

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, $n = 15$) 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.

สัมพัทธ์เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญระหว่างการตรวจด้วยระบบซีเควนเซียลอินเจกชัน-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์กับแบบเอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์พเบนท์แอสเสย์ชนิดเพลท 96 หลุม ดังแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.89 ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างต่อการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งจะน้อยกว่า แต่เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างโดยวิธีซีเควนเซียลอินเจกชัน-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์นั้นใช้เวลาเพียงประมาณ 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์พเบนท์แอสเสย์แบบเดิมซึ่งใช้เวลา 5-8 ชั่วโมง ดังนั้นระบบที่พัฒนาขึ้นนี้มีประโยชน์และเหมาะสมสำหรับการศึกษาคัดกรองสารตัวอย่างจำนวนน้อยหรือปานกลางเช่นในชนบทซึ่งมีจำนวนประชากรไม่มาก แต่อยู่ห่างไกลจากสถานที่ให้บริการที่มีการวิเคราะห์โรคขั้นสูงที่มีราคาแพง โดยเฉลี่ยแล้วปริมาณ เอชเอ ที่พบในซีรัมผู้ป่วยที่เป็นโรคตับ (264 ± 160 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จะมีปริมาณสูงกว่าคนปกติ (50 ± 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$, ระดับความเชื่อมั่น 99.9 %) แสดงให้เห็นว่าระบบที่เสนอนี้สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของผู้ป่วยโรคตับจากคนปกติได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved