DETECTION OF DNA HYBRIDIZATION USING PROTEIN A MODIFIED ION SENSITIVE FIELD EFFECT TRANSISTOR

NANG MO HOM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2014

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

DETECTION OF DNA HYBRIDIZATION USING PROTEIN A MODIFIED ION SENSITIVE FIELD EFFECT TRANSISTOR

NANG MO HOM 5537753 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: KESARA WAT-AKSORN, Ph.D., CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D.

ABSTRACT

A DNA sensor based Ion Sensitive Field Effect Transistor (ISFET) with protein A modification, for the detection of DNA hybridization, was investigated. In this experiment, the surface of the ISFET was first modified with protein A via physical adsorption. Protein A has a sticky property and can bind specifically to the fragment crystallizable (Fc) portion of the antibody leading to the uniform orientation for effectively binding to the antigen. In order to detect DNA hybridization, an anti-biotin antibody was immobilized over protein A and a single-strand biotinylated DNA probe was added to bind to a specific anti-biotin antibody. The voltage shift of DNA/DNA hybridization was observed right after the complementary DNA target was added over the immobilized probe. The non-complementary DNA target was also tested as a negative control. The saturated concentrations for all steps were as follows: 1mg/ml for protein A, 1 mg/ml for anti-biotin antibody, 0.5 μM for biotinylated probe, and 0.5 μM for synthetic DNA target. As high amount of protein A and anti-biotin may barricade the hybridization signal detection; therefore, in this experiment 0.1 mg/ml of both protein A and anti-biotin were tested instead of their saturated concentrations. Using this strategy, DNA hybridization of the synthetic DNA target was successfully detected with the detection limit approximately at 0.08 μM as well as differentiated complementary DNA from non-complementary DNA target.

KEY WORDS: ISFET / PROTEIN A / DNA HYBRIDIZATION

Copyright by Mahidol University

56 pages

การตรวจดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยไบโอเซนเซอร์ชนิดที่มีโปรตีนเอตรึงอยู่บนทรานซิสเตอร์สนามไฟฟ้าชนิดไวต่ออิออน

DETECTION OF DNA HYBRIDIZATION USING PROTEIN A MODIFIED ION SENSITIVE FIELD EFFECT TRANSISTOR

NANG MO HOM 5537753 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: เกศรา วัดอักษร, Ph.D., จำรัส พร้อมมาศ, Ph.D.

บทคัดย่อ

ดีเอนเอเซนเซอร์สำหรับการตรวจดีเอนเอไฮบริไดเซชั่น (DNA hybridization) โดยวิธีการตรึงโปรตีนเอบนผิวทรานซิสเตอร์สนามไฟฟ้าชนิดไวต่ออิออน (ion sensitive field effect transistor: ISFET) ได้ถูกพัฒนาขึ้นในการทดลองนี้ โดยใช้โปรตีนเอเคลือบบนผิวของ ISFET เป็นขั้นตอนแรก คุณสมบัติที่ติดแน่นของโปรตีนเอและจำเพาะต่อ Fc ของแอนติบอดีทำให้เกิดการกำหนดทิศทางของแอนติบอดีได้สม่ำเสมอเพื่อให้จับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นทำการตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไบโอตินบนชั้นโปรตีนเอ ต่อจากนั้นเติมตัวตรวจจับดีเอนเอ (DNA probe) จากการสังเคราะห์ที่ติดด้วยไบโอตินเพื่อที่จะตรวจดีเอนเอไฮบริไดเซชั่น แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นจากดีเอนเอไฮบริไดเซชั่นหลังจากที่เติมดีเอนเอเป้าหมายจากการสังเคราะห์ที่จำเพาะต่อตัวตรวจจับดีเอนเอ และเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งเป็นดีเอนเอเป้าหมายที่ไม่จำเพาะต่อตัวตรวจจับดีเอนเอ ผลการศึกษาพบว่าภาวะที่เหมาะสมของโปรตีนเอและแอนติบอดีคือ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 0.5 ไมโครโมลาร์สำหรับตัวตรวจจับดีเอนเอ และดีเอนเอเป้าหมาย เนื่องจากปริมาณที่สูงของโปรตีนเอและแอนติบอดีอาจกีดขวางการตรวจพบดีเอนเอไฮบริไดเซชั่น ดังนั้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโปรตีนเอและแอนติบอดีได้ถูกนำไปใช้แทน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในการทดลองนี้ ผลการทดลองพบว่าสามารถดีเอนเอไฮบริไดเซชั่นได้สำเร็จด้วยความเข้มข้นต่ำประมาณ 0.08 ไมโครโมลาร์และสามารถตรวจแยก complementary ดีเอนเอจาก non-complementary ดีเอนเอเป้าหมายได้อย่างชัดเจน

Copyright by Mahidol University

56 หน้า