

การพัฒนา QCM-DNA ไบโอเซนเซอร์เพื่อการตรวจหา DNA methylation ของจีน p16 ในมะเร็งท่อน้ำดี

ปรีดา ปรการกมานันท์¹ ปริญญา ประสงค์ดี¹ เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์¹ จุรีรัตน์ ดาดวง¹ จำรัส พร้อมมาศ²
พัชรี เจริญนัยกุล^{1*}

บทคัดย่อ

การเกิด DNA methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของกลุ่มยีนต้านมะเร็ง เป็นกลไกที่พบได้บ่อยในมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดีส่งผลให้กลุ่มยีนดังกล่าวซึ่งมีหน้าที่ในการป้องกันการเกิดมะเร็งไม่สามารถแสดงออกได้ เทคนิค methylation-specific PCR (MSP) เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจหาการเกิด DNA methylation เนื่องจากใช้เทคนิค PCR ช่วยเพิ่มความไว แต่ MSP ยังคงมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ที่มีหลายขั้นตอน ใช้เวลานาน จำเป็นต้องใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งปริมาณมาก รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ยังเป็นสารอันตราย การศึกษาจึงได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจหา DNA methylation ของจีน p16 โดยใช้หลักการพื้นฐานของ quartz crystal microbalance (QCM) ซึ่งเปรียบเสมือนเครื่องวัดน้ำหนักระดับนาโนกรัม การจับกันระหว่างโพรบ (probe) ที่ถูกตรึงบนผิว QCM กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีเบสคู่สมกัน ทำให้มวลรวมบน QCM เพิ่มขึ้นและแปลผลจากการวัดการลดลงของความถี่ในการสั่นของควอตซ์ โดยใช้ตัวอย่างที่เตรียมจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ DNA methylation ของจีน p16 เป็นต้นแบบในการทดสอบกับไบโอเซนเซอร์ที่ติดด้วยโพรบที่จำเพาะกับ methylation และ unmethylation ดีเอ็นเอของจีน p16 ผลการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการตรึงโพรบบนไบโอเซนเซอร์ พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของ mercaptopropionic acid (MPA), avidin และโพรบที่เหมาะสม คือ 10 mM, 1 mg/dL และ 1 μ M ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ p16 methylation และ p16 unmethylation พบว่าไบโอเซนเซอร์สามารถตรวจจับดีเอ็นเอผลิตผลโดยให้ผลสอดคล้องกับ agarose gel electrophoresis และมีความไวในการตรวจสูงกว่าถึง 1,000 เท่า มีความเที่ยงตรงที่ยอมรับได้ไม่เกินร้อยละ 15 การทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลลบจาก methylation และ unmethylation ให้ค่า cut-off น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 Hz และไม่พบการเกิด cross hybridization ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่จำเพาะ นอกจากนี้ QCM ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถใช้งานซ้ำได้ถึง 3 ครั้ง โดยยังคงปริมาณสัญญาณที่วัดได้ โดยสรุปการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า ต้นแบบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาบน QCM ดังกล่าวให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานเดิม โดยมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถลดเวลาในการวิเคราะห์ผลให้เหลือเพียง 5 นาที อย่างไรก็ตามต้นแบบ QCM ไบโอเซนเซอร์นี้ยังต้องได้รับการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพโดยการบูรณาการเข้ากับเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายไปพร้อมกับการตรวจติดตามบนเซนเซอร์ต่อไป

คำสำคัญ : เครื่องวัดน้ำหนักระดับนาโน, ดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน, ดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*ผู้รับผิดชอบบทความ

The development of QCM-DNA sensor for p16 methylation detection in cholangiocarcinoma

Preeda Prakrankamanant¹, Parinya Prasongdee¹, Temduang Limpaboon¹, Jureerat Daduang¹, Chamras Promptmas², Patcharee Jearanaikoon^{1*}

Abstract

Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes are associated with an epigenetically mediated gene silencing, which is a common feature in various human cancers including cholangiocarcinoma. Even though methylation-specific PCR (MSP) has been accepted for its sensitivity to detect methylation in cancerous tissues, this technique is time-consuming, labor-intensive and usage of carcinogenic chemicals. To overcome this limitation, DNA biosensor using quartz crystal microbalance (QCM) was developed in this study. QCM, a mass sensor, is rapidly becoming an important tool for biological analysis. p16 methylation in KKU-M213 CCA cell line was investigated as a model for protocol validation. In principle, specific biotinylated DNA probe were immobilized via avidin-biotin system on gold surface of a QCM device. The specific hybridization between immobilized probe with methylated and unmethylated p16 products were monitored by decreasing in frequency due to mass change. The results showed that the optimal concentrations of mercaptopropionic acid (MPA), avidin, and 5'-biotinylated DNA probe were 10 mM, 1 mg/dL and 1 μ M, respectively. The oscillation signal obtained from methylation or unmethylation positive samples were clearly discriminated from negative ones. The cut-off values were calculated from negative methylation and unmethylation at 30 Hz with preferable lower than 15 % precision. The QCM sensor can detect positive signal at 1,000 fold dilution compared to agarose gel electrophoresis. No cross-hybridization was observed when unmethylation product was performed on methylation sensor and vice versa. Moreover, QCM can be reused for at least 3 times with considerable signal reduction. In conclusion, our developed QCM sensor for p16 methylation illustrated an acceptable performance compared to conventional method. The detection process can be reduced within 5 minutes. However, this prototype sensor as well as mini-PCR integration device for real time analysis should be further developed.

Keywords: Quartz crystal microbalance, DNA methylation, DNA biosensor

¹Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

²Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

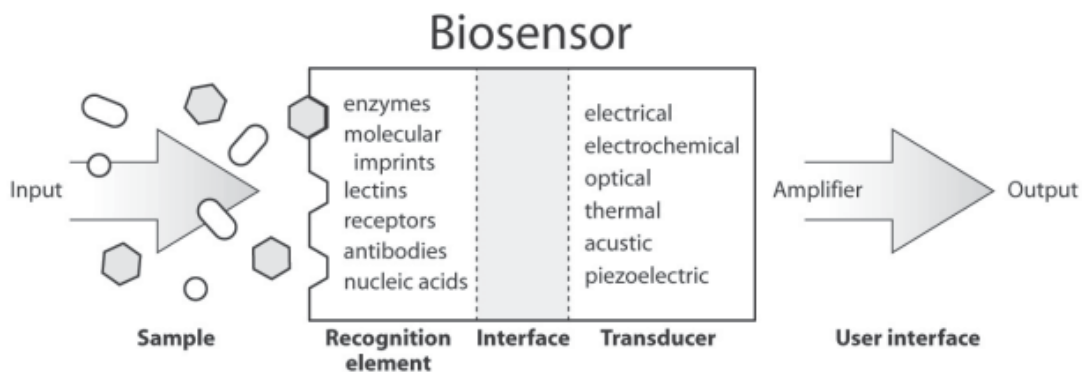
*Corresponding author (email: patjea@kku.ac.th)

บทนำ

เป็นที่ทราบกันว่า DNA methylation ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) และในกลุ่มยีนซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing gene) เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ยีนเหล่านี้หยุดการแสดงออก (gene silencing) ซึ่งเป็นอุปสรรคที่พบได้บ่อยในมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี⁽¹⁻³⁾ แม้ในปัจจุบันการตรวจเพื่อติดตามการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค methylation-specific PCR (MSP) จะเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูง แต่ยังมีข้อจำกัดด้านความไวเนื่องจากใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งในปริมาณมาก มีความยุ่งยากหลายขั้นตอน ใช้เวลานาน และต้องสัมผัสกับสารเคมีอันตรายที่อาจก่อให้เกิดมะเร็ง⁽⁴⁾ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์ จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อเพิ่มความไวและลดเวลาในการตรวจ อีกทั้งเพิ่มความยืดหยุ่นในการตรวจกรองในภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ใช้เพียงอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่มีราคาไม่สูง และไม่ต้องการทักษะของผู้ตรวจและ

อุปกรณ์ทางด้าน molecular biology อีกต่อไป

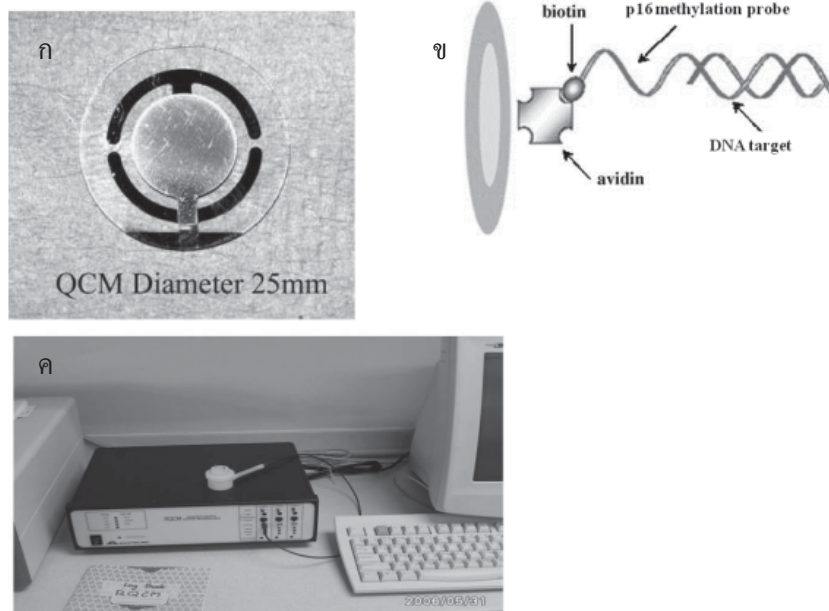
ในปัจจุบันการพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลต่างๆ โดยเฉพาะดีเอ็นเอได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรคที่สำคัญทางการแพทย์ เช่น โรคมะเร็ง โรคติดเชื้อต่างๆ รวมทั้งวินิจฉัยโรคประจำตัว ไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีองค์ประกอบที่สำคัญสองส่วนคือ ไบโอรีเซพเตอร์ (bioreceptor) และ ทรานสดิวเซอร์ (transducer) ไบโอรีเซพเตอร์จะถูกออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการตรวจวัด⁽⁵⁾ เมื่อไบโอรีเซพเตอร์ทำปฏิกิริยากับสารที่ตรวจวัดจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณทางเคมีหรือฟิสิกส์และส่งต่อมายังทรานสดิวเซอร์เพื่อแปลงสัญญาณทางเคมีหรือฟิสิกส์เหล่านี้ให้กลายเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าที่สามารถแปลเป็นตัวเลขด้วยเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างและหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์⁽⁵⁾

Quartz crystal microbalance (QCM) เป็นไบโอ-เซนเซอร์ระบบหนึ่งที่สามารถตรวจหาดีเอ็นเอโดยใช้หลักการจับกัน (hybridization) ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับโพรบ (probe) บนผิวของ QCM ทำให้มวลรวมบน QCM เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความถี่ในการสั่นของควอตซ์ลดลง จากนั้นจึงแปลงสัญญาณความถี่เป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ในการแปลผล ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่กับมวลที่มีการเปลี่ยนแปลงไป

บนผิวของ QCM สามารถอธิบายได้โดยสมการของ Sauerbrey ($F = -2.3 \times 10^6 f_0^2 \frac{m}{A}$; f_0 คือความถี่เริ่มต้นของควอตซ์, A คือ พื้นที่ผิวที่เป็นอิเล็กโทรดของควอตซ์)⁽⁶⁾ ดัง **รูปที่ 2** ซึ่งจากสมการนี้สามารถนำความถี่ที่เปลี่ยนแปลงมาประเมินจำนวนโมเลกุลที่เกาะอยู่บนควอตซ์ได้ ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีความไวสูง สามารถตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายได้โดยตรง และไม่ต้องมีการติดฉลากดีเอ็นเอเป้าหมาย



รูปที่ 2 (ก) แสดงควอตซ์ขนาด 9 MHz ชนิด AT-cut ที่มีทองเป็นผิวอิเล็กโทรด (ข) แสดงหลักการในการตรวจหา methylation ของจีน p16 โดย QCM ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้หลักการของ DNA hybridization (ค) เครื่องวัดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของควอตซ์รุ่น RQCM (ผลิตภัณฑ์บริษัท Maktek ประเทศสหรัฐอเมริกา)

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ การพัฒนาระบบ QCM ไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจจำแนกการเกิด DNA methylation และ unmethylation ของจีน p16 โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M213 ซึ่งพัฒนามาจากเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เป็นตัวอย่างเริ่มต้นในการเตรียมผลิตภัณฑ์ให้ผลบวกจากการทำ MSP เพื่อนำ

มาจำแนกเป็น DNA methylation และ unmethylation โดย QCM ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาจะถูกประเมินคุณสมบัติด้านความไว (sensitivity) ความเที่ยงตรง (precision) ความจำเพาะ (specificity) และสามารถในการใช้ซ้ำ (reusability)

วัสดุและวิธีการศึกษา

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213

ได้รับความอนุเคราะห์ในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 จากรองศาสตราจารย์บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์โดยใช้ Wizard® SV genomic DNA extraction kits (ผลิตภัณฑ์ของ Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ในการตรวจหาภาวะ DNA methylation ของจีน p16

QCM ไบโอเซนเซอร์

ใช้ควอตซ์ที่มีความถี่ช่วง 9 MHz ชนิด AT-cut ที่มีผิวหน้าเคลือบด้วยทอง โดยมีพื้นที่ทองเท่ากับ 1.34 ตารางเซนติเมตร (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Maxtek ประเทศสหรัฐอเมริกา) วัดความเปลี่ยนแปลงของความถี่ด้วยเครื่อง Quartz Crystal Microbalance รุ่น RQCM (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Maxtek ประเทศสหรัฐอเมริกา)

การออกแบบโพรบสำหรับตรึงบนผิว QCM

ใช้โอลิโกโพรบที่พัฒนามาจากการศึกษาของ Herman และคณะ⁽⁷⁾ จำนวน 2 สาย คือ methylated probe (5'-TTTTTTTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') และ unmethylated probe (5'-TTTTTTTTGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') โดยติดไบโอดีนไว้ที่ปลายด้าน 5' (สังเคราะห์โดยบริษัทแปซิฟิกชายน ประเทศไทย)

การตรวจหาการเกิด DNA methylation ของจีน p16 ด้วยเทคนิค MSP

เติมดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปลงด้วยไบซัลไฟท์⁽⁷⁾ จำนวน 100 ng ลงในส่วนผสม PCR 25 μ L จำนวน 2 หลอด คือ methylated และ unmethylated reaction แต่ละหลอดประกอบไปด้วย 1X PCR buffer, 200 μ M ของ dNTPs, 10 mM ของ 2-mercaptoethanol, 3.0 mM ของ $MgCl_2$, 5 pmole

ของ methylated primers (Forward primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGTTTATTAGAGGGTGGGGCGG ATCGC-3'; Reverse primer : 5'- GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3') หรือ unmethylated primers (Forward primer: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGATTGT-3'; Reverse primer: 5'-GCGGATAACAATTTTCACACAGGCAACCCCAAACCACAACCATAA-3') และ 2 units ของ *Taq* polymerase ทำการเพิ่มจำนวนรวม 35 รอบ โดยสภาวะที่ใช้เพิ่มจำนวนในแต่ละรอบ คือ denaturation ที่ 95 °C 5 นาที annealing ที่ 61 °C 30 วินาทีสำหรับ methylated primer และ 59 °C 30 วินาทีสำหรับ unmethylated primer และ extension ที่ 72 °C 30 วินาที

การเตรียม QCM ไบโอเซนเซอร์

นำ QCM มาล้างผิวทองด้วยสารละลาย Piranha (ประกอบด้วย 1 ส่วน 30% H_2O_2 ต่อ 3 ส่วน H_2SO_4) นาน 2 นาทีเพื่อกำจัดคราบไขมัน จากนั้นเติม mercaptopropionic acid (MPA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล้างด้วยน้ำกลั่น เปิดหมุ่ฟุ้งชั้นบนผิวอิเล็กโทรดด้วย 200 mM ของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC และ 50 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตรึงผิวอิเล็กโทรดด้วยโปรตีน avidin ที่ละลายใน HEPES buffer เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ล้าง avidin ส่วนเกินด้วย HEPES buffer ปิดกั้นหมู่ฟุ้งชั้นที่ไม่จับกับ avidin ด้วย 1 mM ethanolamine pH 8.0 จากนั้นเติมโพรบที่ติดฉลากด้วยไบโอดีนจำนวน 50 μ L เป็นระยะเวลา 20 นาที โดยโพรบจะถูกตรึงบนผิว QCM ซึ่งสามารถจับอย่างจำเพาะระหว่าง avidin-biotin interaction เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าวจะได้ QCM ไบโอเซนเซอร์ที่พร้อมใช้ตรวจจำแนก p16 methylation

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม QCM ไบโอเซนเซอร์ ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายชนิด methylation และ unmethylation

ในการเตรียม QCM ไบโอเซนเซอร์ ได้ตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MPA โปรตีน avidin และโพรบ เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ในระบบ QCM

MPA เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในการเตรียมพื้นผิวทองบน QCM ได้ทำการปรับความเข้มข้นของ MPA เป็น 5 ระดับความเข้มข้นคือ 1, 5, 10, 15 และ 20 mM โดยความเข้มข้นของ MPA ที่เหมาะสมคือจุดที่ทำให้ความถี่เปลี่ยนแปลง (F) มากที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของ avidin ที่มากเกินไป (2 mg/dL) โดยแต่ละค่าความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปรตีน avidin ได้ศึกษาความเข้มข้นของ avidin เป็น 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/dL ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวัด F โดยความเข้มข้นของ avidin ที่เหมาะสมจะให้ค่า F มากที่สุด แต่ละค่าความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ methylated และ unmethylated probe ทำโดยปรับความเข้มข้นของทั้งสองโพรบเป็น 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 และ 1.5 μ M ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการวัด F เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลัง probe immobilization ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะให้ค่า F มากที่สุด โดยแต่ละค่าความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง เซนเซอร์ที่ติด methylated probe และ unmethylated probe เรียก methylated เซนเซอร์และ unmethylated เซนเซอร์ตามลำดับ

การประเมินประสิทธิภาพของ QCM ไบโอเซนเซอร์

ในการประเมินประสิทธิภาพของ QCM ไบโอเซนเซอร์ ชนิด methylated QCM ไบโอเซนเซอร์ ใช้ดีเอ็นเอผลิตผลที่ให้ผลบวกต่อ methylated primer ในปฏิกิริยา MSP เป็น positive control ในทางกลับกัน

สำหรับการทดสอบ unmethylated QCM ไบโอเซนเซอร์ โดยใช้ดีเอ็นเอผลิตผลจาก unmethylated MSP เป็น positive control ทำการเจือจางผลิตผลด้วยอัตราส่วน 1:100 แล้ว denature ด้วยความร้อนที่ 95 °C นาน 10 นาที แช่ด้วยน้ำแข็ง 5 นาทีก่อนที่จะหยดลงบนเซนเซอร์ QCM ไบโอเซนเซอร์ ที่เตรียมได้จากการใช้สภาวะที่เหมาะสมจะถูกประเมินคุณสมบัติด้านต่างๆดังต่อไปนี้

1. การตรวจจำแนก p16 methylation และ unmethylation ด้วย QCM ไบโอเซนเซอร์

นำ methylated QCM ไบโอเซนเซอร์และ unmethylated QCM ไบโอเซนเซอร์ ที่เตรียมได้มาทดสอบความสามารถในการจำแนกภาวะ methylation และ unmethylation ของจีน p16 บันทึกความแตกต่างของค่า F ระหว่าง MSP product ที่ให้ผลบวกกับเซนเซอร์ทั้งสองชนิด

2. การศึกษาหาค่า negative cut off สำหรับการแปลผล

นำ ดีเอ็นเอผลิตผลที่ให้ผลลบ สำหรับ methylated และ unmethylated product ของจีน p16 มาเป็น negative control ในการวัดความแปรปรวนจากการทำซ้ำจำนวน 20 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและ SD เพื่อนำมาหา cut off สำหรับการแปลผลลบเท่ากับค่าเฉลี่ย + 2SD

3. การศึกษาความไวในการตรวจจำแนก p16 methylation ด้วย QCM ไบโอเซนเซอร์

เจือจาง positive control สำหรับ methylated (65 μ g/mL) และ unmethylated product (50 μ g/mL) ของจีน p16 ตั้งแต่ 1:10 - 1:1000 แล้วทำการทดสอบบน QCM เซนเซอร์ทั้งสองชนิด บันทึกค่า F ที่เกิดขึ้นในแต่ละอัตราส่วน พิจารณาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังให้ค่า F มากกว่าค่า negative cut-off

4. การศึกษาความจำเพาะในการตรวจจำแนก p16 methylation ด้วย QCM ไบโอเซนเซอร์

ทดสอบการเกิด cross hybridization ระหว่าง methylated เซนเซอร์ กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น unmethylated และในทางกลับกันทดสอบ unmethylated เซนเซอร์ด้วยดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น methylated การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความถี่ที่ได้ต้องน้อยกว่าค่า negative cut-off จึงจะแปลผลได้ว่าไม่เกิด cross hybridization

5. การศึกษาความเที่ยงตรง (Precision) ในการจำแนก p16 methylation

นำ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น positive control สำหรับ methylated และ unmethylated ของจีน 16 ที่เจือจางด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสมมาเป็นตัวอย่างในการวัดความเที่ยงตรงโดยทดสอบบน QCM เซนเซอร์ทั้งสองชนิด ทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 12 ครั้ง ทำต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 วัน

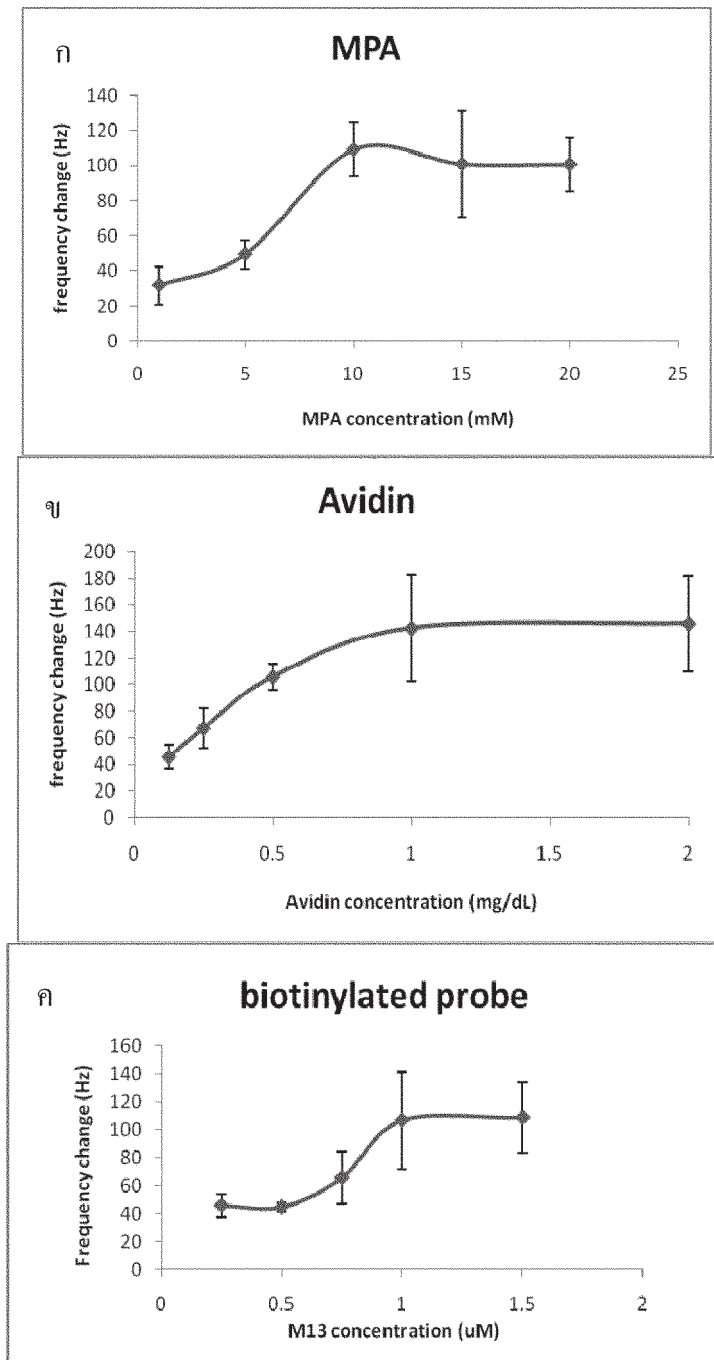
6. การศึกษาความสามารถในการใช้ซ้ำของ QCM ไบโอเซนเซอร์

ล้างผิวควอทซ์ด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 1 mM นาน 1 นาทีเพื่อแยกเบสคู่สมระหว่าง โพรบกับดีเอ็นเอ ทำการเติมดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีเบสคู่สมอีกครั้ง พิจารณาค่า F ที่ได้จะต้องมากกว่าค่า negative cut-off เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Wilcoxon signed-rank test

ผลการศึกษา

สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม QCM ไบโอเซนเซอร์

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่ให้ค่าความถี่ของการเปลี่ยนแปลงสูงสุดคือความเข้มข้นของสาร MPA ในการเตรียมไบโอเซนเซอร์ โปรตีน avidin และโพรบเท่ากับ 10 mM, 1.0 mg/dL และ 1.0 μ M ตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม QCM ไบโอเซนเซอร์ (ก) MPA (ข) avidin (ค) 5'-biotinylated DNA probe

ผลการประเมินประสิทธิภาพของ QCM ไบโอเซนเซอร์

1. การใช้ QCM ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจหาการเกิด p16 methylation ในเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M213

ผลการทดสอบการใช้งานของไบโอเซนเซอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เตรียมได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-

M213 ที่ให้ผลบวกของ p16 methylation พบว่าให้ค่าสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่ในผลิตผลบวก บน methylation เซนเซอร์ เท่ากับ 124.99 ± 18.29 Hz และ unmethylation เซนเซอร์เท่ากับ 106.31 ± 21.86 Hz ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าสัญญาณการเปลี่ยนแปลงความถี่ (F) ในผลิตผลบวกและผลลบบน methylation และ unmethylation เซนเซอร์

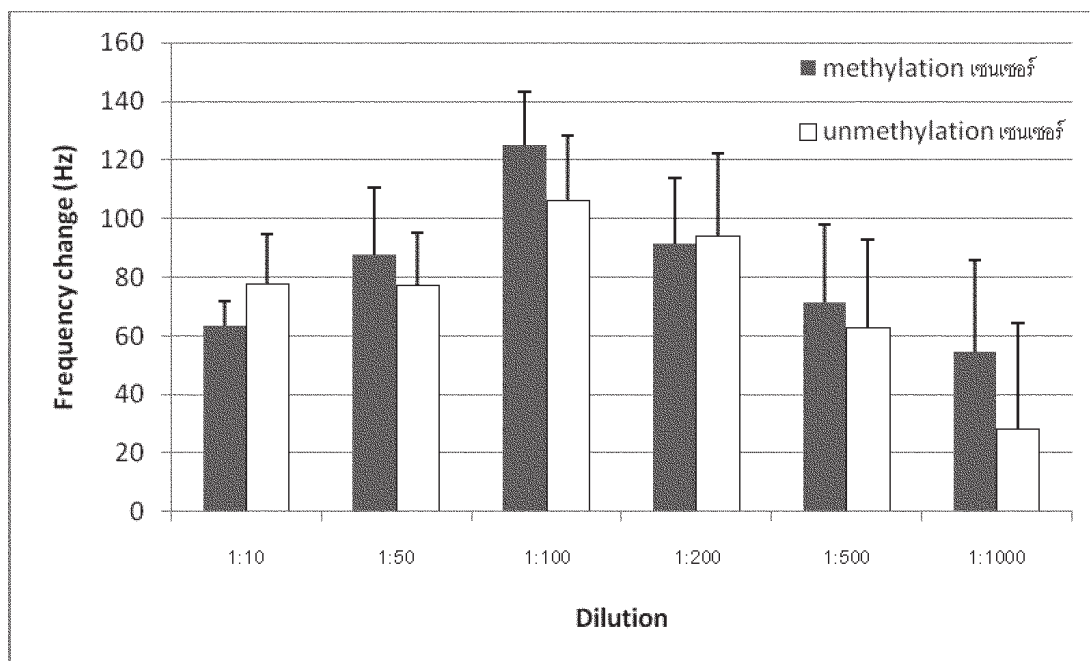
QCM เซนเซอร์	ค่าสัญญาณในตัวอย่างที่ให้ผลบวก mean $\pm$ SD (Hz) (n = 3)	ค่าสัญญาณในตัวอย่างที่ให้ผลลบ mean $\pm$ SD (Hz) (n = 20)
Methylation เซนเซอร์	124.99 ± 18.29	16.88 ± 5.38
Unmethylation เซนเซอร์	106.31 ± 21.86	20.65 ± 5.45

2. ค่า negative cut-off สำหรับแปลผล

จากการศึกษาพบว่าค่าสัญญาณสำหรับดีเอ็นเอที่เป็นผลลบบน methylation และ unmethylation เซนเซอร์ ที่คำนวณจากค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนเท่ากับ 27.64 และ 26.10 Hz ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1 จึงใช้ค่าที่ได้นี้ในการอนุมานตัวอย่างที่จะแปลเป็นผลบวกว่า จะต้องให้สัญญาณบน methylated และ unmethylated QCM เซนเซอร์ไม่น้อยกว่า 30 Hz

3. ความไวในการตรวจหาการเกิด p16 methylation ด้วย QCM ไบโอเซนเซอร์

ผลการเจือจางดีเอ็นเอผลิตผลจาก MSP ก่อนทำการไฮบริไดซ์บน QCM เซนเซอร์ พบว่า QCM ไบโอเซนเซอร์ ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายได้ถึงแม้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเจือจางไปถึง 1:1,000 (รูปที่ 4) โดยที่อัตราส่วนเท่ากับ 1:100 จะให้ค่าปริมาณสัญญาณสูงสุด



รูปที่ 4 แสดงผลการศึกษาความไวในการจำแนก DNA methylation ของ methylation เซนเซอร์และ unmethylation เซนเซอร์ พบว่าความเข้มข้นที่ให้ระดับปริมาณสัญญาณสูงสุด คือ ที่ระดับการเจือจางดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 1:100

4. ความจำเพาะในการจำแนก p16 methylation

ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า F ที่เกิดจากการไฮบริไดซ์ระหว่าง methylated เซนเซอร์ กับ unmethylated product และ unmethylated เซนเซอร์ กับ methylated product นั้นให้ค่าที่อยู่ในช่วงผลลบ

หรือต่ำกว่า negative cut off (ต่ำกว่า 30 Hz) แสดงว่าไม่พบการเกิด cross hybridization ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายคนละชนิดบน QCM ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 2 แสดงค่า F ในการทดสอบคุณสมบัติด้านความจำเพาะโดยไม่พบการเกิด cross hybridization ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายคนละชนิด

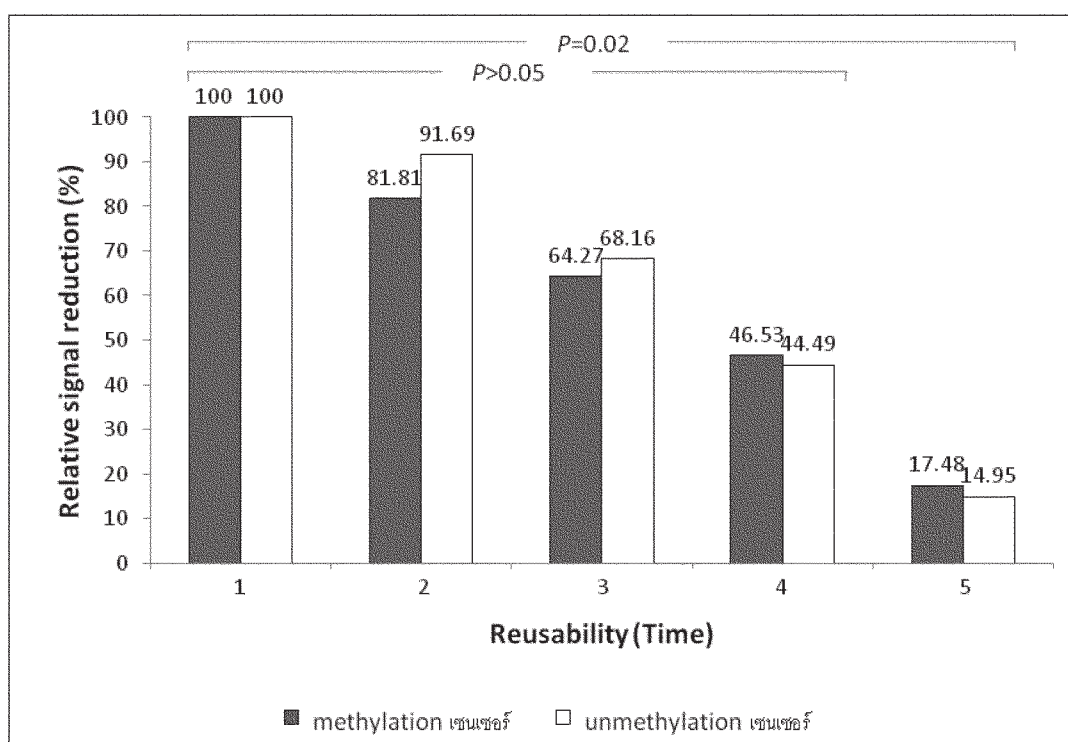
Probe	p16 MSP product (1:100)	Quartz (N)	ค่าเฉลี่ย $\Delta F_{p16} \pm SD$ (Hz)
Unmethylated M13	Methylation - positive	3	12.50 $\pm$ 6.84
	Methylation - negative	3	14.69 $\pm$ 9.29
Methylated M13	Unmethylation - positive	3	10.35 $\pm$ 14.65
	Unmethylation - negative	3	17.27 $\pm$ 10.31

5. ความเที่ยงตรงในการจำแนก p16 methylation ด้วย QCM ไบโอเซนเซอร์

จากการศึกษาความเที่ยงตรงในการใช้และรายงานผล methylation และ unmethylation เซนเซอร์พบว่าให้ความเที่ยงตรงแบบ between-run (n=12) คิดเป็น % CV เท่ากับร้อยละ 14.6 และ 10.4 ตามลำดับ

6. ความสามารถในการใช้ซ้ำของ QCM-DNA sensor

เมื่อทำการวัดความถี่ภายหลังการนำเซนเซอร์มาล้างและจับด้วยดีเอ็นเอเป้าหมาย พบว่าสามารถใช้งานซ้ำได้สูงสุด 3 ครั้ง โดยสัญญาณที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบด้วยสถิติ Wilcoxon signed-rank test ดังแสดงใน รูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงผลการศึกษาความสามารถในการใช้ซ้ำใน methylation และ unmethylation เซนเซอร์

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การตรวจหาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ด้วยหลักการ DNA hybridization นั้นมีข้อดีหลายประการเช่น สามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง อาศัยการออกแบบของเบสคู่สมระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับกับโพรบ การศึกษานี้ได้พัฒนาเซนเซอร์ที่จำเพาะต่อ

การตรวจหา DNA methylation ของจีน p16 โดยโอลิโกโพรบจะถูกตรึงบนผิวอิเล็กโทรดทองของ QCM ไบโอเซนเซอร์ด้วย avidin-biotin interaction โมเลกุลของ avidin จะถูกตรึงด้วยพันธะเคมีบนผิวอิเล็กโทรดทอง จากการคำนวณด้วย Sauerbrey's equation พบว่าที่ความเข้มข้นของ avidin เท่ากับ 1.0 mg/dL ที่

ทำให้เกิดสัญญาณความถี่เปลี่ยนแปลงไปประมาณ 140 Hz คิดเป็นโมเลกุลของ avidin เกาะอยู่บนอิเล็กโทรดทองอยู่ประมาณ 5.2×10^{12} โมเลกุล ซึ่งใกล้เคียงกับการคาดการณ์ทางทฤษฎี⁽⁸⁾ ว่าโมเลกุลของ avidin เกาะอยู่บนผิวอิเล็กโทรดได้เพียง 4.0×10^{12} และเนื่องจาก 1 โมเลกุลของโปรตีน avidin สามารถจับกับโปรบที่ติดฉลากด้วยไบโอดีนได้จำนวนสูงสุด 4 โมเลกุล⁽⁸⁾ ดังนั้นปริมาณโปรบที่ติดไบโอดีนจะถูกตรึงอยู่บนผิวเซนเซอร์เป็น 2.08×10^{13} (คิดจาก $5.2 \times 10^{12} \times 4$) โมเลกุล ซึ่งอยู่ในช่วงค่าที่สามารถยอมรับได้ จากการประมาณความเข้มข้นของโปรบที่ใช้เท่ากับ $1 \mu\text{M}$ ที่ให้สัญญาณของความถี่ประมาณ 110 Hz นั้น คิดเป็นปริมาณโปรบอยู่เกาะอยู่ประมาณ 3.7×10^{13} โมเลกุล

ในการศึกษาเพื่อจำแนกการเกิด DNA methylation ของจีน p16 พบว่า QCM ไบโอสเซนเซอร์ ที่พัฒนาขึ้นสามารถจำแนกภาวะ methylation และ unmethylation ได้อย่างจำเพาะและมีความไวที่สูง อีกทั้งยังไม่พบการเกิด cross hybridization ระหว่าง methylated เซนเซอร์ กับ unmethylation ดีเอ็นเอ หรือ unmethylated เซนเซอร์ probe กับ methylated ดีเอ็นเอ ผลของสัญญาณมีความเที่ยงตรงที่ยอมรับได้ซึ่งกำหนดให้ CV ไม่เกินร้อยละ 15⁽⁸⁾ ในการศึกษาของ Zhou และคณะ⁽⁹⁾ ได้ทำการทดลองเพิ่มความไวของวิธีด้วยเทคนิค multi-layer self assembly โดยเป็นการเพิ่มระนาบของโมเลกุลซึ่งจะช่วยเพิ่มตำแหน่งในการจับของโปรตีน avidin มากขึ้นเป็นผลให้ความไวที่ได้สูงขึ้น นอกจากนี้เมื่อทำการแยกเบสคู่สมของดีเอ็นเอเป้าหมายที่จับอยู่กับโปรบบนผิวทองของควอทซ์แล้วพบว่าโปรบที่ยังคงตรึงอยู่บนผิวเซนเซอร์สามารถใช้งานซ้ำได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆโดยที่ยังคงคุณภาพได้ถึง 3 ครั้ง โดยให้สัญญาณลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบภาวะความคงตัวของเซนเซอร์และการเก็บรักษา แต่จากการศึกษาของ Caruso และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่า QCM ที่เตรียมเสร็จสามารถเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 2-3 สัปดาห์โดยไม่เสียคุณสมบัติใดๆ

นอกจากการพัฒนาไบโอสเซนเซอร์โดยใช้เทคนิค QCM แล้วยังได้มีการพัฒนาไบโอสเซนเซอร์โดยใช้เทคนิค microchip capillary electrophoresis (mCE)⁽⁴⁾ เพื่อการตรวจหา DNA methylation โดยเป็นเทคนิคที่ทั้งความไวและความจำเพาะสูง แต่เทคนิค mCE ยังต้องการอุปกรณ์ในการตรวจจับสัญญาณหรือ detector ที่เป็น optical system ซึ่งมีราคาสูง ต้นแบบที่ได้พัฒนานี้จึงถือเป็นรายงานแรกที่กำลังกล่าวถึงการประยุกต์ใช้ QCM เพื่อตรวจหา DNA methylation ของจีนด้านมะเร็ง อย่างไรก็ตามเซนเซอร์ที่ได้ยังมีความต้องการเพื่อที่จะพัฒนาต่อยอดโดยนำไปบูรณาการเข้ากับเทคนิค PCR เพื่อที่จะช่วยลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายให้เป็นแบบ real time analysis ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 161:1015-22.
2. Limpaiboon T, Khaenam P, Chinnasri P, Soonklang M, Jearanaikoon P, Sripan B, et al. Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2005; 217: 213-9.
3. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 4: 1-17.
4. Zhou XM, Shao SJ, Xu GD, Zhong RT, Liu DY, Tang JW, et al. Highly sensitive determination of the methylated p16 gene in cancer patients by microchip electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 816: 145-51.
5. Turner AP. Tech. Sight. Biochemistry. Biosensors-sense and sensitivity. *Science* 2000; 290: 1315-7.

6. Sauerbrey G. The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for micro-weighing. *Z Phys* 1959; 115: 206-22.
7. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-6.
8. Zhou XC, Huang LQ, Li SFY. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics* 2001; 16: 85-95.
9. Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Methods* 2005; 37: 48-56.
10. Caruso F, Rodda E, Furlong DF, Niikura K, Okahata Y. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. *Biosensors and Bioelectronics* 1997; 12: iii - iv.