

52361208 : MAJOR : PHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORD : GOLD NANOPARTICLES / CONJUGATION / FAB ANTIBODY /

AFLATOXIN B1

ARPON KAEOPRATHANA : DIRECT CONJUGATION OF FAB MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO AFLATOXIN B1 AND GOLD NANOPARTICLES FOR IMMUNODETECTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WISIT TANGKEANGSIRISIN, Ph.D., ASST. PROF. SIRIPAN LIMSIRICHAIKUL, Ph.D. 107 pp.

Gold nanoparticles is one of the perfect metals for studying the optical properties and most widely applied in biomedicines, biotechnology and diagnostic applications. The objectives of this study is to synthesize gold nanoparticles (AuNPs) using Turkevich method and conjugated to Fab fragment of antibody specific to aflatoxin B1 (Fab-MB2) that performed in our laboratory, then gold nanoparticles and their conjugates (Au-MB2) were characterized using UV-visible spectroscopy, FTIR, direct-ELISA and indirect-ELISA. Fab fragment antibody was successfully purified using protein G-affinity chromatography and immobilized onto the surface of gold nanoparticles by directly adsorbing. The maximum absorption spectra (λ_{max} , A_{520}) of Au-MB2 shifts from 520 to 531 nm. The effect of factors such as pH and concentration of Fab-MB2 has been studied. Increasing pH does not affect size and the color appearance. The presence of aggregates was proved by UV-visible spectroscopy, in which the color change observed depend on the concentration of Fab-MB2. The ratio of absorptions at 630/562 nm (A_{630}/A_{562}) is expected to be reduced as the degree of aggregation decreases. Therefore, the optimal molar ratio for conjugation was 0.7 of Fab-MB2 to AuNPs. Zeta potential measurements reveal the Au-MB2 remained stable after conjugation. In addition, the results of FTIR study clearly suggested that Fab-MB2 molecules were immobilized on surface of AuNPs and proved the specific binding of Au-MB2 to its specific antigen. Indirect-ELISA was used to confirm the specific binding of Au-MB2 to AFB1-BSA. Finally, the Au-MB2 was successfully prepared and could be potentially used for versatile applications.

Program of Pharmaceutical Sciences

Graduate school, Silpakorn university

Student's signature.....Academic Year 2012

Thesis Advisor's signature 1..... 2.....

52361208 : สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์

คำสำคัญ : อนุภาคทองคำขนาดนาโน / การเชื่อมต่อ / Fab แอนติบอดี / อะพลาท็อกซินบี 1

อาการณ์ แก้วปรารธนา : การเชื่อมต่อชิ้นส่วน Fab โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะพลาท็อกซิน บี1 บนอนุภาคทองคำขนาดนาโนเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ภก.ผศ.ดร. วิสิฐ ตั้งเคียงศิริสิน และ ภญ.ผศ.ดร.สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล. 107 หน้า.

อนุภาคทองคำขนาดนาโนเป็นหนึ่งในโลหะที่มีคุณสมบัติเชิงแสงที่ดีและถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างมากในงานชีวแพทยศาสตร์ เทคโนโลยีชีวภาพและงานตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ วัตถุประสงค์งานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยสังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนตามวิธีของเทอริวิทซ์ และทำการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วน Fab ของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารอะพลาท็อกซินบี 1 ที่สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ชิ้นส่วน Fab สามารถแยกบริสุทธิ์ได้โดยใช้เทคนิค protein G-affinity chromatography จากนั้นนำไปเชื่อมต่อโดยตรงเข้ากับอนุภาคทองคำขนาดนาโน อนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ขึ้นและอนุภาคที่ทำการเชื่อมต่อแล้วถูกนำมาศึกษาคุณลักษณะด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง, FTIR, direct-ELISA และ indirect-ELISA ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคที่ทำการเชื่อมติดแล้วเพิ่มจาก 520 เป็น 531 นาโนเมตร ทำการศึกษาผลของ pH และความเข้มข้นของชิ้นส่วน Fab พบว่าค่า pH ที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลต่อขนาดของอนุภาคและสีที่ปรากฏ การรวมกลุ่มตกตะกอนของอนุภาคพิสูจน์ได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง สีที่เปลี่ยนไปขึ้นกับความเข้มข้นของชิ้นส่วน Fab ที่ใช้ อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 และ 562 ลดลงแสดงว่าโอกาสการตกตะกอนลดลงด้วย ดังนั้นอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างชิ้นส่วน Fab และอนุภาคทองคำที่เหมาะสม คือ 0.7 การวัดศักย์ซีต้าของอนุภาค (zeta potential) เผยให้เห็นว่าอนุภาคที่ทำการเชื่อมต่อแล้วมีความคงตัว นอกจากนั้น การศึกษาด้วย FTIR สามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่าชิ้นส่วน Fab ติดอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำและพิสูจน์การจับจำเพาะของอนุภาคที่เตรียมขึ้นกับแอนติเจนจำเพาะของมัน Indirect-ELISA ถูกนำมาใช้ในการยืนยันการจับจำเพาะระหว่างอนุภาคที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำและสารอะพลาท็อกซิน บี 1 งานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นส่วน Fab เข้ากับอนุภาคทองคำได้สำเร็จและมีประสิทธิภาพสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย

สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษาปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1..... 2.....

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not successfully complete without the kindness of many people. First and foremost, Asst. Prof. Wisit Tangkeangsirisin, Ph.D., who gave me to opportunity to gain the practical skills and experience I need to become a more successful individual. His truly scientist intuition has made him as a constant oasis of ideas and passions in science, which exceptionally inspire and enrich my growth as a student, a researcher and a scientist want to be. I am indebted to him more than he knows. Without his encouragement and valuable guidance this thesis would not have materialized.

This thesis is partially supported by Faculty of Pharmacy, Silpakorn University and Graduate School, Silpakorn University for the financial support. I would like to especially thank for Assoc. Prof. Manee Luangtanaanan, Ph.D. and all of staff at the department of pharmaceutical technology for giving me the place and equipments. I gratefully acknowledge Asst. Prof. Sathit Niratisai, Ph.D., Asst. Prof. Puchapat Sojikul, Ph.D. and Asst. Prof. Siripan limsirichaikul, Ph.D. for their constructive comments on this thesis. I am thankful that in their activity, they accepted to be members of the reading committee.

Special thanks also to all my graduate friends, Ms. Sirikul Dangmanee, Mr. Tharatree Srichan and Mr. Nuttapat Pisuttinusart for providing a stimulating and fun filled environment.

My graduation would not be achieved without best wish from my parents, Mr. Sithichai and Ms. Somthawin Kaeoprathana, who always gives me greatest love. I wish to thank my sisters, Ms. Siraporn and Ms. Supree Kaeoprathana, for their love and always beside me during the happy and hard moments to push me and motivate me. Especially, I would like to deepest gratitude to Mr. Premchai Chengchalard who persistent confidence in me, has taken the load off my shoulder. I owe his for being unselfishly let his intelligence and ambitions collide with mine. Finally, I would like to thank everyone who was important to the successful realization of thesis, as well as expressing my apology that I could not mention personally one by one.