Potentiometric and Capacitive Affinity Biosensors

Apon Numnuam

เลขหมู่ QD553 A66 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)

Co-advisor

.....

(Assoc. Prof. Dr. Proespichaya Kanatharana)

Examining Committee

.....Chairperson

(Prof. Dr. Eric Bakker)

.....

(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. Krerkchai Thongnoo)

Dean of Graduate School

ชื่อวิทยานิพนธ์ โพเทนชิโอเมทริกและคาพาซิทีฟแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์

ผู้เขียน นายอาภรณ์ นุ่มน่วม

สาขาวิชา เคมี

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้พัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับตรวจวัดการจับแบบแอฟฟินิตีในไบโอเซนเซอร์ทั้งโดยตรง และโดยอ้อม (direct and indirect affinity biosensor detection) การจับแบบแอฟฟินิตีตรวจวัดโดยอ้อมอาศัยหลักการโพเทนชิโอเมทริกโดยใช้ไอออนซิเล็กทีฟอิเล็กโทรด (potentiometric ion-selective electrode) ในการวิเคราะห์แบบแซนด์วิช (sandwich assay) โดยสารที่ต้องการวิเคราะห์ (target analyte) จะถูกจับโดยวัสดุชีวภาพ (bioaffinity molecules) ที่ตรึงบนผิวทอง หลังจากนั้นเติมวัสดุชีวภาพตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยควอนตัมดอทแคดเมียมซัลไฟล์ (CdS quantum dot) จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แคดเมียมซัลไฟล์จะถูกออกซิไดซ์เป็นแคดเมียมไอออน (Cd^{2+}) และตรวจวัดด้วยแคดเมียมไอออนซิเล็กทีฟอิเล็กโทรด (Cd^{2+} ion-selective electrode) ได้ศึกษาและทดสอบระบบโดยใช้คู่แอฟฟินิตีสองคู่ คือ ทรอมบินแอปแทมเมอร์ (thrombin aptamer) กับ ทรอมบิน (thrombin) และดีเอนเอกับดีเอนเอ (DNA-DNA) หรือ ดีเอนเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) โดยการจับกันคู่แอฟฟินิตีทั้งสองคู่ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ศึกษาโดยใช้ไอออนซิเล็กทีฟโพเทนชิโอเมทริกอิเล็กโทรด

สำหรับคู่แอฟฟินีตีของทรอมบินแอปแทมเมอร์ (thrombin aptamer) กับ ทรอมบิน (thrombin) พบว่าไอออนซิเล็กทีฟอิเล็กโทรดสามารถตรวจวัดทรอมบิน ในช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 10 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร หรือ 28 เฟมโตโมล (28 fmol) ในปริมาตรการวัด 200 ไมโครลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.14 นาโนโมลาร์ (0.14 nM) ในกรณีของดีเอนเอเทคนิคนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงโดยสัญญาณมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเกิดการจับของสายดีเอ็นเอที่มี 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-assmbled monolayer, SAM) บนขั้วอิเล็กโทรดทองซึ่งเป็นอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (target analyte) กับวัสดุ

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

ในการตรวจวัดดีเอ็นเอทำโดยตรึงฮิสโทนจากไทมัสของลูกวัว (calf thymus histone) และ ของกุ้ง (shrimp histone) บนอิเล็กโทรดทอง และใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอจากไทมัสของลูกวัว กุ้ง และจาก แบคทีเรียอีโคไล (*E.coli*) จากการทดลองพบว่าฮิสโทนสามารถจับกับดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งเดียวกันได้ดีกว่าต่างแหล่ง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทั้งฮิสโทนจากไทมัสของลูกวัวและกุ้ง ให้ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัดดีเอ็นเอจากทั้งสามแหล่งอยู่ที่ 1.0×10^{-5} นาโนกรัมต่อลิตร จากการศึกษาการจับกันของฮิสโทนและดีเอนเอจากไทมัสของลูกวัว พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสองช่วง คือ 1.0×10^{-5} ถึง 1.0×10^{-2} นาโนกรัมต่อลิตร และ 1.0×10^{-1} ถึง 1.0×10^{2} นาโนกรัมต่อลิตร นอกจากนี้อิเล็กโทรดสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 43 ครั้ง โดยให้ค่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation) 3.1 เปอร์เซนต์ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาดีเอ็นเอในโปรตีนที่สกัดจากกุ้ง พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน 80-116 เปอร์เซนต์

ในการประยุกต์ใช้ระบบคาพาซิทีฟในการการตรวจวัดหาพลาสมิดดีเอ็น ได้ตรึงแลครีเพรสเซอร์โปรตีนบนอิเล็กโทรดทอง ภายใต้สภาวะที่เหมะสมศึกษาผลของพลาสมิดที่มีลักษณะเกลียว (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 นอกจากนี้อิเล็กโทรดสามารถนำมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 40 ครั้ง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 4.0 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ระบบคาพาซิทีฟสามาถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดเตตราไซคลิน (Tetracyclines) โดยการตรึงดีเอนเอสายคู่ (double stranded DNA) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ศึกษาผลของเตตราไซคลิน (Tetracycline) และอนุพันธ์ของเตตราไซคลิน ได้แก่ คลอเตตราไซคลิน (chlortetracycline) และ ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ต่อสัญญาณการตอบสนอง พบว่าจะให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 1.0×10^{-4} ถึง 1.0×10^{2} ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับเตราไซคลินและคลอเตตราไซคลิน และ 1.0×10^{-3} ถึง 1.0×10^{3} สำหรับออกซีเตตราไซคลิน โดยให้ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด 1.0×10^{-5} ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับเตตราไซคลินและคลอเตตราไซคลิน และ 0.5×10^{-4}

ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับออกซีเตตราไซคลิน นอกจากนี้อิเล็กโทรดสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 54 ครั้ง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 4.0 เปอร์เซนต์ เมื่อนำไปวิเคราะห์เตตราไซคลินที่ตกค้างในน้ำเสียของโรงพยาบาล พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน 71-102 เปอร์เซนต์ และทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งการมีอยู่ของเตตราไซคลินในตัวอย่างน้ำเสียสามารถตรวจวัดได้ทั้งเทคนิคคาพาซิทิฟไบโอเซนเซอร์ 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_2O_2 yielding a diluted electrolyte background suitable for potentiometric detection of released Cd^{2+} with polymeric membrane Cd^{2+}-selective microelectrode. Two affinity binding pairs were studued, 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 µl 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 µl.

Direct detection of affinity biosensor was performed by potentiostatic capacitance measurments. 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 cureent 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 thioctic 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} ngl^{-1} 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^{-1} and 10^{-1} to 10^{2} ng l^{-1}, 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^{-1} and 1 to 1,000 ng ml^{-1}, with lower detection limits of 0.002 pg ml^{-1} and 0.03 pg ml^{-1} 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} μgl^{-1} for

tetracycline and chlortetracycline, and 10^{-3}- 10^{3} μg l^{-1} for oxytetracycline. The detection limit was 10^{-5} $\mu g l^{-1}$ for tetracycline and chlortetracycline, and 0.5×10^{-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.