

Chulalongkorn University

Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2022

การประยุกต์ใช้คิวซีเอ็มเซนเซอร์ในการวิเคราะห์อันตรกิริยาเพื่อการตรวจวัด *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

สาธิต รอดภักดิ์กุล
คณะวิทยาศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>

Recommended Citation

รอดภักดิ์กุล, สาธิต, "การประยุกต์ใช้คิวซีเอ็มเซนเซอร์ในการวิเคราะห์อันตรกิริยาเพื่อการตรวจวัด *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*" (2022). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 6579.
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/6579>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การประยุกต์ใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ในการวิเคราะห์อันตรกิริยาเพื่อการตรวจวัด *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APPLICATION OF QCM SENSOR FOR *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
DETECTION BASED ON INTERACTION ANALYSIS



Mr. Satit Rodphukdeekul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biomedical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ใช้คิวซีเอ็มเซนเซอร์ในการวิเคราะห์อันตรายกิริยาเพื่อการ
	ตรวจวัด <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
โดย	นายสาธิต รอดภักดีกุล
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ นายแพทย์ไทรรักษ์ พิสิทธิ์กุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุภูมิ สมบูรณ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ นายแพทย์ไทรรักษ์ พิสิทธิ์กุล)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วัชรวิทย์ บุญลือ)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศุภชัย ฤทธิเจริญวัตถุ)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ยูจิ มียาฮาระ)	

สาธิต รอดกักตัก : การประยุกต์ใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ในการวิเคราะห์อันตรกิริยาเพื่อการตรวจวัด *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (APPLICATION OF QCM SENSOR FOR *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DETECTION BASED ON INTERACTION ANALYSIS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. นพ.ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ชนิดควอตซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ (quartz crystal microbalance, QCM) ในการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ชนิด *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเพื่อการตรวจวัดแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์

ไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดถูกสร้างขึ้นโดยใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ ชนิด 30 เมกะเฮิรตซ์ ที่ผ่านการปรับสภาพพื้นผิวเล็กโทรดทองด้วย 11-mercaptopundecanoic acid (11-MUA) และได้ประเมินความหนาแน่นการเรียงตัวของชั้น 11-MUA ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี จากนั้นทำการตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Anti-A. *actinomycetemcomitans* กับ 11-MUA โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) เพื่อใช้แอนติบอดีทำหน้าที่เป็นสารรู้จำทางชีวภาพ (biorecognition element) สำหรับการตรวจวัด A. *actinomycetemcomitans*

การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีชนิด anti-A. *actinomycetemcomitans* ทำด้วยกัน 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 ใช้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF) ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ว่าสามารถใช้ข้อมูล ΔF ในการจำแนกความสามารถในการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ โดยคู่แอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อกันมีรูปแบบ ΔF ที่แสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของ ΔF ที่ขึ้นกับความเข้มข้น รูปแบบที่ 2 ใช้ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ว่าสามารถใช้วิธีนี้จำแนกความจำเพาะของแอนติบอดีชนิด Anti-A. *actinomycetemcomitans* กับแบคทีเรียต่างชนิดได้ โดยเมื่อเกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเซลล์ที่มีความจำเพาะกัน ค่า dF/dT จะเปลี่ยนแปลงเป็นลบ และค่า dF/dT แสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปแบบที่ขึ้นกับความเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อมูล ΔF รูปแบบที่ 3 ใช้ข้อมูลเวลาการตอบสนอง (T) ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ว่าการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเซลล์ A. *actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นสูงสุด (1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ให้ค่า T เฉลี่ยเพียง 143 วินาที ทำให้ทราบผลลัพธ์ของการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเซลล์ A. *actinomycetemcomitans* รวดเร็วกว่าการติดตามจากข้อมูล ΔF ถึง 3 เท่า รูปแบบที่ 4 ใช้ข้อมูลความชันของการตอบสนอง (response slope) ซึ่งบ่งชี้ความสัมพันธ์ระหว่างความชันของการตอบสนอง (y) และจำนวนเซลล์ A. *actinomycetemcomitans* (x) ในฟังก์ชันเอกซ์โพเนนเชียล โดยมีสมการความสัมพันธ์คือ $y = 0.0053x^{0.2861}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 เท่ากับ 0.7737 โดยความชันของการตอบสนองของสถานะที่เซลล์มีความเข้มข้นสูงจะมีความชันของการตอบสนองมากกว่าสถานะที่เซลล์มีความเข้มข้นต่ำ

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5871422021 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORD: QCM SENSOR IMMUNOASSAY PERIODONTAL BACTERIA DETECTION

Satit Rodphukdeekul : APPLICATION OF QCM SENSOR FOR *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DETECTION BASED ON INTERACTION ANALYSIS. Advisor: Prof. MANA SRIYUDTHSAK, D.Eng. Co-advisor: TRAIRAK PISITKUN, M.D.

This work aims to study the application of a quartz crystal microbalance (QCM) biosensor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* detection based on the interaction between the bacterium and its specific monoclonal antibody, anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody.

The biosensor was developed using 30 MHz QCM sensor. The surface modification was performed by using 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA). The 11-MUA layer on the gold surface was evaluated using a cyclic voltammetry technique to determine its packing density. The anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody was covalently linked to 11-MUA using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) and acts as a biorecognition element of the biosensor for the detection.

The interaction between anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody and periodontal bacteria was analyzed by means of 4 methods: 1) Frequency shift (ΔF) results indicated that the ΔF can be used to classify the binding ability between anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody and different bacteria. The specific antibody-bacteria pair provided the ΔF pattern in a concentration-dependent manner. 2) First derivative of the frequency response (dF/dT) results indicated that this method can also be used to characterize the specificity of anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody. For the specific binding reaction, the dF/dT shows negative change and concentration-dependent manner as the ΔF method. 3) Response time (T) results indicated that the specific binding at the highest concentration of *A. actinomycetemcomitans* (1.16×10^8 cells/ml) provided the average T value of only 143 seconds which 3 times faster than the ΔF method. 4) Response slope results indicated the relationship between the response slope (y) and the number of *A. actinomycetemcomitans* cells (x) can be expressed in an exponential function: $y = 0.0053x^{0.2861}$ with a correlation coefficient (R^2) of 0.7737. The response slope of the high cell concentration had a greater response slope than that of the low cell concentration.

Field of Study: Biomedical Engineering

Academic Year: 2022

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนนิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ และทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนประเภท 60/40 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนวิจัย Research Center for Biomedical Engineering ประเทศญี่ปุ่น ศาสตราจารย์มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ดูแลให้คำปรึกษา สนับสนุน และให้โอกาสในการทำวิจัยนี้ อาจารย์ นพ.ไตรรักษ์ พิสิษฐกุล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษา และศาสตราจารย์ Yuji Miyahara และผู้ช่วยศาสตราจารย์ Miyuki Tabata ที่ให้การสนับสนุนและคำแนะนำในการทำวิจัยที่ Institute of Biomaterials & Bioengineering (IBB), Tokyo Medical and Dental University (TMDU) ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาควิชา ภูมิ สมบูรณ์ และคณะกรรมการทุกท่าน สมาชิก Bioelectronics Research Laboratory (BERL) ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสมาชิก Department of Bioelectronics IBB/TMDU ประเทศญี่ปุ่น และเพื่อน ๆ ทุกคน

เหนือสิ่งอื่นใด ขอขอบคุณ ครอบครัวและมิตรภาพที่ให้การสนับสนุนด้วยความรักความเข้าใจ และให้กำลังใจตลอดการศึกษาในครั้งนี้

สาธิต รอดภักดีกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

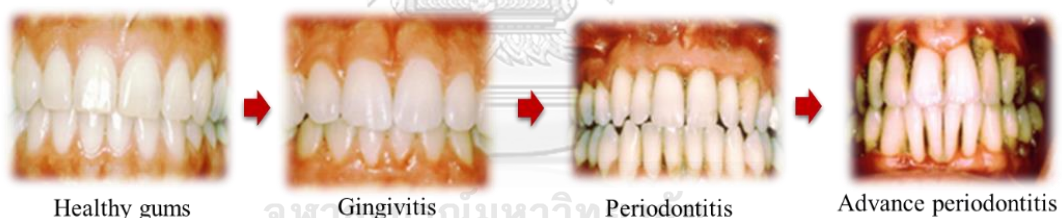
สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่ 1: บทนำ	1
บทที่ 2: ไบโอดีเซนเซอร์.....	6
บทที่ 3 ระบบตรวจวัด.....	20
บทที่ 4 การประดิษฐ์ควิซีเอ็มเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัด	30
บทที่ 5: การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์	46
บทที่ 6: การวิเคราะห์อันตรายกิริยา.....	60
บทที่ 7: บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	76
ภาคผนวก A.....	81
ภาคผนวก B.....	93
ภาคผนวก C.....	100
บรรณานุกรม.....	112
ประวัติผู้เขียน.....	122

บทที่ 1: บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของการตรวจเช็กโรคปริทันต์

โรคในช่องปาก เช่น โรคฟันผุ และโรคปริทันต์ เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ และส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โรคปริทันต์เป็นการติดเชื้อของเหงือกดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 1.1 จากรูปจะพบว่าเหงือกสุขภาพดีจะมีสภาพสมบูรณ์และเป็นสีชมพู การสะสมของคราบพลัคจะทำให้เริ่มเป็นโรคโดยมีอาการเหงือกอักเสบ (gingivitis) ซึ่งเกิดขึ้นในระยะแรกนี้ และมักส่งผลกระทบต่อผิวเหงือกโดยเฉพาะบริเวณรอยต่อของเหงือกและฟัน อาจทำให้มีเลือดออกที่เหงือกขณะแปรงฟัน เหงือกจะบวมแดงและเมื่อกดที่เหงือกจะเจ็บ เหงือกอักเสบสามารถรักษาให้หายได้โดยการแปรงฟันอย่างสม่ำเสมอเพื่อขจัดแบคทีเรียและคราบพลัคบนผิวฟัน อย่างไรก็ตาม เมื่อขาดการรักษาจะทำให้โรคเหงือกอักเสบดำเนินไปเป็นโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) จากการที่ผู้ป่วยมีภาวะเหงือกอักเสบเรื้อรัง ในระยะนี้จะทำให้เกิดร่องลึกกระหว่างเหงือกและรากฟันรวมทั้งอาจเกิดการสะสมของแบคทีเรียที่บริเวณนั้น ๆ จนเนื้อเยื่อและกระดูกขากรรไกรที่ยึดเหงือกและฟันไว้ด้วยกันเสียหายและทำให้สูญเสียฟันได้ในที่สุด หากได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาตั้งแต่ระยะแรกจะทำให้มีโอกาสนายได้มากกว่าการปล่อยให้โรคดำเนินไปจนถึงระยะที่สูญเสียฟัน



รูปที่ 1.1 ระยะของโรคเหงือก

(ดัดแปลงจาก <https://hawthornedentalnj.com>)

ไมโครไบโอมในปาก (microbiome) หรือจุลินทรีย์ที่พบในปากตามธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญในการเกิดพัฒนาการทางสรีรวิทยาในปากและระบบป้องกันตัวเองของมนุษย์ การเสียสภาพสมดุลของไมโครไบโอมในปากจะทำให้เกิดโรคในช่องปากได้ และส่งผลให้เกิดโรคอื่นในร่างกายตามมาอีกด้วย การศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานเกี่ยวกับไมโครไบโอมในปาก เช่น *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* และ *Fusobacterium nucleatum* ว่าเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญและถูกใช้เป็นตัวชี้วัดสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคปริทันต์อักเสบ^[1] การมีอยู่ของแบคทีเรียชนิดเดียวหรือหลายชนิด ในระดับที่

จำเพาะยังเป็นตัวบ่งชี้โอกาสในการเกิดโรค และเป็นตัวทำนายการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบได้ [2-4] นอกจากนี้ปริทันต์อักเสบยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและแฟกเตอร์ที่พบในของเหลวช่องเหงือก (gingival crevicular fluid, GCF) ในระหว่างการดำเนินไปของโรค [5]

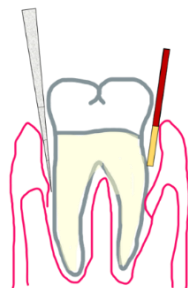
การพบทันตแพทย์เพื่อตรวจสุขภาพช่องปากเป็นประจำเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันโรคเหงือก และการสูญเสียฟันหากขาดแคลนทรัพยากรทางสาธารณสุขและความใส่ใจสุขภาพช่องปากจะทำให้เกิดปัญหาสุขภาพช่องปากได้ [6] ในการตรวจโรคปริทันต์ที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1.2 แพทย์จะตรวจสถานะในช่องปากเพื่อเก็บข้อมูลโดยวัดระดับบวมอักเสบของปากของผู้ป่วยจากการตรวจคราบจุลินทรีย์ ความรุนแรงทางคลินิกถูกประเมินจากการตรวจระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ (Probing Depth) การวัดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์โดยดูจากการมีเลือดออกหลังการโพรบ (Bleeding On Probing) การหาค่าการทำลายการยึดเกาะทางคลินิก (Clinical Attachment Loss) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการรวมค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์กับค่าระยะการร่นของเหงือก [5]

วิทยานิพนธ์นี้มุ่งเน้นศึกษาการตรวจหาเชื้อ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตหลังสารพิษไซโตลีสติสเทนดิงทอกซิน หรือซีดีที (cytotoxic distending toxin, CDT) ที่มีบทบาทสำคัญในการไปยับยั้งวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ในระยะจี 2 (G2) ทำให้เซลล์ไม่เข้าสู่ขบวนการแบ่งเซลล์ (mitosis) การตรวจชนิดของแบคทีเรียในวิทยานิพนธ์นี้จะอาศัยการวิเคราะห์อันตรกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้แนวทางในการตรวจทางชีวเคมี จุลชีววิทยา รังสีวิทยาและทางพันธุศาสตร์เพื่อติดตามโรคและเพื่อเป็นแนวทางในการรักษา การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้มาใช้เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ใต้เหงือก (subgingival microbiota) ซึ่งเป็นผลจากการรักษาโรคปริทันต์ โดยวิธีการนี้จะนำตัวอย่างแบคทีเรียจากช่องปากไปทำให้กระจายตัว และเจือจางให้มีความหนาแน่นเหมาะสมในสารละลายเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงตรวจสอบจำนวนและชนิดของแบคทีเรียโดยการสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์หรือการย้อมสี อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่สิ้นเปลืองแรงงานและเวลาเป็นอย่างมาก นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเลี้ยงให้เจริญในอาหารได้ง่ายจนถึงกับไม่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ซึ่งทำให้ยากต่อการทราบชนิดและปริมาณแบคทีเรียจากการเพาะเชื้อจากตัวอย่างจากปากของผู้ป่วยเพียงอย่างเดียว [7]

Clinical examination

- Probing Depth (PD)
- Bleeding On Probing (BOP)
- Clinical Attachment Loss (CAL)

**Laboratory tests**

- Biochemistry
- Microbiology
- X-Ray
- Genetic analysis

รูปที่ 1.2 วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคปริทันต์

(ดัดแปลงจาก Ramenzoni และคณะ ^[8])

การถ่ายภาพแบบสองมิติเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการประเมินสุขภาพของฟัน วิธีการนี้มีข้อจำกัดอยู่ที่ความไม่ชัดเจนของขอบและการบิดเบี้ยวของวัตถุในภาพซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากการซ้อนทับของวัตถุและส่งผลต่อการประเมินโครงสร้างของกระดูกและฟัน ทำให้ไม่สามารถประเมินความรุนแรงของโรคปริทันต์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ^[9] ปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR) เป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการตรวจหาสารพันธุกรรมที่มีอยู่ในปริมาณน้อย การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ จะต้องเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในช่องปากโดยการสอดกระดากเข้าไปในร่องเหงือกของฟันทุกซี่ในช่องปาก และนำกระดากชิ้นนั้นไปสกัดดีเอ็นเอ จำแนกหาชนิดเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องการผู้ที่มีความรู้และมีทักษะสูงเพื่อจัดการกับตัวอย่างในการตรวจและวิเคราะห์ข้อมูล ค่าใช้จ่ายในการตรวจด้วยเทคนิคนี้ยังเป็นข้อจำกัดหลักที่ทำให้ไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวินิจฉัยเป็นประจำอีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่าเทคนิคนี้มีโอกาสให้ผลลบเทียม เมื่อใช้ตรวจ DNA จากเชื้อก่อโรคปริทันต์ ^[10] อีกด้วย

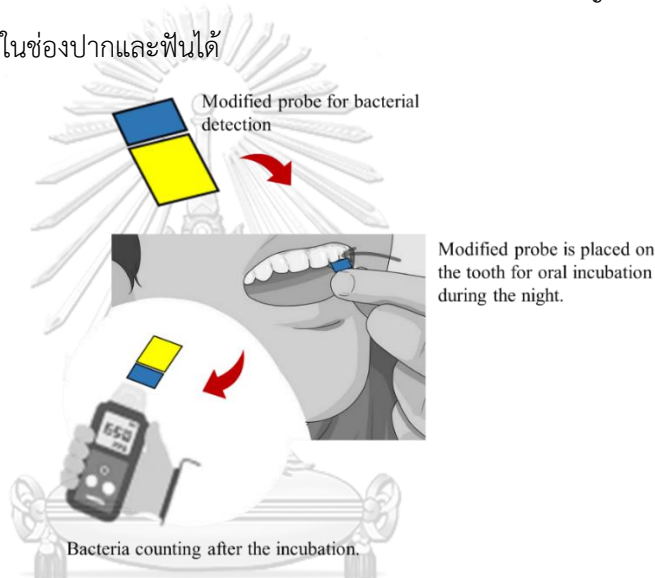
มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยที่ใช้งานได้สะดวกวางจำหน่ายในท้องตลาด เช่น ชุดคิทสำหรับตรวจแบคทีเรีย *P. gingivalis*, *P. intermedia* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยอาศัยหลักการทางวิทยาศาสตร์ที่แตกต่างกัน กล่าวคือมีการใช้แอนติบอดีในเทคนิค Sandwich-ELISA เพื่อตรวจเชื้อและติดตามผลจากการเปลี่ยนสี มีการตรวจชนิดเชื้อก่อโรคจากการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่เชื้อผลิตขึ้น ^[11] มีการใช้เทคโนโลยีโพรบ DNA เพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรค แต่ชุดตรวจเหล่านี้เป็นการตรวจในเชิงคุณภาพ มีความรวดเร็วและความไวไม่มากพอ มักเป็นกระบวนการตรวจที่มีหลายขั้นตอน และมีข้อจำกัด เช่น ในกรณีตรวจเชื้อก่อโรคปริทันต์จากการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน หากเชื้อก่อโรคไม่มีเอนไซม์จำพวกทริปซินก็จะไม่สามารถตรวจพบได้ เป็นต้น ^[12] จากข้อจำกัดต่าง ๆ ข้างต้น บ่งชี้ว่าวิธีการตรวจวัดที่มีอยู่ในปัจจุบันยังคง

มีข้อจำกัดในการระบุรายละเอียดของกระบวนการทางชีววิทยาของโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการและเครื่องมือเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคปริทันต์อักเสบแบบใหม่จึงยังเป็นสิ่งที่จำเป็นและต้องการ

มีการศึกษาเกี่ยวกับควอตซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ (QCM หรือควิซีเอ็มเซนเซอร์) มาเป็นเวลามากกว่า 30 ปี เนื่องด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์มีความสามารถที่มีลักษณะเฉพาะตัว กล่าวคือควิซีเอ็มเซนเซอร์สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนผิวอิเล็กทรอนิกส์ได้ ไม่ว่าผิวอิเล็กทรอนิกส์จะสัมผัสกับอากาศ ของเหลว หรือว่าเป็นของแข็งที่มาจับกับผิวอิเล็กทรอนิกส์ หลักการวัดพื้นฐานของควิซีเอ็มเซนเซอร์คือการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของความถี่เรโซแนนซ์ของตัวควิซีเอ็มเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงมวลหรือความหนืดที่ผิวอิเล็กทรอนิกส์ ที่ต้องการวัดแบบที่เรียจึงสามารถทำได้โดยการให้แบคทีเรียจับกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียนั้นบนอิเล็กทรอนิกส์ของควิซีเอ็ม เมื่อแบคทีเรียเข้ามาจับกับแอนติบอดีจะทำให้มวลหรือความหนืดที่ผิวอิเล็กทรอนิกส์เปลี่ยนแปลง อันจะส่งผลให้ค่าความถี่เรโซแนนซ์ของควิซีเอ็มเปลี่ยนแปลง ควิซีเอ็มเซนเซอร์จึงเป็นแพลตฟอร์มที่สามารถประยุกต์ใช้กับการตรวจแบคทีเรียได้ โดยมีข้อได้เปรียบที่ผลิตจากวัสดุที่มีราคาไม่แพง นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์วิเคราะห์แอสเทรียเชิงลึกของการดำเนินไปของโรคได้ เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่มีความไวสูง ดังนั้นข้อมูลที่ได้รับจากการตรวจวัดด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะช่วยให้ทันตแพทย์วางแผนการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ไม่จำเป็นต้องมีสารติดฉลากเหมือนเทคนิค PCR และ ELISA และสามารถตรวจวัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในสารละลายได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการอื่นหลังทำอันตรกิริยากับเซลล์ตัวอย่าง เช่น การทำการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในวิธี ELISA เป็นต้น จึงไม่ต้องใช้ผู้ที่ทักษะสูงมาทำการตรวจวัด

วิทยานิพนธ์นี้ใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อตรวจแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ในสารตัวอย่าง และศึกษาพฤติกรรมการจับกันระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีที่จำเพาะซึ่งถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์ของควิซีเอ็มเซนเซอร์ โดยประเมินจำนวนแบคทีเรียจากค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ (frequency shift, ΔF) ที่แปรตามมวลของแบคทีเรียที่ถูกจับด้วยแอนติบอดี นอกจากนี้ เป็นที่ทราบกันว่าความเร็วในการจับกัน (rate of reaction) ระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของสารทั้งสอง จึงเป็นไปได้ว่าจะสามารถวัดความเข้มข้นของแบคทีเรียได้จากการวัดค่าเวลาการตอบสนอง (response time, T) ของเซนเซอร์ในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแบคทีเรีย การตรวจแบคทีเรียโดยอาศัยการวิเคราะห์อันตรกิริยาเพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกสำหรับใช้ประเมินความเสี่ยงของโรคปริทันต์ จะช่วยให้สามารถระบุการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบได้อย่างแม่นยำมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคปริทันต์ดีขึ้น นอกจากนี้โปรโตคอลที่พัฒนาขึ้นและผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษานี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ได้กับโรคปริทันต์และโรคติดเชื้ออื่น ๆ อีกด้วย

ข้อมูลจากการศึกษานี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาควิซีเอ็มเซนเซอร์เป็นโพรบตรวจแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะแอนแอโรบิก เช่น ใช้ในช่องปากได้ โดยผลิตโพรบชนิดใหม่เป็นชุดทดสอบโรคปริทันต์โดยออกแบบอุปกรณ์ให้มีส่วนส่วนปิดครอบควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อป้องกันการแตกหักของควิซีเอ็มเซนเซอร์ขณะบ่มภายในปาก แต่ในขณะเดียวกันอุปกรณ์จะต้องมีช่องว่างให้ของเหลวภายในปากสัมผัสกับควิซีเอ็มเซนเซอร์ได้ (รูปที่ 1.3) ตัวอย่างเช่น เมื่อต้องการตรวจวัดแบคทีเรียในช่องปาก ผู้ใช้จะอมโพรบของเซนเซอร์ที่ดัดแปลงพื้นผิวนี้ไว้ในปากระหว่างนอนหลับเมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงนำโพรบออกจากปากและประกอบเข้ากับเครื่องมือตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์ เพื่อวิเคราะห์ชนิดและจำนวนแบคทีเรียด้วยเครื่องตรวจวัดในตอนเช้า ทำให้ประเมินชนิดและอัตราการเจริญของแบคทีเรีย และบอกความเสี่ยงในการเกิดโรคในช่องปากและฟันได้



รูปที่ 1.3 การพัฒนาเซนเซอร์เป็นโพรบสำหรับตรวจโรคปริทันต์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีสำหรับการตรวจตัวอย่างแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีโดยวัดการเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF) และเวลาการตอบสนอง (T)
3. เพื่อจำแนกสัมพรรคภาพ (affinity) และความจำเพาะ (specificity) ของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลน

ขอบเขตของการวิจัย

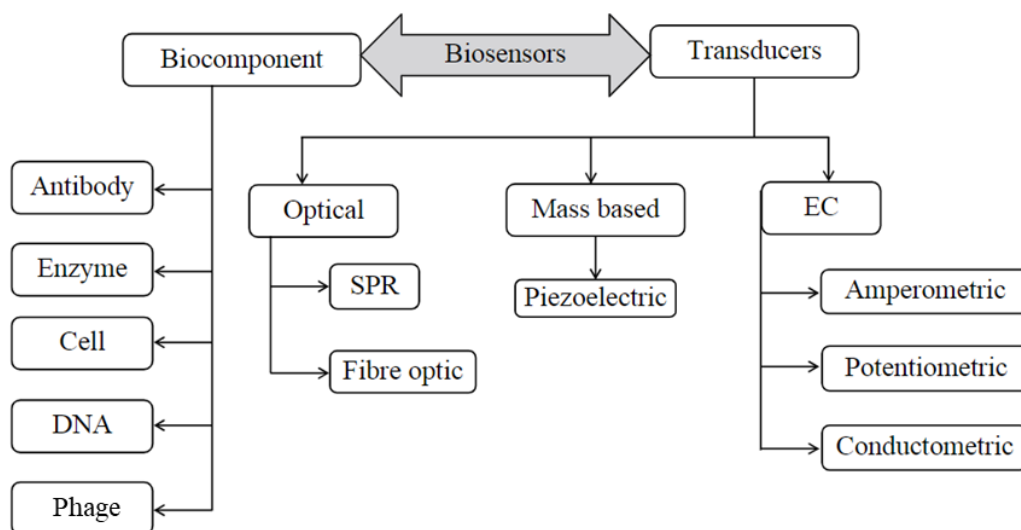
ทำการตรวจแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF) และเวลาการตอบสนอง (T) ที่ได้จากปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนกับแบคทีเรียที่จำเพาะ โดยใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ ออกแบบและประดิษฐ์ควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อใช้ตรวจวัดแบคทีเรียในวัฏภาคของเหลว

บทที่ 2: ไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ ประกอบขึ้นจากส่วนประกอบหลักสองส่วน คือ ส่วนประกอบทางชีวภาพ หรือเรียกว่าไบโอดีเซปเตอร์ หรือสารรู้จำทางชีวภาพ และทรานสดิวเซอร์ บทนี้จะกล่าวถึงประเภทของไบโอเซนเซอร์ ควอตซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ (QCM) ส่วนประกอบทางชีวภาพ อันตรกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี และงานวิจัยก่อนหน้า

2.1 ประเภทของไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์สามารถจำแนกได้ตามชนิดของสารรู้จำทางชีวภาพ และชนิดทรานสดิวเซอร์ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การจำแนกไบโอเซนเซอร์^[13]

ไบโอเซนเซอร์ทำงานโดยอาศัยความชอบจับหรือสัมพรรคภาพ (affinity) ระหว่างสารชีวภาพกับสารเป้าหมาย เช่น สัมพรรคภาพระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี, เอนไซม์กับซับสเตรท และเบสคู่สม (complementary) ของดีออกซีนิวคลีอิกแอซิด (DNA) ในขณะที่ทรานสดิวเซอร์ทำหน้าที่เปลี่ยนปริมาณทางฟิสิกส์ที่เกิดขึ้นให้อยู่ในรูปสัญญาณทางไฟฟ้าซึ่งตรวจวัดได้ ซึ่งอาจเป็นปริมาณทางแสง (optical) มวล (mass based) หรือทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical, ED)

ทรานสดิวเซอร์เชิงแสงอาศัยการตรวจวัดแสงที่ถูกดูดกลืนหรือเปล่งออกมาจากปฏิกิริยาเมื่อตรวจวัด ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงเชิงแสง เช่น การดูดกลืนฟลูออเรสเซนซ์ การเกิดลูมิเนสเซนซ์ และการเกิดเซอร์เฟซพลาสมอนรีโซแนนซ์ (Surface Plasmon Resonance, SPR) ^[14]

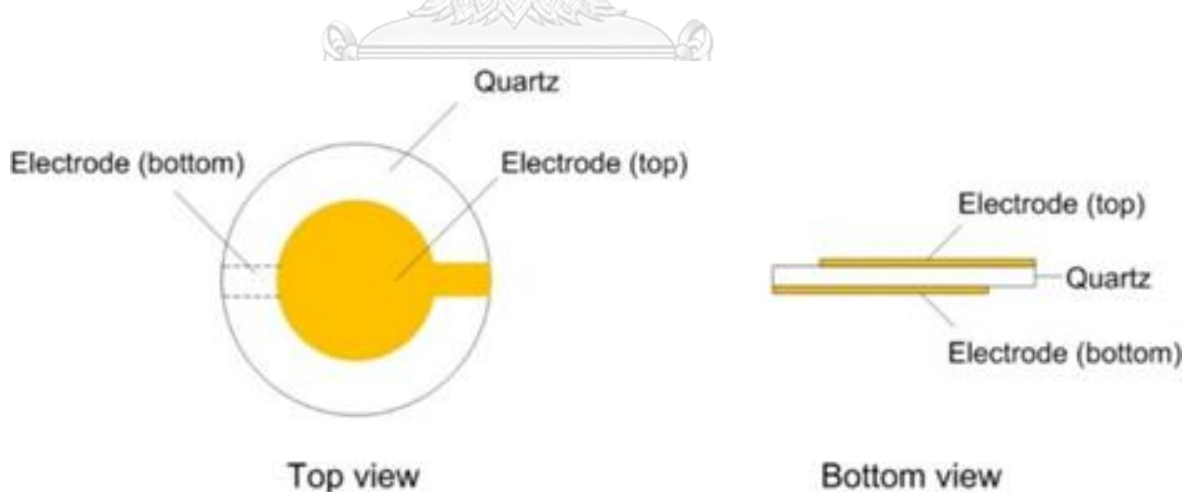
ทรานสดิวเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี ^[15] แบ่งออกเป็นชนิดแอมเพโรเมตริก, โพเทนซิโอเมตริก และคอนดักโตเมตริก ไบโอเซนเซอร์ชนิดแอมเพโรเมตริกตรวจวัดกระแสที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารที่ทำปฏิกิริยา ไบโอเซนเซอร์ชนิดโพเทนซิโอเมตริกตรวจวัดศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) เทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) คอนดักโตเมตริกตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการนำไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยา แม้จะมีการประยุกต์ใช้ทรานสดิวเซอร์ทางไฟฟ้าเคมีในทางไบโอเซนเซอร์อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามเซนเซอร์บางชนิดในกลุ่มนี้มีข้อด้อยบางประการ เช่น การเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีที่พื้นผิวทรานสดิวเซอร์อาจเกิดสารที่มีผลทำให้สารชีวภาพที่ตรึงอยู่บนเซนเซอร์เสียสภาพหลังผ่านการเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมี นอกจากนี้ในบางกรณียังจำเป็นต้องใช้สารเคมีช่วยนำไฟฟ้าหรือเพื่อขยายสัญญาณซึ่งถือเป็นการเพิ่มตัวแปรให้กับระบบตรวจวัดอีกด้วย ในขณะที่ควิซีเอ็มตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่พื้นผิว โดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายกับสารรู้จำทางชีวภาพที่ตรึงอยู่บนเซนเซอร์ อีกทั้งไม่จำเป็นต้องมีสารติดฉลากในการตรวจวัด ระบบตรวจวัดจึงไม่ถูกรบกวนด้วยตัวแปรเพิ่มเติมอื่น ๆ ^[16] นอกจากนี้ควิซีเอ็มเป็นทรานสดิวเซอร์ที่มีความไวสูง สามารถออกแบบให้มีขนาดเล็กได้ และประกอบติดตั้งในระบบตรวจวัดทางอิเล็กทรอนิกส์ได้สะดวก ^[17] เมื่อพิจารณาร่วมกับข้อดีเรื่องการไม่ทำลายสารรู้จำทางชีวภาพ ควิซีเอ็มจึงเป็นทรานสดิวเซอร์ที่มีการใช้ในการตรวจวัดทางเคมีและทางชีวภาพมาจนปัจจุบัน

ควิซีเอ็มเซนเซอร์ในการศึกษานี้เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงมวลที่เกิดขึ้นจากอันตรกิริยาของปฏิกิริยาทางชีวโมเลกุลระหว่างเซลล์แบคทีเรียและแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนผิวเซนเซอร์ โดยวัดค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่และเวลาการตอบสนองเพื่อประเมินจำนวนแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ในตัวอย่างของเหลว

2.2 ควอตซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ (QCM)

องค์ประกอบหลักของควิซีเอ็มเซนเซอร์แสดงได้ดังรูปที่ 2.2 ซึ่งประกอบด้วยแผ่นควอตซ์บางที่มีผิวอิเล็กโทรดทองอยู่ทั้งด้านทั้งสอง (ด้านบนและล่าง) อิเล็กโทรดทองทำหน้าที่เป็นพื้นผิวตรวจรู้ มุมมองด้านบนของควิซีเอ็มเซนเซอร์แสดงอิเล็กโทรดทองด้วยสีเหลืองและแสดงแผ่นควอตซ์บางด้วยสีขาว มุมมองด้านข้างของควิซีเอ็มแสดงให้เห็นแผ่นควอตซ์บางอยู่ระหว่างกลางซึ่งประกบด้วยอิเล็กโทรดทองที่ด้านบนและล่างของแผ่นควอตซ์

ควิซีเอ็มเซนเซอร์จะตรวจวัดมวลที่สะสมอยู่ที่พื้นผิวอิเล็กโทรดโดยอาศัยปรากฏการณ์เพียโซอิเล็กทริก (piezoelectric effect) ^[18] ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงพลังงานทางกลไปเป็นพลังงานไฟฟ้าเมื่อควอตซ์ซึ่งเป็นวัสดุเพียโซอิเล็กทริกถูกความเค้นกดภายนอก (compressive stress) กระทำ จะทำให้เกิดความต่างศักย์ระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสองในทางกลับกัน เมื่อป้อนศักย์ไฟฟ้าสลับแก่ควอตซ์โดยต่อกับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่เหมาะสมจะเกิดการออสซิลเลตในทิศทางขนานกันกับพื้นผิวของแผ่นควอตซ์ (คลื่นเฉือน) ด้วยความถี่ที่จำเพาะที่เรียกว่าความถี่เรโซแนนท์ (resonant frequency) ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF) ของการออสซิลเลตของควอตซ์และการเปลี่ยนแปลงมวล (Δm) บนพื้นผิวควอตซ์ ได้อธิบายไว้โดยสมการของ Sauerbrey (สมการ 2.1) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควอตซ์ที่ออสซิลเลต เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงมวลที่พื้นผิวควอตซ์ ^[19]



รูปที่ 2.2 โครงสร้างควิซีเอ็มเซนเซอร์

สมการ 2.1:

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \left(\frac{\Delta m}{A} \right)$$

- ซึ่ง f_0 คือความถี่รีโซแนนท์มูลฐาน (Hz),
 Δf คือการเปลี่ยนแปลงความถี่ (Hz),
 A คือพื้นที่ของอิเล็กโทรด (cm^2),
 ρ_q คือความหนาแน่นของควอตซ์คริสตัล (2.648 g/cm^3),
 μ_q คือโมดูลัสของแรงเฉือนของหน้าตัด ($\mu_q = 2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm s}^2$),
 Δm คือมวลที่สะสมอยู่ต่อหน่วยพื้นที่ของพื้นผิวควอตซ์คริสตัล (g)

สมการ Sauerbrey จะใช้ได้เมื่อมวลของวัสดุที่สะสมบนพื้นผิวเซนเซอร์น้อยกว่ามวลของควอตซ์ และวัสดุนั้นมีความแข็งเกร็ง (rigid) และมีความเป็นเอกรูปตลอดพื้นผิวเซนเซอร์ สมการของ Sauerbrey จะใช้ไม่ได้เมื่อมวลมีความอ่อนนิ่ม (soft) หรือมีสภาพยืดหยุ่นแบบหน่วงหนืด (viscoelasticity)

K.K. Kanazawa และ J.G. Gordon II ได้เสนอสมการซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงความถี่เมื่อด้านหนึ่งของควอตซ์คริสตัลสัมผัสกับของเหลวในปี 1985 ^[20] ดังนี้:

สมการ 2.2:

$$\Delta f = -f_q^{3/2} \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{\pi \rho_q \mu_q}}$$

- ซึ่ง Δf คือการเปลี่ยนแปลงความถี่ (Hz),
 f_q คือความถี่รีโซแนนท์มูลฐานของควอตซ์คริสตัล,
 ρ_q คือความหนาแน่นของควอตซ์คริสตัล (2.648 g/cm^3),
 μ_q คือโมดูลัสของแรงเฉือนของหน้าตัด ($\mu_q = 2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm s}^2$),
 ρ_l คือความหนาแน่นของของเหลวที่สัมผัสกับควอตซ์คริสตัล,
 η_l คือความหนืดของของเหลวที่สัมผัสกับกับควอตซ์คริสตัล

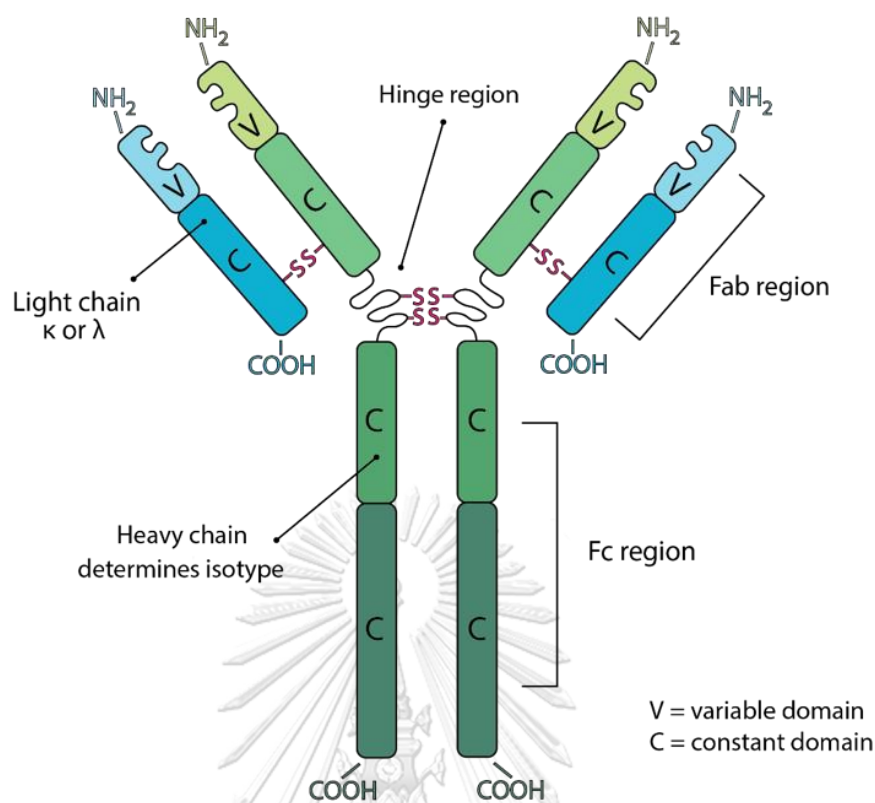
อย่างไรก็ดี กรณีการตรวจวัดการจับกันของแบคทีเรียกับแอนติบอดีในสภาวะของเหลวของวิทย์านพบนนี้สารทั้งสองไม่เป็นวัตถุแข็งเกร็ง (rigid body) อีกทั้งสารทั้งสองอยู่ในรูปสารละลายที่มีความ

หนืด การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่ (Δf) กับความเข้มข้นหรือมวลของ แบนคทีเรียจึงอาจไม่เป็นไปตามสมการที่ 2.1 และ 2.2

โดยทั่วไปแล้ว การใช้งานไบโอเซนเซอร์เพื่อการตรวจวัดยังต้องอาศัยสารชีวภาพที่มีความจำเพาะ กับเชื้อแบคทีเรีย หัวข้อต่อไปจะกล่าวถึงสารชีวภาพที่ใช้ประดิษฐ์เซนเซอร์ในการศึกษานี้

2.3 สารชีวภาพ

แอนติบอดีเป็นโมเลกุลโกลโคโปรตีนที่มีชื่อว่าอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาว ^[13] แอนติบอดีเป็นส่วนประกอบทางชีวภาพของไบโอเซนเซอร์ที่ถูกใช้งานมากที่สุดชนิดหนึ่งเนื่องจากมีความจำเพาะสูงและหาได้ง่าย รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของแอนติบอดี แอนติบอดีประกอบด้วยสาย เพปไทด์สี่สาย ได้แก่ สายหนัก (heavy chain) สองสาย (สีเขียว) และสายเบา (light chain) สองสาย (สีฟ้า) สายเพปไทด์เหล่านี้เชื่อมต่อเข้าด้วยกันโดยพันธะนอนโคเวเลนต์และพันธะไดซัลไฟด์ ^[21] สายเบาแบ่ง ออกเป็นเป็นสายแคปปา (κ) หรือแลมบ์ดา (λ) สายหนักจะเป็นส่วนกำหนดไอโซไทป์ของแอนติบอดี ทั้ง สายเบาและสายหนักประกอบด้วยโดเมนแปรผัน (variable domain) ที่มีปลายอะมิโน (NH_2) หนึ่งโดเมน และโดเมนคงที่ (constant domain) ที่มีปลายคาร์บอกซิล (COOH) หนึ่งโดเมนขึ้นไป สายเบาทั้งสองมี โดเมนคงที่เพียงโดเมนเดียว ในขณะที่สายหนักมีโดเมนคงที่สามหรือสี่โดเมน สายหนักที่มีโดเมนคงที่สาม โดเมนมีแนวโน้มที่จะรวมส่วนบานพับ (hinge region) ระหว่างโดเมนคงที่ที่หนึ่งและที่สอง ^[22]



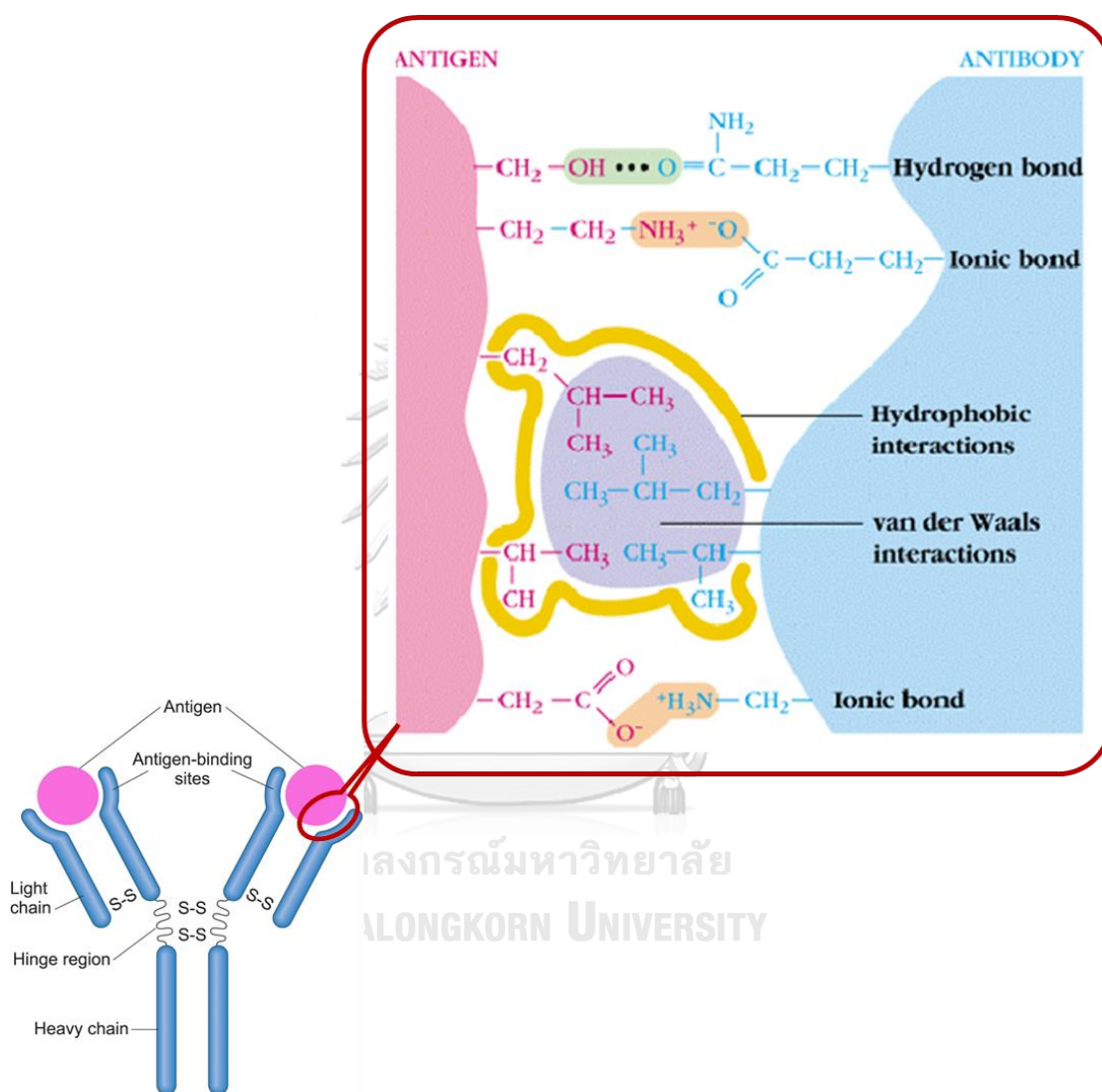
รูปที่ 2.3 โครงสร้างแอนติบอดี

(จาก <https://bxccl.com/antibody-structure/>)

โครงสร้างแอนติบอดียังแบ่งออกเป็นคริสตัลไลเซเบิลแฟกเมนต์ (crystallisable fragment, F_c) ซึ่งเป็นส่วนฐานของตัว “Y” ส่วนบานพับของสายหนักรมีความยืดหยุ่นช่วยให้อีพิโทปของแอนติบอดีจับแอนติเจน (antigen-binding fragment, F_{ab}) ได้ง่าย ส่วนนี้มีโดเมนแปรผัน (variable domain) ซึ่งทำให้แอนติบอดีมีความจำเพาะกับแอนติเจน โดยโดเมนแปรผันจะแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด ความจำเพาะสูงและสัมพรรคภาพที่แข็งแกร่งกับแอนติเจนที่จำเพาะของแอนติบอดีทำให้แอนติบอดีเป็นสารชีวภาพในอุดมคติทางไบโอเซนเซอร์

2.4 อันตรกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี

การจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นอันตรกิริยาชนิดนอนโคเวเลนต์ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 อันตรกิริยาชนิดนอนโคเวเลนต์

(ดัดแปลงจาก Su Dong K และคณะ, 2003 ^[23])

พันธะไฮโดรเจนเกิดเมื่อแอนติเจนและแอนติบอดีอยู่ในบริเวณที่ใกล้เคียงกันมาก เป็นแรงยึดเหนี่ยวที่ค่อนข้างอ่อน ก่อรูปอยู่ระหว่างหมู่ไฮโดรฟิลิก เช่น หมู่ OH และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ พันธะไอออนิกหรือแรงทางประจุไฟฟ้าเป็นอันตรกิริยาระหว่างประจุกับประจุ โดยเป็นผลจากการดึงดูดกันระหว่างหมู่ไอออนประจุตรงข้ามกันของสายโปรตีนสองสาย เช่น หมู่อะมิโนที่มีประจุ (NH_3^+) บนไลซีนในแอนติเจน และหมู่คาร์บอกซิลที่

มีประจุ (COO⁻) บนแอสพาทเต เรซิดิวในแอนติบอดี แรงทางประจุไฟฟ้าอาจเป็นแรงดึงดูด หรือแรงผลักได้ ขึ้นกับชนิดประจุที่มี ^[24] อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกเป็นแรงระหว่างหมู่ไฮโดรโฟบิก เช่น หมู่ด้านข้างของแวลีน ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน มีการประมาณว่าอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกมีส่วนทำให้เกิดความแข็งแรงของ อันตรกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีมากถึง 50% ^[25] แรงแวนเดอร์วาลส์จะขึ้นกับอันตรกิริยา ระหว่างหมอกอเล็กตรอนที่แวลล์อิมโมเลกุลแอนติเจนและแอนติบอดี

2.5 งานวิจัยก่อนหน้า

มีรายงานเกี่ยวกับชุดทดสอบ (chairside test kits) สำหรับการตรวจวัดจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งอาศัย หลักการตรวจวัดที่แตกต่างกันซึ่งแพทย์อาจใช้ชุดทดสอบเหล่านี้เพื่อประเมินการติดเชื้อเบื้องต้น เพื่อ ประเมินระดับความรุนแรง หรือเพื่อระบุกลุ่มของแบคทีเรียจากสารคัดหลั่งที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในเนื้อเยื่อที่ อักเสบ หัวข้อนี้ได้แสดงตัวอย่างชุดตรวจไว้ดังนี้

ชุดทดสอบ Evalusite อาศัยการตรวจวัดแอนติเจนของเชื้อ *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* และ *Prevotella intermedia* ด้วยเทคนิค sandwich enzyme immunoassay ที่ใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดี ^[26] ข้อด้อยของเทคนิคนี้คือต้องผ่านกระบวนการเพื่อการ ตรวจวัดหลายขั้นตอน และผลการตรวจวัดที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของสีทำให้ประเมินค่าในเชิง ปริมาณได้ไม่แม่นยำ

ชุดตรวจ PerioSafe[®] และ ImplantSafe[®] อาศัยการจดจำอีพิโทปของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinase, MMP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลายคอลลาเจนที่อยู่ในของเหลวช่องเหงือกและ น้ำลาย มีการใช้เอนไซม์ matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) เป็นตัวชี้วัดการเกิดการสลายตัวของ เนื้อเยื่อในช่องปากของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง มีรายงานว่าชุดตรวจนี้ไม่สามารถแยกความ แตกต่างของไอโซฟอร์มของเอนไซม์ได้ เนื่องจากการตรวจอาศัยการจดจำที่อีพิโทปของ MMP เท่านั้น ^[27] ดังนั้นการตรวจพบ MMPs ในของเหลวช่องเหงือกด้วยเทคนิค ELISA นี้ จึงไม่ได้สะท้อนให้เห็นสถานะที่ ชัดเจนของโรค ^[28]

ชุดทดสอบ Perioscan ใช้สำหรับการตรวจเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มทริปซิน (trypsin-like enzyme) ซึ่งได้แก่ *Bacteroides forsythus*, *Pg*, *Treponema denticola* และเชื้อในสปีชีส์ *Capnocytophaga* เมื่อผู้ป่วยมีเชื้อในกลุ่มนี้ จะมีเอนไซม์ทริปซินในปริมาณสูง เมื่อตรวจวัดจะใช้สาร สังกะเรทที่เป็นซับสเตรทของเอนไซม์ทริปซินที่มีชื่อว่า N-เบนโซอิล-DL-อาร์จินีน-2 2-แนฟธิลามิด (N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide, BANA) ^[29] จากนั้นติดตามปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นด้วย

การเปลี่ยนแปลงสี ข้อด้อยของเทคนิคนี้คือไม่สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคที่ไม่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มทริปซินได้ และผลการตรวจวัดที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงสีทำให้ประเมินค่าในเชิงปริมาณได้ไม่แม่นยำ

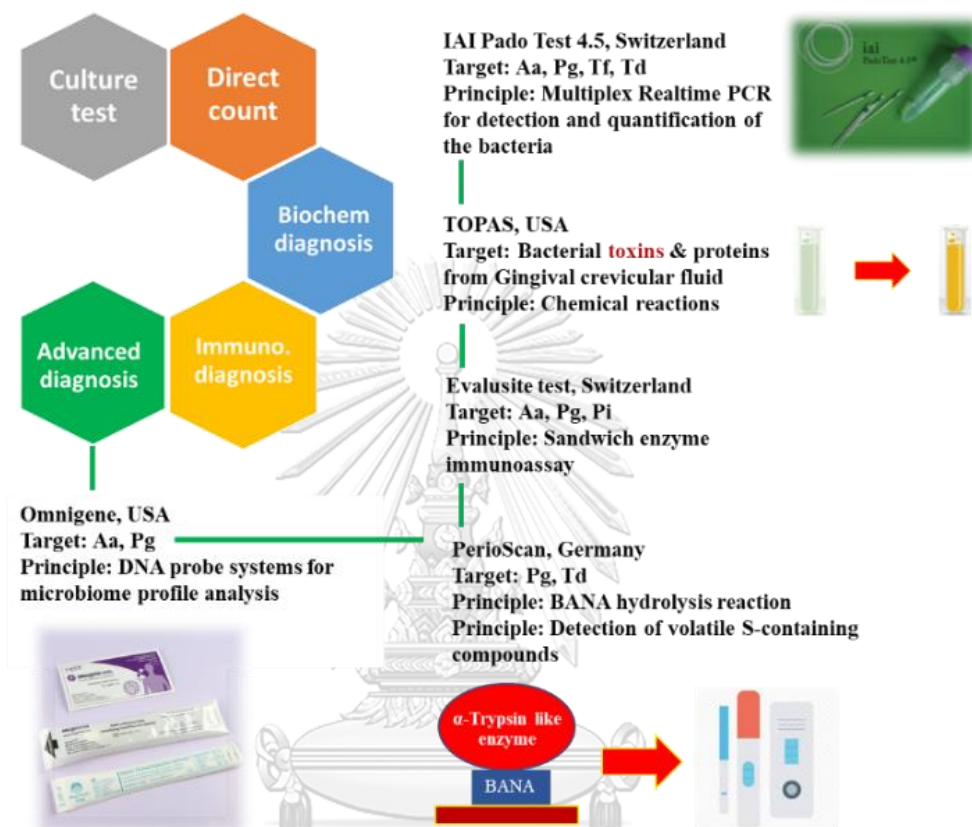
ชุดทดสอบ Omnigene อาศัยโพรบ DNA โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย สกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรีย และตรึง DNA ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทำการไฮบริไดเซชันด้วยโพรบ DNA ที่ออกแบบให้จำเพาะกับชนิดแบคทีเรียที่ตรวจ ซึ่งโพรบ DNA นี้มีส่วนประกอบของไอโซโทปกัมมันตรังสีของฟอสฟอรัส (^{32}P) จากนั้นจึงตรวจวัดเชื้อ *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* ได้จากฟิล์ม X-ray ข้อด้อยของชุดตรวจนี้คือเมื่อใช้ตัวอย่างทางคลินิก (clinical specimen) แล้วพบว่าการตรวจเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* มีความไวต่ำเพียง 21% และความจำเพาะ 83%

ชุดทดสอบ IAI Pado Test 4.5 อาศัยหลักการเดียวกันกับชุดทดสอบ Omnigene แต่ใช้โพรบ RNA ในการเกิดไฮบริไดเซชันอย่างจำเพาะกับแบคทีเรียชนิด *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia* และ *T. denticola* โพรบที่ใช้จะถูกออกแบบมาเพื่อให้จับกับลำดับอนุกรมยีน 16S rRNA ที่ประมวลรหัส rRNA ในหน่วยย่อยของไรโบโซมของแบคทีเรีย จากนั้นจึงตรวจผลจากฟิล์ม X-ray ข้อด้อยของชุดตรวจนี้คือมีจุดเริ่มของการตรวจวัด (threshold) ต่ำ

นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจทางชีวเคมี เช่น ชุดตรวจ Prognos-Stik ที่ตรวจการมีอยู่ของเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอส (serine protease) อีลาสเทส (elastase) ในของเหลวช่องเหงือก หรือชุดตรวจ Perio-Check (Ac Tech) เช่น ชุดตรวจสำหรับตรวจหาเอนไซม์โปรตีเอส (protease) เช่น คอลลาจีเนส (collagenase), อีลาสเทส และโปรตีนเอส (proteinase) ในตัวอย่างของเหลวช่องเหงือกจากผู้ป่วย โดยเอนไซม์โปรตีเอสเป็นตัวบ่งชี้การอักเสบในเนื้อเยื่อเหงือกและการติดเชื้อปริทันต์อักเสบ ชุดตรวจนี้ใช้ซัสเตรทของเอนไซม์นั้น ๆ ซึ่งติดฉลากด้วยสารสีอยู่ด้วย และทำให้ซัสเตรทติดอยู่ที่แผ่นตรวจ (strip test) เมื่อขบมแผ่นตรวจนี้กับตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งคัดหลั่งเอนไซม์เหล่านี้ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซัสเตรท และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี^[12] ข้อด้อยของชุดตรวจชนิดนี้คือยังไม่สามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณได้ และมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ PMN คอลลาจีเนสต่ำ

ชุดตรวจ TOPAS (Toxicity Prescreening ASsay) ตรวจสารพิษจากแบคทีเรียและเอนไซม์โปรตีเอสจากในตัวอย่างของเหลวช่องเหงือก ติดตามผลจากการเปลี่ยนสีเพื่อบ่งปริมาณความเข้มข้นของสารพิษดังกล่าว หากแบคทีเรียก่อโรคมียีนจำนวนมากและมีแอกทิวิตีสูงก็ยิ่งทำให้สารพิษมีความเข้มข้นสูงตามไปด้วยและแสดงผลการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลือง ข้อด้อยของชุดตรวจชนิดนี้คือยังไม่สามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณได้

ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการนิยมใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เป็นเทคนิคมาตรฐานเพื่อระบุการติดเชื้อโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย เทคนิคนี้ต้องอาศัยการระบุตำแหน่งยีนเป้าหมายและการใช้ไพรเมอร์อีกทั้งต้องมีขั้นตอนการสกัด DNA ^[30]



รูปที่ 2.5 วิธีการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกสำหรับการตรวจแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน

(ดัดแปลงจาก Dhalla N และคณะ 2015 ^[31])

เทคโนโลยีไบโอเซนเซอร์ได้ถูกพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพดีเหนือข้อจำกัดต่าง ๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้น ^[32] นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับต้นทุนกับประสิทธิภาพ และความน่าเชื่อถือของอุปกรณ์แล้วบ่งชี้ว่า คิวซีเอ็มเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่มีความเหมาะสม มีความน่าสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ทางเคมีและชีวภาพเนื่องจากเป็นเซนเซอร์ที่มีราคาต่ำ และมีความไวสูง ในขณะที่การตรวจวัดด้วยชุดตรวจทั่วไปใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

จากการศึกษาก่อนหน้า มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่าง (sample) ในลักษณะต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิจัยทางชีววิทยาของเซลล์

Ramkumar S และคณะ รายงานการใช้ควิซซีเอ็มเซนเซอร์ชนิด 27 เมกะเฮิร์ตซ์ เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน α A-คริสตัลลินชนิดมิวแทนท์ กับโปรตีน α B-คริสตัลลิน แบบเรียลไทม์^[33] ผลการศึกษาแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซซีเอ็มเซนเซอร์อันเกิดจากอันตรกิริยาของ α A-คริสตัลลิน กับโปรตีน α B-คริสตัลลิน ที่มีการเปลี่ยนแปลงความถี่สูงถึง -350 เฮิร์ตซ์ คิดเป็นปริมาณการจับกัน 10.5 นาโนกรัม และในขณะที่กลุ่มที่เกิดอันตรกิริยาดำจะมีการเปลี่ยนแปลงความถี่ในช่วง -150 ถึง -220 เฮิร์ตซ์ หรือเทียบเป็นปริมาณการจับ 4.9 ถึง 7.5 นาโนกรัม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ควิซซีเอ็มเซนเซอร์เป็นเครื่องมือในการบ่งชี้อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลได้

Joshi T และคณะ รายงานการใช้ QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation) ชนิดความถี่รีโซแนนท์ 5 เมกะเฮิร์ตซ์^[34] เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับอันตรกิริยาของอนุพันธ์อะมิโนไกลโคไซด์ (คานามัยซิน A และนีโอมัยซิน B) กับเมมเบรนเลียนแบบของแบคทีเรีย (bacterial mimetic membrane) ได้แก่ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) และ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (sodium salt) (DMPG) (DMPC/DMPG ในอัตราส่วน 4:1) ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค QCM-D นั้น การลดลงของความถี่ (Δf) หมายถึงการเพิ่มมวลบนพื้นผิวควิซซีเอ็มเซนเซอร์ และการเพิ่มขึ้นของค่าตัวแปรการสูญเสีย (dissipation factor, ΔD) หมายถึงชั้นลิปิดไบเลเยอร์มีความแข็งเกร็งลดลง (less rigid) คลายตัว (loosening) หรือบวมหรือหนาขึ้น (thickening) เทคนิคนี้ให้ข้อมูลเชิงคุณภาพเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมมเบรน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์อะมิโนไกลโคไซด์ออกฤทธิ์ทำลายเมมเบรนผ่านกลไกสองขั้นตอน เริ่มจากการแทรกตัวเข้าไปในเมมเบรนอย่างรวดเร็วและเมื่อถึงค่าความเข้มข้นวิกฤตจะทำให้เมมเบรนเกิดการแตกตัว^[34] การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค QCM-D นี้ช่วยให้สามารถเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของยาปฏิชีวนะที่มีต่อสภาพเมมเบรนของแบคทีเรีย โดยติดตามการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและเมมเบรน และการเปลี่ยนแปลงสภาพความแข็งแรงของเมมเบรนนั้นแบบเรียลไทม์

Fukusho S. และคณะ รายงานการใช้ควิซซีเอ็มเซนเซอร์ชนิดความถี่รีโซแนนท์ 27 เมกะเฮิร์ตซ์ เพื่อวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเพปไทด์กับ RNA แอปตาเมอร์ โดยออกแบบเพปไทด์ให้มีโครงสร้างเป็นเกลียวและมีอาร์จินีนมากเพื่อให้คล้ายโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของไวรัส (Rev protein) ของ HIV-1 และตรึงเพปไทด์นี้กับพื้นผิวควิซซีเอ็มเซนเซอร์ ศึกษาผลการจับกับ RNA ชนิดต่าง ๆ เพื่อคัดกรอง RNA ที่จับกับเพปไทด์ชนิดนี้ได้มากที่สุด ประเมินความชอบจับจากการเปลี่ยนแปลงมวล และหาค่าคงที่การรวมตัว (association constant) ของ RNA กับเพปไทด์^[35] ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ควิซซีเอ็มเซนเซอร์ในการคัดกรอง RNA ที่มีความชอบจับกับเพปไทด์ชนิดนี้ได้ โดย RNA ที่ถูกคัดเลือก (ชนิด A-3) มี

ค่าคงที่การรวมตัวกับเพปไทด์นี้เท่ากับ 7.2×10^7 โมลาร์⁻¹ ซึ่งเท่ากับหรือสูงกว่าค่าคงที่การรวมตัวของเพปไทด์ชนิด Rev กับลำดับ Rev response element (RRE) หรือแอนตาดเมอร์ชนิดอื่นจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ออกแบบและพัฒนาสำหรับยับยั้งการติดเชื้อจาก RNA ไวรัสได้

Köβlinger C และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของควิซีเอ็มเซนเซอร์และเอสพัวร์เซนเซอร์ในการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดพื้นผิวและการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี งานวิจัยนี้ใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ชนิด 20 เมกะเฮิร์ตซ์ เอสพัวร์เซนเซอร์ที่มีชั้นทอง 50 นาโนเมตร ที่มีชั้นไทเทเนียม 5 นาโนเมตร อยู่บนชิพซิลิกอน และใช้แหล่งกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่น 1300 นาโนเมตร ระบบที่ใช้อัตราการไหลของของไหล 30 ไมโครลิตร นาที⁻¹ โดยศึกษาการจับแบบไม่จำเพาะของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) กับผิวทอง, การเกิดอันตรกิริยาระหว่างโบวีนซีรัมอัลบูมินกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันระหว่างซีรัมกับแอนติเจนของเชื้อ HIV (recombinant HIV gp41 antigen)^[36] เมื่อได้ทำการทดสอบแล้ว ได้สรุปผลเปรียบเทียบข้อมูลเชิงปริมาณของการตรวจวัดด้วยเทคนิคควิซีเอ็มและเอสพัวร์ไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบปริมาณการตรวจวัดที่ได้จากเทคนิคควิซีเอ็มและเอสพัวร์

ปริมาณการตรวจวัด	เทคนิคควิซีเอ็ม	เทคนิคเอสพัวร์
ความไว (thickness sensitivity)	180 เฮิร์ตซ์/นาโนเมตร	26.3 มิลลิกรัม/นาโนเมตร
ขีดจำกัดการตรวจของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	20 นาโนโมลาร์	23 นาโนโมลาร์
ขีดจำกัดการตรวจของซีรัม	1:1000	1:1000
ความไวของการตรวจเชิงภูมิคุ้มกันสำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี	0.5 นาโนโมลาร์/เฮิร์ตซ์	3 นาโนโมลาร์/มิลลิกรัม
ระยะ penetration depth ของคลื่นในตัวกลาง	126 นาโนเมตร	150 นาโนเมตร
พื้นที่ที่มีความไว	5 มิลลิเมตร	5×10^{-3} มิลลิเมตร
สัญญาณต่อสัญญาณรบกวน	2.3	0.45

อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดที่มีการเปลี่ยนแปลงความหนืดเช่นในวิทยานิพนธ์นี้ ควิซีเอ็มเซนเซอร์มีความเหมาะสมมากกว่าเทคนิคเอสพัวร์ เนื่องจากความถี่รบกวนจากควิซีเอ็มเซนเซอร์ขึ้นกับความหนืด

และความหนาแน่นของตัวกลางที่เซนเซอร์สัมผัส ได้แสดงการเปรียบเทียบวิธีการตรวจเซลล์แบคทีเรียเพิ่มเติมไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ชนิดต่าง ๆ ในการตรวจแบคทีเรีย

เชื้อก่อโรคเป้าหมาย	ทรานสดิวเซอร์	วิธีการตรวจรู้	ขีดจำกัดการตรวจ	เอกสารอ้างอิง
<i>P. gingivalis</i>	ฟลูอิดิกส์ อิเล็กทรอนิกส์	ไม่มีการตรึง, อ่านค่าอิมพีแดนซ์ระหว่างการไหล ของสารตัวอย่าง	10^3 เซลล์/มล.	[37]
<i>E. coli</i>				
แบคทีเรียริตวีสซัลเฟต	กลาสซีคาร์บอน อิเล็กทรอนิกส์	วิเคราะห์ศักย์ไฟฟ้า, แบคทีเรียต้องผ่านกระบวนการ เฉพาะ	2.3×10 ถึง 2.3×10^7 CFU/มล.	[38]
<i>E. coli</i>	ขั้วไฟฟ้าคาโบลเมล	ตรวจกระแสที่แอนติบอดีทุติยภูมิ โดยใช้กลูโคสออกซิเดส	3×10^1 ถึง 3.2×10^6 CFU/มล.	[39]
<i>S. oneidensis</i>	SERS	อนุภาคนาโนซิลเวอร์แบบแซนวิช การจับกันของสารตรวจวัดที่ตรึงอยู่ บนไฟเบอร์นำแสง	10^6 เซลล์/มล.	[40]
<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	SPR	อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีเลคติน	1.5×10^4 CFU/มล.	[41]
<i>E. coli</i> O157:H7	QCM	แอนติบอดีสำหรับจับ, อนุภาคนาโนที่มีแอนติบอดีสำหรับ ขยายสัญญาณ	10^6 เซลล์/มล.	[42]
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	QCM	ตรึงแอนติบอดีโดยใช้ 11-MUA ร่วมกับ EDC/NHS	การศึกษานี้	

คำย่อ: SERS: พื้นผิวขยายสัญญาณรามัน (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy); SPR: เซอร์เฟสพลาสมอนรีโซแนนซ์ (Surface Plasmon Resonance); QCM: ควอตซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ (Quartz Crystal Microbalance); CFU: โคลนีฟอร์มมิงยูนิต (Colony forming unit)

ในวิทยานิพนธ์นี้จะพัฒนาควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อตรวจแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ชนิด *A. actinomycetemcomitans* โดยใช้ 11-เมอร์แคปโตอันเดคะโนอิกแอซิด (11-Mercaptoundecanoic acid, 11-MUA) ในการปรับสภาพพื้นผิวอิเล็กโทรดทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อให้สามารถตรึงแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพในการจับกับแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ ดังรายละเอียดที่จะกล่าวถึงในบทต่อไป



บทที่ 3 ระบบตรวจวัด

ในบทนี้จะกล่าวถึงรายละเอียดและองค์ประกอบของระบบที่ใช้ในการตรวจวัดแบคทีเรีย ระบบตรวจวัดนี้ถูกออกแบบให้เหมาะสำหรับการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการตรวจวัดแบคทีเรีย ในภูมิภาคของเหลว โดยระบบตรวจวัดจะติดตามการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่อยู่ในระบบของไหล ในตอนท้ายของบทนี้ได้แสดงผลทดสอบการใช้งานเบื้องต้นของระบบตรวจวัดนี้

3.1 การออกแบบระบบ

ระบบตรวจวัดที่ใช้ประกอบด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์ ระบบของไหล และระบบ NAPiCOS® การออกแบบและการเลือกใช้ระบบย่อยข้างต้นนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถตรวจวัดแบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์ในภูมิภาคของเหลว ควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ใช้เป็นชนิดที่มีความไวสูง มีความถี่รีโซแนนซ์ 30 เมกะเฮิรตซ์ และควิซีเอ็มเซนเซอร์ทำงานอยู่ในระบบของไหล โดยใช้ระบบของไหลเพื่อการลำเลียงและควบคุมการเคลื่อนที่ของของเหลวในระบบตรวจวัด การใช้ระบบตรวจวัดในภูมิภาคของเหลวเหมาะสำหรับศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดี เนื่องจากสภาพการเกิดปฏิกิริยาใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ระบบ NAPiCOS® เป็นระบบตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์โดยเก็บข้อมูลสัญญาณอย่างต่อเนื่องเป็นโปรไฟล์การเปลี่ยนแปลงความถี่ตามเวลา ช่วยให้ข้อมูลความถี่สำหรับใช้ในการศึกษาพฤติกรรมการจับกันและสามารถวิเคราะห์กลไกการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแบคทีเรียเป้าหมายได้

3.1.1 ควิซีเอ็มเซนเซอร์

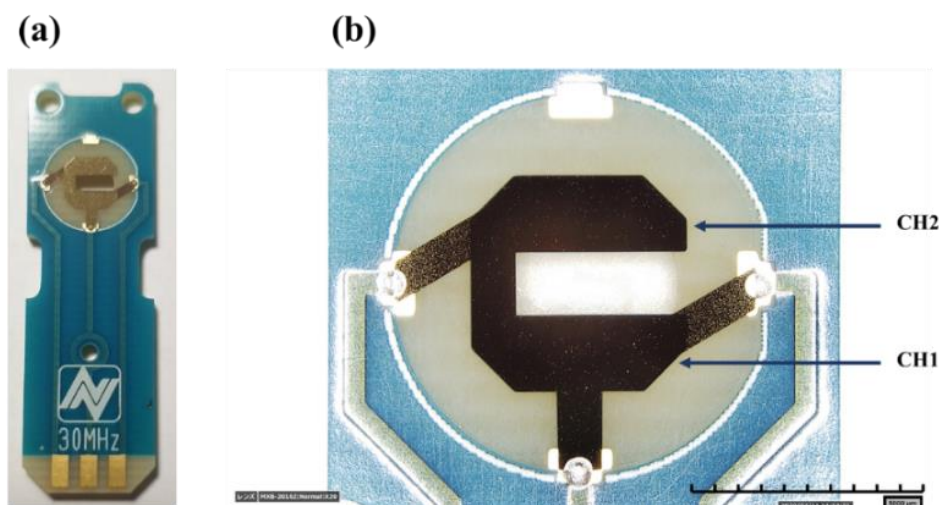
จากหลักการทำงานของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 จะทราบได้ว่าควิซีเอ็มเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่มีความไวที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณตัวอย่างในระดับนาโนกรัมได้ จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่ามีการใช้งานการใช้ควิซีเอ็มในการตรวจปริมาณแบคทีเรียมาบ้างแล้ว ^[43-46] อย่างไรก็ตามการศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้นอกจากจะทำการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียในละลายตัวอย่างแล้ว ยังต้องการศึกษาอันตรกิริยาทางชีวโมเลกุลระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดีผ่านการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์อีกด้วย

โดยทั่วไปแล้ว ควิซีเอ็มเซนเซอร์จะมีจำนวนอิเล็กโทรดหนึ่งอิเล็กโทรดบนหนึ่งด้านของควอตซ์คริสตัลหนึ่งชิ้น ในที่นี้จะเรียกว่าเป็น ควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบช่องสัญญาณเดียว ข้อจำกัดประการหนึ่งของควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบช่องสัญญาณเดียว คือสัญญาณที่ตรวจวัดได้เป็นผลรวมระหว่างสัญญาณจริงของการตรวจวัด และสัญญาณที่มาจากสิ่งแวดล้อมหรือตัวกวน เช่น หากขณะตรวจวัดมีการกระเทือนจากการไหล

ของของเหลวในระบบ ค่าความถี่ที่ตรวจวัดได้จะเป็นรวมผลระหว่างสัญญาณจริงและผลจากการกระเทือนนั้นด้วย แม้ผู้ใช้ได้พยายามลดปัจจัยรบกวนต่าง ๆ ขณะทำการตรวจวัดให้น้อยที่สุด แต่ด้วยเซนเซอร์ชนิดนี้มีความไวสูงมาก การรบกวนแม้เพียงเล็กน้อยจึงมีผลต่อสัญญาณตรวจวัด

เพื่อให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าสัญญาณจริงมากที่สุด เซนเซอร์ที่มีอิเล็กโทรดมากกว่าหนึ่งอิเล็กโทรดบนหนึ่งด้านของเซนเซอร์จึงถูกพัฒนาขึ้น โดยทั่วไปจะมี 2 อิเล็กโทรด อิเล็กโทรดหนึ่งจะถูกปรับแต่งเพื่อให้ออกสนองต่อเป้าหมายที่ต้องการวัดซึ่งจะเรียกว่าอิเล็กโทรดวัด (sensing electrode) ในขณะที่อีกอิเล็กโทรดจะไม่มีการปรับแต่งเพื่อใช้ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทั่วไป ซึ่งจะเรียกว่าอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) โดยทั้งสองอิเล็กโทรดของควิซีเอ็มเซนเซอร์จะสัมผัสกับสารตัวอย่างภายใต้ระบบเดียวกันและในเวลาเดียวกัน ทำให้อิเล็กโทรดวัดจะตอบสนองทั้งต่อสารเป้าหมายและสภาพแวดล้อมของการตรวจวัด ในขณะที่อิเล็กโทรดอ้างอิงนั้นจะตอบสนองเฉพาะสภาพแวดล้อมเท่านั้น ดังนั้นเมื่อนำสัญญาณของทั้งสองมาลบกันก็จะสามารถหักลบสัญญาณที่เกิดจากปัจจัยรบกวนใด ๆ จากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมออกไปได้

การศึกษานี้เลือกใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์ชนิดสองช่องสัญญาณ ที่มีความถี่เรโซแนนซ์ 30 เมกะเฮิร์ตซ์ แบบสองช่องสัญญาณ(รุ่น PSA-SB-3002T, Nihon Dempa Kogyo Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น) รูปที่ 3.1(a) แสดงควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีสองอิเล็กโทรดอยู่บนชิพควอตซ์คริสตัล (quartz crystal) ขึ้นเดียวกัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.87 มิลลิเมตร เนื่องจากชิพควอตซ์คริสตัลมีความบางมาก จึงเปราะและแตกหักได้ง่าย จึงต้องติดตั้งชิพควอตซ์คริสตัลอยู่บนส่วนรองรับหรือซับสเตรท (วัสดุแผ่นสีฟ้า) อีกชั้นหนึ่ง และส่วนรองรับหรือซับสเตรทนี้ยังเป็นส่วนที่มีการเชื่อมต่อทางไฟฟ้าสำหรับต่อควิซีเอ็มเซนเซอร์เข้ากับหน่วยตรวจวัดความถี่ของระบบ NAPICOS® รูปที่ 3.1(b) แสดงพื้นผิวของช่องสัญญาณทั้งสองของควิซีเอ็มเซนเซอร์ คำว่า “CH1” และ “CH2” ชี้บอกตำแหน่งบริเวณผิวทองของช่องสัญญาณที่ 1 และช่องสัญญาณที่ 2 สำหรับใช้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่พื้นผิวของควิซีเอ็มเซนเซอร์นี้



รูปที่ 3.1 คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ใช้ในการศึกษา

นอกจากนี้ คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ใช้ในการประดิษฐ์ มีขนาดเล็ก ทำให้ลดปริมาณตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ และให้การตอบสนองการตรวจวัดที่รวดเร็ว ส่งผลให้การตรวจวัดทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น^[47]

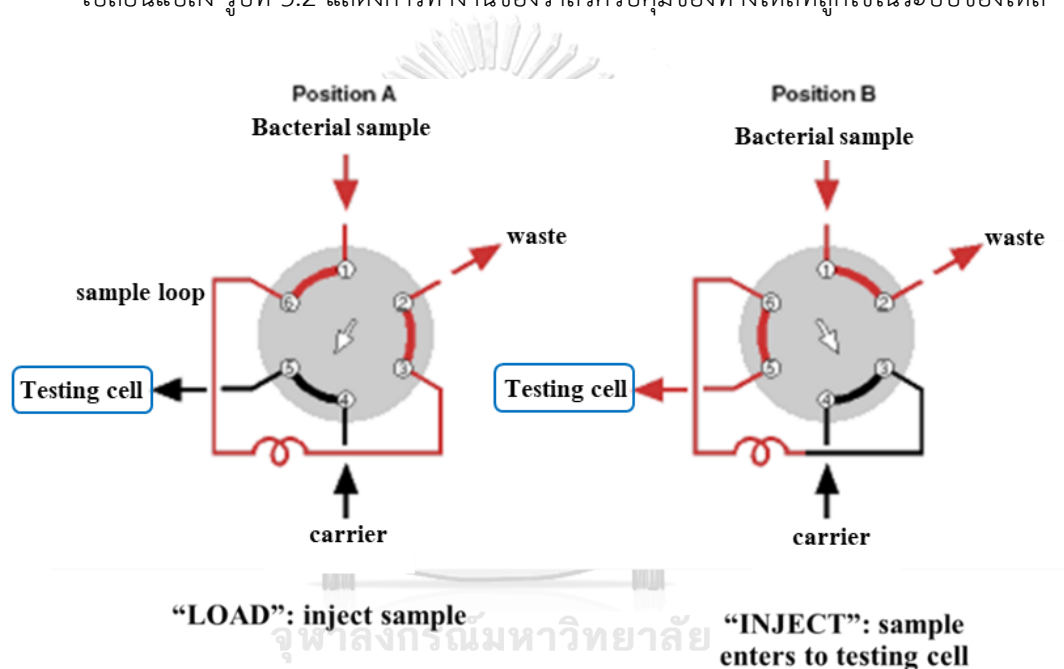
3.1.2 ระบบของไหล

การศึกษานี้เลือกใช้ไซรินจ์ปั๊มเป็นตัวขับเคลื่อนของเหลวเพื่อควบคุมการเคลื่อนที่ของมวลสารซึ่งรวมถึงเซลล์แบคทีเรียที่จะถูกตรวจวัดในระบบ ส่งผลให้เกิดการถ่ายเทมวลแบบการพา (convection) เป็นตัวแปรหลัก เนื่องจากแรงกระทำจากภายนอกที่ทำให้เกิดการพานั้นจะมีผลกระทบมากและเร็วกว่าผลจากการแพร่ (diffusion) ที่ต้องพึ่งพาความแตกต่างของความเข้มข้น และผลจากเคลื่อนย้าย (migration) ที่ต้องพึ่งผลของประจุไฟฟ้าของมวลสาร ทำให้การพาสามารถใช้ได้กับระบบที่ต้องการวัดความเข้มข้นต่ำ หรือใช้วัดสารที่มีประจุไฟฟ้าน้อย ๆ ได้ ระบบของไหลที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้ จึงประกอบด้วย:

1. **ปั๊ม** เป็นอุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหล ซึ่งก็คือการควบคุมการพาของสารในระบบ การศึกษานี้ใช้ไซรินจ์ปั๊ม (Harvard Apparatus, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทำงานควบคุมอัตราการไหลที่ 50 ไมโครลิตร/นาที่ เพื่อขับสารละลายและตัวอย่างแบคทีเรียให้เข้าไปถึงบริเวณตรวจวัดของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ ไซรินจ์ปั๊มนิยมใช้ในระบบของไหลที่ใช้สารปริมาณน้อย เนื่องจากมีความถูกต้องและแม่นยำมากกว่าเพอร์ิสแทลทิดปั๊ม^[48]
2. **ท่อนำสาร** ทำหน้าที่ลำเลียงของเหลวจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในระบบเพื่อเชื่อมต่อแต่ละหน่วยย่อยในระบบของไหลเข้าด้วยกัน การศึกษานี้ใช้ท่อที่ผลิตจากวัสดุพอลิอีเธอร์อีเธอร์คีโตน

(polyetheretherketone, PEEK) หรือเรียกว่าท่อ PEEK วัสดุชนิดนี้มีค่ายังมอดูลัส (Young's modulus) 3.6 จิกะปาสคาล และมีความทนต่อแรงดึง (tensile strength) 170 เมกะปาสคาล^[49] ทำให้มีความแข็งแรงทางกล อีกทั้งยังมีสภาพเป็นฉนวนไฟฟ้า มีความคงตัวทางอุณหภูมิ และมีความคงตัวทางเคมี^[50] ทำให้ไม่เสื่อมสภาพเมื่อผ่านการใช้งาน ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารเคมี และไม่รบกวนการตรวจวัด

3. วาล์วควบคุมช่องทางไหล (six-port valve) เป็นหน่วยสำหรับการควบคุมทิศทางการไหลของสารตัวอย่างให้เข้าสู่ห้องตรวจวัด (testing cell) โดยที่ไม่ให้อัตราการไหลของไหลในระบบเปลี่ยนแปลง รูปที่ 3.2 แสดงการทำงานของวาล์วควบคุมช่องทางไหลที่ถูกใช้ในระบบของไหล



รูปที่ 3.2 ผังแสดงการทำงานของวาล์วควบคุมช่องทางไหล

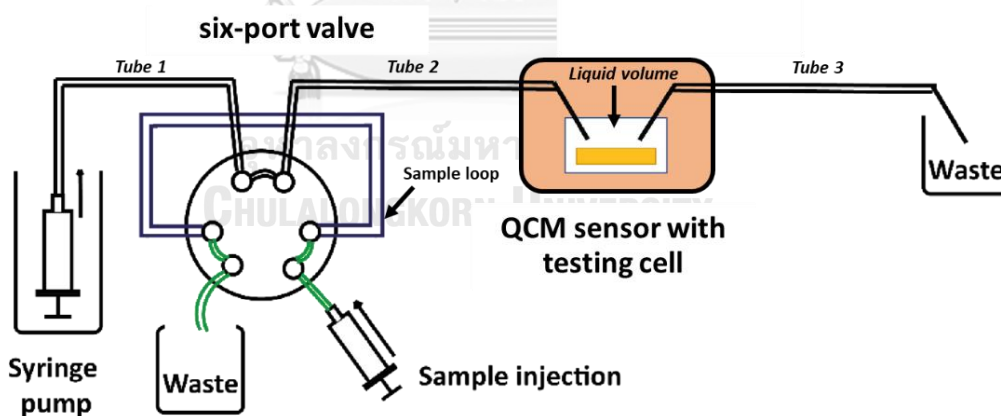
(ดัดแปลงจาก <https://www.vici.com/support/app/app11j.php>)

จากรูปจะเห็นว่าเมื่อวาล์วอยู่ที่ตำแหน่ง A เป็นช่วงของการไหลสารตัวอย่างแบบที่เรียกว่าเข้าป้อนอยู่ในรูปตามปริมาตรของลูบที่ใช้ ตัวอย่างส่วนเกินจะไหลผ่านลูบตัวอย่างออกไปยังส่วนรองรับของเสีย ในช่วงเวลานี้สารตัวอย่างจะไหลตรงไปยังห้องตรวจวัด เมื่อวาล์วถูกสลับไปที่ตำแหน่ง B ตัวอย่างแบบที่เรียกว่าในรูปตัวอย่างจะถูกผลักให้ไหลไปยังห้องตรวจวัด การฉีดตัวอย่างผ่านวาล์วควบคุมช่องทางไหลนี้มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของแบบที่เรียตัวอย่างไปยังห้องตรวจวัด ระบบการฉีดผ่านวาล์วควบคุมช่องทางไหลนี้มีส่วนช่วยควบคุมทิศทางการไหลของปริมาตรสารในระบบ และลดปัญหาที่เกิดจากการการแพร่ของสารตัวอย่างก่อนการวัด^[51] ได้

การออกแบบและการประกอบติดตั้งระบบของไหล

ในการตรวจวัดตัวอย่างแบบที่เรียในวิภูภาคของเหลวด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์ จะมีการใช้งานไซรินจ์ปั๊ม ท่อ และวาล์วควบคุมช่องทางไหลดังอธิบายไว้ข้างต้น ในระบบลักษณะนี้ ควิซีเอ็มเซนเซอร์จะถูกจัดวางไว้ภายในห้องตรวจวัดที่สารไหลผ่าน (flow-through testing cell) ดังแสดงในรูปที่ 3.3 และมีการเชื่อมต่อหน่วยย่อยต่าง ๆ เข้าด้วยกันเพื่อทำให้เกิดระบบของไหลสำหรับการตรวจวัดได้ ในงานวิจัยนี้ใช้ท่อ PEEK (เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 1/16" OD × เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.50 มิลลิเมตร ID, 6010-37505 GL Sciences Inc., ประเทศญี่ปุ่น) เป็นส่วนเชื่อมต่อระหว่างหน่วยต่าง ๆ โดยท่อ PEEK ถูกใช้ใน 4 ส่วนหลัก (แสดงไว้ในรูปที่ 3.3) ได้แก่

1. ท่อหมายเลข 1 จะเชื่อมต่อระหว่างวาล์วควบคุมช่องทางไหล (Rheodyne, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และไซรินจ์ปั๊ม
2. ลูบตัวอย่าง ที่มีปริมาตรภายในสำหรับตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร
3. ท่อหมายเลข 2 เชื่อมต่อระหว่างวาล์วควบคุมช่องทางไหล และช่องทางเข้า (inlet) ของห้องตรวจวัด และ
4. ท่อหมายเลข 3 ใช้เพื่อขนส่งสารละลายที่มีตัวอย่างจากด้านช่องทางออก (outlet) ของห้องตรวจวัดไปยังส่วนรองรับของเสีย



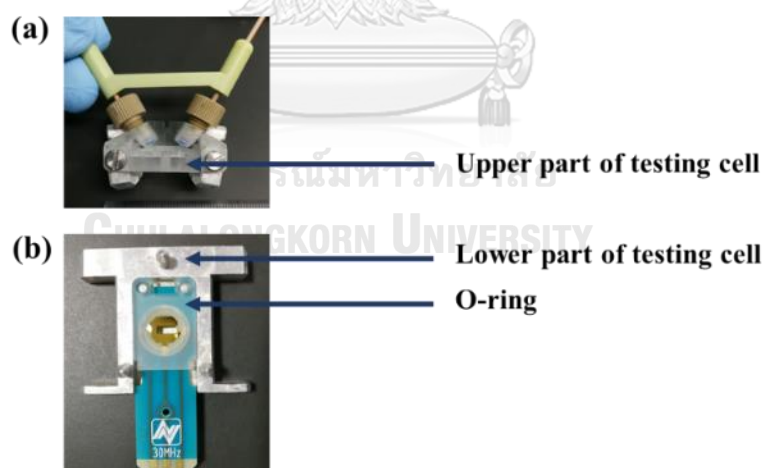
รูปที่ 3.3 การจัดเตรียมระบบของไหลสำหรับการตรวจวัด

การประกอบห้องตรวจวัด

เนื่องจากคิวิซีเอ็มเซนเซอร์อยู่ในภูมิภาคของเหลว ห้องตรวจวัด (testing cell) จึงเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยให้ของเหลวไหลผ่านพื้นที่ตรวจวัดที่ผิวหน้าของเซนเซอร์ได้ในลักษณะที่สารละลายที่จะตรวจวัดสัมผัสกับผิวด้านหนึ่งของคิวิซีเอ็มเซนเซอร์ และผิวอีกด้านหนึ่งของคิวิซีเอ็มเซนเซอร์ยังคงสัมผัสกับอากาศและแห้งอยู่ตลอดการตรวจวัด เนื่องจากคิวิซีเอ็มเซนเซอร์จะไม่สามารถทำงานได้หากสัมผัสกับของเหลวทั้งสองด้าน

ห้องตรวจวัดที่ดีจะทำให้เกิดการไหลแบบต่อเนื่อง ทำให้ตัวอย่างแบคทีเรียในสารตัวพาเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณการตรวจวัด และไหลผ่านไปผิวเซนเซอร์โดยไม่เกิดการสะสมไว้ภายใน ส่วนประกอบของห้องตรวจวัดที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.4

ส่วนที่กำหนดปริมาตรของห้องตรวจวัดคือโอริง (O-ring) โอริงเป็นวัสดุยืดหยุ่นที่เจาะรูตรงกลางสำหรับการป้องกันของเหลวในระบบไหลเข้าไปที่บริเวณหน้าสัมผัสทางไฟฟ้าของคิวิซีเอ็มเซนเซอร์ ปริมาตรโดยประมาณของห้องตรวจวัดคือ 53 ไมโครลิตร ในการใช้งานจะวางโอริงไว้บนคิวิซีเอ็มเซนเซอร์ ผิวด้านหนึ่งของคิวิซีเอ็มเซนเซอร์จึงถูกล้อมรอบด้วยโอริงในขณะที่ของเหลวไหลผ่านเซนเซอร์ ผิวด้านด้านนี้และโอริงจึงร่วมกันทำหน้าที่เป็นบริเวณตรวจวัด



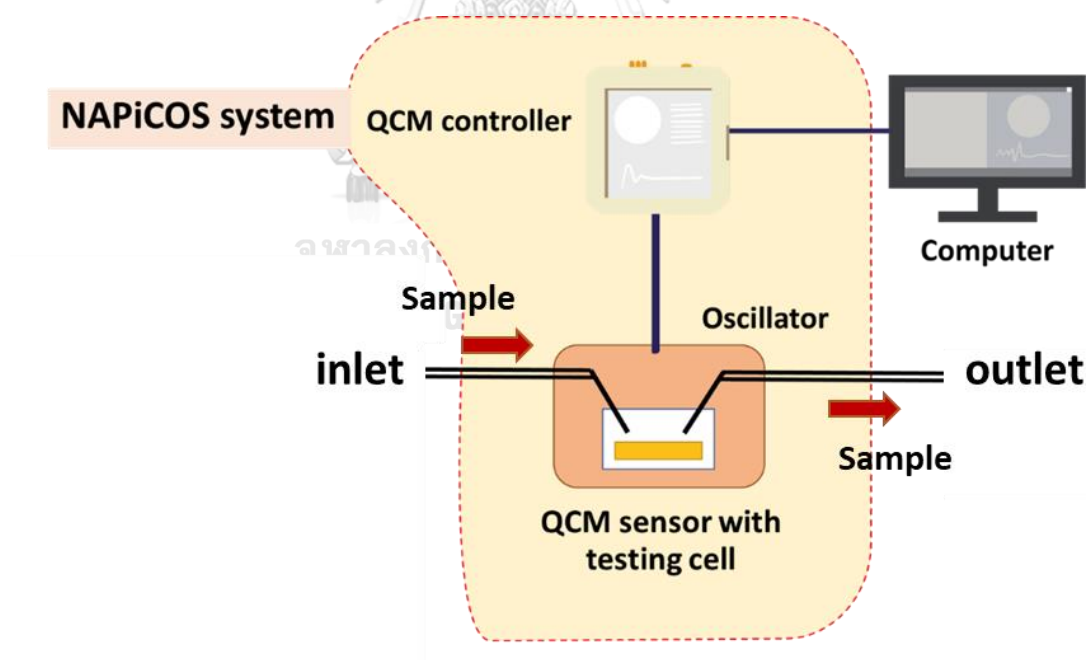
รูปที่ 3.4 ส่วนประกอบห้องตรวจวัดสำหรับคิวิซีเอ็มเซนเซอร์

รูปที่ 3.4(a) แสดงให้เห็นส่วนด้านบน (upper part) ของห้องตรวจวัดซึ่งจะเห็นเป็นวัสดุใส มีช่องทางเข้า (inlet) และช่องทางออก (outlet) ของสาร ส่วนด้านล่าง (lower part) แสดงในรูปที่ 3.4(b) ซึ่งเป็นวัสดุแข็งสีเงินสำหรับใช้เกี่ยวกับเขี้ยวของสปริงที่ติดอยู่กับส่วนด้านบน ในการใช้งานจะประกอบส่วน

ด้านบน โอริง คิวซีเอ็มเซนเซอร์ และส่วนด้านล่างเข้าด้วยกัน ด้วยแรงหนีบของตัวหนีบสปริง เกิดเป็นห้องตรวจวัดที่สมบูรณ์ ตัวหนีบสปริงจะหนีบประกบส่วนด้านบนและส่วนด้านล่างเข้าหากัน และบีบอัดโอริงที่อยู่ระหว่างกลางเพื่อผนึกบริเวณเหนือผิวเซนเซอร์เกิดเป็นบริเวณตรวจวัด จากนั้นห้องตรวจวัดที่มีคิวซีเอ็มเซนเซอร์นี้จะเชื่อมต่อเข้ากับระบบตรวจวัด NAPiCOS® เพื่อใช้งานต่อไป

3.1.3 ระบบ NAPiCOS®

NAPiCOS® เป็นระบบตรวจวัดสัญญาณความถี่ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ โดยระบบ NAPiCOS® ได้รับการรับรองความเสถียรตามมาตรฐาน IEEE Standard 1139-1999 (IEEE Standard Definitions of Physical Quantities for Fundamental Frequency and Time Metrology—Random Instabilities) มีค่าความละเอียดในการตรวจวัดความถี่ (resolution) 0.01 เฮิรตซ์ ใช้งานร่วมกับซอฟต์แวร์ NAPiCOS® Real Time monitoring มีห้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่ช่วงอุณหภูมิแบบสามารถปรับตั้งได้ ตั้งแต่ +10 ถึง +40 องศาเซลเซียส (เพิ่มทีละ 0.1 องศาเซลเซียส) ความเสถียรของการควบคุมอุณหภูมิ ± 0.02 องศาเซลเซียสหรือน้อยกว่า ทำงานในการทำงานผ่าน USB อินเทอร์เน็ต (USB2.0 compliant)



รูปที่ 3.5 ระบบ NAPiCOS® สำหรับคิวซีเอ็มเซนเซอร์ [52]

ก่อนการใช้งานแต่ละครั้ง คิวซีเอ็มเซนเซอร์กับห้องตรวจวัดที่ประกอบขึ้นตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น จะถูกเสียบเข้ากับระบบ NAPICOS® ที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่ 25 องศาเซลเซียส (บริเวณสี่เหลี่ยมของรูปที่ 3.5) เพื่อควบคุมอุณหภูมิและช่วยป้องกันการระเหยของสารละลาย จากนั้นจะเปิดการทำงานของไซริงจ์ปั๊ม (syringe pump) เพื่อขับตัวพาให้ไหลเต็มเต็มทุกส่วนในระบบ ตัวพาจะเริ่มไหลออกจากส่วนไซริงจ์ของไซริงจ์ปั๊ม ผ่านวาล์วควบคุมช่องทางไหล เข้าสู่ห้องตรวจวัดทางช่องทางเข้า ผ่านผิวหน้าของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ และออกจากห้องตรวจวัดทางช่องทางออก ไปยังส่วนรองรับของเสีย

ตัวพาหรือรันนิ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์หรือ PBS บัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) (1X, ประกอบด้วย KH_2PO_4 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 มิลลิโมลาร์, pH 7.4) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายที่มีตัวอย่างแบบที่เรื้อย เนื่องจาก PBS บัฟเฟอร์ เป็นสารไอโซโทนิกที่มีความคงตัว ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มีค่า pH ที่เป็นกลาง คือ 7.4

จากนั้นระบบ NAPICOS® จะตรวจวัดการตอบสนองของคิวซีเอ็มผ่านการส่งการที่คอมพิวเตอร์ให้ เริ่มบันทึกสัญญาณความถี่ที่เกิดขึ้นแบบเรียลไทม์ ข้อมูลจากการตรวจนับความถี่ (frequency counter) ถูกส่งไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อแสดงให้เห็นการตอบสนองของเซนเซอร์ตลอดการตรวจวัด

ในการศึกษานี้ ตั้งค่าให้การไหลของตัวพาเกิดขึ้นแบบต่อเนื่อง โดยไม่มีการหยุดปั๊มระหว่างการตรวจวัด เพื่อให้รันนิ่งบัฟเฟอร์ถูกปั๊มอย่างต่อเนื่องเข้าสู่ห้องตรวจวัด และไหลผ่านผิวหน้าของคิวซีเอ็มเซนเซอร์

3.2 ผลการทดสอบความเสถียรของระบบตรวจวัด

เนื่องด้วยความเสถียรของเบสไลน์ (baseline) เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการตรวจวัดทางไบโอเซนเซอร์ ในการศึกษานี้ได้ทดสอบความเสถียรของเบสไลน์ โดยการติดตั้งคิวซีเอ็มเซนเซอร์กับห้องตรวจวัดเข้ากับระบบ NAPICOS® แล้วควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเริ่มเปิดการทำงานของระบบของไหล โดยไซริงจ์ปั๊มจะเริ่มขับตัวพาให้ไหลเต็มเต็มทุกส่วนในระบบ และเริ่มบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ขณะที่มีตัวพาไหล โดยยังไม่มีปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง จึงไม่มีปฏิกิริยาใด ๆ เกิดขึ้นที่พื้นผิวของเซนเซอร์ สัญญาณดังกล่าวจะถูกพิจารณาว่าเป็นเบสไลน์ หากสัญญาณเบสไลน์ไม่เสถียร จะต้องพิจารณาหาสาเหตุเพื่อแก้ไข หรือรอจนกว่าสัญญาณเบสไลน์มีความเสถียร

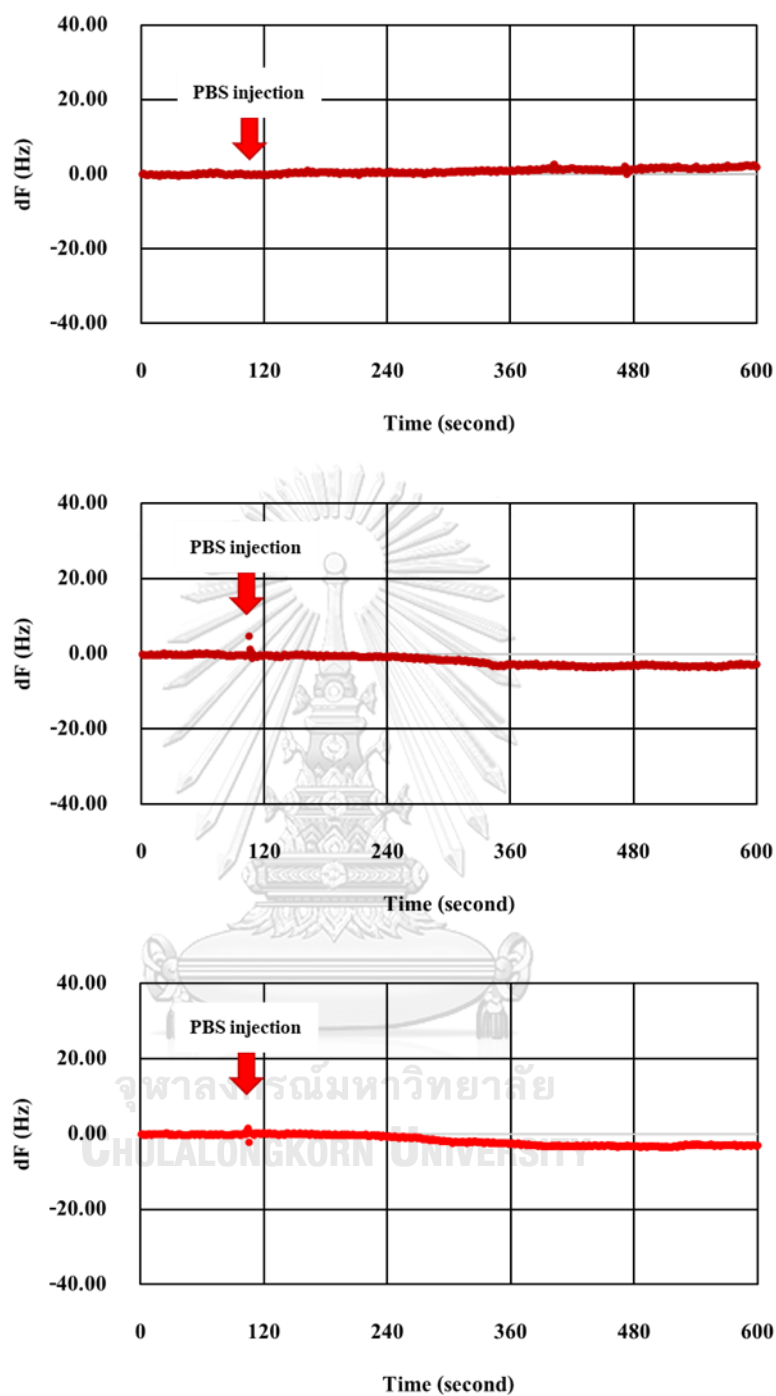
วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อสังเกตความเสถียรของระบบเพื่อวัดค่าเบสไลน์ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ ขณะที่มีการไหลของตัวพา

ทรานส์มิเตอร์สำหรับการตรวจวัดนี้ใช้ คิวซีเอ็มเซนเซอร์ซึ่งถูกติดตั้งไว้ในห้องตรวจวัด ใช้อัตราการใช้ 50 ไมโครลิตร/นาที่ เพื่อให้ได้เบสไลน์ที่เสถียรนานประมาณ 20 ถึง 30 นาที เมื่อเบสไลน์เสถียรแล้ว จะฉีด PBS บัฟเฟอร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เข้าในระบบ เพื่อจำลองแทนการฉีดตัวอย่างแบบที่เรียเข้าไปในระบบ และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความถี่เป็นเวลาอย่างน้อย 600 วินาที โดยทำการทดลองซ้ำสามครั้ง

จากรูปที่ 3.6 แสดงให้เห็นผลการเปลี่ยนแปลงความถี่ของระบบที่ประมาณ ± 3 ถึง ± 5 เฮิร์ตซ์ ซึ่งยืนยันว่าระบบมีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดในขั้นตอนต่อ ๆ ไป

ในการทดลองนี้พบข้อควรระวังเกี่ยวกับการใช้งานระบบตรวจวัดในภูมิภาคของเหลวของงานวิจัยนี้คือการเกิดฟองอากาศ และการรั่วของสารละลาย ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการตรวจวัดจริง และนำไปสู่การเกิดสัญญาณที่ผิดปกติได้ การเกิดฟองอากาศขึ้นภายในบริเวณผิวหน้าของเซนเซอร์จะทำให้ปริมาตรของเหลวภายในห้องตรวจวัดเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมาก และค่าความถี่ที่ตรวจวัดได้จะเปลี่ยนแปลงจากเบสไลน์ไปอย่างมากด้วยเช่นกัน ส่งผลให้ไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงจากการตรวจวัดได้ ผู้วิจัยได้แก้ปัญหาการเกิดฟองอากาศ โดยนำสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ที่จะใช้กับระบบของไหลไปทำการไล่แก๊สออกด้วยการใช้เครื่องอัลตราโซนิกร่วมกับปั๊มสุญญากาศ เพื่อไล่แก๊สออกจากสารละลายทำให้ลดการเกิดฟองอากาศก่อนที่จะนำไปใช้งาน

นอกจากนี้การรั่วของสารละลายจากห้องตรวจวัดไปยังผิวหน้าอีกด้านของเซนเซอร์ (ด้านสัมผัสกับอากาศ) ในกรณีนี้จะต้องถอดเซนเซอร์ออกจากระบบตรวจวัดและทำความสะอาดและทำให้ผิวหน้าด้านดังกล่าวแห้งอีกครั้งก่อนการใช้งานใหม่ ในส่วนการรั่วของสารละลาย ผู้วิจัยได้แก้ปัญหาโดยการทาจารบีเกรดสำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ในปริมาณเล็กน้อยที่ขอบด้านนอกของโอริงซึ่งเป็นส่วนที่ไม่สัมผัสกับห้องตรวจวัดโดยตรง จารบีจะช่วยประสานรอยต่อในส่วนที่จะสัมผัสกับขอบนอกของเซนเซอร์ จึงทำให้ลดโอกาสเกิดการรั่วได้



รูปที่ 3.6 ค่าสัญญาณเบสไลน์ของควิซีเอ็มเซนเซอร์

บทที่ 4 การประดิษฐ์ควิซีเอ็มเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัด

การประดิษฐ์ควิซีเอ็มเซนเซอร์ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ตรวจวัดแบคทีเรีย ซึ่งเซนเซอร์ต้องมีการยึดติดไว้ด้วยสารรู้จำทางชีวภาพ (biorecognition element) เพื่อใช้ในการจับกับแบคทีเรียอย่างจำเพาะ ในทางไบโอเซนเซอร์การยึดติดนี้เรียกว่าการตรึง (immobilization) แบ่งออกเป็น 4 ประเภทหลัก ได้แก่ การดูดซับ (adsorption), การกักเก็บ (entrapment), การเชื่อมโยงแบบขวาง (cross-linking) และวิธีเชื่อมต่อดัวยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bonding) ^[53] ในการศึกษานี้เลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี หรือเรียกย่อว่าแอนติบอดี เป็นสารรู้จำทางชีวภาพ

วิธีการดูดซับเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน สารรู้จำทางชีวภาพจะติดอยู่กับพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์ด้วยอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้า (electrostatic interaction) ^[54] หรืออาจจะเป็นอันตรกิริยาระหว่างสาร (Van der Waals force) ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือมีความเสถียรต่ำ ที่ไม่มีความจำเพาะ ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ทำเซนเซอร์ที่ต้องทำใช้งานหลายครั้ง เนื่องจากอาจเกิดการหลุดออกของสารรู้จำทางชีวภาพในระหว่างการวิเคราะห์

วิธีการกักเก็บเป็นเทคนิคสำหรับกักสารรู้จำทางชีวภาพไว้อยู่ภายในเมทริกซ์ ^[55] แรงยึดเหนี่ยวระหว่างสารรู้จำทางชีวภาพกับเมทริกซ์ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ ^[56] ความไวของเซนเซอร์ที่ใช้วิธีนี้อาจลดลง เนื่องจาบบริเวณการจับ (binding site) ของโมเลกุลของสารรู้จำทางชีวภาพที่ใช้ในการตรวจจับอาจถูกบดบังอยู่ภายในเมทริกซ์ ^[57] หรือเป็นผลจากการจัดทิศทางระดับโมเลกุลของสารรู้จำทางชีวภาพที่ไม่เอื้อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี รวมทั้งอาจเกิดการสูญเสียโมเลกุลของสารรู้จำทางชีวภาพที่กักเก็บอยู่หลุดออกสู่ภายนอก อันเนื่องมาจากขนาดโมเลกุลที่ใช้นั้นเล็กกว่าช่องที่ใช้กักเก็บ

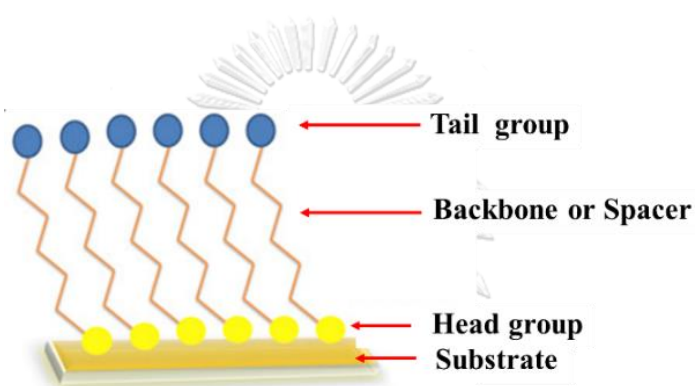
วิธีการเชื่อมโยงแบบขวางเป็นเทคนิคทางเคมีที่เชื่อมโยงสารรู้จำทางชีวภาพด้วยพันธะโคเวเลนต์ผ่านทางตัวเชื่อมโยงแบบขวาง (cross-linker) เช่น กลูটারัลดีไฮด์ วิธีนี้อาจส่งผลให้แอกทิวิตีในการจับกันของสารรู้จำทางชีวภาพลดลงเนื่องจากการเกิดการเชื่อมโยงในตำแหน่งของโมเลกุลแบบสุ่ม หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่บริเวณการจับ ส่งผลให้สารรู้จำทางชีวภาพจับแบคทีเรียได้ไม่แน่นหรือจับได้ไม่ดี

การศึกษานี้เลือกใช้วิธีเชื่อมต่อดัวยพันธะโคเวเลนต์ในการตรึงแอนติบอดีบนควิซีเอ็มเซนเซอร์ โดยหลักการแล้ววิธีเชื่อมต่อดัวยพันธะโคเวเลนต์นี้ จะเริ่มจากการเตรียมชั้น SAM ขึ้นมาที่พื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์ก่อน เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การทำให้พื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์มีฟังก์ชัน (surface functionalization) จากนั้นชั้น SAM หรือพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์ที่มีฟังก์ชัน (SAM-Au) จะเกิดพันธะโคเวเลนต์กับแอนติบอดี ดังนั้นการเลือกใช้หมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์ให้สัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันของแอนติบอดีจะมีส่วนช่วยกำหนดทิศทางการตรึงแอนติบอดีให้เกิดขึ้นได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้โมเลกุลแอนติบอดีที่ถูกตรึงด้วยพันธะโคเวเลนต์บนพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์จะมีความเสถียรและไม่หลุดออกเหมือนกับวิธีอื่นข้างต้น

ในบทนี้จะกล่าวถึงการประดิษฐ์ควิซีเอ็มไบโอเซนเซอร์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ การดัดแปลงพื้นผิวทองของควิซีเอ็มให้มีฟังก์ชัน และการตรึงแอนติบอดี

4.1 การดัดแปลงพื้นผิวทองให้มีฟังก์ชัน

การศึกษานี้เลือกใช้เทคนิคเซลฟ-แอสเซมเบิล โมโนเลเยอร์ (Self-Assembled Monolayer, SAM) ในการดัดแปลงพื้นผิวทองให้มีฟังก์ชัน โดยเป็นการเติมหมู่ฟังก์ชันที่พื้นผิวทองสำหรับใช้ตรึงสารรู้จำทางชีวภาพด้วยพันธะโคเวเลนต์ต่อไป ^[53] ในที่นี้เรียกสารที่ใช้ในการดัดแปลงพื้นผิวทองด้วยเทคนิค SAM นี้ว่า โมเลกุล SAM



รูปที่ 4.1 เซลฟ-แอสเซมเบิล โมโนเลเยอร์ของโมเลกุล SAM บนผิวทอง

โมเลกุล SAM (รูปที่ 4.1) เป็นสารจำพวกอัลเคนไธออล ที่ประกอบขึ้นจากส่วนประกอบดังนี้: หมู่หัว (head group) เป็นโมเลกุลไธออล (-SH) ส่วนนี้ จะเกิดปฏิกิริยาเคมีซอร์พชัน (chemisorption) ของไธออลกับพื้นผิวทองของอิเล็กโทรด โครงหลัก (backbone) หรือตัวคั่น (spacer) ซึ่งเป็นโซ่อัลเคน และ หมู่หาง (tail group) มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลาย ส่วนนี้จะเกิดพันธะโคเวเลนต์กับสารรู้จำทางชีวภาพหรือแอนติบอดี

การเกิดปฏิกิริยาเคมีซอร์พชันของอัลเคนไธออลที่ผิวทองเกิดได้ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดทีฟแอตแทชเมนต์ดังนี้ ^[53]:



การเตรียม SAM ที่พื้นผิวทอง เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เอง หมู่ซัลเฟอร์ที่ส่วนปลายของโมเลกุล SAM จะก่อพันธะเคมีโคเวเลนต์ (semi-covalent) ที่เสถียรกับพื้นผิวทอง และมีแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างเมธิลีนคาร์บอนของโซ่อัลเคน^[58] พลังงานพันธะ Au-S เท่ากับ 44 กิโลแคลอรีต่อโมล และแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างหมู่เมธิลีนข้างเคียงเท่ากับ 1.4 ถึง 1.8 กิโลแคลอรีต่อโมล แรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างโซ่อัลเคนข้างเคียงทำให้โมเลกุล SAM ตั้งขึ้นในแนวตั้งด้วยความเอียงทำมุมกับแนวระดับเล็กน้อยประมาณ 30 องศา^[59] การดัดแปลงพื้นผิวด้วยเทคนิคนี้สามารถเลือกใช้โมเลกุล SAM ที่มีความยาวของโซ่อัลเคนไฮดรอกไซด์ขนาดต่าง ๆ และเลือกชนิดหมู่ฟังก์ชันที่หาง เช่น หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) หรือหมู่อะมิโน (-NH₂) ให้เหมาะสมสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของสารรู้จำทางชีวภาพ และสิ่งที่จะตรวจวัด

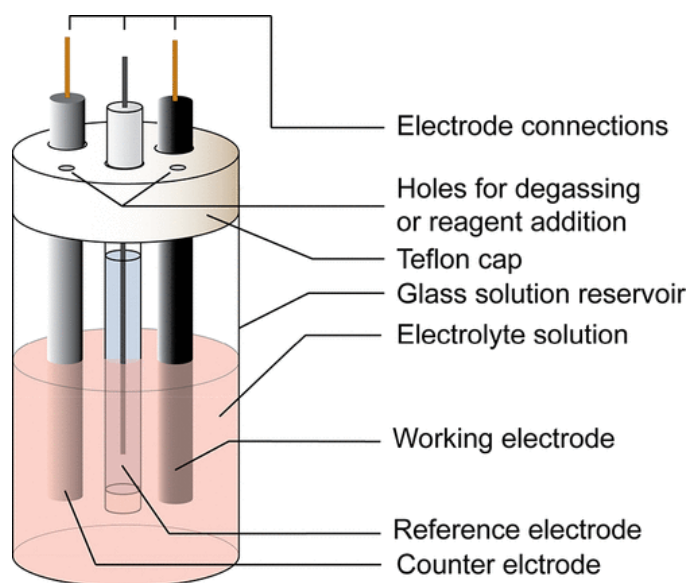
ในการศึกษานี้ใช้โมเลกุล SAM ที่มีชื่อว่า 11-เมอร์แคปโตดอเดcanoic acid (11-MUA) ซึ่งมีปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล และมีปลายอีกด้านหนึ่งเป็นหมู่ไทโธล (thiol) ที่สามารถจับกับพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์สำหรับตรึงโมเลกุลแอนติบอดี โครงสร้างทางเคมีของ 11-MUA ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 โมเลกุล 11-เมอร์แคปโตดอเดcanoic acid

4.1.1 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของพื้นผิวทองที่ผ่านการดัดแปลงด้วยโมเลกุล SAM

ใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry)^[60] สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีโมเลกุล SAM อยู่ ไซคลิกโวลแทมเมทรีเป็นเทคนิคไฟฟ้าเคมีที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนแก่อิเล็กโทรดกับกระแสที่เปลี่ยนแปลงไป^[61] โมเลกุล SAM ที่อยู่บนอิเล็กโทรด จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับศักย์ไฟฟ้า กล่าวคือมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนและเกิดเป็นกระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้ การป้อนศักย์ไฟฟ้าจะเป็นไปในลักษณะสแกนไประหว่างช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กำหนดไว้ กระแสที่ผ่านอิเล็กโทรดจะถูกบันทึกสอดคล้องกับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ป้อน



รูปที่ 4.3 เซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ^[62]

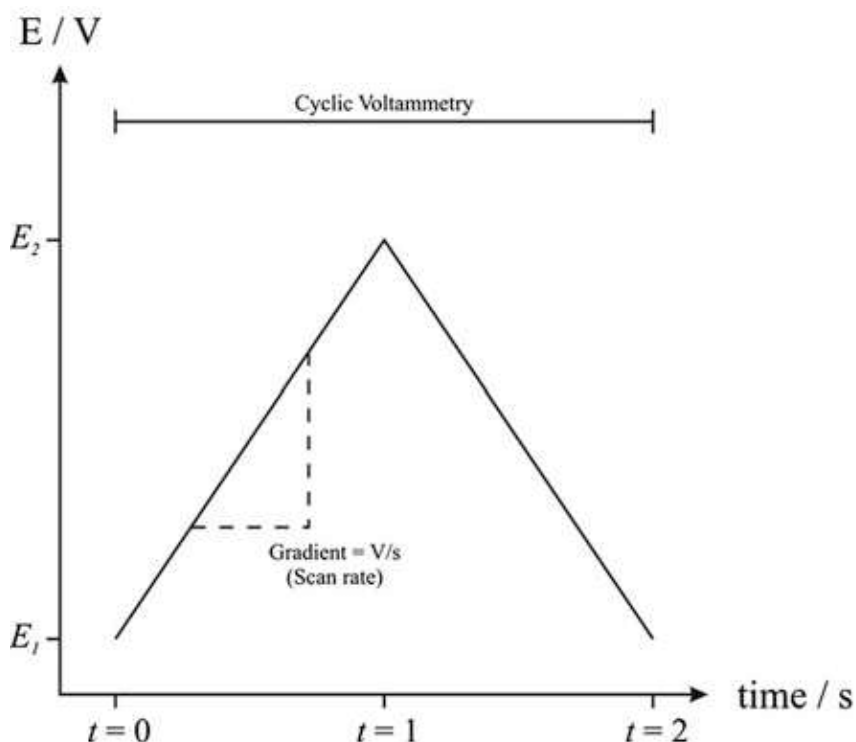
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี จะใช้เครื่อง Autolab PGSTAT100 และ GPES software (Autolab PGSTAT100 Potentiostat (Metrohm Autolab, ประเทศเนเธอร์แลนด์) เป็นอุปกรณ์จ่ายศักย์ไฟฟ้าและค่าวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น โดยเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์และมีซอฟต์แวร์สำหรับควบคุม แสดงผล และประมวลผล เครื่อง Autolab PGSTAT100 จะต่อเชื่อมกับอิเล็กโทรด 3 ขั้ว ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งอิเล็กโทรดประกอบด้วย:

อิเล็กโทรดทำงาน (working electrode, WE) เป็นอิเล็กโทรดที่มีการควบคุมศักย์ไฟฟ้าและตรวจวัดกระแสที่เกิดขึ้น การดัดแปลงด้วยโมเลกุล 11-MUA จะทำบนผิวทองของอิเล็กโทรดนี้ เพื่อวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของโมเลกุล SAM

อิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode, RE) เป็นอิเล็กโทรดมาตรฐานที่มีศักย์ไฟฟ้าคงที่ ใช้เปรียบเทียบเพื่อกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโทรดทำงาน

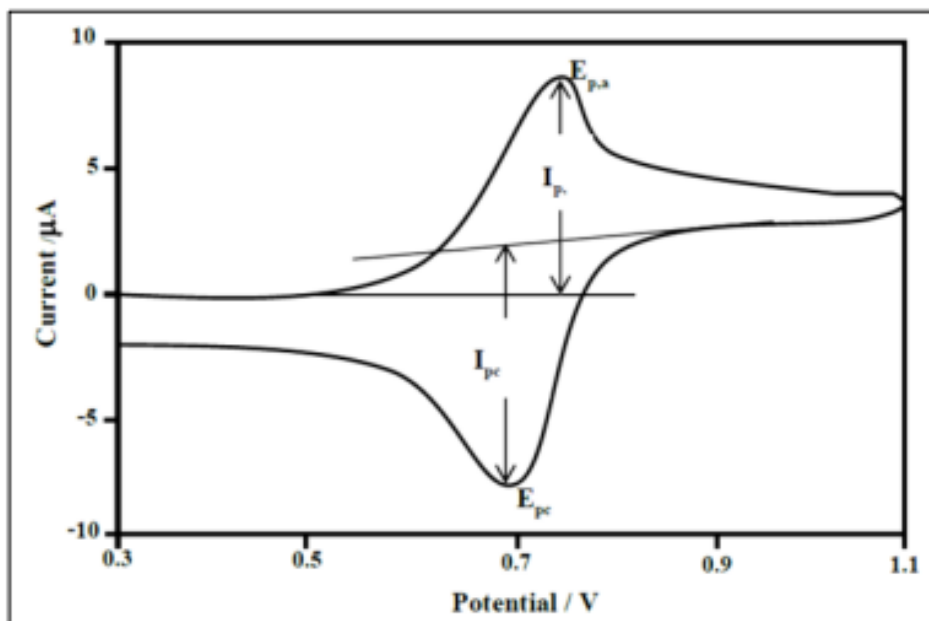
อิเล็กโทรดช่วย (counter electrode, CE) ทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรดที่ทำงานร่วมกับอิเล็กโทรดทำงานเพื่อให้กระแสสามารถไหลผ่านครบวงจร ^[63]

อิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการนำไฟฟ้าในระบบโดยไม่รบกวนปฏิกิริยา ในการทดลองนี้จะใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 0.5 โมลาร์



รูปที่ 4.4 รูปคลื่นศักย์ไฟฟ้าของเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี^[64]

รูปที่ 4.4 อธิบายหลักการตรวจวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยในแต่ละการตรวจวัดจะมีการเปลี่ยนค่าศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโทรดทำงาน (WE) เป็นลักษณะสามเหลี่ยม เมื่อเริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ ($t=0$) เครื่องวิเคราะห์จะให้ศักย์ไฟฟ้าไปที่อิเล็กโทรด ศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นของอิเล็กโทรดทำงานอยู่ที่ E_1 และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ด้วยอัตราคงที่ เรียกศักย์ไฟฟ้านี้ว่าการสแกนไปข้างหน้า เมื่อศักย์ไฟฟ้าถึงจุด E_2 ($t=1$) ศักย์ไฟฟ้าจะเริ่มลดลงด้วยอัตราเดิม เรียกศักย์ไฟฟ้านี้ว่าการสแกนย้อนกลับ โดยค่าศักย์ไฟฟ้าจะลดลงจนถึงค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น E_1 ($t=2$) อีกครั้ง ในการวิเคราะห์จะเลือกใช้ช่วงค่าศักย์ไฟฟ้าให้ สารที่ต้องการวิเคราะห์นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันได้ ในการทดลองนี้ จะวิเคราะห์ปริมาณชั้น 11-MUA บนพื้นผิวทอง ใช้วิธีกำหนดระดับแรงดัน (ramp voltage) ตั้งแต่ -0.0 ถึง -1.2 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 0.1 โวลต์/วินาที



รูปที่ 4.5 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม ^[64]

E_{pc} : ศักย์ไฟฟ้าที่พิกแคโทดิก, E_{pa} : ศักย์ไฟฟ้าที่พิกแอโนดิก, i_{pc} : กระแสที่พิกแคโทดิก, i_{pa} : กระแสที่พิกแอโนดิก

รูปที่ 4.5 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ของกระแส (แกนตั้ง) เทียบกับ ศักย์ไฟฟ้า (แกนนอน) เมื่อพิจารณาพิกด้านบนจากจุดยอดของพิกลากเส้นตัดกับแกนศักย์ไฟฟ้า จะได้ ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าที่พิกแอโนดิก (anodic peak potential) หรือ E_{pa} ซึ่งมีค่าเป็นบวก พิกด้านล่างจะเป็น ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าที่พิกแคโทดิก หรือ E_{pc} (cathodic peak potential) ส่วนความสูงของพิกทางด้านบน คือกระแสที่พิกแอโนดิก (anodic peak current), i_{pa} และความสูงของพิกด้านล่างเป็นกระแสที่พิกแคโทดิก (cathodic peak current), i_{pc} ซึ่งกระแสของพิกจะแปรผันตามความเข้มข้นของสาร โดยค่าศักย์ไฟฟ้า E_{pa} และ E_{pc} เป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิด กระแสที่พิก (i_p) ในเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีอธิบายโดยใช้ สมการ Randles-Sevcik

สมการ 4.1:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^3 A \times D^{1/2} \nu^{1/2} C$$

- ที่ซึ่ง n คือจำนวนของอิเล็กตรอนในปฏิกิริยารีดอกซ์,
 A คือพื้นที่อิเล็กโทรดทำงาน [m^2],
 D คือค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสารสาร [m^2/s],
 ν คืออัตราการสแกน [V/s],
 C คือความเข้มข้นของอิเล็กโทรแอคทีฟสปีชีส์ที่อิเล็กโทรด [mol/m^3]

เมื่อกำหนดเทคนิคที่จะใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของพื้นผิวทองที่ผ่านการดัดแปลงด้วยโมเลกุล 11-MUA ได้แล้ว จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการดัดแปลงพื้นผิวทองด้วยโมเลกุล SAM ดังจะบรรยายในหัวข้อต่อไป

4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการดัดแปลงพื้นผิวทองด้วยโมเลกุล SAM

การดัดแปลงพื้นผิวทองด้วยโมเลกุล SAM บนพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบสองช่องสัญญาณ ชนิด 30 เมกะเฮิร์ตซ์ และใช้ 11-MUA เป็นโมเลกุล SAM โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการเตรียมชั้นของ 11-MUA บนพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์ สำหรับใช้ตรงแอนติบอดีต่อไป การทดลองมีรายละเอียดดังนี้

1. ทำความสะอาดพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบสองช่องสัญญาณ ชนิด 30 เมกะเฮิร์ตซ์ ด้วยการแช่อิเล็กโทรดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 1 นาที และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ 1 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ก่อนการใช้งาน
2. จัดเตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับการดัดแปลงพื้นผิวทอง (บริเวณ CH1 และ CH2) โดยใช้ซินโอริงสำหรับดัดแปลงพื้นผิวทอง (รูปที่ 4.6) ที่มีลักษณะเป็นวัสดุยืดหยุ่นสีขาวมีสองช่อง ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นแบ่งระหว่างแต่ละช่องสัญญาณ CH1 และ CH2 ของควิซีเอ็มเซนเซอร์ เพื่อให้สามารถรองรับของเหลวให้สัมผัสกับพื้นผิวทองโดยไม่ไหลออกจากบริเวณที่ทำการดัดแปลง



รูปที่ 4.6 ชิ้นโอรังสำหรับดัดแปลงพื้นผิวทอง

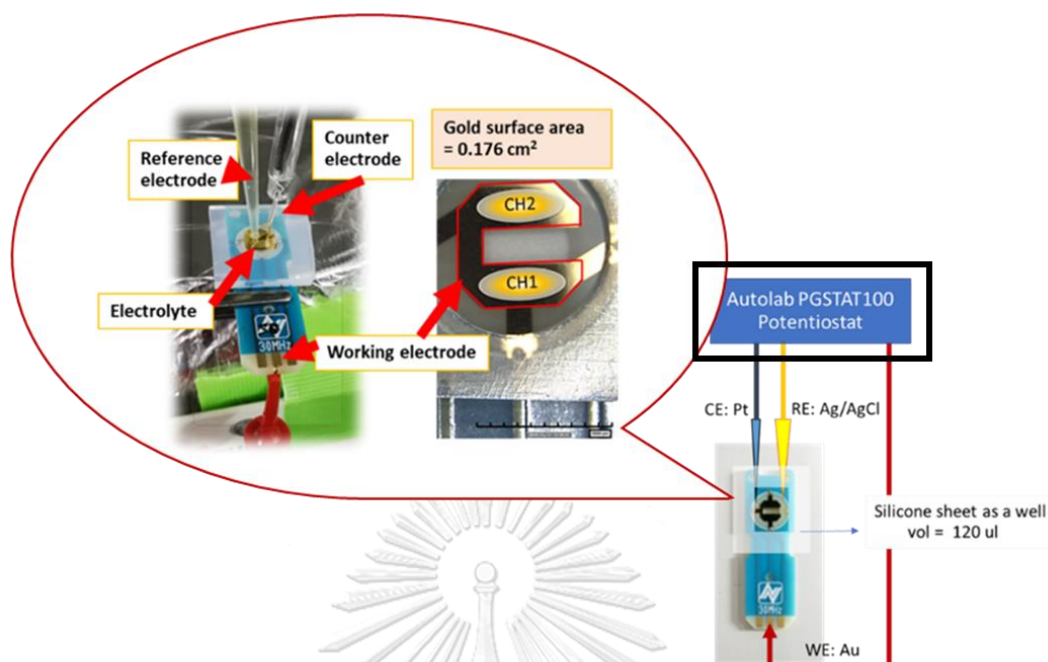
3. เตรียมสารละลาย SAM ได้แก่ 11-MUA (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
4. นำควิซีเอ็มเซนเซอร์และชิ้นโอรังสำหรับดัดแปลงพื้นผิวทองประกอบเข้ากับชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็มเซนเซอร์ (รูปที่ 4.7) ซึ่งทำหน้าที่จับโอรังสำหรับดัดแปลงพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์ให้ประกอบติดอยู่ด้วยกัน ทำให้เกิดช่องว่างเหนือพื้นผิวของแต่ละช่องสัญญาณควิซีเอ็มเซนเซอร์ (หรือ CH1 และ CH2)



รูปที่ 4.7 ชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็มเซนเซอร์

5. เติมสารละลาย 11-MUA ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงไปบนพื้นผิวทองแต่ละช่องสัญญาณ (ทั้งช่องสัญญาณ CH1 และ CH2) ใช้พาราฟิล์มปิดหุ้มรอบชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็ม

- เซนเซอร์ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง) และ 24 ชั่วโมง (ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง) เพื่อให้เกิดการเรียงตัวแบบโมโนเลเยอร์ (monolayer forming)
6. เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างทำความสะอาดควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกดัดแปลงด้วย 11-MUA ด้วยเอทานอล และน้ำปราศจากไอออน (deionized water) และทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน พื้นผิวทองที่ผ่านการดัดแปลงด้วย 11-MUA จะถูกนำไปวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีต่อไป
 7. เตรียมวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะโดยใช้อิเล็กโทรด 3 ขั้ว ดังนี้
 - a. **อิเล็กโทรดทำงาน:** อิเล็กโทรดทองที่ถูกดัดแปลงด้วย 11-MUA (อิเล็กโทรดทองเป็นส่วนหนึ่งของควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบสองช่องสัญญาณ ชนิด 30 เมกะเฮิร์ตซ์)
 - b. **อิเล็กโทรดช่วย:** ลวดแพลทินัม (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร, The Nilaco Corporation, ประเทศญี่ปุ่น)
 - c. **อิเล็กโทรดอ้างอิง:** ลวดซิลเวอร์ในสารละลายซิลเวอร์คลอไรด์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร, The Nilaco Corporation, ประเทศญี่ปุ่น) (อิเล็กโทรดอ้างอิงถูกประดิษฐ์ขึ้นตามที่บรรยายไว้ในภาคผนวก C (รูปที่ C-18))
 8. เตรียมอิเล็กโทรดได้แก่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 0.5 โมลาร์ ที่ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยไนโตรเจนโดยการเป่าแก๊สไนโตรเจนผ่านสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ก่อนการทดลองเพื่อไล่แก๊สออกซิเจนที่ละลายอยู่ให้ออกไปจากสารละลาย และตัดซิลิโคนสำหรับใช้เป็นที่ยึดรับสารอิเล็กโทรด เพื่อให้สารละลายสัมผัสกับอิเล็กโทรดทั้ง 3 ขั้ว (รูปที่ 4.8)
 9. วิเคราะห์ปริมาณชั้น 11-MUA บนพื้นผิวทอง โดยประกอบอิเล็กโทรดและชุดการทดลองเข้ากับเครื่อง Autolab PGSTAT100 และ GPES software (รูปที่ 4.8) ใช้วิธีเพิ่มระดับแรงดัน (ramp voltage) ตั้งแต่ -0.0 ถึง -1.2 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 0.1 โวลต์/วินาที (ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงมวล 11-MUA บนพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์จากค่าการเปลี่ยนแปลงก่อนทำวิเคราะห์ในข้อ 9)
 10. จะพบพีคที่สัมพันธ์กับการถ่ายเทประจุจากอิเล็กโทรดไปยัง 11-MUA ที่ -0.9 (โวลต์ เทียบกับ Ag/AgCl) ตามวิธีการศึกษาที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[60, 65] ทำการคำนวณหาปริมาณ 11-MUA ต่อหน่วยพื้นที่ (ν_{SAM} , นาโนเมตร⁻²) โดยใช้สมการ 4.2^[66]

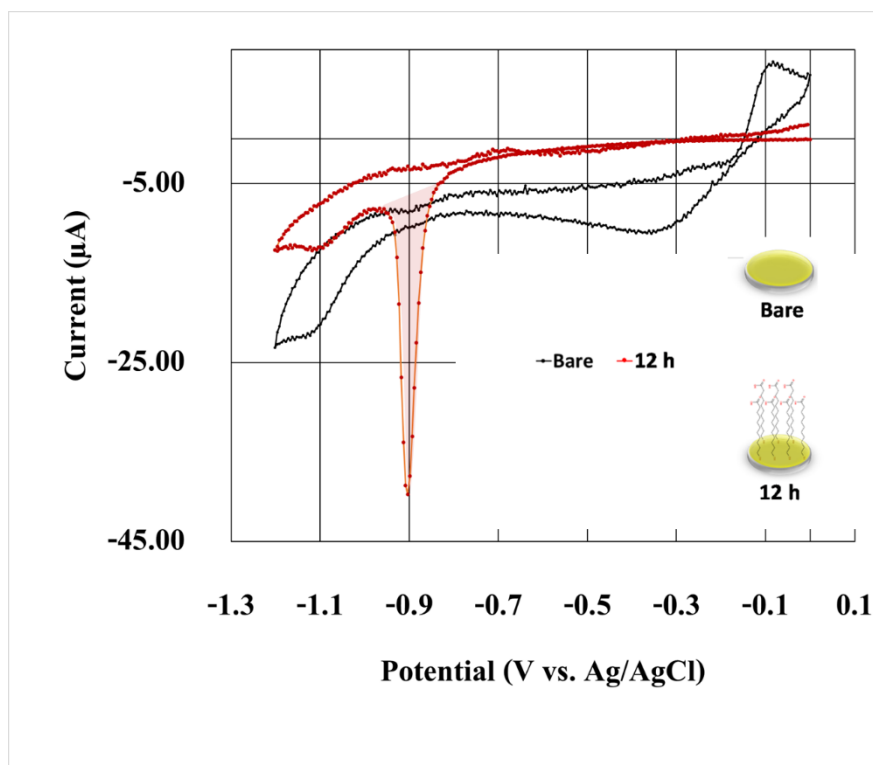


รูปที่ 4.8 แสดงแผนภาพแทนเซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับการทดลองเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

สมการ 4.2: $Y_{SAM} = Q_{SAM} N_A / (F \cdot A)$

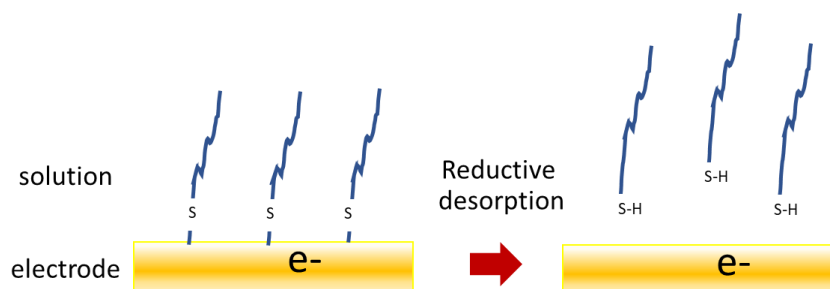
- ที่ซึ่ง Q_{SAM} คือความหนาแน่นประจุรวมที่พื้นผิวที่ตรวจวัดได้จากพื้นที่ใต้ส่วนพีค (C),
 F คือค่าคงที่ฟาราเดย์ ($96485.33 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$),
 N_A คือค่าคงที่อวอกาโดร ($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
 Y_{SAM} คือปริมาณ 11-MUA ต่อหน่วยพื้นที่ (nm^{-2})
 A คือพื้นที่ทองเท่ากับ $2 \times 8.8 \times 10^{12} \text{ nm}^2$

ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 4.9 ซึ่งเป็นไซคลิกโวลแทมโมแกรมของอิเล็กโทรดทองที่ไม่มีการดัดแปลง (bare) (สีดำ) เทียบกับอิเล็กโทรดทองที่ถูกดัดแปลงด้วย 11-MUA (สีแดง) (ดูเพิ่มเติมผนวก A รูปที่ A-3 ถึง A-5) พื้นที่ใต้พีค (พื้นที่สีแดงอ่อน) แทนการเกิดรีดักชันที่พันธะ Au-S โดยพื้นที่ใต้พีคในการสแกนครั้งแรก (Q_{SAM}) เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดประจุจากอิเล็กโทรดไปยัง 11-MUA ตำแหน่งพีคดังกล่าวอยู่ที่ประมาณ -0.95 โวลต์ เทียบกับ Ag/AgCl โดยฐานของพีครีดักชันเริ่มจาก -0.8 ถึง -1.0 โวลต์



รูปที่ 4.9 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของ 11-MUA บนอิเล็กโทรดทองโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมของอิเล็กโทรดทองที่ถูกดัดแปลงด้วย 11-MUA สังเกตพบพีคลักษณะเฉพาะของ 11-MUA ที่เกิดขึ้นระหว่างการหลุดออก (reductive desorption) ของชั้น 11-MUA ที่สะสมตัวที่ผิวทอง ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.10 การเกิดอิเล็กโทรเรดักชันของโมเลกุล 11-MUA บนพื้นผิวทองระหว่างการตรวจวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีนี้เป็นการหลุดออก (desorbed) ของโมเลกุล 11-MUA ออกจากผิวทอง หลังการใช้ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบที่เพียงพอ



รูปที่ 4.10 การเกิดอิเล็กโทรเรดักชันของ 11-MUA บนพื้นผิวทอง

มีรายงานว่าศักย์ไฟฟ้ารีดักทีฟของ SAM ในสารละลายอัลคาไลน์ขึ้นกับปัจจัยหลายประการรวมถึงความยาวของโซ่อัลคิลของโมเลกุล SAM ^[67] โดยในการทดลองนี้ โมเลกุล SAM คือ 11-เมอร์แคปโตอันเดคะ

โนอิคแอซิด (11-MUA, $C_{11}H_{22}O_2S$) เป็นอัลเคนไฮดรอลที่มีความยาวของโซ่อัลคิลเท่ากับ C_{11} ปริมาณของ 11-MUA ต่อหน่วยพื้นที่ (γ , นาโนเมตร⁻²) ถูกคำนวณและแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณของ 11-MUA ที่ก่อรูปบนพื้นผิวทอง

เวลาในการ บ่ม (ชั่วโมง)	พื้นที่ของพิก (γ_{11-MUA} , C)	ความหนาแน่นของการอัด ตัว (โมเลกุล.นาโนเมตร ⁻²)	น้ำหนักของ 11-MUA บนพื้นผิว CH1 (นาโนกรัม)
12	1.28E-05 (n=4)	4.54	144.5
24	1.26E-05 (n=2)	4.46	142.3

*หมายเหตุ ค่าพื้นที่ของพิก (γ) เป็นค่าที่ได้จากโปรแกรม GPES software ของเครื่อง Autolab PGSTAT100

สำหรับการบ่มที่ 12 และ 24 ชั่วโมง คำนวณความหนาแน่นของ SAM ได้เท่ากับ ~4.46 และ 4.54 โมเลกุล.นาโนเมตร⁻² ซึ่งสอดคล้องกับความหนาแน่นสูงสุดของโมเลกุลอัลเคนไฮดรอลบนพื้นผิวทอง [60, 68]

การคำนวณหามวลของควิซีเอ็มเซนเซอร์เกิดจากการดัดแปลงด้วย 11-MUA ได้คำนวณจากจากการค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ตามสมการของ Sauerbrey และค่าจำเพาะของควิซีเอ็มเซนเซอร์ชนิดสองช่องสัญญาณ ที่มีความถี่รีโซแนนซ์ 30 เมกะเฮิร์ตซ์ (รุ่น PSA-SB-3002T) จากสูตร

$$\Delta m \text{ (นาโนกรัม)} = \Delta F \times 0.46 \text{ (นาโนกรัม/เซนติเมตร}^2\text{)} \times 0.088 \text{ (เซนติเมตร}^2\text{)}$$

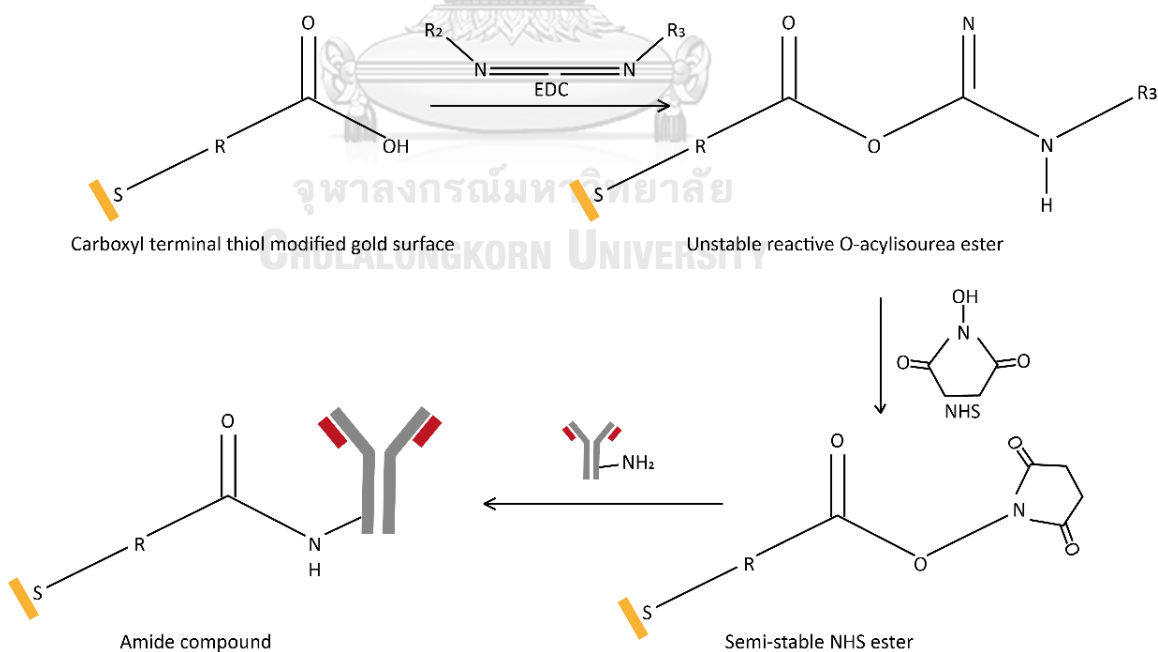
พบว่าปริมาณของ 11-MUA บนพื้นที่ผิวที่มีการดัดแปลงมีค่าเท่ากับ 144.5 และ 142.3 นาโนกรัมตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งสองช่วงเวลาพบการก่อรูปของชั้น 11-MUA ที่ผิวทองไม่แตกต่างกันมากนัก จึงเลือกใช้เวลาในการดัดแปลงพื้นผิวที่ 12 ชั่วโมงสำหรับการดัดแปลงพื้นผิวทองให้มีฟังก์ชันด้วยโมเลกุล SAM สำหรับใช้ตรึงแอนติบอดีในการศึกษาขั้นต่อไป

4.2 การตรึงแอนติบอดีเพื่อสร้างการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์

ในการสร้างอิมมูโนเซนเซอร์โดยใช้ 11-MUA บนพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์นั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะถูกเชื่อมโยงแบบโควาเลนต์กับ 11-MUA โดยใช้ 1-เอธิล-3-(3-ไดเมธิลอะมิโนโพรพิล) คาร์โบไดโอไมด์/N-ไฮดรอกซีซัคซินิไมด์ (EDC/NHS) เป็นตัวสร้างพันธะ การเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่าง 11-MUA กับแอนติบอดีเป็นวิธีที่ทำให้เกิดควมคุมทิศทางของแอนติบอดีที่ดีที่สุดบนพื้นผิวเซนเซอร์

EDC/NHS (รูปที่ 4.11), EDC จะกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิวเพื่อสร้างพันธะเอมีนบน 11-MUA แต่ไม่คงตัวและไวต่อการเกิดไฮโดรไลซิส NHS จึงถูกเติมกับ EDC เพื่อให้เกิดเอมีนที่จะจับกับเอมีนบนแอนติบอดีได้ดีขึ้น

การตรึงและทิศทางของแอนติบอดีบนพื้นผิวของควิซีเอ็มเซนเซอร์มีความสำคัญและส่งผลโดยตรงต่ออันตรกิริยาของการจับกันระหว่างเซลล์แบคทีเรียและแอนติบอดี สำหรับปฏิกิริยาการตรึงพื้นผิว 11-MUA ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ EDC/NHS ถูกนำไปจับกับแอนติบอดีชนิด anti-A. *actinomycetemcomitans* (325AA2) เพื่อก่อให้เกิด ควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิด anti-A. *actinomycetemcomitans* หัวข้อนี้จะกล่าวถึงการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการตรึงแอนติบอดี และขั้นตอนการทำปฏิกิริยา รวมถึง pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึง



รูปที่ 4.11 การตรึงแอนติบอดีกับ 11-MUA บนพื้นผิวทอง

4.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงแอนติบอดี

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงมีความสำคัญเนื่องจากจะส่งผลให้เกิดการตรึงแอนติบอดีที่มีคุณภาพสูง ที่สามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจหาแบคทีเรียได้

ขั้นแรก คิวซีเอ็มเซนเซอร์ถูกดัดแปลงโดยใช้สภาวะที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 จากนั้นคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกดัดแปลงจะถูกนำไปใช้เพื่อตรวจแบคทีเรียในระบบของไหลเพื่อยืนยันว่าสามารถตรึงแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* ได้สำเร็จ การตรึงแอนติบอดีที่สำเร็จจะทำให้เกิดการตอบสนองของควมถี่หลังจากการฉีดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เข้าไปในระบบ สามารถอธิบายผลการทดลอง ได้ดังนี้:

สภาวะ 1 แสดงขั้นตอนกระตุ้นพื้นผิว SAM (SAM modified surface) แบบสองขั้นตอน ซึ่งไม่พบว่ามีสัญญาณของการจับกัน

สภาวะ 2 แสดงขั้นตอนการกระตุ้นพื้นผิว SAM แบบหนึ่งขั้นตอน โดย PBS บัฟเฟอร์, pH 7.4 ถูกใช้เป็นบัฟเฟอร์ สำหรับการตรึงแอนติบอดี ซึ่งไม่พบว่ามีสัญญาณของการจับ เช่นเดียวกันกับสภาวะ 1 ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า สภาวะ 1 และ 2 ไม่ทำให้เกิดการตรึงแอนติบอดี

ตารางที่ 4.2 สภาวะในการตรึงแอนติบอดี

สภาวะ	วิธี	สารทำปฏิกิริยา	ความเข้มข้น	เวลาในการบ่ม
1	1. การตัดแปลงพื้นผิวทอง	SAM	11-MUA ในเอทานอล 2 มิลลิโมลาร์	12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
	2. การกระตุ้นพื้นผิว SAM	EDC/NHS	ขั้นตอน 1: เติมน้ำ NHS ในน้ำปราศจากไอออน 0.5 โมลาร์ ขั้นตอน 2: เติมน้ำ EDC ในน้ำปราศจากไอออน 0.2 โมลาร์	60 นาทีสำหรับแต่ละขั้นตอน ที่อุณหภูมิห้อง
	3. การตรึงแอนติบอดี	แอนติบอดี (325AA2)	mAb ชนิด Anti-A. <i>actinomycescomitans</i> 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS บัฟเฟอร์, pH 7.4	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
2	1. การตัดแปลงพื้นผิวทอง	SAM	11-MUA 2 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล	12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
	2. การกระตุ้นพื้นผิว SAM	EDC/NHS	ขั้นตอน 1: เติมน้ำสารละลายผสมของ NHS 0.5 โมลาร์ และ EDC 0.2 โมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
	3. การตรึงแอนติบอดี	แอนติบอดี (325AA2)	mAb ชนิด Anti-A. <i>actinomycescomitans</i> 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS บัฟเฟอร์, pH 7.4	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3	1. การตัดแปลงพื้นผิวทอง	SAM	11-MUA 2 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล	12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
	2. การกระตุ้นพื้นผิว SAM	EDC/NHS	ขั้นตอน 1: เติมน้ำสารละลายผสมของ NHS 0.5 โมลาร์ และ EDC 0.2 โมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
	3. การตรึงแอนติบอดี	แอนติบอดี (325AA2)	mAb ชนิด Anti-A. <i>actinomycescomitans</i> 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 5.0	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับสภาวะ 3 เป็นขั้นตอนการกระตุ้น SAM แบบหนึ่ง ในสภาวะนี้ อะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 5.0 ถูกใช้เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการตรึงแอนติบอดี หลังทำการทดลองการตรวจหาแบคทีเรียในระบบของไหล พบว่ามีการตอบสนองของควมถี่ประมาณ 100 เฮิรตซ์ เมื่อเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* (1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) ถูกนำไปยังคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดี

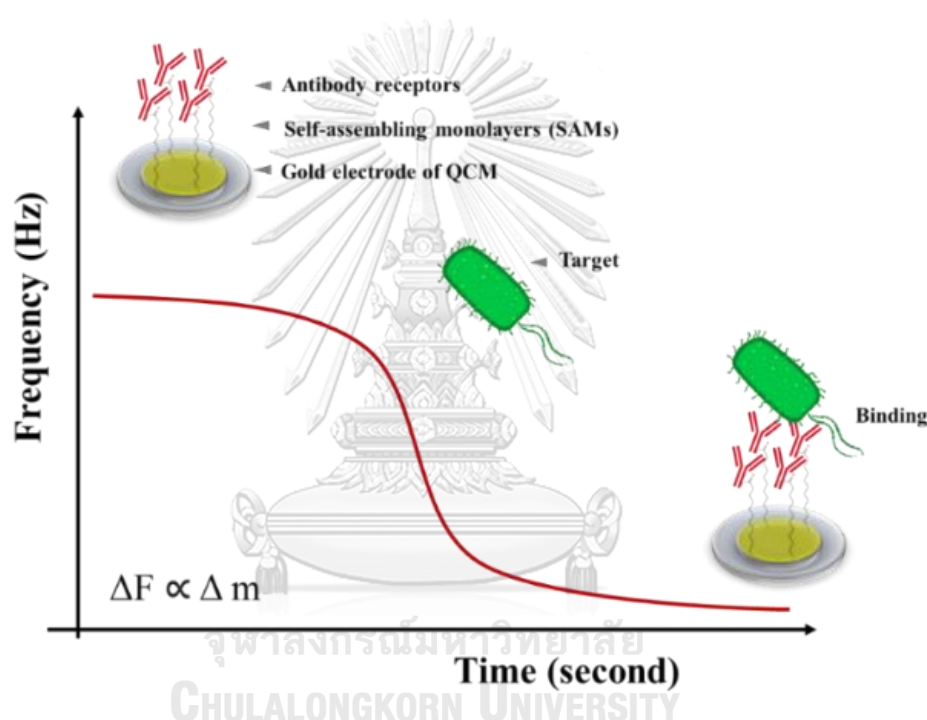
เนื่องจาก pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงควรต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของลิแกนด์คือแอนติบอดี (325AA2) ซึ่งมีค่า pI 7.4 ถึง 7.6 ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการตรึงที่ดี โดยหลักการแล้ว โปรตีนจะมีประจุเป็นบวกเมื่อละลายในสารละลายที่ pH ต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกและแอนติบอดีในขณะที่ย่านผิวที่ดัดแปลงด้วย 11-MUA และ EDC/NHS มีประจุลบ^[69] ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* (325AA2) คือสภาวะที่ 3 ดังได้บรรยายไว้ด้านล่าง:

ตารางที่ 4.3 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงแอนติบอดี

วิธี	สารทำปฏิกิริยา	ความเข้มข้น	เวลาในการบ่ม
1. การดัดแปลงพื้นผิวทอง	SAM	11-MUA 2 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล	12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
2. การกระตุ้นพื้นผิว SAM	EDC/NHS	ขั้นตอน 1: เติมสารละลายผสมของ NHS 0.5 โมลาร์ และ EDC 0.2 โมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. การตรึงแอนติบอดี	แอนติบอดี (325AA2)	mAb ชนิด Anti- <i>A. actinomycetemcomitans</i> 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 5.0	60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

บทที่ 5: การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์

การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ตามการศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโดยใช้ คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* ตรึงอยู่บนพื้นผิว การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียจะพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงความถี่ ในรูปที่ 5.1 แสดงเหตุการณ์จำลองตั้งแต่ขั้นตอนที่คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีแอนติบอดีตรึงอยู่ถูกจัดวางไว้ในระบบของไหล จากนั้นจึงฉีดตัวอย่างแบคทีเรียเข้าไปในระบบของไหลและแบคทีเรียจับกับแอนติบอดีบนพื้นผิวเซนเซอร์ สัญญาณความถี่เริ่มเปลี่ยนแปลงจนถึงจุดอิ่มตัว จากนั้นจะคำนวณปริมาณตัวอย่างแบคทีเรีย (target) จากการเปลี่ยนแปลงความถี่ทั้งหมด



รูปที่ 5.1 หลักการของคิวซีเอ็มเซนเซอร์สำหรับการตรวจแบคทีเรีย

ในหัวข้อนี้จะสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณของแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans* ในสารละลายแบคทีเรียที่ถูกเจือจางด้วย PBS บัฟเฟอร์ 1X PBS, pH 7.4 (KH_2PO_4 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 มิลลิโมลาร์) และจะศึกษาความจำเพาะของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* ตรึงอยู่ โดยใช้เซลล์แบคทีเรียอื่น ได้แก่ เซลล์ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* ฉีดเข้าไปในระบบตรวจวัดและสังเกตการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่เกิดขึ้น

5.1 เซลล์แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้การศึกษานี้ประกอบด้วย *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719) และ *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง^[70] ในขณะที่ *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104) เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแอกติโนมัยโคซิส (actinomycosis) *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอฟิล์มของคราบพลัค (plaque) แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดำเนินไปของโรคปริทันต์^[71]

การศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ได้รับตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ Yasuo Takeuchi ภาควิชาปริทันตวิทยา Tokyo Medical and Dental University ประเทศญี่ปุ่น การนำแบคทีเรียมาใช้นั้นได้ใช้เทคนิคเขี่ยเชื่อบนเพลท (Steak plate technique) เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวก่อนนำมาใช้งาน^[72]



รูปที่ 5.2 เทคนิคเขี่ยเชื่อบนเพลท

การแยกเชื้อแบคทีเรียให้เป็นโคโลนีเดี่ยวทำได้โดยการหยดตัวอย่างแบคทีเรียลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น ใช้อุปกรณ์เขี่ยเชื้อลากตัวอย่างแบคทีเรียเป็นแนวตามรูปที่ 5.2 จากพื้นที่เริ่มต้นที่มีหัวเขี่ยนั้นไปยังพื้นที่ใกล้เคียง (1) -> (2) -> (3) -> (4) จากนั้นบ่มเพลทที่เขี่ยเชื้อแล้วในภาชนะปิด ที่มีตัวดูดซับออกซิเจน (AnaeroPack®, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., ประเทศญี่ปุ่น) เพื่อทำให้เกิดสภาวะแอนแอโรบิก บ่มในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 24 ชั่วโมง จะสังเกตพบแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่บริเวณ (4) เลือกใช้เซลล์โคโลนีเดี่ยวนี้สำหรับการนำไปขยายเพิ่มจำนวนต่อไป

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะสภาวะแอนแอโรบิก ทำโดยใช้กรรมวิธีของ Komazaki R. และคณะ^[73] โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (broth) สูตร Brain-Heart Infusion (Oxoid Ltd.,

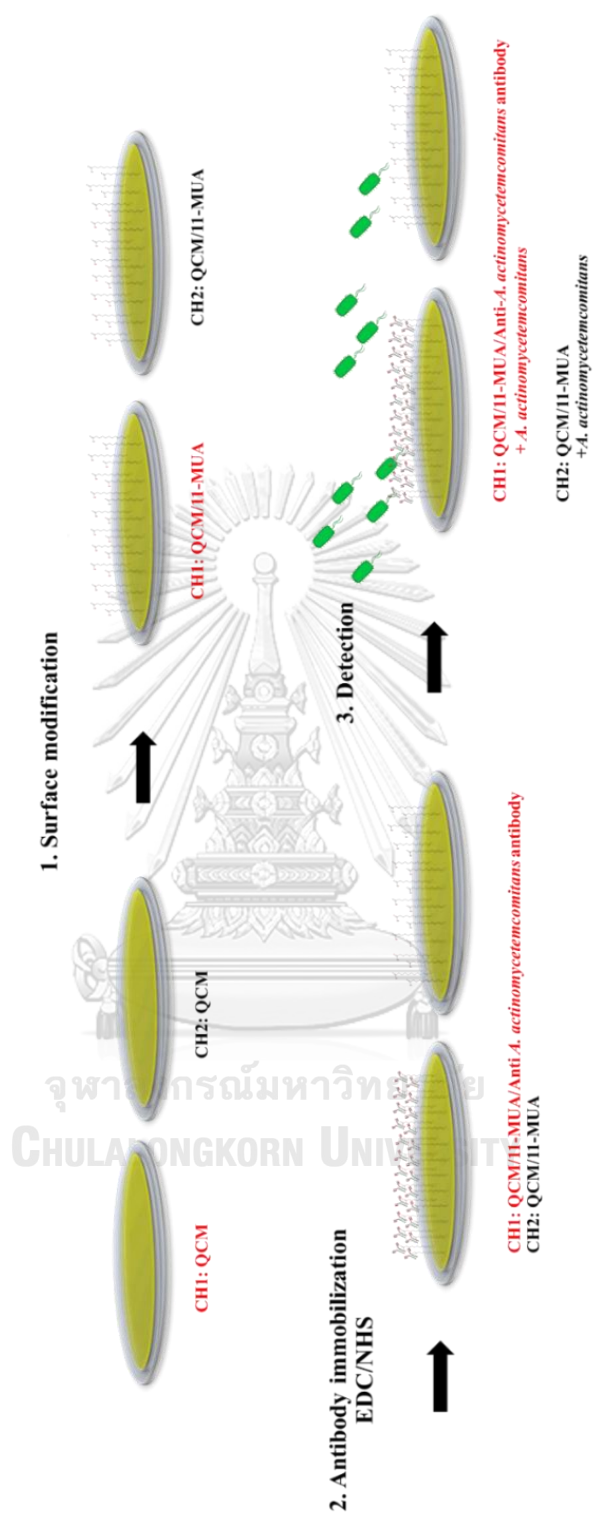
Basingstoke, ประเทศสหราชอาณาจักร) ที่มีเฮมิน (hemin) 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Sigma, Poole, ประเทศสหราชอาณาจักร) บ่มเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะ แอแนโรบิก

เมื่อจะเก็บเซลล์มาใช้งาน จะปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่อยู่ในอาหารเหลว โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง Micro Refrigerated Centrifuge Model 3740 (Kobota Corporation, ประเทศญี่ปุ่น) ที่ 8000 g เป็น เวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกอาหารเหลวออกจากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยใน PBS บัฟเฟอร์ใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน การนับจำนวนเซลล์เพื่อปรับ ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย จะใช้แชมเบอร์สำหรับการนับเชื้อ (Petroff-Hauser counting chamber) โดยการเติมตัวอย่างแบคทีเรียที่ถูกเจือจางด้วย PBS บัฟเฟอร์ 1X PBS, pH 7.4 (KH_2PO_4 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วนที่ทำให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และนับ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เชิงแสง

สำหรับการเก็บเซลล์เป็นสต็อกในระยะยาว จะปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมที่ 8000 g เป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกอาหารเดิมออก และผสมเซลล์กับ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่เตรียมมาใหม่ที่มีกลีเซอรอล 40% ในสัดส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) แบ่งบรรจุ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลีเซอรอลลงในหลอดสำหรับแช่แข็ง (cryotube) เก็บหลอดตัวอย่างแบคทีเรียไว้ที่ตู้แช่ แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานครั้ง ต่อไป

5.2 การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์

กระบวนการตรวจเซลล์แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ จะใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบสองช่องสัญญาณ ชนิด 30 เมกะเฮิร์ตซ์ โดยกำหนดให้ช่องสัญญาณที่หนึ่ง (CH1) เป็นช่องสัญญาณสำหรับตรวจวัดแบคทีเรีย จึงได้ ทำดัดแปลงพื้นผิวทองด้วย 11-MUA และตรึงแอนติบอดีชนิด *Anti-A. actinomycetemcomitans* ส่วน ช่องสัญญาณที่สอง (CH2) เป็นช่องสัญญาณควบคุม (control) จะดัดแปลงพื้นผิวทองด้วย 11-MUA และ ตามด้วย EDC/NHS เมื่อเตรียมพื้นผิวเซนเซอร์เสร็จสิ้นแล้ว จึงจัดวางควิซีเอ็มเซนเซอร์ดังกล่าวเข้าในระบบ ตรวจวัดชนิดของไหล (แสดงไว้ในรูปที่ 3.3 - การจัดเตรียมระบบของไหลสำหรับการตรวจวัด) ที่ต่อเชื่อมอยู่ ในระบบ NAPiCOS® (แสดงไว้ในรูปที่ 3.5 - ระบบ NAPiCOS® สำหรับควิซีเอ็มเซนเซอร์) เพื่อใช้ในการ ตรวจวัดตัวอย่างแบคทีเรีย ดังแสดงเป็นผังแผนภาพของกระบวนการตรวจโดยใช้ควิซีเอ็มไบโอเซนเซอร์ ดัง รูปที่ 5.3 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้



รูปที่ 5.3 แผนผังภาพของกระบวนการตรวจโดยใช้ควิซซีเอ็มไบโอเซนเซอร์

1) การดัดแปลงพื้นผิวทอง (Surface modification)

ดำเนินการดัดแปลงพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์โดยใช้สาร 11-MUA ที่ช่องสัญญาณที่ 1 และช่องสัญญาณที่ 2 และแทนด้วยสัญลักษณ์: CH1: QCM และ CH2: QCM ดังนี้

1.1) ใช้ซินโอริงสำหรับดัดแปลงพื้นผิวทอง (แสดงไว้ในรูปที่ 4.6 - ซินโอริงสำหรับดัดแปลงพื้นผิวทอง)

และชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็มเซนเซอร์ (แสดงไว้ในรูปที่ 4.7 - ชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็มเซนเซอร์) เพื่อดัดแปลงพื้นผิวทองของควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบสองช่องสัญญาณ ชนิด 30 เมกะเฮิร์ตซ์

1.2) เตรียมสารละลาย 11-MUA (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในเอทานอล ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกับหัวข้อ “4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการดัดแปลงพื้นผิวทองด้วยโมเลกุล SAM” ในบทที่ 4

1.3) เตรียมสารละลาย 11-MUA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ลงไปบนพื้นผิวทองของทั้งช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 ช่องละ 180 ไมโครลิตร โดยชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ใช้ มีช่องรองรับสารละลาย 11-MUA อยู่ในตำแหน่งเหนือช่องสัญญาณทั้งสอง

1.4) ใช้ฟาราฟิล์มปิดหุ้มรอบชุดสำหรับการดัดแปลงควิซีเอ็มเซนเซอร์ เก็บไว้ให้แห้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเรียงตัวของชั้น 11-MUA ที่ช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 และแทนด้วยสัญลักษณ์

CH1: QCM/11-MUA และ

CH2: QCM/11-MUA ตามลำดับ

1.5) หลังครบ 12 ชั่วโมง นำสารละลาย 11-MUA ออก ล้างช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 ด้วยเอทานอล 250 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำปราศจากไอออน 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารละลาย 11-MUA และเอทานอลที่เป็นส่วนเกินออกไป

2) การตรึงแอนติบอดี (Antibody immobilization)

ดำเนินการตรึงแอนติบอดีบน 11-MUA โดยจะตรึงแอนติบอดีเฉพาะช่องสัญญาณที่ 1 ซึ่งแทนด้วยสัญลักษณ์ CH1: QCM/11-MUA/ Anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody และช่องสัญญาณที่ 2 ซึ่งเป็นช่องสัญญาณควบคุม (control) จะไม่มีการตรึงแอนติบอดี แทนด้วยสัญลักษณ์ CH2: QCM/11-MUA ดังนี้

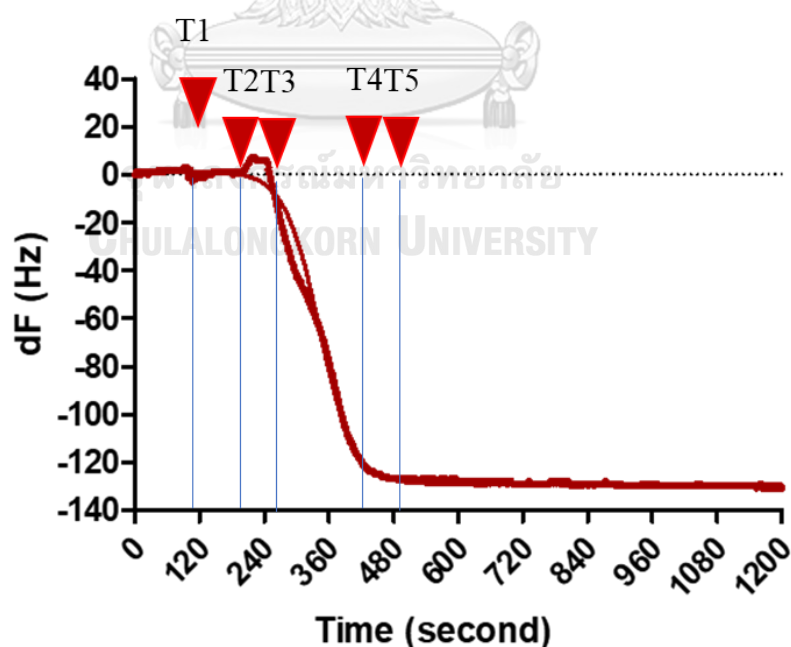
- 2.1) เตรียมสารละลายผสมของ N-ไฮดรอกซีซึกซินิไมด์ (NHS, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, ประเทศญี่ปุ่น) 0.5 โมลาร์ และ 1-เอธิล-3-[3-ไดเมธิลอะมิโนโพรพิล] คาร์โบไดไฮไมด์ ไฮโดรคลอไรด์ (EDC, Chemical Dojin Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น) 0.2 โมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน ในที่นี้เรียกว่าสารละลายผสม EDC/NHS
- 2.2) เติมสารละลายผสม EDC/NHS ลงไปบนพื้นผิวทองที่ผ่านการปรับผิวด้วย 11-MUA ของช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 ช่องละ 100 ไมโครลิตร เพื่อกระตุ้นพื้นผิว QCM/11-MUA และบ่มเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 2.3) หลังครบเวลา 60 นาที นำสารละลายผสม EDC/NHS ออกจากช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 ไมโครลิตร และดูดน้ำปราศจากไอออนนั้นออก
- 2.4) เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) ชนิด Anti-*A. actinomycetemcomitans* 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 5.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ช่องสัญญาณ CH1 เติมอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 5.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ช่องสัญญาณ CH2 (ไม่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี) และบ่มอย่างต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
- 2.5) หลังครบเวลา 60 นาที นำสารละลายออกจากช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 และหยุดความไวปฏิกิริยาที่ปลายคาร์บอกซิลของ 11-MUA โดยเติมสารละลายเอธานอลามีน 1 โมลาร์, pH 8.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายเอธานอลามีน ออกจากช่องสัญญาณ CH1 และช่องสัญญาณ CH2 จะแทนด้วยสัญลักษณ์
CH1: QCM/11-MUA/ Anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody และ
CH2: QCM/11-MUA ตามลำดับ

3) การตรวจวัด (Detection)

ดำเนินการตรวจวัดแบบที่เรียวยโดยการฉีดตัวอย่างแบคทีเรียไปยังห้องตรวจวัด สารละลายตัวอย่างที่มีแบคทีเรียจะสัมผัสกับช่องสัญญาณที่ 1 และช่องสัญญาณที่ 2 ในเวลาเดียวกัน แทนด้วยสัญลักษณ์:

CH1: QCM/11-MUA/Anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody +
A. actinomycetemcomitans และ CH2: QCM/11-MUA + *A. actinomycetemcomitans* ดังนี้

- 3.1) นำควิชีเอ็มเซนเซอร์ที่ผ่านขั้นตอนการตรึงแอนติบอดี ติดตั้งในห้องตรวจวัดของระบบตรวจวัดชนิดของไหล (แสดงไว้ในรูปที่ 3.3 - การจัดเตรียมระบบของไหลสำหรับการตรวจวัด) ที่ต่อเชื่อมอยู่ในระบบ NAPICOS® (แสดงไว้ในรูปที่ 3.5 - ระบบ NAPICOS® สำหรับควิชีเอ็มเซนเซอร์)
- 3.2) เริ่มการทำงานของปั๊มเพื่อนำ PBS บัฟเฟอร์ 1X PBS, pH 7.4 (KH_2PO_4 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 มิลลิโมลาร์) เข้าสู่ระบบด้วยอัตราการไหล 50 ไมโครลิตร/นาที่ รอจนได้เบสไลน์ที่คงตัวเป็นเวลาประมาณ 20 ถึง 30 นาที
- 3.3) เตรียมเซลล์แขวนลอย *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้น 1.16×10^3 , 1.16×10^4 , 1.16×10^5 , 1.16×10^6 , 1.16×10^7 และ 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ไล่ล่งหน้าโดยใช้ PBS บัฟเฟอร์ 1X PBS, pH 7.4 (KH_2PO_4 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 มิลลิโมลาร์) เป็นสารละลายเจือจาง
- 3.4) ฉีดตัวอย่างแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร เข้าไปยังระบบตรวจวัดผ่านทางวาล์วควบคุมช่องทางไหล แต่ละความเข้มข้น จะทำการทดลองซ้ำสามครั้ง โดยใช้ควิชีเอ็มเซนเซอร์ใหม่ทุกครั้ง
- 3.5) สังเกตการตอบสนองของความถี่ที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 500 วินาที (แสดงการเกิดเหตุการณ์ตามจุดเวลาต่าง ๆ ไว้ในรูปที่ 5.4 และตารางที่ 5.1)



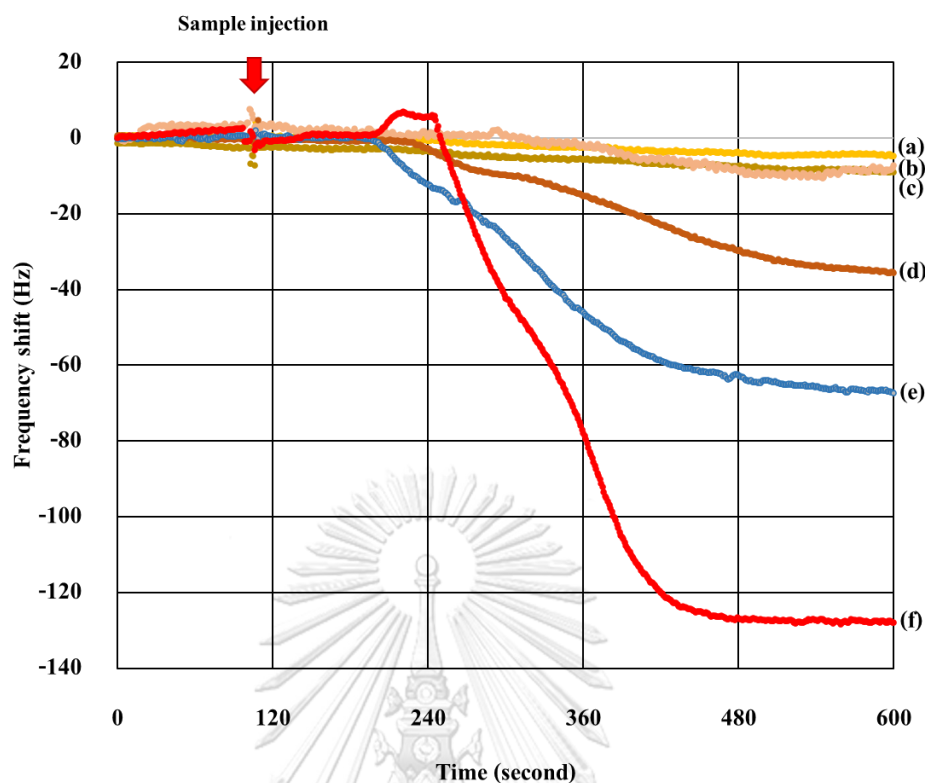
รูปที่ 5.4 รูปแบบตัวอย่างของสัญญาณจากควิชีเอ็มในระหว่างกระบวนการตรวจวัด

ตารางที่ 5.1 จุดเวลาของกระบวนการตรวจหาตัวอย่าง

จุดเวลา	เหตุการณ์ที่เกิดขึ้น	เวลาที่แกน x (วินาที)
T1	ฉีดตัวอย่างแบคทีเรียผ่านทางวาล์วควบคุมช่องทางไหล - ที่อัตราการไหล 50 ไมโครลิตร/นาที่ - ปริมาตรการฉีด 200 ไมโครลิตร	100
T2	ตัวอย่างเริ่มเข้าสู่ห้องตรวจวัด - ผ่านทางท่อ PEEK 390 มิลลิเมตร คิดเป็นปริมาตรเท่ากับ 77 ไมโครลิตร	192
T3	ตัวอย่างเต็มเต็มที่วางภายในห้องตรวจวัด	400
T4	ตัวอย่างไหลผ่านห้องตรวจวัด	432
T5	ตัวอย่างทั้งหมดไหลผ่านออกจากห้องตรวจวัด	494

จากตารางที่ 5.1 ทำให้ทราบว่าตัวอย่างจะไหลออกจากห้องตรวจวัดอย่างสมบูรณ์ ที่เวลาประมาณ 494 วินาที ดังนั้นในการตรวจวัดแต่ละครั้งจึงติดตามการเปลี่ยนแปลงความถี่เป็นเวลอย่างน้อย 500 วินาที

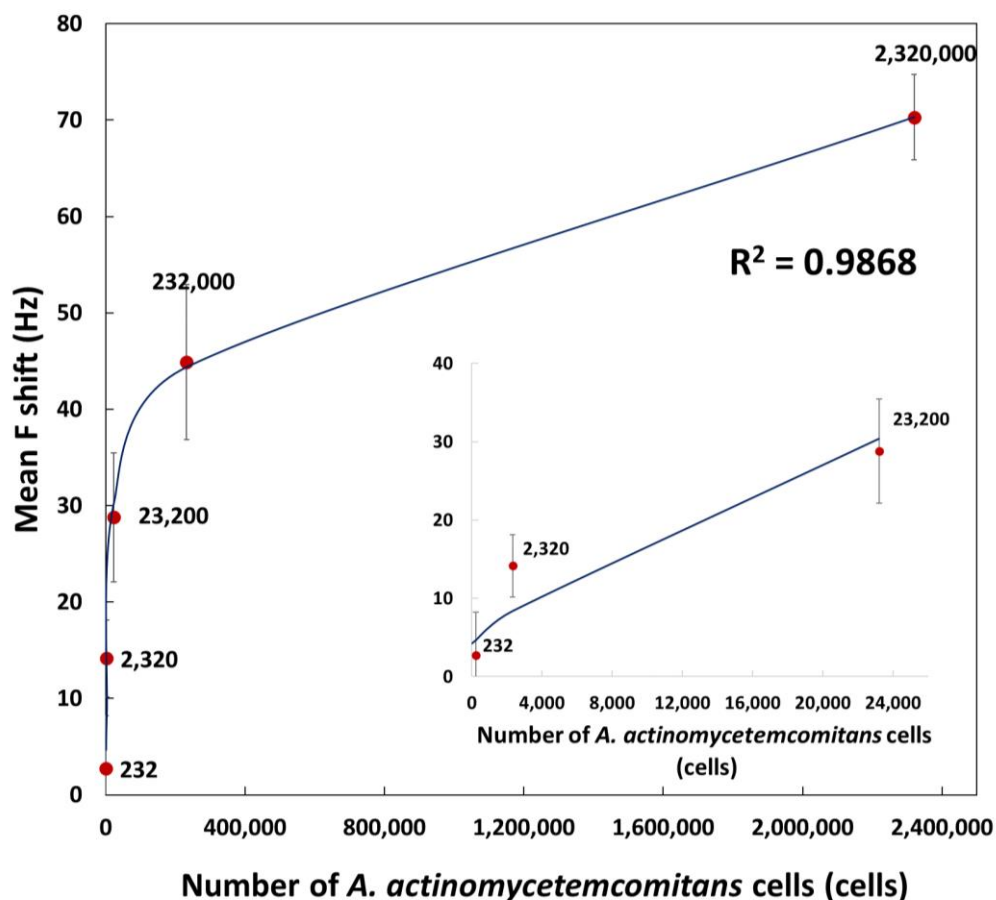
3.6) นำค่าการตอบสนองของความถี่จากข้อ 3.5 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแบคทีเรียและการตอบสนองของความถี่ (รูปแบบการตอบสนองทั้งหมดของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีต่อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ถูกแสดงไว้ใน ภาคผนวก A รูปที่ A-6)



รูปที่ 5.5 การตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการทดลองจากรูปที่ 5.5 บ่งชี้ว่าเมื่อฉีดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น (a) 1.16×10^3 , (b) 1.16×10^4 , (c) 1.16×10^5 , (d) 1.16×10^6 , (e) 1.16×10^7 และ (f) 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร (คิดเป็นจำนวนเซลล์ตั้งแต่ 232 ถึง 2.32×10^7 เซลล์) เข้าไปในระบบตรวจวัด จะมีการเปลี่ยนแปลงความถี่ประมาณ 7, 16, 24, 40, 67 และ 131 เฮิรตซ์ ตามลำดับ ณ เวลาที่ประมาณ 400 วินาที ซึ่งเป็นเวลาที่ตัวอย่างแบคทีเรียเข้าเต็มภายในห้องตรวจวัด ทำให้ได้การเปลี่ยนแปลงความถี่คงที่ ซึ่งการตอบสนองของความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์ต่อเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration dependent)

ได้สร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่ และจำนวนแบคทีเรียสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans* ดังแสดงไว้รูปที่ 5.6 (ค่าเฉลี่ยและ SD ได้จากการตรวจวัดซ้ำสามครั้ง)



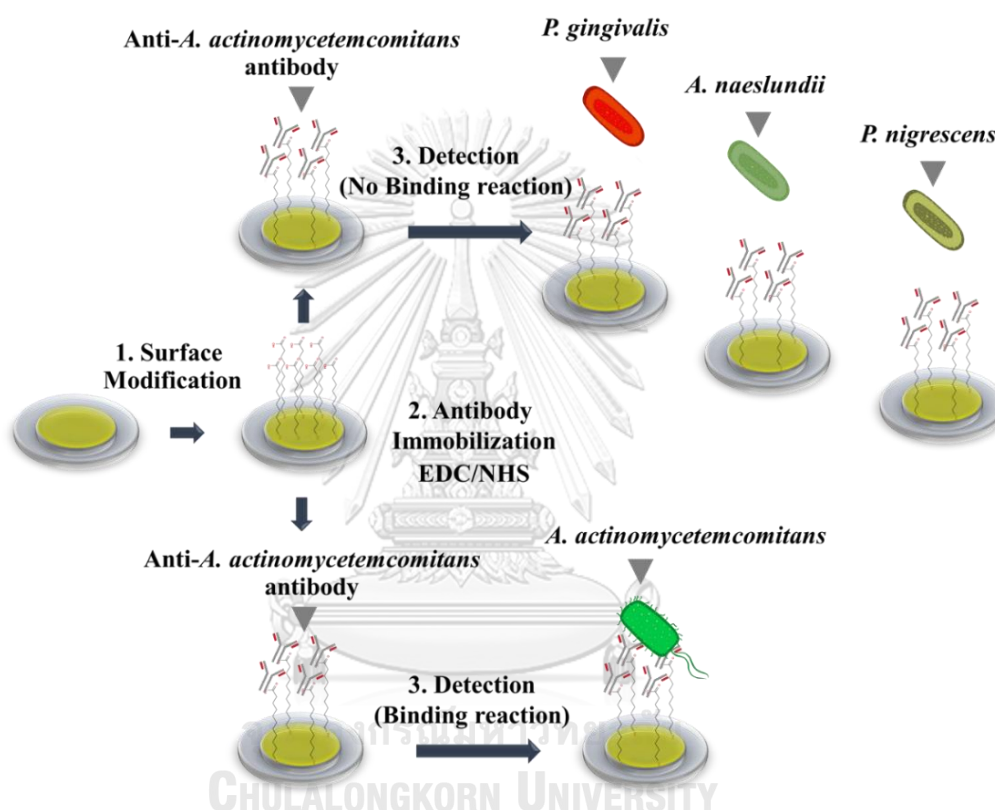
รูปที่ 5.6 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหา *A. actinomycetemcomitans*

ในวิธีการตรวจวัดทั่วไป จะกำหนดให้ขีดจำกัดล่างของการตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงของค่าความถี่ที่มีค่าเป็นสามเท่าของการเปลี่ยนแปลงของค่าเบสไลน์ของเซนเซอร์ ในการศึกษา ค่าเบสไลน์ของเซนเซอร์ได้ การเปลี่ยนแปลงสัญญาณของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ฉีด PBS บัฟเฟอร์เข้าในระบบ (จากรูปที่ 3.6 - พบว่าค่าสัญญาณเบสไลน์ของควิซีเอ็มเซนเซอร์มีการเปลี่ยนอยู่ที่ประมาณ ± 3 ถึง 5 เฮิร์ตซ์ โดยอาศัยสมการการถดถอย (regression equation) ขีดจำกัดล่างของการตรวจวัดจึงเท่ากับ 1.16×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (800 เซลล์) โดยมีช่วงการวัดได้สูงถึง 2.32×10^6 เซลล์

จากผลการทดลองในหัวข้อนี้แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* สามารถตรวจจับตัวแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans* ได้เป็นอย่างดีจากผลการเปลี่ยนแปลงความถี่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการตรึงแอนติบอดีประสบความสำเร็จ และการยึดติดระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดีบนผิวทองมีความแน่นหนาที่เพียงพอต่อการวัด เนื่องจากค่า

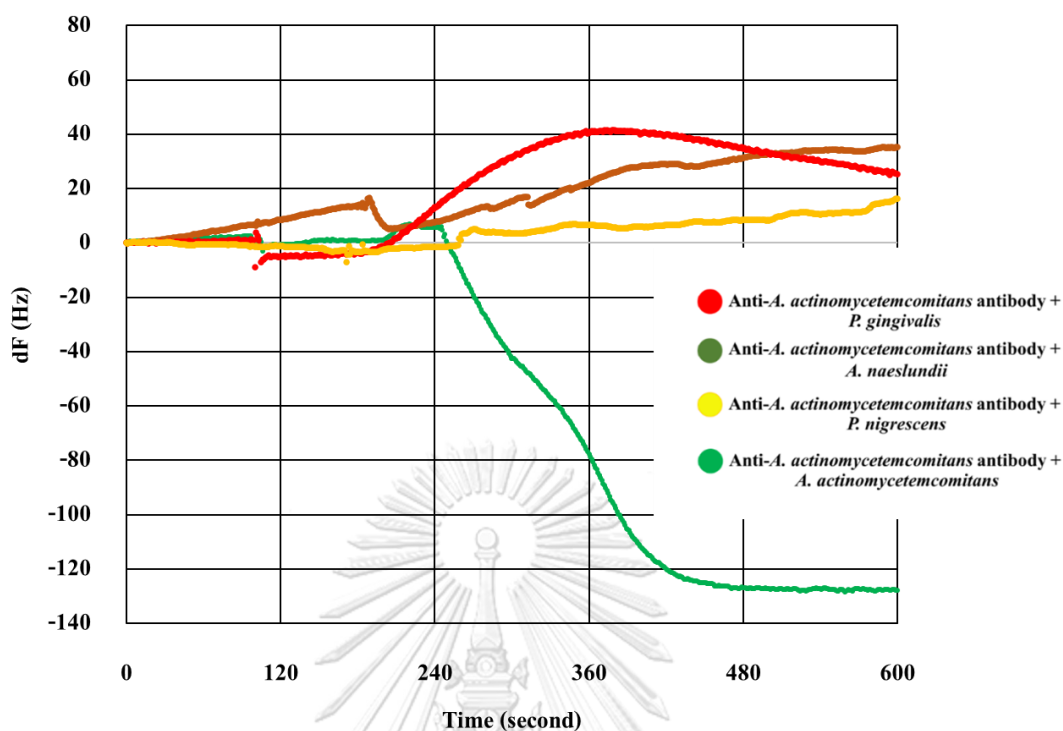
สัญญาณการจับกันอยู่หนึ่งตลอดการตรวจวัด คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดแบคทีเรีย และใช้เวลาในการตรวจที่รวดเร็วภายในเวลาประมาณ 10 นาที

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความจำเพาะของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* โดยเปรียบเทียบการจับกันของเซนเซอร์นี้กับเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์ *A. actinomycetemcomitans*, เซลล์ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* ดังแสดงในรูป 5.7



รูปที่ 5.7 ความจำเพาะของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกดัดแปลง

ในขั้นตอนการตรวจวัดแบคทีเรียจะนำคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีแล้วมาติดตั้งในห้องตรวจวัดของระบบตรวจวัดชนิดของไหล เตรียมเซลล์ *A. actinomycetemcomitans*, เซลล์ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* ที่ความเข้มข้น 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ไว้วางหน้า โดยใช้ PBS บัฟเฟอร์ 1X PBS, pH 7.4 (KH_2PO_4 1 มิลลิโมลาร์, NaCl 1 มิลลิโมลาร์, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 มิลลิโมลาร์) เป็นสารละลายเจือจาง และฉีดตัวอย่างแบคทีเรียแต่ละชนิด ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร เข้าไปยังระบบการตรวจวัด ทำการทดสอบแยกกัน โดยใช้เซนเซอร์ใหม่ที่ถูกตรึงแอนติบอดีใหม่ทุกครั้ง สังเกตการตอบสนองของควมถี่ที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 500 วินาที



รูปที่ 5.8 การเปรียบเทียบการตอบสนองของควมถี่ที่ได้จากเซลล์แบคทีเรียสี่ชนิดบนคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่
ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิด Anti-A. actinomycetemcomitans

รูปที่ 5.8 แสดงผลการตอบสนองของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีชนิด anti-A. actinomycetemcomitans ต่อเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* (เส้นสีเขียว) และมีเซลล์ *P. gingivalis* (เส้นสีแดง), เซลล์ *P. nigrescens* (เส้นสีเหลือง) และเซลล์ *A. naeslundii* (เส้นสีน้ำตาล) เป็นตัวควบคุมเชิงลบ ผลการตอบสนองของคิวซีเอ็มเซนเซอร์บ่งชี้ว่าสัญญาณความถี่ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ค่อย ๆ ลดลงเมื่อฉีดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เข้าไปยังระบบการตรวจวัด และเห็นเปลี่ยนแปลงความถี่ถึงประมาณ 120 เฮิร์ตซ์ ภายใน 7 นาที แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงความถี่ในลักษณะเดียวกับ เซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เมื่อฉีดเซลล์ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* เข้าไปยังพื้นผิวเซนเซอร์

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่เวลาประมาณ 200 ถึง 500 วินาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ตัวอย่างเริ่มเข้าสู่ห้องตรวจวัดจนกระทั่งตัวอย่างไหลผ่านออกจากห้องตรวจวัด พบว่าในช่วงเวลานี้เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* ทำให้เกิดค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 20 ถึง 40 เฮิร์ตซ์ ตามลำดับ แต่เซลล์ *P. gingivalis* ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกและค่อย ๆ ลดลง จนถึงประมาณ 20 เฮิร์ตซ์ อย่างไรก็ตามทั้งเซลล์ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์

A. naeslundii ล้วนไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่ลดลงต่ำกว่า 0 เฮิร์ตซ์ แสดงว่าเซลล์ทั้งสามชนิดไม่จับกับแอนติบอดีและค่อย ๆ ออกไปจากระบบตรวจวัดในที่สุด ขณะที่เซลล์ *A. actinomycetemcomitans* แสดงการเปลี่ยนแปลงของความถี่ที่ลดลงอย่างต่อเนื่องและค่อย ๆ คงที่ที่ประมาณ -120 เฮิร์ตซ์ การเปลี่ยนแปลงความถี่นี้แสดงให้เห็นว่า *A. actinomycetemcomitans* จับกับพื้นผิวแอนติบอดีและอยู่ในระบบตรวจวัด จึงอาจกล่าวได้ว่าแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* 325AA2 มีความจำเพาะต่อเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เท่านั้น

มีรายงานถึงการใช้งานแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* 325AA2 ในปี 1996 โดย Gmür และ Thurnheer เพื่อใช้ในการระบุชนิดเซลล์แบคทีเรีย และงานวิจัยนี้กล่าวถึงประสิทธิภาพของแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* 325AA2 ว่ามีความจำเพาะต่อเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* สูง^[74] ในปี 2014 Benjamin D. Reeves และคณะ ได้ประยุกต์ใช้แอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* 325AA2 ไอโซไทป์ mIgG2b ที่ผลิตจากหนูเมาส์^[75] เพื่อศึกษาจลนศาสตร์การจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิดนี้กับไบโอฟิล์ม และยืนยันประสิทธิภาพของแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* 325AA2 ว่ามีความจำเพาะในการจับกับเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เช่นกัน วิทยานิพนธ์นี้ใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกับการศึกษาทั้งสอง และยืนยันผลดังกล่าว

โดยทั่วไปแล้วการจับกันระหว่างแอนติเจน (หรือในที่นี้หมายถึงแอนติเจนบนผิวเซลล์แบคทีเรีย) กับแอนติบอดีนั้นจะขึ้นกับอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ ระหว่างโมเลกุลทั้งสอง ซึ่งหากระบุให้ชัดเจนจะหมายถึงแรงไฮโดรโฟบิกระหว่างหมู่ไฮโดรโฟบิกของหมู่ด้านข้างของอะมิโนแอซิดในโมเลกุลเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือโปรตีนที่ฝังเซลล์ของเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* กับหมู่ไฮโดรโฟบิกของหมู่ด้านข้างของอะมิโนแอซิดในโมเลกุลแอนติบอดี มีการประมาณว่าอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกมีส่วนทำให้เกิดความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีมากถึง 50%^[25] นอกจากนี้มีรายงานว่าสภาพพื้นผิวของเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เป็นประจุลบ^[76-78] มีค่าศักย์ซีตา (zeta potential) อยู่ในช่วง -11 ถึง -26 มิลลิโวลต์^[79] และค่าศักย์ซีตาของแบคทีเรียนี้อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดอันตรกิริยาที่แตกต่างระหว่างเซลล์ชนิดอื่น ๆ

ตารางที่ 5.2 ค่าศักย์ซีตาของแบคทีเรีย

ชนิดเซลล์	ค่าศักย์ซีตา (มิลลิโวลต์)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-11 ถึง -26 ^[79]
<i>P. gingivalis</i>	-17.3 ^[80]
<i>A. naeslundii</i>	-25 ถึง -35 ^[81]

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* ที่ประดิษฐ์ขึ้นมีความจำเพาะต่อ *A. actinomycetemcomitans* ที่สูงอย่างชัดเจน



บทที่ 6: การวิเคราะห์อันตรกิริยา

บทนี้กล่าวถึงรายละเอียดของการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนที่ตรวจวัดด้วยคิวิซีเอ็มเซนเซอร์ โดยการวิเคราะห์สัญญาณความถี่ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ 1. การเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF) 2. การหาค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) 3. การวิเคราะห์เวลาการตอบสนอง (response time, T) และ 4. การวิเคราะห์ความชันของการตอบสนอง (response slope)

ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมดเป็นผลจากการทดลองก่อนหน้านี้ ในบทที่ 5 “การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์” วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลในบทนี้จะเริ่มต้นด้วยการอธิบายวิธีเตรียมการทดลองโดยสังเขปอีกครั้ง เพื่อลำดับที่มาของข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์

วัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์อันตรกิริยาทั้งหมดเป็นไปเพื่อการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสัญญาณความถี่ที่ผ่านกระบวนการวิเคราะห์แบบต่าง ๆ มาใช้อธิบายสัมพรรคภาพในการจับกัน (binding affinity) และใช้จำแนกความจำเพาะ (specificity) ของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนต่อแบคทีเรียที่ตรวจวัดด้วยคิวิซีเอ็มเซนเซอร์ได้

6.1 การเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF)

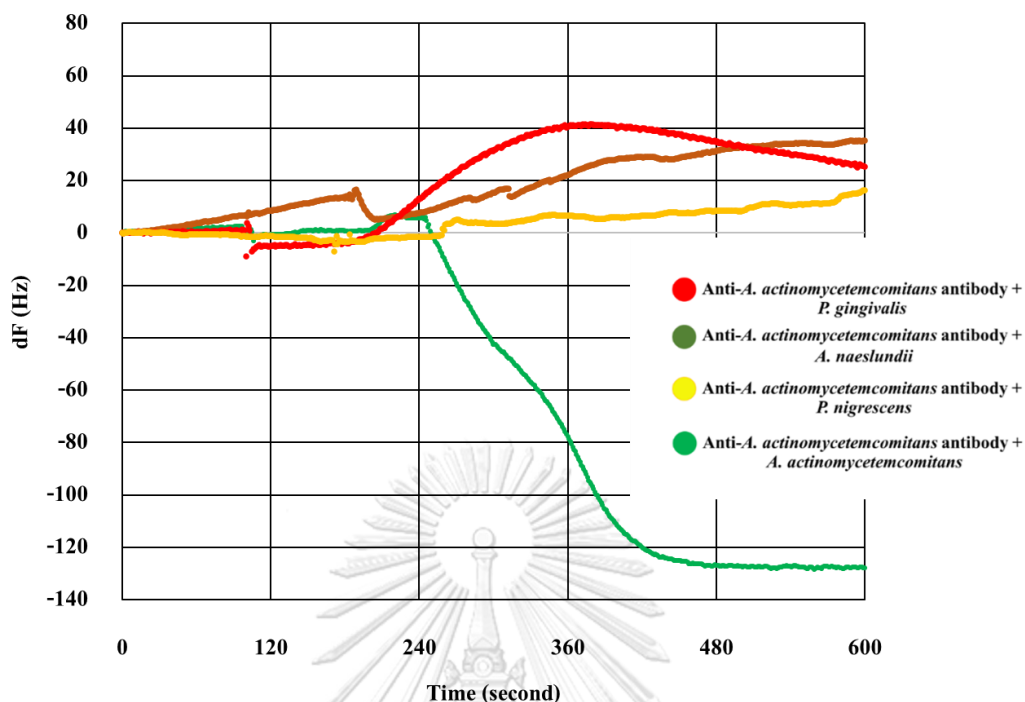
หัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุว่าการเปลี่ยนแปลงความถี่สามารถใช้อธิบายสัมพรรคภาพในการจับกัน และความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนกับเซลล์แบคทีเรียได้หรือไม่ โดยจะพิจารณาสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิด anti-A. actinomycetemcomitans กับเซลล์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ A. actinomycetemcomitans, เซลล์ P. gingivalis, เซลล์ P. nigrescens และเซลล์ A. naeslundii ที่ความเข้มข้นเดียวกัน การเตรียมการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลความถี่สำหรับการวิเคราะห์ มีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

1) การดัดแปลงพื้นผิวทอง ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวิซีเอ็มเซนเซอร์”

2) การตรึงแอนติบอดี ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวิซีเอ็มเซนเซอร์”

3) การตรวจวัด ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวิซีเอ็มเซนเซอร์”

4) การจัดการข้อมูลความถี่ ใช้ข้อมูลความถี่ที่เกิดขึ้น ที่เวลา 400 วินาทีมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่เทียบกับเวลา



รูปที่ 6.1 อันตรกิริยาแบบเรียลไทม์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ กับแอนติบอดีชนิด anti-A. actinomycetemcomitans

เมื่อพิจารณาสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิด anti-A. actinomycetemcomitans กับเซลล์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ แล้วพบว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงความถี่ (รูปที่ 6.1) ของคู่แอนติบอดีกับเซลล์แบคทีเรียที่มีความจำเพาะ และคู่แอนติบอดีกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีความจำเพาะ แตกต่างกันอย่างชัดเจน

สัญญาณที่ได้บ่งชี้ว่าเมื่อฉีดตัวอย่างเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* เข้าไปในระบบตรวจวัดของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิด anti-A. actinomycetemcomitans แล้ว เซลล์แบคทีเรียชนิด *A. actinomycetemcomitans* เกิดการจับกับแอนติบอดีอย่างชัดเจน โดยมีค่าความถี่ที่ลดลงถึง 120 เฮิรตซ์ (สีเขียว) และความถี่ที่ลดลงนี้จะไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงวินาทีที่ 600 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีจับกับเซลล์แบคทีเรียอย่างแน่นหนาและไม่หลุดออกจากกัน ในทางตรงกันข้ามเมื่อฉีดตัวอย่างเซลล์ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* เข้าไปในระบบตรวจวัดของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวกัน ไม่พบสัญญาณความถี่ที่ลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีชนิด anti-A. actinomycetemcomitans ที่ตรึงอยู่บนควิซีเอ็มเซนเซอร์นี้ไม่จับกับเซลล์แบคทีเรียชนิด *P. gingivalis*, *P. nigrescens* และ *A. naeslundii* ผลการเปลี่ยนแปลงความถี่นี้สอดคล้องกับผลการทดลอง

ELISA ที่ได้ทดสอบยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดี 325AA2 กับ

A.

actinomycescomitans (ดูรูปที่ C-6 ในภาคผนวก C) จากผลการเปลี่ยนแปลงความถี่นี้ สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความถี่สามารถแสดงให้เห็นความสามารถในการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียได้ หากแอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกัน และเกิดการจับกันได้ ค่าสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่จะค่อย ๆ ลดต่ำลงดังที่เกิดกับคู่เซลล์ A. *actinomycescomitans* และแอนติบอดีชนิด anti-A. *actinomycescomitans* หากแอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียไม่มีความจำเพาะต่อกัน ค่าสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่จะไม่ลดต่ำลง และเซลล์จะค่อย ๆ ออกไปจากระบบตรวจวัดในที่สุด การเปลี่ยนแปลงความถี่ที่มีค่าสูงขึ้นเมื่อฉีดเซลล์ชนิดอื่นอาจเกิดจากปัจจัยของสภาพไฟฟ้าที่พื้นผิวเซลล์ที่เป็นลบ (ตารางที่ 5.2 ค่าศักย์ไฟฟ้าของแบคทีเรีย) และสภาพไฟฟ้าของพื้นผิวเซนเซอร์ที่เป็นลบ

6.2 การหาค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT)

หัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) สามารถใช้อธิบายสัมพรรคภาพในการจับกัน และความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนกับเซลล์แบคทีเรียได้หรือไม่ ผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบใน 2 ลักษณะ ได้แก่ ก. การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ต่างชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และ ข. การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ก. การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ต่างชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

การเตรียมการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) สำหรับการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ต่างชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกันมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

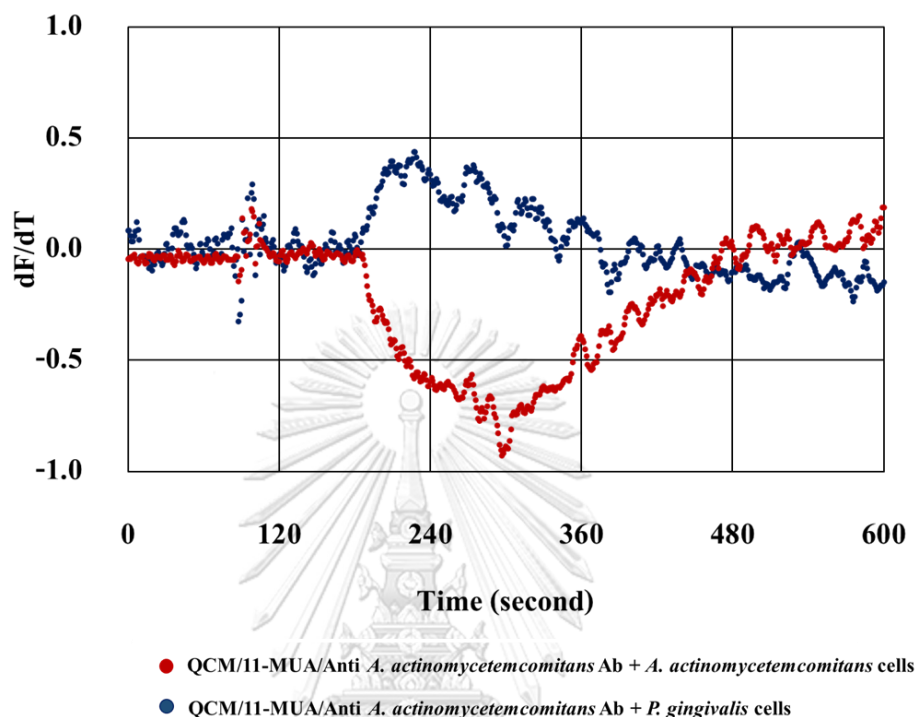
1) การดัดแปลงพื้นผิวทอง ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์”

2) การตรึงแอนติบอดี ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์”

3) การตรวจวัด ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์”

4) การจัดการข้อมูลความถี่ ใช้ข้อมูลความถี่ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 600 วินาที โดยนำข้อมูลมาผ่านวิธีหาค่าเฉลี่ยแบบเคลื่อนที่ (moving average) เพื่อกำจัดความแปรปรวนระหว่างข้อมูลความถี่ภายในเวลา 600 วินาที จากนั้นคำนวณค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่หรือค่าอัตราการเปลี่ยนแปลง

ความถี่ (dF/dT) ภายในช่วง 10 วินาที ($dt = 10$ วินาที) สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dF/dT เทียบกับเวลา และเปรียบเทียบค่าที่ต่ำสุดของ dF/dT (พีค) ในแบคทีเรียทั้งสองชนิด

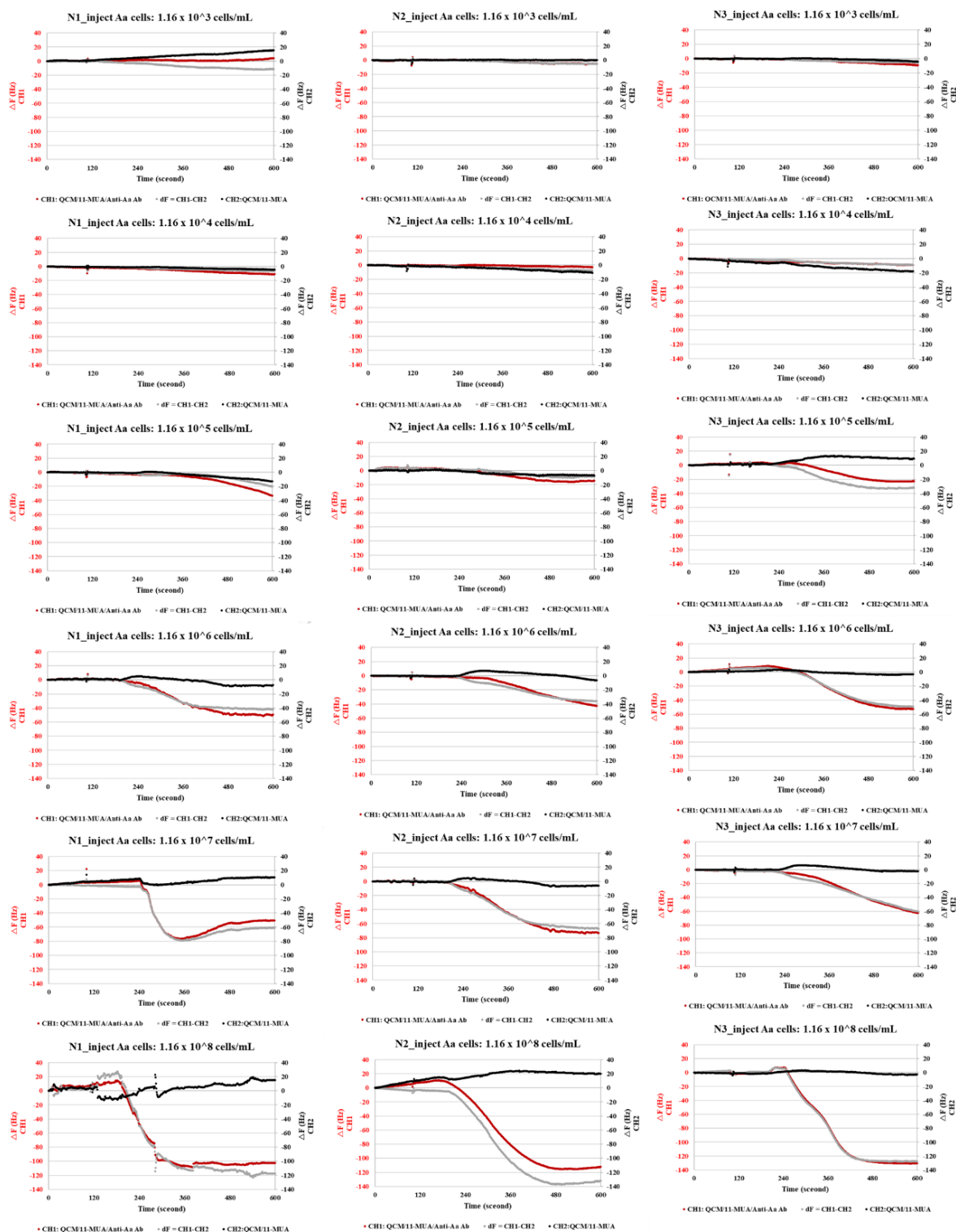


รูปที่ 6.2 ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ของแบคทีเรียสองชนิดกับ แอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans*

เมื่อพิจารณาค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ของแบคทีเรียสองชนิดกับ แอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* แล้วพบว่ารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์ อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) (รูปที่ 6.2) ที่ได้จากคู่แอนติบอดีกับเซลล์แบคทีเรียที่มีความจำเพาะ และคู่แอนติบอดีกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีความจำเพาะ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จุดสีแดงในรูปเป็นค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ที่ได้จากการฉีดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้น 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรไปยังระบบตรวจวัด จุดสีน้ำเงินเป็นค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) จากการฉีดเซลล์ *P. gingivalis* ที่ความเข้มข้น 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรไปยังระบบตรวจวัด

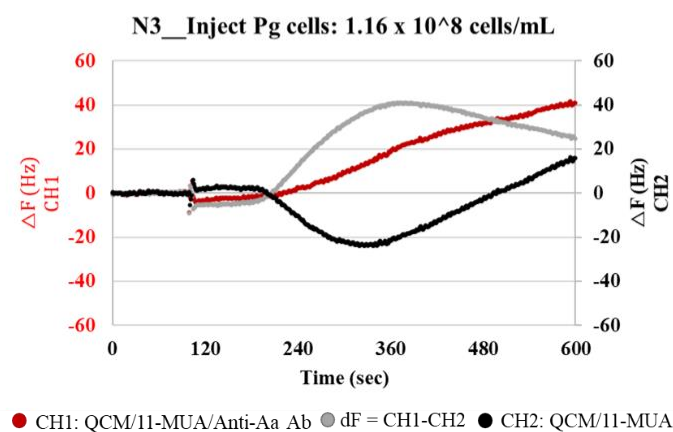
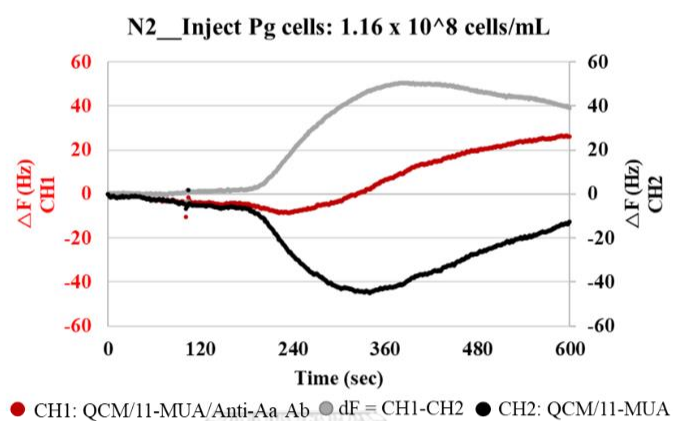
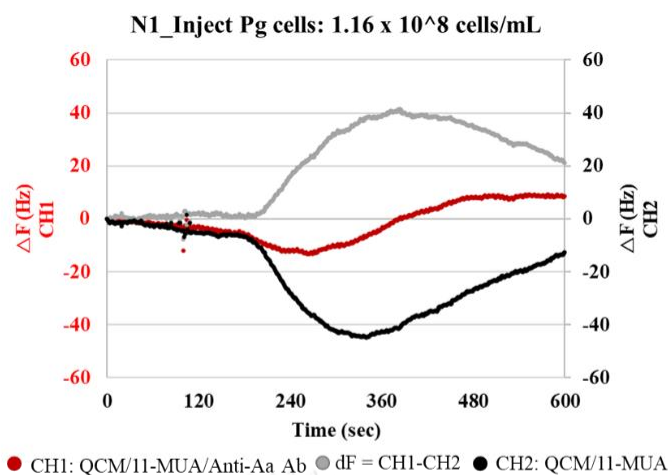
ในสถานะที่เกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* กับเซลล์แบคทีเรียชนิด *A. actinomycetemcomitans* ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT)

จะลดลงที่เวลาประมาณ 240 ถึง 360 วินาที โดยมีค่าประมาณ -1.0 และกลับเพิ่มขึ้นไปยังแนวระดับของเบสไลน์ ในทางตรงกันข้าม เมื่อใช้เซลล์แบคทีเรียชนิด *P. gingivalis* ซึ่งไม่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* ที่ไม่เกิดการจับกัน ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) จะไม่ลดลงต่ำกว่า 0 ตลอดระยะเวลา 600 วินาที ที่ทำการทดลอง เมื่อพิจารณารายละเอียดของค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ที่ได้จากเซลล์แบคทีเรียชนิด *P. gingivalis* (จุดสีน้ำเงิน) พบว่ามีค่าที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ที่เวลาประมาณ 240 วินาที เป็นค่าประมาณ +0.5 และค่อย ๆ ลดลงเข้าใกล้ค่า 0.0 การเพิ่มขึ้นชั่วคราวนี้เป็นผลมาจากสัญญาณความถี่ของช่องสัญญาณ CH2 ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ ซึ่งเป็นอันตรกิริยาระหว่างเซลล์แบคทีเรียชนิด *P. gingivalis* และพื้นผิว 11-MUA ตามที่ได้อธิบายรายละเอียดของอิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ในการตรวจวัด ในหัวข้อ “3.1.1 คิวซีเอ็มเซนเซอร์” ในบทที่ 3 ระบบตรวจวัด) ก่อนหน้านี้นี้ว่าช่องสัญญาณ CH2 ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์เป็นช่องสัญญาณที่ใช้ในการหักกลับเพื่อให้ได้สัญญาณจริงของการตรวจวัดแต่ละครั้ง ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้กำหนดให้ช่องสัญญาณ CH2 เป็นอิเล็กทรอนิกส์ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ ช่องสัญญาณ CH2 จึงผ่านการดัดแปลงพื้นผิวด้วย 11-MUA เท่านั้น และไม่มีการตรึงแอนติบอดี (สัญญาณจากช่องสัญญาณ CH1 แสดงแทนด้วยเส้นสีแดง สัญญาณจากช่องสัญญาณ CH2 แสดงแทนด้วยเส้นสีดำ สัญญาณหลังการหักกลับ แสดงแทนด้วยเส้นสีเทา ในรูปที่ 6.3 และรูปที่ 6.4) เมื่อนำค่าสัญญาณจากช่องสัญญาณ CH2 นี้มาหาค่า dt/df จึงทำให้จุดสีน้ำเงินในรูปที่ 6.2 สูงขึ้นเล็กน้อย ที่เวลาประมาณ 240 วินาที และค่อย ๆ ลดลง โดยอันตรกิริยาระหว่าง *P. gingivalis* กับพื้นผิว 11-MUA (ช่องสัญญาณ CH2) นี้อาจเป็นผลมาจากประจุที่พื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย^[76] และประจุที่ปลายคาร์บอกซิล (-COOH) ของ 11-MUA ที่อยู่บนพื้นผิวกิวซีเอ็มเซนเซอร์ อย่างไรก็ตามไม่พบว่าการจับกันระหว่าง *P. gingivalis* กับพื้นผิว 11-MUA



รูปที่ 6.3 รูปแบบการตอบสนองของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดี

ชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* ในการตรวจวัดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans*



รูปที่ 6.4 รูปแบบการตอบสนองของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* ในการตรวจวัดเซลล์ *P. gingivalis*

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้อธิบายสภาพพื้นผิวของเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* และเซลล์ *P. gingivalis* ไว้ว่ามีสภาพพื้นผิวเป็นประจุลบ [76-78] และคุณสมบัติของประจุที่พื้นผิวเซลล์และขนาดของ *A. actinomycetemcomitans* และ *P. gingivalis* นั้นต่างกันเล็กน้อย [79, 80] ค่าศักย์ซีตา (zeta potential) ของ *A. actinomycetemcomitans* เป็นลบอยู่ในช่วง -11 ถึง -26 มิลลิโวลต์ [79] และค่าศักย์ซีตาของ *P. gingivalis* เท่ากับ -17.3 มิลลิโวลต์ [80] ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.2

โดยประจุที่พื้นผิวแบคทีเรียจะเป็นลบโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะก่อนเข้าสู่เฟสคงที่ (pre-stationary phase) ของการเจริญเติบโตของเซลล์ [82] ค่าศักย์ซีตาของแบคทีเรียมีผลต่อการจับกับโมเลกุลอื่น ๆ รวมถึงส่งผลต่อเวลาในการเคลื่อนที่ (migration) ของแบคทีเรียบนเซนเซอร์ที่มี 11-MUA ด้วย ปัจจัยเหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้าที่ต่างกันระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดดังเห็นได้จากลักษณะสัญญาณในรูปที่ 6.2

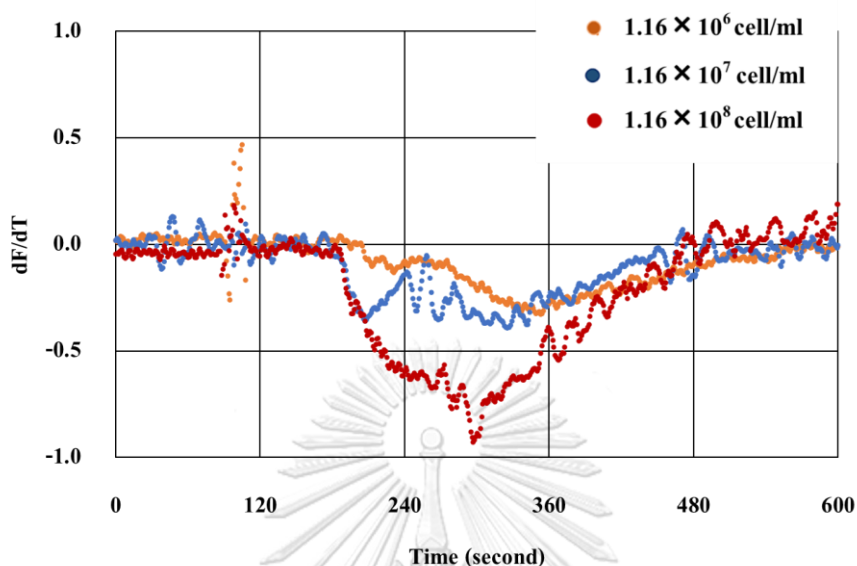
จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น อาจกล่าวได้ว่าสามารถใช้ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ในการจำแนกความจำเพาะของแอนติบอดีชนิด Anti-*A. actinomycetemcomitans* กับแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans* และแบคทีเรีย *P. gingivalis* ได้ ผลการทดลองบ่งชี้ว่าเมื่อเกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเซลล์ที่มีความจำเพาะกัน ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) จะเปลี่ยนแปลงโดยประจุที่พื้นผิวเซลล์แบคทีเรียเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างของรูปแบบ (profile) ของค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT)

ข. การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน

การเตรียมการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) สำหรับการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเซลล์ชนิดเดียวกัน ที่ความเข้มข้นต่างกันมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

- 1) การดัดแปลงพื้นผิวทอง** ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวซีเอ็มเซนเซอร์”
- 2) การตรึงแอนติบอดี** ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวซีเอ็มเซนเซอร์”
- 3) การตรวจวัด** ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวซีเอ็มเซนเซอร์”
- 4) การจัดการข้อมูลความถี่** ใช้ข้อมูลความถี่ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 600 วินาที นำข้อมูลมาผ่านวิธีหาค่าเฉลี่ยแบบเคลื่อนที่เพื่อกำจัดความแปรปรวนระหว่างข้อมูลความถี่ใน j เวลา 600 วินาที และคำนวณค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่หรือค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ภายในช่วง

10 วินาที ($dt = 10$ วินาที) สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dF/dT เทียบกับเวลา และเปรียบเทียบค่าที่ต่ำสุดของ dF/dT (พีค) จากแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 6.5 ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ของ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans*

เมื่อพิจารณาค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* แล้วพบว่ารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ของแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* กับ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (รูปที่ 6.5) แสดงแนวโน้มที่ต่างกัน จุดสีส้ม จุดสีน้ำเงิน จุดสีแดงเป็นค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) จากการฉีดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้น 1.16×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร 1.16×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเมื่อพิจารณาค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) (แกน y) ที่เวลาประมาณ 200 ถึง 360 วินาที ค่าที่ต่ำสุดของ dF/dT จากแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans* ลดลงในทุกความเข้มข้น โดยมีค่าต่ำสุดประมาณ -0.3, -0.4 และ -0.9 เฮิร์ต/วินาที สำหรับความเข้มข้น 1.16×10^6 , 1.16×10^7 และ 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ว่าค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มเป็นรูปแบบที่ขึ้นกับความเข้มข้น (concentration dependent manner) เมื่อพิจารณาค่าเวลา (แกน x) ที่จุด

ต่ำสุดของแต่ละความเข้มข้นพบว่าเซลล์ที่ความเข้มข้น 1.16×10^6 , 1.16×10^7 และ 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร มีตำแหน่งพีคหรือค่าเวลาเท่ากับ 353, 327, 297 วินาที ซึ่งแสดงแนวโน้มอิทธิพลของจำนวนเซลล์ที่ส่งผลต่อเวลาในการเคลื่อนที่ โดยเซลล์ที่มีจำนวนมากจะเคลื่อนที่เร็วกว่าเซลล์ที่มีจำนวนน้อย

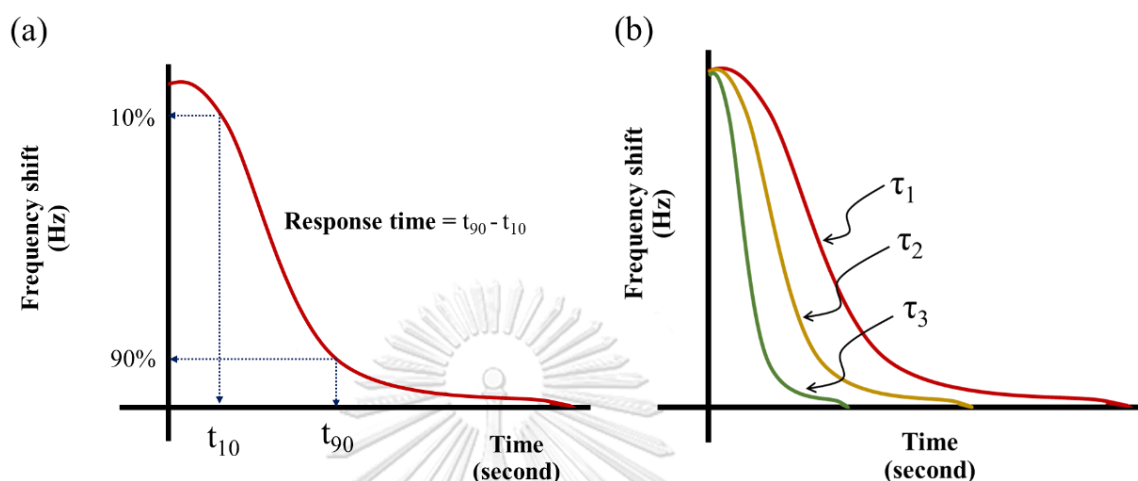
อย่างไรก็ตามการทดลองซ้ำทั้ง 3 ครั้ง ยังมีความแปรปรวนดังจะเห็นได้จากรูปที่ A-9 ภาคผนวก A การวิเคราะห์ในหัวข้อนี้จึงได้เลือกมาเพียง 1 ข้อมูล ($n=1$) จากแต่ละความเข้มข้น ซึ่งเป็นข้อมูลที่บ่งชี้แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงแบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration dependent manner) อย่างไรก็ตามหากค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ (df) จากการตรวจวัดด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์มีค่าน้อยกว่า 40 เฮิร์ต อาจไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ เนื่องจากเมื่อผ่านการคำนวณแล้ว ค่า df/dT มีค่าประมาณ -0.3 เฮิร์ต/วินาที ทำให้แยกความแตกต่างของรูปแบบ (profile) ของค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (df/dT) ได้ยาก

6.3 การวิเคราะห์เวลาการตอบสนอง (T)

หัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุว่าเวลาการตอบสนองสามารถใช้อธิบายสัมพรรคภาพในการจับกันและความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนกับเซลล์แบคทีเรียได้หรือไม่ โดยเวลาการตอบสนอง (response time, T) เป็นตัววัดความเร็วในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของเซนเซอร์ มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาปฏิกิริยาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่มีการใช้เวลาการตอบสนอง (T) เป็นพารามิเตอร์ในการเปรียบเทียบ การประเมิน หรือการอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นแบบต่าง ๆ เช่น เวลาการตอบสนองในการประเมินการส่งสัญญาณไซแนปส์ของเซลล์ประสาท^[83], การศึกษาฤทธิ์ของลิโดเคน (lidocaine) ที่ส่งผลต่อช่องสัญญาณ Na^+ ^[84] การศึกษาเส้นโค้งการลดลงของสารฟลูออเรสเซนต์^[85] และการศึกษาอันตรกิริยาของ β -อาร์เรสติน2 กับ β 2-อะดรีนอจิกรีเซปเตอร์^[86] เป็นต้น

เวลาการตอบสนอง (T) เป็นปริมาณของเวลาที่สัญญาณใช้เพื่อให้ถึงระดับ 10% และ 90% ของค่าสัญญาณสุดท้าย รูปที่ 6.6 เป็นตัวอย่างเส้นโค้งการตอบสนองของความถี่ที่เกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเซลล์แบคทีเรีย รูปที่ 6.6(a) เป็นตัวอย่างที่แสดงการคำนวณเวลาการตอบสนอง (T) โดยเวลาการตอบสนองเป็นผลต่างระหว่างเวลาของสัญญาณที่ระดับ 90% กับเวลาของสัญญาณที่ระดับ 10% และรูปที่ 6.6(b) แสดงตัวอย่างของเวลาการตอบสนอง (T) ที่สภาวะต่างกันที่เกิดจากพฤติกรรมการจับกัน

ระหว่างแอนติบอดีกับเซลล์แบคทีเรียที่ต่างกัน รูปที่ 6.6(b) แสดงตัวอย่างให้เห็นว่าค่า $\tau_3 < \tau_2 < \tau_1$ ซึ่งหมายความว่าเวลาการตอบสนอง (τ) ของสภาวะ 3 เร็วกว่าสภาวะ 2 และสภาวะ 1



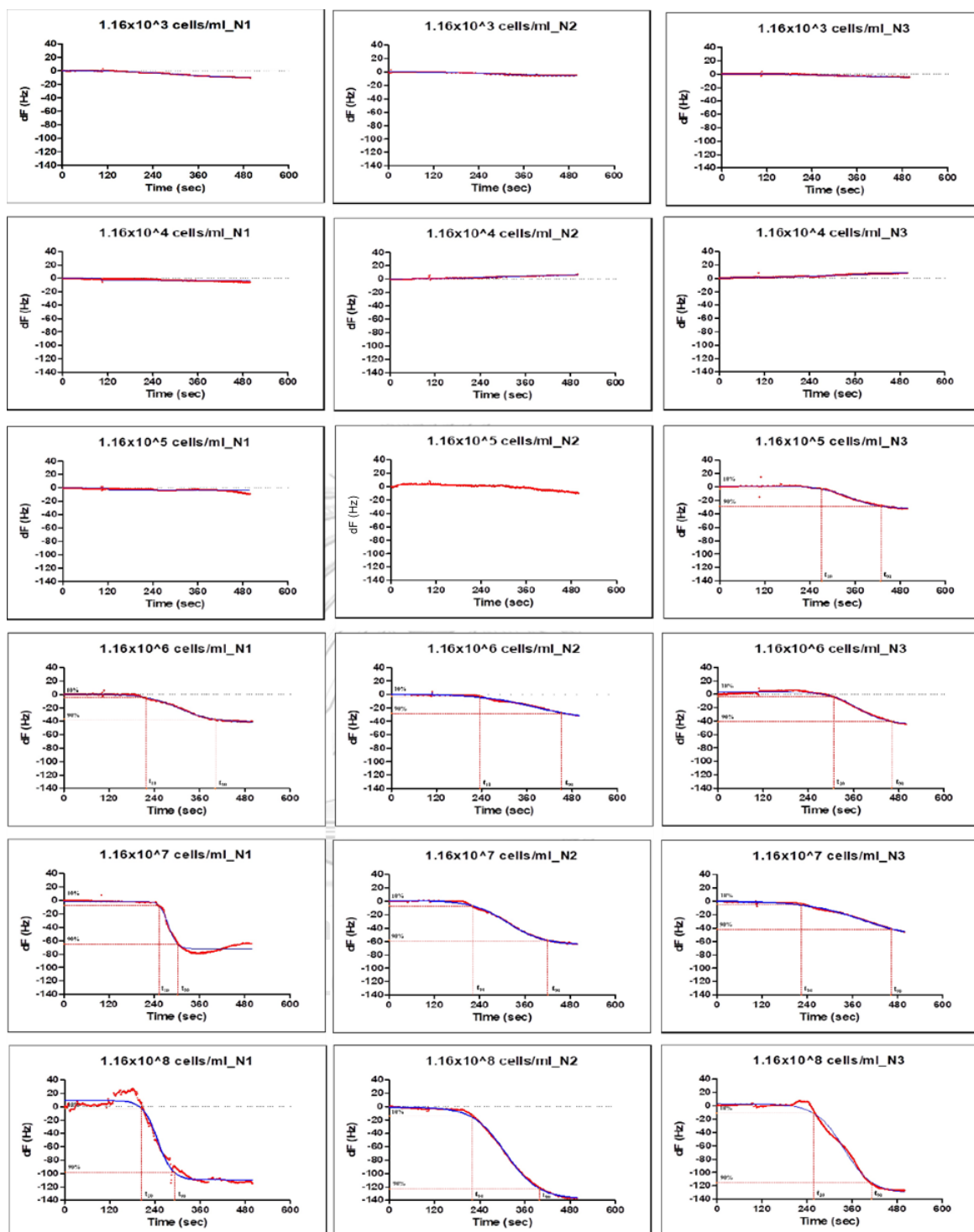
รูปที่ 6.6(a) ตัวอย่างการคำนวณเวลาการตอบสนอง และ
รูปที่ 6.6(b) ตัวอย่างเวลาการตอบสนองที่สภาวะต่างกัน

ในหัวข้อนี้ใช้เวลาการตอบสนอง (τ) เป็นพารามิเตอร์สำหรับวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของสัญญาณของการจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* กับเซลล์แบคทีเรียชนิด *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ การเตรียมการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลความถี่สำหรับการวิเคราะห์เวลาการตอบสนอง มีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

- 1) **การดัดแปลงพื้นผิวทอง** ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวซีเอ็มเซนเซอร์”
- 2) **การตรึงแอนติบอดี** ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวซีเอ็มเซนเซอร์”
- 3) **การตรวจวัด** ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยคิวซีเอ็มเซนเซอร์”
- 4) **การจัดการข้อมูลความถี่** ใช้ข้อมูลความถี่ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 600 วินาที มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่เทียบกับเวลา (เส้นสีแดง) สร้างเส้นโค้งที่เข้ากับข้อมูลได้ดี (fitted curve) (เส้นสีน้ำเงิน) แสดงผลการเปลี่ยนแปลงความถี่จากเซลล์ที่แต่ละความเข้มข้นที่เวลา t_{10} และ t_{90} ไว้ในรูปที่ 6.7 จากนั้นทำการคำนวณเวลาการตอบสนอง (τ) โดยการหาผลต่างระหว่างเวลาของสัญญาณ

ที่ระดับ 90% กับเวลาของสัญญาณที่ระดับ 10% และแสดงผลไว้ในตารางที่ 6.1 พร้อมกับหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 6.1 การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* จาก 1.16×10^6 , 1.16×10^7 , 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ทำให้ได้ค่า τ เฉลี่ยที่ 185, 158, 143 วินาที ตามลำดับ เวลาการตอบสนอง (τ) ที่น้อยหมายความว่าปฏิกิริยาการจับกันระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดีมีสัมพรรคภาพสูง หรือจับกันได้ดีกว่าสภาวะที่เซลล์มีความเข้มข้นต่ำ ความเข้มข้นของเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ที่ 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ทำให้เกิดค่า τ เฉลี่ยที่เร็วที่สุด คือ 143 วินาที การเกิดปฏิกิริยาการจับกันที่เร็วกว่าอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแบคทีเรียภายในห้องตรวจวัดที่สูงทำให้มีโอกาสเกิดการชนปะทะ (collision probability) ระหว่างเซลล์แบคทีเรียและพื้นผิวแอนติบอดีมากกว่า การชนปะทะที่มากกว่าอาจเพิ่มอัตราการรวมตัวระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดีที่จำเพาะได้ วิทยานิพนธ์นี้ดำเนินการตรวจวัดการเกิดอันตรกิริยาที่ภาวะไม่สมดุล กล่าวคือเป็นระบบตรวจวัดที่มีการไหลของ PBS บัฟเฟอร์ตลอดเวลาโดยไม่หยุดนิ่ง มีรายงานเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์ MCF-7 และเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells, MSCs) แสดงพฤติกรรมการกลิ้งไถล (rolling) บนพื้นผิวแอนติบอดีที่จำเพาะซึ่งตรึงอยู่บนพื้นผิวอิเล็กโทรดภายใต้สภาวะที่มีการไหลแบบต่อเนื่อง [87, 88] การกลิ้งไถลของเซลล์เกี่ยวข้องกับการเกิดการรวมตัว (association) และการแยกตัว (dissociation) ของพันธะที่เกี่ยวข้องกับการจับกันระหว่างเซลล์กับแอนติบอดีภายใต้สภาวะการไหลต่อเนื่อง เป็นที่ทราบกันว่าความเร็วในการจับกัน (rate of reaction) ระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของสารทั้งสอง การวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่าสามารถวัดความเข้มข้นหรือจำนวนของแบคทีเรียได้จากการวัดค่าเวลาการตอบสนอง (response time, τ) ของเซนเซอร์ในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์เวลาการตอบสนองสำหรับการเปลี่ยนแปลงความถี่อาจไม่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นต่ำ เช่น ที่ 1.16×10^3 ถึง 1.16×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เนื่องจากสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่มีค่าน้อยเกินไป กล่าวคือน้อยกว่า 40 เฮิร์ต เมื่อคำนวณหาผลต่างของเวลาของสัญญาณที่ระดับ 90% กับเวลาของสัญญาณที่ระดับ 10% จึงได้ค่าที่น้อยมาก (น้อยกว่า 10 วินาที) และทำให้เห็นแนวโน้มได้ไม่ชัดเจน



รูปที่ 6.7 ค่า t_{10} และ t_{90} จากเส้นโค้งที่เข้ากับข้อมูลได้ดี (fitted curve)

ตารางที่ 6.1 เวลาการตอบสนอง (T) ของการจับกันระหว่างเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* และแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans*

ความเข้มข้นของเซลล์ <i>A. actinomycetemcomitans</i> (เซลล์/มิลลิลิตร)		t_{10}	t_{90}	เวลาการตอบสนอง ($T = t_{90} - t_{10}$)
1.16×10^3	N1	N/A	N/A	N/A
	N2	N/A	N/A	N/A
	N3	N/A	N/A	N/A
	ค่าเฉลี่ย	N/A	N/A	N/A
	SD	N/A	N/A	N/A
1.16×10^4	N1	N/A	N/A	N/A
	N2	N/A	N/A	N/A
	N3	N/A	N/A	N/A
	ค่าเฉลี่ย	N/A	N/A	N/A
	SD	N/A	N/A	N/A
1.16×10^5	N1	N/A	N/A	N/A
	N2	N/A	N/A	N/A
	N3	277	440	163
	ค่าเฉลี่ย	N/A	N/A	N/A
	SD	N/A	N/A	N/A
1.16×10^6	N1	227	413	186
	N2	238	449	211
	N3	307	465	158
	ค่าเฉลี่ย	257	442	185
	SD	35	22	22
1.16×10^7	N1	259	306	47
	N2	224	419	195
	N3	222	453	231
	ค่าเฉลี่ย	235	393	158
	SD	17	63	80
1.16×10^8	N1	208	303	95
	N2	219	396	177
	N3	261	417	156
	ค่าเฉลี่ย	229	372	143
	SD	23	50	35

6.4 การวิเคราะห์ความชันของการตอบสนอง (response slope)

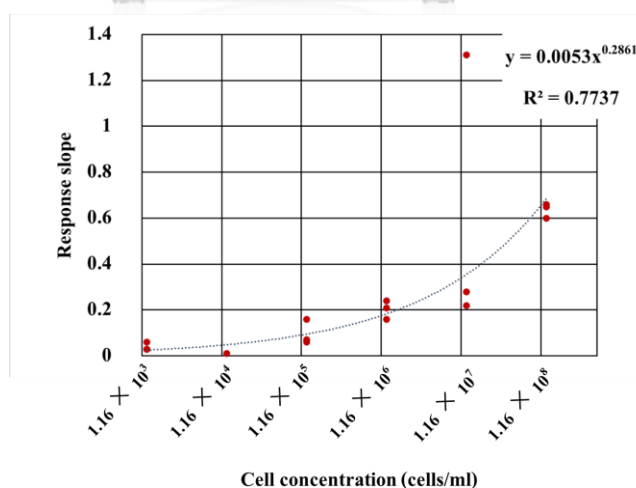
หัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุว่าความชันของการตอบสนองสามารถใช้อธิบายสัมพรรคภาพในการจับกัน และความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนกับเซลล์แบคทีเรียได้หรือไม่ โดยใช้สัญญาณของการจับกันระหว่างแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* กับเซลล์แบคทีเรียชนิด *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ การเตรียมการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลความถี่สำหรับการวิเคราะห์ความชันของการตอบสนอง มีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

1) การดัดแปลงพื้นผิวทอง ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์”

2) การตรึงแอนติบอดี ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์”

3) การตรวจวัด ดำเนินการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 5.2 “การตรวจหาเซลล์แบคทีเรียด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์”

4) การจัดการข้อมูลความถี่ ใช้ข้อมูลความถี่ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 600 วินาที มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่เทียบกับเวลา สร้างเส้นโค้งที่เข้ากับข้อมูลได้ดี (fitted curve) คำนวณหาความชันของการตอบสนองที่เป็นผลจากการฉีดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปยังระบบตรวจวัด (แสดงไว้ในภาคผนวก A, รูปที่ A-8 ความชันของการตอบสนอง) สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความชันของการตอบสนองเทียบกับความเข้มข้นของเซลล์



รูปที่ 6.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความชันของการตอบสนองจากการตรวจวัดด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์และ ความเข้มข้นเซลล์ *A. actinomycetemcomitans*

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความชันของการตอบสนองกับความเข้มข้นของเซลล์ (รูปที่ 6.8) แล้วพบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นฟังก์ชันเอกซ์โพเนนเชียล ที่มีสมการของความสัมพันธ์คือ $y = 0.0053x^{0.2861}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 เท่ากับ 0.7737 ความชันของการตอบสนองนี้ที่ได้จากการตรวจวัดสามครั้ง จุดสีแดงแทนข้อมูลที่ได้จากเซลล์แต่ละความเข้มข้น ผลการทดลองสนับสนุนสมมติฐานเกี่ยวกับการเพิ่มโอกาสของชนปะทะระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดีเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น โดยผลการวิเคราะห์บ่งชี้ว่า ในสถานะที่เซลล์ในห้องตรวจวัดมีความเข้มข้นสูง จะมีความชันของการตอบสนองมากกว่าสถานะที่เซลล์มีความเข้มข้นต่ำ มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าประสิทธิภาพในการจับเซลล์ของแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นตามความถี่ของการสัมผัสกันระหว่างเซลล์กับแอนติบอดี [89]

จากผลการวิเคราะห์ในรูปแบบต่าง ๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้น จะเห็นได้ว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีในวัฏภาคของเหลว (liquid phase) สามารถอธิบายได้ในหลายรูปแบบ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานอื่น ๆ ได้ต่อไป



บทที่ 7: บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โรคปริทันต์จัดเป็นโรคที่ส่งผลเสียรุนแรงต่อเหงือกและฟัน หากผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยและรับการรักษาในระยะแรกๆ ที่เริ่มเป็นโรคจะช่วยลดความรุนแรงต่อเหงือกและฟันของผู้ป่วยได้ สาเหตุหนึ่งของโรคนี้มาจากแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ที่สะสมและเพิ่มจำนวนในช่องปากจนเกินภาวะสมดุล ทำให้เซลล์บริเวณนั้นเกิดการอักเสบและคัดหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมาทำให้เนื้อเยื่อเหงือกและฟันเกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง ส่งผลให้สูญเสียเนื้อเยื่อ กระดูกฟันและขากรรไกรที่ยึดเหงือกและฟันในที่สุด

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการและเครื่องมือสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อยู่หลายชนิด อย่างไรก็ตามเครื่องมือและวิธีการในปัจจุบันยังไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดและปริมาณแบคทีเรียได้ในเวลาอันสั้น เช่น หากต้องการทราบชนิดแบคทีเรียก่อโรค แพทย์จะต้องนำตัวอย่างจากช่องปากไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาหลายวันเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา การตรวจวินิจฉัยที่ใช้เวลานานอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาลดลงและทำให้เกิดค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น การตรวจวินิจฉัยรูปแบบอื่น เช่น การใช้ชุดทดสอบต่าง ๆ (test kits) มีข้อดีคือ ให้ผลได้รวดเร็ว ใช้งานสะดวก แต่ชุดทดสอบส่วนใหญ่ให้ผลเชิงคุณภาพและเป็นเพียงการตรวจเบื้องต้น เช่น การใช้ชุดทดสอบตรวจวัดว่ามีแบคทีเรียก่อโรคหรือไม่โดยสรุปผลจากการเปลี่ยนแปลงสี เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเป็นการตรวจวัดแบคทีเรียในเชิงปริมาณ เช่น การประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA และเทคนิค PCR ในการตรวจแต่เทคนิคเหล่านี้ต้องการผู้ใช้งานที่มีทักษะสูง มีการใช้สารเคมีและเครื่องมือที่มีราคาแพงทำให้ต้นทุนในการตรวจและการรักษาสูง อีกทั้งเทคนิคมาตรฐานเหล่านี้ก็ยังไม่สามารถให้ข้อมูลในการศึกษาวิจัยกลไกบางอย่างของโรคได้ เช่น เทคนิค ELISA ยังไม่สามารถอธิบายพฤติกรรมการจับกันหรืออันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารตัวอย่างที่วิเคราะห์กับโพรบที่จำเพาะของมันได้ เช่น ชุดทดสอบที่พัฒนามบนพื้นฐานของเทคนิค ELISA ที่มีชื่อว่าชุดทดสอบ PerioSafe® และ ImplantSafe® อาศัยการจดจำอีพิโทปของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinase, MMP) นั้น ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไอโซฟอร์มต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ตรวจพบได้ เนื่องจากชุดทดสอบทำได้เพียงตรวจพบว่ามี MMPs ในตัวอย่างของเหลวช่องเหงือก แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเอนไซม์นั้นอยู่ในรูปไวปฏิกิริยา (active form) หรือไม่ จึงไม่สามารถอธิบายสภาวะระดับโมเลกุลของโรคได้^[28] เห็นได้ว่าการพัฒนาชุดทดสอบทางชีวภาพต้องอาศัยความสามารถในการจำแนกความจำเพาะของสารรู้จำทางชีวภาพเป็นอย่างมาก เป็นต้น

วิทยานิพนธ์นี้ใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อตรวจแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ในสารละลายตัวอย่าง และศึกษาพฤติกรรมการจับกันระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีที่จำเพาะซึ่งถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวอิเล็กโทรดของควิซีเอ็มเซนเซอร์ โดยประเมินความเข้มข้นแบคทีเรียจาก 1) ค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ (frequency shift,

ΔF) ที่แปรตามมวลของแบคทีเรีย 2) ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (df/dT) 3) ค่าเวลาการตอบสนอง (response time, T) และ 4) ความชันของการตอบสนอง ของเซนเซอร์ในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแบคทีเรีย การตรวจแบคทีเรียอาศัยการวิเคราะห์อันตรกิริยาเพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกสำหรับใช้ประเมินความเสี่ยงของโรคปริทันต์ จะช่วยให้สามารถระบุการดำเนินไปของโรคปริทันต์อีกเสบได้อย่างแม่นยำมากขึ้น ช่วยลดข้อจำกัดของการตรวจวัดดังกล่าวข้างต้นได้ นอกจากนี้วิทยานิพนธ์นี้ยังได้ศึกษาแนวทางในวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล เพื่อจำแนกสัมพรรคภาพ (affinity) และความจำเพาะ (specificity) ของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลน (แอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* ที่จำเพาะกับแบคทีเรียชนิด *A. actinomycetemcomitans*) จากการตรวจวัดด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์ในวัฏภาคของเหลวอีกด้วย

วิทยานิพนธ์นี้เลือกใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์แบบสองช่องสัญญาณ ชนิด 30 เมกะเฮิร์ตซ์ ในวัฏภาคของเหลว โดยวัฏภาคของเหลวเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาอันตรกิริยาเนื่องจากเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาพตามธรรมชาติ ในขั้นแรกผู้วิจัยได้ออกแบบและเลือกใช้งานระบบสำหรับการตรวจวัดผลทดสอบการใช้งานระบบเบื้องต้นพบว่าระบบตรวจวัดสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่อยู่ในระบบของไหลได้อย่างเสถียร โดยมีการเปลี่ยนแปลงความถี่ของระบบประมาณ ± 3 ถึง 5 เฮิร์ตซ์ ในสภาวะที่ใช้อัตราการไหล 50 ไมโครลิตร/นาที่ อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้อควรระวังเกี่ยวกับการใช้งานในประเด็นการเกิดฟองอากาศและการรั่วของสารละลายซึ่งสามารถลดได้โดยการหาการปิดกั้นสำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ในปริมาณเล็กน้อย และป้องกันการเกิดฟองโดยการนำสารละลายที่จะใช้ไปผ่านระบบดูดอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศล่วงหน้า

การประดิษฐ์ควิซีเอ็มเซนเซอร์เพื่อตรวจแบคทีเรียประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือการดัดแปลงพื้นผิวทองให้มีฟังก์ชันและการตรึงแอนติบอดี ในการดัดแปลงพื้นผิวทองให้มีฟังก์ชัน ใช้ 11-เมอร์แคปโตอันเดเคนอิกแอซิด (11-Mercaptoundecanoic acid, 11-MUA) ขั้นตอนนี้เลือกใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีเพื่อวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของโมเลกุล 11-MUA ที่ผิวของควิซีเอ็มเซนเซอร์ ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ว่าเกิดชั้น 11-MUA บนผิวทอง ที่ความหนาแน่น ~ 4.46 โมเลกุล.นาโนเมตร⁻² เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งค่าที่ได้สอดคล้องกับความหนาแน่นสูงสุดของโมเลกุลอัลเคนไธออลบนพื้นผิวทองตามรายงานก่อนหน้า [60, 68] ในขั้นตอนต่อมาได้เป็นขั้นตอนการตรึงแอนติบอดีลงบนชั้น 11-MUA ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการตรึงแอนติบอดีคือการเลือกใช้บัฟเฟอร์ให้มีค่า pH สอดคล้องกับจุดไอโซอิเล็กทริก (pI) ของแอนติบอดีที่จะตรึง [90] ผู้วิจัยเลือกใช้ซีสเตอีนบัฟเฟอร์ (pH 5.0) ในการตรึงแอนติบอดีชนิด Anti-*A. actinomycetemcomitans* (325AA2) ที่มีค่า pI 7.4 ถึง 7.6 ด้วยสภาวะดังกล่าว

นี้จะทำให้แอนติบอดีมีประจุบวกและถูกดึงดูดเข้าหาพื้นผิว 11-MUA ที่มีประจุเป็นลบ^[69] ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มโอกาสในการเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างแอนติบอดีและพื้นผิว 11-MUA ได้^[91] ในสร้างพันธะเลือกใช้ 1-เอธิล-3-(3-ไดเมธิลอะมิโนโพรพิล) คาร์โบไดไอไมด์/N-ไฮดรอกซีสึกซินิกไมด์ (EDC/NHS)

เมื่อประติษฐคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่มีแอนติบอดีตรึงอยู่บนพื้นผิวแล้ว ในขั้นต่อมาผู้วิจัยได้การตรวจวัดแบบที่เรียกอโรคปริทันต์ *A. actinomycetemcomitans* โดยใช้ตัวอย่างแบบที่เรียกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 1.16×10^3 , 1.16×10^4 , 1.16×10^5 , 1.16×10^6 , 1.16×10^7 และ 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร และใช้ปริมาตรในการตรวจวัดกับระบบตรวจวัดเท่ากับ 200 ไมโครลิตร (คิดเป็นจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการตรวจวัดเท่ากับ 232 ถึง 2.32×10^7 เซลล์ ตามลำดับ) ผลการตรวจวัดพบว่าได้ค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่ 7, 16, 24, 40, 67 และ 131 เฮิร์ตซ์ ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่พบเป็นแบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration dependent) และกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่กับปริมาณแบคทีเรียบ่งชี้ว่าขีดจำกัดล่างของการตรวจวัดเท่ากับ 1.16×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (800 เซลล์) โดยมีช่วงการวัดได้สูงถึง 2.32×10^6 เซลล์ คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในวิทยานิพนธ์นี้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดแบบที่เรียในเวลาประมาณ 500 วินาที

ผู้วิจัยได้ศึกษาความจำเพาะของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* โดยเปรียบเทียบการจับกันของเซนเซอร์นี้กับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ใช้ คือ *P. gingivalis*, เซลล์ *P. nigrescens* และเซลล์ *A. naeslundii* (negative control) เพิ่มเติม ผลการตรวจวัดที่ได้บ่งชี้ว่าคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* มีความจำเพาะสูง เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงความถี่เมื่อทดสอบกับเซลล์ที่ไม่จำเพาะเมื่อได้ใช้งานระบบตรวจวัดทั้งระบบแล้ว

เมื่อได้ตรวจวัดแบบที่เรียด้วยระบบคิวซีเอ็มเซนเซอร์แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างแบคทีเรียกับแอนติบอดีชนิด anti-*A. actinomycetemcomitans* โดยวิเคราะห์สัญญาณความถี่ที่ได้จากการตรวจวัดใน 4 รูปแบบ ได้แก่

รูปแบบที่ 1 การใช้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความถี่ (ΔF) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสัญญาณที่ได้สามารถใช้จำแนกความสามารถในการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียได้ โดยคู่แอนติบอดีและเซลล์แบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกันและคู่ที่ไม่จำเพาะต่อกันมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงความถี่ที่ต่างกันอย่างชัดเจน

รูปแบบที่ 2 การใช้ข้อมูลค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีนี้จำแนกความจำเพาะของแอนติบอดีชนิด Anti-*A. actinomycetemcomitans*

กับแบคทีเรียต่างชนิดได้ โดยเมื่อเกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเซลล์ที่มีความจำเพาะกัน ค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) จะเปลี่ยนแปลงเป็นลบ และค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงความถี่ (dF/dT) แสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปแบบที่ขึ้นกับความเข้มข้น เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงความถี่ อย่างไรก็ตาม หากค่าการเปลี่ยนแปลงความถี่จากการตรวจวัดด้วยควิซีเอ็มเซนเซอร์มีค่าน้อยกว่า 40 เฮิร์ตซ์ อาจไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เนื่องจากค่า dF/dT มีค่าน้อย (ประมาณ -0.3 เฮิร์ตซ์/วินาที) ทำให้แยกความแตกต่างของสัญญาณได้ไม่ชัดเจน และควรทำการทดลองซ้ำมากกว่า 3 ครั้งเพื่อให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

รูปแบบที่ 3 ใช้ข้อมูลเวลาการตอบสนอง (T) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ที่ความหนาแน่นสูงสุด 1.16×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ทำให้ได้ค่า T เฉลี่ยที่เร็วที่สุด คือใช้เวลาเพียง 143 วินาที ซึ่งการตรวจวัดด้วยเวลารวดเร็วกว่าการติดตามการเปลี่ยนแปลงความถี่ กล่าวคือลดเวลาในการสังเกตผลจาก 500 วินาทีเป็นประมาณ 200 วินาที หรือเร็วกว่าประมาณ 3 เท่า อย่างไรก็ตามข้อมูลเวลาการตอบสนอง (T) ในวิทยานิพนธ์นี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นต่ำ เช่น ที่ 1.16×10^3 ถึง 1.16×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เนื่องจากสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่มีค่าน้อยเกินไป (น้อยกว่า 40 เฮิร์ตซ์) เมื่อคำนวณหาผลต่างของเวลาของสัญญาณที่ระดับ 90% กับเวลาของสัญญาณที่ระดับ 10% จึงได้ค่าที่น้อยมาก (น้อยกว่า 10 วินาที) และทำให้เห็นแนวโน้มได้ไม่ชัดเจน

รูปแบบที่ 4 ใช้ข้อมูลความชันของการตอบสนอง (response slope) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างความชันของการตอบสนองและจำนวนเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* ในฟังก์ชันเอกซ์โพเนนเชียล ที่มีสมการของความสัมพันธ์คือ $y = 0.0053x^{0.2861}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 เท่ากับ 0.7737 โดยความชันของการตอบสนองของสภาวะที่เซลล์มีความเข้มข้นสูง จะมากกว่าสภาวะที่เซลล์มีความเข้มข้นต่ำ

การศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ทำให้เกิดวิธีการและอุปกรณ์สำหรับการตรวจแบคทีเรียและวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแบบใหม่ ข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรคปริทันต์ในระยะเริ่มต้นช่วยเพิ่มโอกาสในการหายจากโรคได้ ด้วยการใช้งานควิซีเอ็มเซนเซอร์ในวิทยาการของเหลวนี้ทำให้สามารถประยุกต์การใช้งานไปยังการศึกษาอันตรกิริยาของปฏิกิริยาทางชีวโมเลกุลอื่น ๆ ได้ ส่งผลให้เกิดประโยชน์สำหรับการวิจัยด้านชีวการแพทย์ การพัฒนายาใหม่ การวิจัยด้านสิ่งแวดล้อม และอุตสาหกรรมอาหาร ฯลฯ

สำหรับการพัฒนาควิซีเอ็มเซนเซอร์ในอนาคต ผู้ที่สนใจอาจพัฒนาระบบตรวจวัดสำหรับการใช้ควิซีเอ็มเซนเซอร์จำนวนมากร่วมกัน (multi-sensor) ในการตรวจวัดหนึ่งครั้ง โดยตรึงแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ไว้ควิซีเอ็มเซนเซอร์แต่ละชิ้นเพื่อการตรวจจับแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์หลายชนิดได้พร้อมกัน ทำให้ได้ข้อมูล

สัดส่วนของแบคทีเรียในตัวอย่างเดียวกันซึ่งทำให้วินิจฉัยความรุนแรงของโรคปริทันต์ในผู้ป่วยได้ละเอียดมากยิ่งขึ้น และสามารถคาดการณ์การลุกลามของโรคปริทันต์อีกเสบได้ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* และ *P. intermedia* ร่วมกันส่งผลต่อความรุนแรงของโรคปริทันต์^[4, 92] และการดำเนินไปของโรคปริทันต์เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *T. denticola*^[93] ซึ่งการศึกษานี้บ่งชี้ว่าโรคปริทันต์อาจเกิดจากแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิด



ภาคผนวก A

ข้อมูลการทดลอง

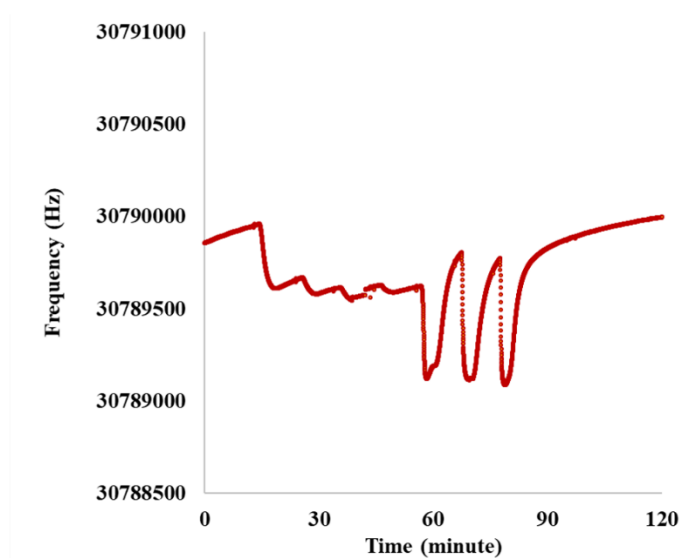


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

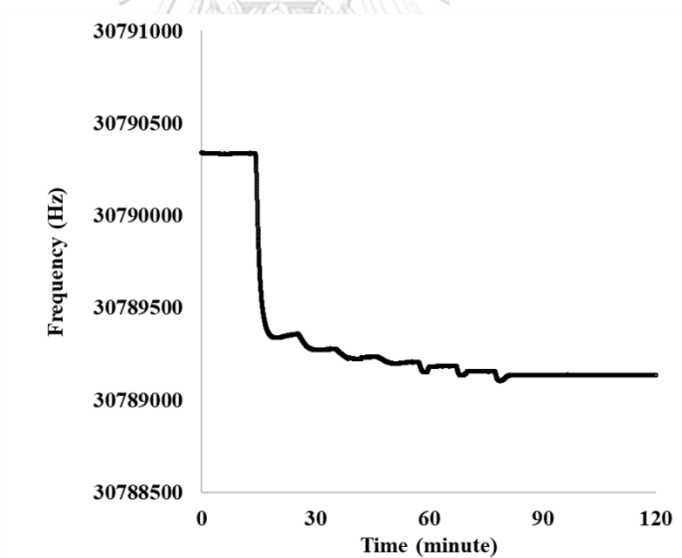
Step 1: Bare Au surface														
1x10 ⁶				1x10 ⁷				1x10 ⁸				PBS		
30 min				30 min				30 min				30 min		
90 min				90 min				90 min				90 min		
120 min				120 min				120 min				120 min		
Step 2: Add cell solution / incubation / remove cell solution														
1x10 ⁶				1x10 ⁷				1x10 ⁸				PBS		
30 min				30 min				30 min				30 min		
90 min				90 min				90 min				90 min		
120 min				120 min				120 min				120 min		
Step 3: Wash with 0.2 µm filtered PBS buffer, pH 7.2 (2 time: 50 µl/time)														
1x10 ⁶				1x10 ⁷				1x10 ⁸				PBS		
30 min				30 min				30 min				30 min		
90 min				90 min				90 min				90 min		
120 min				120 min				120 min				120 min		
Result: Optimal condition for cell immobilization:														

รูปที่ A-1 การดูดซับของแบคทีเรียบนผิวทอง

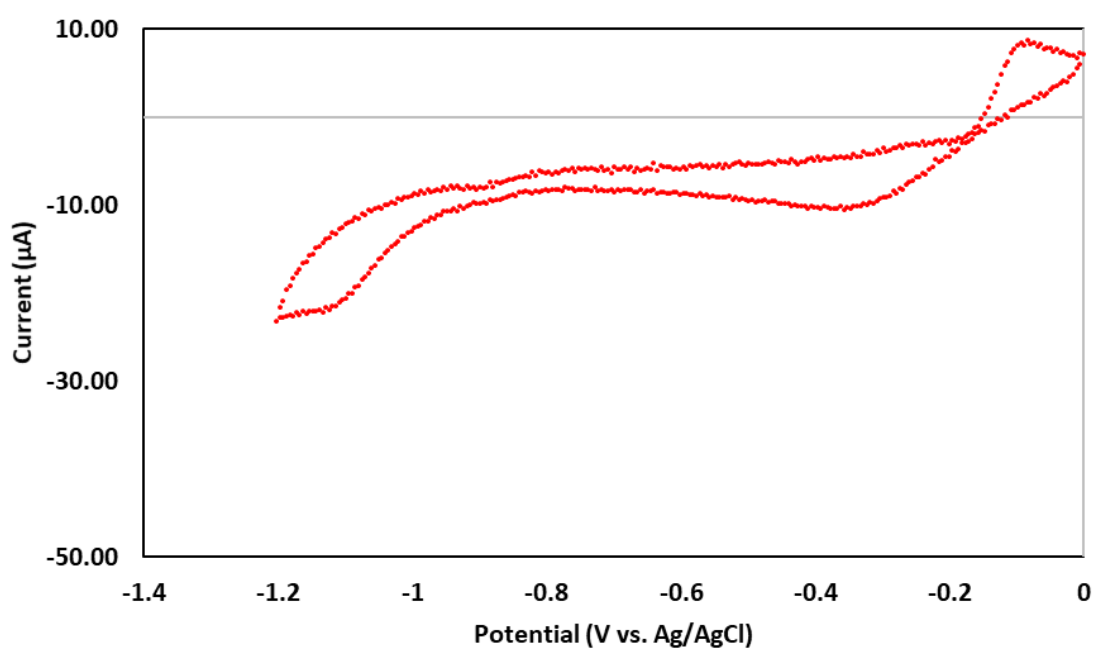
(a)



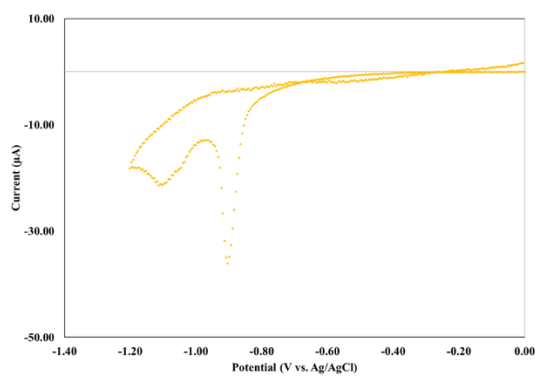
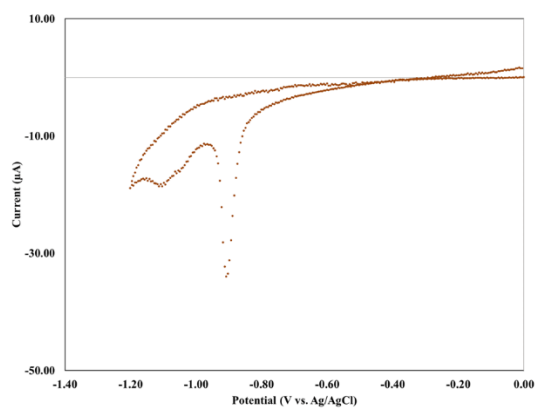
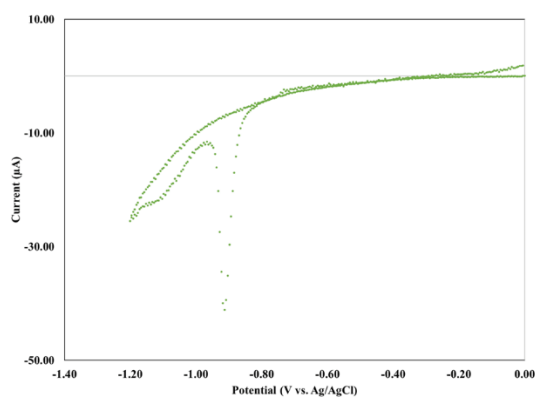
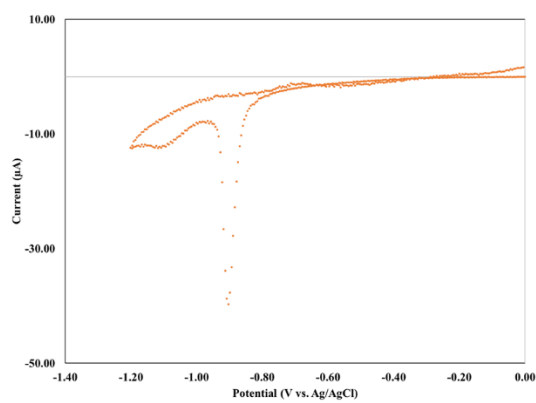
(b)



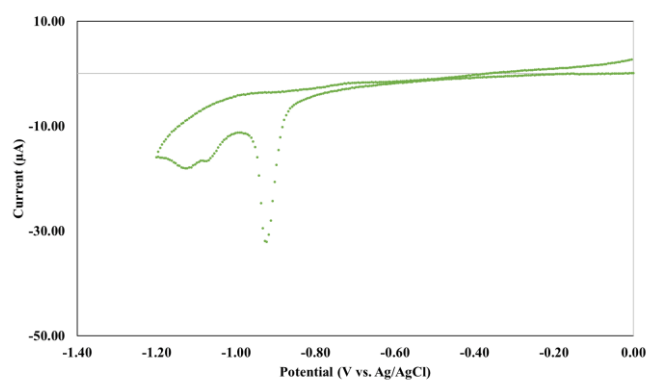
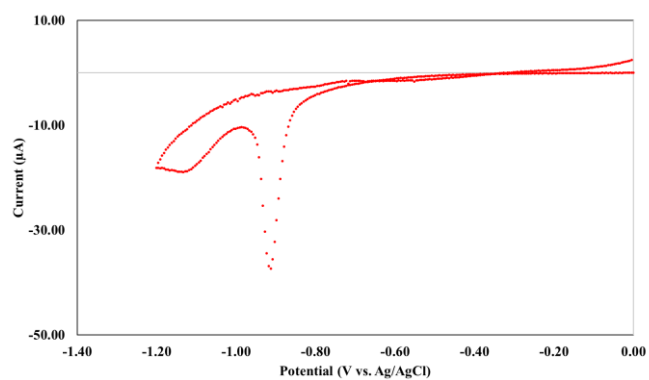
รูปที่ A-2 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของพื้นผิวควิซซีเอ็มเซนเซอร์ที่เคลือบ
A. actinomycetemcomitans



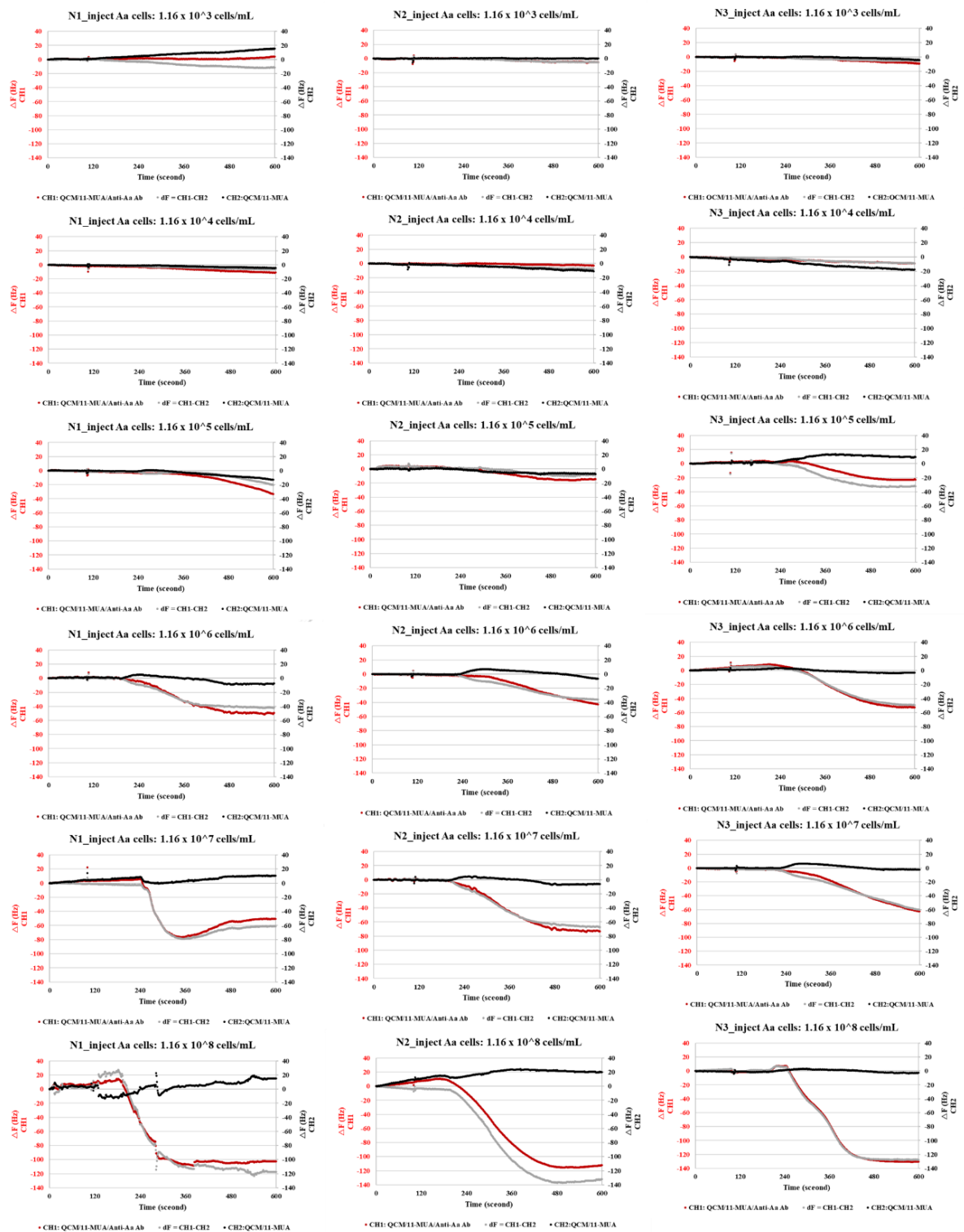
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รูปที่ A-3 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของผิวทองเปลว
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ A-4 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมบนผิวทองที่มี 11-MUA ที่ 12 ชั่วโมง

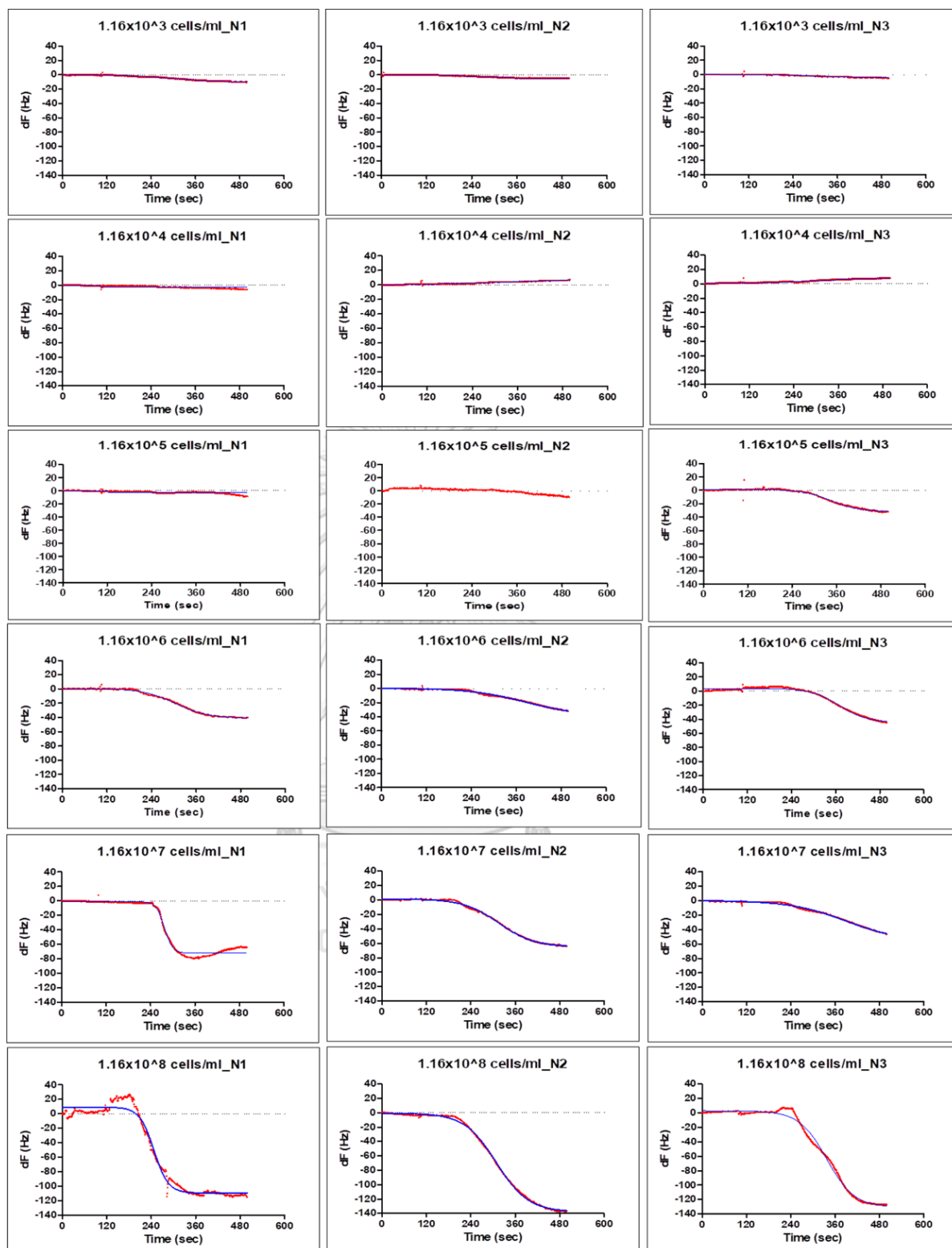


รูปที่ A-5 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมบนผิวทองที่มี 11-MUA ที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ A-6 รูปแบบการตอบสนองของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีชนิด

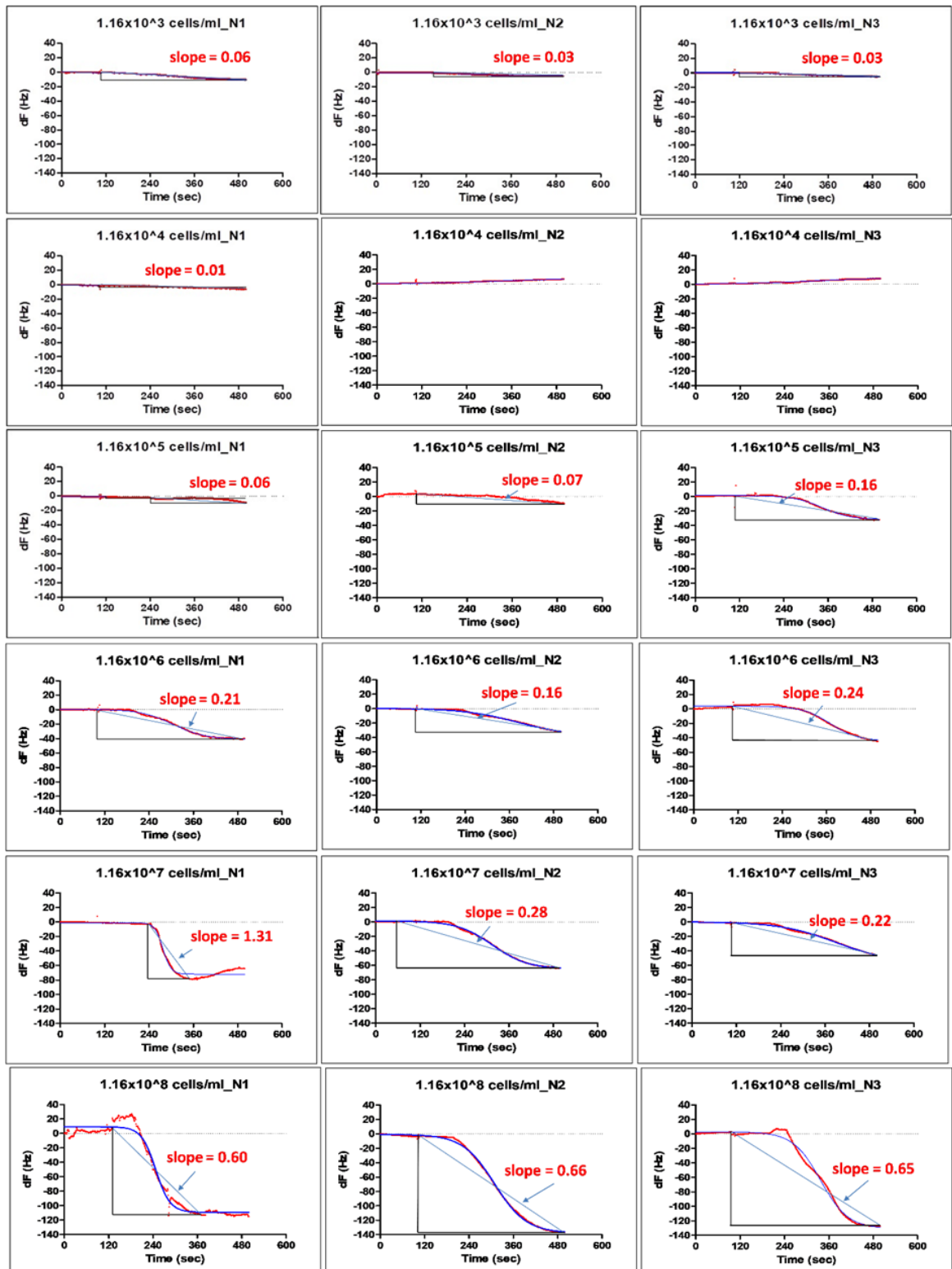
anti- A. actinomycetemcomitans ในการตรวจวัดเซลล์ *A. actinomycetemcomitans*



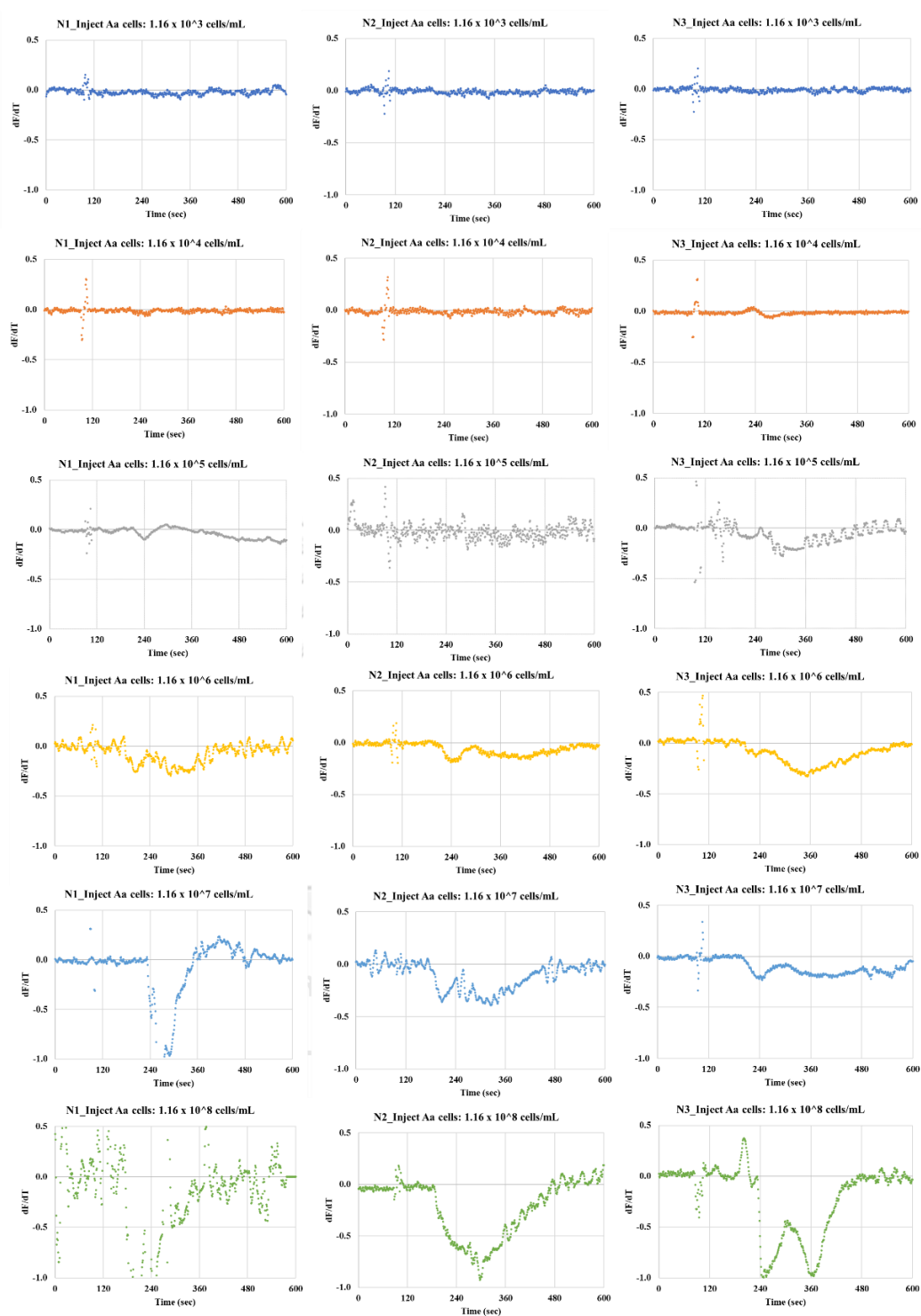
รูปที่ A-7 Nonlinear regression ของรูปแบบการตอบสนองของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึง

แอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* ในการตรวจวัด

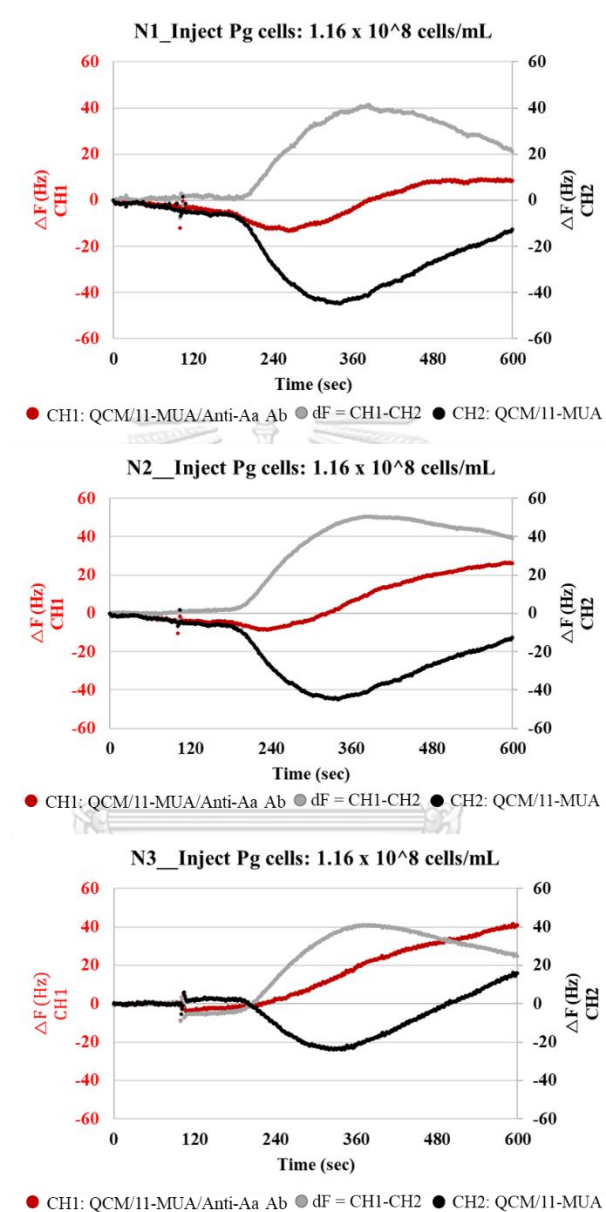
เซลล์ *A. actinomycetemcomitans*



รูปที่ A-8 ความชันของการตอบสนอง (response slope) ของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึง
แอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* ในการตรวจวัด
เซลล์ *A. actinomycetemcomitans*

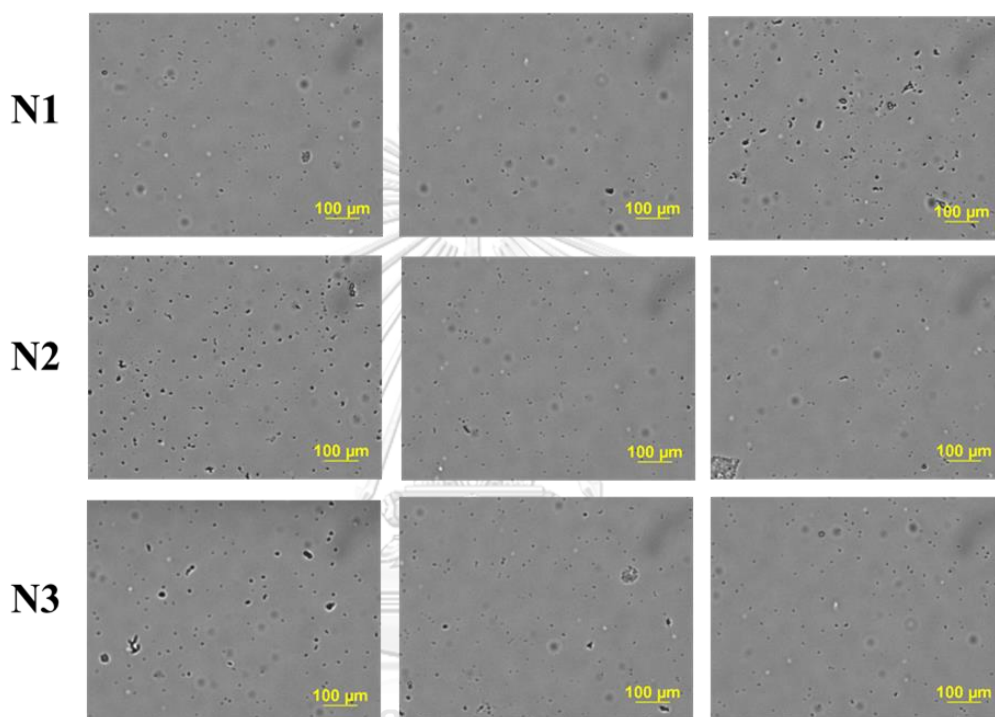


รูปที่ A-9 dF/dT ของรูปแบบการตอบสนองของคิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดี
ชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* ในการตรวจวัด
เซลล์ *A. actinomycetemcomitans*



รูปที่ A-10 รูปแบบการตอบสนองของควิซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตรึงแอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* ในการตรวจวัดเซลล์ *P. gingivalis*

Sensor: QCM/11-MUA/anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody
Inject: *A. actinomycetemcomitans*, 1.16×10^8 cells/mL, 200 μ L



รูปที่ A-11 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์เชิงแสง หลังการฉีด *A. actinomycetemcomitans*
 เข้าสู่ระบบตรวจวัด

ภาคผนวก B

การเตรียมสารเคมี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การเตรียมสารละลายสตอคแวนโคมัยซิน

1. เติมแวนโคมัยซินไฮโดรคลอไรด์ 0.5 มิลลิลิตร (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน DMSO, Sigma-Aldrich Japan G.K., ประเทศญี่ปุ่น)
2. เติมน้ำ Ultra pure 19.5 มิลลิลิตร
3. ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของแวนโคมัยซินคือ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสตอคเฮมินและวิตามิน K1

1. เติมเฮมิน 50 มิลลิกรัม (เฮมินจากวัว, $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich Japan G.K., ประเทศญี่ปุ่น)
2. เติม NaOH 1 โมลาร์, 250 ไมโครลิตร
3. เติมน้ำ Ultra pure 100 มิลลิลิตร
4. กวนและทำให้ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. เติมวิตามิน K1 1 ไมโครลิตร (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, ประเทศญี่ปุ่น) ไปยังสารละลาย
6. ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของวิตามิน K1 คือ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
7. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ในที่มืด

การเตรียมสารละลายสตอคบาซิทรราชิน

1. เติмбаซิทรราชิน 100 มิลลิกรัม (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, ประเทศญี่ปุ่น)
2. เติมน้ำ Ultra pure 8 มิลลิลิตร
3. ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของบาซิทรราชินคือ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TS blood agar สำหรับ *P. gingivalis*

1. เติมหรีปติเคสชอยอะการ์ 40 กรัม (Becton Dickinson, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2. เติมน้ำ Ultra pure 990 มิลลิลิตร
3. กวนและทำให้ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. หลังทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของสารละลายต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส, เติม defibrillated horse blood 50 มิลลิลิตร และสตอคเฮมินและวิตามิน K1 10 มิลลิลิตร ลงไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. นำอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในเฟลทเพาะเลี้ยงไปไว้ในตู้ชีวนิรภัย
6. ปิดฝาเฟลทเลี้ยงเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ในที่มืด

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSBV สำหรับ *A. actinomycetemcomitans*

1. เติมหรีปติเคสชอยอะการ์ 40 กรัม
2. เติมสิ่งสกัดจากยีสต์ 1 กรัม (Becton Dickinson, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. เติมน้ำ Ultra pure 892 มิลลิลิตร
4. กวนและทำให้ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. หลังทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส, เติมซีรัมจากม้า 100 มิลลิลิตร (New Zealand origin, ThermoFischer scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา), สตอคบาซิทรานซิน 6 มิลลิลิตร และสตอคแวนโคมัยซิน 2 มิลลิลิตร ลงไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. นำอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในเฟลทเพาะเลี้ยงไปไว้ในตู้ชีวนิรภัย
7. ปิดฝาเฟลทเลี้ยงเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ในที่มืด

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BHI broth

1. เติม Brain heart infusion 37 กรัม (Becton Dickinson, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2. เติมสิ่งสกัดจากยีสต์ 1 กรัม
3. เติมน้ำ Ultra pure 930 มิลลิลิตร
4. กวนและทำให้ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. หลังทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส, เติมซีรัมจากม้า 100 มิลลิลิตร (New Zealand origin, ThermoFischer scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา), สตอคบาซิทราน 6 มิลลิลิตร และสตอคแวนโคมัยซิน 2 มิลลิลิตร ลงไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมกลีเซอรอล 40%

1. เติมกลีเซอรอล 40 มิลลิลิตร (95.5% น้ำหนัก/น้ำหนัก, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, ประเทศญี่ปุ่น)
2. เติมน้ำ Ultra pure 60 มิลลิลิตร
3. ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมบัฟเฟอร์คาร์บอนเตต

1. ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต-โบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (C3041 Sigma-Aldrich) 1 แคลปซูล
2. เติมน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร
3. ผสมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (อายุการใช้งาน 1 เดือน)

การเตรียมสารละลาย BSA 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในบัฟเฟอร์คาร์บอเนตสำหรับ ELISA

1. เติม BSA อัลบูมิน (Bovine serum fraction V, pH 7.0) 200 มิลลิกรัม
2. เติมบัฟเฟอร์คาร์บอเนต 100 มิลลิลิตร
3. ผสมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจางแอนติบอดี (BSA 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) สำหรับ ELISA

1. เติม BSA 500 มิลลิกรัม
2. เติม PBS บัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร
3. ผสมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียม Tween 20-PBS สำหรับ ELISA

1. เติม tween 20 0.05% ใน PBS 1 ซอง
2. เติมน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร
3. ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (H_2SO_4 0.5 โมลาร์) สำหรับ ELISA

1. เติม H_2SO_4 (98% โดยมวล, 18.30 โมล/ลิตร) 13.66 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร
3. ผสมในฟลาสก์สำหรับปรับปริมาตร (volumetric flask)
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลายแอนติบอดี code: 325AA

1. ความเข้มข้นสต็อกคือ 49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
2. เตรียมความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายสต็อก 10.2 ไมโครลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง (BSA 0.5% ใน PBS) เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 ไมโครลิตร

การเตรียม 2nd detector Protein G-conjugate horseradish peroxidase (Life technology, ประเทศสหรัฐอเมริกา) สำหรับ ELISA

1. ความเข้มข้นสต็อกคือ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. เตรียมความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายสต็อก 3 ไมโครลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 30 มิลลิลิตร

ซับสเตรทของ ELISA

- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB ELISA substrate, ab 171523, Abcam)

การเตรียมสารละลาย 11-เมอร์แคปโทอันเดคะโนอิกแอซิด (11-MUA) 2 มิลลิโมลาร์

1. เติม 11-MUA 4.37 มิลลิกรัม ลงไปยังเอธานอล 1,000 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย 11-MUA 20 มิลลิโมลาร์
2. ละลายให้เข้ากันดีในเครื่องอัลตราโซนิก นาน 15 นาที
3. เจือจางสารละลาย 11-MUA 20 มิลลิโมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์โดยใช้เอธานอล

การเตรียมของผสมของสารละลาย EDC และ NHS

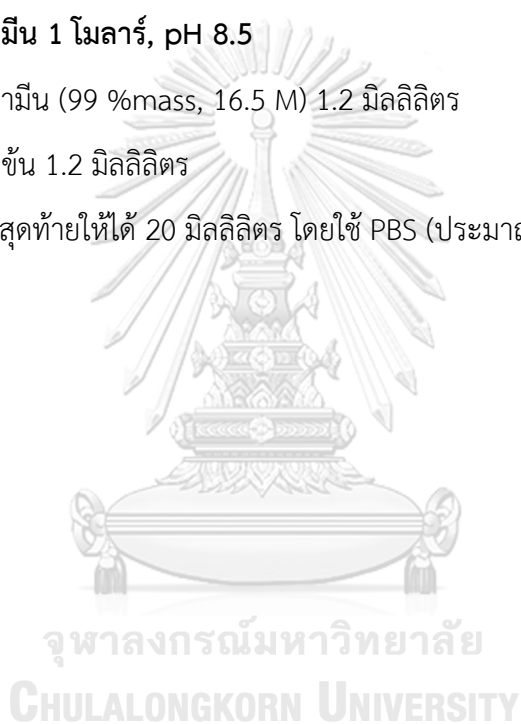
1. เตรียมสารละลาย NHS 0.5 โมลาร์ และ EDC 0.2 โมลาร์ โดยใช้ 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC, น้ำหนักโมเลกุล 191.70) และ N-hydroxy succinimide (NHS, น้ำหนักโมเลกุล 115.09)
2. เติมน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 2.5 มิลลิลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์อะซีเตท 0.2 โมลาร์ pH 5

1. เติม CH_3COONa 2.72 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล 136.08, บัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตท (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, ประเทศญี่ปุ่น) ลงไปยังน้ำปราศจากไอออน
2. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน
1. เติมกรดอะซีติก 0.2 โมลาร์ 14.8 มิลลิลิตร ลงไปยังสารละลาย $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2 โมลาร์ 35.2 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ pH 5

การเตรียมเอธานอลามีน 1 โมลาร์, pH 8.5

1. เติมเอธานอลามีน (99 %mass, 16.5 M) 1.2 มิลลิลิตร
2. เติม HCl เข้มข้น 1.2 มิลลิลิตร
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 มิลลิลิตร โดยใช้ PBS (ประมาณ 17.5 มิลลิลิตร)



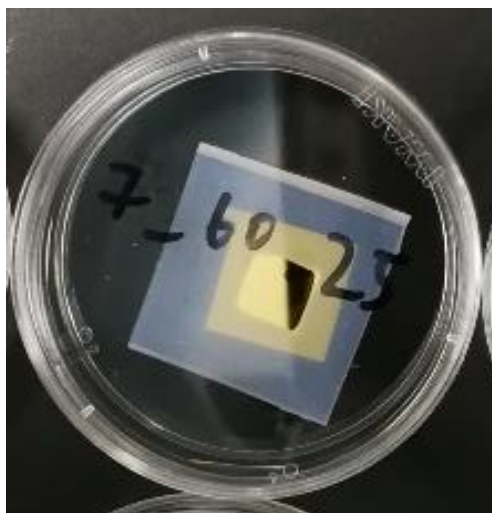
ภาคผนวก C

การศึกษาเบื้องต้น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การเคลือบแบบที่เรียกว่าวิธีการดูดซับทางกายภาพ

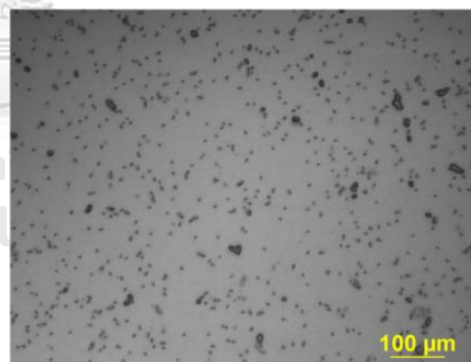


รูปที่ C-1 Si wafer ที่มีพื้นผิวทองและแชนเบอร์สำหรับการปั๊ม

(a)

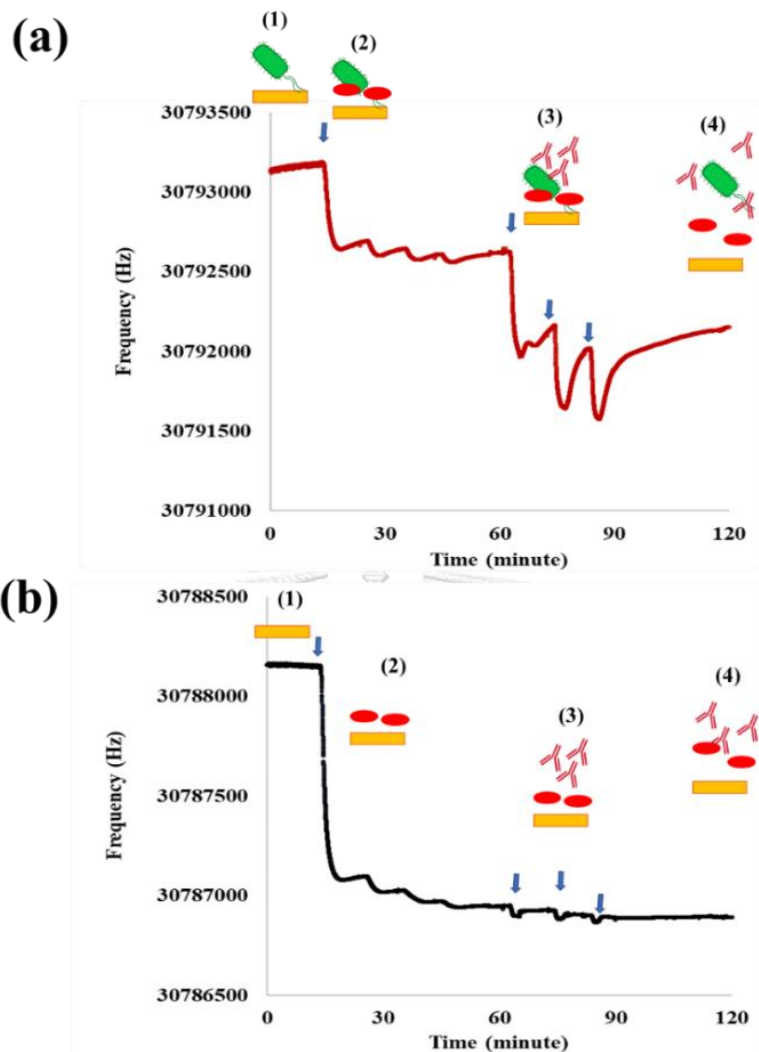


(b)



รูปที่ C-2 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์เชิงแสง หลังการปั๊ม *A. actinomycetemcomitans*

บน Si wafer ที่มีพื้นผิวทอง (a) ก่อนการปั๊ม (b) หลังการปั๊ม

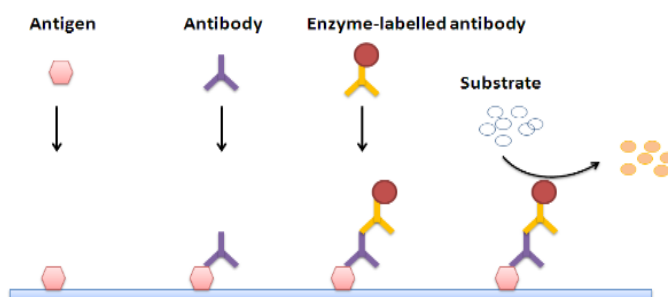


รูปที่ C-3 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซเควมเซอร์ที่เคลือบเซลล์

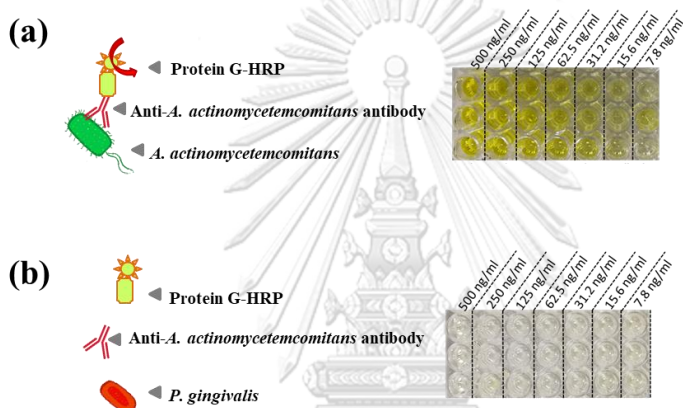
A. actinomycetemcomitans ตามด้วยการฉีดแอนติบอดี

ชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* เข้าในระบบตรวจวัด CH1 เป็นพื้นผิวทองที่เคลือบเซลล์ *A. actinomycetemcomitans* และโปรตีน BSA ก่อนตรวจวัด (b) CH 2 เป็นพื้นผิวทองที่เคลือบโปรตีน BSA ก่อนตรวจวัด

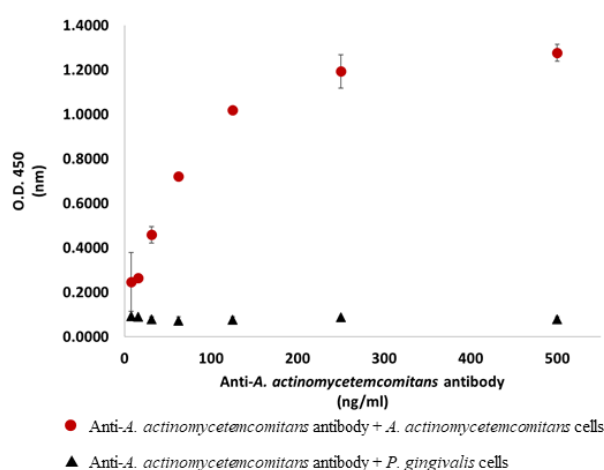
การศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans*



รูปที่ C-4 หลักการ Indirect ELISA

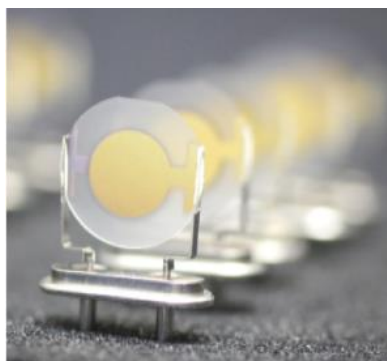


รูปที่ C-5 ผลการทดลอง ELISA assay สำหรับแอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans*



รูปที่ C-6 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิด anti- *A. actinomycetemcomitans* จาก ELISA

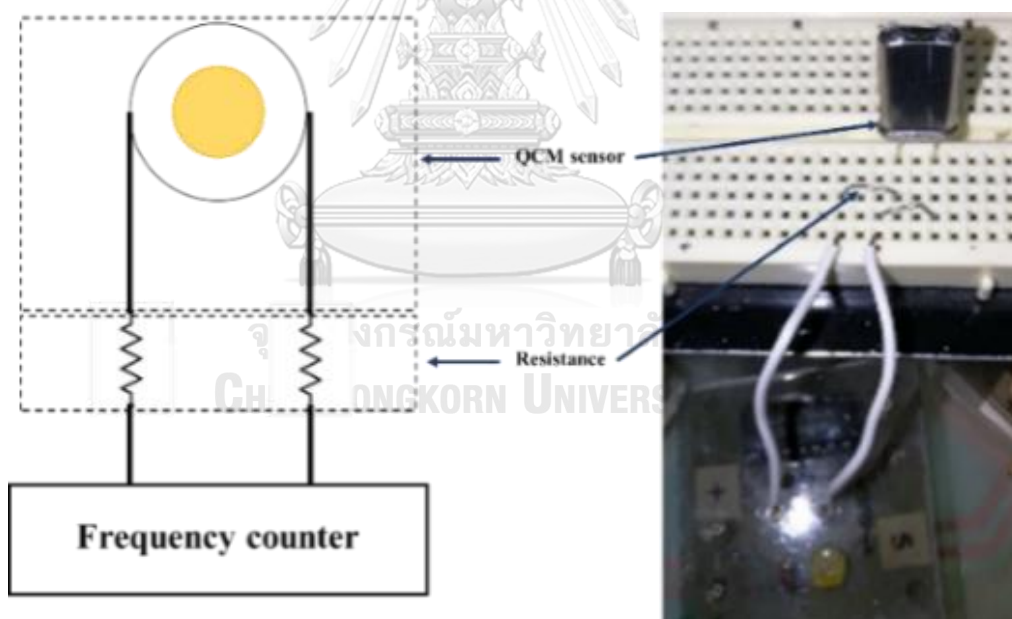
การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้งานควิซีเอ็มเซนเซอร์



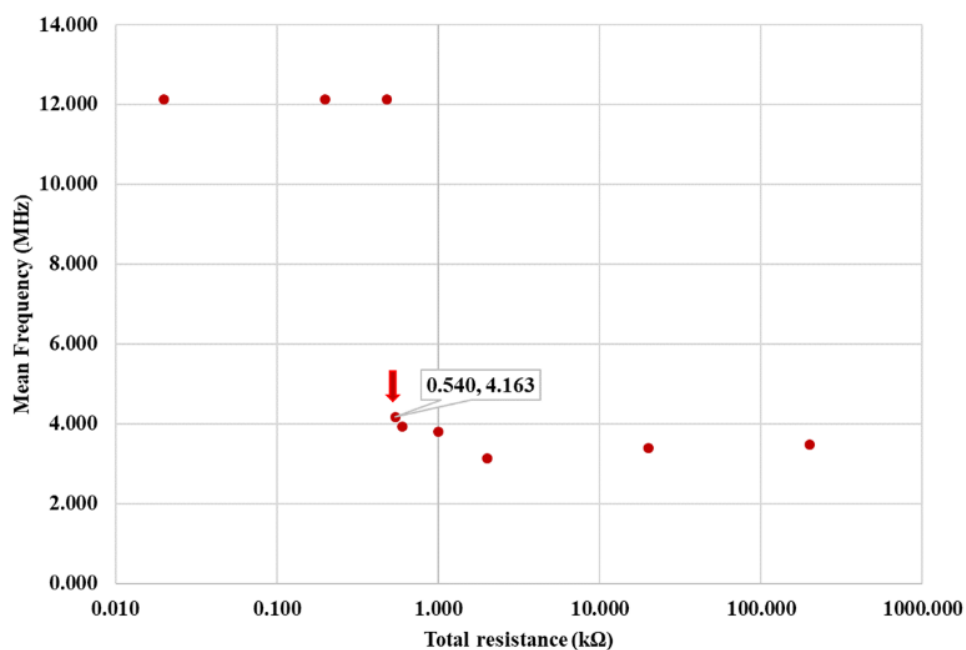
- Ø Quartz : 8.04 mm
- Ø Au : 4.30 mm
- Quartz thickness : 0.20 mm
- Resonant frequency: 12 MHz
- LOD (mass/area): 1 ng/cm²
- Surface : Au on AT-cut quartz

รูปที่ C-7 ควิซีเอ็มเซนเซอร์ 12 MHz

การออกแบบและการประดิษฐ์ QCM chip



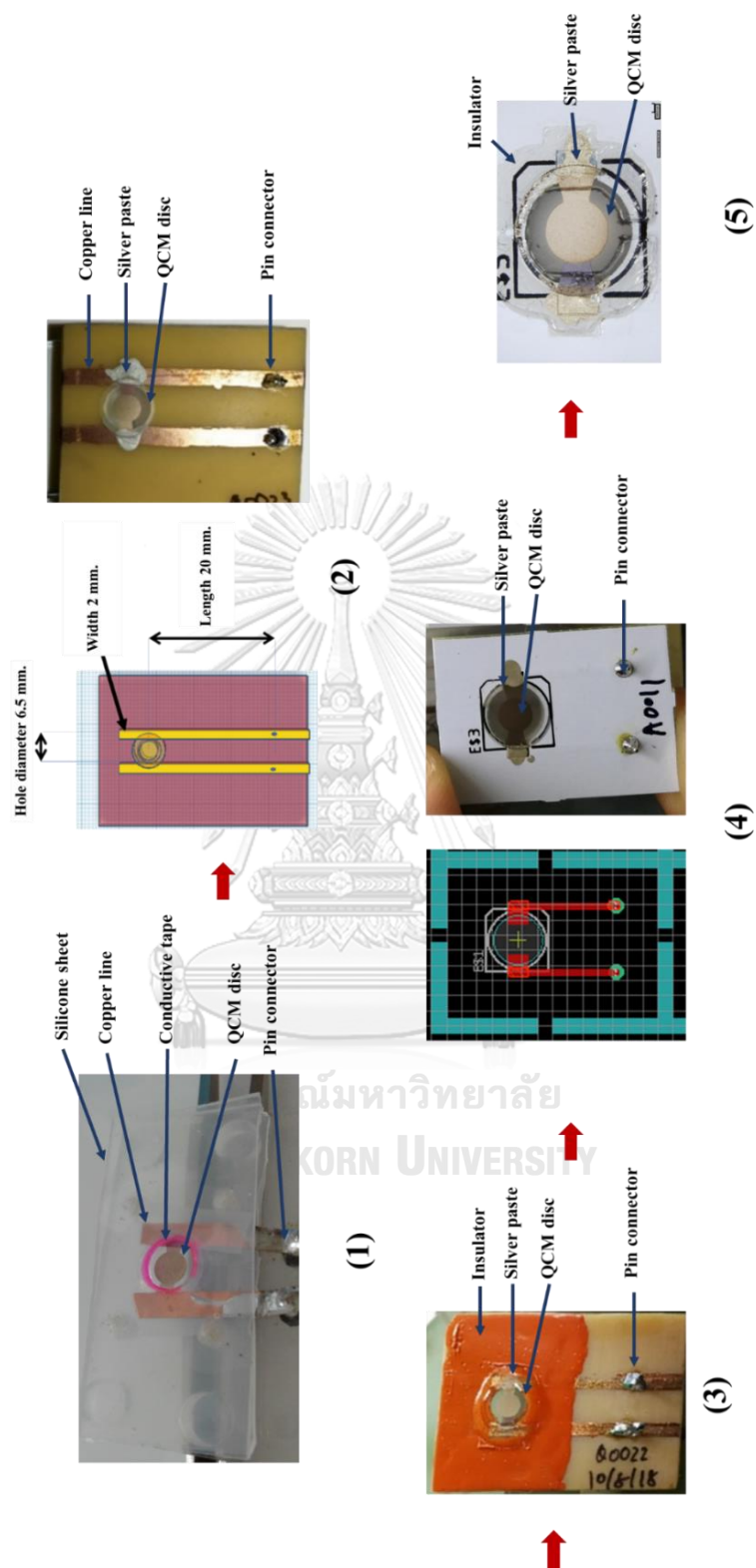
รูปที่ C-8 การเตรียมการทดลองเพื่อทดสอบความต้านทานไฟฟ้า



รูปที่ C-9 ผลของความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์

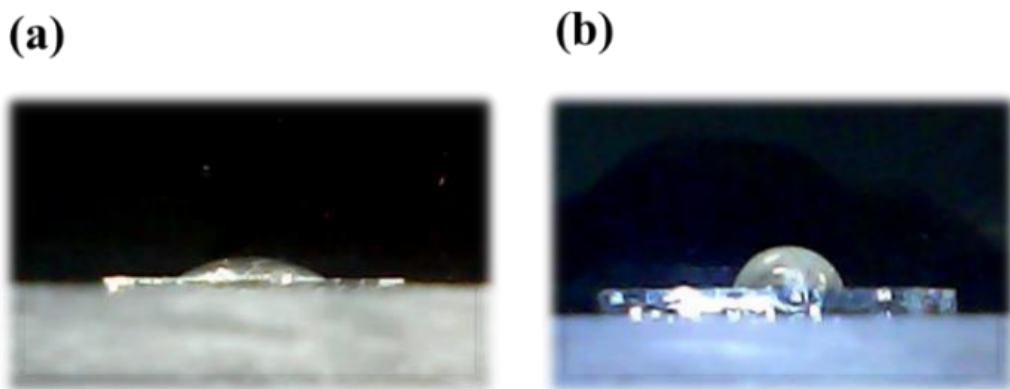
Resistance (kΩ)	Total resistance (kΩ)	Frequency (MHz)			Mean Frequency (MHz)
0.000	0.000	12.120	12.120	12.120	12.120
0.010	0.020	12.120	12.120	12.120	12.120
0.100	0.200	12.120	12.120	12.120	12.120
0.240	0.480	12.120	12.120	12.120	12.120
0.270	0.540	4.140	4.130	4.220	4.163
0.300	0.600	3.980	3.920	3.900	3.933
0.500	1.000	3.820	3.760	3.800	3.793
1.000	2.000	3.190	3.010	3.200	3.133
10.000	20.000	3.390	3.440	3.380	3.403
100.000	200.000	3.430	3.570	3.450	3.483

ตารางที่ C-1 ผลของความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์

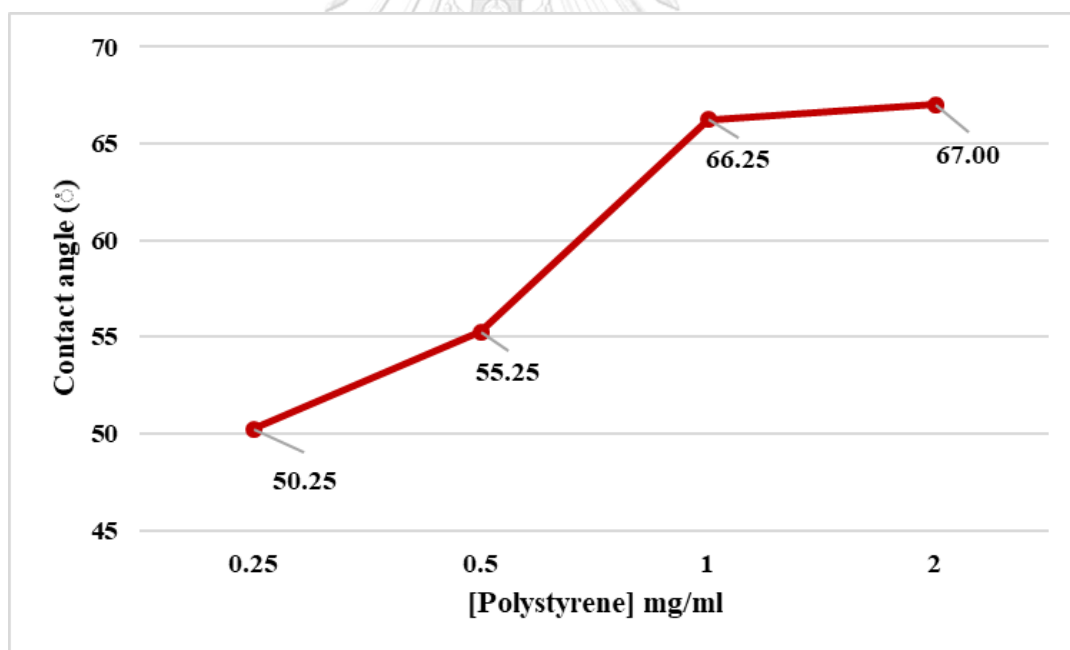


รูปที่ C-10 การประดิษฐ์ QCM chip

















การดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิสไตรีน



รูปที่ C-11 การตรวจวัดมุมสัมผัสเมื่อดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิสไตรีน (a) กระจกที่ไม่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิสไตรีน (b) กระจกที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิสไตรีน 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

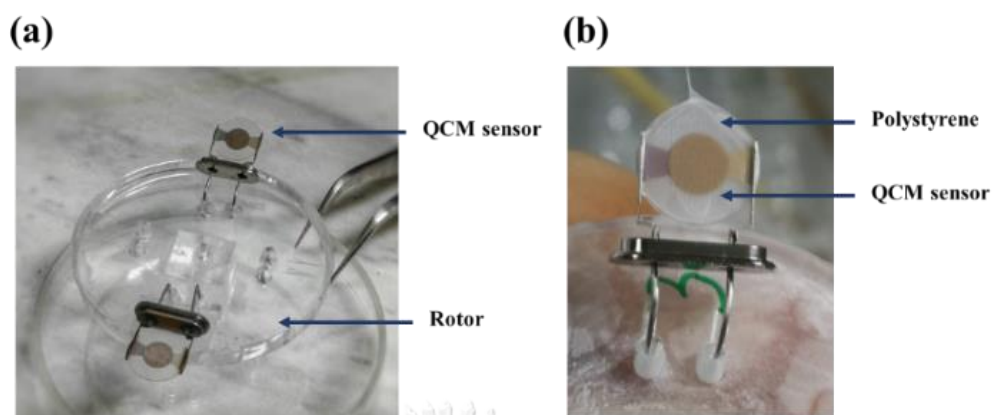


รูปที่ C-12 ความสัมพันธ์ระหว่างมุมสัมผัสจากดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิสไตรีน

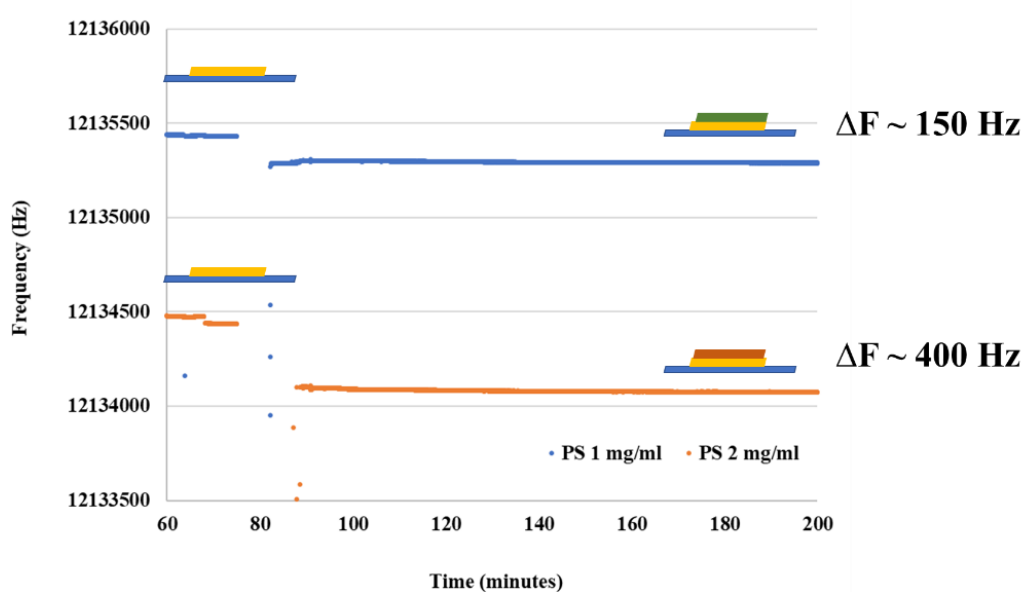
[PS] mg/ml	Spinning time (sec)	Sample (N)				mean
		1	2	3	4	
0.25	10					
Contact angle (°)		50,50	48,52	50,50	49,53	50.25
0.5	10					
Contact angle (°)		60,55	56,52	54,58	52,55	55.25
1	10					
Contact angle (°)		65,65	70,65	69,63	65,68	66.25
2	10					
Contact angle (°)		74,65	64,65	65,72	66,65	67.00

รูปที่ C-13 มุมสัมผัสของพื้นผิวกระจกที่ถอดดัดแปลงด้วยพอลิไธรีน

การทดสอบวิธีเคลือบพอลิสไตรีนด้วยการปั่นเหวี่ยง

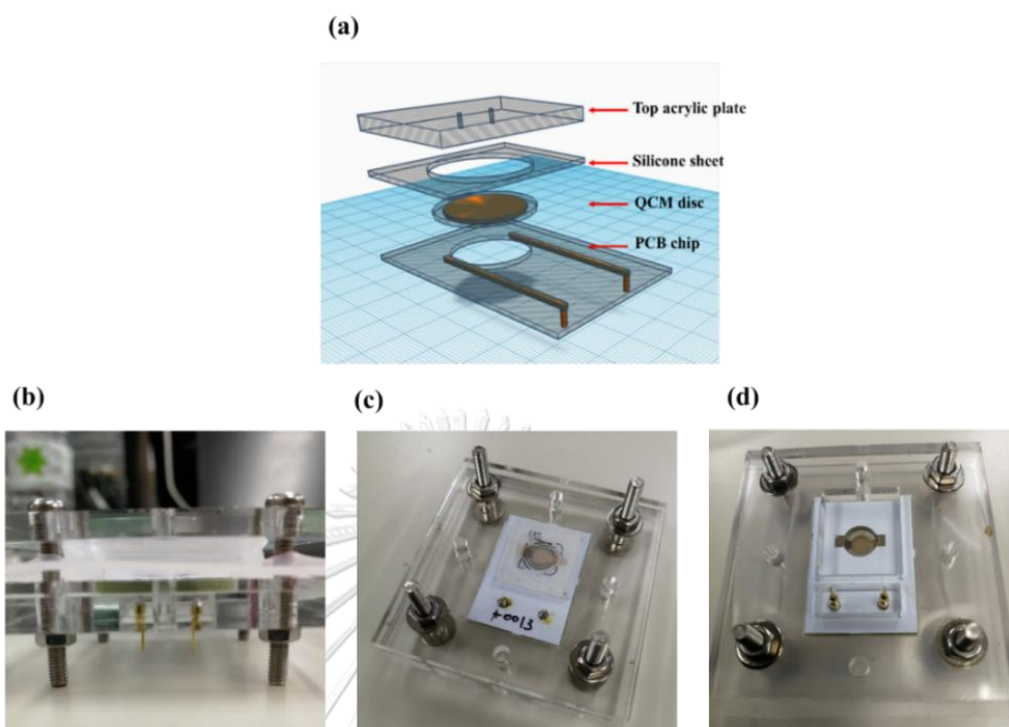


รูปที่ C-14 คิวซีเอ็มเซนเซอร์ที่ตัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิสไตรีน (a) คิวซีเอ็มเซนเซอร์ในโรเตอร์ ก่อนการเคลือบพอลิสไตรีนด้วยการปั่นเหวี่ยง (b) คิวซีเอ็มเซนเซอร์หลังการเคลือบพอลิสไตรีน ด้วยการปั่นเหวี่ยง

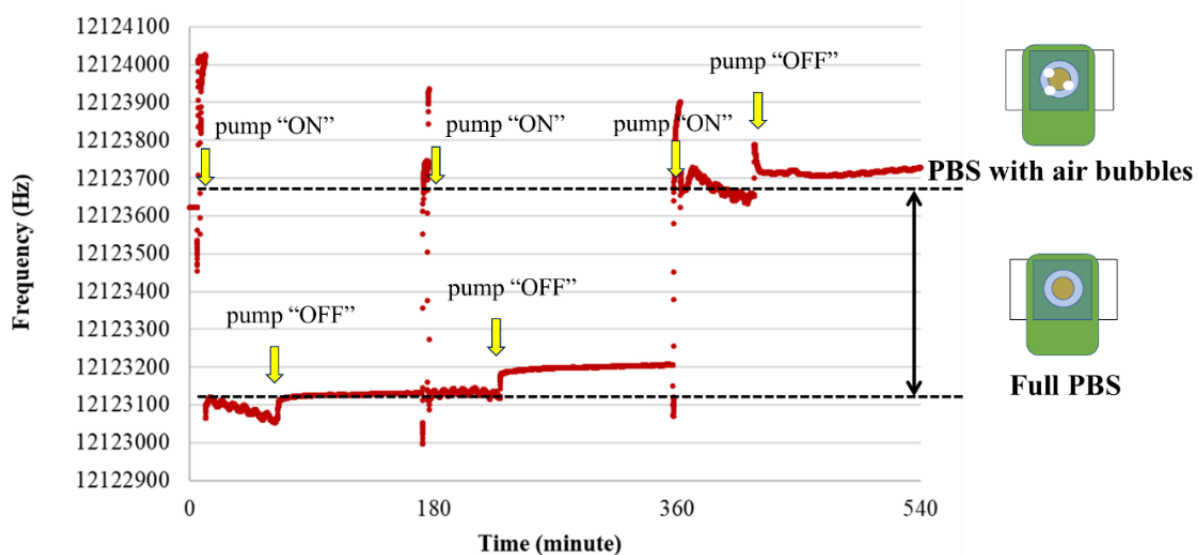


รูปที่ C-15 การเปลี่ยนแปลงความถี่คิวซีเอ็มเซนเซอร์หลังการเคลือบพอลิสไตรีน

การออกแบบและการประดิษฐ์ห้องตรวจวัด



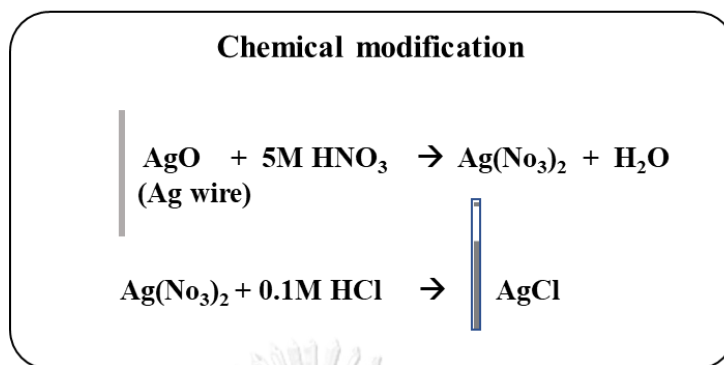
รูปที่ C-16 ห้องตรวจวัด (a) รูปเขียนในการออกแบบ (b) ห้องตรวจวัดจากมุมมองด้านข้าง
(c) ห้องตรวจวัดจากมุมมองด้านบน (d) ห้องตรวจวัดจากมุมมองด้านล่าง



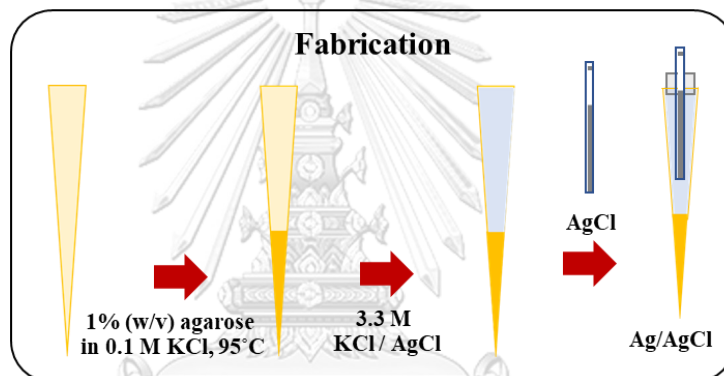
รูปที่ C-17 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของควิซีเอ็มเซนเซอร์เมื่อทดสอบการใช้งาน
ในวัฏภาคของเหลว

การประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงสำหรับการทดลองไซคลิกโวลแทมเมตรี

(a)



(b)



รูปที่ C-18 การเตรียมขั้วไฟฟ้าอ้างอิงชนิด Ag/AgCl

บรรณานุกรม

1. Ye C, Xia Z, Tang J, Khemwong T, Kapila Y, Kuraji R, et al. Unculturable and culturable periodontal-related bacteria are associated with periodontal inflammation during pregnancy and with preterm low birth weight delivery. *Scientific Reports* 2020;10:15807.
2. Park OJ, Yi H, Jeon JH, Kang SS, Koo KT, Kum KY, et al. Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J Dent Res* 2015;94:921-7.
3. Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Martinelli M, Cura F, Lauritano D, et al. Quantitative Analysis of Periodontal Pathogens in Periodontitis and Gingivitis. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29:101-10.
4. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PLoS One* 2015;10:e0136646-e.
5. Ramenzoni LL, Lehner MP, Kaufmann ME, Wiedemeier D, Attin T, Schmidlin PR. Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics* 2021;11:571.
6. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res* 2017;96:380-7.
7. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology* 2000 2006;42:180-218.
8. Ramenzoni LL, Lehner MP, Kaufmann ME, Wiedemeier D, Attin T, Schmidlin PR. Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics (Basel)* 2021;11.
9. Eickholz P, Kim T-S, Benn DK, Staehle HJ. Validity of radiographic measurement of interproximal bone loss. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1998;85:99-106.

10. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2016;20:128-35.
11. Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-Like Activity in Subgingival Plaque. *Journal of Periodontology* 1987;58:266-73.
12. He W, You M, Wan W, Xu F, Li F, Li A. Point-of-Care Periodontitis Testing: Biomarkers, Current Technologies, and Perspectives. *Trends in Biotechnology* 2018;36:1127-44.
13. Bansi Dhar M, Chandra Mouli P. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. [N.p.]: Smithers Rapra; 2017.
14. Long F, Zhu A, Shi H. Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. *Sensors* 2013;13:13928-48.
15. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews* 2010;39:1747-63.
16. He L, Huang R, Xiao P, Liu Y, Jin L, Liu H, et al. Current signal amplification strategies in aptamer-based electrochemical biosensor: A review. *Chinese Chemical Letters* 2021;32:1593-602.
17. Na Songkhla S, Nakamoto T. Overview of Quartz Crystal Microbalance Behavior Analysis and Measurement. *Chemosensors* 2021;9:350.
18. Chen JY, Penn LS, Xi J. Quartz crystal microbalance: Sensing cell-substrate adhesion and beyond. *Biosensors Bioelectron* 2018;99:593-602.
19. Sauerbrey G. *Z Phys Chem* 1959:206-22.
20. Kanazawa KK, Gordon JG. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry* 1985;57:1770-1.
21. Hnasko R. *ELISA. [electronic resource] : Methods and Protocols*: Springer New York; 2015.
22. Dondelinger M, Filée P, Sauvage E, Quinting B, Muyldermans S, Galleni M, et al. Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition. *Frontiers in Immunology* 2018;9.
23. Su Dong K, Ki-Roo S, Byoung-Tak Z, editors. *Molecular immunocomputing with application to alphabetical pattern recognition mimics the characterization of ABO*

blood type. The 2003 Congress on Evolutionary Computation, 2003 CEC '03; 2003 8-12 Dec. 2003.

24. van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. Nature of the antigen-antibody interaction: Primary and secondary bonds: Optimal conditions for association and dissociation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1986;376:111-9.

25. Medical Immunology. 5 ed: CRC Press; 5th edition; 2001 August 24, 2001.

26. Malagi S. Chairside Diagnostic Test Kits In Periodontics - A Review. *International Arab Journal of Dentistry* 2015;30:99-102.

27. Al-Majid A, Alassiri S, Rathnayake N, Tervahartiala T, Gieselmann D-R, Sorsa T. Matrix Metalloproteinase-8 as an Inflammatory and Prevention Biomarker in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *International Journal of Dentistry* 2018;2018:7891323.

28. Gul SS, Abdulkareem AA, Sha AM, Rawlinson A. Diagnostic Accuracy of Oral Fluids Biomarker Profile to Determine the Current and Future Status of Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Diagnostics* 2020;10:838.

29. Ravishankar P, Mithra D, Chakraborty P, Kumar A. Chairside diagnostics in periodontics. *SRM Journal of Research in Dental Sciences* 2017;8:78-81.

30. Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:508-14.

31. Dhalla N, Patil S, Chaubey KK, Narula IS. The detection of BANA micro-organisms in adult periodontitis before and after scaling and root planing by BANA-Enzymatic™ test kit: An in vivo study. *J Indian Soc Periodontol* 2015;19:401-5.

32. Brosel-Oliu S, Abramova N, Uria N, Bratov A. Impedimetric transducers based on interdigitated electrode arrays for bacterial detection – A review. *Anal Chim Acta* 2019;1088:1-19.

33. Ramkumar S, Fujii N, Sakaue H, Fujii N, Thankappan B, kumari RP, et al. Real-time heterogeneous protein—protein interaction between α A-crystallin N-terminal mutants and α B-crystallin using quartz crystal microbalance (QCM). *Amino Acids* 2015;47:1035-43.

34. Joshi T, Voo ZX, Graham B, Spiccia L, Martin LL. Real-time examination of aminoglycoside activity towards bacterial mimetic membranes using Quartz Crystal

- Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D). *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:385-91.
35. Fukusho S, Furusawa H, Okahata Y. In vitro selection and analysis of RNA aptamer recognize arginine-rich motif (ARM) model peptide on a QCM. *Nucleic Acids Symposium Series* 2000;44:187-8.
36. Köβlinger C, Uttenthaler E, Drost S, Aberl F, Wolf H, Brink G, et al. Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1995;24:107-12.
37. Zhu T, Pei Z, Huang J, Xiong C, Shi S, Fang J. Detection of bacterial cells by impedance spectra via fluidic electrodes in a microfluidic device. *Lab on a Chip* 2010;10:1557-60.
38. Wan Y, Zhang D, Hou B. Selective and specific detection of sulfate-reducing bacteria using potentiometric stripping analysis. *Talanta* 2010;82:1608-11.
39. Li Y, Fang L, Cheng P, Deng J, Jiang L, Huang H, et al. An electrochemical immunosensor for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 using C60 based biocompatible platform and enzyme functionalized Pt nanochains tracing tag. *Biosensors Bioelectron* 2013;49:485-91.
40. Yang X, Gu C, Qian F, Li Y, Zhang JZ. Highly Sensitive Detection of Proteins and Bacteria in Aqueous Solution Using Surface-Enhanced Raman Scattering and Optical Fibers. *Anal Chem* 2011;83:5888-94.
41. Gasparyan VK, Bazukyan IL. Lectin sensitized anisotropic silver nanoparticles for detection of some bacteria. *Analytica Chimica Acta* 2013;766:83-7.
42. Jiang X, Wang R, Wang Y, Su X, Ying Y, Wang J, et al. Evaluation of different micro/nanobeads used as amplifiers in QCM immunosensor for more sensitive detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors Bioelectron* 2011;29:23-8.
43. Shen Z, Huang M, Xiao C, Zhang Y, Zeng X, Wang PG. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Anal Chem* 2007;79:2312-9.

44. Mao X, Yang L, Su XL, Li Y. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7. *Biosens Bioelectron* 2006;21:1178-85.
45. Bao L, Deng L, Nie L, Yao S, Wei W. Determination of microorganisms with a quartz crystal microbalance sensor. *Analytica Chimica Acta* 1996;319:97-101.
46. Plomer M, Guilbault GG, Hock B. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme Microb Technol* 1992;14:230-5.
47. Tuantranont A, Wisitsora-at A, Sritongkham P, Jaruwongrungrsee K. A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance: A review. *Analytica Chimica Acta* 2011;687:114-28.
48. Mohammed BS, Fields DA, Mittendorfer B, Coggan AR, Klein S. Are peristaltic pumps as reliable as syringe pumps for metabolic research? Assessment of accuracy, precision, and metabolic kinetics. *Metabolism* 2004;53:875-8.
49. McKeen LW. Chapter 10 - High-Temperature Polymers. In: McKeen LW, editor. *The Effect of Creep and Other Time Related Factors on Plastics and Elastomers* (Second Edition). Boston: William Andrew Publishing; 2009. p. 337-72.
50. JianBing C. PEEK and PES☆. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*: Elsevier; 2018.
51. Morioka K, Sato H, Morita K, Akihida H, Nakajima H, Shoji A, et al. Development of an on-chip sample injection system with a 6-port valve incorporated in a microchip. *RSC Advances* 2020;10:35848-55.
52. Rodphukdeekul S, Tabata M, Ratanaporncharoen C, Takeuchi Y, Somboon P, Boonlue W, et al. Quantitative Assessment of Periodontal Bacteria Using a Cell-Based Immunoassay with Functionalized Quartz Crystal Microbalance. *Chemosensors* 2021;9:159.
53. Sandhyarani N. Chapter 3 - Surface modification methods for electrochemical biosensors. In: Ensafi AA, editor. *Electrochemical Biosensors*: Elsevier; 2019. p. 45-75.
54. Liu B, Liu J. Surface modification of nanozymes. *Nano Research* 2017;10:1125-48.
55. Sheldon RA. *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2007;349:1289-307.

56. John R, Spencer M, Wallace GG, Smyth MR. Development of a polypyrrole-based human serum albumin sensor. *Analytica Chimica Acta* 1991;249:381-5.
57. Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays in biochemistry* 2016;60:9-18.
58. Porter MD, Bright TB, Allara DL, Chidsey CED. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society* 1987;109:3559-68.
59. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews* 1996;96:1533-54.
60. Horiguchi Y, Goda T, Matsumoto A, Takeuchi H, Yamaoka S, Miyahara Y. Direct and label-free influenza virus detection based on multisite binding to sialic acid receptors. *Biosensors and Bioelectronics* 2017;92:234-40.
61. Rajendran S. Applications of Cyclic voltammetry in Corrosion inhibition studies *Int J Nano Corr Sci and Engg* 3(4)(2016) Applications of Cyclic voltammetry Applications of Cyclic voltammetry in Corrosion inhibition studies National Level Seminar on " New Perspective in Science and Technology " , St Antony's College of Arts and Sciences for Women, T 3(4)(2016) 166 -180 Cyclic voltammetry in Corrosion inhibition studies. *International Journal of Nano Corrosion Science and Engineering* 2016;3:166-80.
62. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education* 2018;95:197-206.
63. Iqbal MZ, Zakar S, Haider SS. Role of aqueous electrolytes on the performance of electrochemical energy storage device. *J Electroanal Chem* 2020;858:113793.
64. Joshi P, Sutrave DS. A Brief Study of Cyclic Voltammetry and Electrochemical Analysis. *International Journal of ChemTech Research* 2018;11:77-88.
65. Goda T, Miyahara Y. Thermo-responsive molecular switches for ATP using hairpin DNA aptamers. *Biosensors Bioelectron* 2011;26:3949-52.
66. Yang DF, Wilde CP, Morin M. Electrochemical desorption and adsorption of nonyl mercaptan at gold single crystal electrode surfaces. *Langmuir* 1996;12:6570-7.

67. Sumi T, Uosaki K. Electrochemical Oxidative Formation and Reductive Desorption of a Self-Assembled Monolayer of Decanethiol on a Au(111) Surface in KOH Ethanol Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004;108:6422-8.
68. Poirier GE, Tarlov MJ, Rushmeier HE. Two-Dimensional Liquid Phase and the $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ Phase of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). *Langmuir* 1994;10:3383-6.
69. Nagata K, Handa H, editors. Real-time analysis of biomolecular interactions : applications of BIACORE2000.
70. Challacombe SJ, Shirlaw PJ, Thornhill MH. Chapter 102 - Immunology of Diseases of the Oral Cavity. In: Mestecky J, Strober W, Russell MW, Kelsall BL, Cheroutre H, Lambrecht BN, editors. *Mucosal Immunology* (Fourth Edition). Boston: Academic Press; 2015. p. 1943-83.
71. Fiorillo L, Cervino G, Laino L, D'Amico C, Mauceri R, Tozum TF, et al. *Porphyromonas gingivalis*, Periodontal and Systemic Implications: A Systematic Review. *Dentistry Journal* 2019;7:114.
72. Cross T, Schoff C, Chudoff D, Graves L, Broomell H, Terry K, et al. An Optimized Enrichment Technique for the Isolation of Arthrobacter Bacteriophage Species from Soil Sample Isolates. *Journal of Visualized Experiments* 2015;2015.
73. Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, et al. Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Sci Rep* 2017;7:13950-.
74. Gmur R. Monoclonal antibodies for the rapid identification in clinical samples of *Peptostreptococcus micros* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, d, and e. *Med Microbiol Lett* 1996;5:335-49.
75. Reeves BD, Young M, Grieco PA, Suci P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm killing by a targeted ciprofloxacin prodrug. *Biofouling* 2013;29:1005-14.
76. Dickson JS, Koohmaraie M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:832-6.

77. Rodríguez-Hernández J. Chapter 5 - Antimicrobial micro/nanostructured functional polymer surfaces. In: Grumezescu AM, editor. Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: William Andrew Publishing; 2016. p. 153-92.
78. Ahlstrand T, Kovesjoki L, Maula T, Oscarsson J, Ihlin R. Aggregatibacter actinomycetemcomitans LPS binds human interleukin-8. J Oral Microbiol 2019;11:1549931.
79. Groenink J, Veerman ECI, Zandvoort MS, Van der Mei HC, Busscher HJ, Nieuw Amerongen AV. The interaction between saliva and Actinobacillus actinomycetemcomitans influenced by the Zeta potential. Antonie van Leeuwenhoek 1998;73:279-88.
80. Cowan MM, Van der Mei HC, Stokroos I, Busscher HJ. Heterogeneity of Surfaces of Subgingival Bacteria as Detected by Zeta Potential Measurements. Journal of Dental Research 1992;71:1803-6.
81. Rao MKY, Somasundaran P, Schilling KM, Carson RG, Ananthapadmanabhan KP. Electrokinetic properties of Streptococcus sanguis and Actinomyces naeslundii. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1995;4:87-95.
82. Hayashi H, Seiki H, Tsuneda S, Hirata A, Sasaki H. Influence of growth phase on bacterial cell electrokinetic characteristics examined by soft particle electrophoresis theory. Journal of Colloid and Interface Science 2003;264:565-8.
83. Dixon C, Sah P, Lynch JW, Keramidas A. GABAA receptor α and γ subunits shape synaptic currents via different mechanisms. The Journal of biological chemistry 2014;289:5399-411.
84. Bennett PB, Valenzuela C, Chen L-Q, Kallen RG. On the Molecular Nature of the Lidocaine Receptor of Cardiac Na⁺ Channels. Circulation Research 1995;77:584-92.
85. Kim E, Akimoto S, Tokutsu R, Yokono M, Minagawa J. Fluorescence lifetime analyses reveal how the high light-responsive protein LHCSR3 transforms PSII light-harvesting complexes into an energy-dissipative state. The Journal of biological chemistry 2017;292:18951-60.

86. Nuber S, Zabel U, Lorenz K, Nuber A, Milligan G, Tobin AB, et al. β -Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature* 2016;531:661-4.
87. Mahara A, Yamaoka T. Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column. *Biomaterials* 2010;31:4231-7.
88. Myung JH, Launier CA, Eddington DT, Hong S. Enhanced Tumor Cell Isolation by a Biomimetic Combination of E-selectin and anti-EpCAM: Implications for the Effective Separation of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Langmuir* 2010;26:8589-96.
89. Stroock AD, Dertinger SK, Ajdari A, Mezic I, Stone HA, Whitesides GM. Chaotic mixer for microchannels. *Science* 2002;295:647-51.
90. Eissa S, Alhadrami HA, Al-Mozaini M, Hassan AM, Zourob M. Voltammetric-based immunosensor for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen. *Microchimica Acta* 2021;188:199.
91. Sadik OA, Xu H, Gheorghiu E, Andreescu D, Balut C, Gheorghiu M, et al. Differential Impedance Spectroscopy for Monitoring Protein Immobilization and Antibody–Antigen Reactions. *Anal Chem* 2002;74:3142-50.
92. Farias BC, Souza PRE, Ferreira B, Melo RSA, Machado FB, Gusmão ES, et al. Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2012;43:909-16.
93. Nastych O, Goncharuk-Khomyn M, Foros A, Cavalcanti A, Yavuz I, Tsaryk V. Comparison of Bacterial Load Parameters in Subgingival Plaque during Peri-implantitis and Periodontitis Using the RT-PCR Method. *Acta Stomatol Croat* 2020;54:32-43.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สาธิต รอดภักดีกุล
วัน เดือน ปี เกิด	31 พฤษภาคม 2528
สถานที่เกิด	กรุงเทพ ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	2553: วท.ม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาเภสัชวิทยา) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2550: วท.บ. (ชีวเคมี) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานตีพิมพ์	Satit Rodphukdeekul, Miyuki Tabata, Chindanai Ratanaporncharoen, Yasuo Takeuchi, Pakpum Somboon, Watcharee Boonlue, Yuji Miyahara and Mana Sriyudthsak. 2021. "Quantitative Assessment of Periodontal Bacteria Using a Cell-Based Immunoassay with Functionalized Quartz Crystal Microbalance" Chemosensors 9, no. 7: 159. https://doi.org/10.3390/chemosensors9070159 .