

7

249887

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



249887

การจัดสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อการตรวจหาการติดเชื้อใน
โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

(Establishment of Gold Nanoparticle Technology for Detection of Infection in Fever
of Unknown Origin)

นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
ดร. โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ
แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
ดร. ณัฐพร พิมพะ
สัตวแพทย์หญิง ดวงพร พูลสุขสมบัติ
นายแพทย์ วันลา กุลวิจิต
นายแพทย์ ธเนศ สิ้นส่งสุข
นายแพทย์ จักรวาล สังฆพรหม
แพทย์หญิง มาลี เตชพรรุ่ง

หน่วยงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒

๒๐๐๒๕๔๕๑๘

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



249887

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การจัดสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อการตรวจหาการติดเชื้อใน
โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

(Establishment of Gold Nanoparticle Technology for Detection of Infection in Fever
of Unknown Origin)

นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
ดร. ไรจน์ฤทธิ ไรจน์ธเนศ
แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
ดร. ณัฐพร พิมพะ
สัตวแพทย์หญิง ดวงพร พูลสุขสมบัติ
นายแพทย์ วันล้ำ กุลวิชาติ
นายแพทย์ ธเนศ สิ้นส่งสุข
นายแพทย์ จักรวาล สังฆพรหม
แพทย์หญิง มาลี เตชพรรุ่ง



หน่วยงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒

บทคัดย่อ

การจัดสร้างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อการตรวจหาการติดเชื้อในโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, โรจน์ฤทธิ์ โรจน์ธเนศ, กนิษฐา ภัทรกุล, ณัฐพร พิมพะ,
ดวงพร พูลสุขสมบัติ, วันลา กุลวิจิต, ธเนศ สิ้นส่งสุข, จักรวาล สังฆพรหม, มาลี เดชพรุ่ง

249887

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโนเมตรที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารทางชีวภาพที่มีความจำเพาะสูง อุปกรณ์นำส่งยาหรือยีน และ สารให้คอนทราสต์ เป็นต้น โดยอาศัยความสามารถในการปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรด้วยสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ, โปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, ยา หรือ สีเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตอนุภาคทองคำนาโนเมตรขึ้นมาเพื่อใช้เองในประเทศไทยโดยไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างชาติ โดยตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้งาน รวมถึงได้ตรวจหาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรต่อเซลล์เยื่อเนื้อผิว และทำการจัดสร้างแผ่นตรวจโรคแลทเทอรัลโฟลว์เพื่อตรวจหาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ โดยใช้อนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรเป็นตัวให้สัญญาณนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอและแอนติบอดี จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นมาคุณภาพดีมาก มีความเสถียรสูง ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้งานในแผ่นตรวจโรคได้ทั้งในระบบการตรวจดีเอ็นเอและการตรวจแอนติบอดี องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้เป็นต้นแบบในการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไปตรวจหาการติดเชื้อในโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุในผู้ป่วยจริงของประเทศไทย

Abstracts

Establishment of Gold Nanoparticle Technology for Detection of Infection in Fever of Unknown Origin

Amornpun Sereemasapun, Rojrit Rojanathanes, Kanitha Patarakul, Nuttaporn Pimpha,
Duangporn Phulsuksombati, Wanla Kulwichit, Chakrawan Sangkaprom, Thanee Sinsongsuk,
Malee Techapornroong

249887

Gold nanoparticle (AuNP) is a stable and inert metal nanoparticle. AuNP has been used as biosensors, drug/gene delivery devices and contrast agents because of its surface functionalization. AuNP can be tailored with biomolecules such as DNA, protein, carbohydrate, drug and fluorescent dye. This research aims to study and establish gold nanoparticles for medical application in Thailand. The physicochemical properties, nanoparticle characterization, and cellular cytotoxicity were evaluated for further use. Moreover, both of DNA-based and antibody-based lateral flow test strips were fabricated to detect bacterial infection that causes fever of unknown origin. Results showed that the synthesized nanogolds are in good quality, stable, cellular nontoxic and are capable of being applied as biosensor for both DNA and antibody system. The knowledge from this study is a core template for further application in detection of infection that causes fever of unknown origin in Thailand.

สารบัญเรื่อง

1. บทนำ (Introduction)

โรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Fever of Unknown origin)	1-6
การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์	6-8
การพัฒนาและผลิตอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตร	6-12
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	12
ขอบเขตของการวิจัยในเชิงปริมาณ/เชิงคุณภาพ	12
ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual framework)	13
ความคาดหมาย แนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	14

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

Gold Nanoparticle Synthesis and characterization	15-17
Evaluation of in vitro gold nanoparticle cytotoxicity	18-20
Physiochemical Effects of DNA-coated goldnanoparticles	20-23
Fabrication of Lateral Flow test Strip	23-24
Optimization of influencing parameters for fabrication of gold - nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test	25-26
Preparation, modification, and testing of antibody-conjugated AuNPs	27-36
Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated AuNPs	37-38

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results and Discussions)

Characterization of metal nanoparticles	39-42
Effects of gold nanoparticles on cell morphology	42-49
<i>In Vitro</i> Cytotoxicity and intra-cellular localization	49-54
Aggregation of metal nanoparticles	55-62
Optimization of influencing parameters for fabrication of gold nanoparticle-based nucleic acid lateral flow strip test	63-68

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

Preparation, modification, and testing of antibody-conjugated AuNPs	68-86
Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated gold nanoparticles	86-90
4. บทสรุป (Conclusion)	91
5. ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป (Suggestion for further work)	92
6. เอกสารอ้างอิง (Bibliography)	93-97
7. ภาคผนวกท้ายเล่ม ประวัติคณะผู้วิจัย	98-120

สารบัญตาราง

Table	Page
Table 1.1 : สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุ ที่เกิดจากโรคติดเชื้อ.....	3
Table 1.2 : สาเหตุของไข้ไม่ทราบสาเหตุในคนสูงอายุและคนหนุ่มสาว.....	3
Table 1.3 : สาเหตุของไข้ที่ตรวจพบในผู้ป่วย 471 ราย.....	4
Table 1.4 : การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการแพทย์	7
Table 2.3.1 : Oligonucleotide sequences.....	21
Table 2.3.2 : DNA mixture composition.....	21
Table 3.1: Experimental protocols studying the effects of reductants and sonication on the conjugation of thiolated probes and AuNPs.....	64
Table 3.2 : Effect of amount of thiolated probes on AuNPs conjugation.....	67

สารบัญภาพ

Figure		Page
Figure 1.1	จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับรายงานว่าเป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุในประเทศไทย	2
Figure 1.2	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้	10
Figure 1.3	สเปกตรัมแสงของคอลลอยด์ของ AuNPs ขนาด 15 nm ที่เตรียมได้	11
Figure 1.4	การเปลี่ยนสีของคอลลอยด์ของ AuNPs	12
Figure 1.5	Conceptual framework	13
Figure 2.1	12.7 mM tetrachloroauric acid	15
Figure 1.2	38.8 mM trisodium citrate	15
Figure 2.3	Diluted tetrachloroauric acid during boiling on the hot plate	17
Figure 2.4	Final 100 ppm gold nanoparticles colloid with a clear orange-red color	17
Figure 2.5	UV/Vis spectrophotometer	17
Figure 2.6	The morphology of HeLa cells.	18
Figure 2.7	Model of components of Lateral flow strip test	24
Figure 2.8	Processes of Lateral flow strip test assembly	24
Figure 2.9	Whole process of antibody-conjugated gold nanoparticles	32
Figure 2.10	Preparation of antigen on nitrocellulose membrane	33
Figure 2.11	Usage of silver solution to enhance signal from gold nanoparticles	36
Figure 3.1	The characterization of AuNPs using spectrophotometer	39
Figure 3.2	The characterization of metal nanoparticles using TEM	40
Figure 3.3	Zeta potential of gold nanoparticles is measured by nanosizer	41
Figure 3.4	Size distribution of gold nanoparticles is characterized by nanosizer	41
Figure 3.5	General cell morphology in negative control	43
Figure 3.6	HeLa cells morphology in positive control.	44
Figure 3.7	HeLa cells morphology in the presence of citrate.	45
Figure 3.8	HeLa cells morphology in the presence of 10 ug/mL gold nanoparticles.	46
Figure 3.9	HeLa cells morphology in the presence of 50 ug/mL gold nanoparticles.	47
Figure 3.10	HeLa cells morphology in the exposure to 100 ug/mL gold nanoparticles.	48
Figure 3.11	The influence of gold nanoparticles on cell viability.	50
Figure 3.12	Cellular uptake of 10-15 nm gold nanoparticles via the endocytosis.	51

สารบัญภาพ

Figure		Page
Figure 3.13	Internalization of gold nanoparticles.	52
Figure 3.14	Intracellular organelles morphology.	53
Figure 3.15	The effect of different amount of buffer to the aggregation of AuNPs.	55
Figure 3.16	The effect of different amount of NaCl to the aggregation of AuNPs	56
Figure 3.17	The effect of different amount of mixture1 to the aggregation of AuNPs.	57
Figure 3.18	The effect of different amount of mixture2 to the aggregation of AuNPs	58
Figure 3.19	The effect of different amount of mixture3 to the aggregation of AuNPs	59
Figure 3.20	Comparison of effect of mixture1-3 on the aggregation of AuNPs	60
Figure 3.21	Comparison between non-complementary DNA and complementary DNA on AuNP stabilization	61
Figure 3.22	Comparison between 1-mismatched -complementary DNA and complementary DNA on AuNP stabilization	62
Figure 3.23	Deconjugation profile after DTT treatment on the conjugates.	66
Figure 3.24	(A) The color changes of conjugates after adding DTT.	67
Figure 3.24	(B) Positive results of lateral flow strip test with DNA targets	67
Figure 3.25	Result of stabilization of gold nanoparticles that are conjugated with different concentration of antibody	69
Figure 3.26	Schematic representation of functionalization procedure by conjugating antibody onto gold nanoparticles	70
Figure 3.27	Schematic representation of placing antigen onto nitrocellulose membrane and membrane blocking process	70
Figure 3.28	Result of general antigen detection using <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles.	72
Figure 3.29	Sequences of major outer membrane proteins of bacteria <i>Leptospira pomona</i> 73	
Figure 3.30	Final <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles.	74

สารบัญภาพ

Figure		Page
Figure 3.31	Effect of antibody incubation time upon the final signal intensity in antigen detection	74
Figure 3.32	Effect of centrifuge temperature upon the final detecting signal of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles probe.	76
Figure 3.33	Effect of PEG upon the final signal intensity when conjugated gold nanoparticles probes were used to detect antigen.	78
Figure 3.34	Effect of concentration of antigen to the sensitivity of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles	79
Figure 3.35	Effect of blocking agent to the function of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles.	81
Figure 3.36	Effect of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles sensing time upon the signal intensity	82
Figure 3.37	schematic representation of silver enhancing process	84
Figure 3.38	Effect of silver enhance upon the signal from different detection time of <i>L. pomona</i> antibody-conjugated gold nanoparticles	85
Figure 3.39	Optimum antibody dilution for preparing antibody-coated gold particles.	87
Figure 3.40	Detection of <i>Leptospira</i> in urine.	88
Figure 3.41	Specificity of <i>Leptospira</i> -coated gold nanoparticles.	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย
(List of Abreviation)

%	Percentage
°C	Degree Celsius
µg	Microgram
µL	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
ATP	Adenosine triphosphate
AuNP	Gold nanoparticle
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
DNA	Deoxyrironucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
g (centrifugation speed)	Gravity
h.	Hour
M	Molar
mM	Millimolar
mg	Milligram
MgCl ₂	Magnesium Chloride
mL	Milliliter
mtDNA	Mitochondrial DNA
nM	Nanomolar
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline

PCR	Polymerase chain reaction
rRNA	Ribosomal RNA
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute
RT	Reverse transcription
tRNA	Transfer RNA
u.	unit
α	Alpha