รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการพัฒนาการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยแนวใหม่ในวัตถุดิบและอาหารแปรรูป

DNA molecule for novel development in quality and safety analysis of raw materials and processed foods

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์[1]

นันทวัน หัตถมาศ[2]

ปาลิตา แปวไชสง[1]

มัลลิกา แก้วดี[1]

[1] ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2] ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2552 ภายใต้โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่และปีนปีที่ 3 ของโครงการ

โครงการขอขอบคุณ Prof. Dr. Eiichi Tamiya, Osaka Univerity, Japan ที่ได้ให้คำปรึกษาด้านเทคนิคในการตรวจสอบด้วยไบโอเซ็นเซอร์ ขอขอบคุณบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด บริษัทโพรเทคเตอร์ นิวตริชั่น ประเทศไทยจำกัด และกองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง ที่ได้ให้ความร่วมมือในการดำเนินการและให้ตัวอย่าง

เลขหมู่
เลขทะเบียน 015068
วัน, เดือน, ปี 11 เม.ย. 54

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาระบบห้องปฏิบัติการสมบูรณ์ที่เป็นนวัตกรรมที่เรียกว่า micro total analysis system (μ-TAS) หรือ Lab-on-a-chip เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์และรับรองคุณภาพของอาหารด้วยดีเอ็นเอ ตัวชิปประกอบไปด้วยส่วนทำปฏิกิริยาสำหรับการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ ส่วนช่องสารเคมีขนาดเล็ก สำหรับให้สารเคมีและตัวอย่างเข้าและออกจากระบบ ปริมาตรของส่วนทำปฏิกิริยา มีขนาด 7 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอจะถูกตรึงไว้ในส่วนต้นของส่วนทำปฏิกิริยาด้วยสนามแม่เหล็ก การสกัดดีเอ็นเอจากอาหารอย่างรวดเร็วทำโดยการใช้สารละลายความเข้มข้นของเกลือ chaotopic สูง ควบคู่กับ silicon oxide resin ให้จับอยู่ในส่วนปฏิกิริยา ขณะเดียวกันดีเอ็นเอที่สกัดได้จะเพิ่มปริมาณในทันทีหลังเสร็จขั้นตอนการสกัดและชะออกโดยการเพิ่มปริมาณด้วยระบบการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิระนาบเดี่ยว โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 6 บริเวณของยีนเป้าหมาย การตรวจสอบผลทำโดยการตรวจสัญญาณเรืองแสงด้วยตาเปล่า กระบวนการทั้งหมดเสร็จสิ้นได้ใน 60 นาที การทดสอบบนชิปโดยใช้ระบบการตรวจการปนของปลาปักเป้าที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า วิธีมีความไวโดยมี Limit of detection อยู่ที่ 100 ก๊อปปี้ของดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาไม่พบการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างดีเอ็นเออื่น ตัวชิปที่รายงานในครั้งนี้เป็นโมเดลที่ช่วยให้การตรวจดีเอ็นเอทำได้ในภาคสนาม เนื่องจากไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

Abstract

Novel complete laboratory system namely micro total analysis system (μ-TAS) or lab-on-a-chip for analysis without depending on laboratory facilities were developed for food safety and quality assurance based on DNA detection. The chip was composed of a reaction zone for DNA extraction and amplification and microchannels for the inlet and the outlet of the reagents and sample. The volume of the reaction zone was about 7 μl. Trapping of DNA was by magnetic field set at the fore part of the reaction zone. Rapid DNA extraction from food matrix was performed based on chaotropic effect of silicon oxide resin trapped at chip's reaction zone, where DNA was simultaneously amplified using isothermal reaction with highly specific primers to six domains of each target gene simultaneously upon elution. Resulting fluorescence signals of the DNA was detected visually. All processes were completed within 60 min. The testing on this chip using pufferfish detection limit at 100 copies of DNA/reaction. No cross-reactivity was observed from the samples of other unrelated species. The chip reported here provided a rapid yet simple test model for major DNA analysis suitable for field monitoring due to the ease of operation without requirement of laboratory equipments.

สารบัญเรื่อง(Table of Contents)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
1. บทนำ	1
2. เนื้อเรื่อง (Main Body)	16
2.1 วัสดุทดลองและวิธีการ (Materials and Methods)	16
2.1.1วัสดุทดลอง	16
2.1.2วิธีการดำเนินการทดลอง	16
1. การออกแบบโครงร่างระบบและวางแผนการสร้าง μ -TAS สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและเลือกวัสดุที่เป็นไปได้	16
2. ดำเนินการสร้างและทดสอบระบบMicro fluidic	16
3. ขึ้นรูปแบบและทดสอบ	17
4. ประเมินผลการสร้างระบบสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์	17
5. การดำเนินการระบบเชื่อมโยงเพื่อส่งดีเอ็นเอสู่ระบบเพิ่มปริมาณ	17
6. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมปฏิกิริยาในระบบ	17
7. สร้างรูปแบบและทดสอบระบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	17
8. การสร้างรูปแบบจำลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการคัดเลือกระบบการตรวจสอบ	18
9. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมและตรวจวัดเพื่อศึกษา และประเมินระบบที่ได้พัฒนาขึ้น	18
10. จัดทำระบบการตรวจวัดทางฟิสิกส์ในรูปแบบ μ-TAS เพื่อการแสดงผล	18
11. วางระบบขึ้นรูปและผสานการเชื่อมต่อ	18
12. ทดสอบประเมินผลระบบในห้องปฏิบัติการ	19
13. การประเมินการใช้งานจริงในภาคสนาม ร่วมกับภาพอุตสาหกรรม	19
2.2 ผลการวิจัย	19
2.2.1. การออกแบบโครงร่าง และวางแผนการสร้างชิป μ-TAS สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและเลือกวัสดุที่เป็นไปได้	19
2.2.2.ดำเนินการสร้างและทดสอบระบบ micro fluidic โดยใช้วัสดุสังเคราะห์ PDMS	20
2.2.3. ขึ้นรูปแบบและทดสอบ	21
2.2.4. ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ	22
2.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด	23

หัวเรื่อง **เลขหน้า**

2.2.4.2 การสกัดกรดนิวคลิอิคภายในตัวชิป 23

2.2.5. ประเมินผลการสร้างระบบสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ 25

2.2.6. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมปฏิกิริยาในระบบ 27

2.2.7. ขึ้นรูปแบบและทดสอบระบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 28

2.2.8. การสร้างรูปแบบจำลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการคัดเลือกระบบการตรวจสอบ 31

2.2.9.จัดทำอุปกรณ์ควบคุมการตรวจวัดเพื่อศึกษาและประเมินระบบที่ได้พัฒนาขึ้น 37

2.2.10. จัดทำระบบการตรวจวัดทางฟิสิกส์ในรูปแบบ μ-TAS เพื่อการแสดงผล 39

2.2.11. วางระบบขึ้นรูปและผสานการเชื่อมต่อ 39

2.2.12. ทดสอบประเมินผลระบบในห้องปฏิบัติการ 41

2.2.13. การประเมินการใช้งานจริงในภาคสนาม ร่วมกับภาพอุตสาหกรรม 43

3. อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง 44

4. เอกสารอ้างอิง 46

5. ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด 55

สารบัญตาราง (List of Tables)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบโมเดลการตรวจวัดบนพื้นฐานการรวมรูปแบบการตรวจที่ต่างกัน	37

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างชิปและรายละเอียดของโครงสร้าง	20
ภาพที่ 2 การขึ้นรูปแบบบน silicon wafer เริ่มจากการสปินโค๊ท2a(ซ้าย)และภายหลังการถ่ายแบบลงบน silicon wafer ด้วยหลักการ photolithography แล้วพัฒนาต่อทำให้ได้แม่แบบชิป2b (ขวา)	21
ภาพที่ 3 ชิปสำเร็จรูปที่ออกแบบพัฒนาขึ้น ประกอบด้วยช่องรับสารละลาย บริเวณปฏิกิริยา และช่องถ่ายสารละลายออกจากระบบ	21
ภาพที่ 4 โครงสร้างของชิปสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นและระบบการทำงานที่ประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยผ่านสารละลายต่างๆ เข้าสู่บริเวณปฏิกิริยาผ่านช่องรับหมายเลข 1-4 บริเวณปฏิกิริยา (บริเวณทบตัว) และช่องถ่ายสารละลายออกจากระบบ (ภาพบน) และแสดงการจับดีเอ็นเอบนเรซิ่นในบริเวณปฏิกิริยา โครงสร้างดังกล่าวช่วยให้สามารถสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณได้ทั้งอิสระและต่อเนื่อง	26
ภาพที่ 5 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจาก matrix ตัวอย่างโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์จำเพาะต่อ lectin ยีนโดยเทคนิค PCR เลน M 100 นิวคลีโอไทด์มาร์คเกอร์ เลน 1-16 ได้แก่ ดีเอ็นเอควบคุมบวกและ ดีเอ็นเอจาก matrix ถั่วเหลืองใน matrix ข้าว 100% 50% 20% 10% 5% 2% 1% 0.5% 0.1% 0.05% 0.01% 0.005% 0.001% 0.0005% และชุดควบคุมลบ (non template control)ตามลำดับ	27
ภาพที่ 6 โครงสร้างของอุปกรณ์ควบคุมสารละลายในรูป micromanipulator อย่างง่าย	28
ภาพที่ 7 การตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เลน 1-11 ดีเอ็นเอจากปลาต่างชนิด ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ	30
ภาพที่ 8 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เลน 1-11 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุดจาก 100,000,000 ถึง 1 ชุดตามลำดับ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ	30
ภาพที่ 9 การตรวจสอบการปนของวัตถุดิบจากปลาปักเป้าในเนื้ออาหารชนิดต่างๆ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ ตัวอย่างควบคุมเป็นดีเอ็นเอผสมจากปลาทั้ง 3 ชนิด	31
ภาพที่ 10. ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัดกับค่าสูงสุดของกระแส	34

หัวเรื่อง **เลขหน้า**

ภาพที่ 11 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป็นผลคูณของดีเอ็นเอ ขนาด180 นิวคลิโอไทด์ของยีน lectin เลน M มาร์ค์เกอร์ขนาด 100 nt เลน 1-11 จากซ้าย ดีเอ็นเอควบคุมบวกและดีเอ็นเอจาก matrix ถั่วเหลือง50% 20% 10% 5% 2% 1% 0.5% 0.1% 0.05% 0.01% และชุดควบคุมลบ (non template control) ตามลำดับ ตัวอย่างดีเอ็นเอไวรัสขนาดเท่ากับผลคูณของดีเอ็นเอ ขนาด180 นิวคลิโอไทด์ตามลำดับ 35

ภาพที่ 12 การตรวจสอบปฏิกิริยาโดยดูจากการเรืองแสงบนชิปบนแหล่งกำเนิดแสง UV ความยาวคลื่น 312 nm และภาพถ่ายมุมใกล้ภายมนบริเวณปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่างไม่เรืองแสง (-) ด้านบนขวา และเรืองแสง (+) ด้านล่างขวา 36

ภาพที่ 13 การตรวจปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 200 µl ด้วยหลอด UV แบบ LED 38

ภาพที่ 14 รูปแบบโครงสร้างการเชื่อมต่อของชุดห้องปฏิบัติการสมบูรณ์อย่างง่ายแบบย่อส่วน 2 ชิป 40

ภาพที่ 15 การทดสอบเบื้องต้นกับ matrix ปลาปักเป้า (เลน1) และเนื้อปลาผสมที่มีปลาปักเป้า อยู่ 5 % (เลน2) และเนื้อปลาผสมที่ไม่มีปลาปักเป้า (เลน3) ขณะที่เลน 4 เป็น ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ 41

ภาพที่ 16 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนชิป รายละเอียดแต่ละเลนเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุดจาก 1,000,000 ถึง 5 ชุดตามลำดับ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ และ M แสดงมาร์เกอร์ดีเอ็นเอขนาด 100 nt 42

ภาพที่ 17. รูปแบบการใช้งานต่อเนื่องบนชิปเริ่มจากการผ่านตัวอย่างดีเอ็นเอและจับไว้บนชิป การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนชิปที่วางอยู่บน block อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส 43

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviation)

μA	micro ampare
μM	micro Mole
μL	micro Litre
mM	milli Mole
ng	nano gram
Bp	base pair
PCR	Polymerase Chain Reaction
LAMP	loop mediated isothermal amplification
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
CRM	Certified Reference Material

บทนำ (Introduction)

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่นอกจากจะช่วยให้ชีวิตอยู่รอดแล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับสุขภาพและพลานามัยที่ดี ในอดีตการได้รับอาหารอย่างพอเพียง และครบหมวดหมู่จัดได้ว่าบรรลุตามสุขบัญญัติที่กำหนดขึ้นแล้ว แต่ในปัจจุบันการพัฒนามาตรฐานในการดำรงชีวิตทำให้ผู้บริโภคเริ่มหันมาให้ความสำคัญและพิถีพิถันในเรื่องคุณภาพและความปลอดภัยมากขึ้น เสถียรภาพ และความมั่นคงในอาหารจึงไม่จำกัดขอบเขตเพียงชนิดและปริมาณเพียงอย่างเดียว แต่จะรวมถึงคุณภาพมาตรฐานที่สูงขึ้น และมีความปลอดภัยเป็นเลิศเป็นสำคัญ(WHO, 2003)

การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพความปลอดภัยในอาหารนั้นจำเป็นต้องตรวจหาหลักฐานเชื่อมโยงกับคุณภาพและอันตรายที่เกี่ยวข้องให้ได้ คุณภาพอาจวัดได้ด้วยการประเมินทางกายภาพ ทางเคมี ขณะที่อันตรายอาจอยู่ในรูปสิ่งมีชีวิตจำพวก เชื้อโรค ในรูปสารเคมีหรืออันตรายทางกายภาพที่พบในอาหาร ซึ่งมีผลต่อสุขภาพ ที่ผ่านมาการทดสอบทางกายภาพและเคมีโดยรวมมีข้อจำกัด จึงพัฒนาสู่การทดสอบเชิงโมเลกุลมากขึ้น โดยเฉพาะโปรตีนและดีเอ็นเอในอาหาร (Lockley and Bardsley, 2000)

อาหารแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ วัตถุดิบอาหาร และอาหารแปรรูป สำหรับวัตถุดิบอาหารในกลุ่มแรกโครงสร้างของเซลล์มีความสมบูรณ์ จะสามารถตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี ในรูปโปรตีน และดีเอ็นเอได้ง่าย ขณะที่ในอาหารแปรรูป องค์ประกอบเหล่านั้นจะเปลี่ยนไปตามความซับซ้อน รูปแบบในการแปรรูปและสารเคมีที่อยู่ในระบบแปรรูปนั้น ความซับซ้อนในรูปแบบทั้งหมดทำให้โมเลกุลโปรตีนอาจเสื่อมสลายไปก่อน การตรวจวิเคราะห์จึงทำได้ยากขึ้น และเมื่อองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เปลี่ยนไป โมเลกุลที่จะตรวจสอบได้ก็จะมีน้อยลง เทคนิคการตรวจสอบไปที่โมเลกุลดีเอ็นเอนี้ สามารถดำเนินการได้แม้ในภาวะที่ตัวอย่างผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนมาก่อน ใช้ได้กับอาหารที่มีวัตถุดิบผสมกันหลายชนิด และใช้ได้กับอาหารสัตว์ที่มีส่วนของวัตถุดิบที่มีเนื้อเยื่อและกระดูก ซึ่งเป็นตัวอย่างที่การสกัดดีเอ็นเอทำได้ยาก (Chaumpluk, 2003)

การวิเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอในฐานะเป็นตัวกลางที่เชื่อมโยงไปถึงคุณภาพ และอันตรายในอาหารได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน(Lockley and Bardsley, 2000) ความนิยมนี้ช่วยให้การประยุกต์การตรวจโมเลกุลดีเอ็นเอขยายครอบคลุมไปถึงการจำแนกสายพันธุ์ การตรวจภาวะปัจเจกและความแท้ของพันธุ์ การวิเคราะห์โรค การตรวจสอบการติดเชื้อ การตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ การตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ และตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมเพื่อช่วยการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้เพราะโมเลกุลดีเอ็นเอมีเสถียรภาพสูงย่อยสลายในภาวะรุนแรงได้ช้ากว่าโมเลกุลชนิดอื่น(Bauer, 2003) การตรวจสอบไปที่โมเลกุลดีเอ็นเอนี้จึงสามารถเชื่อมโยงตรง และเป็นดัชนีชี้บอกภาวะทางคุณภาพและอันตรายในอาหารได้

การตรวจสอบนิยมใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป็นหัวใจหลัก โดยหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเป็นอันที่ได้รับความสนใจมากที่สุด ตัวเทคนิคกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบถัดๆ ไป จากการใช้ความร้อนในการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่คลายตัวออก พร้อมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

โมเลกุลใหม่ จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่น้อยในตอนเริ่มต้นให้มากขึ้นได้ (Saiki *et al.*, 1988) ปัจจุบันระบบดังกล่าวประยุกต์ได้เป็น 2 รูปแบบได้แก่ การใช้อุปกรณ์ขนาดเล็ก วิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า และการใช้เทคนิคการเรืองแสงของโมเลกุลเคมีเป็นสื่อเชื่อมโยงไปสู่การระบุปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นซึ่งทำให้สามารถคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจริงในแต่ละหน่วยเวลา (real-time) ได้

เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อหลายชนิด ตรวจการปนของพืชดัดแปรพันธุกรรม ตรวจหาโอกาสปะปนด้วยโมเลกุลที่กระตุ้นการเกิดภูมิแพ้ ตรวจหาชนิดของเนื้อสัตว์ และความแท้ของสายพันธุ์ ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าใช้งานได้เป็นอย่างดี(Lockley and Bardsley, 2000) อย่างไรก็ดีการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์อาหารในประเทศไทยมีอยู่น้อยมาก เทคนิคที่ใช้ในต่างประเทศต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและใช้บุคลากรที่มีความรู้ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปขยายผล นอกจากนี้ขาดการพัฒนาให้อยู่ในรูปชุดสำเร็จที่ใช้งานได้ง่าย การพัฒนาต่อยอดจึงมีความจำเป็น (Chaumpluk, 2003)

นวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันส่งผลให้วิธีการตรวจมีความหลากหลายมากขึ้นตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequence-based amplification) (Compton, 1991) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเอง (self-sustained replication) (Guatelli *et al.*, 1990) การเพิ่มปริมาณโดยการใช้ปฏิกิริยาแทนที่สายดีเอ็นเอ (strand displacement amplification) และการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิระนาบเดียว(Walker *et al.*, 1992) โดยการชักนำในระบบห่วง (Loop mediated isothermal amplification) (Notomi, 2000) นอกเหนือจากนี้ยังพบว่ามีผู้คิดค้นวิธีการเพิ่มปริมาณสัญญาณที่เป็นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ได้แก่ branched DNA amplification (bDNA) invader และ rolling circle amplification (Lyamichev *et al.*, 1999 และ Lizardi *et al.*, 1998) ซึ่งเทคนิคในกลุ่มหลังจัดเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณเป้าหมาย

จากการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียทางเทคนิคพบว่า นอกจากเทคนิค PCR แล้ว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำในระบบห่วง (LAMP) มีข้อเด่นกว่าเทคนิคอื่นโดยเฉพาะการใช้อุณหภูมิระนาบเดียว(Notomi, 2000) โดยที่ไม่มีกระบวนการทางความร้อนต่างระดับอุณหภูมิ มาคลายสายดีเอ็นเอจากเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายเดียวมาเกี่ยวข้อง จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ปฏิกิริยา LAMP อาศัยเอนไซม์ DNA polymersase ที่มีกิจกรรมแทนที่สายดีเอ็นเอในตัว โดยการผลักสายดีเอ็นเอเดิมให้หลุดออกและแทนที่ด้วยการสังเคราะห์สายใหม่ การใช้ไพรเมอร์ 2-3 คู่ ทำให้ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาสูงมาก มากกว่าเทคนิค PCR ที่เคยทำได้ถึง1000 เท่าในเวลาที่น้อยกว่า นำให้เทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากแหล่งที่มีดีเอ็นเอหลากชนิดปนกัน เช่นที่พบในอาหาร การที่อุณหภูมิเป็นระนาบเดียวที่ 65^{0}C (BcaBest™ DNA polymerase) จึงทำให้การตรวจสอบไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุม

อุณหภูมิอัตโนมัติที่ใช้สำหรับPCRซึ่งมีราคาแพง จึงเหมาะอย่างยิ่งในการออกแบบระบบตรวจสอบให้สามารถดำเนินการได้ แม้ในสถานที่ที่ขาดความพร้อมของเครื่องมือ

ที่ผ่านมากมีผู้นำเทคนิคดังกล่าวไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และรา(Horisaka *et al.*, 2004 และ Parida, 2004) โดยหลักการถ้าเพียงทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ก็จะสามารถออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ 2-3 คู่ ที่มีอุณหภูมิจับตัว (annealing temperture) ใกล้เคียงกันเป็นหลัก ในปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบดีเอ็นเอในถั่วเหลือง ข้าวโพด มะละกอ และมะเขือเทศดัดแปรพันธุ์ ข้าวสายพันธุ์ประเทศไทย ชนิดของเนื้อสัตว์ ความแท้ของสายพันธุ์ กล้วยไม้และไม้ผลบางชนิด จึงมีความพร้อมในข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว(Chaumpluk, 2003)

เนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่ใหม่มาก และอยู่ในช่วงเริ่มต้นของการประยุกต์ และปัจจุบันยังไม่มีผู้นำเทคนิคมาใช้ทดสอบอาหาร การบุกเบิกนำเทคนิคมาต่อยอดเพื่อการตรวจวิเคราะห์อาหารนอกจากจะช่วยให้ตรวจสอบระดับคุณภาพและความปลอดภัยในอาหารทำได้แม้ในภาวะความไม่พร้อมทางเครื่องมือซึ่งเหมาะกับประเทศแล้ว ยังช่วยสร้างโอกาสในการในการเป็นผู้นำนวัตกรรมนี้ในการตรวจวิเคราะห์อาหารได้

สำหรับการตรวจสอบและติดตามโมเลกุลนั้น ในปัจจุบันการพัฒนาโมเลกุลเรืองแสงในรูปสีเพื่อให้จับกับโมเลกุลเป้าหมาย พัฒนาไปถึงขั้นที่สามารถตรวจสอบเป้าหมายต่างกันได้พร้อมๆ กัน โดยการใช้การเรืองแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน เทคนิคที่พัฒนาขึ้นใช้หลักการทั้งการส่งสัญญาณผ่านการจับตัวกันของสีและโมเลกุลดีเอ็นเอ เช่น SYBR Green ™ (Lipsky *et al.*, 2001) หรือการถ่ายทอดพลังงานจากตัวโมเลกุลของสีส่งถ่ายไปยังโมเลกุลอื่นขณะจับตัวกับชิ้นดีเอ็นเอ(FRET) โดยตัวจับที่มีผลต่อ probe สามารถออกแบบให้อยู่ในรูปโครงสร้าง 2 มิติต่างกัน เพื่ออาศัยกลไกการเปลี่ยนโครงสร้าง หรือปฏิกิริยา exonuclease ของเอ็นไซม์ ช่วยให้โมเลกุลของสีที่เคยจับอยู่กับดีเอ็นเอแสดงปฏิกิริยาด้วยหลักการเรืองแสง(Clegg, 1992) การประยุกต์โมเลกุลสีเหล่านี้เข้าสู่ระบบตรวจวิเคราะห์จะช่วยให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและอาจทำให้การตรวจสอบทำได้ง่ายขึ้นอีกด้วย

นอกจากการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรูปแบบของปริมาณดีเอ็นเอในแผ่น agarose gel และการเรืองแสงของโมเลกุลสีเมื่อตรวจจับด้วยหลักการของ optical chemistry แล้ว หลักการจับตัวและหรือส่งสัญญาณจากตัวตรวจจับไปยังโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโมเลกุลดีเอ็นเอในอาหารเพื่อบ่งบอกสภาพและความปลอดภัยในอาหารนั้นๆ ได้ ในโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายใดๆ ตรวจสอบความสามารถในการส่งผ่านไฟฟ้าของโมเลกุล ทำได้โดยอาศัยหลักการ hybridization ของดีเอ็นเอแบบจำเพาะกับโมเลกุล binder (electronic biointerface) (Mascini, 2001)ปฏิกิริยาทางเคมีจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายแบบจำเพาะ(Saiki *et. al.*, 1988 และ Notomi *et al.* 2000) ภายใต้การจับตัว โมเลกุลดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมีผลให้การไหลของกระแสไฟฟ้าให้ลดลงแปรผันตามจำนวนโมเลกุลของดีเอ็นเอตามหลักการ redox current การตรวจวัดจึงทำได้โดยตรงจากการวัดการไหลเวียนของกระแสไฟฟ้า เป็นผลให้สามารถนำมาคำนวณปริมาณโมเลกุลได้ ช่วยให้การตรวจเป็นไปในลักษณะเชิง

ปริมาณได้(Mascini, 2001) ปัจจุบันสามารถนำหลักการดังกล่าวไปใช้ร่วมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคทั้ง PCR และ LAMP และได้มีการพัฒนาในรูปการค้าเพื่อการตรวจทางการแพทย์แล้ว (Maeda *et al.*, 2005) ข้อดีของการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical detection) จะช่วยตรวจหาดีเอ็นเอแม้ในระดับปริมาณน้อยมากได้

ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในอาหาร โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายที่พบในอาหารในรูปดีเอ็นเอจากการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอที่เป็นรีคอมบิแนนซ์ หรือดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบชนิดพันธุ์สามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย การตรวจจับการไหลเวียนของกระแสไฟฟ้าภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะช่วยให้สามารถบ่งบอกภาวะคุณภาพและความปลอดภัยของตัวอย่างอาหารได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

สำหรับประเทศไทย ในการตั้งดัชนีสำคัญกำหนดยุทธศาสตร์ให้ไทยเป็นครัวของโลกนั้น การดำเนินการเพื่อกระตุ้นคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารถือว่าเป็นกิจกรรมสำคัญ เนื่องจากในกรอบเวทีที่การแข่งขันในตลาดการค้าเสรีที่จะมาถึงภายใน 5-10 ปีข้างหน้า เกณฑ์คุณภาพและความปลอดภัยของอาหารมาตรฐานในระดับสากล จะใช้เป็นเครื่องมือหลักในการประกันคุณภาพ และความปลอดภัย และเป็นสิ่งซึ่งที่เชื่อมโยงตรงกับภาพลักษณ์ของสินค้าที่ประเทศไทยส่งออก

จากการวิเคราะห์ปัญหาที่ผ่านมาพบว่า ประเทศมีจุดอ่อนในการดำเนินการเรื่องคุณภาพ การปนเปื้อนด้วยสารเคมี เชื้อโรค และปนพันธุ์ ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากวัตถุดิบและกระบวนการต่างๆ ในขั้นตอนการผลิต การแก้ปัญหาทำได้โดยเอาใจใส่ในการตรวจสอบ พัฒนาวิธีที่จะช่วยให้การวิเคราะห์มีต้นทุนถูกลงง่ายขึ้นรวดเร็วและที่สำคัญเหมาะสมต่อประเทศมีความสำคัญอย่างยิ่ง โครงการนี้ใช้จุดแข็งของความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุลที่มีอยู่แล้วมาบูรณาการร่วมกับนวัตกรรมทางเทคโนโลยีในการตรวจเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างง่ายในรูปชุดสำเร็จ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง การนำ electro chemical detection technology และการสังเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาใช้เป็นชุดควบคุมบวกสำหรับการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เพื่อช่วยแก้ปัญหาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารตามความจำเป็นเร่งด่วน ตามการเปลี่ยนแปลงไปของกฎระเบียบ เทคโนโลยีการตรวจสอบและการเปิดเสรีทางการค้า เน้นความสำคัญตามความสำคัญของสินค้าส่งออก(product champion)

จากกฎระเบียบที่กำหนดขึ้นในหลายประเทศ และความต้องการของผู้บริโภคในตลาดโลกพบว่าประเด็นการปนพันธุ์ข้าวและประเด็นการปนด้วยวัตถุดิบดัดแปรพันธุกรรมมีผลต่อการกำหนดคุณภาพสินค้าเป็นประเด็นเร่งด่วนเนื่องจากหากไม่ดำเนินการจะส่งผลส่งผลต่อการส่งออกได้ ประเทศไทยส่งข้าวออกคิดเป็นมูลค่า 67135 ล้านบาท ในปี 2547 โดยมีข้าวหอมมะลิ ข้าวกล้องหอมมะลิ และปลายข้าวหอมมะลิ คิดเป็นมูลค่ารวมถึง 23000 ล้านบาท ปัญหาที่พบในปัจจุบันได้แก่ การปนพันธุ์ระหว่างข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบทางเคมีและทางกายภาพอย่างมีประสิทธิภาพได้ การ

ตรวจสอบโดยตรงไปที่สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอจึงเป็นวิธีการเดียวการไม่เร่งดำเนินการจะก่อให้เกิดปัญหาสะสมซึ่งทำให้ประเทศสูญเสียในระดับหลายหมื่นล้านบาทได้

โดยปกติข้าวหนึ่งเมล็ดประกอบด้วยส่วนที่เป็นต้นอ่อนและส่วนที่เก็บอาหารซึ่งมีดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบย่อยอยู่ภายในและแม้จะผ่านการสี องค์ประกอบเหล่านี้ยังคงอยู่ ขณะที่คาร์โบไฮเดรตซึ่งมีบางส่วนละลายน้ำ แม้จะเป็นองค์ประกอบหลักที่มีจำนวนมาก แต่สามารถหลีกและสกัดเฉพาะดีเอ็นเอออกมาได้

การจำแนกพันธุ์ข้าวนั้นเริ่มจากการใช้มาร์คเกอร์ยีนบนพื้นฐานของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เป็นทางเลือกสำคัญในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต วิธีการวิเคราะห์ได้จากการนำความรู้ของชิ้นดีเอ็นเอต่าง ๆ มาใช้ จึงเป็นการวิเคราะห์ไปที่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยตรง ที่สำคัญได้แก่ การทำ Random Amplified Polymorphic DNA การวิเคราะห์ ไมโครแซทเทลไลท์ และการวิเคราะห์ Amplified Fragment Length Polymorphism

การศึกษาเบื้องต้นพบว่าข้าวแต่ละพันธุ์แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมในรูปโพลีมอร์ฟิซึมมาก Sang *et al.*, (2001) อาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเฉพาะในยีนที่เป็นที่ทราบอยู่บ้างแล้ว เช่น *Adh* เป็นมาร์คเกอร์ทดสอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงบริเวณของยีน พร้อมกับการวิเคราะห์ Restriction Profile ทำให้บอกความแตกต่างทางจีโนมในข้าวแต่ละตัวอย่างได้

Blair *et al.*, (2002) ใช้หลักการเดียวกันเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์พร้อมตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ในรูป Polymorphism Information Content (PIC) เมื่อนำเอา PIC มาเปรียบเทียบรวมกันเป็น panel จะสามารถบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ข้าวได้

ความสำเร็จจากการศึกษาจีโนมดีเอ็นเอในข้าว ทำให้โอกาสในการพัฒนามาร์คเกอร์ทำได้มากขึ้นและในบางครั้งก็เปิดโอกาสให้สามารถตรวจสอบเฉพาะเจาะจงลงไปที่ตัวยีนที่สนใจได้

Yamanaka *et al.* (2004) ใช้เทคนิค SNP ในการตรวจสอบไปที่ยีน Waxy โดยอาศัยมาร์คเกอร์ที่เป็น derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) เพื่อหาตำแหน่งที่เกิดมิวเทชั่นโดยไม่ต้องดำเนินการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และพบว่าสามารถแยกพันธุ์ข้าวที่มีความแตกต่างที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาในระยะหลังยังพบความแตกต่างในรูป microRNA (miRNA) ในข้าวอีกด้วย ความแตกต่างของ mRNA เหล่านี้ก่อให้เกิดวิวัฒนาการในจีโนมของข้าวแต่ละสายพันธุ์ (Wang *et al*, 2004) แม้ในปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดนำข้อแตกต่างเหล่านี้มาใช้ แต่มีความเป็นไปได้ที่การนำดีเอ็นเอที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ mRNA นั้นมาใช้เป็นประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ข้าวได้

นอกจากความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอในนิวเคลียส สายพันธุ์ของพืชชั้นสูงมีความแตกต่างของดีเอ็นเอในระดับออร์แกเนลอื่นอีกด้วย Chen *et al.*, (1993) และ Kanno *et al.*, (1993) พบการกระจายตัวของ deletion ในคลอโรพลาสดีเอ็นเอ ซึ่งต่อมามีผู้นำข้อมูลนี้มาใช้ในการศึกษาความแตกต่างในสายพันธุ์ (Ishii and McCouch, 2000)

ทำนองเดียวกันมีผู้ศึกษาความแตกต่างของยีนในพลาสมิด เนื่องจากในข้าวสายพันธุ์ในกลุ่มอินเดียจะพบกลไกที่เรียกว่า indica specific deletion ในพลาสติด ความแตกต่างนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์การปนและความแท้ของสายพันธุ์ (Ishikawa *et al.*, 2002) ทางเลือกในการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบแยกแยะอย่างง่ายสามารถทำได้โดยง่าย

นอกจากการตรวจสอบการตรงพันธุ์ การปะปนของสายพันธุ์พบว่าการประกันคุณภาพสามารถเสริมให้มีความสมบูรณ์ผ่านการมุ่งเน้นการตรวจสอบความเป็นอินทรีย์โดยการตรวจรับรองภาวะปลอดจีเอ็นโอหรือการรับรองภาวะปลอดGMOsโดยตรง เพื่อเสริมความเชื่อมั่นให้กับตัวสินค้าและภาพลักษณ์เชิงบวก การตรวจสอบ GMOs สามารถทำได้โดยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอแปลกปลอมที่ได้จากกระบวนการดัดแปรพันธุกรรม โดยเจาะจงไปที่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง ในกรณีของข้าวมีรายงานดีเอ็นเอเกี่ยวข้องเป็น 35Sโปรโมเตอร์ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ hygromycin และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสะสมธาตุเหล็ก

สำหรับในวัตถุดิบพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น พบว่าตัวที่เป็นปัญหาและมีผลต่อการส่งออกได้แก่ ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม เนื่องจากเป็นต้นตอของวัตถุดิบอาหารแปรรูปอีกไม่น้อยกว่า 5000 ชนิด ที่ผ่านมาการปฏิเสธสินค้าที่ปนด้วยอาหารดัดแปรพันธุกรรมในบะหมี่สำเร็จรูป ในน้ำมันที่ผสมในทูน่ากระป๋องและในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปหลายชนิด ทำให้ไทยสูญเสียเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 2000 ล้านบาท ในถั่วเหลือง ปัญหาที่พบได้แก่การปนของสายพันธุ์ GTS 40-3-2 ซึ่งโครงสร้างดีเอ็นเอประกอบด้วย 35S โปรโมเตอร์ อินตรอนของ CP4 และยีน epsps ขณะที่ในข้าวโพด ปัญหาหลักได้แก่การปนของหลายสายพันธุ์ เช่น Bt11 E176 MON 810 T25 GA21 ซึ่งมีโครงสร้างของโปรโมเตอร์เป็น 35S โปรโมเตอร์ PEPC และ CDPK โปรโมเตอร์ 35S โปรโมเตอร์ 35S โปรโมเตอร์ และ actin โปรโมเตอร์ ตามลำดับ และมีตัวยีนทั้งในรูป *Cry IA* (b) หรือ *epsps* หรือ *pat* การตรวจจึงมุ่งไปที่ element เหล่านี้ แม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ GMOs จะได้รับการพัฒนาให้รุดหน้าไปมาก(Miraglia *et al.*, 2004) และสามารถใช้อ้างอิงได้ อย่างไรก็ดีจะพบว่ารายงานส่วนใหญ่แสดงวิธีที่มีความยุ่งยากและเป็นการพัฒนาเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะต้องใช้น้ำยาในรูปของเหลวที่ต้องเก็บในอุณหภูมิต่ำ ไม่สะดวกหรือยังขาดการต่อยอดเพื่อใช้ในการนำไปตรวจในภาคสนามชุดสำเร็จรูปที่วางจำหน่ายอยู่จึงมีข้อจำกัดอย่างมาก นอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์ต้องอาศัย certified reference materials(CRMs) ซึ่งมีราคาแพง มีมูลค่าการนำเข้าทั้งในส่วนน้ำยาและสารอ้างอิงไม่น้อยกว่าปีละ 60 ล้านบาท ดังนั้นพัฒนาวิธีการตรวจสอบในรูปชุดสำเร็จอย่างง่ายบนพื้นฐานของวิธีที่มีรายงานโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงาน หลายวิธีการเป็นวิธีที่ดำเนินการเป็นมาตรฐานในระดับสากล เช่น EU Codex ซึ่งเป็นที่ยอมรับการใช้อ้างอิงวิธีเหล่านั้นมาปรับเปลี่ยนหรือสร้างขึ้นให้มีความแตกต่าง พร้อมเสริมด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบด้วย CRMs เป็นโมเลกุลดีเอ็นเอที่ใช้เป็นชุดควบคุมบวกและเทคนิคในการตรวจและการเพิ่มปริมาณที่อาศัยหลักการเคมีไฟฟ้าและระนาบอุณหภูมิเดี่ยวจะช่วยให้การดำเนินการตรวจวิเคราะห์ของ

ประเทศเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพรวดเร็วแม่นยำ และที่สำคัญประหยัดต้นทุนและช่วยให้สามารถดำเนินการได้แม้ในภาคสนาม

ที่ผ่านมายังไม่มีหน่วยงานใดในประเทศที่ดำเนินการพัฒนาโดยหลักการ electrochemistry นี้มาใช้การตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธีการอย่างง่ายนี้ นอกจากจะช่วยให้การตรวจสอบวัตถุดิบนำเข้าเป็นไปได้แล้ว ยังลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายที่ควรจะเสียไปสู่ต่างประเทศได้อีกทางหนึ่งอีกด้วย

นอกจากนี้ในปัจจุบันทิศทางที่สำคัญของการพัฒนาในเรื่องการตรวจวิเคราะห์ในอนาคตอันใกล้นี้คือ การที่เราสามารถตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นนอกห้องปฏิบัติการ ที่เรียกว่า Point of Care Diagnostics ด้วยเครื่องมือที่รวดเร็ว พกพาง่าย และมีขนาดเล็ก ดังนั้นแนวโน้มการวิจัยและพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีขนาดย่อส่วนจึงเป็นที่สนใจของนักวิจัยทั่วโลก เทคโนโลยีหนึ่งที่ได้รับความสนใจและสามารถนำมาใช้ในการสร้างเครื่องมือดังกล่าวโดยการย่อส่วนห้องปฏิบัติการหรือห้องแล็บให้มาอยู่บนแผ่นชิปขนาดเล็กเท่ากับบัตรเครดิต ก็คือเทคโนโลยีระบบเครื่องกลไฟฟ้าจุลภาค หรือ MICRO-ELECTRO-MECHANICAL-SYSTEMS (MEMS) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีในการสร้างโครงสร้างที่มีขนาดระหว่าง 100 นาโนเมตร ไปถึง 1000 ไมโครเมตร โดยที่นำ เทคนิคในการสร้างวงจรรวมทางอิเล็กทรอนิกส์ (Integrated Circuit หรือเรียกย่อว่า IC) มาใช้ เทคโนโลยีดังกล่าวใช้ในการสร้างอุปกรณ์ที่ประกอบด้วยท่อมีขนาดระดับไมโครเมตรที่สามารถเก็บของเหลวปริมาตรน้อยมากในระดับไมโครลิตรหรือนาโนลิตร ($=10^{-9}$ ลิตร) เรียกว่า ระบบของไหลจุลภาค (ระดับไมโครลิตร เรียกว่าไมโครฟลูอิดิก หรือ Microfluidics ถ้าระดับนาโนลิตร เรียกว่า นาโนฟลูอิดิก หรือ Nanofluidics) ท่อดังกล่าวมีขนาดตั้งแต่มิลลิเมตรจนกระทั่งถึงไมโครเมตร ระบบไมโครฟลูอิดิกจึงเป็นการย่อส่วนของระบบไหลตามท่อโดยมีเทคนิคในการจัดการกับของเหลวปริมาณน้อยมากเป็นกุญแจที่สำคัญ ระบบของไหลจุลภาคไม่เป็นเพียงแค่ย่อส่วนอุปกรณ์ต่างๆ ให้เล็กลงเท่านั้นแต่ต้องการการออกแบบที่แตกต่างจากระบบขนาดใหญ่ เพราะเมื่อปริมาตรของไหลมีขนาดน้อยในระดับไมโครลิตรมันมีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไป เราเรียกว่า ผลจากการย่อส่วน (Scaling Effect) ในโลกของไมโครฟลูอิดิกของเหลวจะไหลในลักษณะเป็นชั้น(Laminar Flow) ไม่ผสมกัน แรงตึงผิว (Surface Tension) ของของเหลวจะมีผลเป็นอย่างมาก ดังนั้นปรากฏการณ์ที่ไม่มีในระบบปกติจึงแสดงให้เห็น ในบางครั้งจึงมีการกำหนดความหมายของระบบไมโครฟลูอิดิกให้กว้างครอบคลุมถึงปรากฏการณ์ดังกล่าวไม่เป็นเพียงแต่ระบบย่อส่วนเท่านั้น

หลักการทางฟิสิกส์ของระบบของไหลจุลภาคนั้นมีเหมือนกับระบบของไหลปกติเพียงแต่ปรากฏการณ์ที่มีผลนั้นแตกต่างกันเนื่องจากการย่อส่วน (Scalling Effect) ที่ชัดเจนได้แก่ การกระจายความร้อน (Thermal Diffusion) ในระบบของไหลจุลภาคเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วกว่า ลักษณะการไหลก็จะเป็นแบบชั้นไม่ผสมกัน (Laminar Flow) แรงตึงผิว (Surface Tension Force) มีผลมากจนเกิดปรากฏการณ์การไหลด้วยแรงตึงผิวไปตามท่อ (Capillary Phenomena) และการเกิดชั้นคู่ของประจุที่ผิวผนัง (Electric DoubleLayer หรือ EDL) เป็นต้น ข้อแตกต่างของระบบของไหลจุลภาคนี้เองทำให้เราสามารถสร้างอุปกรณ์ที่ไม่เคยมีมาก่อนในท่อระดับไมโครเมตรนั้น ของเหลวจะไหลแบบเป็นชั้นเนื่องจากค่า Reynolds Number

ซึ่งเท่ากับอัตราส่วนระหว่างแรงเฉื่อย(Inertial Force) กับแรงหนืด (Viscous Force) ของของไหลนั้นต่ำ กว่า 1500-2000 ทำ ให้ลักษณะการไหลไม่เกิดการกวน(Turbulance) การเกิดชั้นคู่ของประจุ (EDL) นั้นทำให้การไหลของของเหลวในท่อเป็นแบบ Electrokinetic เนื่องจากพื้นผิวของแข็ง มักจะเกิดประจุเมื่อมีการสัมผัสกับสารอิเล็กโตรไลท์ (Electrolyte) เช่น น้ำ เป็นต้น ประจุที่เกิดขึ้นที่ผิวมีผลกับสนามไฟฟ้าที่คอยดึงประจุขั้วตรงข้ามกับมันและผลักประจุที่มีขั้วเดียวกับมัน ดังนั้นประจุที่อยู่ใกล้กับผิวจึงเกิดเป็นชั้นที่มีขั้วตรงกันข้ามกัน จึงเรียกว่าชั้นประจุคู่ การย่อส่วนไม่เพียงแต่ลดขนาดของท่อเท่านั้นแต่ยังมีอุปสรรคที่ท้าทายรอการแก้ ได้แก่ ปัญหาความไม่บริสุทธิ์ของสาร(Impurities) และ ปัญหาเกี่ยวกับฟองอากาศ (Gas Bubble) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเรานำระบบของไหลจุลภาคไปใช้เป็นเครื่องมือภาคสนาม ต้องมีการนำของเหลวต่างๆ เข้าและออกจากระบบ การออกแบบระบบเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็น ระบบจึงจำเป็นต้องมีเทคนิคการกรอง (Filtration) เพื่อแก้ปัญหา เพราะแม้แต่อนุภาคขนาดปกติและฟองอากาศเพียงฟองเดียวอาจทำให้ระบบทั้งระบบไม่ทำงานตามต้องการปัญหาที่ท้าทายอีกอย่างหนึ่งคือการลดปริมาตรของสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลดีในแง่ของการลดสารเคมีในการทำปฏิกิริยา(Reagent) แต่หมายถึงการลดลงของสัญญาณการตรวจจับอีกด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการย้อมสี (Labeling) ที่ดี การตรวจวัด(Detection) ที่มีประสิทธิภาพ หรือมีเทคนิคการเตรียมความเข้มข้นของสาร (Pre-concentration) อย่างไรก็ตามในบางกรณีความเข้มข้นของโมเลกุลเป้าหมายในสารตัวอย่างไม่เพียงพอเมื่อปริมาตรลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีเทคนิคการแยก (Separation) เพื่อที่จะสามารถใช้สารตัวอย่างทั้งหมดการระเหยเป็นไอ (Liquid Evaporation) จะเกิดขึ้นได้ง่ายเมื่อปริมาตรของของเหลวลดลง เนื่องจากอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเพิ่มขึ้นอย่างมหาศาล ดังนั้นจึงต้องมีการผนึกท่อและหลุมรับสารให้ดี แต่บางครั้งก็สามารถใช้ประโยชน์ในขั้นตอนการเตรียมความเข้มข้นของสารปัญหาที่สำคัญอีกเรื่องหนึ่งคือการประกอบ (Assembly) การบรรจุ (Packaging) และการรวมกัน (Integration) ซึ่งมีผลต่อความเชื่อถือได้ (Reliability) ของระบบ การเชื่อมต่อ (Interconnection) ของไหลเข้าและออกจากระบบต้องสามารถทนต่อแรงดันที่สูงได้ ไม่มีการรั่วและทนทานต่อสภาพแวดล้อม การใช้งานภาคสนามบางกรณีต้องมีการผนึกเพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้า (Air-tight) หรือมีการจัดวางส่วนของการตรวจวัดด้วยแสงให้มีความเที่ยงตรงสูง

ระบบของไหลจุลภาคสามารถสร้างขึ้นด้วยเทคนิคเดียวกันกับการสร้างวงจรรวมไอซี ดังนั้นซิลิกอน (Silicon) จึงเป็นวัสดุแรกๆที่มีการนำมาใช้ แต่ต้องมีการศึกษาเรื่องปฏิสัมพันธ์ของพื้นผิว (Surface Interaction) เป็นสำคัญ อย่างไรก็ดีในปัจจุบัน วัสดุประเภทแก้วและโพลิเมอร์ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางแทนที่ซิลิกอนเนื่องจากราคาที่ถูกกว่า แนวโน้มการใช้โพลิเมอร์มาทดแทนแก้วซึ่งมีคุณสมบัติทางแสงที่ดีกว่าก็กำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากราคาที่ถูกกว่า ผลิตได้ง่ายกว่า มีสภาพพื้นผิวที่เหมาะกับการเคลือบโปรตีนได้ง่ายกว่าและทนทานไม่แตกหักง่าย โพลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ PMMA (polymethylmethacrylate) หรือที่เรียกว่า Plexiglas หรือPerspex และ Acrylic, PC (polycarbonate), PSU (polysulfone), PP (polypropylene) และ PDMS (polydimethylsiloxane) ปกติแล้ว PMMA PC และ PSU เป็นวัสดุที่ใช้ในขบวนการสร้างแบบ โครงสร้างที่มีความหนามากเป็นพิเศษ (LIGA Process) PDMS เป็นElastomer ชนิด

หนึ่งที่เหมาะสำหรับการสร้างแบบหล่อขึ้นรูปถึงแม้ว่าจะมีปัญหาเกี่ยวกับการหดตัวของมัน วัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในระบบของไหลจุลภาคได้แก่ โลหะ เช่น ทองคำ เงิน แพลททินัม ฯลฯ นำมาใช้ในการสร้างขั้วไฟฟ้าหรือเป็นองค์ประกอบของส่วนตรวจวัด วัสดุประเภท active material สามารถนำมาใช้สร้างแอกทิวเอเตอร์ต่างๆ เช่น ไมโครปั๊ม หรือไมโครวาล์วก็สามารถสร้างขึ้นด้วยวัสดุประเภทเพียโซอิเล็กทริก (Piezoelectric) ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบยืดหดเมื่อให้กระแสไฟฟ้าแก่มัน วัสดุอีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในการสร้างโครงสร้างที่เคลื่อนที่ได้ เช่น Diaphragm ของไมโครปั๊มหรือมโครวาล์ว เรียกว่า Shape Memory Alloy หรือ SMA ซึ่งเป็นวัสดุที่สามารถจดจำรูปร่างเดิมของมัน เมื่อให้ความร้อนโครงสร้างผลึกจะเปลี่ยนแปลงไป เกิดการเปลี่ยนรูปร่างไป แต่เมื่ออุณหภูมิลดลงมันจะกลับมาสู่สภาพรูปร่างแบบเดิมอีกครั้ง

ขบวนการสร้างส่วนต่างๆในระบบของไหลจุลภาคนั้นอาศัยเทคนิคในการสร้างวงจรอิเล็กทรอนิกส์ซึ่งใช้ซิลิกอนเป็นหลักเรียกว่า Silicon Microfabrication โดยมีขั้นตอนการสร้างลวดลายด้วยการฉายแสง (Photolithography) เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ทำให้เกิดลวดลายตามที่เราออกแบบเอาไว้ และที่นิยมมากในปัจจุบันคือขบวนการสร้างด้วยวัสดุประเภทโพลิเมอร์ ที่ต้องอาศัยการหล่อแบบขึ้นรูป (Molding) ทำให้ได้ต้นแบบที่มีราคาถูกกว่าและง่ายกว่าในการสร้างขบวนการสร้างอีกแบบหนึ่งที่ใช้สร้างโครงสร้างที่มีความหนาหรือมีความสูงมากเรียกว่า LIGA ที่มาจากภาษาเยอรมันที่แปลว่าlithography, electroplating และ moulding อาศัยการใช้แสงที่มีกำลังสูง เช่น X-Ray มาสร้างต้นแบบที่มีลวดลายและมีผนังของโครงสร้างที่เรียบและตั้งฉากกับแผ่นฐานรอง หลักจากนั้นจึงนำแม่แบบนี้ไปหล่อขึ้นรูปด้วยการเคลือบด้วยไฟฟ้า แล้วจึงถอดแบบนำไปใช้เป็นแม่แบบในการหล่อขึ้นรูปต่อไป การสร้างร่องที่มีผนังที่เรียบและตั้งฉากนั้นสามารถสร้างขึ้นด้วยขบวนการอีกแบบหนึ่งเรียกว่า การกัดแบบลึก (Deep Reactive Ion Etching หรือ DRIE) อาศัยการกัดด้วยการปะทะชนของประจุและการทำปฏิกิริยาทางเคมีบริเวณผิว นอกจากนี้ยังมีขบวนการสร้างเชิงปริมาณ (Mass Production) โดยใช้การฉีดขึ้นรูปแบบละเอียด (Microinjection Moulding) ซึ่งอาศัยการฉีดพลาสติกที่หลอมเหลวเข้าไปในแม่แบบประ๓3585 กบด้วยแรงดันสูง หลักจากนั้นจึงทำให้เย็นลงและแข็งตัว จึงถอดออกจากแบบและประกบยึดเป็นชิปที่สมบูรณ์ และเทคนิคขบวนการที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบันคือ ขบวนการ Soft Lithography เป็นขบวนการหล่อขึ้นรูปด้วย PDMS โพลิเมอร์บนแม่แบบ (Master) ที่ทำจากซิลิกอนเวเฟอร์ หรือการกำหนดลวดลายด้วยการพิมพ์ (Stamping)ด้วยแม่แบบที่ทำจาก PDMS โพลิเมอร์ ขบวนการ soft lithography มีหลายเทคนิค เช่น การหล่อขึ้นรูปแบบเท การหล่อขึ้นรูปแบบใช้แรงดึงดูดตามท่อ (Capillary Micromoulding) การถ่ายลวดลายแบบพิมพ์สัมผัส (Micrcontact Printing) เป็นต้น

ในระบบของไหลจุลภาคนั้น ขบวนการประกอบและบรรจุภัณฑ์ซึ่งเป็นขั้นตอนหลักจากการสร้างนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งเพราะของไหล เช่น สารตัวอย่าง หรือสารเคมีต้องผ่านเข้าและออกจากชิปคล้ายกับการเชื่อมต่อสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์เข้าและออกจากไมโครอิเล็กทรอนิกส์ชิป แต่เป็นของไหลมิใช่อิเล็กตรอน จึงทำให้มีความยุ่งยากและซับซ้อนมากในการเชื่อมต่อชิปกับโลกภายนอก ปัจจุบันมีการใช้พอร์ต (Ports) ที่ออกแบบมาเป็นพิเศษให้สามารถนำของไหลเข้าและออกจากท่อหรือหลุมบนชิปสู่ท่อสาย

ยางได้โดยง่าย แต่ยังมีราคาแพงและไม่แพร่หลาย ดังนั้นปัญหาเหล่านี้ยังคงเป็นปัญหาที่นักวิจัยกำลังมองหาคำตอบที่ดีที่สุด

การออกแบบและจำลองการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ (Design and Simulation)ได้ถูกนำมาใช้มากขึ้น ปัจจุบันซอฟต์แวร์ด้านการจำลองการทำงาน (Simulation Software) มีมากมายหลายยี่ห้อ แต่มีจำนวนน้อยที่ออกแบบให้สามารถจำลองการไหลในระดับจุลภาคได้ จึงมีการเพิ่มความสามารถเฉพาะด้านนี้ให้แก่ซอฟต์แวร์ที่ใช้จำลองการไหล (Computational Fluid Dynamics หรือ CFD) การจำลองการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ช่วยทำให้เราเข้าใจพฤติกรรมการไหลในท่อขนาดเล็ก และช่วยให้เราตรวจสอบการทำงานของชิปได้ก่อนที่เราจะสร้างจริง ทำให้ลดการสูญเสียเวลาและค่าใช้จ่าย

ในระบบของไหลจุลภาคหนึ่งๆ อาจจะประกอบด้วยท่อ หัวฉีด ปั๊ม ช่อง ตัวผสม ส่วนกรอง วาล์ว เซ็นเซอร์ ฯลฯ การสร้างชิปของระบบของไหลจุลภาคหนึ่งๆ ต้องอาศัยความรู้อย่างลึกซึ้งในเรื่องผลของการย่อส่วน วิทยาศาสตร์เกี่ยวกับพื้นผิว คุณสมบัติของวัสดุเป็นต้น เพื่อให้ระบบสามารถทำงานได้ตามต้องการและถูกต้องส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดในระบบของไหลจุลภาคได้แก่เครือข่ายของท่อขนาดเล็กซึ่งทำหน้าที่เชื่อมโยงส่วนต่างๆ ในระบบ u3611 ปกติจะเป็นท่อปิดที่มีขนาดตั้งแต่ไมโครเมตรจนกระทั่งขนาดนาโนเมตร ขึ้นอยู่กับการใช้งาน เช่น ในระบบที่มีการปั๊มแบบสนามไฟฟ้า (Electrokinetic Pumping) จะต้องการท่อที่มีความแคบมากกว่าฟิลเตอร์หรือตัวกรอง (Filter) เป็นส่วนสำคัญในช่วงต้นของระบบที่มีการนำของไหลเข้าสู่ระบบ มีหลายเทคนิคที่นำมาใช้ เช่น การสร้างรูพรุน (Sieve) หรือการสร้างช่องด้วยเสา (poles) เพื่อป้องกันไม่ให้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่ารูหรือช่องว่างระหว่างเสาไหลผ่านไปได้ หรือการเปลี่ยนพฤติกรรมการไหลจากแบบชั้น (Laminar Flow) ไปเป็นแบบกวนวน (Turbulent flow) ต้องอาศัยตัวขวาง (Obstructor) การไหลเพื่อให้เกิดการกวนผสมระหว่างการไหลไมโครวาล์ว (Microvalve) เป็นอุปกรณ์ที่ช่วยควบคุมการไหลในท่อด้วยการปิดเปิดประตูกั้น แบ่งออกเป็นสองชนิดได้แก่ ชนิดPassive และชนิด Active ไมโครวาล์วชนิด Passive นั้นอาศัยความดันที่แตกต่างระหว่างด้านทั้งสองของวาล์วเพื่อควบคุมการเปิดปิด ไม่ต้องมีแอกทิวเอเตอร์มาขับเคลื่อน แต่ไมโครวาล์วแบบ Active นั้นอาศัยอุปกรณ์ขับเคลื่อนเพื่อควบคุมการทำงาน มีอยู่หลายชนิดได้แก่ pneumatic, thermopneumatic, thermomechanical, piezoelectric, electrostatic, electromagnetic, electrochemical, capillary force เป็นต้น ของเหลวในระบบสามารถไหลในท่อไปตามส่วนต่างๆ ได้อาศัยปั๊มขนาดเล็กที่เรียกว่า ไมโครปั๊ม (Micropump) ซึ่งมีทั้งแบบชนิด Mechanical และ Non-mechanical ไมโครปั๊มแบบ Mechanical อาศัยการสร้างแรงดันจากการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของ chamber ในปั๊มเป็นการถ่ายทอดพลังงานทางกลไปสู่ของไหลโดยตรง ไมโครปั๊มแบบกลมีอยู่หลายชนิด ตัวอย่างเช่น peristaltic, reciprocating, rotary pumps เป็นต้น ไมโครปั๊มแบบ Non-mechanical นั้นสามารถเคลื่อนของไหลไปตามท่อโดยไม่ได้อาศัยพลังงานทางกล ไม่มีส่วนใดๆ เคลื่อนไหว แต่อาศัยพลังงานอื่นๆ เช่น แรงตึงผิว การขยายตัวจากพลังงานความร้อน แรงจากสนามไฟฟ้า หรือสนามแม่เหล็ก เป็นต้น

การสร้างหยด (Droplet) ของเหลวขนาดเล็กที่มีปริมาตรในระดับนาโนลิตรหรือพิโคลิตรเป็นส่วนหนึ่งของระบบที่จำเป็นกับการใช้งานบางอย่างต้องอาศัยหัวฉีด (Nozzle) ที่ควบคุมด้วยไฟฟ้าโดยสามารถใช้หลักการเดียวกันกับการสร้างหยดหมึกในเครื่องพิมพ์แบบอิงค์เจ็ต

ไมโครมิกเซอร์ (Micromixer) เป็นอุปกรณ์ที่ช่วยผสมสารเคมีเข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา โดยปกติแล้วการผสมในระดับจุลภาคนั้นอาศัยการแพร่ของสาร (Diffusion) เพราะการไหลในระดับจุลภาคเป็นแบบชั้น เวลาที่ใช้ในการผสมหรือเวลาในการแพร่ของสารก็จะขึ้นอยู่กับระยะที่สารสองชนิดมาสัมผัสกัน ดังนั้นเพื่อให้เกิดการผสมที่รวดเร็ว จึงต้องออกแบบให้มีพื้นที่สัมผัสของสารของชนิดให้มากที่สุด ไมโครมิกเซอร์ก็เช่นเดียวกัน แบ่งออกเป็นสองชนิด ได้แก่ แบบ Active และ Passive ไมโครมิกเซอร์แบบ Active นั้น อาศัยการกวนด้วยการปั๊มหรือใบพัดขนาดจิ๋ว ในขณะที่ไมโครมิกเซอร์แบบ Passive นั้นไม่มีส่วนใดๆ ที่เคลื่อนที่ อาศัยการแพร่ของสารโดยตรงMicroreactor เป็นอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญของระบบที่เป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาทางเคมี มีลักษณะเป็นหลุมหรือช่องขนาดเล็กที่สารมากกว่าหนึ่งชนิดมาผสมกัน การที่มีขนาดเล็กช่วยทำให้การนำความร้อนเกิดได้เร็วขึ้น การกระจายความร้อนสม่ำเสมอ อัตราส่วนระหว่างพื้นผิวและปริมาตรสูงขึ้น จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็วมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดสารเคมีและค่าใช้จ่าย และสามารถสร้างเป็นระบบแบบขนานได้

ไมโครเซ็นเซอร์ (Microsensor) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการตรวจวัด (Detection) ในระบบ เช่น เซ็นเซอร์สำหรับวัดความเข้มข้นของสารละลาย (Concentration Sensor) เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดทางชีวภาพ (Biosensor) เซ็นเซอร์วัดอัตราการไหล(Flow Sensor) เซ็นเซอร์วัดความเป็นกรดหรือด่าง (pH Sensor) เซ็นเซอร์ทางเคมี (Chemical Sensor) เป็นต้น ไมโครเซ็นเซอร์ก็มีมากมายหลายชนิด เช่น เซ็นเซอร์แบบเซมิคอนดักเตอร์ เซ็นเซอร์แบบฟิล์มบาง เซ็นเซอร์แบบความต้านทาน เป็นต้น

ส่วนการแยก (Separation) เป็นขั้นตอนสุดท้ายในระบบที่จะบ่งบอกว่าสารนั้นเป็นสารชนิดใด อาศัยเทคนิคต่างๆ มากมายเช่น gas chromatography, liquid chromatography, capillary electrophoresis, mass spectrometry, flow injection analysis เป็นต้น

ข้อดีของระบบของไหลจุลภาคมีอยู่หลายประการ ได้แก่

1) ขนาดที่เล็กลงของระบบช่วยทำให้เราสามารถพกพาไปติดตั้งหรือทำการทดลองได้ง่าย

2) ราคาถูกเมื่อผลิตจำนวนมากเพราะอาศัยการผลิตแบบ Batch Fabrication คล้ายการสร้างไมโครอิเล็กทรอนิกส์ชิป

3) ใช้พลังงานน้อยเนื่องจากการย่อส่วน

4) ประหยัดสารเคมี (Reagent) ที่มีราคาแพงและลดค่าใช้จ่าย

5) ประสิทธิภาพสูงกว่าเนื่องจากลดการปนเปื้อนและความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงาน

6) สามารถใช้ในงานที่ต้องการตรวจซ้ำเป็นจำนวนมาก (High Throughput) โดยอาศัยการสร้างระบบแบบขนาน (ParallelProcessing)

7) ลดขั้นตอนการทำงาน เช่น ขั้นตอนการเตรียมสารซึ่งสามารถทำได้บนชิป

8) เพิ่มความปลอดภัยในการทำงานเนื่องจากใช้สารอันตรายน้อยลง

ระบบของไหลจุลภาคสามารถนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น การสร้างห้องปฏิบัติการบนชิป (Lab-on-a-Chip) ชิปสำหรับการตรวจ DNA ชิปสำหรับการตรวจโปรตีน เป็นต้น เพื่อใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัย (Diagnostics) โรคชนิดต่างๆ การคัดกรองยา (Drug Screening) หรือการตรวจวัดสภาพแวดล้อม การใช้งานระบบของไหลจุลภาคสามารถใช้ได้ในหลายสาขา ได้แก่

1) การตรวจวินิจฉัย เช่น การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นนอกสถานที่ (Point-of-Care)

2) การค้นหายารักษาโรค เช่น การคัดกรองยา การทดสอบยา

3) การแพทย์และสาธารณสุข เช่น เครื่องมือตรวจแบบพกพา

4) อุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทดสอบความปลอดภัยในอาหารว่ามีสารพิษหรือเชื้อโรคปนเปื้อนหรือไม่

5) เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น Protein Chip, DNA chip, Cell chip เป็นต้น

6) อุตสาหกรรมเคมี เช่น เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ขนาดเล็ก

7) สิ่งแวดล้อม เช่น การตรวจวัดคุณภาพของดิน น้ำหรืออากาศ

Fan et al., (1999) ได้สาธิตแนวทางใหม่ในการดำเนินการในรูปปฏิกิริยาสมบูรณ์ในชิ้นวัสดุขนาดเล็กที่เรียกว่า micro totalanalysis หรือ μ - TAS โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา hybridization บน beads ที่เป็น paramagnetic ใน micro fluidic chip และตรวจสอบสัญญาณจาก fluorescent probe และพบการเกิด hybridization สมบูรณ์ภายในเวลาไม่กี่วินาที Anderson et al., (2000) ได้พัฒนาชุดอุปกรณ์โดยใช้ polycarbonate ราคาถูกเป็นวัสดุและออกแบบให้อุปกรณ์สามารถจัดการกับสารเคมีหรือบัฟเฟอร์หลายชนิด และนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ HIV ไวรัส เริ่มตั้งแต่สกัดแยกกรดนิวคลีอิก ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา hybridization ได้พร้อมๆ กันบนชุดอุปกรณ์ดีเอ็นเอ นับเป็นตัวอย่างที่ดีในการอ้างอิงรูปแบบที่อาศัยการจับตัวของโพรบและไพรเมอร์ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา และหลักการถ่าย ทอดพลังงานระหว่างโมเลกุลเรืองแสงทั้ง reporter และ quencher สามารถออกแบบโพรบให้อยู่ในรูป Taq man probe, Scorpion probe และ Molecular beacon(Clegg, 1992) แม้ว่าโมเลกุลเรืองแสงเหล่านี้จะช่วยขยายโอกาสในการนำมาประยุกต์เพื่อตรวจสอบโมเลกุลได้กว้างขวางมากขึ้นแต่กลับมีต้นทุนในการดำเนินการทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์ fluorophore เชื่อมติดกับดีเอ็นเอมีราคาสูงมากดังนั้นการนำโมเลกุลเรืองแสงในรูปfluorophore มาใช้จะต้องศึกษาและปรับให้เกิดความเหมาะสมและคุ้มค่าต่อไป

นอกจากโมเลกุลเรืองแสงในรูป fluorophore แล้ว สารเคมีบางชนิดในกลุ่ม minor groove binder และ intercalator เมื่อจับกับดีเอ็นเอสามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลนำไปสู่การตรวจวัดทางกายภาพในรูปการเรืองแสงและการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า (Saito et al., 2004) สารเคมีกลุ่มนี้มีต้นทุนในการพัฒนาต่ำกว่า fluorophore ข้างต้นมากการจับตัวระหว่างโมเลกุลที่เป็น DNA binder สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีในการตรวจวิเคราะห์อาหาร Chaumpluk, (2005a, 2005b, 2005c, 2006, 2007) ประสบความสำเร็จในการพัฒนาการตรวจสอบทางเคมีไฟฟ้า (electro chemical basedbiosensor) ในการตรวจสอบ

การปนของดีเอ็นเอจากโคกระบือในอาหารและอาหารสัตว์และการตรวจปนของเชื้อไข้หวัดนก avian influenza virus H5N1 และการตรวจดีเอ็นเอในอาหารโดยใช้โมเลกุลสีที่เป็น minor groove binder ในรูปโมเลกุล Hoechst 33258 ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการจับตัวของโมเลกุล binder ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าโดยรวมและ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดและพัฒนา μ - TAS ได้ ซึ่งจะเป็นอีกช่องทางในการประยุกต์รูปแบบการตรวจสอบสัญญาณในรูปแบบใหม่ให้เกิดขึ้นได้การทบทวนเอกสารพบว่า ในการพัฒนาระบบตรวจสอบให้มีความสมบูรณ์และมีขนาดเล็กจำเป็นต้องเน้นงานวิจัยไปที่การพัฒนา chamber array ขนาดเล็ก สำหรับการทำปฏิกิริยาและตรวจสอบ และพัฒนาเทคนิค microflow บน matrix ให้มีประสิทธิภาพเพื่อเชื่อมโยงระบบทั้งหมดเข้าไว้ด้วยกัน ในปัจจุบันการสร้าง matrix ใช้เป็นรูปแบบต่างๆ สามารถทำได้ง่ายขึ้น Foder et al., 1993

ได้นำหลักการ photolithography มาใช้ในการสังเคราะห์ microchip ขนาดเล็กสำหรับทดสอบดีเอ็นเอโดยใช้ PDMS เป็นเนื้อวัสดุนอกจากวัสดุ PDMS แล้ว Yang et al., (2002) แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาการตรวจสอบด้วยหลักการ PCR สามารถทำได้บนวัสดุที่เป็น polycarbonate plastic ด้วยเช่นกัน ทำให้ได้ microarray ขนาดเล็กที่ภายในเป็น microreactor นอกจาก PDMS และ polycarbonate แล้ววัสดุที่นิยมใช้เป็นสื่อกลางมากที่สุดได้แก่ silicon และ กระจกซึ่งจัดเป็นวัสดุหลัก(Manz et al., 1991) วัสดุดังกล่าวแม้ในระยะต้นจะอยู่ในรูประนาบเดี่ยว แต่เทคนิค microfabrication ในปัจจุบันสามารถทำให้เกิดระนาบได้มากขึ้น เปิดโอกาสให้สามารถปรับประยุกต์การทำงานต่างๆ เป็น 2 และ 3 มิติและช่วยให้งานที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการไหลเวียนตามหลัก micro fluidic ทำได้ง่ายขึ้น ทำให้สามารถทำปฏิกิริยาที่ซับซ้อนหรือสามารถเชื่อมโยงปฏิกิริยาหรือกิจกรรมต่างๆหลายชนิดเข้าด้วยกันได้

ระบบตรวจที่พัฒนาในระยะต่อมานอกจากจะสามารถทำ PCR บนวัสดุขนาดเล็กได้แล้วยังสามารถพัฒนาชุดอุปกรณ์ให้การเชื่อมต่อจากตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR สามารถนำมาตรวจสอบต่อโดยการวัดทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ electrodeในรูปทองคำและดีบุก iridium tin oxide (Lee et al., 2003)นอกจากการประยุกต์ใช้การตรวจทางไฟฟ้าแล้วยังมีรายงานการประยุกต์ใช้ laser technology เข้ามาร่วมในการตรวจวิเคราะห์เพื่อช่วยให้สามารถตรวจติดตามสัญญาณ fluorescence ได้ตามระยะเวลาจริง (real time)ในปัจจุบันการพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ทำได้โดยการนำอุปกรณ์ตรวจจับที่อาจมีขนาดใหญ่มาใช้เครื่องมือตรวจขนาดเล็กเช่น laser - induce fluorescence และ mass spectrometry หรือแม้กระทั่งการปรับส่วนที่เป็น electrochemical detector ทั้งเทคนิค Laser induce fluorescence และ mass spectrometry ทำได้ไม่ง่ายนัก และอาจส่งผลต่อมูลค่ารวมของอุปกรณ์ที่พัฒนาให้มีมูลค่าสูงเกินกว่าที่จะยอมรับได้ อย่างไรก็ดีการเชื่อมโยงหลักการง่ายๆ ในการวัดความขุ่นหรือแม้กระทั่งการวัดทางเคมีไฟฟ้าอาจทำให้การตรวจสอบมีความไวต่อการตรวจมากขึ้นและการที่อุปกรณ์ตรวจวัดมีขนาดเล็ก ทำให้ลดขนาดโดยรวมของชุดตรวจสอบลงได้ดีกว่าการใช้เทคนิคอื่น (Belmont et al., 1996 และ Kounares, 1994)

ความก้าวหน้าในการพัฒนาชุดสำเร็จในรูป μ - TAS ในปัจจุบันมีมากขึ้น ในส่วนที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอ เทคนิค μ - TAS ยังคงอยู่บนพื้นฐานของการนำเทคนิค PCR มาใช้เพียงแต่ปรับการทำ

ปฏิกิริยา PCR อย่างเป็นระบบให้สามารถดำเนินการได้ง่ายขึ้น ใช้ตัวอย่างน้อยลงโดยมี Chang et al. 1996 เป็นกลุ่มแรกที่ประสบความสำเร็จในปัจจุบัน พัฒนาการของระบบ μ - TAS สำหรับการตรวจดีเอ็นเออาศัยการออกแบบในรูป micro fluidic channels (Obeid and Christopulos, 2003) ที่รองรับกับงาน PCR ได้โดยปกติในการออกแบบระบบปัจจัยสำคัญที่ต้องใช้ความระมัดระวังได้แก่ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ซึ่งควรออกแบบให้กินเวลาในช่วงสั้นๆ

ในปัจจุบันจะพบว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาได้ลดลงต่ำกว่า 30 นาที โดยบางกรณีมีการนำหลักการให้ความร้อนไม่ว่าจะเป็น laser หรือ electric heating elements มาใช้ (Chion et al., 2001)นอกจากปัจจัยเรื่องระยะเวลาแล้ว ชิปที่อยู่บนหลักการ μ - TAS ควรจะมีการใช้กำลังหรือพลังงานต่ำ มีปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสมเพราะทั้ง 2 ปัจจัยมีผลต่อต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง การออกแบบและการปรับ fluidic channels จึงมีบทบาทสำคัญยิ่งเพื่อให้เกิดการสูญเสียตัวอย่างและสารเคมีน้อยที่สุดเนื่องจาก PCR เป็นระบบที่ได้รับความนิยมโดยเฉพาะการนำหลักการ multiplex มาประยุกต์ใช้ทำให้สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายต่างชนิดไปพร้อมๆ กันได้ แต่ปฏิกิริยา PCR ที่มีเงื่อนไขจำนวนรอบสลับซับซ้อนจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิต่างระดับ 2-3 รอบตามปฏิกิริยา 2 step หรือ 3 step ข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้การออกแบบ μ - TAS มีความซับซ้อนและใช้พลังงานมากขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นหากสามารถใช้รูปแบบการเพิ่มปริมาณแบบอื่นที่ไม่ซับซ้อนมาทดแทน การออกแบบ μ - TAS ระบบใหม่จะทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นรวมทั้งมีค่าใช้จ่ายต่ำลง

จากประสบการณ์ของคณะผู้วิจัยในการตรวจและวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร ณ.ห้อง ปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจากรูปแบบการใช้บริการการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ดำเนินการอยู่ในห้องปฏิบัติการต่างๆทั้งในประเทศและต่างประเทศ และจากการวิเคราะห์โครงสร้างของดีเอ็นเอหรือการตรวจวิเคราะห์ (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2547) พบว่าการตรวจวิเคราะห์อาหารจะเป็นประโยชน์สูงสุดหากนำไปใช้ตอบสนองหลักการ point of care นั่นคือสามารถใช้ตรวจสอบในภาคสนามกับวัตถุดิบกับเนื้ออาหารขณะผลิตและทดสอบที่ตัวผลิตภัณฑ์ การตรวจวิเคราะห์ในระบบ μ - TAS จึงตอบสนองต่อความจำเป็นดังกล่าวได้ดี เนื่องจากจะช่วยให้จัดการกับจำนวนตัวอย่างได้มาก ใช้งานง่าย ลดปัญหา carry over เนื่องจากเป็นระบบใช้แล้วทิ้ง ใช้สารเคมีและตัวอย่างน้อยทำให้ต้นทุนต่ำ สามารถพกพา นำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในภาคสนามในโรงงานผลิตได้เป็นอย่างดี หัวใจสำคัญในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในรูปแบบ μ - TAS ให้ได้นั้นจำเป็นต้องให้ความสำคัญกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร

ที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารที่สมบูรณ์ในรูปแบบ μ - DNA extractor มาก่อนเนื่องจากอาหารมีเนื้ออาหาร (matrix) 2 รูปแบบ ได้แก่รูปแบบ ธรรมชาติที่พบในวัตถุดิบอาหารที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรและรูปแบบที่มีเนื้ออาหารแปรรูปไป การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้ออาหาร จึงมีความแตกต่างกันไปด้วย

การสกัดดีเอ็นเอจากวัตถุดิบอาหาร ที่มีเนื้อเป็นธรรมชาติ อาศัยหลักการทำให้เซลล์แตก โดยอาศัยความเป็นด่างหรือสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพรุนแรง(denaturant) ในรูป detergent ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน ก่อนที่จะจับดีเอ็นเอหรือตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเรซินหรือ silica สังเคราะห์หรือการตกตะกอน ด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้ออาหารแปรรูปต้องการโมเลกุลที่เป็น chaotic ทำปฏิกิริยารุนแรงกับเนื้ออาหารและจับดีเอ็นเอด้วยเรซินหรือ silica สังเคราะห์หรือด้วยโมเลกุล binder ที่แสดงคุณสมบัติเป็น paramagnetic ก่อนจะปลดปล่อยดีเอ็นเอในขั้นตอนท้ายสุดด้วยการลดระดับความเข้มข้นของเกลือในระบบ (Tengel et. al., 2001 และ Nakama and Morishita, 2004)ซึ่งวิธีเหล่านี้มักจะบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 – 65 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับระบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Notomi et al., 2000) ขั้นตอนการสกัดดังกล่าวนี้สามารถนำหลักการ capturing processโดยใช้ microbeads ร่วมกับ flow channel (Endo et. al. , 2005) มาประยุกต์ใช้ได้สำหรับการเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหลักจัดว่ามีความสำคัญเป็นอันดับที่ 2 จากการเปรียบเทียบ

เทคโนโลยีทั้งในรูป branched DNA amplification (bDNA) invader amplification และ rolling circle amplification (Lyamicher et.al. , 1999 และ Lizardi et. al. ,1998) พบว่านอกจาก PCR แล้ว การเพิ่มดีเอ็นเอด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำโดยไพรเมอร์ให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบห่วง(LAMP) มีข้อเด่นเหนือกว่าเทคนิคอื่นแม้กระทั่งวิธีพีซีอาร์โดยเฉพาะในเรื่อง การใช้อุณหภูมิระนาบเดียวที่ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับอุณหภูมิขณะสกัดดีเอ็นเอ เรื่องความเฉพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ ที่มีถึง 6 ไพรเมอร์ ทำให้มีความเฉพาะเจาะจงสูงกว่า พีซีอาร์ ถึงมากกว่า 1000 เท่า และประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากแหล่งที่มีดีเอ็นเอหลากชนิดปนกันอย่างเช่นที่พบในดีเอ็นเอที่สกัดจากอาหาร ทำให้สัดส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลดลงจากภาวะปกติลงมาก (จากปกติ 3 ชั่วโมงเป็น 20 – 25 นาที) โดนที่จำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ มีปริมาณสูงกว่า PCR ไม่น้อยกว่า 105 เท่า ทำให้เทคนิค LAMP มีประศักยภาพสูง นอกจากนี้การใช้อุณหภูมิที่คงที่ ที่ 60-65 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้การออกแบบระบบครอบคลุมอุณหภูมิใน μ -TAS ทำได้ง่ายขึ้น ลดความจำเป็นในการเตรียมอุปกรณ์จัดการกับอุณหภูมิต่างระดับลงได้ ซึ่งอาจส่งผลต่อขนาดของอุ u3611 ปกรณ์ให้สามารถทำได้กะทัดรัดขึ้นและมีต้นทุนต่ำลงและเนื่องจากรูปแบบการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในอาหารส่วนใหญ่อยู่บนการตรวจสอบเฉพาะเป็นรายการจึงทำให้ความจำเป็นในการตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายหลายเป้าหมายไปพร้อมๆกันหมดไป สำหรับการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจสอบได้จากความขุ่นของตะกอนสารประกอบ ฟอสเฟต ซึ่งได้ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาหรือดูจากการเรืองแสงของโมเลกุล binder อย่างใดอย่างหนึ่ง (Notomi et al.,2000, Chaumpluk, 2006) ซึ่งจะเสริมให้การตรวจสอบหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้ง่ายขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องอาศัย

โมเลกุล fluorophore ซึ่งมีราคาแพงเนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคใหม่ การพัฒนาเทคนิคสำหรับการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาหารยังคงมีน้อยอยู่ โครงการนี้จึงเริ่มต้นด้วยการพัฒนาการตรวจสอบตามหลักการที่เคยอ้างอิงในวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ให้สามารถ

ดำเนินการได้ด้วยหลักการทาง LAMPดังนั้น μ -TAS ที่เสนอพัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นระบบที่จะประกอบด้วยส่วนสกัดดีเอ็นเอ ส่วนขยายเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและส่วนตรวจสอบร่วมกัน สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากอาหารดำเนินการโดยอ้างอิงบูรณาการสกัดดีเอ็นเอ (Chaumpluk, 2003) และออกแบบการควบคุมการไหลและจับตัวของดีเอ็นเอใน channel ตามรูปแบบของ Endo et. al., (2004) ร่วมกันกับรูปแบบที่มีผู้เสนออื่นๆ และทำให้บริสุทธิ์ตามหลักการจับตัวของดีเอ็นเอกับ resin beads ออกแบบระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามหลักการ LAMP (Notomi et. al., 2000) และตรวจสอบความขุ่นของตะกอนสารประกอบฟอสเฟตที่ได้หรือจากการเรืองแสงของโมเลกุล binder หรือจากการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าเคมี

ดังนั้นการนำจุดแข็งทางชีววิทยาโมเลกุล โดยเฉพาะความรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์และการโคลนชิ้นดีเอ็นเอมาบูรณาการร่วมกันกับนวัตกรรมทางเทคโนโลยี เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างง่ายในรูปชุดสำเร็จรูป เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว การนำหลักการ electrochemical detection technology การสังเคราะห์โมเลกุลอ้างอิงที่เป็นดีเอ็นเอมาร่วม และเสริมด้วยการรวมปฏิกิริยาให้อยู่ในรูป lab-on-a-chip จะช่วยแก้ปัญหาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารของประเทศ ช่วยให้เกิดการบุกเบิกต่อยอดทางเทคโนโลยี เกิดนวัตกรรม เสริมการประยุกต์ในการตรวจอาหารด้วยดีเอ็นเอที่ยังมีอยู่น้อยในขณะนี้ และเป็นองค์ความรู้ที่สามารถต่อยอดไปสู่การตรวจด้วยดีเอ็นเอในรายการใหม่ๆ นอกจากนี้เมื่อใช้ร่วมกับรูปแบบสัญลักษณ์ก็จะช่วยเสริมภาพลักษณ์ในแง่บวก และเป็นการประชาสัมพันธ์ให้กับตัวสินค้าของประเทศซึ่งเชื่อมโยงกับศักยภาพในการแข่งขันในสินค้าอาหารอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

2. เนื้อเรื่อง (Main Body)

2.1. วัสดุทดลองและวิธีการ (Materials and Methods)

2.1.1. วัสดุทดลอง

ธัญพืชที่ใช้ในการทดสอบได้จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ข้าวได้จาก บริษัทไดอะ เมอร์แซนไดซ์ จำกัด

2.1.2. วิธีการดำเนินการทดลอง

1. การออกแบบโครงร่างระบบและวางแผนการสร้าง μ -TAS สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและเลือกวัสดุที่เป็นไปได้

ออกแบบโครงสร้างระบบด้วยโปรแกรม illustrator CS3 โดยใช้เส้นสีดำ แทน ช่องทางเดินของสารละลายทั้งหมด ถ่ายแบบลงในฟิลม์เนกกาทีฟ วางแผนการสร้าง μ-TAS โดยการสืบค้นข้อมูล ข้อดีข้อเสียของวัสดุสังเคราะห์สำหรับการวางระบบสกัดดีเอ็นเอและเลือกวัสดุที่เป็นไปได้ระหว่าง PDMS และ Silicon อย่างใดอย่างหนึ่ง

2. ดำเนินการสร้างและทดสอบระบบMicro fluidic

สร้างแม่พิมพ์จากแผ่นฟิล์ม negative ด้วยเทคนิค photolithography ลงบน silicon water ขนาด 3.4 นิ้ว พัฒนาบน photoresist SU-8 และล้างออก(Nakayama et all., 2006)

3. ขึ้นรูปแบบและทดสอบ

สร้างแม่พิมพ์และใช้แม่พิมพ์ดังกล่าวหล่อวัสดุที่ต้องการจากข้อ 1 การขึ้นรูปจากแม่พิมพ์รวมถึงการดำเนินการเชื่อมต่อท่อเดินสารละลายในรูป micro fluidic โดยใช้ ท่ออ่อน ทำจาก PVP derivative

ทดสอบการไหลของสารละลาย การรั่วซึมและความดันในรอบโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีสารละลาย bromophenol blue 0.01% เป็นตัวชี้วัด ภายหลังล้างระบบทดสอบด้วยเอธานอลและน้ำกลั่นตามลำดับ

4. ประเมินผลการสร้างระบบสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ทดสอบความสามารถ ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบ โดยดำเนินการกับตัวอย่างที่ได้จากการผสมระหว่าง matrix ต่างกัน 2 matrixes ได้แก่ ถั่วเหลืองในข้าว ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้นำมาแยกในสนามไฟฟ้าด้วย 2% TAE gel

การสกัดดีเอ็นเอจาก matrix ร่วม โดยใช้เนื้ออาหารผสมระหว่างถั่วเหลืองและข้าวในอัตราส่วนต่างกัน พบว่า การใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะต่อยีน lectin ในถั่วเหลือง

5. การดำเนินการระบบเชื่อมโยงเพื่อส่งดีเอ็นเอสู่ระบบเพิ่มปริมาณ

การส่งดีเอ็นเอเข้าสู่ระบบเพิ่มปริมาณ ทำโดยการใช้แรงดันจากหลอดฉีดยา syring ขนาด 1 มิลลิลิตร ทดสอบของการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ ในขั้นต้นควบคุมความเร็วของอัตราการไหลคงที่ 1 mL/นาที

ในรูปแบบหลักทางทฤษฎี ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอในบริเวณปฏิกิริยา โดยอาศัยการจับตัวของดีเอ็นเอบนผิวของ ferrous resin โดยตรง การส่งดีเอ็นเอจึงทำได้โดยละลายสารละลายดีเอ็นเอที่ตรึงอยู่ที่ผิวของ resin ด้วยบัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอส แล้วส่งสารละลายดีเอ็นเอดังกล่าวไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา isothermal amplification

6. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมปฏิกิริยาในระบบ

ออกแบบและจัดทำอุปกรณ์ควบคุมอัตราไหลของของไหล (microfluidic) โดยใช้วัสดุอลูมิเนียมหล่อ การควบคุมอุปกรณ์ของไหลสามารถใช้งานได้ด้วยมือด้วยกลไกอย่างง่ายและราคาถูก ตรวจสอบอุปกรณ์โดยใช้ syring ขนาด 1 ml

7. สร้างรูปแบบและทดสอบระบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ออกแบบและสร้างรูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนพื้นฐานหลักการ isothermal DNA amplification (Notomi et al, 2000) เริ่มจากการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากประเด็นปัญหา ที่สำคัญของประเทศ เน้นการเริ่มต้นจากการวิเคราะห์ประเด็นที่ต้องการดำเนินการอย่างเร่งด่วน การออกแบบไพรเมอร์โดยการสืบค้นยีนที่เป็นยีนเป้าหมาย ไพรเมอร์ทั้งหมดออกแบบด้วยโปรแกรม Primer Explorer (Fujitsu, Japan) และในปฏิกิริยาประกอบด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM $MgSO_4$ 20 mM

$(NH_4)_2SO_4$ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ตามที่ระบุไว้โดย Notomi *et al.*,(2000) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ผสม ที่ประกอบด้วย 10 pmole each ของ F3B3 และ 40 pmole ของ FIP และ BIP ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา ศึกษาความไวของปฏิกิริยาความจำเพาะและการทดสอบกับเนื้อตัวอย่างอาหารจริง (Notomi et al, 2000)

ทำนองเดียวกันการดำเนินการยังให้ความสำคัญต่อการตรวจการปนของวัตถุดิบที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ เช่น การตรวจการปนของถั่วลิสงและถั่วเหลือง โดยดำเนินการในรูปแบบเดียวกันกับการตรวจการปนของเนื้อปลาปักเป้า

8. การสร้างรูปแบบจำลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการคัดเลือกระบบการตรวจสอบ

ศึกษาระบบการตรวจสอบในปัจจุบันทั้งที่อยู่บนการตรวจสอบด้านไฟฟ้าเคมี(Chaumpluk et al., 2007) โดยพัฒนารูปแบบการตรวจวิเคราะห์บนพื้นฐานการตรวจสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าโดยตรงจากการเปลี่ยนสัญญาณทางเคมีภายในโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยโมเลกุล เคมี(Kobayashi *et al.*, 2004) เน้นความสามารถในการเชื่อมโยงกับระบบ μ-TAS ตรวจสอบประเมินผลการพัฒนาวิธีการตรวจโดยตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมในระหว่างช่วง 20-50 μM ของ สารกระตุ้นจำพวก groove binder ในสารละลาย PBS ดำเนินการด้วย carbon screen printed electrode พื้นผิว 2.63 ตารางมิลลิเมตร โดยใช้ $AgCl_2$ เป็น pseudo reference electrode ตรวจวัดสัญญาณด้วยหลักการ linear sweep voltrammetry (LSV) ด้วย DNA Chip Tester (Biodevice Technology, Japan)

ด้านการเรืองแสงโดยใช้โมเลกุลไบน์เดอร์(Chaumpluk et al., 2006) และการเปลี่ยนแปลงทางแสงอันเนื่องจากปรากฏการณ์พลาสมอน ในรูปแบบการสร้างโมเดลความเป็นไปได้ในแนวทางการตรวจวิเคราะห์ การเชื่อมโยงเข้ากับระบบ และความเป็นไปได้ในการใช้งานจริง โดยเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของแต่ละโมเดล ความเป็นไปได้ทางเทคนิค ประสิทธิภาพและการประเมินผลทางเศรษฐศาสตร์ พร้อมคัดเลือกโมเดลที่เหมาะสมเพื่อการตรวจสอบ

9. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมและตรวจวัดเพื่อศึกษา และประเมินระบบที่ได้พัฒนาขึ้น

ออกแบบและสร้างอุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบสัญญาณเพื่อการตรวจวัดผลการทดสอบและอุปกรณ์ควบคุมการเปิดปิด ให้สอดคล้องกับโมเดลการตรวจสอบสัญญาณที่ศึกษาได้ในข้อ 8

10. จัดทำระบบการตรวจวัดทางฟิสิกส์ในรูปแบบ μ-TAS เพื่อการแสดงผล

นำอุปกรณ์และโครงสร้างที่ได้จากข้อ 1) 5) 6) และ 9) มาทำการทดสอบร่วมเพื่อตรวจวัดผลการวิเคราะห์ใน μ-TAS ทางกายภาพ

11. วางระบบขึ้นรูปและผสานการเชื่อมต่อ

ในกรณีที่ระบบมีการแยกส่วน จำเป็นต้องผสานเชื่อมต่อ เพื่อให้เกิดเป็นμ-TAS ระบบเดียว และหากสามารถรวมส่วน ให้รวมส่วนทั้ง 3 ระบบเข้าด้วยกันโดยเทคนิค piping หรือการออกแบบให้เกิดการเชื่อมโยงกันโดยตรงภายในชิปเดียวกัน

12. ทดสอบประเมินผลระบบในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบการใช้งานทางห้องปฏิบัติการโดยใช้ matrix อาหาร ทดสอบกับระบบ μ-TAS ที่พัฒนาขึ้น ทั้งความไวของปฏิกิริยา ความจำเพาะของปฏิกิริยาและการทดสอบใช้งานจริงกับเนื้ออาหารโดยตรง

13. การประเมินการใช้งานจริงในภาคสนาม ร่วมกับภาพอุตสาหกรรม

นำระบบทดลองอย่างง่ายไปสาธิตและถ่ายทอดวิธีการใช้งานโดยตรงยังผู้ประกอบการในภาคอุตสาหกรรม เน้นการดำเนินการเองโดยผู้ประกอบการและการประเมินผลการใช้งาน ณ จุดทดสอบ

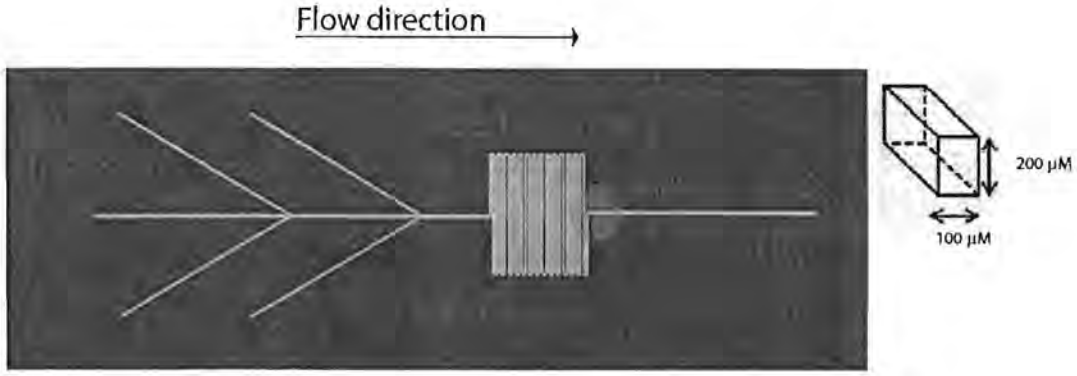
2.2. ผลการวิจัย

2.2.1. ชิปและการพัฒนาชิป

2.2.1.1. การออกแบบโครงร่าง และวางแผนการสร้างชิป μ-TAS สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและการออกแบบเลือกวัสดุที่เป็นไปได้

การออกแบบโครงร่าง การวางแผนสร้างชิปและการขึ้นรูป เริ่มจากการวางแผนการออกแบบชิปซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนการออกแบบการเลือกวัสดุและขั้นตอนการสร้างตัวชิป โดยในขั้นต้นก่อนการออกแบบตัวชิปจะเน้นพิจารณาบนรากฐานของชนิดของเรซิ่นที่คาดว่าจะตัดสินใจใช้ในกระบวนการการสกัดดีเอ็นเอในที่นี้ ได้แก่การใช้เรซิ่นสังเคราะห์ในรูปแบบ silica resin และการใช้เรซิ่นสังเคราะห์ในรูป silica ferrous oxide resin ผลการพิจารณาพบว่า การออกแบบชิปที่มีการฝังตัวของ silica resin ในรูปแบบ stationary phase เป็นเรื่องที่ยากกว่า เนื่องจาก silica resin เป็นผลึกที่การตรึงให้อยู่บนชิปจำเป็นต้องทำให้อยู่ในรูปก้อนแข็งซึ่งอาจมีผลต่อการอุดตันของ micro channel หรือ การขึ้นรูปเป็นก้อนอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ข้อสรุปการออกแบบระบบที่จำเป็นต้องเลือกใช้ silica ferrous oxide resin ในท้ายที่สุด

การพิจารณาใช้ silica ferrous oxide resin ทำให้โครงสร้างชิปอยู่บนหลักการ ไหลของ fluidic phase มากกว่า stationary phase การออกแบบชิปในครั้งนี้จึงเน้นการปล่อยให้ของไหลที่เป็นของผสมที่มีดีเอ็นเอเป็นส่วนประกอบไหลผ่านไปพร้อมกับ oxide resin โดยขณะที่ไหลไปด้วยกันและจงใจให้เกิดเกิดการจับตัวของดีเอ็นเอบนพื้นผิวของ oxide resin ผลดังกล่าวทำให้การออกแบบโครงสร้างชิปเน้นโครงสร้างการ flow ของสารละลายในการสกัดดีเอ็นเอ โครงสร้างชิปที่ออกแบบได้ประกอบไปด้วย ท่อเข้าขนาดเล็ก(inlet) ออกแบบให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 50-200 ไมครอน (ตัวอย่างที่แสดง 100 ไมครอน) มีช่องรับตัวอย่างได้ตั้งแต่ 1-5 ช่อง (ภาพที่ 1.) ช่องรับตัวอย่างเชื่อมต่อกันเป็นทางเดินเดียว มีบริเวณที่ท่อเรียงตัวชิดกันเป็นบริเวณปฏิกิริยา (reaction area) บริเวณปฏิกิริยาเป็นท่อที่ขดชิดกัน 10-20 ทบ (ที่แสดงในรูปมี 14 ทบ) ระยะ 0.8×1.1 เซนติเมตร อาจย่อหรือขยายจากนี้ จากนั้นท่อจะเรียงตัวเป็นทางเดียวจนถึงช่องออก (outlet) ซึ่งมี 1 ช่อง ทิศทางการไหลของสารเคมีเริ่มจากช่องเข้าสู่ช่องออก สารเคมีที่เป็นของไหลจะถูกผลักดันด้วยแรงดันโดยตรง ปริมาตรของบริเวณปฏิกิริยา เป็น 14 ไมโครลิตร



ภาพที่ 1 โครงสร้างชิปและรายละเอียดของโครงสร้าง

มิติที่เกี่ยวข้อง

ความยาวจากช่องเข้าถึงช่องออก 6 เซ็นติเมตร

แขนงท่อเข้า 1.5 เซ็นติเมตร

บริเวณปฏิกิริยา จำนวนท่อที่ขดตัวชิดกัน 14 ทบ จำนวนท่อที่ทบชิดกันเกิดเป็นบริเวณชิปที่มีพื้นที่ทบตัว ระยะ 0.8 x 1.1 เซ็นติเมตร

เส้นผ่านศูนย์กลาง 100 ไมครอน

ส่วนที่เป็น inlet จะออกแบบเพื่อเป็นช่องทางเดินสารละลายเข้าสู่ชิป และส่วนที่เป็น outlet จะเป็นส่วนที่ถ่ายสารละลายออก สำหรับโครงสร้างดังกล่าวที่เน้นความเรียบง่าย เพื่อประโยชน์ในการใช้งานในอนาคตในขั้นต้นได้เลือกวัสดุในการขึ้นรูปเป็น PDMS เนื่องจาก ใช้งานง่าย มีราคาถูก และเทคนิคการขึ้นรูปไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

2.2.2. ดำเนินการสร้างและทดสอบระบบ micro fluidic โดยใช้วัสดุสังเคราะห์ PDMS

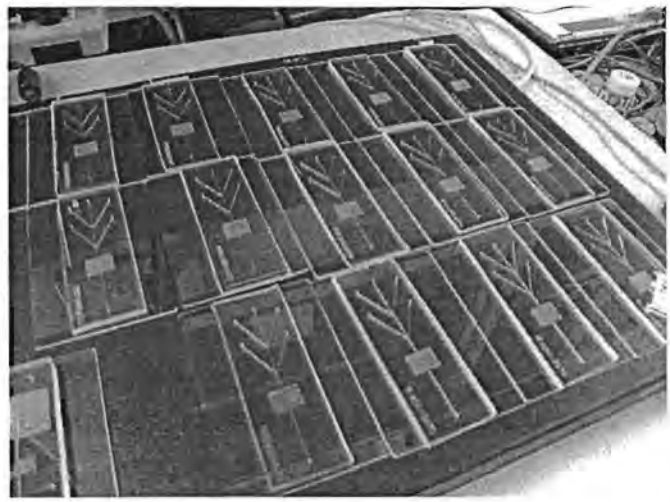
ผลการสร้างและทดสอบระบบ micro fluidic โดยใช้วัสดุสังเคราะห์ PDMS และการขึ้นรูป เริ่มจากสร้างพิมพ์ตามขั้นตอน photolithography โดยสร้างรูปแบบผ่านฟิลม์เนกาทีฟ ได้แบบโครงสร้างที่ได้กำหนดขึ้น ด้วยโปรแกรม Adobe Illustrator CS™ และผลการนำแบบที่ออกได้ เมื่อนำมาถ่ายลงฟิล์ม ได้ฟิล์มเพื่อใช้หลักในการสร้างแม่แบบต่อไป

ผลการขึ้นรูปเมื่อดำเนินการโดยใช้ photoresist SU-8 เคลือบสปินโค๊ทลงบน silicon wafer (ภาพที่ 2a-b) ภายหลังการอบที่อุณหภูมิสูงและล้างออกด้วย developer ได้แม่แบบในการขึ้นรูปชิปซึ่งเป็นต้นทางของชิปที่พัฒนาขึ้น

ภาพที่ 2 การขึ้นรูปแบบบน silicon wafer เริ่มจากการสปินโค๊ท2a(ซ้าย)และภายหลังการถ่ายแบบลงบน silicon wafer ด้วยหลักการ photolithography แล้วพัฒนาต่อทำให้ได้แม่แบบชิป 2 b (ขวา)

2.2.3. ขึ้นรูปแบบและทดสอบ

ในการพัฒนาในครั้งนี้ เลือกตัวชิปให้ทำจากวัสดุ PDMS(polydimethylsiloxane) ด้วยเหตุผลเนื่องจาก PDMS เป็นวัสดุที่จัดเตรียม ขึ้นรูป และใช้งานได้ง่าย โดยหล่อ PDMS ให้ เกิดความหนา 1.5 มิลลิเมตร การสร้างชิปบน silicon wafer และทำให้แข็งตัวภายใต้อุณหภูมิ 90 ^{0}C และวางบนกระจก slide ขนาด 76x52 มิลลิเมตร เชื่อมต่อท่อและใช้ปฏิกิริยา plasma เพื่อให้วัสดุ PDMS ที่ได้ยึดติดกับแผ่น slide อย่างแนบสนิทได้ชิปสำเร็จเป็น ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ชิปสำเร็จรูปที่ออกแบบพัฒนาขึ้น ประกอบด้วยช่องรับสารละลาย บริเวณ ปฏิกิริยาและช่องถ่ายสารละลายออกจากระบบ

ชิปที่สร้างขึ้นนี้ประกอบส่วนท่อสารละลายโดยการวางท่อที่อาศัยใช้แรงดันจาก micromanipulator ผ่านหลอดส่งสารละลาย โดยก่อนการใช้งานจะฉีดสารละลาย BSA 3% เข้าสู่ชิปและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.4. ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ

ปฏิกิริยาสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

การตรวจบนพื้นฐานโมเลกุลดีเอ็นเอมีขั้นตอนที่สำคัญเริ่มจาก สกัดดีเอ็นเอจากอาหารการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอาหารนั้นโดยใช้หลักการจับตัวแบบคู่สมของดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจและการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากอาหาร

ในครั้งนี้เน้นการศึกษา พัฒนาและต่อยอดองค์ความรู้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้ออาหารที่นิยมใช้เป็นมาตรฐานให้สามารถปรับใช้กับโครงสร้าง μ-TAS

ได้พัฒนาวิธีการที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาการสกัดดีเอ็นเอสำหรับอาหาร 2 กลุ่มได้แก่ วัตถุดิบอาหาร (agricultural produce) และอาหารสำเร็จรูป ใช้เนื้ออาหารของวัตถุดิบอาหารซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตร พบว่าโครงสร้างของเซลล์ที่อยู่ในองค์ประกอบของเนื้ออาหารยังมีความสมบูรณ์ สามารถตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในรูปโปรตีน และดีเอ็นเอได้ง่าย ขณะที่ในเนื้ออาหารแปรรูป องค์ประกอบเหล่านี้จะเปลี่ยนไปตามความซับซ้อน รูปแบบในการแปรรูปทำให้โปรตีนเสียสภาพไปก่อน รูปแบบของเนื้ออาหารส่งผลต่อวิธีการที่เลือกใช้ โดยเนื้ออาหารแปรรูปไปมากมีผลให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้ยากเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนไป โมเลกุลดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบได้จะมีปริมาณน้อยลงและจะมีขนาดลดลง

เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากอาหารมีความเฉพาะเจาะจงค่อนข้างสูง อาหารประกอบด้วยเนื้ออาหารที่แตกต่างกัน ผ่านกระบวนการแปรรูปที่ต่างกัน จึงทำให้โอกาสในการสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพมีความแปรผันไปตามเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอ ในระหว่างการทดลอง ได้นำ Chelex resin และ ferrous oxide resin มาประยุกต์ใช้ ทั้งสองวิธีช่วยให้สามารถหลีกเลี่ยงกระบวนการสกัดโดยการใช้สารละลายในกลุ่ม organic solvent ลง และหลีกเลี่ยงความเสียหายอันเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง organic solvent กับ PDMS ได้

ผลการทดลองพบว่าหากตัวอย่างเป็นวัตถุดิบอาหาร (agricultural products) การใช้ chelating resin จะช่วยให้การสกัดดีเอ็นเอทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า มีต้นทุนที่ต่ำกว่า แต่มีข้อเสียในเรื่องความยากง่ายในการปรับปริมาตรตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เพื่อนำเข้าสู่ระบบในกรณีที่ต้องกำหนดปริมาตรของดีเอ็นเอแม่แบบก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และหากตัวอย่างเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูป การใช้ chelating resin จะไม่สนองตอบต่อวัตถุประสงค์ ขณะที่การใช้หลักการ chaotropic ร่วมกับ silica ferrous oxide resin แม้มีต้นทุนสูงกว่าแต่จะเหมาะสมกับตัวอย่างทุก matrix ทั้งวัตถุดิบอาหารและผลิตภัณฑ์แปรรูปและยังลดปัญหาทางเทคนิคในการปรับปริมาตรตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เพื่อนำเข้าสู่ระบบ นอกจากนี้การใช้หลักการ chaotropic ยังสอดคล้องกับวิธีหลักในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารบนวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์

สำหรับการปรับวิธีให้สามารถมาใช้ได้อยู่บนพื้นฐานแนวคิดการปลดปล่อยดีเอ็นเอจากระบบในเวลาอันรวดเร็ว จึงนำหลักการสกัดดีเอ็นเอในภาวะ denaturation แทนการดำเนินการในภาวะปกติ อาศัยแรงทางกายภาพ ความร้อนในรูปอุณหภูมิในระดับ semi denatured ร่วมกับการย่อยทางเคมีและ หรือการปลดปล่อยดีเอ็นเอด้วย chaotropic agent เป็นกระบวนการเริ่มต้น

วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ส่วนได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด และ ขั้นตอนการสกัดกรดนิวคลิอิค

2.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด ซึ่งเป็นขั้นตอนที่รวมกระบวนการทางเคมีและกายภาพเข้าด้วยกันเพื่อช่วยให้ดีเอ็นเอได้รับการปลดปล่อยจาก matrix ตัวอย่าง ขั้นตอนทั้งหมดในขั้นนี้เรียกว่า pretreatment ผลการทดลองพบว่าวิธีที่เหมาะสมกับตัวอย่างเป็นดังนี้

1. การสกัดบนพื้นฐานบัฟเฟอร์ด่างอ่อน ที่มีตัวยับยั้งนิวคลิเอส และความร้อน 95^0 C

หากเนื้อ matrix ของตัวอย่างเป็น เมล็ดพืชที่มีองค์ประกอบอะไมโลส อะไมโล เพคติน สูง มีสัดส่วนของไขมันต่ำ เช่น เมล็ดข้าว และข้าวสารชนิดต่างๆ ให้แกะเปลือกออก นำตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ด่างอ่อนที่ประกอบด้วย 100mM Tris HCl pH 8.0 0.1mM EDTA 2 N NaOH ปริมาตร 200 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95^0 C นาน 10 นาที จนตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ นำไปบดให้ละเอียด ปั่นให้ตกตะกอน แล้วนำเฉพาะส่วนใสไป สู่ขั้นตอนสกัดกรดนิวคลิอิกต่อไป

2. การสกัดบนพื้นฐานของทริสบัฟเฟอร์ ที่มีตัวยับยั้งนิวคลิเอส เอ็นไซม์ย่อยโปรตีน และสารลดแรงตึงผิว หากตัวอย่างได้จากเนื้อเยื่อที่มีสัดส่วนของโปรตีนสูง เช่นส่วนหนึ่งส่วนใดของเซลล์สัตว์ เนื้อเยื่อสัตว์ เป็นต้น ให้นำตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม บดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 100 mM Tris HCl pH 8.0 1 mM EDTA 300 mM NaCl 0.1% mercapto ethanol 200 µl ที่มี 10 µl proteinase K (> 600 mAU/mL) บ่มปฏิกิริยาที่ 56^{0}C เป็นเวลา 15-30 นาที ปั่นให้ตกตะกอนแล้วนำเฉพาะส่วนใสไปสกัดกรดนิวคลิอิกต่อไป

การนำตัวอย่างที่ได้ในขั้นตอนแรกมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 14000 rpm นาน 2 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนใส 15 µl มารวมกับสารละลาย chaotopic เข้มข้นที่มีรีดิวซ์ซิ่งเอเจนต์ และเรซิ่นสังเคราะห์ เรซิ่นสังเคราะห์ดังกล่าวจะจับกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.4.2 การสกัดกรดนิวคลิอิคภายในตัวชิป

เทคนิคการสกัดดีเอ็นที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้อาศัยวิธีการจับดีเอ็นเอในสารละลายให้อยู่กับ matrix resin โดยใช้คุณสมบัติของ silica resin ที่เคลือบบน ferrous oxide ซึ่งเป็นได้ทั้งในรูป micro particle และ nanoparticle หรือในรูปทั้ง magnetite หรือ maghemite

ในการสกัดเบื้องต้น (pretreatment) อาศัยการทำลายโครงสร้างเซลล์หรือ matrix ตัวอย่างด้วยแรงทางกายภาพ (บด ปั่น ฯลฯ) หรือแรงทางเคมี (ใช้อุณหภูมิสูง ใช้ strong detergents หรือใช้เอนไซม์ย่อย

โปรตีน (proteinase K or protease) การทำลายโครงสร้างของ matrix ทำให้กรดนิวคลิอิกปลดปล่อยออกจาก matrix สู่บัฟเฟอร์ที่ได้จากขั้นตอนแรก และ เมื่อใส่สารละลายเกลือ ความเข้มข้นของ chaotropic สูง เช่น guanidinium chloride หรือ guadinidium thiocyanate ที่ต้องรักษาความเข้มข้นให้สูงเกินกว่า 2 M ในสารละลายตัวอย่าง นั่นหมายความว่า ความเข้มข้นเริ่มต้นของสาร chaotropic ควรเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่า 8 M สำหรับ guadinidium chloride (กรณีผสม 1:4) และ 5-7 M ของ guanidinium thiocyanate กรณีผสม ผสม 1:4-5 และต้องมีความเข้มข้นของ EDTA 5-15 mM นอกจากนี้ในบัฟเฟอร์ต้องมี reducing agent ที่แรง เช่น DTT โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น 0.1 mM DTT

กลไกการสกัดดีเอ็นเอสำหรับวิธีการที่พัฒนานี้ อยู่บนพื้นฐานการทำให้โปรตีนในตัวอย่างจะเสียสภาพอย่างรุนแรง ขณะที่กรดนิวคลิอิกจะเกิดการคลายตัวของสายจนเป็น single strand และปลดปล่อยออกมาจากตัวอย่าง วิธีดังกล่าวสามารถใช้กับ การสกัดดีเอ็นเอ จากทุกแหล่ง ทุกชนิดของ matrix ที่ต้องการสกัดโดยไม่มีข้อจำกัด และเมื่อใส่ เรซิ่นสังเคราะห์ ดีเอ็นเอจะจับตัวกับเรซิ่นสังเคราะห์ ขณะที่โปรตีนต่างๆ จะไม่จับตัว ทำให้คงเหลืออยู่ในสารละลาย เมื่อผ่านสารละลายเข้าสู่บริเวณที่มีสนามไฟฟ้าsilica resin ที่เป็น ferrous oxide จะถูกกักตัวไว้ด้วยสนามแม่เหล็ก ความเข้มข้นของสนามควรสูงกว่า 100 emu/gFe หรือมี saturate field strength สูงกว่า 200 kA/m หรือ 2.7 kOe หากเป็น NaFeB magnet มีค่า BH max มากกว่า 200 kJ/M3 หรือสนามแม่ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของไฟฟ้าในรูปแบบใดๆ การจับตัวของดีเอ็นเอกับเรซิ่นสังเคราะห์

การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาขั้นตอนการปฏิบัติการผ่าน inlet ที่ได้ออกแบบไว้ทั้งหมด 5 ช่อง โดยแต่ละช่องในส่วนของ inlet จะทำหน้าที่ด้วยวัตถุประสงค์ที่จำเพาะในขั้นแรกการนำดีเอ็นเอในรูป crude extract จากขั้นตอน pretreatment ที่ได้ มาผสมรวมกับสารละลาย chaotropic เข้มข้นที่มีสารรีดิวซ์ซิงและเรซิ่นสังเคราะห์ในรูป ferrous oxide เรซิ่นจะจับดีเอ็นเอ จากนั้นปล่อยสารละลายเข้าสู่ระบบโดยใช้ช่องหมายเลข (1) (ภาพที่ 4)สารละลายที่ประกอบด้วย chaotropic agent สารรีดิวซ์ซิงและเรซิ่นสังเคราะห์ ดีเอ็นเอจะถูกจับไว้บนผิวของ เรซิ่นสังเคราะห์ ระดับปริมาณดีเอ็นเอขึ้นกับปริมาณเรซิ่นสังเคราะห์ ซึ่งในทางปฏิบัติหากใช้เรซิ่น 7-10 uL จะจับดีเอ็นเอได้ 1 ไมโครกรัม สารละลายดีเอ็นเอรวม เมื่อผ่านสนามแม่เหล็กตัวสนามแม่เหล็กจะจับเรซิ่นโลหะ ferrous oxide ซึ่งมีดีเอ็นเอจับอยู่บนบริเวณพื้นผิวไว้ที่บริเวณปฏิกริยา (บริเวณสีชมพู)ส่วนที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอจะไหลผ่านบริเวณปฏิกิริยาออกไป และถูกกำจัดออกที่ outlet ขั้นตอนต่อมาได้แก่การล้างดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ โดยใช้ช่องหมายเลข (2) จนสะอาดโดยใช้ปริมาตรบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร การล้างดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ในขั้นที่ 2 นี้ทำโดยการใช้สารละลาย แอลกอฮอล์ alkanol 80 % มีคาร์บอนอยู่ 2-3 คาร์บอน มีเกลืออยู่ 0.1 M NaCl และ EDTA 0.1-2 mM ในบัฟเฟอร์ 5 mM Tris HCl โดยเอธานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ดีที่สุด จากนั้นเป่าให้แห้งโดยการผ่านอากาศเข้าสู่ช่องหมายเลข (3) ถือว่าการสกัดดีเอ็นเอภายในชิปเสร็จสิ้นลง (ภาพที่ 4)

2.2.5. ประเมินผลการสร้างระบบสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ทดสอบความสามารถ ในการสกัดดีเอ็นเอ อยู่บนพื้นฐานการสกัดและตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยดำเนินการกับตัวอย่างที่ได้จากการผสมระหว่าง matrix ต่างกัน 2 matrixes ได้แก่ ถั่วเหลืองในข้าว ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้นำมาแยกในสนามไฟฟ้าด้วย 2% TAE gel

การสกัดดีเอ็นเอจาก matrix ร่วม โดยใช้เนื้ออาหารผสมระหว่างถั่วเหลืองและข้าวในอัตราส่วนต่างกัน พบว่า การใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะต่อยีน lectin ในถั่วเหลือง สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในทุกระดับการปนและเมื่อนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน lectin จะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนได้ในตัวอย่างที่มีระดับปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 0.05% สำหรับในชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจะไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

การสกัดดีเอ็นเอเมื่อใช้เนื้อถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบใช้เวลาทั้งสิ้น 30 นาที และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีปกติที่ต้องใช้เวลามากกว่า 3.5 ชั่วโมง พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอบนชิปช่วยลดระยะเวลาลงได้ 7 เท่า ใช้สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอน้อยกว่าและที่สำคัญกระบวนการทั้งหมดลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือหลักเช่น เครื่องปั่นตกตะกอน และสารละลายไฮโดรคาร์บอน ที่นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดยทั่วไป

อย่างไรก็ดี ผลการทดลองยังพบว่า หากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้เริ่มต้นจากเนื้ออาหารที่น้อยกว่าระดับ 50 มิลลิกรัม ระดับปริมาณดีเอ็นเอส่วนหนึ่งจะสูญเสียไปขณะสกัด โดยโครงสร้าง PDMS จะดูดซับดีเอ็นเอ ให้ติดกับโครงสร้าง ทำให้การสกัดดีเอ็นเอไม่มีประสิทธิภาพ

สำหรับรูปแบบการนำส่งดีเอ็นเอสู่ระบบ จึงประกอบด้วย 2 รูปแบบ ได้แก่

1. การ Dry DNA ละลายให้อยู่ในรูปสารละลายแล้วส่งผ่านไปสู่บริเวณที่ต้องการทำปฏิกิริยาในรูปสารละลาย

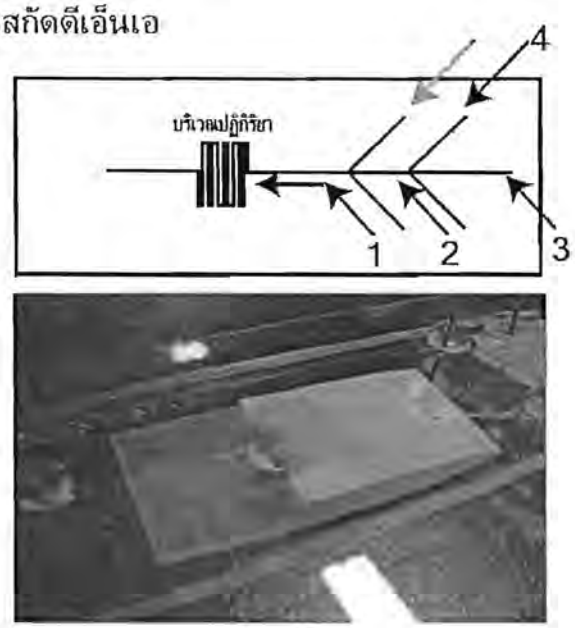
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงไปยังบริเวณที่มีดีเอ็นเอจับคู่

อย่างไรก็ดี จากผลการทดลองหากพิจารณาระบบต่อเนื่องระหว่างการสกัดดีเอ็นเอและระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า การนำระบบต่อเนื่อง จะเป็นอุปสรรคต่อการคำนวณปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการส่งต่อ ดังนั้น การลดโอกาสในการละลายดีเอ็นเอในสารละลายด้วยบัฟเฟอร์แล้วใช้ตัวสารละลายปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเข้าไปในระบบโดยตรง จะทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ละลายออกมามีปริมาตรที่ได้รับการควบคุมได้ง่ายกว่าและอยู่ในภาวะใช้งานได้ดีกว่า

การทดลองต่อมาจึงส่งผ่านสารละลายในระบบเพื่อเชื่อมโยงและส่งดีเอ็นเอเข้าสู่ระบบเพิ่มปริมาณโดยตรงภายหลังการตากดีเอ็นเอบน resin ให้แห้งโดยใช้ลมผ่าน micro channel ที่สร้างขึ้นและผ่านสารละลายปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเข้าสู่บริเวณปฏิกิริยา

การทดลองพบว่าการผ่านสารละลายดีเอ็นเอโดยฉีดปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณเข้าสู่ระบบ สามารถควบคุมได้โดยการใช้อุปกรณ์ควบคุมปฏิกิริยา อัตโนมัติ ซึ่งจะช่วยควบคุมการไหลของของไหล เข้าสู่

บริเวณปฏิกิริยาได้ ที่สำคัญต้องคำนวณให้การไหลของปฏิกิริยาไปหยุดลงในส่วนสุดท้ายของบริเวณปฏิกิริยาพอดี ซึ่งหมายถึงจะต้องใช้ปริมาตรของไหล 7-10 ไมโครลิตร เข้าสู่บริเวณปฏิกิริยา แล้วทิ้งไว้เกินกว่า 2-5 นาที



ภาพที่ 4 โครงสร้างของชิปสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นและระบบการทำงานที่ประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยผ่านสารละลายต่างๆ เข้าสู่บริเวณปฏิกิริยาผ่านช่องรับหมายเลข 1-4 บริเวณปฏิกิริยา (บริเวณทบตัว) และช่องถ่ายสารละลายออกจากระบบ (ภาพบน) และแสดงการจับดีเอ็นเอบนเรซิ่นในบริเวณปฏิกิริยา โครงสร้างดังกล่าวช่วยให้สามารถสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณได้ทั้งอิสระและต่อเนื่อง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอบนชิปพบว่าเมื่อตรวจระบบการตรวจสอบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเมื่อใช้ถั่วเหลืองเป็น specimen ร่วมกับ matrix กลางเป็นข้าว และระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน lectin ขนาด 118 นิวคลิโอไทด์ที่จำเพาะต่อถั่วเหลืองเท่านั้น (MacCormick *et al.*, 1998)

ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพ(แสดงดังภาพที่ 5) ชี้ให้เห็นว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองแม้เพียงการปนในระดับ0.005% ได้ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอนี้มีประสิทธิภาพไม่ต่างจากการสกัดดีเอ็นเอปกติที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ และแสดงให้เห็นว่าโดยการจับตัวของเรซิ่นสังเคราะห์ในบริเวณปฏิกิริยา (reaction area) ดีเอ็นเอที่จับอยู่บนเรซิ่นมีความสะอาด(ไม่มีการปนของโมเลกุลยับยั้งเกินกว่าปริมาณรับได้)และมีปริมาณมากพอที่จะเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR อย่างไรก็ดีระดับปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณ matrix เริ่มต้น ดังนั้นยังคงจำเป็นที่ต้องศึกษาชนิดและระดับปริมาณของเนื้อ matrix สูงสุดหรือต่ำสุดที่สามารถใช้งานบนชิปได้ต่อไป อย่างไรก็ดีการที่ดีเอ็น

เอที่สกัดสามารถนำมาทำปฏิกิริยา PCR ได้ดีบ่งบอกได้ว่าจะสามารถนำดีเอ็นเอเดียวกันมาใช้เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP ได้ด้วยเช่นกัน

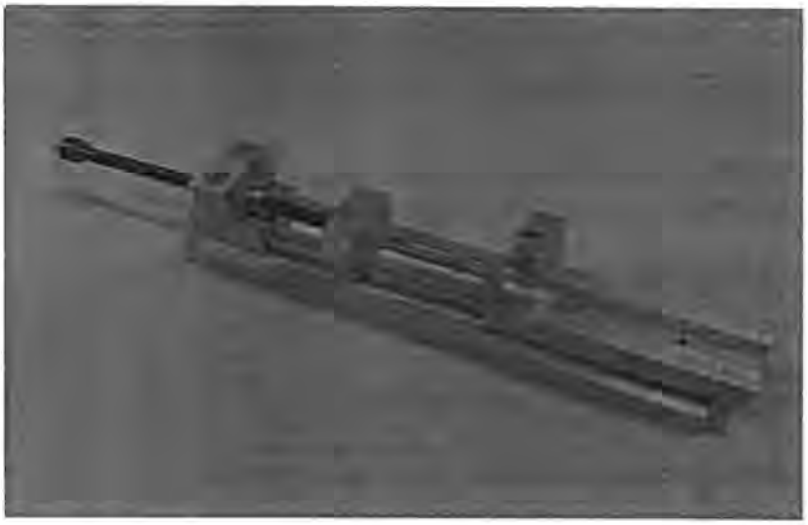
ภาพที่ 5 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจาก matrix ตัวอย่างโดยการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์จำเพาะต่อ lectin ยีน โดยเทคนิค PCR เลน M 100 นิวคลอโอไทด์มาร์เกอร์ เลน 1-16 ได้แก่ ดีเอ็นเอควบคุมบวกและ ดีเอ็นเอจาก matrix ถั่วเหลืองใน matrix ข้าว 100% 50% 20% 10% 5% 2% 1% 0.5% 0.1% 0.05% 0.01% 0.005% 0.001% 0.0005% และชุดควบคุมลบ (non template control)ตามลำดับ

2.2.6. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมปฏิกิริยาในระบบ

ได้ออกแบบและจัดทำอุปกรณ์ควบคุมอัตราไหลของของไหล (microfluidic) โดยใช้วัสดุอลูมิเนียมหล่อ อุปกรณ์ดังกล่าวควบคุมของไหลแรงดันที่เกิดจากการปรับหมุนปุ่มกลไกด้วยมือกลไกอย่างง่ายและราคาถูกการใช้งานดำเนินการผ่าน ตรวจสอบอุปกรณ์ฉีดสารละลายโดยใช้ syring ขนาด 1 ml เป็นหลัก

อุปกรณ์ควบคุมปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 ระบบ ได้แก่อุปกรณ์การไหลของของไหลในระบบให้เกิดความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาต่างๆ ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์และอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา ในขั้นต้นพบว่าอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิสามารถใช้ heat block ปรับประยุกต์ได้โดยง่าย การวิจัยและพัฒนาในครั้งนี้จึงเน้นการพัฒนาระบบการควบคุมของไหล ที่มีโครงสร้างอย่างง่าย ราคาถูกและมีความเหมาะสมเป็นหลัก

ได้ดำเนินการพัฒนาอุปกรณ์ควบคุมสารละลายในรูปแบบ micromanipulator อย่างง่าย เพื่อลดความผิดพลาดในการควบคุมการไหลของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาโดยเลือกใช้วัสดุอลูมิเนียม ร่วมกับโลหะทองเหลืองและน็อตเหล็ก โดยอาศัยการเคลื่อนตัวของเกลียวน็อตตัวผู้ ผ่านแท่นอลูมิเนียมที่จัดทำขึ้นที่มีส่วนประกอบของน็อตตัวเมียติดอยู่ ไปทดแทนระยะขจัดของแทนที่ตัวอยู่กับก้านที่ต่ออยู่กับหลอดฉีดยา (ภาพ 6)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของอุปกรณ์ควบคุมสารละลายในรูป micromanipulator อย่างง่าย

มิติของแท่นอุปกรณ์ประกอบด้วย ตัวแท่น กว้างxยาว=17.5x4 ซม. ฐานรับ syring กว้าง x ยาว 7x2.52 ซม. แซะล่องสามเหลี่ยมลึก 0.5 ซม. แทนล็อค หลอดฉีดยา กว้างxสูงxหนา=2.75x2.52x0.9 โดยยึดตัวน็อตขนาด 1.5 หุน น็อตส่งแท่นบังคับหลอดฉีดยา ยาว 10 ซม. แท่นบังคับหลอดฉีดยา กว้างxยาวxสูง = 2.75x2.5x2.5 ซม.

การใช้งานบังคับการไหลของของไหลโดยใช้นิ้วมือควบคุมแรงดันที่เกิดขึ้นในหลอดsyring โดยตรงต้น ทุนของชุดอุปกรณ์ ชุดละ 650 บาท (ไม่รวมต้นทุนค่าแรงงานและค่าวัสดุ)

2.2.7. ขึ้นรูปแบบและทดสอบระบบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากประเด็นปัญหาที่สำคัญของประเทศ การประเมินความสำคัญในประเด็นความจำเป็นในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์สำหรับภาคอุตสาหกรรมอาหารพบว่า ประเด็นปัญหาการปนของปลาปักเป้าในอาหาร เป็นประเด็นที่ต้องการดำเนินการอย่างเร่งด่วนเนื่องจากเป็นประเด็นที่กฎหมายควบคุมอาหารที่ใกล้ดำเนินการบังคับใช้แล้วแต่ไม่มีวิธีการปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพรองรับ ดังนั้น เพื่อให้ตอบสนองและเป็นไปตามความต้องการในการบังคับใช้ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการปนของเนื้อปลาปักเป้าในอาหาร การดำเนินการของโครงการจึงเริ่มจาก

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออยู่บนพื้นฐานหลักการ isothermal DNA amplification (Notomi *et al*, 2000) โดยในขั้นต้นเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถตรวจการปนของเนื้อปลาปักเป้าโดยการสืบค้นยีนที่เป็นยีนร่วม ออกแบบไพรเมอร์จากยีนเป้าหมายนั้น พัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณโดยประกอบปฏิกิริยาและการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา ศึกษาความไวของปฏิกิริยาความจำเพาะและการทดสอบกับเนื้อตัวอย่างอาหารจริง

ทำนองเดียวกันการดำเนินการยังให้ความสำคัญต่อการตรวจการปนของวัตถุดิบที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ เช่น การตรวจการปนของถั่วลิสงและถั่วเหลือง โดยดำเนินการในรูปแบบเดียวกันกับการตรวจการปนของเนื้อปลาปักเป้า

เนื่องจากหัวใจสำคัญในการทดสอบผลการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับการแสดงสัญญาณดีเอ็นเอและการแปลผลของสัญญาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์ ในการตรวจวิเคราะห์อาหารสัญญาณดีเอ็นเอเริ่มต้นมีอยู่น้อย ความจำเป็นที่ต้องเพิ่มปริมาณสัญญาณเข้าสู่ระดับที่ตรวจสอบได้ ทำให้ต้องพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะกับระบบตรวจนั้นๆ

และเนื่องจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้น ควรมีเงื่อนไขปฏิกิริยาที่เอื้ออำนวยต่อการดำเนินการอย่างง่ายและต่อเนื่องบนชิป โดยไม่ต้องพึ่งพาเครื่องมือ นอกจากนี้ต้องดำเนินการต่อเนื่องโดยใช้เวลาอันสั้น ดังนั้นโครงการ จึงเลือกใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว ซึ่งอยู่บนหลักการการขจัดสายดีเอ็นเอ (strand displacement) ขณะสังเคราะห์ หรือเพิ่มปริมาณปฏิกิริยาดังกล่าวอยู่บนกลไกการสังเคราะห์สายใหม่ พร้อมๆ กันกับการดันสายเก่าให้หลุดออก โดยหลักการการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวในปฏิกิริยาจำเป็นต้องอาศัยไพรเมอร์หลัก 2 คู่ จำเพาะต่อ 6 บริเวณ ได้แก่ ไพรเมอร์ คู่นอก (outer primer) และไพรเมอร์คู่ใน (inner primer) (Notomi et at, 2000) การพัฒนาในครั้งนี้จึง ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อบริเวณของยีน sagitoxin binding protein ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายสำหรับเป็นต้นแบบในการตรวจการปนของปลาปักเป้าในอาหาร

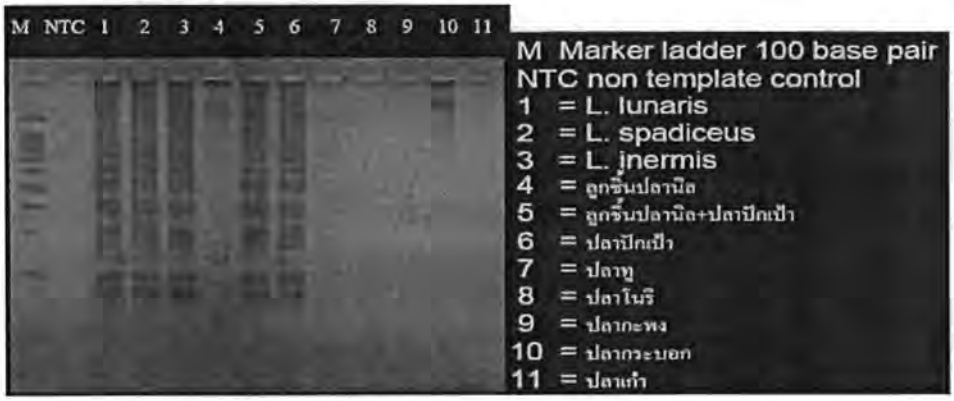
การศึกษาเบื้องต้น พบว่าสำหรับประเทศไทย ปลาปักเป้าส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์และมีการลักลอบนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเป็นชนิด *Lagocephalus lunaris*, *L. inermis* และ *L. spadiceus* โดยการปะปนมักเกิดขึ้น ณ ต้นทางการผลิต ทั้งจากแพปลาและล้งปลา และจากโรงงานแปรรูปอาหารขนาดเล็กที่กระบวนการผลิตไม่รัดกุม หรือมีการลักลอบ ทำให้ยากต่อการควบคุม กำกับดูแลโดยเจ้าพนักงาน และเงื่อนไขดังกล่าวทำให้จะต้องตรวจสอบการปนในบริเวณแพปลา ล้งหรือโรงงานในภาคสนาม ซึ่งเป็นข้อจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีการตรวจให้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญการและไม่พึ่งพาห้องปฏิบัติการ เพื่อช่วยให้การตรวจสามารถทำได้ในภาคสนาม ณ จุดที่ต้องการโดยตรง

การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดบนพื้นฐานของยีนsagitoxin binding protein ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนจับตัวกับพิษการทดลองพบว่า การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ สามารถดำเนินการได้โดยใช้เนื้อ matrix ปลา ผสมลงกับตัวอย่างบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย 100 mM Tris HCl pH 8.0 1 mM EDTA 300 mM NaCl Proteinase K (> 600 Au/mL) และ 0.1% mecapto ethanol โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 56^{0}C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วสูงสุด 3 นาที ส่วนกระบวนการอื่นเป็นไปตามที่รายงานก่อนหน้านี้ การทดสอบปฏิกิริยาเมื่อไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน พบว่าไพรเมอร์สามารถให้รูปแบบดีเอ็นเอเฉพาะตัว ขนาดที่เป็น ผลคูณของดีเอ็นเอขนาด 180 nt การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา (specificity) กับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้ออาหาร ที่เป็นปลา 9 ชนิด ได้แก่

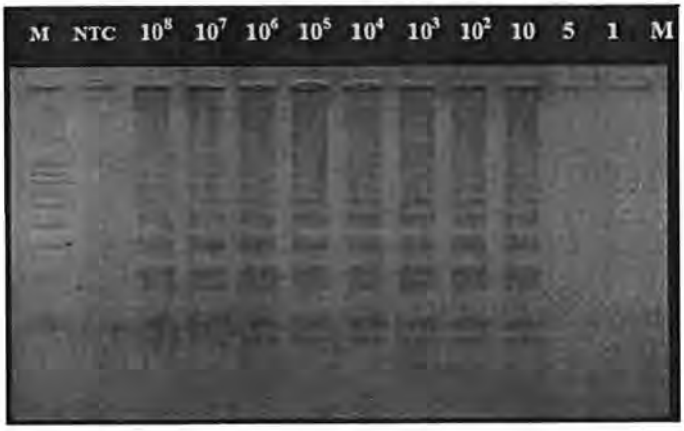
ปลา *L. lunaris, L. spadiceus,* และ *L. inermis* เป้าหมายและเน้น ปลานิล ปลาทู ปลาโนรี ปลากะพง ปลากระบอก ปลาเก๋า พบว่าชุดไพรเมอร์ให้ความจำเพาะต่อปลา *Lagocephalus lunaris, L. inermis* และ *L. spadiceus* เท่านั้น (ภาพที่7)

การทดสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนในรูปแบบ copy number จาก 10^5 10^4 10^3 10^2 10 5 และ 1 ชุด พบว่าชุดไพรเมอร์และปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบการปนของปลาปักเป้าในตัวอย่างได้ในระดับ 10 copy ของดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 8)

การตรวจการปนของเนื้อปลาปักเป้าในอาหารโดยใช้เนื้ออาหารหลากชนิด พบว่า สามารถจำแนกการปนของเนื้อปลาผ่านความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบจากแถบดีเอ็นเอได้โดยเฉพาะในเนื้ออาหารที่มีการปนและไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในอาหารที่ไม่มีการปนของวัตถุดิบปลาปักเป้าแต่อย่างใด (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 การตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เลน 1-11 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากปลาต่างชนิด ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ



ภาพที่ 8 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เลน 1-11 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุดจาก 100,000,000 ถึง 1 ชุดตามลำดับ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

ภาพที่ 9 การตรวจสอบการปนของวัตถุดิบจากปลาปักเป้าในเนื้ออาหารชนิดต่างๆ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ ตัวอย่างควบคุมเป็นดีเอ็นเอผสมจากปลาทั้ง 3 ชนิด

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์และระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะและมีความไว สามารถใช้ตรวจสอบตามที่ต้องการและตรวจสอบการปนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.8. การสร้างรูปแบบจำลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการคัดเลือกระบบการตรวจสอบ

การศึกษาระบบการตรวจสอบในปัจจุบันทั้งที่อยู่บนพื้นฐานการตรวจสอบบนหลักการหลัก 3 ส่วน ได้แก่ ด้านไฟฟ้าเคมี ด้านการจับตัวโดยใช้โมเลกุลไบน์เดอร์และด้านการเปลี่ยนแปลงทางแสงอันเนื่องจากปรากฏการณ์ถ่ายทอดพลังงานหรือพลาสมอน โดยเน้นการศึกษาบนพื้นฐานของรูปแบบการสร้างโมเดล ความเป็นไปได้ในแนวทางการตรวจวิเคราะห์ การเชื่อมโยงเข้ากับระบบ และความเป็นไปได้ในการใช้งานจริง โดยเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของแต่ละโมเดล ความเป็นไปได้ทางเทคนิค ประสิทธิภาพและการประเมินผลทางเศรษฐศาสตร์ พร้อมคัดเลือกโมเดลที่เหมาะสมพัฒนาไปสู่เพื่อการตรวจสอบ

ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่วนสำคัญที่สุดของปฏิกิริยานอกจากการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว การตรวจสัญญาณดีเอ็นเอบนชิป เพื่อตัดสินใจสรุปผลสำหรับการวิเคราะห์ เป็นสิ่งสำคัญในการตรวจเช่นกัน

ปกติการตรวจวินิจฉัยผลการทดสอบที่อยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มปริมาณปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบได้จากการนำดีเอ็นเอตัวอย่างไปแยกด้วยสนามไฟฟ้า การวินิจฉัยผลจึงขึ้นอยู่กับการพบหรือไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในขนาดที่คาดหวัง หรือในบางกรณีอาจใช้โพลบดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอมาจับเพื่อยืนยันผล ขั้นตอนเหล่านี้เป็นอุปสรรคต่อการวินิจฉัยทำให้เกิดความยุ่งยากและเสียเวลา นอกจากนี้ทำให้การตรวจวิเคราะห์ต้องพึ่งพาอุปกรณ์เพิ่มมากขึ้น

ด้วยคุณสมบัติของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระบบ LAMP ที่ต่างไปจาก PCR ทำให้รูปแบบในการวินิจฉัย ผลการตรวจสอบของ LAMP มีทั้งส่วนที่ต่างไปจาก PCR และส่วนที่สามารถนำหลักการเดียวกันมาร่วมประยุกต์ใช้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี LAMP เต็มไปด้วยประสิทธิภาพ ปฏิกิริยาสังเคราะห์ที่ดำเนินไปทุกวินาทีและในทุกครั้งที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ยาวขึ้นทีละmonomer (เกิด polymerization) substrate dNTP จะถูกใช้งานแล้วเปลี่ยนเป็น PPi ผลดังกล่าวทำให้เกิดการสะสมขาวตะกอนขุ่นขาวของแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตในหลอดทดลอง Notomi *et al.*,(2000)ได้ใช้ตะกอนแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต เป็นดัชนีในการสร้างสัญญาณดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณที่ประสบผลจะช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดความขุ่นและความขุ่นดังกล่าวใช้เป็นหลักในการชี้วัดปฏิกิริยา อย่างไรก็ดีความขุ่นเป็นตัวแปรที่อาจไม่เห็นเด่นชัด จึงไม่ได้เลือกใช้สำหรับการพัฒนาในครั้งนี้

นอกจากความขุ่นของตะกอนแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตแล้ว การตรวจวัดดีเอ็นเอโดยตรง จะทำให้มั่นใจว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประสบความสำเร็จอย่างแท้จริง โครงการได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการเลือกใช้วิธีการตรวจวัดรูปแบบต่างๆ เช่น การนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยปฏิกิริยา LAMP มาตรวจสอบโดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้าซึ่งเป็นวิธีการที่ตอบวัตถุประสงค์ได้ตรงประเด็น สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน สร้างความเชื่อมั่นในผลการตรวจวิเคราะห์ที่ตรวจสอบได้ด้วยสายตา จึงทำให้เป็นที่นิยม นอกจากนี้ยังได้นำวิธีการใช้โมเลกุลเรืองแสงในรูป DNA binder มาประยุกต์ในการตรวจสอบสัญญาณ สารในกลุ่มนี้สามารถจับตัวกับโครงสร้าง minor groove ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง double helix ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ดังนั้นหากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคLAMP ประสบผลสำเร็จ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมากมาย ซึ่งเมื่อผสมรวมกับโมเลกุลเรืองแสงที่เป็นminor groove binder จะทำให้เกิดการเรืองแสงที่ตรวจสอบได้

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว การวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีซึ่งเป็นการวิเคราะห์อีกรูปแบบหนึ่งได้กำลังรับความสนใจมาก โดยหลักการ การวัดจะใช้อิเล็คโทรด(electrode)เล็กๆ ตรวจวัดความต่างศักย์หรือการไหลของกระแสไฟฟ้าในตัวอย่าง ในระบบที่เป็นสารละลายสามารถทำได้โดยตรงโดยมีเงื่อนไขว่าจะต้องกระตุ้นระบบให้มีการส่งต่อ ส่งผ่านหรือสะสมอิเล็คตรอนผ่านพื้นผิวของอิเลคโทรด การกระตุ้นทางไฟฟ้าให้เกิดภาวะดังกล่าวทำได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ การเน้นสะสมสัญญาณ (ดีเอ็นเอ) หรือระบบอิเลคโทรด ผ่านทางการจับตัวของดีเอ็นเอลงบนผังพื้นผิวของอิเลคโทรด ทั้งในรูปดีเอ็นเอที่ได้จาก probe หรือจากตัวอย่างอย่างใดอย่างหนึ่ง และการใช้ตัวกลางที่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอเป็นตัวส่งสัญญาณ กรณีหลังไม่เน้นการจับตัวบนพื้นผิวของอิเลคโทรด จึงทำให้ทำงานได้ง่ายและรวดเร็ว ตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ของการตรวจวิเคราะห์ในลักษณะ point of care ได้เป็นอย่างดี

การศึกษาจากกลไกการตรวจดีเอ็นเอทางทฤษฎี พบว่า การตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมีอยู่บนพื้นฐานความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดแรงเคลื่อนของประจุ (แรงเคลื่อนไฟฟ้า voltage) ผลักดันให้ประจุเคลื่อนไปในวงจรในลักษณะเดียวกันกับที่เกิดขึ้นในแบตเตอรี่และถ่านไฟฉาย โดยปกติในปฏิกิริยา

ทางเคมีที่มีความต่างทางศักย์ทางไฟฟ้าโดยธรรมชาติประจุลบจะเคลื่อนเข้าหาขั้วบวก และประจุบวกจะเคลื่อนเข้าหาขั้วลบ ความกระตือรือร้นที่จะเคลื่อนที่ไปของประจุ หากมีมากจะเรียกว่ามีความต่างศักย์สูง ซึ่งสามารถวัดความต่างศักย์เหล่านี้ได้ด้วย volt meter เมื่อครบวงจรความต่างศักย์ที่สูงนี้จะกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนตัวของอิเล็คตรอนไปในวงจรที่เรียกว่า การไหลของกระแสไฟฟ้าซึ่งตรวจวัดได้ด้วยวิธีทาง ampero meter

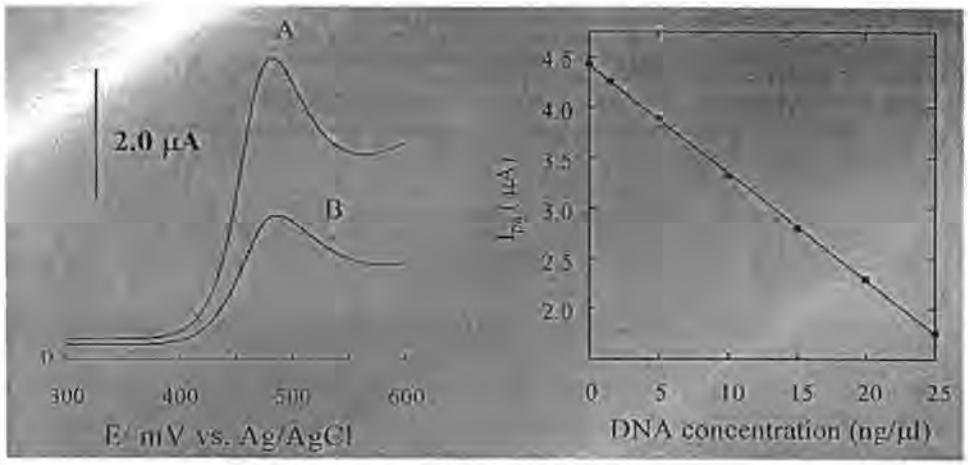
ในวงจรไฟฟ้าใดๆ หากเพิ่มค่าความต่างศักย์ไปเรื่อยๆจะพบการเปลี่ยนแปลงของกระแส (A) เกิดขึ้นที่ขั้วไฟฟ้า หากนำมา plot เป็นกราฟจะได้กราฟของค่ากระแสที่ล้อตามการเพิ่มของแรงเคลื่อนไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงของประจุอิเล็คตรอนในปฏิกิริยาใดๆสามารถหา peak ของกระแสหรือค่าสูงสุดได้

ในทางปฏิบัติ การวัดการเปลี่ยนแปลงของประจุของปฏิกิริยาเคมีใดๆ จะต้องนำปฏิกิริยาเคมีที่ให้ประจุมาวางบนพื้นผิวที่ต้องการวัด ในกรณีดีเอ็นเอ ด้วยภาวะปฏิกิริยาปกติการแตกตัวเป็นประจุของดีเอ็นเอคงที่ การวางหยดสารละลายดีเอ็นเอลงบนอิเล็คโทรด ไม่ช่วยให้สามารถตรวจสอบสัญญาณ (signals) ที่เกิดจากการไหลของกระแสไฟฟ้า (อันเนื่องมาจากการปรากฏของดีเอ็นเอความเข้มข้นใดๆ) เด่นชัดนัก จึงจำเป็นต้องอาศัยโมเลกุลเคมีอื่นๆที่จับตัวกับดีเอ็นเอแล้วช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณมาผสมร่วมกันกับดีเอ็นเอ จากการตรวจสอบพบว่าโมเลกุลที่เป็น DNA binder บางชนิดมีคุณสมบัติเหมาะสมสอดคล้องเนื่องจากจะจับตัวกับดีเอ็นเอและกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าได้ดี

ในการทดลอง และผลการทดลองที่ห้องปฏิบัติการได้เคยพัฒนารูปแบบการตรวจวัดมากก่อนพบว่าโมเลกุล Hoechst 33258 ให้ช่วงการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์กว้างที่สุด และใช้ค่ากระแส pulse เพื่อเริ่มต้นต่ำที่สุด เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวจับกับดีเอ็นเอเพื่อการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า โมเลกุล Hoechst 33258 จับตัวกับดีเอ็นเอบริเวณ AT rich domain ในสาย double strand DNA ในส่วน minor groove แต่จะไม่จับตัวกับสาย RNA นอกจากนี้ยังจับตัวกับสายดีเอ็นเอสั้นๆที่เป็น single strand ได้ไม่ดีทำให้ประสิทธิภาพในการจับตัวกับ primer หรือ probe ไม่ดีตาม เหล่านี้เป็นผลดีส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์มีความเฉพาะเจาะจงโดยขจัดสัญญาณที่เกิดจากการปนของ RNA และ oligo DNA ออกไปได้

นอกจากนี้การจับตัวระหว่าง Hoechst 33258 กับดีเอ็นเอจะกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพในเรื่องประจุ หรือเกิดการเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างไปได้และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เมื่อสารละลาย Hoechst 33258 จับตัวกับดีเอ็นเอจะกระตุ้นให้ดีเอ็นเอรวมตัวกันเป็นก้อนหากมีดีเอ็นเอมาก การรวมตัวนั้นก็จะยิ่งชัดเจน ในภาวะที่มีดีเอ็นเอน้อย การจับตัวของ Hoechst 33258 จะเกิดไม่มากทำให้มี free electrons หลงเหลืออยู่มากตาม เมื่อนำไปวางบนพื้นผิวของอิเล็คโทรด จะได้ค่าสูงสุดของกระแสที่นำไปใช้อ้างอิงได้ ในทางตรงข้ามในภาวะที่มีดีเอ็นเอมาก การจับตัวเกิดมาก free electrons ลดลง ค่าการเปลี่ยนแปลงกระแสก็จะลดลงด้วย

ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัดกับค่าสูงสุดของกระแสเป็นไปในลักษณะสมการผกผัน ที่เป็นเส้นตรง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัดกับค่าสูงสุดของกระแส

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ความจำเพาะของปฏิกิริยาที่เหนือกว่าของ LAMP และศักยภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหนือกว่า PCR ถึง 3-8 ออเดอร์ เป็นการเพิ่มระดับสัญญาณที่ตรวจจับได้ให้สูงขึ้นและทำให้ค่าที่อ่านได้มีความถูกต้องแม่นยำ

เนื่องจากการพัฒนาวิธีการตรวจดีเอ็นเอบนชิปสามารถดำเนินการได้หลากรูปแบบ ทั้งตรวจวัดความขุ่น หรือการเรืองแสง หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้า อย่างไรก็ดี ในการดำเนินการในโครงการนี้พิจารณาความเหมาะสมจากความเป็นไปได้ในการเชื่อมโยงระบบการตรวจวินิจฉัยผลให้เข้ากับรูปแบบของชิป การประเมินผลทางทฤษฎีพบว่า การตรวจวัดความขุ่นเป็นระบบการตรวจวินิจฉัยผลที่ไม่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากจะต้องพัฒนาตัวแบบสำหรับวัดการดูดกลืนแสงซึ่งเป็น optical part ที่มีความยุ่งยาก ขณะเดียวกันการวางระบบการตรวจวินิจฉัยผลในรูปแบบการวัดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้าแม้จะสามารถออกแบบให้มีอิเล็คโทรดอยู่บนชิปได้ แต่การตรวจวัดด้วยหลักการนี้จะทำให้การพัฒนาชิปมีความยุ่งยากมีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นและมีต้นทุนที่สูงขึ้น จึงได้เลือกใช้ปฏิกิริยาเรืองแสงจาก ดีเอ็นเอไบนด์เดอร์

การศึกษาเบื้องต้นพบว่าการตรวจสอบสัญญาณจากดีเอ็นเอไบนด์เดอร์ด้วยรังสี UV บนแผ่นชิปสามารถทำได้ทั้งความยาวคลื่น 260 312 315 320 350nm โดยรังสี UV ความยาวคลื่น 312-350 ให้ผลดีโครงสร้างของชิปไม่ส่งผลต่อการสังเกตุผลการเรืองแสง อย่างไรก็ดีรังสี UV ความยาวคลื่น 312 ได้นำไปใช้ประกอบเป็นเครื่องส่องเจลดูการเรืองแสงมากที่สุดและเป็นที่นิยมแพร่หลาย เพื่อให้ระบบการสกัดดีเอ็นเอ ระบบการเพิ่มปริมาณและระบบตรวจสอบทำงานเชื่อมต่อกันอย่างต่อเนื่อง จึงได้ สร้างและวิเคราะห์แบบจำลอง เพื่อศึกษาการทำงานที่เป็นไปได้ในการปรับใช้มากสุด โดยแบบจำลองที่ดำเนินการแบ่งเป็น

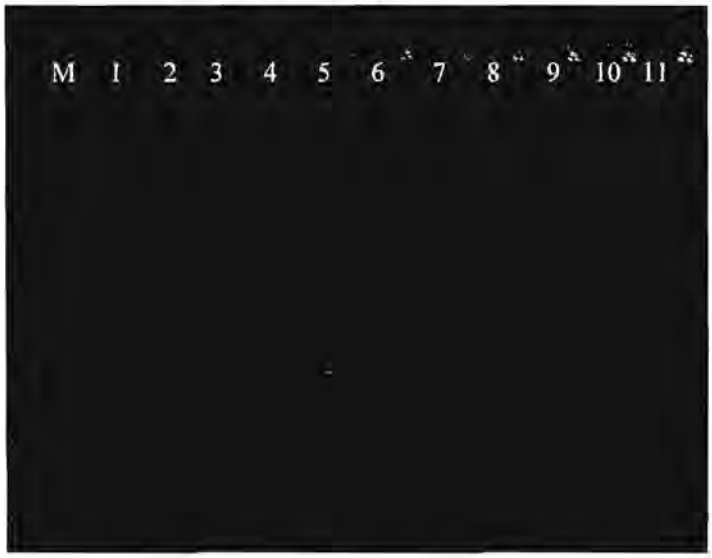
1.แบบจำลองต่อเนื่องระหว่างระบบสกัดดีเอ็นเอและระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2.แบบจำลองต่อเนื่องระหว่างระบบสกัดดีเอ็นเอระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและระบบตรวจสอบโดยใช้เคมีไฟฟ้า

3.แบบจำลองต่อเนื่องระหว่างระบบสกัดดีเอ็นเอระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและระบบตรวจสอบโดยใช้หลักการเรืองแสง

แบบจำลองต่อเนื่องระหว่างระบบสกัดดีเอ็นเอและระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้อที่ 1 เป็นระบบควบคุมที่เน้นการนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบไปแยกด้วยสนามไฟฟ้า เพื่อตรวจสอบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การทดสอบแบบจำลองดังกล่าวโดยใช้เนื้ออาหาร ถั่วเหลือง และระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน lectin พบว่า การสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ chaotopic buffer และ ferrous oxide ตามที่ได้ทดลองในข้อ 1.4 และการส่งผ่านดีเอ็นเอในรูปการละลายด้วยสารละลายปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงตามแบบจำลองนี้ สามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยเมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอไปแยกด้วยสนามไฟฟ้า ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป็นผลคูณของดีเอ็นเอ ขนาด180 นิวคลิโอไทด์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการผ่านสารละลายปฏิกิริยาและผลักดันปฏิกิริยาผ่านท่อ microfluidic ไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 11)

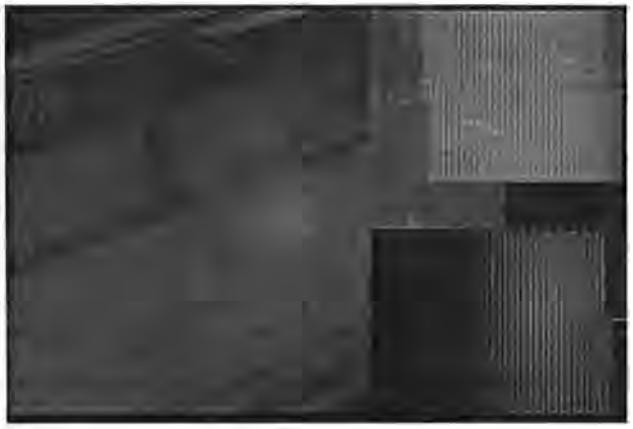


ภาพที่ 11 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป็นผลคูณของดีเอ็นเอ ขนาด180 นิวคลิโอไทด์ของยีน lectin
เลน M มาร์คเกอร์ขนาด 100 nt เลน 1-11 จากซ้าย ดีเอ็นเอควบคุมบวกและ ดีเอ็นเอจาก matrix ถั่วเหลือง50% 20% 10% 5% 2% 1% 0.5% 0.1% 0.05% 0.01% และชุดควบคุมลบ (non template control) ตามลำดับ
ตัวอย่างดีเอ็นเอไวรัสขนาดเท่ากับผลคูณของดีเอ็นเอ ขนาด180 นิวคลิโอไทด์ตามลำดับ

อย่างไรก็ดี เมื่อนำแบบจำลองที่ 2 มาทดสอบทางเคมีไฟฟ้าโดยผ่านผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอลงบนผิวหน้าของ อิเล็คโทรดที่มีสารละลาย Hoechst 33258 อยู่ พบว่าค่า anodic peak ที่วัดได้ 15 วินาทีที่หลังผสมผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมีค่าแปรผันระหว่าง 0.85 ถึง 1.22 μA (ค่า SD=±0.12) การควบคุมการผสมของสารละลาย Hoechst 33258 กับดีเอ็นเอทำได้ยาก ขณะเดียวกันในแง่การประยุกต์พบว่าหากจะต้องวัดการ

เปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า จำเป็นต้องนำ electrode เข้าไปเชื่อมโยงกับตัวชิป ทำให้การดัดแปรชิปมีความยุ่งยาก ซับซ้อนเพิ่มขึ้น และยังทำให้ต้นทุนของชิปเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย

ขณะที่ผลการทดสอบแบบจำลองระบบต่อเนื่องที่ตรวจสอบจำนวนดีเอ็นเอผ่านระบบการเรืองแสง พบว่า การใช้สารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติเป็น specific DNA minorgroove binder วิเคราะห์ สามารถผสม binder เข้าไปกับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง ดังนั้น ในทุกครั้งที่ปฏิกิริยาประสบความสำเร็จ จะพบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตราทวีคูณ ระดับ $>10^{8}$ - 10^{15} โมเลกุล ที่ระดับดังกล่าว binder ที่จับอยู่กับ minorgroove DNA จะก่อให้เกิดการถ่ายทอดพลังงานผ่านการเรืองแสง แสงดังกล่าวมีคุณสมบัติที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าภายหลังส่องบน UV illuminatorหรือแหล่งกำเนิดแสง UV หรือ black light ที่มีอำนาจทะลุผ่านวัสดุ PDMS ขณะที่ binder ที่เป็นอิสระจะไม่เกิดการเรืองแสง การเรืองแสงของปฏิกิริยาเป็นดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การตรวจสอบปฏิกิริยาโดยดูจากการเรืองแสงบนชิปบนแหล่งกำเนิดแสง UV ความยาวคลื่น 312 nm และภาพถ่ายมุมใกล้ภายมนบริเวณปฏิกิริยาเปรียบเทียบระหว่างไม่เรืองแสง (-) ด้านบนขวา และเรืองแสง (+) ด้านล่างขวา

โดยปกติการเรืองแสงสามารถตรวจวัดได้ตามหลักการ Photospectrometry แต่การประกอบชุดตรวจสอบทางแสง จะมีความซับซ้อน และต้องอาศัยตัวตรวจวัดทางแสงซึ่งมีราคาแพง

การศึกษาโมเดลทั้งสามข้างต้นและวิเคราะห์ข้อดีและข้อเสียของแต่ละโมเดลทั้ง 3 ได้ผลดังตาราง

ผลการเปรียบเทียบโมเดลที่ได้ทดสอบ (ตารางที่ 1) พบว่า โมเดลที่ 3 การประยุกต์การตรวจสอบด้วยหลักการเรืองแสงโดยใช้ DNA binder เป็นโมเดลทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดจากทั้ง 3 โมเดลที่ได้พิจารณา จึงได้เลือกใช้โมเดลดังกล่าว เป็นหลัก

โมเดลการตรวจสอบสัญญาณด้วยการเรืองแสงนี้ ช่วยให้การทำงานระหว่างระบบสกัดดีเอ็นเอ ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และระบบการตรวจสอบสัญญาณ มีความต่อเนื่อง ราบรื่นและช่วยให้การควบคุมการไหลของของไหลในปฏิกิริยาไม่ซับซ้อนที่สำคัญไม่จำเป็นต้องควบคุมอัตราการไหลให้คงที่แต่อย่างใด

ตารางที่.1 เปรียบเทียบโมเดลการตรวจวัดบนพื้นฐานการรวมรูปแบบการตรวจที่ต่างกัน.

	โมเดล 1 โมเดลสกัดและเพิ่มปริมาณเท่านั้นโดยตรวจวัดด้วยวิธีปกติ	โมเดล 2 โมเดลสกัดเพิ่มปริมาณและตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า	โมเดล 3 โมเดลสกัด เพิ่มปริมาณและตรวจวัดการเรืองแสง
ข้อดี	- ง่าย ไม่ต้องดัดแปลงโครงสร้างชิปมากนัก - มีต้นทุนการดัดแปลงชิปต่ำสุดในระหว่าง 3 โมเดล	- ตรวจสอบสัญญาณเป็นตัวเลข - การตรวจสอบมีความซับซ้อนปานกลาง - ตรวจสอบได้รวดเร็ว	- ตรวจสอบการเรืองแสงได้ด้วยตาเปล่า - ต้องการการดัดแปลงชิปน้อยกว่าโมเดล 2 - ใช้ต้นทุนการตรวจสัญญาณต่ำสุด -การตรวจสัญญาณไม่ยุ่งยาก - การตรวจสอบสัญญาณทำได้รวดเร็ว
ข้อเสีย	- ใช้เวลาในการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าเพิ่ม 40 นาที - มีค่าใช้จ่ายเพิ่มในการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า	- จำเป็นต้องดัดแปลงโครงสร้างชิปให้รองรับ electrode - มีต้นทุน electrode เพิ่ม - การควบคุมของผสมระหว่างสารละลาย Hoechst 33258 และดีเอ็นเอทำได้ยาก	- ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณในเชิงปริมาณยกเว้นในกรณีดัดแปลงชิปให้มีระบบตรวจวัดทาง photospectrometer

หมายเหตุ ทั้ง 3 วิธีใช้รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและชุดไพรเมอร์เดียวกัน ประสิทธิภาพ ความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยาที่ขึ้นอยู่กับระบบการเพิ่มปริมาณเป็นหลัก ดังนั้นประสิทธิภาพ ความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยาจึงไม่แตกต่างกัน

2.2.9. จัดทำอุปกรณ์ควบคุมการตรวจวัดเพื่อศึกษา และประเมินระบบที่ได้พัฒนาขึ้น

ออกแบบและสร้างอุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบสัญญาณเพื่อการตรวจวัดผลการทดสอบและอุปกรณ์ควบคุมการเปิดปิด ให้สอดคล้องกับโมเดลการตรวจสอบสัญญาณที่ศึกษาได้ในข้อ 8 ในปัจจุบันโครงการได้ดำเนินการออกแบบ จัดทำระบบการตรวจวัดทางฟิสิกส์ในรูปปฏิบัติการเป็นระบบ (micro total analysis) โดยนำโครงสร้างระบบควบคุมอุณหภูมิ โครงสร้างระบบตรวจสอบโดยใช้แหล่งกำเนิดแสงในรูป LED หรือ อุปกรณ์ขนาดเล็กที่ให้แสงคุณภาพเดียวกับ UV หรือ black light

การพัฒนาระบบการทดสอบในข้อ 8 พบว่าการเรืองแสงจะเห็นชัดเจน หากบริเวณปฏิกิริยาจะได้รับการปรับให้ใกล้กับแหล่งกำเนิดแสง นอกจากนี้แหล่งกำเนิดแสง ควรจะส่องจากทางด้านบน เนื่องจากด้านล่างของตัวชิบ ใช้วัสดุกระจกสไลด์ ซึ่งเป็นตัวกั้น UV หรือ black light

การสำรวจความเป็นไปได้โดยดูจากวัสดุแหล่งกำเนิดแสงพบว่าในท้องตลาดมีหลอด LED รุ่นที่สามารถให้แสงสีม่วง มากกว่า 2 ชนิด มีหลอด UV ขนาดเล็กและมีแหล่งกำเนิดแสง UV สำเร็จชนิดพกพา โดยพบว่าต้นทุนของแหล่งกำเนิดแสง UV ทั้ง 3 แหล่ง ชนิด ที่เป็นแบบพกพามีราคาต้นทุนสูงถึง 6 หมื่นบาท และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ขณะที่ต้นทุนของหลอด UV อยู่ที่ 2500 บาท ขณะที่ของ LED อยู่ที่ 150-200 บาท

ปัจจุบันโครงการอยู่ในระหว่างการตรวจสอบปฏิกิริยาเรืองแสงบนตัวชิปกับหลอด LED โดยที่ผ่านมาผู้วิจัยได้ทดสอบการใช้งานหลอด LED สำเร็จรูปกับการตรวจปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 200 µl พบว่าสามารถเห็นสัญญาณการเรืองแสงได้เช่นกัน (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 13 การตรวจปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 200 µl ด้วยหลอด UV แบบ LED

อย่างไรก็ดี การทดสอบผ่านพื้นผิว PDMS ในระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสงที่ต่างกัน จะต่างไปอย่างสิ้นเชิงกับการตรวจสอบไปที่หลอดทดลอง

และเนื่องจากในระหว่างการพัฒนาจำเป็นต้องใช้งบประมาณ ซึ่งโครงการเพิ่งได้รับงบประมาณในงวดที่ 2 ดังนั้นผลการดำเนินการในส่วนนี้จึงยังไม่ปรากฏ

2.2.10. จัดทำระบบการตรวจวัดทางฟิสิกส์ในรูปแบบ μ-TAS เพื่อการแสดงผล

นำอุปกรณ์และโครงสร้างที่ได้จากข้อ 2.2.1 ข้อย่อย 1) 5) 6) และ 9) มาทำการทดสอบร่วมเพื่อตรวจวัดผลการวิเคราะห์ใน μ-TAS ทางกายภาพ อุปกรณ์ควบคุมที่คาดว่าจะดำเนินการ เกี่ยวข้องกับการควบคุมการไหลของของไหลที่สามารถควบคุมการเริ่มต้นการหยุดของปฏิกิริยาจาก 2 ช่อง channel อย่างไรก็ดีเนื่องจาก การควบคุมการทำงานของปฏิกิริยาสามารถใช้การผ่านปฏิกิริยา 1 channel ด้วยอุปกรณ์ควบคุมที่พัฒนาขึ้นในข้อ 6 โดยใช้มือ จึงทำให้ความสำคัญของการดำเนินการถูกจัดอยู่ใน priority ที่ต่ำกว่า นอกจากนี้เหตุผลสำคัญอีกประการหนึ่งคือ โครงการรับงบประมาณงวดที่ 2 (ที่เหลืออีก ประมาณ 60%) จึงทำให้ยังไม่สามารถดำเนินการในส่วนนี้ได้ ดังนั้นจึงได้ชะลอการดำเนินการไว้และหากได้รับงบประมาณส่วนที่ขาดนี้แล้ว คาดว่าจะเร่งดำเนินการได้ทันที

2.2.11. วางระบบขึ้นรูปและผสานการเชื่อมต่อ

การรวมระบบการสกัดดีเอ็นเอระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและระบบการตรวจสอบสัญญาณ ที่ได้ดำเนินการมาในข้อ 2.3-2.8 จากที่มีอยู่ เข้าด้วยกันบนชิปเดียว ใช้รูปแบบและโครงสร้างชิปเดิม ที่ออกแบบไว้ และดำเนินการทดลองระบบสกัดดีเอ็นเอ ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการตรวจสอบสัญญาณอย่างต่อเนื่อง

เนื่องจากตัวโครงสร้างชิปได้รับการออกแบบบนพื้นฐานแนวคิดการทำงานร่วมอย่างต่อเนื่องของปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากการวางแผนประสบการณ์ของผู้วิจัยและที่ปรึกษาดำเนินการมาก่อนหน้านี้แล้ว ในขั้นต้นได้ดำเนินการทดสอบแยกแต่ละระบบโดยใช้ชิปเดิมหลังจากนั้นจึงดำเนินการเชื่อมโยงต่อเนื่อง การทดลองเบื้องต้นได้ผลเป็นดังที่คาดไว้ กล่าวคือสามารถทำปฏิกิริยาต่อเนื่องได้ จึงได้ดำเนินการผสานการเชื่อมต่อ ตามที่ได้วางแผน

การเชื่อมต่อระบบการสกัดดีเอ็นเอ ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และระบบตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ ดำเนินการสอดล้อกับผลการพัฒนาระบบทั้ง 3 ข้างต้น โดยสำหรับระบบการสกัด ดีเอ็นเออาศัยท่อ FEP ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาว 0.005 เซนติเมตร เชื่อมต่อโดยใช้วัสดุ PDMS เป็นตัวประสานและทดสอบระบบแรงศักยภาพใน microfluidic channel และการทดสอบการเคลื่อนตัวของผิวอากาศภายใน microfluidic channel

การตรวจสอบการไหลดำเนินการโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อและการไล่น้ำออกจากระบบดำเนินการโดยการใช้ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์ เป็นหลัก การทดสอบเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้ช่องของ microfluidic charnel ที่มากกว่า 3 เท่า มีผลต่อการรักษาสภาพแรงดันภายในระบบ โดยเนื่องจาก PDMS เป็นวัสดุที่หยุ่นคล้ายยางดังนั้น การเพิ่มหรือลดแรงดันจะทำให้แรงดันถูกดูดซับเข้าไปในระบบได้ การทดสอบเบื้องต้นพบว่าการรักษาให้ microfluidic charnel มีเพียง 2 ช่อง ในทางปฏิบัติ จะช่วยให้ การเดินของสารละลายปฏิกิริยาในระบบ ทำได้ง่ายและต่อเนื่อง

การเชื่อมต่อของระบบสกัดดีเอ็นเอเข้ากับระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีข้อควรระวังที่สำคัญได้แก่ การทำให้ดีเอ็นเอแห้ง ภายหลังการล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ซึ่งในทางปฏิบัติดำเนินการโดยการผ่านอากาศที่อัดด้วยแรงดันอย่างช้าๆ การดันด้วยแรงที่มากมีผลต่อการเคลื่อนตัวและดูดซับไว้ของสนามแม่เหล็กต่อ ferrous oxide resin

สำหรับระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หาก matrix ของ ferrous oxide resin แห้งแล้ว สามารถผ่านน้ำยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ซึ่งได้แก่ สารละลาย Tris Buffer

การปล่อยให้สารละลายบัฟเฟอร์ค้างในช่อง test zone เป็นเวลา 2-4 นาที ช่วยให้ดีเอ็นเอที่จับตัวอยู่ที่ผิวของ ferrous oxide resin ละลายเข้าสู่ในปฏิกิริยาขั้นตอนดังกล่าว สามารถดำเนินการต่อเนื่องได้โดยไม่มีอุปกรณ์ อย่างไรก็ดี ขณะทดสอบ พบว่า การผ่านสารละลาย BSA เข้มข้น 1 % แล้วแช่ค้างไว้ 1 คืน จะช่วยให้ตัวชิบไม่ดูดซับ DNA จากระบบ

จากการตรวจสอบการไหลของปฏิกิริยาพบว่า การใช้ปริมาตรของปฏิกิริยาเพียง 20 µl เพียงพอสำหรับการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ

สำหรับกระบวนการเชื่อมต่อในทางปฏิบัติในชิปสำเร็จรูปนี้สามารถดำเนินการโดยใช้โครงสร้างชิปรวม 2 ระบบบนชิป เดียวกันได้ (ภาพที่ 14.)

ภาพที่ 14 รูปแบบโครงสร้างการเชื่อมต่อของชุดห้องปฏิบัติการสมบูรณ์อย่างง่ายแบบย่อส่วน 2 ชิป

การดำเนินการดังกล่าวช่วยเอื้อให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพร้อมกันหลายตัวอย่างทำได้ง่ายขึ้น การวางระบบการเชื่อมต่อสามารถดำเนินการเป็นชุดจาก 1 ชุดทดสอบเป็นมากกว่าหนึ่งชุดทดสอบ เพื่อสะดวกในการทดสอบปฏิกิริยาพร้อมๆ กัน สามารถควบคุมอุณหภูมิ บน plateform เดียวกัน ที่ 63°C สำหรับการตรวจจะใช้ UV source ที่ความยาวคลื่น 365 nm

2.2.12. ทดสอบประเมินผลระบบในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบการใช้งานทางห้องปฏิบัติการโดยใช้ matrix อาหาร ทดสอบกับระบบ μ-TAS ที่พัฒนาขึ้น ทั้งความไวของปฏิกิริยา ความจำเพาะของปฏิกิริยาและการทดสอบใช้งานจริงกับเนื้ออาหารโดยตรง โดยใช้ปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM $MgSO_4$ 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ไพรเมอร์ F3B3 อย่างละ 5 probe และ F1B และ B1P อย่างละ 40 pmole โดยใส่สารเรืองแสง 500x และเอนไซม์ Bst DNA polymerase 20 U

การทดสอบเบื้องต้นกับ matrix ปลาปักเป้า และเนื้อปลาผสมที่มีปลาปักเป้าอยู่ 5 % และเนื้อปลาผสมที่ไม่มีปลาปักเป้า พบว่าการทดสอบระบบโดยประเมินจากการแยกดีเอ็นเอที่ได้จาก outlet ของ chip ผ่านสนามไฟฟ้า ได้แถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อตัวอย่างที่เป็นปลาปักเป้าเท่านั้น แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ไม่มีการปนของเนื้อปลาปักเป้า (ภาพที่ 15)

ภาพที่ 15 การทดสอบเบื้องต้นกับ matrix ปลาปักเป้า (เลน1) และเนื้อปลาผสมที่มีปลาปักเป้าอยู่ 5 % (เลน2) และเนื้อปลาผสมที่ไม่มีปลาปักเป้า (เลน3) ขณะที่เลน 4 เป็น ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ

การศึกษาการดำเนินการของระบบชิป โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปลาปักเป้าเจือจาง ครั้งละ 10 ระดับจนถึง 0 ก็อปปี้ ของดีเอ็นเอ พบว่าการตรวจสอบบน PDMS ชิป สามารถตรวจสอบการปนของเนื้อในระดับ 100 ก็อปปี้ (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 16 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนชิป รายละเอียดแต่ละเลนเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนชุดจาก 1,000,000 ถึง 5 ชุดตามลำดับ ntc แสดงตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ และ M แสดงมาร์เกอร์ดีเอ็นเอขนาด 100 nt

ในเบื้องต้นผลการทดสอบพบแถบดีเอ็นเอได้แม้ระดับของตัวอย่างจะมีดีเอ็นเอในระดับต่ำซึ่งยังคงเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

ผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่า การใช้ชิปสามารถดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้จริง แม้ Limit of Detection (LOD) จะสูงกว่าการทดสอบนอกชิป 10 เท่า ก็ตาม ซึ่ง ในทางปฏิบัติ การทดสอบในระดับ 100 ก็อปปี้ แสดงให้เป็นถึงศักยภาพของวิธีการและโครงสร้างชิป เนื่องจาก ดีเอ็นเอ 100 ก็อปปี้ เทียบเท่ากับดีเอ็นเอ 3 pg/reaction

การดำเนินการต่อเนื่อง ใช้ปริมาตรของสารละลาย สำหรับสกัดดีเอ็นเอ ปริมาตร 200 □L โดยเนื้ออาหารตัวอย่างขนาด 100 μg และบัฟเฟอร์ บดเข้าด้วยกันด้วยก้านบด โดยในขั้นตอนการ pre-treatment จะบ่มไว้ที่ 55 องศา เป็นเวลา 8 นาที จากนั้น นำตัวอย่างไปปั่นให้ตกตะกอน และนำส่วนใสที่ได้มาผสมกับ ferrous oxide 7 μL การฉีดสารละลายเข้าสู่ระบบ ใช้เวลา 2 นาที สนามแม่เหล็กที่อยู่ในตำแหน่งเหนือบริเวณปฏิกิริยาจะดักจับ ferrous oxide resin ไว้ หลังจากนั้น ดีเอ็นเอที่ถูกตรึงอยู่บน resin จะได้รับการล้างด้วย 70 % เอทานอล และทำให้แห้งด้วยการค่อยๆ ปล่อยอากาศผ่านบริเวณปฏิกิริยา เพื่อทำให้ resin แห้งเกือบสนิท ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะละลายออกมาจากบริเวณปฏิกิริยาด้วยสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การดำเนินปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มจากการถ่ายสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μL ที่ประกอบไปด้วย ประกอบด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM $MgSO_4$ 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ตามที่ระบุไว้โดย Notomi *et al.*, (2000) และสารเรืองแสง SyberGreen 50x โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ผสม ที่ประกอบด้วย 10 pmole each ของ F3B3 และ 40 pmole ของ FIP และ BIP สารละลายทั้งหมดจะได้รับการฉีดเข้าสู่ระบบ โดยให้สารละลายหยุดเคลื่อนที่ เมื่อเข้าไปถึงปลายสุดของท่อที่บริเวณปฏิกิริยา บ่มจับที่อุณหภูมิ 63 องศา (ดังภาพที่ 17.)

ภาพที่ 17. รูปแบบการใช้งานต่อเนื่องบนชิปเริ่มจากการผ่านตัวอย่างดีเอ็นเอและจับไว้บนชิป การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนชิปที่วางอยู่บน block อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลสามารถดูจากการเรืองแสงบนชิปเมื่อส่องดูด้วย UV

2.2.13. การประเมินการใช้งานจริงในภาคสนาม ร่วมกับภาพอุตสาหกรรม

นำระบบทดลองอย่างง่ายไปสาธิตและถ่ายทอดวิธีการใช้งานโดยตรงยังผู้ประกอบการในภาคอุตสาหกรรม เน้นการดำเนินการเองโดยผู้ประกอบการและการประเมินผลการใช้งาน ณ จุดทดสอบ ได้ดำเนินการประเมินการใช้งานจริงโดยได้รับความร่วมมือกับ บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด 39/6 หมู่ 3 ตำบล บ้านใหม่ อำเภอปากเกร็ด จังหวัด นนทบุรี

บริษัทโพรเทคเตอร์ นิวตริชั่น ประเทศไทยจำกัด 17/1 ซอย 8 .ถนน พระรามเก้า สวนหลวง กรุงเทพฯ และ กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง ในการสาธิต ประเมินการใช้งาน และถ่ายทอดบางส่วนของเทคโนโลยี โดยได้จัดอบรมกลุ่มย่อยเมื่อวันที่ 21 ธันวาคม 2551 และวันที่ 18 สิงหาคม 2552 โดยเน้นการตรวจวิเคราะห์การปนของดีเอ็นเอจากพืชดัดแปรพันธุกรรม (35S Promoter) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นจากโครงการในปี 2551 การตรวจการปนของ bovine species ในอาหารสัตว์ โดยใช้นำยาตรวจสำเร็จรูป ที่พัฒนาขึ้นในปี 2551 เช่นกัน และการตรวจการปนของปลาปักเป้าในอาหารตามลำดับ โดยใช้ปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นในรายงานครั้งนี้

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการประยุกต์ระบบปฏิบัติการสมบูรณ์อย่างง่ายบนชิป เป็นสาขาที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน โดยหลักการใช้ชิปช่วยให้การตรวจสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และอยู่ในรูปที่พกพาได้

ที่ผ่านมา มีการวิจัยเกี่ยวข้องกับ Lab on chip ในการวิเคราะห์ทางเกษตรและอาหารน้อยมาก ส่วนหนึ่งมีเฉพาะ การสกัดดีเอ็นเอบนชิป (Ji *et al.*, 2007) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR บนชิป (Xiang *et al.*, 2007)

ในการศึกษาในครั้งนี้ โครงการได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบปฏิบัติการที่รวมการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ ในระบบเดียวในรูปโครงสร้างชิปสำเร็จรูป โดยพัฒนาจากวัสดุสังเคราะห์ PDMS

ตัวชิปประกอบไปด้วยท่อ ขนาด 100x200 μm.เป็นทั้งช่องนำสารละลายเข้า ช่องบริเวณทำปฏิกิริยา และช่องจำหน่ายสารละลาย ระบบได้เชื่อมโยงการสกัดดีเอ็นเอ โดยอาศัยพื้นฐาน การจับตัวของดีเอ็นเอ ในภาวะที่มี เกลือสูง (high chaotopic salt) กับ ferrous oxide resin

โดยหลักการ การสกัดดีเอ็นเอจากอาหารโดยใช้ ferrous oxide resin สามารถดำเนินการโดยใช้เทคนิคการสกัดโดยใช้สารซักฟอกรุนแรง (detergents) รวมกับสารเคมีที่คอยจับโมเลกุลดีเอ็นเอซึ่งอาจอยู่ในรูป resin สังเคราะห์ ในรูป silica resin หรือ รูป ferrous oxide resin หรืออยู่ในรูป glass resin (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543a, ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543b, Giusti et al., 1986, Weigand et. al., 1992, Chaumpluk , 2006, Chaumpluk , 2007) อย่างไรก็ดีหากดำเนินการตามขั้นตอนมาตรฐานจะพบว่าเป็นกระบวนการที่ยุ่งยาก ใช้เวลาและอาจไม่สะดวกในการนำมาประยุกต์ลงบนชิป

การหลักการสกัดในส่วนของไหลบนชิปจำเป็นต้องหลีกเลี่ยงกระบวนการที่ใช้ organic extraction solvents จำพวก phenol phenol chloroform ที่เป็นอันตรายต่อทั้งระบบชิปและต่อการใช้งาน

Walsh, *et al.*, (1991) รายงานการใช้ chelating resin กับการสกัดดีเอ็นเอเพื่อการตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งช่วยให้การสกัดทำได้อย่างรวดเร็วโดยลดการพึ่งพา organic extraction solvents นอกจากนี้ยังมี inhibitor ที่อาจติดมาขณะสกัดดีเอ็นเอน้อยกว่า วิธีดังกล่าวต่อมาใช้เป็นวิธีในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่ได้จากหลักฐานทางคดี หรือใช้ตรวจจำแนกบุคคล (Willard *et al.*, 1998, Brinkmann, 1998, Tsuchimochi *et al.*, 2002) ทำนองเดียวกัน Shawn *et al.*, (2005) ได้ประยุกต์หลักการ magnetic beads technology เข้ากับกระบวนการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้สามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอเป็น routine ในรูป robotic processes ได้ อาศัยหลักการ chaotropic agent ในรูป guanidine thiocyanate หรือ guanidine hydrochloride ร่วมกับ silica ferrous oxide resin (Cox, 1968, Boom *et al.*, 1998)จึงได้เลือกระบบการสกัดดีเอ็นเอ 2 ระบบหลักนี้ในการพิจารณานำมาประยุกต์กับหลักการทำงานบนชิป

การสกัดดีเอ็นเอด้วยเรซิ่นต่างไปอย่างสิ้นเชิงกับระบบที่ใช้สารละลายไฮโดรคาร์บอน หรือระบบที่ใช้ centrifugal force (Cho *et al.*, 2007) ระบบที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้เน้นการใช้ความเข้มข้นของเกลือ chaotopic สูง ร่วมกับ ferrous oxide resin โดยไม่ใช้ magnetic lead สำเร็จรูป ระบบสามารถสกัดดีเอ็นเอและปล่อยให้จับตัวบนบริเวณของ reaction zone

สำหรับการละลายดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างง่ายต่อเนื่องใช้รูปแบบการทำปฏิกิริยาต่างไปจากที่มีรายงานโดยใช้เทคนิค PCR (Cheng *et al.*, 1996)

ในระบบเนื่องจากใช้ปฏิกิริยา isothermal DNA amplification ทดแทนปฏิกิริยา PCR ดังนั้นในระบบใช้แหล่งกำเนิดความร้อนในรูป heat block ที่ให้ความร้อนคงที่ ทำให้ประหยัดและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน ปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวนี้ นอกจากจะมีจุดเด่นเรื่องจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ ที่สร้างความจำเพาะเหนือกว่าPCR 1000-100000 เท่า และยังให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมากกว่าPCRมาก และที่สำคัญใช้อุณหภูมิเดียวคงที่ที่ 63^{0}C บ่มปฏิกิริยาในระยะเวลาอันสั้น (Notomi *et. al.*, 2000) ทำให้เมื่อนำมาปรับใช้กับชิป จึงช่วยให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนชิปได้ง่ายกว่า

อย่างไรก็ดี การศึกษาที่ผ่านมามีเพียงการนำปฏิกิริยา isothermal DNA Amplication มาใช้ร่วมกันกับการแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าบนชิปเท่านั้น ไม่พบการดำเนินกิจกรรมจนครบภายในชิปเดียวมากนัก

การทดลองในครั้งนี้ทำให้เห็นว่าการนำหลักการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ จะช่วยให้ การจัดการทางเทคโนโลยีทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

สำหรับการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอบนชิป มีผู้ที่สาธิตการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (Obeid *et al.*, 2003) การใช้สารเรืองแสงผ่านการสแกนด้วยเครื่อง (Matsubara *et al.*, 2004) และการใช้ระบบการตรวจสอบทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ชิปรวมกับสารละลาย Hoechst 33258 ระบบที่กล่าวมีทั้งข้อดีและข้อเสีย เช่นการตรวจสอบการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าต้องอาศัย กลไกทางไฟฟ้า จึงเป็นการเพิ่มความซับซ้อนให้กับตัวชิป การใช้สารเรืองแสงหากตรวจวัดด้วยเครื่องจำเป็นต้องมี detector ตรวจสอบการเรืองแสง

อย่างไรก็ดีหากการตรวจสอบเป็นเพียงการตรวจการเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพ เฉพาะการเรืองแสงระบบตรวจวัดด้วย fluorescence จะจัดเป็นระบบที่มีความเหมาะสมที่สุด ทั้งในแง่ลดความซับซ้อนในการออกแบบตัวชิป ลดระยะเวลาในการตรวจสอบสัญญาณและง่ายต่อการดำเนินการ ขณะที่การตรวจโดยหลักการทางเคมีไฟฟ้า การเชื่อมโยงวงจร และตัวตรวจวัดในรูป electrode บนชิป ทำให้การพัฒนารูปแบบมีความซับซ้อนและทำให้ต้นทุนชิป/หน่วยสูงขึ้นโดยไม่จำเป็น

ระบบการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ จึงจำเป็นครั้งแรก ที่รวมปฏิกิริยาสกัด เพิ่มปริมาณโดยวิธี isothermal DNA Amplification และตรวจสอบสัญญาณต่อเนื่องกันบนชิปเดียว โดยอาศัยปริมาตรในการเพิ่มปริมาณเพียง 14 ไมโครลิตร และใช้เวลาเพียง 60 นาที (รวมทุกขั้นตอน)

ตัวชิปเป็นรูปแบบพื้นฐานที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในอาหารได้อย่างกว้างขวาง

ปัจจุบัน โครงการประสบความสำเร็จในการพัฒนาน้ำยาขึ้น ตรวจการปนของดีเอ็นเอ สุกร ดีเอ็นเอจาก โค กระบือ ระบบการตรวจโรคของสัตว์น้ำเป็นต้น สำหรับเหตุผลหลักในการเลือกพัฒนาระบบการตรวจการปนของเนื้อปลาปักเป้าในอาหารเป็นไปตามประกาศ กระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 264/2545 ห้ามการนำปลาปักเป้ามาใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารที่มีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ วันที่ 19 ธันวาคม 2545 ทำให้การตรวจวิเคราะห์อาหารที่มีโอกาสปนด้วยวัตถุดิบปลาปักเป้าเป็นรายการที่จำเป็นต้องดำเนินการตามกฎหมาย ในทางปฏิบัติการตรวจสอบทางกายภาพ ไม่สามารถระบุการปนได้ การตรวจสอบส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่การตรวจทางชีวเคมี ได้แก่ การตรวจขนาดและรูปแบบของโปรตีนโดยเทคนิค polyacryamide gel electrophoresis และตรวจสอบทางเซรั่มวิทยา ซึ่งทั้งสองเทคนิคมีทั้งข้อจำกัดในการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปไปจากวัตถุดิบเดิม ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และความไวและความแม่นยำ การวิเคราะห์บนพื้นฐานของโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีเสถียรภาพกว่าแม้เนื้ออาหารจะผ่านการแปรรูปก็ไม่มีผลกระทบต่อการตรวจจึงมีบทบาทสำคัญ อย่างไรก็ดีแม้ต่อมามีผู้พัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่อยู่บนพื้นฐานการตรวจยีนในบริเวณ 16S RNA แต่ด้วยข้อจำกัดในเรื่องข้อมูลชนิดปลาที่ต่างกันในแต่ละประเทศและรายละเอียดทางเทคนิคที่ต้องพึ่งพาเครื่องมือโดยเฉพาะเครื่อง thermocycler และความชำนาญการของเจ้าหน้าที่ทางเทคนิค ทำให้การตรวจโดยเทคนิคนี้ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเท่านั้น นอกจากนี้ แม้มีการบังคับใช้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข การบังคับใช้ระเบียบดังกล่าวไม่สามารถทำได้เต็มที่เนื่องจากขาดเทคนิคและบุคคลากร

การนำปฏิกิริยาเหล่านี้มาเชื่อมโยงจะทำให้การประยุกต์โครงสร้างและการทำงานของชิป ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ที่สำคัญเป็นการตรวจที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์การตรวจ ตอบสนองหลักกการ point of care ตามต้องการ

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการส่งออก. 2547. รายงานข้อมูลการส่งออกสินค้าของไทย ประจำปี 2547.กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. มปท.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543. GMOs สำหรับผู้ประกอบการ. เอกสารประกอบการสัมมนามาตรการและข้อกำหนดเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารของประเทศในทวีปยุโรป. สถาบันฝึกอบรมการค้าระหว่างประเทศ กรมส่งเสริมการส่งออก 14-15 มีนาคม 2543. ISBN: 974-333-625-7.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ พ.ศ. 2543a "เทคนิคการวิเคราะห์ GMOs" โรงพิมพ์เลี่ยงเชียง, หน้า 9-20, ใน สุกัญญา สุนทรรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ บรรณาธิการ จี.เอ็ม.โอ สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์ สาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ISBN: 974-493-516-2.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ พ.ศ. 2547a. การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเออย่างง่ายจากมะละกอ และการตรวจมะละกอ GMOs. ในหนังสืออบรมเชิงปฏิบัติการ ดีเอ็นเอกับการรับรองความปลอดภัยของอาหารมองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับโครงการภายใต้แผนปรับโครงสร้างอุตสาหกรรม (ระยะที่ 2) หน้า 29-33.(ISBN 974-13-3159-2)

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ พ.ศ. 2547b. โครงสร้างพื้นฐานของดีเอ็นเอกับการวิเคราะห์. ในหนังสืออบรมเชิงปฏิบัติการ ดีเอ็นเอกับการรับรองความปลอดภัยของอาหารมองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับโครงการภายใต้แผนปรับโครงสร้างอุตสาหกรรม (ระยะที่2) หน้า 82-89.(ISBN 974-13-3159-2)

Anderson, R.C., Su, X., Boydan, G.J., Fanton, J. 2000. Aminiture integrated device for automated multistep genetic assay Nucleic Acid Res. 28:260-270.

Belmont, C., Tercior, M.L., Buttle, J., Fiaccabrino, G.C., and Roucellea – Hep. 1996. Mercury – plated iridium base microelectrode array for trace metals detection by voltammetry : optimum conditions and reliability. Anal Chim Acta. 329: 203-214.

Benson D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. 2004.
Genbank Update. (available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)

Blair M.W., Hedetale V., McCouch S.R. 2002. Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelec diversity in cultivated rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet. 105(2-3):449-457.

Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J. 1990.Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 28(3):495–503.

Brinkmann B. 1998. Overview of PCR-based systems in identity testing. Methods Mol Biol.98:105-19.

Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J., Gruden K.. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. BMC Biotechnol. 14;6:37.

Buaer, T., Weller, P., Hammes, W.P. and Hertel, C. 2003. The effect of processing parameters on DNA degradation I food. Eur Food Res Technol 217:338-343.

Chaumpluk Piyasak.2003.Tracing of DNA molecule for quality assurance in food matrix using PCR technique. 29th Congress on science and Technology of Thailand. 32. (invited)

Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2005a. Novel electrochemical identification and quantification of bovine species in feedstuffs. JAIST International Symposium on Nano Technology 2005. 17-18.

Chaumpluk, P. and Tamiya, E. 2005. Novel electrochemical biosenor for identification and quantification of specific DNAs in foods and feedstuffs. The International Conference on BioNanotechnology: A New Chapter of Life. 18.

Chaumpluk, P., Theamboonlers, A., Oraveerakul, K., Poovorawan, Y and Tamiya, E. 2005b. Novel electronical identification and quantification of H5N1 avian influenza virus. Handbook and abstracts. 15th. Scientific annual meeting. 10.

Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2006. Novel electrochemical identification and semi-quantification of bovine constituents in feedstuffs. Science and Technology of Advanced Materials7 :263 – 269.

Chaumpluk, P., Kargan, K., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2007a. Accumulation of amplified target DNAs using thiol/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocene–streptavidin–magnetic system and a direct detection of specific DNA signals with screen printed gold electrode. Science and Technology of Advanced Materials 8 :323 – 330.

Chaumpluk, P., Hadthamard, Kosakul, T., Kanlayanarat,S., Tamiya, E. 2007b. An Electrochemical DNA Sensor for the Detection of Chlorophyllase Gene Expression in Fresh Cut Broccoli. Acta Horticulturae 746:195-202.

Chaumpluk, P., Suwankitti W. 2008. Simple and rapid detection of trace amounts of peanut in foods based on *Ala h1* gene using Loop-mediated isothermal DNA amplification and electrochemical DNA sensor. PACCON 2008. 28-30 Jan 2008. Sofitel Central Bangkok. Thailand

Chen W.B., Nakamura, I , sato, YI., and Nakai, h. 1993. Distribution of deletion type in choloroplast DNA of cultivated and wild rice. Japan J. Genetic 68:597-603.

Cheng, J., Sinoffnem, M. A., Huichia, G. E., Kricka, L. J., Wilding, P. 1996. Chip PCR II : investigation of different PCR amplification systems in microtabric... silicon-glass chips. Nuc Acids Res. 24: 380-385.

Chiou, J., Matsudiara, P., Sohin, A., Ehrlich, D. 2001. A closed-cycle capillary polymerase chain reaction machine. Anal Chem. 73: 2018-2021.

Cho, Y. K., Lec, J. G., Park, J. M., Lee, B. S., and Ko, C. 2007. One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on centrifugal microfluidic device.Lab Chip 7: 565-573

Clegg, R.M. 1992. Fluorescent resonance energy transfer and nucleic acids. Methods Enzymol 211:353-388.

Compton, J.1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350:91-92.

Cox R.A..1968. The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. Methods Enzymol 12B:120–129.

Endo, T. Okayama A. Matsubara. Y. Iishi K. Kabayashi M. Yamamura, S. Murita Y. Takamura Y. Mizukami It and Tamiya E. 2005. Fluorescence-based assay with enzyme amplification on micro-flow immunosensor chip for monitoring coplanar polychlorinated biphenyls. Anal Chim Acta. 531: 7-13.

Fan, Z.H., Manger, S., Granzow, R., Heaney, P., Ho, W., Dong, Q.,Kumar, R. 1999. Dynamic DNA hybridization on a chip using paramagnetic beads. Anal Chem. 71: 4851 – 4859.

Folder, S.P.A., Rava, R.C., Huang, X.H.C., Pease, A.C., Holmes, C.P. and Adams C.L. 1993. Multiplexed Biochemical Assays with Biological Chips. Nature. 364: 555- 556.

Giusti A, Baird M, Pasquale S, Balazs I, Glassberg J. Application of deoxyribonucleic acid polymorphisms to the analysis of DNA recovered
from sperm. J Forensic Sci 1986;31(2):409–17.

Guatelli, J.C., Whitefield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. and Gingeras, T.R.1990.Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retro viral replication. Proc.Nat. Acad. Sci., USA 87:392-396.

Hirisaka, T., Fujita, Kayoko, Iwata, Taketoshi, Nakadai, Aya, Otani, T. A., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y. and Hayashidani, H. 2004. Sensitive and specific detection of Yersinia pseudotuberculosis by loop-mediated isothermal amplification. J. Clinical Microbiol. 42(11):5349-5352.

Ishii, T., McCouch S.R. 2000. Microsatellite and microsynteny in the chroloplast genome of Oryza and eight other Gramineae species. Theor Appl Genet. 100: 1257-1266.

Ishilawa, Y., Sato, I., Tang, T. and Nakamura, I. 2000. Different maternal origins of Japanese lowland and upland rice population. Thepr Appl Genet. 104: 976-980.

Ji, H.M., Samper, V., Chen, Y., Hui, W.C., Lye, H.J., Mustafa, F.B., Lee, A.C., Cong, L., Heng, C.K., Lim, T.M. 2007. DNA purification silicon chip. Sensors and Actuators A 139:139-144.

Kanno, A. Watanabe, N., Nakamura, I, Hirai, A. 1993. Variation in choloplast DNA from rice (Oryza sativa L.): differences between deletions mediated by short direct repeat sequences within a single species. Theor Appl Genet. 86: 579-584.

Kounaves, S.P., Deng, W., Hallock, P.R., Kovacs, T.A.,Storment, C.W. Iridium-based ultramicroelectrode array frabricated by microlithography. Anal Chem. 66: 418-423.

Lee, T.M.-H, Carles, M. and Hsing I-M.2003. Integrated microfluidic devices. Lab chip 3: 100-105.

Lipsky, R.H., Mazzanti, C.M., Rudolph, J.G., Xu, K., Vyas, G., Bozak, D., Radel, M.Q. and Goldman, G. 2001. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clinical Chemistry* 47(4):635-644.

Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. and Ward, D.C. 1998. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification Nature Genetics 19:225-232.

Lockley, A.K. and Bardsley, R.G., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Sci. and Technol.* **11**: 6777-9.

Lyamichev, V., Mast, A.L., Hall, J.G., Prudent, J.R., Kaiser, M.W., Takova, T., Kwiatkowski, R.W., Sander, T. J., de Arruda, M., Arco, D.A., Neri, B.P. and Brow, M.A. 1999. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nature Biotech. 17:929-926.

MacCormick, C.A., Griffin, H.G., Underwood, H.M., and Mason, M.J. (1998). Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. J. Appl. Microbiol. 84: 969-980.

Maeda, H., Kokeguchi, S., Fujimoto, C., Tanimoto, I., Yoshizumi, W. Nishimura, F. and Takashiba, S. 2005. Detection of periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immunology and Medical Microbiology 43:233-239.

Mascini, M., Palchetti, H., and Marrazza, G. 2001. DNA electrochemical biosensors. J. Anal. Chem 369:15-22.

Matsubara, Y., Kerman, K. , Kobayashi, M., Yamamura, S., Morita, Y. , Takamura, Y., Tamiya, E. 2004. On-chip nanoliter-volume multiplex TaqMan polymerase chain reaction from a single copy based on counting fluorescence released microchambers. Anal. Chem. 76, 6434–6439

Murray M.G., Thomson, W.F. 1980.Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 19:4321-4325.

Manz A., Fettinger J.C., Verpoorte, E. Lundi, H., Windry, H.M. and Harison, D.J. 1991. Micromachining of monocrystaline silicon and glass for chemical analysis systems: a look into next century's technology or just a fashionable craze? Trend in Anal Chem. 10: 144-146.

Meyer, R., Hufelein, C., Luüthy, J.; Candrian, U., 1995. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in foods. *Journal of AOAC International*. 156: 1542-1551.

Milaglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J.P.P.F., and Zagon, R.J. 2004. Detection and

traceability of genetically modified organisms in the food production chain. Food and Chemical Toxicology 42:1157-1180.

Nakama, A., and Morishita, F. 2004. Examnination of DNA extract from kernels and processed foods using silica-base resin. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 45:207-211.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28:e63.

Obeid, P.J., Christopoulos, T.K., Crabtree, H.J., Backhouse, C.J. 2003. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. Anal. Chem. 75, 288–295.

Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of west nile virus. J. Clinical Microbiol. 42(1):257-263.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Sang, G.S., Ge S. T, Lu B. R, Hong D. Y. 2001. Rapid and reliable identification of rice genomes by RFLP analysis of PCR-amplified Adh genes. Genome. 44(6): 1136-42.

Tengel, C., Schussler, P., Setzke, E., Balles, J., and Sprenger-Haussels M. 2001. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. Biotechniques 31:426-429.

Tsuchimochi T., Iwasa M., Maeno Y., Koyama H., Inoue H., Isobe I., Matoba R., Yokoi M., Nagao M. 2002.Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. Am. J. Forensic Med Pathol. 23(3):268-71.

Wang J.F., Zhou H., Chen Y.Q., Luo Q.J., Qu L.H. 2004. Identification of 20 micro RNAs from Oryza sativa. Nucleic Acids Res. 12;32(5):1688-1695.

Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.C. and Shank, D.D. 1992. Strand displacement amplification- isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Research 20:1691-1696.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques10 (4):506-13.

Weigand P, Schurenkamp M, Schutte U. 1992. DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. Int J Legal Med:104(6):359–60.

Willard J.M., Lee D.A., Holland M.M. 1998. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. Methods Mol Biol. 1998;98:9-18

Wilson K.2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr Protoc Mol Biol Chapter 2 unit 2.4 Willey. NewYork.

WHO. 2003. Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems. Food and agricultue organization of United Nations World Health Organisation. Rome FAO/WHO publication. np.

Yamanaka S, Nakamura I, Watanabe KN, Sato YI. 2004. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. Theor Appl Genet 108(7):1200-4 .

Yang J., Liu Y., Rauch C.B., Stevens, R.L., Lia R.H., Lenigk R. and Grodzinsia P. 2002. High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors. Lab on a chip. 2: 179-187.

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

(ภาษาอังกฤษ) MR. PIYASAK CHAUMPLUK

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีและไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-5494

โทรสาร 0-2252-8579 piyasakcha@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2540	ปริญญาเอก	PhD (Agri. Sci.)	Kyoto University	Japan

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Utilize marker gene for gene detection system development Molecular Biology

Production of high value substance by utilizing plant viral replication machinery in transgenic plant and algae Molecular Biology

GMOs detection and meat species identification Molecular Biology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

1. Establishment of mother line of Gentian plant resistant to cucumber mosaic virus via genetic engineering Iwate Biotechnology Research Center , Iwate JAPAN Project member 1993-1996

2. ศึกษาระบบการควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมและสร้างรูปแบบจำลองเพื่อใช้ในการควบคุมกำกับดูแล สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข หัวหน้าโครงการ

3. Development of sample protocols to detect genetically modified orgamisms (GMOs) and the integration of the protocols together with Identity preserved (IP)- Handling approach for the assured production of GMOs- free products for export หัวหน้าโครงการ

4. Heat treatment during the soy milk preparation and its effect on the detection efficiency of polymerase chain reaction หัวหน้าโครงการ

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Chaumpluk Piyasak, Chikae Miyuki, Takamura Yazuru and Tamiya Eiichi .2005. Novel Electrochemical Identification and Quantification of Bovine Species in Feedstuffs. JAIST International Symposium on Nano technology2005. September 15-17. Ishikawa Japan.

2. Chaumpluk Piyasak.2003.Tracing of DNA molecule for quality assurance in food matrix using PCR technique. 29th Congress on science and Technology of Thailand. 32. (invited)

3. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2546. เคล็บลับ PCR ในงานชีววิทยาโมเลกุล.เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องเคล็บลับ PCR กับการวิจัยและการตรวจวิเคราะห์. โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร. 28-30 กรกฎาคม 2546.

4. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2546. เทคนิคการตรวจสอบ GMOs. โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อพัฒนาการ
เรียนการสอน มุมน่ามองของเทคโนโลยีสมัยใหม่ : แง่มุมสำคัญของGMOs กับบทบาทในชีวิตประจำวัน. โครงการความร่วมมือเพื่อพัฒนาการเรียนการสอนและการจัดการสอนวิชาคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี ระดับโรงเรียนของ สสวท.ร่วมกับ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 1 - 2 สิงหาคม 2546.

5. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2546. ดีเอ็นเอและยีนในพืช การทดลองขั้นสูงเกี่ยวกับดีเอ็นเอ. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอและยีนในพืช การทดลองขั้นสูงเกี่ยวกับดีเอ็นเอ. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช.คณะทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยนเรศวร.29 พฤศจิกายน 2546.

6. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547.หวัดนก ตามติดและตามตรวจ. จุลสารพันธุศาสตร์ 24(1):6-7.

7. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. พันธุศาสตร์ของพืชดัดแปรพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ (1). จุลสารพันธุศาสตร์ 24(1): 8-12.

8. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. การตรวจดีเอ็นเอและความปลอดภัยของผักและผลไม้. เอกสารประกอบการสัมมนาวันเกษตรแห่งชาติ. คณะทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยนเรศวร.มกราคม 2547.

9. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. ปฏิบัติการเรื่องของจีโนม ความสัมพันธ์เฉพาะระหว่างดีเอ็นเอ จีโนม และดีเอ็น เอนอกโครโมโซม. เอกสารประกอบการอบรมครูชีววิทยาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย หลักสูตรที่ 1 (ปฏิบัติการ). ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 26 เมษายน 7 พฤษภาคม 2547.

10. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547.การสกัดจีโนมมิคดีเอ็นเออย่างง่ายจากมะละกอและการตรวจมะละกอ GMOs.เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล. ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.

11. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547.เคล็ดลับ PCR ในงานชีววิทยาโมเลกุลอาหาร เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความ ปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล.ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.

12. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. รอบรู้กับ GMOs : GMOs สถานการณ์ การตรวจและตลาดสินค้า เอกสารประกอบการอบรมเชิง ปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความ ปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล. ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.

13. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. โครงสร้างพื้นฐานของดีเอ็นเอกับการวิเคราะห์ เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความ ปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.

14. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. พันธุศาสตร์ของพืชดัดแปรพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ (2). จุลสารพันธุศาสตร์ 24(2): 11-15.

15. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ .2547. การประเมินระบบการแสดงฉลากเปรียบเทียบระหว่างประเทศและระบบควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมของญี่ปุ่น ยุโรป และ สหรัฐอเมริกา. รายงานความก้าวหน้าฉบับที่ 1 ส่ง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สิงหาคม 2547. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

16. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ .2547. มาตรการรองรับและปฏิบัติจริงเกี่ยวกับระบบตรวจบนพื้นฐานการทดสอบโปรตีนด้วยชุดสำเร็จและดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ. รายงานความก้าวหน้าฉบับที่ 2 ส่ง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สิงหาคม 2547. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

17. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ .2548.สถานภาพของระบบอุตสาหกรรมและความเคลื่อนไหวสู่ระบบรับรองสอบทวนและตรวจติดตามอาหารดัดแปรพันธุกรรม.รายงานความก้าวหน้าฉบับที่ 3 ส่ง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มกราคม 2548. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน (ระบุชื่อโครงการวิจัย)

1. Authentical test for Halal products based on the determination of DNA from porcine species with genome specific primers to unique cDNA clone
2. Genetic Transformation and gene expression study in *Dunalliella sp.*

ผู้ประสานงานแผนงานวิจัย

1. ชื่อ นางสาวนันทวัน หัตถมาศ

Miss Nanthawan Hadthamard

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ –

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ 4 ระดับ 4

4. สถานที่ทำงาน ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพฯ 10330

5. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร ชั้น 16 อาคารมหามกุฎ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์/โทรสาร (02) 218-7653

E-mail : hadthamard@yahoo.com

6. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน
2543	ตรี	วท.บ. (อุตสาหกรรมเกษต	อุตสาหกรรมเกษตร	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2546	โท	วท.ม. (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)	เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

7. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุสาขาวิชาการ

- การตรวจวิเคราะห์การปนของดีเอ็นเอเนื้อโค และแกะในผลิตภัณฑ์อาหาร Molecular Biology

- การผลิตแป้งมันสำปะหลังดัดแปร Food processing

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัย ว่าเป็น

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

- การผลิตแป้งมันสำปะหลังดัดแปรเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด
- ศึกษาแนวทางการยืดอายุการเก็บรักษาเงาะโรงเรียนโดยใช้กรดซาลิไซลิก และกรดแอบไซซิก
- การควบคุมการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสโดยโมเลกุลคลอโรฟิลเลสกลับทิศทางจากภายนอกต่อคุณภาพของ

บรอคโคลี่

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ (ระบุชื่อโครงการวิจัย) -

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ(ภาษาไทย) นางสาว ปาลิตา แปวไธสง

   (ภาษาอังกฤษ) Miss Palita Paewthaisong

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ

   -

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัยประจำโครงการ

4. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสารและ E-mail

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ10330 โทรศัพท์ 02-218-5494 โทรสาร 02-218-5494 E-mail : palita_pa@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2545	ปริญญาตรี	วท.บ ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ประเทศไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุสาขาวิชาการ

Molecular for blood screening , Molecular biology.

7.ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็น ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ

ศึกษาระบบการควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมและสร้างรูปแบบจำลองเพื่อใช้ในการควบคุมกำกับดูแล

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ผู้ร่วมวิจัย

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน(ระบุชื่อโครงการวิจัย)

การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคน ในกระสัง *Peperomia pellucida*(L.)Kunth ที่ได้รับการถ่ายยีน

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่(ระบุชื่อโครงการวิจัย) -

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว มัลลิกา แก้วดี

(ภาษาอังกฤษ) Miss Mallika Keawdee

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการ
ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืช
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-5494 โทรสาร 0-218-5494
E-mail : mallikakeawdee@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2545	ปริญญาตรี	วท.บ พืชสวน	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสุรินทร์	ประเทศไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
การสกัดดีเอ็นเอจากพืช Molecular Biology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

1. การสร้างสายพันธุ์แท้เพื่อผลิตฟักทองลูกผสม หัวหน้าโครงการ

2. ศึกษาระบบการควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมและสร้างรูปแบบจำลองเพื่อใช้ในการควบคุมกำกับดูแล
สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ผู้ร่วมวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ -