Thesis Title Development of an Electrochemical-based Bioassay Using a Pencil Lead Working Electrode for the Determination of Some Biomarkers

Author Miss Preeyaporn Reanpang

Degree Master of Science (Chemistry)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Supaporn Kradtap

ABSTRACT

This research aims to develop a simple amperometric detection system using three electrodes for quantitative assay of horseradish peroxidase (HRP) which is commonly used as a label in immunoassay and as a reagent for quantitative analysis of H_2O_2. The studies utilized 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as substrate. Electrochemical signal directly related to concentrations of HRP and H_2O_2. The low cost commercial pencil lead was employed as a working electrode (WE) while Pt wire and Ag/AgCl were auxiliary electrode (AE) and reference electrode (RE), respectively. Various parameters that affect the analysis such as the size of pencil lead, brands and grades of pencil lead and numbers of pencil lead to make a bundle of working electrode were studied to select for the most suitable pencil lead working electrode. A calibration curve for HRP was constructed in DI water in the range of 0-50 µg/L (R^2=0.991) with detection limit of 1.8 µg/L.

The proposed system was applied to determine some biomolecules such as cancer biomarkers (i.e., chondroitin sulfate (CS), hyaluronan (HA) and sialic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(SA)) and oxidative stress biomarker (i.e., hydrogen peroxide (H_2O_2)). Assay procedures of cancer biomarkers were based on bio/immunoassay with enzyme HRP label. Biomolecules that specifically recognize analytes of interest were immobilized onto the pencil lead working electrode. Different immobilization methods including physical adsorption, acidity modification, chitosan modification, glutaraldehyde modification were tried. It was found that bovine submaxillary mucin (BSM) used for the assay of sialoglycoconjugate (SA) could be adsorbed onto the pencil lead working electrode with a simple physical adsorption method. Therefore, sialoglycoconjugate was selected as a model cancer biomarker. Competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted based on the competition between immobilized BSM and SA (or BSM standard) in solution to bind with a limited amount of biotinylated lectin. Upon separation of the unbound reagents, anti-biotin antibody conjugated with HRP, and substrate TMB were introduced. A dose response curve for sialoglycoconjugate was obtained in the range of 1-10^7 ng/mL. In addition, assay procedure of oxidative stress biomarker (H_2O_2) based on an immobilized HRP electrode was carried out. A linear calibration graph was obtained in the range of 0-1 mM (R^2=0.981) H_2O_2. Application of the system for quantitative analysis of H_2O_2 in urine was attempted to evaluate for possibility and limitation of using the system with real samples.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาไบโอแอสเสย์แบบเคมีไฟฟ้าโดยใช้ไส้ดินสอเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับการหาปริมาณสารบ่งชี้ทางชีวภาพบางชนิด

ผู้เขียน นางสาวปรียาภรณ์ เรียนแพง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. สุภาภรณ์ ครัดทัพ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบการตรวจวัดแอมแปโรเมตริกอย่างง่ายโดยใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งใช้เป็นตัวติดฉลากในงานด้านอิมมูโนแอสเสย์และยังใช้เป็นสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยในงานนี้ได้ใช้เทตระเมทิลเบนซิดีนเป็นซับสเตรต สัญญาณไฟฟ้าเคมีที่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระบบได้ใช้ไส้ดินสอที่มีขายตามท้องตลาดซึ่งมีราคาถูกเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ขณะที่ลวดแพลตทินัมและซิลเวอร์/ซิลเวอร์-คลอไรด์เป็นขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าอ้างอิงตามลำดับ และได้ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการวิเคราะห์เพื่อเลือกไส้ดินสอที่เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานที่ดีได้แก่ ขนาดของไส้ดินสอ ชนิด ความแข็งของไส้ดินสอและจำนวนแท่งของไส้ดินสอที่นำมาเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในน้ำปราศจากไอออนอยู่ในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อลิตร (R^2= 0.991) และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 1.8 ไมโครกรัมต่อลิตร

ระบบที่ได้นำเสนอถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารไบโอโมเลกุลบางชนิด ได้แก่ สารบ่งชี้ทางชีวภาพการเป็นโรคมะเร็ง (เช่น คอนดรอยตินซัลเฟต (CS), ไฮยาลูโรแนน (HA) และ กรดไซอะลิก (SA)) และสารบ่งชี้ทางชีวภาพบอกถึงภาวะอนุมูลอิสระเกิน (เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ขั้นตอนการวิเคราะห์สารบ่งชี้ทางชีวภาพการเป็นโรคมะเร็งอาศัยการวิเคราะห์ไบโออิมมูโนแอสเสย์โดยใช้เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวติดฉลาก โดยที่ไบโอโมเลกุลที่มีความจำเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เจาะจงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ถูกตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงานไส้ดินสอและได้ทำการทดลองตรึงสารด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การดูดซับทางกายภาพ, โมดิฟิเคชั่นด้วยกรด, โมดิฟิเคชั่นด้วยไคโตซาน และโมดิฟิเคชั่นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่ามิวซินที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ไซอาโลไกลโคคอนจูเกต (SA) สามารถถูกตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้าทำงานไส้ดินสอด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพอย่างง่ายได้ ดังนั้นจึงเลือกไซอาโลไกลโคคอนจูเกตเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพการเป็นโรคมะเร็งเป็นแม่แบบในการวิเคราะห์ เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนแอสเสย์แบบแข่งขันเป็นเทคนิคที่นำมาใช้โดยอาศัยหลักการแข่งขันมิวซินที่ถูกตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้าทำงานไส้ดินสอกับไซอาโลไกลโคคอนจูเกต (หรือสารมาตรฐานมิวซิน) ที่อยู่ในสารละลาย เพื่อจับกับไบโอทินนิลเลทเลคตินที่มีปริมาณจำกัด หลังจากแยกสารส่วนที่ไม่จับออกแล้ว แอนติไบโอทินคอนจูเกตกับเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสและเทตระเมทิลเบนซิดีนถูกเติมลงไป ช่วงกราฟตอบสนองสำหรับไซอาโลไกลโคคอนจูเกตอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1-10^7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นได้ทำการวิเคราะห์สารบ่งชี้ทางชีวภาพบอกถึงภาวะอนุมูลอิสระเกิน (H_2O_2) โดยอาศัยขั้วไฟฟ้าที่ถูกตรึงด้วยเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในการวิเคราะห์ ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ได้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1 มิลลิโมลาร์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (R^2=0.981) ได้ประยุกต์ใช้ระบบที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะเพื่อประเมินความเป็นไปได้และข้อจำกัดของการใช้ระบบการวิเคราะห์ดังกล่าวกับตัวอย่างจริง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved