

## บทนำ

Tuberculosis (TB) หรือ วัณโรค จัดเป็นโรคติดต่อชนิดร้ายแรงมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *มัยโคแบคทีเรีย ทูเบอร์คิวโลซิส (Mycobacterium tuberculosis)* เชื่อดังกล่าวนี้นี้สามารถแพร่กระจายจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ทางอากาศคือ โดย การจาม ไอรดกัน การพูดคุยกัน หรือ การสูดหายใจเอาเชื้อเข้าไปเท่านั้น เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบที่ส่วนใดของร่างกายเราก็ได้ แต่โดยปกติมันมักจะพบที่ปอด เชื้อวัณโรคเป็นแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มมัยโคแบคทีเรียที่โตช้าและต้องใช้เวลานานในการเพาะ เลี้ยงประมาณ 1-2 เดือน พบว่า ประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ที่ได้รับเชื้อจะป่วยเป็นวัณโรค เชื้อวัณโรคส่วนมากก่อโรคที่ปอด แต่สามารถก่อโรคที่อวัยวะอื่นได้ ขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย

วัณโรค เป็นสาเหตุการตายในอันดับต้น ๆ ของประชากรโลกปีละประมาณหลายล้านคน และเป็นสาเหตุให้คนไทยเสียชีวิตสูงเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาโรคติดเชื้อทั้งหมด จากรายงานของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า มีผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นประมาณปีละ 85,000 คน และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคประมาณ 7,000 คนต่อปี การแพร่ระบาดของโรคเอดส์ในปัจจุบันทำให้สถานการณ์ทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากทำให้มีผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มจำนวนขึ้น โดยวัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้ป่วยเอดส์

ผู้ที่ติดเชื้อวัณโรค จะไม่รู้สึกรู้สึเจ็บป่วย หรือมีอาการใดๆเกิดขึ้น และไม่สามารถแพร่เชื้อวัณโรคได้ แต่สามารถพัฒนาจนกลายเป็นโรควัณโรค เมื่อไรก็ได้ในอนาคตหากร่างกายอ่อนแอ หรือมีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งการแพร่ระบาดของโรค เมื่อมีคนหายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกาย เชื้อแบคทีเรียจะไปฝังตัวอยู่ที่ปอดของคนผู้นั้น และเริ่มเติบโตจากปอดนี้ เชื้อสามารถแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นในร่างกายของผู้ติดเชื้อได้ทางกระแสเลือด เช่น ไปสู่ไต กระดูกสันหลัง และที่สมอง เชื้อวัณโรคที่ติดต่อดังนั้นมักจะ เป็นเชื้อที่มาจากปอด และหลุดกลม ในขณะที่เชื้อวัณโรคจากส่วนอื่นของร่างกาย เช่นที่ไต หรือกระดูกสันหลังมักไม่ก่อให้เกิดการติดต่อ คนที่ป่วยด้วยวัณโรคปอด จะสามารถแพร่เชื้อให้บุคคลที่เข้าใกล้หรือเกี่ยวข้องได้ในทุกๆวัน ในจำนวนนี้หมายรวมถึงผู้ที่เป็สมาชิกในครอบครัว เพื่อน และผู้ร่วมงาน

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นการตรวจที่ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ แต่ใช้ระยะเวลาถึง 2 – 4 เดือน วิธีการย้อม AFB เป็นวิธีการย้อมสีกับกรดโมโคลิค ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวต่ำ วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอส่วนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรคที่ต้องการตรวจหา โดยใช้ IS6110 ยีน ให้ผลการจับกับเชื้อดี แต่มีข้อเสียในขั้นตอน gel electrophoresis ต้องสัมผัสกับ Ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และเมื่อเร็ว ๆ นี้ เทคโนโลยีไบโอเซ็นเซอร์ เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สำหรับประเภทหนึ่งที่ทำง่ายและให้ผลการตรวจที่เร็ว

ไบโอเซนเซอร์(Biosensors) เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งจะมีตัวรับ (Bioreceptors) เช่น เอนไซม์, จุลินทรีย์ หรือดีเอ็นเอ กับตัวส่งสัญญาณ (Transducers) ได้แก่ Electrochemical, Optical, Thermometric และ Piezoelectric ซึ่งข้อดี คือ ทำงาน ราคาถูก ใช้เวลารวดเร็ว และ

ใช้ปริมาณของตัวอย่างน้อย ตัวรับที่นิยมใช้กัน เช่น เอ็นไซม์, แอนติบอดี, แอนติเจน และ ดีเอ็นเอ กับ ส่วนตัวแปลงสัญญาณทำหน้าที่ประมวลผลการวิเคราะห์ในรูปแบบสัญญาณทางไฟฟ้า และตัวแปลงสัญญาณที่รู้จักกันในชื่อ ไพโซอิเล็กทริก เกี่ยวข้องกับการวัดค่าความถี่ Resonant มีผลกับการเปลี่ยนมวลที่ผิว quartz crystals ด้วย

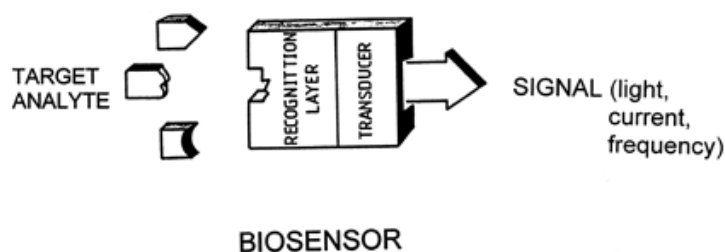
ดังนั้นดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ (DNA-Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance Biosensor หรือเรียกย่อ ๆ ว่า QCM) เป็นการวัดค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงมีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่าง ความจำเพาะของ DNA probe บนผิวอิเล็กโทรดของต่อ Complementary DNA target ในสารละลาย การพัฒนาความไวของการวัด โดยการใช้ Quartz crystals ที่มีค่าความถี่มูลฐานที่มีค่ามากกว่า 10 MHz แต่ Quartz crystals เป็นอุปกรณ์ที่ทำยาก เนื่องจากมีความเปราะบาง แดง่าย และปัญหาของค่าความถี่ไม่คงที่ ดังนั้นต้องมีการพัฒนาในส่วนของการเพิ่มปริมาณสารที่เกาะบนผิว Quartz crystals ด้วยการตรึงสาร (Immobilization) ด้วยข้อจำกัดของการตรึงสารจะไม่สามารถเกาะติดผิวได้ด้วยวิธี Absorption

QCM เป็น Mass sensor มีความไวต่อน้ำหนัก การวัดมวลที่เปลี่ยนไปสามารถวัดได้ในระดับต่ำกว่า นาโนกรัม ซึ่งประกอบด้วย Quartz ที่เป็นแผ่น (Disc) ที่มีขั้วอิเล็กโทรดสองด้าน, ออสซิลเลเตอร์ และ สักย์ไฟฟ้า มีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงมวลกับความถี่ เป็นไปตามสมการ 
$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \frac{\Delta m}{A}$$
 ซึ่ง Sauerbrey ได้แสดงให้เห็นว่า ความถี่ Resonant ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น สัมพันธ์กับมวลที่ติดบนผิว Quartz crystals จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อสร้างเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์และพัฒนาดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์สำหรับการการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ โดยเฉพาะการพัฒนา sensitivity, specificity, reproducibility, selectivity ในการตรวจวัด

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

ไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีการใช้งานมากมายในหลายๆด้าน เช่น การแพทย์ การเกษตรอุตสาหกรรม การทหาร และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ไบโอเซนเซอร์ เครื่องมือประกอบด้วยไบโอร์เซพเตอร์ (bioreceptor) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ไบโอร์เซพเตอร์เป็น โมเลกุลชีวภาพที่มีความสามารถในการจดจำตัวถูกวิเคราะห์ (target analyte) ได้อย่างเฉพาะเจาะจง ได้แก่ เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก แอนติบอดี และโปรตีนรีเซพเตอร์ (receptor protein) ฯลฯ โดยไบโอร์เซพเตอร์ถูกตรึงด้วยวิธีการทางกายภาพหรือวิธีการทางเคมีกับตัวแปลงสัญญาณ (transducer) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบหลักของเครื่องมือไบโอเซนเซอร์

ความจำเพาะของไบโอเซนเซอร์เป็นผลมาจากความจำเพาะของไบโอร์เซพเตอร์ ที่ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะระหว่างตัวถูกวิเคราะห์กับไบโอร์เซพเตอร์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง physiochemical เช่น การผลิตไอออน อิเล็กตรอน การผลิตและการใช้แก๊ส ความร้อน การเปลี่ยนแปลงมวลคุณสมบัติของสีหรือแสง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ที่เหมาะสม จึงเป็นการลดขั้นตอนที่ซับซ้อน และสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ อีกทั้งยังมีความไวในการตรวจสอบสูงคือสามารถตรวจหาสารในระดับปริมาณ femtomolar ได้ ต่อมาไบโอเซนเซอร์ถูกพัฒนาขึ้นโดยนำเทคโนโลยีของเมมเบรนมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ โดยเมมเบรนทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านซึ่งจะให้เฉพาะตัวถูกวิเคราะห์เข้าไปทำปฏิกิริยากับ ไบโอร์เซพเตอร์ และป้องกัน โมเลกุลชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีของใยแก้วนำแสง (optical fiber) และ nanotechnology มาประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอเซนเซอร์

ดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ (DNA-Piezoelectric Quart Crystal Microbalance Biosensor หรือเรียกย่อๆ ว่า QCM) เป็นการวัดค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงมีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างความจำเพาะของ DNA probe บนผิวอิเล็กโตรดทองคำต่อ complementary DNA target ในสารละลาย มีข้อดี คือ ทำงานราคาถูก ใช้เวลารวดเร็ว ใช้ปริมาณของตัวอย่างน้อย เป็นการวัดแบบ real time โดยวัดค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลง สามารถวัดได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ และสามารถใช้ประโยชน์ในด้าน early detection

ส่วนตัวแปลงสัญญาณทำหน้าที่ประมวลผลการวิเคราะห์ในรูปสัญญาณทางไฟฟ้า และตัวแปลงสัญญาณที่รู้จักกันในชื่อ “ไพโซอิเล็กทริก” เกี่ยวข้องกับการวัดค่าความถี่ resonance มีผลกับการเปลี่ยนมวลที่ผิว quartz crystals ด้วย การพัฒนาความไวของการวัดโดยใช้ quartz crystals ที่มีค่าความถี่มูลฐานที่มีค่ามากกว่า 10 MHz แต่ quartz crystals เป็นอุปกรณ์ที่มีความเปราะบาง แดกง่าย และปัญหาของค่าความถี่ไม่คงที่ ดังนั้นต้องมีการพัฒนาในส่วนของการปรับสภาพสารที่เกาะบนผิว quartz crystals กับการตรึงสาร (immobilization) ด้วยข้อจำกัดของการตรึงสารจะไม่สามารถเกาะติดผิวได้ด้วยวิธี absorption

QCM เป็น mass sensitive sensor ประกอบด้วย quartz ที่เป็นแผ่น (disc) มีขั้วอิเล็กโทรดสองด้าน ออสซิลเลเตอร์ และสวิตช์ไฟฟ้า QCM มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของมวลสารที่ตรึงอยู่บนผิว อิเล็กโทรดของ quartz crystals ในระดับต่ำกว่านาโนกรัม โดยความสัมพันธ์ต่อมวลกับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงนั้นจะเป็นไปตามสมการ

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \frac{\Delta m}{A}$$

ซึ่ง Sauerbrey ได้แสดงให้เห็นว่า ความถี่ resonance ที่เปลี่ยนแปลงไป ( $\Delta f$ ) เป็นสัดส่วนกับมวล ( $\Delta m$ ) ที่ติดบนผิว จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อสร้างเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์และพัฒนาให้สามารถตรวจวัดเชื้อได้

ในปัจจุบันการนำเทคโนโลยีไบโอเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อยังไม่เป็นที่แพร่หลายเมื่อเทียบกับ Glucose biosensor ที่มีมูลค่าทางการตลาดในระดับสูง แต่ในอนาคตไบโอเซนเซอร์จะมีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อต่างๆ (ตารางที่ 1) จากสิ่งส่งตรวจที่มีเป็นจำนวนมาก เช่น การระบาดของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค และ emerging infectious diseases (EIDs)

ในปี 2002 He F. and Zhang L นำเทคโนโลยีไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อชนิด *M. tuberculosis* โดยใช้การจับกันระหว่างแอนติเจน/แอนติบอดี ต่อมาในปี 2004 Mac Sweeney และคณะได้พัฒนาวิธีการ Optical DNA biosensor สำหรับการตรวจวินิจฉัย multi-drug resistant genes ใน *M. tuberculosis* ซึ่งพบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง ต่อมาในปี 2005 Diaz-Gonzalez และคณะได้นำเทคนิค Immunosensor โดยอาศัยหลักการของ electrochemistry ในการวัดการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงลงบน carbon electrodes ด้วยวิธี screen-printing หรือ Fabrication ต่อมาในปี 2007 ชงชัย แก้วพินิจ และคณะได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการพัฒนาดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ซึ่งต้องทำการย่อย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HpaII ก่อนที่จะนำไปวัดด้วย DNA piezoelectric biosensor โดยใช้ quart crystals แบบ AT-cut ที่ 35° 10' ตามแนวแกน Z ซึ่งค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงมีความสัมพันธ์กับมวลที่ติดบนผิว quartz crystals และได้ทำการสร้างเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์และพัฒนาใช้งานเกี่ยวกับ ดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาระหว่าง DNA probe กับ complementary DNA target ให้สามารถตรวจวัดเชื้อวัณโรคโดยใช้ยีน IS6110 ในบริเวณที่มีความจำเพาะต่อ

*M. tuberculosis* จากการออกแบบวงจรวัดความถี่ให้เครื่องมือวัดสามารถอ่านค่าได้ไม่เกิน 20 MHz และใช้ quartz crystals ที่มีอิเล็กโทรดทองคำความถี่ 12 MHz ทำการตรึง DNA probe ลงบนผิวอิเล็กโทรดของ quartz crystals โดยหาปริมาณที่เหมาะสมของ mercaptopropionic acid หรือ MPA, avidin, DNA probe และ complementary DNA target พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของ MPA เท่ากับ 15 mM ของ avidin เท่ากับ 0.1 mg/ml ของ DNA probe เท่ากับ 1.5  $\mu$ M และ complementary DNA target ที่ความเข้มข้น 0.7  $\mu$ M โดยค่าความถี่ที่ลดลงแปรผันตรงกับความเข้มข้น ความไว (sensitivity) ในการตรวจอยู่ในระดับ 10 ng เทียบเท่ากับปริมาณเชื้อ  $2 \times 10^6$  เซลล์ อย่างไรก็ตามงานของรชชยนั้นยังไม่ได้ทำกับสิ่งส่งตรวจโดยตรง นอกจากนี้ยังต้องทดสอบ specificity, reproducibility, selectivity, accuracy, precision และค่าอื่นๆ ที่ต้องทดสอบสำหรับความน่าเชื่อถือของเครื่องมือโดยเทียบกับ gold standard methods เช่นการทำ culture ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการต่อยอดเพื่อพัฒนาเครื่องมือให้มีความสมบูรณ์สามารถนำไปผลิตใช้งานจริงได้

**ตารางที่ 1** ตัวอย่างไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อต่างๆ ดำเนินการมาตั้งแต่ปี ค.ศ.

2004

| Diseases                                                         | Type of Biosensors                         | References                                 |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Mad cow diseases                                                 | Antibody based-<br>piezoelectric biochip   | United States Patent 20060121531           |
| Anthrax                                                          | Antibody based-<br>piezoelectric biosensor | WWW.BIOMED.DREXEL.EDU/TechnologyPortfolio/ |
| Methicillin-resistant<br><i>Staphylococcus aureus</i><br>(MRSA). | DNA-based<br>piezoelectric biosensor       | Tombelli et al , 2006                      |
| Salmonella typhimurium                                           | Affinity probes<br>piezoelectric biosensor | Olsen et al, 2006                          |
| Shagas' diseases<br>( <i>Trypanosoma cruzi</i> )                 | Immunosensor                               | Ferreira et al, 2005                       |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                                | Immunosensor                               | Diaz-Gonzalez et al, 2005                  |
| HIV                                                              | Antibodi based-<br>piezoelectric biosensor | Tombelli et al , 2005                      |
| multi-drug resistant<br>tuberculosis                             | Optical DNA biosensor                      | Mac Sweeney et al, 2004                    |
| Hepatitis C virus                                                | DNA based-piezoelectric<br>biosensor       | Skladal et al, 2004                        |
| SAR                                                              | Immunosensor                               | Zuo et al, 2004                            |

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

##### 3.1 การเตรียมสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ

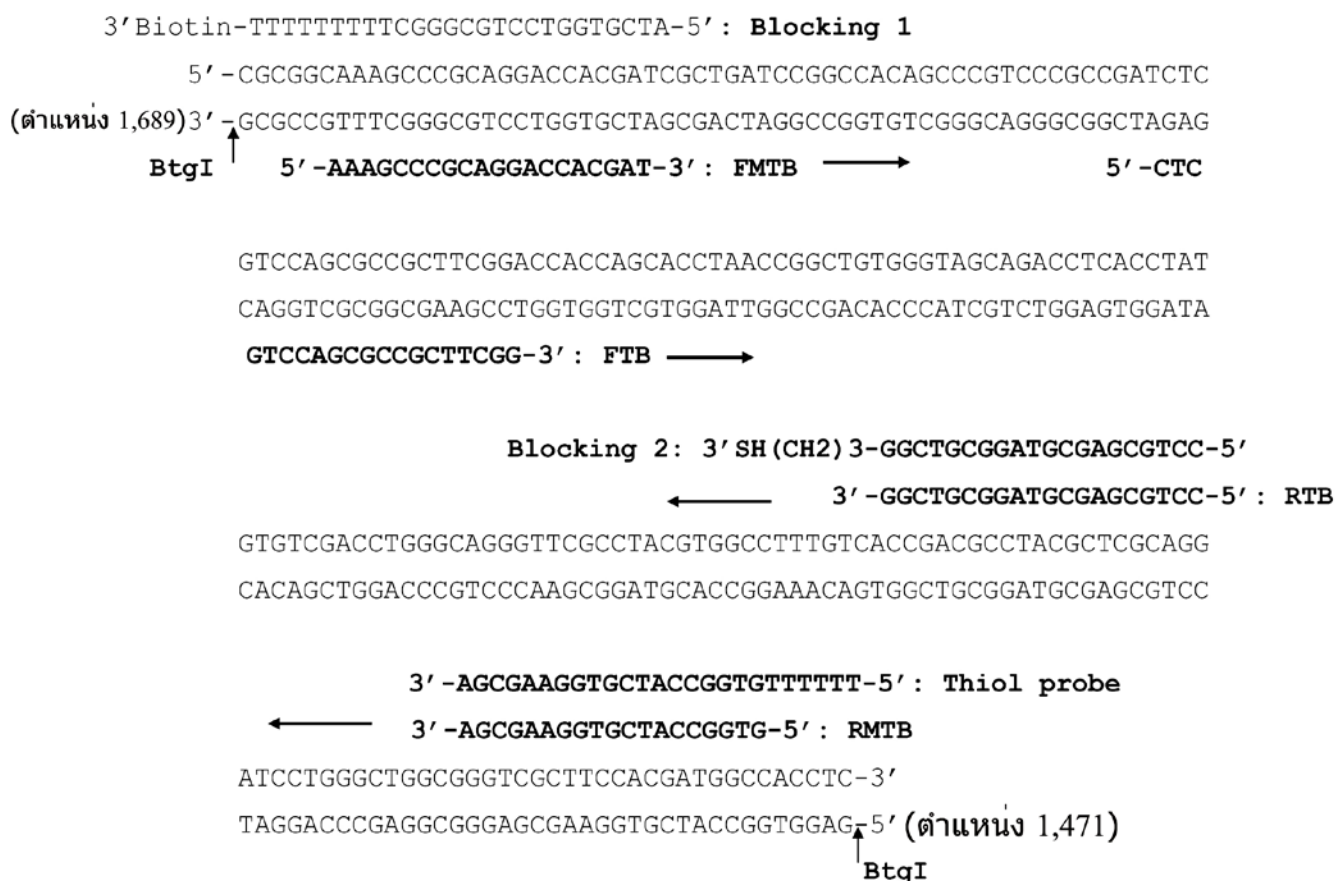
ในการพัฒนาดีเอ็นเอไอโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ให้มีความไวในการตรวจวัดเชื้อวัณโรคชนิด *M. tuberculosis* จากเสมหะ ซึ่งได้จาก สำนักวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข และสิ่งส่งตรวจอื่นๆ โดยตรง โดยที่เสมหะนั้นจะได้รับจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นวัณโรคที่ส่งเข้ามายังห้องปฏิบัติการของสำนักวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข ทั้งหมด 200 ตัวอย่าง การทดสอบจะใช้ สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่ smear AFB stain positive 150 ตัวอย่าง (1+ , 2+ และ 3+) และอีก 50 ตัวอย่างเป็น other mycobacterium (*M. avium*) และ smear AFB negative จากนั้นนำสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะที่ได้จาก smear AFB stain มาทำการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ DNAzol® (invitrogen) โดยการนำเสมหะที่ได้จาก สำนักวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข ที่มีการตรวจ AFB positive เติมน้ำยา DNAzol® 1 ml ผสมกัน แล้วปั่นตกตะกอน 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำ supernate ใส่ tube ใหม่ เติม absolute ethanol เย็น เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นตกตะกอน 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย 70% ethanol 1 – 3 ครั้ง แล้วตากให้แห้ง เติมน้ำกลั่น sterile แล้วเก็บที่ -80 °C เพื่อเตรียมทดสอบกับ DNA probe

##### 3.2 การออกแบบ Probe และ primer

การออกแบบ Probe และ primer จะออกแบบจากยีนในส่วนของยีน IS6110 (Accession number AJ242908.1) เนื่องจากมีการวิจัยด้วยวิธี PCR ว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* สูง ซึ่งมีความยาว 2,645 base pair (bp) โดยจะเลือกบริเวณที่จำเพาะต่อ target ที่เราต้องการตรงตำแหน่งที่ 1,474 -1,493 จำนวน 19 bp และเชื่อมด้วย TTTTTT (รูปที่ 2, ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ ในดีเอ็นเอไอโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์

| ชื่อ                     | ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' ไป 3'                                    |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------|
| DNA biotinylated probe   | Biotin-TTTTTTGTGGCCATCGTGGAAGCGA                              |
| DNA thiol probe          | SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -TTTTTTGTGGCCATCGTGGAAGCGA |
| Blocking 1               | CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -SH     |
| Blocking 2               | ATCGTGGTCCTGCGGGCTTTTTTTTTT-Biotin                            |
| Complementary DNA target | TCGCTTCCACGATGGCCAC                                           |
| Primer FMTB              | AAAGCCCCGAGGACCACGAT                                          |
| Primer RMTB              | GTGGCCATCGTGGAAGCGA                                           |
| Primer FTB               | CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG                                          |
| Primer RTB               | CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG                                          |



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งการออกแบบ DNA probe และ primer ของยีน IS6110

### 3.3 การออกแบบและการพัฒนางจรอิเล็กทรอนิกส์

การออกแบบวงจรอิเล็กทรอนิกส์ในไฟโซอิเล็กทรอนิกส์ไปโอเซนเซอร์จะใช้โปรแกรม Protel DXP การออกแบบวงจรนับวัดความถี่ครั้งนี้ มีความสำคัญที่ IC (Integrate Circuit) ไมโครคอนโทรลเลอร์ คือ ATMEGA48 ซึ่งเป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ที่มีคุณสมบัติโดดเด่นในด้านความสามารถในการประมวลผล ซึ่งทำงานด้วยความถี่สัญญาณนาฬิกา XTAL ได้สูงถึง 20 MHz โดยสามารถประมวลผลได้รวดเร็ว คือ 1 Cycle ของความถี่ XTAL และทำการเขียนโปรแกรมการทำงานของเครื่องมือด้วยภาษา Assembly ลง IC จากนั้นนำอุปกรณ์ ทั้ง IC, ตัวต้านทาน, LCD, ตัวเก็บประจุ (หจก. ไอออโดเมชั่น) ประกอบบน Print อุปกรณ์ ที่ใช้เป็นเกรด high quality product เพื่อช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัด

### 3.4 การเตรียม Quartz crystals

ลำดับแรกจะใช้ Quartz crystals มีความถี่ประมาณ 12 MHz , เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร, เส้นผ่าศูนย์กลางทอง 4 มิลลิเมตรและความหนา 0.2 มิลลิเมตร (บริษัท เทียวเซร่า คินเซกิ (ประเทศไทย) จำกัด) (รูปที่ 3) หรือใช้ code “QCM” ซึ่งได้ทำการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่ามีควมไวในระดับ ng แล้วทำการล้างผิวอิเล็กทรอนิกส์ที่เคลือบมาก่อนด้วย Piranha solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% กับ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ในอัตราส่วน 1 : 3

) นานประมาณ 30 วินาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วตากให้แห้ง และทำการวัดค่าความถี่ Baseline ( $f_0$ ) แต่เมื่อทำการเปลี่ยนความถี่ของ quartz crystal ให้สูงขึ้น 1 MHz ซึ่งจะส่งผลให้มีความไวเพิ่มขึ้นประมาณ 452 เท่าโดยมวลสารที่ติดลงไป ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ Sauerbrey

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \frac{\Delta m}{A}$$

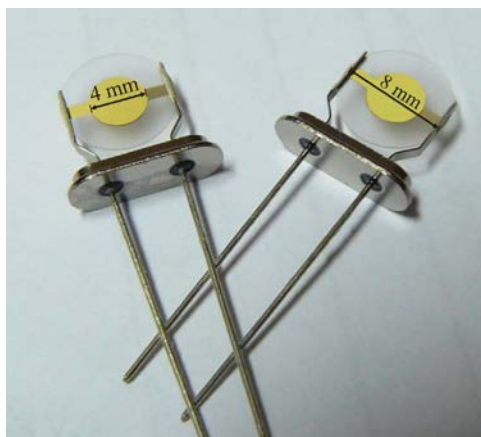
$\Delta f$  = ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป (Hz)

$f$  = ความถี่มูลฐานของ quartz crystal (Hz)

$\Delta m$  = มวลที่เปลี่ยนแปลงไป (g)

$A$  = พื้นที่ผิวทอง ( $\text{cm}^2$ )

ตามการรายงานของ Blum L.J. และคณะ ปี 1991 ได้อธิบายถึง sensitivity ของ quartz crystal เมื่อมีการเปลี่ยนความถี่ quartz crystal จากสมการ เมื่ออธิบายถึงความสามารถในการอ่านค่าความถี่ 9 MHz ให้ sensitivity ประมาณ 400 Hz/ $\mu\text{g}$  หรือถ้าเป็น 15 MHz ให้ sensitivity ประมาณ 2600 Hz/ $\mu\text{g}$  ซึ่งให้ sensitivity ที่ดีกว่า ดังนั้น sensitivity จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ ความถี่ quartz crystal ที่ใช้ด้วย



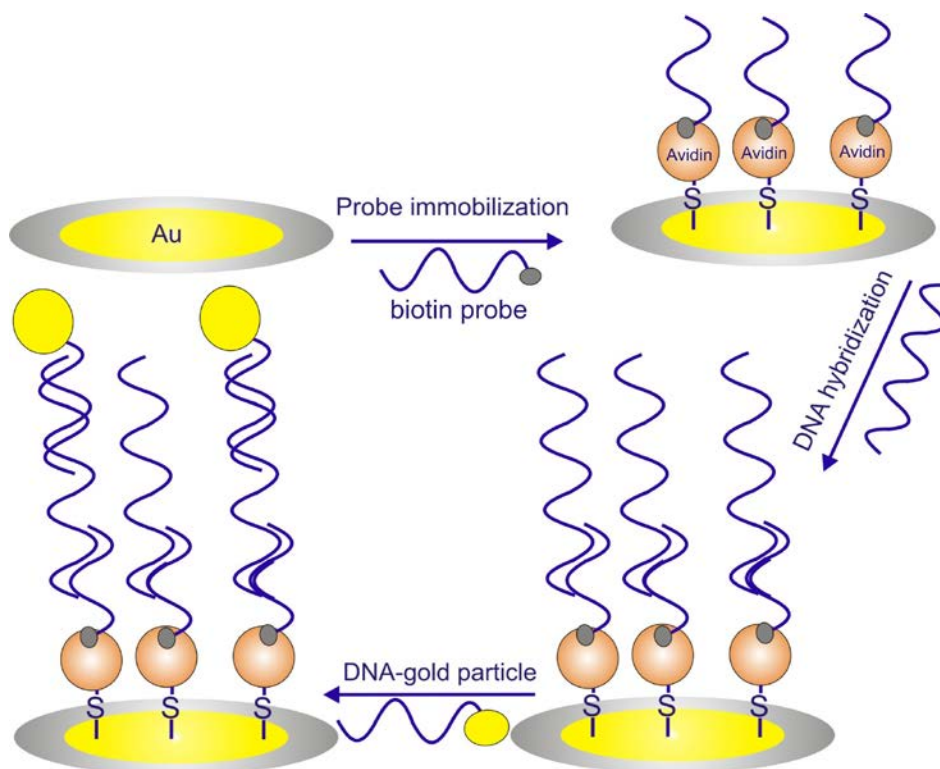
รูปที่ 3 Quartz crystals ความถี่ประมาณ 12 MHz

### 3.5 การตรึงสารลงบนผิว Quartz crystals (Immobilization) และทดสอบวิธีการต่างๆ ในการตรึงสาร

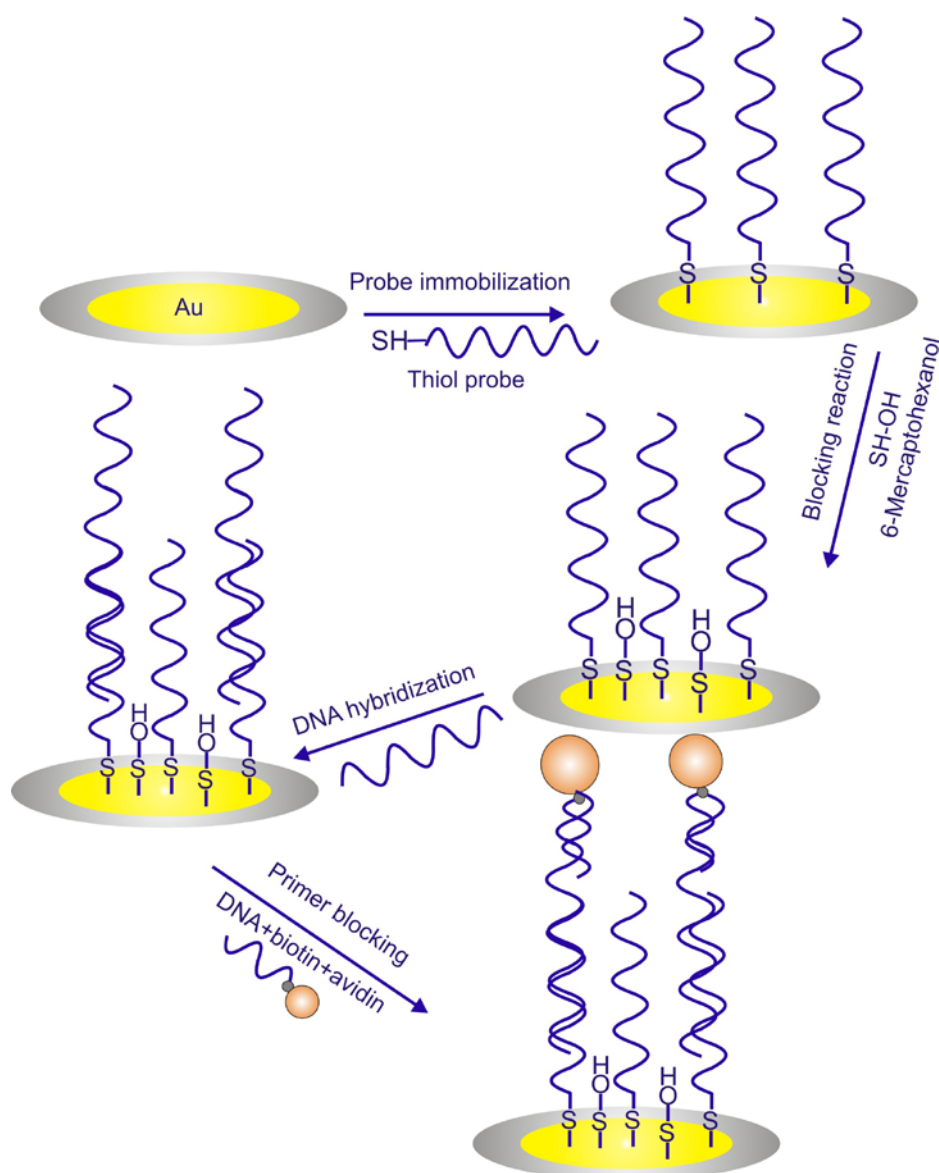
สำหรับ Biotin probe ใช้วิธีการ Immobilization โดยทำการเชื่อมโมเลกุลของสารต่าง ๆ ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยการนำ Quartz crystal จุ่มลงใน 3-mercaptopropionic acid หรือ MPA (Sigma, USA) นาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด เพื่อให้ได้หมู่ ซัลเฟอร์ที่จับกับผิวอิเล็กทรอนิกส์ทอง ล้างด้วย เอทานอล 100% และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 7  $\mu\text{l}$  ของ 100 mg/ml 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide หรือ EDC (Fluka, Switzerland) และ 7  $\mu\text{l}$  ของ 100 mg/ml N-hydroxysuccinimide หรือ NHS (Fluka, Switzerland) ในน้ำกลั่น

ทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการเติม 10  $\mu\text{l}$  ของ Avidin (Sigma, USA) ใน HEPES buffer (0.05 M HEPES, 0.2 M NaCl, pH 7.5) ทิ้งไว้นานอย่างน้อยประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_1$ ) ทำการเติม ethanolamine HCl (Fluka, Switzerland) 1 mM, pH 8.0 ทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการล้างด้วย Immobilization buffer (NaCl 300 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, และ EDTA 0.1 mM, pH 7.4) และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 20  $\mu\text{l}$  ของ DNA biotinylated probe ซึ่งละลายอยู่ใน Immobilization buffer นานประมาณ 20 นาที ก่อนทำการล้างด้วย Immobilization buffer และน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_2$ ) ทำการ Hybridization ระหว่าง DNA probe กับ Complementary DNA target โดยการเติม 20  $\mu\text{l}$  ของ complementary DNA target ซึ่งละลายอยู่ใน Hybridization buffer (NaCl 150 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, และ EDTA 0.1 mM, pH 7.4) นาน 20 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย Hybridization buffer ตามด้วยน้ำกลั่น ทำการตากให้แห้งก่อนการวัดค่าความถี่ ( $f_3$ ) โดยค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลง ( $\Delta f$ ) จะมีค่าเท่ากับ  $f_2 - f_3$  ส่วน Thiol probe ใช้วิธีการ Immobilization โดยการเติม 10  $\mu\text{l}$  ของ thiol probe ละลายใน buffer (1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.8) หมู่ซัลเฟอร์ใน thiol probe จะจับกับผิวอิเล็กโทรดทอง ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างส่วนที่ไม่จับทิ้งด้วย PBS buffer และทำการ block ปฏิกริยาด้วย 1 mM 6-mercaptohexanol ละลายในน้ำ ประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_1$ ) ทำการ Hybridization ระหว่าง DNA probe กับ Complementary DNA target โดยการเติม 20  $\mu\text{l}$  ของ complementary DNA target ซึ่งละลายอยู่ใน Hybridization buffer นาน 20 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย Hybridization buffer ตามด้วยน้ำกลั่น ทำการตากให้แห้งก่อนการวัดค่าความถี่ ( $f_2$ ) โดยค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลง ( $\Delta f$ ) จะมีค่าเท่ากับ  $f_1 - f_2$  (รูปที่ 4A, 4B)

4A



4B



รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการ immobilization และ hybridization ผ่านทาง 4A) biotin probe 4B) thiol probe

### 3.6 การศึกษาค่าเหมาะสม (Optimization) ในการตรวจวัด

การศึกษางานวิจัยเพื่อให้เกิดความถูกต้องและแม่นยำ จำเป็นต้องมีการหาค่าปริมาณเหมาะสมของสารแต่ละชนิด เพื่อให้ทราบการเกาะติดบนผิว quartz crystal ที่ให้ค่าความถี่สูงสุดและประสิทธิภาพของความไวในการตรวจวัดดีที่สุด เนื่องด้วย เครื่องมือวัด DNA-piezoelectric biosensor มีข้อดีคือ สามารถวัดค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดการ binding ระหว่างสารต่างๆ probe หรือ target ที่จำเพาะเจาะจงต่อ probe อีกทั้งยังสามารถบอกถึงมวลที่มีเกาะติดบนผิวของ quartz crystal ในเวลาเดียวกัน ด้วยการคำนวณจากสมการ Sauerbrey

#### 3.6.1 ค่าความเหมาะสมของ DNA probe

ทำการศึกษาความเข้มข้นของ DNA biotinylated probe ในช่วง 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0  $\mu\text{M}$  โดยการเชื่อม ปฏิกริยาบน surface เป็น Au/MPA/EDC/ NHS/Avidin จากนั้นเติม DNA biotinylated probe

ในแต่ละความเข้มข้น แล้วทำการ block ทุกปฏิกิริยา ด้วย ethanolamine HCl ทำการล้าง ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ส่วน thiol probe ละลายใน 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.8 แล้วเติม probe ในแต่ละความเข้มข้น เป็น 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0  $\mu\text{M}$  แล้วทำการ block non-specific ด้วย 1mM ของ 6-mercaptohexanol ซึ่งขั้นตอนการเตรียม probe ทั้งสองสามารถเก็บเป็น stock ที่ +4 °C เพื่อให้สามารถใช้งานได้สะดวกและลดภาระการเตรียม probe ทุกครั้งที่มีการทดสอบ

### 3.6.2 ค่าความเหมาะสมของ Target

ละลาย Target DNA ใน Hybridization buffer และศึกษาความเข้มข้นในช่วง 0, 0.5, 0.7, 1.0, และ 2.0  $\mu\text{M}$  โดยการเติม 20  $\mu\text{l}$  ของ DNA target ในแต่ละความเข้มข้น ให้ทำปฏิกิริยากับ DNA target หลังจากนั้นทำการล้าง ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่

### 3.7 การพัฒนาความไวของเครื่องมือดีเอ็นเอไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์โดยวิธี Signal enhancement โดยใช้ Mass molecules

ตามสมการของ Sauerbrey เราสามารถ enhance signal ของการวัดได้โดยการเพิ่ม Mass จากการติด Mass molecules เช่น Gold particle หรือ Avidin เข้ากับ oligonucleotides สายสั้นๆประมาณ 19 - 20 bp ซึ่งมีลำดับเบส complementary กับส่วนของ Target DNA ที่ไม่ได้จับกับ DNA probe ดังนั้นจะเกิดการจับกันระหว่าง thiol probe/target DNA/Au-oligo หรือ avidin ในลักษณะ Sandwich-hybridization ซึ่งจะเพิ่มความไวเพิ่มขึ้น โดยใช้ค่าความเข้มข้นของ 0.1 mg/ml avidin ทำการจับกับ primer blocking 2 เกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 3B

### 3.8 การทดสอบ ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)

ทดสอบความสามารถของการทำซ้ำโดยใช้ผู้วัดหลายคนเพื่อวัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกัน ใช้วิธีวัดเดียวกัน วัดความสามารถการทำซ้ำโดยพิจารณาความผันแปร (Variation) ที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างผู้วัด (จำนวนผู้วัด  $n_{op}$  คน)

$$\sigma^2_{\text{Re prod}} = \sqrt{\left[ \frac{\overline{R}_{op}}{d_2(n_{op})} \right]^2 \cdot \frac{[\overline{R}/d_2(n_M)]^2}{n_M}}$$

โดย

$$n_{op} = 3 \text{ จำนวนผู้วัด}$$

$$d_2(n_{op} = 3) = 1.693$$

$$R_{opi} = \text{Range โดย } (\overline{X}_{Ai}, \overline{X}_{Bi}, \overline{X}_{Ci}) \quad i(\text{part\#}) = 1, 2, 3, \dots, 10$$

$\overline{X}_{Ai}$  คือค่าเฉลี่ยของการวัดชิ้นงานชิ้นที่  $i$  ซ้ำโดยผู้วัด A

$\overline{X}_{Bi}$  คือค่าเฉลี่ยของการวัดชิ้นงานชิ้นที่  $i$  ซ้ำโดยผู้วัด B

$\overline{X}_{Ci}$  คือค่าเฉลี่ยของการวัดชิ้นงานชิ้นที่  $i$  ซ้ำโดยผู้วัด C

การศึกษาโดยการนำ Quartz crystal จุ่มลงใน MPA นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย เอทานอล 100% และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 7  $\mu$ l ของ 100 mg/ml EDC และ 100 mg/ml NHS ในน้ำกลั่นทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการเติม 10  $\mu$ l ของ Avidin ใน HEPES buffer ทิ้งไว้นานอย่างน้อยประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_1$ )

### 3.9 ทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด (Total Variation)

คือความผันแปรที่เกิดจากผู้วัดหลายคน วัดชิ้นงานชิ้นเดียวกันซ้ำหลายครั้ง

$$\sigma_T^2 = \sigma_{Re\text{peat}}^2 + \sigma_{Re\text{prod}}^2$$

โดย  $\sigma_{Re\text{peat}}^2$  คือค่าความผันแปรที่เกิดจากการวัดซ้ำ โดยใช้ผู้วัดคนเดียวกัน วัดชิ้นงานชิ้นเดียวกันซ้ำหลายครั้ง

$\sigma_{Re\text{prod}}^2$  คือค่าความผันแปรที่เกิดจากผู้วัดหลายๆ คน วัดชิ้นงานเดียวกัน

คำนวณสัดส่วนความผันแปร (Ratios) โดย สมการ

$$\frac{\sigma_{Re\text{peat}}^2}{\sigma_{Re\text{peat}}^2 + \sigma_{Re\text{prod}}^2}$$

โดยจะใช้การศึกษาโดยการนำ Quartz crystal จุ่มลงใน MPA นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย เอทานอล 100% และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 7  $\mu$ l ของ 100 mg/ml EDC และ 100 mg/ml NHS ในน้ำกลั่นทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการเติม 10  $\mu$ l ของ Avidin ใน HEPES buffer ทิ้งไว้นานอย่างน้อยประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_1$ )

### 3.10 การทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ (precision)

โดยวัดวัตถุชิ้นเดียวกันหลายครั้ง โดยใช้ผู้วัด วิธีวัด เครื่องมือวัด ชุดเดียวกัน ถ้าค่าจากการวัดวัตถุชิ้นเดียวกันซ้ำหลายครั้งได้ค่าใกล้เคียงกัน (โดยไม่สนใจว่าค่านั้นจะเป็นค่าที่ถูกต้องหรือไม่)

การศึกษาโดยการนำ Quartz crystal จุ่มลงใน MPA นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย เอทานอล 100% และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 7  $\mu$ l ของ 100 mg/ml EDC และ 100 mg/ml NHS ในน้ำกลั่นทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการเติม 10  $\mu$ l ของ Avidin ใน HEPES buffer ทิ้งไว้นานอย่างน้อยประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_1$ ) แล้วทำการวัดค่าชิ้นเดียวกันซ้ำอีกจำนวน 10 ครั้ง แล้วบันทึกค่าความถี่

### 3.11 การทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ (accuracy)

ทดสอบความสามารถของระบบวัดที่สามารถวัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่ถูกต้อง หรือค่าจริง หรือในกรณีที่มีการวัดซ้ำ ค่าเฉลี่ยของค่าวัดควรมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ถูกต้อง โดยการวัดตัวอย่างๆ ละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าคลาดเคลื่อน +/- ซึ่งเป็นค่า error ของเครื่อง

การศึกษาโดยการนำ Quartz crystal จุ่มลงใน MPA นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย เอทานอล 100% และน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติม 7  $\mu$ l ของ 100 mg/ml EDC และ 100 mg/ml NHS ในน้ำกลั่นทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ทำการเติม 10  $\mu$ l ของ Avidin ใน HEPES buffer ทิ้งไว้นานอย่างน้อยประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วทำการวัดค่าความถี่ ( $f_1$ )

### 3.12 การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal

Quart crystal หลังจากที่ทำ hybridization ระหว่าง 1  $\mu$ M thiol probe กับ 1.5  $\mu$ M synthetic complementary DNA target แล้วสามารถนำมา reuse ใช้ใหม่ได้โดยการเติม 1 mM HCl เพื่อ remove การจับกันระหว่าง probe กับ target แต่ไม่ทำให้ probe นั้นหลุดจากผิวของ quartz crystal ดังนั้นสามารถนำ quartz crystal ที่มี probe นั้นไปทำ hybridization กับ target ใหม่ได้เรื่อย ๆ โดยทำการวัดค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการจับกันระหว่าง DNA probe กับ synthetic complementary DNA target

### 3.13 การทดสอบอายุการใช้งานของ Quart crystal/Probe (shelf life)

Quart crystal ทำการ immobilization DNA probe ลงบน Quartz crystal ทั้ง thiol probe และ biotin probe ซึ่ง DNA probe ของ thiol probe จะไปติด Au/thiol probe และ biotin probe จะไปติดเป็น Au/MPA/EDC/NHS/Avidin /Biotin probe จากนั้นทำการเก็บ probe ที่อุณหภูมิ +4°C ก่อนนำมาทดสอบกับ DNA target (PCR product 209 bp) อายุการใช้งานที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบค่าที่อ่านได้จากการวัดตัวอย่างเดียวกัน

### 3.14 การทดสอบความจำเพาะของ DNA probe (specificity)

ทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ต่อ *M. tuberculosis* โดยทดสอบกับ เชื้อ Mycobacterium ชนิดอื่นๆ ซึ่งในการทดลองใช้ *M. avium* โดยใช้ความเข้มข้นหรือจำนวนเชื้อที่เทียบเคียงกัน

### 3.15 การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจริง

เชื้อ *M. tuberculosis* และ non *M. tuberculosis* จากเสมหะและสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ จะต้องนำมาสกัดให้ได้เฉพาะดีเอ็นเอโดยใช้ DNAzol<sup>®</sup> แล้วนำมาทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ก่อนประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำการละลายใน hybridization buffer จึงทำ hybridization กับ probe

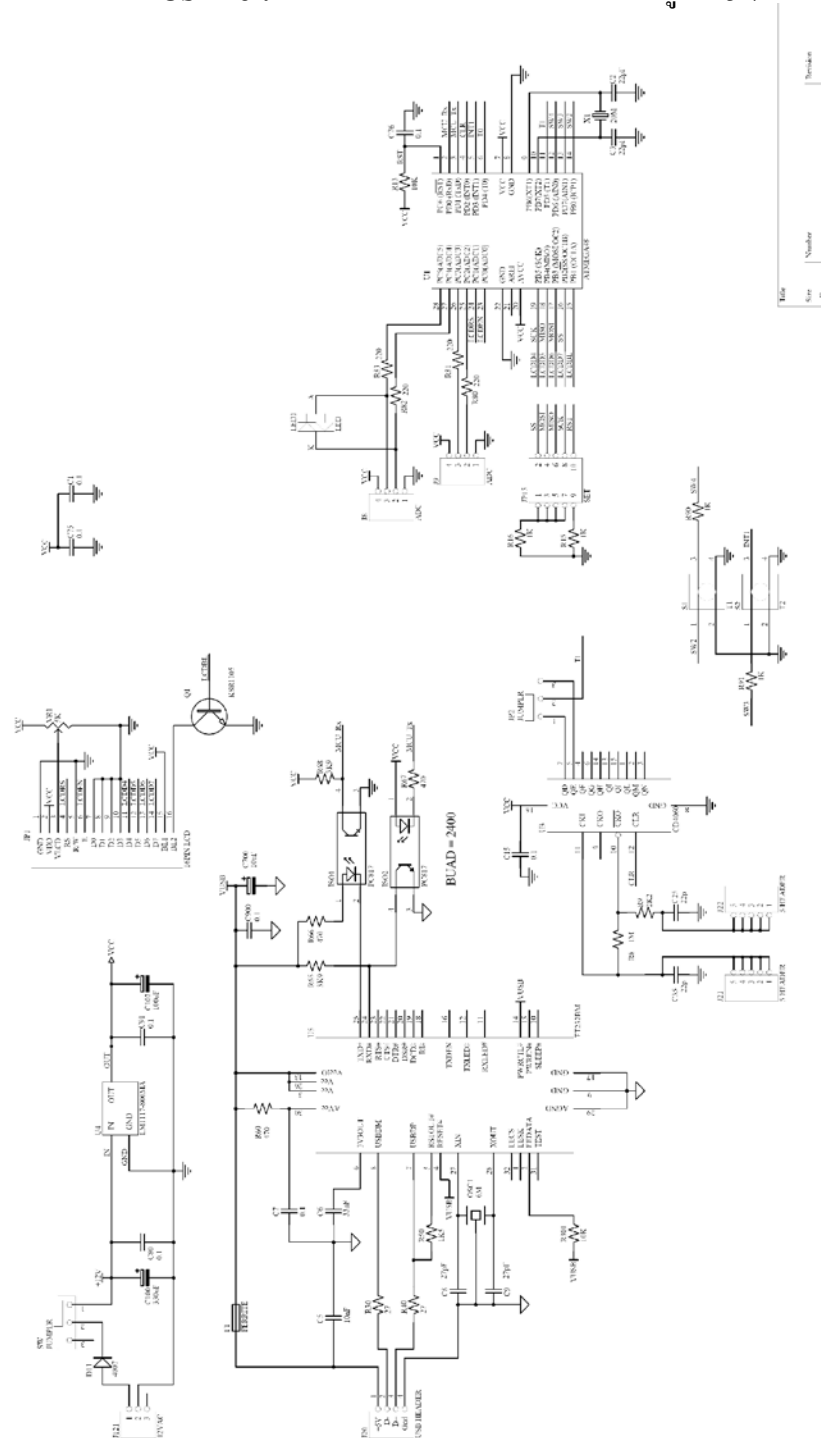
ตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจจะนำมาทำการตรวจสอบกับวิธี PCR เพื่อทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ผลทั้งสองแบบ

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 วงจรนับวัดความถี่ 20 MHz

วงจรนับวัดความถี่ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือวัดคลื่นไฟฟ้าโซอิล็กทริกไบโอเซนเซอร์ ซึ่งวงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่ออกแบบครั้งนี้ พยายามทำให้มีขนาดกะทัดรัดเพื่อให้เหมาะสำหรับการเคลื่อนย้ายและพกพาได้สะดวก พร้อมทั้งต่อเชื่อม USB Port เพื่อประมวลผลในคอมพิวเตอร์ ดังรูปที่ 5-7



รูปที่ 5 วงจรนับวัดความถี่ 20 MHz.



## 4.2 การทดสอบสถานะต่างๆของ Quartz crystal

การทดสอบการใช้งานกับ Quartz crystal ในสถานะต่างๆ พบว่า ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ biotin probe คือ  $1\ \mu\text{M}$  ให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลง  $-205\pm 11.70\ \text{Hz}$  (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 8) ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thiol probe คือ  $1\ \mu\text{M}$  ให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลง  $-105\pm 11.70\ \text{Hz}$  (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบการใช้ biotin probe กับ thiol probe พบว่า ใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ  $1\ \mu\text{M}$  แต่พบว่า biotin probe มีความไวในการตรวจจับได้ดีกว่า thiol probe แต่เมื่อ thiol probe ทำการเติมด้วย  $1\ \text{mM}$  6-mercaptohexanol(MCH) ซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มความไวได้ดีเท่ากับ biotin probe คือที่ความเข้มข้นที่  $1.5\ \mu\text{M}$  ให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลง  $-200\pm 8.58\ \text{Hz}$  (ตารางที่ 5, รูปที่ 8) ส่วนการทดสอบกับ complementary DNA target ซึ่งค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ synthetic DNA target น้อยกว่า  $0.5\ \mu\text{M}$  โดยที่ probe ทั้งสองให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไม่เท่ากัน เมื่อทำการทดสอบกับ complementary DNA target ปรากฏว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6, 7 และ รูปที่ 9)

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเหมาะสมของ biotin probe ที่ความเข้มข้น  $0 - 2\ \mu\text{M}$  กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

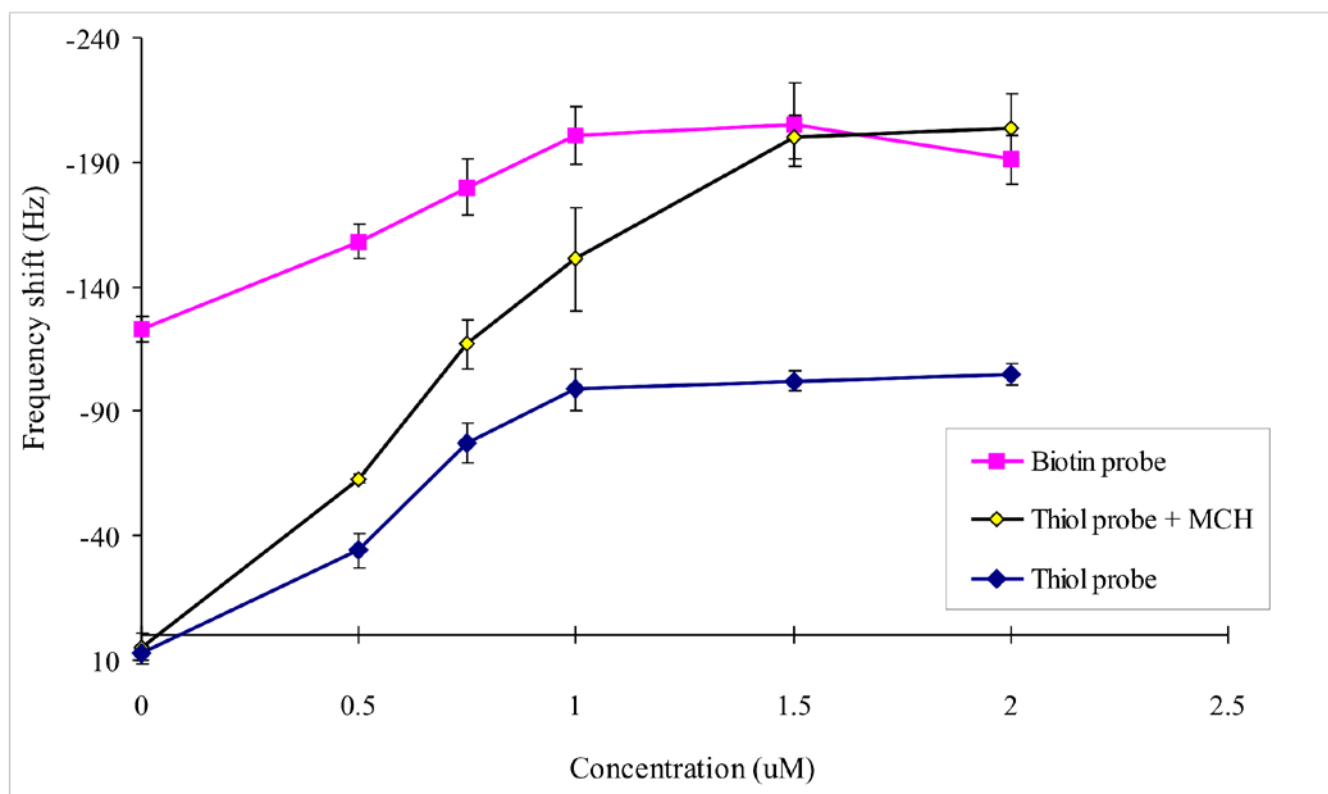
|                      | ความเหมาะสมของ Biotin probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |                    |                     |                    |                    |                    |
|----------------------|--------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                      | $0\ \mu\text{M}$                                       | $0.5\ \mu\text{M}$ | $0.75\ \mu\text{M}$ | $1.0\ \mu\text{M}$ | $1.5\ \mu\text{M}$ | $2.0\ \mu\text{M}$ |
| Quartz 1             | -118 Hz                                                | -168 Hz            | -178 Hz             | -202 Hz            | -222 Hz            | -188 Hz            |
| Quartz 2             | -121 Hz                                                | -150 Hz            | -183 Hz             | -199 Hz            | -197 Hz            | -185 Hz            |
| Quartz 3             | -130 Hz                                                | -155 Hz            | -180 Hz             | -203 Hz            | -197 Hz            | -199 Hz            |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | -123 Hz                                                | -158 Hz            | -180 Hz             | -201 Hz            | -205 Hz            | -191 Hz            |
| SD                   | $\pm 5.10$                                             | $\pm 6.90$         | $\pm 11.15$         | $\pm 11.70$        | $\pm 16.60$        | $\pm 9.54$         |

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเหมาะสมของ thiol probe ที่ความเข้มข้น  $0 - 2\ \mu\text{M}$  กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

|                      | ความเหมาะสมของ Thiol probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |                    |                     |                    |                    |                    |
|----------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                      | $0\ \mu\text{M}$                                      | $0.5\ \mu\text{M}$ | $0.75\ \mu\text{M}$ | $1.0\ \mu\text{M}$ | $1.5\ \mu\text{M}$ | $2.0\ \mu\text{M}$ |
| Quartz 1             | +11 Hz                                                | -28 Hz             | -78 Hz              | -102 Hz            | -102 Hz            | -111 Hz            |
| Quartz 2             | +4 Hz                                                 | -40 Hz             | -73 Hz              | -97 Hz             | -107 Hz            | -103 Hz            |
| Quartz 3             | +6 Hz                                                 | -35 Hz             | -81 Hz              | -99 Hz             | -97 Hz             | -101 Hz            |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | +7 Hz                                                 | -34 Hz             | -77 Hz              | -99 Hz             | -105 Hz            | -105 Hz            |
| SD                   | $\pm 2.94$                                            | $\pm 6.85$         | $\pm 7.87$          | $\pm 8.36$         | $\pm 4.00$         | $\pm 4.32$         |

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเหมาะสมของ Thiol probe/6-mercaptohexanol (MCH) ที่ความเข้มข้น 0 – 2  $\mu\text{M}$  กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

|                      | ความเหมาะสมของ Thiol probe/6-mercaptohexanol (MCH) กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |                   |                    |                   |                   |                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                      | 0 $\mu\text{M}$                                                               | 0.5 $\mu\text{M}$ | 0.75 $\mu\text{M}$ | 1.0 $\mu\text{M}$ | 1.5 $\mu\text{M}$ | 2.0 $\mu\text{M}$ |
| Quartz 1             | +9 Hz                                                                         | -65 Hz            | -108 Hz            | -137 Hz           | -200 Hz           | -199 Hz           |
| Quartz 2             | -3 Hz                                                                         | -61 Hz            | -113 Hz            | -135 Hz           | -189 Hz           | -191 Hz           |
| Quartz 3             | -1 Hz                                                                         | -64 Hz            | -131 Hz            | -180 Hz           | -210 Hz           | -223 Hz           |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | +5 Hz                                                                         | -63 Hz            | -117 Hz            | -151 Hz           | -200 Hz           | -204 Hz           |
| SD                   | $\pm 6.21$                                                                    | $\pm 1.73$        | $\pm 9.88$         | $\pm 20.76$       | $\pm 8.58$        | $\pm 13.60$       |



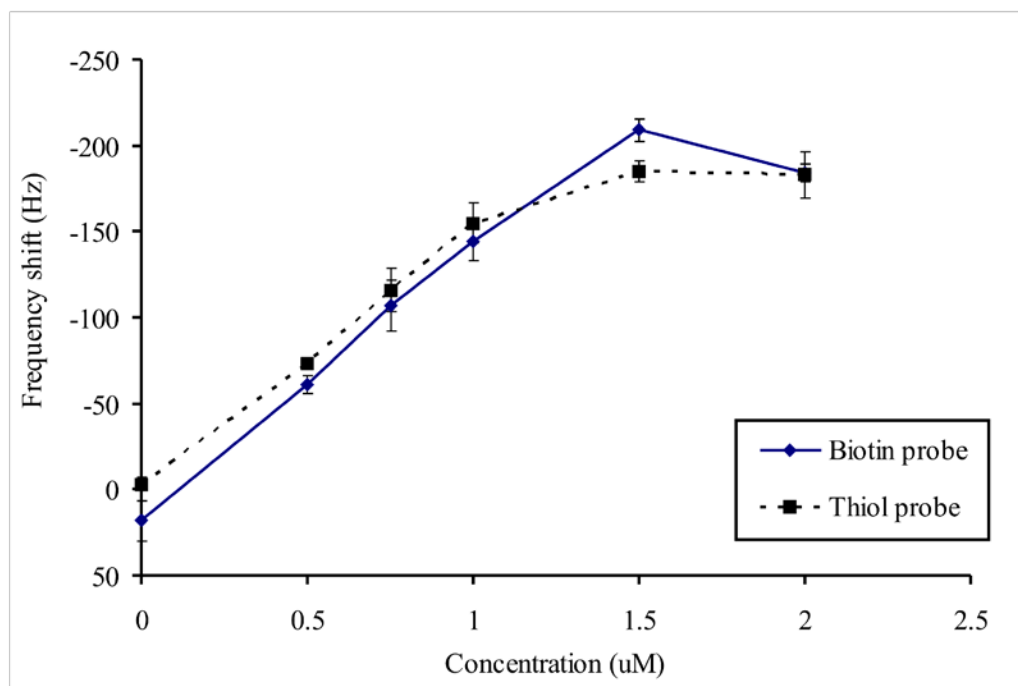
รูปที่ 8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าความเหมาะสมของ biotin probe และ thiol probe ที่ความเข้มข้น 0 – 2  $\mu\text{M}$  กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

**ตารางที่ 6** แสดงการทดสอบระหว่าง biotin probe กับ complementary DNA target ที่ความเข้มข้น  
0 – 2  $\mu\text{M}$  กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

|                      | ความเหมาะสมของ Biotin probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |                   |                    |                   |                   |                   |
|----------------------|--------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                      | 0 $\mu\text{M}$                                        | 0.5 $\mu\text{M}$ | 0.75 $\mu\text{M}$ | 1.0 $\mu\text{M}$ | 1.5 $\mu\text{M}$ | 2.0 $\mu\text{M}$ |
| Quartz 1             | +23 Hz                                                 | -56 Hz            | -100 Hz            | -171 Hz           | -202 Hz           | -189 Hz           |
| Quartz 2             | -3 Hz                                                  | -59 Hz            | -132 Hz            | -160 Hz           | -207 Hz           | -170 Hz           |
| Quartz 3             | +2 Hz                                                  | -68 Hz            | -124 Hz            | -172 Hz           | -218 Hz           | -183 Hz           |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | +18 Hz                                                 | -61 Hz            | -107 Hz            | -144 Hz           | -209 Hz           | -184 Hz           |
| SD                   | $\pm 11.65$                                            | $\pm 5.09$        | $\pm 14.53$        | $\pm 11.21$       | $\pm 6.68$        | $\pm 5.29$        |

**ตารางที่ 7** แสดงการทดสอบระหว่าง Thiol probe กับ complementary DNA target ที่ความเข้มข้น  
0 – 2  $\mu\text{M}$  กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

|                      | ความเหมาะสมของ Thiol probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |                   |                    |                   |                   |                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                      | 0 $\mu\text{M}$                                       | 0.5 $\mu\text{M}$ | 0.75 $\mu\text{M}$ | 1.0 $\mu\text{M}$ | 1.5 $\mu\text{M}$ | 2.0 $\mu\text{M}$ |
| Quartz 1             | -5 Hz                                                 | -77 Hz            | -125 Hz            | -141 Hz           | -178 Hz           | -177 Hz           |
| Quartz 2             | -1 Hz                                                 | -72 Hz            | -98 Hz             | -140 Hz           | -192 Hz           | -170 Hz           |
| Quartz 3             | +3 Hz                                                 | -71 Hz            | -124 Hz            | -152 Hz           | -184 Hz           | -201 Hz           |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | -3 Hz                                                 | -73 Hz            | -116 Hz            | -155 Hz           | -185 Hz           | -183 Hz           |
| SD                   | $\pm 3.82$                                            | $\pm 2.64$        | $\pm 12.50$        | $\pm 11.97$       | $\pm 5.74$        | $\pm 13.27$       |



รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการทดสอบของ synthetic complementary DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

#### 4.3 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) และการทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด (Total Variation)

ในการทดสอบความสามารถในการวัด และการทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด จะใช้การตรึงสารบนผิว quartz crystal ผ่านทาง Au/MPA/EDC/NHS/Avidin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จากการทดสอบการวัด 3 คน โดยวัดชิ้นงานเดียว 10 ครั้งของ Avidin ที่ตรึงลงไป จะพบว่า ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่ง จะให้ค่า  $\sigma_{Re\ prod}$  เท่ากับ 1.006 ค่าความผันแปรของเครื่องมือวัดรวม เท่ากับ 1.344 และค่าสัดส่วนความผันแปรของเครื่องมือวัด เท่ากับ 0.24 (ตารางที่ 8, รูปที่ 10)

ตารางที่ 8 แสดงการทดสอบความสามารถของการทำซ้ำโดยใช้ผู้วัดหลายคน วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกันและใช้วิธีวัดเดียวกัน

| การทดสอบความสามารถในการวัดซ้ำของผู้วัดแต่ละคน |                                     |                                     |                                     |                                       |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| ชิ้นงาน<br>เดียว (ครั้งที่<br>ที่)            | คนที่ 1                             | คนที่ 2                             | คนที่ 3                             | $R_{opi}$                             |
| 1                                             | -174 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_1 = -1 \text{ Hz}$      |
| 2                                             | -173 Hz                             | -174 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_2 = -1 \text{ Hz}$      |
| 3                                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_3 = 0 \text{ Hz}$       |
| 4                                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_4 = 0 \text{ Hz}$       |
| 5                                             | -174 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_5 = -1 \text{ Hz}$      |
| 6                                             | -174 Hz                             | -173 Hz                             | -174 Hz                             | $\overline{R}_6 = -1 \text{ Hz}$      |
| 7                                             | -173 Hz                             | -171 Hz                             | -174 Hz                             | $\overline{R}_7 = -2 \text{ Hz}$      |
| 8                                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_8 = 0 \text{ Hz}$       |
| 9                                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_9 = 0 \text{ Hz}$       |
| 10                                            | -173 Hz                             | -173 Hz                             | -173 Hz                             | $\overline{R}_{10} = 0 \text{ Hz}$    |
|                                               | $\overline{R}_{Ai} = -1 \text{ Hz}$ | $\overline{R}_{Bi} = -2 \text{ Hz}$ | $\overline{R}_{Ci} = -1 \text{ Hz}$ | $\overline{R}_{op} = -0.6 \text{ Hz}$ |
|                                               | $\overline{R} = -1.3 \text{ Hz}$    |                                     |                                     |                                       |

จากตารางจะได้

$$\bar{R} = \frac{R_{Ai} + R_{Bi} + R_{Ci}}{3}$$

$$\bar{R} = \frac{1 + 2 + 1}{3}$$

$$\bar{R} = 1.3$$

ดังนั้น  $[\bar{R}_{op} / d_2(n_{op})] = (0.6 / 1.693)$

โดย  $d_2(n_{op} = 3) = 1.693$

$$= 0.591$$

$$\frac{[\bar{R} / d_2(n_M)]}{n_M} = \frac{(1.3 / 1.128)}{2}$$

โดย  $d_2(n_M = 2) = 1.128$

$$= \frac{1.152}{2}$$

$$= 0.576$$

$$\hat{\sigma}_{Re\text{ pret}} = [\bar{R} / d_2(n_M)] = (1.3 / 1.128)$$

$$\hat{\sigma}_{\text{Reprod}} = \sqrt{(0.591)^2 + \frac{(1.152)^2}{2}} = 1.006$$

ดังนั้นความผันแปรที่เกิดจากผู้วัดหลายคน วัดชิ้นงานชิ้นเดียวกันซ้ำหลายครั้ง

$$\sigma_T^2 = \sigma_{\text{Re peat}}^2 + \sigma_{\text{Re prod}}^2$$

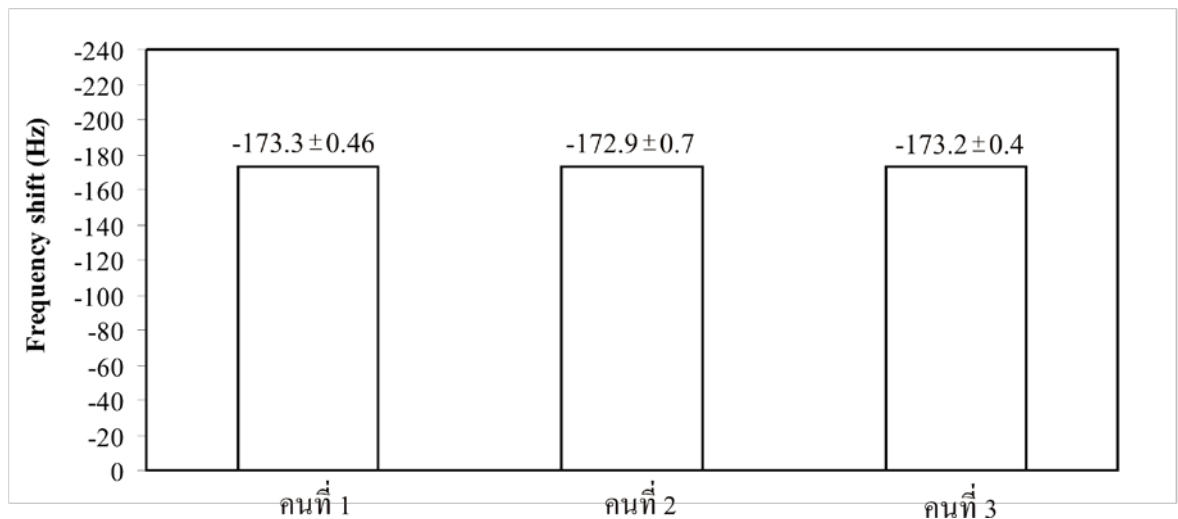
โดย  $\sigma_{\text{Re peat}}^2$  คือค่าความผันแปรที่เกิดจากการวัดซ้ำ โดยใช้ผู้วัดคนเดียว วัดชิ้นงานชิ้นเดียวกันซ้ำหลายครั้ง

$\sigma_{\text{Re prod}}^2$  คือค่าความผันแปรที่เกิดจากผู้วัดหลายๆ คน วัดชิ้นงานเดียวกัน

จะได้

$$\begin{aligned}\sigma_T^2 &= \sigma_{\text{Re peat}}^2 + \sigma_{\text{Re prod}}^2 \\ \sigma_T^2 &= 0.576^2 + 1.006^2 \\ &= 0.332 + 1.012 \\ &= 1.344\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{สัดส่วนความผันแปร (Ratios)} &= \frac{\sigma_{\text{Re peat}}^2}{\sigma_{\text{Re peat}}^2 + \sigma_{\text{Re prod}}^2} \\ &= \frac{0.576^2}{0.576^2 + 1.006^2} \\ &= 0.24\end{aligned}$$



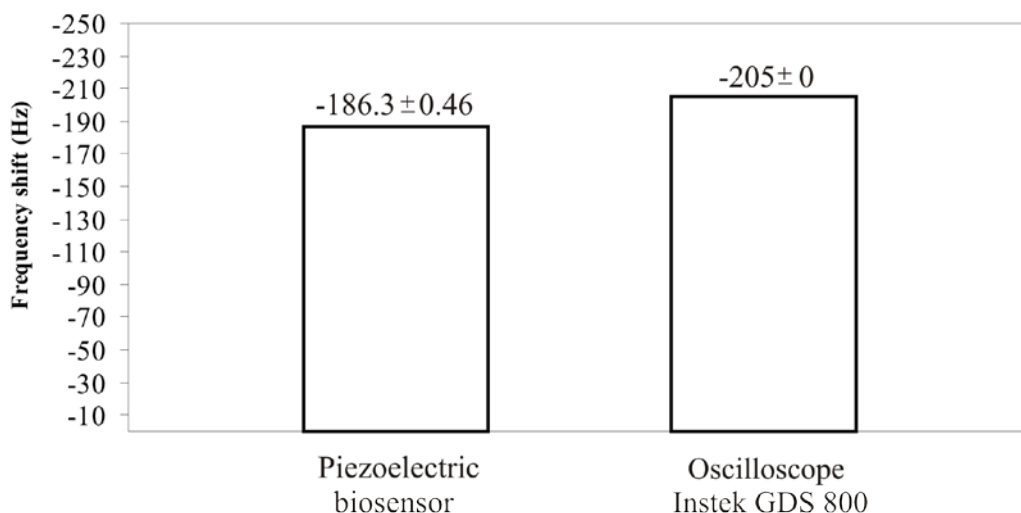
รูปที่ 10 แผนภูมิแสดงการทดสอบความสามารถของการทำซ้ำโดยใช้ผู้วัดหลายคน วัดชิ้นงานเดียวกัน โดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกันและใช้วิธีวัดเดียวกัน

#### 4.4 การทดสอบความเที่ยงตรง(precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของเครื่องมือวัด

การทดสอบความเที่ยงตรง(precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของเครื่องมือวัดโดยวัดวัตถุชิ้นเดียวกันหลายครั้ง โดยใช้ผู้วัด วิธีวัด เครื่องมือวัด ชุดเดียวกัน จากตารางที่มีการใช้เครื่องมือวัด ใช้การวัดจากการตรึง Avidin ลงบนผิว quartz crystal ได้เป็น Au/MPA/EDC/NHS/Avidin โดยค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป แต่จะเห็นได้ว่า ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงของเครื่อง ไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลง  $-186 \pm 0.4$  Hz แต่เมื่อผ่านเครื่องมือวัด Oscilloscope (Instek GDS 800) จะเห็นว่าค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น  $-205 \pm 0$  Hz ซึ่งจะให้ค่าที่แม่นยำกว่า เนื่องจากค่าความคลาดเคลื่อนไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการวัดแต่ละครั้ง (ตารางที่ 9, รูปที่ 11)

ตารางที่ 9 แสดงทดสอบความความเที่ยงตรงและความแม่นยำของเครื่องมือวัดโดยใช้ผู้วัดเดียว วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกัน กับ การเปลี่ยนแปลงความถี่

| ชิ้นงานเดียว (ครั้งที่) | ไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์  | Digital storage oscilloscope<br>(Instek GDS 800) |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|
| 1                       | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 2                       | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 3                       | -187 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 4                       | -187 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 5                       | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 6                       | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 7                       | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 8                       | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 9                       | -187 Hz                     | -205 Hz                                          |
| 10                      | -186 Hz                     | -205 Hz                                          |
|                         | $\bar{R} = -186 \pm 0.4$ Hz | $\bar{R} = -205 \pm 0$ Hz                        |



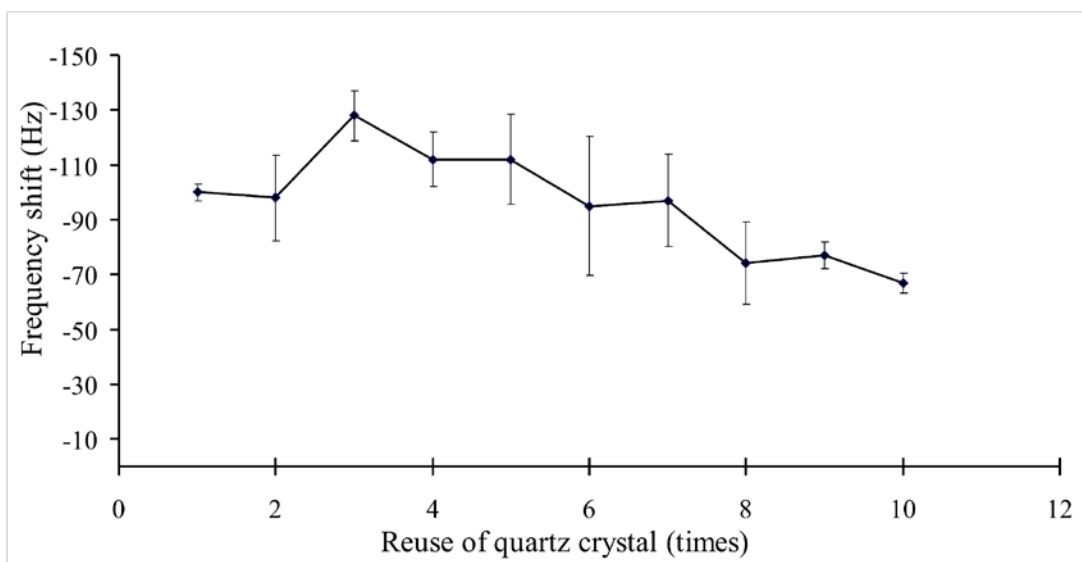
รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงทดสอบความความเที่ยงตรงและความแม่นยำของเครื่องมือวัดโดยใช้ผู้วัดเดียว วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงความถี่

#### 4.5 การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal

Quart crystal ที่ ดัง จาก ที่ ทำ hybridization ระหว่าง thiol probe กับ 1.5 uM synthetic complementary DNA target แล้วสามารถนำมา reuse ใช้ใหม่ได้โดยการเติม 1 mM HCl เพื่อ remove การจับกันระหว่าง probe กับ target โดย เครื่องมือวัด สามารถทำการ reuse ใช้ใหม่ในชั้นเดิม ได้มากกว่า 10 ครั้ง แต่จะทำให้ ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปลดลงบ้าง เนื่องจาก 1 mM HCl อาจไปทำลายพันธะที่เกิดการจับกันของ DNA probe กับ quartz crystal (ตารางที่ 10, รูปที่ 12)

ตารางที่ 10 การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

| Quartz               | การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                     |
|----------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                      | ครั้งที่ 1<br>(Hz)                                             | ครั้งที่ 2<br>(Hz) | ครั้งที่ 3<br>(Hz) | ครั้งที่ 4<br>(Hz) | ครั้งที่ 5<br>(Hz) | ครั้งที่ 6<br>(Hz) | ครั้งที่ 7<br>(Hz) | ครั้งที่ 8<br>(Hz) | ครั้งที่ 9<br>(Hz) | ครั้งที่ 10<br>(Hz) |
| 1                    | -96                                                            | -116               | -124               | -99                | -134               | -71                | -97                | -61                | -72                | -64                 |
| 2                    | -103                                                           | -99                | -141               | -123               | -106               | -130               | -118               | -95                | -84                | -72                 |
| 3                    | -102                                                           | -78                | -120               | -114               | -95                | -83                | -77                | -82                | -76                | -65                 |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | -100                                                           | -98                | -128               | -112               | -112               | -95                | -97                | -74                | -77                | -67                 |
| SD                   | ±3.11                                                          | ±15.55             | ±9.11              | ±9.9               | ±16.42             | ±25.46             | ±16.74             | ±14.99             | ±5.00              | ±3.56               |

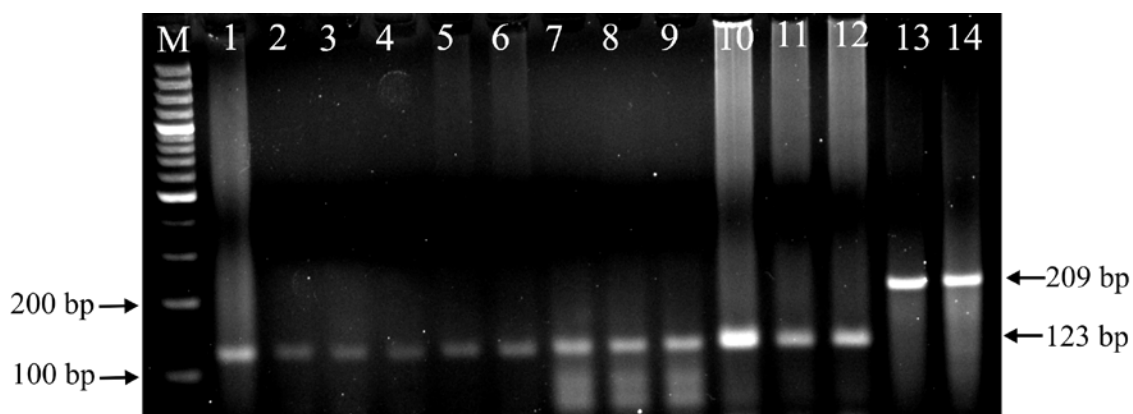


รูปที่ 12 แสดงการทดสอบการ reuse ของ Quart crystal กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

#### 4.6 การทดสอบความจำเพาะของ DNA probe (specificity)

การทดสอบใช้ PCR product lane ที่ 10 – 14 การทดสอบเครื่องมือวัด ซึ่ง lane ที่ 10-12 PCR product 123 bp ใช้ primer FTB และ RTB โดยทำ 94 °C 2 นาที, 94-60-72 °C 1 นาที จำนวน 30 cycles และ extension ที่ 72 °C 10 นาที ส่วน lane ที่ 13-14 PCR product 209 bp เป็น product ที่ specific ต่อ DNA probe ซึ่งได้ PCR product 209 bp ใช้ primer FMTB และ RMTB โดยทำ 94 °C 2 นาที, 94-53-72 °C 1 นาที จำนวน 30 cycles และ extension ที่ 72 °C 10 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ 2% gel electrophoresis

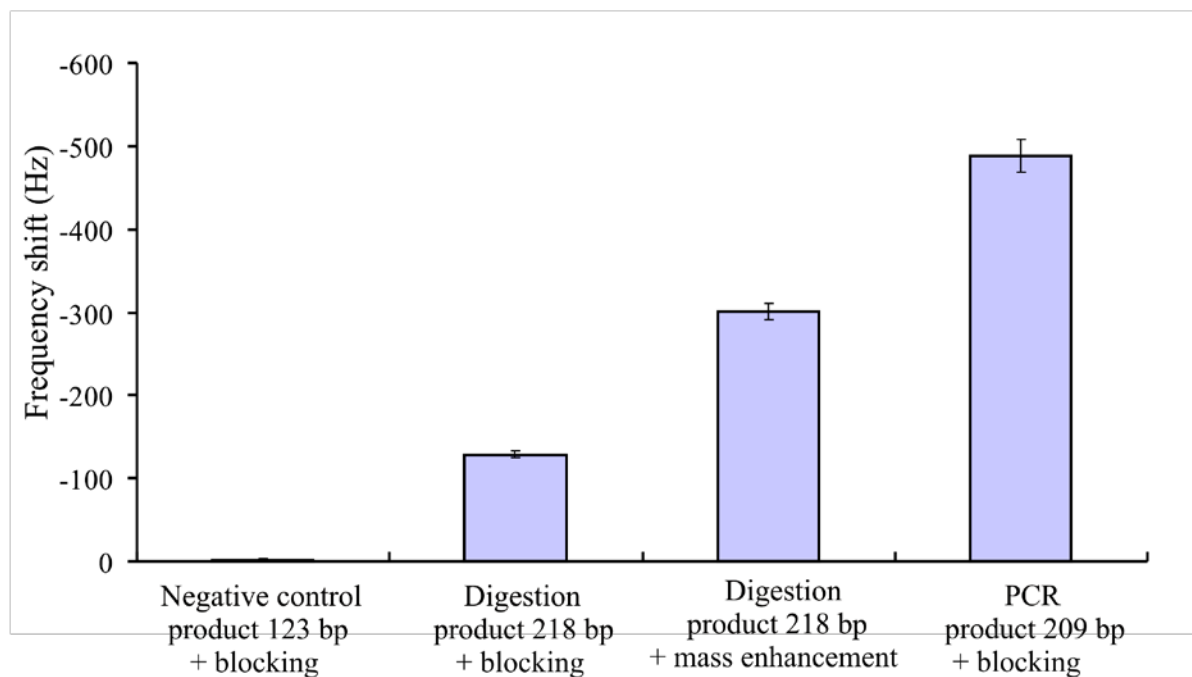
การทดสอบความจำเพาะของ thiol probe กับ DNA target โดยการทดสอบ Quartz crystal 3 ชิ้น จะพบว่า negative control (PCR product 123 bp) ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงประมาณ  $-1.6 \pm 2.27$  Hz, positive control (PCR product 209 bp) ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงประมาณ  $-488 \pm 19.48$  Hz, และการย่อย genome DNA ของ *M. tuberculosis* ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* ได้ product 218 bp ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงประมาณ  $-129 \pm 3.87$  Hz แต่เมื่อการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* หลังจากเชื่อมด้วย primer จับกับ enhancement (Avidin) จะให้ค่าความไวในการวัดเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 11, รูปที่ 13 – 14)



**รูปที่ 13** แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -13 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose  
Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: positive control (M. tuberculosis H37RVKK11-20), Lane 2: sample 1, Lane 3: sample 2, Lane 4: sample 3, Lane 5: sample 4, Lane 6: sample 5, Lane 7: sample 6, Lane 8: sample 7, Lane 9: sample 8, Lane 10: sample 9, Lane 11: sample 10, Lane 12: sample 11, Lane 13: sample 12, Lane 14: sample 13

**ตารางที่ 11** แสดงการทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ของการ hybridized ระหว่าง Thiol probe กับ DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

|                      | Thiol probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป   |                             |                                       |                                                                   |
|----------------------|------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                      | Negative control<br>(PCR product 123 bp) | PCR<br>(PCR product 209 bp) | Non-PCR<br>(Digestion product 218 bp) | non-amplified<br>genomic DNA<br>+<br>mass enhancement<br>(avidin) |
| Quartz 1             | -3 Hz                                    | -515 Hz                     | -125 Hz                               | -297 Hz                                                           |
| Quartz 2             | +5 Hz                                    | -477 Hz                     | -134 Hz                               | -315 Hz                                                           |
| Quartz 3             | +3 Hz                                    | -471 Hz                     | -127 Hz                               | -292 Hz                                                           |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | -1.6 Hz                                  | -488 Hz                     | -129 Hz                               | -301 Hz                                                           |
| SD                   | $\pm 2.27$                               | $\pm 19.48$                 | $\pm 3.87$                            | $\pm 9.88$                                                        |



รูปที่ 14 แผนภูมิแสดงการทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ของการ hybridized ระหว่าง Thiol probe กับ DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

#### 4.7 การทดสอบอายุการใช้งานของ Quart crystal/Probe (shelf life)

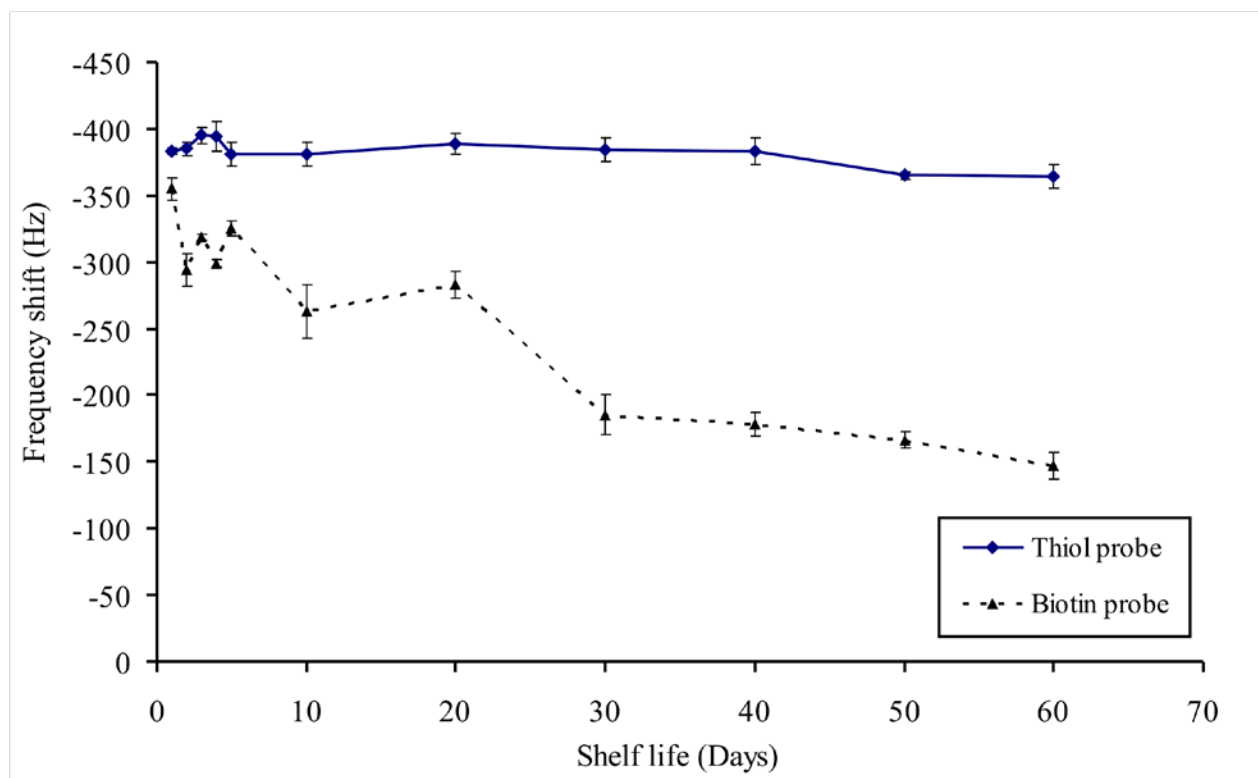
การทดสอบอายุการใช้งานของ Quart crystal/Probe การทดสอบอายุการใช้งานของ biotin probe และ thiol probe หลังจากที่มีการตรึง DNA probe ลงบนผิว quartz crystal ซึ่ง biotin probe จะผ่านทาง Au/MPA/EDC /NHS/Avidin/biotin probe ส่วน thiol probe จะผ่านทาง Au/thiol probe/MCH จะเห็นได้ว่าเมื่อผ่านทาง thiol probe จะให้ค่า shelf life มีค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปดีกว่า biotin probe หลังจากที่มีการจับกันระหว่าง DNA probe กับ DNA target อาจเนื่องมาจาก biotin probe จะมี protein avidin เชื่อมอยู่ อาจจะทำให้ avidin เมื่อเก็บในสภาพแห้ง เป็นระยะเวลาสั้น อาจทำให้ avidin ถูกทำลายได้ (ตารางที่ 12 – 13 , รูปที่ 15)

**ตารางที่ 12** แสดงการทดสอบอายุการใช้งานของ biotin probe ที่เวลาต่าง ๆ กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

| Quartz               | การทดสอบอายุการใช้งานของ probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |               |               |               |               |                |                |                |                |                |                |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                      | 1 วัน<br>(Hz)                                             | 2 วัน<br>(Hz) | 3 วัน<br>(Hz) | 4 วัน<br>(Hz) | 5 วัน<br>(Hz) | 10 วัน<br>(Hz) | 20 วัน<br>(Hz) | 30 วัน<br>(Hz) | 40 วัน<br>(Hz) | 50 วัน<br>(Hz) | 60 วัน<br>(Hz) |
| 1                    | -350                                                      | -306          | -321          | -295          | -333          | -271           | -297           | -173           | -170           | -164           | -145           |
| 2                    | -348                                                      | -299          | -317          | -303          | -324          | -239           | -275           | -195           | -187           | -176           | -136           |
| 3                    | -367                                                      | -278          | -320          | -299          | -319          | -280           | -278           | -187           | -176           | -163           | -160           |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | -355                                                      | -294          | -319          | -299          | -325          | -263           | -283           | -185           | -178           | -166           | -147           |
| SD                   | $\pm 8.52$                                                | $\pm 11.90$   | $\pm 2.23$    | $\pm 3.26$    | $\pm 5.80$    | $\pm 19.73$    | $\pm 9.75$     | $\pm 14.99$    | $\pm 9.09$     | $\pm 6.13$     | $\pm 9.89$     |

**ตารางที่ 13** แสดงการทดสอบอายุการใช้งานของ thiol probe ที่เวลาต่าง ๆ กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

| Quartz               | การทดสอบอายุการใช้งานของ probe กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป |               |               |               |               |                |                |                |                |                |                |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                      | 1 วัน<br>(Hz)                                             | 2 วัน<br>(Hz) | 3 วัน<br>(Hz) | 4 วัน<br>(Hz) | 5 วัน<br>(Hz) | 10 วัน<br>(Hz) | 20 วัน<br>(Hz) | 30 วัน<br>(Hz) | 40 วัน<br>(Hz) | 50 วัน<br>(Hz) | 60 วัน<br>(Hz) |
| 1                    | -385                                                      | -378          | -387          | -405          | -383          | -371           | -399           | -371           | -393           | -362           | -354           |
| 2                    | -380                                                      | -389          | -399          | -399          | -370          | -393           | -380           | -392           | -387           | -374           | -363           |
| 3                    | -384                                                      | -387          | -400          | -379          | -391          | -380           | -387           | -388           | -369           | -361           | -375           |
| $\bar{X}_{\Delta f}$ | -383                                                      | -385          | -395          | -394          | -381          | -381           | -389           | -384           | -383           | -365           | -364           |
| SD                   | $\pm 2.08$                                                | $\pm 4.79$    | $\pm 5.91$    | $\pm 11.12$   | $\pm 8.66$    | $\pm 9.03$     | $\pm 7.85$     | $\pm 9.11$     | $\pm 10.19$    | $\pm 2.94$     | $\pm 8.60$     |

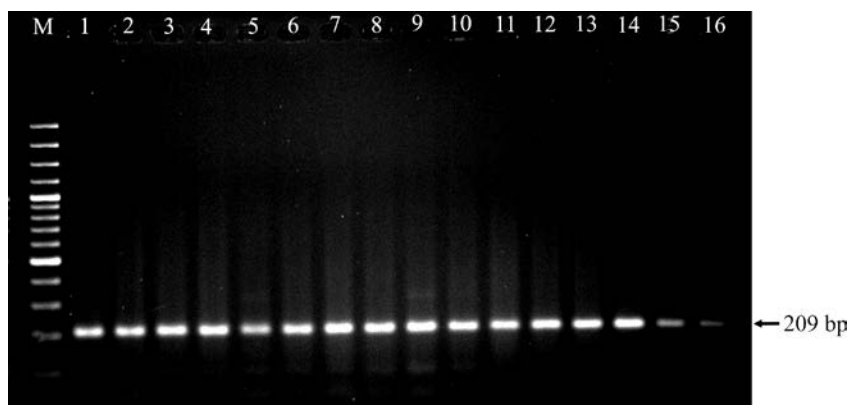


รูปที่ 15 กราฟแสดงการทดสอบอายุการใช้งานของ biotin probe และ thiol probe ที่เวลาต่าง ๆ กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลง

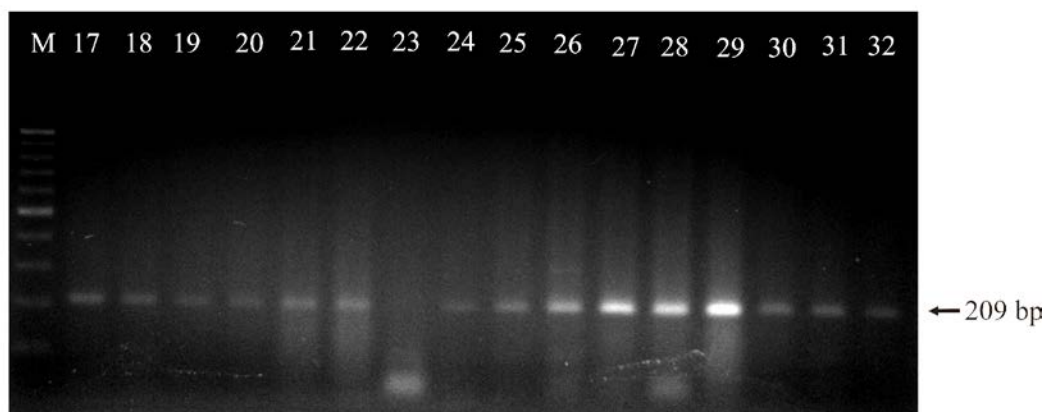
#### 4.8 การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจริง

เชื้อ *M. tuberculosis* (150 ตัวอย่าง) และ non *M. tuberculosis* (150 ตัวอย่าง) จากเสมหะและสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ จะต้องนำมาสกัดให้ได้เฉพาะดีเอ็นเอโดยใช้ DNAzol<sup>®</sup> แล้วนำมาทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ก่อนประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำการละลายใน hybridization buffer จึงทำ hybridization กับ probe

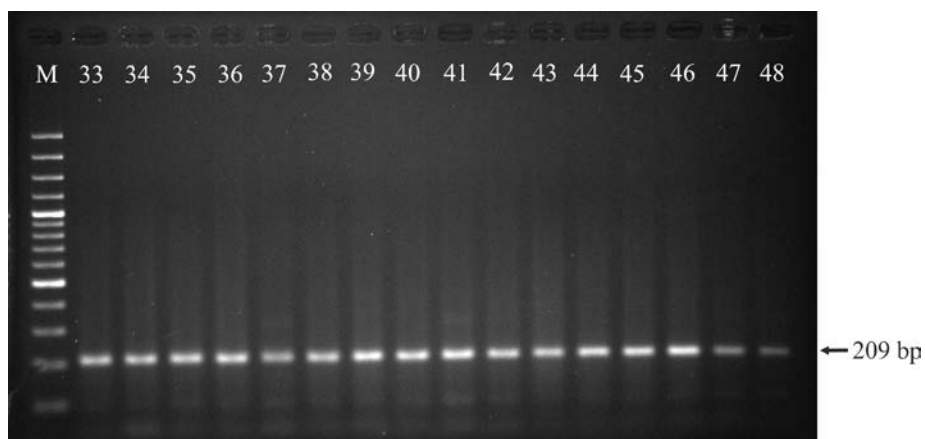
การตรวจสอบกับวิธี PCR โดยใช้ primer FMTB และ primer RMTB ซึ่งได้ product 209 bp จะทำการวิเคราะห์ผลการ PCR ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose และทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ผลทั้งสองแบบ ซึ่งผลการทดสอบ ด้วยวิธี PCR พบว่า sample ที่ 23 ปรากฏว่าไม่ขึ้นแบนให้เห็น จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง และเมื่อทำการทดสอบกับเครื่องมือวัด โดยไม่ผ่านกระบวนการเพิ่มจำนวน โยวิธี PCR (non-PCR) ปรากฏว่า สามารถตรวจวัดได้ทั้ง 20 ตัวอย่าง แต่พบว่าความถี่ที่วัดได้จากการเปลี่ยนแปลงมวลบนผิว quartz crystal อาจเนื่องมาจากปริมาณของ DNA target ในหลอดทดลองมีปริมาณไม่เท่ากัน แต่ก็ยังสามารถยืนยันได้ว่าการจับกันระหว่าง DNA probe กับ DNA target



**รูปที่ 16** แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -15 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose  
 Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: positive control (M. tuberculosis H37RVKK11-20), Lane 2:  
 sample 1, Lane 3: sample 2, Lane 4: sample 3, Lane 5: sample 4, Lane 6: sample 5, Lane 7: sample 6,  
 Lane 8: sample 7, Lane 9: sample 8, Lane 10: sample 9, Lane 11: sample 10, Lane 12: sample 11, Lane  
 13: sample 12, Lane 14: sample 13, Lane 15: sample 14, Lane 16: sample 15

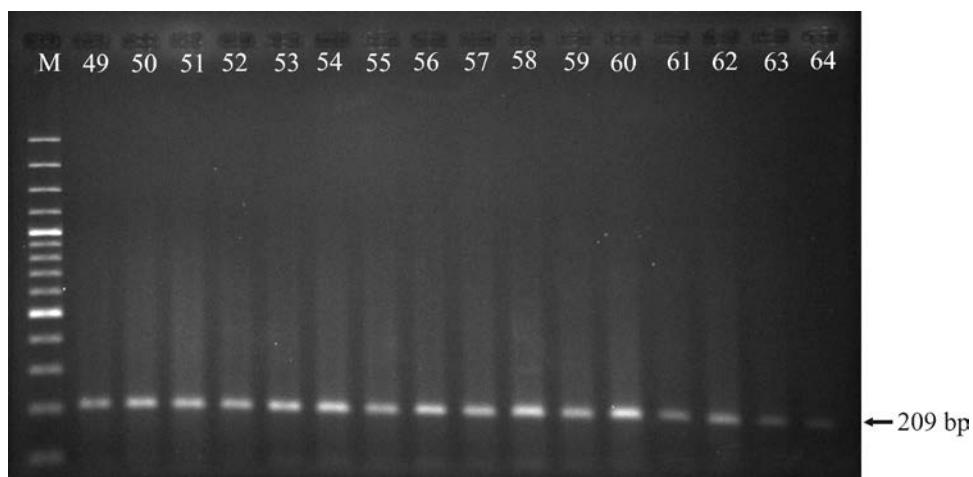


**รูปที่ 17** แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 16 - 31 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose  
 Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 17: sample 16, Lane 18: sample 17, Lane 19: sample 18, Lane 20:  
 sample 19, Lane 21: sample 20, Lane 22: sample 21, Lane 23: sample 22, Lane 24: sample 23, Lane 24:  
 sample 24, Lane 26: sample 25, Lane 27: sample 26, Lane 28: sample 27, Lane 29: sample 28, Lane 30:  
 sample 29, Lane 31: sample 30, Lane 32: sample 31



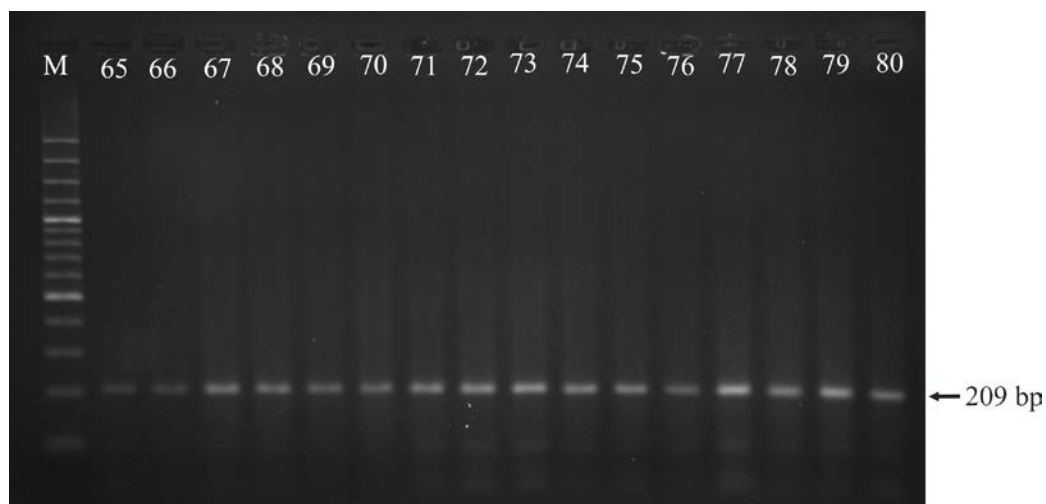
**รูปที่ 18** แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 32 - 47 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose

Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 33: sample 32, Lane 34: sample 33, Lane 35: sample 34, Lane 36: sample 35, Lane 37: sample 36, Lane 38: sample 37, Lane 39: sample 38, Lane 40: sample 39, Lane 41: sample 40, Lane 42: sample 41, Lane 43: sample 42, Lane 44: sample 43, Lane 45: sample 44, Lane 46: sample 45, Lane 47: sample 46, Lane 48: sample 47



**รูปที่ 19** แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 48 – 63 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose

Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 49: sample 48, Lane 50: sample 49, Lane 51: sample 50, Lane 52: sample 51, Lane 53: sample 52, Lane 54: sample 53, Lane 55: sample 54, Lane 56: sample 55, Lane 57: sample 56, Lane 58: sample 57, Lane 59: sample 58, Lane 60: sample 59, Lane 61: sample 60, Lane 62: sample 61, Lane 63: sample 62, Lane 64: sample 63



**รูปที่ 20** แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 64 – 79 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose  
 Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 65: sample 64, Lane 66: sample 65, Lane 67: sample 66, Lane 68:  
 sample 67, Lane 69: sample 68, Lane 70: sample 69, Lane 71: sample 70, Lane 72: sample 71, Lane 73:  
 sample 72, Lane 74: sample 73, Lane 75: sample 74, Lane 76: sample 75, Lane 77: sample 76, Lane 78:  
 sample 77, Lane 79: sample 78, Lane 80: sample 79

**ตารางที่ 14** แสดงการทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ของการ hybridized ระหว่าง Thiol probe กับ DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป

| Samples | PCR<br>(PCR product 209 bp) | Piezoelectric biosensor<br>non-amplified genomic DNA |
|---------|-----------------------------|------------------------------------------------------|
| 1       | +                           | -260 Hz                                              |
| 2       | +                           | -291 Hz                                              |
| 3       | +                           | -278 Hz                                              |
| 4       | +                           | -312 Hz                                              |
| 5       | +                           | -288 Hz                                              |
| 6       | +                           | -295 Hz                                              |
| 7       | +                           | 308 Hz                                               |
| 8       | +                           | -195 Hz                                              |
| 9       | +                           | -235 Hz                                              |
| 10      | +                           | -286 Hz                                              |
| 11      | +                           | -128 Hz                                              |
| 12      | +                           | -248 Hz                                              |
| 13      | +                           | -178 Hz                                              |
| 14      | +                           | -300 Hz                                              |
| 15      | +                           | -236 Hz                                              |
| 16      | +                           | -288 Hz                                              |
| 17      | +                           | -261 Hz                                              |
| 18      | +                           | -195 Hz                                              |
| 19      | +                           | -265 Hz                                              |
| 20      | +                           | 270 Hz                                               |

## 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 DNA biotinylated probe ที่ออกแบบจากส่วนของยีน IS6110 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* และเชื่อมด้วย TTTTTT เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA probe เกิด Steric hindrance กันเองเมื่อเกาะติดกับผิวของ quartz crystals และช่วยให้การจับกับ DNA target ได้ดีขึ้น การทดสอบการใช้งานกับ Quartz crystal ในสภาวะต่างๆ พบว่า ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ biotin probe คือ 1  $\mu\text{M}$  ให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลง  $-205 \pm 11.70$  Hz ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thiol probe คือ 1  $\mu\text{M}$  ให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลง  $-105 \pm 11.70$  Hz เมื่อเปรียบเทียบการใช้ biotin probe กับ thiol probe พบว่า ใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 1  $\mu\text{M}$  แต่พบว่า biotin probe มีความไวในการตรวจจับได้ดีกว่า thiol probe แต่เมื่อ thiol probe ทำการเติมด้วย 1 mM 6-mercaptohexanol(MCH) ซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มความไวได้ดีเท่ากับ biotin probe คือที่ความเข้มข้นที่ 1.5  $\mu\text{M}$  ให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลง  $-200 \pm 8.58$  Hz ส่วนการทดสอบกับ complementary DNA target ซึ่งค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ synthetic DNA target น้อยกว่า 0.5  $\mu\text{M}$  โดยที่ probe ทั้งสองให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไม่เท่ากัน

ในการทดสอบความสามารถในการวัด และการทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด จะใช้การตรึงสารบนผิว quartz crystal ผ่านทาง Au/MPA/EDC/NHS/Avidin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จากการทดสอบการวัด 3 คน โดยวัดชิ้นงานเดียว 10 ครั้งของ Avidin ที่ตรึงลงไป จะพบว่า ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่ง จะให้ค่า  $\sigma_{\text{Re prod}}$  เท่ากับ 1.006 ค่าความผันแปรของเครื่องมือวัดรวม เท่ากับ 1.344 และค่าสัดส่วนความผันแปรของเครื่องมือวัด เท่ากับ 0.24

การทดสอบความเที่ยงตรง(precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของเครื่องมือวัดโดยวัดวัตถุชิ้นเดียวกันหลายครั้ง โดยใช้ผู้วัด วิธีวัด เครื่องมือวัด ชุดเดียวกัน จากตารางที่มีการใช้เครื่องมือวัด ใช้การวัดจากการตรึง Avidin ลงบนผิว quartz crystal ได้เป็น Au/MPA/EDC/NHS/Avidin โดยค่าความถี่ที่

เปลี่ยนแปลงไป แต่จะเห็นได้ว่า ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงของเครื่อง ไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลง  $-186 \pm 0.4$  Hz แต่เมื่อผ่านเครื่องมือวัด Oscilloscope (Instek GDS 800) จะเห็นว่าค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น  $-205 \pm 0$  Hz ซึ่งจะทำให้ค่าที่แม่นยำกว่า เนื่องจากค่าความคลาดเคลื่อนไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการวัดแต่ละครั้ง และ quartz crystal เมื่อนำมา reuse ใช้ใหม่ได้โดยการเติม 1 mM HCl เพื่อ remove การจับกันระหว่าง probe กับ target โดยเครื่องมือวัด สามารถทำการ reuse ใช้ใหม่ในชั้นเดิมได้มากกว่า 10 ครั้ง แต่จะทำให้ ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปลดลงบ้าง เนื่องจาก 1 mM HCl อาจไปทำลายพันธะที่เกิดการจับกันของ DNA probe กับ quartz crystal

การทดสอบใช้ PCR product lane ที่ 10 – 14 การทดสอบเครื่องมือวัด ซึ่ง lane ที่ 10-12 PCR product 123 bp ใช้ primer FTB และ RTB โดยทำ 94 °C 2 นาที, 94-60-72 °C 1 นาที จำนวน 30 cycles และ extension ที่ 72 °C 10 นาที ส่วน lane ที่ 13-14 PCR product 209 bp เป็น product ที่ specific ต่อ DNA probe ซึ่งได้ PCR product 209 bp ใช้ primer FMTB และ RMTB โดยทำ 94 °C 2 นาที, 94-53-72 °C 1 นาที จำนวน 30 cycles และ extension ที่ 72 °C 10 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ 2% gel electrophoresis

การทดสอบความจำเพาะของ thiol probe กับ DNA target โดยการทดสอบ Quartz crystal 3 ชิ้น จะพบว่า negative control (PCR product 123 bp) ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงประมาณ  $-1.6 \pm 2.27$  Hz, positive control (PCR product 209 bp) ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงประมาณ  $-488 \pm 19.48$  Hz, และการย่อย genome DNA ของ *M. tuberculosis* ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* ได้ product 218 bp ให้ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงประมาณ  $-129 \pm 3.87$  Hz แต่เมื่อการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* หลังจากเชื่อมด้วย primer จับกับ enhancement (Avidin) จะให้ค่าความไวในการวัดเพิ่มมากขึ้น

การทดสอบอายุการใช้งานของ quart crystal/probe การทดสอบอายุการใช้งานของ biotin probe และ thiol probe หลังจากที่มีการตรึง DNA probe ลงบนผิว quartz crystal ซึ่ง biotin probe จะผ่านทาง Au/MPA/EDC /NHS/Avidin/biotin probe ส่วน thiol probe จะผ่านทาง Au/thiol probe/MCH จะเห็นว่าเมื่อผ่านทาง thiol probe จะให้ค่า shelf life มีค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปดีกว่า biotin probe หลังจากที่มีการจับกันระหว่าง DNA probe กับ DNA target อาจเนื่องมาจาก biotin probe จะมี protein avidin เชื่อมอยู่ อาจจะทำให้ avidin เมื่อเก็บในสภาพแห้ง เป็นระยะเวลานาน อาจทำให้ avidin ถูกทำลายได้

เชื้อ *M. tuberculosis* (150 ตัวอย่าง) และ non *M. tuberculosis* (150 ตัวอย่าง) จากเสมหะและสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ จะต้องนำมาสกัดให้ได้เฉพาะดีเอ็นเอโดยใช้ DNAzol<sup>®</sup> แล้วนำมาทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BtgI* เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ก่อนประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำการละลายใน hybridization buffer จึงทำ hybridization กับ probe

การตรวจสอบกับวิธี PCR โดยใช้ primer FMTB และ primer RMTB ซึ่งได้ product 209 bp จะทำการวิเคราะห์ผลการ PCR ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose และทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ผลทั้งสองแบบ ซึ่งผลการทดสอบ ด้วยวิธี PCR พบว่า sample ที่ 23 ปรากฏว่าไม่ขึ้นแบนให้เห็น จึงจำเป็นอย่าง

การทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง และเมื่อทำการทดสอบกับเครื่องมือวัด โดยไม่ผ่านกระบวนการเพิ่มจำนวนยีนวิธี PCR (non-PCR) ปรากฏว่า สามารถตรวจวัดได้ทั้ง 20 ตัวอย่าง แต่พบว่าความถี่ที่วัดได้จากการเปลี่ยนแปลงมวลบนผิว quartz crystal อาจเนื่องมาจากปริมาณของ DNA target ในหลอดทดลองมีปริมาณไม่เท่ากัน แต่ก็ยังสามารถยืนยันได้ว่าการจับกันระหว่าง DNA probe กับ DNA target และความสามารถของเครื่องมือวัดจะให้ความแตกต่างเป็นค่าความถี่ที่ลดลง เมื่อมีสารเกาะติดและจะให้ค่าไปทางบวก เมื่อไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารหรือสารไม่เกาะจับบนผิว quartz crystals

การพัฒนาเครื่องมือวัดไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์ในการวิจัยครั้งนี้ ก่อให้เกิดประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อช่วยให้การวินิจฉัยเร็วขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่ายและสามารถตรวจหลาย ๆ ตัวอย่างพร้อมกันได้ ซึ่งอุปกรณ์สามารถที่จะได้จากภายในประเทศ

### บรรณานุกรม

- 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.
- Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10):2582-6.
- Blum LJ, Coulet PR. Biosensor: principles and application. M. Dekker. Newyork; 1991:108-137.
- Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, Sanga E, Hoelscher M, Notomi T, Hase T, Perkins MD. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1936-40. Epub 2007 Mar 28.
- 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.
- 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.biotech.or.th/ Eng/WhatisTBinfo.html#Top](http://tb.biotech.or.th/Eng/WhatisTBinfo.html#Top).
- 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.biotech.or.th/Eng/FT-Bg.html#TOP>.
- 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.
- Daniel TM. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 1989;11 Suppl 2:S471-8.
- Dell'Atti D, Zavaglia M, Tombelli S, Bertacca G, Cavazzana AO, Bevilacqua G, Minunni M, Mascini M. Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk Human Papilloma Virus strains. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):140-6.
- 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.

- Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4359-65.
- Fengjiao H, Suqin L. Detection of *P. aeruginosa* using nano-structured electrode separated piezoelectric DNA biosensor. *Talanta* 2004;62(2):271-7.
- Ferreira AAP, Colli W, da Costa PI, Yamanaka H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 175–181.
- He F, Zhang L. Rapid diagnosis of *M. tuberculosis* using a piezoelectric immunosensor. *Anal Sci*. 2002;18(4):397-401.
- Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, Akimoto S, Ohashi M, Suga S, Nishimura N, Ozaki T, Nishiyama Y, Notomi T, Ohta Y, Asano Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):140-5.
- Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M, Odagiri T. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*. 2006 Nov 10;24(44-46):6679-82.
- Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Van Tu P, Tien NT, Tashiro M, Odagiri T. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods*. 2007 May;141(2):173-80.
- Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2616-22.
- Joshua K. QCM based DNA biosensor. *Chem* 2006;243:1-7.
- Kaewphinit T, Santiwattanakul S, Chansiri K. Development of DNA-piezoelectric biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceeding of World Congress on Biomedical Engineering* 2007; In press.
- Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, Horiuchi Y, Kojima K, Takahashi M, Arakawa Y. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1899-902.

- 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.
- Ke C, Berney H, Mathewson A, Sheehan MM. Rapid amplification for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* using a non-contact heating method in silicon microreactor based thermal cyclers. *Sensor Actuat* 2004;102:308-14.
- Kim NH, Baek TJ, Park HG, et al. Highly sensitive biomolecule detection on a quartz crystal microbalance using gold nanoparticles as signal amplification probes. *Analytical Sciences* 23 (2): 177-181 FEB 2007)
- 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.
- 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.
- Mahaisavariya P, Chaiprasert A, Khemneng 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.
- Mannelli I, Minunni M, Tombelli S, Wang R, Michela Spiriti M, Mascini M. Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors. *Bioelectrochemistry.* 2005;66(1-2):129-38.
- Michos AG, and et. al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by Amplicor MTB PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 54(2):121-6.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods.* 2004 May 31;59(2):145-57.
- Mukai T, Miyamoto Y, Yamazaki T, Makino M. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the dnaA gene. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 Jan;254(2):232-9.
- Olsen EV, Sorokulova IB, Petrenko VA, Chen IH, Barbaree JM, Vodyanoy VJ. Affinity-selected filamentous bacteriophage as a bioreactors of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron.* 2006;21(8):1434-42.
- Olsen EV, Sorokulova IB, Petrenko VA, Chen IH, Barbaree JM, Vodyanoy VJ. Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave

- Pfiffer GE. *Mycobacterium* : General characteristic, Laboratory detection, and Staining procedures. In: Manual of Clinical Microbiology 9<sup>ed</sup> (Murray PR: Ed.). ASM Press, 2007; 543-72.
- Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, Onuma M. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr;43(4):1646-50.
- 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.
- Shirato K, Nishimura H, Saijo M, Okamoto M, Noda M, Tashiro M, Taguchi F. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 2007 Jan;139(1):78-84.
- Skladal P, dos Santos Riccardi C, Yamanaka H, da Costa PI. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. *J Virol Methods*. 2004 ;117(2):145-51.
- 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 1; 35(4): 1030–1.
- Sun H, Zhang Y, Fung Y. Flow analysis coupled with PQC/DNA biosensor for assay of *E. coli* based on detecting DNA products from PCR amplification. *Biosens Bioelectron*. 2006 15;22(4):506-12.
- Tombelli S, Minunni M, Luzi E, Mascini M. Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry*. 2005 Oct;67(2):135-41.
- Tombelli S, Minunni M, Santucci A, Spiriti M.M. and Mascini M. A DNA-based piezoelectric biosensor: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Talanta* 2006; 68:806–812
- Tombelli S, Mascini M. Piezoelectric quartz crystal biosensors: recent immobilization schemes. *Anal Letter* 2000; 33 (11):2129-51.
- Tombelli S, Mascini M, Sacco C. And Turner A.P.F. A DNA piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*. 2000;418 (1): 1-9
- Tombelli S, Mascini M, Turner AP. Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. *Biosens Bioelectron*. 2002;17(11-12):929-36.
- Tortois E, and Marcelli F. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(1):51-5.

- United States Patent 20060121531 Piezoelectric bio-chip for detecting pathogen of mad cow disease and thereon preparation
- 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.
- Wu VC, Chen SH, Lin CS. Real-time detection of Escherichia coli O157:H7 sequences using acirculating-flow system of quartz crystal microbalance. Biosens Bioelectron. 2007 15;22(12):2967-75.
- WWW.BIOMED.DREXEL.EDU/TechnologyPortfolio/
- Yao C, Zhu T, Tang J, Wu R, Chen Q, Chen M, Zhang B, Huang J, Fu W. Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor. Biosens Bioelectron. 2007 Sep 14; [Epub ahead of print]
- Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Kanki M, Aoyama I, Tsukamoto T. Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses. J Med Virol. 2007 Mar;79(3):326-34. Erratum in: J Med Virol. 2007 Jun;79(6):863.
- Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, Totsuka A, Wakita T. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J Virol Methods. 2007 Nov;145(2):162-8.
- 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. Biosens Bioelectron. 2001;16:85-95.
- Zuo B, Li S, Guo Z, Zhang J, Chen C. Piezoelectric immunosensor for SARS-associated coronavirus in sputum. Anal Chem. 2004 ;76(13):3536-40.