

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยตัวตรวจวัดแบบ QCM

นายเอก วุฒยวนิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A DETECTION OF CELL QUANTITY USING QCM SENSOR

Mr. Anek Wuthayavanich

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

Department of Electrical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491967

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยตัวตรวจวัดแบบ QCM

โดย

นายเอนก วุฒยวนิช

สาขาวิชา

วิศวกรรมไฟฟ้า

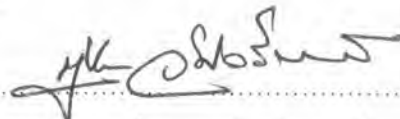
อาจารย์ที่ปรึกษา

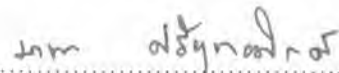
รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์


คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ


..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ กฤษดา วิสวธีรานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนากัทร ปาลกะ)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.กัญญวิมวดี กิรติกร)

เอก วุฒยานิช : การตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยตัวตรวจวัดแบบ QCM. (A DETECTION OF CELL QUANTITY USING QCM SENSOR) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.มานะ ศรีบุทศศักดิ์, 70 หน้า

งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีการตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของตัวตรวจวัดแบบ QCM (Quartz Crystal Microbalance) โดยได้ประดิษฐ์ระบบวัดจำนวนเซลล์ที่สามารถวัดในเวลาจริงได้พร้อมกัน 4 ช่อง และสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง 32-42 °C จากการได้ศึกษาเสถียรภาพของระบบวัดพบว่า QCM มีสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ต่ออุณหภูมิในสารละลายเลี้ยงเซลล์ และในอากาศมีค่าใกล้เคียงกันคือ -11 Hz/°C และ -9Hz/°C นอกจากนี้พบว่าความถี่เรโซแนนซ์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปคล้ายไซน์ตามการระเหยของน้ำ เมื่อควบคุมอุณหภูมิ และการระเหยของน้ำที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์แล้วพบว่าระบบวัดที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรภาพในการเปลี่ยนแปลงความถี่ในขณะใช้งานในของเหลวเท่ากับ $\pm 5\text{Hz}/\text{Hour}$

เมื่อนำ QCM มาตรวจวัดจำนวนเซลล์แมคโครฟาจ (ATCC Number TIB-71;Raw 246.7) พบว่า QCM มีการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์เป็นบวก และมีค่าสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นกับจำนวนเซลล์ในแต่ละการทดลองโดยให้ผลตอบแทนในช่วง $+50-200 \frac{\text{Hz}}{10^6 \text{ cells} / \text{ml}}$ ผลการทดลองที่ได้นี้ให้ผลที่ต่างจากการคิดโดยใช้สมการของ Sauerbrey และ Kanazawa ที่มีความสัมพันธ์เชิงลบ ได้ตั้งสมมติฐานการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ในเชิงบวกนี้ว่าเกิดจากการเพิ่มความเครียดที่ผิวของ QCM เนื่องจากน้ำหนักของเซลล์และการที่เซลล์มีลักษณะไม่ตรงตามเงื่อนไขของสมการของ Sauerbrey หรือ Kanazawa กล่าวคือ เซลล์มีลักษณะยืดหยุ่น ไม่เป็นฟิล์มบาง รวมทั้งลงเกาะบนผิวทองได้ไม่ดี ซึ่งจากเหตุผลที่กล่าวมานี้ส่งผลให้ความถี่เรโซแนนซ์มีค่าเพิ่มขึ้น โดยได้พบปรากฏการณ์เช่นนี้ในกรณีของผงอะลูมินาเช่นกัน

ภาควิชา วิศวกรรมไฟฟ้าลายมือชื่อนิสิต
 สาขาวิชา วิศวกรรมไฟฟ้าลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
 ปีการศึกษา 2549

4770552321 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEY WORDS: QCM/ RESONANCE FREQUENCY/CELL DETECTION

ANEK WUTHAYAVANICH: A DETECTION OF CELL QUANTITY USING QCM SENSOR.

THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.MANA SRIYUDTHSAK, 70 pp.

This thesis presents a method for the detection of cell quantity via frequency change of QCM sensor. Four channels continuous and real time cell monitoring system with temperature controller in the range of 32-42 °C has been designed and constructed. It was found that the temperature coefficient of QCM in media solution and air were -11 Hz/°C and -9Hz/°C, respectively. The frequency change of QCM was also found to be depended on water evaporation. By controlling the temperature and water evaporation, the stability of the system of ±5Hz/hour was achieved.

Positive linear relations between frequency change and numbers of macrophage cell (ATCC Number TIB-71; Raw 246.7) was observed with sensitivity of $+50-200 \frac{Hz}{10^6 cells/ml}$. These results did not follow Sauerbrey and Kanazawa equation which have negative correlation. It was assumed that the increase of the resonance frequency due to the cell adhesion was affected by stress on QCM's surface, since the characteristic of cell was not the rigid mass or thin film and the attachment on the QCM's surface was weak. This phenomenon was also observed in the case of alumina powder on QCM.

Department.....Electrical Engineering.....Student's signature *Anek Wuthayavanich*
Field of study.....Electrical Engineering.....Advisor's signature *Mana Sriyudthsak*
Academic year.....2006.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจ และคอยเกื้อหนุนข้าพเจ้าในด้านต่างๆ จนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ รศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำกับข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อภรณ์ ชีรมงคลศรีมี สำหรับคำแนะนำ และ ความช่วยเหลือต่างๆ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนสอนวิธีการเลี้ยงเซลล์ กับ ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อน และพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการไบโออิเล็กทรอนิกส์ ที่ได้ช่วยเหลือต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณน้องๆ และพี่สายพิณ ที่ได้ช่วยเหลือข้าพเจ้าในการเลี้ยงเซลล์

ท้ายสุดบุคคลที่ข้าพเจ้าไม่ได้กล่าวถึง และได้มีส่วนร่วมในงานวิจัยของข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอขอบคุณบุคคลเหล่านั้น และขออภัยที่มา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	4
1.3 ขอบเขตของวิทยานิพนธ์.....	4
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2 หลักการและระบบตรวจวัดเซลล์ด้วยตัวตรวจวัดแบบ QCM.....	6
2.1 การทำงานของตัวตรวจวัดแบบ QCM.....	6
2.1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกับความถี่เรโซแนนซ์.....	9
2.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความหนืดและความหนาแน่น ของของเหลวกับความถี่เรโซแนนซ์.....	10
2.2 การวัดผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงมวลที่เกาะที่ผิวของ QCM และ/หรือ เนื่องจาก การที่ QCM สัมผัสกับของเหลว.....	11
2.2.1 หลักการทำงานของวงจรรออสซิลเลเตอร์.....	11
2.3 ระบบวัดปริมาณเซลล์.....	14
2.3.1 ระบบที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์.....	14
2.3.2 ระบบประมวลผลและเก็บข้อมูล.....	15
2.3.3 ระบบควบคุมอุณหภูมิ.....	16
2.4 การทดสอบระบบวัดเบื้องต้น.....	17
2.5 การนำ QCM มาตรวจวัดจำนวนเซลล์.....	18

บทที่	หน้า
3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อเสถียรภาพของ QCM ในการวัดจำนวนเซลล์.....	19
3.1 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของ QCM เทียบกับอุณหภูมิ.....	19
3.2 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของ QCM เทียบกับอุณหภูมิ ขณะผิวทองด้านหนึ่ง QCM สัมผัสกับของเหลว.....	22
3.3 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของ QCM เนื่องจากการเกิดคลื่นตามยาวที่ผิวน้ำ.....	26
4 การใช้ QCM มาตรวจวัดปริมาณเซลล์.....	29
4.1 การศึกษาการเกาะติดของเซลล์ที่ผิวทอง.....	29
4.2 การเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM ต่อเซลล์ในแต่ละวันที่ทำการทดลอง.....	31
4.3 การเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM กับ ปริมาณเซลล์.....	42
5 สรุปผลการทดลอง และ วิเคราะห์ข้อดีข้อเสียของ QCM เมื่อใช้วัดปริมาณเซลล์.....	57
เทียบกับวิธีอื่นๆ	
รายการอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	61
ภาคผนวก ก.....	62
ภาคผนวก ข.....	66
ภาคผนวก ค.....	67
ภาคผนวก ง.....	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	70

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 วิธีการตรวจปริมาณเซลล์ด้วยวงจรรออสซิลเลต	3
1.2 บล็อกไดอะแกรมแสดงลักษณะการตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยใช้ QCM	4
2.1 รูปแบบการสั้นของ QCM เมื่อป้อนศักย์ไฟฟ้าให้	6
2.2 วงจรสมมูลของ QCM ขณะอยู่ในอากาศ	7
2.3 อิมพีแดนซ์ และ มุมเฟสของ QCM ในช่วง ความถี่เรโซแนนซ์ และ แอนติเรโซแนนซ์	8
2.4 วงจรสมมูลของ QCM เมื่อมีมวลยึดเกาะบริเวณพื้นผิว	9
2.5 วงจรสมมูลของ QCM เมื่ออยู่ในของเหลวและมีมวลยึดเกาะบริเวณพื้นผิว	10
2.6 บล็อกไดอะแกรมของวงจรรออสซิลเลเตอร์	11
2.7 วงจรรออสซิลเลเตอร์แบบ โคพิสต์โดยใช้ IC 74HC04 เป็นตัวขยายสัญญาณ	12
2.8 การขยายสัญญาณของ IC 74HC04	13
2.9 องค์ประกอบของวงจรที่ทำให้เกิดการกลับเฟสอีก 180°	13
2.10 ห้องที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณเซลล์	14
2.11 บล็อกไดอะแกรมแสดงระบบประมวลผลและเก็บข้อมูล	15
2.12 ภาพของระบบวัดที่ใช้ในการทดลอง	15
2.13 ภาพของระบบควบคุมอุณหภูมิ	16
2.14 ผลการวัดความถี่ของ QCM ก่อน และหลังหยดน้ำปราศจากอิออนลงบน QCM	17
2.15 ลักษณะของเซลล์ RAW246.7	18
3.1 การเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM เทียบกับอุณหภูมิ	20
3.2 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของ QCM ต่อ อุณหภูมิ เมื่อผลึกควอตซ์ถูกตัดผิดพลาด	21
เป็นมุมต่างๆ	
3.3 การเปลี่ยนแปลงความถี่ของ QCM เทียบกับ อุณหภูมิ เมื่อผิวด้านหนึ่งสัมผัสกับ	22
สารละลายเลียงเซลล์	
3.4 การเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM เทียบกับอุณหภูมิ	25
3.5 ผลของการเกิดคลื่นตามยาวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์	26
เป็นคลื่นลักษณะไซน์	
3.6 การจำลองโพลไฟล์การเคลื่อนที่ของ QCM ที่มีอิเล็กโทรดรัศมี 2 มิลลิเมตร	28
ด้วยโปรแกรม COMSOL	

ภาพประกอบ	หน้า
3.7 การเกิดคลื่นตามยาว (longitudinal wave) แทรกสอดแบบเสริมทำให้เกิด	28
การเพิ่ม ความเครียดที่ผิวของ QCM มากขึ้น	
4.1 การกระจายตัวของเซลล์บนผิวทองของ QCM ก่อน (ก) และหลังล้าง (ข) ด้วย PBS	29
4.2 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้น 6.5×10^5 Cells/ml	32
4.3 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้น 1.6×10^6 Cells/ml	34
4.4 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้น 1.5×10^6 Cells/ml	36
4.5 เซลล์ ที่เกาะบนผิวทองของ QCM แต่ละตัว	36
4.6 ผลตอบของ QCM เมื่อใส่สารละลายเลี้ยงเซลล์โดยปราศจากเซลล์	37
4.7 การเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์เป็นบวก เมื่อใส่ผงอะลูมินาลงใน chamber	40
4.8 แสดงลักษณะการกระจายตัวของผงอะลูมินาบนผิวทองของ QCM	40
4.9 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้นต่างๆ	45
(ก) เซลล์ความเข้มข้น 1.2×10^6 Cell (ข) เซลล์ความเข้มข้น 0.4×10^6 Cells/ml	
(ค) เซลล์ความเข้มข้น 0.2×10^6 Cells/ml	
4.10 ปริมาณ เซลล์ ที่เกาะบนผิวทองของ QCM เมื่อแปรค่าความเข้มข้น	46
เซลล์ต่างๆ	
4.11 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้นต่างๆ	48
(ก) เซลล์ความเข้มข้น 1×10^6 Cell (ข) เซลล์ความเข้มข้น 0.4×10^6 Cells/ml	
(ค) เซลล์ความเข้มข้น 0.2×10^6 Cells/ml	
4.12 ปริมาณ เซลล์ ที่เกาะบนผิวทองของ QCM เมื่อแปรค่าความเข้มข้น	49
เซลล์ต่างๆ	
4.13 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้นต่างๆ	51
(ก) เซลล์ความเข้มข้น 1×10^6 Cell (ข) เซลล์ความเข้มข้น 0.4×10^6 Cells/ml	
(ค) เซลล์ความเข้มข้น 0.2×10^6 Cells/ml	
4.14 ปริมาณเซลล์ที่เกาะบนผิวทองของ QCM เมื่อแปรค่าความเข้มข้น	52
เซลล์ต่างๆ	
4.15 ผลตอบของ QCM ที่เซลล์ความเข้มข้นต่างๆ	54
(ก) เซลล์ความเข้มข้น 0.9×10^6 Cell (ข) เซลล์ความเข้มข้น 0.4×10^6 Cells/ml	
(ค) เซลล์ความเข้มข้น 0.2×10^6 Cells/ml	

ภาพประกอบ	หน้า
4.16 ลักษณะผลตอบของ QCM เมื่อใส่สารละลายเลียงเซลล์โดยปราศจากเซลล์.....	55
4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงความถี่กับความเข้มข้นของเซลล์.....	55
ในการทดลองครั้งที่ 1 2 3 และ 4	
ก1 แกนอ้างอิงของ QCM ที่ใช้ในการคำนวณ.....	63
ง1 ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ที่ได้จากเครื่องกำเนิดความถี่กับ.....	69
ค่าความถี่ที่อ่านได้จากระบบวัดที่พัฒนาขึ้น	

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1.1 แสดงตัวอย่างการประยุกต์ใช้งาน QCM	3
ตารางที่ 3.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดและความหนาแน่นของน้ำที่อุณหภูมิค่าต่างๆ ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ (Δf_L) น้อยลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น	23
ตารางที่ 3.2 การเปลี่ยนความถี่เรโซแนนซ์เทียบกับอุณหภูมิเมื่อหักผลของความหนืด และความหนาแน่นของสารละลายเลี้ยงเซลล์	24
ตารางที่ 4.1 สรุปการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM	37
หลังจากหยดสารละลายเลี้ยงเซลล์ หลังจากใส่เซลล์ลงในห้อง 2 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง	
ตารางที่ 4.2 สรุปการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM	45
หลังจากหยดสารละลายเลี้ยงเซลล์ หลังจากใส่เซลล์ลงในห้อง 2 ชั่วโมง	
ตารางที่ 4.3 สรุปการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM	48
หลังจากหยดสารละลายเลี้ยงเซลล์ หลังจากใส่เซลล์ลงในห้อง 2 ชั่วโมง	
ตารางที่ 4.4 สรุปการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM	51
หลังจากหยดสารละลายเลี้ยงเซลล์ หลังจากใส่เซลล์ลงในห้อง 2 ชั่วโมง	
ตารางที่ 4.5 สรุปการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของ QCM	54
หลังจากหยดสารละลายเลี้ยงเซลล์ หลังจากใส่เซลล์ลงในห้อง 2 ชั่วโมง และ หลังจากหลังจากใช้ micropipet ดูดขึ้นลงจนเซลล์หลุดจากผิว	
ตารางที่ ๖1 ค่าความผิดพลาดจากการวัดเมื่อแปรค่าความถี่เรโซแนนซ์ ในช่วง 2,000-10,000 Hz	68