

สารบัญ

	หน้า
DNA piezoelectric biosensor	
บทคัดย่อ	1
1. บทนำ	4
2. ทบทวนวรรณกรรม	6
3. วิธีการดำเนินวิจัย	9
3.1 การเตรียมสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ	9
3.2 การออกแบบ Probe และ primer	9
3.3 การออกแบบและการพัฒนางจรอิเล็กทรอนิกส์	10
3.4 การเตรียม Quartz crystals	10
3.5 การตรึงสารลงบนผิว Quartz crystals (Immobilization) และทดสอบ วิธีการต่างๆ ในการตรึงสาร	11
3.6 การศึกษาค่าเหมาะสม (Optimization) ในการตรวจวัด	13
3.6.1 ค่าความเหมาะสมของ DNA probe	13
3.6.2 ค่าความเหมาะสมของ Target	14
3.7 การพัฒนาความไวของเครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์ไบโอเซนเซอร์ โดยวิธี Signal enhancement โดยใช้ Mass molecules	14
3.8 การทดสอบ ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility)	14
3.9 ทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด (Total Variation)	15
3.10 การทดสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ (precision)	15
3.11 การทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ (accuracy)	15
3.12 การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal	16
3.13 การทดสอบอายุการใช้งานของ Quart crystal/Probe (shelf life)	16
3.14 การทดสอบความจำเพาะของ DNA probe (specificity)	16
3.15 การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจริง	16
4. ผลการวิจัย	17
4.1 วงจรนับวัดความถี่ 20 MHz	17
4.2 การทดสอบสภาวะต่างๆของ Quartz crystal	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
DNA piezoelectric biosensor	
4.3 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) และ การทดสอบความผันแปรรวมจากการวัด (Total Variation)	22
4.4 การทดสอบความเที่ยงตรง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของเครื่องมือวัด	25
4.5 การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal	26
4.6 การทดสอบความจำเพาะของ DNA probe (specificity)	27
4.7 การทดสอบอายุการใช้งานของ Quart crystal/Probe (shelf life)	29
4.8 การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจริง	31
5. สรุปและอภิปรายผล	36
บรรณานุกรม	39

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อต่างๆ ดำเนินการมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 2004	8
ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ ในดีเอ็นเอไพโซ- อิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์	14
ตารางที่ 3 แสดงค่าความเหมาะสมของ biotin probe ที่ความเข้มข้น 0 – 2 μM กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	19
ตารางที่ 4 แสดงค่าความเหมาะสมของ thiol probe ที่ความเข้มข้น 0 – 2 μM กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	19
ตารางที่ 5 แสดงค่าความเหมาะสมของ Thiol probe/6-mercaptohexanol (MCH) ที่ความเข้มข้น 0 – 2 μM กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	20
ตารางที่ 6 แสดงการทดสอบระหว่าง biotin probe กับ complementary DNA target ที่ความเข้มข้น 0 – 2 μM กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	21
ตารางที่ 7 แสดงการทดสอบระหว่าง Thiol probe กับ complementary DNA target ที่ความเข้มข้น 0 – 2 μM กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	21
ตารางที่ 8 แสดงการทดสอบความสามารถของการทำซ้ำโดยใช้ผู้วัดหลายคน วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกันและใช้วิธีวัดเดียวกัน	23
ตารางที่ 9 แสดงทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของเครื่องมือวัด โดยใช้ผู้วัดเดียว วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกัน กับการเปลี่ยนแปลงความถี่	25
ตารางที่ 10 การทดสอบการ reuse ของ Quart crystal กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	26
ตารางที่ 11 แสดงการทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ของการ hybridized ระหว่าง Thiol probe กับ DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	28
ตารางที่ 12 แสดงการทดสอบอายุการใช้งานของ biotin probe ที่เวลาต่าง ๆ กับ ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	30
ตารางที่ 13 แสดงการทดสอบอายุการใช้งานของ thiol probe ที่เวลาต่าง ๆ กับ ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	30
ตารางที่ 14 แสดงการทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ของการ hybridized ระหว่าง Thiol probe กับ DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป	35

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	แสดงองค์ประกอบหลักของเครื่องมือไบโอเซนเซอร์
รูปที่ 2	แสดงตำแหน่งการออกแบบ DNA probe และ primer ของยีน IS6110
รูปที่ 3	Quartz crystals ความถี่ประมาณ 12 MHz
รูปที่ 4	แสดงขั้นตอนการ immobilization และ hybridization ผ่านทาง 4A) biotin probe 4B) thiol probe
รูปที่ 5	วงจรนับวัดความถี่ 20 MHz
รูปที่ 6	print circuit board ของเครื่องมือวัดความถี่
รูปที่ 7	เครื่องมือวัดความถี่ (ไพโซอิเล็กทริกไบโอเซนเซอร์)
รูปที่ 8	กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าความเหมาะสมของ biotin probe และ thiol probe ที่ความเข้มข้น 0 – 2 uM กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป
รูปที่ 9	กราฟแสดงผลการทดสอบของ synthetic complementary DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป
รูปที่ 10	แผนภูมิแสดงการทดสอบความสามารถของการทำซ้ำโดยใช้ผู้วัดหลายคน วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกันและใช้วิธีวัดเดียวกัน
รูปที่ 11	แผนภูมิแสดงทดสอบความความเที่ยงตรงและความแม่นยำของเครื่องมือวัด โดยใช้ผู้วัดเดียว วัดชิ้นงานเดียวกันโดยใช้เครื่องมือวัดชุดเดียวกัน กับการเปลี่ยนแปลงความถี่
รูปที่ 12	แสดงการทดสอบการ reuse ของ Quart crystal กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป
รูปที่ 13	แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -13 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose
รูปที่ 14	แผนภูมิแสดงการทดสอบความจำเพาะของ DNA probe ของการ hybridized ระหว่าง Thiol probe กับ DNA target กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไป
รูปที่ 15	กราฟแสดงการทดสอบอายุการใช้งานของ biotin probe และ thiol probe ที่เวลาต่าง ๆ กับความถี่ที่เปลี่ยนแปลง
รูปที่ 16	แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -15 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose
รูปที่ 17	แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -13 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 18 แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -13 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose	33
รูปที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -13 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose	33
รูปที่ 20 แสดงการวิเคราะห์ผลการ PCR กับ real sample 1 -13 ด้วย Gel electrophoresis ใน 2% agarose	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

1. QCM	=	DNA-Piezoelectric Quart Crystal Microbalance Biosensor
2. Δf	=	ความถี่ resonance ที่เปลี่ยนแปลงไป
3. Δm	=	มวลที่เปลี่ยนแปลงไป
4. EIDs	=	emerging infectious diseases
5. MPA	=	3-mercaptopropionic acid
6. EDC	=	1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
7. NHS	=	N-hydroxysuccinimide
8. HEPES	=	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
9. PBS	=	Phosphate buffer saline
10. MCH	=	6-mercaptohexanol
11. FMTB	=	Forward Mycobacterium Tuberculosis primer
12. RMTB	=	Reverse Mycobacterium Tuberculosis primer
13. FTB	=	Forward Tuberculosis primer
14. RTB	=	Reverse Tuberculosis primer
15. <i>BtgI</i>	=	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>BtgI</i>
16. Non-PCR	=	Non-amplified polymerase chain reaction
17. PCR	=	polymerase chain reaction
18. bp	=	basepair
19. Hz	=	Hertz
20. DNAzol [®]	=	น้ำยาสกัด DNA