

รายงานฉบับสมบูรณ์**เรื่อง**

**การพัฒนาดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ใน
การตรวจวัดเชื้อ *มายโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูลอซิส***

โดย

**รองศาสตราจารย์ ดร. โกสม จันท์ศิริ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์**

**รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย สันติวัฒนกุล
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์**

**งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี ๒๕๔๙**

การพัฒนาดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัด

เชื้อมัคโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูลิซิส

The development of DNA-Piezoelectric biosensor for the detection of

Mycobacterium tuberculosis

โกสม จันทรศิริ¹ และ สมชาย สันติวัฒนกุล²

Kosum Chansiri¹ and Somchai Santiwattanakul²

1. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

2. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

บทคัดย่อ

บทนำ วัณโรค จัดเป็นโรคติดต่อชนิดร้ายแรงมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *มัคโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูลิซิส (Mycobacterium tuberculosis)* ซึ่งเป็นสาเหตุการตายในอันดับต้นๆ ของประชากรโลกปีละประมาณหลายล้านคนและเป็นสาเหตุให้คนไทยเสียชีวิตสูงเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาโรคติดต่อทั้งหมด การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการเดิมเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ดังนั้น เทคโนโลยีไบโอเซนเซอร์ เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สำเร็จรูปที่ทำงานง่าย ราคาถูก ใช้ปริมาณของตัวอย่างน้อยและให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ซึ่งไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์เป็นไบโอเซนเซอร์เกี่ยวกับการวัดค่าความถี่ Quartz Crystals ดัดแบบ AT-cut ที่ $35^{\circ} 10'$ ตามแนวแกน Z ซึ่งค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงมีความสัมพันธ์กับมวลที่ติดบนผิว Quartz crystals ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์และพัฒนาใช้งานเกี่ยวกับ ดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาระหว่าง DNA probe กับ DNA target ให้สามารถตรวจวัดเชื้อวัณโรคโดยใช้ยีน IS6110 บริเวณที่มีความจำเพาะต่อ *M. tuberculosis* วิธีการ ออกแบบวงจรวัดความถี่และ Quartz crystals ที่เคลือบด้วยทองคำความถี่ 12 MHz ทำการหาค่าความเหมาะสมของ Mercaptopropionic acid (MPA), Avidin, DNA probe, synthetic DNA target and DNA target ผลการทดลอง เครื่องมือวัดอ่านค่าตั้งแต่ 0 – 20 MHz ค่าความเหมาะสมของ MPA, Avidin, DNA probe, และ synthetic DNA target เป็น 15 mM, 0.1 mg/ml, 1.5 uM, และ 0.7 uM ค่าความถี่ -166 Hz, -130.9 Hz, -163.38 Hz, และ -20 Hz และมวลเพิ่มขึ้น $+49.31 \text{ ng/cm}^2$, $+56.52 \text{ ng/cm}^2$, $+63.22 \text{ ng/cm}^2$, และ $+7.74 \text{ ng/cm}^2$ ตามลำดับ DNA target ย่อยด้วย *HpaII* ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.035 ug/ul ค่าความถี่ -12.5 ถึง -76 Hz มวลเพิ่มขึ้น $+4.84$ ถึง $+29.40 \text{ ng/cm}^2$ หรือมีเชื้อประมาณ 2.01×10^6 ถึง 5.02×10^6 เซลล์ เครื่องมือวัดดังกล่าวเป็นต้นแบบในการพัฒนาให้เป็นเครื่องมือตรวจวัดเชื้อวัณโรค นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปสู่การวินิจฉัยเชื้ออื่น ๆ ได้

คำสำคัญ : วัณโรค, ไบโอเซนเซอร์, ดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์

Abstract

Tuberculosis (TB) is a disease caused by bacteria called *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis is among the top ten causes of global mortality and morbidity and an important public health problem in Thailand because of its leading cause of death. The standard method of laboratory diagnosis is time consuming. Recently, there has been an increasing interest in biosensor technology for rapid hybridization detection by using simple procedures, low-cost instrumentation, fast response times, and minimum sample pretreatment. The resonant frequency of a piezoelectric biosensor can be affected by a change in mass at AT-cut. This aim of this study was to invent piezoelectric biosensor for the detection of *M. tuberculosis* in specimen. The method was to design electronic circuit. The procedure concludes: optimization of mercaptopropionic acid (MPA), avidin, DNA probe, synthetic DNA target and detection of the *M. tuberculosis*. The result of this study showed that resonant frequency of the tool could measure 0 – 20 MHz. The optimal concentrations of MPA, avidin, and DNA biotinylated probe were 15 mM, 0.1 mg/ml, and 1.5 μ M, respectively. The frequencies of MPA, avidin, and DNA biotinylated probe were shifted at -166 Hz, -130.9 Hz, and -163.38 Hz, respectively, of which the masses were changed at +49.31 ng/cm², +56.52 ng/cm², +63.22 ng/cm², respectively. However, the frequency shift of a synthetic complementary DNA target at 0.7 μ M which the masses were changed at +7.74 ng/cm². The frequency was decreased when concentration was increased. The concentrations of genomic DNA target digestion with *HpaII* restriction enzyme were 0.01 to 0.035 μ g/ μ l of which the frequencies shift were decreased approximately from -12.5 to -76 Hz of which the masses were changed at +4.84 to +29.40 ng/cm². These DNA target concentrations were equal to 2.01x10⁶ to 5.02x10⁶ cells of *M. tuberculosis*. In the conclusion, the tool could be beneficial for further development as portable device for low cost routine diagnosis. It could be also an alternative tool for detection of the other diseases.

Key words: Tuberculosis, biosensor, DNA-piezoelectric biosensor

ประกาศคุณประการ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปี 2549 ตามสัญญาเลขที่ 009/2549

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	1
2. ทบทวนวรรณกรรม	3
3. วิธีการดำเนินวิจัย	5
3.1 การออกแบบ Probe	5
3.2 การออกแบบวงจรอิเล็กทรอนิกส์	5
3.3 การเตรียม Quartz crystals	5
3.4 การตรึงสารลงบนผิว Quartz crystals (Immobilization)	5
3.5 การศึกษาค่าเหมาะสม(Optimize) ในการตรวจวัด	6
3.51 ค่าเหมาะสมของ MPA	6
3.52 ค่าความเหมาะสมของ Avidin	6
3.53 ค่าความเหมาะสมของ DNA biotinylated probe	6
3.54 ค่าความเหมาะสมของ Synthetic DNA target	7
4. ผลการวิจัย	8
4.1 วงจรนับวัดความถี่ 20 MHz	8
4.2 การศึกษาปริมาณเหมาะสมของสารต่าง ๆ ในการตรวจวัด	11
4.2.1 ปริมาณเหมาะสมของ MPA	11
4.2.2 ปริมาณเหมาะสมของ Avidin	16
4.2.3 ปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe	20
4.2.4 ปริมาณเหมาะสมของ Synthetic DNA target	23
4.2.5 การตรวจวัดเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	25
5. สรุปและอภิปรายผล	29
บรรณานุกรม	30
ประวัติผู้วิจัย	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น Probe และ Complementary DNA target ในดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์	5
ตารางที่ 2 ความเข้มข้น 1 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml	11
ตารางที่ 3 ความเข้มข้น 5 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml	12
ตารางที่ 4 ความเข้มข้น 10 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml	13
ตารางที่ 5 ความเข้มข้น 15 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml	14
ตารางที่ 6 ความเข้มข้น 20 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml	15
ตารางที่ 7 ความเข้มข้น 15 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.025 mg/ml	17
ตารางที่ 8 ความเข้มข้น 15 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.05 mg/ml	17
ตารางที่ 9 ความเข้มข้น 15 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.1 mg/ml	18
ตารางที่ 10 ความเข้มข้น 15 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.15 mg/ml	18
ตารางที่ 11 ความเข้มข้น 15 mM ของ mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml	19
ตารางที่ 12 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 0.5 uM	20
ตารางที่ 13 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 0.75 uM	20
ตารางที่ 14 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 1.0 uM	21
ตารางที่ 15 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 1.5 uM	21
ตารางที่ 16 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 2.0 uM	22
ตารางที่ 17 ความเข้มข้น Probe 1.5 uM กับ Target 0 uM (Hybridization buffer)	23
ตารางที่ 18 ความเข้มข้น Probe 1.5 uM กับ Target 0.5 uM	23
ตารางที่ 19 ความเข้มข้น Probe 1.5 uM กับ Target 0.7 uM	23
ตารางที่ 20 ความเข้มข้น Probe 1.5 uM กับ Target 1.0 uM	24

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 21 ความเข้มข้น Probe 1.5 μ M กับ Target 2.0 μ M	24
ตารางที่ 22 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μ M กับ 0.01 μ g/ μ l DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i> .	25
ตารางที่ 23 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μ M กับ 0.015 μ g/ μ l DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i> .	25
ตารางที่ 24 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μ M กับ 0.020 μ g/ μ l DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i> .	26
ตารางที่ 25 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μ M กับ 0.025 μ g/ μ l DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i> .	26
ตารางที่ 26 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μ M กับ 0.035 μ g/ μ l DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i> .	27

สารบัญรูป

	หน้า	
รูปที่ 1	ขั้นตอนการตรึงสาร(Immobilization) ลงบนผิว Quartz crystals	6
รูปที่ 2	วงจรรีบวัดความถี่ 20 MHz	9
รูปที่ 3a	Print circuit board สำหรับประกอบวัสดุอิเล็กทรอนิกส์	10
รูปที่ 3b	เครื่องไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์	10
รูปที่ 4	ปริมาณเหมาะสมของ MPA	16
รูปที่ 5	ปริมาณเหมาะสมของ Avidin	19
รูปที่ 6	ปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe	22
รูปที่ 7	ปริมาณเหมาะสมของ Synthetic DNA target	24
รูปที่ 8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง DNA biotinylated probe กับ DNA target ที่ตัดด้วย <i>HpaII</i>	27
รูปที่ 9	แผนภูมิแสดงการตรวจวัดเชื้อ; <i>M. tuberculosis</i> (positive), <i>M. avium</i> (negative), และ hybridization buffer (blank)	28

บทที่ 1

บทนำ

Tuberculosis (TB) หรือ วัณโรค จัดเป็นโรคติดต่อชนิดร้ายแรงมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *มัยโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูลอซิส (Mycobacterium tuberculosis)* เชื่อดังกล่าวนี้อาจแพร่กระจายจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ทางอากาศคือโดย การจาม ไอรดกัน การพูดคุยกััน หรือ การสูดหายใจเอาเชื้อเข้าไปเท่านั้น ⁽¹⁾ เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบที่ส่วนใดของร่างกายเราก็ได้ แต่โดยปกติมันมักจะพบที่ปอด ⁽²⁾ เชื้อวัณโรคเป็นแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มมัยโคแบคทีเรียที่โตช้าและต้องใช้เวลาในการเพาะ เลี้ยงประมาณ 1-2 เดือน พบว่า ประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ที่ได้รับเชื้อ จะป่วยเป็นวัณโรค เชื้อวัณโรคส่วนมากก่อโรคที่ปอดแต่สามารถก่อโรคที่อวัยวะอื่นได้ ขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ⁽³⁾

วัณโรค เป็นสาเหตุการตายในอันดับต้น ๆ ของประชากรโลกปีละประมาณหลายล้านคน ^(4,5) ในปี พ.ศ. 2547 จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก(WHO) พบว่า มีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั่วโลกประมาณ 8.9 ล้านคน ซึ่งในจำนวนนี้สามารถตรวจพบด้วยวิธีการย้อม AFB (Acid fast bacilli) ที่ให้ผลบวกประมาณ 3.9 ล้านคน และเสียชีวิตแล้วประมาณ 1.7 ล้านคน ⁽⁶⁾ และเป็นสาเหตุให้คนไทยเสียชีวิตสูงเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาโรคติดต่อทั้งหมด จากรายงานของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า มีผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นประมาณปีละ 85,000 คน และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคประมาณ 7,000 คนต่อปี การแพร่ระบาดของโรคเอดส์ในปัจจุบันทำให้สถานการณ์ทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากทำให้มีผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มจำนวนขึ้น โดยวัณโรคเป็นโรคติดต่อที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้ป่วยเอดส์

ผู้ที่ติดเชื้อวัณโรค จะไม่รู้สึกเจ็บป่วย หรือมีอาการใดๆเกิดขึ้น และไม่สามารถแพร่เชื้อวัณโรคได้ แต่สามารถพัฒนาจนกลายเป็นโรควัณโรค เมื่อไรก็ได้ในขนาดที่ร่างกายอ่อนแอ หรือมีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งการแพร่ระบาดของโรค เมื่อมีคนหายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกาย เชื้อแบคทีเรียจะไปฝังตัวอยู่ที่ปอดของคนผู้นั้น และเริ่มเติบโตจากปอดนี้ เชื้อสามารถแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นในร่างกายของผู้ติดเชื้อได้ทางกระแสเลือด เช่นไปสูไต กระดูกสันหลัง และที่สมอง เชื้อวัณโรคที่ติดต่อได้นั้นมักจะเป็นเชื้อที่มาจากปอด และหลุดลม ในขณะที่เชื้อวัณโรคจากส่วนอื่นของร่างกาย เช่นที่ไต หรือกระดูกสันหลังมักไม่ก่อให้เกิดการติดต่อ คนที่ป่วยด้วยวัณโรคปอด จะสามารถแพร่เชื้อให้บุคคลที่เข้าใกล้หรือเกี่ยวข้องได้ในทุกๆวัน ในจำนวนนี้หมายรวมถึงผู้ที่เป็สมาชิกในครอบครัว เพื่อน และผู้ร่วมงาน ⁽²⁾

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นการตรวจที่ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ แต่ใช้ระยะเวลาถึง 2 – 4 เดือน ⁽³⁾ วิธีการย้อม AFB เป็นวิธีการย้อมสีกับกรดไมโคลิก ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวต่ำ ⁽⁷⁾ วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอส่วนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรคที่ต้องการตรวจหา โดยใช้ IS6110 ยีน ให้ผลการจับกับเชื้อดี แต่มีข้อเสียในขั้นตอน gel electrophoresis ต้องสัมผัสกับ Ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ^(8,9) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ เทคโนโลยีไบโอเซ็นเซอร์ เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สำเร็จรูปประเภทหนึ่งที่กำลังพัฒนาและให้ผลการตรวจที่เร็ว ^(11,12)

ไบโอเซนเซอร์(Biosensors) เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งจะมีตัวรับ (Bioreceptors) เช่น เอนไซม์, จลนทรีย์ หรือดีเอ็นเอ กับตัวส่งสัญญาณ (Transducers) ได้แก่ Electrochemical, Optical, Thermometric และ Piezoelectric ซึ่งข้อดี คือ ทำงาน ราคาถูก ใช้เวลา รวดเร็ว และใช้ปริมาณของตัวอย่างน้อย ตัวรับที่นิยมใช้กัน เช่น เอนไซม์, แอนติบอดี, แอนติเจน⁽¹³⁾ และ ดีเอ็นเอ⁽¹⁴⁾ กับส่วนตัวแปลงสัญญาณทำหน้าที่ประมวลผลการวิเคราะห์ในรูปแบบสัญญาณทาง ไฟฟ้า และตัวแปลงสัญญาณที่รู้จักกันในชื่อ ไพโซอิเล็กทริก เกี่ยวข้องกับการวัดค่าความถี่ Resonant มีผลกับการเปลี่ยนมวลที่ผิว quartz crystals ด้วย⁽¹³⁾

ดังนั้นดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ (DNA-Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance Biosensor หรือเรียกย่อ ๆ ว่า QCM) เป็นการวัดค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงมีผลต่อการ ทำปฏิกิริยาระหว่างความจำเพาะของ DNA probe บนผิวอิเล็กโทรดทองต่อ Complementary DNA targetในสารละลาย⁽¹⁵⁾ การพัฒนาความไวของการวัด โดยการใช้ Quartz crystals ที่มีค่าความถี่มูลฐานที่มีค่ามากกว่า 10 MHz แต่ Quartz crystals เป็นอุปกรณ์ที่หายาก เนื่องจากมีความเปราะบาง แดกง่าย และปัญหาของค่าความถี่ไม่คงที่⁽¹⁶⁾ ดังนั้นต้องมีการพัฒนาในส่วนของปริมาณสารที่เกาะบน ผิว Quartz crystals กับการตรึงสาร (Immobilization) ด้วยข้อจำกัดของ การตรึงสารจะไม่สามารถ เกาะติดผิวได้ด้วยวิธี Absorption^(17,18)

QCM เป็น Mass sensor มีความไวต่อน้ำหนัก การวัดมวลที่เปลี่ยนไปสามารถวัดได้ในระดับ ต่ำกว่านาโนกรัม ซึ่งประกอบด้วย Quartz ที่เป็นแผ่น (Disc) ที่มีขั้วอิเล็กโทรดสองด้าน, ออสซิลเลเตอร์ และศักย์ไฟฟ้า มีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงมวลกับความถี่ เป็นไปตามสมการ

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \frac{\Delta m}{A}$$
 ซึ่ง Sauerbrey ได้แสดงให้เห็นว่า ความถี่ Resonant ที่เปลี่ยนแปลงไป

เป็นสัดส่วนกับมวลที่ติดบนผิว Quartz crystals^(19,20) จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อสร้าง เครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์และพัฒนาให้สามารถตรวจวัดเชื้อวัณโรคได้

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

การเพาะเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* culture)

การเก็บสิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่จะมาจากระบบทางเดินหายใจ เช่น sputum, tracheal และ bronchial aspiration, และ bronchoalveolar lavage นอกจากนี้ยังอาจเก็บสิ่งส่งตรวจจากบริเวณอื่นๆ ที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อได้ เช่น ปัสสาวะ, gastric aspirates, เนื้อเยื่อ, biopsy specimens, หรือจากsterile body fluids เช่น น้ำไขสันหลัง, pleural และ pericardial aspirates ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องมักจะส่งเลือดและอุจจาระในการเพาะเชื้อวัณโรค สิ่งส่งตรวจควรส่งถึงห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมงแต่ถ้าไม่สามารถส่งได้ก็ควรเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (ยกเว้นเลือด) การเก็บเสมหะเพื่อส่งตรวจเพาะเชื้อควรเก็บตรวจในช่วงเช้าตรู่ 3 วันติดต่อกัน และการย้อม AFB ที่ให้ผลบวกจะให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อสูง ซึ่งการพบว่า smear AFB ให้ผลบวก 2 ใน 3 ตัวอย่างจะสามารถประเมินในเบื้องต้นว่าเป็นวัณโรคปอดได้⁽²¹⁾

การเพาะเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจที่ได้จาก sterile site ไม่จำเป็นต้องทำ decontamination แต่ถ้าเป็นบริเวณที่มีเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ปนเปื้อนจะต้องทำ decontamination ด้วย NaCl-2%NaOH และนำไปปั่นที่ มากกว่าหรือเท่ากับ 3,000 X g นาน 15 นาที ตะกอนจะนำมาเพาะเชื้อใน L-J medium หรือ selective 7H11 agar และ ย้อมสี AFB ตะกอนบางส่วนจะนำไปย้อมสี AFB สำหรับเลือดนั้นจะเจาะลงในขวด hemoculture สำหรับเพาะเชื้อวัณโรค เช่น BACTEC หรือ BacT/alert สิ่งส่งตรวจจะถูกอบเพาะที่ 35-37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5-10% คาร์บอนไดออกไซด์ หรือถ้าเป็นเชื้อที่เพาะใน L-J medium สามารถเพาะในบรรยากาศปกติได้ ระยะเวลาในการเพาะเชื้อประมาณ 6-8 สัปดาห์ ถ้าสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกกับ AFB stain แต่ยังไม่พบการเจริญของเชื้อใน 4 สัปดาห์ให้เพาะต่อไปอีก 4 สัปดาห์ เมื่อพบว่าการเจริญของเชื้อจึงนำมาทดสอบ Niacin accumulation test , nitrate reduction test ซึ่งจะให้ผลบวก

การวินิจฉัยทางอิมมูโนวิทยาสำหรับเชื้อ TB

ได้มีความพยายามในการพัฒนาทาง serology เพื่อตรวจ TB แต่ก็ยังไม่มีการทดสอบใดที่ใช้ในงานทางคลินิกได้⁽²²⁾ ความจำเพาะในการใช้ crude extraction นั้นต่ำมากจนไม่อาจนำมาใช้ทางคลินิกได้ แต่เมื่อนำวิธีการทาง enzyme-linked immunosorbent assay จะทำให้ความไวและความจำเพาะเพิ่มขึ้น⁽²³⁾ แอนติเจนที่ใช้ได้แก่ 38-kDa, lipoarabinomannan, antigen 60, antigen 85 complex, และกลุ่ม glycolipids ต่างๆ เช่น phenolic glycolipid Tb1, 2,3-diacyltrehalose, และ lipooligosaccharide ในปี ค.ศ. 2005 Welding และคณะได้มีการพบ novel protein ใหม่ในการตรวจหา TB ได้แก่ TB9.7, TB15.3, TB16.3, และ TB51⁽²⁴⁾ ความไวในการตรวจหา TB ด้วยวิธี immunoassays อยู่ที่ 65.8-100% และความจำเพาะอยู่ที่ 96-100%⁽²³⁾

การตรวจอื่นๆ ที่ถูกนำมาใช้ตรวจหา TB

การนำเอา HPLC วิเคราะห์ mycolic acid, complete genome sequences, genotypic identification ซึ่งในปัจจุบันมีน่ายาตรวจสำเร็จรูปเช่น AccuProbe, GenoType Mycobacteria, และ Innogenetic เป็นต้น

ผลงานที่มีมาก่อน

ในปี 2002 He และคณะนำเทคโนโลยีไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อชนิด *มายโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูลอซิส* โดยใช้การจับกันระหว่างแอนติเจน/แอนติบอดี⁽²⁵⁾ ต่อมาในปี 2004 Mac Sweeney และคณะได้พัฒนาริธีการ Optical DNA biosensor สำหรับการตรวจวินิจฉัย multi-drug resistant genes ใน *M. tuberculosis* ซึ่งพบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง⁽²⁶⁾ ต่อมาในปี 2005 Diaz-Gonzalez และคณะได้นำเทคนิค Immunosensor โดยอาศัยหลักการของ electrochemistry ในการวัดการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงลงบน carbon electrodes ด้วยวิธี screen-printing หรือ Fabrication⁽²⁷⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานในการใช้เครื่องมือวัดแบบดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อชนิด *มายโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูลอซิส* ซึ่งเป็นการวัดหาชนิดและปริมาณของเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การออกแบบ Probe

การออกแบบ Probe จะออกแบบจากยีนในส่วนของยีน IS6110 (Accession number AF189752) เนื่องจากมีการวิจัยด้วยวิธี PCR ว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* สูง^(21,22,23) ซึ่งมีความยาว 2,752 base pair (bp) โดยจะเลือกบริเวณที่จำเพาะต่อ target ที่เราต้องการตรงตำแหน่งที่ 1593-1622 จำนวน 30 bp และเชื่อมด้วย TTTTTT (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น Probe และ Complementary DNA target ในดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์

Name	Nucleotide sequence 5' to 3'
DNA biotinylated probe	Biotin-TTTTTTGGGGTTTTGGGTCTGACGACTGGCGATTTA
DNA target	TAAATCGCCAGTCGTCAGACCCAAAACCCC

3.2. การออกแบบวงจรอิเล็กทรอนิกส์

การออกแบบวงจรอิเล็กทรอนิกส์ในไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์จะใช้โปรแกรม Protel DXP การออกแบบวงจรมีวัดความถี่ครั้งนี้ มีความสำคัญที่ IC (Integrate Circuit) ไมโครคอนโทรลเลอร์ ซึ่งที่ใช้ คือ ATTINY2313 เป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ในตระกูล AVR ที่มีขนาด 20 ขาและทำการเขียนโปรแกรมการทำงานของเครื่องมือด้วยภาษา Assembly ลง IC จากนั้นนำอุปกรณ์ ทั้ง IC, ตัวต้านทาน, LCD, ตัวเก็บประจุ (หมัก. ไอออโดเมชั่น) ประกอบบน Print board

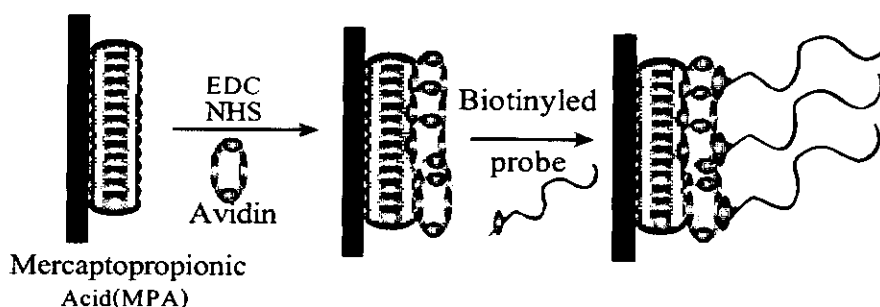
3.3. การเตรียม Quartz crystals

Quartz crystals มีความถี่ประมาณ 12 MHz, เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร, เส้นผ่าศูนย์กลางทอง 4 มิลลิเมตรและความหนา 0.2 มิลลิเมตร (บริษัท เคียวเซระ คินเซคิ (ประเทศไทย) จำกัด) แล้วทำการล้างผิวอิเล็กทรอนิกส์ทองที่เคลือบมาก่อนด้วย Piranha solution (H_2O_2 30% กับ H_2SO_4 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3) นานประมาณ 30 วินาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วตากให้แห้ง และทำการวัดค่าความถี่ Baseline (f_0)

3.4. การตรึงสารลงบนผิว Quartz crystals (Immobilization)

ทำการเชื่อมโมเลกุลของสารต่าง ๆ ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยการนำ Quartz crystal จุ่มลงใน 3-mercaptopropionic acid หรือ MPA (Sigma, USA) นาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด เพื่อให้ได้หมู่ซัลเฟอร์ที่จับกับผิวอิเล็กทรอนิกส์ทอง ล้างด้วย เอทานอล 100% และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 7 ul ของ 100 mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide หรือ EDC (Fluka, Switzerland) ในเอทานอล 100% และ 7 ul ของ 100 mg/ml *N*-hydroxysuccinimide หรือ NHS (Fluka, Switzerland) ในน้ำกลั่นทิ้งไว้ นานประมาณ 30 นาที ทำการเติม 10 ul ของ Avidin (Sigma, USA)

ใน phosphate buffer saline (Na_2HPO_4 10mM, NaH_2PO_4 10 mM และ NaCl 0.15M, pH 7.8) ทั้งไว้นานอย่างน้อยประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ดากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ (f_1) ทำการเติม ethanolamine HCl(Fluka, Switzerland) 1 mM, pH 8.0 ทั้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการล้างด้วย Immobilization buffer(NaCl 300 mM, Na_2HPO_4 20 mM, และ EDTA 0.1 mM, pH 7.4) และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 20 ul ของ DNA biotinylated probe ซึ่งละลายอยู่ใน Immobilization buffer นานประมาณ 20 นาที ก่อนทำการล้างด้วย Immobilization buffer และน้ำกลั่น ดากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ (f_2) (รูปที่ 1) ทำการ Hybridization ระหว่าง DNA probe กับ Complementary DNA target โดยการเติม 20 ul ของ complementary DNA target ซึ่งละลายอยู่ใน Hybridization buffer (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 20 mM, และ EDTA 0.1 mM, pH 7.4) นาน 20 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย Hybridization buffer ตามด้วยน้ำกลั่น ทำการดากให้แห้ง ก่อนการวัดค่าความถี่^(17,18) (f_3) โดยค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลง (Δf) จะมีค่าเท่ากับ $f_2 - f_3$



รูปที่ 1 ขั้นตอนการตรึงสาร(Immobilization) ลงบนผิว Quartz crystals

3.5. การศึกษาค่าเหมาะสม (Optimize) ในการตรวจวัด

3.5.1 ค่าเหมาะสมของ MPA

การหาค่าความเหมาะสมของ MPA จะทำการศึกษาความเข้มข้นในช่วง 1, 5, 10, 15 และ 20 mM เติม 5 ul ของ EDC และ NHS จากนั้นเติม 7 ul ของ avidin ทำการล้าง ดากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่

3.5.2 ค่าเหมาะสมของ Avidin

ทำการศึกษาความเข้มข้นของ Avidin ในช่วง 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 mg/ml โดยใช้ค่าความเหมาะสมของ MPA ตามด้วย 7 ul ของ EDC และ NHS จากนั้นเติม Avidin ในแต่ละความเข้มข้น ทำการล้าง ดากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่

3.5.3 ค่าเหมาะสมของ DNA biotinylated probe

ทำการศึกษาความเข้มข้นของ DNA biotinylated probe ในช่วง 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 μM โดยใช้ค่าความเหมาะสมของ MPA ตามด้วย 7 ul ของ EDC และ NHS จากนั้นเติม 10 ul

ของค่าเหมาะสม Avidin จากนั้นเติม DNA biotinylated probe ในแต่ละความเข้มข้น ทำการล้าง ดากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่

3.5.4 ค่าเหมาะสมของ Synthetic DNA target

ละลาย Target DNA ใน Hybridization buffer และศึกษาความเข้มข้นในช่วง 0, 0.5, 0.7, 1.0, และ 2.0 μM โดยใช้ค่าความเหมาะสมของ MPA ตามด้วย 7 μl ของ EDC และ NHS ตามลำดับ จากนั้นเติม 10 μl ของค่าเหมาะสมของ Avidin แล้วจึงเติม 20 μl ของ DNA biotinylated probe และ 20 μl ของ synthetic complementary DNA target ในแต่ละความเข้มข้น หลังจากนั้นทำการ ล้าง ดากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่

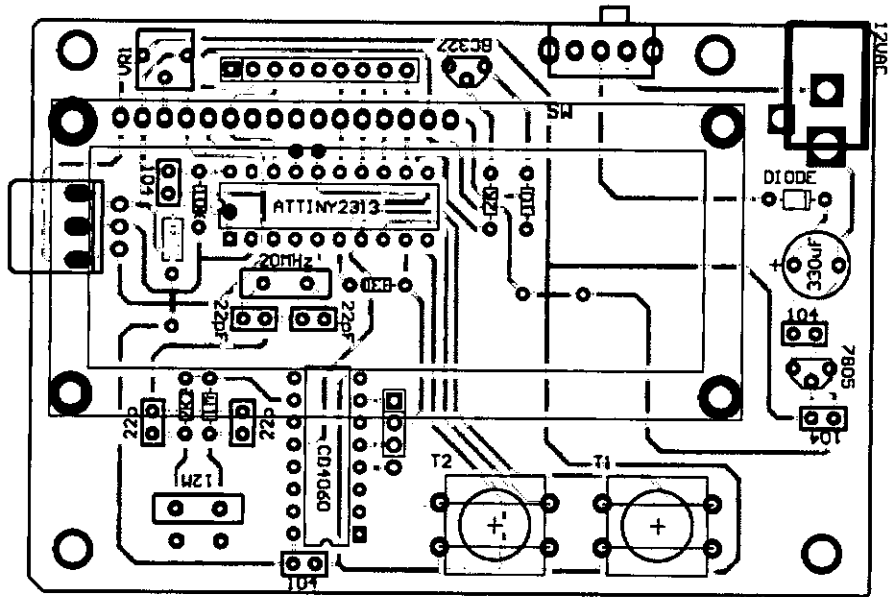
บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1. วงจรนับวัดความถี่ 20 MHz

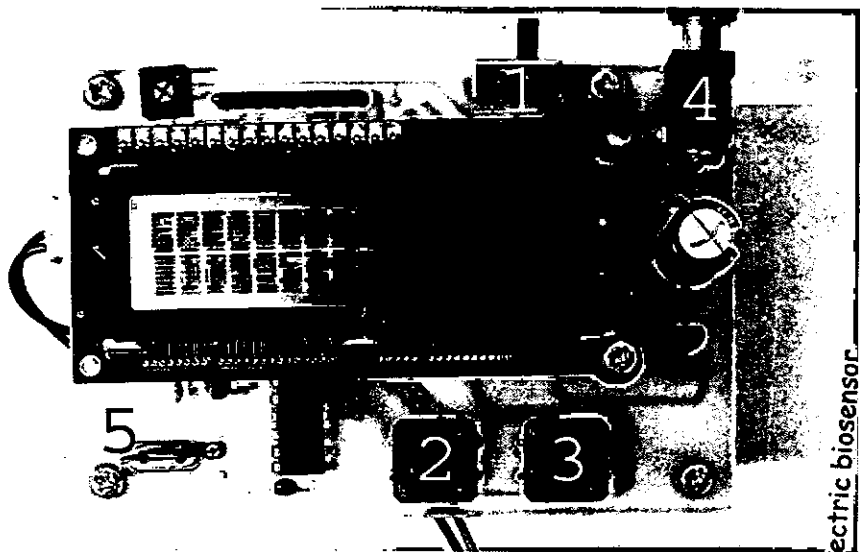
วงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่ออกแบบครั้งนี้ ทำให้มีขนาดกะทัดรัดเพื่อให้เหมาะสำหรับการเคลื่อนย้ายและพกพาได้สะดวก (รูป 2, รูปที่ 3a, และ 3b)

การทำงานของวงจร เริ่มจากสวิตช์ SW1 ทำหน้าที่ เปิด-ปิด การจ่ายไฟให้กับวงจรทั้งหมด โดยใช้แหล่งจ่ายไฟแบบ DC หรือ AC ที่มีแรงดันไฟขนาด 6-9 V และไดโอดต่อเพื่อทำหน้าที่เป็นวงจรเรกติไฟเออร์ ตัวเก็บประจุ C80 จะทำหน้าที่กรองแรงดันหรือฟิลเตอร์ (Filter) เพราะในการเปลี่ยนแรงดันไฟกระแสสลับให้เป็นแรงดันไฟกระแสตรงจะยังมีการกระเพื่อมของแรงดันไฟตรงที่เราเรียกว่าริปล (Ripple) ดังนั้นเราจึงใช้ตัวเก็บประจุเพื่อลดค่าแรงดันริปลลงไปโดยการเก็บค่าประจุไว้เมื่อช่วงแรงดันสูงและจะจ่ายประจุให้กับโหลดเมื่อมีการกระเพื่อมทางด้านต่ำดังนั้นโหลดจะได้แรงดันที่ราบเรียบขึ้น IC7805 เป็นไอซีเรกูเลเตอร์ (IC Regulator) ขนาด 5 V ซึ่งจะทำหน้าที่รักษาระดับของแรงไฟให้มีค่าคงที่ 5 V ตัวเก็บประจุ C90 จะทำหน้าที่กรองแรงดัน ที่ออกมาจากเอาต์พุตของ IC7805 และ ตัวเก็บประจุ C100 สามารถปรับค่าได้ ส่วนตัวเก็บประจุ C15 ทำหน้าที่กรองสัญญาณความถี่สูงทิ้งไป ซึ่งอาจจะเกิดจากอุปกรณ์วงจรภายในของไอซี ในการต่อใช้งานจะต่อระหว่างขาไฟเลี้ยงของไอซี กับขากราวด์ โดยต่อให้ใกล้กับขาไอซีให้มากที่สุด

ไอซีไมโครคอนโทรลเลอร์ที่ใช้ คือ ATTINY2313 เป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ในตระกูล AVR ที่มีขนาด 20 ขา ส่วนสวิตช์ S1 และ S2 จะเป็นวงจรถัดคาบเวลาของสัญญาณ รีเซตของ ATTINY2313 ตัวต้านทาน RP1 จะเป็นชนิดที่มีหลายตัวใน แพคเกจ (Packet) เดียวกัน โดยจะมีขาที่ต่อรวมอยู่ 1 ขา ส่วนขาที่เหลือจะมีเท่ากับจำนวนของตัวต้านทานที่ต่อรวม โดยนำมาต่อให้กับขาของพอร์ต PB แม้ว่าพอร์ต PD และ PB จะมีตัวต้านทานพูลอัฟภายในแล้วก็ตาม(ยกเว้นขา PB4 และ PB5 จะไม่มีตัวต้านทานพูลอัฟภายใน) ซึ่งจะทำหน้าที่สำหรับการยกกระดืบสัญญาณ (Pull - up) ของขาพอร์ตให้มีค่าสถานะสูง และจ่ายกระแส เมื่อถูกดึงระดับสถานะให้ต่ำจากภายนอก ATTINY2313 จะได้รับสัญญาณนาฬิกาจากคริสตอล X-tal ,C25 และ C35 ซึ่งตัวเก็บประจุ เป็นแบบเซรามิค ที่มีค่าอยู่ในระหว่าง 22 pF - 47 pF ส่วนคริสตอลค่าความถี่ใช้ 20MHz ส่วนขา PB4 จะเชื่อมกับ LCD ส่วนที่จุดต่อ JP2 มีไว้สำหรับการทดลองรับข้อมูลโดยใช้สวิตช์ JP2 ซึ่งจะต่อกับขาพอร์ต PD2 กับ PD5 ของไอซีไมโครคอนโทรลเลอร์ IC เบอร์ 74LS245 จะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ (Buffer) ข้อมูลขนาด 8 บิต ในกรณีที่ต้องการเชื่อมต่อพอร์ตกับอุปกรณ์ภายนอก ในกรณีที่ไอซีไมโครคอนโทรลเลอร์จะไม่สามารถที่จ่ายกระแสมากเกินไปที่จะขับอุปกรณ์เอาต์พุตโดยตรงได้ ดังนั้นจึงต้องผ่านไอซีที่ทำหน้าที่บัฟเฟอร์เสียก่อน จึงเปรียบเสมือนเป็นอุปกรณ์ป้องกันหรือตัวกันชนให้กับไอซีและเชื่อมด้วยคริสตอลที่ทดสอบที่ขา10 และ11ของIC74LS245



(a.)



(b.)

รูปที่ 3 a. Print circuit board สำหรับประกอบวัสดุอิเล็กทรอนิกส์ และ b. เครื่องไฟโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วยหมายเลข 1 = สวิตช์เปิด-ปิด, 2 = สวิตช์สำหรับตรวจวัดครั้งเดียว, 3 = สวิตช์สำหรับตรวจวัดต่อเนื่อง, 4 = ไฟ DC 9 V, 5 = ช่องเสียบ Quartz crystals และ 6 = LCD ประมาณผล

4.2. การศึกษาปริมาณเหมาะสมของสารต่าง ๆ ในการตรวจวัด

4.2.1 ปริมาณเหมาะสมของ MPA

ในการหาปริมาณเหมาะสมของ MPA จะศึกษาโดยทางอ้อม เนื่องจากมวลโมเลกุลมีจำนวนน้อย จึงมีการวัดในชั้นตอนของ Avidin ซึ่งในการทำการตรึงสารลงบน Quartz crystal จะทำในช่วงอุณหภูมิห้องเหมือนกันทุกปฏิกิริยา ที่ความเข้มข้นในช่วง 1, 5, 10, 15 และ 20 mM ของ MPA และ Avidin ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml โดยใช้ Quartz crystals ทั้งหมด 20 ชิ้นจะเห็นได้ชัดว่าที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20 mM ได้ค่าความถี่ลดลงเฉลี่ย (Δf) เป็น -0.415, -56, -109, -166, และ -54.947 Hz และมวลที่เปลี่ยนแปลงบนผิว quartz crystals เป็น +0.16, +17.29, +42.17, +49.31 และ +21.29 ng/cm² ตามลำดับ (ตารางที่ 2 – 6 และ รูปที่ 4)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้น 1 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml (เฉลี่ย = -0.415±47.62 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.960164	11.954190	-*	+0.16
2	11.958656	11.958273	-0.000383	
3	11.956772	11.956668	-0.000104	
4	11.958329	11.958318	-0.000011	
5	11.956028	11.956144	+0.000116	
6	11.955577	11.956044	+0.000467	
7	11.995761	11.957038	-*	
8	11.959497	11.955577	-*	
9	11.958664	11.958240	-0.000424	
10	11.956156	11.956660	+0.000504	
11	11.956385	11.956406	+0.000021	
12	11.957006	11.956878	-0.000128	
13	11.958774	11.958979	-*	
14	11.958936	11.958934	-0.000002	
15	11.959657	11.955672	-*	
16	11.960131	11.953868	-*	
17	11.956598	11.956070	-0.000528	
18	11.954819	11.954960	+0.000141	
19	11.956096	11.955801	-0.000295	

ตารางที่ 3 ความเข้มข้น 5 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml
(เฉลี่ย = -44.7 ± 303.25 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.960164	11.954190	-*	+17.29
2	11.958656	11.958273	-0.000383	
3	11.956772	11.956668	-0.000104	
4	11.958329	11.958318	-0.000011	
5	11.956028	11.956144	+0.000116	
6	11.955577	11.956044	+0.000467	
7	11.995761	11.957038	-*	
8	11.959497	11.955577	-*	
9	11.958664	11.958240	-0.000424	
10	11.956156	11.956660	+0.000504	
11	11.956385	11.956406	+0.000021	
12	11.957006	11.956878	-0.000128	
13	11.958774	11.958979	-*	
14	11.958936	11.958934	-0.000002	
15	11.959657	11.955672	-*	
16	11.960131	11.953868	-*	
17	11.956598	11.956070	-0.000528	
18	11.954819	11.954960	+0.000141	
19	11.956096	11.955801	-0.000295	
20	11.958307	11.959099	-*	

ตารางที่ 4 ความเข้มข้น 10 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml (เฉลี่ย = $-109.0 \pm 242.64\text{Hz}$)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9}g/cm^2)
1	11.958576	11.958238	-0.000338	+42.17
2	11.954361	11.954347	-0.000790	
3	10.803872	11.954860	-*	
4	11.958691	11.958392	-0.000299	
5	11.954240	11.954011	-0.000229	
6	11.955531	11.955201	-0.000330	
7	11.955640	11.955512	-0.000128	
8	11.955905	11.955659	-0.000246	
9	11.955430	11.955203	-0.000227	
10	11.956572	11.956384	-0.000188	
11	11.956032	11.955976	-0.000056	
12	11.958633	11.958107	-0.000526	
13	11.953904	11.960244	-*	
14	11.959993	11.960030	+0.000037	
15	11.957976	11.957852	-0.000124	
16	11.955308	11.955041	-0.000267	
17	11.956038	11.956156	+0.000118	
18	11.958793	11.958944	+0.000158	
19	11.954067	11.957408	-*	
20	11.957414	11.957312	-0.000102	

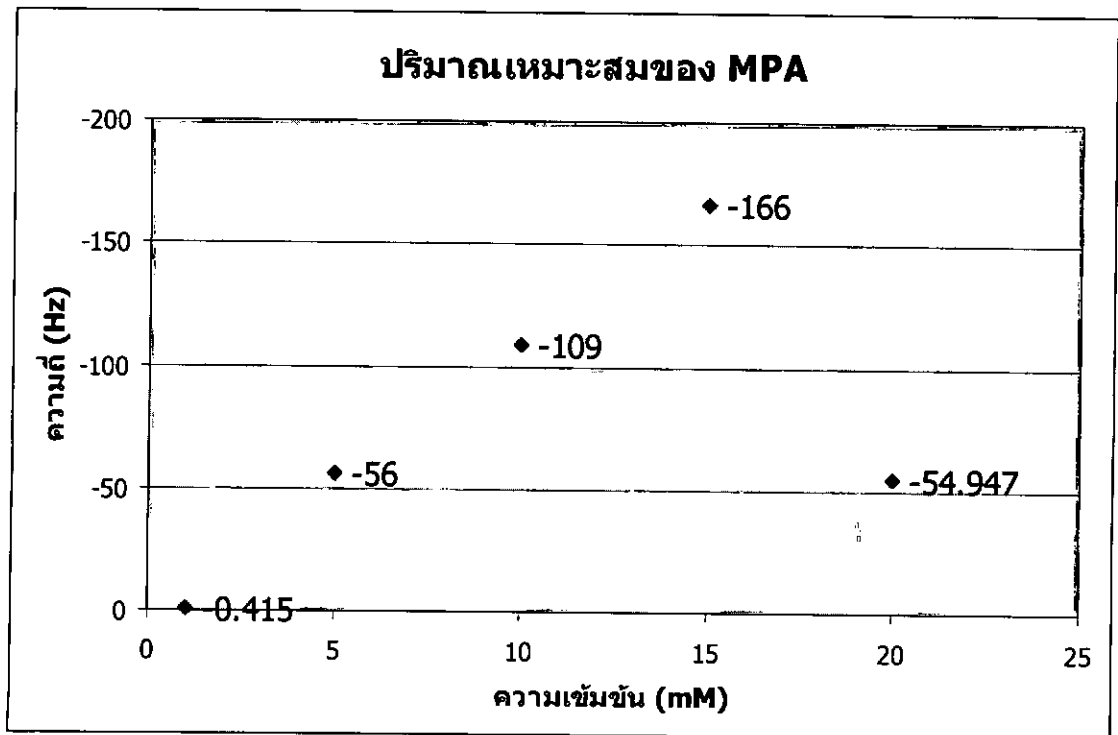
ตารางที่ 5 ความเข้มข้น 15 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml
(เฉลี่ย = -166.0 ± 178.06 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.955386	11.955371	-0.000015	+49.31
2	11.958746	11.959016	+0.000270	
3	11.954582	11.954379	-0.000203	
4	11.958382	11.958014	-0.000368	
5	11.955486	11.955139	-0.000347	
6	11.955624	11.955478	-0.000146	
7	11.958577	11.955830	.*	
8	11.956389	11.956377	-0.000012	
9	11.959881	11.955313	.*	
10	11.954414	11.954380	-0.000034	
11	11.958094	11.958003	-0.000091	
12	11.958120	11.957966	-0.000154	
13	11.957899	11.957952	+0.000053	
14	11.959401	11.959446	+0.000042	
15	11.955667	11.955480	-0.000187	
16	11.956785	11.957089	+0.000034	
17	11.959233	11.958920	-0.000313	
18	11.960288	11.959960	-0.000328	
19	11.958724	11.958331	-0.000393	
20	11.958614	11.958515	-0.000099	

ตารางที่ 6 ความเข้มข้น 20 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml
(เฉลี่ย = -54.947 ± 239.57 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.957094	11.957302	+0.000208	+21.29
2	11.959174	11.958782	-0.000392	
3	11.955254	11.956328	-*	
4	11.958209	11.958667	+0.000458	
5	11.957640	11.957384	-0.000256	
6	11.954144	11.954019	-0.000125	
7	11.959612	11.959446	-0.000166	
8	11.957611	11.957500	-0.000111	
9	11.954958	11.954633	-0.000325	
10	11.957766	11.958358	+0.000592	
11	11.954638	11.954561	-0.000077	
12	11.957276	11.957286	+0.000010	
13	11.954601	11.954520	-0.000081	
14	11.960180	11.959843	-0.000337	
15	11.959641	11.959550	-0.000091	
16	11.959459	11.959411	-0.000048	
17	11.957667	11.957593	-0.000078	
18	11.958902	11.958782	-0.000120	
19	11.960000	11.959972	-0.000028	
20	11.955880	11.955803	-0.000077	

หมายเหตุ * เกิดการสึกหลอของผิวทองบน quartz crystal ทำให้ไม่สามารถวัดค่าความถี่ได้



รูปที่ 4 ปริมาณเหมาะสมของ MPA

4.2.2 ปริมาณเหมาะสมของ Avidin

เมื่อได้ปริมาณเหมาะสมของ MPA แล้วใช้ปริมาณเหมาะสมนั้นศึกษาปริมาณเหมาะสมของ Avidin ซึ่งการศึกษาใช้ค่าความเข้มข้นช่วง 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 mg/ml โดยใช้ Quartz crystals ทั้งหมด 10 ชิ้นจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 1.5, และ 0.2 mg/ml ได้ค่าความถี่ลดลงเฉลี่ย (Δf) เป็น -65.8, -109.2, -130.9, -91, และ -54.9 Hz และมวลที่เปลี่ยนแปลงบนผิว quartz crystals เป็น +25.46, +42.24, +56.52, +35.21 และ +21.23 ng/cm² ตามลำดับ (ตารางที่ 7 – 11 และ รูปที่ 5)

ตารางที่ 7 ความเข้มข้น 15 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.025 mg/ml (เฉลี่ย = -65.8 ± 15.08 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.957465	11.957392	-0.000073	+25.46
2	11.956448	11.956355	-0.000093	
3	11.959244	11.959147	-0.000097	
4	11.953907	11.953897	-0.000010	
5	11.957796	11.957777	-0.000019	
6	11.954694	11.954716	+0.000022	
7	11.954867	11.954793	-0.000074	
8	11.954470	11.954380	-0.000090	
9	11.957867	11.957716	-0.000151	
10	11.958084	11.958011	-0.000073	

ตารางที่ 8 ความเข้มข้น 15 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.05 mg/ml (เฉลี่ย = -109.2 ± 17.45 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.958832	11.958643	-0.000189	+42.24
2	11.955142	11.954939	-0.000203	
3	11.958536	11.958489	-0.000047	
4	11.954360	11.954286	-0.000074	
5	11.956268	11.956170	-0.000116	
6	11.955926	11.955860	-0.000066	
7	11.955336	11.955297	-0.000039	
8	11.958211	11.958321	-0.000110	
9	11.959414	11.959252	-0.000162	
10	11.957745	11.957659	-0.000086	

ตารางที่ 9 ความเข้มข้น 15 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.1 mg/ml
(เฉลี่ย = -130.9 ± 23.07 Hz)

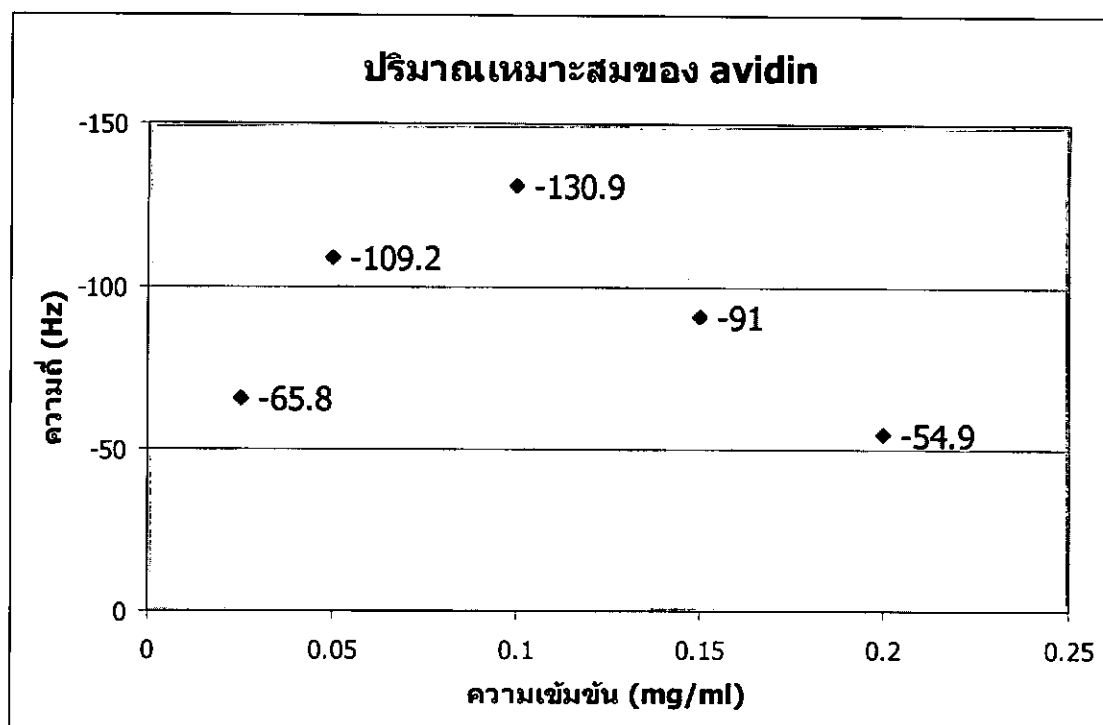
Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.957270	11.957150	-0.000120	+56.52
2	11.956118	11.956051	-0.000067	
3	11.959808	11.959707	-0.000101	
4	11.954340	11.954366	+0.000020	
5	11.957091	11.956916	-0.000175	
6	11.958523	11.958371	-0.000152	
7	11.954664	11.954494	-0.000170	
8	11.954513	11.954251	-0.000262	
9	11.957905	11.957809	-0.000096	
10	11.960198	11.960012	-0.000186	

ตารางที่ 10 ความเข้มข้น 15 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.15 mg/ml
(เฉลี่ย = -91 ± 35.21 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.955865	11.955734	-0.000131	+35.21
2	11.954859	11.954804	-0.000055	
3	11.954224	11.954104	-0.000120	
4	11.954713	11.954630	-0.000083	
5	11.958120	11.957993	-0.000127	
6	11.959188	11.959145	-0.000043	
7	11.959937	11.959830	-0.000107	
8	11.959910	11.959848	-0.000062	

ตารางที่ 11 ความเข้มข้น 15 mM ของ 3-mercaptopropionic acid (MPA) กับ avidin 0.2 mg/ml (เฉลี่ย = -54.9 ± 28.57 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.955004	11.954988	-0.000016	+21.23
2	11.958441	11.958392	-0.000049	
3	11.957035	11.957022	-0.000013	
4	11.956779	11.956707	-0.000072	
5	11.956251	11.956171	-0.000080	
6	11.954326	11.954265	-0.000061	
7	11.956032	11.955939	-0.000093	
8	11.958974	11.959680	+0.000706	



รูปที่ 5 ปริมาณเหมาะสมของ Avidin

4.2.3 ปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe

เมื่อได้ปริมาณเหมาะสมของ Avidin แล้วใช้ปริมาณดังกล่าวในการศึกษาปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe ซึ่งการศึกษาใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 μM ใช้ Quartz crystals ทั้งหมด 8 ชิ้น พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 μM ได้ค่าความถี่ลดลงเฉลี่ย (Δf) เป็น 43.6, 25.6, -52, -163.38, และ -104.25 Hz และมวลที่เปลี่ยนแปลงบนผิว quartz crystals เป็น -11.95, -9.93, +20.12, +63.22 และ +40.33 ng/cm^2 ตามลำดับ (ตารางที่ 12 – 16 และรูปที่ 6)

ตารางที่ 12 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 0.5 μM

(เฉลี่ย = 43.6 ± 283.78 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) ($10^{-9} \text{ g}/\text{cm}^2$)
1	11.956123	11.956302	+0.000179	-11.95
2	11.955507	11.956150	+0.000643	
3	11.955404	11.955131	-0.000273	
4	11.958691	11.958417	-0.000274	
5	11.955192	11.955294	+0.000102	
6	11.960019	11.960155	+0.000136	
7	11.954723	11.954537	-0.000187	
8	11.955100	11.955123	+0.000023	

ตารางที่ 13 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 0.75 μM

(เฉลี่ย = 25.6 ± 291.29 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) ($10^{-9} \text{ g}/\text{cm}^2$)
1	11.959155	11.959064	-0.0000091	-9.93
2	11.957316	11.957369	+0.000053	
3	11.954403	11.954345	-0.000058	
4	11.956292	11.956056	-0.000236	
5	11.958976	11.959590	+0.000614	
6	11.956673	11.957200	+0.000527	
7	11.955624	11.955361	-0.000263	
8	11.959779	11.959438	0.000341	

ตารางที่ 14 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 1.0 μM

(เฉลี่ย = -52 ± 43.86 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.956254	11.956235	-0.000019	+20.12
2	11.955683	11.955644	-0.000039	
3	11.957595	11.957568	-0.000027	
4	11.954724	11.954603	-0.000121	
5	11.956241	11.958108	-0.000133	
6	11.954475	11.954457	-0.000018	
7	11.957284	11.957252	-0.000032	
8	11.958660	11.958633	-0.000027	

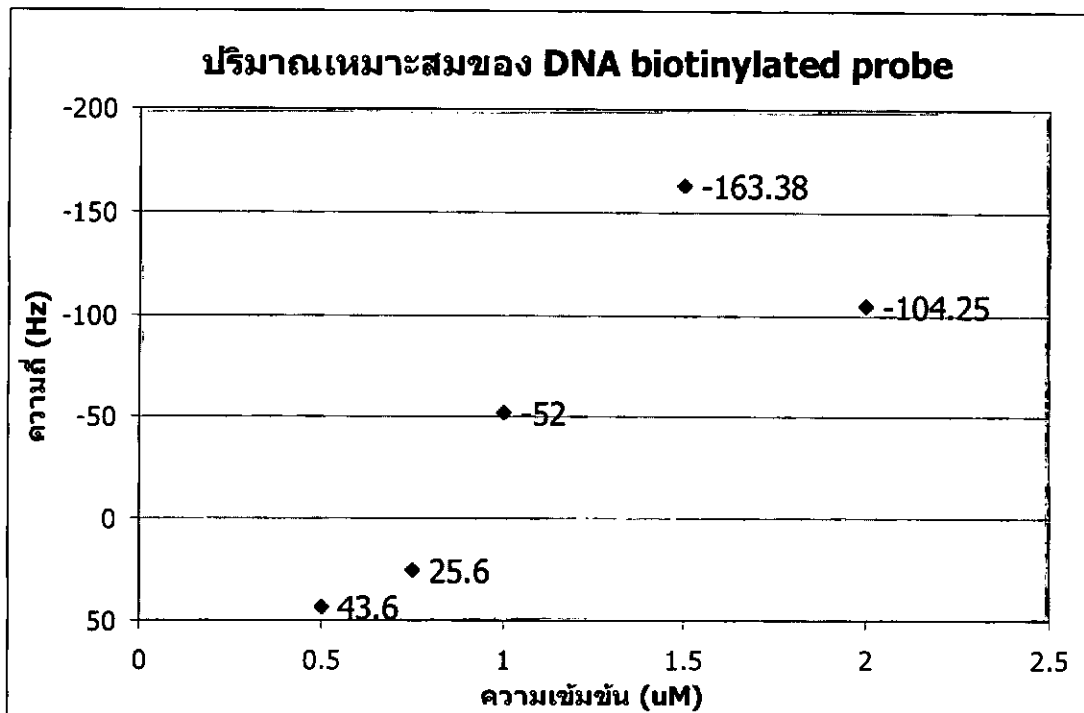
ตารางที่ 15 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 1.5 μM

(เฉลี่ย = -163.38 ± 56.47 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.956254	11.956235	-0.000019	+63.22
2	11.955683	11.955644	-0.000039	
3	11.957595	11.957568	-0.000027	
4	11.954724	11.954603	-0.000121	
5	11.956241	11.958108	-0.000133	
6	11.954475	11.954457	-0.000018	
7	11.957284	11.957252	-0.000032	
8	11.958660	11.958633	-0.000027	

ตารางที่ 16 ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของ avidin กับ Probe 2.0 μM
(เฉลี่ย = -104.25 ± 95.48 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	MPA+EDC+NHS+Avidin (f_1) (MHz)	$\Delta f = f_1 - f_0$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	11.954313	11.954305	-0.000008	+40.33
2	11.957905	11.957803	-0.000102	
3	11.956020	11.955873	-0.000333	
4	11.956598	11.956564	-0.000034	
5	11.958886	11.958796	-0.000090	
6	11.956806	11.956740	-0.000066	
7	11.957108	11.957056	-0.000052	
8	11.958521	11.958372	-0.000149	



รูปที่ 6 ปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe

4.2.4 ปริมาณเหมาะสมของ Synthetic DNA target

เมื่อได้ปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe แล้วใช้ปริมาณดังกล่าวในการศึกษา ปริมาณเหมาะสมของ synthetic DNA target การศึกษาใช้ความเข้มข้นในช่วง 0, 0.5, 0.7, 1.0, และ 2.0 μM ใช้ Quartz crystals ทั้งหมด 3 ชิ้นพบว่าที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 0.7, 1.0, และ 2.0 μM ได้ค่าความถี่ลดลงเฉลี่ย (Δf) เป็น 27.3, -1, -20, -24, และ -51.5 Hz และมวลที่เปลี่ยนแปลงบนผิว quartz crystals เป็น -10.58, +0.39, +7.74, +9.29 และ +19.92 ng/cm^2 ตามลำดับ (ตารางที่ 17 – 21 และรูปที่ 7)

ตารางที่ 17 ความเข้มข้น Probe 1.5 μM กับ Target 0 μM (Hybridization buffer)
(เฉลี่ย = 27.3 ± 12.68 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) ($10^{-9} \text{ g}/\text{cm}^2$)
1	11.954361	11.954294	-0.000067	11.954334	+0.000040	-10.58
2	11.955187	11.955148	-0.000036	11.955158	+0.000010	
3	11.954656	11.954556	-0.000100	11.954588	+0.000032	

ตารางที่ 18 ความเข้มข้น Probe 1.5 μM กับ Target 0.5 μM
(เฉลี่ย = -1.0 ± 0 Hz)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) ($10^{-9} \text{ g}/\text{cm}^2$)
1	11.953923	11.953777	-0.000146	11.953776	-0.000001	+0.39
2	11.957102	11.956973	-0.000129	11.957060	+0.000087	
3	11.957734	11.957366	-0.000368	11.957449	+0.000083	

ตารางที่ 19 ความเข้มข้น Probe 1.5 μM กับ Target 0.7 μM
(เฉลี่ย = -20.0 ± 1 Hz)

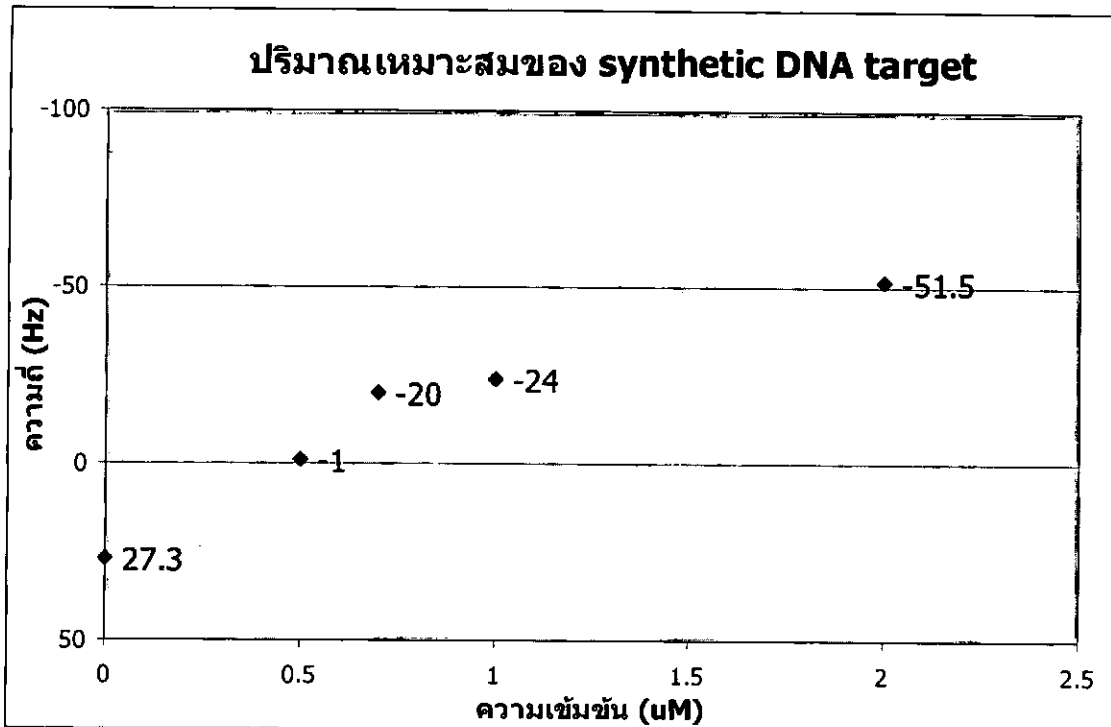
Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) ($10^{-9} \text{ g}/\text{cm}^2$)
1	11.957400	11.957308	-0.000092	11.957289	-0.000019	+7.74
2	11.959460	11.959374	-0.000086	11.959353	-0.000021	
3	11.959232	11.959112	-0.000120	11.959195	+0.000083	

ตารางที่ 20 ความเข้มข้น Probe 1.5 μM กับ Target 1.0 μM
(เฉลี่ย = $-24 \pm 0\text{Hz}$)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9}g/cm^2)
1	11.954353	11.954283	-0.000070	11.954315	+0.000032	+9.29
2	11.955644	11.955550	-0.000094	11.955526	-0.000024	
3	11.958321	11.958084	-0.000237	11.958121	+0.000037	

ตารางที่ 21 ความเข้มข้น Probe 1.5 μM กับ Target 2.0 μM
(เฉลี่ย = $-51.5 \pm 1.5 \text{ Hz}$)

Quartz	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9}g/cm^2)
1	11.957112	11.957043	-0.000069	11.956993	-0.000050	+19.92
2	11.956936	11.956808	-0.000128	11.956817	+0.000009	
3	11.960075	11.959915	-0.000160	11.959862	-0.000053	



รูปที่ 7 ปริมาณเหมาะสมของ Synthetic DNA target

4.2.5 การตรวจวัดเชื้อ *M. tuberculosis*

ในการตรวจวัดจะทำการตัดสาย DNA ให้ได้ขนาดเล็ก ๆ ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII* ขนาด 338 bp จากนั้นทำการละลาย DNA ใน Hybridization buffer โดยการทดสอบใช้ *M. tuberculosis*(positive), *M. avium*(negative) และ hybridization buffer (blank) การทดลองจะใช้เวลาความเข้มข้นของ DNA target เป็น 0.01, 0.015, 0.020, 0.025, และ 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ได้ผลการตรวจวัดดังแสดงในตารางที่ 22 – 26 และรูปที่ 8 – 9

ตารางที่ 22 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μM กับ 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA target ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *HpaII*.

(เฉลี่ย = -12.5 ± 1.5 Hz)

Quartz	Name	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	\bar{X}_{target} (Hz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	MTB	11.957112	11.957043	-0.000069	11.956993	-0.000050	-12.5	+4.84
2	MTB	11.956936	11.956808	-0.000128	11.956817	+0.000009		
3	MTB	11.960075	11.959915	-0.000160	11.959862	-0.000053		
4	MAV	11.958540	11.958395	-0.000145	11.958409	+0.000014	+14	-5.42
5	Buffer	11.955347	11.955200	-0.000147	11.955206	+0.000006	+6	-2.32

ตารางที่ 23 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μM กับ 0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA target ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *HpaII*.

(เฉลี่ย = -12.5 ± 6.5 Hz)

Quartz	Name	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	\bar{X}_{target} (Hz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	MTB	11.955212	11.955065	-0.000147	11.955086	+0.000021	-12.5	+4.84
2	MTB	11.956900	11.956748	-0.000152	11.956729	-0.000019		
3	MTB	11.958004	11.957854	-0.000150	11.957848	-0.000006		
4	MAV	11.957052	11.956632	-0.000420	11.956630	-0.000002	-2	+0.77
5	Buffer	11.958736	11.958646	-0.000090	11.958675	+0.000029	+29	-11.22

ตารางที่ 24 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μM กับ 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII*.

(เฉลี่ย = -38.0 ± 22 Hz)

Quartz	Name	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	\bar{X}_{target} (Hz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	MTB	11.956876	11.956560	-0.000316	11.956500	-0.000060	-38	+14.70
2	MTB	11.957652	11.957504	-0.000148	11.957488	-0.000016		
3	MTB	11.954576	11.954409	-0.000167	11.954420	+0.000011		
4	MAV	11.954704	11.954572	-0.000132	11.954614	+0.000042	+42	-16.25
5	Buffer	11.955801	11.955716	-0.000085	11.955739	+0.000023	+23	-8.89

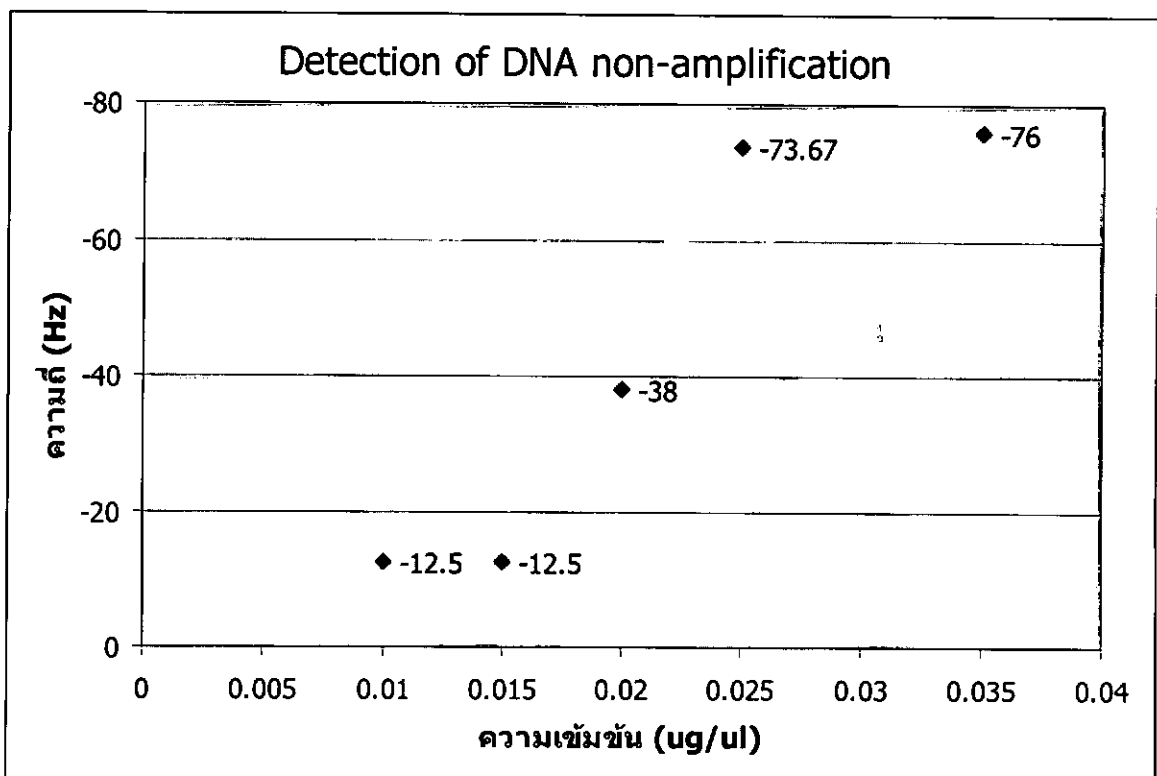
ตารางที่ 25 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μM กับ 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII*.

(เฉลี่ย = -73.67 ± 22.84 Hz)

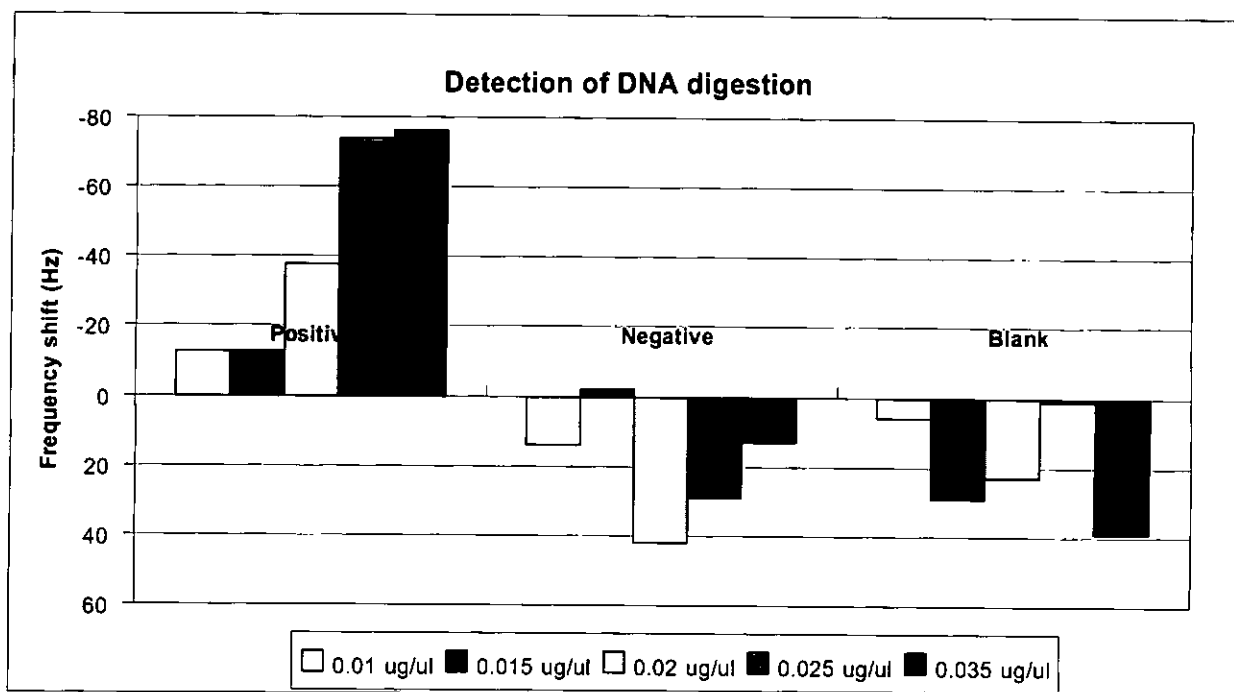
Quartz	Name	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	\bar{X}_{target} (Hz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	MTB	11.957306	11.957131	-0.000175	11.957036	-0.000095	-73.67	+28.50
2	MTB	11.955946	11.955812	-0.000134	11.955728	-0.000084		
3	MTB	11.957402	11.957260	-0.000172	11.957188	-0.000042		
4	MAV	11.958222	11.958148	-0.000074	11.958177	+0.000029	+29	-11.21
5	Buffer	11.957670	11.957555	-0.000115	11.957556	+0.000001	+1	-0.04

ตารางที่ 26 ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง DNA biotinylated probe 1.5 μM กับ 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA target ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII*.
(เฉลี่ย = -76.0 ± 14.29 Hz)

Quartz	Name	Baseline (f_0) (MHz)	Probe (f_2) (MHz)	$\Delta f = f_2 - f_0$ (MHz)	Target (f_3) (MHz)	$\Delta f = f_3 - f_2$ (MHz)	\bar{X}_{target} (Hz)	Mass change ($\bar{X}_{\Delta m}$) (10^{-9} g/cm^2)
1	MTB	11.960104	11.959891	-0.000213	11.959798	-0.000093	-76	+29.40
2	MTB	11.959257	11.959094	-0.000163	11.959017	-0.000077		
3	MTB	11.954933	11.954763	-0.000170	11.954705	-0.000058		
4	MAV	11.959168	11.959052	-0.000116	11.959065	+0.000013	+13	-5.03
5	Buffer	11.956576	11.956425	-0.000151	11.956464	+0.000039	+39	-15.09



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง DNA biotinylated probe กับ DNA target ที่ตัดด้วย *HpaII*



รูปที่ 9 แผนภูมิแสดงการตรวจวัดเชื้อ; *M. tuberculosis* (positive), *M. avium* (negative), และ hybridization buffer (blank)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

ในการพัฒนาเครื่องไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ ซึ่งเราจะทำการตรวจสอบความสามารถของเครื่องมือวัดก่อนการทดลองโดยใช้สมการของ Sauerbrey พบว่าที่ค่าความถี่ Quartz crystals ประมาณ 12 MHz และพื้นที่เคลือบทอง 0.125 ตารางเซนติเมตร จะให้ค่ามวลเปลี่ยนแปลงประมาณ 2 ug/Hz โดยใช้เวลาประมาณ 10 วินาทีจึงสามารถอ่านค่าความถี่ได้ ซึ่งข้อดีของไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้ที่สามารถวัดทั้งค่าความถี่และค่ามวลไปพร้อมกันในเวลาเดียวกันได้ และในขั้นตอนของการของการล้าง Quartz crystals ทั้งสองด้านโดยจะต้องไม่ล้างนานเกินไป เพราะจะทำให้ผิวทองเกิดการเสื่อมหรืออาจจะหลุดลอกได้ และต้องทำให้แห้งก่อน โดยวิธีการทิ้งไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อให้แห้งเร็วขึ้น ควรทำการหาค่า baseline ก่อนทุกครั้ง เนื่องจาก Quartz crystals แต่ละชิ้นมีค่าความถี่ไม่เท่ากันและเพื่อจะได้ทราบการเกาะติดของสารในขั้นตอนต่าง ๆ ของ Immobilization รวมถึงทราบประสิทธิภาพของเครื่องมือวัดที่ให้ค่าความถี่ที่ดีที่สุด โดยปริมาณเหมาะสมของ MPA ซึ่งที่ 15 mM $\Delta f \sim -166$ Hz , ปริมาณเหมาะสมของ Avidin ที่ 0.1 mg/ml $\Delta f \sim -130.9$ Hz, ปริมาณเหมาะสมของ DNA biotinylated probe ที่ออกแบบจากส่วนของยีน IS6110 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* และเชื่อมด้วย TTTTTT เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA probe เกิด Steric hindrance กันเองเมื่อเกาะติดกับผิวของ Quartz crystals และช่วยให้การจับกับ DNA target ได้ดีขึ้น ที่ 1.5 uM $\Delta f \sim -163.38$ Hz และปริมาณเหมาะสมของ DNA target พบว่าค่าความถี่ค่อย ๆ เปลี่ยนแปลง เริ่มตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.5 uM $\Delta f \sim -1$ Hz และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่าตรวจวัดที่ความเข้มข้น 0.01 – 0.035 ug/ul, $\Delta f \sim -12.5$ ถึง -76 Hz ความสามารถของเครื่องมือวัดจะให้ความแตกต่างเป็นค่าความถี่ที่ลดลง เมื่อมีสารเกาะติดและจะให้ค่าไปทางบวก เมื่อไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารหรือสารไม่เกาะจับบนผิว Quartz crystals

การพัฒนาเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ในการวิจัยครั้งนี้ ก่อให้เกิดประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อช่วยให้การวินิจฉัยเร็วขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่ายและสามารถตรวจหลาย ๆ ตัวอย่างพร้อมกันได้ ซึ่งอุปกรณ์สามารถที่จะได้ผลภายในประเทศ

บรรณานุกรม

1. Raviglione MC, Narain JP, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis and treatment. *Bulletin of World Health Organization* 1992;70:515-26.
2. Chaiprasert A. Rapid TB laboratory diagnosis service. A project co-ordinated between the faculty of medicine, Siriraj hospital, Mahidol university and the national center for genetic engineering and Biotechnology, from URL: [http://tb.biotec.or.th/ Eng/WhatisTBinfo.html#Top](http://tb.biotec.or.th/Eng/WhatisTBinfo.html#Top).
3. Chaiprasert A. Rapid TB laboratory diagnosis service. A project co-ordinated between the faculty of medicine, Siriraj hospital, Mahidol university and the national center for genetic engineering and Biotechnology, from URL: <http://tb.biotec.or.th/Eng/FT-Bg.html#TOP>.
4. Caldwell J, Caldwell P, Ankrah EM. et al. African families and AIDS: context, reactions and potential interventions. *Health Transition Review* 1993;3:1-16.
5. Wandwalo ER, Morkve O. Knowledge of disease and treatment among tuberculosis patients in Mwan za, Tanzania. *International Journal of Tuberc and Lung Dis* 2000;4:1041-6.
6. WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. Geneva: World Health Organization 2006.
7. Ke C, Berney H, Mathewson A, Sheehan MM. Rapid amplification for the detection of *Mycobacter- ium tuberculosis* using a non-contact heating method in silicon microreactor based thermal cycler. *Sensor Actuat* 2004;102:308-14.
8. Kai E, Sawanta S, Ikebukuro K, Honda T, Karube I. Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance. *Anal Chem* 1999;71:796-800.
9. Mahaisavariya P, Chaiprasert A, Khemngern S, Manonukul J, Tingtoy N. Detection and identification of *Mycobacterium* species by polymerase chain reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. *J Med Assoc Thai* 2005;8(1): 108-13.
10. Minunni M, Mannelli I, Spiriti MM, Tombelli S, Mascini M. Detection of highly repeated sequences in non-amplified genomic DNA by bulk acoustic wave (BAW) affinity biosensor. *Anal Chim Acta* 2004;526(1):19-25.
11. Jayarajah CN, Thompson M. Signaling of transcriptional chemistry in the on-line detection format. *Biosens Bioelectron* 2002;17(3):159-71.

12. Almadidy A, Watterson J, Piunno PAE, Raha S, Foulds IV, Horgen PA. Direct selective detection of genomic DNA from coli form using a fiber optic biosensor. *Anal Chim Acta* 2002;461(1):37-47.
13. Kumar A. Biosensors based on piezoelectric crystal detectors: theory and application, 2000, from URL: <http://www.tms.org/pubs/journals/JOM/0010/Kumar/Kumar-0010.html>.
14. Fengjiao H, Suqin L. Detection of *P. aeruginosa* using nano-structured electrode separated piezoelectric DNA biosensor. *Talanta* 2004;62(2):271-7.
15. Maes N, Magdalena J, Rottiers S, De Gheldre Y, Struelens MJ. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2002;40:1514-7.
16. Caruso F, Rodda E, Furlong D, Niikura K, Okahata Y. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilisation and hybridisation for nucleic acid sensor development. *Anal Chem* 1997;69:2043-9.
17. Tombelli S, Mascini M. Piezoelectric quartz crystal biosensors: recent immobilization schemes. *Anal Letter* 2000; 33 (11):2129-51.
18. Zhou XC, Huang LQ, Li SFY. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilisation methods and the application in genetic diagnosis. *Biosen Bioelectron* 2001;16:85-95.
19. Blum LJ, Coulet PR. Biosensor: principles and application. M. Dekker. Newyork; 1991:108-137.
20. Joshua K. QCM based DNA biosensor. *Chem* 2006;243:1-7.
21. Stone BL, Burman WJ, Hildred MV, Jarboe EA, Reves RR, and Wilson ML. The diagnostic yield of acid-fast-bacillus smear-positive sputum specimens. *J Clin Microbiol.* 1997 I; 35(4): 1030–1.
22. Daniel TM. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 1989;11 Suppl 2:S471-8.
23. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;135(5):1137-51.
24. Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(1):57-65.

25. He F, Zhang L. Rapid diagnosis of *M. tuberculosis* using a piezoelectric immunosensor. *Anal Sci.* 2002;18(4):397-401.
26. Mac Sweeney MM, Bertolino C, Berney H, Sheehan M. Characterization and optimization of an optical DNA hybridization sensor for the detection of multi-drug resistant tuberculosis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2004; 3:1960-3.
27. Diaz-Gonzalez M, Gonzalez-Garcia MB, Costa-Garcia A. Immunosensor for *Mycobacterium tuberculosis* on screen-printed carbon electrodes. *Biosens Bioelectron.* 2005 15;20(10):2035-43.

ประวัติย่อผู้วิจัย

Name : KOSUM CHANSIRI รหัสประจำตัว 38-20-0336
โกสม จันทศิริ

Date of Birth : 23 August 1961

Place of Birth : Bangkok, Thailand

Marital status : Single

Institutional Affiliation : Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
Srinakharinwirot University,
Sukhumvit 23, Bangkok 10110,
Thailand.

Education : B.Sc. (Chemistry) 1983
Kasetsart University, Bangkok
M.Sc. (Biochemistry) 1985
Mahidol University, Bangkok
Ph.D. (Biochemistry and Molecular Genetics) 1994
University of New South Wales, Australia

Position Held :

1986-1995	Lecturer
1995-1999	Assistant Professor
1999-present	Associate Professor
1994-2003	Chairman, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.
2004-2005	Deputy Dean of Research Affairs Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
2007-present	Deputy Dean of Administration Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University