**Thesis Title** Development of Flow Injection-Capillary Immunoassay

System

Author Mr. Apichart Boonmalai

**Degree** Master of Science (Chemistry)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Supaporn Kardtap

## **ABSTRACT**

Clinical screening of some diseases involving a large number of samples which requires an increasing demand for automated analysis system with short analysis time, low reagent consumption and easy operation. Sequential injection system offers the above criteria and it is suitable to be coupled to capillary immunoassay because of its precise timing for incubation and washing steps and capability to handle many reagents with the computer system. The sequential injection-capillary immunoassay system was designed to overcome the backpressure which is a common drawback found in packed column. The main objectives are to lower the cost of the system by using glass capillary instead of fused silica capillary as a solid surface for immobilization of antigen and to make immunoassay process more automated. In this study, the system was applied to assay hyaluronan (HA), a potential biomarker for liver disease. Competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the amount of HA in human serum. This technique is based on the competition between immobilized HA and HA in solution to

bind with a fixed amount of biotinylated HA-binding proteins (b-HABPs). Upon separation of the unbound reagents, anti-biotin antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) enzyme and Tetramethylbenzidine (TMB) substrate were introduced. The colored product was monitored at 650 nm. The lowest detectable concentration using this method was found to be 9 ng/mL with the dynamic working range of 10-1,000 ng/mL. The precision within- and between run were found to be 3 % and 6 % RSD, respectively. There were no significantly difference between the sequential injection-capillary immunoassay (SI-CI) and the conventional ELISA with 96 well plate as the correlation coefficient (r) was found to be 0.89. Even though, sample throughput per unit time is lower, the analysis time per sample obtained from the SI-CI system was only about 30 min as compared to the 5-8 h used in conventional well ELISA. Therefore, the SI-CI system is useful and suitable for screening study of low to medium size sample such as in the rural area where population size is not large but it is far away from extensive and expensive diagnosis facilities. Average level of HA found in human serum with liver disease (264±160 ng/mL, n = 15) was significantly higher than that in normal serum (50±20 ng/mL, n = 15) 15) at the significance level of 0.001 (p < 0.001, 99.9% confidence level), which indicated that the proposed system could distinguish liver disease patients from normal persons.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การพัฒนาระบบ โฟลอินเจคชัน-คาปิลลารีอิมมู โนแอสเสย์

ผู้เขียน

นายอภิชาติ บุญมาลัย

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนซ์

ผศ. คร. สุภาภรณ์ ครัคทัพ

## บทคัดย่อ

การตรวจคัดกรองโรคบางชนิดทางการแพทย์นั้นเกี่ยวข้องกับจำนวนตัวอย่างส่งตรวจ จำนวนมาก ความต้องการการตรวจวัดที่มีความเป็นอัตโนมัติ ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ใช้สาร ระบบซีเควนเชียลอินเจคชันสนองความต้องการดังกล่าว ปริมาณน้อยและใช้งานง่ายจึงเพิ่มขึ้น ้ข้างต้นและเหมาะสมในการใช้ร่วมกับคาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์เพราะมีความแม่นยำในการ กำหนดเวลาขึ้นตอนการบ่มเพาะและการล้างระบบ และยังสามารถใช้กับรีเอเจนต์ที่มีหลายตัวโดย การควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ ระบบซีเควนเชียลอินเจคชัน-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์ใค้ ออกแบบมาเพื่อแก้ปัญหาแรงดันย้อนกลับซึ่งเป็นปัญหาที่พบในระบบแพคคอลัมน์ หลักของงานวิจัยนี้เพื่อที่จะลดต้นทุนของระบบการวิเคราะห์โดยใช้คาปิลลารีแก้วแทนการใช้ฟิวส์ ซิลิกาคาปิลลารีเป็นพื้นผิวของแข็งที่ใช้ตรึงแอนติเจน และเพื่อทำให้กระบวนการอิมมูโนแอสเสย์มี ความเป็นอัตโนมัติมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้ระบบสำหรับการหาปริมาณไฮยาลูโรแนน (เอชเอ) ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจติดตามโรคตับ เอ็นใชม์ถิงค์อิมมูโนซอร์พเบนท์ แอสเสย์แบบแข่งขันเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการหาปริมาณ เอชเอ ในซีรัม เทคนิคนี้อาศัยหลักการ แข่งขันกันระหว่างเอชเอที่ถูกตรึงกับเอชเอในสารละลายเพื่อจับกับใบโอทินนิลเลท เอชเอ ใบน์ดิง ้โปรตีนที่มีปริมาณจำกัด หลังจากแยกสารส่วนที่ไม่จับออกแล้ว แอนติไบโอทินคอนจูเกตฮอสราดิส เพอร์ออกซิเคสเอนใชม์และเทตระเมทิลเบนซิดีนซับเสรตจะถูกเติมลงไป เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้มีค่า เท่ากับ 9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ช่วงสำหรับการวิเคราะห์ 10-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐาน กวามแม่นยำภายในการทดลองและระหว่างการทดลอง

สัมพัทธ์เท่ากับ 3 เปอร์เซนต์ และ 6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญ ระหว่างการตรวจด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจคชัน-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์กับแบบเอ็นไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอร์พเบนท์แอสเสย์ชนิคเพลท 96 หลุม ดังแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.89 ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างต่อการวิเคราะห์ในแต่และครั้งจะน้อยกว่า แต่เวลาที่ใช้ในการ วิเคราะห์ต่อตัวอย่างโดยวิธีซีเควนเชียลอินเจคชัน-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์นั้นใช้เวลาเพียง ประมาณ 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์พเบนท์แอสเสย์แบบเดิมซึ่งใช้เวลา 5-8 ชั่วโมง ดังนั้นระบบที่พัฒนาขึ้นนี้มีประโยชน์และเหมาะสำหรับการศึกษาคัดกรองสารตัวอย่าง จำนวนน้อยหรือปานกลางเช่นในชนบทซึ่งมีจำนวนประชากรไม่มาก แต่อยู่ห่างไกลจากสถานที่ ให้บริการที่มีการวิเคราะห์โรคขั้นสูงที่มีราคาแพง โดยเฉลี่ยแล้วปริมาณ เอชเอ ที่พบในซีรัมผู้ป่วยที่ เป็นโรคตับ (264±160 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จะมีปริมาณสูงกว่าคนปกติ (50±20 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 (p < 0.001, ระดับความเชื่อมั่น 99.9 %) แสดงให้เห็นว่าระบบ ที่เสนอนี้สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของผู้ป่วยโรคตับจากคนปกติใด้

## ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Copyright © by Chiang Mai University All rights reserved