

การพัฒนาดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์เพื่อเป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์

Development of DNA piezoelectric biosensor for diagnosis

โกศุม จันทศิริ¹ 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

3. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3. Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท.....วิจัยประยุกต์...ประจำปี...2551.....จำนวนเงิน...900,000...บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย...1...ปี ตั้งแต่...ตุลาคม 2551....ถึง...กันยายน 2552.....

บทคัดย่อ

บทนำ วัณโรค จัดเป็นโรคติดต่อชนิดร้ายแรงมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *มัยโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คิวโลซิส* (*Mycobacterium tuberculosis*) ซึ่งเป็นสาเหตุการตายในอันดับต้นๆ ของประชากรโลกปีละประมาณหลายล้านคนและเป็นสาเหตุให้คนไทยเสียชีวิตสูงเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาโรคติดต่อทั้งหมด การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการเดิมเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ดังนั้น เทคโนโลยีไบโอเซนเซอร์ เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สำเร็จรูปที่ทำงานง่าย ราคาถูก ใช้ปริมาณของตัวอย่างน้อยและให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ซึ่งไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์เป็นไบโอเซนเซอร์เกี่ยวกับการวัดค่าความถี่ Quartz Crystals คัดแบบ AT-cut มีความสัมพันธ์กับมวลที่ติดบนผิว Quartz crystals ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์และพัฒนาใช้งานเกี่ยวกับ ดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาระหว่าง DNA probe กับ DNA target ให้สามารถตรวจวัดเชื้อวัณโรคโดยใช้ยีน IS6110 บริเวณที่มีความจำเพาะต่อ *M. tuberculosis* วิธีการ ออกแบบวงจรวัดความถี่และใช้ Quartz crystals ที่เคลือบด้วยทองให้มีความถี่ 12 MHz ทำการตรึงสารลงบนผิว quartz crystals แล้วหาค่าความเหมาะสมของการตรึงสาร รวมทั้งการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ, ความสามารถของการวัดซ้ำ, ทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด, การทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ, การทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ, การทดสอบการ reuse ของ quart crystal, การทดสอบอายุการใช้งานของ quart crystal และ การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจริง ผลการทดลอง เครื่องมือวัดอ่านค่าตั้งแต่ 0 – 20 MHz ค่าความเหมาะสมของ thiol probe และ biotin probe เป็น 1 uM และ 1.5 uM ตามลำดับ และ synthetic DNA target เป็น 0.5 uM และการทดสอบความสามารถของเครื่องมือวัดพบ ค่าความผันแปรของเครื่องมือวัดรวม เท่ากับ 1.344 และค่าสัดส่วนความผันแปรของเครื่องมือวัด เท่ากับ 0.24 และ quartz crystal สามารถใช้ซ้ำได้มากกว่า 10 ครั้ง ทั้งยังสามารถเก็บ thiol probe ได้มากกว่า 2 เดือนที่ 4 °C การทดสอบ DNA target ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนโดย PCR และ ย่อยด้วย *BtgI* พบว่าแม้ DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วย PCR จะมีความมากกว่าการย่อยด้วย *BtgI* แต่การเพิ่มความไวโดยการติดเพิ่มมวล จะทำให้มีความไวเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 2 เท่าและให้ความไวในการตรวจไม่แตกต่างกัน 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 DNA probe, synthetic DNA target and the detection of reproducibility, total variation, precision, accuracy, reusable, shelf life and detection of the *M. tuberculosis* in clinical samples. The result of this study showed that resonant frequency of the tool could measure 0 – 20 MHz. The optimal concentrations of DNA biotinylated probe and thiol probe were 1.0 μM and 1.5 μM , respectively. However, the frequency shift of a synthetic complementary DNA target at 0.5 μM . The detection of total, ratio variation and reusable were 1.344, 0.24, and up to 10 times respectively. Shelf life of quartz crystal can be kept at 4 $^{\circ}\text{C}$ up to 2 months without reduction of their performance. The detection of PCR DNA target (209 bp) and DNA genome digestion with *BtgI* restriction enzyme added primer blocking and mass enhancement which the sensitivity was no significant but the frequency shift of PCR DNA target was decreased more than. 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