



## Potentiometric and Capacitive Affinity Biosensors

Apon Numnuam

เลขหนังสือ	00553 Abb 2008 C.1
Bib Key	302968
	26 ก.พ. 2552

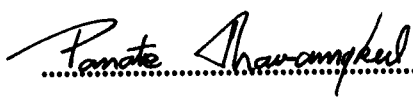
**A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy in Chemistry  
Prince of Songkla University  
2008**

**Copyright of Prince of Songkla University**

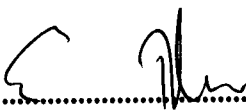
**Thesis Title** Potentiometric and Capacitive Affinity Biosensors  
**Author** Mr. Apon Numnuam  
**Major Program** Chemistry

---

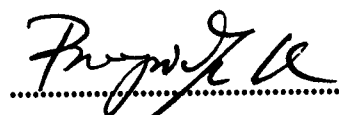
**Major Advisor**

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Panote Thavarungkul)

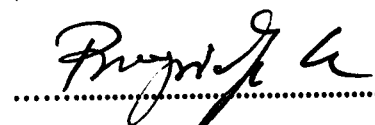
**Examining Committee**

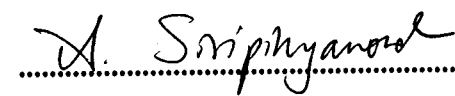
  
.....Chairperson  
(Prof. Dr. Eric Bakker)

**Co-advisor**


  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Panote Thavarungkul)

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

  
.....  
(Asst. Prof. Dr. Atitaya Siripinyanond)

The Graduate School, Prince of Songkla University, has approved this thesis as fulfillment of the requirements for the Doctor of Philosophy Degree in Chemistry

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Kerkchai Thongnoo)  
Dean of Graduate School

ชื่อวิทยานิพนธ์ โฟเทนซิโอมเมทริกและคาปาซิทีฟแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์

ผู้เขียน นายอากรณ์ นุ่มน่วม

สาขาวิชา เคมี

ปีการศึกษา 2551

### บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้พัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดการจับแบบแอฟฟินิตีในไบโอเซนเซอร์ทั้งโดยตรง และโดยอ้อม (direct and indirect affinity biosensor detection) การจับแบบแอฟฟินิตีตรวจวัดโดยอ้อมอาศัยหลักการโฟเทนซิโอมเมทริกโดยใช้ไอออนซีเล็กทีฟอิเล็กโทรด (potentiometric ion-selective electrode) ในการวิเคราะห์แบบแซนด์วิช (sandwich assay) โดยสารที่ต้องการวิเคราะห์ (target analyte) จะถูกจับโดยวัสดุชีวภาพ (bioaffinity molecules) ที่ตรึงบนผิวทอง หลังจากนั้นเติมวัสดุชีวภาพตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยควอนตัมดอทแคดเมียมซัลไฟด์ (CdS quantum dot) จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แคดเมียมซัลไฟด์จะถูกออกซิไดซ์เป็นแคดเมียมไอออน ( $Cd^{2+}$ ) และตรวจวัดด้วยแคดเมียมไอออนซีเล็กทีฟอิเล็กโทรด ( $Cd^{2+}$  ion-selective electrode) ได้ศึกษาและทดสอบระบบโดยใช้แอฟฟินิตีสองคู่ คือ ทروมบินแอฟแทมเมอร์ (thrombin aptamer) กับ ทروมบิน (thrombin) และดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (DNA-DNA) หรือ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) โดยการจับกันแอฟฟินิตีทั้งสองคู่ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ศึกษาโดยใช้ไอออนซีเล็กทีฟโฟเทนซิโอมเมทริกอิเล็กโทรด

สำหรับแอฟฟินิตีของทروมบินแอฟแทมเมอร์ (thrombin aptamer) กับ ทروมบิน (thrombin) พบว่าไอออนซีเล็กทีฟอิเล็กโทรดสามารถตรวจวัดทروมบิน ในช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 10 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร หรือ 28 เฟมโตโมล (28 fmol) ในปริมาตรการวัด 200 ไมโครลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.14 นาโนโมลาร์ (0.14 nM) ในกรณีของดีเอ็นเอเทคนิคนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงโดยสัญญาณมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเกิดการจับของสายดีเอ็นเอที่มี 2 เบสไม่เข้าคู่กัน และให้ช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.01 นาโนโมลาร์ ถึง 500 นาโนโมลาร์ (0.01-500 nM) ที่ขีดจำกัดของการตรวจวัด 10 พิโคโมลาร์ (10 pM) หรือ 2 เฟมโตโมล (2 fmol) ของปริมาตรการวัด 200 ไมโครลิตร

สำหรับการตรวจวัดการจับแบบแอฟฟินิตีโดยตรงอาศัยการวัดค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) โดยวัสดุชีวภาพ (bioaffinity molecules) จะถูกตรึงบน เซลฟ-แอสเซมเบิลโมโนเลเยอร์ (self-assembled monolayer, SAM) บนขั้วอิเล็กโทรดทองซึ่งเป็นอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (target analyte) กับวัสดุ

ชีวภาพบนอิเล็กทรอนิกส์ทำงานทำให้ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) ลดลง ศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของระบบ โดยใช้คู่แอฟฟินิตี 3 คู่ คือ โปรตีนฮิสโตน (histone) กับ ดีเอ็นเอ (DNA) แลครีเพรสเซอร์ (*lac repressor*) กับ พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) และ ดีเอ็นเอ (DNA) กับเตตราไซคลิน (tetracycline)

ในการตรวจวัดดีเอ็นเอทำโดยตรึงฮิสโตนจากไทมัสของลูกวัว (calf thymus histone) และ ของกุ้ง (shrimp histone) บนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซอด และใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอจากไทมัสของลูกวัว กุ้ง และจาก แบคทีเรียอีโคไล (*E. coli*) จากการทดลองพบว่าฮิสโตนสามารถจับกับดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งเดียวกันได้ดีกว่าต่างแหล่ง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทั้งฮิสโตนจากไทมัสของลูกวัว และกุ้ง ให้ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัดดีเอ็นเอจากทั้งสามแหล่งอยู่ที่  $1.0 \times 10^{-5}$  นาโนกรัมต่อลิตร จากการศึกษการจับกันของฮิสโตนและดีเอ็นเอจากไทมัสของลูกวัว พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสองช่วง คือ  $1.0 \times 10^{-5}$  ถึง  $1.0 \times 10^{-2}$  นาโนกรัมต่อลิตร และ  $1.0 \times 10^{-1}$  ถึง  $1.0 \times 10^2$  นาโนกรัมต่อลิตร นอกจากนี้อิเล็กทรอนิกส์ทรานซอดสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 43 ครั้ง โดยให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation) 3.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาดีเอ็นเอในโปรตีนที่สกัดจากกุ้ง พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน 80-116 เปอร์เซ็นต์

ในการประยุกต์ใช้ระบบคาปาซิทิฟในการตรวจวัดหาพลาสมิดดีเอ็นเอ ได้ตรึงแลครีเพรสเซอร์โปรตีนบนอิเล็กทรอนิกส์ทรานซอด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมศึกษาผลของพลาสมิดที่มีลักษณะเกลียว (supercoiled plasmid DNA) และคลายเกลียว (open circular plasmid DNA) ต่อสัญญาณการตอบสนอง พบว่าทั้งพลาสมิดที่เป็นเกลียว (supercoiled plasmid DNA) และคลายเกลียว (open circular plasmid DNA) จะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงเดียวกันสองช่วง คือ 0.0001 ถึง 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 ถึง 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ขีดจำกัดต่ำสุดของวัด 0.002 พิโคกรัมต่อลิตรและ 0.03 พิโคกรัมต่อลิตร สำหรับพลาสมิดคลายเกลียว และเป็นเกลียวตามลำดับ นอกจากนี้อิเล็กทรอนิกส์ทรานซอดสามารถนำมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 40 ครั้ง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 4.0 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ระบบคาปาซิทิฟสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดเตตราไซคลิน (Tetracyclines) โดยการตรึงดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ศึกษาผลของเตตราไซคลิน (Tetracycline) และอนุพันธ์ของเตตราไซคลิน ได้แก่ กลอเตตราไซคลิน (chlortetracycline) และ ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ต่อสัญญาณการตอบสนอง พบว่าจะให้ช่วงความเป็นเส้นตรง  $1.0 \times 10^{-4}$  ถึง  $1.0 \times 10^2$  ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับเตตราไซคลินและกลอเตตราไซคลิน และ  $1.0 \times 10^{-3}$  ถึง  $1.0 \times 10^3$  สำหรับออกซีเตตราไซคลิน โดยให้ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด  $1.0 \times 10^{-5}$  ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับเตตราไซคลินและกลอเตตราไซคลิน และ  $0.5 \times 10^{-4}$

ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับออกซีเตตราไซคลิน นอกจากนี้อิเล็กทรอนิกส์สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้  
ถึง 54 ครั้ง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 4.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปวิเคราะห์เตตรา  
ไซคลินที่ตกค้างในน้ำเสียของโรงพยาบาล พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน 71-102 เปอร์เซ็นต์  
และทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง  
(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งการมีอยู่ของเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำ  
เสียสามารถตรวจวัดได้ทั้งเทคนิคคาปาซิทีฟไบโอเซนเซอร์ และลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

**Thesis title** Potentiometric and Capacitive Affinity Biosensors  
**Author** Mr. Apon Numnuam  
**Major Program** Chemistry  
**Academic Year** 2008

### Abstract

This thesis focuses on the development and evaluation of the performance of electrochemical transducer for direct and indirect detection of affinity biosensors. Indirect detection of affinity reactions were investigated with potentiometric ion-selective electrode. The detection rely on sandwich assay where target analyte was bound to immobilized bioaffinity molecules on the gold substrate and secondary bioaffinity molecule conjugated with CdS quantum dot label was further added. Then, CdS was dissolved with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yielding a diluted electrolyte background suitable for potentiometric detection of released Cd<sup>2+</sup> with polymeric membrane Cd<sup>2+</sup>-selective microelectrode. Two affinity binding pairs were studied, thrombin aptamer-thrombin and DNA-DNA (DNA hybridization). This is the first time for both of these affinity pairs that they are demonstrated with ion-selective microelectrode.

For thrombin aptamer-thrombin binding, ion selective microelectrode gave the linearity range of 10-250 ppb with a limit of detection at 5 ppb, corresponding to 28 fmol in 200  $\mu$ l or 0.14 nM. In case of DNA hybridization, it can detect the target DNA with high selectivity, including effective discrimination against 2-base mismatched DNA and show a wide linear dynamic range of 0.01-500 nM with the limit of detection at 10 pM or 37 pg or 2 fmol in 200  $\mu$ l.

Direct detection of affinity biosensor was performed by potentiostatic capacitance measurements. Bioaffinity molecules were immobilized on self-assembled monolayer (SAM) of thioctic acid on working gold electrode (WE). The binding between target analyte and immobilized bioaffinity molecule on gold electrode cause the capacitance to decrease. The capacitance due to the direct affinity reaction could then be determined from the current response when a potential step was applied.

Three affinity binding pairs, histone-DNA, *lac* repressor protein-plasmid DNA and DNA-tetracyclines (TCs) were investigated in a flow injection system.

The DNA detection was investigated by immobilized histone on the electrode surface. Histones from calf thymus and shrimp were immobilized on gold electrodes covered with self-assembled monolayer (SAM) of thiocetic acid. Each of these histones were used to detect DNA from calf thymus, shrimp and *E. coli*. The studies indicated that histones can bind better with DNA from the same source and give higher sensitivity than the binding with DNA from different sources. Under optimum conditions, both histones from calf thymus and shrimp provided the same lower detection limit of  $10^{-5}$  ng l<sup>-1</sup> for DNA from different sources i.e., calf thymus, shrimp and *E.coli*. For the affinity reaction between calf thymus histone and DNA two linear ranges,  $10^{-5}$  to  $10^{-2}$  ng l<sup>-1</sup> and  $10^{-1}$  to  $10^2$  ng l<sup>-1</sup>, were obtained. The immobilized histones were stable and after regeneration good reproducibility of the signal could be obtained up to 43 times with a %RSD of 3.1. When applied to analyze residual DNA in crude protein extracted from white shrimp good recoveries were obtained between 80-116 %.

Further application of capacitive transducer is plasmid DNA detection with immobilized *lac* repressor protein. Under optimum conditions, a study of the influence of different isoforms of plasmid DNA were detected by injecting supercoiled plasmid DNA (sc pDNA) and open circular (relaxed form) plasmid DNA (oc pDNA) into the capacitive biosensor system. The observed capacitance signal from open circular or relaxed form was similar to that of supercoiled plasmid DNA. The linear ranges were the same for both isoforms, from 0.0001 to 0.1 ng ml<sup>-1</sup> and 1 to 1,000 ng ml<sup>-1</sup>, with lower detection limits of 0.002 pg ml<sup>-1</sup> and 0.03 pg ml<sup>-1</sup> for open circular and supercoiled plasmid DNA, respectively (Table 10.3). The immobilized *lac* repressor protein on self-assembled monolayer (SAM) gold electrode was stable and could be reused up to more than 40 times with RSD lower than 4.0 %.

In addition, this technique was also applied for screening detection of tetracycline by immobilized double-stranded DNA on gold electrode surface. Under optimum conditions, influence of three different compounds of tetracycline(s), i.e., tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC), to immobilized dsDNA was studied. It showed a linear dynamic range of  $10^{-4}$ - $10^2$  µg l<sup>-1</sup> for

tetracycline and chlortetracycline, and  $10^{-3}$ -  $10^3 \mu\text{g l}^{-1}$  for oxytetracycline. The detection limit was  $10^{-5} \mu\text{gl}^{-1}$  for tetracycline and chlortetracycline, and  $0.5 \times 10^{-4}$  for oxytetracycline (Table 10.3). The immobilized DNA was stable and after regeneration good reproducibility of signal could be obtained up to 54 times with % RSD < 4. When applied to analyze residual tetracycline in wastewater from hospital recoveries were obtained between 71-102%. The presence of tetracyclines (TCs) in wastewater sample could be detected by both biosensor and HPLC.