

**QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE DNA SENSOR FOR  
DETECTION OF VIBRIO CHOLERAE CTX GENE**

**JITTRA SAESOR**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(MEDICAL TECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2006**

**ISBN 974-04-7572-8  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การตรวจหาชิ้น *ctx* ของ *Vibrio cholerae* ด้วยวิธีควอทซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ ดีเอ็นเอเซ็นเซอร์  
(QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE DNA SENSOR FOR DETECTION OF VIBRIO CHOLERAЕ CTX GENE)

จิตรรา แซ่ซอร์ 4637685 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จำรัส พรหมมาส, Ph.D., เกศรา วัดอักษร, Ph.D., วิจิตร วงศ์ลำชา, Ph.D.

บทคัดย่อ

อหิวาตกโรคเป็นโรคที่มีอาการของอุจจาระร่วงอย่างเฉียบพลัน โดยมีสาเหตุจากที่อกซิมของเชื้อ *Vibrio cholerae* การตรวจหาเชื้อต้นเหตุดังกล่าวให้เร็วที่สุดมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของโรคนี้ได้อย่างทันทั่วถึง การใช้ตัวตรวจจับดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะมีประโยชน์อย่างมากสำหรับตรวจหาชิ้น *ctx* ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิตที่อกซิมของเชื้อ *Vibrio cholerae* ous

ระบบดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ใช้หลักการไฮบริดเซชันระหว่างตัวตรวจดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ซึ่งมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีความสำคัญอย่างมากในการช่วยวินิจฉัยโรค ควอทซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์เป็นระบบไปโอเซ็นเซอร์ชนิดหนึ่ง ที่มีการนำมาใช้ในการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้หลักการไฮบริดเซชันเช่นกัน เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูง ราคาถูก และสามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้โดยตรง ไม่ต้องมีการติดฉลากดีเอ็นเอเป้าหมาย จุดมุ่งหมายในการศึกษานี้คือการพัฒนากระบวนการตรวจหาชิ้น *ctx* อย่างรวดเร็วโดยใช้หลักการของ Polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับไปโอเซ็นเซอร์ชนิดควอทซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์

ในการศึกษานี้ทำการเตรียมผิวอิเล็กโทรดด้วยวิธี Self-assembled monolayer ของสาร mercaptopropionic acid (MPA) บนผิวอิเล็กโทรดทองของควอทซ์คริสตัลชนิด AT-cut ที่มีความถี่ 5 เมกะเฮิรตซ์ จากนั้นกระตุ้นผิวอิเล็กโทรดด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride และ *N*-hydroxysulfosuccinimide แล้วจึงตรึงผิวอิเล็กโทรดด้วยอวิดิน ซึ่งใช้สำหรับจับกับตัวตรวจดีเอ็นเอที่มีลำดับของดีเอ็นเอของยีน *ctx* ที่ติดด้วยไบโอดีนตรงปลาย 5' ของดีเอ็นเอ การตรวจหาชิ้น *ctx* ด้วยระบบดีเอ็นเอเซ็นเซอร์นี้จะทำโดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *ctx* ที่เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายโดย PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนยีน *ctx* และ ดีเอ็นเอเป้าหมาย หลังจากทำ PCR แล้วจึงแยกเบสคู่สมก่อนการไฮบริดเซชันกับตัวตรวจดีเอ็นเอที่มีลำดับของดีเอ็นเอของยีน *ctx* ซึ่งถูกตรึงบนผิวอิเล็กโทรดทองของควอทซ์คริสตัลแล้ว การไฮบริดเซชันระหว่างตัวตรวจดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สมกันจะส่งผลให้ความถี่ของควอทซ์คริสตัลลดลง ซึ่งเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ในการแปลผล

จากการศึกษาพบว่าปริมาณของ MPA อวิดินและตัวตรวจดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการตรึงบนพื้นผิวของควอทซ์คริสตัล คือ 10 mM 0.1 mg/ml และ 1  $\mu$ M ตามลำดับ และจากการทดลองพบว่าเมื่อนำ PCR amplicon ของยีน *ctx* ของเชื้อ *Vibrio cholerae* จำนวน 11 ตัวอย่างมาทำการตรวจหาชิ้น *ctx* พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจพบยีน *ctx* ทั้ง 11 ตัวอย่าง ในขณะที่เชื้อที่ไม่ใช่ *Vibrio cholerae* จำนวน 11 ตัวอย่างไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของความถี่ลดลงจากควอทซ์คริสตัล ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบดังกล่าวให้ผลที่มีความถูกต้องถึง 100% โดยมีความจำเพาะและความไวสูง อีกทั้งการตรวจหาชิ้น *ctx* ของเชื้อ *Vibrio cholerae* ใช้เวลาเพียง 20 นาที หลังจากกระบวนการ PCR

79หน้า. ISBN 974-04-7572-8

QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE DNA SENSOR FOR DETECTION OF  
VIBRIO CHOLERAE CTX GENE.

JITTRA SAESOR 4637685 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D.,  
KESARA WAT-AKSORN, Ph.D., WIJIT WONGLUMSOM, Ph.D.

ABSTRACT

Cholera is an importance acute diarrheal disease caused by the toxin *Vibrio cholerae*. The rapid detection of this organism is necessary for effective control of this disease. The detection of *ctx* gene encoding for cholera toxin using specific DNA probe is extremely useful to meet this requirement.

DNA biosensors based on nucleic acid hybridization have rapidly been developed due to their increasing importance in the diagnosis of diseases. Quartz crystal microbalance (QCM) has been used for detecting DNA hybridization, due to its sensitivity, inexpensiveness, and suitability for direct and label-free monitoring hybridization of complementary strands of oligonucleotides. The aim of this study was to develop a QCM system for rapid detection of the cholera toxin gene (*ctx* gene) from the product of the polymerase chain reaction (PCR) of this specific gene.

Gold electrode of 5 MHz AT-cut quartz crystal was modified with self-assembled monolayer of mercaptopropionic acid (MPA). Then, avidin was immobilized after the activation of MPA with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride and *N*-hydroxysulfosuccinimide. This avidin coated gold electrode surface was used for attachment of 5'-biotinylated oligonucleotide probe containing *ctx* sequence. The primer for *ctx* gene was utilized for *ctx* sequence amplification by PCR. The denatured PCR product was applied to the quartz crystal active surface containing the cholera toxin probe for detection of specific hybridization of both molecules. Decreasing of oscillation frequency was monitored as an indicator of hybridization events.

The optimal concentrations of MPA, avidin, and 5'-biotinylated oligonucleotide probe were 10 mM, 0.1 mg/ml and 1 $\mu$ M, respectively. The oscillation signal detected by this sensor showed that all of eleven *V. cholerae* O1 were positive for *ctx* gene. No significant frequency shift was observed from the eleven bacterial strains belonging to non-cholera. This QCM system performed with high sensitivity and specificity and is therefore suitable for detection of *ctx* gene of *Vibrio cholerae* O1 within 20 minutes after PCR.

KEY WORDS: QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE, CHOLERA  
VIBRIO CHOLERAE, CTX GENE, DNA BIOSENSOR.

79 P. ISBN 974-04-7572-8