เวธกา เช้าเจริญ : การพัฒนาคาพาซิทีฟอิมมูโนเซนเซอร์ในการตรวจวัดโปรตีนเหมือนไคติเนสซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (THE DEVELOPMENT OF CAPACITIVE IMMUNOSENSORS TO DETECT CHITINASE-LIKE PROTEIN BIOMARKERS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 173 หน้า

ในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาคาพาซิทีฟอิมมูโนเซนเซอร์แบบไม่ติดฉลากเพื่อการตรวจวัดโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ต่อโรค 2 ชนิดคือ YKL-39 และ YKL-40 ในระบบโฟลว์อินเจคชันวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 ในระบบการแสดงออกจากเซลล์แบคทีเรีย และเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อใช้สำหรับการผลิตโพลีโคลนอลที่จำเพาะต่อโปรตีน YKL-40 จากการศึกษาพบว่า YKL-40 แอนติบอดีมีความจำเพาะและทำปฏิกิริยาอย่างสูงต่อโปรตีน YKL-40 เมื่อนำ YKL-40 โพลีโคนอลแอนติบอดีที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ มาตรึงบนผิวอิเลคโทรดทองคำทำงานโดยเทคนิคการเคลือบผิวแบบเรียงตัวชั้นเดียว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ของระบบอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 จากแบคทีเรีย ได้แก่ ปริมาณสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร อัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 3.16 มิลลิโมลาร์ (พีเฮชเท่ากับ 2.5) เป็นสารรีเจเนอร์เรต และบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าพีเฮชที่ 7.0 ในขณะที่ สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ของระบบอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ ปริมาณสารตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร อัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 3.16 มิลลิโมลาร์ (พีเฮชเท่ากับ 2.5) เป็นสารรีเจเนอร์เรต และบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าพีเฮชที่ 7.0 โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ทั้งสองระบบของอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 พบช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.1 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าขีดจำกัดที่ต่ำสุดในการวัดอยู่ที่ 0.07±0.01 ไมโครกรัมต่อลิตรในอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 จากแบคทีเรีย และ 0.08±0.02 ไมโครกรัมต่อลิตรในอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อิเลคโทรดทำงานสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 40 รอบ สำหรับอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 จากแบคทีเรีย และ 50 รอบ สำหรับอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-40 จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และระบบยังแสดงความจำเพาะต่อโปรตีน YKL-40 ในตัวอย่างแบบจำลองพบว่า การพัฒนาระบบอิมมูโนเซนเซอร์ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีการวิเคราะห์ในช่วงร้อยละ 98 ถึง 102 และในการตรวจวัดค่าโปรตีน YKL-40 ใน 4 ตัวอย่างของคนปกติ 5 ตัวอย่างของมะเร็งเต้านม และ 4 ตัวอย่างของมะเร็งสมอง ด้วยวิธีอิมมูโนเซนเซอร์ต่อ

โปรตีน YKL-40 จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ให้ค่าการตรวจวัดของโปรตีน YKL-40 ที่ตรงกับวิธีมาตรฐาน ELISA อย่างไรก็ตาม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างกว่า และมีค่าขีดจำกัดที่ต่ำสุดในการวัดต่ำกว่า อีกทั้งอิเลคโทรดทำงานสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง

ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาการพัฒนาคาพาซิทีฟอิมมูโนเซนเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดโปรตีน YKL-39 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการติดตามความก้าวหน้าของโรคข้อเสื่อม โพลีโคนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ถูกใช้ในการตรึงกับอิเลคโทรดทองทำงานโดยเทคนิค การเคลือบผิวแบบเรียงตัวชั้นเดียวด้วยไทโอยูเรีย สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ของระบบของคาพาซิทีฟอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-39 ได้แก่ ปริมาณสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร อัตราการไหล 100 ไมโครลิตรต่อนาที กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 3.16 มิลลิโมลาร์ (พีเฮชเท่ากับ 2.5) เป็นสารรีเจเนอร์เรต และบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ มีค่าพีเฮชที่ 7.0 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพบช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าขีดจำกัดที่ต่ำสุดในการวัดอยู่ที่ 0.07±0.02 ไมโครกรัมต่อลิตร อิเล็กโทรดตรึงโพลีโคนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 49 ครั้งโดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่าร้อยละ 5 ค่าที่ได้ในการตรวจวัดค่าโปรตีน YKL-39 ในตัวอย่างเซลล์ ตัวอย่างแบบจำลอง และน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมพบว่า วิธีคาพาซิทีฟอิมมูโนเซนเซอร์ต่อโปรตีน YKL-39 และ วิธีมาตราฐาน ELISA พบว่าวิธีทั้งสองให้ค่าการตรวจวัดของโปรตีน YKL-39 ที่ตรงกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

WETHAKA CHAOCHAROEN : THE DEVELOPMENT OF CAPACITIVE IMMUNOSENSORS TO DETECT CHITINASE-LIKE PROTEIN BIOMARKERS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 173 PP.

THE DEVELOPMENT OF CAPACITIVE IMMUNOSENSORS TO DETECT CHITINASE-LIKE PROTEIN BIOMARKERS

In this study, a label-free capacitive immunosensor to detect two disease markers YKL-39 and YKL-40 has been established in a flow injection system. This thesis is divided into two parts. The first part involves expression of YKL-40 in bacterial and mammalian cell expression systems that were used as for production of anti-YKL-40 polyclonal antibody. The YKL-40 antibodies were highly specific and strongly reacting with YKL-40. The purified YKL-40 polyclonal antibody was immobilized on a gold working electrode via a self-assembled monolayer. Optimum operational conditions of the bacterial- YKL-40 immunosensor were a sample volume of 200 µL, a flow rate of 100 µL/min, HCl solution, pH 2.5, as regeneration solution and 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, as running buffer. For the mammalian-YKL-40 immunosensor, they were a sample volume of 250 µL, a flow rate of 100 µL/min, HCl solution, pH 2.5, as a regeneration solution and 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, as running buffer. Under optimum operational conditions, both YKL-40 immunosensors gave a linear dynamic range between 0.1 and 1,000 µg/L, with limit of detection of 0.07±0.01 µg/L for the bacterial-YKL-40 immunosensor and 0.08±0.02 µg/L in the mammalian-YKL-40 immunosensor. The

reproducibility of working electrode can be regenerated up to 40 cycles for the bacterial-YKL-40 immunosensor and 50 cycles for the mammalian-YKL-40 immunosensor. The system also showed good selectivity towards YKL-40. In model samples, the newly-developed capacitive immunosensor provided good recovery in a range of 98 to 102%. The serum level of YKL-40 in 4 healthy people, 5 breast cancer patients and 4 glioblastoma patients was detected with the mammalian-YKL-40 immunosensor and the results agreed with the standard ELISA method. However, this developed method offered greater advantages with a broader linear range, lower limit of detection and multiple uses of the antibody-immobilized electrode.

In the second part, a capacitive immunosensor for detection YKL-39 as osteoarthritis biomarker was developed. Antibody against YKL-39 was immobilized on a gold working electrode via a self-assembled thiourea monolayer. Optimum operational conditions were a sample volume of 200 µL, a flow rate of 100 µL/min, HCl solution, pH 2.5, as a regeneration solution and 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, as running buffer. The linear detection range was between 0.1 µg/L and 1 mg/L with the detection limit of 0.07±0.02 µg/L. The immobilized anti-YKL-39 antibody on gold electrode was stable and after regeneration good reproducibility of the signal could be obtained up to 49 times with an RSD lower than 5%. Good agreement was obtained when YKL-39 concentrations of cell lysate, model samples and synovial fluid were determined by the YKL-39 capacitive immunosensor system as compared to the ELISA method.

School of Biochemistry Student's signature _____

Academic Year 2015 Advisor's signature _____