DEVELOPMENT OF A MICROFLUIDIC BIOSENSOR FOR CHOLERA TOXIN DETECTION

NATINAN BUNYAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2010

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

DEVELOPMENT OF A MICROFLUIDIC BIOSENSOR FOR CHOLERA TOXIN DETECTION

NATINAN BUNYAKUL 4736819 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORORY COMMITTEE: CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D., WIJIT WONGLUMSOM, Ph.D., KWANCHANOK PASUWAT, Ph.D.

ABSTRACT

Cholera is an epidemic diarrheal disease characterized by severe watery diarrhea and can lead to rapid dehydration and acidosis. The severe dehydration can cause death within 3-4 h in cases of untreated patients. The causative agent of this disease is cholera toxin (CT) produced from the bacteria *Vibrio cholerae*. Nowadays, the conventional laboratory diagnosis of cholera is performed by culturing the bacteria from a patient's specimen, which requires 1-2 days. This method might be too long for immediate treatment. Moreover, some strains may not produce the toxin which can be resulted in false positive.

Recently, microfluidic biosensor technology using antibody and cell receptor affinity has been developed to detect CT. The biosensor may either be based on principles of fluorescence or electrochemical detection. The microfluidic device consists of a network of microchannels fabricated in a polydimethylsiloxane (PDMS) membrane seal, with a glass substrate for optical detection or an interdigitated ultramicroarray electrode (IDUA) bearing glass substrate for electrochemical detection. Plexiglas plates were used for housing the devices to connect the macro-world and ensure against leakage during the operation. The liposomes that have the GM_1-gangliosides incorporated in the phospholipid bilayer encapsulate the fluorescence dye sulforhodamine B, and the electro-active compounds ferro/ferricyanide for signal generation of the optical and electrochemical formats, respectively.

Magnetic beads conjugated with antibodies specific to cholera toxin sub-unit B (CTB) and GM_1-liposomes that were used in the assay proved to be a good combination for cholera toxin detection in the microfluidic devices. The limits of detection (LOD) of the fluorescence and electrochemical formats for CTB in purified samples were 6 and 1 ng/mL and in spiked stool samples were 15 and 35 ng/mL for the fluorescence and electrochemical formats, respectively.

Both formats of the microfluidic immunosensor can detect the toxin with high sensitivity in both purified and spiked stool samples. The electrochemical format assay showed advantages over the fluorescence format in terms of flexibility and reliability of signal recording, which is promising for a truly portable device for field screening.

KEY WORDS: BIOSENSOR / MICROFLUIDIC / CHOLERA TOXIN / LIPOSOMES / IMMUNOSENSOR

149 pages.

Copyright by Mahidol University

การพัฒนาไมโครฟลูอิดิกไบโอเซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวิเคราะห์คลอเลอราท็อกซิน
DEVELOPMENT OF A MICROFLUIDIC BIOSENSOR FOR CHOLERA TOXIN DETECTION

เนตินันท์ บุญญกูล 4736819 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: จำรัส พร้อมมาศ, ปร.ด., วิจิตร วงค์ล่ำซำ, Ph.D., ขวัญชนก พสุวัต, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคอุจจาระร่วงรุนแรง หรือ อหิวาตกโรค จัดเป็นโรคของระบบทางเดินอาหารที่มีอาการรุนแรง ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ภายใน 3-4 ชั่วโมงหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมและทันท่วงที ซึ่งโรคนี้เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* โดยเชื้อนี้สามารถสร้างสารพิษคลอเลอราท็อกซินที่เป็นสาเหตุของพยาธิสภาพต่างๆ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญ

ในการศึกษานี้จึงพัฒนาไมโครฟลูอิดิกอิมมูโนเซ็นเซอร์ที่ใช้ร่วมกับไลโปโซม ที่ทำหน้าที่ช่วยขยายสัญญาณการวิเคราะห์ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาคลอเลอราท็อกซินในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบที่ใช้การวิเคราะห์ด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์และสัญญาณทางไฟฟ้าเคมี ระบบไมโครฟลูอิดิกสร้างขึ้นจากพีดีเอ็มเอ็ส (PDMS) อีลาสโตเมอร์ ที่ขึ้นรูปเป็นแผ่น สามารถใช้ติดกับแผ่นแก้วใสขนาดเล็กเพื่อการวัดสัญญาณทางแสง หรือติดกับแผ่นแก้วที่มีอีเล็กโทรดขนาดเล็ก เพื่อการวัดสัญญาณทางไฟฟ้าเคมี ในการพัฒนาไมโครฟลูอิดิกอิมมูโนเซ็นเซอร์นี้ใช้ สารฟลูออเรสเซนต์ sulforhodamine B และสารประกอบที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมี ferro/ferricyanide เป็นสารให้สัญญาณการวิเคราะห์ทางแสงและทางไฟฟ้าเคมี ตามลำดับ

การใช้แอนติบอดีและรีเซพเตอร์ที่จำเพาะกับคลอเลอราท็อกซินในระบบการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ตรวจในตัวอย่างมาตรฐาน โดยมีความไวในการตรวจหาระดับของสารพิษคลอเลอราท็อกซินได้ต่ำสุดเท่ากับ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์และไฟฟ้าเคมี ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาสารพิษคลอเลอราท็อกซินในตัวอย่างอุจจาระเหลว โดยมีความไวในการตรวจหาระดับของสารพิษคลอเลอราท็อกซินในตัวอย่างตรวจเสมือนจริงดังกล่าวได้ต่ำสุดที่ 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 35 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์และไฟฟ้าเคมี ตามลำดับ ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์หาคลอเลอราท็อกซินในตัวอย่างอุจจาระจะส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ด้วยสัญญาณไฟฟ้าเคมีได้มากกว่าการวิเคราะห์ด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก็ตาม แต่ด้วยเหตุผลของความสะดวกในการวัดสัญญาณและประมวลผล รวมถึงศักยภาพของเครื่องมือวัดสัญญาณทางไฟฟ้าที่สามารถพัฒนาให้มีขนาดเล็ก พกพาได้สะดวก ส่งผลให้ไมโครฟลูอิดิกอิมมูโนเซ็นเซอร์ชนิดการวัดสัญญาณทางไฟฟ้าเคมีมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปใช้ตรวจคัดกรองผู้ป่วยอหิวาตกโรคนอกห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ

149 หน้า

Copyright by Mahidol University