

การศึกษาการเบรกตาวนทางไฟฟ้าของเม็ดเลือดแดงสำหรับการตรวจจับมาลาเรีย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Study on the electrical breakdown of red blood cells for malaria detection



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Electrical Engineering

Department of Electrical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการเบรกดาวน์ทางไฟฟ้าของเม็ดเลือดแดงสำหรับการตรวจจับมาลาเรีย
โดย	น.ส.วีรดา หมดสี
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาภรณ์ ธีรมงคลศรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.คณิศร์ มาตรา)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วีรดา หมดสี : การศึกษาการเบรกดาวน์ทางไฟฟ้าของเม็ดเลือดแดงสำหรับการตรวจจับ
มาลาเรีย. (Study on the electrical breakdown of red blood cells for
malaria detection) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของโลก ถึงแม้ว่าจำนวนผู้ป่วยจะลดลงทุกปี. การดื้อยาของเชื้อมาลาเรียส่งผลกระทบต่อการใช้ยาควบคุมโรคเป็นอย่างมาก. ดังนั้น การวินิจฉัยของมาลาเรียจำเป็นต้องมีความรวดเร็วและแม่นยำ. ปัจจุบันการตรวจหา มาลาเรียมีหลายวิธี เช่น การตรวจหาด้วยกล้องจุลทรรศน์, การตรวจโดยใช้ชุดตรวจ RDTs, การตรวจด้วยวิธีการพีซีอาร์. ขีดจำกัดและความสามารถในการตรวจแต่ละวิธีนั้นมีความแตกต่างกัน. วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาการคัดแยกเซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย และการตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียโดยใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก. การสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียด้วยหลักการอิเล็กโตรพอเรชัน. ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการทดลอง คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย. การทดลองคัดแยกเซลล์เลือดปกติออกจากเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียถูกทำที่อัตราส่วนจำนวนเซลล์ 1:10,000. เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียหลังผ่านกระบวนการคัดแยกจะถูกสลายที่แรงดัน 9 V_p, 100 kHz เพื่อสกัดสารพันธุกรรม. ตัวอย่างที่ได้จากการสลายเซลล์ถูกนำไปขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการพีซีอาร์. ผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์จะถูกนำมาตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียด้วยวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิศวกรรมไฟฟ้า
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6270361421 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEYWORD: Dielectrophoresis, Electroporation, cell lysis, Impedance analysis,
Microfluidic, Malaria, Escherichia coli

Weerada Matsi : Study on the electrical breakdown of red blood cells for
malaria detection. Advisor: Prof. Boonchai Techaumnat

Malaria is still a global public health problem though the number of patients is decreasing every year. Drug resistance to malaria has a profound impact on the disease control. Malaria diagnosis needs to be fast and accurate. There are currently several methods for detecting malaria: microscopy, RDTs, and PCR. The limits and capabilities of each method are different. This thesis studies the separation of normal blood cells and malaria blood cells and malaria DNA detection by using dielectrophoretic force. The lysis of malaria-infected cells is done by electroporation. The samples used for the experiment were normal red blood cells and malaria-infected cells. The separation experiment of red blood cells from malaria-infected cells is done at the cell-number ratio of 1:10,000. Experimental lysis of the malaria-infected cells is done by using a voltage of $9 V_p$, 100 kHz after the separation process to extract the malaria DNA. The sample that gets from the lysis sends to amplified DNA by PCR. The PCR products are used to detect malaria DNA by the method of DEPIM.

Field of Study: Electrical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไข ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์, รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธร, นางสาวอุรัสยา พัฒนวงศ์ และ นางสาวรัตนภรณ์ โรจน์รุ่ง จากภาคปริสตีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการจัดเตรียมเซลล์เลือด และการขยายดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR, ศาสตราจารย์ ดร.เกศินี โชติวานิช และ นางสาวนัฐพร เป็ยรักษา จาก Cell and Tissue Resources Unit (CTCRU) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการจัดเตรียมเซลล์เพาะเชื้อมาลาเรีย, รองศาสตราจารย์ ดร.คณิตร์ มาตรา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทธร บุษผ้น จากสาขาส่งเสริมสุขภาพ คณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการจัดเตรียมเซลล์ E. coli, Prof. M. Nakano จาก Kyushu University สำหรับการจัดทำอิเล็กทรอนิกส์.

วีรดา หมดสี



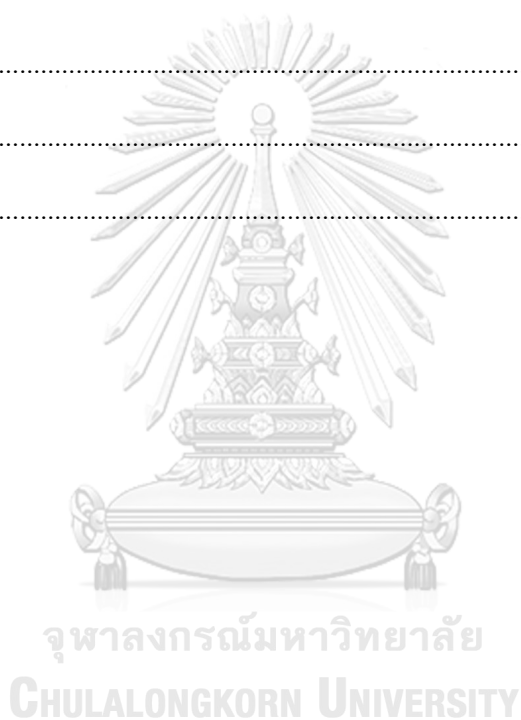
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการดำเนินงาน	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เซลล์เม็ดเลือดแดง	3
2.2 มาลาเรีย	3
2.3 แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก (Dielectrophoretic Force, F_{DEP}).....	5
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ DEP ในการคัดแยกเซลล์.....	6
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก.....	9
2.6 การกระตุ้นการเบรกดาวนที่เยื่อหุ้มเซลล์.....	11
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเบรกดาวนเซลล์.....	12
2.8 ตัวประกอบของคลอเซียส-มอสซอตติของเซลล์.....	14
บทที่ 3 อุปกรณ์การทดลอง.....	16
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	16
3.1.1 เซลล์เม็ดเลือดแดง.....	16

3.1.2 เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย	16
3.1.3 เซลล์ <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	17
3.1.4 อนุภาคพอลิสไตรีน (Polystyrene).....	18
3.2 อุปกรณ์ของไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์	18
3.2.1 ขั้นตอนการสร้างช่องทางไหล	18
3.2.2 อิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ในการทดลอง	20
3.3 อุปกรณ์สำหรับภายนอกช่องทางไหล	21
3.3.1 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า.....	21
3.3.2 เครื่องควบคุมวัฏจักรหน้าที่ (Duty Cycle, D _T)	21
3.3.3 ปุ่มกระบอกฉีดยา.....	21
3.4 Lock-In-Amplifier (LIA-MVD-200-H, FEMTO Messtechnik GmbH, Germany)	21
3.5 กล้องจุลทรรศน์	22
บทที่ 4 การทดลอง.....	23
4.1 การเตรียมสารละลายและตัวอย่าง	23
4.1.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการคัดแยกและสลายเซลล์.....	23
4.1.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัด DEPIM ของเชื้อ <i>E. coli</i>	23
4.1.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัด DEPIM ของดีเอ็นเอมาลาเรีย	24
4.2 การทดลองคัดแยกและสลายเซลล์เลือดเพาะปกติกับเซลล์เลือดติดเชื้อมาลาเรีย.....	25
4.3 การทดลองวัด DEPIM เพื่อตรวจหา <i>E. coli</i> ในตัวอย่าง	27
4.4 การทดลองวัด DEPIM เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย	27
บทที่ 5 ผลการศึกษาและการอภิปรายผล	28
5.1 การศึกษาไดอิเล็กโตรโฟรีซิสในการคัดแยกเซลล์.....	28
5.2 ผลการสลายเซลล์เลือดด้วยการกระตุ้นอิเล็กโตรพอเรซิส.....	29
5.3 ผลการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติกของเซลล์ <i>E. coli</i>	33

5.4 ผลการศึกษาการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดโพลีโทรโพเรติกของอนุภาคพอลิस्टาไร์นที่จับกับดีเอ็นเอ ของมาลาเรีย	36
บทที่ 6 สรุป.....	41
บรรณานุกรม.....	42
ภาคผนวก ก.....	46
ภาคผนวก ข.....	48
ภาคผนวก ค.....	49
ภาคผนวก ง.....	50
ภาคผนวก จ.....	51
ประวัติผู้เขียน.....	54



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมาลาเรียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก. แม้ว่า จำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากมาลาเรียลดลงทุกปี แต่การควบคุมโรคยังต้องเผชิญกับปัญหาหลายด้าน โดยเฉพาะการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การควบคุมโรคเป็นอย่างมาก. ดังนั้น การวินิจฉัยของมาลาเรียจำเป็นต้องมีความรวดเร็วและแม่นยำ เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาได้อย่างทันท่วงที. วิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในปัจจุบันนี้มีดังนี้ 1. การตรวจหาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscope) 2. การตรวจโดยใช้ชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid Diagnostic Tests, RDTs) 3. การตรวจแบบพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR). การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ การทำฟิล์มหนาและบาง (Thick and Thin Blood Smear) ซึ่งเซลล์จะถูกย้อมด้วยสี Giemsa stain เพื่อให้ง่ายต่อการระบุและนับเชื้อ [1, 2]. การทำฟิล์มบางสามารถระบุชนิดเชื้อได้แม่นยำกว่าฟิล์มหนา เนื่องจากเซลล์เรียงตัวเพียงชั้นเดียว. การตรวจแบบ RDTs คือ การวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยาในการตรวจหาแอนติเจน ซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) เคลือบบนชุดทดสอบ. การตรวจแบบพีซีอาร์ คือ การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อโดยตรง โดยแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ ดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) และอาร์เอ็นเอโพรบ (RNA probe). ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ได้รับความจากการทำโคลนนิ่งลำดับฐาน จากนั้น นำสารพันธุกรรมที่ได้รับมาตรวจหาเชื้อ. การตรวจหาเชื้อแบบส่องกล้องจุลทรรศน์ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการระบุเชื้อแต่ละชนิดเพื่อให้สามารถทำการรักษาได้ตรงตามเชื้อแต่ละสายพันธุ์. ในปัจจุบัน ระบบของไหลจุลภาคถูกประยุกต์ใช้ในการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ติดเชื้อมาลาเรีย รวมถึงการสลายเซลล์เพื่อตรวจสอบหาโปรตีนหรือ ดีเอ็นเอของเซลล์. วิธีการข้างต้นมีข้อดี คือ ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ ใช้ปริมาณสารและตัวอย่างจำนวนน้อย [3-5].

ของไหลจุลภาค (Microfluidics) คือ เทคโนโลยีที่นำมาประยุกต์ใช้กับระบบการจัดการของไหลในระดับไมโครไปถึงมิลลิเมตร ซึ่งดำเนินการหรือจัดการของไหลในปริมาณน้อย. การใช้ช่องทางไหลขนาดเล็กจึงช่วยลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีในงานทดลอง ราคาถูก มีความละเอียดและความไวสูง และใช้เวลาสั้นในการวิเคราะห์ [6]. ปัจจุบัน ระบบของไหลจุลภาคถูกนำมาประยุกต์ใช้งานมากขึ้นในด้านเคมี, ชีววิทยา, แพทย์ศาสตร์ และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น. ตัวอย่างเช่น ด้านการแพทย์ของไหลจุลภาคถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์การวินิจฉัยเชื้อที่อยู่ในตัวอย่างเลือด, น้ำลาย และเนื้อเยื่อของเซลล์ [7]. งานวิจัยนี้ นำของไหลจุลภาคมาประยุกต์ใช้กับการคัดแยกเซลล์เลือดเพาะปกติ

และเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย โดยใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก (Dielectrophoretic Force, DEP). การทดลองสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียหลังจากผ่านกระบวนการคัดแยกเพื่อสกัดโปรตีนหรือสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *P.falciparum*. การทดลองวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก (dielectrophoretic impedance measurement, DEPIM) เพื่อตรวจจับดีเอ็นเอของมาลาเรียที่จับกับอนุภาคพอลิสไตรีน.

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาเกี่ยวกับการตรวจจับเชื้อมาลาเรียด้วยเทคโนโลยีบนชิพ (On-chip technology) โดยมุ่งเน้นไปที่การสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพื่อสกัดสารพันธุกรรม. หลังจากนั้นตัวอย่างถูกนำไปขยายจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีการพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมาลาเรีย. ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้รับกลับมากจะถูกนำมาใช้กับอนุภาคพอลิสไตรีน สำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียด้วยวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก. จากผลการวิจัยนี้ ผู้วิจัยคาดหวังว่าจะสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของมาลาเรียด้วยวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติกได้.

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 คัดแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมาลาเรีย
- 1.2.2 สลายเซลล์ติดเชื้อมาลาเรียหลังจากผ่านกระบวนการคัดแยกเพื่อสกัดสารพันธุกรรม
- 1.2.3 ทดสอบหาเชื้อมาลาเรียหลังสารที่ปลดปล่อยจากการสลายเซลล์
- 1.2.4 ตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียที่จับกับอนุภาคพอลิสไตรีนด้วยวิธีวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก

1.3 ขอบเขตการดำเนินงาน

- 1.3.1 พิจารณาเฉพาะเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย
- 1.3.2 ทดลองสลายเซลล์เฉพาะเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *P.falciparum*
- 1.3.3 ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อโดยใช้วิธีตรวจจับมาลาเรียแบบการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อมาลาเรียของเซลล์เม็ดเลือดแดงบนชิพโดยไม่ต้องใช้วิธีการส่องกล้องตรวจได้ และสามารถหาดีเอ็นเอของมาลาเรียผ่านการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

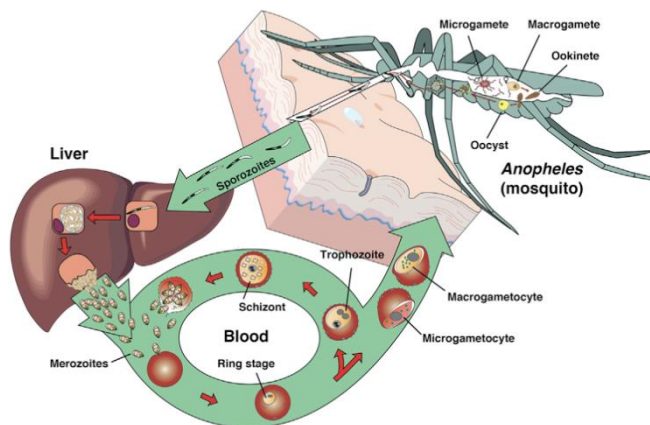
2.1 เซลล์เม็ดเลือดแดง

เซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในร่างกายมนุษย์. ร่างกายผู้หญิงมีเม็ดเลือดแดงประมาณ 4-5 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร และผู้ชายมีเม็ดเลือดแดงประมาณ 5-6 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร [8]. เซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนจากปอดไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆรวมทั้งขนส่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นของเสียกลับไปยังปอดเพื่อแลกเปลี่ยนก๊าซ. เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่มีนิวเคลียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-8 ไมโครเมตร และมีรูปทรงคล้ายจานที่มีความยืดหยุ่นเพื่อให้สามารถปรับตัวเคลื่อนที่ผ่านเส้นเลือดฝอยได้. ขั้นตอนการสร้างเม็ดเลือดแดง เกิดขึ้นที่บริเวณไขกระดูก. เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เพิ่งออกจากไขกระดูก เรียกว่า “เรติคูลโลไซท์ (reticulocyte)” ใช้เวลาเจริญเต็มที่ประมาณ 7 วัน และมีอายุประมาณ 120 วัน. เซลล์เม็ดเลือดแดงที่หมดอายุขัยจะถูกทำลายที่ม้าม [9].

2.2 มาลาเรีย

โรคมาลาเรียเกิดจากเชื้อปรสิตพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ซึ่งสามารถแพร่เข้าสู่คนได้จากยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะ. สปอโรซอยต์ (*Sporozoites*) ที่อยู่ในต่อมน้ำลายของยุงตัวเมียถูกฉีดเข้าไปในตัวให้อาศัย (เช่น คน) ในระหว่างที่ดูดเลือด. *Sporozoites* ย้ายไปยังตับและบุกรุกเฉพาะเซลล์ตับ (*hepatocytes*) เท่านั้น. การแบ่งตัวของปรสิตสร้างรูปแบบ *merozoite* ก่อนปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อไปบุกรุกเม็ดเลือดแดงและเริ่มวงจรในกระแสเลือดแบบไม่อาศัยเพศ. รูปแบบของเซลล์ภายในถูกพัฒนาให้เข้าสู่ระยะ *trophozoite* และ *schizont* เพื่อสร้าง *merozoite*. เซลล์ที่พัฒนาแล้วถูกปล่อยออกมาและสร้างวงจรในกระแสเลือดแบบไม่อาศัยเพศใหม่เพื่อให้เกิดการขยายตัว ดังรูปที่ 2.1 [10]. ปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียมีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisii*, *P. ovale wallikeri* และ *P. knowlesi*. มาลาเรีย 2 สายพันธุ์ที่เป็นภัยคุกคามมากที่สุด คือ *P. falciparum* และ *P. vivax*. เนื่องจาก *P. falciparum* พบมากที่สุดจึงเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและมีอัตราการเกิดใหม่สูง. ความเป็นไปได้ที่อัตราการตายของผู้ป่วยจากสายพันธุ์ *P. vivax* ถูกประเมินค่าต่ำเกินไป [11]. ในปี 2018 (จากรายงานของ WHO) พบสายพันธุ์ *P. falciparum* 99.7% ของผู้ป่วยมาลาเรียในภูมิภาคแอฟริกา, 71% ของผู้ป่วยในภูมิภาคเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก, 65% ของผู้ป่วยในภูมิภาคแปซิฟิกตะวันตก และ 50% ของผู้ป่วยมาลาเรียในภูมิภาคในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. สายพันธุ์ *P. vivax* ถูกพบ 75% ของผู้ป่วยมาลาเรียในภูมิภาคอเมริกา. ในปี 2019 ทั่วโลกพบผู้ป่วยมาลาเรีย 229 ล้านราย และมีอัตราการตาย 409,000 ราย

[12]. แม้ว่าอัตราการเกิดโรคมาลาเรียและอัตราการตายจะลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปี แต่โรคมาลาเรียก็ยังคงมีความสำคัญอยู่เนื่องจากการดื้อยา ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมและกำจัดโรคมาลาเรีย.



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของปรสิตที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรีย [10]

N. Tangpukdee. et al. นำเสนอวิธีการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธีการตรวจหาเชื้อที่แตกต่างกัน [13]. การวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำมีความสำคัญต่อการจัดการโรคมาลาเรียอย่างมีประสิทธิภาพ. การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการมีทั้งหมด 3 วิธี. วิธีที่ 1 คือ การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการใช้ฟิล์มหนาและบางที่ย้อมด้วยสี Giemsa. วิธีการนี้ใช้ต้นทุนต่ำ ต้องมีความสามารถในการระบุสายพันธุ์และประเมินความหนาแน่นของเชื้อได้. ข้อเสีย คือ ต้องใช้เวลานานและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการวินิจฉัย. วิธีที่ 2 คือ การตรวจด้วยเทคนิค quantitative buffy coat (QBC). วิธีการนี้ปรับปรุงการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และทำให้การวินิจฉัยง่ายขึ้นโดยการย้อมสี deoxyribonucleic acid (DNA) ของปรสิตด้วยสีเรืองแสง. ข้อเสียของเทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและไม่สามารถระบุชนิดและจำนวนเซลล์ติดเชื้อได้ [14]. วิธีที่ 3 คือ การตรวจแบบ RDTs สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย. วิธีนี้เหมาะสำหรับการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum*. วิธีที่ 4 คือ การตรวจหาเชื้อมาลาเรียระดับโมเลกุล ได้แก่ การตรวจหาด้วยเทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีที่เฉพาะเจาะจงและละเอียดอ่อน นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อที่ดื้อยา และการติดเชื้อแบบผสม. วิธีการแบบพีซีอาร์ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีความซับซ้อนและค่าใช้จ่ายสูง.

2.3 แรงไดอิเล็กโตรโฟเรติก (Dielectrophoretic Force, F_{DEP})

แรงไดอิเล็กโตรโฟเรติก คือ แรงที่กระทำต่ออนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้าที่ไม่สม่ำเสมอ. ปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดแรงที่กระทำต่ออนุภาค ได้แก่ คุณสมบัติทางไฟฟ้าของตัวกลางและอนุภาค ขนาดรูปทรงของอนุภาค และความถี่ของสนามไฟฟ้า. ไดอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบบวก (Positive Dielectrophoresis, pDEP) ส่งผลให้อนุภาคเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณที่มีสนามไฟฟ้าเข้มสูง. ไดอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบลบ (Negative Dielectrophoresis, nDEP) ส่งผลให้อนุภาคเคลื่อนที่ออกจากบริเวณสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงเข้าหาความเข้มต่ำ [15].

เมื่อพิจารณารัศมี R ของอนุภาคที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสตรง แรง (F_{DEP}) คำนวณได้จากสมการ

$$F_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_l K(\epsilon_c, \epsilon_l) \nabla E^2 \quad (2.1)$$

K คือ ตัวประกอบของคลอเซียส-มอสซอตติ คำนวณได้จาก

$$K(\omega) = \frac{(\epsilon_c - \epsilon_l)}{(\epsilon_c + 2\epsilon_l)} \quad (2.2)$$

ϵ_l คือ สภาพยอมของเหลวตัวกลาง และ ϵ_c คือ สภาพยอมของอนุภาค

เมื่อพิจารณาอนุภาคที่อยู่ภายใต้ไฟฟ้ากระแสสลับ เราสามารถเขียนสภาพยอมเชิงซ้อนได้ดังนี้

$$\tilde{\epsilon} = \epsilon + \frac{\sigma}{j\omega} \quad (2.3)$$

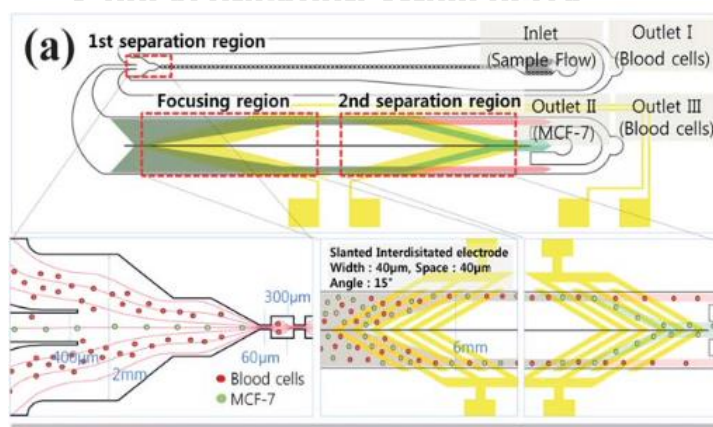
σ คือ สภาพนำไฟฟ้า และ ω คือ ความถี่เชิงมุมของแรงดันกระแสสลับ

เราจะได้สมการหาแรง DEP ที่กระทำต่ออนุภาคที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสสลับที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนี้

$$F_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_l \text{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (2.4)$$

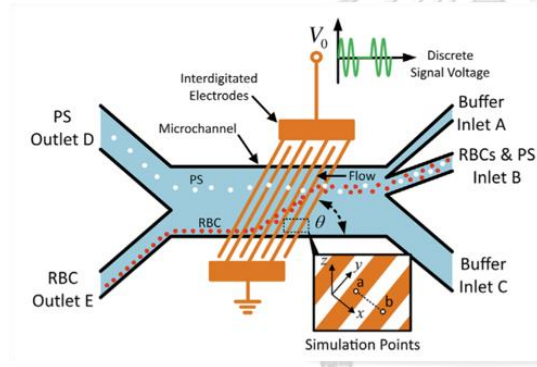
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ DEP ในการคัดแยกเซลล์

H.S. Moon. et al. [16] นำเสนอวิธีการแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์เลือดโดยการใช้ multi-orifice flow fractionation (MOFF) และแรง DEP ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยกอนุภาคด้วยอัตราการไหลที่สูงโดยไม่ต้องทำเครื่องหมาย. การทดลองแบ่งได้ทั้งหมด 3 ส่วน ดังรูปที่ 2.2. ส่วนแรกเป็นส่วนของบริเวณการแยกครั้งแรก ซึ่งใช้ช่องทางไหล 3 ช่องทางในการแยกเซลล์ MCF-7 ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง. เซลล์ MCF-7 เคลื่อนที่ผ่านทางช่องทางไหลตรงกลางเพื่อเข้าสู่ส่วนต่อไป. ส่วนที่ 2 เป็นบริเวณโฟกัส (focusing region) ที่จัดตำแหน่งเซลล์ทั้งสองด้านของช่องทางไหลด้วยแรง pDEP เพื่อให้เซลล์เรียงตัวเข้าสู่ส่วนต่อไป. ส่วนที่ 3 คือ บริเวณการแยกครั้งที่ 2 (2nd separation region) สำหรับแยกเซลล์ MCF-7 ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่หลุดเข้ามาจากการแยกครั้งแรก. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง, เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7. การทดลองใช้เงื่อนไขที่แตกต่างกัน. การแยกแบบ MOFF มีเงื่อนไขในการแยกดังนี้ ค่าเรย์โนลด์ของช่องทางไหล (channel Reynolds number, Re_c) เท่ากับ 30, 50, 70 และ 90. การแยกโดยการใช้แรง DEP มีอิเล็กโตรดทั้งหมด 2 บริเวณ คือ ส่วนที่ใช้ในบริเวณโฟกัส และส่วนที่ใช้ในบริเวณการแยกครั้งที่ 2. เงื่อนไขในการทดลองของบริเวณโฟกัส คือ การจัดเรียงเซลล์มีแรงดันเท่ากับ 10 V, ความถี่เท่ากับ 2 MHz. เงื่อนไขของบริเวณการแยก คือ การแยกเซลล์ MCF-7 ออกจากเซลล์เลือดโดยมีแรงดันเท่ากับ 10 V, ความถี่เท่ากับ 900 kHz. การจัดเรียงเซลล์แบบที่ใช้ MOFF และ DEP ร่วมกัน ทำให้สามารถแยกเซลล์แบบต่อเนื่องในอัตราความเร็วที่สูงได้ และสามารถแยกเซลล์ MCF-7 ออกจากเซลล์เม็ดเลือดได้. เซลล์ตัวอย่างจะถูกจัดเรียงตามขนาดก่อนที่ MOFF และเซลล์ MCF-7 จะถูกแยกออกจากเซลล์เม็ดเลือดโดยการใช้แรง DEP. การทดลองมีประสิทธิภาพในการแยก 99.24% ถึง 94.23%.



รูปที่ 2.2 แผนผังการทดลอง [16]

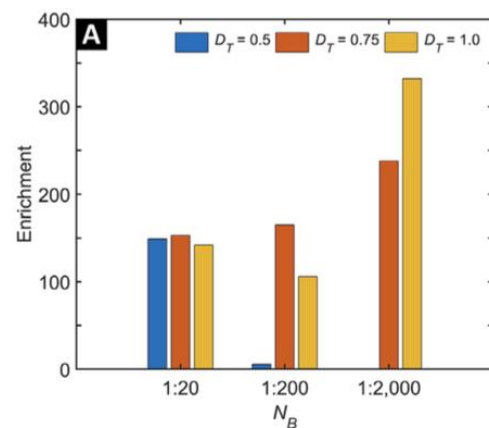
B. Techaumnat. et al. [17] นำเสนอวิธีการคัดแยกระหว่างอนุภาคพอลิสไตรีนและเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยแรง DEP แบบไม่ต่อเนื่อง. งานวิจัยนี้คัดแยกอนุภาคพอลิสไตรีนในเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบต่อเนื่องภายใต้เงื่อนไขที่แตกต่างกันดังนี้ วัฏจักรการทำงาน (D_T), แรงดันไฟฟ้า, อัตราการไหล, ความเข้มข้นของเซลล์ และอัตราส่วนของเซลล์ต่ออนุภาคและมุมของอิเล็กโทรด. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงและอนุภาคพอลิสไตรีนขนาด $10\ \mu\text{m}$. ตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงได้มาจากอาสาสมัคร. การทดลองมีการผสมระหว่างเซลล์และอนุภาคในอัตราส่วนจำนวนอนุภาคต่อเซลล์ ($N_{\text{Par}}/N_{\text{Cell}}$) ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1:20, 1:200 และ 1:2000 ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงอยู่ที่ 4×10^3 , 2×10^5 และ $2 \times 10^6\ \text{cells}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.3 (ข). ช่องทางไหลประกอบด้วยทางเข้า 3 ช่องทาง (A, B และ C) และมีช่องทางออก 2 ช่องทาง ดังรูปที่ 2.3 (ก). ช่องทางไหลมีขนาด ลึก $15\ \mu\text{m}$ กว้าง $700\ \mu\text{m}$ ยาว $27.5\ \text{mm}$ และใช้อิเล็กโทรดกว้าง $50\ \mu\text{m}$ ระยะแคบ $25\ \mu\text{m}$. การทดลองสรุปได้ว่า เงื่อนไขที่ดีที่สุดในการแยกเซลล์เม็ดเลือดและอนุภาคได้ดีคือ $V_0 = 6\ \text{V}$, $\theta = 30^\circ$ และ $D_T = 0.75$.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

(ก)

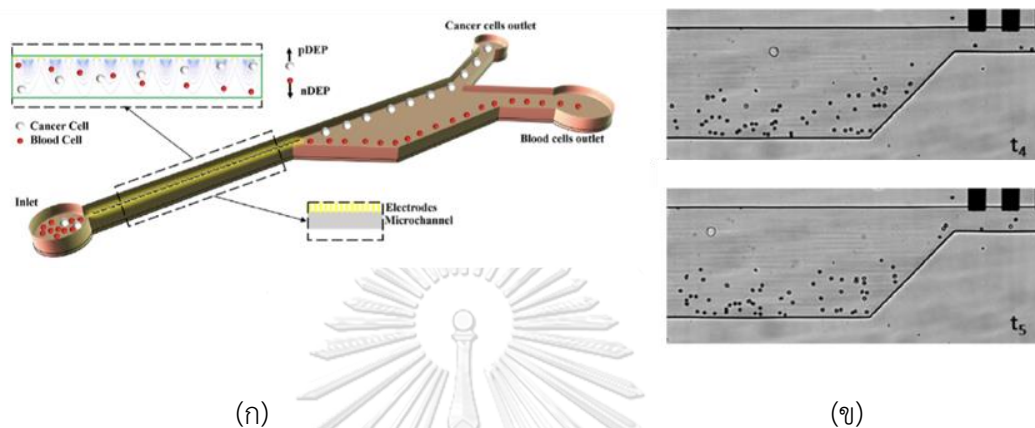


(ข)

รูปที่ 2.3 (ก) แผนภูมิการทดลอง (ข) ผลในการแยกของอนุภาคที่บริเวณช่องทางออก D ที่ $V_0 = 6\ \text{V}$, $\theta = 30^\circ$ [17]

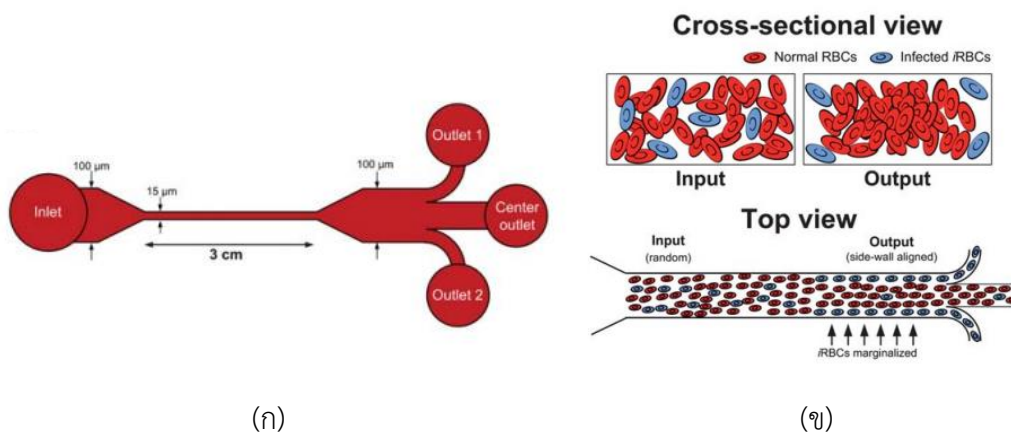
A. Anas et al. [18] นำเสนอวิธีการแยกเซลล์มะเร็งแบบต่อเนื่องโดยใช้แรง DEP. งานวิจัยนี้คัดแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงภายใต้เงื่อนไขที่ความหนาแน่นของเซลล์มะเร็งต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากับ $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$. สารละลายบัฟเฟอร์มีสภาพนำไฟฟ้า $150\ \mu\text{S}/\text{cm}$. แรงดันไฟฟ้าเท่ากับ $15\ \text{V}_{\text{pp}}$, ความถี่ $40\ \text{kHz}$ และอัตราการไหลเท่ากับ $6\ \mu\text{L}/\text{h}$. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231. ช่องทางไหลประกอบด้วยทางเข้า 1 ช่องทางและทางออก 2 ช่องทาง ดังรูปที่ 2.4 (ก). ช่องทางไหลมีความกว้าง $50\ \mu\text{m} \times 35\ \mu\text{m}$.

อิเล็กโตรดมีความกว้าง $39\ \mu\text{m}$ ระยะแคบ $36\ \mu\text{m}$. การแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงทำได้โดยเซลล์มะเร็งได้รับแรง DEP ถูกเบี่ยงเบนให้ติดขอบบนของช่องทางการไหล. ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงจะถูกผลักให้ไหลออกทางด้านล่างช่องทางการไหล ดังรูปที่ 2.4 (ข). การทดลองด้วยวิธีดังกล่าวสามารถแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์เลือดได้.



รูปที่ 2.4 (ก) แผนผังของอุปกรณ์ (ข) เซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดแดงระหว่างกระบวนการแยกในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน [18]

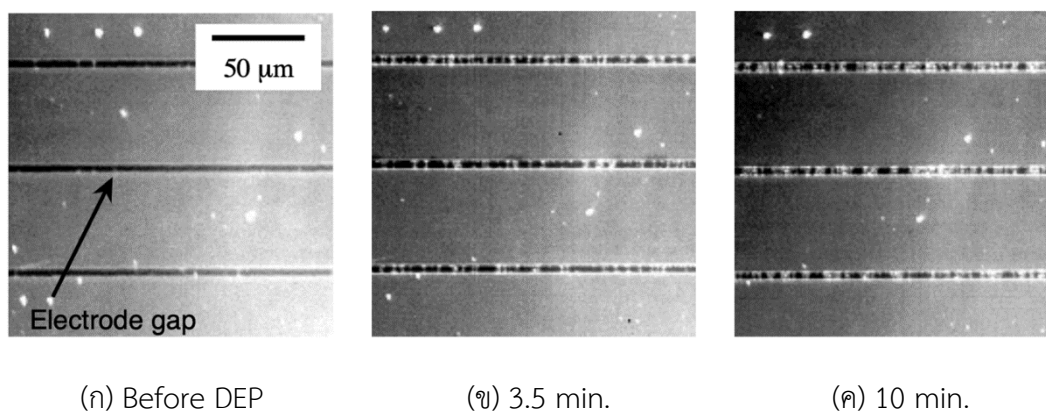
H.W. Hou et al. [19] นำเสนอวิธีการแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมาลาเรียโดยใช้หลักการไดอิเล็กโตรโฟเรซิสในอุปกรณ์ของไหลจุลภาค. งานวิจัยนี้คัดแยกเซลล์ติดเชื้อมาลาเรียภายใต้เงื่อนไขอัตราการไหลเท่ากับ $0.2\ \mu\text{L}/\text{min}$, $1\ \mu\text{L}/\text{min}$, $2.5\ \mu\text{L}/\text{min}$, $5\ \mu\text{L}/\text{min}$ และความหนาแน่นของเซลล์ที่แตกต่างกัน. ตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ คือ อนุภาคพอลิสไตรีนขนาด $3\ \mu\text{m}$, เซลล์เม็ดเลือดแดง และเซลล์เชื้อมาลาเรีย (*P. falciparum* 3D7) ที่ ring stage และ trophozoite/schizont. ช่องทางการไหลประกอบด้วย 1 ช่องทางเข้าและ 3 ช่องทางออก ดังรูปที่ 2.5(ก). เซลล์ติดเชื้อจะไหลออกทางช่องทางออกด้านบนและล่าง ดังรูปที่ 2.5(ข). งานวิจัยนี้ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) และกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $2\ \text{mM}$. การทดลองพบว่า มีประสิทธิภาพในการแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมาลาเรียที่ระยะวงแหวนอยู่ที่ประมาณ 75%. ประสิทธิภาพในการแยกของระยะตัวแก่ของ trophozoite/schizont อยู่ที่ประมาณ 90%.



รูปที่ 2.5 (ก) แผนภาพของช่องทางไหล (ข) แผนภาพแสดงการไหลของเซลล์เลือดปกติและเซลล์ติดเชื้อภายในช่องทางไหล [19]

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก

J. Suehiro et al. [20] นำเสนอวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติก (Dielectrophoretic impedance, DEPIM). งานวิจัยใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกที่เป็นบวกมาจับอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ให้ไปเกาะบนไมโครอิเล็กโตรดในรูปแบบของสายโซ่. ตัวอย่างเซลล์ที่ใช้คือ *E.coli* สายพันธุ์ K-12. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง คือ mannitol 0.1 M ที่สภาพนำไฟฟ้า 0.2 mS/m. งานวิจัยนี้ทดลองภายใต้เงื่อนไขความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 10^7 cm^{-3} และอัตราการไหลเท่ากับ 2.7 ml/min. การสะสมของเชื้อ *E.coli* บนไมโครอิเล็กโตรดนั้นใช้แรง DEP บวก ที่แรงดัน 5 $V_{\text{peak-peak}}$ เป็นเวลา 10 นาที ดังรูปที่ 2.6. สำหรับการวัดอิมพีแดนซ์ใช้แรงดัน 10.7 $V_{\text{peak-peak}}$, 100 kHz. การทดลองพบว่า วิธีการที่เสนอในงานวิจัยสามารถประเมินปริมาณของเซลล์ในตัวอย่างได้ และสามารถตรวจหาเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธีทั่วไป.



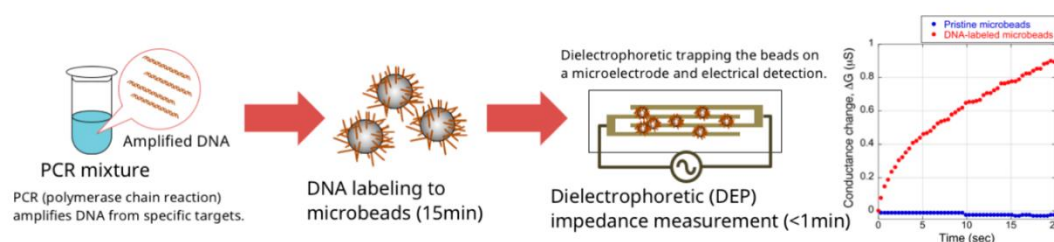
(ก) Before DEP

(ข) 3.5 min.

(ค) 10 min.

รูปที่ 2.6 เซลล์ *E.coli* ที่สะสมบริเวณอิเล็กโตรด [20]

M. Nakano et al. [21] นำเสนอวิธี DEPIM เพื่อตรวจจับดีเอ็นเอที่ถูกขยายจำนวนโดยวิธีการพีซีอาร์อย่างรวดเร็ว. ตัวอย่างการทดลองที่ใช้ คือ อนุภาคพอลิสไตรีน และดีเอ็นเอของ norovirus. งานวิจัยนี้ใช้บัฟเฟอร์ B&W ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 M และ NaCl 1 M. บัฟเฟอร์ 10 μl มีอนุภาคพอลิสไตรีน $6-7 \times 10^5$ อนุภาค. ผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ถูกผสมลงในบัฟเฟอร์ที่มีอนุภาค 10 μl . ตัวอย่างถูกบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อยึดจับกับดีเอ็นเอบนพื้นผิวของอนุภาค. อนุภาคที่ยึดกับดีเอ็นเอถูกนำไปล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง และถูกแขวนลอยอีกครั้งในน้ำปราศจากไอออน 40 μl . ตัวอย่างถูกหยดลงบนไมโครอิเล็กโทรด 40 μl และรอ 1 นาที เพื่อให้อนุภาคตกตะกอน. การทดลองนี้ใช้แรง DEP ในการดึงอนุภาคพอลิสไตรีนที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาไมโครอิเล็กโทรดเพื่อวัดอิมพีแดนซ์ ดังรูปที่ 2.7. แรงดันที่ใช้เท่ากับ $2 V_{pp}$, 100 kHz. การทดลองนี้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอภายใน 20 นาที. การตรวจจับดีเอ็นเอด้วยวิธี DEPIM พบว่า ช่วงปริมาณการตรวจจับลดลงอยู่ที่ $10-10^5$ copies/reaction เมื่อเทียบกับวิธีการพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ $10-10^7$ copies/reaction. การทดลองนี้สามารถตรวจจับไวรัส และดีเอ็นเออื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ร่วมกับพีซีอาร์แบบเดิม.



รูปที่ 2.7 แผนภูมิการทดลองตรวจหาดีเอ็นเอ [21]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M. Nakano et al. [22] นำเสนอวิธีการตรวจหาการดื้อยาต้านจุลชีพ. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือ ยีนของ blaCTX-M-15 ที่สกัดจาก *Escherichia coli* (NCTC 13441) ซึ่งถูกขยายดีเอ็นเอด้วยวิธีการ recombinase polymerase amplification (RPA). งานวิจัยนี้ทดลอง DEPIM ของอนุภาคพอลิสไตรีนที่มีดีเอ็นเอภายใต้เงื่อนไขที่แรงดัน $1 V_{rms}$, 100 kHz. การเตรียมอนุภาคพอลิสไตรีนยึดจับดีเอ็นเอ มี 2 แบบ คือ แบบชั้นตอนเดียวและสองชั้นตอน. การทดลองนี้พบว่า ทั้งสองชั้นตอนมีขีดจำกัดการตรวจเท่ากัน. เวลาที่ใช้ในการตรวจจับน้อยกว่า 30 นาที.

2.6 การกระตุ้นการเบรกตาวนที่เยื่อหุ้มเซลล์

อิเล็กทรอนิกส์ทรานซิสเตอร์ คือ การสร้างช่องเปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้าเพื่อให้สารเคมี, ยา และดีเอ็นเอเข้าสู่หรือออกจากเซลล์. เซลล์ที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าเกิดการอัดประจุขึ้นบริเวณเยื่อหุ้ม-เซลล์จึงส่งผลให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าภายในและภายนอกเซลล์ (V_m). การทำให้เซลล์เกิดช่องว่าง ขึ้นอยู่กับแรงดันที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เบรกตาวน (V_b). ถ้าแรงดัน V_m สูงกว่า V_b จะทำให้เกิดการสลายตัวของเซลล์ที่ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้. การสลายตัวของเซลล์ต้องทำให้ V_m สูงกว่า V_b . เราสามารถคำนวณ V_m ได้จาก [23]

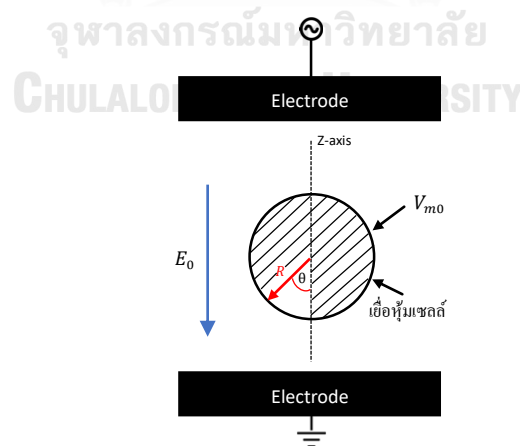
$$V_m = 1.5RE_0 \cos \theta [1 - \exp(-t/\tau_c)] \quad (2.5)$$

เมื่อ θ คือ มุมที่เกิดจากแนวแกน z และรัศมี (R) ของเซลล์ ดังรูปที่ 2.8, E_0 คือ สนามไฟฟ้าและ t คือ เวลาที่ใช้ในการอัดประจุ.

$$\tau_c = RC_m \left(\frac{1}{\zeta_i} + \frac{1}{2\zeta_o} \right) \quad (2.6)$$

C_m คือ ความจุของประจุไฟฟ้าต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ของเยื่อหุ้มเซลล์, ζ_i และ ζ_o คือ สภาพนำไฟฟ้าภายในและภายนอกเซลล์. เราสามารถคำนวณแรงดัน V_m ภายใต้สภาวะคงตัวจาก

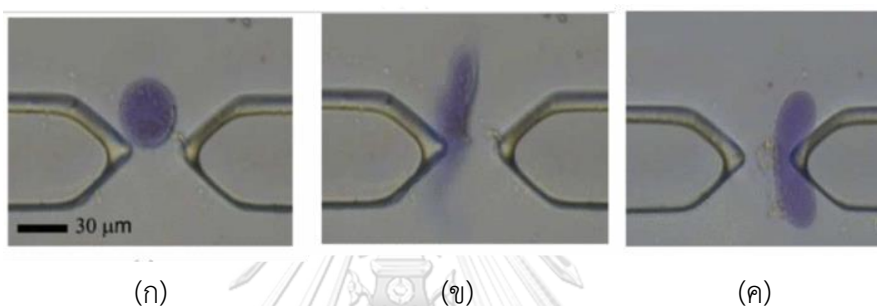
$$V_{m0} = 1.5RE_0 \cos \theta \quad (2.7)$$



รูปที่ 2.8 ลักษณะของมุมระหว่างรัศมีของเซลล์กับแกน z

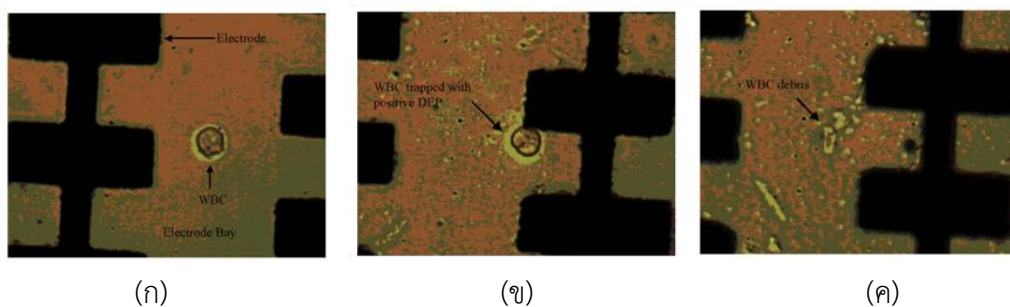
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเบรกดาว์นเซลล์

T. Tonapan et al. [24] นำเสนอการเบรกดาว์นพฤติกรรมและการแยกแวกคิวโลของโพโรโทพลาสต์ด้วยพัลส์ทางไฟฟ้า. งานวิจัยนี้ใช้โพโรโทพลาสต์ดอกอัญชันร่วมกับอุปกรณ์ของไหลจุลภาคเพื่อสลายเยื่อหุ้มเซลล์. พฤติกรรมของโพโรโทพลาสต์ศึกษาภายใต้เงื่อนไขของความถี่และระยะเวลาในการป้อนพัลส์ที่แตกต่างกัน. งานวิจัยนี้ใช้ความถี่ที่ 20 kHz ถึง 1 MHz และระยะเวลาที่ใช้อยู่ที่ 1 ถึง 100 ms. สภาพนำไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วงระหว่าง 55 ± 5 mS/m และ 250 ± 10 mS/m. การทดลองพบว่าการสลายตัว 2 แบบ คือ การสลายตัวที่เกิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวกคิวโล (tonoplast) และการสลายตัวที่เกิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 2.9.



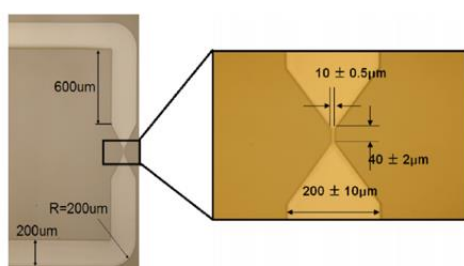
รูปที่ 2.9 ผลของเซลล์ที่เกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์, เยื่อหุ้มแวกคิวโล และเยื่อหุ้มเซลล์เพียงอย่างเดียว : (ก) ก่อนป้อนพัลส์ (ข) ขณะป้อนพัลส์ (ค) หลังการป้อนพัลส์ [24]

R. Qasem et al. [25] นำเสนอวิธีการสลายเซลล์ร่วมกับอุปกรณ์ของไหลจุลภาค. งานวิจัยนี้ได้สลายเซลล์แบบต่อเนื่องโดยการใช้อิเล็กโตรพอเรชันภายใต้เงื่อนไขความถี่และอัตราการไหลที่ต่างกัน. อิเล็กโตรดมีระยะห่างเท่ากับ 20 และ 40 μm . เซลล์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์เพาะของหนู (MN9D). สภาพนำไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 0.5 S/m. การทดลองพบว่าการสลายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ MN9D สูงถึง 80% ที่ความถี่ 3 MHz และอัตราการไหลเท่ากับ 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ดังรูปที่ 2.10.

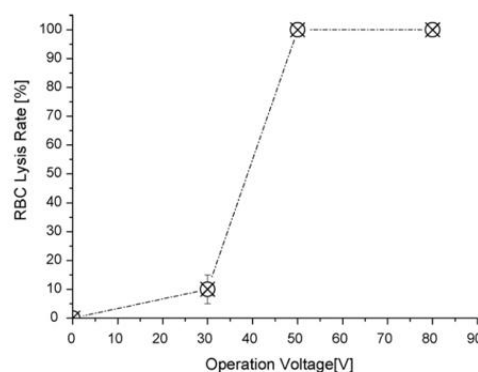


รูปที่ 2.10 ผลของเซลล์ที่เกิดการสลายตัว (ก) ก่อนป้อนสนามไฟฟ้า (ข) เซลล์ที่ติดกับอิเล็กโตรดโดยใช้แรง DEP ก่อนการป้อนสนามไฟฟ้าเพื่อสลายเซลล์ (ค) หลังการสลายตัว [25]

D.W. Lee and Y.H. Cho [26] นำเสนอวิธีการสลายเซลล์ที่แรงดันไฟฟ้าต่ำ. ผู้วิจัยได้ออกแบบให้มีช่องเปิดขนาดเล็กกระหว่างช่องทางไหลจุลภาคเพื่อให้สามารถใช้แรงดันต่ำในการสร้างสนามไฟฟ้าในการสลายเซลล์โดยมีขนาดช่องเปิด $10\ \mu\text{m}$ ดังรูปที่ 2.11(ก). งานวิจัยนี้สลายเซลล์เม็ดเลือดแดงภายใต้เงื่อนไขแรงดันที่ 30, 50 และ 80 V. แรงดันมีผลต่อความเร็วของเซลล์และสนามไฟฟ้าบริเวณช่องเปิด. เซลล์เม็ดเลือดแดงอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่สภาพนำไฟฟ้า $1.6\ \text{S/m}$. มีอัตราการไหล $1\ \mu\text{L}/\text{min}$. การทดลองพบว่า เซลล์มีการสลายตัวที่ 100% ตั้งแต่ 50 V ซึ่งมีสนามไฟฟ้าเท่ากับ $1.2\ \text{kV}/\text{cm}$ ดังรูปที่ 2.11(ข).



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.11 (ก) ลักษณะและขนาดของช่องทางไหลและออริฟิซ (ข) การสลายตัวของเซลล์ [26]

A.J.H. Sale and W.A. Hamilton [27] นำเสนอวิธีการสลายเซลล์โดยใช้สนามไฟฟ้าแรงสูง. งานวิจัยนี้ใช้เซลล์ของแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina ureae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, spheroplasts ของ *Escherichia coli* และ Erythrocyte. การสลายเซลล์ตรวจสอบได้จากการวัดการดูดกลืนแสง โดยการดูดกลืนของแสงลดลงนั้นเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์ที่ถูกสลาย. งานวิจัยนี้ทดลองภายใต้เงื่อนไขพัลส์เท่ากับ $20\ \mu\text{sec}$ ที่ $1\ \text{pulse}/\text{s}$. การทดลองใช้สารละลาย Tris ที่ความเข้มข้น $0.03\ \text{M}$ (pH 8). การทดลองพบว่า สนามไฟฟ้าที่ใช้ในการสลายของเซลล์แปรผกผันกับขนาดของเซลล์. เซลล์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่จะใช้สนามไฟฟ้าน้อยกว่าเซลล์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก

N. Bao et al. [28] นำเสนอวิธีการสลายเซลล์โดยการทำอิเล็กโตรพอเรชันของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เนื้องอกที่ไหลเวียนในเลือด (Circulating tumor cells, CTCs). งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเซลล์ M109 และเซลล์เลือดที่ได้จากหนู ซึ่ง CTCs ได้จากการที่ฉีดเซลล์ M109 เข้าไปในหนู. การทดลองสลายเซลล์ศึกษาภายใต้เงื่อนไขที่อัตราการไหล $0.28\ \text{mL}/\text{min}$, ระยะเวลาอิเล็กโตรพอเรชันและ

ความเข้มข้นสนามไฟฟ้าในช่วงระยะเวลา 100 - 300 ms. อิเล็กโตรพอเรชันที่เซลล์เริ่มสลายตัวอยู่ที่ 300 - 400 V/cm สำหรับ M109, 400 - 500 V/cm สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาว และ 1100 - 1200 V/cm สำหรับเซลล์เม็ดเลือดแดง.

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น การคัดแยกเซลล์โดยใช้หลักการแรงไดอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถแยกเซลล์เป้าหมายออกจากเซลล์ที่ไม่ต้องการได้. การสลายเซลล์ร่วมกับอุปกรณ์ของไหลจุลภาคมีข้อดี คือ สามารถสลายเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถสลายเซลล์ได้มากกว่าหนึ่งเซลล์. การตรวจหาเซลล์หรือดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติกมีข้อดี คือ สามารถตรวจหาเซลล์เป้าหมายได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีทั่วไป. ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของงานวิจัยที่ผ่านมา. งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและสลายเซลล์โดยใช้อุปกรณ์ของไหลจุลภาคภายในชุดเดียวกัน และตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย. ซิฟท์ที่ใช้สำหรับการคัดแยกและสลายเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการคัดแยกเซลล์ดีเอ็นเอมาลาเรียออกจากเซลล์เลือดปกติ และส่วนที่สองเป็นการสลายเซลล์ดีเอ็นเอมาลาเรียหลังผ่านกระบวนการคัดแยก. หลังจากนั้น ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียที่ได้มาจากการสลายเซลล์ถูกนำไปขยายด้วยวิธีการพีซีอาร์. การวัดอิมพีแดนซ์ด้วยวิธีเชิงไดอิเล็กโตรโฟรีติกถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย.

2.8 ตัวประกอบของคลอเซียส-มอสซอตติของเซลล์

งานวิจัยพิจารณาจากเซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมและมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ภายใต้กระแสสลับ. เราสามารถคำนวณค่าสภาพยอมภายในเซลล์ ($\tilde{\epsilon}_c$) ได้จาก [29]

$$\tilde{\epsilon}_c = C_m R \frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1} \quad (2.8)$$

เมื่อ R คือ รัศมีของเซลล์, σ_c คือ สภาพนำไฟฟ้าภายในเซลล์

$$\tau_c = \frac{\epsilon_c}{\sigma_c} \quad (2.9)$$

และ

$$\tau_m = \frac{C_m R}{\sigma_c} \quad (2.10)$$

จากสมการ (2.2) จะได้ตัวประกอบของคลอเซียส-มอสซอตติในรูปของจำนวนเชิงซ้อนเป็น [26]

$$\tilde{K}(\omega) = -\frac{\omega^2(\tau_l\tau_m - \tau_c\tau'_m) + j\omega(\tau'_m - \tau_l - \tau_m) - 1}{\omega^2(\tau_c\tau'_m + 2\tau_l\tau_m) - j\omega(\tau'_m + 2\tau_l + \tau_m) - 2} \quad (2.11)$$

เมื่อ $\tau_l = \frac{\varepsilon_l}{\sigma_l}$ (2.12)

และ $\tau'_m = \frac{C_m R}{\sigma_l}$ (2.13)



บทที่ 3

อุปกรณ์การทดลอง

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

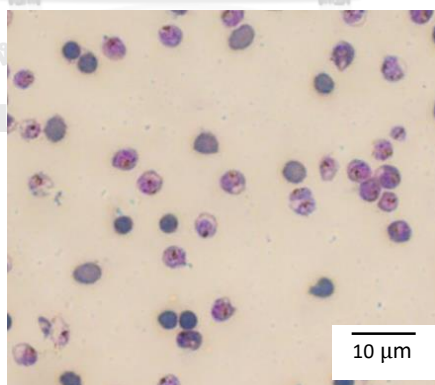
3.1.1 เซลล์เม็ดเลือดแดง

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้รับจากอาสาสมัคร และ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640.

3.1.2 เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย

เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นสายพันธุ์ *P.falciparum* ที่ผ่านการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ซึ่งประกอบด้วย HEPES, NaHCO₃, Gentamicin 40 mg/ml และ 10% (v/v) Heat-Inactivated Human AB Serum. เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30-36 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C. เซลล์จะถูกคัดกรองด้วย Magnetic Column (LS Column, Miltenyi Biotec) เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ติดเชื้อมาลาเรีย. จากนั้น เซลล์จะถูกนำกลับมาไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ดังรูปที่ 3.1 แสดงลักษณะเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ. เซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียจัดเตรียมโดย Cell and Tissue Culture Resources Unit (CTCRU) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล.

สารละลายที่ใช้สำหรับทดลองกับเซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย ประกอบด้วย Sucrose 250 mM, D-glucose 16 mM, BSA 0.5 %. PBS ใช้สำหรับปรับสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย.



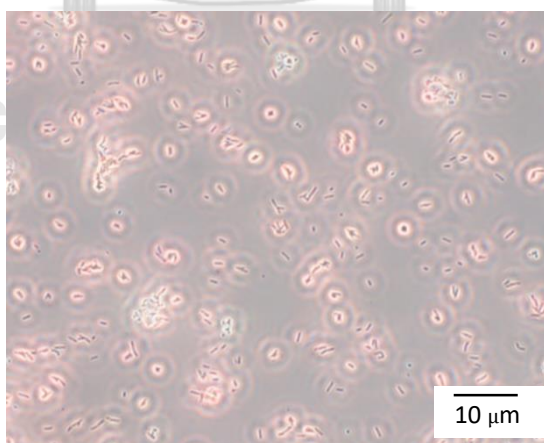
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3 เซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) กลุ่มโคลิฟอร์ม มีลักษณะเป็นแท่ง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน. แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งไม่เป็นอันตรายหากอาศัยอยู่ในลำไส้แต่จะเป็นอันตรายเมื่อเชื้อลุดล้าเข้าสู่ระบบต่างๆของร่างกาย. *E. coli* ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ เช่น โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดหรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ. *E. coli* บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับลำไส้หรือท้องเสีย และอาหารเป็นพิษ [30]. เซลล์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ TISTR Number 074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง M001-500G (HIMEDIA). เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจัดเตรียมโดยสังกัดสาขาวิชาส่งเสริมสุขภาพ คณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการเพาะเชื้อ *E.coli* สำหรับใช้ในการทดลอง

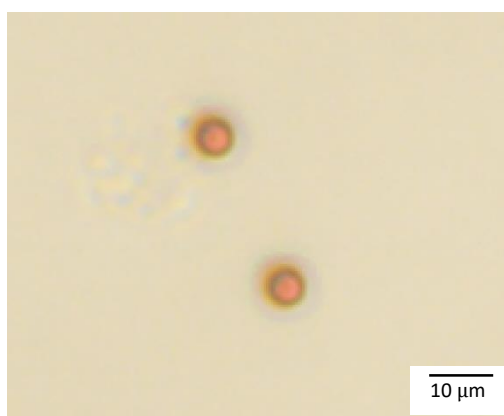
1. ดึงเชื้อ *E. coli* ออกมา 1 โคลน (colony) จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จากนั้นนำเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว M002-500G (HIMEDIA) 5 ml.
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชม. เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว.
3. หลังจากบ่มเชื้อผ่านไป 18 ชม. ดูดเชื้อจากอาหารเหลวมา 1 ml เพื่อนำไปใส่ในอาหารเหลว 100 mL และบ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชม. รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างเซลล์ *E.coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.4 อนุภาคพอลิสไตรีน (Polystyrene)

อนุภาคพอลิสไตรีน (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen) เป็นอนุภาคแบบแม่เหล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง $2.8 \mu\text{m}$. อนุภาคสามารถยึดเกาะกับโมเลกุลที่มีไบโอตินด้วยปฏิกิริยาของ Streptavidin กับไบโอติน. อนุภาคชนิดนี้มีประจุต่ำเหมาะสำหรับผูกมัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ, โปรตีน, เปปไทด์ และแอนติบอดี. พื้นผิวของอนุภาคพอลิสไตรีนสามารถยึดจับกับโมเลกุลไบโอตินได้ 2-3 ตำแหน่งในแต่ละอนุภาค. ผู้วิจัยนำอนุภาคพอลิสไตรีนมาใช้ในการยึดจับกับดีเอ็นเอของมาลาเรียที่เป็นผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ในการทดลองวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติกเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย.



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างอนุภาคพอลิสไตรีนในสารละลาย

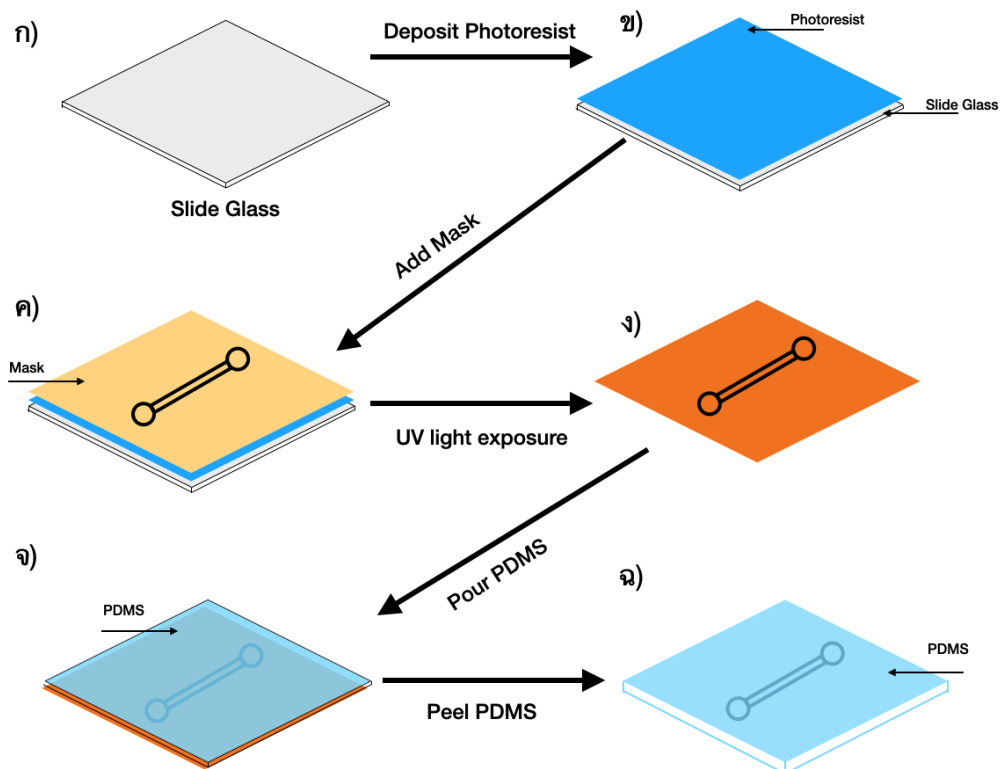
3.2 อุปกรณ์ของไหลจุลภาคและอิเล็กทรอนิกส์

อุปกรณ์สำหรับการคัดแยกและสลายเซลล์ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ อิเล็กทรอนิกส์แบบชั่วคราวและช่องทางไหลจุลภาค. อุปกรณ์สำหรับการทดลอง DEPIM คือ อิเล็กทรอนิกส์แบบ castle-walled.

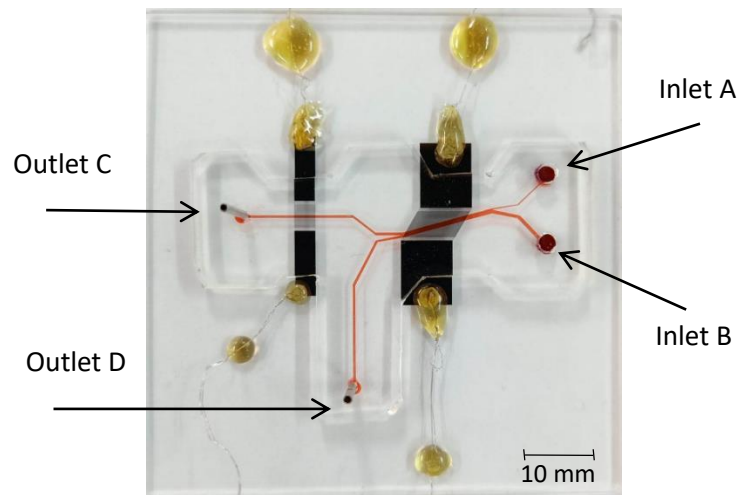
3.2.1. ขั้นตอนการสร้างช่องทางไหล

กระบวนการที่ใช้ในการสร้างช่องทางไหล คือ กระบวนการซอฟต์แวร์ลิโทกราฟี (Soft lithography) ดังรูปที่ 3.4. แม่พิมพ์ของช่องทางไหลใช้ฟิล์มไวแสง RY-3315EE (Hitachi Chemical) หนา $15 \mu\text{m}$. สำหรับขั้นตอนแรก ผู้วิจัยติดฟิล์มไวแสงลงบนกระจกสไลด์ ดังรูปที่ 3.4(ข) จากนั้นนำหน้ากากของช่องทางไหลมาทาบบนกระจกสไลด์ที่มีฟิล์มไวแสง ดังรูปที่ 3.4(ค). กระจกที่ถูกทาบกับหน้ากากจะถูกนำไปฉายด้วยแสงยูวีเป็นเวลา 6 วินาที ดังรูปที่ 3.4(ง) เพื่อให้ฟิล์มไวแสงเกิดการแข็งตัว. กระจกที่ผ่านการฉายแสงยูวีถูกล้างด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ทั้งหมด 3 ครั้ง เป็นเวลา 30 s, 25 s และ 10 s ตามลำดับ และตามด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเป่าให้แห้งก็จะได้แม่พิมพ์ของช่องทางไหลออกมา. ช่องทางไหลใช้ Polydimethylsiloxane (PDMS) เพื่อหล่อขึ้นงาน. ผู้วิจัยนำแม่พิมพ์มาเคลือบด้วยสารกันติด Barrier-Coat No.6 (ShinEtsu) เพื่อลดการติดกันระหว่าง PDMS กับกระจก.

จากนั้นผู้วิจัยเท PDMS (KE-106, ShinEtsu) ลงบนกระจกสไลด์ที่มีแม่พิมพ์ไวแสงและซิลิโคนหนา 3 mm วางทาบอยู่บนกระจก. กระจกสไลด์ที่มี PDMS ถูกนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 95°C เพื่อให้ PDMS เกิดการแข็งตัว ดังรูปที่ 3.4(จ). ขั้นตอนการสร้างช่องทางการไหลจุลภาคโดยละเอียดแสดงในภาคผนวก ก. ช่องทางไหลจะถูกปรับสภาพผิวด้วยเครื่องโครนาดีสชาร์จ (BD-20AC, Electro-Technic, Product) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ PDMS สามารถยึดเกาะติดกับกระจกอิเล็กทรอนิกส์ได้ดี. จากนั้นผู้วิจัยประกอบอิเล็กทรอนิกส์และช่องทางไหลเข้าด้วยกัน. ช่องทางการไหลและอิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ในการทดลองคัดแยกและสลายเซลล์ ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.4 กระบวนการสร้างช่องทางการไหลด้วยวิธีการซอโฟลิตोगราฟี



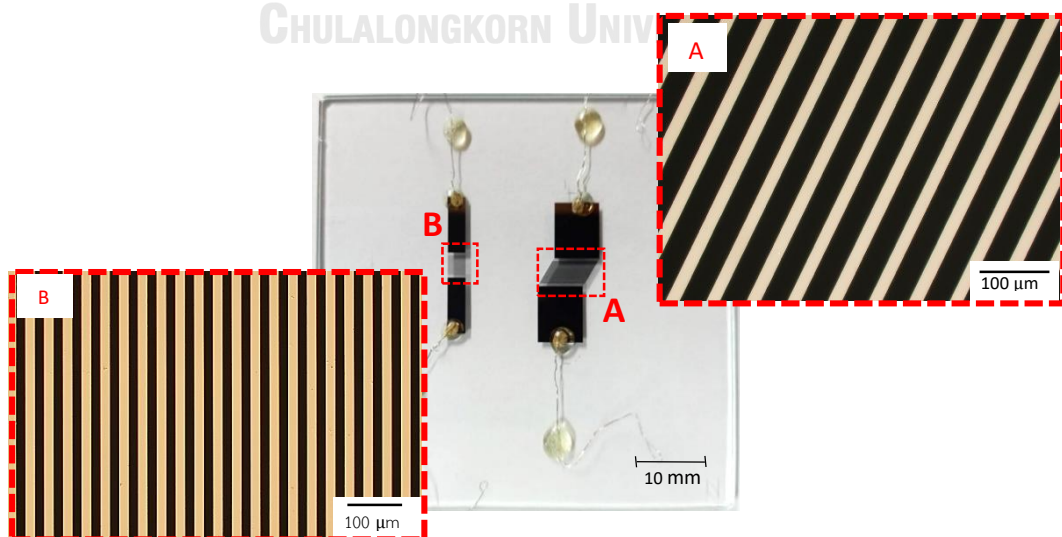
รูปที่ 3.5 ช่องทางการไหลและอิเล็กโทรดสำหรับการทดลองคัดแยกและสลายเซลล์

3.2.2 อิเล็กโทรดที่ใช้ในการทดลอง

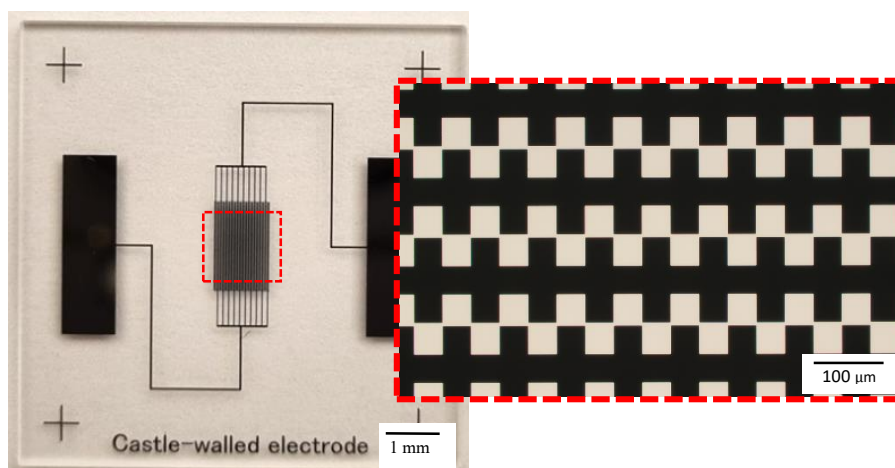
อิเล็กโทรดที่ใช้สำหรับการทดลองมีทั้งหมด 2 ชุด ดังนี้

1) อิเล็กโทรดที่ใช้สำหรับการทดลองคัดแยกเซลล์และสลายเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ใช้คัดแยกเซลล์อิเล็กโทรดทำมุมเอียงกับช่องทางไหล 45° มีทั้งหมด 45 คู่ ระยะแกป $25 \mu\text{m}$ กว้าง $8000 \mu\text{m}$. ส่วนที่ใช้สลายเซลล์มีทั้งหมด 40 คู่ ระยะแกป $20 \mu\text{m}$ กว้าง $3000 \mu\text{m}$. รูปที่ 3.6 แสดงลักษณะของอิเล็กโทรดที่ใช้ในการคัดแยกและสลายเซลล์.

2) อิเล็กโทรดที่ใช้สำหรับการวัด DEPIM เป็นแบบ castle-walled มีระยะแกป $5 \mu\text{m}$. รูปที่ 3.7 แสดงลักษณะอิเล็กโทรดสำหรับการวัดอิมพีแดนซ์



รูปที่ 3.6 ลักษณะอิเล็กโทรดแบบขั้วสลับสำหรับการคัดแยกและสลายเซลล์



รูปที่ 3.7 ลักษณะอิเล็กโทรดสำหรับการวัดอิมพีแดนซ์

3.3 อุปกรณ์สำหรับภายนอกช่องทางไหล

3.3.1 เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า

งานวิจัยนี้ใช้เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า (ATG3022C, Tektronix) เป็นแหล่งจ่ายไฟฟ้า. อุปกรณ์นี้สามารถกำหนดความถี่ตั้งแต่ 1 μHz ถึง 25 MHz และแรงดันตั้งแต่ 10 mV_p ถึง 10 V_p .

3.3.2 เครื่องควบคุมวัฏจักรหน้าที่ (Duty Cycle, D_T)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับควบคุมแรงดันไฟฟ้าที่จ่ายให้กับอิเล็กโทรดในการทดลองคัดแยกเซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรีย. อุปกรณ์นี้สามารถปรับค่า D_T ได้ตั้งแต่ 0.5 ถึง 1. อุปกรณ์นี้ใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์เป็นตัวสร้างสัญญาณควบคุม. สัญญาณที่ได้รับจากไมโครคอนโทรลเลอร์จะถูกส่งไปเปิด-ปิดการทำงานของรีเลย์ ซึ่งรีเลย์ทำหน้าที่ในการควบคุมการจ่ายไฟให้อิเล็กโทรด. D_T เป็นอัตราส่วนระหว่าง T_{ON} กับ $(T_{ON} + T_{OFF})$

3.3.3 ป้อนกระบอกลดเฉื่อย

การป้อนเซลล์และสารละลายเข้าสู่ภายในช่องทางไหลทำได้โดยใช้ป้อนกระบอกลดเฉื่อยแบบกระบอกลดเฉื่อย (Fusion 200, Chemyx Inc.). กระบอกลดเฉื่อยสามารถใช้ได้ตั้งแต่ขนาด 50 μL ถึง 60 mL. อัตราการไหลใช้ได้ตั้งแต่ 0.0001 $\mu\text{L}/\text{min}$ (กระบอกลดเฉื่อยขนาด 0.5 μL syringe) ถึง 85 mL/min (กระบอกลดเฉื่อยขนาด 50 mL syringe).

3.4 Lock-In-Amplifier (LIA-MVD-200-H, FEMTO Messtechnik GmbH, Germany)

Lock-In-Amplifier แบบสองเฟสใช้สำหรับวัดสัญญาณที่มีความเข้มของสัญญาณที่ต่ำ และสามารถคัดกรองสัญญาณรบกวน. อุปกรณ์นี้สามารถวัดได้ตั้งแต่ที่ 50 Hz – 120 kHz. อินพุตสามารถกำหนดเป็นแรงดันหรือกระแสไฟฟ้าได้ และความไวสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงที่กว้าง. การตั้งค่า

ของ time-constant และโหมด 1f/2f (single phase/dual phase) สามารถตั้งค่าผ่านสวิตช์ตามคู่มือได้. ดังรูปที่ 3.8. การทำงานของเครื่องบ่อนความถี่อ้างอิง (Reference input) จากเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า. เครื่องขยายสัญญาณจะตอบสนองกับสัญญาณขาเข้าที่ความถี่เดียวกับสัญญาณอ้างอิง.



รูปที่ 3.8 Lock-In-Amplifier

3.5 กล้องจุลทรรศน์

งานวิจัยนี้ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (IX73, Olympus) ในการทดลองเพื่อสังเกตการเคลื่อนที่, ตำแหน่ง และลักษณะของเซลล์. ผู้วิจัยใช้บันทึกภาพและวิดีโอของเซลล์ขณะทดลอง. กล้องสามารถขยายได้ทั้ง 4x, 10x, 20x, 40x และ 60x.

บทที่ 4

การทดลอง

4.1 การเตรียมสารละลายและตัวอย่าง

4.1.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการคัดแยกและสลายเซลล์

สารละลายที่ใช้กับตัวอย่างเซลล์เลือดประกอบด้วย Sucrose 250 mM, D-glucose 16 mM, และ BSA (Bovine Serum Albumin) 0.5% เพื่อลดการเกาะติดของเซลล์. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายสำหรับการคัดแยกและสลายเซลล์สามารถดูรายละเอียดได้ในภาคผนวก ข.

การเตรียมตัวอย่างเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียและเซลล์เลือดเพาะปกติที่อัตราส่วน iRBC:nRBC เท่ากับ 1:10,000

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเซลล์ มีดังนี้

1. เขย่าตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดให้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการใช้งาน (ไม่ควรให้เกิดฟองอากาศขณะเขย่า)
2. อัตราส่วนระหว่าง iRBC:nRBC เท่ากับ 1:10,000 ผสมตัวอย่างปริมาตร 200 μl ลงในหลอดทดลอง โดยปริมาตรของเซลล์เลือดเพาะปกติเท่ากับ 107.4 μl , สารละลายเท่ากับ 92.3 μl และเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียเท่ากับ 0.3 μl จากนั้นใช้ปิเปตทวนเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้าด้วยกัน. ปริมาตรของตัวอย่างทั้งสองชนิดแปรผันตาม % การติดเชื้อของเซลล์มาลาเรียที่ได้รับมา.
3. ล้างเซลล์ตัวอย่างด้วยสารละลาย 1,000 μl นำไปปั่นเหวี่ยง 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2-3 รอบเพื่อให้ได้สภาพนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.02 S/m.

4.1.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัด DEPIM ของเชื้อ *E.coli*

สารละลายที่ใช้สำหรับการทดลองเชื้อ *E.coli* ประกอบด้วย Mannitol 0.1 M ที่สภาพนำไฟฟ้า 0.2 mS/m. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายสำหรับการทดลองวัด DEPIM ของเชื้อ *E.coli* สามารถดูรายละเอียดได้ในภาคผนวก ข.

การเตรียมตัวอย่างเซลล์ *E.coli* สำหรับการทดลองวัดอิมพีแดนซ์

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเซลล์ มีดังนี้

1. ผสมด้วยอัตราส่วนปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีเชื้อ *E.coli* และสารละลาย เท่ากับ 300 μl (3×10^8 CFU) : 100 μl และ 500 μl (5×10^8 CFU) : 100 μl . ผู้วิจัยใช้อัตราส่วนผสมที่ต่างกันเนื่องจากต้องการเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อ *E.coli*
2. ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย mannitol 1,000 μl โดยปั่นเหวี่ยง 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที. ทำซ้ำ 2-3 รอบ จนกว่าจะสภาพนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.2 mS/m.

ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ *E.coli* สามารถดูรายละเอียดได้ในภาคผนวก จ.

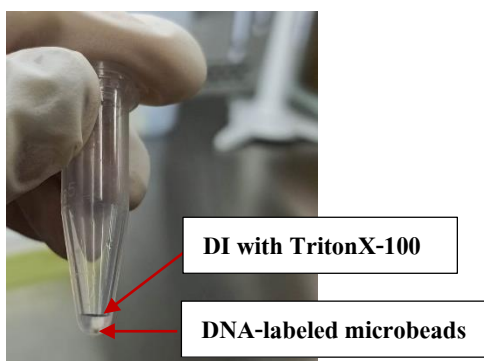
4.1.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัด DEPIM ของดีเอ็นเอมาลาเรีย

สารละลายบัฟเฟอร์ B&W (Binding and Washing) ความเข้มข้น 2X ถูกใช้สำหรับการล้างอนุภาคพอลิสไตรีนก่อนการใช้งาน และใช้สำหรับยึดดีเอ็นเอของมาลาเรียกับอนุภาคพอลิสไตรีน. สารละลาย B&W ประกอบด้วย NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM และ EDTA 1 mM. อนุภาคพอลิสไตรีนที่ยึดจับดีเอ็นเอของปรสิตมาลาเรียจะแขวนลอยในน้ำปราศจากไอออนที่มี TritonX-100 0.001% โดยปริมาตร เพื่อลดการเกาะจับระหว่างอนุภาคพอลิสไตรีน. ผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์จะถูกนำมาใช้ในการทดลอง DEPIM เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับการทดลองหาดีเอ็นเอของมาลาเรียสามารถดูรายละเอียดได้ในภาคผนวก ข.

การเตรียมตัวอย่างอนุภาคพอลิสไตรีนที่ยึดติดกับดีเอ็นเอมาลาเรีย

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง มีดังนี้

1. เตรียมอนุภาคพอลิสไตรีนโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2x B&W 1-2 ครั้ง. เติมนอนุภาคพอลิสไตรีน 2 μl ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 20 μl . ใช้ปิเปตกวนให้เข้ากัน และวางหลอดทดลองที่มีอนุภาคพอลิสไตรีนลงบนแท่นแม่เหล็ก.
2. เปลี่ยนถ่ายสารแขวนลอยอนุภาคด้วยสารละลาย B&W 1000 μl จำนวน 2 ครั้ง. ขณะที่หลอดทดลองยังคงอยู่บนแท่นแม่เหล็ก (ไม่ต้องใช้ปิเปตกวน).
3. เติมผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ 20 μl ลงในสารแขวนลอยอนุภาคพอลิสไตรีนที่เตรียมไว้.
4. บ่มให้ดีเอ็นเอยึดจับกับอนุภาคที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที.
5. ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผสม TritonX-100 0.001% 1000 μl โดยที่ยังอยู่บนแท่นแม่เหล็กจนกว่าจะได้สภาพนำไฟฟ้าของสารแขวนลอยเท่ากับ 0.3 mS/m
6. เจือจางตัวอย่างที่ได้ด้วยสารแขวนลอย 60 μl จะได้ตัวอย่างดังรูปที่ 4.1

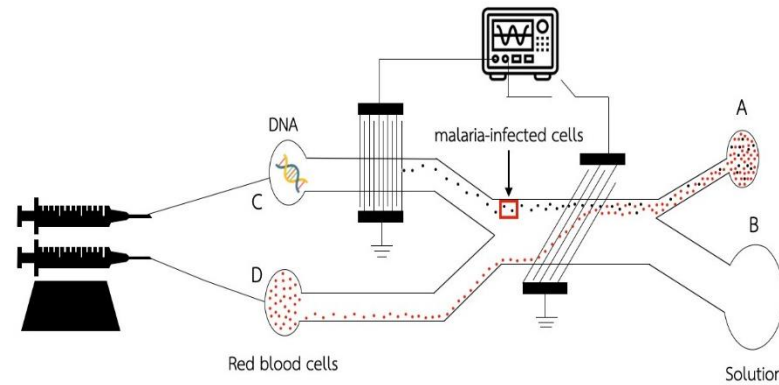


รูปที่ 4.1 สารแขวนลอยอนุภาคพอลิสไตรีนหลังปฏิกิริยาดีเอ็นเอมาลาเรีย

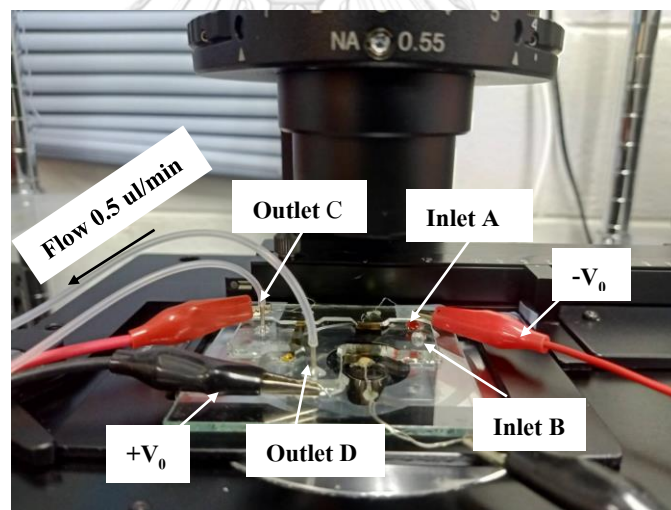
4.2 การทดลองคัดแยกและสลายเซลล์เลือดเพาะปกติกับเซลล์เลือดติดเชื้อมาลาเรีย

การทดลองคัดแยกเซลล์และสลายเซลล์ ใช้เซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียที่ได้จากแลป CTCRU. การทดลองนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียออกจากเซลล์เลือดเพาะปกติ และสลายเซลล์ติดเชื้อที่ผ่านการคัดแยกเพื่อสกัดสารพันธุกรรมและเก็บตัวอย่างเพื่อส่งไปขยายด้วยวิธีการพีซีอาร์. รูปที่ 4.2 แสดงแผนภาพโครงร่างการทดลอง. สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้าเท่ากับ 20 mS/m. ตัวอย่างมีอัตราผสมของจำนวน iRCBR:nRBC เท่ากับ 1:10,000. อัตราการไหลที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. การทดลองคัดแยกเซลล์ใช้ D_T เท่ากับ 0.85 และแรงดันเท่ากับ 9 V_p ที่ความถี่ 750 kHz. สำหรับการทดลองสลายเซลล์ ผู้วิจัยใช้แรงดันและความถี่เท่ากับ 9 V_p และ 40 kHz ตามลำดับ เพื่อสกัดสารพันธุกรรมที่อยู่ภายในเซลล์ติดเชื้อมาลาเรีย. ผู้วิจัยได้ทดลองคัดแยกเซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียโดยใช้แรงไดอิเล็กโตรโพรติก. สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์เลือดป้อนเข้าทางช่องทาง A และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มีเซลล์เลือดจะถูกป้อนเข้าทางช่องทาง B. ปั๊มกระบอกฉีดยา (Syringe Pump) ต่อเข้ากับช่องทางออก C และ D เพื่อให้เซลล์เคลื่อนที่ผ่านอิเล็กโตรดแบบต่อเนื่อง. เซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านอิเล็กโตรดจะถูกรั้งด้วยแรงไดอิเล็กโตรโพรติกบังคับให้เป็นเบนให้เข้าสู่ช่องทางออก D และเซลล์ที่ไม่มีผลกระทบจากแรงไดอิเล็กโตรโพรติกจะไหลเข้าสู่ช่องทาง C. เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียจะไหลเข้าสู่ช่องทางออก C และเซลล์เลือดเพาะปกติถูกเบี่ยงเบนเข้าสู่ช่องทางออก D. เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียที่ผ่านการคัดแยกจะเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้นตอนการสลายเซลล์เพื่อสกัดสารพันธุกรรม. ในขณะที่ทำการทดลอง อุปกรณ์ของไหลจุลภาคจะถูกวางไว้บนฐานของกล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้สำหรับการสังเกตและบันทึกภาพและวิดีโอ ดังรูปที่ 4.2. หลังจากผ่านการคัดแยกและสลายเซลล์เป็นเวลา 40 นาที. ผู้วิจัยใช้สารละลายล้างเซลล์เลือดออกจากช่องทางเข้า A. ผู้วิจัยหยุดป้อนแรงดันหลังจากล้างเซลล์เลือดออกจนหมด จากนั้นคว่ำชิ้นงานเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ตัวอย่างไหลออกจากข้อต่อเข็ม ณ บริเวณช่องทางออก C และปรับอัตราการไหลจาก 0.5 เป็น 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. หลังจากผ่านไป 20 นาที

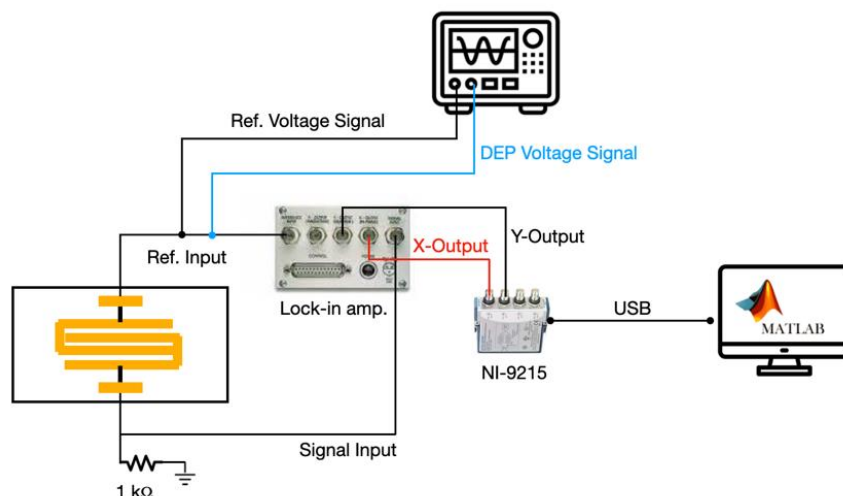
ผู้วิจัยตัดสายยางบริเวณข้อต่อเข็มที่ช่องทางออก C เพื่อเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tube). ผู้วิจัยนำตัวอย่างไปส่งที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำพีซีอาร์.



รูปที่ 4.2 แผนภูมิการทดลองแยกและสลายเซลล์



รูปที่ 4.3 อุปกรณ์ของของไหลจุลภาคในขณะที่ทำการทดลอง



รูปที่ 4.4 แผนภูมิเค้าร่างการทดลองวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติก

4.3 การทดลองวัด DEPIM เพื่อตรวจหา *E.coli* ในตัวอย่าง

แผนภูมิเค้าร่างการทดลองดังรูปที่ 4.4. อัตราผสมของเซลล์ *E.coli* และสารละลายเท่ากับ 3×10^8 CFU :100 และ 5×10^8 CFU:100 μ l. ผู้วิจัยหยดตัวอย่างเซลล์ 50 μ l ลงบนอิเล็กโตรดแบบ Castle-wall ที่มีระยะแกปที่สั้นที่สุดระหว่างอิเล็กโตรด 5 μ m. ผู้วิจัยป้อนแรงดัน 1 V_p, 100 kHz ให้กับอิเล็กโตรดเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อทำให้เกิดแรง DEP กับเซลล์ *E.coli*. *E.coli* จะเคลื่อนที่ไปเกาะบริเวณแกปของอิเล็กโตรด. หลังจากผ่านไป 10 นาที ผู้วิจัยป้อนแรงดันอ้างอิง 50 mV_p, 100 kHz เพื่อทำการวัดอิมพีแดนซ์ lock-in amplifier. กล้องจุลทรรศน์ใช้สำหรับสังเกตการเกาะจับของเซลล์ที่บริเวณอิเล็กโตรด และผู้วิจัยใช้ MATLAB ในการบันทึกข้อมูล.

4.4 การทดลองวัด DEPIM เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย

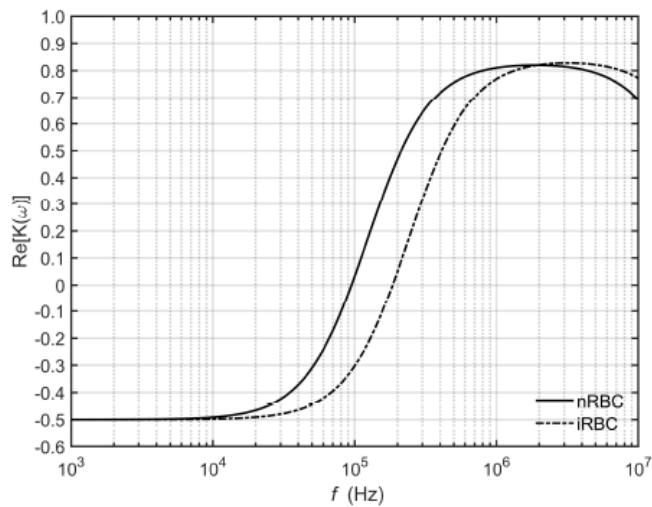
ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้จากหัวข้อ 4.1.3. แผนภูมิเค้าร่างการทดลองวัด DEPIM ในการตรวจจับดีเอ็นเอของมาลาเรีย แสดงดังรูปที่ 4.4. ผู้วิจัยหยดตัวอย่างลงบนอิเล็กโตรด 20 μ l และทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้อนุภาคตกตะกอน. หลังจากนั้น ผู้วิจัยป้อนแรงดัน 1 V_p, 100 kHz เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อให้เกิดแรง DEP กับอนุภาค. อนุภาคที่ยึดจับกับดีเอ็นเอของปรสิตมาลาเรียจะเคลื่อนที่เรียงตัวติดกันเป็นสายโซ่ที่บริเวณอิเล็กโตรด. หลังจากผ่านไป 2 นาที ผู้วิจัยป้อนแรงดันอ้างอิง 30 mV_p, 100 kHz เพื่อทำการวัดอิมพีแดนซ์ด้วย lock-in amplifier. กล้องจุลทรรศน์ใช้สำหรับสังเกตการเกาะจับของอนุภาคที่มีดีเอ็นเอของมาลาเรียที่บริเวณอิเล็กโตรด และผู้วิจัยใช้ MATLAB ในการแสดงผลของข้อมูลที่วัดได้และบันทึกผล.

บทที่ 5

ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

5.1 การศึกษาไดโพลีโทรโพเรซิสในการตัดแยกเซลล์

การศึกษาแรงไดโพลีโทรโพเรซิส มีจุดประสงค์เพื่อตัดแยกเซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรียออกจากเซลล์เลือดเพาะปกติ. สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้า 20 mS/m. อิเล็กโตรดมีระยะแคบ 25 μm . ผู้วิจัยได้ทดลองป้อนสัญญาณไฟฟ้าที่ความถี่ 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2.5 และ 4 MHz. สำหรับแรงดันผู้วิจัยปรับตั้งแต่ 7.5 ถึง 10 V_p (ตั้งค่า Load Impedance เป็น High Z) โดยเพิ่มครั้งละ 0.5 V_p เพื่อหาแรงดันที่ส่งผลให้เซลล์เลือดเพาะปกติเกิดการเบี่ยงเบน. ช่องทางไหลประกอบด้วย 2 ช่องทางเข้า และ 2 ช่องทางออก. รูปที่ 5.2 แสดงการตัดแยกเซลล์ที่ความถี่ 1, 1.5, 2.5 และ 4 MHz. ภาพแสดงผลของแรงดัน 9 V_p , 750 kHz และของแรงดัน 8 V_p ความถี่ 0.5, 0.75 และ 1 MHz แสดงดังรูปที่ 5.3 และ 5.4 ตามลำดับ. ความถี่ตั้งแต่ 0.5–1 MHz ส่งผลให้เซลล์เกิดการเบี่ยงเบนได้. เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 5.2(ก) และ 5.4(ค) ที่ความถี่เดียวกันแต่แรงดันต่างกัน. แรงดันที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเบี่ยงเบนของเซลล์เพิ่มขึ้น. ผลการศึกษาพบว่า แรงดันและความถี่ที่เหมาะสมต่อการตัดแยกเซลล์เลือดเพาะปกติออกจากเซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรียเท่ากับ 9 V_p , 750 kHz. เซลล์เลือดเพาะปกติไหลออกจากช่องทางออก D และเซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรียไหลออกจากช่องทาง C ดังรูปที่ 5.3(ค). พฤติกรรมการเบี่ยงเบนของเซลล์สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์. หลักการในการเลือกความถี่ คือ เซลล์เลือดเพาะปกติต้องตอบสนองต่อแรงไดโพลีโทรโพเรซิส และทำให้เซลล์เลือดเพาะปกติเกิดการเบี่ยงเบนตามแนวอิเล็กโตรด (เบี่ยงเบนเข้าหาบริเวณที่มีสนามไฟฟ้าสูง). ในขณะเดียวกัน เซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรียจะต้องไม่ตอบสนองหรือตอบสนองน้อยที่สุดต่อแรงไดโพลีโทรโพเรซิส. หากผู้วิจัยใช้ความถี่ในช่วง 1–4 MHz ส่งผลให้เซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรียตอบสนองต่อแรงไดโพลีโทรโพเรซิสเพิ่มมากขึ้น แสดงดังรูปที่ 5.1. ดังนั้น ความถี่ที่เหมาะสมสำหรับการตัดแยกเท่ากับ 750 kHz เนื่องจากค่าของ $RE[K(\omega)]$ เซลล์เลือดเพาะเชื่อมมาลาเรียน้อยกว่าเซลล์เลือดเพาะปกติ.



Parameters	nRBC	iRBC
R (μm)	4.04	4.005
ϵ_l (F/m)	$78 \epsilon_0$	
σ_l (S/m)	0.02	
ϵ_c (F/m)	$60 \epsilon_0$	
σ_c (S/m)	0.26	0.38
C_m (mF/m ²)	11.9	6.0

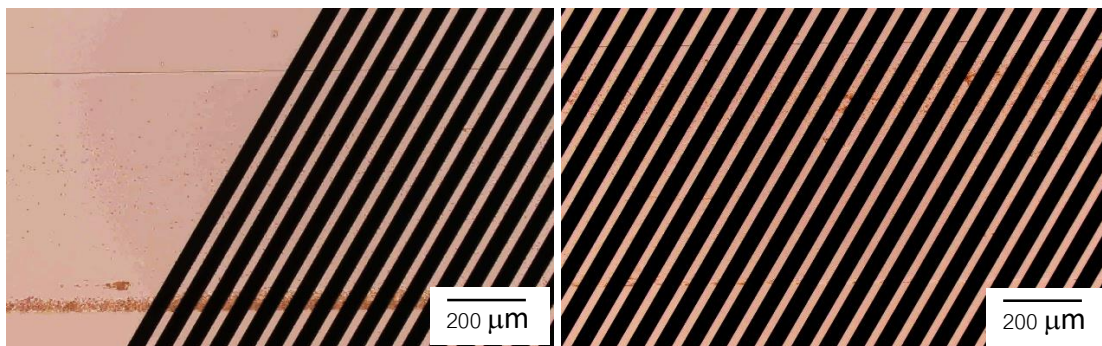
(ก)

(ข)

รูปที่ 5.1 ผลการคำนวณ (ก) $\text{Re}[K(\omega)]$ ของเซลล์เลือดเพาะปกติและเซลล์เลือดเพาะเชื้อ มาลาเรีย (ข) สภาพนำไฟฟ้า σ_c และความเก็บประจุไฟฟ้าจำเพาะ C_m [31]

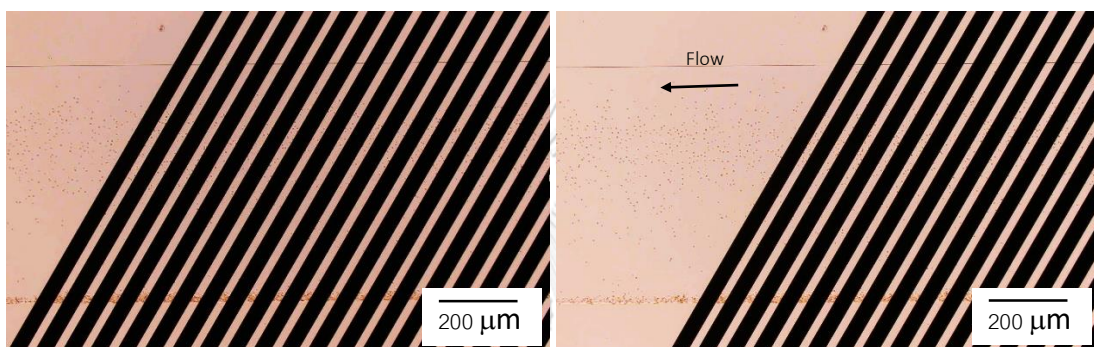
5.2 ผลการสลายเซลล์เลือดด้วยการกระตุ้นอิเล็กโทรพอเรชัน

การศึกษากการสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย มีจุดประสงค์เพื่อสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ และศึกษาผลของแรงดันที่ส่งผลต่อการสลายของเซลล์ด้วยการกระตุ้นอิเล็กโทรพอเรชัน. การทดลองสลายเซลล์เป็นขั้นตอนต่อจากส่วนการคัดแยกเซลล์ โดยเซลล์ที่ผ่านการคัดแยกจะไหลออกทางช่องทาง C ดังรูปที่ 5.3 (ค) เพื่อเข้าสู่บริเวณของอิเล็กโทรดสำหรับการสลายเซลล์ ดังรูปที่ 5.6 (ก). อิเล็กโทรดมีระยะแกป $20 \mu\text{m}$. การสลายของเซลล์สังเกตจากบริเวณช่องทางออก หากปรากฏเซลล์ไหลออกจากบริเวณช่องทางออกแสดงว่าเซลล์ไม่เกิดการสลายตัว. การทำอิเล็กโทรพอเรชันผู้วิจัยป้อนสัญญาณรูปคลื่นสี่เหลี่ยมที่มีความถี่ 40 kHz . ผู้วิจัยปรับแรงดันตั้งแต่ 8 ถึง 10 V_p โดยเพิ่มครั้งละ 0.5 V_p เพื่อหาแรงดันที่ส่งผลต่อการสลายของเซลล์.



(ก) 1 MHz

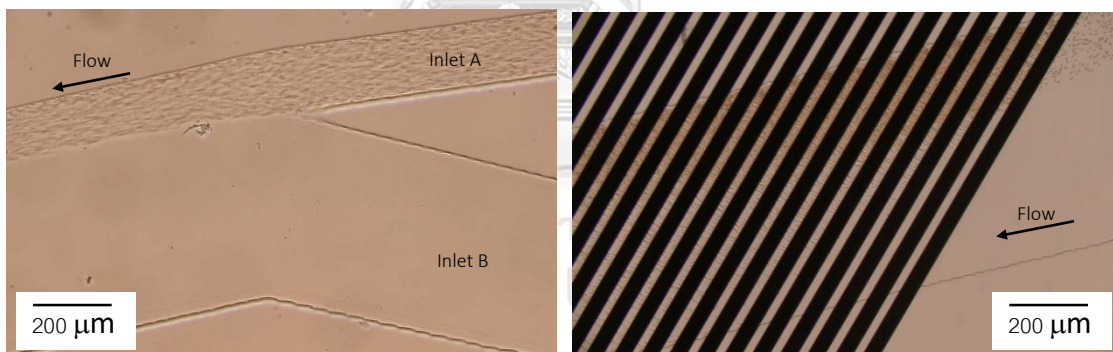
(ข) 1.5 MHz



(ค) 2.5 MHz

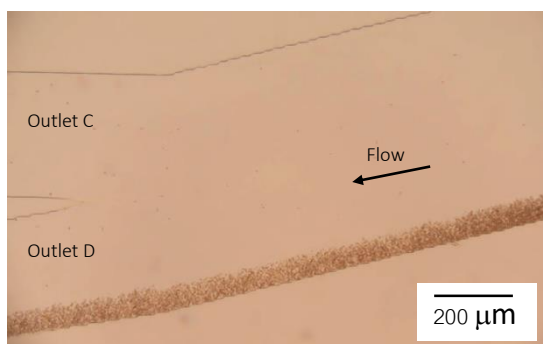
(ง) 4 MHz

รูปที่ 5.2 ตำแหน่งของเซลล์ภายใต้แรงดัน 10 V_p



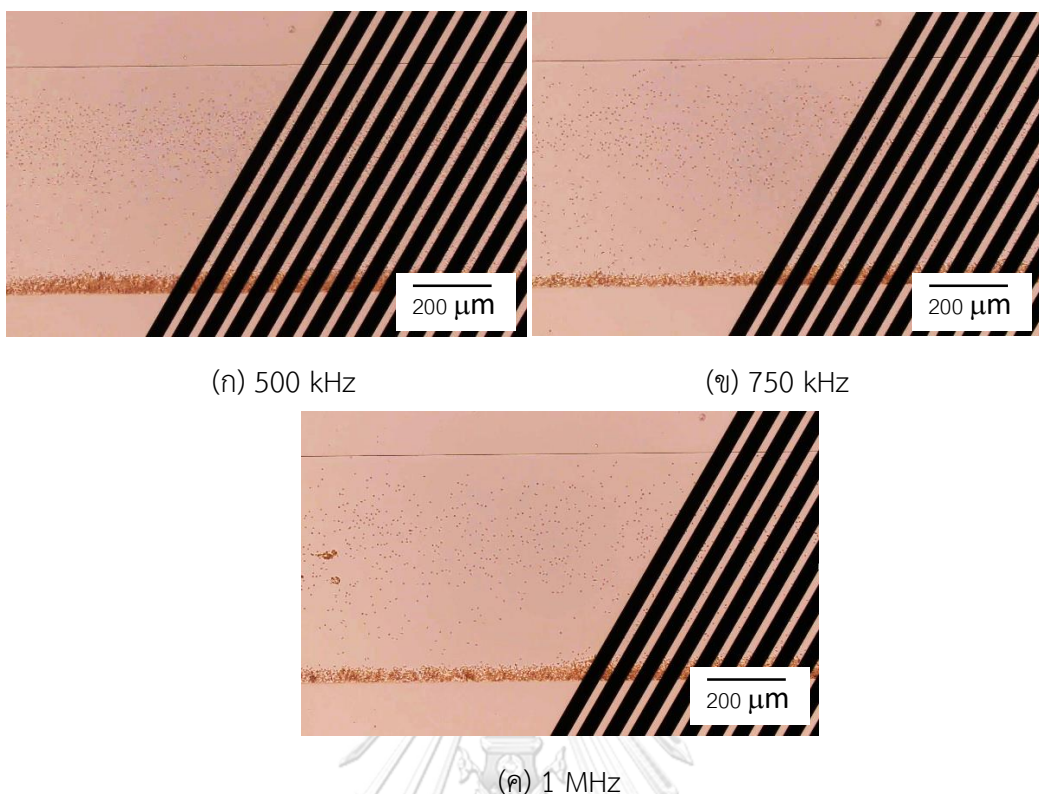
(ก) บริเวณช่องทางเข้า

(ข) บริเวณอิเล็กทรอนิกส์



(ค) บริเวณช่องทางออก

รูปที่ 5.3 ตำแหน่งของเซลล์ในช่องทางไหลภายใต้แรงดัน 9 V_p, 750 kHz



(ก) 500 kHz

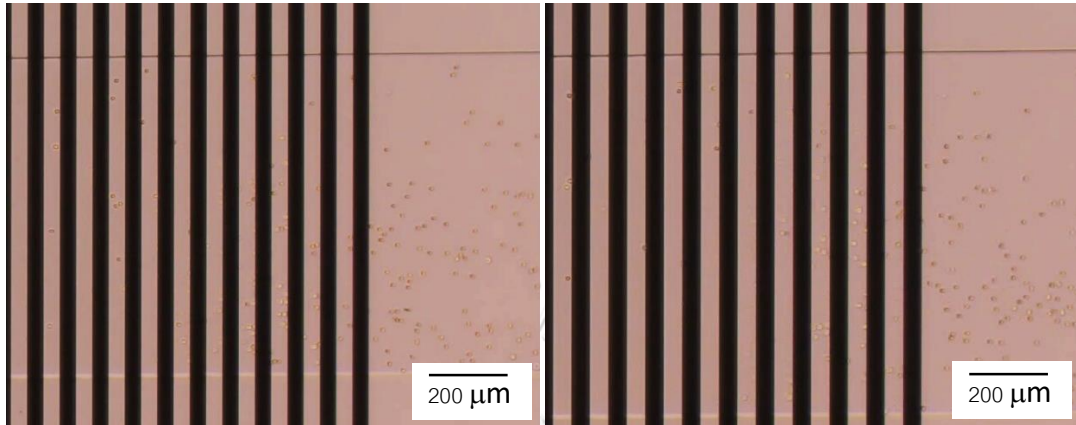
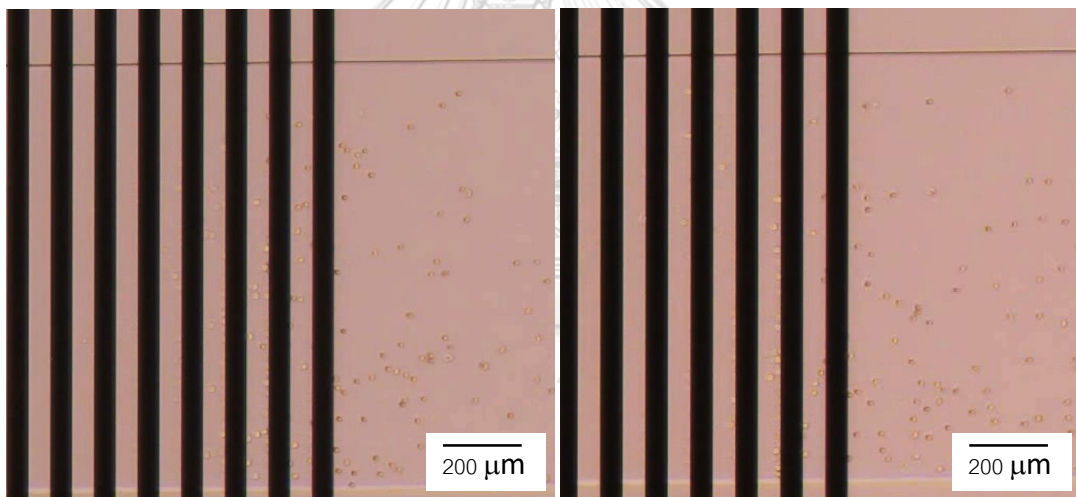
(ข) 750 kHz

(ค) 1 MHz

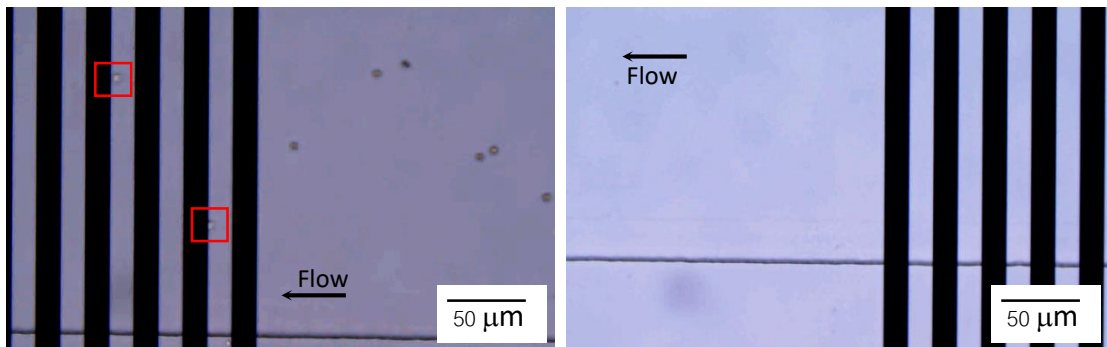
รูปที่ 5.4 ตำแหน่งของเซลล์ภายใต้แรงดัน 8 V_p

รูปที่ 5.5 ภาพแสดงผลการสลายเซลล์เลือดเพาะปกติจากการกระตุ้นอิเล็กโตรพอเรชันที่แรงดัน 8, 8.5, 9 และ 9.5 V_p ความถี่ 40 kHz. หากป้อนแรงดันสูง (10 V) เป็นระยะเวลานาน อิเล็กโตรดจะเกิดการสึกกร่อน. เมื่อเซลล์ไหลเข้าสู่อิเล็กโตรดเยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการเบรกดาวนเนื่องจากแรงดันไฟฟ้า. เซลล์เลือดเพาะปกติถูกสลายตัวที่แรงดัน 8 V_p ขึ้นไป. เซลล์ติดเชื้อมาลาเรียต้องการแรงดันที่สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ. ดังนั้น แรงดันที่เหมาะสมสำหรับการสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียอยู่ที่ 9 V_p, 40 kHz โดยไม่พบเซลล์ ณ บริเวณช่องทางออก ดังรูปที่ 5.6. ตัวอย่างที่ผ่านการสลายเซลล์เป็นเวลา 40 นาที จะไหลเข้าสู่ช่องทางออก C. ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างออกจากช่องทางออก C โดยการเก็บตัวอย่างประมาณ 150-200 μl ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์. ตัวอย่างถูกเก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำไปส่งขยายปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อด้วยวิธีการพีซีอาร์ที่ Molecular Biology of Malaria and Opportunistic Parasites Research Unit, สาขาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สารพันธุกรรมที่ขยายได้จะเป็นของเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่มีดีเอ็นเออยู่ภายในเซลล์. งานวิจัยนี้ใช้พีซีอาร์ชนิด nested PCR ในการขยายจำนวนดีเอ็นเอซึ่งรอบแรกจำนวน 40 cycles และรอบที่สองจำนวน 35 cycles. ไพรเมอร์รอบที่สองจะมีไบโอติน (Biotin) ประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์. ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ดังรูปที่ 5.7(ก). แถบที่ 2-9 คือ เป็นการดำเนินขั้นตอนทดสอบซ้ำในตัวอย่าง

เดียวกัน. แล็บสุดท้าย คือ negative control. หากแถบสีขาวขุ่นปรากฏ ดังรูป 5.7(ก) แสดงว่ามีดีเอ็นเอของมาลาเรียอยู่ในตัวอย่าง. รูปที่ 5.7(ข) แสดงแถบเพื่อเทียบขนาดของดีเอ็นเอ. ผลลัพธ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์จะถูกนำมาใช้ต่อไปในการทดลองวัด DEPIM เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย.

(ก) 8 V_p(ข) 8.5 V_p(ค) 9 V_p(ง) 9.5 V_p

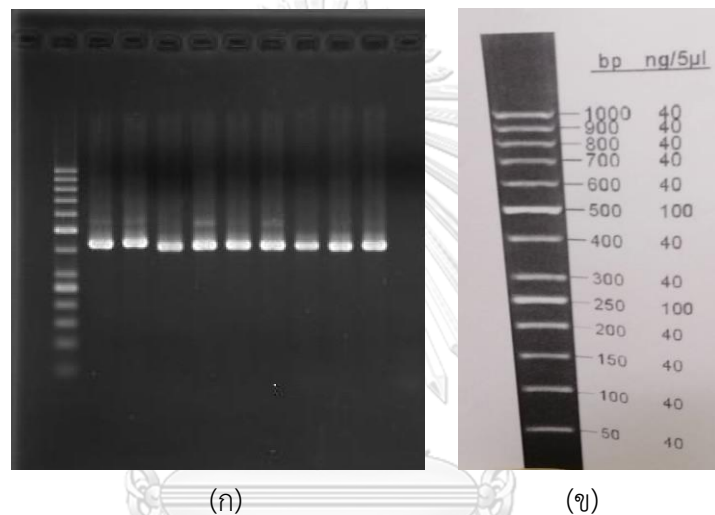
รูปที่ 5.5 การสลายของเซลล์เลือดเพาะปกติภายใต้แรงดันที่ต่างกัน



(ก) บริเวณช่องทางเข้า

(ข) บริเวณช่องทางออก

รูปที่ 5.6 เซลล์เลือดเพาะปกติและเลือดเพาะเชื้อมาลาเรียภายใต้แรงดัน $9 V_p$, 40 kHz



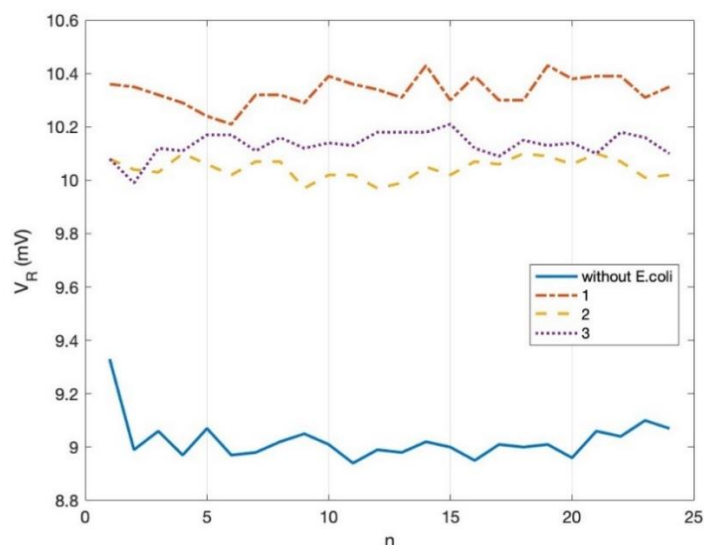
(ก)

(ข)

รูปที่ 5.7 ลักษณะแถบดีเอ็นเอ (ก) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ข) แถบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

5.3 ผลการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติกของเซลล์ *E. coli*

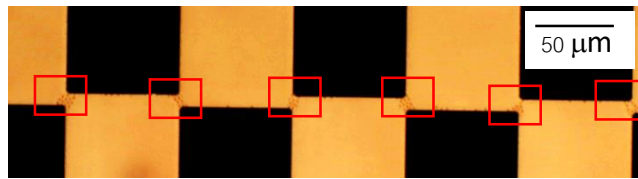
การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *E. coli* โดยใช้แรงไดอิเล็กโตรโพรสิสยึดจับเซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าอิมพีแดนซ์ระหว่างอิเล็กโตรด. สารละลายมีสภาพนำไฟฟ้า 0.2 mS/m. อัตราส่วนผสมระหว่าง Mannitol : *E. coli* เท่ากับ 3×10^8 CFU : 100 μ l และ 5×10^8 CFU : 100 μ l. ผู้วิจัยป้อนแรงดันไฟฟ้าที่ $1 V_p$, 100 kHz เพื่อทำให้เกิดแรง DEP ในการดึงดูดเซลล์เข้าหาอิเล็กโตรด. สำหรับการวัดอิมพีแดนซ์ใช้แรงดันที่ $50 mV_p$, 100 kHz (เนื่องจากที่แรงดัน $1 V_p$ ทำให้แรงดันขาออกเกิน 10 V ที่เครื่องวัดได้). รูปที่ 5.8 แสดงผลการทดลองในกรณีที่ไม่มีเซลล์และมีเซลล์. กราฟสีน้ำเงินแสดงแรงดันในกรณีไม่มีเซลล์ และกราฟจุดแสดงแรงดันของกรณีมีเซลล์. ผลการทดลองของทั้ง 2 กรณีต่างกันที่ค่าของ V_R .



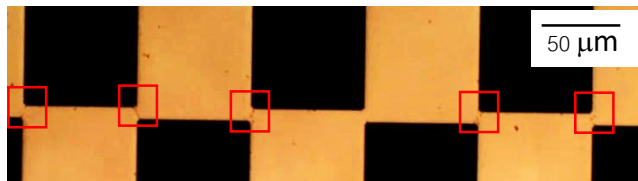
รูปที่ 5.8 ผลการทดลองวัดแรงดันตกคร่อมความต้านทาน 1 k Ω

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองกับตัวอย่างความเข้มข้นของ *E.coli* จำนวน 1 ชุด โดยทดลอง 3 ครั้ง เพื่อวัดในตัวอย่างเดียวกัน. จากรูปที่ 5.8 แสดงแรงดันตกคร่อมที่ความต้านทาน 1 k Ω โดยมีแกนนอนเป็นจุดของการวัดค่า. อัตราขยายของแรงดันที่วัดได้เท่ากับ 200 เท่า. ในกรณีที่ไม่มีเซลล์ที่เชื่อมระหว่างอิเล็กโทรดแรงดันที่ได้มีค่าประมาณ 0.0451 ± 0.0004 mV. การทดลองทั้ง 3 ครั้งได้แรงดัน 0.0517 ± 0.0003 mV, 0.0502 ± 0.0002 mV และ 0.0507 ± 0.0002 mV ตามลำดับ. การเพิ่มขึ้นของแรงดันในแต่ละการทดลองเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารละลายและเกิดจากเซลล์บางส่วนที่ยังคงยึดจับที่บริเวณอิเล็กโทรด. กรอบสีแดงในรูปที่ 5.9 แสดงจำนวนเซลล์ที่เกาะบริเวณอิเล็กโทรดของการทดลองแต่ละครั้ง. เมื่อเซลล์ตกอยู่ภายใต้แรง DEP เซลล์จะเกิดการเรียงตัวกันตรงบริเวณระยะแกบของอิเล็กโทรด ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางอิมพีแดนซ์. รูปที่ 5.9 แสดงลักษณะเซลล์ที่ดึงดูดเข้าหาอิเล็กโทรดภายใต้แรง DEP. จำนวนความเข้มข้นที่ 3×10^8 และ 5×10^8 CFU สามารถพบเชื้อ *E.coli* ในตัวอย่าง โดยใช้อุปกรณ์และพารามิเตอร์ที่กำหนดได้.

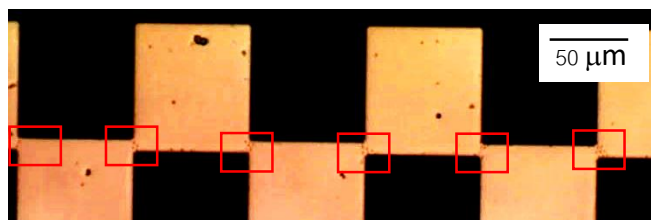
ข้อสังเกตหลังจากการทดลอง คือ ผู้วิจัยพบว่าเมื่อหยุดป้อนแรง DEP เซลล์จะหลุดออกจากอิเล็กโทรด แสดงในกรอบสีแดงดังรูปที่ 5.10 (ข) และ (ค). เวลาที่เซลล์หลุดออกจากอิเล็กโทรดโดยสมบูรณ์ประมาณ 10 วินาที และในการทดลองนี้มีการป้องกันผลในส่วนนี้โดยการวัดเปรียบเทียบกับสารละลายที่ไม่มีเซลล์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของอิมพีแดนซ์.



(ก) สำหรับการทดลองครั้งที่ 1

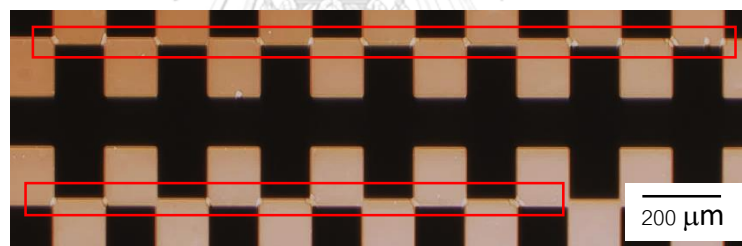


(ข) สำหรับการทดลองครั้งที่ 2



(ค) สำหรับการทดลองครั้งที่ 3

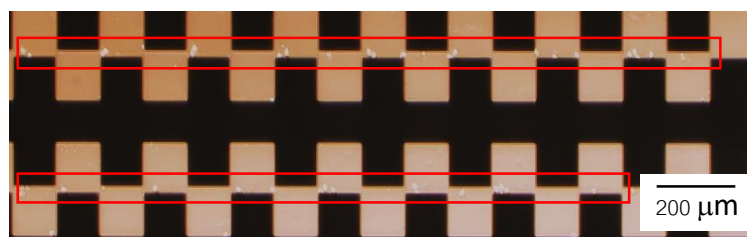
รูปที่ 5.9 เซลล์ที่เชื่อมระหว่างอิเล็กโทรด ขณะป้อนแรง DEP



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ก)



(ข)

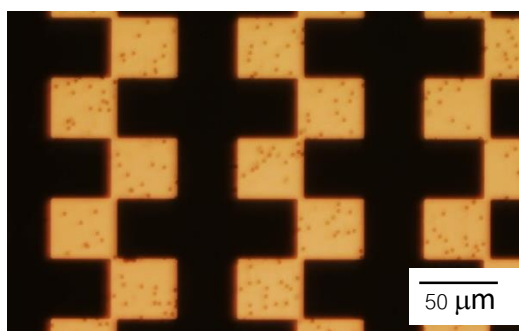


(ค)

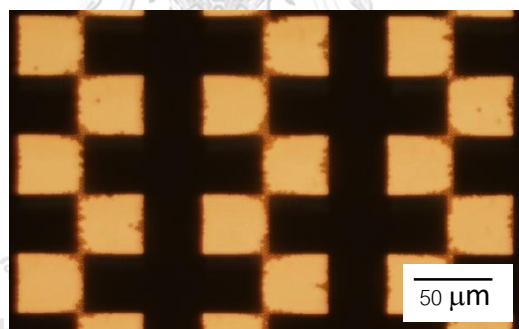
รูปที่ 5.10 ลักษณะเซลล์ (ก) ก่อนหยุดป้อนแรง DEP (ข) และ (ค) หลังหยุดป้อนแรง DEP

5.4 ผลการศึกษาการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติกของอนุภาคพอลิสไตรีนที่จับกับดีเอ็นเอของมาลาเรีย

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียที่ยึดจับกับอนุภาคพอลิสไตรีนโดยใช้แรง DEP ในการดักจับอนุภาคเพื่อทำให้อนุภาคถูกดูดเข้าหาอิเล็กโตรด. ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้รับมาถูกเก็บรักษาไว้ในช่องแช่แข็ง. การยึดจับดีเอ็นเอเข้ากับอนุภาคใช้กระบวนการที่อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 4.1.3. อนุภาคที่ใช้ปริมาณ 24,000 อนุภาค/ μL . ผู้วิจัยป้อนแรงดันไฟฟ้าที่ $1 V_p$, 100 kHz เพื่อทำให้เกิดแรง DEP. แรงดันที่ใช้ในการวัดอิมพีแดนซ์เท่ากับ $30 mV_p$ เพื่อให้แรงดันขาออกไม่เกิน $10 V_p$ ที่เครื่องวัดได้.

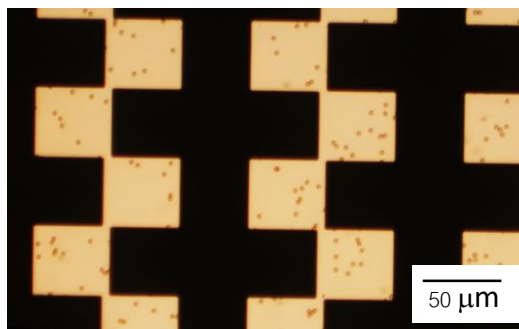


(ก) ป้อนแรงดันอ้างอิง

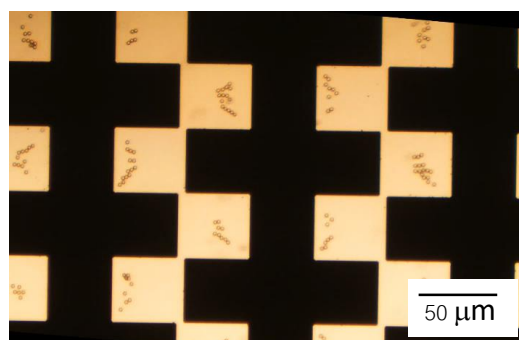


(ข) ภายใต้อิทธิพล DEP

รูปที่ 5.11 ไดอิเล็กโตรโพรติกของอนุภาคสเตรปตาวิดินที่บ่มกับผลผลิตจากพีซีอาร์บริเวณอิเล็กโตรด



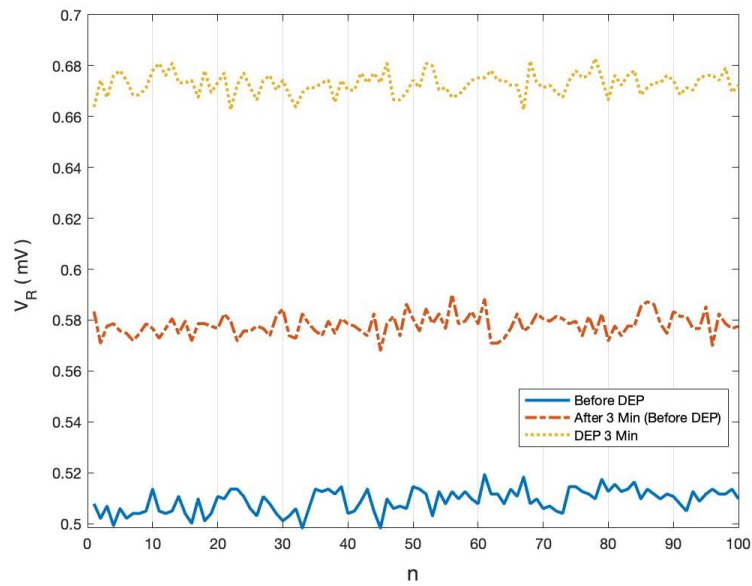
(ก) ป้อนแรงดันอ้างอิง



(ข) ภายใต้แรง DEP

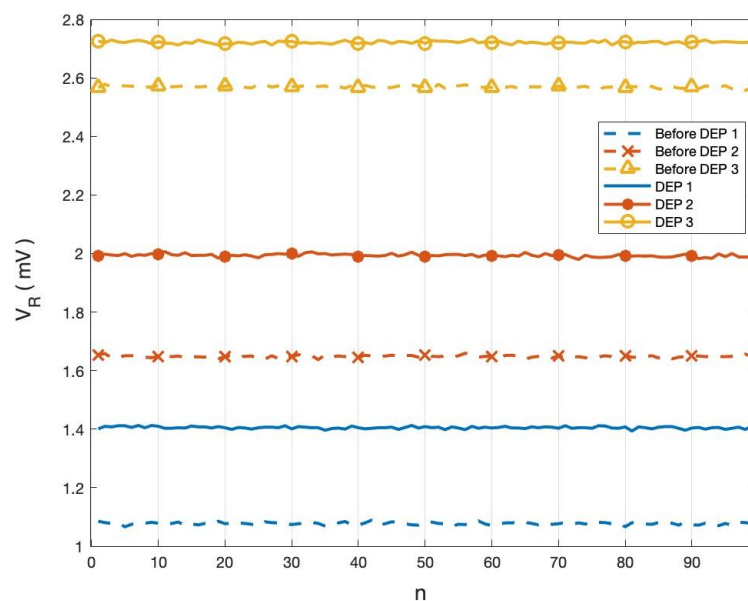
รูปที่ 5.12 อนุภาคสเตรปตาวิดินที่ไม่ผ่านการบ่มกับผลผลิตจากพีซีอาร์

รูปที่ 5.12 แสดงลักษณะอนุภาคที่ไม่ผ่านการบ่มกับผลผลิตพีซีอาร์. ในรูปที่ 5.12(ก) แสดงลักษณะอนุภาคก่อนการป้อนแรง DEP อนุภาคจะอยู่กระจัดกระจายไม่เกาะกลุ่มกัน. ในรูปที่ 5.12(ข) อนุภาคถูกผลักออกจากอิเล็กโทรดและเกาะกันเป็นกลุ่ม. รูปที่ 5.11 แสดงลักษณะอนุภาคที่ผ่านการบ่มกับผลผลิตพีซีอาร์. ในรูปที่ 5.11(ข) อนุภาคถูกดึงดูดเข้าหาอิเล็กโทรดและเรียงตัวกันเป็นสายโซ่. ดังนั้น การทดลองพบว่า อนุภาคที่มีดีเอ็นเอจะเรียงตัวกันเป็นสายโซ่เชื่อมต่อกันบริเวณแถบของอิเล็กโทรด และอนุภาคที่ไม่มีดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ออกจากอิเล็กโทรดและรวมกันบริเวณช่องอิเล็กโทรด. การยึดจับของอนุภาคที่มีดีเอ็นเอ ณ บริเวณอิเล็กโทรดส่งผลต่อค่าแรงดันตกคร่อมความต้านทานที่วัดได้.



รูปที่ 5.13 แรงดัน V_R ที่ตกคร่อมความต้านทาน 1 k Ω ของน้ำปราศจากไอออน

รูปที่ 5.13 แสดงผลการวัดค่า V_R ของน้ำปราศจากไอออนที่ไม่มีอนุภาค โดยมีแกนนอนเป็นจุดวัดค่าอัตราขยายประมาณ 300 เท่า. กราฟสีน้ำเงินแสดง V_R ที่วัดได้จากการป้อนแรงดันอ้างอิง. กราฟจุดสีแดงแสดง V_R ที่วัดได้หลังปล่อยทิ้งไว้ 3 นาทีโดยที่ไม่ป้อนแรง DEP. กราฟจุดสีเหลืองแสดง V_R ที่วัดได้หลังจากการป้อน DEP เป็นเวลา 3 นาที. ดังนั้น แรงดันจะเพิ่มขึ้นประมาณ 23 mV หลังจากตั้งทิ้งไว้ 3 นาที. หลังจากผู้วิจัยป้อนแรง DEP เป็นเวลา 3 นาทีแรงดันจะเพิ่มขึ้นประมาณ 32 mV. ผู้วิจัยคาดว่า การเพิ่มขึ้นของแรงดันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย.

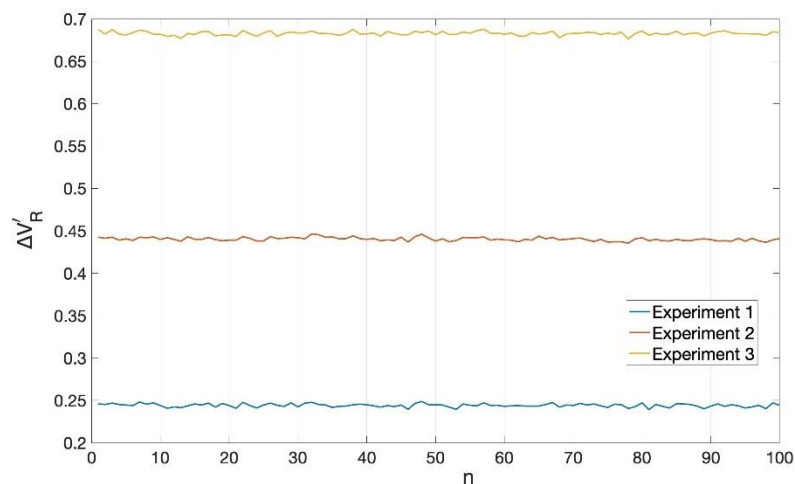


รูปที่ 5.14 แรงดัน V_R ที่ตกคร่อมความต้านทาน 1 k Ω ของอนุภาคที่มีดีเอ็นเอของมาลาเรีย

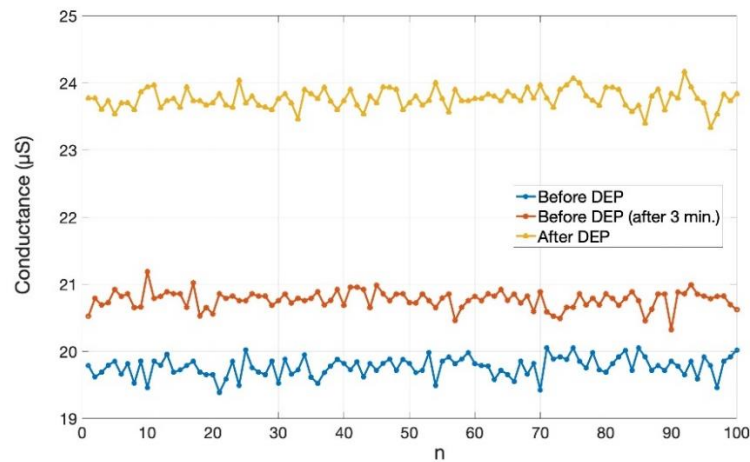
ผลการวัดแรงดันตกคร่อมความต้านทานของอนุภาคที่มีดีเอ็นเอแสดง ดังรูปที่ 5.14. กราฟสีฟ้า, กราฟสีแดง และกราฟสีเหลืองแสดงผลการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ **ที่**แยกชุดของตัวอย่าง. จุดสัญลักษณ์แสดงค่าการวัดก่อนการป้อนแรง DEP และเส้นกราฟ แสดงค่าการวัดหลังป้อนแรง DEP. ผลการทดลองพบว่า ในการทดลองแต่ละครั้งแรงดันที่หลังป้อนแรง DEP มีค่าเพิ่มขึ้น. กำหนดให้ V_{R1} คือ แรงดันที่วัดได้ของน้ำปราศจากไอออนหลังจากป้อนแรง DEP 3 นาที, V_{R2} คือ แรงดันที่วัดได้ของน้ำปราศจากไอออนที่มีอนุภาคที่ยึดจับดีเอ็นเอหลังจากป้อน DEP 2 นาที. ΔV_R คือ ผลส่วนต่างวัดของแรงดันระหว่างหลังป้อน DEP 2 นาที และ 3 นาที หาได้จากสมการ

$$\Delta V_R = V_{R2} - V_{R1} \quad (5.1)$$

จากรูปที่ 5.15 สรุปได้ว่าค่าแรงดัน ΔV_R เปลี่ยนแปลงประมาณ 51% ของ V_R ที่วัดได้. ดังนั้น เมื่อตัวอย่างของอนุภาคพอลิซิสไตรีนได้จับกับดีเอ็นเอของมาลาเรีย ค่าความนำไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรดที่วัดได้จะมีค่าลดลงจากค่าความนำไฟฟ้าพื้นหลัง. ผลการทดลองพบว่า การวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดโอดอิเล็กโทรโฟเรติกสามารถตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียได้.

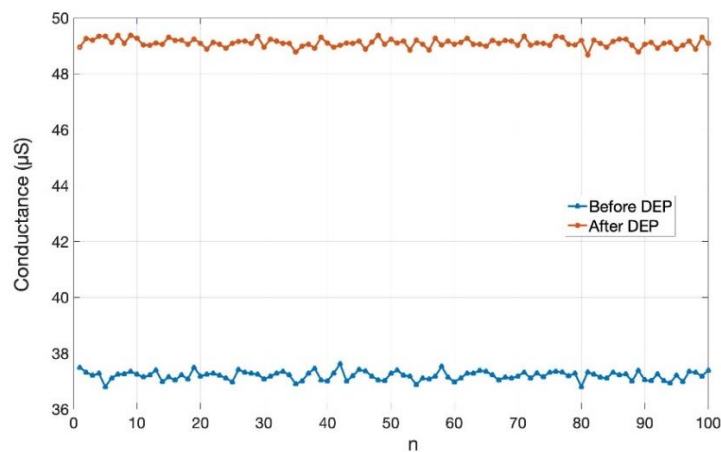


รูปที่ 5.15 ΔV_R แรงดันที่ตกคร่อมความต้านทาน 1 k Ω ที่ได้จากสมการที่ (5.1)



รูปที่ 5.16 ความนำไฟฟ้าของอนุภาคที่ไม่ผ่านการบ่มดีเอ็นเอของมาลาเรีย

รูปที่ 5.16 แสดงผลค่าความนำไฟฟ้าของอนุภาคที่ไม่ผ่านการบ่มดีเอ็นเอของมาลาเรีย โดยมีแกนนอนเป็นจุดวัดค่าภายใน 1 วินาที และแกนตั้งเป็นค่าความนำไฟฟ้า. กราฟสีน้ำเงินแสดงค่าความนำไฟฟ้าก่อนการบ่มดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดแรง DEP, กราฟสีแดงแสดงค่าความนำไฟฟ้าทิ้งไว้ 3 นาที โดยไม่มีการบ่มดีเอ็นเอ และกราฟสีเหลืองแสดงค่าความนำไฟฟ้าหลังจากบ่มดีเอ็นเอที่ทำให้เกิด DEP. การเพิ่มขึ้นของความนำไฟฟ้าแปรผกผันกับเวลา.



รูปที่ 5.17 ความนำไฟฟ้าของอนุภาคที่ผ่านการบ่มดีเอ็นเอของมาลาเรีย

รูปที่ 5.17 แสดงค่าความนำไฟฟ้าของอนุภาคที่ผ่านการบ่มดีเอ็นเอ โดยมีแกนนอนเป็นจุดวัดค่าภายในช่วงเวลา 1 วินาที และแกนตั้งเป็นค่าความนำไฟฟ้า. กราฟสีน้ำเงินแสดงค่าความนำไฟฟ้าก่อนการบ่มดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดแรง DEP และกราฟสีแดงแสดงค่าความนำไฟฟ้าหลังบ่มดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดแรง DEP. การเพิ่มขึ้นของความนำไฟฟ้าเกิดจากสารละลายและอนุภาคที่มีดีเอ็นเอบางส่วนที่ยังติดอยู่ตรงบริเวณอิเล็กโทรด

บทที่ 6

สรุป

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาเกี่ยวกับการทดลองคัดแยกเซลล์เลือดเพาะปกติออกจากเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรีย. การทดลองสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียหลังผ่านกระบวนการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธีการกระตุ้นการเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์. การวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติกใช้สำหรับการทดลองตรวจหาเชื้อ *E.coli* ในตัวอย่าง และการทดลองตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย

การทดลองคัดแยกเซลล์ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียต่อเซลล์เลือดเพาะปกติเท่ากับ 1:10,000. ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียออกจากเซลล์เลือดเพาะปกติโดยใช้แรงดัน 9 Vp, 750 kHz. เซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียที่ได้รับจากการคัดแยกถูกนำไปทดลองการสลายเซลล์ เพื่อสกัดดีเอ็นเอของมาลาเรีย.

การทดลองกระตุ้นการเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียใช้แรงดัน 9 Vp, 40 kHz. ผลการทดลองพบว่า การสลายเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียทำให้สามารถสกัดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียได้. ดีเอ็นเอของเซลล์เลือดเพาะเชื้อมาลาเรียที่ได้จากการสลายเซลล์ถูกนำไปขยายดีเอ็นเอด้วยวิธีการพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้เพียงพอต่อการใช้ยัดจับกับอนุภาค. จากนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ถูกนำไปทดลองวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติก เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรีย.

การทดลองตรวจหาเชื้อ *E.coli* ในตัวอย่างด้วยวิธีการวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติก. อัตราส่วนผสมระหว่างสารละลายและเซลล์ *E.coli* เท่ากับ 100 μl : 3×10^8 CFU, และ 100 μl : 5×10^8 CFU. การทดลองดังกล่าวยืนยันว่าสามารถใช้วิธีวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติกตรวจหาเซลล์ในตัวอย่างโดยใช้แรง DEP แบบบวกได้. ในการทดลองวัดอิมพีแดนซ์เชิงไดอิเล็กโตรโพรติกเพื่อตรวจหาอนุภาคที่ยึดจับกับดีเอ็นเอของมาลาเรีย. ผลการทดลองพบว่า ที่แรงดัน 1 Vp, 100 kHz สามารถดักจับอนุภาคที่มีดีเอ็นเอของมาลาเรียได้. ผลการวัดอิมพีแดนซ์แสดงว่าสามารถตรวจหาดีเอ็นเอของมาลาเรียได้ โดยสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของความนำไฟฟ้า.

บรรณานุกรม

1. คงพวง, ค., การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ. 2549: สำนักงานโรคติดต่อฯ โดยแมลง.
2. จังหวัดชลบุรี, ส., คู่มือ การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียสำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล. 2560, กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี.
3. Panklang, N., et al., *A discrete dielectrophoresis device for the separation of malaria-infected cells*. *Electrophoresis*, 2022. **43**(12): p. 1347-1356.
4. Chen, X., D.F. Cui, and C.C. Liu, *On-line cell lysis and DNA extraction on a microfluidic biochip fabricated by microelectromechanical system technology*. *Electrophoresis*, 2008. **29**(9): p. 1844-1851.
5. Kim, J., et al., *Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification*. *Integr Biol (Camb)*, 2009. **1**(10): p. 574-86.
6. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 368-73.
7. Niculescu, A.G., et al., *Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(4).
8. วิกีพีเดีย, ส., เม็ดเลือดแดง.
9. Russell, N.J., et al., *Red Blood Cells*, in *Blood Biochemistry*, N.J. Russell, et al., Editors. 1982, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 4-20.
10. Cowman, A.F., et al., *The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites*. *Cell Host & Microbe*, 2017. **22**(2): p. 232-245.
11. Organization, W.H., *Malaria*.
12. Organization, W.H., *World malaria report 2020*.
13. Tangpukdee, N., et al., *Malaria diagnosis: a brief review*. *Korean J Parasitol*, 2009. **47**(2): p. 93-102.
14. Clendennen, T.E., G.W. Long, and J.K. Baird, *QBC® and Giemsa-stained thick blood films: diagnostic performance of laboratory technologists*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995. **89**(2): p. 183-184.
15. Jones, T.B., *Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation*. IEEE

- Engineering in Medicine and Biology Magazine, 2003. **22**(6): p. 33-42.
16. Moon, H.S., et al., *Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP)*. Lab Chip, 2011. **11**(6): p. 1118-25.
 17. Techaumnat, B., et al., *Study on the discrete dielectrophoresis for particle-cell separation*. Electrophoresis, 2020. **41**(10-11): p. 991-1001.
 18. Alazzam, A., B. Mathew, and F. Alhammadi, *Novel microfluidic device for the continuous separation of cancer cells using dielectrophoresis*. J Sep Sci, 2017. **40**(5): p. 1193-1200.
 19. Hou, H.W., et al., *Deformability based cell margination—A simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation*. Lab on a Chip, 2010. **10**(19).
 20. Junya, S., et al., *Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method*. Journal of Physics D: Applied Physics, 1999. **32**(21): p. 2814.
 21. Nakano, M., Z. Ding, and J. Suehiro, *Comparison of Sensitivity and Quantitation between Microbead Dielectrophoresis-Based DNA Detection and Real-Time PCR*. Biosensors (Basel), 2017. **7**(4).
 22. Nakano, M., S. Kalsi, and H. Morgan, *Fast and sensitive isothermal DNA assay using microbead dielectrophoresis for detection of anti-microbial resistance genes*. Biosensors and Bioelectronics, 2018. **117**: p. 583-589.
 23. Zimmermann, U., *Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1982. **694**(3): p. 227-277.
 24. Tonapan, T., et al., *Experimental study on breakdown behavior and vacuole isolation of protoplasts under electrical pulses*. IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, 2016. **23**(4): p. 2492-2498.
 25. Ramadan, Q., et al., *Simultaneous cell lysis and bead trapping in a continuous flow microfluidic device*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **113**(2): p. 944-955.
 26. Lee, D.W. and Y.-H. Cho, *A continuous electrical cell lysis device using a low dc*

- voltage for a cell transport and rupture. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **124**(1): p. 84-89.
27. Sale, A.J.H. and W.A. Hamilton, *Effects of high electric fields on micro-organisms: III. Lysis of erythrocytes and protoplasts*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1968. **163**(1): p. 37-43.
28. Bao, N., et al., *Microfluidic electroporation of tumor and blood cells: observation of nucleus expansion and implications on selective analysis and purging of circulating tumor cells*. *Integrative Biology*, 2010. **2**(2-3): p. 113-120.
29. Jones, T.B., *Electromechanics of Particles*. 1995, Cambridge: Cambridge University Press.
30. Nataro James, P. and B. Kaper James, *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998. **11**(1): p. 142-201.
31. ปานกลาง, น., การประยุกต์ใช้แรงไดอิเล็กโตรโฟรีติกในระบบของไหลจุลภาคกับการจัดการเซลล์เลือด, in จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. *คณะวิศวกรรมศาสตร์*. 2563, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
32. Nakano, M., Z. Ding, and J. Suehiro, *Frequency-dependent conductance change of dielectrophoretic-trapped DNA-labeled microbeads and its application in DNA size determinations*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2018. **22**(3).



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

1. การสร้างแม่พิมพ์ช่องทางไหลโดยใช้ฟิล์มไวแสงชนิดลบ

ขั้นตอนการสร้างแม่พิมพ์ช่องทางไหล มีดังนี้

1. นำกระจกมาล้างด้วย IPA โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5 นาที
2. นำกระจกที่ผ่านการล้างด้วย IPA มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และเป่าให้แห้ง
3. นำฟิล์มไวแสงชนิดลบ หน้า 15 μm มาติดบนกระจกด้วยเครื่องรีดฟิล์มที่อุณหภูมิ 110°
4. ลอกแผ่นฟิล์มด้านบนออก แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที
5. นำน้ำจากมาแบบบนกระจกแล้วนำไปฉายแสงยูวีเพื่อให้ฟิล์มแข็งตัวประมาณ 6 วินาที
6. หลังจากฉายแสงเสร็จแล้ว นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที
7. ล้างด้วย Na_2CO_3 ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 เป็นเวลา 25 วินาที, ครั้งที่ 2 15 วินาที และครั้งที่ 3 10 วินาที
8. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 20 นาที
9. ส่องช่องทางไหลด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะช่องทางไหล

2. การหล่อช่องทางไหลและการประกอบชิ้นงานสำหรับการทดลอง

ขั้นตอนการหล่อช่องทางไหล มีดังนี้

1. เคลือบกระจกที่มีแม่พิมพ์ไวแสงและกระจกเปล่าด้วย BARRIER COAT No.6 ที่อัตราส่วน 1:20 เพื่อป้องกันการติดกันระหว่างกระจกและ PDMS
2. ตัดแผ่นซิลิโคนที่มีความหนา 3 mm ขนาดเท่ากับกระจก จากนั้นนำแผ่นซิลิโคนมาแนบบนกระจกที่มีแม่พิมพ์ไวแสง
3. ผสม PDMS กับ CAT-RG ที่อัตราส่วน 1:10 จากนั้นเท PDMS ลงบนแม่พิมพ์ไวแสงที่เตรียมไว้ให้เต็มแผ่นซิลิโคนที่แนบบนแผ่นกระจก
4. นำกระจกเปล่าที่เคลือบด้วย BARRIER COAT No.6 ปิดทับด้านบน และนำเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 95°C
5. นำชิ้นงานออกจากเตาอบและตัดชิ้นงานตามแบบที่ต้องการ จากนั้นเจาะรูช่องทางไหล ณ บริเวณทางออกทั้งสองช่อง
6. ล้าง PDMS ด้วยโทลูอีน (Toluene) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยไอโซโพรพานอล (IPA) เป็นเวลา 5 นาที

7. ล้างชิ้นงานด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเป่าให้แห้ง
8. นำชิ้นงานวางบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้โพลีอีนระเหย
9. นำชิ้นงานมาโครนาดีสชาร์จ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อปรับสภาพผิวในการยึดติดของช่องทางไหลและอิเล็กทรอนิกส์
10. ประกอบช่องทางไหลกับกระจกที่มีอิเล็กทรอนิกส์ จากนั้นนำชิ้นงานที่ประกอบแล้วไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที
11. ต่อขั้วเชื่อมที่บริเวณช่องทางออกของช่องทางไหลเพื่อต่อเข้ากับปั๊มกระบอกฉีดยา และต่อขั้วอิเล็กทรอนิกส์เพื่อต่อเข้ากับเครื่องให้กำเนิดไฟฟ้า



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับการทดลองคัดแยกและสลายเซลล์

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย มีดังนี้

1. นำน้ำปราศจากไอออนใส่ในบีกเกอร์ 100 mL
2. เติมสารละลาย Sucrose 8.5 g, D-glucose 0.3 g และ BSA 500 μ l ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำปราศจากไอออน จากนั้นกวนสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารแบบแม่เหล็ก (MS 155, HL Instrument)
3. ปรับสภาพนำไฟฟ้าด้วย PBS (Phosphate Buffered Saline) เพื่อปรับให้ได้สภาพนำไฟฟ้าเท่ากับ 20 mS/m

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลองวัด DEPIM ของเชื้อ *E.coli*

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย มีดังนี้

1. นำน้ำปราศจากไอออนใส่ในบีกเกอร์ 100 mL จากนั้นเติม mannitol 1.82 g ลงในบีกเกอร์
2. กวนสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารแบบแม่เหล็ก (MS 155, HL Instrument)
3. ตรวจสอบสภาพนำไฟฟ้าให้ได้เท่ากับ 0.2 mS/m จากนั้นเทสารละลายลงในหลอดทดลองเพื่อเก็บรักษา

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลองวัด DEPIM ของอนุภาคพอลิस्टาไทรินที่มีดีเอ็นเอ มาลาเรีย

ขั้นตอนการเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับการล้างและเชื่อมอนุภาคพอลิस्टาไทรินกับดีเอ็นเอ มีดังนี้

1. นำน้ำปราศจากไอออนใส่ในบีกเกอร์ 100 mL.
2. เติม NaCl 11.69 g, Tris-HCl 0.12 g และ EDTA 0.03 g ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำปราศจากไอออน จากนั้นกวนสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารแบบแม่เหล็ก (MS 155, HL Instrument) จากนั้นเก็บบัฟเฟอร์หลอดทดลองขนาด 50 mL.

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายที่ใช้แขวนลอยสำหรับดีเอ็นเอที่ยึดติดกับดีเอ็นเอ มีดังนี้

นำน้ำปราศจากไอออนลงในบีกเกอร์ 100 mL จากนั้นผสม TritonX-100 (0.001%) 1 μ l.

ผู้วิจัยกวนสารให้เข้ากัน และตรวจสอบสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายก่อนการใช้งานทุกครั้ง.

ภาคผนวก ค

การย้อมเซลล์

1. การย้อมเซลล์ *E.coli* ด้วยวิธีการย้อมสีแกรม (Gram Stain)

การย้อมสีเซลล์ *E.coli* มีรายละเอียด ดังนี้

1. เกลี่ยเชื้อลงบนกระจกสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ (ลดความหนาแน่นของเชื้อ) และปล่อยให้แห้งในอากาศ
2. ตรึงเชื้อให้ติดแน่นกับกระจกสไลด์เพื่อไม่ให้เซลล์ไม่หลุดขณะที่ทำการย้อมสี โดยการนำกระจกสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อแล้วผ่านบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
3. หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง
4. หยดสีไอโอดีน (lugol's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง
5. ล้างสีออกด้วย (decolorize) บนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 15 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด (ขั้นตอนการล้างนี้เป็นขั้นตอนสำคัญเนื่องจากการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี)
6. หยดสีซาฟรานิน (safranin) บนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 15-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ที่มีเชื้อมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การย้อมเซลล์ด้วยสี Giemsa

การย้อมสีเซลล์ติดเชื้อมาลาเรียมีรายละเอียด ดังนี้

1. นำตัวอย่างเซลล์เลือดหยดลงบนกระจกสไลด์ และเกลี่ยให้เป็นฟิล์มเลือดบางๆ จากนั้นปล่อยให้แห้ง
2. นำกระจกสไลด์ที่มีฟิล์มเลือดลงไปแช่ในเมทานอล 2 นาที จากนั้นนำกระจกขึ้นและทิ้งไว้ให้แห้ง
3. หยดสี Giemsa ลงบนฟิล์มเลือดให้ท่วมและทิ้งไว้ 20 นาที
4. ล้างสี Giemsa ด้วยน้ำปราศจากไอออน และทิ้งไว้ให้แห้งและนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ง

เทคนิคพีซีอาร์

พีซีอาร์ (polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนา Kery Mullis โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ. เทคนิคพีซีอาร์ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการศึกษาเชื้อก่อโรคต่างๆ, เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และการตรวจวินิจฉัยโรคทางกรรมพันธุ์. หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากต้นแบบดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNA Polymerase. พีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ครั้งละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ปฏิกิริยา. ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในทุกๆรอบของปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอนดังนี้ 1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอแม่แบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 90-95°C. 2. Primer annealing เป็นขั้นตอนการจับคู่สมของไพรเมอร์ที่ถูกสังเคราะห์ที่มีลำดับเบสเหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 40-60°C. 3. Primer extension เป็นขั้นตอนการเพิ่มความยาวของดีเอ็นเอโดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ซึ่งสร้างต่อไปในทิศทาง 5' ไปหา 3' อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนนี้ คือ 72°C. เทคนิคพีซีอาร์ที่ถูกดัดแปลงมาจากเทคนิคพื้นฐาน มีดังนี้ 1. Booster PCR เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการลดการเกิดของไพรเมอร์ dimers. 2. Asymmetric PCR เป็นเทคนิคที่ให้ผลของดีเอ็นเอเป้าหมายจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 2 สายให้ไม่เท่ากัน. 3. Nested PCR เป็นเทคนิคที่ขยายจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการลดจำนวนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการให้น้อยลง. เทคนิคนี้สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ต้องการ. 4. Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่เพิ่มขยายดีเอ็นเอได้หลายเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน. 5. Inverse PCR เป็นเทคนิคการขยายดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้เชื่อมสายดีเอ็นเอที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้ติดกันเป็นวงกลม. 6. RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ RNA เป็นแม่แบบโดยการสังเคราะห์ cDNA มาจาก mRNA.

สายพันธุ์ของมาลาเรียสามารถระบุได้โดยวิธีการ nested PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์รอบนอกของ plasmodium ชนิดจำเพาะเจาะจงที่ได้รับยีนมาจากไรโบโซมอลาร์เอ็นเอหน่วยย่อยขนาดเล็ก (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA). พีซีอาร์ทำทั้งหมด 2 รอบ ซึ่งรอบแรกจำนวน 40 cycles และรอบสองจำนวน 35 cycles. อุณหภูมิที่ใช้สำหรับทุกๆรอบปฏิกิริยา 94°C 40 วินาที, 60°C 30 วินาที และ 72°C 1 นาที. ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับรอบแรก คือ M18SF0: 5'-CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGG-3' และ M18SR0: 5'-CAAGGAAGTTTAAGGCAACAACA-3'. ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับรอบสอง คือ PF18SF: Biotin 5'-CATCTTTTCGAGGTGACTTTTTAG-3' และ PF18SR: 5'-GTTTTTTACTCTATTTCTCTCTTC-3'.

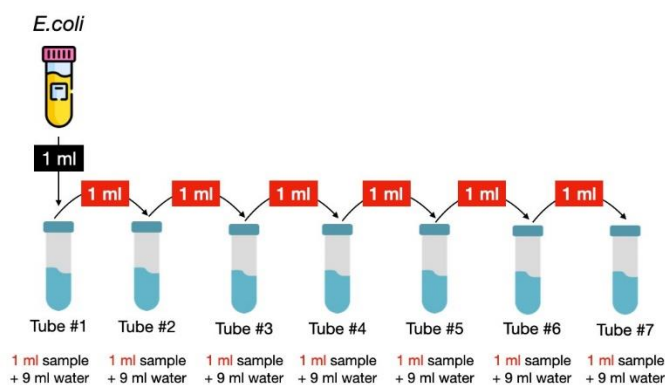
ภาคผนวก จ

การนับเชื้อ

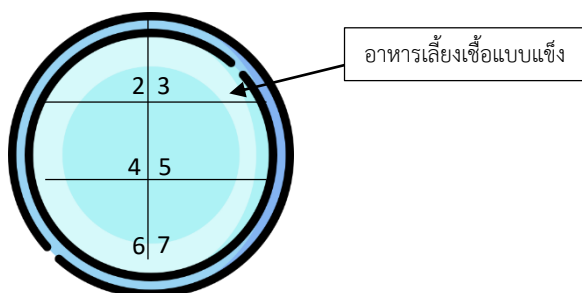
ขั้นตอนการเจือจางเชื้อ *E.coli* เพื่อสังเกตเชื้อและนับเชื้อ

ขั้นตอนการเจือจางเชื้อมีรายละเอียด ดังนี้

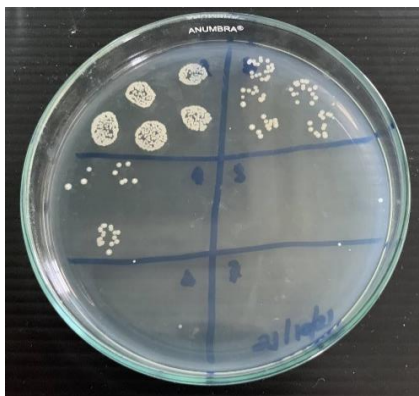
1. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองทั้งหมด 7 หลอด หลอดละ 9 ml.
2. เติมเชื้อตัวอย่าง 1 μl ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหลอดแรก จากนั้นผสมให้เข้ากัน.
3. นำเชื้อจากหลอดแรก 1 μl ลงในหลอดที่สอง จากนั้นผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำจนกว่าจะถึงหลอดสุดท้าย (นำเชื้อจากหลอดก่อนหน้าลงในหลอดถัดไป) ดังรูปที่ จ.1
4. นำจานเพาะเชื้อมาแบ่งเป็น 6 ช่อง ดังรูปที่ จ.2
5. นำเชื้อจากแต่ละหลอดหยดลงในช่องให้ตรงกับหมายเลขหลอด เช่น หลอดที่ 2 หยดลงช่องที่ 2 และ หลอดที่ 3 หยดลงช่องที่ 3 ตามลำดับ หยดช่องละ 5 หยด (หยดละ 10 μl). ควรเปลี่ยนปลายปิเปตทุกครั้งก่อนดึงเชื้อจากหลอดใหม่ และนำปากหลอดทดลองไปผ่านบนเปลวไฟทุกครั้งทั้งก่อนและหลังใช้งาน เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อระหว่างหลอด.
6. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ 35-37°C นาน 24-48 ชม.



รูปที่ จ.1 การเจือจางเชื้อ *E.coli*



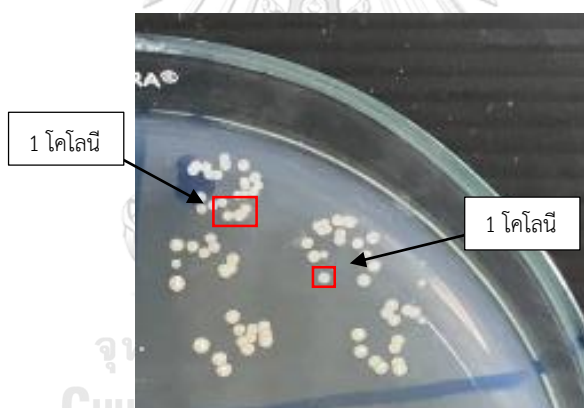
รูปที่ จ.2 ลักษณะการแบ่งช่องบนจานเพาะเชื้อ



รูปที่ จ.3 ลักษณะของเชื้อ *E.coli* หลังจากการเจือจาง

การนับเชื้อด้วยวิธีการ drop plate

การนับเชื้อให้นับถัดมาจากการเจือจางที่เข้มข้นที่สุด โดยจะนับโคโลนีในช่วง 25-250 หรือ 30-300 โคโลนี. โคโลนีที่อยู่ติดกันให้นับเป็น 1 โคโลนี ดังรูปที่ จ.4. ช่องหมายเลข 2 ไม่สามารถนับได้เนื่องจากจำนวนโคโลนีเยอะและอยู่ติดกันเกินไป จึงต้องขยับมานับที่ช่องหมายเลข 3.



รูปที่ จ.4 การนับจำนวนโคโลนีในแต่ละหยด

การคำนวณหาจำนวนเชื้อ *E.coli* ด้วยวิธีการหยดตัวอย่างลงบนจานเพาะเชื้อ

$$\text{จำนวนเชื้อ (CFU/ml)} = \frac{\bar{x}}{d \times V}$$

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี

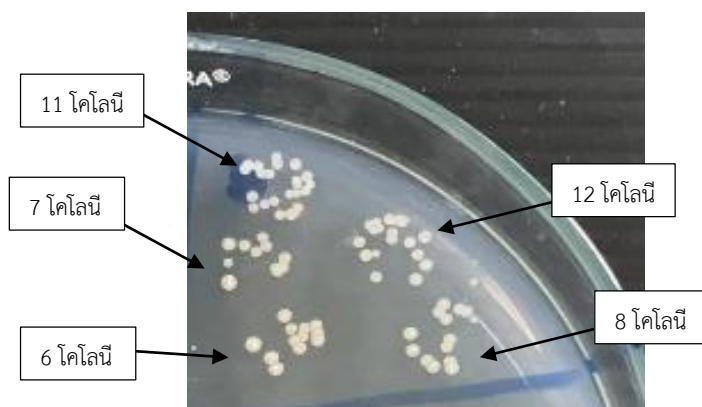
d คือ ลำดับความเจือจางที่เลือก

V คือ ปริมาตรของหยดตัวอย่างที่หยดลงบนจานเพาะเชื้อ

\bar{x} ของจำนวนโคโลนีคำนวณได้จากสมการนี้

$$\bar{x} = \frac{\Sigma C_1 + \Sigma C_2 + \dots}{\text{จำนวนหยดตัวอย่างทั้งหมดในช่องที่นับ}}$$

ตัวอย่างการคำนวณจำนวนเชื้อ *E.coli*



รูปที่ จ.5 การนับจำนวนโคโลนีในแต่ละหยด

รูปที่ จ.5 คำนวณค่า \bar{x} ของจำนวนโคโลนีได้เท่ากับ 8.8 โคโลนี และจำนวนเชื้อของ *E.coli* เท่ากับ 880,000 CFU/ml.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วีรดา หมดสี
วัน เดือน ปี เกิด	21/08/2539
สถานที่เกิด	ภูเก็ต
วุฒิการศึกษา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่ปัจจุบัน	13/30 ม.4 ซ.ศิริพงษ์ ต.อ่าวลึกใต้ อ.อ่าวลึก จ.กระบี่ 81110
ผลงานตีพิมพ์	วีรดา หมดสี, นิติงค์ ปานกลาง และบุญชัย เตชะอำนาจ, "การสลายเซลล์ เลือดติดเชื่อมมาลาเรียด้วยสนามไฟฟ้าบนชิป", The 45th Electrical Engineering Conference (EECON-45), 2022



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY