

**MICROCANTILEVER-BASED BIOSENSOR FOR DETECTION
OF *Vibrio cholerae* O1**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ไบโอเซนเซอร์ชนิดไมโครแคนติลิวอร์สำหรับการตรวจวัดเชื้อ *Vibrio Cholerae* O1

(MICROCANTILEVER-BASED BIOSENSOR FOR DETECTION OF *Vibrio Cholerae* O1)

อุษา สังขนาท 4837280 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จำรัส พร้อมมาศ, ประ.ด., อติสร เดือนตราสนนท์, ประ.ด., เกศรา วัตอักษร, ประ.ด.

บทคัดย่อ

Vibrio cholerae O1 คือเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงหรือ อหิวาตกโรค การตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคอย่างรวดเร็วมีความสำคัญต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ *V. cholerae* O1 แต่วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการปัจจุบันใช้ระยะเวลายาวนาน มีกระบวนการหลายขั้นตอนแต่ให้ความไวในการตรวจวิเคราะห์ต่ำ ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ชนิดไมโครแคนติลิวอร์สำหรับการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* O1 กระบวนการทดลองเริ่มจากการตรึงสารแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเชื้อที่ต้องการศึกษาด้วยวิธีการที่เรียกว่า self-assembled monolayers (SAMs)

สารเคมีที่ชื่อว่า 3-mercaptopropionic acid ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทอัลเคนไธออลที่มีความสามารถในการเรียงตัวเป็นชั้นเดียวอยู่บนผิวทองและให้หมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิก (-COOH) สำหรับใช้ในการสร้างพันธะชนิดโควาเลนต์กับโมเลกุลของแอนติบอดี ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องการการกระตุ้นจากสารเคมีที่ชื่อว่า 1-ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) และ *N*-hydroxysuccinimide (NHS) หลังจากนั้นพื้นที่ที่ยังว่างอยู่บนพื้นผิวไมโครแคนติลิวอร์จะถูกปิดด้วยโปรตีนซีรัมจากวัว (bovine serum albumin)

ไมโครแคนติลิวอร์จะถูกนำไปทดสอบกับสารแขวนลอยของเชื้อ *V. cholerae* ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกิดขึ้นและสร้างคอมเพลกซ์ที่มีมวลลดทับลงบนไมโครแคนติลิวอร์ ซึ่งมีผลทำให้ความถี่ในการสั่นของไมโครแคนติลิวอร์ลดลงซึ่งตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Atomic force microscope (AFM) ไบโอเซนเซอร์ชนิดไมโครแคนติลิวอร์มีความสามารถในการตรวจวัดเชื้อ *V. cholerae* O1 ในช่วงค่าความเข้มข้นที่ 1×10^3 - 1×10^6 CFU/ml ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้คือ 1×10^3 CFU/ml และความไวในการตรวจวัดมีค่าประมาณ 146.5 พิโคกรัม/เฮิร์ต ไมโครแคนติลิวอร์ที่ผ่านการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแล้วจะถูกนำไปถ่ายภาพพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนนิ่งเพื่อยืนยันการเกาะของเชื้อ *V. cholerae* O1 บนผิวของไมโครแคนติลิวอร์ จากผลการทดลองพบว่าไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่นี้ให้การทดสอบที่รวดเร็วด้วยวิธีการตรวจที่ง่ายและมีความไวสูง เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ *V. cholerae* O1 ตามความต้องการของกระทรวงสาธารณสุข

MICROCANTILEVER-BASED BIOSENSOR FOR DETECTION
OF *Vibrio cholerae* O1

USA SUNGKANAK 4837280 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D., ADISORN TUANTRANONT,
Ph.D., KESARA WAT-AKSORN, Ph.D.

ABSTRACT

Vibrio cholerae O1 is a bacterium which causes severe diarrhea or cholera in humans. Rapid detection is necessary for effective control of this disease but the conventional method for *V. cholerae* O1 detection is time consuming, laborious and has low sensitivity. In this study, a new microcantilever-based biosensor was developed for detection of this food and waterborne pathogen. This biosensor was constructed by immobilizing the anti-*V. cholerae* O1 monoclonal antibody on microcantilever surface using the self-assembled monolayers (SAMs) method.

The 3-Mercaptopropionic acid (MPA) was used as alkanethiol to form a monolayer and to leave the carboxyl group on the microcantilever surface. The antibody was immobilized on this surface by activation of 1-ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS). The empty surface was blocked with bovine serum albumin (BSA) to prevent nonspecific binding.

For the sensing experiment, antibody and antigen (*V. cholerae* O1 cells) binding induced mass loading of *V. cholerae* O1 cells bound onto the cantilever beam surface and caused the shift of resonance frequency of the cantilever beam, which was then measured by atomic force microscope (AFM). The microcantilever-based biosensor was able to detect *V. cholerae* O1 in concentrations ranging from 1×10^3 to 1×10^6 CFU/ml. The limit of detection was 1×10^3 CFU/ml and the mass sensitivity, $\Delta m/\Delta F$, was approximately 146.5 pg/Hz. A scanning electron microscope (SEM) was used to evaluate topography of microcantilever with *V. cholerae* O1 antigen-antibody binding. The new biosensor provides fast and uncomplicated detection steps with high sensitivity, and offers the protection required for public health protection.

KEY WORDS: MICROCANTILEVER / IMMUNOSENSOR / CHOLERA /

*VIBRIO CHOLERA*E O1 / ATOMIC FORCE MICROSCOPY

95 P.