Thesis Title Development of Sequential Injection-Capillary Immunoassay System for Determination of Sialoglycoconjugates

Author Miss Napaporn Wannaprom

Degree Master of Science (Chemistry)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Supaporn Kradtap

ABSTRACT

The conventional ELISA with 96 well plate immunoassay is normally used for clinical assay. This technique involves some tedious steps (incubation and washing steps) which are non-automatic, highly time consuming, and subjected to human errors. Automatic immunoassay system will eliminate some of these limitations. In this study, a sequential injection-capillary immunoassay (SI-CI) system was developed to overcome the backpressure which is a common drawback found in flow based packed column immunoassay. The system was applied to assay sialoglycoconjugates in human serum, a potential biomarker for various types of cancer disease. Competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted based on the competition between immobilized bovine submaxillary mucin (BSM) and sialoglycoconjugates in serum (or sialoglycoconjugates (BSM equivalent) standards) to bind with a limited amount of biotinylated lectin. Upon separation of the unbound reagents, anti-biotin antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) enzyme and tetramethylbenzidine (TMB) substrate were introduced. The color product of enzyme HRP and substrate TMB was developed and monitored at 650 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The lowest detectable concentration using this method was found to be 4 ng/mL with the dynamic working range of 10-1000 ng/mL. The analysis time per sample obtained from the SI-CI system was about 40 min as compared to the 5-8 h used in conventional well ELISA. Average level of sialoglycoconjugates found in human serum with cancer disease (356±232 ng/mL, n = 17) was significantly higher than in normal serum (22±21 ng/mL, n = 33) at the significant level of 0.01 ($p \leq 0.01$), which indicated that the proposed system could distinguish cancer disease patients from healthy persons.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาระบบซีเควนเชียลอินเจคชัน-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์สำหรับการหาปริมาณไซอาโลไกลโคคอนจูเกต

ผู้เขียน นางสาวนภาพร วรรณาพรม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สุภาภรณ์ ครัดทัพ

บทคัดย่อ

โดยทั่วไปอิมมูโนซอร์พเบนท์แอสเสย์ชนิดเพลท 96 หลุมเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจตัวอย่างทางคลินิก เทคนิคนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก เช่น การบ่มเพาะและการล้าง เป็นระบบที่ไม่อัตโนมัติ ใช้เวลาในการวิเคราะห์มากและเกิดความผิดพลาดจากผู้ทดลองได้ง่าย การพัฒนาระบบอิมมูโนแอสเสย์ที่มีความเป็นอัตโนมัติจะช่วยลดข้อจำกัดดังกล่าวได้ ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบซีเควนเชียลมาใช้ร่วมกับคาปิลลารีอิมมูโนแอสเสย์ เพื่อแก้ปัญหาแรงดันย้อนกลับซึ่งเป็นปัญหาที่พบในระบบโฟลอิมมูโนแอสเสย์แบบแพคคอลัมน์ ได้ประยุกต์ใช้ระบบสำหรับการหาปริมาณไซอาโลไกลโคคอนจูเกตในซีรัม ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจติดตามโรคมะเร็งชนิดต่างๆ เอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนแอสเสย์แบบแข่งขันเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ โดยอาศัยหลักการแข่งขันระหว่างมิวซินที่ถูกตรึงไว้บนผิวแก้ว กับไซอาโลไกลโคคอนจูเกตที่มีอยู่ในตัวอย่าง (หรือสารมาตรฐานไซอาโลไกลโคคอนจูเกต) เพื่อจับกับไบโอทินนิลเลทเลคตินที่มีปริมาณจำกัดหลังจากแยกสารส่วนที่ไม่จับออกแล้ว แอนติไบโอทินคอนจูเกตกับเอนไซม์ฮอสราดิสเพอร์ออกซิเดสและเทตระเมทิลเบนซิดีนซับสเตรทจะถูกเติมลงไป เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ช่วงสำหรับการวิเคราะห์ 10-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างโดยวิธีซีเควนเชียล-คาปิลลารีอิมมูโนแอสเลย์นั้นใช้เวลาประมาณ 40 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอิมมูโนซอร์พเบนท์เอสเสย์ชนิดเพลท 96 หลุมซึ่งใช้เวลา 5-8 ชั่วโมง โดยเฉลี่ยแล้วปริมาณไซอาโลไกลโคคอนจูเกตที่พบในซีรัมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง (356±232 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน 17 ตัวอย่าง) จะมีปริมาณสูงกว่าคนปกติ (22±21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, จำนวน 33 ตัวอย่าง) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ($p \leq 0.01$) แสดงให้เห็นว่าระบบที่เสนอนี้สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของผู้ป่วยโรคมะเร็งจากคนปกติได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved