

วิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณจากเทคนิคลูบเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (แลมป) โดยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง

นางสาวไอรินทร์ หงส์วิทธิธร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEMI-QUANTITATIVE QUANTITATION OF LOOP MEDIATED ISOTHERMAL  
AMPLIFICATION (LAMP) GENERATED DNA BY DISTANCE-BASED  
PAPER ANALYTICAL DEVICE

Miss Irin Hongwarittorn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular  
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	วิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณจากเทคนิคลูโปเมดิ เอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (แลมป์) โดยอุปกรณ์ ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง
โดย	นางสาวไอรินทร์ หงส์วริทธิ์ธร
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)  
.....กรรมการ  
(ดร. ศิริพร จิตแก้ว)  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ไอรินทร์ หงส์วริทธิ์ธร : วิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณจากเทคนิคลูบเมดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (แลมป์) โดยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (SEMI-QUANTITATIVE QUANTITATION OF LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) GENERATED DNA BY DISTANCE-BASED PAPER ANALYTICAL DEVICE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วนิดา หลายวัฒน์ไพศาล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, หน้า.

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (Distance-based paper analytical device; dPAD) ได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอตั้งต้นแบบกึ่งปริมาณจากปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ในช่วงยีน *malB* ด้วยเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) โดยอาศัยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีฟ้าที่เกิดจากการจับกันระหว่างสาร Polyethylenimine (PEI) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ประจุบวกที่ตรึงบนชุดตรวจกับสาร Hydroxynaphthol blue (HNB) ที่อยู่ในสารละลาย LAMP โดยสาร HNB นั้นเป็นตัวบ่งชี้โลหะไอออน (Metal ion indicator) ที่ใช้เป็นตัวติดตามการเปลี่ยนแปลงของแมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ ) ที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา LAMP โดยชุดตรวจ dPAD ที่ได้พัฒนาขึ้นสร้างบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 113 ด้วยเทคนิคพิมพ์ขี้ผึ้ง (Wax printing) สามารถตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณได้จากการอ่านระยะทางการเคลื่อนที่ได้ด้วยตาเปล่าและแปลผลการตรวจวัดเป็นปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อตัวอย่างในปฏิกิริยาได้ต่ำสุดเท่ากับ  $4.14 \times 10^3$  สำเนาต่อไมโครลิตร โดยวิธีการอ่านผลด้วยตาเปล่าได้รับการตรวจสอบความถูกต้องจากการอ่านด้วยโปรแกรม ImageJ และพบว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB มีความสัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.971 ดังนั้นชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกใหม่สำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณได้ อีกทั้งยังมีประโยชน์สำหรับการใช้งานในประเทศกำลังพัฒนา เนื่องจากชุดตรวจสร้างขึ้นได้ง่าย ราคาถูก ขั้นตอนการใช้งานไม่ยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาในการตรวจวัดภายใน 5 นาทีเท่านั้น

ภาควิชา	เคมีคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5676666537 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: DISTANCE-BASED PAPER ANALYTICAL DEVICES / LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) / POLYETHYLENIMINE (PEI) / HYDROXYNAPHTHOL BLUE (HNB)

IRIN HONGWARITTORRN: SEMI-QUANTITATIVE QUANTITATION OF LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) GENERATED DNA BY DISTANCE-BASED PAPER ANALYTICAL DEVICE. ADVISOR: ASST. PROF. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D., pp.

A distance-based paper analytical device (dPAD) for loop mediated isothermal amplification (LAMP) detection based on distance measurement was proposed. *malB* gene of *E. coli* was chosen as a template DNA. In accordance with the principle, the dPAD was immobilized by Polyethylenimine (PEI) on the paper device. Hydroxynaphthol blue (HNB), a colorimetric indicator for monitoring the change of magnesium ion concentration in the LAMP reaction, was used to react with the immobilized PEI. The positive charges of PEI react with the negative charges of free HNB in the LAMP reaction, producing a blue colour deposit on the device with reference to semi-quantitative determination of an initial genomic DNA. The dPAD for the visual detection of the LAMP reaction could quantify the initial number of genomic DNA copies as low as  $4.14 \times 10^3$  copies  $\mu\text{L}^{-1}$ . To demonstrate the accuracy of the visual reading, the length of colour displayed on the dPAD was imaged using a ImageJ program. And the blue distance of HNB on dPAD was highly correlated with the initial number of genomic DNA copies ( $r^2=0.971$ ). Thus, this distance-based visual semi-quantitative platform is suitable for choice of LAMP detection method within 5 minutes, particular in resource-limited settings because of the advantages of low cost, simple fabrication and operation, disposability and portable detection of the dPAD device.

Department: Clinical Chemistry Student's Signature .....

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา และแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการทางานวิจัย ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ทั้งยังให้ความช่วยเหลือสนับสนุนจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ดร.ศิริพร จิตรแก้ว กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิวงกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ นาง นันทนัช เมืองโคตร บุคลากรสายสนับสนุนของภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีวะวิทยาคลินิกสำหรับการหาและเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะ

ขอขอบคุณเงินทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 32 ครั้งที่ 3/2559 (เลขที่ GCUGR1125593075) และทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณ พี่ น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ โดยเฉพาะ นางสาวจุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง และนางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษามาโดยตลอด สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	6
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 การก่อโรคของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.2 ความสำคัญของการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล (Molecular biology).....	9
2.3 เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).....	11
2.4 กลไกการเกิดปฏิกิริยา LAMP.....	12
2.5 วิธีการตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค LAMP.....	16
2.5.1 การตรวจวัดจากความขุ่น.....	16
2.5.2 การตรวจวัดโดยอาศัยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis).....	16
2.5.3 การตรวจวัดด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก (Cationic polymer).....	17
2.5.4 การตรวจวัดจากสารเรืองแสง.....	18
2.5.5 การตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงสีของตัวบ่งชี้ (Indicator).....	20

2.5.6 การตรวจวัดจากหลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี (Immunoassays).....	21
2.6 กระดาษและประโยชน์ของกระดาษ.....	22
2.7 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based devices; PADs).....	22
2.8 ตัวอย่างกลไกการตรวจวัดบนกระดาษ.....	23
2.9 การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษ.....	24
2.10 ตัวอย่างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (Distance-based paper analytical devices; dPADs).....	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	28
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	33
3.2.1 การเพาะเลี้ยงและสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ.....	33
3.2.2 ปฏิกริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP.....	34
3.2.3 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของไพรเมอร์ที่เลือกใช้ต่อเชื้อ <i>E. coli</i> .....	35
3.2.4 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของปฏิกริยา LAMP.....	36
3.2.5 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดปฏิกริยา LAMP.....	36
1.) การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทางการเคลื่อนที่ (dPADs) ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกริยา LAMP.....	36
2.) ขั้นตอนการใช้งานของชุดตรวจ dPADs.....	37
3.) การศึกษาความเข้มข้นของสี HNB ในสารละลาย LAMP ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบปฏิกริยา LAMP บนกระดาษกรอง.....	39
4.) การศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง dPADs.....	40
3.2.6 การหาสถานะที่เหมาะสม (Optimization) ของสารละลาย PEI ต่อการตรวจสอบปฏิกริยา LAMP บนชุดตรวจ dPADs.....	40
1.) การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมบนชุดตรวจ dPADs....	40



2.) การศึกษาหาจำนวนครั้งของการตรึงสารละลาย PEI บนชุดตรวจ dPADs .....	40
3.) การศึกษาหาชนิดของตัวชะที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs .....	41
4.) การศึกษาหาปริมาณของตัวชะที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs .....	42
3.2.7 การศึกษาคูณสมบัติ (Characterization) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา .....	42
1.) การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของเชื้อตัวอย่างด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา .....	42
2.) การศึกษาความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา .....	42
3.) การศึกษาหาช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุด ตรวจdPADs .....	43
4.) การศึกษาหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB (Limit of detection; LOD) บนชุดตรวจ dPADs .....	43
5.) การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ ใช้ในปฏิกิริยา LAMP ด้วยเทคนิค Real-time LAMP .....	44
6.) การตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ในการอ่านผลบนชุดตรวจ dPADs ที่ พัฒนาขึ้นด้วยตาเปล่า สำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่ง ปริมาณ .....	45
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	46
4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของไพรเมอร์ที่เลือกใช้ต่อเชื้อ <i>E. coli</i> .....	46
4.2 ผลการศึกษาความไว (Sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP .....	47
4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสี HNB ในสารละลาย LAMP ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบ ปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษกรอง .....	48
4.4 ผลการศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง dPADs .....	50
4.5 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของสารละลาย PEI ต่อการตรวจสอบ ปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPADs .....	51
4.5.1 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมบนชุดตรวจ dPADs .....	51

4.5.2 ผลการศึกษาหาจำนวนครั้งของการตรึงสารละลาย PEI บนชุดตรวจ dPADs.....	54
4.5.3 ผลการศึกษาหาชนิดของตัวชะที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs.....	56
4.5.4 ผลการศึกษาหาปริมาณของตัวชะที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs.....	57
4.6 ผลการศึกษาคุณสมบัติ (Characterization) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา.....	58
4.6.1 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของเชื้อตัวอย่างด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น .....	58
4.6.2 ผลการศึกษาความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา.....	60
4.6.3 ผลการศึกษาหาช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs .....	62
4.6.4 ผลการศึกษาหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB (Limit of detection; LOD) บนชุดตรวจ dPADs .....	64
4.6.5 ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP ด้วยเทคนิค Real-time LAMP .....	65
4.6.6 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ในการอ่านผลบนชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นด้วยตาเปล่า สำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณ .....	69
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาวิจัย .....	72
สรุปผลการศึกษาวิจัย .....	72
รายการอ้างอิง .....	76
ภาคผนวก.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	91

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1	แสดงภาพการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP.....	12
รูปที่ 2.2	แสดงขั้นตอน Starting structure producing.....	14
รูปที่ 2.3	แสดงขั้นตอน Cycle amplification .....	15
รูปที่ 2.4	แสดงสมการปฏิกิริยาการเกิดตะกอนจากปฏิกิริยา LAMP .....	16
รูปที่ 2.5	ภาพแสดงหมู่เอมีนของสาร Polyethylenimine (PEI).....	17
รูปที่ 2.6	แสดงภาพการใช้สาร PEI ตรวจวัดผลผลิต LAMP .....	17
รูปที่ 2.7	แสดงภาพการใช้สาร SYBR Green I ตรวจวัดผลผลิต LAMP .....	19
รูปที่ 2.8	แสดงหลักการการตรวจวัดผลผลิต LAMP ด้วยสาร Calcein .....	19
รูปที่ 2.9	แสดงภาพการใช้สาร Calcein ตรวจวัดผลผลิต LAMP .....	20
รูปที่ 2.10	ภาพแสดงประจุลบของสาร Hydroxynaphthol blue (HNB).....	20
รูปที่ 2.11	แสดงภาพการใช้สาร HNB ตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP .....	21
รูปที่ 2.12	แสดงภาพการใช้สาร Malachite green ตรวจวัดผลผลิต LAMP .....	21
รูปที่ 2.13	แสดงภาพการใช้อนุภาคทองคำตรวจวัดผลผลิต LAMP .....	21
รูปที่ 2.14	แสดงรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (PADs).....	23
รูปที่ 2.15	รูปแสดงการตรวจวัดสารต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่าง ด้วยเทคนิคการตรวจแบบ วัดระยะทาง.....	26
รูปที่ 2.16	แสดงรูปการตรวจหาหมู่เลือดด้วยเทคนิคการตรวจแบบวัดระยะทาง.....	27
รูปที่ 3.1	ภาพแสดงลำดับเบสดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อ <i>E.coli</i> .....	34
รูปที่ 3.2	ภาพแสดงส่วนประกอบของ dPAD.....	37
รูปที่ 3.3	ภาพแสดงขั้นตอนการใช้งานของชุดตรวจ dPAD .....	38
รูปที่ 3.4	ภาพตัวอย่างก่อนและหลังของชุดตรวจที่ใช้โปรแกรม ImageJ ตัดพื้นสีรบกวน.....	39

รูปที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อตัวอย่าง <i>E. coli</i> ที่ใช้ใน ปฏิกิริยา LAMP.....	46
รูปที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบความไวของการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP .....	48
รูปที่ 4.3 แสดงภาพของการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองและกราฟแสดง ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD .....	49
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่สร้างด้วย กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, 4 และเบอร์ 113.....	51
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI.....	52
รูปที่ 4.6 ภาพแสดงหลักการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยชุดตรวจ dPADs .....	53
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1-3 ครั้ง.....	55
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วชะด้วยน้ำ Milli-Q และสารละลาย น้ำเกลือ (0.9% NSS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร .....	57
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วชะด้วยน้ำ Milli-Q ตั้งแต่ปริมาตร 0- 100 ไมโครลิตร.....	58
รูปที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อตัวอย่าง <i>E. coli</i> ที่ใช้ใน ปฏิกิริยา LAMP.....	60
รูปที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบความไวของการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs .....	62
รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB จากการใช้ชุดตรวจ dPADs กับดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP.....	64

รูปที่ 4.13 แสดงกราฟความสัมพันธ์ฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic Function) ระหว่างระดับความเข้มสีของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) กับจำนวนรอบในการเกิดปฏิกิริยา (Cycles).....	67
รูปที่ 4.14 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มสีของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) กับอุณหภูมิที่ใช้ เพื่อให้ได้เอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวจำนวน 50 เฟอร์เซนต์ (Temperature, celsius).....	68
รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Threshold cycles (Ct) กับดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP.....	69
รูปที่ 4.16 ภาพแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ของปฏิกิริยา LAMP.....	71
รูปที่ 4.17 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ที่ตรวจวัดด้วยโปรแกรม ImageJ และระยะทางสีที่อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	71
รูปที่ ก.1 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มสีของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) กับจำนวนรอบในการเกิดปฏิกิริยา (Cycles).....	89
รูปที่ ก.2 แสดงผลการตรวจวัดด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีสาร SYBR Green I เจือจาง.....	90

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	29
ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
ตารางที่ 3.4 แสดงลำดับเบสที่ใช้เป็นไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้น .....	34
ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบหาค่า Limit of detection ของระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB ในปฏิกิริยาผลบวกบนชุดตรวจ dPADs .....	65
ตารางที่ 4.2 ค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB จากการวัดด้วยโปรแกรมและอ่านผลด้วยตาเปล่า ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนของดีเอ็นเอตั้งต้น.....	70

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

การตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล หรือ อณูชีววิทยา (Molecular biology) เป็นการตรวจวิเคราะห์ตัวบ่งชี้สารทางชีวภาพทั้งรหัสพันธุกรรมและโปรตีนที่แสดงออกในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ในระดับพันธุกรรม โดยอาศัยเทคนิคที่มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ทำให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ การตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาจึงมีประโยชน์อย่างมากต่อการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุหรือโอกาสในการเกิดโรค เช่น กรณีโรคติดต่อหรือโรคระบาด จะใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อโรคชนิดต่างๆ การตอบสนองต่อการติดเชื้อของผู้ป่วย เพื่อนำไปสู่การป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อให้มีประสิทธิภาพ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางตัดสินใจในการรักษาที่ดีที่สุดแก่ผู้ป่วยแต่ละราย ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาตั้งแต่ระยะเบื้องต้น รวมถึงการตรวจเพื่อติดตามการรักษา (1) โดยเทคนิคการตรวจวิเคราะห์จะอาศัยปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) เป็นเทคนิคหลัก เนื่องจากการเพิ่มจำนวนเชื้อเพื่อให้สามารถตรวจหาได้แม้จะมีเชื้ออยู่ในสิ่งส่งตรวจเป็นปริมาณน้อยมากก็ตาม

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ณ อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส โดยแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ด้วยคุณสมบัติการทำงานแบบ Strand displacement ของเอนไซม์ *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNA polymerase ร่วมกับไพรเมอร์ (Primer) จำนวน 4 เส้นที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายถึง 6 ตำแหน่ง (2) จึงทำให้เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง นอกจากนี้ปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนเดียว และอาศัยเพียงอ่างน้ำหรือเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath/heating block) เท่านั้น การเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค LAMP ทำให้เกิดสารไพโรฟอสเฟต (Pyrophosphate) เป็นผลผลิตจำนวนมาก สารดังกล่าวสามารถจับกับแมกนีเซียม (Magnesium) กลายเป็นแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (Magnesium pyrophosphate) ซึ่งจะตกตะกอนเป็นสีขาวสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า (3, 4) ทำให้การตรวจสอบปฏิกิริยาทำได้ในขั้นตอนเดียวกัน เทคนิคนี้จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือสำหรับตรวจปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี เพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีความจำเพาะ

และความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยา ไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง หรือหาได้ยาก เช่น เครื่องมือที่ควบคุมการเพิ่ม-ลดอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้อย่างหลากหลาย ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและความสะดวกต่อการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการนั้นๆ เนื่องจากวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน เทคนิคการตรวจสอบปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกที่นิยมในห้องปฏิบัติการทางอณูชีวโมเลกุล คือเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ และต้องอาศัยอุปกรณ์เครื่องมือจำเพาะซึ่งมีราคาแพง อีกทั้งอาจต้องใช้สารอันตรายอย่างสาร Ethidium bromide ถือเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ ในเทคนิค LAMP ยังสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาได้ด้วยการวัดความขุ่นที่เกิดขึ้น (Turbidity) และสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ขึ้นอยู่กับปริมาณจำนวนกรดนิวคลีอิกที่เพิ่มขึ้น หากมีปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมายจำนวนน้อย ก็จะทำให้สังเกตเห็นความขุ่นที่เกิดขึ้นเป็นไปได้ยาก อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า วิธีการหนึ่งคือการเปลี่ยนแปลงสีของสารที่จับกับดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยตรง เช่น สาร SYBR Green I (5, 6), Picogreen (7) หรือ Propidium iodide (6) เป็นต้น ซึ่งต้องเติมภายหลังการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ไปจับกับดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมา และการเปิดฝาเพื่อเติมสารตรวจสอบปฏิกิริยาที่จับกับดีเอ็นเอโดยตรง เป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นๆ เข้าไปในปฏิกิริยา แต่หากเติมสารเหล่านี้ก่อนเกิดปฏิกิริยา LAMP อาจมีโอกาสยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ (8) เนื่องจากสารเหล่านี้จะไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้สารเหล่านี้ยังมีราคาแพงอีกด้วย อีกวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาคือการเปลี่ยนแปลงสีของตัวบ่งชี้โลหะไอออน (Metal ion indicator) ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เช่น สาร Calcein (9) หรือสาร Hydroxynaphthol blue (HNB) (10) เป็นต้น ซึ่งสามารถเติมสารเหล่านี้ก่อนเกิดปฏิกิริยา LAMP ได้ แต่สาร Calcein เป็นสารเรืองแสงดังนั้นเวลาตรวจสอบปฏิกิริยาจึงต้องอาศัยเครื่องอ่านสารเรืองแสง ทำให้มีค่าใช้จ่ายและอุปกรณ์เครื่องมือที่ต้องใช้เพิ่มเติม ส่วนการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ด้วยสาร HNB นั้นมีข้อดีคือ เป็นสารที่มีราคาถูก ไม่เป็นอันตรายและสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์เพิ่มเติม (11) และสาร HNB มีความไวในการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ได้ ใกล้เคียงกับสาร SYBR Green I ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้โดยตรง (10) ดังนั้นการตรวจสอบปฏิกิริยา สาร LAMP ด้วยสาร HNB จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือสำหรับตรวจปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี

ในปัจจุบันชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper based analytical devices; PADs) ได้รับการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP แบบ Vertical flow (VF) strip (12-14) และแบบ Lateral flow dipstick (LFD) (15-21) เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง เป็นมิตร



ต่อสิ่งแวดลอม และนิยมนำมาใช้เป็นตัวกลางสำหรับเทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography) นอกจากนี้เส้นใยเซลลูโลส (Cellulose fiber) มีพื้นที่ผิวสัมผัสเหมาะสำหรับการตรึงน้ำยาเก็บไว้บนกระดาษก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ ช่วยทำให้ชุดตรวจวิเคราะห์ใช้งานได้ง่ายขึ้น และสะดวกต่อการตรวจวิเคราะห์ เพราะกระดาษสามารถคงสภาพน้ำยาที่แห้งแล้ว ณ อุณหภูมิที่เก็บกระดาษที่ตรึงน้ำยาไว้ได้ และด้วยคุณสมบัติในการดูดซับสารละลาย ทำให้สารละลายสามารถไหลผ่านตามโครงสร้างรูพรุนของกระดาษได้โดยอาศัยแรงดึงดูดตามรูขนาดเล็ก (Capillary force) โดยไม่ต้องอาศัยแรงดึงดูดภายนอก (22,23) จากคุณสมบัติของกระดาษดังกล่าวมานั้น จึงสามารถนำกระดาษมาประยุกต์ใช้เป็นชุดตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ที่พกพาได้ ราคาไม่แพงและออกแบบให้เหมาะสมนำมาใช้งานในพื้นที่ภาคสนามได้ โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในชุดตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP แบบ VF strip และแบบ LFD คือเทคนิคอิมโมโนโครมาโตกราฟี (Immunochromatography) โดยอาศัยการทำงานของไพรมอร์ กับดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) ที่ติดฉลาก เช่น สาร Biotin และ Fluorescein isothiocyanate (FITC) เป็นต้น และแอนติบอดีต่อสารเหล่านี้ซึ่งติดฉลากสารที่มีสี เช่น สาร Colloidal gold ทำให้สามารถอ่านผลบนชุดทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ข้อดีของชุดตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP แบบ VF strip และแบบ LFD คือมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นในปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือในการอ่านผลการตรวจสอบ หรือขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล (15,16) แต่ขั้นตอนการสร้างชุดตรวจมีความยุ่งยาก น้ำยาที่ใช้ในการเตรียมชุดตรวจก็มีราคาแพง นอกจากนี้ Connelly และคณะ (24) ได้คิดค้นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่สามารถเตรียมสารตัวอย่างและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP พร้อมทั้งตรวจวัดผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยสาร SYBR Green I แต่วิธีตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษเหล่านี้เป็นการตรวจสอบปฏิกิริยาในเชิงคุณภาพ (Qualitative detection) เท่านั้น คือ สามารถบอกได้แค่ว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายในปฏิกิริยาหรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่ามีมากน้อยแค่ไหน ถึงแม้ในทางคลินิกนั้นการแปลผลเชิงคุณภาพจะเพียงพอต่อการวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะโรคติดเชื้อ แต่ในบางครั้งการแปลผลเชิงปริมาณ (Quantitative) มีความจำเป็นต่อการวินิจฉัย เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคหรือติดตามการตอบสนองของโรคต่อการรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งตัวอย่างที่เป็น เลือด, พลาสมา, ซีรัม หรือน้ำไขสันหลัง

เทคนิคการตรวจวัดสารสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Colorimetry) บนกระดาษเป็นเทคนิคที่ใช้ได้ง่ายที่สุด (25) เพื่อกำหนดการเกิดสีหรือการเปลี่ยนแปลงสีจากการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนกระดาษ เทคนิคนี้เป็นการตรวจวัดผลที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ในพื้นที่ภาคสนาม เพราะเป็นเทคนิคที่อ่านผลได้ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง (26) โดยเฉพาะการตรวจวัดเชิงปริมาณบนชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษจะอาศัยการวัดความเข้มสี (Color intensity) ที่เกิดขึ้นบนกระดาษ ซึ่ง

จะมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตัวตรวจวัด (Analyte) ที่มีอยู่ในปฏิกิริยา แต่การวัดความเข้มข้นนั้นต้องอาศัยอุปกรณ์เครื่องมือตรวจวัดสี เช่น กล้องถ่ายรูป, เครื่องสแกนภาพ เป็นต้น และคุณภาพของภาพขึ้นอยู่กับแสงที่เกิดขึ้นขณะถ่ายภาพอีกด้วย (27) ทำให้ภาพที่ได้ในแต่ละครั้งมีคุณภาพสีไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้เกณฑ์ในการตัดสินสีของภาพหรือความเข้มข้นที่เกิดขึ้นของแต่ละบุคคลยังแตกต่างกัน อาจทำให้ผลการตรวจวัดได้ไม่เท่ากัน (28) แต่เทคนิคการตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงไปยังคงมีความจำเป็นต่อการตรวจวัดเชิงปริมาณบนชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ ดังนั้นจึงมีการตรวจวัดเชิงปริมาณโดยอาศัยการวัดระยะทางของสีที่เกิดขึ้น (Distance-based measurement) บนชุดตรวจแทนการวัดความเข้มข้น ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือตรวจวัดเพิ่มเติม (29) โดยระยะทางของสีที่เกิดขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณตัวตรวจวัดที่อยู่ในสารตัวอย่าง ซึ่งเทคนิคการตรวจวัดระยะทางของสีที่เกิดขึ้นนั้นสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับชุดตรวจที่ทำมาจากวัสดุชนิดต่างๆ เช่น แก้ว, ซิลิคอน (Silicon), สารพอลิไดเมทิลซิลอกเซน (Polydimethylsiloxane; PDMS) หรือด้าย เป็นต้น (30) โดยเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาเพื่อตรวจวัดปริมาณของสารเคมีที่อยู่ในสารตัวอย่าง ในปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนาเทคนิคการวัดระยะทางของสีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจเพื่อตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในสารตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกที่จะใช้ในพื้นที่ภาคสนามดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณจากเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ซึ่งถือเป็นผลงานวิจัยแรกที่อาศัยชุดตรวจแบบวัดระยะทางหาปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่อยู่ในสารละลาย โดยใช้ชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทางบน (Distance-based PADS; dPADs) ชุดตรวจสร้างขึ้นจากกระดาษกรอง (Whatman) ที่มีต้นทุนต่ำและหาซื้อได้ทั่วไป โดยอาศัยเทคนิคพิมพ์ขี้ผึ้ง (Wax printing) (31) กำหนดขอบเขตบนกระดาษให้เป็นส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำนั้นจะใช้เป็นพื้นที่สำหรับการเกิดปฏิกิริยาและอ่านผลด้วยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ที่เกิดขึ้น ชุดตรวจสามารถใช้งานได้ง่าย เหมาะสมที่จะใช้เป็นชุดตรวจพกพาและเก็บรักษาได้ ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บทำให้ง่ายต่อการขนส่งเคลื่อนย้าย ง่ายต่อการทำลาย และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างของเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 ซึ่งเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารในมนุษย์ได้มากที่สุด เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิด (32) การติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น โดยอาศัยดีเอ็นเอในช่วงยีน *malB* เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย (6) ในการทดสอบหลักการตรวจหาจำนวนชุดของดีเอ็นเอตั้งต้นที่อยู่ในปฏิกิริยา LAMP ด้วยการวัดระยะทางของสีที่เกิดขึ้นจากการจับกันระหว่างสี HNB ในสารละลาย LAMP กับสารที่ตรึงไว้บนชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ เนื่องจากสีที่

เกิดขึ้นในปฏิกิริยา LAMP ไม่สามารถสังเกตเห็นได้จากการดูดซับบนกระดาษโดยตรง แม้สี HNB ภายในหลอดทดลองจะชัดเจน แต่สี HNB บนกระดาษนั้นแสดงไม่ชัดเจน เนื่องจากการกระจายตัวของสีที่มีจำนวนน้อยบนพื้นที่ขนาดใหญ่ของรูพรุนกระดาษ เพื่อเพิ่มความเข้มของสี HNB ให้สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนบนกระดาษ จึงได้ตรึงสาร Polyethylenimine (PEI) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ประจุบวกที่ไม่มีสีไว้ เพื่อปรับเปลี่ยนพื้นผิวบนกระดาษให้สามารถจับกับสี HNB ได้ โดยการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณบนชุดตรวจนั้นเกิดจากการบ่มสารละลาย LAMP จนเกิดปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้วภายในหลอดทดลอง สี HNB ที่อยู่ในปฏิกิริยาจะเปลี่ยนแปลงไปตามจำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณมาก โอกาสที่จะมีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นปริมาณมากด้วยเช่นกัน ซึ่งในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นมาก สี HNB ที่สามารถจับกับสาร PEI บนชุดตรวจจะมีปริมาณมาก ทำให้เกิดระยะทางของสีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่ายาวกว่าในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณน้อย โดยอาศัยโปรแกรม ImageJ วิเคราะห์ระยะทางการเกิดสีบนชุดตรวจที่ผ่านการทดสอบเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ของการตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณบนชุดตรวจว่าระยะทางที่เกิดขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใส่ไปในปฏิกิริยา LAMP และทดสอบความน่าเชื่อถือว่าระยะทางสีที่เกิดขึ้นสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และแปลผลออกมาได้ตรงกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือในขั้นตอนการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลเพิ่มเติม จึงเหมาะกับการใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนา งานภาคสนาม หรือพื้นที่ที่ไม่มีอุปกรณ์เครื่องมือ เนื่องจากชุดตรวจสร้างได้ง่าย และราคาถูก ซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนในการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่สำหรับตรวจสอบปฏิกิริยา Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) บนกระดาษให้สามารถตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า
2. เพื่อประยุกต์วิธีการตรวจสอบปฏิกิริยา Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (dPADs)
3. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบปฏิกิริยาบนกระดาษกรองแบบวัดระยะทางให้อ่านผลการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) ได้

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาของ Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) แบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) บนชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (Distance- based paper analytical devices; dPADs) ที่สร้างขึ้นโดยอาศัยเทคนิคพิมพ์ขี้ผึ้ง (Wax printing) ลงบนกระดาษกรอง โดยการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP เกิดจากการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ (Distance measurement) ของสี Hydroxynaphthol blue (HNB) ในสารละลาย LAMP ที่จับกับสาร Polyethylenimine (PEI) ที่ตรึงไว้บนกระดาษกรอง เกิดสีที่สามารถอ่านผลบนกระดาษได้ด้วยตาเปล่า และแปลผลแบบกึ่งปริมาณได้โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือในขั้นตอนการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลเพิ่มเติม โดยใช้โปรแกรม ImageJ วิเคราะห์ระยะทางการเคลื่อนที่บนชุดตรวจที่ผ่านการทดสอบ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ของการตรวจวัดระยะทางบนชุดตรวจ และความน่าเชื่อถือของการแปลผลแบบกึ่งปริมาณว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสีนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใส่ไปในปฏิกิริยา LAMP

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. วิธีการตรวจสอบปฏิกิริยา Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) สามารถเกิดขึ้นได้บนกระดาษกรองและตรวจวัดสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า
2. พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบปฏิกิริยา Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ที่มีขนาดเล็ก จัดเก็บและเคลื่อนย้ายได้ง่าย สามารถพกพาได้สะดวก ราคาถูก ง่ายต่อการกำจัดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
3. ชุดทดสอบสามารถแปลผลการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) ได้

ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (PADs)

4. สามารถนำผลงานการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ในพื้นที่ภาคสนามที่ไม่มีอุปกรณ์เครื่องมือสำหรับอ่านผลใช้เชิงกึ่งปริมาณ



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 การก่อโรคของเชื้อ *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Enterobacteriaceae โดยแบ่งสายพันธุ์เชื้อ *E. coli* จากการแสดงอาการทางคลินิกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1.) สายพันธุ์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Diarrhoeagenic *E. coli*) ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ชนิดดังนี้ 1.1) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียในเด็กทารก เมื่อเชื้อเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้แล้วจะปล่อยสารพิษ (Toxin) เข้าสู่เซลล์ดังกล่าว ซึ่งจะรบกวนการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุต่างๆ ทำให้เกิดอาการท้องเสีย, 1.2) Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียแบบมีเลือดปน (Bloody diarrhoea) พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ เป็นเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหารจำพวกเนื้อวัว โดยเชื้อจะสร้างสารพิษที่เรียกว่า Shiga toxin (Stx) หรือ Verocytotoxin (VT) จึงเรียกเชื้อชนิดนี้ว่า Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) หรือ Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) โดยสารพิษนี้จะยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนและทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้สารพิษสามารถเข้าสู่หลอดเลือดและก่อพยาธิสภาพที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียที่มีเลือดปนขึ้น, 1.3) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียเป็นน้ำ (Watery diarrhoea) ในเด็กเล็กและกลุ่มนักท่องเที่ยวต่างชาติ (Travellers' diarrhoea) พบมากในประเทศกำลังพัฒนา โดยเชื้อจะปล่อยสารพิษที่ทนความร้อน (Heat-stable enterotoxin; STs) และไม่ทนความร้อน (Heat-labile enterotoxin; LTs) ไปรบกวนการดูดซึมแร่ธาตุของเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้เกิดอาการท้องเสีย, 1.4) Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิด Traveller's diarrhoea ได้บ่อยรองจาก ETEC พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ โดยมีอาการท้องเสียเป็นน้ำ แต่ในบางรายอาจรุนแรงมีเลือดปนได้ สามารถพบเชื้อได้ทั้งในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ เชื้อจะอยู่รวมกันเป็นลักษณะของไบโอฟิล์ม (Biofilm) เชื้อจะเจริญผ่านชั้นเยื่อเมือกที่ปกคลุมเซลล์เยื่อบุลำไส้ทำให้เกาะติดกับเยื่อบุลำไส้และปล่อยสารพิษไปรบกวนกระบวนการดูดซึมของเซลล์ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้, 1.5) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นชนิดที่มีพยาธิสภาพการก่อโรคคล้ายกับเชื้อ *Shigella* คือทำให้เกิดโรคบิด และท้องเสียแบบมีเลือดปนเมือก เชื้อชนิดนี้ไม่มีแฟลกเจลลา (Flagella) ที่จะช่วยให้เชื้อเคลื่อนที่ การติดเชื้อเกิดจากการสัมผัสส่งเชื้อจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ เชื้อจึงสามารถทำลายเซลล์ในชั้นที่ลึกกว่าชั้นเยื่อบุลำไส้ และ 1.6) Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) เป็นชนิดที่

ก่อให้เกิดอาการท้องเสียในเด็กอายุมากกว่า 12 เดือน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในผู้ใหญ่ได้ด้วย เชื้อกลุ่มนี้จะสร้างสารที่ช่วยในการเกาะติดกับเซลล์ออกมาเป็นจำนวนมาก โดยสารเหล่านั้นจะทำให้เซลล์ยื่นยาวออกไปโอบล้อมเชื้อเข้าสู่เซลล์ และสร้างสารพิษที่เรียกว่า Secreted autotransporter toxin (Sat) ไปทำลาย Tight junctions ของเซลล์ ทำให้การซึมผ่านของสารเข้า-ออกเซลล์ผิดปกติ เกิดอาการท้องเสียได้ (33, 34)

2.) สายพันธุ์ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหาร (Extraintestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC) ได้แก่ 2.1) Uropathogenic *E. coli* (UPEC) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเป็นระบบที่พบว่ามี การติดเชื้อ *E. coli* มากที่สุด ส่วนใหญ่มักจะปนเปื้อนมาจากระบบทางเดินอาหารเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินปัสสาวะเชื้อจะเกาะติดที่เซลล์เยื่อบุ เกิดการกระตุ้นให้เซลล์นำแบคทีเรียเข้าเซลล์และอยู่รวมตัวกันคล้าย Biofilm เรียกว่า Intracellular bacterial communities (IBCs) เมื่อแบคทีเรียใน IBC ออกมานอกเซลล์ก็จะสามารถเข้าสู่เซลล์ชั้นต่อไปของระบบทางเดินปัสสาวะได้ และถ้าไม่ได้รับการรักษา อาจเกิดการติดเชื้อที่ไตได้ (35) 2.2) Meningitis/sepsis-associated *E. coli* (MNEC) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิดมากที่สุด โดยปนเปื้อนมาจากระบบทางเดินอาหารของแม่ในขณะคลอด เชื้อจะผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด ก่อนจะเข้าสู่สมองและระบบประสาทได้ผ่านเซลล์ที่เรียกว่า Blood Brain Barrier (BBB) ก่อให้เกิดการอักเสบจากการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมองได้ (33)

## 2.2 ความสำคัญของการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล (Molecular biology)

อณูชีววิทยา หรือ ชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง และการทำงานของหน่วยพันธุกรรม ในระดับโมเลกุล โดยมุ่งเน้นศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งรวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) อาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid; RNA) โปรตีน (Protein) และโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงกลไกที่ควบคุมการทำงานของสิ่งเหล่านี้ (36) ในปัจจุบันนี้ ความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาได้ก้าวหน้าอย่างมาก และมีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยเฉพาะการตรวจวินิจฉัยทางโมเลกุล (Molecular diagnosis) ซึ่งอาศัยการตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุล คือการตรวจวัดการเกิดขึ้นของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะสุขภาพหรือโรคที่เฉพาะเจาะจง ช่วยทำให้สาเหตุของโรค ความเสี่ยงหรือโอกาสเกิดโรคได้ และหาปริมาณเชื้อที่ก่อโรค ทำให้แพทย์รักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องรวดเร็วขึ้นในแต่ละบุคคล เลือกวิธีการรักษาได้เหมาะสมกับโรคมกยิ่งขึ้น หรือตรวจติดตามโรคตามการรักษา (37) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูแลรักษาผู้ป่วยให้ดียิ่งขึ้น การ

ตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลนั้นจะช่วยทำให้หาสาเหตุของโรคได้ เพราะการศึกษาสากลพื้นฐานในระดับโมเลกุล ทำให้เข้าใจกลไกของการเกิดโรคได้มากขึ้น ช่วยพยากรณ์อาการและการดำเนินของโรคที่จะเกิดขึ้นภายในแต่ละบุคคลได้ หรือผลกระทบของโรคนั้นๆ ต่อร่างกายผู้ป่วย เช่น การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอหรือโปรตีนในสารถน้ำหรือเนื้อเยื่อหลังได้รับเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของผู้ป่วยส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ในร่างกาย ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโรคได้ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีความแตกต่างเฉพาะบุคคล ซึ่งส่งผลดีตั้งแต่ขั้นตอนของการดูแลสุขภาพ การประเมินความเสี่ยง การคัดกรองโอกาสเกิดโรค การพยากรณ์โรค การเลือกวิธีการรักษาและการตรวจติดตามการรักษา ซึ่งเป็นการปฏิบัติการดูแลสุขภาพอย่างแท้จริง (38) ยกตัวอย่างเช่น การรักษาโรคติดเชื้อ ในการรักษาขั้นต้นแพทย์จะให้ยาปฏิชีวนะพื้นฐานก่อนซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ถูกต้อง แต่หากสามารถระบุชนิดและปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว จะช่วยทำให้แพทย์ตัดสินใจให้ยาปฏิชีวนะได้อย่างถูกต้องเหมาะสมกับชนิดและปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในร่างกายผู้ป่วยได้อย่างแท้จริง ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพและลดโอกาสการติดยาของผู้ป่วยได้

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของรหัสพันธุกรรมที่มีผลต่อเซลล์ต่างๆ นั้นได้อาศัยเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (Molecular Biology Techniques) มาช่วยแยกและตรวจวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) และโปรตีน (Protein) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้ ทำให้เข้าใจสาเหตุการเกิดโรค หรือลักษณะอาการที่แสดงออกของโรคนั้นๆ จึงสามารถนำความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและใช้ระบุตัวบ่งชี้ของโรคนั้นๆ (39) โดยการตรวจสอบความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมระหว่างเซลล์ที่ทำให้เกิดการแสดงออกปกติกับเซลล์ที่เกิดโรคนั้นอาศัยเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุลพื้นฐาน ได้แก่ 1.) การสกัดสาร (ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน) จากตัวอย่างตรวจ 2.) การแยกสารด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) 3.) การตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) 4.) การเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก (Nucleic Acid Amplification Tests; NAATs) โดยวิธีการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก ถือเป็นเทคนิคที่สำคัญและนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางการแพทย์ โดยเฉพาะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกที่ได้รับการค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Saki และคณะ (40) เทคนิคพีซีอาร์ได้รับความนิยมนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง เช่น การคิดค้นพัฒนา ยา การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การโคลนยีน (Gene cloning) หรือการควบคุมคุณภาพอุตสาหกรรม เป็นต้น (41) เพราะขั้นตอนดำเนินการได้มาตรฐาน สารเคมีที่ใช้หาได้ง่าย แต่ก็มีข้อจำกัด เช่น ใช้เวลานาน เครื่องมือราคาแพงที่

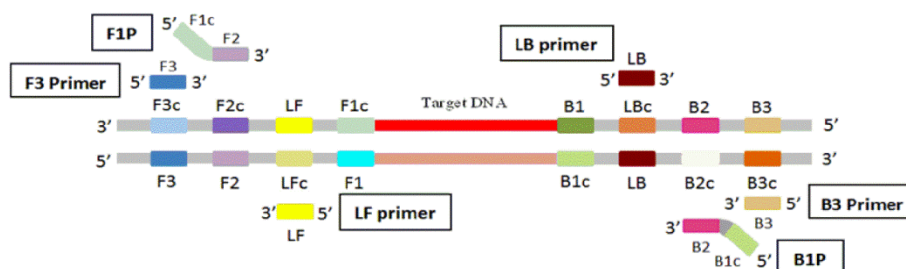


ต้องผ่านการควบคุมคุณภาพและการดูแลรักษาอย่างดี มีโอกาสปนเปื้อนที่แน่นอน และมีตัวยับยั้ง (Inhibitors) ปฏิกริยาจำนวนมาก (42) เป็นต้น ข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้มีการคิดค้นเทคนิคอื่นๆ เพิ่มขึ้น เช่น เทคนิค Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) (43), เทคนิค Strand displacement amplification (SDA) (44), เทคนิค Ligase chain reaction (LCR) (45), เทคนิค Rolling circle amplification (RCA) (46) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีข้อดีเพิ่มเติมคือ ใช้ระยะเวลาอันน้อยลง ต้นทุนถูกลง และเครื่องมือสามารถเคลื่อนย้ายได้ (47) แต่ก็ยังมีข้อบกพร่องคือ เทคนิคเหล่านี้ยังต้องการเครื่องมือที่มีความแม่นยำและวิธีการตรวจสอบกรดนิวคลีอิกที่เพิ่มขึ้นนั้นมีขั้นตอนยุ่งยาก (41) ต่อมาได้มีการค้นพบเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะ (2) ซึ่งพบว่าเป็นเทคนิคเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกที่มีความจำเพาะและความไวสูง มีขั้นตอนที่ง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และการตรวจสอบกรดนิวคลีอิกที่เพิ่มขึ้นสามารถทำได้ง่ายกว่าเทคนิคอื่นๆ เทคนิค LAMP จึงได้รับความสนใจในวงการวิจัยทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย และถูกนำไปประยุกต์ใช้งานต่อเป็นจำนวนมาก

### 2.3 เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก ณ อุณหภูมิคงที่ และตรวจสอบได้ในขั้นตอนเดียวกันด้วย เทคนิคนี้มีความจำเพาะสูง เพราะอาศัยไพรเมอร์ 2 คู่ จำนวน 4 เส้น ซึ่งสามารถตรวจสอบความจำเพาะกับเป้าหมายได้ถึง 6 ตำแหน่ง คือตำแหน่ง F1, F2, F3, B1, B2 และ B3 ไพรเมอร์ Forward inner primer (FIP) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ F1c และ F2 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ F1 และ F2c ไพรเมอร์ Backward inner primer (BIP) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ B1c และ B2 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ B1 และ B2c ไพรเมอร์ Forward outer (F3 Primer) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ F3 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ F3c และไพรเมอร์ Backward outer (B3 Primer) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ B3 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ B3c อาจมีไพรเมอร์เพิ่มขึ้นอีก 1 คู่ ได้แก่ Loop forward (LF) และ Loop backward (LB) ซึ่งสามารถช่วยเร่งปฏิกริยาได้ ทำให้ปฏิกริยามีความไวเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (48) ดังรูปที่ 2.1 ไพรเมอร์เหล่านี้ช่วยทำให้ปฏิกริยาการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว โดยใช้เอนไซม์ *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) DNA polymerase ช่วยในการเกิดปฏิกริยาที่อุณหภูมิประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องอาศัยความร้อนช่วยคลายเกลียวจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวก่อนเกิดปฏิกริยาเพิ่มจำนวนเหมือนกับเทคนิคพีซีอาร์ เพราะคุณสมบัติการทำงานแบบ Strand displacement ของเอนไซม์ชนิดนี้ ทำให้เทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกสูงถึง  $10^9$ - $10^{10}$  ครั้งในระยะเวลา 15-60 นาที

และสามารถใช้ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบได้ การเพิ่มจำนวนโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบสามารถทำตามขั้นตอนเดียวกับใช้ดีเอ็นเอต้นแบบได้ เพียงแต่ต้องเติมเอนไซม์ Reverse transcriptase ลงในปฏิกิริยาด้วย (49)



รูปที่ 2.1 แสดงภาพการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP

## 2.4 กลไกการเกิดปฏิกิริยา LAMP

กลไกการเกิดปฏิกิริยา LAMP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ 1.) ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วง (Starting structure producing step) เพื่อสร้างโครงสร้างที่เป็นห่วง (Stem-loop) อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอเป้าหมาย 2.) ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจากโครงสร้างห่วง (Cycle amplification step)

### 1. ขั้นตอน Starting structure producing (50)

ขั้นตอนที่ 1 ที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายคู่จะอยู่ในสภาวะสมดุลไดนามิก (Dynamic equilibrium) คือมีการจับกันแบบสายคู่ (Double stranded DNA) และคลายบางส่วนเป็นสายเดี่ยว (Single stranded DNA) ตลอดเวลา ทำให้ไพรเมอร์ FIP มีโอกาสเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สม (Complementary sequence) กันได้ ดังรูปที่ 2.2(1). จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase จะเริ่มทำงานเกิดการแทนที่และแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยไม่ต้องอาศัยอุณหภูมิในการคลายเกลียวดีเอ็นเอสายคู่เหมือนกับเทคนิค PCR

ขั้นตอนที่ 2 มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น โดยเริ่มสร้างจากลำดับเบสตำแหน่ง F2 ของไพรเมอร์ FIP ดังรูปที่ 2.2(2.)

ขั้นตอนที่ 3 ต่อมาไพรเมอร์ F3 (Outer primer) จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ลำดับเบสตำแหน่ง F3c ดังรูปที่ 2.2(3.) ทำให้มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น เพื่อให้ดีเอ็นเอสายใหม่หลุดออกจากดีเอ็นเอเป้าหมาย

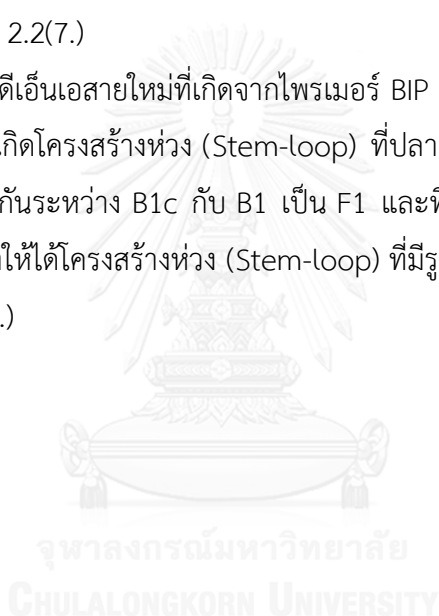
ขั้นตอนที่ 4 ดีเอ็นเอสายใหม่ ที่มีลำดับเบสต่อจากไพรเมอร์ F3 จะจับเข้ากับดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลักษณะเหมือนดีเอ็นเอสายคู่ต้นแบบ ดังรูปที่ 2.2(4.)

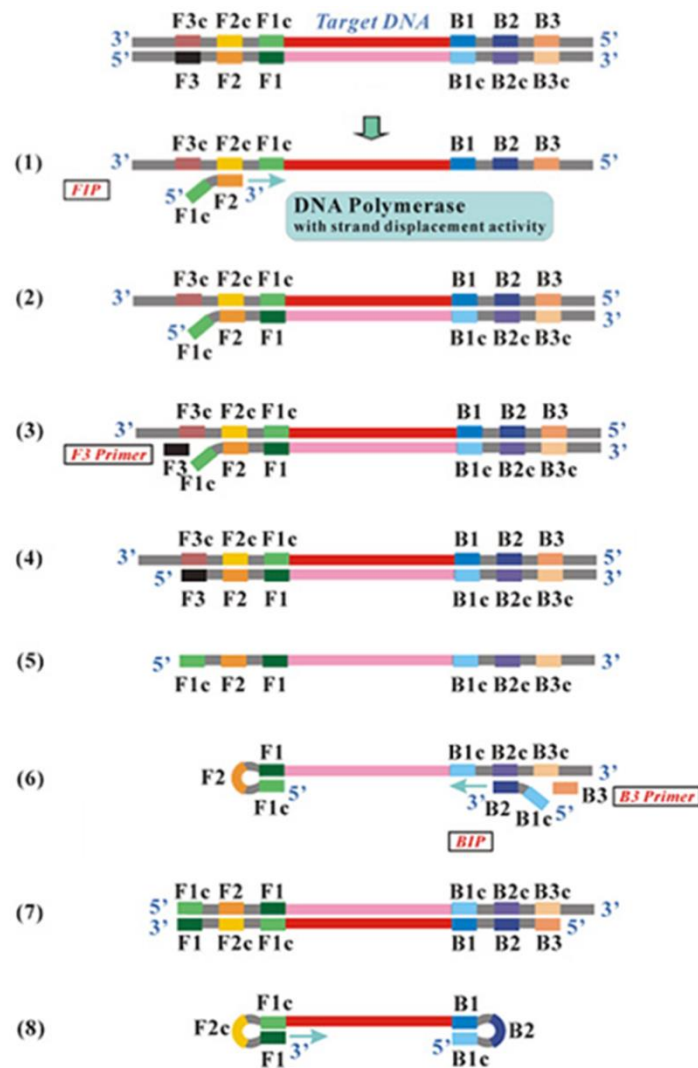
ขั้นตอนที่ 5 ขณะเดียวกันดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสต่อจากไพรเมอร์ FIP จะถูกแยกออกมาเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดังรูปที่ 2.2(5.) ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 5' เพราะมีลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง F1c กับ F1 ดังรูปที่ 2.2(6.)

ขั้นตอนที่ 6 ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีโครงสร้างห่วง (Stem-loop) อยู่ที่ปลายด้าน 5' จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบให้ไพรเมอร์ BIP เข้าจับเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งจะเป็นสายที่โครงสร้างเป็นห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 3' จากนั้นไพรเมอร์ B3 จะเข้ามาจับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณตำแหน่ง B3c ดังรูปที่ 2.2(6.) เพื่อแยกดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากไพรเมอร์ BIP ออกจากดีเอ็นเอต้นแบบ และสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นอีก

ขั้นตอนที่ 7 ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสต่อจากไพรเมอร์ B3 จะจับเข้ากับดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ดังรูปที่ 2.2(7.)

ขั้นตอนที่ 8 ขณะเดียวกันดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากไพรเมอร์ BIP จากขั้นตอนที่ 6 ที่หลุดแยกออกมาเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จะเกิดโครงสร้างห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 5' และ 3' เนื่องจากที่ปลายด้าน 5' มีลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง B1c กับ B1 เป็น F1 และที่ปลายด้าน 3' มีลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง F1c กับ F1 ทำให้ได้โครงสร้างห่วง (Stem-loop) ที่มีรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) ดังรูปที่ 2.2(8.)



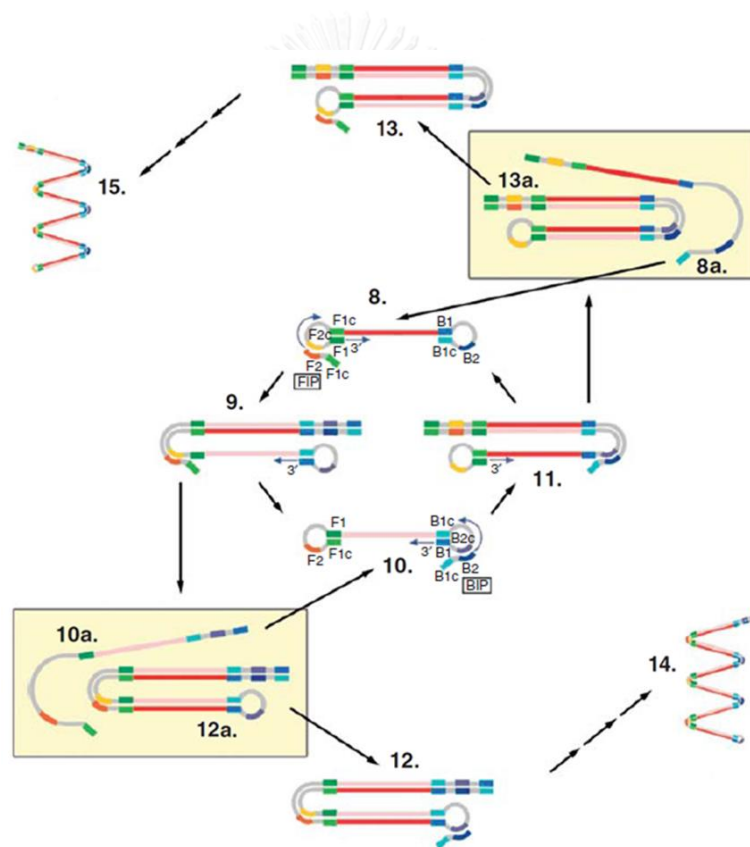


รูปที่ 2.2 แสดงขั้นตอน Starting structure producing (50)

## 2. ขั้นตอน Cycle amplification (9)

ในขั้นตอน Cycle amplification จะใช้ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วงรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวน โดยจะเกิดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เองต่อจากบริเวณตำแหน่ง F1 ทางด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบ (Self-primed strand displacement DNA synthesis) ในขณะเดียวกันไพรเมอร์ FIP จะเข้าจับกับตำแหน่ง F2c บริเวณโครงสร้างห่วงของดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บนดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วงเป็นรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) ต่อไปเรื่อยๆ จนถึงตำแหน่ง B1c ทำให้โครงสร้าง Stem-loop ทางด้านปลาย 5' ของดีเอ็นเอต้นแบบหลุดออก เพราะการจับคู่กันของลำดับเบสคู่สม

ระหว่างตำแหน่ง B1 ของดีเอ็นเอสายใหม่กับตำแหน่ง B1c ของดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นเอง (Self-primed strand displacement DNA) หลุดออกเป็นสายเดี่ยว แล้วเกิดโครงสร้างห่วงที่ด้าน Backward จากนั้นจะเกิดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เองต่อจากบริเวณตำแหน่ง B1 ทางด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบ (Self-primed strand displacement DNA synthesis) ตามในโครงสร้างที่ 9 และดีเอ็นเอสายนี้จะทำให้ดีเอ็นเอสายที่ต่อจากไพรเมอร์ FIP ในโครงสร้างที่ 9 หลุดออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวตามโครงสร้างที่ 10a ขณะเดียวกันก็จะทำให้เกิดดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วงเป็นรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) ตามโครงสร้างที่ 10 ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับโครงสร้างที่ 8 และโครงสร้างที่ 10 ก็จะให้เกิดดีเอ็นเอเอกลักษณ์แบบโครงสร้างที่ 8 เช่นกัน วนเวียนต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ ทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ยาวขึ้นหลายๆ Copies

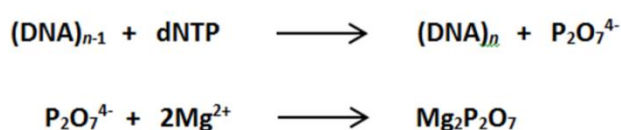


รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอน Cycle amplification (50)

## 2.5 วิธีการตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิค LAMP

### 2.5.1 การตรวจวัดจากความขุ่น

การตรวจวัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้น สามารถทำได้ในขั้นตอนเดียวกับการเกิดปฏิกิริยา ตามสมการปฏิกิริยาการเกิดตะกอนจากปฏิกิริยา LAMP ดังรูปที่ 2.4 เมื่อดิวอกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide; dNTP) มาต่อกัน ทำให้เกิดสารไพโรฟอสเฟต (Pyrophosphate;  $P_2O_7^{4-}$ ) ซึ่งสามารถจับกับแมกนีเซียมไอออน (Magnesium ion;  $Mg^{2+}$ ) กลายเป็นแมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟต (Magnesium pyrophosphate;  $Mg_2P_2O_7$ ) ซึ่งเป็นตะกอนสีขาวที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้น (4) โดยสาร Pyrophosphate ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา LAMP นั้นสามารถตรวจวัดได้เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส แตกต่างจากปฏิกิริยา PCR ที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ เพราะสาร Pyrophosphate สามารถกลายเป็นฟอสเฟตไอออน (Phosphate ion) ได้เมื่อถูกความร้อนสูง (51) ดังนั้นในปฏิกิริยา PCR สาร Pyrophosphate จึงถูกทำลายไปได้ในขั้นตอนการคลายเกลียวดีเอ็นเอ (Denaturation) ซึ่งใช้อุณหภูมิสูงถึง 95 องศาเซลเซียส แต่การตรวจวัดความขุ่นที่เกิดขึ้นจะสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า อาจต้องอาศัยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) หรือเมื่อปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นจนดีเอ็นเอมีปริมาณอย่างน้อย 10 ไมโครกรัมต่อสารละลายปริมาตร 25 ไมโครลิตร (4) หากจำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมีปริมาณไม่มากพอก็ต้องอาศัยเครื่องตรวจติดตามวัดความขุ่นแบบ Real-time โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density; O.D.) ที่ 600 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที (52)



รูปที่ 2.4 แสดงสมการปฏิกิริยาการเกิดตะกอนจากปฏิกิริยา LAMP (8)

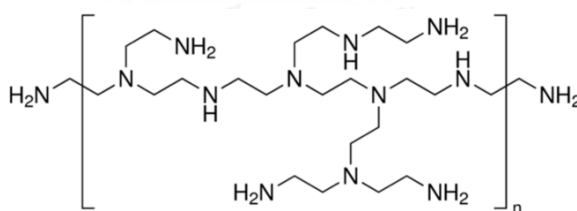
### 2.5.2 การตรวจวัดโดยอาศัยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

การตรวจวัดกรดนิวคลีอิกที่เพิ่มขึ้นจากเทคนิค LAMP (LAMP product) ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) จะให้แถบ (Band) หลายๆ ขนาด ลักษณะรูปแบบคล้ายขั้นบันได (Ladder-like patterns) ซึ่งต่างจากปฏิกิริยาของ PCR product ทั่วไปที่ให้เพียงแถบเดียว เนื่องจากในขั้นตอน Cycle amplification ทำให้ได้ขนาดของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแตกต่างกัน (53) การ

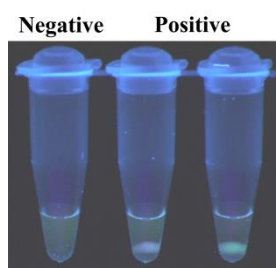
ตรวจวัดผลผลิต LAMP ด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานานในการตรวจวัด และต้องใช้เครื่องมือเฉพาะเพิ่มเติม นอกจากนี้ยังมีการใช้สารที่เป็นอันตรายอย่างสาร Ethidium bromide ร่วมด้วย

### 2.5.3 การตรวจวัดด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก (Cationic polymer)

การตรวจวัดด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นประจุบวก เช่น สาร Polyethyleneimine (PEI) ที่มีหมู่เอมีน (Imine group) เป็นประจุบวกดังแสดงในรูป 2.5 ซึ่งสามารถจับกับหมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) ของกรดนิวคลีอิกได้ (54) นอกจากนี้ความเข้มข้นของสาร PEI มีผลต่อการจับกับกรดนิวคลีอิก เนื่องจากในปฏิกิริยาต้องมีสาร PEI ที่เหมาะสมกับจำนวนกรดนิวคลีอิก เพื่อให้สารละลายมีประจุเป็นกลางจึงจะเกิดการตกตะกอน (55) ดังนั้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร PEI มากจะลดประสิทธิภาพในการจับกับกรดนิวคลีอิกลงได้ เพราะสารละลายจะมีประจุเป็นบวก จึงไม่เกิดการตกตะกอนระหว่างสาร PEI กับกรดนิวคลีอิก และพบว่าสาร PEI ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์สามารถจับกับกรดนิวคลีอิกและเกิดการตกตะกอนได้ดีที่สุด จึงนำมาใช้ในตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ที่เกิดขึ้น เพราะสาร PEI จะจับกับสารที่มีมวลโมเลกุลสูงอย่างผลผลิต LAMP ถึงจะเกิดสารขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ แต่จะไม่เกิดสารที่ไม่ละลายน้ำนี้ เมื่อจับกับสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำอย่างไพรเมอร์ในปฏิกิริยา เมื่อเติมสาร PEI หลังจากปฏิกิริยา LAMP เสร็จสิ้นแล้ว สารนี้จะจับกับผลผลิต LAMP และเมื่อนำมาปั่นเหวี่ยงจะพบตกตะกอนใสที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าดังรูปที่ 2.6 สาร PEI ไม่สามารถเติมก่อนการเกิดปฏิกิริยา LAMP ได้ เพราะจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (56)



รูปที่ 2.5 ภาพแสดงหมู่เอมีนของสาร Polyethyleneimine (PEI)

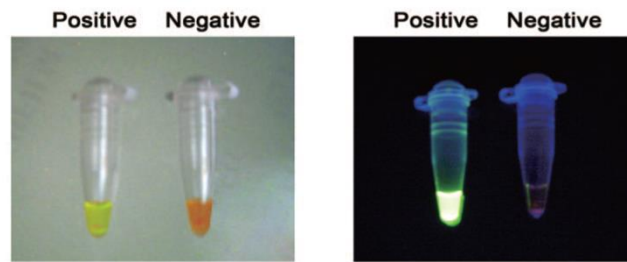


รูปที่ 2.6 แสดงภาพการใช้สาร PEI ตรวจวัดผลผลิต LAMP โดยสังเกตภายใต้แสง UV (56)

#### 2.5.4 การตรวจวัดจากสารเรืองแสง

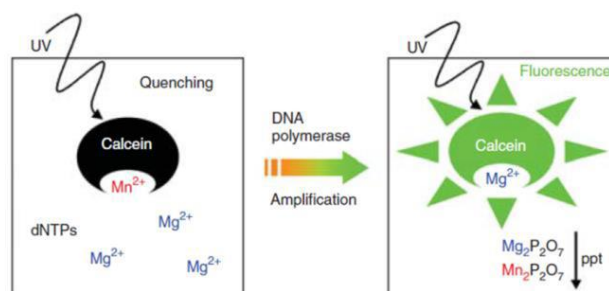
การตรวจวัดด้วยสารเรืองแสงอาศัยคุณสมบัติเมื่อสารเรืองแสงจับกับกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) จะกระตุ้นให้มีการดูดกลืนพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมแล้วปล่อยพลังงานแสงออกมาที่อีกความยาวคลื่นหนึ่ง ทำให้เกิดการเรืองแสง คุณสมบัตินี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ (57) สารเรืองแสงแต่ละชนิดจับกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างกัน ทำให้มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยงานวิจัยเกี่ยวกับเทคนิค LAMP จำนวนมากที่ใช้สารเรืองแสงในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (LAMP product) ได้แก่ 1.) สาร Ethidium bromide (58) โดยสารนี้จะจับระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอ นิยมนำมาใช้ย้อมสีดีเอ็นเอบนเจลมากกว่านำมาตรวจวัดดีเอ็นเอที่อยู่ในสารละลาย เนื่องจากต้องอาศัยเครื่องมือในการตรวจวัดสารนี้ เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) จึงต้องใช้อย่างระมัดระวัง 2.) สาร Acridine orange (6) ไม่จำเพาะต่อการตรวจวัด เพราะสามารถจับได้ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ 3.) สาร Hoechst 33258 (59, 60) จะจับกับร่องขนาดเล็ก (Minor groove) ของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่มีเบสอะดีนีน (Adenine; A) และเบสไทมีน (Thymine; T) เป็นจำนวนมาก นิยมใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) เพื่อตรวจติดตามปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอมากกว่า ซึ่งสารเรืองแสงที่กล่าวมานั้นให้ความแตกต่างของการเรืองแสงระหว่างก่อนกับหลังจับดีเอ็นเออย่างไม่ชัดเจน 4.) สาร SYBR Green I จะจับกับร่องขนาดเล็ก (Minor groove) ของดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งหมู่ฟอสเฟต (Phosphate groups) เป็นสารที่ให้ความแตกต่างชัดเจนเมื่อนำมาตรวจวัดดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) (57) สาร SYBR Green I ถูกกระตุ้นได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 494 นาโนเมตร แล้วปล่อยพลังงานแสงออกมาได้ดีที่ความยาวคลื่น 521 นาโนเมตร (61) สามารถนำมาตรวจวัดดีเอ็นเอที่อยู่ในสารละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวสูง และทำได้ง่าย (62) จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นโดยเทคนิค LAMP สาร SYBR Green I นั้นต้องเติมหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP แล้ว ถ้ามีผลผลิต LAMP เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้นคือสีส้ม (ผลลบ ; Negative) ให้กลายเป็นสีเขียว (ผลบวก ; Positive) เมื่อสังเกตภายใต้แสงยูวี (UV) ที่มีความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร หรืออาจสังเกตภายใต้แสงปกติ (5) ดังรูปที่ 2.7 แต่สาร SYBR Green I มีความไวสูงในการตรวจวัดกรดนิวคลีอิก หากเติมที่ความเข้มข้นที่ทำให้สังเกตการเรืองแสงได้ด้วยตาเปล่าลงในสารละลาย LAMP โดยตรงก่อนการเกิดปฏิกิริยาจะทำให้มีโอกาสไปยับยั้งปฏิกิริยา LAMP ได้ (8) จึงต้องเปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อเติมสาร ทำให้ผลผลิตมีโอกาสฟุ้งกระจายสูง เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย (53)



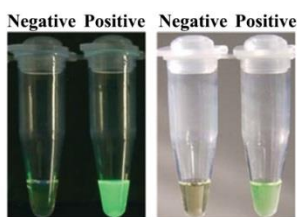


รูปที่ 2.7 แสดงภาพการใช้สาร SYBR Green I ตรวจสอบวัดผลผลิต LAMP โดยภาพถ่ายสั้กเกตภายใต้แสงปกติ และภาพขาวสั้กเกตภายใต้แสง UV (5)

ต่อมาได้มีการคิดค้นโดยใช้สาร Calcein แทน สารนี้เป็นสารเรืองแสงที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้โลหะไอออน ถูกกระตุ้นได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร แล้วปล่อยพลังงานแสงออกมาได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (61) เป็นสารที่มีราคาถูกกว่าสาร SYBR Green I และสามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ การต่อกันของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide; dNTP) ทำให้เกิดสารไพโรฟอสเฟต (Pyrophosphate;  $P_2O_7^{4-}$ ) ซึ่งจับได้ดีกับโลหะไอออน (Metal ions) และเมื่อจับกันจะกลายเป็นผลึกเกลือที่ไม่ละลายน้ำ ส่งผลให้ความเข้มข้นของโลหะไอออนในสารละลายลดลง (4) สาร Calcein ในสารละลาย LAMP ที่จับกับแมงกานีส (Manganese) จะถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการเรืองแสง ทำให้เห็นสารละลายเป็นสีส้ม (ผลลบ ; Negative) เมื่อเกิดปฏิกิริยา LAMP ขึ้น สาร Pyrophosphate ซึ่งจับกับแมงกานีสได้ดีกว่าแมงกานีสเทียม เกิดการดึงแมงกานีสออกจากสาร Calcein ทำให้สาร Calcein ไปจับกับแมงกานีสอิสระที่อยู่ในสารละลาย เกิดการเรืองแสงสีเขียว (ผลบวก ; Positive) (9) ตามหลักการดังรูปที่ 2.8 และสีที่เกิดขึ้นดังรูปที่ 2.9



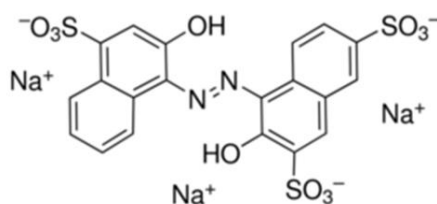
รูปที่ 2.8 แสดงหลักการการตรวจวัดผลผลิต LAMP ด้วยสาร Calcein (9)



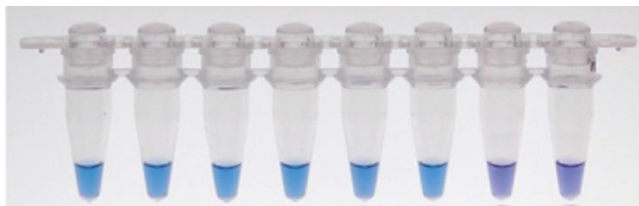
**รูปที่ 2.9** แสดงภาพการใช้สาร Calcein ตรวจวัดผลผลิต LAMP โดยภาพซ้ายสังเกตภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรและภาพขวาสังเกตภายใต้แสงปกติ (9)

### 2.5.5 การตรวจวัดจากการเปลี่ยนแปลงสีของตัวบ่งชี้ (Indicator)

ความไวในการเกิดปฏิกิริยา LAMP ทำให้ปฏิกิริยานี้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ดังนั้นจึงมีความพยายามคิดค้นวิธีการตรวจวัดผลผลิต LAMP ที่ลดโอกาสเกิดการปนเปื้อนให้ได้มากที่สุด โดยการเติมสารที่สามารถตรวจวัดผลผลิต LAMP ลงในสารละลาย LAMP ก่อนนำไปป้อนให้เกิดปฏิกิริยาด้วยการอาศัยตัวบ่งชี้โลหะไอออน (Metal ion indicator) ตัวอื่นนอกเหนือจากสาร Calcein ได้แก่ สาร Hydroxy naphthol blue (HNB) ซึ่งนำมาใช้ตรวจวัดสารแมกนีเซียมที่เปลี่ยนแปลงไปในปฏิกิริยา LAMP เนื่องจากประจุลบของกรดซัลโฟนิกของสาร HNB ดังแสดงในรูปที่ 2.10 สามารถจับได้กับประจุบวกของแมกนีเซียมในสารละลาย โดยสามารถเติมสารนี้ได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบปฏิกิริยา LAMP โดยในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีสีม่วง แต่ในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อเกิดการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ ทำให้แมกนีเซียมถูกใช้ไปตามสมการปฏิกิริยาการเกิดตะกอนจากปฏิกิริยา LAMP ดังรูปที่ 2.4 ส่งผลให้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในสารละลาย LAMP ลดลง สารแมกนีเซียมที่จับได้กับสาร HNB ในปฏิกิริยาลดลงด้วย จึงเห็นในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลบวก (มีดีเอ็นเอเป้าหมาย) เปลี่ยนเป็นสีฟ้า ซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ดีที่ 650 นาโนเมตร ถือว่าเป็นสารที่มีความไวที่ดีในการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ใกล้เคียงกับสาร SYBR Green I (10) แต่การเปลี่ยนแปลงสี HNB ของผลลบ (สีม่วง) และผลบวก (สีฟ้า) มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นอาจเกิดการแปลผลที่ผิดพลาดได้จากความแตกต่างของสีที่ไม่ชัดเจน (63)



**รูปที่ 2.10** ภาพแสดงประจุลบของสาร Hydroxynaphthol blue (HNB)

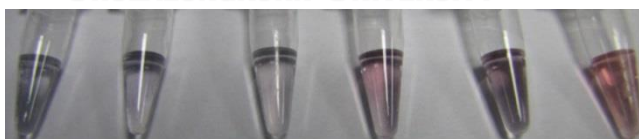


**รูปที่ 2.11** แสดงภาพการใช้สาร HNB ตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP โดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงเป็นสีฟ้าภายใต้แสงปกติ (10)

ต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้สารอื่นในการตรวจวัดผลผลิต LAMP เช่น สาร Malachite green เป็นสารที่มีประจุบวกสามารถจับกับกรดนิวคลีอิกได้บริเวณหมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) สามารถเติมลงในสารละลาย LAMP ก่อนนำไปต้มให้เกิดปฏิกิริยาได้ และเมื่อเกิดผลผลิต LAMP ขึ้น จะสังเกตเห็นสารละลาย LAMP เปลี่ยนจากสารไม่มีสีเป็นสีฟ้าหรือสีเขียวอ่อนดังรูปที่ 2.12 (64) นอกจากนี้ยังมีการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) ติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ (Gold nanoparticle; AuNP) เมื่อเกิดปฏิกิริยา LAMP ขึ้นจะทำให้เกิดเกาะกลุ่มของอนุภาคทองคำ (Aggregation) จึงเห็นการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือสีฟ้าดังรูปที่ 2.13 (65)



**รูปที่ 2.12** แสดงภาพการใช้สาร Malachite green ตรวจวัดผลผลิต LAMP โดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากไม่มีสีเป็นสีฟ้าหรือสีเขียวอ่อนภายใต้แสงปกติ (64)



**รูปที่ 2.13** แสดงภาพการใช้อนุภาคทองคำตรวจวัดผลผลิต LAMP โดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือสีฟ้าภายใต้แสงปกติ (65)

#### 2.5.6 การตรวจวัดจากหลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี (Immunoassays)

การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP โดยอาศัยหลักการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้กับชุดตรวจแบบ Lateral flow test (LFT) strip โดยการติดฉลาก เช่น Biotin และ Fluorescein isothiocyanate (FITC) ไว้ที่ไพรเมอร์และดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) เมื่อเกิดปฏิกิริยา LAMP ขึ้น ผลผลิต LAMP ที่มีดีเอ็นเอตรวจสอบติดอยู่ด้วยจะไปจับกับแอนติบอดีของดี

เอ็นเอตรวจสอบซึ่งมีฉลากสีติดอยู่ ทำให้เห็นแถบสีเกิดขึ้นที่ชุดตรวจ (21) การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยหลักการนี้มีความจำเพาะ และความไวในการตรวจวัด นอกจากนี้วิธีการใช้งานและการแปลผลนั้นทำได้ง่าย จึงเป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาเป็นชุดตรวจวิเคราะห์ที่สามารถทราบผลได้ทันที (Point-of-Care Testing: POCT)

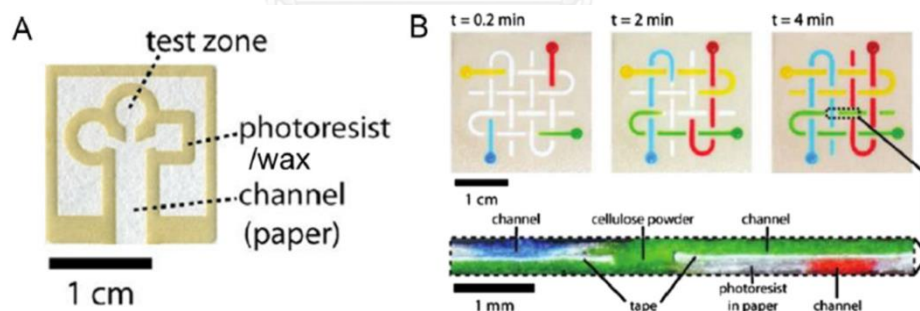
## 2.6 กระดาษและประโยชน์ของกระดาษ

ในปัจจุบันมีการนำหลักการระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system) มาประยุกต์บนกระดาษ เพื่อใช้เป็นห้องปฏิบัติการบนกระดาษ (Lab-on-paper) ที่สามารถทราบผลได้ทันทีและพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based devices; PADs) ให้สามารถตรวจหาสารต่างๆ บนกระดาษแผ่นเล็กๆ ได้ เนื่องจากกระดาษมีคุณสมบัติในการดูดซับสารละลาย ทำให้สารละลายสามารถไหลผ่านตามโครงสร้างรูพรุนของกระดาษได้โดยอาศัยแรงดึงตามรูเล็ก (Capillary force) โดยไม่ต้องอาศัยแรงดึงจากภายนอก (23) ทำให้กระดาษสามารถกรอง ขนส่ง และตรึงสารไว้ทำปฏิกิริยาภายหลังได้ ขณะเดียวกันก็ควบคุมอัตราการไหลของสารได้ นอกจากนี้ยังสามารถกำหนดปริมาตรและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา และสามารถประยุกต์ขั้นตอนการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้หลากหลายอีกด้วย (66) กระดาษยังเป็นวัสดุที่มีพื้นผิวเรียบเหมาะแก่การใช้เป็นพื้นที่ในการทำปฏิกิริยาของสาร มีขนาดเล็ก บาง ทำให้ประหยัดพื้นที่ในการเก็บรักษา ผลิตมาจากเซลลูโลส ซึ่งไม่มีสารที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาการทดสอบ สีขาวของกระดาษยังช่วยทำให้เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนเมื่อเกิดสีหรือมีการเปลี่ยนแปลงของสี และกระดาษสามารถติดไฟได้ ทำให้ง่ายต่อการทำลายจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (21) กระดาษยังมีราคาถูก หาใช้ได้ง่าย จึงเหมาะกับงานภาคสนาม หรือประเทศที่กำลังพัฒนา (67) นอกจากนี้อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (PADs) สามารถตรึงน้ำยาบนกระดาษแล้วเก็บไว้ใช้ทดสอบทีหลังได้ เนื่องจากกระดาษสามารถคงสภาพน้ำยาที่แห้งแล้ว ณ อุณหภูมิที่เก็บกระดาษที่ตรึงน้ำยาไว้ (68) โดยกระดาษที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ เช่น ไยแก้ว (Glass fiber) และพอลิเอสเตอร์ เป็นต้น จะสามารถจับกับโมเลกุลของสารได้ดีกว่า สารสามารถเคลื่อนที่และเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่ากระดาษที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (26) ส่งผลให้กระดาษที่มีรูพรุนขนาดใหญ่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ที่ต้องอาศัยการไหลแบบ Lateral บนกระดาษ

## 2.7 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based devices; PADs)

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (PADs) ได้รับการพัฒนาเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบ 2 มิติ (2D PADs) และแบบ 3 มิติ (3D PADs) ดังรูปที่ 2.14 ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปแบบของกระดาษที่ถูกออกแบบ โดย PADs แบบ 2 มิติจะเป็นการสร้างขอบเขตในการทดสอบปฏิกิริยาของสารต่างๆ บนกระดาษ ซึ่ง

เกิดจากการสร้างแบบให้มีพื้นที่ส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เพื่อให้ส่วนที่ชอบน้ำสามารถใช้เป็นพื้นที่ในการเกิดปฏิกิริยาตรวจวัด และอ่านผลได้ (69) เนื่องจากส่วนนี้จะยอมให้สารละลายเคลื่อนที่หรือไหลไปตามท่อที่สร้างขึ้นบนกระดาษด้วยแรงดึงตามรูเล็ก (Capillary force) ได้ ซึ่งความสามารถในการไหลของสารละลายบนกระดาษนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของกระดาษซึ่งมีรูพรุนแตกต่างกันและความกว้างของพื้นที่ส่วนชอบน้ำ ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับสถานะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และความชื้นด้วย (22) โดยเทคนิคการสร้างขอบเขตพื้นที่สำหรับการเกิดปฏิกิริยาที่ต้องการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ เช่น เทคนิคพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) (23) การพิมพ์ลายโดยใช้วัสดุพอลิเมอร์ เช่น สาร Polydimethylsiloxane (PDMS) (70) การตัดกระดาษ (Paper cutting) (71) การพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ (Ink jet printing) (72) การพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (Wax printing) (31) การสกรีนด้วยขี้ผึ้ง (Wax screen printing) และการจุ่มกระดาษลงในสารละลายขี้ผึ้ง (Wax dipping) (73) เป็นต้น ส่วน PADs แบบ 3 มิติเกิดจากกระดาษที่พับซ้อนกัน โดยให้พื้นที่ส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) แต่ละชั้นของกระดาษเชื่อมต่อกัน โดยใช้เทปกาวสองหน้าช่วยยึดกระดาษบริเวณพื้นที่ส่วนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) แต่ละชั้นให้ติดกัน ให้เกิดโครงสร้างรูพรุนของกระดาษในพื้นที่ส่วนที่ชอบน้ำเชื่อมต่อกันทั้งหมด ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ทำปฏิกิริยาให้กับ PADs ซึ่งในแต่ละชั้นของ PADs แบบ 3 มิติอาจใช้กระดาษที่แตกต่างกันตามจุดประสงค์ของการใช้งาน แต่ละส่วนยังคงรวมตัวเป็นส่วนเดียวกันอยู่ภายใต้ PADs เดียวกัน (22)



รูปที่ 2.14 แสดงรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (PADs)

โดยภาพ A เป็น PADs แบบ 2 มิติและภาพ B เป็น PADs แบบ 3 มิติ (67)

## 2.8 ตัวอย่างกลไกการตรวจวัดบนกระดาษ

การตรวจวัดหลากหลายปฏิกิริยาถูกนำมาประยุกต์ใช้กับ PADs ได้แก่ 1.) ปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงเป็นปฏิกิริยาที่นิยมมาประยุกต์ใช้เป็นอย่างมาก เช่น ปฏิกิริยาระหว่างกรด-เบส ตัวอย่างคือ ชุดตรวจวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) จะ

เปลี่ยนแปลงสีแตกต่างกันในสภาวะกรดและเบส โดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) ในสารละลาย, ปฏิกริยาการตกตะกอน (Precipitation) หรือปฏิกริยาการเกาะกลุ่ม (Aggregation) และปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เช่น การตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสบนกระดาษกรองโครมาโทกราฟี โดยอาศัยเอนไซม์ Glucose oxidase (GOx) ตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในสิ่งตัวอย่าง และใช้เอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) เปลี่ยนสาร 2,4,6-Tribromo-3-hydroxy benzoic acid (TBHBA) และสาร 4-Aminoantipyrine (4-AAP) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีแดงขึ้นบนชุดตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ (74) เป็นต้น 2.) ปฏิกริยาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ตัวอย่างเช่น ชุดตรวจการตั้งครรภ์ที่ตรวจวัดฮอร์โมน Human Chorionic Gonadotropin (hCG) ในปัสสาวะ โดยอาศัยแอนติบอดีต่อฮอร์โมนชนิดนี้ซึ่งติดด้วยฉลากสี เมื่อมีแอนติเจนคือฮอร์โมน hCG ในปฏิกริยา จะสังเกตเห็นแถบสีปรากฏขึ้นได้ 3.) ปฏิกริยาของเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) เช่น การตรวจวัดปริมาณคอเรสเตอรอลโดยใช้ขั้วชนิดแกรฟีนประยุกต์ที่ผลิตขึ้นมา (Graphene/ Polyvinylpyrrolidone/ Polyaniline nanocomposite) ซึ่งอาศัยหลักการทางเคมีไฟฟ้า ชนิดแอมเพอโรเมทรี (Amperometry) เพื่อติดตามปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่เกิดขึ้นในปฏิกริยา ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของคอเรสเตอรอล (75) 4.) ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับกรดนิวคลีอิก เช่น การตรวจหาตัวตรวจวัดบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบ 3 มิติ (3D PAD) โดยอาศัยหลักการจับคู่เบสกันอย่างจำเพาะ (Hybridization) ระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงกับดีเอ็นเอเป้าหมายในสารที่ต้องการตรวจวัด โดยความเข้มข้นของตัวตรวจวัดเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของการเรืองแสงที่เกิดขึ้นบนกระดาษ (76)

## 2.9 การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษ

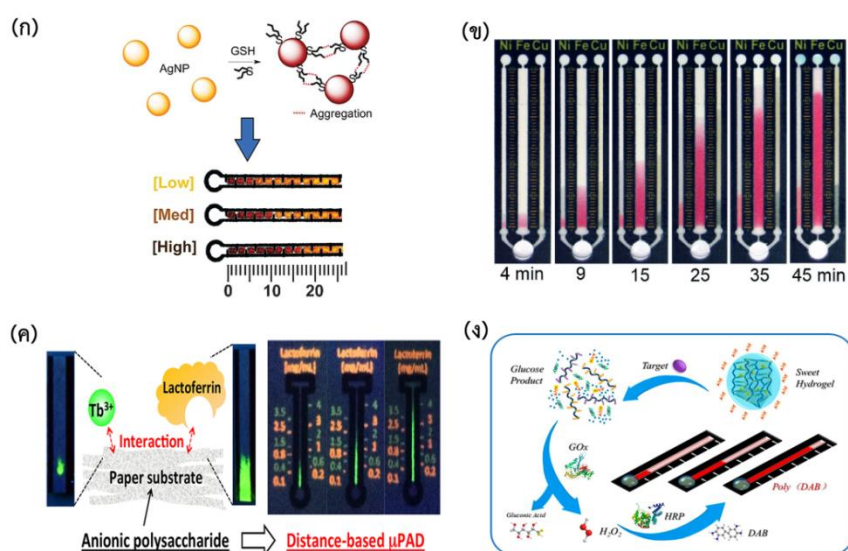
การตรวจวัดปฏิกริยาโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นบน PADs แบ่งเป็น 2 แบบหลักๆ คือ 1.) แบบเชิงคุณภาพ (Qualitative) เช่น สังเกตการปรากฏของสีบนกระดาษด้วยตาเปล่า ซึ่งสามารถอ่านผลการทดสอบได้เป็นผลลบ (Negative) หมายถึงไม่เกิดปฏิกริยาและผลบวก (Positive) หมายถึงเกิดปฏิกริยา เป็นต้น 2.) แบบเชิงปริมาณ (Quantitative) จะอาศัยการประมาณค่าสีที่ปรากฏในบริเวณพื้นที่ทดสอบ ซึ่งสะท้อนถึงตัวตรวจวัด (Analyte) ในปฏิกริยาที่เกิดขึ้น โดยการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นกับค่าแปลผลที่กำหนดไว้ (77) โดยบันทึกภาพจากกล้องถ่ายรูปหรือเครื่องสแกน เพื่อวิเคราะห์ความเข้มของสี (Intensity) ที่เกิดขึ้นกับค่าแปลผลมาตรฐานที่กำหนดไว้ เนื่องจากความเข้มสีดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งความสัมพันธ์นั้นจะอยู่ในรูปแบบสมการ  $y = a \ln (bx)$  เป็นความสัมพันธ์เชิงลอการิทึม (Logarithm) เพราะ ณ ความเข้มข้นหนึ่งของตัวตรวจวัด โดยเฉพาะความเข้มข้นสูง ค่าความเข้มของสีจะไม่เกิดการ

เปลี่ยนแปลงอีกเพราะเป็นจุดอ้อมตัวของสีที่เกิดขึ้น (78) การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้นนี้ เป็นวิธีการตรวจวัดที่ทำได้ง่าย อาศัยอุปกรณ์เครื่องมือที่หาได้ง่ายไม่ยุ่งยาก เช่น กล้องถ่ายรูป แต่การตรวจวิเคราะห์ความเข้มสีนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพของภาพ แสงจากสภาพแวดล้อมขณะบันทึกภาพ และการกำหนดจุดโฟกัสในแต่ละครั้งของการถ่ายภาพ (22) ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจแบบวัดระยะทาง (Distance-based detection) ในการไหลของสารในปฏิกิริยาที่สังเกตการเกิดสีบนพื้นที่ทดสอบซึ่งมีลักษณะเป็นท่อยาว เพื่อให้สามารถวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวตรวจวัดที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยาบนพื้นที่ทดสอบจนเกิดการตกตะกอนขึ้น โดยระยะทางการเคลื่อนที่ของการตกตะกอนขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวตรวจวัดในสารตัวอย่าง (29)

## 2.10 ตัวอย่างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (Distance-based paper analytical devices; dPADs)

ในปัจจุบันอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (dPADs) ได้รับการพัฒนาให้ตรวจวัดสารต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่างได้ เช่น การตรวจวัดหาปริมาณของกลูต้าไธโอนบนกระดาษโดย Cate และคณะ (29) โดยวัดระยะทางในการเคลื่อนที่ของกลูต้าไธโอนที่จับกับอนุภาคเงินระดับนาโนเมตร ปริมาณกลูต้าไธโอนที่แตกต่างกันจะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับอนุภาคเงินระดับนาโนเมตรมากขึ้นตามสัดส่วนความเข้มข้น ส่งผลให้ระยะการเคลื่อนที่ของสารมีความแตกต่างกันไป หากมีปริมาณกลูต้าไธโอนมาก ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับอนุภาคเงินระดับนาโนได้มาก ระยะเคลื่อนที่จะยาวกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณกลูต้าไธโอนน้อย ดังรูปที่ 2.15(ก) นอกจากนี้ Cate และคณะ (28) ได้มีการพัฒนาการตรวจวัดหาปริมาณโลหะเหล็ก ทองแดง และนิกเกิลบนกระดาษอีกด้วย โดยสามารถตรวจหาปริมาณของโลหะทั้งสามชนิดภายในการตรวจเพียงครั้งเดียว ซึ่งระยะการเคลื่อนที่ของสีที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนตามความเข้มข้นของโลหะทั้งสามชนิดดังกล่าว ดังรูปที่ 2.15(ข) ต่อมา Yamada และคณะ (79) ได้พัฒนาการตรวจวัดหาปริมาณแลคโตเฟอริน (Lactoferrin) ในน้ำตา โดยอาศัยการจับกับโลหะเทอร์เบียม (Terbium) บนกระดาษ เมื่อเกิดการจับกันระหว่างสารแลคโตเฟอรินกับโลหะเทอร์เบียมจะเกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นภายใต้สภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม ซึ่งระยะการเคลื่อนที่ของการเรืองแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนตามความเข้มข้นของแลคโตเฟอริน ดังรูปที่ 2.15(ค) นอกจากนี้ Wei และคณะ (80) ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทางโดยอาศัยสารไฮโดรเจล (Hydrogel) ซึ่งบรรจุเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาตรวจวัด (Microfluidic distance readout sweet hydrogel integrated paper-based analytical device;  $\mu$ DiSH-PAD) ชุดตรวจดังกล่าวได้อาศัยแอปตาเมอร์ (Aptamers) ที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการตรวจ เช่น โคเคน (Cocaine) เป็นต้น เมื่อในสิ่งตัวอย่างมีสารที่จำเพาะจะทำให้ไฮโดรเจลซึ่ง

เป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งแตกออกแล้วปล่อยเอนไซม์จำนวนหนึ่งที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกลูโซ่ เพื่อเพิ่มสัญญาณการตรวจวัดและทำให้เกิดแถบสีที่สามารถตรวจวัดได้บนชุดตรวจ ดังรูปที่ 2.15(ง) โดยระยะการเคลื่อนที่ของสีที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนตามความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่จำเพาะต่อแอนติบอดี

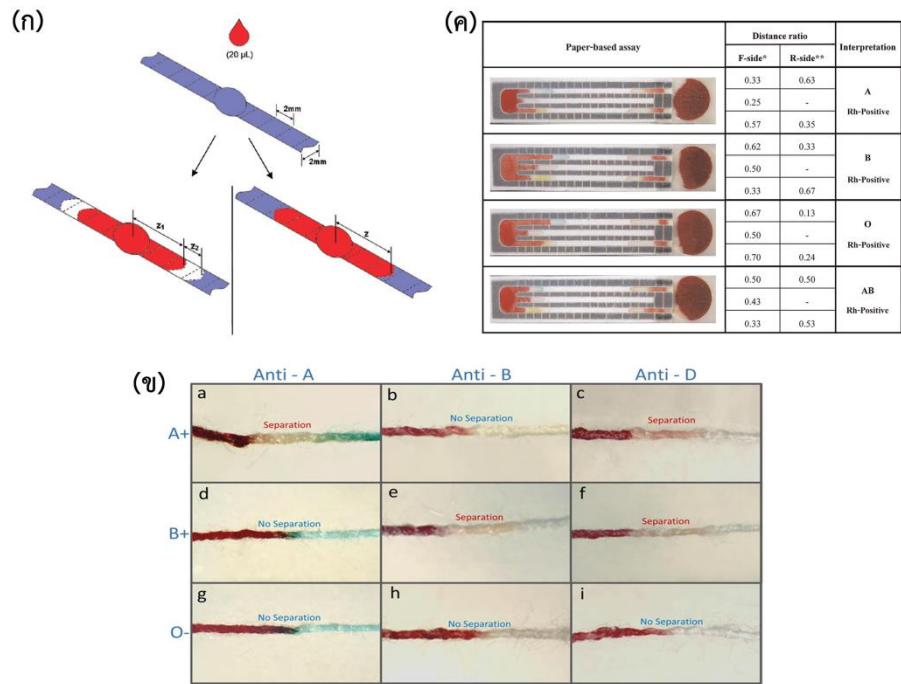


รูปที่ 2.15 รูปแสดงการตรวจวัดสารต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่าง ด้วยเทคนิคการตรวจแบบวัดระยะทาง (ก) การตรวจวัดหาปริมาณของกลูต้าไธโอน (27) (ข) การตรวจวัดหาปริมาณโลหะเหล็ก ทองแดง และนิกเกิลภายในการตรวจเพียงครั้งเดียว (26) (ค) การตรวจวัดหาปริมาณแลคโตเฟอริน (Lactoferrin) ในน้ำตา (79) และ (ง) การตรวจวัดหาปริมาณโคเคนโดยอาศัยสารไฮโดรเจล (80)

### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้เทคนิคการตรวจแบบวัดระยะทางยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาหมู่เลือด โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกลุ่มกันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดีบนกระดาษกรอง และอ่านผลจากการเคลื่อนที่สีของเม็ดเลือดแดงที่ไหลไปบนกระดาษที่ผ่านการตรึงน้ำยาแอนติบอดีแล้ว ดังรูปที่ 2.16(ก) (81) ต่อมา Ballerini และคณะใช้เทคนิคการตรวจแบบวัดระยะทางตรวจหาหมู่เลือดบนวัสดุที่หาได้ง่ายและราคาถูก อย่างเช่น เส้นด้าย (Thread) ที่มีส่วนผสมของเซลลูโลส (Cellulose) และโพลีเอสเตอร์ (Polyester) มาใช้ในการตรวจ โดยแปลผลจากความยาวของซีรัมที่เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าเมื่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับน้ำยาแอนติบอดีที่จำเพาะนั้นๆ ดังรูปที่ 2.16(ข) (82) ยิ่งไปกว่านั้น Noiphung และคณะได้พัฒนาการตรวจหมู่เลือด Rh และ ABO แบบ Cell grouping และ Serum grouping ภายในชุดตรวจเดียวกัน โดยแปลผลจากอัตราส่วนของระยะทางการเคลื่อนที่ระหว่างเม็ดเลือดแดงที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยาแอนติบอดี และซีรัมที่เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า ดังรูปที่ 2.16(ค) (83)





รูปที่ 2.16 แสดงรูปการตรวจหาหมู่เลือดด้วยเทคนิคการตรวจแบบวัดระยะทาง (ก) หลักการตรวจหมู่เลือดบนกระดาษ (81) (ข) ภาพการตรวจหมู่เลือดบนเส้นด้าย (82) และ (ค) ภาพการตรวจหมู่เลือด Rh และ ABO ภายในชุดตรวจเดียวกัน (83)

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Dry thermal block)	Major Science, USA
2.	เครื่องให้ความร้อน (Hotplate)	IKA® C-MAG HS7, China
3.	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโน	Thermo scientific, USA
4.	เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า	Mupid, Japan
5.	เครื่องวิเคราะห์ภาพเจล	Syngene, USA
6.	เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง (Exicycler™ 96 Real-Time)	Bioneer, Korea
7.	เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก	Bio-Active Co., Ltd., Thailand
8.	เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง	Beckman Coulter Inc.
9.	ตู้อบเลี้ยงเชื้อ	Memmert GmbH,
10.	ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HVP-50	Hiclave™, Japan
11.	เครื่องชั่งสาร	Mettler-Toledo International Inc., Thailand
12.	เครื่องผลิตน้ำ Milli-Q	Millipore, USA
13.	เครื่องผสมสาร (Vortex)	Scientific Industries, USA
14.	เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH)	Thermal Scientific, USA

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
15.	เครื่องปริ้นพร้อมหมึกพิมพ์ชนิดแก้วึกซ์ (Xerox ColorQube 8570)	Fuji Xerox Co., Ltd., Japan
16.	เครื่องสแกนเอกสาร (Epson expression ME-301)	Epson Co., Ltd., Thailand

ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	กระดาษกรอง Whatman No.1, 113 และ 4	GE Healthcare, UK
2.	เทปใสและเทปกาว 2 หน้า	ร้านศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ประเทศไทย
3.	Microcentrifuge tube (1.5 mL)	Axygen® Scientific, USA
4.	PCR tube strips (0.2 mL)	Scientific Specialties, Inc., USA
5.	Auto pipette	Gilson, Inc.,USA
6.	Pipette tip (10, 200, 1000 µL)	Gilson, Inc.,USA
7.	Filter tip (10, 20, 100 µl)	Nest Biotechnology Co., Ltd., China
8.	Serological pipette	HBG Henneberg-Sander GmbH, Germany
9..	Glassware ได้แก่ beaker, cylinder	PYREX, USA
10.	ขวดใส่สารเคมี	CHOTT DURAN®, Germany

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	น้ำยาและสารเคมี	การใช้งาน	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922™	เชื้อตัวอย่างในการทดสอบ	Microbiologics, Inc., USA
2.	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC®12453™	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	Microbiologics, Inc., USA
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC®29212™	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	Microbiologics, Inc., USA
4.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	ภาควิชาเวชศาสตร์การ ธนาคารเลือดและจุล ชีววิทยาคลินิก คณะสห เวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
5.	<i>Citrobacter freundii</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	
6.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	มหาวิทยาลัย
8.	<i>Serratia marcescens</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	น้ำยาและสารเคมี	การใช้งาน	บริษัทและประเทศที่ผลิต
9.	<i>Staphylococcus aureus</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	ภาควิชาเวชศาสตร์การ ธนาคารเลือดและจุล
10.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	เชื้อในการทดสอบ ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP	ชีวิวิทยาคลินิก คณะสห เวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
11.	Blood agar	อาหารเลี้ยงเชื้อ	
12.	Agar A	สารที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยง เชื้อ	Bio Basic Canad Inc., Canada
13.	Yeast Extract	สารที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยง เชื้อ	Bio Basic Canad Inc., Canada
14.	Tryptone powder	สารที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยง เชื้อ	Bio Basic Canad Inc., Canada
15.	Sodium chloride	สารที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยง เชื้อ	Sigma-Aldrich, USA
16.	Tryptone soya agar plate	อาหารเลี้ยงเชื้อ	Oxoid Limited, UK
17.	Wizard® Genomic DNA Purification Kit	สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ ตัวอย่าง	Promega Co., Ltd., USA
18.	Primer	สารตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP	Integrated DNA Technologies, Singapore

ตารางที่ 3.3 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	น้ำยาและสารเคมี	การใช้งาน	บริษัทและประเทศที่ผลิต
19.	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set	สารตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP	Thermo Scientific, USA
20.	<i>Bst</i> 2.0 WarmStart® DNA polymerase	เอนไซม์ใช้ในปฏิกิริยา LAMP	New England Biolabs Inc., USA
21.	Betaine และ MgSO <sub>4</sub>	สารที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP	Sigma-Aldrich, USA
22.	SYBR Green I	สารตรวจวัดในปฏิกิริยา Real-time LAMP	Invitrogen, USA
23.	Hydroxynaphthol blue (HNB)	สารตรวจวัดที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP	Sigma-Aldrich, USA
24.	Branched polyethylenimine (PEI)	สารตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้บนชุดตรวจกระดาษ	Sigma-Aldrich, USA
25.	Agarose	สารที่ใช้เป็นเจลเพื่อทำ electrophoresis	
26.	GeneRuler 100 bp DNA Ladder	ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับทำ electrophoresis	Thermo Scientific, USA

## 3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

### 3.2.1 การเพาะเลี้ยงและสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ

เชื้อ *Escherichia coli* ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอตัวอย่างในการทำปฏิกิริยา LAMP เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Luria-Bertani (LB) และบ่มข้ามคืน (18 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเพาะเลี้ยงหนึ่งโคโลนี (Colony) จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด LB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มข้ามคืน (18 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification ก่อนตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโน (NanoDrop™ spectrophotometer) โดยคุณภาพของดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบได้ต้องมีอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 เพื่อแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนในสารสกัดปริมาณน้อย และอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/230 นาโนเมตรอยู่ในช่วงประมาณ 2.0-2.2 เพื่อแสดงว่าสารสกัดมีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์และสารที่มีอะโรมาติกปริมาณน้อย เช่น สารไอโซโพรพานอล (Isopropanol) และสารเอทานอล (Ethanol) จากขั้นตอนการตกตะกอนและล้างดีเอ็นเอ จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยนำค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้มาคำนวณหาจำนวนชุดของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Number of copies} = \frac{\text{Amount of DNA} \times \text{Avogadro's number}}{\text{Length of genome} \times \text{Average weight of a base pair}}$$

(copies  $\mu\text{L}^{-1}$ )

โดย Amount of DNA หมายถึง ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่วัดได้ หน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร

Avogadro's number หมายถึง จำนวนอะตอมของธาตุคาร์บอน

มีค่าเท่ากับ  $6.022 \times 10^{23}$  โมเลกุลต่อโมล

Length of genome หมายถึง ความยาวของสารพันธุกรรมทั้งหมดในเชื้อ *E. coli* มี

ค่าประมาณ  $4.7 \times 10^6$  คู่เบส อ้างอิงตามใน GenBank

(NC\_000913.3)

Average weight of a base pair หมายถึง น้ำหนักเฉลี่ยของคู่เบส มีค่าเท่ากับ 650 กรัมต่อโมล

### 3.2.2 ปฏิบัติการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP

ปฏิบัติการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค LAMP นั้นมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 6 เส้น ได้แก่ Forward inner primer (FIP), Backward inner primer (BIP), Forward outer primer (F3 Primer), Backward outer primer (B3 Primer), Loop forward (LF) และ Loop backward (LB) ซึ่งแต่ละเส้นมีลำดับเบสดังตารางที่ 3.4 โดยจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ในช่วงยีน *malB* (6) ตำแหน่งลำดับเบสที่ 3204 ถึง 3407 เทียบใน GenBank (GDB J01648) ดังรูปที่ 3.1 โดยลำดับเบสบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของตำแหน่งโปรโมเตอร์ (Promoter) ของยีน *malB* ที่ถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจับและดูดซึมน้ำตาลมอลโทสเข้าเซลล์ (Maltose binding protein; MBP) (84)

ตารางที่ 3.4 แสดงลำดับเบสที่ใช้เป็นไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้น (6)

Primer	Sequence (5' - 3')	Bases
FIP	CATTTTGCAGCTGTACGCTCGCAGCCCATCATGAATGTTGCT	42
BIP	CTGGGGCGAGGTCGTGGTATTCCGACAAACACCACGAATT	40
F3	GCCATCTCCTGATGACGC	18
B3	ATTTACCGCAGCCAGACG	18
LF	CTTTGTAACAACCTGTCATCGACA	24
LB	ATCAATCTCGATATCCATGAAGGAG	25

Target	Sequence (5' to 3')	Bases
<i>E. coli</i>	<p><u>GCCATCTCCTGATGACGCATAGTCAGCCCATCATGAATGTTGCTGTCGAT</u>  F3 F2 Loop F</p> <p><u>GACAGGTTGTTACAAAGGGAGAAGGGCATGGCGAGCGTACAGCTGCAAAA</u>  Loop F F1</p> <p><u>TGTAACGAAAGCCTGGGGCGAGGTCGTGGTATCGAAAGATATCAATCTCGA</u>  B1 Loop B</p> <p><u>TATCCATGAAGGTG*AATTCGTGGTGGTGGTTCGGACCGTCTGGCTGCGGT</u>  Loop B B2 B3</p> <p><u>AAAT</u>  B3</p>	204

รูปที่ 3.1 ภาพแสดงลำดับเบสดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อ *E. coli* (6)



โดยทดสอบสารละลาย LAMP reaction 25 ไมโครลิตรในหลอดพีซีอาร์ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8.8) 20 มิลลิโมลาร์, KCl 50 มิลลิโมลาร์,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 มิลลิโมลาร์, Tween® 20 1 เปอร์เซ็นต์,  $\text{MgSO}_4$  8 มิลลิโมลาร์, Betaine 0.8 โมลาร์, dNTPs 1.4 ไมโครโมลาร์, ไพรมเมอร์ FIP และ BIP อย่างละ 1.6 ไมโครโมลาร์, ไพรมเมอร์ F3 และ B3 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, ไพรมเมอร์ LF และ LB อย่างละ 0.8 ไมโครโมลาร์, สาร HNB 0.24 มิลลิโมลาร์, *Bst* DNA polymerase 8 units และใส่ดีเอ็นเอตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Dry thermal block) เป็นเวลา 30 นาที โดยทุกการทดสอบปฏิกิริยาผลลบ (Negative reaction) จะไม่ใส่ดีเอ็นเอตัวอย่าง และปฏิกิริยาผลบวก (Positive reaction) จะมีดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ในสารละลาย LAMP

### 3.2.3 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของไพรมเมอร์ที่เลือกใช้ต่อเชื้อ *E. coli*

เชื้อที่จะใช้ทดสอบความจำเพาะของไพรมเมอร์ที่เลือกใช้ต่อเชื้อตัวอย่าง *E. coli* ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Proteus mirabilis*, เชื้อ *Acinetobacter baumannii*, เชื้อ *Citrobacter freundii*, เชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Serratia marcescens* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Tryptone soya (TSA) และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus*, เชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Tryptone soya (TSA) และเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Blood และบ่มข้ามคืน (18 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเพาะเลี้ยงหนึ่งโคโลนี (Colony) จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มข้ามคืน (18 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification ก่อนตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโน (NanoDrop™ spectrophotometer) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อเหล่านี้ไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP หลังบ่มปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้วให้ตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ปริมาตร 2 ไมโครลิตรด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สี Ethidium bromide ย้อมดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมา (LAMP product) และใช้บัฟเฟอร์ 1X TAE ทำภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 20 นาที แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล

### 3.2.4 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP

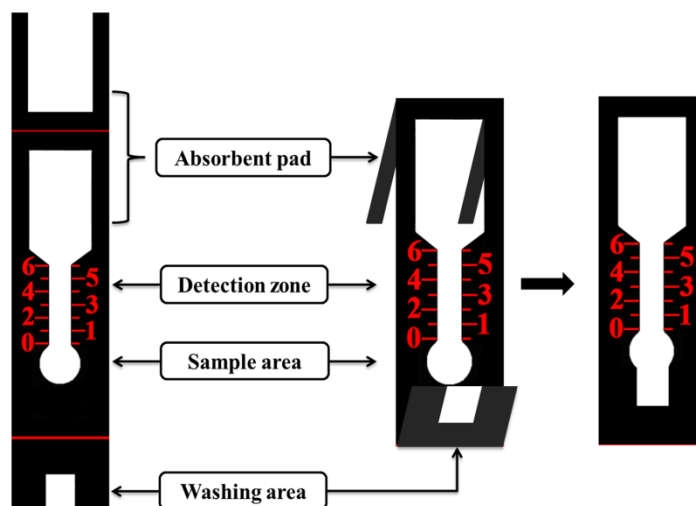
ทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ที่สกัดได้มาวัดหาความเข้มข้นตั้งต้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโน (NanoDrop™ spectrophotometer) แล้วทำการเจือจางความเข้มข้นเป็นสิบเท่า (10-fold serial dilution) แล้วนำดีเอ็นเอนั้นมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค LAMP ในงานวิจัยนี้ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 0,  $3.94 \times 10^3$ ,  $3.94 \times 10^4$ ,  $3.94 \times 10^5$ ,  $3.94 \times 10^6$  และ  $3.94 \times 10^7$  สำเนาต่อไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ HNB ภายในหลอดทดลองที่ใส่ไปตั้งแต่ต้นก่อนการเกิดปฏิกิริยา และวิธี 2% Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP จากปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นความเข้มข้นน้อยที่สุดของแต่ละวิธี

### 3.2.5 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP

1.) การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทางการเคลื่อนที่ (dPADs) ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP

ขั้นตอนการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP แบบวัดระยะทางการเคลื่อนที่ (Distance-based paper-based analytical devices; dPADs) ที่ใช้ในวิจัยนี้ออกแบบด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 เพื่อกำหนดรูปแบบและขนาดของพื้นที่ในการตรวจวัดดังรูปที่ 3.2 ซึ่งประกอบด้วยส่วนของแผ่นดูดซับ (Absorbent pad) รูปสี่เหลี่ยม 2 ส่วน ขนาดส่วนละ  $10 \times 17$  มิลลิเมตร เป็นพื้นที่สำหรับการดูดซับสาร, ส่วนตรวจวัด (Detection zone) ลักษณะเป็นท่อนขนาด  $1.5 \times 12$  มิลลิเมตร มีหมายเลข 0-6 กำกับข้างท่อนซึ่งแต่ละหมายเลขมีระยะห่างกัน 2 มิลลิเมตร รวมเป็นระยะทางทั้งหมด 12 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นพื้นที่สำหรับการตรวจวัดการเคลื่อนที่ของสีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า, ส่วนของตัวอย่างตรวจ (Sample area) รูปวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เป็นพื้นที่สำหรับหยดสารละลาย LAMP 25 ไมโครลิตร เพื่อทำการทดสอบ และส่วนพื้นที่สำหรับล้าง (Washing area) รูปสี่เหลี่ยม ขนาด  $4 \times 5$  มิลลิเมตร ซึ่งเป็นพื้นที่สำหรับหยดตัวชะปริมาณ 100 ไมโครลิตร การสร้างเส้นขอบเขตของการทดสอบบนกระดาษอาศัยเครื่องปริ้นชนิดแว็กซ์ของ Fuji xerox รุ่น ColorQube 8570 และกำหนดขอบเขตส่วนพื้นที่ที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนพื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) โดยอาศัยความร้อนจากเครื่องให้ความร้อน (Hotplate) ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วประกอบในส่วนแผ่นดูดซับ 2 ส่วนของชุดตรวจ dPAD เข้าด้วยกัน

โดยใช้เทปกาวสองหน้าติดบนบริเวณพื้นที่ไม่ชอบน้ำ (บริเวณแวกซ์) ของส่วนแผ่นดูดซับ และติดกาวสองหน้าบริเวณพื้นที่ระหว่างส่วนหยดตัวอย่างตรวจและพื้นที่สำหรับล้างไว้โดยไม่ต้องลอกเทปกาวออก เพื่อให้ชุดตรวจสอบสะดวกต่อการใช้งาน

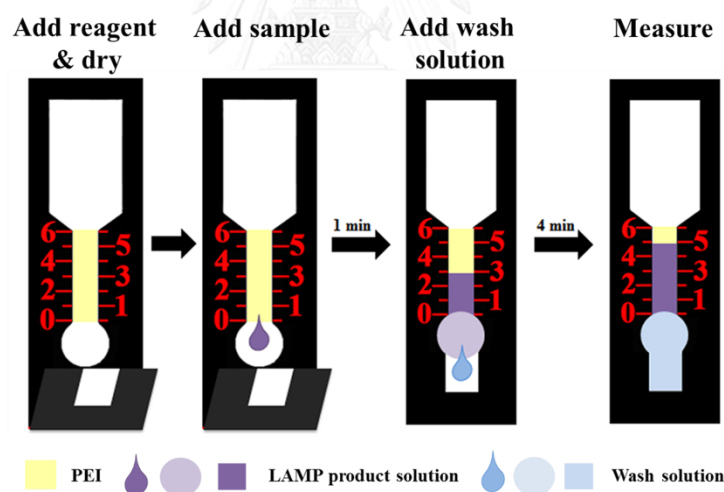


รูปที่ 3.2 ภาพแสดงส่วนประกอบของ dPAD

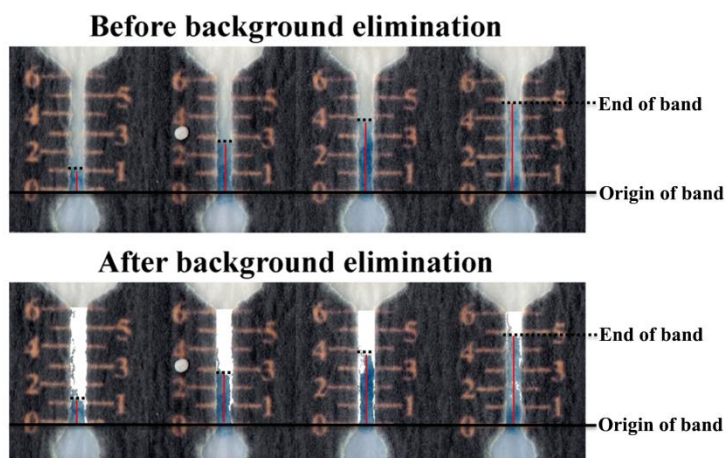
## 2.) ขั้นตอนการใช้งานของชุดตรวจ dPADs

ขั้นตอนการตรึงสารละลาย PEI ก่อนการใช้งานของชุดตรวจ dPADs โดยหยดสารละลาย PEI ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 2 ไมโครลิตรบนพื้นที่ส่วนตรวจวัดจากด้านบนลงล่าง ตำแหน่งหมายเลข 5, 3 และ 1 ตามลำดับ เพื่อให้สารละลายไม่ไหลออกนอกขอบเขตพื้นที่ส่วนตรวจวัด หลังจากนั้นรอสารละลาย PEI ให้ซึมลงกระดาษและแห้งที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 10 นาทีแล้วตรึงสารละลาย PEI ปริมาตร 2 ไมโครลิตรซ้ำอีกครั้ง บนพื้นที่ส่วนตรวจวัดจากด้านล่างขึ้นบน ตำแหน่งหมายเลข 1, 3 และ 5 ตามลำดับ เพื่อให้สารละลาย PEI ซึมลงบนกระดาษด้วยความเข้มข้นที่สม่ำเสมอทั่วพื้นที่ส่วนตรวจวัด รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที ก่อนนำมาใช้งาน โดยในขั้นตอนการใช้งานดังรูปที่ 3.3 นั้นเริ่มจากหยดสารละลาย LAMP ปริมาตร 25 ไมโครลิตรที่ผ่านการบ่มมาแล้วลงบนพื้นที่ส่วนของหยดตัวอย่าง แล้วอาศัยแรงดึงตามรูขนาดเล็ก (Capillary force) ของกระดาษดึงให้สารละลายไหลไปตามบริเวณของส่วนตรวจวัดซึ่งใช้เวลานานประมาณ 1 นาที จากนั้นหยดตัวอย่างปริมาตรที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นตัวช่วยให้สี HNB ในสารละลาย LAMP ไหลไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย PEI ที่ตรึงบนชุดตรวจ dPAD และช่วยล้างสี HNB ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย PEI ออกจากบริเวณพื้นที่ส่วนตรวจวัดของชุดตรวจ เพื่อขจัดพื้นสีรบกวน (Background) การตรวจวัดระยะทางสี หลังจากรอให้ตัวชะ ทำหน้าที่จนแห้งสนิท ซึ่งนานประมาณ 4 นาที จึงตรวจวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนส่วนตรวจวัดด้วยตาเปล่า เพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอตั้ง

ต้นแบบกึ่งปริมาณ แต่เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ของการตรวจแบบวัฏระยะทางด้วยตาเปล่า จึงสแกนภาพของชุดตรวจที่ผ่านการทดสอบแล้วด้วยเครื่องสแกน Epson expression ME-301 แล้วบันทึกภาพความละเอียด 600 dpi ในชื่อไฟล์นามสกุล Jpeg ก่อนวิเคราะห์ระยะทางการเกิดสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยการกำหนดขอบเขตของส่วนตรวจวัดเป็นพื้นที่วิเคราะห์ขนาด 40×300 pixels ก่อนใช้เครื่องมือ Color threshold โหมดภาพสี RGB ของโปรแกรม เป็นตัวช่วยในการตัดพื้นสีรบกวน และกำหนดขอบเขตสีที่ชัดเจนเท่านั้น ซึ่งเป็นขอบเขตที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังรูปตัวอย่างที่ 3.4 ก่อนทำการวิเคราะห์ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ด้วยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่สี (Red line) จากตำแหน่งจุดเริ่มต้นของแถบสี (Origin of band) จนถึงจุดสิ้นสุดของแถบสี (End of band) เมื่อกำหนดระยะทางทั้งหมดของส่วนพื้นที่ตรวจวัดเป็น 12 มิลลิเมตร เนื่องจากโปรแกรมสามารถวัดค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุด (The detection limit) ได้ดีกว่าการตรวจวัฏระยะด้วยตาเปล่าดังนั้นทุกภาพของชุดตรวจ dPAD จากการทดสอบจึงอาศัยโปรแกรม ImageJ ช่วยประเมินความถูกต้องของการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ด้วยตาเปล่า



รูปที่ 3.3 ภาพแสดงขั้นตอนการใช้งานของชุดตรวจ dPAD



**รูปที่ 3.4** ภาพตัวอย่างก่อนและหลังของชุดตรวจที่ใช้โปรแกรม ImageJ ตัดพื้นสีรบกวน โดยมีหมายเลข 0-6 กำกับบนชุดตรวจ คือระยะทางตั้งแต่ 0-12 มิลลิเมตร สัญลักษณ์เส้นทึบ, เส้นประ และเส้นสีแดง แสดงจุดเริ่มต้นของแถบสี จุดสิ้นสุดของแถบสีและระยะทางที่วัดได้ของแถบสีตามลำดับ

### 3.) การศึกษาความเข้มข้นของสี HNB ในสารละลาย LAMP ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษกรอง

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ในหลอดทดลอง โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสี HNB เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ในการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ที่เกิดขึ้นนั้น ความเข้มข้นของสี HNB 0.12 มิลลิโมลาร์ก็เพียงพอต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา และเหมาะสมต่อการสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสี HNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้า เมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้น (10) ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสี HNB ในสารละลาย LAMP ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลอง และสามารถนำมาตรวจสอบปฏิกิริยาได้บนกระดาษกรอง โดยทดสอบปฏิกิริยา LAMP ที่ใส่สี HNB ความเข้มข้น 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 และ 0.36 มิลลิโมลาร์ภายในหลอดทดลอง ก่อนนำสารละลายที่ผ่านการบ่มจนเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วมาทดสอบบนชุดตรวจ dPADs ที่สร้างดังรูปที่ 3.2 จากกระดาษกรองเบอร์ 113 ซึ่งมีรูพรุนขนาดใหญ่ที่สุดของกระดาษกรอง Whatman เพื่อให้สี HNB ความเข้มข้นน้อยที่สุดสามารถเคลื่อนที่ได้จนสังเกตเห็นระยะทางที่แตกต่างกันระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวก โดยเลือกสี HNB ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาภายในหลอดทดลอง และเห็นความแตกต่างของระยะทางการเคลื่อนที่ของสีบนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกชัดเจนที่สุด โดยแต่ละความเข้มข้นของสี HNB ที่ใส่ในสารละลาย LAMP ทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง

#### 4.) การศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง dPADs

ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้กระดาษกรองของ Whatman เพื่อนำมาใช้สร้างชุดตรวจ dPADs เนื่องจากกระดาษกรองเป็นวัสดุที่ราคาถูกและหาได้ง่าย ทั้งยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการไหลของของเหลว เพราะอาศัยแรงดึงตามรูขนาดเล็ก (Capillary force) ของกระดาษเท่านั้น นอกจากนี้กระดาษยังมีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกันหลายขนาดให้เลือกใช้ให้ มีอัตราการไหลของของเหลวที่ระยะเวลาต่างๆ กัน จึงสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการนำมาใช้พัฒนาชุดตรวจ dPADs สำหรับการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP เพื่อแปลผลหาปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใส่ในสารละลาย LAMP ในการศึกษาเลือกใช้กระดาษกรองที่เหมาะสมในการสร้างชุดตรวจ dPADs จึงนำกระดาษกรองเบอร์ 1, 4 และ 113 มาสร้างชุดตรวจ dPADs ดังรูปที่ 3.2 ก่อนนำมาทดสอบการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ที่ใส่สี HNB ในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกิริยาบนกระดาษ และชุดตรวจ dPADs ที่นำมาทดสอบนั้นได้ผ่านการตรึงสารละลาย PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเลือกกระดาษกรองชนิดที่ให้ความแตกต่างของระยะทางการเคลื่อนที่ของสีบนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกชัดเจนที่สุด โดยกระดาษกรองแต่ละเบอร์ทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง

### 3.2.6 การหาสถานะที่เหมาะสม (Optimization) ของสารละลาย PEI ต่อการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPADs

#### 1.) การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมบนชุดตรวจ dPADs

ความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่ใช้ตรึงบนบริเวณส่วนตรวจวัด (Detection zone) ของชุดตรวจ dPADs มีความสำคัญต่อการตรวจแบบวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ เพราะสามารถทำให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนกระดาษได้ ในงานวิจัยนี้จึงทดสอบตรึงสารละลาย PEI ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ ลงบนบริเวณส่วนตรวจวัดของชุดตรวจ dPADs แล้วหยดสารละลาย LAMP ที่ผ่านการบ่มจนเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วลงบนส่วนของตัวอย่างตรวจ (Sample area) โดยเลือกความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของระยะทางการเคลื่อนที่ของสีบนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกชัดเจนที่สุด โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลาย PEI ทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง

#### 2.) การศึกษาหาจำนวนครั้งของการตรึงสารละลาย PEI บนชุดตรวจ dPADs

เมื่อหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมในการใช้ตรึงบนชุดตรวจ dPADs คือทำให้เกิดความแตกต่างของระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและ

ผลบวกชัดเจนที่สุดแล้ว เพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เลือกใช้ตรงบนชุดตรวจ สามารถจับกับฮี HNB ในสารละลาย LAMP ได้ทั้งหมด โดยการเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกัน ระหว่างสาร PEI กับฮี HNB ซึ่งมีความสำคัญต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยเช่นกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย PEI บนชุดตรวจ dPADs ที่สามารถช่วยลดระยะเวลาทางการเคลื่อนที่ฮี HNB ของปฏิกิริยาผลลบ และเพิ่มระยะเวลาทางการเคลื่อนที่ฮี ของปฏิกิริยาผลบวก โดยการเพิ่มจำนวนครั้งที่ตรงสารละลาย PEI แทนการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย PEI เนื่องจากการตรงความเข้มข้นสูงเพียงครั้งเดียวอาจทำให้สาร PEI ไม่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และสารละลาย PEI ที่มีความเข้มข้นสูงจะต้องใช้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้พอดีกับพื้นที่กระดาษของส่วนตรวจวัด เพราะสารมีความหนืดมากขึ้น โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมจากการทดสอบในหัวข้อ “การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมบนชุดตรวจ dPADs” มาตรงบนชุดตรวจ dPADs จำนวน 1-3 ครั้ง โดยเลือกจำนวนครั้งที่ตรงแล้วให้ความแตกต่างของระยะเวลาทางการเคลื่อนที่ของฮีบนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกชัดเจนที่สุด โดยจำนวนที่ตรงแต่ละครั้งทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง

### 3.) การศึกษาหาชนิดของตัวชะที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs

ขั้นตอนการใช้งานของชุดตรวจ dPADs นั้นมีขั้นตอนการชะที่ช่วยให้ฮี HNB ไหลไปทำปฏิกิริยากับสาร PEI ได้ทั่วบริเวณพื้นที่ส่วนตรวจวัด และช่วยล้างสีรบกวนออกจากพื้นที่ดังกล่าวด้วย ดังนั้นชนิดของตัวชะที่ใช้ต้องไม่รบกวนการเคลื่อนที่ของฮี HNB และช่วยลดพื้นสีรบกวนสำหรับการตรวจวัดระยะเวลาทางสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้น้ำ Milli-Q และสารละลายน้ำเกลือ (0.9% Normal saline solution; NSS) มาทดสอบใช้เป็นตัวชะสำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรงสารละลาย PEI ความเข้มข้นเหมาะสมตามการทดสอบในหัวข้อ “การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมบนชุดตรวจ dPADs” มาทดสอบหาชนิดตัวชะที่ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรสูงสุดที่ชุดตรวจ dPADs ตามรูปที่ 3.2 สามารถดูดซับได้ภายในเวลา 5 นาที โดยเลือกชนิดตัวชะที่ให้ความแตกต่างของระยะเวลาทางการเคลื่อนที่ของฮีบนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกชัดเจนที่สุด โดยแต่ละชนิดของตัวชะทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง

#### 4.) การศึกษาหาปริมาณของตัวชี้ที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs

การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPAD ได้อาศัยตัวชี้ช่วยเพิ่มแรงดึงตามรูขนาด เล็ก (Capillary force) ของกระดาษ เพื่อดูดให้สารเคลื่อนที่ได้ดียิ่งขึ้น และล้างสีรบกวนออกจากพื้นที่ ตรวจวัด ดังนั้นปริมาณของตัวชี้มีความสำคัญต่อการอ่านผลแบบวัฏระยะทางการเคลื่อนที่ของสี ซึ่ง ในงานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบระยะเวลาทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวก โดย เลือกใช้ชนิดตัวชี้ที่เหมาะสมจากการทดสอบในหัวข้อ “การศึกษาหาชนิดของตัวชี้ที่เหมาะสมของ ชุดตรวจ dPADs” มาทดสอบเปรียบเทียบปริมาณตั้งแต่ 0-100 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ ชุดตรวจ dPADs ตามรูปที่ 3.2 สามารถดูดซับได้ภายในเวลา 5 นาที โดยเลือกปริมาณตัวชี้ที่ให้ ความแตกต่างของระยะเวลาทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวก ชัดเจนที่สุด โดยแต่ละปริมาณ ทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง

#### 3.2.7 การศึกษาคุณสมบัติ (Characterization) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา

##### 1.) การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของเชื้อตัวอย่างด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา

ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของเชื้อตัวอย่าง *E. coli* ด้วยชุดตรวจ dPADs ที่ พัฒนาขึ้น โดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ได้แก่ เชื้อ *Proteus mirabilis*, เชื้อ *Acinetobacter baumannii*, เชื้อ *Citrobacter freundii*, เชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Serratia marcescens* และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, เชื้อ *Enterococcus faecalis* และเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ที่สกัดไว้ใน การทดสอบ ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่เลือกใช้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยนำดีเอ็นเอเหล่านั้น มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น โดย ทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อการทดสอบ

##### 2.) การศึกษาความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา

การทดสอบหาความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น โดยนำดีเอ็นเอของ เชื้อ *E. coli* ที่สกัดไว้ใน การทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP มาเจือจางความเข้มข้นเป็นสิบเท่า (10-fold serial dilution) แล้วนำดีเอ็นเอนั้นมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค LAMP ในงานวิจัยนี้ใช้ดีเอ็น เอตั้งต้นปริมาณ 0,  $3.94 \times 10^3$ ,  $3.94 \times 10^4$ ,  $3.94 \times 10^5$ ,  $3.94 \times 10^6$  และ  $3.94 \times 10^7$  สำเนาต่อ ไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค



LAMP แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา โดยแต่ละปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง และเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นแต่ละปริมาณ

### 3.) การศึกษาหาช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs

การทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยชุดตรวจ dPADs ได้นำดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $3.94 \times 10^4$ ,  $3.94 \times 10^5$ ,  $3.94 \times 10^6$  และ  $3.94 \times 10^7$  สำเนาต่อไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP โดยทำปฏิกิริยาผลลบที่ไม่ได้ใส่ดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาควบคู่ไปด้วย เมื่อปฏิกิริยา LAMP ผ่านการบ่มเสร็จสิ้นเรียบร้อยแล้วจึงนำมาตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs เพื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นแตกต่างกัน บันทึกผลการทดสอบด้วยเครื่องสแกนและวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีด้วยโปรแกรม ImageJ โดยแต่ละปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นทำการตรวจซ้ำกัน 3 ครั้ง และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นกับระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจ dPADs เพื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณที่พัฒนาขึ้น

### 4.) การศึกษาหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB (Limit of detection; LOD) บนชุดตรวจ dPADs

การหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB บนชุดตรวจ เพื่อตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยที่สุดในปฏิกิริยา LAMP ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs เนื่องจากการตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) มีระยะทางการเคลื่อนที่สีที่เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นจึงต้องหาระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB บนชุดตรวจที่สามารถนำมาตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณได้ โดยค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น วิธีที่มีค่า Limit of detection (LOD) ต่ำๆ จะสามารถตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยๆ ได้ดีหรือมีความไวมาก ซึ่งวิธีการหาค่า LOD สามารถหาได้จากการทดลองวัดระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB ของปฏิกิริยาผลลบ ที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจ dPADs จำนวน 10 ปฏิกิริยา จากนั้นนำค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสีที่วัดได้มาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (9) และนำมาหาค่า LOD จากสูตร

$$\text{Limit of detection (LOD)} = \text{Mean} + 3\text{SD}$$

เมื่อ Mean คือ ค่าเฉลี่ยระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจจากการตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบ จำนวน 10 ปฏิกริยา และ SD (Standard derivation) คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัดระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB บนชุดตรวจของปฏิกริยาผลลบ จำนวน 10 ปฏิกริยานั้น จากนั้นนำค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB มาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยที่สุดในปฏิกริยา LAMP ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs จากสมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB และช่วงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกริยาที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs

##### 5.) การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกริยา LAMP ด้วยเทคนิค Real-time LAMP

การศึกษาความถูกต้องของช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดปฏิกริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น โดยนำดีเอ็นเอปริมาณตั้งต้นที่อยู่ในช่วงความสัมพันธ์มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยา LAMP แบบ Real-time ในการศึกษาความถูกต้องนี้ได้ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นเดียวกับดีเอ็นเอที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบหาช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้ในการตรวจวัดปฏิกริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs โดยเตรียมสารละลาย LAMP reaction 25 ไมโครลิตรในหลอดพีซีอาร์ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8.8) 20 มิลลิโมลาร์, KCl 50 มิลลิโมลาร์,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 มิลลิโมลาร์, Tween® 20 1 เปอร์เซ็นต์,  $\text{MgSO}_4$  8 มิลลิโมลาร์, Betaine 0.8 โมลาร์, dNTPs 1.4 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ FIP และ BIP อย่างละ 1.6 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ F3 และ B3 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ LF และ LB อย่างละ 0.8 ไมโครโมลาร์, *Bst* DNA polymerase 8 units, สาร SYBR Green I ที่เจือจางความเข้มข้น 1:100 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ซึ่งเหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกริยา LAMP แบบ Real-time ผลการทดสอบดังรูปที่ ก.1 และ ก.2 (ภาคผนวก) และดีเอ็นเอตัวอย่างของเชื้อ *E.coli* ตั้งต้นปริมาณ  $3.94 \times 10^4$ ,  $3.94 \times 10^5$ ,  $3.94 \times 10^6$  และ  $3.94 \times 10^7$  สำเนาต่อไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตร โดยทำปฏิกริยาผลลบที่ไม่ได้ใส่ดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกริยาควบคู่ไปด้วย บ่มสารละลาย LAMP ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง (Exicycler™ 96 Real-Time) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 90 รอบ (เวลารวมเป็น 45 นาที) และหยุดปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยเครื่องจะสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบในการบ่มสารกับความเข้มสีของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence intensity) โดยทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อการทดสอบ

6.) การตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ในการอ่านผลบนชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นด้วยตาเปล่า สำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณ

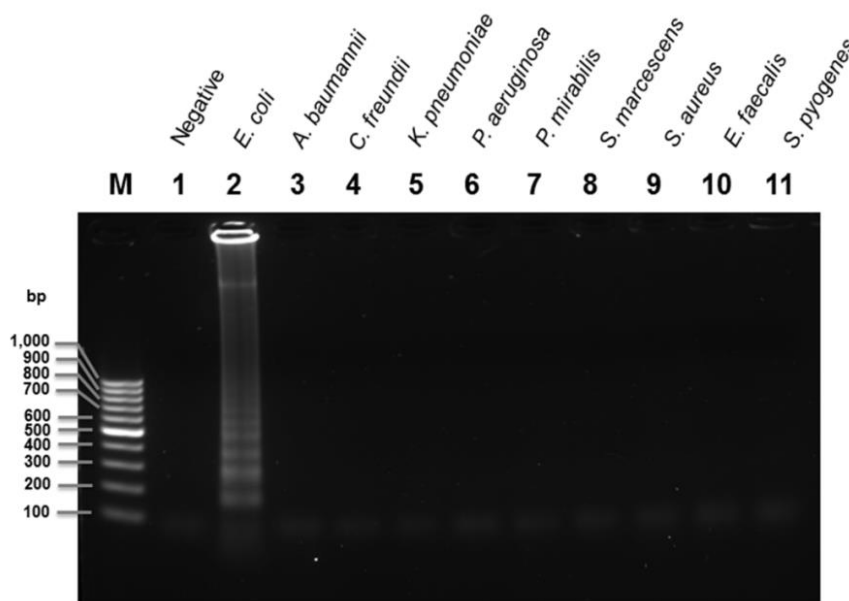
การตรวจสอบความถูกต้องในการอ่านค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งจะวิเคราะห์ผลการอ่านด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งการอ่านผลด้วยตาเปล่า โดยเตรียมชุดตรวจในสถานะและวันเวลาเดียวกัน พร้อมทั้งตรึงสารละลาย PEI ไว้ล่วงหน้าก่อนทำการทดสอบ ส่วนปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ในการทดสอบจะใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างของเชื้อ *E.coli* ที่มีปริมาณแตกต่างกัน 4 ระดับซึ่งสกัดมาจากโคโลนี (Colony) เดียวกัน ได้แก่ ปริมาณตั้งต้น  $0$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร โดยแต่ละปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นนั้นทำการตรวจซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง บันทึกผลการทดสอบด้วยเครื่องสแกนและวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (9) จากนั้นนำผลที่ได้คำนวณหาค่าความแปรปรวน หรือ เปอร์เซ็นต์ของ Coefficient of variations (%CV) ต่อไป และเปรียบเทียบค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสีที่คำนวณได้กับตำแหน่งหมายเลขที่กำหนดไว้บนชุดตรวจ dPADs สำหรับการอ่านผลด้วยตาเปล่า

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของไพรเมอร์ที่เลือกใช้ต่อเชื้อ *E. coli*

ทุกปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* ซึ่งถูกคิดค้นและออกแบบโดย Hill และคณะ (6) ดังนั้นเพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP จึงทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เหล่านี้กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ได้แก่ เชื้อ *Acinetobacter baumannii*, เชื้อ *Citrobacter freundii*, เชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อ *Proteus mirabilis*, เชื้อ *Serratia marcescens* และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, เชื้อ *Enterococcus faecalis* และเชื้อ *Streptococcus pyogenes* เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้วจึงตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยการทำ 2% Agarose gel electrophoresis พบว่ามีเพียงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* เท่านั้นที่เกิดแถบ (Band) หลายๆ ขนาด ลักษณะรูปแบบคล้ายขั้นบันได (Ladder-like patterns) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะแถบของปฏิกิริยา LAMP แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ผู้วิจัยนำมาใช้มีความน่าเชื่อถือ สามารถใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ได้อย่างจำเพาะ



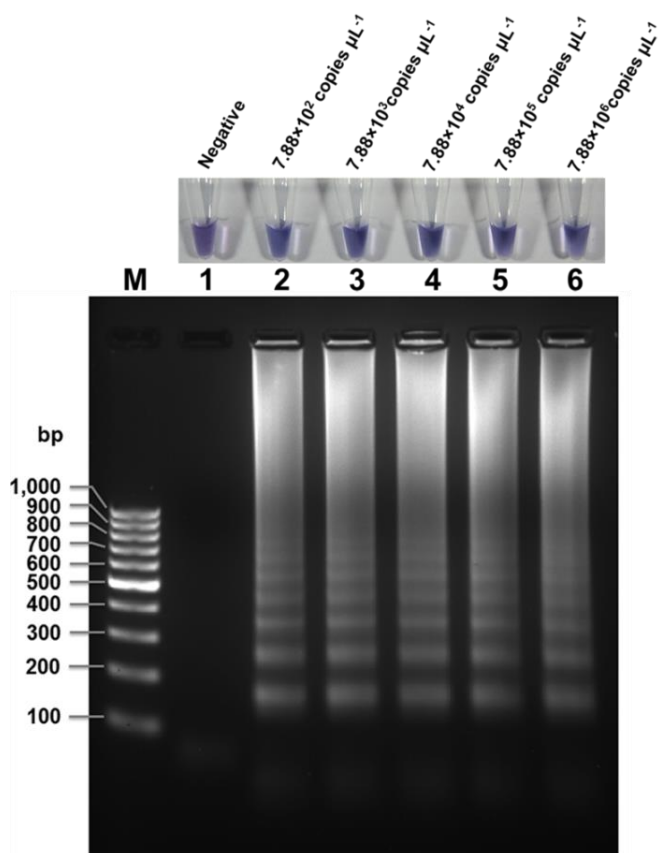
รูปที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อตัวอย่าง *E. coli* ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP โดยตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย 2% Agarose gel electrophoresis; ช่อง M คือดีเอ็นเอ

มาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, ช่อง 1 คือปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) และช่อง 2-11 คือปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอของเชื้อ *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus pyogenes* ตามลำดับ

#### 4.2 ผลการศึกษาความไว (Sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP

ผลการทดสอบความไวของวิธีการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยการเปลี่ยนแปลงสีของ HNB ที่ใส่ไปตั้งแต่ต้นก่อนการเกิดปฏิกิริยาขึ้น พบว่าในปฏิกิริยาผลลบที่ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* เมื่อบ่มตามระยะเวลาที่กำหนด สารละลาย LAMP ยังคงเป็นสีม่วง ในขณะที่ปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* ปริมาณตั้งแต่  $7.88 \times 10^2$  -  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร สารละลาย LAMP เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีฟ้า ดังรูปที่ 4.2 แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองของปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^2$ ,  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรได้ แสดงว่าการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยการเปลี่ยนแปลงสีของ HNB ภายในหลอดทดลองสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้แบบเชิงคุณภาพ คือบอกได้ว่ามีหรือไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายในปฏิกิริยา แต่ไม่สามารถบอกได้ว่ามีอยู่มากน้อยแค่ไหนในปฏิกิริยา โดยการตรวจวัดด้วยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีนี้สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณน้อยที่สุด  $7.88 \times 10^2$  สำเนาต่อไมโครลิตร

ส่วนการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าได้ผลเช่นเดียวกับการตรวจวัดด้วยการเปลี่ยนแปลงสีของ HNB คือพบแถบ (Band) ลักษณะคล้ายขั้นบันได (Ladder-like patterns) ในปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* ปริมาณตั้งแต่  $7.88 \times 10^2$  -  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4.2 แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าแถบไหน มีดีเอ็นเอตั้งต้นอยู่เท่าไร และสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณน้อยที่สุด  $7.88 \times 10^2$  สำเนาต่อไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ามีความไวในการตรวจวัดที่เท่ากัน แต่วิธีการตรวจวัดด้วยสี HNB สามารถทำได้ง่ายกว่า ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาน้อยกว่าและไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือเพิ่มเติม อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ในขณะที่การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก เสียเวลาเพิ่มมากขึ้น ต้องมีเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ และในการอ่านผลเพิ่มเติมด้วย

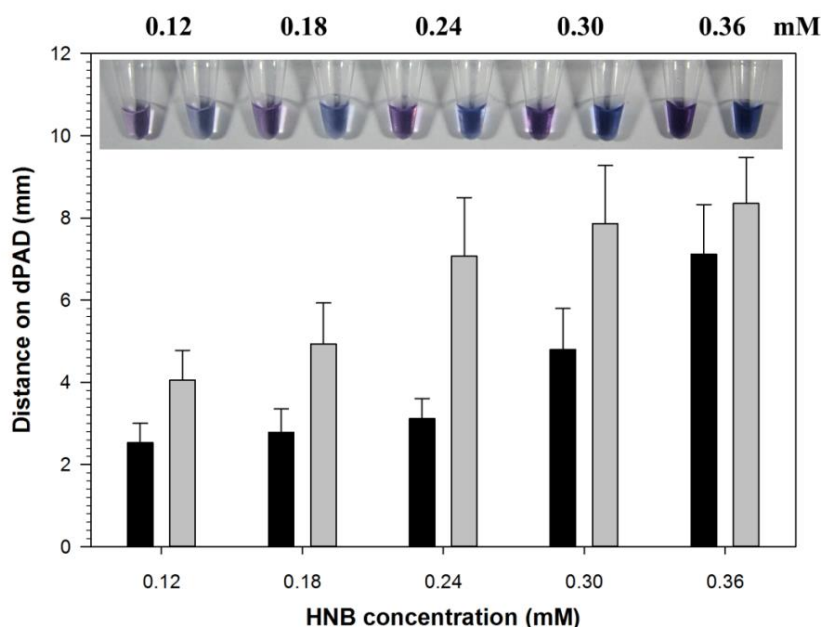


**รูปที่ 4.2** แสดงผลการทดสอบความไวของการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองและ 2% Agarose gel electrophoresis; ช่อง M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, ช่อง 1 คือปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) และช่อง 2-6 คือปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* ปริมาณ  $7.88 \times 10^2$ ,  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

#### 4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสี HNB ในสารละลาย LAMP ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษกรอง

ผลจากการทดสอบการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลอง โดยการใช้สี HNB ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.12-0.36 มิลลิโมลาร์ พบว่าสี HNB ความเข้มข้น 0.12, 0.18, 0.24, 0.30, และ 0.36 มิลลิโมลาร์ ไม่ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา LAMP สามารถอ่านผลการตรวจวัดปฏิกิริยาภายในหลอดทดลองจากการเปลี่ยนแปลงสี HNB จากสีม่วงในปฏิกิริยาผลลบซึ่งไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา เปลี่ยนเป็นสีฟ้าในปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา ดังภาพในรูปที่ 4.3 และเมื่อนำมาตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs เพื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ

จากกราฟในรูปที่ 4.3 พบว่าระยะทางการเคลื่อนที่สีในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลลบที่มี HNB ความเข้มข้น 0.12-0.24 มิลลิโมลาร์ มีระยะทางที่ไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้น 0.30 และ 0.36 มิลลิโมลาร์ มีระยะทางเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของ HNB แสดงให้เห็นว่าสี HNB ความเข้มข้น 0.12-0.24 มิลลิโมลาร์สามารถนำมาใช้ตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPAD ได้ เพราะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการจับกับสาร PEI ที่ตรึงบนกระดาษ แต่ความเข้มข้น 0.30 และ 0.36 มิลลิโมลาร์นั้นมียีส HNB ที่เป็นอิสระมากเกินพอต่อการจับกับสาร PEI ในขณะที่ระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB ในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลบวกมีระยะทางที่เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของ HNB ในปฏิกิริยา ทำให้สี HNB ความเข้มข้น 0.24 มิลลิโมลาร์มีความเหมาะสมที่สุดต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPAD เพราะในปฏิกิริยาผลบวก มีสาร HNB ที่เป็นอิสระมากพอให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวก รวมทั้งสี HNB ที่เป็นอิสระในปฏิกิริยาเหมาะสมต่อการจับกับสาร PEI ที่ตรึงบนชุดตรวจ dPAD เมื่อเทียบกับสี HNB ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสี HNB จากสีม่วงของปฏิกิริยาผลลบเป็นสีฟ้าของปฏิกิริยาผลบวกภายในหลอดทดลอง (10) แม้ความเข้มข้นของสี HNB ที่ใช้ตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษกรองจะมากกว่าประมาณ 2 เท่า แต่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา LAMP ภายในหลอดทดลอง และไม่เพิ่มราคาต้นทุนของการตรวจวัดปฏิกิริยา เนื่องจากสาร HNB มีราคาถูกและใช้เพียงจำนวนน้อยเท่านั้น



**รูปที่ 4.3** แสดงภาพของการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองและกราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD โดยเปรียบเทียบสารละลาย LAMP ที่มีสาร HNB ความ

เข้มข้นตั้งแต่ 0.12-0.36 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในสารละลายปฏิกิริยาผลลบบมีสีม่วงและปฏิกิริยาผลบวกมีสีฟ้า โดยแท่งกราฟสีดำ (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลลบบและแท่งกราฟสีเทา (▒) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลบวก โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

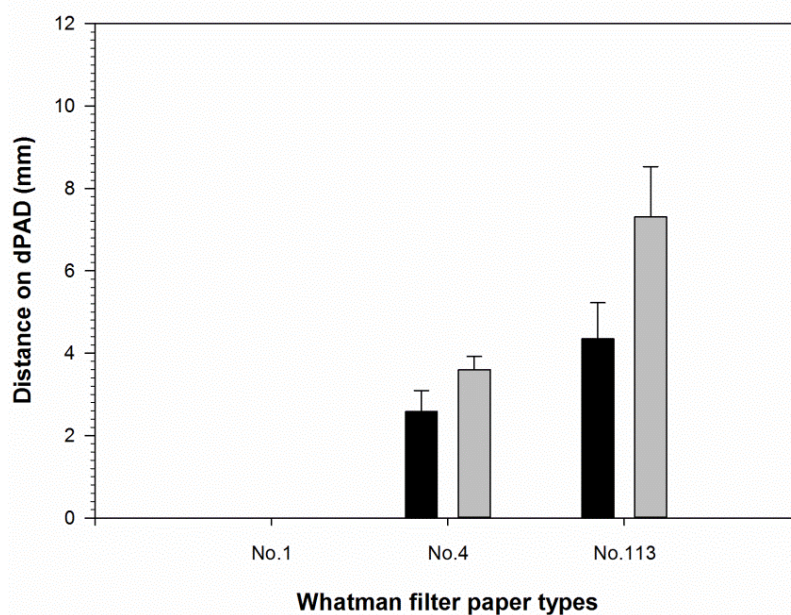
นอกจากความเข้มข้นของ HNB ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่สีบนกระดาษแล้ว สารแมกนีเซียมที่อยู่ในสารละลาย LAMP ก็มีผลต่อการเคลื่อนที่สีด้วยเช่นกัน เนื่องจากภายในหลอดทดลอง ประจุลบของกรดซัลฟอนิกของสาร HNB สามารถจับได้กับประจุบวกของแมกนีเซียม เมื่อเกิดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ทำให้แมกนีเซียมที่จับได้กับสาร HNB ในปฏิกิริยาลดลง จึงเกิด HNB ที่เป็นอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของแมกนีเซียมตั้งต้นในปฏิกิริยาจึงมีผลต่อการเคลื่อนที่สีบนกระดาษ แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการทดสอบ เนื่องจากต้องการยืนยันการเกิดปฏิกิริยา LAMP โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลอง ดังนั้นจึงใช้แมกนีเซียมความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ (10) แต่แมกนีเซียมความเข้มข้นสูงจะช่วยให้พื้นสีรบกวนลดลงได้ เพราะมีแมกนีเซียมมากพอที่จะจับกับสาร HNB ที่เป็นอิสระได้ทั้งหมด เมื่อตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบบ (ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย) ด้วยชุดตรวจ dPAD อาจทำให้ไม่เกิดแถบสีฟ้าขึ้นเลย นอกจากนี้ในปฏิกิริยาผลบวก (มีดีเอ็นเอเป้าหมาย) อาจช่วยให้เห็นแถบสีที่ชัดเจนขึ้นได้อีกด้วย

#### 4.4 ผลการศึกษาชนิดของกระดาษกรองที่เหมาะสมต่อการสร้าง dPADs

ชุดตรวจ dPADs ที่สร้างจากกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, 4 และ 113 ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP เพื่อเลือกชนิดกระดาษกรองที่เหมาะสมในการสร้าง dPADs พบว่ากระดาษกรองเบอร์ 113 เหมาะสมในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP มากที่สุด ผลการทดสอบดังกราฟในรูปที่ 4.4 เนื่องจากระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ระหว่างปฏิกิริยาผลลบบและผลบวกแตกต่างกันอย่างชัดเจนที่สุด อันเนื่องมาจากกระดาษกรองเบอร์ 113 มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 30 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถทำให้สี HNB และสารอื่นๆภายในปฏิกิริยา เช่น ดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่ได้ถูกเพิ่มจำนวน และดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกเพิ่มจำนวน (LAMP product) เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถเคลื่อนที่ไปได้ทั้งหมด ไม่เกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของสี HNB ทำให้พบว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ในปฏิกิริยาผลบวกมีระยะทางที่ยาวกว่าในปฏิกิริยาผลลบบ แม้กระดาษกรองเบอร์ 4 จะมีขนาดของรูพรุน (20-25 ไมโครเมตร) ใกล้เคียงกับกระดาษกรองเบอร์ 113 แต่พบว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสีสั้นกว่า ทั้งในปฏิกิริยาผลลบบและผลบวก ทำให้ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ระหว่างปฏิกิริยาผลลบบและผลบวกแตกต่างกันน้อยมาก อันเนื่องมาจากกระดาษกรองเบอร์ 4 มีอัตรา



การไหลของของเหลว 37 วินาทีต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งช้ากว่ากระดาษกรองเบอร์ 113 ที่มีอัตราการไหลของของเหลว 28 วินาทีต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษกรองเบอร์ 1 ซึ่งมีขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร และมีอัตราการไหลของของเหลว 150 วินาทีต่อ 100 มิลลิลิตร พบว่ากระดาษกรองเบอร์ 1 นั้นไม่สามารถดูดซับสารละลาย LAMP ได้ภายในเวลา 5 นาที เนื่องจากตะกอนแมกนีเซียม ไพรอเฟออสเฟต ( $Mg_2P_2O_7$ ) ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนขนาดเล็กของกระดาษกรองเบอร์ 1 จึงทำให้ไปขัดขวางการไหลของสี HNB



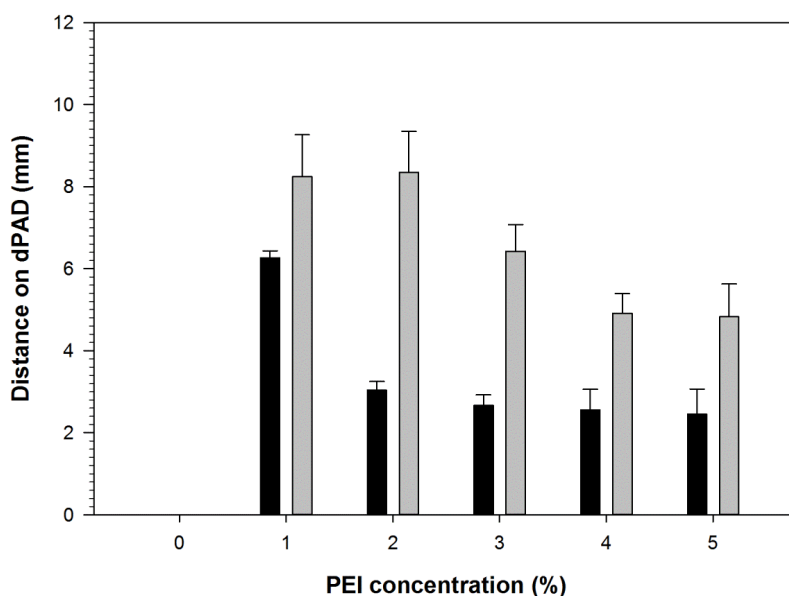
**รูปที่ 4.4** กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่สร้างด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, 4 และเบอร์ 113 โดยแท่งกราฟสีดำ (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลลบและแท่งกราฟสีเทา (▒) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลบวก โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

#### 4.5 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของสารละลาย PEI ต่อการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPADs

##### 4.5.1 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมบนชุดตรวจ dPADs

ผลการศึกษาความเข้มข้นของสาร PEI ที่ตรึงไว้บริเวณส่วนตรวจวัดของชุดตรวจ dPADs โดยตรึงสาร PEI ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP เพื่อแสดงว่าความเข้มข้นของสาร PEI มีผลต่อการจับกับสาร HNB เนื่องจากระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ที่ตรวจวัดได้บนกระดาษหาคายสาร PEI ปรับเปลี่ยนพื้นผิวกระดาษให้สามารถจับกับสี HNB ได้ เพื่อช่วยเพิ่มความเข้มของสี HNB ให้สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนบนกระดาษ ดังกราฟแสดงในรูปที่

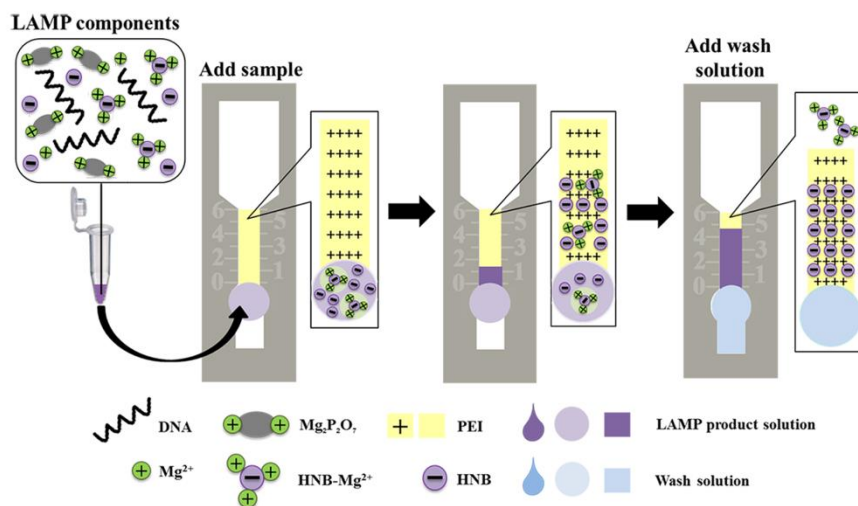
4.5 เมื่อนำชุดตรวจ dPADs ที่ไม่ได้ตรึงสาร PEI มาตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบและผลบวก ไม่พบการเคลื่อนที่ของสี HNB บนกระดาษที่สามารถวัดระยะทางได้ เนื่องจากสีได้กระจายตัวตามรูพรุนของกระดาษกรอง และจางหายไปจากการเจือจางด้วยตัวชะ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สาร PEI มีความสำคัญในการจับกับสี HNB ทำให้สามารถสังเกตเห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสีบนกระดาษได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อใช้ชุดตรวจที่ตรึงสาร PEI ความเข้มข้น 2-5 เปอร์เซ็นต์ มาตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบ พบว่ามีระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนกระดาษที่สามารถวัดระยะทางได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ของสารละลายและสามารถจับกับสี HNB ความเข้มข้น 0.24 มิลลิโมลาร์ในปฏิกิริยา LAMP เกิดเป็นแถบสีที่วัดระยะทางได้ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร PEI มากขึ้น พบว่าในปฏิกิริยาผลบวกวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีบนกระดาษได้ลดลงแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสาร PEI มากขึ้นจะลดประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ของสารละลาย LAMP บนชุดตรวจได้ เนื่องจากสาร PEI ความเข้มข้นสูงมีความหนืดมาก ทำให้ขัดขวางการไหลของสารละลาย LAMP เพราะสาร PEI กระจายตัวอย่างหนาแน่นบนกระดาษ ในขณะที่ PEI ความเข้มข้นต่ำมีการกระจายไม่หนาแน่นมากนัก ทำให้มีช่องว่างให้สี HNB เคลื่อนที่ไปได้ดีกว่า ดังนั้นสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์จึงเหมาะสมที่สุดในตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ที่บนชุดตรวจนี้ เพราะทำให้เกิดระยะทางการเคลื่อนที่สีระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกได้แตกต่างกันมากที่สุด



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI

ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5 เปอร์เซ็นต์ โดยแท่งกราฟสีดำ (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลลบและแท่งกราฟสีเทา (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลบวก โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

จากผลการทดลองดังกล่าวยืนยันหลักการที่เกิดขึ้นบน dPAD ได้ดังรูปที่ 4.6 โดยเมื่อนำสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลลบที่มีสีม่วงมาหยดลงอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (dPAD) ที่ตรึงด้วยสาร PEI ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ประจุบวกจากหมู่เอมีน (Amines) สาร HNB ที่ไม่ได้จับกับแมกนีเซียมไอออน คือสาร HNB ที่เป็นอิสระ (Free HNB) ซึ่งมีประจุลบจะจับกับสาร PEI บนกระดาษ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีบน dPAD จากไม่มีสีเป็นสีฟ้าขึ้น ดังนั้นสารละลาย LAMP ปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (Negative reaction) เมื่อนำมาตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจ dPAD จึงเห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB แต่ระยะทางที่วัดได้จะสั้น เพราะสาร HNB ที่เป็นอิสระมีอยู่จำนวนน้อย ในขณะที่สารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลบวกมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้น เกิดสาร HNB ที่เป็นอิสระมากขึ้น ดังนั้นเมื่อยดสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (Positive reaction) ลงบนชุดตรวจ dPAD จึงเห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ยาวกว่าของปฏิกิริยาผลลบ โดยจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลาย PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อการจับกับสี HNB ที่เป็นอิสระอยู่ในปฏิกิริยา LAMP



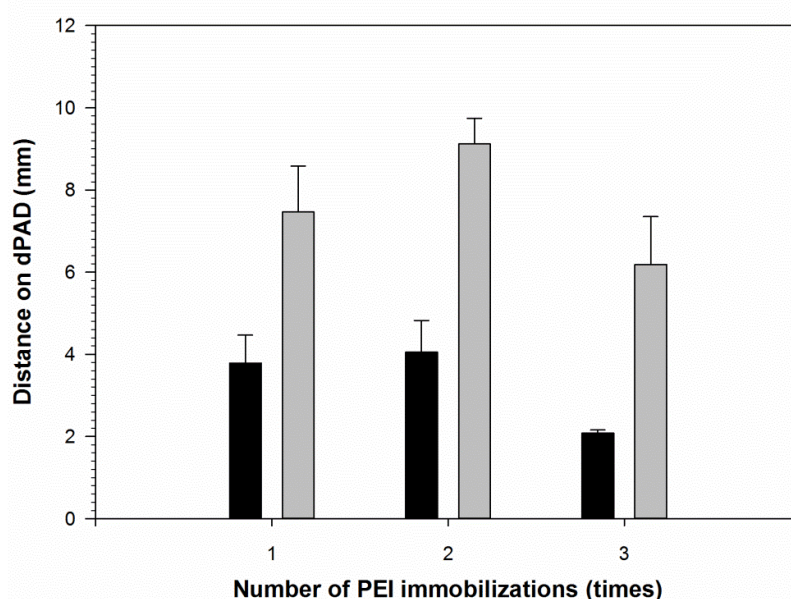
รูปที่ 4.6 ภาพแสดงหลักการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยชุดตรวจ dPADs

#### 4.5.2 ผลการศึกษาหาจำนวนครั้งของการตรึงสารละลาย PEI บนชุดตรวจ dPADs

ผลการหาความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมที่จะใช้ตรึงบนชุดตรวจ dPADs คือ สารละลาย PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แต่เพื่อให้สารละลาย PEI ที่ใช้สามารถจับกับฮี HNB ในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลลบได้ทั้งหมด จนเห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสีสั้นที่สุดในการตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบบนชุดตรวจ ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นของสารละลาย PEI ที่เหมาะสมนั้นต้องสามารถจับกับฮี HNB ในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลบวกได้มากที่สุด จนทำให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสียาวที่สุด เพื่อให้เกิดความแตกต่างของระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ระหว่างปฏิกิริยาผลลบกับปฏิกิริยาผลบวกมากที่สุด จึงจะสามารถนำความเข้มข้นของสารละลาย PEI นั้นมาใช้ในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณบนชุดตรวจ dPADs ได้ แต่การตรึงสาร PEI ความเข้มข้นสูงเพียงครั้งเดียวอาจทำให้สาร PEI ซึมลงบนพื้นที่ส่วนตรวจวัดของชุดตรวจไม่สม่ำเสมอ จึงเกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารละลาย LAMP ได้โดยเฉพาะในปฏิกิริยาผลบวกที่มีตะกอน  $Mg_2P_2O_7$  ไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนกระดาษได้ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของสาร PEI โดยอาศัยจำนวนครั้งในการตรึงสารเป็นการเพิ่มความหนาแน่นของประจุบวกให้สามารถจับกับ HNB ได้ดียิ่งขึ้น ช่วยเพิ่มระยะทางการเคลื่อนที่สีได้ และผลการศึกษาหาจำนวนครั้งของการตรึงสาร PEI บนชุดตรวจ dPADs ดังกราฟแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่า เมื่อนำชุดตรวจที่ตรึงสาร PEI 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 และ 2 ครั้ง (ความเข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์) มาตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบ ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ไม่แตกต่างกัน แต่ในปฏิกิริยาผลบวกนั้น การเคลื่อนที่ของสีบนชุดตรวจที่ตรึงสาร PEI 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) วัดระยะทางได้ยาวกว่าบนชุดตรวจที่ตรึงสาร PEI 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ครั้ง (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสาร PEI จากการเพิ่มจำนวนครั้งที่ตรึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกันระหว่างสาร PEI กับฮี HNB ที่เป็นอิสระในปฏิกิริยา LAMP ทำให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจได้ยาวขึ้น เพราะสารละลาย LAMP สามารถเคลื่อนที่ไปได้ โดยไม่ถูกขัดขวาง ทำให้สาร HNB สามารถเคลื่อนไปจับสาร PEI ได้เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร PEI โดยการตรึงจำนวน 3 ครั้ง (ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์) พบว่าการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs วัดระยะทางได้สั้นลงทั้งในปฏิกิริยาผลลบและผลบวก แสดงว่าสาร PEI ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการจับกับฮี HNB เนื่องจากในปฏิกิริยาผลลบ พบว่าระยะการเคลื่อนที่ของสีสั้นลง แต่ความเข้มข้นดังกล่าวขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารละลาย LAMP ในปฏิกิริยาผลบวก ทำให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ในปฏิกิริยาผลบวกสั้นลง ดังนั้นการตรึงสาร PEI 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) เหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPADs เพราะสามารถจับกับสาร HNB ได้ดีที่สั้นที่สุด เกิดเป็นแถบสีที่วัดระยะทางการเคลื่อนที่ได้บนชุดตรวจ โดย

ไม่ชัดเจนของการเคลื่อนที่ของสารละลาย LAMP ทำให้ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB แตกต่างกัน ชัดเจนที่สุดระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวก โดยชุดตรวจที่ตรึงสาร PEI ความเข้มข้น 2% จำนวน 2 ครั้ง มีระยะทางการเคลื่อนที่สียาวกว่าเมื่อเทียบกับชุดตรวจที่ตรึงสาร PEI ความเข้มข้น 4% เพียงครั้งเดียว (กราฟในรูปที่ 4.5) แม้ความเข้มข้นรวมของ PEI บนกระดาษเป็น 4% เท่ากันก็ตาม เนื่องจากการตรึงความเข้มข้นสูงเพียงครั้งเดียวจะขัดขวางการไหลของสี HNB เพราะการกระจายตัวอย่างหนาแน่นของสาร PEI

เมื่อเทียบกับสาร PEI ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอให้เห็น การตกตะกอนของการจับกันระหว่างสาร PEI กับผลผลิต LAMP ที่เกิดขึ้นภายในหลอดทดลอง (54) โดยความเข้มข้นของสาร PEI ที่ใช้ตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP บนกระดาษกรองจะมากกว่าประมาณ 20 เท่า เนื่องจากการปรับเปลี่ยนพื้นผิวบนกระดาษให้มีประจุเป็นบวก เพื่อให้สามารถจับกับสี HNB ที่มีประจุลบได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสาร PEI ที่เหมาะสมจึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของสี HNB ให้สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนบนกระดาษ และต้องไม่เหมาะสมต่อการจับกับดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต LAMP ซึ่งมีประจุเป็นลบเช่นกันจนทำให้ไปขัดขวางการไหลของสี HNB



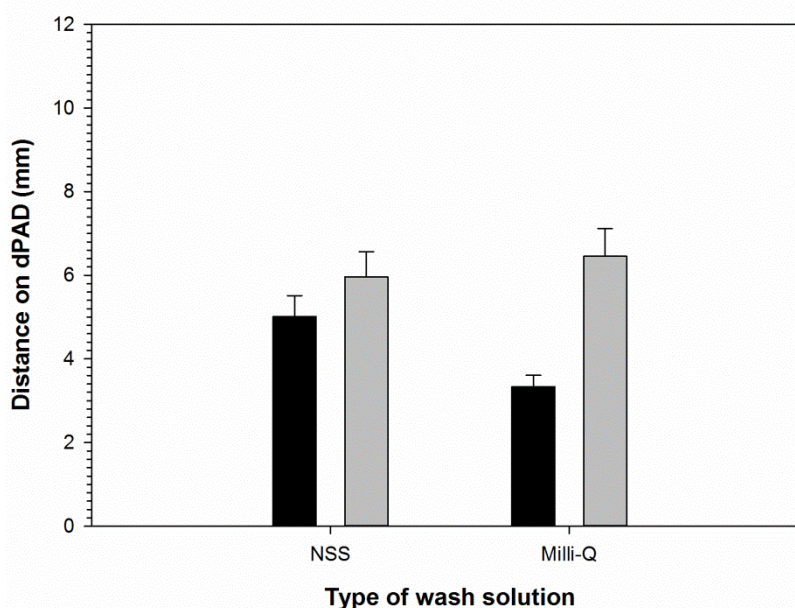
**รูปที่ 4.7** กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1-3 ครั้ง โดยแท่งกราฟสีดำ (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลลบและแท่งกราฟสีเทา (▒) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลบวก โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

ชุดตรวจ dPADs ที่ผ่านการตรึงสาร PEI แล้วสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้งาน โดยปิดผนึกด้วยเครื่องผนึกสุญญากาศ (Vacuum sealer) แต่ผู้วิจัยมิได้ทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษาชุดตรวจและอุณหภูมิอื่นที่สามารถยืดอายุการใช้งานของชุดตรวจได้ เนื่องจากได้อ้างอิงจากสาร PEI ที่ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษสามารถตรึงน้ำยาบนกระดาษแล้วเก็บไว้ใช้ทดสอบที่หลังได้ เนื่องจากกระดาษสามารถคงสภาพน้ำยาที่แห้งแล้ว (66) ดังนั้นชุดตรวจ dPADs นี้จะสามารถเก็บไว้ ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อยืดอายุการใช้งานได้

#### 4.5.3 ผลการศึกษาหาชนิดของตัวชะที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs

ขั้นตอนการใช้งานของชุดตรวจ dPADs นั้นมีขั้นตอนการชะ เพื่อช่วยให้สี HNB ไหลไปทำปฏิกิริยากับสาร PEI ได้ทั่วบริเวณส่วนพื้นที่ตรวจวัด และช่วยล้างสี HNB ที่ไม่จับกับสาร PEI ให้หลุดออกจากบริเวณส่วนตรวจวัดของชุดตรวจ ดังนั้นชนิดของตัวชะที่เหมาะสมจะช่วยให้ตรวจวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีได้อย่างถูกต้อง โดยไม่รบกวนการเคลื่อนที่ของสี HNB และช่วยลดพื้นสีรบกวนต่อการวัดระยะทางบนกระดาษได้ เมื่อนำชุดตรวจ dPADs ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) มาทดสอบตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบและผลบวก แล้วชะด้วยน้ำ Milli-Q และสารละลายน้ำเกลือ (0.9% NSS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พบว่าชุดตรวจ dPADs ของปฏิกิริยาผลลบที่ใช้น้ำ Milli-Q เป็นตัวชะ มีระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB สั้นกว่าชุดตรวจที่ใช้น้ำเกลือเป็นตัวชะ แสดงให้เห็นว่า น้ำ Milli-Q ช่วยล้างสี HNB ที่ไม่ได้จับกับสาร PEI ให้หลุดออกจากบริเวณส่วนตรวจวัดได้ดีกว่าน้ำเกลือ โดยน้ำ Milli-Q ไม่รบกวนการเคลื่อนที่ของสี HNB เนื่องจากเป็นน้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากไอออนจึงไม่รบกวนการจับกันระหว่าง PEI และ HNB สังเกตได้จากชุดตรวจ dPADs ของปฏิกิริยาผลบวก พบว่าระยะทางการเคลื่อนที่สียาวกว่าปฏิกิริยาผลลบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำ Milli-Q เป็นตัวชะเพราะไม่รบกวนการเคลื่อนที่ของสี HNB และยังช่วยลดพื้นสีรบกวน ทำให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่สีของปฏิกิริยาผลลบและผลบวกแตกต่างกันมากกว่าการใช้น้ำเกลือเป็นตัวชะ ดังแสดงกราฟในรูป 4.8 ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบตัวชะเพียงแค่สองชนิดนี้ เนื่องจากเป็นสารที่หาได้ง่าย และขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก แต่อาจมีตัวชะชนิดอื่นที่สามารถช่วยทำให้สาร HNB เคลื่อนได้ดีและลดพื้นสีรบกวนได้เช่นน้ำ Milli-Q และการใช้ น้ำปราศจากไอออน

(Deionized water) หรือ น้ำกลั่น (Distilled water) อาจทดแทนน้ำ Milli-Q ที่มีราคาสูงได้

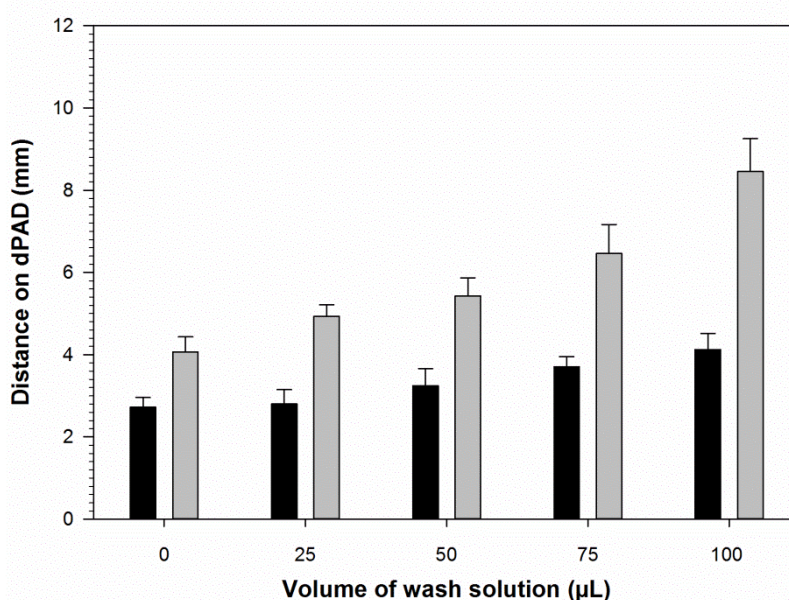


**รูปที่ 4.8** กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วชะด้วยน้ำ Milli-Q และสารละลายน้ำเกลือ (0.9% NSS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยแท่งกราฟสีดำ (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลลบ และแท่งกราฟสีเทา (□) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลบวก โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

#### 4.5.4 ผลการศึกษาหาปริมาณของตัวชี้ที่เหมาะสมของชุดตรวจ dPADs

การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPAD ได้อาศัยตัวชี้ช่วยเพิ่มแรงดึงดูดตามรูขนาดเล็ก (Capillary force) ของกระดาษ เพื่อดูดให้สี HNB เคลื่อนที่ได้ดียิ่งขึ้น และล้างสีรบกวนจาก HNB ที่ไม่จับกับสาร PEI ให้หลุดออกจากพื้นที่ตรวจวัด ดังนั้นการหาปริมาณน้ำ Milli-Q ที่เหมาะสม จะช่วยให้ตรวจวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีได้อย่างถูกต้อง และช่วยลดพื้นสีรบกวนต่อการวัดระยะทางบนกระดาษได้ เมื่อนำชุดตรวจ dPADs ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) มาทดสอบตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบและผลบวกแล้วชะด้วยน้ำ Milli-Q ตั้งแต่ปริมาตร 0-100 ไมโครลิตร ดังกราฟแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่า เมื่อไม่มีการชะด้วยน้ำ Milli-Q หลังการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ในปฏิกิริยาผลลบและผลบวกมีความแตกต่างกันน้อยที่สุด แต่เมื่อมีการชะด้วยน้ำ Milli-Q พบว่า ระยะทางการเคลื่อนที่สีของปฏิกิริยาผลลบและผลบวกเพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการชะด้วยน้ำ

Milli-Q เป็นขั้นตอนสำคัญในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยชุดตรวจ dPADs เพราะช่วยให้สาร HNB เคลื่อนที่ได้ดีขึ้น และเมื่อใช้น้ำ Milli-Q ปริมาณมากขึ้น พบว่าระยะทางการเคลื่อนที่สีของปฏิกิริยาผลบวกยิ่งเพิ่มมากขึ้น และเพิ่มมากกว่าระยะทางการเคลื่อนที่สีของปฏิกิริยาผลลบอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าน้ำ Milli-Q ช่วยให้สี HNB ที่เป็นอิสระอยู่ในสารละลาย LAMP ไหลไปจับกับสาร PEI บนชุดตรวจได้ ซึ่งในปฏิกิริยาผลบวกจะมีสี HNB ที่เป็นอิสระอยู่ในสารละลายมากกว่าในปฏิกิริยาผลลบ ดังนั้นจากการศึกษาหาปริมาณตัวชี้วัดที่เหมาะสมต่อชุดตรวจ dPADs พบว่าน้ำ Milli-Q ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ชุดตรวจที่สร้างจากกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 113 สามารถดูดซับได้ภายใน 5 นาที เป็นปริมาณที่ทำให้เกิดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีแตกต่างกันชัดเจนที่สุดระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวก



**รูปที่ 4.9** กราฟแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ที่ตรึงด้วยสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วชะด้วยน้ำ Milli-Q ตั้งแต่ปริมาณ 0-100 ไมโครลิตร โดยแท่งกราฟสีดำ (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลลบและแท่งกราฟสีเทา (■) แสดงระยะทางการเคลื่อนที่สีในปฏิกิริยาผลบวก โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

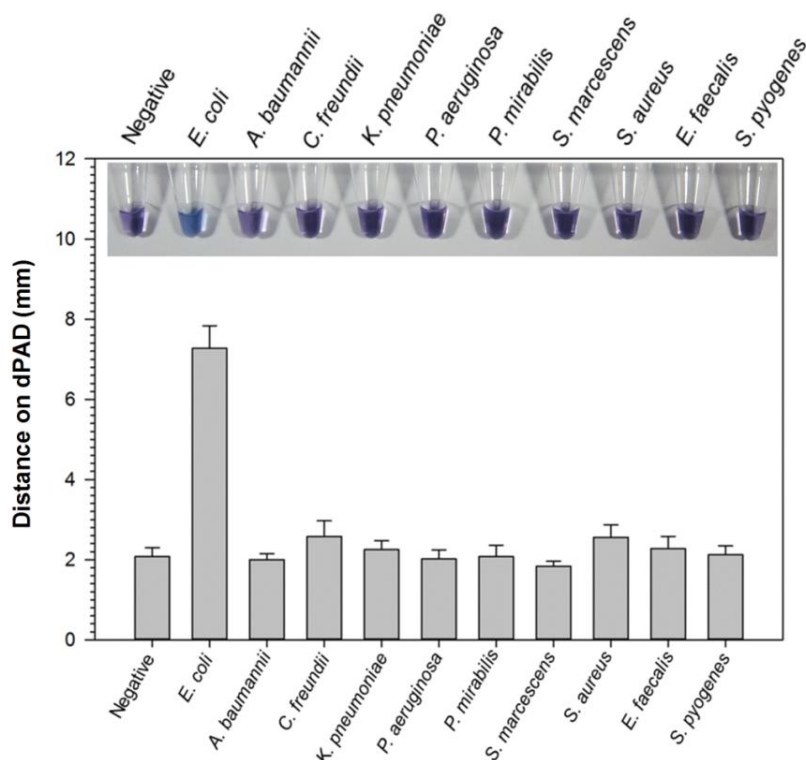
#### 4.6 ผลการศึกษาคุณสมบัติ (Characterization) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา

##### 4.6.1 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตัวอย่างด้วยชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น

ผู้วิจัยได้ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ซ้ำอีกครั้ง แต่อาศัยการตรวจวัดปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ภายในหลอดทดลองเทียบกับการเคลื่อนที่ของสีบนชุด



ตรวจ dPADs ดังรูปที่ 4.10 พบว่ามีเพียงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* เท่านั้นที่สังเกตเห็นว่าสี HNB ภายในหลอดทดลองเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีฟ้า ซึ่งแสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเกิดขึ้นในปฏิกิริยา และเมื่อนำมาตรวจวัดด้วยชุดตรวจ dPADs พบว่าปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* สามารถวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีได้ชัดเจนที่สุด ซึ่งระยะทางแตกต่างกับปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) อย่างชัดเจน ในขณะที่ปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอของเชื้อชนิดอื่นอยู่ พบว่ามีระยะทางการเคลื่อนที่ของสีบนชุดตรวจได้ใกล้เคียงกับปฏิกิริยาผลลบ ดังรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ dPAD ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* เช่นเดียวกับการตรวจวัดปฏิกิริยาภายในหลอดทดลอง โดยผลจากการทดสอบพบว่ามีความจำเพาะสูงเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hill และคณะ (6) ซึ่งเป็นผู้คิดค้นไพรเมอร์เหล่านี้ เนื่องจากได้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นนอกเหนือจากเชื้อ *E. coli* ใกล้เคียงกันหลายชนิด นอกจากนี้พบว่าความจำเพาะของวิธีการตรวจวัดด้วยชุดตรวจ dPAD ที่พัฒนาขึ้นสอดคล้องกับความจำเพาะของการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry assay) บนชุดตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค (Microfluidic device) โดย Safavieh และคณะ (85) รวมทั้งการตรวจวัดโดยอ่านผลจากการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์บนชุดตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical device;  $\mu$ PAD) ของ Connelly และคณะ (24) ซึ่งได้อาศัยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเดียวกันทั้งหมด

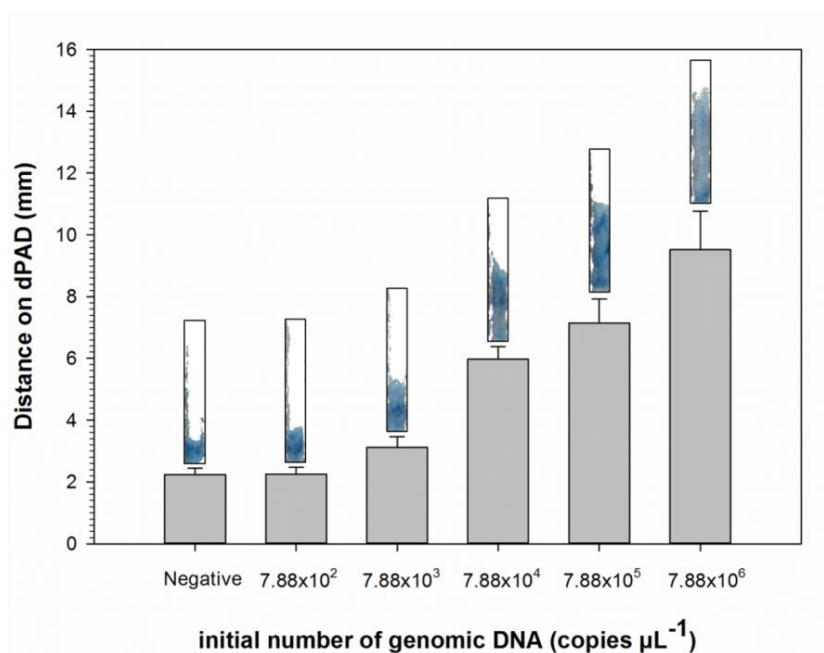


**รูปที่ 4.10** แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อตัวอย่าง *E. coli* ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP โดยตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองและชุดตรวจ dPADs ซึ่งแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPAD ของปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) และปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอของเชื้อ *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus pyogenes* ตามลำดับ โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

#### 4.6.2 ผลการศึกษาความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนา

เมื่อนำสารละลาย LAMP ที่ผ่านการบ่มจนเสร็จสิ้นแล้วมาตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs ที่ตรึงด้วยสาร PEI พบว่าภายในหลอดทดลองของปฏิกิริยาผลลบที่ไม่มีดีเอ็นเอนั้น เมื่อหยดสารละลาย LAMP ที่มีสีม่วงลงบนชุดตรวจจะเห็นการเคลื่อนที่ของสี HNB เป็นระยะทางสีฟ้าขึ้นบริเวณส่วนตรวจวัดที่ตรึงสาร PEI ซึ่งวัดระยะทางการเคลื่อนที่ได้สั้นประมาณ 2.23 มิลลิเมตร และเมื่อหยดสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^2$ ,  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ซึ่งภายในหลอดทดลองสังเกตเห็นเป็นสี

ฟ้าทั้งหมด ลงบนชุดตรวจ dPADs พบการเคลื่อนที่ของสี HNB ที่วัดระยะทางได้ 2.25, 3.12, 5.97, 7.15 และ 9.52 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังกราฟในรูปที่ 4.11 ซึ่งเป็นไปตามหลักการที่เกิดขึ้นบน dPADs ดังที่แสดงในรูปที่ 4.6 เมื่อเปรียบเทียบในระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา LAMP ที่เท่ากัน ในสารละลาย LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย ทำให้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้น้อย เมื่อตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจ dPADs จึงเห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB สั้นกว่าการตรวจวัดปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นอยู่มาก เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากกว่าและเกิดสาร HNB ที่เป็นอิสระอยู่ในสารละลายซึ่งจับกับสาร PEI บนชุดตรวจ dPADs ได้มากกว่า จึงเห็นระยะทางการเคลื่อนที่ได้ยาวกว่า แต่การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณน้อยที่สุด  $7.88 \times 10^3$  สำเนาต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นการตรวจวัดที่มีความไวน้อยกว่าวิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองและวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ทว่าการตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs นั้นสามารถบอกความแตกต่างของปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นต่างกันได้ โดยสังเกตจากระยะทางการเคลื่อนที่สีที่แตกต่างกัน ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเช่นกัน แม้ชุดตรวจ dPADs มีความไวน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการตรวจวัดเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีอื่น แต่การตรวจวัดด้วย dPADs มีราคาถูกเพราะใช้วัสดุราคาไม่แพง ชุดตรวจสร้างและใช้งานได้ง่ายเมื่อเทียบกับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบ Real-time บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค (Microfluidic chip) แบบพกพา (86) และการตรวจด้วยหลักการเคมีไฟฟ้าบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค (85) ที่สร้างจากวัสดุราคาแพง มีขั้นตอนการสร้างยุ่งยาก นอกจากนี้ชุดตรวจ dPADs ใช้ตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าเมื่อเทียบกับการตรวจวัดโดยอ่านผลจากการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์บนชุดตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ( $\mu$ PAD) (24) ที่ต้องอาศัยเครื่องตรวจวัดการเรืองแสง



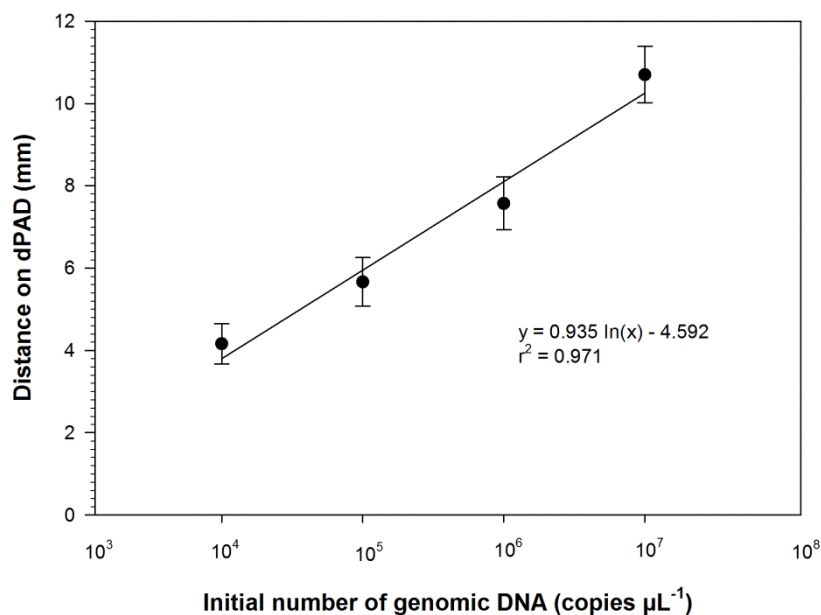
**รูปที่ 4.11** แสดงผลการทดสอบความไวของการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs โดยเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ของปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) และปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* ปริมาณ  $7.88 \times 10^2$ ,  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ตามลำดับ โดยแต่ละแท่งกราฟแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation

#### 4.6.3 ผลการศึกษาหาช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs

การศึกษาหาช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายจากเชื้อ *E. coli* ด้วยชุดตรวจ dPADs ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังผลการทดสอบข้างต้น โดยนำดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $3.94 \times 10^7$  สำเนาต่อไมโครลิตรมาเจือจางความเข้มข้นเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ได้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $3.94 \times 10^4$ ,  $3.94 \times 10^5$ ,  $3.94 \times 10^6$  และ  $3.94 \times 10^7$  สำเนาต่อไมโครลิตร ใส่จำนวน 5 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ดังนั้นในหนึ่งปฏิกิริยาจะมีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร และทำปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา) ควบคู่ไปด้วย โดยแต่ละปริมาณทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ปฏิกิริยา เมื่อนำสารละลาย LAMP มาบ่มจนเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้ว จึงตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs แล้ววัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ด้วยโปรแกรม ImageJ

จากผลการทดสอบเมื่อนำค่าระยะทางที่วัดได้ไปสร้างกราฟเส้นตรง โดยตีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP แสดงอยู่ในสเกลลอการิทึม (Logarithmic Scale) พบว่า ในปฏิกิริยาผลบวกที่มีตีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร มีระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs เท่ากับ  $4.16 \pm 0.49$ ,  $5.67 \pm 0.59$ ,  $7.57 \pm 0.64$  และ  $10.70 \pm 0.68$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB กับปริมาณของตีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาอยู่ในรูปแบบสมการฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic function) เนื่องจากระยะทางการเคลื่อนที่ที่สั้นที่สุดที่วัดได้คือระยะทางของปฏิกิริยาผลลบและปฏิกิริยาผลบวกก็จะมีระยะทางการเคลื่อนที่ที่ที่ยาวขึ้นตามปริมาณของตีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาที่มากขึ้น ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นตามหลักการที่อธิบายไว้ข้างต้น

อย่างไรก็ตามเมื่อในปฏิกิริยามีตีเอ็นเอตั้งต้นความเข้มข้นหนึ่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนของตีเอ็นเอมากจนใช้แมกนีเซียมในสารละลาย LAMP จนหมดและมีสาร HNB ที่เป็นอิสระอยู่ในสารละลายมากที่สุด เมื่อตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยชุดตรวจ dPADs จะทำให้วัฏระยะทางการเคลื่อนที่ของสีได้ยาวที่สุดด้วย โดยระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB ของปฏิกิริยาผลบวกที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบ คือปฏิกิริยาที่มีตีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณในช่วง  $7.88 \times 10^3 - 7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรซึ่งอยู่ในช่วงกราฟที่มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.971 ดังแสดงในรูปที่ 4.12 แสดงถึงความน่าเชื่อถือว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยา LAMP ที่มีตีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณในช่วง  $7.88 \times 10^3 - 7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร โดยตีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณสูงสุดที่ได้ทำการทดสอบนั้นเป็นปริมาณที่ได้จากการสกัดตีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างตามขั้นตอนของชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งได้ตีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณประมาณ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงไม่ได้ทดสอบตีเอ็นเอตั้งต้นที่มีปริมาณมากกว่านี้



**รูปที่ 4.12** กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB จากการใช้ชุดตรวจ dPADs กับดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP ปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงอยู่ในสเกลลอการิทึม (Logarithmic Scale) โดยแต่ละจุด (●) แสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation โดยมีค่าความสัมพันธ์ฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic Function) :  $r^2 = 0.971$

#### 4.6.4 ผลการศึกษาหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB (Limit of detection; LOD) บนชุดตรวจ dPADs

ผลทดสอบหาค่า Limit of detection ของระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB ในปฏิกิริยาผลบวก เพื่อตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีอยู่ในปฏิกิริยา LAMP นั้นใช้ปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) ที่ผ่านการบ่มเสร็จสิ้นแล้ว 10 ปฏิกิริยามาตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs แล้วนำค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ที่วัดได้มาหาค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของสี HNB หรือ Limit of detection (LOD) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Limit of detection (LOD)} = \text{Mean} + 3\text{SD}$$

เมื่อ Mean คือ ค่าเฉลี่ยระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจจากการตรวจวัดปฏิกิริยาผลลบ จำนวน 10 ปฏิกิริยา และ SD (Standard derivation) คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัดระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB บนชุดตรวจของปฏิกิริยาผลลบ จำนวน 10 ปฏิกิริยานั้น

ผลจากการทดลองพบว่าได้ค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs เป็นระยะทางน้อยที่สุด เท่ากับ 2.955 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** ผลการทดสอบหาค่า Limit of detection ของระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB ในปฏิกิริยาผลบวกบนชุดตรวจ dPADs

ค่าทางสถิติ	ค่าระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB ของปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น)
Mean (mm)	2.304
SD	0.217
3SD	0.651
LOD (mm)	2.955

จากนั้นนำมาหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยที่สุดในปฏิกิริยาผลบวกที่สามารถตรวจหาได้ด้วยชุดตรวจ โดยคำนวณจากสมการแสดงความสัมพันธ์ช่วงค่าปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs ซึ่งเป็นสมการฟังก์ชันลอการิทึม ( $y = a \ln(x) + y_0$ ) คือ

$$y = 0.935 \ln(x) - 4.592$$

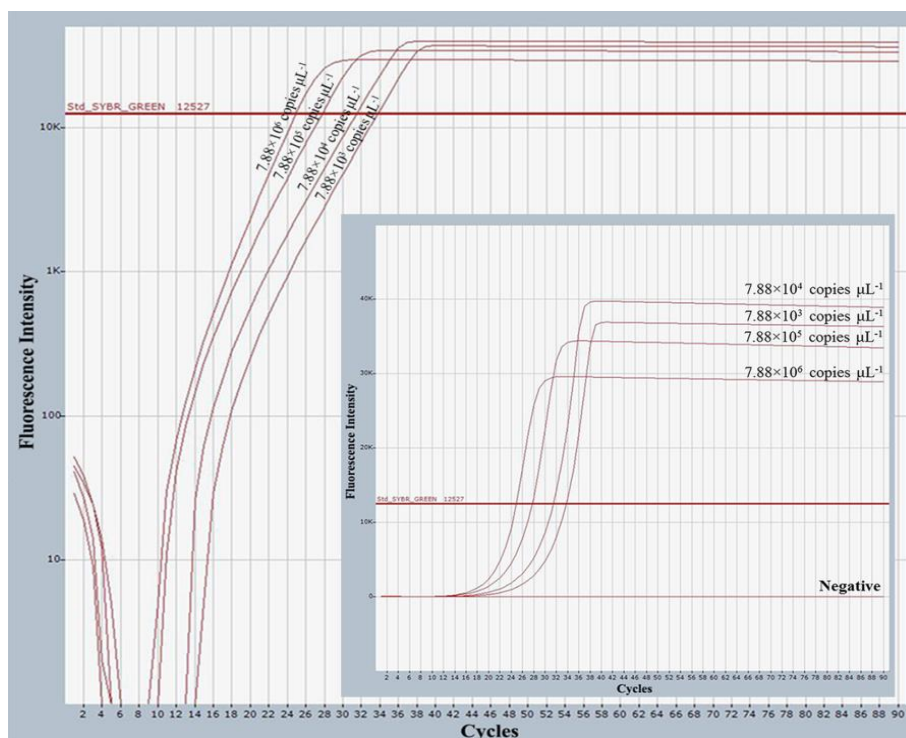
ผลจากการคำนวณ พบว่าความสามารถในการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นอย่างน้อยที่สุดในปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs เท่ากับ  $4.14 \times 10^3$  สำเนาต่อไมโครลิตร เมื่อเทียบกับการตรวจวัดเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีอื่น พบว่าชุดตรวจ dPADs มีความสามารถในการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยกว่า แต่การตรวจวัดด้วย dPADs นั้นมีราคาถูก มีขั้นตอนการสร้างชุดตรวจที่ง่าย และการทำงานไม่ยุ่งยากซับซ้อน เมื่อเทียบกับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค (85, 86) นอกจากนี้ยังเป็นชุดตรวจบนกระดาษที่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า เมื่อเทียบกับการตรวจวัดการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ  $\mu$ PAD (24) ที่สามารถตรวจวัดได้แบบเชิงคุณภาพ และต้องอาศัยเครื่องตรวจวัดเพิ่มเติมอีกด้วย

#### 4.6.5 ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของช่วงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP ด้วยเทคนิค Real-time LAMP

ผลการศึกษาความถูกต้องถึงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* ในช่วงปริมาณ  $7.88 \times 10^3$  -  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นช่วงปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้

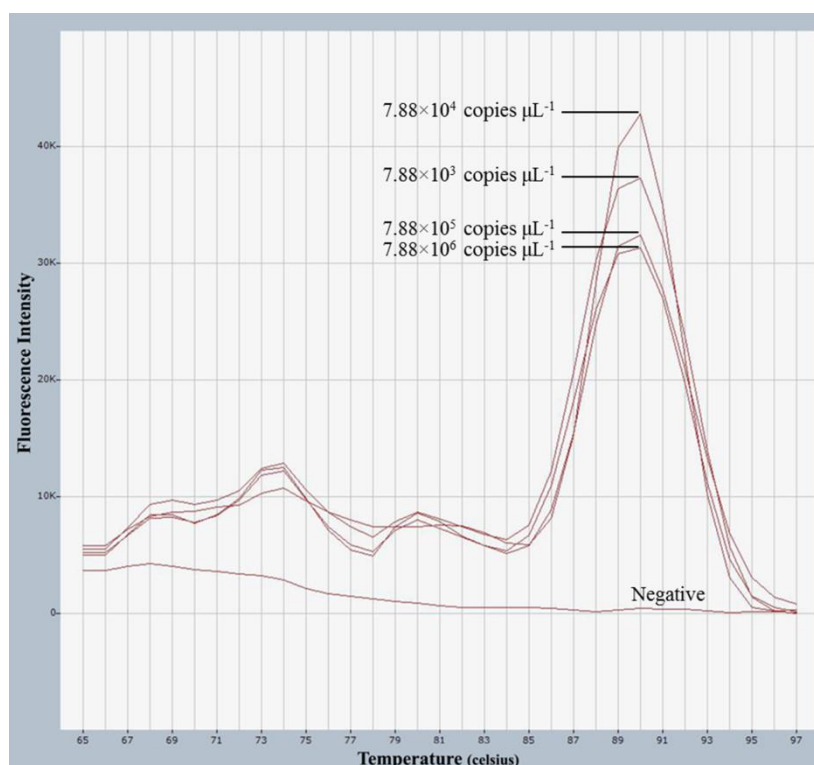
ด้วยชุดตรวจ dPADs เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือในการตรวจวัดแบบปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นจากเชื้อ *E.coli* ในช่วงปริมาณดังกล่าว จึงอาศัยเทคนิค Real-time LAMP ตรวจวัดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบปริมาณ โดยนำดีเอ็นเอตั้งต้นเดียวกับดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณได้ด้วยชุดตรวจ dPADs ที่เจือจางปริมาณต่างกัน 10 เท่าระหว่าง  $7.88 \times 10^3$  -  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Real-time LAMP จากผลการทดสอบพบว่า เส้นกราฟของดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรแสดงเส้นกราฟได้เร็วกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ดังภาพแทรกในรูปที่ 4.13 แต่พบว่า ระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารเรืองแสงที่เครื่อง Real-time ตรวจวัดได้ในแต่ละดีเอ็นเอตั้งต้นนั้นไม่เท่ากัน เนื่องจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ใช้ระยะเวลาสั้นในการเริ่มต้นปฏิกิริยา ทำให้การเรืองแสงของปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณสูงเกิดขึ้นก่อนจะถึงระดับ ความเข้มข้นของการเรืองแสงที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นในปฏิกิริยาที่ดีเอ็นเอตั้งต้นสูง จึงพบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารเรืองแสงน้อย (87) เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารเรืองแสงและจำนวนรอบในการเกิดปฏิกิริยามาสร้างกราฟฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic Function) ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าในการเกิดปฏิกิริยาจำนวนรอบที่ 1-6 พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารเรืองแสงเกิดขึ้น เนื่องจากเทคนิค LAMP ไม่มีขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อนขั้นตอนการเพิ่มจำนวน จึงทำให้สารเรืองแสงที่ใช้ตรวจวัดปฏิกิริยา คือ SYBR Green I ไปจับกับดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาก่อนที่เอนไซม์จะเข้ามาทำหน้าที่แยกสายดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายต่อไป และเมื่อเทียบค่าความเข้มข้นของสารเรืองแสงของ SYBR Green ที่ 12527 ซึ่งเป็นระดับ Threshold พบว่า ในปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร มีค่า Threshold cycles (Ct) น้อยกว่าปริมาณอื่นๆ แสดงว่าในปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณสูง มีจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่า





รูปที่ 4.13 แสดงกราฟความสัมพันธ์ฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic Function) ระหว่างระดับความเข้มสีของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) กับจำนวนรอบในการเกิดปฏิกิริยา (Cycles) ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร และปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น) (ภาพแทรก คือกราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time LAMP จากเครื่อง Exicycler™ 96 Real-Time)

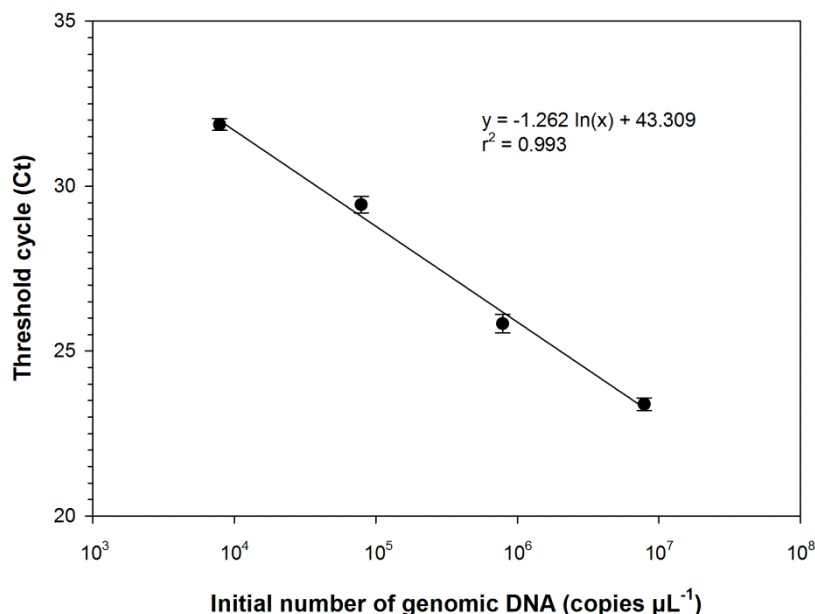
เมื่อพิจารณาค่า Melting temperature ( $T_m$ ) คือ อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า  $T_m$  ของแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 89 และ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งน่าจะเป็นค่า  $T_m$  ของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนผลผลิตด้วยเทคนิค LAMP (LAMP product) จากกลไกการเกิดปฏิกิริยา LAMP ในขั้นตอน Cycle amplification นั้นอาจทำให้เกิดดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดใหญ่ขึ้นมากกว่าหนึ่งชิ้น จึงทำเกิดค่า  $T_m$  ที่ใกล้เคียงกันสองค่าดังรูปที่ 4.14



**รูปที่ 4.14** แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มสีของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) กับอุณหภูมิที่ใช้ เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวจำนวน 50 เฟอร์เซ็นต์ (Temperature, celsius) ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร และปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น)

เมื่อนำค่า Threshold cycles (Ct) ที่ระดับความเข้มสารเรืองแสง เท่ากับ 12527 ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำกัน 3 ปฏิกิริยา มาสร้างกราฟมาตรฐานที่มีดีเอ็นเอช่วงปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ - $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร พบว่าค่า Ct ของปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร เท่ากับ  $33.54 \pm 0.20$ ,  $31.07 \pm 0.42$ ,  $27.23 \pm 0.50$  และ  $24.67 \pm 0.27$  รอบ ตามลำดับ โดยค่า Ct เพิ่มขึ้นแบบผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP ที่ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นอยู่ในรูปแบบสมการฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic function) ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.993 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่าค่า Ct มีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E.coli* ในช่วงปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ - $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็น

ช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs และเป็นช่วงค่าที่เชื่อถือว่าจะสามารถตรวจวัดแบบปริมาณได้



**รูปที่ 4.15** กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Threshold cycles (Ct) กับดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP ความเข้มข้น  $7.88 \times 10^3$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงอยู่ในสเกลลอการิทึม (Logarithmic Scale) โดยแต่ละจุด (●) แสดงถึงค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Error bars แสดงถึง Standard deviation โดยมีค่าความสัมพันธ์ฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic Function) :  $r^2 = 0.993$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

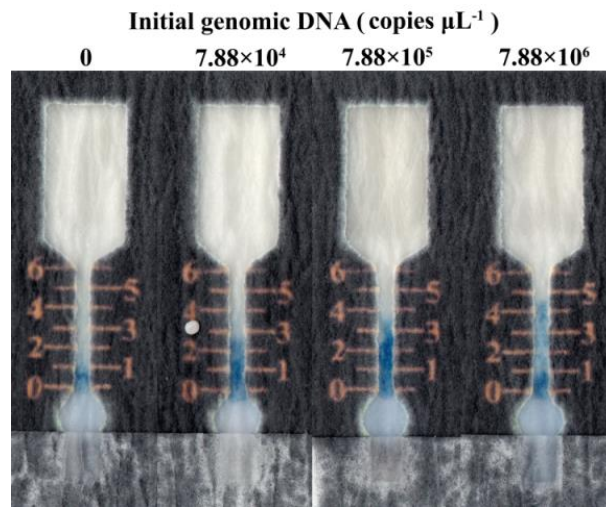
#### 4.6.6 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ในการอ่านผลบนชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นด้วยตาเปล่า สำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณ

ผลการตรวจสอบความถูกต้องในการอ่านค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งทำการวิเคราะห์ผลการอ่านด้วยโปรแกรม ImageJ เปรียบเทียบกับตำแหน่งการอ่านผลด้วยตาเปล่า จากชุดตรวจที่เตรียมขึ้นพร้อมกัน และตรึงสารละลาย PEI ไว้ล่วงหน้าก่อนการทดสอบ โดยปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ในการทดสอบใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างของเชื้อ *E.coli* ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับซึ่งสกัดมาจากโคโลนี (Colony) เดียวกัน ได้แก่ ปริมาณตั้งต้น 0,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นนั้นทำการตรวจซ้ำกันจำนวน 20 ครั้ง ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อนำปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 0 (ปฏิกิริยาผลลบ),  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรมาตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs เกิดการเคลื่อนที่ของสีที่วัดระยะทางได้ด้วย

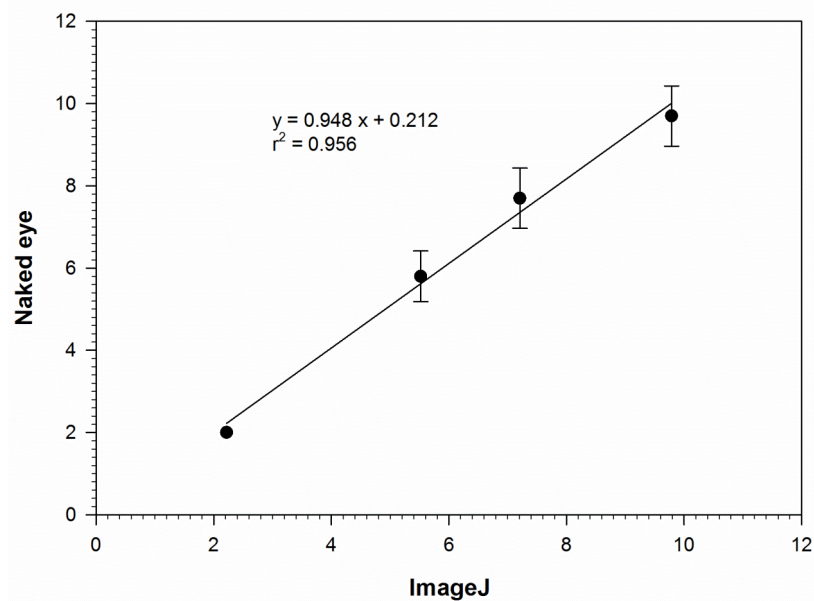
โปรแกรม ImageJ เท่ากับ  $2.22 \pm 0.27$ ,  $5.52 \pm 0.56$ ,  $7.21 \pm 0.66$  และ  $9.79 \pm 0.83$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยคำนวณค่าความแปรปรวน (% Coefficient of variations; %CV) ของการตรวจวัด LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยการวัดระยะทางสีที่เกิดขึ้นได้เท่ากับ 8.45 - 12.27 เปอร์เซ็นต์ (n = 80) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระยะทางการเคลื่อนที่สีที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.16 เมื่อนำชุดตรวจเหล่านี้มาวัดระยะทางโดยอ่านจากตำแหน่งหมายเลข 0-6 ที่กำกับไว้บนชุดตรวจ dPADs พบว่าระยะทางการเคลื่อนที่สีของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 0 (ปฏิกิริยาผลลบ),  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร อ่านผลได้ที่ตำแหน่งหมายเลข 1, 3, 4 และ 5 ตามลำดับซึ่งแต่ละหมายเลขมีระยะห่าง 2 มิลลิเมตร (ระยะทางรวมเป็น 12 มิลลิเมตร) เทียบเป็นระยะทางเท่ากับ  $2 \pm 0$ ,  $5.8 \pm 0.62$ ,  $7.7 \pm 0.73$  และ  $9.7 \pm 0.73$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมีค่า %CV ของการตรวจวัด LAMP แบบกึ่งปริมาณ โดยการอ่านระยะทางสีด้วยตาเปล่าได้เท่ากับ 0 - 10.61 เปอร์เซ็นต์ (n = 80) เมื่อเทียบกับระยะทางที่วัดได้จากโปรแกรมพบว่ามีความสัมพันธ์สอดคล้องกันทั้งหมด ( $r^2 = 0.956$ ) ดังแสดงในรูปที่ 4.17 จากผลการทดสอบดังกล่าวยืนยันได้ว่าระยะทางการเคลื่อนที่สีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่สีจากตำแหน่งจุดเริ่มต้นของแถบสี (Origin of band) จนถึงจุดสิ้นสุดของแถบสี (End of band) ซึ่งรวมถึงช่วงแถบสีที่ไม่สม่ำเสมอ แต่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าดังแถบสีของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรในรูปที่ 4.16 และแถบสีที่อ่านผลได้บริเวณกึ่งกลางของตำแหน่งหมายเลขบนสเกลให้อ่านผลเป็นหมายเลขจำนวนมากว่า เนื่องจากจุดสิ้นสุดที่แท้จริงของแถบสีอาจไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่สีอาจเคลื่อนที่ได้ถึงตำแหน่งหมายเลขจำนวนมากว่า การอ่านผลเช่นนี้จึงใกล้เคียงระยะทางการเคลื่อนที่ของสีที่แท้จริงซึ่งตรวจวัดยืนยันระยะทางดังกล่าวด้วยโปรแกรม ImageJ

**ตารางที่ 4.2** ค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB จากการวัดด้วยโปรแกรมและอ่านผลด้วยตาเปล่า ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนของดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา

ดีเอ็นเอตั้งต้นของ เชื้อ <i>E. coli</i> (copies $\mu\text{L}^{-1}$ )	วิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB บนชุดตรวจ dPADs			
	โปรแกรม ImageJ	CVs (%)	หมายเลขกำกับ (ระยะทาง; mm)	CVs (%)
0 (n=20)	$2.22 \pm 0.27$	12.27	1 ( $2 \pm 0$ )	0
$7.88 \times 10^4$ (n=20)	$5.52 \pm 0.56$	10.12	3 ( $5.8 \pm 0.62$ )	10.61
$7.88 \times 10^5$ (n=20)	$7.21 \pm 0.66$	9.16	4 ( $7.7 \pm 0.73$ )	9.52
$7.88 \times 10^6$ (n=20)	$9.79 \pm 0.83$	8.45	5 ( $9.7 \pm 0.73$ )	7.55



รูปที่ 4.16 ภาพแสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้น  $0$ ,  $7.88 \times 10^4$ ,  $7.88 \times 10^5$  และ  $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตร โดยตำแหน่งหมายเลข 0-6 ที่กำกับไว้บนชุดตรวจ คือระยะทาง 0-12 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.17 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ที่ตรวจวัดด้วยโปรแกรม ImageJ และระยะทางสีที่อ่านผลด้วยตาเปล่า

## บทที่ 5

### สรุปผลการศึกษาวิจัย

#### สรุปผลการศึกษาวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทาง (Distance-based paper analytical device; dPAD) เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) แบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) โดยอาศัยหลักการจับกันของสาร Polyethylenimine (PEI) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ประจุบวกที่ตรึงบนชุดตรวจ dPAD กับสาร Hydroxynaphthol blue (HNB) ที่อยู่ในสารละลาย LAMP โดยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษแบบวัดระยะทางได้รับการออกแบบให้สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้จากการอาศัยแรงดึงตามรูขนาดเล็ก (Capillary force) ของกระดาษช่วยดูดสารละลาย LAMP ให้ไหลไปยังบริเวณที่ออกแบบไว้สำหรับการตรวจวัด (Detection zone) ซึ่งแถบสีเกิดขึ้นได้ภายใน 5 นาที และอาศัยเทคนิคพิมพ์ขี้ผึ้ง (Wax printing) สร้างขอบเขตเพื่อกันสารละลายไม่ให้ออกไปยังนอกบริเวณ การตรวจวัดจากแรงดึงตามรูขนาดเล็กดังกล่าว ซึ่งทำให้สามารถเห็นการเคลื่อนที่ของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนพื้นที่ส่วนตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า บันทึกผลด้วยเครื่องสแกนและอ่านค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสีที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) ในการอ่านผลบนชุดตรวจ dPADs ด้วยตาเปล่า และสามารถแปลผลการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณจากดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใส่ไปในปฏิกิริยา ภายในหลอดทดลองปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้น และจำนวนดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นจากเทคนิค LAMP ส่งผลให้แมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ ) ในสารละลายลดจำนวนลง สาร HNB ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้โลหะไอออน (Metal ion indicator) ถูกเติมในสารละลายเพื่อตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของแมกนีเซียมไอออนในสารละลาย เมื่อแมกนีเซียมไอออนในปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จะทำให้สารละลาย LAMP เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีฟ้า แต่ในกรณีที่เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นแตกต่างกันในสารละลาย LAMP ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณไม่เท่ากัน การเปลี่ยนแปลงสีของสาร HNB ไม่สามารถแยกความแตกต่างของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ แม้จะตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีนั้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) แต่ในปฏิกิริยา LAMP นั้นสาร HNB ที่ไม่ได้จับอยู่กับแมกนีเซียมไอออน (Free HNB) จะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นจากเทคนิค LAMP (LAMP product) เมื่อนำมาตรวจวัดบนชุดตรวจ dPAD ปริมาณสาร HNB อิสระจะจับสาร PEI ที่ตรึงไว้บนกระดาษ ทำให้เกิดสี HNB บนชุดตรวจที่สามารถวัดระยะทางการเคลื่อนที่สีได้ ดังนั้นในสารละลาย LAMP ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายมาก มีจำนวน LAMP product เกิดขึ้นมาก ทำให้สาร

HNB อีสระในสารละลายเพิ่มมากขึ้น จะเกิดระยะทางการเคลื่อนที่ของสียาวกว่าในสารละลายที่ไม่มีสี เอ็นเอเป้าหมาย และในสารละลายที่มีสีเอ็นเอเป้าหมายน้อย

โดยปฏิกิริยา LAMP ที่สามารถนำตรวจวัดบนกระดาษได้นั้นต้องมีความเข้มข้นของสาร HNB ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลองและบนกระดาษเพื่อให้สาร HNB สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของแมกนีเซียมไอออนจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นในปฏิกิริยา และสามารถเกิดการจับกันระหว่างสี HNB อีสระกับสาร PEI บนกระดาษแล้วสามารถอ่านผลการเคลื่อนที่ของสีบนกระดาษได้ด้วยตาเปล่าชัดเจน ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร HNB คือ 0.24 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ไม่ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา LAMP ภายในหลอดทดลองและเกิดปฏิกิริยาที่เห็นสีได้ชัดเจนบนกระดาษ โดยเห็นความแตกต่างของระยะทางการเคลื่อนที่สี HNB ระหว่างปฏิกิริยาผลลบและผลบวกได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาต่อให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่ของสีในปฏิกิริยาผลบวกที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแตกต่างกันในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นความเข้มข้นต่างกัน ดังนั้นสารละลาย LAMP ที่สามารถนำมาตรวจวัดด้วยชุดตรวจ dPADs ต้องมีความเข้มข้นของสาร HNB เท่ากับ 0.24 มิลลิโมลาร์

ผลการทดสอบการสร้างชุดตรวจ dPADs พบว่า กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 113 มีคุณสมบัติทั้งในเรื่องของขนาดรูพรุน อัตราการไหลและความสามารถในการดูดซับสารละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างชุดตรวจ dPADs เพราะเมื่อตรึงสาร PEI บริเวณส่วนตรวจวัดของชุดตรวจที่สร้างจากกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 113 พบว่ามีแรงดึงของกระดาษมากพอให้สารละลาย LAMP ไหลผ่านเข้าไปยังบริเวณส่วนตรวจวัดและเกิดปฏิกิริยาจับกันระหว่างสี HNB อีสระกับสาร PEI ขึ้นได้ นอกจากนี้ยังสามารถดูดซับสารได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษที่ไม่ได้ตรึงและตรึงสาร PEI พบว่ากระดาษที่ตรึงสาร PEI สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีได้จากไม่มีสีเป็นสีฟ้าซึ่งเกิดจากการจับกันระหว่างสาร HNB ภายในสารละลาย LAMP กับสาร PEI ที่ตรึงบนกระดาษ โดยความเข้มข้นของสาร PEI ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP บนชุดตรวจ dPADs คือ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ที่เกิดจากการตรึงสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้งลงบนส่วนตรวจวัด เพื่อให้สาร PEI ถูกตรึงเฉพาะพื้นที่ส่วนตรวจวัดและสามารถจับกับสาร HNB ในปฏิกิริยา LAMP ได้ทั้งหมด โดยไม่ขัดขวางการไหลของสารละลาย LAMP โดยเฉพาะในปฏิกิริยาผลบวกที่มีตะกอนแมกนีเซียม ไฮดรอกไซด์ (Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) ซึ่งอาจขัดขวางการเคลื่อนที่ของสี HNB ส่งผลให้อัตราการไหลของปฏิกิริยาผลบวกช้ากว่าปฏิกิริยาผลลบ ดังนั้นการเลือกใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 113 มาสร้างชุดตรวจ dPADs และตรึงสาร PEI ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) จึงเหมาะสมและสามารถตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบเชิงคุณภาพ (Qualitative detection) แต่เมื่อ

ต้องการพัฒนาใช้ชุดตรวจสามารถตรวจวัดแบบกึ่งปริมาณได้ จึงทดสอบหาชนิดของตัวชะ เพื่อช่วยให้สารละลาย LAMP เคลื่อนที่มาทำปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ในพื้นที่ส่วนตรวจวัด และช่วยล้างสีของ HNB ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสาร PEI ออกจากพื้นที่ส่วนตรวจวัด พบว่าชุดตรวจ dPADs ที่ใช้น้ำ Milli-Q เป็นตัวชะช่วยล้างสี HNB ที่ไม่ได้จับกับสาร PEI ให้หลุดออกจากบริเวณส่วนตรวจวัดได้ดีกว่าน้ำเกลือ โดยไม่รบกวนการเคลื่อนที่ของสี HNB สังเกตได้จากชุดตรวจ dPADs ของปฏิกิริยาผลบวกทำให้เห็นระยะทางการเคลื่อนที่สีของปฏิกิริยาผลลบและผลบวกแตกต่างกันมากกว่าการใช้น้ำเกลือเป็นตัวชะ ต่อมาจึงทดสอบหาปริมาณของน้ำ Milli-Q เพื่อช่วยเพิ่มแรงดึงตามรูขนาดเล็ก (Capillary force) ของกระดาษทำให้สารเคลื่อนที่ได้ดียิ่งขึ้น พบว่าน้ำ Milli-Q ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเหมาะสมต่อการชะล้างในปฏิกิริยาผลลบและผลบวก เพราะช่วยทำให้สี HNB เคลื่อนที่บนกระดาษได้ดีขึ้นภายในระยะเวลาดูชัด 5 นาทีเท่านั้น

ผลการศึกษาคูณสมบัติของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นได้ทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ โดยตรวจสอบความน่าเชื่อถือของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *Escherichia coli* ด้วยเทคนิค LAMP จึงทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และทดสอบการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย 2% Agarose gel electrophoresis, การเปลี่ยนแปลงสีของ HNB ภายในหลอดทดลองและชุดตรวจ dPADs พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Escherichia coli* เนื่องจากปฏิกิริยา LAMP ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* เกิดแถบ (Band) ลักษณะรูปแบบคล้ายขั้นบันได (Ladder-like patterns) ขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และมีการเปลี่ยนแปลงสีของสาร HNB ภายในหลอดทดลองจากสีม่วงเป็นสีฟ้า ซึ่งแสดงว่ามี การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นในปฏิกิริยา และเมื่อนำมาตรวจวัดด้วยชุดตรวจ dPADs พบว่าการเคลื่อนที่ของสี HNB ในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* มีระยะทางยาวกว่าในปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น ดังนั้นไพรเมอร์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา LAMP สามารถเชื่อถือได้ เพราะผลการตรวจสอบปฏิกิริยาที่ใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวสอดคล้องกันทั้ง 3 วิธี ได้แก่ วิธี Agarose gel electrophoresis, การเปลี่ยนแปลงของสี HNB ภายในหลอดทดลอง และชุดตรวจ dPAD ที่พัฒนาขึ้น

เมื่อศึกษาคูณสมบัติความไวของชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้น พบว่าการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาผลบวกที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณน้อยที่สุด  $7.88 \times 10^3$  ต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นการตรวจวัดที่มีความไวน้อยกว่าวิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสี HNB ภายในหลอดทดลองและวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ทว่าการตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจ dPADs นั้น สามารถตรวจวัดแบบเชิงปริมาณ (Quantitative detection) ได้ คือบอกความแตกต่างของปฏิกิริยาผลบวกที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่างกัน โดยสังเกตจากระยะทางการเคลื่อนที่สีที่แตกต่างกันตามความ



เข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ต่างกัน โดยดีเอ็นเอตั้งต้นช่วงปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ - $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรมีความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาซึ่งอยู่ในรูปแบบสมการฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithmic function) ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงเส้น ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.971 เมื่อคำนวณค่า Limit of detection (LOD) ของระยะทางการเคลื่อนที่ที่น้อยที่สุดของสี HNB ในปฏิกิริยาผลบวก เท่ากับ 2.955 มิลลิเมตร และความสามารถในการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นอย่างน้อยที่สุดในปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดตรวจ dPADs เท่ากับ  $4.14 \times 10^3$  สำเนาต่อไมโครลิตร

เมื่อศึกษาความถูกต้องถึงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E.coli* ในช่วงปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ - $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยชุดตรวจ dPADs โดยอาศัยเทคนิค Real-time LAMP พบว่าความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อ *E.coli* ในช่วงปริมาณ  $7.88 \times 10^3$ - $7.88 \times 10^6$  สำเนาต่อไมโครลิตรนั้น สามารถตรวจวัดแบบปริมาณได้ เนื่องจากค่า Threshold cycles (Ct) เพิ่มขึ้นแบบผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP และความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นนั้นมีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.993 โดยความถูกต้องในการอ่านค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB บนชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นด้วยตาเปล่ามีความสัมพันธ์สอดคล้องกันทั้งหมด ( $r^2 = 0.956$ ) กับการวัดด้วยโปรแกรม ImageJ ดังนั้นชุดตรวจ dPADs สามารถอ่านผลการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP จากระยะทางการเคลื่อนที่ของสี HNB ตามตำแหน่งหมายเลขบนชุดตรวจได้ด้วยตาเปล่าดังนั้นในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษสำหรับการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณด้วยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีสามารถใช้งานได้จริง ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจวัดที่เร็ว และสามารถแปลผลการตรวจวัดถึงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่ใส่ในปฏิกิริยาได้ ยิ่งไปกว่านั้นชุดตรวจ dPADs ที่พัฒนาขึ้นสร้างได้ง่าย มีราคาถูก สามารถอ่านผลการตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือในการอ่านผล เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดใหม่ที่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณได้ โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง เพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอของเชื้อที่อยู่ในปฏิกิริยา ดังนั้นอุปกรณ์ตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณบนกระดาษที่พัฒนาขึ้นเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางเลือกใหม่ที่มีราคาถูก สร้างได้ง่ายและเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบกึ่งปริมาณในประเทศที่มีรายได้น้อยหรือกำลังพัฒนาต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้หลักการตรวจวัดข้างต้นประยุกต์ใช้ในการสร้างชุดตรวจ dPADs สำหรับการตรวจวัดหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อชนิดอื่นในปฏิกิริยา LAMP ได้ต่อไป

### รายการอ้างอิง

- (1) Poste G. Molecular diagnostics: a powerful new component of the healthcare value chain. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2001;1(1):1-5.
- (2) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(12):e63.
- (3) Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Biochemical and Biophysical Methods*. 2004;59(2):145-157.
- (4) Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289(1):150-154.
- (5) Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Clinical Microbiology*. 2005;43(6):2895-2903.
- (6) Hill J, Beriwal S, Chandra I, Paul VK, Kapil A, Singh T, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*. 2008;46(8):2800-2804.
- (7) Dukes JP, King DP, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*. 2006;151(6):1093-1106.
- (8) Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW, Culleton RL, et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasites & Vectors*. 2011;4:115.

- (9) Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 2008;3(5):877-882.
- (10) Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*. 2009;46(3):167-172.
- (11) Safavieh M, Ahmed M.U, Sokullu E, Ng A, Braescu L, Zourob M. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection. *Analyst*. 2014;139(2):482-487.
- (12) Cui L, Ge Y, Qi X, Xu G, Li H, Zhao K, et al. Detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by reverse transcription-cross-priming amplification coupled with vertical flow visualization. *Clinical Microbiology*. 2012;50(12):3881-3885.
- (13) Jung JH, Oh SJ, Kim YT, Kim SY, Kim WJ, Jung J, et al. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus. *Analytica Chimica Acta*. 2015;853:541-547.
- (14) Cao Z, Wang H, Wang L, Li L, Jin H, Xu C, et al. Visual Detection of West Nile Virus Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Vertical Flow Visualization Strip. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:554.
- (15) Yang Y, Li Q, Wang S, Chen X, Du A. Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Veterinary Parasitology*. 2016;219:71-76.
- (16) Nurul Najian AB, Engku Nur Syafirah EA, Ismail N, Mohamed M, Yean CY. Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Analytica Chimica Acta*. 2016;903:142-148.

- (17) Zhou Y, Wu J, Lin F, Chen N, Yuan S, Ding L, et al. Rapid detection of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) by loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick method. *Molecular and Cellular Probes*. 2015;29(6):389-395.
- (18) Rigano LA, Malamud F, Orce IG, Filippone MP, Marano MR, do Amaral AM, et al. Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiology*. 2014;14:86.
- (19) Kaewphinit T, Arunrut N, Kiatpathomchai W, Santiwatanakul S, Jaratsing P, Chansiri K. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. *BioMed Research International*. 2013;2013:926230.
- (20) Ding WC, Chen J, Shi YH, Lu XJ, Li MY. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Archives of Virology*. 2010;155(3):385-389.
- (21) Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW. Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. *Virological Methods*. 2008;154(1-2):56-60.
- (22) Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*. 2009;82(1):3-10.
- (23) Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(8):1318-1320.
- (24) Connelly JT, Rolland JP, Whitesides GM. "Paper Machine" for Molecular Diagnostics. *Analytical Chemistry*. 2015;87(15):7595-7601.

- (25) Lathwal S, Sikes HD. Assessment of colorimetric amplification methods in a paper-based immunoassay for diagnosis of malaria. *Lab on a Chip*. 2016;16(8):1374-1382.
- (26) Xu Y, Liu M, Kong N, Liu J. Lab-on-paper micro- and nano-analytical devices: Fabrication, modification, detection and emerging applications. *Microchimica Acta*. 2016;183(5):1521-1542.
- (27) Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica KA, Martinez AW, Striehl P, et al. Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*. 2009;81(20):8447-8452.
- (28) Cate DM, Noblitt SD, Volckens J, Henry CS. Multiplexed paper analytical device for quantification of metals using distance-based detection. *Lab on a Chip*. 2015;15(13):2808-2818.
- (29) Cate DM, Dungchai W, Cunningham JC, Volckens J, Henry CS. Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. *Lab on a Chip*. 2013;13(12):2397-2404.
- (30) Tian T, Li J, Song Y, Zhou L, Zhu Z, Yang CJ. Distance-based microfluidic quantitative detection methods for point-of-care testing. *Lab on a Chip*. 2016;16(7):1139-1151.
- (31) Lu Y, Shi W, Qin J, Lin B. Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing. *Analytical Chemistry*. 2009;82(1):329-335.
- (32) Poolman JT, Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *Infectious Diseases*. 2016;213(1):6-13.
- (33) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):123-140.

- (34) Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(4):822-880.
- (35) Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 2003;301(5629):105-107.
- (36) Astbury WT. Molecular Biology or Ultrastructural Biology ? *Nature*. 1961;190(4781):1124.
- (37) Christopher. Introduction to Molecular Diagnostics [updated 26 September 2015; cited 4 October 2015]. Available from: <http://phthisdiagnostics.com/introduction-to-molecular-diagnostics/>.
- (38) AdvamedDx, DxInsights. Introduction to Molecular diagnostics 2013 [cited 16 August 2015]. Available from: [https://dx.advamed.org/sites/dx.advamed.org/files/resource/advameddx\\_dxinsights\\_pdf.pdf](https://dx.advamed.org/sites/dx.advamed.org/files/resource/advameddx_dxinsights_pdf.pdf).
- (39) Rapley R. Basic Techniques in Molecular Biology. In: Walker J, Rapley R, editors. *Medical Biomedical Handbook*: Humana Press; 2005. p. 1-12.
- (40) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-1354.
- (41) Fang X-e, Li J, Chen Q. One new method of nucleic acid amplification—Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virologica Sinica*. 2008;23(3):167-172.
- (42) Fakruddin M. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)—an alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Research Publications Journal*. 2011;5(4):425-439.
- (43) Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991;350(6313):91-92.

- (44) Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*. 1992;20(7):1691-1696.
- (45) Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, Luo J, Barany F, Batt CA. Ligase chain reaction (LCR)--overview and applications. *PCR Methods and Applications*. 1994;3(4):S51-S64.
- (46) Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics*. 1998;19(3):225-232.
- (47) Fakruddin M, Mannan KSB, Chowdhury A, Mazumdar RM, Hossain MN, Islam S, et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *J Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2013;5(4):245.
- (48) Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2002;16(3):223-229.
- (49) SITE EG. The principle of LAMP method : Design of primers [cited 6 September 2015]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>.
- (50) SITE EG. The principle of LAMP method : Basic principle [cited 6 September 2015]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>.
- (51) Gibson NJ, Newton CR, Little S. A colorimetric assay for phosphate to measure amplicon accumulation in polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997;254(1):18-22.
- (52) Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Biochemical and Biophysical Methods*. 2004;59(2):145-157.

- (53) Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao P, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. 2008;18(6):407-421.
- (54) Atkinson A, Jack GW. Precipitation of nucleic acids with polyethyleneimine and the chromatography of nucleic acids and proteins on immobilised polyethyleneimine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1973;308(7):41-52.
- (55) Cordes RM, Sims WB, Glatz CE. Precipitation of nucleic acids with poly(ethyleneimine). *Biotechnology Progress*. 1990;6(4):283-285.
- (56) Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology*. 2006;6:3.
- (57) Dragan A, Pavlovic R, McGivney J, Casas-Finet J, Bishop E, Strouse R, et al. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Fluorescence*. 2012;22(4):1189-1199.
- (58) Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, Onuma M. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *Clinical Microbiology*. 2005;43(4):1646-1650.
- (59) Nakamura N, Fukuda T, Nonen S, Hashimoto K, Azuma J, Gemma N. Simple and accurate determination of CYP2D6 gene copy number by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Analytica Chimica Acta*. 2010;411(7):568-573.
- (60) Nakamura N, Ito K, Takahashi M, Hashimoto K, Kawamoto M, Yamanaka M, et al. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Analytical Chemistry*. 2007;79(24):9484-9493.



- (61) Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glokler JF. Shining a light on LAMP assays- a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*. 2015;58(4):189-194.
- (62) Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(12):e103.
- (63) Zhang F, Wang R, Wang L, Wu J, Ying Y. Tracing phosphate ions generated during DNA amplification and its simple use for visual detection of isothermal amplified products. *Chemical Communications*. 2014;50(92):14382-14385.
- (64) Nzelu CO, Gomez EA, Cáceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Tropica*. 2014;132:1-6.
- (65) Chen Q, Yuan L, Wan J, Chen Y, Du C. Colorimetric detection of hepatitis E virus based on reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay. *Virological Methods*. 2014;197:29-33.
- (66) Parolo C, Merkoçi A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(2):450-457.
- (67) Hu J, Wang S, Wang L, Li F, Pingguan-Murphy B, Lu TJ, et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;54:585-597.
- (68) Stevens DY, Petri CR, Osborn JL, Spicar-Mihalic P, McKenzie KG, Yager P. Enabling a microfluidic immunoassay for the developing world by integration of on-card dry reagent storage. *Lab on a Chip*. 2008;8(12):2038-2045.
- (69) Cassano CL, Fan ZH. Laminated paper-based analytical devices (LPAD): fabrication, characterization, and assays. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2013;15(2):173-181.

- (70) Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-cost printing of poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*. 2008;80(9):3387-3392.
- (71) Fenton EM, Mascarenas MR, López GP, Sibbett SS. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2008;1(1):124-129.
- (72) Abe K, Suzuki K, Citterio D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*. 2008;80(18):6928-6934.
- (73) Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*. 2011;85(5):2587-2593.
- (74) Zhu W-J, Feng D-Q, Chen M, Chen Z-D, Zhu R, Fang H-L, et al. Bizenzyme colorimetric detection of glucose with self-calibration based on tree-shaped paper strip. *Sensors Actuators B: Chemical*. 2014;190:414-418.
- (75) Ruecha N, Rangkupan R, Rodthongkum N, Chailapakul O. Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/polyvinylpyrrolidone/polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;52:13-19.
- (76) Scida K, Li B, Ellington AD, Crooks RM. DNA detection using origami paper analytical devices. *Analytical Chemistry*. 2013;85(20):9713-9720.
- (77) Dineva MA, Candotti D, Fletcher-Brown F, Allain J-P, Lee H. Simultaneous visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay. *Clinical Microbiology*. 2005;43(8):4015-4021.
- (78) Carrilho E, Phillips ST, Vella SJ, Martinez AW, Whitesides GM. Paper microzone plates. *Analytical Chemistry*. 2009;81(15):5990-5998.

- (79) Yamada K, Henares TG, Suzuki K, Citterio D. Distance-Based Tear Lactoferrin Assay on Microfluidic Paper Device Using Interfacial Interactions on Surface-Modified Cellulose. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015;7(44):24864-24875.
- (80) Wei X, Tian T, Jia S, Zhu Z, Ma Y, Sun J, et al. Microfluidic Distance Readout Sweet Hydrogel Integrated Paper-Based Analytical Device ( $\mu$ DiSH-PAD) for Visual Quantitative Point-of-Care Testing. *Analytical Chemistry*. 2016;88(4):2345-2352.
- (81) Khan MS, Thouas G, Shen W, Whyte G, Garnier G. Paper Diagnostic for Instantaneous Blood Typing. *Analytical Chemistry*. 2010;82(10):4158-4164.
- (82) Ballerini DR, Li X, Shen W. An inexpensive thread-based system for simple and rapid blood grouping. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011;399(5):1869-1875.
- (83) Noiphung J, Talalak K, Hongwarittorn I, Pupinyo N, Thirabowonkitphithan P, Laiwattanapaisal W. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;67:485-489.
- (84) Ohsumi M, Sekiya T, Nishimura S, Ohki M. Nucleotide sequence of the regulatory region of malB operons in *E. coli*. *Biochemistry*. 1983;94(1):243-247.
- (85) Safavieh M, Ahmed MU, Tolba M, Zourob M. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of *Escherichia coli*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;31(1):523-528.
- (86) Liu C, Mauk MG, Bau HH. A disposable, integrated loop-mediated isothermal amplification cassette with thermally actuated valves. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2011;11(2):209-220.
- (87) Aoi Y, Hosogai M, Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *Biotechnology*. 2006;125(4):484-491.



### 1. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด Luria-Bertani (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วย 1N NaOH ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar) ให้เตรียมส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมผงวุ้น 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วย 1N NaOH ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอจนเย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

### 2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate-EDTA (TAE) สำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

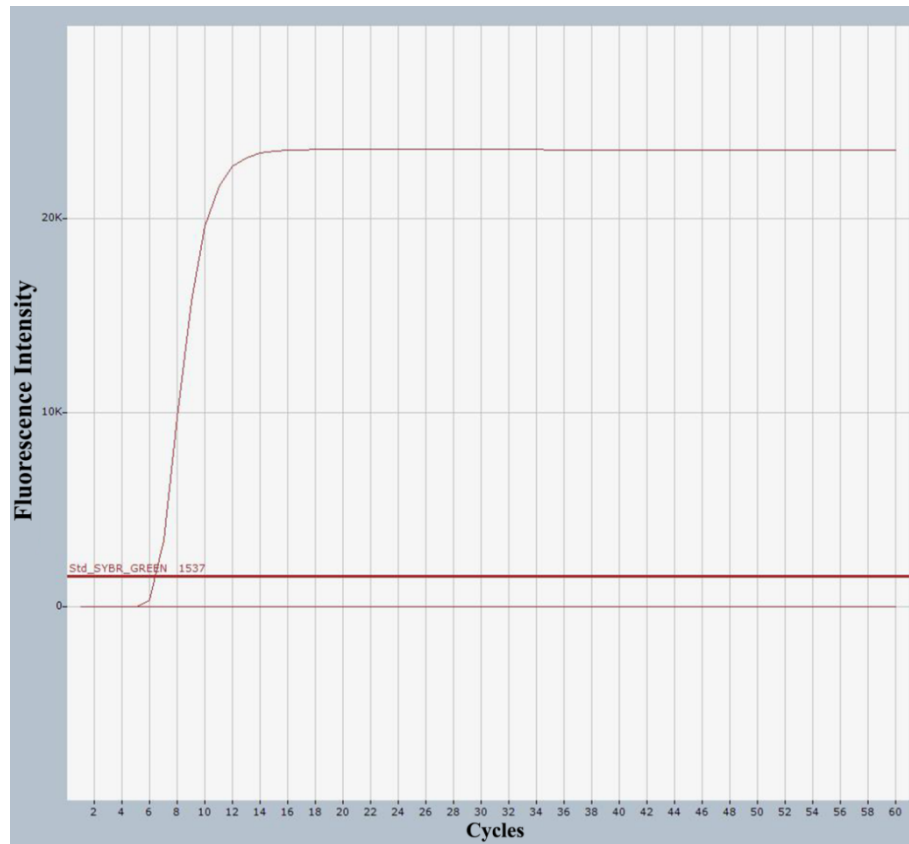
(2 M Tris, 50 mM EDTA)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA, pH 8.0	100	มิลลิลิตร

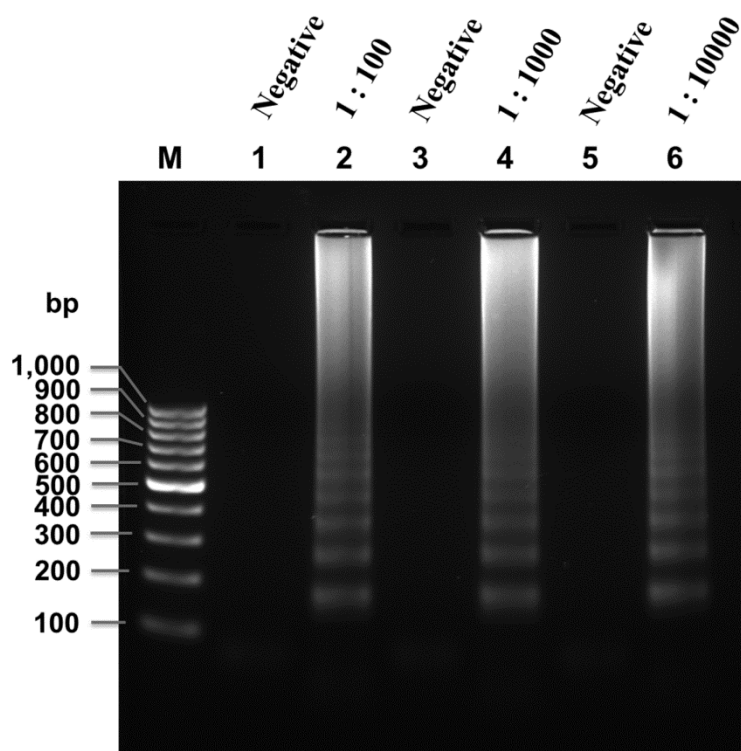
ละลายส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 3. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสาร SYBR Green I ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบ Real-time

การทดสอบหาความเข้มข้นของสาร SYBR Green I ที่ใช้ในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบ Real-time เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด เนื่องจากเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสถานะจริงที่ใช้ นั่นคือเครื่อง Exicycler™ 96 Real-Time ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดสำหรับเทคนิค Real-time PCR ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเรืองแสงที่ใช้ตรวจวัดปฏิกิริยา เพราะปฏิกิริยา LAMP เป็นปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว และขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะตรวจวัดได้มากกว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นด้วยเทคนิค PCR ดังนั้นจึงต้องทดสอบหาความเข้มข้นของสาร SYBR Green I ที่เหมาะสมในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP และเหมาะสมกับความสามารถในการตรวจวัดความเข้มข้นของสารเรืองแสงของเครื่องที่ใช้ เมื่อทดสอบสาร SYBR Green I ที่เจือจางความเข้มข้น 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรในปฏิกิริยา LAMP พบว่าปฏิกิริยาที่มีสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:100 เท่านั้นที่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP แบบ Real-time ได้ด้วยเครื่อง Exicycler™ 96 Real-Time ดังแสดงในรูปที่ ก.1 เพราะเมื่อนำมาตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis พบว่าในปฏิกิริยาผลบวกที่มีสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 อยู่ นั้นเกิดแถบลักษณะรูปแบบคล้ายขั้นบันไดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ ก.2 แสดงให้เห็นว่ามีปฏิกิริยา LAMP เกิดขึ้นแต่ไม่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้ด้วยสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:1,000 และ 1:10,000



รูปที่ ก.1 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) กับจำนวนรอบในการเกิดปฏิกิริยา (Cycles) ของปฏิกิริยา LAMP ที่สาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 และปฏิกิริยาผลลบ (ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น)



รูปที่ ก.2 แสดงผลการตรวจวัดด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000: ช่อง M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, ช่อง 1 และ 2 คือปฏิกิริยาผลลบและผลบวกที่มีสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:100, ช่อง 3 และ 4 คือปฏิกิริยาผลลบและผลบวกที่มีสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:1,000 และช่อง 5 และ 6 คือปฏิกิริยาผลลบและผลบวกที่มีสาร SYBR Green I เจือจางความเข้มข้น 1:10,000 ตามลำดับ



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวไอรินทร์ หงส์วรสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 ตุลาคม 2531 ในกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และทำงานเป็นนักเทคนิคการแพทย์ ที่โรงพยาบาลสมิติเวช ธนบุรี เป็นระยะเวลา 1 ปี ก่อนจะเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 ซึ่งในขณะที่ศึกษานั้นได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเฉพาะค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัย :

(1) Songjaroen, T.; Noiphung, J.; Hongwarittorn, I.; Talalak, K.; Laiwattanapaisal, W. Assay time reduction and thermal stability improvement of a low-cost, wax-dipping paper-based microfluidic device. *Chemical & Pharmaceutical Research*. 6 (2014).

(2) Noiphung, J.; Talalak, K.; Hongwarittorn, I.; Pupinyo, N.; Thirabowonkitphithan, P.; Laiwattanapaisal, W. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. *Biosensors and Bioelectronics*. 67 (2015): 485-489.