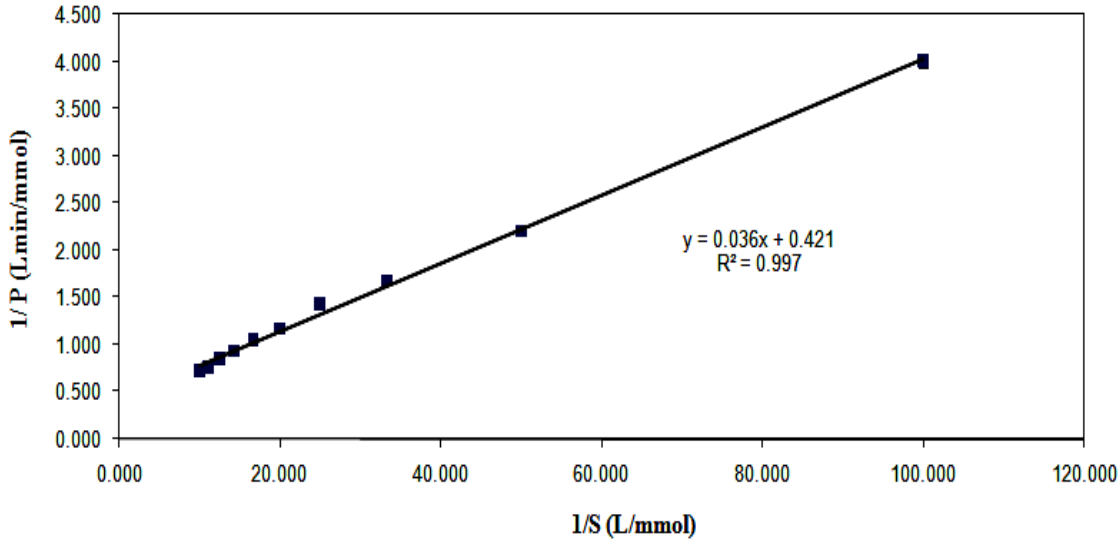
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลิขสิทธิ์




ภาพที่ 51 Lineweaver-Burk plot ของเมทธิลพาราไธออน

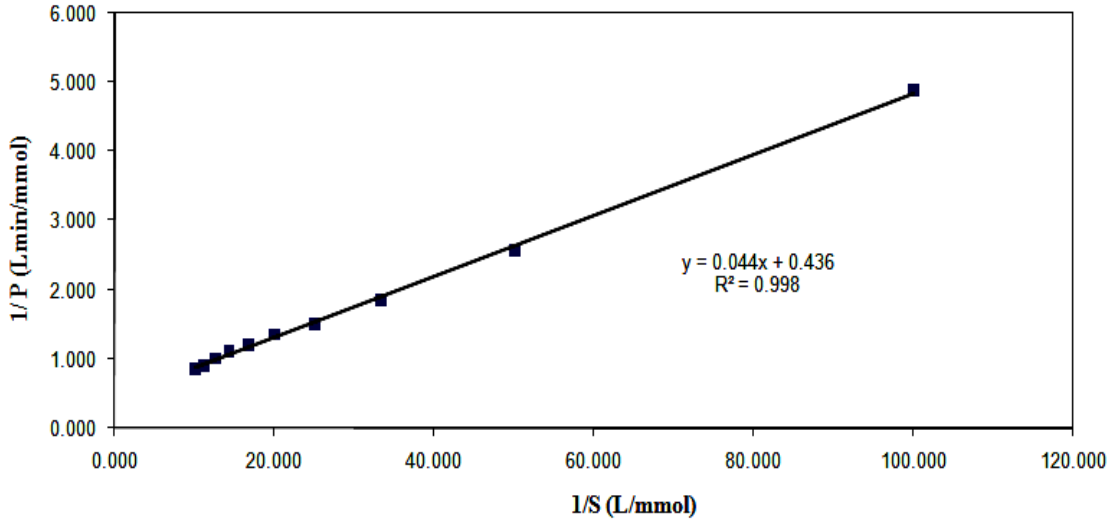
จากภาพที่ 52 พบว่าค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของพาราออกซอน เท่ากับ 2.371 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.086 มิลลิโมลาร์, 78.51 ต่อนาที, 917.16 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยากับพาราออกซอนได้ดีที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์




ภาพที่ 52 Lineweaver-Burk plot ของพาราออกซอน

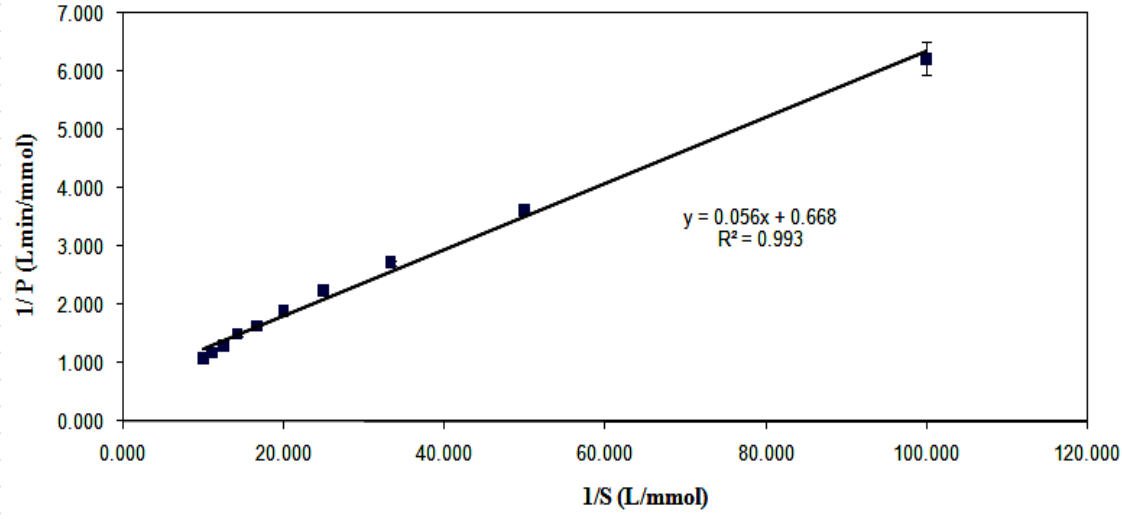
จากภาพที่ 53 ค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของพาราไธออน เท่ากับ 2.294 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.101 มิลลิโมลาร์, 75.94 ต่อนาที, 752.49 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับพาราไธออน




ภาพที่ 53 Lineweaver-Burk plot ของพาราไธออน

จากภาพที่ 54 ค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของเฟนิโทรไทออน เท่ากับ 1.496 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.085 มิลลิโมลาร์, 49.54 ต่อนาที, 582.91 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับเฟนิโทรไทออน

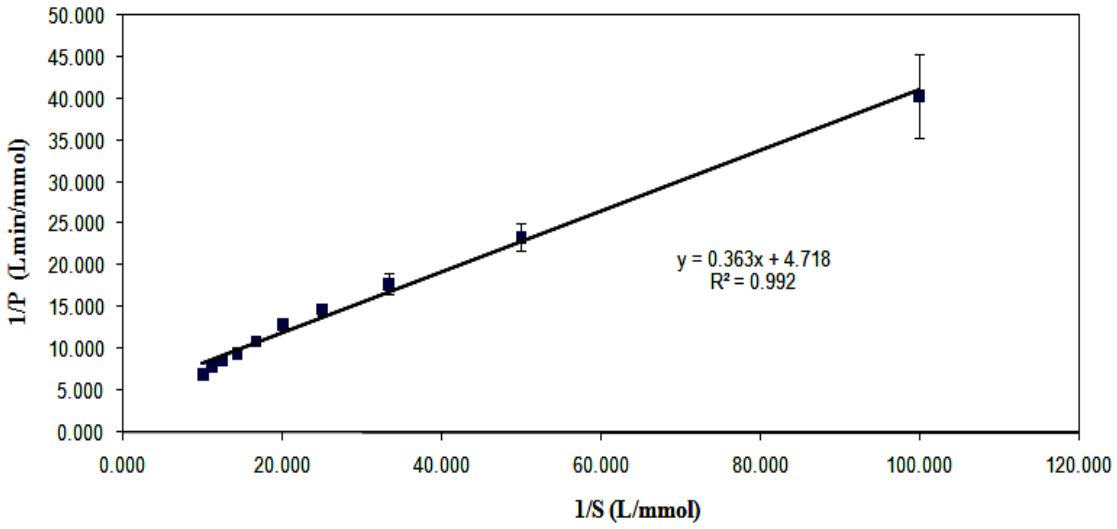
มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์




ภาพที่ 54 Lineweaver-Burk plot ของเฟนิโทรไทออน

จากภาพที่ 55 ค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของคูมาฟอส เท่ากับ 0.212 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.077 มิลลิโมลาร์, 7.02 ต่อนาที, 91.04 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่ง

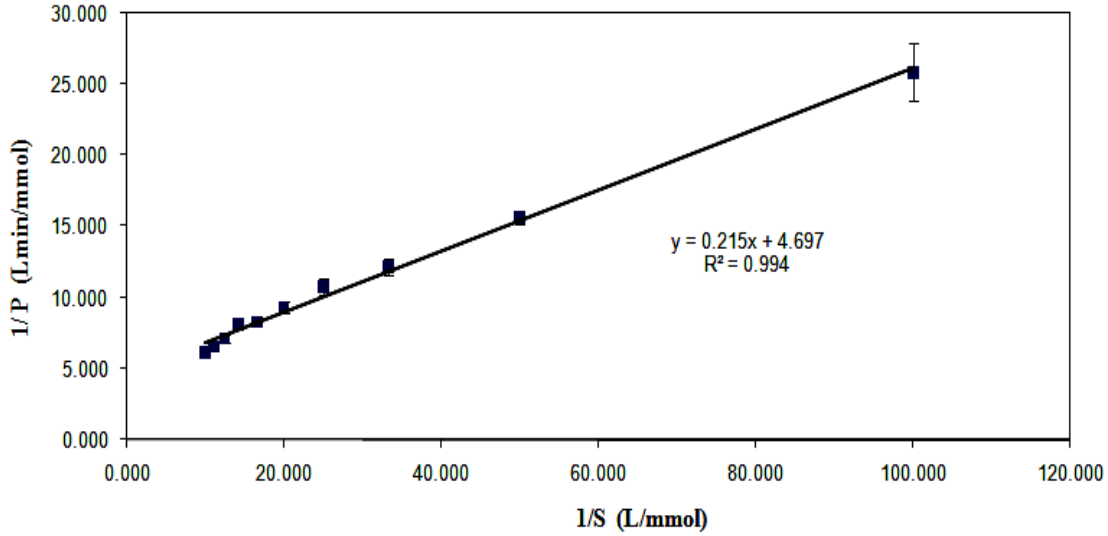
แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ไม่ค่อยดีกับคูมาฟอส




ภาพที่ 55 Lineweaver-Burk plot ของคูมาฟอส

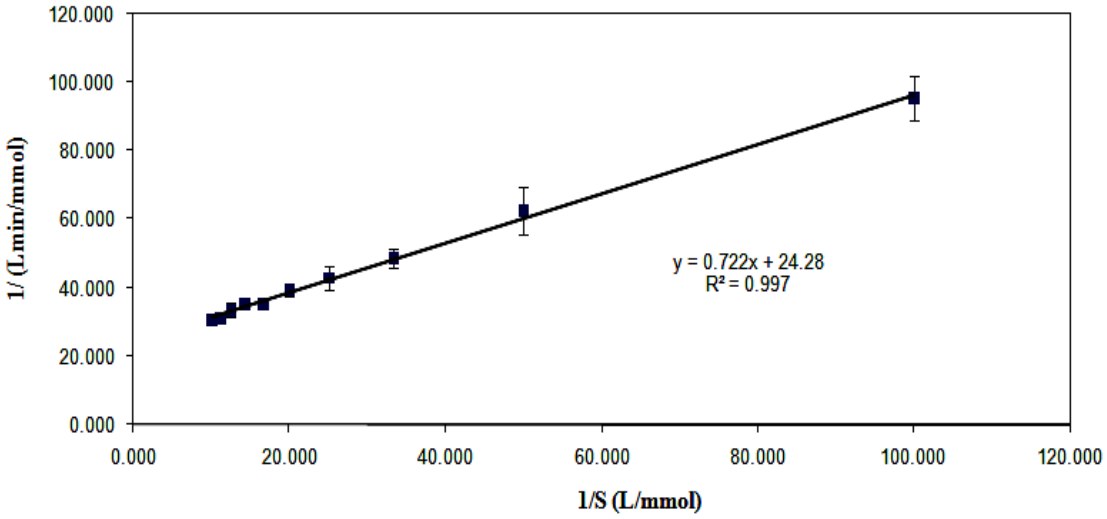
มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

จากภาพที่ 56 ค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของคลอร์ไพริฟอส เท่ากับ 0.213 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.046 มิลลิโมลาร์, 7.05 ต่อนาที, 153.85 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ไม่ดีกับคลอร์ไพริฟอส




ภาพที่ 56 Lineweaver-Burk plot ของคลอร์ไพริฟอส

จากภาพที่ 57 ค่า $V_{max}$, $K_m$, $k_{cat}$ และ catalytic efficiency ของมาลาไธออน เท่ากับ 0.041 มิลลิโมลาร์ต่อนาที, 0.030 มิลลิโมลาร์, 1.36 ต่อนาที, 45.82 ต่อโมลาร์นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้น้อยมากกับมาลาไธออน




ภาพที่ 57 Lineweaver-Burk plot ของมาลาไธออน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

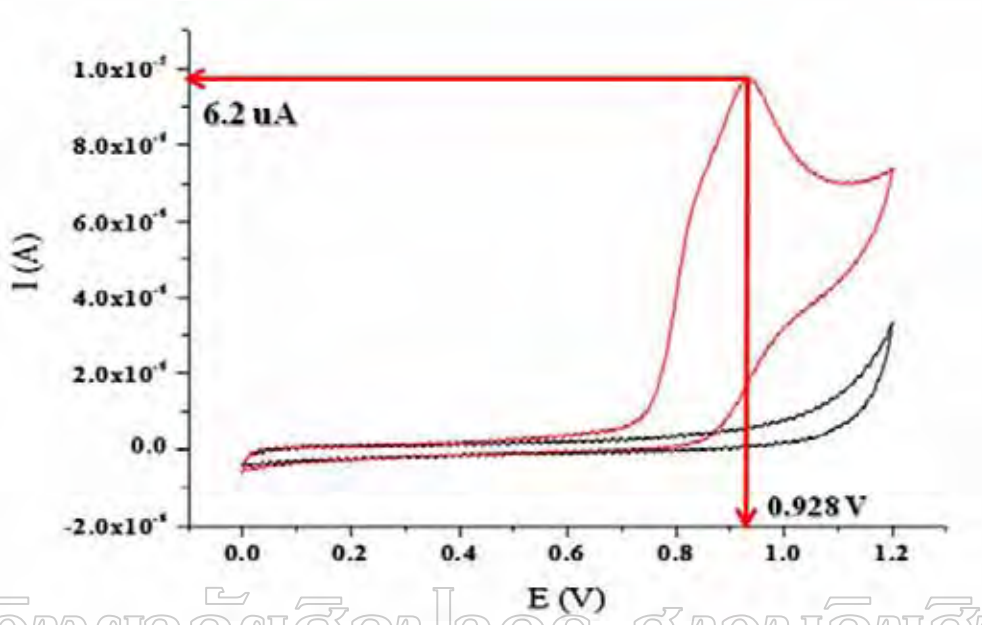
**5. การนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาประยุกต์ใช้โดยการทำไบโอเซนเซอร์**

เมื่อนำเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสหลังจากที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และนำมาศึกษาหาคุณลักษณะของเอนไซม์แล้ว มาประยุกต์ใช้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

**5.1 การศึกษาโวลแทมเมตรีแบบรอบสำหรับการออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล**

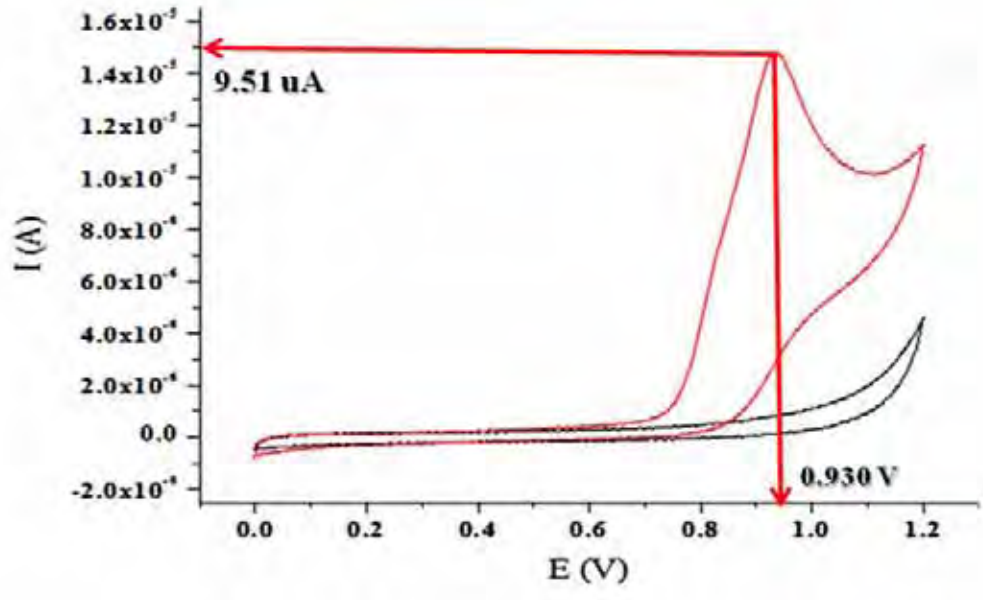
ทำโวลแทมเมตรีแบบรอบสำหรับการออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอล (ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารออร์กาโนฟอสเฟตโดยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลส) โดยการใช้ขั้วกลาสซีคาร์บอน, ขั้วซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์และขั้วแพตตินัม เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน, ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและขั้วไฟฟ้าร่วม ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบระหว่างโมดิฟายด์อิเล็กโทรด (modified CNT-GC electrode) ที่มีการใช้คาร์บอนนาโนทิวป์ และอิเลคโทรดหัวเปล่า (bare GC electrode) ที่ไม่มีการใช้คาร์บอนนาโนทิวป์ จากภาพที่ 58 พบว่าอิเลคโทรดหัวเปล่า ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสำหรับการตอบสนองต่อพาราไนโตฟีนอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 6.20 ไมโครแอมแปร์ ซึ่งเมื่อเทียบกับโมดิฟายด์อิเล็กโทรดจะให้ค่าที่ต่ำกว่า จากรูปที่ 59 โมดิฟายด์อิเล็กโทรดให้ค่ากระแสไฟฟ้าสำหรับการตอบสนองต่อพาราไนโตฟีนอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 9.51 ไมโครแอมแปร์ แสดงว่าคาร์บอนนาโนทิวป์ช่วยในการส่งเสริมการ

ถ่ายเทอิเลคตรอน (promote electron transfer) ไปยังอิเลคโทรดได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้การตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้า (response) สูงสุด ทั้งโมดิฟายด์อิเล็กโทรดและอิเลคโทรดหัวเปล่า มีค่าใกล้เคียงกัน คือ +0.930 และ +0.928 โวลต์ ตามลำดับ




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 58 ไซคลิกโวลแทมเมตรีสำหรับการออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอลโดยใช้อิเลคโทรดหัวเปล่า




ภาพที่ 59 ไซคลิกโวลแทมเมตรีสำหรับการออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอลโดยใช้โมดิฟายด์อิเล็กโทรด

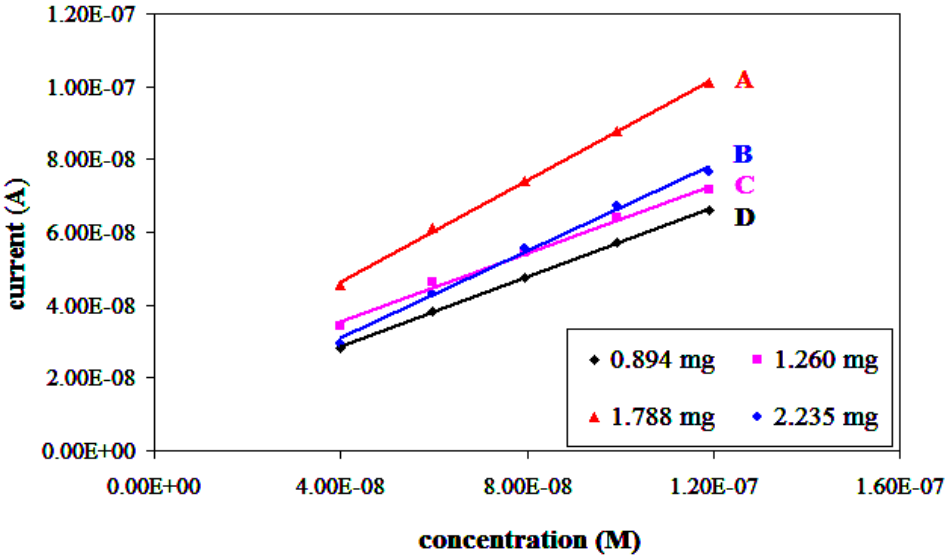
**5.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด**

หลังจากที่ทำการสร้างเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด (MPH electrode) แล้ว นำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ เพื่อให้ได้ค่าความไวของอิเลคโทรดสูงที่สุด สำหรับการตรวจวัดการปนเปื้อยของยาฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ดังนี้

5.2.1 การหาปริมาณของรีคอมบบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่เหมาะสมที่สุด สำหรับตรึงลงบนคาร์บอนนาโนทิวป์

ทำการหาค่าการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้า ในการตรวจวัดเมทธิลพารา-ไธออนของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่แยกบริสุทธิ์จากโคลนในรูปของเอมไซม์ที่ถูกเชื่อม (GST-tag fusion protein) จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ถูกเชื่อมด้วยกลูตาไธโอน เอสทรานเฟอร์เลส (GST-tagged MPH) ในปริมาณต่างๆ ตรึงลงบนคาร์นาโนทิวป์ (MPH-immobilized CNT) บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด (GC electrode) โดยอาศัยการจับกันระหว่างประจุ (electrostatic technique) จากภาพที่ 60 พบว่าเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสปริมาณ 0.894 มิลลิกรัม (กราฟ D) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดต่ำที่สุด คือ 479 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ จากนั้นค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อปริมาณเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสสูงขึ้น กล่าวคือที่ปริมาณเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 1.260 มิลลิกรัม (กราฟ C) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดเท่ากับ 469 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ และที่ปริมาณเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 1.788 มิลลิกรัม (กราฟ A) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงที่สุด คือ 697 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส 2.235 มิลลิกรัม (กราฟ B) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดลดลงเท่ากับ 596 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร



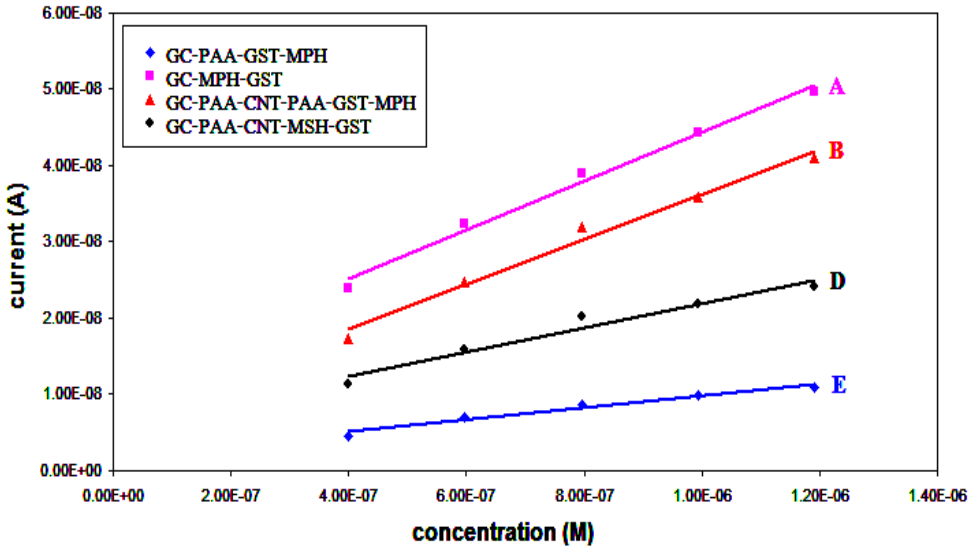

ภาพที่ 60 กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) จากการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของ MPH-immobilized CNT บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด ที่ปริมาณอนไซม์ต่างๆ

5.2.2 การเปรียบเทียบวิธีการตรึงเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรด

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

5.2.2.1 วิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly immersion technique

ทำการเปรียบเทียบวิธีการตรึงเอนไซม์บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly immersion technique จะได้โมดิฟายด์กลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด 4 ชนิด คือ GC-PAA-GST-MPH, GC-PAA-CNT-PAA-GST-MPH, GC-MPH-GST และ GC-PAA-CNT-MSH-GST โมดิฟายด์อิเล็กโทรด จากการทดสอบเพื่อหาค่าการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าต่อเมทธิลพาราไธออน ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 0.93 โวลต์ จากภาพที่ 61 พบว่า GC-MPH-GST โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ A) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงที่สุด คือ 32.1 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ซึ่ง GC-PAA-CNT-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ B) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดเท่ากับ 29.6 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ และ GC-PAA-CNT-MSH-GST โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ D) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรด เท่ากับ 15.9 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ในขณะที่ GC-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ E) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดต่ำที่สุด คือ 7 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์

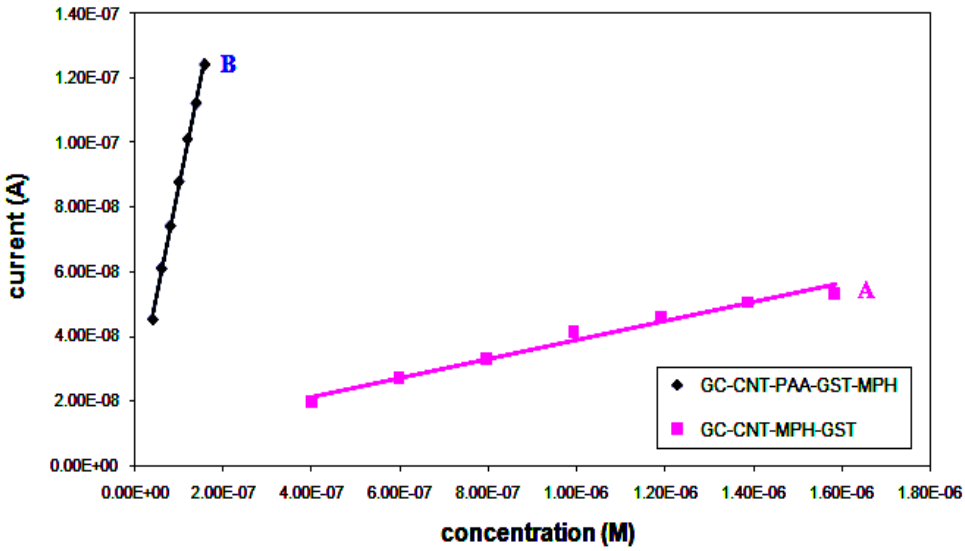



ภาพที่ 61 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly immersion technique

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

5.2.2.2 วิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly drop dry technique

ทำการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly drop dry technique จะได้โมดิฟายด์กลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด 2 ชนิด คือ GC-CNT-PAA-GST-MPH, GC-CNT-MPH-GST โมดิฟายด์อิเล็กโทรด จากการทดสอบหาค่าการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าต่อเมทธิลพารา-ไธออน ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 0.93 โวลต์ จากภาพที่ 62 พบว่า GC-CNT-PAA-GST-MPH โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ B) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงกว่า คือ 660 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ในขณะที่ GC-CNT-MPH-GST โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ A) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดต่ำกว่า คือ 29 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์

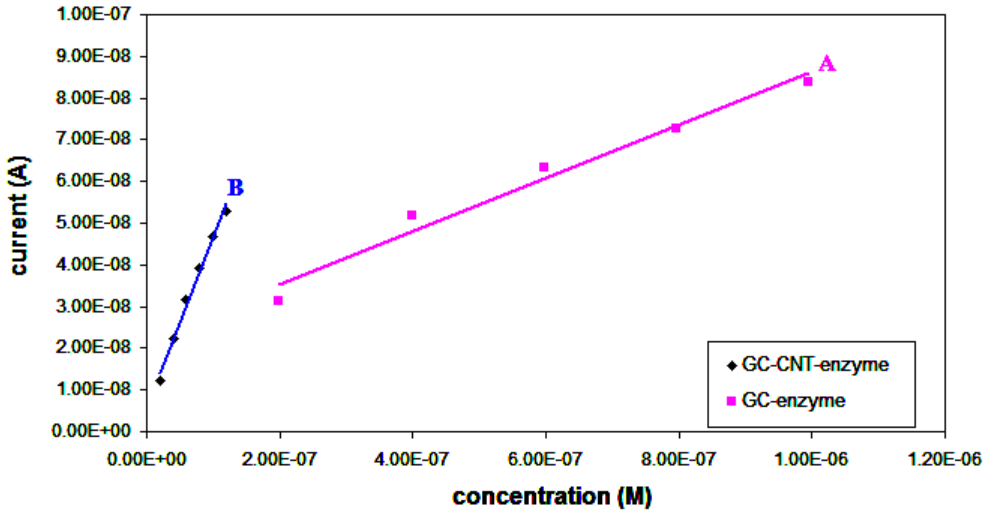



ภาพที่ 62 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี layer by layer electrostatic self assembly drop dry technique

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

5.2.2.3 วิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี drop dry

ทำการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี drop dry จะได้โมดิฟายด์กลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด 2 ชนิด คือ GC-enzyme และ GC-CNT-enzyme โมดิฟายด์อิเล็กโทรด จากการทดสอบหาค่าการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าต่อเมทธิลพาราไธออน ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 0.93 โวลต์ จากภาพที่ 63 พบว่า GC-CNT-enzyme โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ B) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงกว่า คือ 409.8 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ในขณะที่ GC-enzyme โมดิฟายด์อิเล็กโทรด (กราฟ A) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดต่ำกว่า คือ 63.6 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์

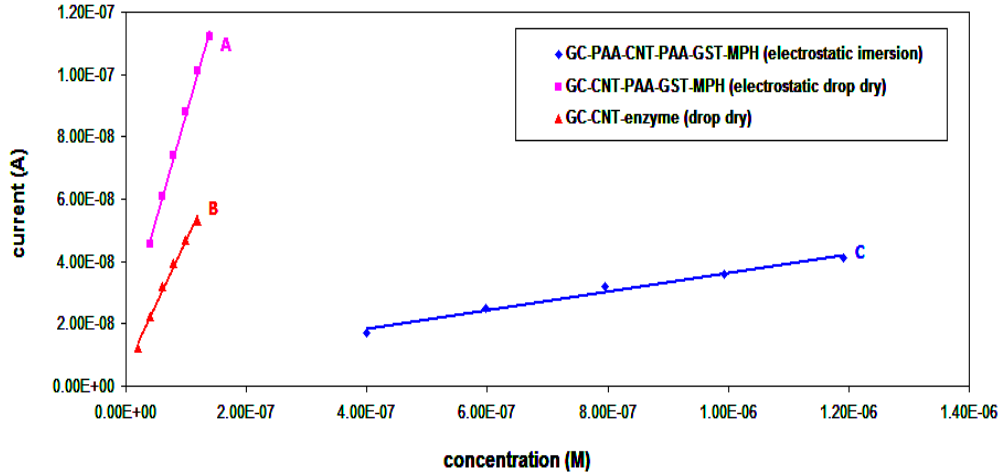



ภาพที่ 63 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี drop dry

5.2.2.4 เปรียบเทียบวิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี electrostatic drop dry technique, วิธี electrostatic immersion technique และวิธี drop dry

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ทำการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์บนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดระหว่างวิธี electrostatic drop dry technique, วิธี electrostatic immersion technique และวิธี drop dry จากภาพที่ 64 พบว่าวิธี electrostatic drop dry technique (กราฟ A) ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดเท่ากับ 675.7 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าทั้งวิธี electrostatic immersion technique (กราฟ C) และวิธี drop dry (กราฟ B) ที่มีค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดเท่ากับ 29.6 และ 409.8 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

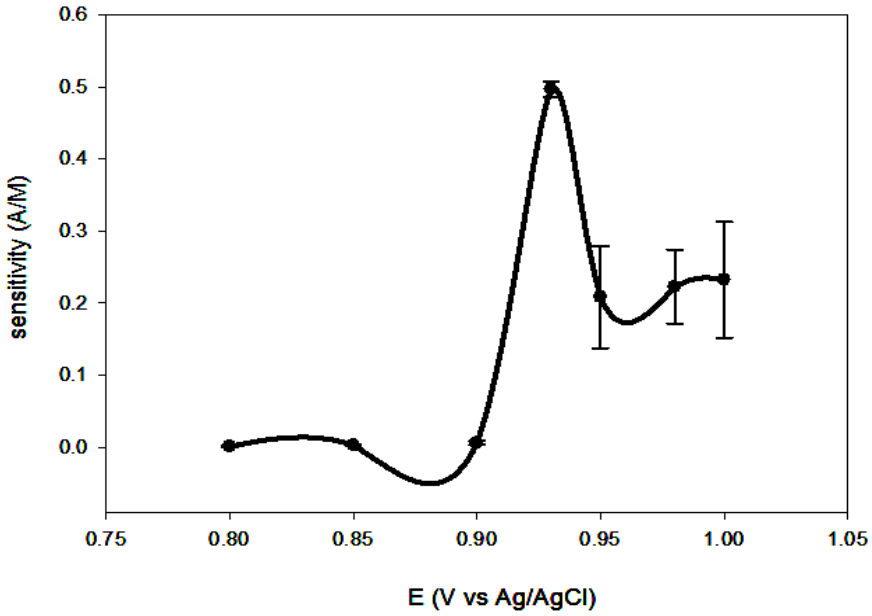



ภาพที่ 64 กราฟเทียบมาตรฐานจากการเปรียบเทียบการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ตรึงบนกลาสซีคาร์บอนอิเลคโทรดด้วยวิธี electrostatic drop dry technique, วิธี electrostatic self assembly immersion techniques และวิธี drop dry

5.2.3 การศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่สูงที่สุดสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไรโตรฟีนอล

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ทำการเปรียบเทียบค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าต่างๆ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล จากภาพที่ 65 พบว่าเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้น ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดจะสูงขึ้นด้วย จนกระทั่งที่ความต่างศักย์ 0.93 โวลต์ ให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดที่สูงที่สุด เท่ากับ 497 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการใช้ตรวจวัดยาฆ่าแมลง และที่ความต่างศักย์ที่สูงกว่า 0.93 โวลต์ ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดจะลดลง




ภาพที่ 65 กราฟไฮโดรไดนามิกโวลแทมโมแกรมสำหรับวัดการเกิดออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล

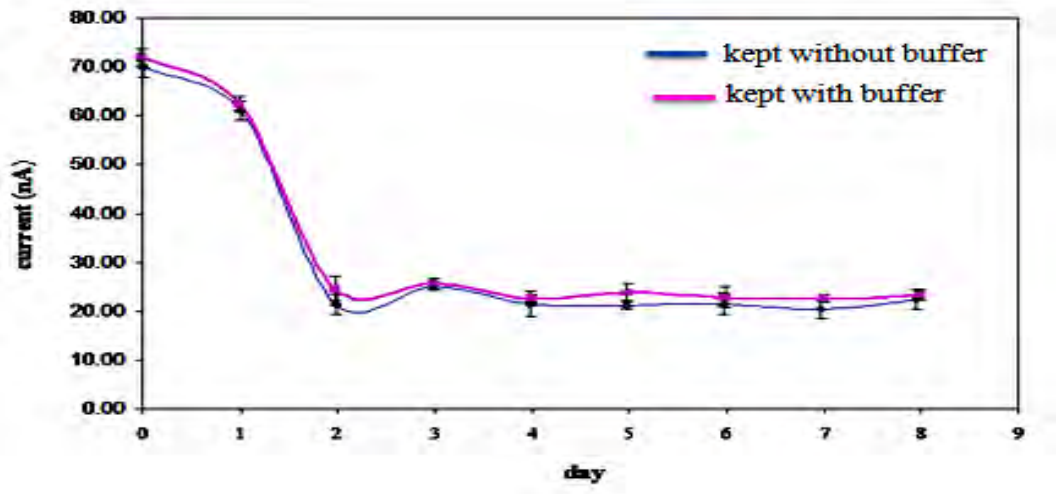
มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

**5.3 การศึกษาคุณลักษณะของเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด**

หลังจากที่เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด (MPH electrode) ถูกสร้างตามสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นแล้ว จึงนำมาศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ดังนี้

5.3.1 การศึกษาหาค่าความเสถียรของอิเลคโทรด

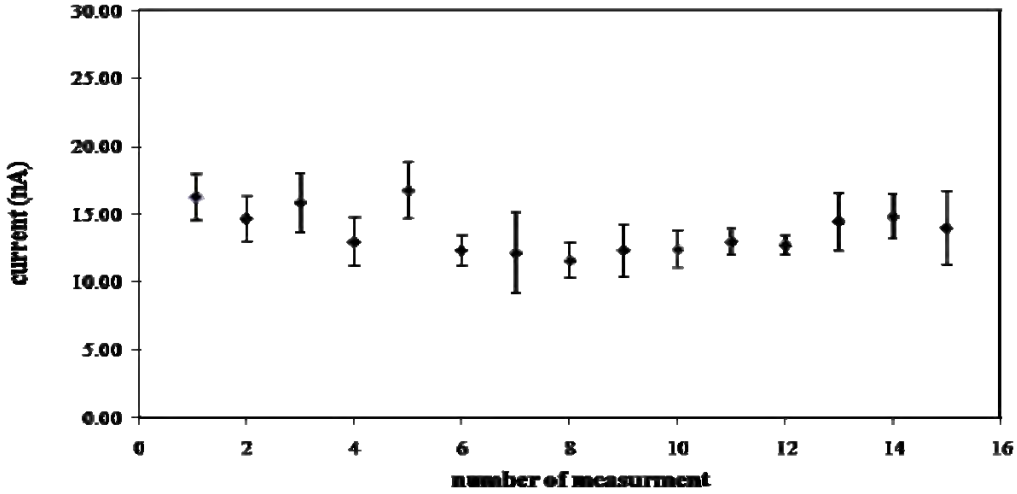
หลังจากที่ทำการสร้างเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด แล้วทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าที่ระยะเวลาต่างๆ จากภาพที่ 66 พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียง 1 วัน ประสิทธิภาพในการตรวจวัดยาฆ่าแมลงจะลดลงเล็กน้อย โดยให้ค่าการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้า เท่ากับ 70 นาโนแอมแปร์ เมื่อที่ระยะเวลาผ่านไป 2 วัน ประสิทธิภาพของอิเลคโทรดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งให้การตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้า เท่ากับ 20 นาโนแอมแปร์ จากนั้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปประสิทธิภาพของอิเลคโทรดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง (กราฟสีฟ้า) และเมื่อทำการเปรียบเทียบอิเลคโทรดที่ถูกแช่อยู่ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน (กราฟสีชมพู)




ภาพที่ 66 แสดงผลการวัดความเสถียรของเมทธิลพาไธออนไอโดรเลสอิเลคโทรดโดยเก็บอิเลค-โทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งแช่ในบัฟเฟอร์ (กราฟสีชมพู) และไม่ถูกแช่ในบัฟเฟอร์ (กราฟสีฟ้า)

5.3.2 การศึกษาหาค่าความสามารถในการวัดซ้ำอย่างต่อเนื่องของอิเลคโทรด

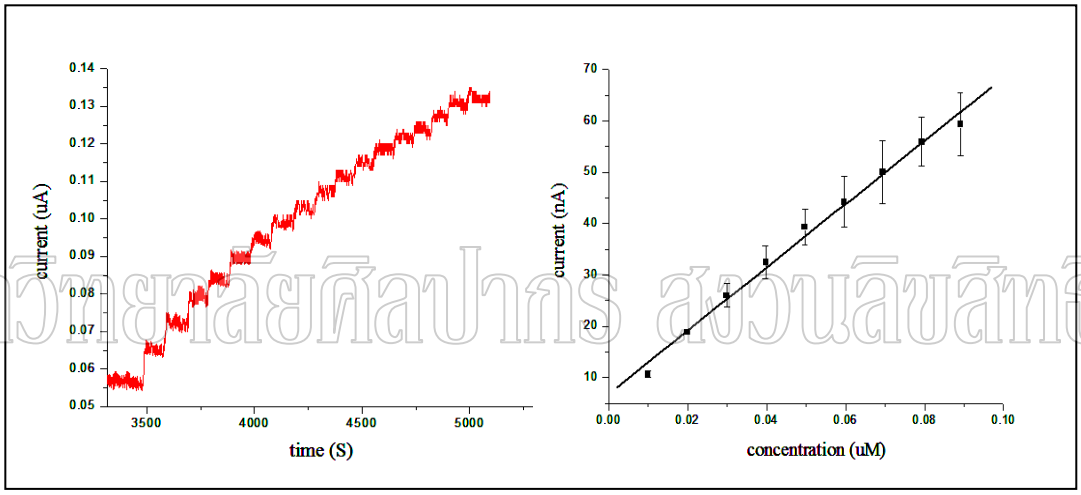
หลังจากที่ทำการสร้างเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด ทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นจำนวนทั้งหมด 15 ครั้ง ด้วยอิเลคโทรดเดิม จากภาพที่ 67 พบว่าอิเลคโทรดนี้สามารถทำการวัดซ้ำได้ โดยเมื่อคำนวณหาค่าร้อยละ relative standard deviation (%RSD) ได้เท่ากับ 9.19 เปอร์เซ็นต์ ± 3.49 %




ภาพที่ 67 แสดงความสามารถในการตรวจวัดซ้ำได้อย่างต่อเนื่องของเมทธิลพาไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด

5.3.3 การศึกษาหาค่าพิสัยเชิงเส้นของการวัด, ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรด และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ระบบสามาถวัดได้

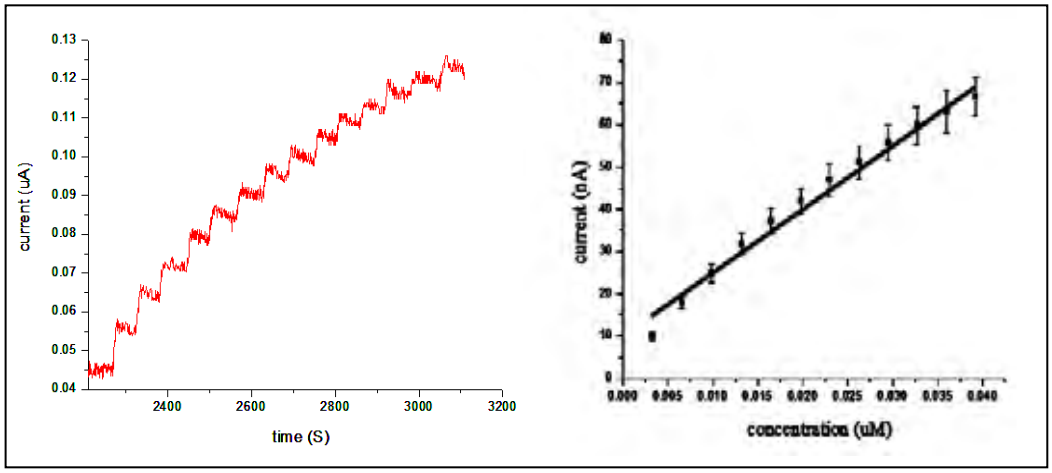
จากการศึกษาการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเมทธิลพาราไธออนโดยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส เมื่อทำการใส่เมทธิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ลงในบัฟเฟอร์อย่างต่อเนื่อง จากภาพที่ 68 พบว่าให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงถึง 616 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ และเมื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระบบสามารถทำการวัดได้ จากสัดส่วนของสัญญาณต่อแบคกราวด์ที่เท่ากับ 3 (signal-to-noise characteristics; S/N = 3) ได้เท่ากับ 5.4 นาโนโมลาร์ โดยให้ค่าพิสัยเชิงเส้นของการวัดอยู่ในช่วง 10-90 นาโนโมลาร์




มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 68 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้า (ภาพซ้าย) และกราฟมาตรฐานของเมทธิลพาราไธออน (ภาพขวา)

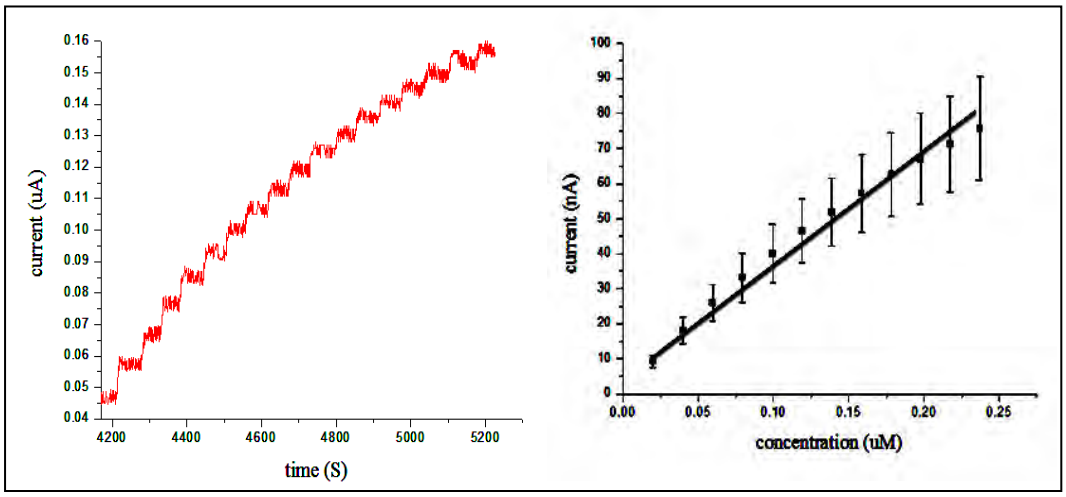
สำหรับการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราออกซอน โดยใส่พาราออกซอนที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ลงในบัฟเฟอร์อย่างต่อเนื่อง จากภาพที่ 69 พบว่าให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงถึง 1547 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ และเมื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระบบสามารถทำการวัดได้ (limit of detection; LOD) จากสัดส่วนของสัญญาณต่อแบคกราวด์ที่เท่ากับ 3 (signal-to-noise characteristics; S/N = 3) ได้เท่ากับ 0.86 นาโนโมลาร์ โดยให้ค่าพิสัยเชิงเส้นของการวัดอยู่ในช่วง 3.3-40 นาโนโมลาร์




ภาพที่ 69 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้า (ภาพซ้าย) และกราฟมาตรฐานของพาราออกซอน (ภาพขวา)

สำหรับการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไธออน โดยใส่พาราไธออที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ลงในบัฟเฟอร์อย่างต่อเนื่อง จากภาพที่ 70 พบว่าให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดสูงถึง 301 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ และเมื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระบบสามารถทำการวัดได้ (limit of detection; LOD) จากสัดส่วนของสัญญาณต่อแบคกราวด์ที่เท่ากับ 3 (signal-to-noise characteristics; S/N = 3) ได้เท่ากับ 0.86 นาโนโมลาร์ โดยให้ค่าพิสัยเชิงเส้นของการวัดอยู่ในช่วง 20-240 นาโนโมลาร์

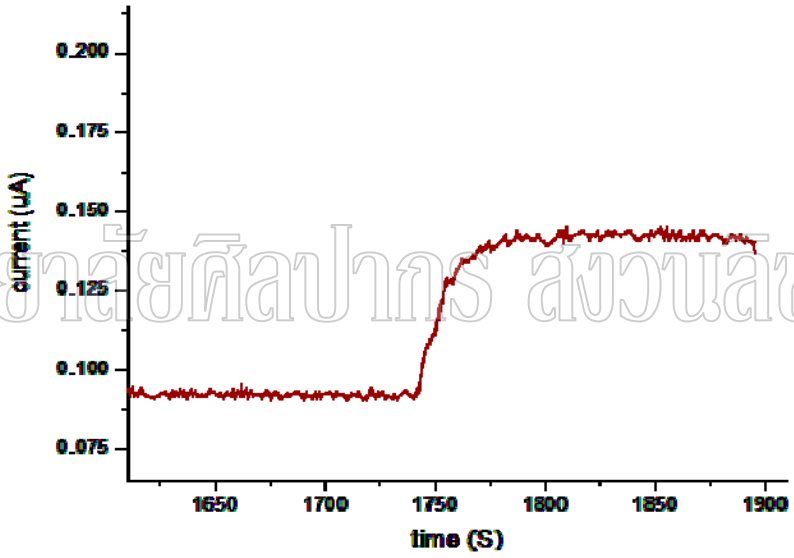
มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์




ภาพที่ 70 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้า (ภาพซ้าย) และกราฟมาตรฐานของพาราไธออน (ภาพขวา)

### 5.4 การนำเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดทดสอบตัวอย่างจริง

เมื่อนำเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดมาทดสอบกับตัวอย่างจริง โดยนำน้ำตัวอย่าง ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำที่บริเวณบางขุนเทียนมาใส่ (spike) ยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน ให้มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางน้ำตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ แล้วนำน้ำตัวอย่างที่มียาฆ่าแมลงปนเปื้อนใส่ลงในบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 76.84 นาโนโมลาร์ ทำการวัดการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากภาพที่ 71 พบว่าได้สัญญาณเท่ากับ 12.4 นาโนแอมแปร์ เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานเมทธิลพาราไธออนได้เท่ากับ 66.34 นาโนโมลาร์ โดยได้ค่าร้อยละผลผลิต (% recovery) เท่ากับ 86.33 เปอร์เซ็นต์ ± 1.37 %

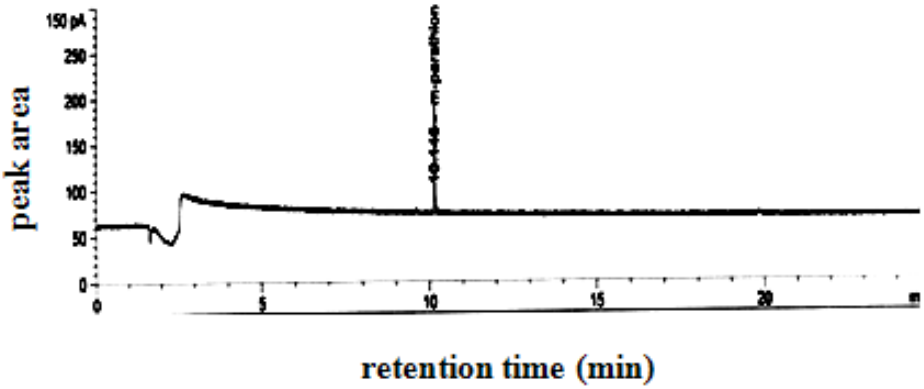



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาพที่ 71 กราฟการตอบสนองต่อสัญญาณไฟฟ้าในการนำเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดวัดตัวอย่างจริง

### 6. การหาปริมาณยาฆ่าแมลงในน้ำตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี

เมื่อนำน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งน้ำที่บริเวณบางขุนเทียนมาใส่ยาฆ่าแมลงเมทธิล-พาราไธออน (spike) ให้มีความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัด และวิเคราะห์ปริมาณยาฆ่าแมลงโดยวิธีแก๊สโครโมโตรกราฟฟี่ จากภาพที่ 72 พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์เมทธิลพาราไธออน (retention time) ประมาณ 10 นาที




ภาพที่ 72 กราฟโครมาโตรแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี

และเมื่อคำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเมทธิลพาราไธออน พบว่าความเข้นข้นที่คำนวณได้เท่ากับ 14.245 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจึงได้ค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 94.97 เปอร์เซ็นต์ ± 7.76 %

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

# บทที่ 5

## สรุปผลการวิจัย

การโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส และการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าว โดยทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว ในพลาสมิด pGEX-4T-2 แล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เจ้าบ้านที่เหมาะสม พบว่าสามารถทำการโคลนได้สำเร็จและมีการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสในพลาสมิดดังกล่าว โดยให้ชื่อโคลนเป็น BpGT ซึ่งคือ *E.coli* BL21 ที่มี pGEX-4T-2 :: *mpd* gene และผลจากการทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ารีคอมบิแนนท์ BpGT มีการแสดงออกของยีนในปริมาณที่สูงมาก

ในการศึกษาการผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากรีคอมบิแนนท์โคลน BpGT พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นมีทั้งส่วนของเหลวที่ละลายน้ำได้ และส่วนตะกอนซึ่งในการปั่นเหวี่ยงจะตกลงพร้อมมากับเศษเซลล์ โดยส่วนใหญ่เอนไซม์จะอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ จากการตรวจสอบผลของ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis สาเหตุน่าจะเนื่องมาจากเกิดการผลิตโปรตีนขึ้นภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก เอนไซม์จึงเกิดการรวมตัวกับโปรตีนและตกตะกอนในลักษณะที่เรียกว่า inclusion body นอกจากนี้เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสชนิดนี้ในธรรมชาติจะติดอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ในลักษณะที่เป็น membrane protein (Keprasertsup, 2001) ซึ่งในการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ในส่วนของเหลว

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลิขสิทธิ์

สามารถนำตัวอย่างไปกรองแล้วผ่านคอลัมน์ (GSTPrep FF column) ได้เลย แต่ในส่วนของเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของตะกอนนั้น ต้องนำตัอย่างไปละลายด้วยยูเรีย และทำไดอะไลซิส เพื่อค่อยๆ กำจัดยูเรียออก เพื่อให้โปรตีนเกิดการ refold ก่อน จึงจะทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ เมื่อเอนไซม์ผ่านคอลัมน์แล้วพบว่ามีความบริสุทธิ์สูง แต่มีกิจกรรมเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายเมทธิลพารา-ไธออนที่ต่ำ สาเหตุน่าจะเนื่องมาจากเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ จะถูกทำให้เสียสภาพด้วยยูเรีย ซึ่งแม้จะทำการไดอะไลซิสกำจัดยูเรีย เพื่อให้โปรตีนเกิดการ refold เกิดเป็นโครงสร้าง 3 มิติ แต่โครงสร้าง 3 มิติแล้วก็ตาม แต่เอนไซม์ส่วนใหญ่อาจยังไม่ refold ในรูปแบบที่มีกิจกรรมได้ ทำให้ยังคงสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ส่วนใหญ่ไป

ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งภายหลังจากที่ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออน-ไฮโดรเลสแล้ว พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนท์โคลน และทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์แล้ว เติมสารละลาย $CoCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ผลิตได้ที่สภาวะดังกล่าวนั้นจากเดิมที่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ เปลี่ยนมาอยู่ในส่วนที่ละลายน้ำได้ และมีส่วนน้อยที่อยู่ในรูปของตะกอน ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์นี้ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ปรากฏว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ผลิตได้ที่สภาวะดังกล่าวนั้นส่วนใหญ่จะเปลี่ยนมาอยู่ในส่วนที่ละลายน้ำได้ และมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

เพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่อยู่ในรูปของตะกอน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์นี้เลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้มีการผลิตโปรตีนอื่นทั่วๆ ไปที่จำเป็นต่อเจริญเติบโตภายในเซลล์น้อย ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โคลนนี้จึงทำการผลิตเฉพาะรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีการเหนี่ยวนำให้ยีนที่สร้างเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสเกิดการแสดงออกด้วย IPTG จากนั้นเมื่อทำการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ พบว่ากิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ถูกแยกบริสุทธิ์นี้เพิ่มสูงขึ้น สาเหตุน่าจะเป็นเพราะเอนไซม์ที่ส่วนใหญ่ละลายน้ำได้นี้ สามารถนำมาผ่านคอลัมน์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำให้เอนไซม์เสียสภาพด้วยยูเรียก่อน นอกจากนี้มีรายงานว่าโคบอลต์คลอไรด์ที่เติมลงไปในขณะที่เหนี่ยวนำรีคอมบิแนนท์โคลนด้วย IPTG ยังช่วยทำให้เอนไซม์มีการสร้างเป็นโครงสร้าง 3 มิติ ที่สมบูรณ์ ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสถียร จึงมีส่วนช่วยทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น (Manavathi *et al*., 2005)

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์แล้ว ไปศึกษาหาคุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใน 50 mM Tris-HCl buffer pH 9.0 นอกจากนี้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์นี้มีความเสถียรเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน 50 mM phosphate buffer pH 6.0 ในขณะที่โคบอลต์ไอออน, ซิงค์ไอออน และแคดเมียมไอออน สามารถเหนี่ยวนำให้เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมของ

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

เอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น แต่ DTT, EDTA และ SDS จะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งสรุปได้ในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปผลของไอออนของโลหะและสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

| Metal ions and chemical reagents | $Co^{2+}$ | $Ni^{2+}$ | $Zn^{2+}$ | $Cd^{2+}$ | $Ca^{2+}$ | $Mg^{2+}$ | $Cu^{2+}$ | $Pb^{2+}$ | $Mn^{2+}$ | DTT | EDTA | SDS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Relativity activity (%) | 131 | 100 | 123 | 226 | 99 | 91 | 100 | 96 | 101 | 87 | 86 | 46 |

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นต่างๆ สรุปได้ในตารางที่ 13 ซึ่งพบว่าพาราออกซอนมีค่า $V_{max}$ และ $k_{cat}$ สูงที่สุด และมีค่า $K_m$ ต่ำที่สุด โดยค่า $V_{max}$ เป็นค่าบ่งบอกถึงอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา แสดงว่าปฏิกิริยาระหว่างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพารา-ไธออนไฮโดรเลสและพาราออกซอนเกิดได้เร็วกว่าซับสเตรทตัวอื่นๆ ส่วนค่า $K_m$ เป็นค่าคงที่ของปฏิกิริยา ซึ่งแสดงถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถจับกับซับสเตรทแล้วเปลี่ยนซับเสตรทให้ กลายเป็นผลิตภัณฑ์ 1 โมลล์ ในขณะที่ $k_{cat}$ เป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณความเข้มข้นของซับสเตรทที่สูงที่สุดที่สามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ ใน 1 หน่วยเวลา (ค่า $k_{cat}$ คำนวณมาจาก $V_{max}$ / [E]) และเมื่อคำนวณหาค่า catalytic efficiency ($k_{cat}$ / $K_m$) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกว่าเอนไซม์มีความจำเพาะกับซับสเตรทตัวใดมากที่สุด พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออน

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ไฮโดรเลสนี้มีความจำเพาะต่อพาราออกซอน > เมทธิลพาราไธออน > พาราไธออน > เฟนิโทรไทออน > คลอร์ไพริฟอส > คูมาฟอส > มาลาไธออน ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้ น่าจะเนื่องมาจากการที่โครงสร้างของพาราออกซอนที่บริเวณตำแหน่งพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond)นั้น หมู่ฟอสเฟต (phosphate) จะจับกับอะตอมของออกซิเจน (O) แทนที่จะเป็นซัลเฟอร์ (S) ดังในสารออร์กาโนฟอสเฟตตัวอื่นๆ ซึ่งออกซิเจนมีค่าอิเลคโทรเนกาติวิตี้ (electronegativity*) สูงกว่าซัลเฟอร์ จึงทำให้ดึงดูดอิเลคตรอนเข้าหาตัวเองได้ดีกว่า ส่งผลให้พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับออกซิเจนแตกได้ง่ายกว่าพันธะระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับซัลเฟอร์ ส่งผลทำให้ปฏิกิริยาระหว่างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสกับพาราออกซอนเกิดได้ดีกว่าสารออร์กาโนฟอสเฟตตัวอื่นๆ ดังนั้นพาราออกซอนจึงเป็นซับสเตรทที่มีความจำเพาะกับรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มากกว่าสารออร์กาโนฟอสเฟตตัวอื่นๆ ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเมทธิลพาราไธออนกับพาราไธออน จะเห็นว่าที่บริเวณตำแหน่งพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ หมู่ฟอสเฟตจับกับซัลเฟอร์เหมือนกัน แต่หมู่แอลคิล (alkyl group) ที่อยู่ในโครงสร้างของเมทธิลพาราไธออนเป็นหมู่เมทธิล (methyl group) ในขณะที่ในโครงสร้างของพาราไธออนเป็นหมู่เอทธิล (ethyl group) แต่โดยที่หมู่เอทธิลนั้นมีโครงสร้างใหญ่กว่าหมู่เมทธิล ทำให้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสเข้ามาจับได้ยากกว่า จึงส่งผลให้ MP มีความจำเพาะกับรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ MPH มากกว่าพาราไธออน

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 13 สรุปผลของการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

| Substrate | $V_{max}$ (mM/min) | $K_m$ (mM) | $k_{cat}$ ($min^{-1}$) | catalytic efficiency ($M^{-1} min^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Methyl parathion | 2.305 | 0.089 | 76.31 | 855.54 |
| Paraoxon | 2.371 | 0.086 | 78.51 | 917.16 |
| Parathion | 2.294 | 0.101 | 75.94 | 752.49 |
| Fenitrothion | 1.496 | 0.085 | 49.54 | 582.91 |
| Coumaphos | 0.212 | 0.077 | 7.02 | 91.04 |
| Chlopyriphos | 0.213 | 0.046 | 7.05 | 153.85 |
| Malathion | 0.041 | 0.030 | 1.36 | 45.82 |

(*electronegativity; En เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการดึงดูดอิเลคตรอนขององอะตอมคู่ที่เกิดพันธะที่จะรวมกันเป็นโมเลกุล โดยธาตุใดมีค่าอิเลคโทรเนกาติวิตีสูง จะมีความสามารถในการดึงดูดหรือรับอิเลคตรอนได้ดี ได้แก่ พวกอโลหะ ส่วนธาตุใดที่มีค่าอิเลคโทรเนกาติวิตีต่ำ จะดึงดูดหรือรับอิเล็กตรอนได้ไม่ดี ได้แก่ พวกโลหะ)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

จากการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมาสร้างไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้มีการนำคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotubes; CNTs) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารกึ่งตัวนำ (semiconductor) มาใช้เพื่อช่วยในการขยายสัญญาณทางไฟฟ้า และยังช่วยลดการเกิดการสะสม

สารผลิตภัณฑ์ที่ผิวหน้าของอิเลคโทรด (surface fouling) อีกด้วย เมื่อทำการตรึงรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสลงบนคาร์บอนนาโนทิวป์โดยเทคนิค layer by layer electrostatic self assembly drop dry technique นั้น พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดจะเพิ่มสูงขึ้น โดยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสที่ปริมาณ 1.788 มิลลิกรัม เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์สูงขึ้นกว่านี้ ค่าความไวในการตรวจวัดจะลดลง สาเหตุเนื่องจากผิวหน้าของอิเลคโทรดมีความหนามากเกินไป ทำให้เกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของอิเลคตรอนไปยังอิเลคโทรด จากการศึกษาหาค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับวัดการเกิดการออกซิเดชั่นของพาราไนโตรฟีนอล พบว่าค่าความศักย์ไฟฟ้า 0.93 โวลต์ เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด โดยค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงกว่า 0.93 โวลต์ จะให้ค่าการตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้าลดลง เนื่องจากที่ความต่างศักย์ที่สูงกว่านี้จะทำให้แก๊สออกซิเจนสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น โดยจะไปรับอิเลคตรอนจากอิเลคโทรดและเกิดการสะสมของแก๊สออกซิเจนที่ผิวหน้าของอิเลคโทรด ดังนั้นพาราโตรฟีนอลจึงไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเพื่อที่จะให้อิเลคตรอนแก่อิเลคโทรดได้

ยไบโอเซนเซอร์นี้สามารถทำการวัดซ้ำได้ โดยเมื่อทำการวัดตัวอย่างซ้ำทั้งหมด 15 ครั้ง ได้ค่า RSD เท่ากับ 9.19 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการเก็บไบโอเซนเซอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียง 3 วัน พบว่าประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งที่ทำการเก็บไบโอเซนเซอร์ในบัฟเฟอร์ สาเหตุเนื่องมาจากในขณะที่ทำการตรึงเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสกับคาร์บอนนาโนทิวป์ แล้วทำการละลาย

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

เอนไซม์ดังกล่าวด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน แทนที่จะละลายด้วยบัฟเฟอร์ ส่งผลทำให้เอนไซม์ไม่เสถียร จึงสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ แม้ว่าจะเก็บเอนไซม์ที่ถูกตรึงแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก็ตาม อย่างไรก็ตาม หากละลายเอนไซม์ที่ตรึงกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยบัฟเฟอร์ก็จะเกิดปัญหาอื่นตามมา เพราะเมื่อละลายเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์แล้วหยดลงบนอิเลคโทรด เมื่อทิ้งไว้ให้แห้งจะเกิดเกลือขึ้นที่ผิวหน้าของอิเลคโทรด ซึ่งส่งผลให้เกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของอิเลคตรอนไปยังอิเลคโทรด ทำให้ค่าความไวในการตรวจวัดของอิเลคโทรดลดลง

เมื่อนำไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นนี้ มาทดลองตรวจวัดยาฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 14 โดยพบว่าเมื่อทำการตรวจวัดพาราออกซอนจะให้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระบบสามารถทำการตรวจวัดได้ต่ำที่สุด และค่าความไวในการตรวจวัดสูงที่สุด เพราะเนื่องจากพาราออกซอนมีความจำเพาะต่อเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสมากที่สุด ดังที่ได้อธิบายแล้วข้างต้น

ตารางที่ 14 สรุปผลของการหาค่าลักษณะเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรด

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

| Property | Methyl parathion | Paraoxon | Parathion |
|---|---|---|---|
| detection limit (nM) | 5.4 | 0.86 | 7.4 |
| sensitivity (nA/uM) | 616 | 1547 | 301 |
| linear range (nM) | 10-90 | 3.3-40 | 20-240 |

ตารางที่ 15 เปรียบผลการหาค่าลักษณะเมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลสอิเลคโทรดกับงานวิจัยก่อนหน้านี้

| OPs Biosensor | Pesticide | LOD | Sensitivity | Linear range | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| OPH/SPE/ nafion | paraoxon<br>methyl parathion | 90 nM<br>70 nM | 1.67 nA/uM<br>2.83 nA/uM | 2-40 uM | Mulchansani, *et al.*, (1999) |
| OPH/CNT/GC/ nafion | paraoxon<br>methyl parathion | 150 nM<br>800 nM | 25 nA/uM<br>6 nA/uM | 2-10 uM<br>2-10 uM | Deo, *et al.*, (2005) |
| OPH/CNT/GC/ glutaraldehyde | paraoxon | 500 nM | 17.29 nA/uM | 0.5-2.5 uM | Laothanachareon, *et al.*, (2008) |
| OPH/MC/CB/ GC/nafion | paraoxon | 120 nM | 198 nA/uM | 0.2-8 uM | Lee, *et al.*, (2009) |
| This Work | methyl parathion<br>paraoxon<br>parathion | 5.4 nM<br>0.86 nM<br>7.4 nM | 616 nA/uM<br>1547 nA/uM<br>301 nA/uM | 10-90 uM<br>3.3-40 uM<br>20-240 uM | |

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

จากตารางที่ 15 เมื่อเปรียบเทียบผลจากการศึกษาคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นนี้ พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระบบสามารถวัดได้ ของยาฆ่าแมลงทั้ง 3 ชนิด จะให้ค่าที่ต่ำกว่า และค่าความไวในการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์นี้จะสูงกว่า

เมื่อนำไบโอเซนเซอร์นี้มาทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างจริงโดยนำน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งน้ำที่บริเวณบางขุนเทียนมาใส่ (spike) ยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน พบว่าได้ค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 86.33 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำน้ำตัวอย่างนี้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครโมโตรกราฟฟี่ พบว่าได้ค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 94.97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้ มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างกันเท่ากับ 6.84 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไบโอเซนเซอร์นี้ สามารถใช้การวิเคราะห์ปริมาณยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ และผลที่ได้ไม่แตกต่างจากวิธีทั่วไปที่ใช้กันอยู่ คือ วิธีแก๊สโครมาโทรกราฟีมากนัก ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นนี้จึงมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**บรรณานุกรม**

กรมควบคุมมลพิษ. กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย. ฝ่ายสารอันตรายจากสาธารณสุข (2541) เอกสารชุดสารเคมีเฉพาะเรื่อง (Monograph) เมทธิลพาราไธออน (Methyl parathion); โรงพิมพ์กรมควบคุมมลพิษ, กรุงเทพมหานคร, 180

กรมวิชาการเกษตร. กองวัตถุมีพิษการเกษตร (2537) รายงานผลการค้นคว้าวิจัยฉบับเต็มประจำปี 2537; กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 35

กรมวิชาการเกษตร. กองวัตถุมีพิษการเกษตร (2538) การประชุมวิชาการกองวัตถุมีพิษการเกษตร ครั้งที่ 1; กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 100-102

เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, บุญศรี จงเสรีจิตต์ และวันเพ็ญ แย้มขุนทอง (2543) การศึกษาขั้นต้นของการวิเคราะห์ในระดับยีนของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 26, กรุงเทพมหานคร

เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และบุญศรี จงเสรีจิตต์ (2544) การศึกษาขั้นต้นของการวิเคราะห์ในระดับยีนของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน; รายงานการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์ที่เสนอต่อสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, นครปฐม, 30-34

พาลาภ สิงหเสนี (2531) พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม; สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 25-65

พรพิมล เจริญส่ง (2533) เมทธิลพาราไธออน; เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ, สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 14

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (2527) ยาฆ่าแมลง; ชมรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร มก. บางเขน, กรุงเทพมหานคร, 55-71

นวลศรี ทยาพัชร (2541) ปัญหาสารพิษทางการเกษตรในประเทศไทย; รายงานวิชาการ, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 13-41

วิรุฬ ศุภลักษณ์นารี (2549) การบ่งชี้ การศึกษาลักษณะและการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออนของเชื้อ *Burkholderia cepacia*; วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (2535) เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องไบโอเซ็นเซอร์ (biosensor); โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ, กรุงเทพมหานคร, 1-20

เสาวลักษณ์ วงเทียนหลาย (2547) การชี้บ่งและการศึกษาคุณลักษณะของยีน methyl parathion hydrolase จากเชื้อ methyl parathion-degrading *Burkholderia cepacia*; วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม

โสภา กลินจันทร์ (2554) ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้; วารสารทางวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 11(4): 62-64

Abou-Donia, M. B. (2003) Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. Arch Environ Health 58, 484-497.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and. Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PST-BLAST: a new generation of protein database search program. Nucleic Acid Research, 17(25): 3389-3402.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1997) Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M., and Denarie, J. (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. Journal of General Microbiology, (113): 229-242.

Chaudhry, G. R., Ali, A. N., and Wheeler, W. B., (1988) Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology, 2(54): 288-293.

Cheng, T. C., Steven, P. H., and Grace, L. C. (1996) Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. Applied and Environmental Microbiology, 5(62): 1636-1641.

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

Cho, C. M. H., Mulchandani, A. and Chen, W. (2002) Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. Applied and Environmental Microbiology. 4(68): 2026-2030.

Choi, J. W., Min, J., Jung, J. W., Rhee, H. W. and Lee W. H. (1998) Fiber-optic biosensor for the detection of organophosphorus compounds using AChE-immobilized viologen LB films. Thin Solid Films, 327-329: 676-680.

Deo, R. P., Wang, J., Block, I., Mulchandani, A., Joshi, K. A., Trojanowicz, M., Scholz, F., Chen, W. and Lin, Y. (2005) Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. Analytica Chimica Acta, 530(2): 185-189.

Du, D., Cai, J., Song, D. and Zhang, A. (2007) Rapid determination of triazophos using acetylcholinesterase biosensor based on sol–gel interface assembling multiwall carbon nanotubes. Journal of Applied Electrochemistry, 37: 893-898.

Daughton, Christian, G. and Dennis P. H. (1977) Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. Applied and Environmental Microbiology, (34): 175-184.

Elashvili, I., Defrank, J. J. and Culotta, V. C. (1998) *phn* E and *glp* T genes enhance utilization of organophosphates in Escherichia *coli* K-12. Applied and Environmental Microbiology, 7 (64): 2601-2608.

Fu, G., Cui, Z., Huang, T. and Li, S. (2004) Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase. Protein Expression Purification, 36(2): 170-176.

Govan, J. R. W. and Vandamme, P. (1998) Agricultural and medical microbiology: a time for bridging Gaps. Microbiology, (144): 2373-2375.

Guoping, F., Zhongli, C., Tingting, H. and Shunpeng, L. (2004) Expression, purification and characterization of novel methyl parathion hydrolase. Protein Expression and Purification. 36: 170-176.

Harper, L. L., McDaniel, C. S., Miller, C. E. and Wild, J. R. (1988) Dissimilar plasmids isolated from Pseudomonas *diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551) contain identical opd genes. Applied and Environmental Microbiology, 54(10): 2586-2589.

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

Hayatsu, M., and Nagata, T. (1993) Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Blastobacter* sp. stain M501. Applied and Environmental Microbiology, 7(59): 2121-2125.

Hayatsu, M., and Nagata, T. (1999) Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthobacter* sp. strain RC100. Applied and Environmental Microbiology, 3(65): 1015-1019.

Hayatsu, M., Hirano, M. and Tokuda, S. (2000) Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100. Applied and Environmental Microbiology, 4 (66): 1737-1740.

Horne, I., Sutherland, T. D., Harcourt, R. L., Russell, R. J. and Oakeshott, J. G. (2002) Identification of an *opd* (Organophosphate Degradation) gene in an *Agrobacterium* Isolate. Applied and Environmental Microbiology, 7(68): 3371-3376.

Kado, C. I., and Liu, S. T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology, 3(145): 1365-1373.

Katsuhiro, N., Tanakak, K. and Miyagawa, M. (2001) Determination of pesticides using negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. Analytical Sciences, 17.

Keprasertsup, C. (1995) Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil bacteria; Master Degree of Science (Environmental Biology), Mahidol University, 45.

Keprasertsup, C., Upatham, S., Sukhapanth, N. and Prempree, P. (2001) Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil bacteria. Science Asia, (27): 261-270.

Konstantinou, I. K., Hela, D. G. and Albanis, T. A. (2006) The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. Environmental Pollution, 141(3): 555-570.

Laothanachareon, T., Champreda, V., Sritongkham, P., Somasundrum, M. and Surareungchai, W. (2008) Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(12): 3049-3055.

Laurie, A. D., and G. L. Jones (1999) The *phn* Genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon. Journal of Bacteriology, 2(181): 531-54.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์วิทยทรัพยากร

Lee, J. H., Park, J. Y., Min, K., Cha, H. J., Choi, S. S. and Yoo, Y. J. (2009) A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents. Biosensors and Bioelectronics 25(7): 1566-1570.

Liu, H., Zhang, J. J., Wang, S. J., Zhang, X. E. and Zhou, N. Y. (2005) Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and p-nitrophenol in Pseudomonas sp. strain WBC-3. Biochemistry Biophysics Research Communication, 334(4): 1107-1114.

Manavathi, B., Pakala, S. B., Gorla, P., Merrick, M. and Siddavattam, D. (2005) Influence of zinc and cobalt on expression and activity of parathion hydrolase from Flavobacterium sp. ATCC27551. Pesticide Biochemistry and Physiology, 83: 37-45.

Mulbry, W. W., Karns, J. S., Kearney, P. C., Nelson, J. O., McDaniel, C. S. and Wild, J. R. (1986) Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. By southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. Applied and Environmental Microbiology, 5(51): 926-930.

Mulbry, W. W. and Karns, J. S. (1989) Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. Applied and Environmental Microbiology, 2(55): 289-293.

Mulbry, W. W., Kearney, P. C., Nelson, J. O. and Karns, J. S. (1987) Physical comparison of parathion hydrolase plasmid from *Pseudomonas diminuta* and *Flavobactrium* sp. Applied and Environmental Microbiology, 2(18): 173-177.

Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J. and Rogers, K. R. (1999) Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorus hydrolase. Analytical Chemistry, 71(11): 2246-2249.

Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I. and Chen, W. (1999) Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode. Biosensors and Bioelectronics, 14(1): 77-85.

Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., Wang, J. and Chen, L. (2001) Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. Biosensors and Bioelectronics, 16(4-5): 225-230.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Munge, B., Liu, G., Collins, G. and Wang, J. (2005) Multiple enzyme layers on carbon nanotubes for electrochemical detection down to 80 DNA copies. Analytical Chemistry, 77(14): 4662-4666.

Munnecke, D. M., and Hsieh, D. P. H. (1974) Microbial decontamination of parathion and *p*-nitrophenol in aqueous media. Applied and Environmental Microbiology, 2(28): 212-2217.

Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, (85): 2444-2448.

Pearson, W. R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA methods in enzymology. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, (183): 63-98.

Pedrosa, V. A., Paliwal, S., Balasubramanian, S., Nepal, D., Davis, V., Wild, J., Ramanculov, E. and Simonian, A. (2010) Enhanced stability of enzyme organophosphate hydrolase interfaced on the carbon nanotubes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. In Press, Corrected Proof.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลิขสิทธิ์

Perry, A., Yamamoto, S. I., Ishaaya, I. and Perry, R. Y. (1998) Insecticides in agriculture and environment retrospects and prospects; Narosa Publishing House, New Dehli, 61.

Reese, M. G. and Eeckman, F. H. Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. Accepted Talk for the Seventh International Genome Sequencing and Analysis Conference, Hyatt Regency, Hilton Head Island, South

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed.; Cold spring harbor laboratory, New York.

SchÖning, M. J., Krause, R., Block, K., Musahmeh, M., Mulchandani, A. and Wang, J. (2003) A dual amperometric/potentiometric FIA-based biosensor for the distinctive detection of organophosphorus pesticides. Sensors and Actuators B: Chemical, 95(1-3): 291-296.

Schulze, H,, Schmid, R. D. and Bachmann, T. T. (2002) Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholineesterase-biosensors and simple sovent extraction. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372: 268-272.

Serdar, C. M., Gibson, D. T. Munnecke, D. M. and Lancaster, J. H. (1982) Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta.* Applied and Environmental Microbiology, 1(44): 246-249.

Serrano, R., LÓpez, F. J. and Hernández, F. (1999) Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A, 855(2): 633-643.

Siddavattam, D., Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S. B. and Merrick, M. (2003) Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (opd) gene cluster found in Flavobacterium sp. Applied and Environmental Microbiology, 69(5): 2533-2539.

Simon, B. P., Campas, M., Andreescu, S. and Marty, J. L. (2006) Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment. Sensors, 6: 1161-1186.

Simonian, A. L., Efremenko, E. N. and Wild, J. R. (2001) Discriminative detection of neurotoxins in multi-component samples. Analytica Chimica Acta, 444(2): 179-186.

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี

Simonian, A. L., Good, T. A., Wang, S. S. and Wild, J. R. (2005) Nanoparticle-based optical biosensors for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides. Analytica Chimica Acta, 534: 69–77.

Schöning, M. J., Krause, R., Block, K., Musahmeh, M., Mulchandani, A. and Wang, J. (2003) A dual amperometric/potentiometric FIA-based biosensor for the distinctive detection of organophosphorus pesticides. Sensors and Actuators B: Chemical, 95(1-3): 291-296.

Spain, J. C. and Gilson. D. T. (1991) Pathway for biodegradation of *p*-Nitrophenol in a *Moraxella* sp. Applied and Environmental Microbiology, 3(57): 812-819.

Tatusova, T. A. and Modden, T. L. (1999) Blast 2 sequences a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiology Letters, 2(174): 247-250.

Tethgatuk, P., Jinsart, W. and Arnold, P. (2001) Determination of organophosphate pesticides in vegetable farm drained water using solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography. Journal Science Research Chulalongkorn University, 26(1): 35-47.

Thomopson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) ClustalW. Nucleic Acids Research, (22): 4673-4680.

Vale, J. A. (1998) Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters, 102-103: 649-652.

Galan-Vidal, C. A., Munoz, J., Dominguez, C. and Alegret, S. (1998) Glucose biosensor strip in a three electrode configuration based on composite and biocomposite materials applied by planar thick film technology. Sensors and Actuators B: Chemical, 52(3): 257-263.

Viveros, L., Paliwal, S., McCrae, D., Wild, J. and Simonian, A. (2006) A fluorescence-based biosensor for the detection of organophosphate pesticides and chemical warfare agents. Sensors and Actuators B: Chemical, 115(1): 150-157.

Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A. and Schöning, M. J. (2003) Flow injection amperometric detection of OP nerve agents based on an organophosphorus-hydrolase biosensor detector. Biosensors and Bioelectronics, 18 (2-3): 255-260.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Waibel, A. H., Hanazawa, T., Hinton, G., Shikano, K. and Lang, K. J. (1989) Phoneme recognition using time-delay neural networks. IEEE Transactions on Acoustic, Speech, and Signal Processing, (37) 328-339.

Zhongli, C., Shunpeng, L. and Guoping, F. (2001) Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene applied and environmental. Microbiology, 10 (67) 4922-4925.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

# ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

**1. อาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth)**

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 10 | กรัม |

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**2. อาหารแข็ง Luria-Bertani (LB agar)**

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium chloride | 10 | กรัม |
| Agar | 14 | กรัม |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ

**3. อาหารเหลว basal mineral medium ที่มี methyl parathion ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (BMM+MP broth)**

| | | |
|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 4.8 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1.2 | กรัม |
| $NH_4NO_3$ | 1.0 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.25 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.04 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7HO_2$ | 0.005 | กรัม |

0.5 mg/ml filter sterile methyl parathion 100 ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น filter sterile methyl parathion ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม filter sterile methyl parathion ผสมให้เข้ากัน

**4. อาหารแข็ง BMM+MP**

| | | |
|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 4.8 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1.2 | กรัม |
| $NH_4NO_3$ | 1.0 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.25 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.04 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7HO_2$ | 0.005 | กรัม |
| Agar | 14 | กรัม |

0.5 mg/ml filter sterile methyl parathion 100 ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น agar และ filter sterile methyl parathion ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นถ่ายสารละลายใสขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่ agar ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งของเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส เติม filter sterile methyl parathion ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**ภาคผนวก ข**

## สารเคมี

**1. Tris-HCl/EDTA pH 8.0 (TE buffer)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris | 40 | มิลลิโมลาร์ |
| EDTA | 2 | มิลลิโมลาร์ |

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วปรับพีเอช 8.0 ด้วยกรด HCL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**2. lysing solution**

| | | |
|---|---|---|
| Tris | 50 | มิลลิโมลาร์ |
| SDS | 3 | เปอร์เซ็นต์ (w/v) |

เตรียม Tris ความเข้มข้น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอช 12.6 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**3. สารละลาย sodiuโมลาร์ dodecyl sulfate (SDS solution)**

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ละลาย SDS ในน้ำที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช 7.2 ด้วยกรด HCl เข้มข้น ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน

**4. glucose/Tris/EDTA pH 8.0 (GTE buffer)**

| | | |
|---|---|---|
| glucose | 50 | มิลลิโมลาร์ |
| Tris | 25 | มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 |
| EDTA | 10 | มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 |

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บสารละลายที่ 4 องศาเซลเซียส

**5. Tris-acetate pH 8.0 (TAE buffer)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris | 0.04 | โมลาร์ |
| EDTA | 0.001 | โมลาร์ |

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอช 8.0 ด้วย glacial acetic acid แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**6. 6X gel-loading buffer**

| | | |
|---|---|---|
| bro โมลาร์ophenol blue | 0.25 | เปอร์เซ็นต์ |
| xylene cyanol FF | 0.25 | เปอร์เซ็นต์ |
| sucrose in water | 40 | เปอร์เซ็นต์ (w/v) |

เก็บสารละลายที่ 4 องศาเซลเซียส

**7. isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG)**

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร โดยละลาย IPTG 1.1915 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* ใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.1-1 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร

**8. Ampicillin**

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง ampicillin 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

* ใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**9. Phosphate buffer saline (PBS buffer) พีเอช 7.4**

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 1.44 กรัม, $KH_2PO_4$ 0.24 กรัม, NaCl 8 กรัม และ KCl 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.4 ด้วย NaOH

**10. สารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)**

เตรียม chloroform ปริมาตร 96 มิลลิลิตร และ isoamyl alcohol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน

**11. สารละลาย phenol : chloroforโมลาร์ : isoamyl alcohol (25 : 24 :1)**

เตรียม phenol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, chloroform 48 มิลลิลิตร และ isoamyl alcohol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน

**12. สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, พีเอช 8.0**

ผสม Tris base 15.76 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 8.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**13. Ethidium bromide**

เตรียม ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง ethidium bromide มา 0.05 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เก็บในขวดสีชา หุ้มด้วยกระดาษ foil และเก็บให้พ้นแสง

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

**14. สารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v) Bis-Acrylamide**

ชั่ง acrylamide 30 กรัม และ bis- acrylamide 0.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**15. สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) Amonium persulfate**

ชั่ง amonium persulfate 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น

**16. Electrophoresis buffer, pH 8.3**

ชั่ง Tris-base 9.0 กรัม, glysine 43.2 กรัม และ SDS 3.0 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 1 N NaCl ให้ได้ประมาณ 8.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เป็น 600 มิลลิลิตร

**17. Stain solution**

ชั่ง Coomassie brilliant blue 0.5 กรัม แล้วเติม methanol 200 มิลลิลิตร, acetic acid 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

**18. Destain solution I**

เตรียมเมทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตร, actic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน

**19. Destain solution II**

เตรียมเมทานอล methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, acetic acid 70 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 880 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน

**20. สารละลายในการทำ refolding protein โดยวิธี dialysis**

| | | |
|---|---|---|
| PBS buffer, พีเอช 7.4 | 0.1 | โมลาร์ |
| DTT | 0.1 | โมลาร์ |
| $ZnSO_4$ | 50 | ไมโครโมลาร์ |
| urea | 8.0 | โมลาร์ |

เตรียมสารละลายยูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ โดยชั่งยูเรียมา 240 กรัม แล้วเติม PBS buffer พีเอช 7.4 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, 0.1 โมลาร์ DTT ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วเติม $ZnSO_4$ 0.01 กรัม (ประมาณ 50 ไมโครโมลาร์) จากนั้นเตรียมสารละลายยูเรียที่ความเข้มข้น 6, 4, 2 และ 0 โมลาร์ โดยชั่งยูเรียมา 180, 120, 60 และ 0 กรัม ตามลำดับ แล้วเติมสารละลายอื่นๆ ตามวิธีข้างต้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร ศูนย์วิทยทรัพยากร

**21. Binding Buffer สำหรับการแยกบริสุทธิ์โปรตีน**

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 140 | มิลลิโมลาร์ |
| KCl | 2.7 | มิลลิโมลาร์ |
| $Na_2HPO_4$ | 10 | มิลลิโมลาร์ |
| $K_2HPO_4$ | 1.8 | มิลลิโมลาร์ |
| DTT เข้มข้น | 1.0 | มิลลิโมลาร์ |

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 1.44 กรัม, $KH_2PO_4$ 0.24 กรัม, NaCl 8 กรัม และ KCl 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 ด้วย NaOH จากนั้นกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน

**22. Elution Buffer สำหรับการแยกบริสุทธิ์โปรตีน**

| | | |
|---|---|---|
| Tris-HCL, pH 8.0 | 50 | มิลลิโมลาร์ |
| reduced glutathione | 10 | มิลลิโมลาร์ |
| DTT | 1.0 | มิลลิโมลาร์ |

Tris-HCL ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร pH 8.0 ที่มี reduced glutathione เข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร และ DTT เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร

**23. Thrombin solution สำหรับการแยกบริสุทธิ์โปรตีน**

ละลายเอนไซม์ทรอมบิน (GE Healthcare, USA) 500 ยูนิต ด้วย PBS buffer pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (1 ยูนิตต่อ 1 ไมโครลิตร) คนเบาๆ แล้วแบ่งเก็บใส่ในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ค

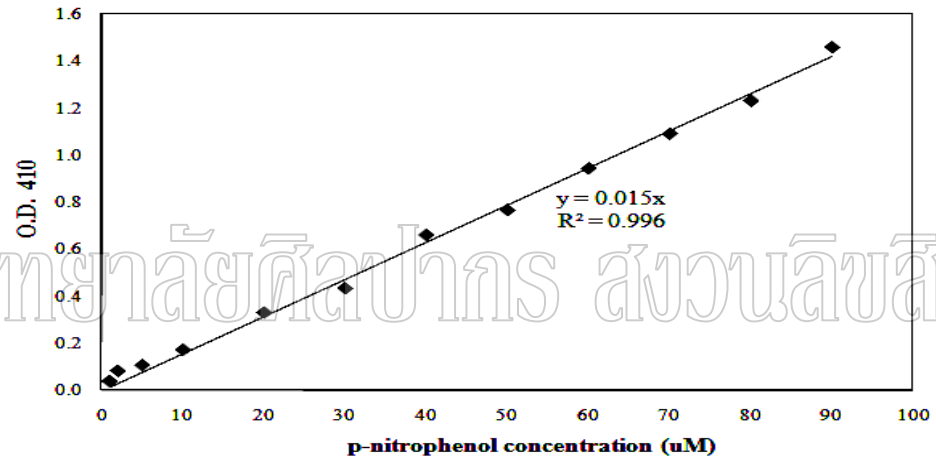
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

## การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

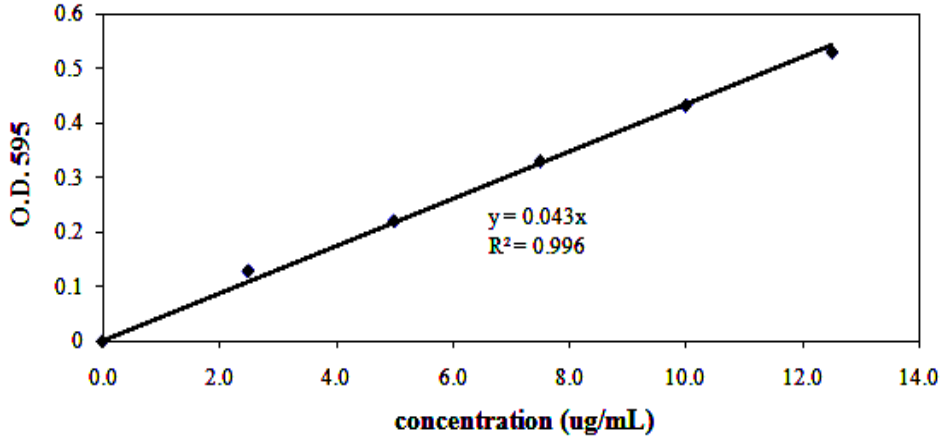
**1. การคำนวณหาค่าต่างๆ ของเอนไซม์ (enzyme assay)**

**1.1 การหาปริมาณของพาราไนโตฟีนอลจากวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี**

เทคนิคนี้จะถูกใช้ในการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โดยจะแปรผันตรงกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น นั่นคือพาราไนโตรฟีนอลซึ่งเกิดจากเมทธิลพาราไธออนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เมทธิลพาราไธออนไฮโดรเลส แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ดังภาพที่ 73




ภาพที่ 73 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล




ภาพที่ 74 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

การคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน (total protein concentration; mg/ml) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$= \left[ \frac{\text{A 595 of sample}}{\text{slope}} \times \frac{\text{1000 (ul)}}{\text{amount of sample}} \right] \times 1000 \times \text{total volume of sample}$$

การคำนวณหาความค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (total activity; umole) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$= \left[ \frac{\text{A 410 of sample}}{\text{slope}} \times \frac{10^{-3} \times 1000 \text{ (ul)}}{\text{amount of sample}} \right] \times \text{total volume of sample}$$

การคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific activity; unit/mg protein) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

$$= \frac{\text{total activity}}{\text{total protein concentration}}$$

การคำนวณหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (purification) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$= \frac{\text{specific activity}}{\text{initial specific activity}}$$

การคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (% recovery) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$= \frac{\text{total activity}}{\text{initial total activity}}$$

# ภาคผนวก ง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

# คำย่อ

| คำย่อ | คำอธิบาย |
|---|---|
| AchE | acetylcholinesterase |
| BMM | basal mineral medium |
| bp | base pair |
| BSA | bovine serum albumin |
| CE | counter electrode |
| CNTs | carbon nanotubes |
| CTAB | cethylbimethyl ammoniumbromide |
| CV | cyclic voltammogram |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | ethylene diamine tetraacetic |
| FPLC | fast protein in liquid chromatography |
| GCE | glassy carbon electrode |
| GSE | gas selection electrode |
| GSH | reduced glutathion |
| GSSG | oxidized glutathion |
| GST | glutathion-S-transferase |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| IPTG | isopropanol thiogalactosidase |
| ISE | ion selection electrode |
| kb | kilobase |
| LB | Luria Bertani |
| LC | lethal concentration |
| LD | lethal dose |
| MP | methyl parathion |
| *mpd* gene | methyl parathion-degrading gene |

มหาวิทยาลัยศิลปากร ลิขสิทธิ์

| **คำย่อ** | **คำอธิบาย** |
|---|---|
| MPH | methyl parathion hydrolyzing enzyme |
| MFO | mixed-function oxidase |
| MWCNTs | multiwall carbon nanotubes |
| *opa* gene | organophosphorus acid anhydrolase gene |
| *opd* gene | organophosphate-degrading gene |
| OPH | organophosphate hydrolyzing enzyme |
| PAA | poly (allylamine hydrochloride) |
| PAH | polycyclic aromatic hydrocarbon |
| PCR | polymerase chain reaction |
| pI | isoelectric point |
| PNP | para-nitrophenol |
| ppb | part per billion |
| ppm | part per million |
| RE | reference electrode |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| WE | working electrode |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| ชื่อ-สกุล | นายอนิรุทธ เอกคุณธรรม |
| | Mr. Anirut Ekkhuntham |
| วัน เดือน ปีเกิด | 17 มิถุนายน 2527 |
| ที่อยู่ | 59/182 หมู่ที่ 10 ซ. 13 ถ. พระราม 2 แขวงบางมด เขตจอมทอง |
| | จ. กรุงเทพมหานคร 10150 |

ประวัติการศึกษา

| | |
|---|---|
| พ.ศ.2546 | สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนรัตนโกสินทร์สมโภชบางขุนเทียน แขวงแสมดำ เขตบางขุนเทียน จ.กรุงเทพมหานคร |
| พ.ศ. 2546 | วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม |
| พ.ศ. 2550 | ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์

| | |
|---|---|
| ระดับปริญญาตรี | การโคลนนิ่งและการศึกษาคุณสมบัติของยีนที่สร้างฮอร์โมน GnRH ในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* |
| ระดับปริญญาตรี | การพัฒนาไบโอเซ็นเซอร์ เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์เมทธิล-พาราไธออนไฮโดรเลสจากโคลน mpd ลูกผสม |

การนำเสนอผลงานวิชาการ

Poster presentation

| | |
|---|---|
| พ.ศ. 2550 | Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from cloned mpd gene (33rd Congress of Science and Technology of Thailand (STT) ครั้งที่ 33) |
| พ.ศ. 2551 | Optimization of expression conditions for recombinant methyl parathion hydrolase production in *Escherichia coli* (34th Congress of Science and Technology of Thailand (STT) ครั้งที่ 33) |

พ.ศ. 2552 Characterization of recombinant methyl parathion hydrolase capable of degrading methyl parathion insecticide (The 21st Annual Meeting and International Conferrence of Thai Society for Biotechnology (TSB) ครั้งที่ 21)

Oral presentation

พ.ศ. 2553 Development of biosensor for pesticide detection using methyl parathion hydrolase from recombinant MPD clone (Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2010))

พ.ศ. 2553 Development of biosensor for pesticide detection using methyl parathion hydrolase from recombinant MPD clone (การประชุมวิชาการโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 4)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์