# บทที่ 2
# การตรวจเอกสารและแนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกรที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล จำเป็นต้องอาศัยประวัติอาการสุกรป่วย รอยโรคที่เห็นด้วยตาเปล่าที่ได้จากการผ่าซากและรอยโรคในเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ ที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะแยกเชื้อเซอร์โคไวรัส ซึ่งมีโอกาสแยกได้ค่อนข้างต่ำมากและใช้เวลานาน อย่างไรก็ตามมีการนำเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคในระดับโมเลกุลเพื่อตรวจหาเชื้อหรือส่วนประกอบของเชื้อเซอร์โคไวรัส เช่น การตรวจหาและเพิ่มจำนวน DNA ของเซอร์โคไวรัสจากซีรั่ม (serum) หรือชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue) ที่มีรอยโรคด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) การตรวจหาแอนติเจนของเซอร์โคไวรัส (ส่วนประกอบของเชื้อที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิตอบสนองต่อเชื้อ) ในเนื้อเยื่อด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมีสทรี (immunohistochemistry) และการตรวจหาสารพันธุกรรมในเซลล์ของเนื้อเยื่อด้วยวิธีอินไซตูไฮบริดไดเซชั่น (*in situ* hybridization) (Morozov *et al.* 1998; McNeilly *et al.* 1999) โดยทั่วไปตัวอย่างชิ้นเนื้อจากอวัยวะที่มีรอยโรคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัส ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองจากบริเวณขาหนีบ พวงลำไส้ หรือบริเวณหลอดลม ม้าม ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ทอนซิล ปอด ตับ และไต อัตราผลการตรวจแยกเชื้อจากอวัยวะแต่ละชนิดอาจไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับสุกรแต่ละตัว ระดับความรุนแรงของรอยโรค รวมทั้งการติดเชื้อร่วมกับเชื้ออื่นๆ เช่น เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็นต้น ในการเพาะแยกเชื้อหรือการตรวจหา DNA ของเชื้อเซอร์โคไวรัส สามารถทำได้จากชิ้นเนื้อที่มีรอยโรค หรือจากตัวอย่างสำลีที่ป้ายจากตำแหน่งรอยโรคที่พบ (swab) เช่น ป้ายมาจากทางเดินอาหารส่วนปลายหรือทวาร (fecal swab) หรือจากทอนซิล (tonsil swab) (Caprioli *et al.* 2006) ซึ่งการใช้ตัวอย่าง swab นั้น มีความเหมาะสมและเอื้อประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคและควบคุมป้องกันโรค เพราะยังสามารถตรวจได้ในสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่ มีรายงานจากการทดลองที่ผ่านมาว่าสามารถตรวจหา DNA ของเชื้อจากตัวอย่าง swab ได้ภายใน 1 วันหลังจากที่มีการฉีดเชื้อ นอกจากนี้ในการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อเซอร์โคไวรัส ควรเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อซึ่งมีรอยโรคจากอวัยวะต่างๆ แทนที่จะเก็บตัวอย่างรอยโรคจากอวัยวะจำนวนไม่กี่แห่ง เนื่องจากพบว่าการเกิดรอยโรคภายหลังการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกรแต่ละตัวอาจไม่เหมือนกัน และอาจให้ผลการตรวจที่ต่างกันด้วย

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกรด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เลส หรือ PCR ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากข้อจำกัดในการเพาะแยกเชื้อ ทำให้การเพาะเชื้อค่อนข้างยาก ได้ปริมาณเชื้อน้อย และใช้เวลานาน การตรวจยืนเป้าหมายนิยมดำเนินการด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ให้ความแม่นยำ จำเพาะต่อเชื้อ และให้ความไวต่อการตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัสได้มากกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อ ตัวเทคนิคสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากกว่า 6 ล้านล้านโมเลกุลภายใน 30 รอบหรือภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการดำเนินการ PCR เริ่มจากกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA รอบๆ บริเวณเป้าหมายโดยใช้ความร้อนทำให้ DNA คลายเกลียวออก พร้อมสังเคราะห์ DNA โมเลกุลใหม่จากไพร์เมอร์เริ่มต้นเมื่อปรับ

อุณหภูมิให้เหมาะสม เลียนแบบการจำลองตัวของ DNA ขณะแบ่งเซลล์ (Saiki *et al*, 1988) ในปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวมีผู้นำมาใช้ร่วมกับโมเลกุลเรืองแสงทำให้สามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อคำนวณปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นต่อหน่วยเวลาในลักษณะสอดคล้องกับเวลาทำปฏิกิริยาจริง แม้เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อหลายชนิด การตรวจการปนของพืชดัดแปรพันธุกรรม การตรวจหาชนิดของเนื้อสัตว์ การตรวจการปนของวัตถุดิบที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าใช้งานได้เป็นอย่างดีก็ตาม (Lockley and Bardsley, 2000) แต่การดำเนินการโดยเทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากจำเป็นต้องใช้เครื่องมือ ต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้และทักษะ ใช้เวลา 3-5ชั่วโมง ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปขยายผลในภาคปฏิบัติ (Chaumpluk, 2006)

นวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันส่งผลให้เกิดความก้าวหน้าในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้วิธีการตรวจมีความหลากหลายมากขึ้น ตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (Sequence-based amplification) (Compton, 1991) การเพิ่มปริมาณจากการจำลองตัวเอง (self–sustained replication) (Guatelli *et al*., 1990) การเพิ่มปริมาณโดยการใช้ปฏิกิริยาแทนที่สาย DNA (strand displacement amplification) (Walker *et al*., 1992) และการเพิ่มปริมาณอุณหภูมิระนาบเดียว (loop mediated isothermal amplification; LAMP) (Notomi et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่ามีผู้คิดค้นวิธีเพิ่มปริมาณ DNA ที่เป็น DNA สายสั้นๆ เช่น branched DNA amplification (bDNA) invader และ rolling cycle amplification (Lyamichev *et al*., 1999 และ Ligardi *et al*., 1998) ซึ่งเทคนิคกลุ่มหลังจัดเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ตรงบริเวณเป้าหมายรูปแบบใหม่ๆ การเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหลักจัดว่ามีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆในการพิจารณาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ จากการเปรียบเทียบเทคโนโลยีทั้งในรูป branched DNA amplification (bDNA) invader amplification และ rolling circle amplification (Lyamichev *et al*., 1999)

นอกจากวิธี PCR แล้ว การเพิ่ม DNA ด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำโดยไพรเมอร์ให้เกิดการสังเคราะห์ DNA แบบห่วง (loop mediated isothermal amplification; LAMP) มีข้อเด่นเหนือกว่าเทคนิคอื่นแม้กระทั่งวิธี PCR โดยเฉพาะในเรื่อง การใช้อุณหภูมิระนาบเดียวที่ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับอุณหภูมิขณะสกัด DNA และในเรื่องความเฉพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่มีถึง 6 ไพรเมอร์ ที่ทำให้มีความเฉพาะเจาะจงสูงกว่าวิธี PCR ถึงมากกว่า 1000 เท่า และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ DNA จากแหล่งที่มี DNA หลากหลายชนิดที่ปนกัน เช่น กรณีของการสกัด DNA ที่มาจากอาหาร ทำให้สัดส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลดลงจากภาวะปกติลงมาก (จากปกติประมาณ 3 ชั่วโมง เป็น 25–40 นาที) โดยที่จำนวนโมเลกุล DNA ที่เพิ่มได้ มีปริมาณสูงกว่าวิธี PCR ไม่น้อยกว่า 1000 เท่า ทำให้เทคนิค LAMP มีประศักยภาพสูง และจากการที่ใช้อุณหภูมิที่คงที่ ที่ 60-65 องศาเซลเซียส ที่สอดคล้องกับการสกัด DNA ทำให้ลดความจำเป็นในการเตรียมอุปกรณ์จัดการกับอุณหภูมิต่างระดับลงได้ ทำให้เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้งานในภาคสนาม สำหรับการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจสอบได้จากความขุ่นของตะกอนสารประกอบฟอสเฟต ซึ่งได้ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาหรือดูจากการเรืองแสงของโมเลกุล binder อย่างใดอย่างหนึ่ง (Notomi *et al*., 2000, Chaumpluk *et al*., 2006) ซึ่งจะเสริมให้การตรวจสอบหลังการเพิ่มปริมาณ DNA ทำได้ง่าย

ในการเพิ่มปริมาณ DNA บนพื้นฐานของหลักการ loop mediated isothermal amplification อยู่บนหลักการขจัดสาย DNA (strand displacement) ขณะสังเคราะห์ ดังนั้นจึงพบการสังเคราะห์ DNA สายใหม่พร้อมๆกันกับพบการดันสายเก่าให้หลุดออก โดยในปฏิกริยาอาศัยไพรเมอร์หลัก 2 คู่ ได้แก่ไพรเมอร์คู่นอก (outer primer) และไพรเมอร์คู่ใน (inner primer) โดยพื้นฐานจะมีบริเวณที่สัมพันธ์กับไพรเมอร์ที่กล่าวมาทั้งหมด 6 บริเวณได้แก่ F3 F2 F1 B3 B2 B1 และบริเวณคู่สม F3c F2c F1c B3c B2c และ B1c ความหมายของ F คือ forward มี 3 บริเวณ ความหมายของ F1c-F3c คือ สายคู่สม complementary strand ของบริเวณ F1-3 และความหมายของ B คือ backward มี 3 บริเวณและเช่นเดียวกันก็มีบริเวณ B1c-B3c คือ สายคู่สม complementary strand ของบริเวณ B1-3 ตามลำดับ ส่วนของ DNA เป้าหมายสายบนจาก 3' ไป 5' จะมีบริเวณที่เกี่ยวข้องด้าน 3' F3c F2c และ F1c ซึ่ง complementary กับบริเวณ F3 F2 F1 ด้าน forward และที่ปลายด้าน 5' มี B1 B2 และ B3 ซึ่งก็จะมีปริมาณที่เป็น complementary เป็น B1c B2c และ B3c ด้านbackward ตามลำดับ ไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องคู่แรกได้แก่ คู่ไพรเมอร์ F3 และ B3 คู่ไพรเมอร์นี้ทำหน้าที่เสมือนไพรเมอร์ที่พบในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณ DNA ปกติ ส่วนคู่ไพรเมอร์อีกคู่นั้นได้แก่ FIP (forward inner primer) และ BIP (backward inner primer) ตามลำดับ ได้แก่บริเวณ F1c และ F2 (5'-F1c ถึง 3' ต่อกับ 5' F2 ถึง -3') ซึ่งจะเป็นคู่สมกับบริเวณ F1 และ F2c และ B1c และ B2 ซึ่งจะเป็นคู่สมกับบริเวณ B1 และ B2c ตามลำดับ หากนำไพรเมอร์ FIP และ BIP มาเขียนร่วมกับ F3 และ B3 จะได้วงจรของไพรเมอร์ในรูปแบบที่ไขว้ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านในจาก 5' ไป 3' และ 3' ไป 5' และมีไพรเมอร์ปกติวางตัวในบริเวณด้านนอก

กลไกการเพิ่มปริมาณ DNA อาศัยแรงผลักดันในการสังเคราะห์จาก inner primer มากกว่าแรงผลักดันในการสังเคราะห์จาก outer primer เหมือนที่พบในปฏิกิริยา PCR ดังนั้นจึงพบว่าในปฏิกริยาความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับคู่ FIP และ BIP จึงสูงกว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ F3 B3 อยู่ถึง 8-10 เท่า นอกจากนี้ เพื่อให้การสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ตัว เกิดอย่างสม่ำเสมออย่างที่ควรจะเป็น ตามอัตราที่อิสระต่างกันโดยการจับของ F2 และ B2 เกิดได้เร็วกว่า ดังนั้น DNA แม่แบบจำเป็นต้องรักษาเสถียรภาพโครงสร้าง DNA ให้อยู่ในรูปใกล้เคียงกันตลอดเวลา โดยจะต้องอยู่ในรูป linear ตลอดเวลาและต้องไม่ให้จับตัวเป็น helix ซึ่งทำได้โดยการใส่สารเคมีพวก helix destabilizing agent สารเหล่านี้จะช่วยลดแรงตึงในโครงสร้างส่วนที่เป็น base stacking ได้ดี ที่อุณหภูมิเหมาะสมของเอนไซม์ *Bst* DNA Polymerase ประมาณ 60-65° C จะเป็นจุดที่อุณหภูมิสูงพอที่จะทำให้โครงสร้าง DNA สายคู่เริ่มคลายตัว ไพรเมอร์ FIP และ BIP ซึ่งออกแบบให้ภายในโครงสร้างไพรเมอร์มีบริเวณ 5'F1c F2 3' และ 5'B1c B2 3' มีค่า melting temperature (Tm) ในบริเวณ F2 และ B2 ต่ำกว่า F1c และ B1c เพื่อกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของบริเวณ F2 และ B2 กับ DNA แม่แบบก่อน ดังนั้นหากพิจารณาเฉพาะปลายด้าย forward ด้านเดียวเสียก่อนจะพบว่า บริเวณ F2 ของไพรเมอร์ FIP (5' F1c F2 3') จะจับกับแม่แบบและเริ่มสังเคราะห์สาย DNA ขึ้นใหม่

เมื่อสังเคราะห์เสร็จหรืออยู่ในระหว่างสังเคราะห์ก็ตาม ปลายสาย DNA บริเวณเริ่มต้นจะมีบริเวณ เหนือบริเวณ F2c (ซึ่งในที่นี้คือ F3c) เปิดอยู่ พร้อมที่จะให้ไพรเมอร์ F3 เข้ามาจับ ซึ่งเมื่อไพรเมอร์ F3 เข้ามาจับแล้วพร้อมกันนั้นเกิดปฏิกิริยายืดสาย (extension) โดยที่ในระหว่างที่ไพร์เมอร์ F3 ต่อสาย DNA ให้ยาวออกไปนั้น ก็

จะเกิดการขจัดเอาสาย DNA เดิมที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ FIP ให้หลุดออก สาย DNA ที่หลุดออกมีบริเวณจากปลาย 5' เป็น 5'F1C F2 F1 ไปเรื่อยๆจนถึงสุดปลาย Backward ซึ่งในที่สุดบริเวณ F1c และ F1 ก็จะจับตัวกันเป็นโครงสร้าง hair pin ทางด้านปลาย backward จะเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน การสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขั้นที่ 2 จะเป็นไปด้วยอัตราที่เร็วและต่อเนื่อง เริ่มจากโครงสร้างที่ได้จากขั้นที่ 1 ที่บริเวณ 3' ของ F1 ของ dumb-bell ปลาย 3' จะเริ่มสังเคราะห์ DNA สายใหม่จนสุดแม่แบบ ขณะเดียวกันที่บริเวณ F2c ซึ่งขณะนี้เป็นโครงสร้าง single strand (บริเวณ loop) ทำให้ไพรเมอร์ FIP สามารถจับตัวและสังเคราะห์สายใหม่ การสังเคราะห์สายโดยไพรเมอร์ FIP นี้ เกิดขึ้นจนสุดสายโครงสร้าง dumb-bell ทำนองเดียวกัน ปลาย B1 จะสามารถสังเคราะห์สาย DNA ขึ้นใหม่ ได้ผลการสังเคราะห์สายที่ปลาย B1 ทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายดอกกระหล่ำ ที่โครงสร้างนี้เมื่อไพรเมอร์ BIP มาเกาะในบริเวณ B2c ส่วน3' ของ B2 จะเกิดการสังเคราะห์สายขึ้นใหม่จนสุด และการสังเคราะห์สาย DNA ขึ้นใหม่นี้จะวนอ้อมทุกสายในโครงสร้าง ทำให้ได้สาย DNA ที่มีโครงสร้างเป็นซิกแซกยาวขึ้นไปได้เรื่อยๆ ได้อย่างไม่สิ้นสุด (Notomi *et al.*, 2000)

เนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคใหม่ การพัฒนาเทคนิคสำหรับการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ DNA ยังคงมีน้อยอยู่ โครงการนี้จึงเริ่มต้นด้วยการพัฒนาการตรวจสอบตามหลักการที่เคยอ้างอิงในวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ให้สามารถดำเนินการได้ด้วยหลักการทาง LAMP นอกจากนี้การนำหลักการทางฟิสิกส์โดยเฉพาะไบโอเซ็นเซอร์ (Biosensor) มาประยุกต์ทำให้การตรวจวิคราะห์ทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น โดยที่ไบโอเซ็นเซอร์ คือ อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นจากการนำหลักการทางฟิสิกส์มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณ โดยอาศัยตัวจับสัญญาณจำเพาะหรือรีเซ็บเตอร์ (Receptor) และตัวแปลงสัญญาณเหล่านี้ให้อยู่ในรูปตัวเลข หรือ ทรานสดูเซอร์ (Transducer) ดังนั้นหลักการการตรวจวิเคราะห์ DNA ด้วยไบโอเซ็นเซอร์จะมีความจำเพาะของสัญญาณ DNA ซึ่งได้มาจากคุณสมบัติจับตัวจำเพาะของคู่สมตามหลักคู่สม (Complementary) ทั้งในรูป probe ในปฏิกิริยา hybridization หรือในรูป primer ในปฏิกิริยา PCR โดยสัญญาณดังกล่าวจะสอดคล้องกับปริมาณ DNA ในระบบ ในขณะที่ตัวแปลงสัญญาณอาจเป็นได้ทั้งการแปลงในรูปไฟฟ้า เช่น การวัดค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า การวัดกระแส หรือการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแสง เช่น การเรืองแสงของโมเลกุลที่จับตัวกับ DNA การวัดค่า resonance การเปลี่ยนแปลงของสี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์เหล่านี้สามารถตรวจวัดในรูปตัวเลขได้ทันทีและสอดคล้องกับปริมาณสัญญาณจริง (ตามความเข้มข้นของ DNA) ด้วยวิธีการที่ง่าย และในหลายกรณีที่ยังสามารถตรวจวัดอย่างต่อเนื่องได้ และด้วยความจำเพาะของ DNA คู่สมที่ช่วยให้เกิดความเฉพาะเจาะจงสูง ความง่ายและไวในการตรวจวัด

ในปัจจุบันการพัฒนาโมเลกุลเรืองแสง fluorophore เพื่อให้จับกับโมเลกุลเป้าหมายพัฒนาไปถึงขั้นที่สามารถตรวจสอบเป้าหมายต่างๆได้พร้อมกัน โดยอาศัยความแตกต่างของความยาวคลื่นที่ต่างกันของโมเลกุลเรืองแสงในการรับพลังงานเพื่อกระตุ้น (excitation) และปลดปล่อยพลังงานเพื่อเกิดการเรือง (emission) (Clegg, 1992) การใช้โมเลกุลเรืองแสงร่วมในการตรวจสอบสามารถดำเนินการได้ 2 รูปแบบหลัก รูปแบบแรกอาศัยความเฉพาะเจาะจงของความเป็นคู่สมของ DNA ร่วมกับปฏิกิริยาติดฉลากโมเลกุลเรืองแสงที่ปลาย 3' หรือ 5' ของสาย DNA และใช้ DNA นั้นในรูป probe อย่างไรก็ดีปฏิกิริยา hybridization ที่เกิดขึ้นในภาวะปกติต้องใช้

เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน 3- 18 ชั่วโมง ซึ่งการตรวจวิเคราะห์สัญญาณซึ่งถือเป็นขั้นตอนสำคัญมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา ด้วยวิธีการใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพ จากการตรวจเอกสารเกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบในช่วงล่าสุด 10 ปี พบการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงของโมเลกุลสี fluorophore เช่น SYBR green Gy3 Gy5 ฯลฯ และการนำหลักการถ่ายทอดพลังงานระหว่างโมเลกุล (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) ของโมเลกุล โพรบ (probe) มาใช้ร่วมกับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA อย่างไรก็ดีการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลเรืองแสงหรือการใช้หลักการในรูป FRET มีต้นทุนการวิเคราะห์สูงพอควร และใช้บุคลากรเฉพาะทาง จึงไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้นัก

นอกจากโมเลกุลเรืองแสงในรูป fluorophore แล้ว สารเคมีบางชนิดในกลุ่ม minor groove binder และ intercalator เมื่อจับกับ DNA แล้วสามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุล ไปสู่การตรวจวัดทางกายภาพในรูปการเรืองแสงและการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า (Saito *et al.*, 2004) สารเคมีกลุ่มนี้มีต้นทุนในการพัฒนาต่ำกว่า fluorophore ข้างต้นมาก

DNA binder แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็น intercalater ทำหน้าที่แทรกตัวระหว่างสาย DNA ที่รู้จักกันดีได้แก่สารละลาย ethidium bromide สารละลาย methylene blue และสารละลาย propidium iodide ฯลฯ สารเหล่านี้นิยมนำมาใช้ย้อม DNA ในงานศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ (cytology) มานาน DNA binder ในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ minor groove binder มีคุณสมบัติสำคัญที่จะจับตัวกับโครงสร้าง double helix ในส่วนที่เป็น minor groove ของ DNA สารในกลุ่มนี้ได้แก่ DAPI Distamycin Nuclear yellow และ Hoechst 33258 ฯลฯ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เน้นการพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการตรวจวัด เพื่อหาบริเวณ DNA เป้าหมายที่เป็น analyze ที่เหมาะสม โดยสืบค้นข้อมูล DNA เพื่อค้นหายีนเป้าหมายที่สามารถใช้เป็นตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบข้อมูลจากเชื้อหลากชนิด แล้วนำมาออกแบบไพร์เมอร์เพื่อพัฒนาระบบวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ที่เหมาะสม เมื่อออกแบบวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนได้แล้ว จะตรวจสอบ back ground ที่เป็น non specific sequence ว่าจะต้องไม่มีอยู่ หรือมีแต่ต่ำที่สุด และใช้การจับตัวของโมเลกุลกับ DNA ในรูปไบนเดอร์โดยตรงกับ DNA products เป้าหมายและกับปริมาณ DNA ในระบบทำให้ค่าที่อ่านได้มีความถูกต้องแม่นยำ ขณะเดียวกันการประยุกต์เทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ยังเป็นการเพิ่มระดับสัญญาณที่ตรวจจับได้ให้สูงขึ้น โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ทำให้ ไบโอเซ็นเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมา สามารถตรวจวัด DNA ได้ง่าย และตอบสนองหลักการ point of care ได้ดี เป็นประโยชน์ในการควบคุม ป้องกัน และตรวจติดตามโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ