

**APPLICATIONS OF SURFACE PLASMON RESONANCE
IMAGING FOR DETECTION OF BACTERIA**



CHOKCHAI PUTTHARUGSA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (PHYSICS)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2011**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

APPLICATIONS OF SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING FOR DETECTION OF BACTERIA

CHOKCHAI PUTTHARUGSA 4937277 SCPY/D

Ph.D. (PHYSICS)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : TOEMSAK SRIKHRIN, Ph.D.,
BOONSONG SUTAPUN, Ph.D., ORAPRAPAI GAJANANDANA, Ph.D.**ABSTRACT**

The aim of this Ph.D. thesis was to develop the surface plasmon resonance imaging (SPR imaging) for applications in hybridoma screening, detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*), and characterization of the antibody in a pairwise binding study. In the application of hybridoma screening, the monolayer of *Aac* antigen was physically adsorbed on the 95:5 polystyrene-co-poly acrylic acid (95PSMA) surface. The specific binding response was found to depend on the surface density of immobilized *Aac* on the sensor surface and the antibody concentration. The limit of detection (LOD) was 5 µg/ml, which was higher than the required concentration for the normal production of the antibody at 10-100 µg/ml. This suggests a possible use of the surface for the hybridoma screening. In the application of *Aac* detection, SPR imaging was developed by using a specific monoclonal antibody (MAb) and comparing it to the conventional ELISA technique. The 1:40 mixed self-assembled monolayers surface was used for immobilized MAb for detection of *Aac*. The LOD using SPR imaging was 10⁶ cfu/ml for direct detection, and increased to 5×10⁵ cfu/ml for sandwich assay. The LOD for the ELISA technique was 5×10⁴ cfu/ml, which was slightly better than that for the SPR technique. However, the sensor surface based on SPR imaging offered a major advantage in terms of surface regeneration, allowing at least five cycles with a shorter assay time, multi-channel analysis with an application on multiplex detection, and ease of surface usage for the detection of *Aac* in the naturally infected plant.

Application in pairwise binding of MAb against *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) was studied using SPR imaging to further select the suitable MAb pair for development of an immunosensor. Both formalin-killed and heat-killed *L. monocytogenes* were compared for determining pairwise binding of each MAb (3C3, 3E4, and 7E6) using the MAb 3E4 as the second MAb. The results show that the second MAb 3E4 bind was at a different epitope to the first MAb (3C3, 3E4, and 7E6) except for the MAb 3E4/3E4 pair in binding to the heat-killed sample. The main advantage of the SPR imaging offers the labeling-free, and provides real-time monitoring. Moreover, it makes for significant time saving in the elimination of the purified sample and label reactant.

KEY WORDS: SURFACE PLASMON RESONANCE / IMMUNOSENSOR /
BACTERIA DETECTION / PAIRWISE BINDING OF
MONOCLONAL ANTIBODY

103 pages

การประยุกต์ใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนแบบภาพสำหรับการตรวจวัดแบคทีเรีย
APPLICATIONS OF SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING FOR
DETECTION OF BACTERIA

โชคชัย พุทธรักษา 4937727 SCPY/D

ปร.ด. (ฟิสิกส์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : เดิมศักดิ์ ศรีศิริรินทร์, Ph.D., บุญส่ง สุตะพันธ์, Ph.D.,
อรประไพ คชนันท์, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนแบบภาพ (SPR imaging) สำหรับการประยุกต์ใช้ในการคัดกรองไฮบริโดมา การตรวจวัดเชื้อ *Aac* และการศึกษาของโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับงานด้านการคัดกรองไฮบริโดมา แอนติเจนจากแบคทีเรีย *Aac* ถูกตรึงลงบนพื้นผิว 95PSMA โดยสัญญาณ SPR จะแปรผันตามความหนาแน่นของแอนติเจนบนพื้นผิวและค่าความเข้มข้นของแอนติบอดี โดยความเข้มข้นของแอนติบอดีต่ำสุดที่สามารถวัดได้คือ 5 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่าค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิตโดยไฮบริโดมาซึ่งมีค่าประมาณ 10 – 100 $\mu\text{g/ml}$ จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะสามารถนำเทคนิค SPR และพื้นผิว 95PSMA มาประยุกต์ใช้ในการคัดกรองไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีได้ สำหรับการตรวจวัด *Aac* ได้พัฒนา SPR imaging และพื้นผิว mixed self – assembled monolayers โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะ และเปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA โดยสามารถตรวจวัดแบคทีเรีย *Aac* ได้ต่ำสุดที่ 5×10^5 cfu/ml ขณะที่เทคนิค ELISA วัดได้ต่ำสุดที่ 5×10^4 cfu/ml ถึงแม้ว่าเทคนิค SPR จะมีความไวในการตรวจวัด *Aac* ได้น้อยกว่าเทคนิค ELISA แต่เทคนิคนี้สามารถวัดซ้ำได้อย่างน้อยห้าครั้ง ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยกว่า และสามารถใช้ในการตรวจวัด *Aac* จากพืชที่เป็นโรคได้

การศึกษาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *L. monocytogenes* โดยใช้ SPR imaging ร่วมกับ sandwich assay เพื่อเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนางานด้านอิมมูโนเซนเซอร์ โดยได้ทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด 3C3, 3E4, และ 7E6 (แอนติบอดีตัวล้าง, captured antibody) กับ heat-killed และ formalin-killed *L. monocytogenes* ซึ่งใช้ 3E4 เป็นแอนติบอดีตัวบน (detecting antibody) เทคนิคนี้มีข้อดีคือไม่ต้องการสารบ่งชี้ (labeling-free) และไม่ต้องการเตรียมสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้ประหยัดเวลา เมื่อเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน ELISA