การตรวจโปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกโดยใช้ควอตซ์คริสทัลไมโครบาแลนซ์

นางสาวธณิกานต์ ศิริพูลศฤงฆ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A DETECTION OF DENGUE VIRUS PROTEIN USING QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE

Miss Tanikan Siripunsaring

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Electrical Engineering

Department of Electrical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

490446

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจโปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกโดยใช้ควอตซ์คริสทัลไมโครบาแลนซ์
โดย	นางสาวธณิกานต์ ศิริพูลศฤงฆ์
สาขาวิชา	วิศวกรรมศาสตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.สมบูรณ์ จงชัยกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์)

..... กรรมการ

(ดร.ชัญญา พุทธิขันธ์)

ธณิกานต์ ศิริพูลศฤงฆ์ : การตรวจโปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกโดยใช้ควอตซ์คริสทัลไมโครบาแลนซ์. (A DETECTION OF DENGUE VIRUS PROTEIN USING QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์, 59 หน้า.

วิทยานิพนธ์นี้นำเสนอการตรวจแอนติเจนของไวรัสไข้เลือดออกโดยใช้ควอตซ์คริสทัลไมโครบาแลนซ์ (Quartz Crystal Microbalance: QCM) โดยได้ประดิษฐ์ระบบวัดแบบ 1 ช่องที่สามารถวัดความถี่เรโซแนนซ์และวัดอุณหภูมิของ QCM ได้พร้อมกัน แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็นโปรตีนรีคอมบิแนนต์ส่วนเปลือกหุ้ม (E) ของไวรัสไข้เลือดออก ซีโรทัยป์ 2 และใช้โพลีสไตรีนเป็นตัวปรับสภาพผิวของ QCM ก่อนการตรึงแอนติบอดี จากการศึกษาพบว่าความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM จะเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจน โดยความถี่เรโซแนนซ์จะลดลงมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนเพิ่มขึ้น เมื่อใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 25.9 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรจะสามารถวัดแอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำสุด คือ 5.38 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าแอนติเจนสามารถเกิดการจับแบบไม่จำเพาะกับแอนติบอดีได้ แต่การจับแบบไม่จำเพาะนี้สามารถป้องกันได้โดยใช้ Bovine Serum Albumine (BSA) สุดท้าย ได้ศึกษาการนำ QCM กลับมาใช้ซ้ำ โดยการล้าง QCM ที่ผ่านการตรึงแอนติบอดีและใช้วัดแอนติเจนแล้วด้วยเบนซีน จากผลการศึกษาพบว่า QCM สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ โดยผลการทดลองที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกับการใช้ QCM ใหม่

ภาควิชา วิศวกรรมไฟฟ้า ลายมือชื่อนิสิต ธณิกานต์ ศิริพูลศฤงฆ์

สาขาวิชา วิศวกรรมไฟฟ้า ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา มานะ ศรียุทธศักดิ์

ปีการศึกษา 2549

4770302821 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEY WORDS: QCM / ANTIBODY / ANTIGEN / DENGUE

TANIKAN SIRIPUNSARING: A DETECTION OF DENGUE VIRUS PROTEIN USING QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. MANA SRIYUDTHSAK, Ph. D., 59 pp.

This thesis presents a detection of dengue virus antigen using quartz crystal microbalance (QCM). A measuring system for measuring QCM resonant frequency and temperature at the same time was developed. The QCM surface was modified with polystyrene before immobilization with monoclonal antibody specific for recombinant dengue virus envelope protein. It was found that the resonant frequency decreased when the concentration of antibody and antigen increased. The minimum concentration of antigen which the QCM could detect was 5.39 µg/ml when the antibody concentration was 25.9 µg/ml. Moreover, the result showed that bovine serum albumin (BSA) could prevent the non-specific binding between antigen and polystyrene surface. Finally, QCM immobilized with antibody and bound with antigen was reused after washing with benzene. The result showed that QCM could be reused and the data of the reused QCM was close to that of new QCM.

Department Electrical Engineering Student's signature Tanikan Siripunsaring

Field of study Electrical Engineering Advisor's signature Mana Sriyudthsak

Academic year 2006

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำกับข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดังนี้ รศ.ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์ อ.ดร.สมบูรณ์ จงชัยกิจ อ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ และดร.ชัญญา พุทธิขันธ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำที่มีค่ายิ่ง

ขอขอบคุณ น.พ.ปรีดา มาลาสิทธิ์ และดร.ชัญญา พุทธิขันธ์ จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ร.พ. ศิริราช ที่ให้ความอนุเคราะห์แอนติบอดีและแอนติเจนที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ อ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆเกี่ยวกับเรื่องดีเอ็นเอ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องในห้องปฏิบัติการไบโอเอ็เล็กทรอนิกส์ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือพูดคุย และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจ และคอยเกื้อหนุนข้าพเจ้าในด้านต่างๆ จนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุดบุคคลที่ข้าพเจ้าไม่ได้กล่าวถึง และได้มีส่วนร่วมในงานวิจัยของข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอขอบคุณบุคคลเหล่านั้นไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน 4
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย 4
2 หลักการและทฤษฎีพื้นฐาน 5
2.1 Quartz Crystal Microbalance (QCM) 5
2.2 แอนติบอดีและแอนติเจน 10
2.3 โรคไข้เลือดออก 13
2.4 การประยุกต์ใช้ QCM เป็นทรานส์ดิวเซอร์ในการตรวจวัดแอนติเจน 14
3 ระบบวัดและวิธีการทดลอง 17
3.1 ระบบวัดที่ใช้ในการทดลอง 17
3.2 ความสามารถของระบบวัด 20
3.3 การประดิษฐ์ตัวตรวจรู้ที่ใช้ในงานวิจัย 22
4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง 30
4.1 การทดลองวัดแอนติเจนของไวรัสไข้เลือดออกโดยใช้ QCM ใหม่ 30
4.2 การทดลองวัดแอนติเจนของไวรัสไข้เลือดออกโดยใช้ QCM ที่นำกลับมาใช้ซ้ำ 39
4.3 การทดลองใช้ BSA เพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติเจน 46
5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 51
5.1 สรุปผล 51

บทที่ หน้า

5.2 ปัญหาและข้อเสนอแนะ 52
รายการอ้างอิง 53
ภาคผนวก 56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 59

บทที่ หน้า

ตารางที่ 1.1 การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจ เวลาที่ใช้ตรวจ และค่าใช้จ่ายในการตรวจ 2
ตารางที่ 4.1 ตารางความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโพลีสไตรีน ในเบนซีนกับความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปหลังเคลือบโพลีสไตรีนและ หลังตรึงแอนติบอดี 31
ตารางที่ 4.2 ตารางความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM กับเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงแอนติบอดี 33
ตารางที่ 4.3 ตารางความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM มวลที่หยด มวลที่เกาะ และเปอร์เซ็นต์ของมวลที่เกาะกับความเข้มข้น ของแอนติบอดี 36
ตารางที่ 4.4 ตารางความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM มวลที่หยด มวลที่เกาะ และเปอร์เซ็นต์ของมวลที่เกาะกับความเข้มข้น ของแอนติเจน 38
ตารางที่ 4.5 ความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปหลังล้างเทียบกับความถี่เรโซแนนซ์ ก่อนใช้ครั้งแรกเมื่อทำความสะอาดผิวด้วยวิธีที่ 1 41
ตารางที่ 4.6 ความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปหลังล้างเทียบกับความถี่เรโซแนนซ์ ก่อนใช้ครั้งแรกเมื่อทำความสะอาดผิวด้วยวิธีที่ 2 41
ตารางที่ 4.7 ความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM หลังเคลือบโพลีสไตรีนและ หลังตรึงแอนติบอดีเปรียบเทียบระหว่าง QCM ใหม่กับ QCM ที่ผ่านการ ใช้แล้ว 1 ครั้ง 43
ตารางที่ 4.8 ความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM ที่นำกลับมาใช้ซ้ำหลังวัด แอนติเจนและมวลของแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดี 44
ตารางที่ 4.9 ความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM หลังตรึงแอนติบอดีและหลังวัด แอนติเจนเมื่อไม่ใช้ BSA 47
ตารางที่ 4.10 ความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM หลังตรึงแอนติบอดีและหลังวัด แอนติเจนเมื่อใช้ BSA 47

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 2.1 ตัวอย่างของการเกิดปรากฏการณ์เพียโซอิเล็กทริก 6
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ QCM 7
รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ที่เปลี่ยนไปกับอุณหภูมิของ QCM แบบ AT-cut 7
รูปที่ 2.4 วงจรสมมูลของ QCM 8
รูปที่ 2.5 วงจรสมมูลของ QCM เมื่อมีมวลมาเกาะที่ผิวของ QCM 9
รูปที่ 2.6 การทำงานของวงจรออสซิลเลเตอร์ 9
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแอนติบอดี 11
รูปที่ 2.8 การตรึงแอนติบอดีลงบนผิวทองและการจับแอนติเจนของแอนติบอดี 15
รูปที่ 3.1 บล็อคไดอะแกรมของระบบวัดที่ใช้ในงานวิจัย 17
รูปที่ 3.2 วงจรออสซิลเลเตอร์แบบใช้เกทที่มีมุมเลื่อนเฟสเท่ากับ π เรเดียน 18
รูปที่ 3.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์กับเวลาเมื่อมีการวัดซ้ำกัน หลายครั้ง 21
รูปที่ 3.4 ผังงานวิธีการทดลองที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ 25
รูปที่ 3.5 ระบบวัดที่ใช้ในงานวิจัย 26
รูปที่ 3.6 QCM และเซนเซอร์วัดอุณหภูมิที่ใช้ในงานวิจัย 26
รูปที่ 3.7 วงจรวัดที่ใช้ในงานวิจัย 27
รูปที่ 3.8 เครื่องหมุน (spinner) ที่ใช้ในงานวิจัย 27
รูปที่ 3.9 เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ที่ใช้ในงานวิจัย 28
รูปที่ 3.10 การโซนิเคต QCM ด้วยโซนิเคเตอร์ 28
รูปที่ 3.11 เครื่องเขย่าออร์บิทัล (orbital shaker) 29
รูปที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปหลังเคลือบ โพลีสไตรีนกับความเข้มข้นของโพลีสไตรีน 31
รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM กับเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงแอนติบอดี 33
รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปและมวลที่เกาะ บนผิวของ QCM กับความเข้มข้นของแอนติบอดี 35
รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างมวลที่เกาะบนผิว QCM กับความเข้มข้นของ แอนติบอดี 37
รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM กับ

ภาพประกอบ หน้า

ความเข้มข้นของแอนติเจน 38
รูปที่ 4.6 วิธีทำความสะอาดผิว QCM เพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ 40
รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM ที่
นำกลับมาใช้ซ้ำกับความเข้มข้นของแอนติเจน 45
รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM
ภายหลังการตรึงแอนติบอดีและภายหลังการวัดแอนติเจนกับความเข้มข้น
ของแอนติบอดี เมื่อไม่ใช้ BSA 48
รูปที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความถี่เรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนไปของ QCM
ภายหลังการตรึงแอนติบอดี ภายหลังการใช้ BSA และภายหลังการวัด
แอนติเจนกับความเข้มข้นของแอนติบอดี เมื่อใช้ BSA 48
รูปที่ 4.10 แบบจำลองการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนเมื่อมีการจับ
แบบไม่จำเพาะระหว่างแอนติเจนกับโพลีสไตรีน 49
รูปที่ 4.11 แบบจำลองการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนเมื่อใช้ BSA
เป็นตัวป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะระหว่างแอนติเจนกับโพลีสไตรีน 49