ชื่อวิทยานิพนธ์ แอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์อาศัยหลักการวัดทางไฟฟ้าเคมี
ผู้เขียน นายวรากร ลิ่มบุตร
สาขาวิชา เคมี
ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้พัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของระบบโฟลว์อินเจคชันคาพาซิทิฟแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์ (flow injection capacitive affinity biosensor system) สำหรับการตรวจวัดแอฟฟินิตีไบดิง (affinity binding)โดยตรง ไบโอรีคอกนิชันอีลีเมนต์ (biorecognition element) จะถูกตรึงอยู่บนเซลฟ-แอสเซมเบิลโมโนเลเยอร์ (self-assembled monolayer, SAM) บนขั้วอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (target analyte) กับไบโอรีคอกนิชันอีลีเมนต์บนขั้วอิเล็กโทรดทำงานทำให้ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) ลดลง

ศึกษาและทดสอบระบบโดยใช้คู่แอฟฟินิตีไบดิงสองคู่คือ ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (human serum albumin, HSA) กับ แอนติฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (anti human serum albumi, anti-HSA) และโปรตีน เอ (protein A) กับ คริสตัลไลเซเบิล แฟรกเมนต์ (crystallizable fragment, Fc) จาก IgG (anti HSA) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของค่าความจุไฟฟ้ากับลอกกาลิทึม (logarithm) ของความเข้มข้นของฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน มีช่วงความเป็นเส้นตรงสองช่วงคือ 1×10^{-15} ถึง 1×10^{-9} โมลาร์ และ1×10^{-7} ถึง 1×10^{-5} โมลาร์โดยมีค่าความไววิเคราะห์ (sensitivity) ที่ต่างกัน ขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 1 เฟมโตโมลาร์ ในกรณีของโปรตีน เอ มีช่วงความเป็นเส้นตรง 1.0×10^{-14} ถึง 1.0×10^{-10} โมลาร์ และขีดจำกัดของการตรวจวัด 10 เฟมโตโมลาร์

ประยุกต์ใช้ระบบในการตรวจวัดแบคทีเรียเอ็นโดท็อกซิน (bacterial endotoxin) ในเฟอร์เมนเตชัน ลิควิด (fermentation liquid) โดยใช้เลกติน (lectin) (เอนโดทอกซิน นิวทรัลไลซิง โปรตีน (endotoxin neutralizing protein, ENP)) จากแมงดาทะเลเป็นไบโอรีคอกนิชันอีลีเมนต์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเทคนิคนี้สามารถตรวจวัดเอ็นโดท็อกซิน ที่ขีดจำกัดของการตรวจวัด 0.1 พิโกโมลาร์ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 1.0×10^{-13} ถึง 1.0×10^{-10} โมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณเอ็นโดท็อกซินในตัวอย่างจริงด้วยเทคนิคคาพาซิทีฟไบโอเซนเซอร์กับวิธี *Limulus Amerbocyte Lysate* (LAL test) พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน ($P < 0.05$)

ศึกษาเซลฟ-แอสเซมเบิลโมโนเลเยอร์ตัวใหม่สำหรับคาพาซิทิฟแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์โดยใช้ไทโอยูเรีย (thiourea) ซึ่งเป็นสารที่มีราคาถูก โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับกรดไทออกติก (thioctic acid, TA) และ กรด 3-เมอแคพโตโพรไพโอนิค (3-mercaptopropionic acid, MPA) ในการศึกษา

ใช้แอลฟาฟีโตโปรตีน (alpha phetoprotein, AFP) กับแอนติ-แอลฟาฟีโตโปรตีน (anti-AFP) เป็นคู่ทดสอบ พบว่าการจับกันโดยพันธะโคเวเลนต์ (covalent coupling) ระหว่างแอนติ-แอลฟาฟีโตโปรตีนกับเซลฟ-แอสเซมเบิลไทโอยูเรียโมโนเลเยอร์บนขั้วอิเล็กโทรดทำงานสามารถใช้ตรวจวัดแอลฟาฟีโตโปรตีนได้ดี และให้ผลเหมือนกับการตรึงโดยใช้ เซลฟ-แอสเซมเบิลไทออกติกโมโนเลเยอร์ และ เซลฟ-แอสเซมเบิลเมอแคพโตโพรไพโอนิคโมโนเลเยอร์คือ มีช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.01 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 10 นาโนกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าระบบนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับแอลฟาฟีโตโปรตีนและอิเล็กโทรดทำงานสามารถนำมาใช้ใหม่ได้ถึง 48 ครั้ง นั้นคือเซลฟ-แอสเซมเบิลไทโอยูเรียโมโนเลเยอร์ที่มีราคาถูกกว่ากรดไทออกติกและ กรด3-เมอแคพโตโพรไพโอนิคเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถประยุกต์ใช้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

พัฒนาคาพาซิทิฟอิมมูโนเซนเซอร์ที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (reusable capacitive immunosensor) สำหรับตรวจวัดคาซิโนเอมไบรโอนิคแอนติเจน (carcinoembryonic antigen, CEA) โดยตรง โดยตรึงแอนติ-คาซิโนเอมไบรโอนิคแอนติเจน (anti-carcinoembryonic antigen, anti-CEA) บนเซลฟ-แอสเซมเบิลไทโอยูเรียโมโนเลเยอร์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมขีดจำกัดการตรวจวัดคือ 10 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงของความเป็นเส้นตรงคือ 0.01 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แอนติ-คาซิโนเอมไบรโอนิคแอนติเจนที่ตรึงอยู่บนเซลฟ-แอสเซมเบิลไทโอยูเรียโมโนเลเยอร์อิเล็กโทรดสามารถนำมาใช้ใหม่ได้ถึง 45 ครั้ง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) น้อยกว่า 3.4 % จากผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของคาซิโนเอมไบรโอนิคแอนติเจนในตัวอย่างซีรัมโดยใช้ระบบโฟลว์อินเจคชันคาพาซิทิฟอิมมูโนเซนเซอร์ พบว่าให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับวิธีเอนไซม์ลิงค์ฟลูออเรสเซนต์แอสเส (enzyme linked fluorescence assay) ($P < 0.05$)

จากการศึกษาสรุปได้ว่าระบบโฟลว์อินเจคชันคาพาซิทิฟแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดโดยตรงของสารที่ต้องการวิเคราะห์หลายชนิด ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการเลือก (selective) สูง สามารถตรวจวัดปริมาณสารได้อย่างถูกต้อง ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย (12-18 นาที) การเตรียมขั้วอิเล็กโทรดทำงานทำได้ง่าย นอกจากนี้พบว่าขั้วอิเล็กโทรดทำงานสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ในสภาวะกรดเป็นตัวรีเจอเนอเรต (regenerate) ซึ่งขั้วอิเล็กโทรดทำงานสามารถใช้ได้มากกว่า 40 ครั้งโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 4.3 %

Thesis Title	Affinity Biosensor Using Electrochemical Detection Principle
Author	Mr. Warakorn Limbut
Major Program	Chemistry
Academic Year	2005

Abstract

Flow injection capacitive affinity biosensor systems for direct detection of affinity binding have been developed and evaluated. Biorecognition element was immobilized on a self-assembled monolayer (SAM) of sulfur-containing molecules on a working electrode. The interaction between target analyte and biorecognition element on electrode surface causes the capacitance to decrease. Two affinity binding pairs, human serum albumin (HSA) and anti human serum albumin (anti-HSA), and protein A and crystallizable fragment (Fc-fragments) from IgG (anti-HSA), were investigated. At optimum conditions the plot between capacitance change and logarithm of HSA concentration showed two linear ranges with different sensitivities, *i.e.*, from 1×10^{-15} to 1×10^{-9} M and 1×10^{-7} to 1×10^{-5} M. The detection limit was 1 fM. In the case of protein A, the linear range was 1.0×10^{-14} to 1.0×10^{-10} M. The detection limit was 10 fM.

The system was applied for direct detection of bacterial endotoxin in fermentation liquid. Lectin (Endotoxin neutralizing protein (ENP)) derived from American horseshoe crab was used as the biorecognition element. Under optimum conditions, endotoxin could be determined with a detection limit of 0.1 pM and linearity ranging from 1.0×10^{-13} to 1.0×10^{-10} M. Good agreement was achieved between the capacitive biosensor system and the conventional *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) test ($P < 0.05$).

A new self-assembled monolayer for capacitive immonosensor using thiourea, a cheaper compound, was also investigated and compared to thioctic acid and 3-mercaptopropionic acid. Anti-alpha-fetoprotein (anti-AFP) and alpha-fetoprotein (AFP) was used as the affinity pair. Covalent coupling of anti-AFP on

self-assembled thiourea monolayer modified gold electrode can be used to detect AFP with high efficiency, similar sensitivity, the same linear range (0.01-10 $\mu g\ l^{-1}$) and detection limit (10 ng l^{-1}) as those obtained from sensors based on self-assembled thioctic acid monolayer and self-assembled 3-mercaptopropionic acid monolayer. The system is specific for AFP and can be regenerated and reused up to 48 times. Self-assembled monolayer using thiourea which is cheaper than thioctic acid and 3-mercaptopropionic acid is a good alternative for biosensor applications when SAMs are used.

A reusable capacitive immunosensor for the direct detection of carcinoembryonic antigen (CEA) using anti-carcinoembryonic antigen (anti-CEA) immobilized on a self-assembled thiourea monolayer (SATUM) via covalent coupling was then developed. Under optimum conditions, a detection limit of 10 pg ml^{-1} and linearity in the range of 0.01 to 10 ng ml^{-1} were obtained. The immobilized anti-CEA on SATUM gold electrode was stable and after regeneration good reproducibility of the signal could be obtained up to 45 times with an RSD lower than 3.4%. Good agreement was obtained when CEA concentrations of human serum samples determined by the flow injection capacitive immunosensor system were compared to those obtained using an enzyme linked fluorescent assay method ($P < 0.05$).

The studies show that flow injection capacitive affinity biosensor systems can be applied for direct detection of several target analytes. This technique is highly selective, can detect analyte with accuracy, using short analysis time (12-18 min). The preparation of the modified electrode is quite simple. Furthermore, the working electrode can be regenerated with good reproducibility (% RSD < 4.3), enable the electrode to be reused for more than 40 times.

self-assembled thiourea monolayer modified gold electrode can be used to detect AFP with high efficiency, similar sensitivity, the same linear range (0.01-10 $\mu g\ l^{-1}$) and detection limit (10 $ng\ l^{-1}$) as those obtained from sensors based on self-assembled thioctic acid monolayer and self-assembled 3-mercaptopropionic acid monolayer. The system is specific for AFP and can be regenerated and reused up to 48 times. Self-assembled monolayer using thiourea which is cheaper than thioctic acid and 3-mercaptopropionic acid is a good alternative for biosensor applications when SAMs are used.

A reusable capacitive immunosensor for the direct detection of carcinoembryonic antigen (CEA) using anti-carcinoembryonic antigen (anti-CEA) immobilized on a self-assembled thiourea monolayer (SATUM) via covalent coupling was then developed. Under optimum conditions, a detection limit of 10 $pg\ ml^{-1}$ and linearity in the range of 0.01 to 10 $ng\ ml^{-1}$ were obtained. The immobilized anti-CEA on SATUM gold electrode was stable and after regeneration good reproducibility of the signal could be obtained up to 45 times with an RSD lower than 3.4%. Good agreement was obtained when CEA concentrations of human serum samples determined by the flow injection capacitive immunosensor system were compared to those obtained using an enzyme linked fluorescent assay method ($P < 0.05$).

The studies show that flow injection capacitive affinity biosensor systems can be applied for direct detection of several target analytes. This technique is highly selective, can detect analyte with accuracy, using short analysis time (12-18 min). The preparation of the modified electrode is quite simple. Furthermore, the working electrode can be regenerated with good reproducibility (% RSD < 4.3), enable the electrode to be reused for more than 40 times.