Thesis Title	Enzyme Amplified Labeling on Carbon Nanomaterials: Application to Immunoassay
Thesis Credits	48
Candidate	Mr. Porramate Chumyim
Thesis Advisors	Dr. Mithran Somasumdrum Assoc. Prof. Dr. Werasak Surareungchai
Program	Doctor of Philosophy
Field of Study	Biotechnology
Department	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
Academic Year	2013

Abstract

Amplified labeling platforms consisting of layers of enzyme on carbon nanomaterials have been developed. The first label used tyrosinase immobilized on carbon nanotubes as an electrochemical label for immunoassay. The second label used a multienzyme system consisting of alkaline phosphatase and diaphorase immobilized on graphene nanoparticles for immunoassay.

The first amplified labeling platform was developed to enhance the ability of an electrochemical immunoassay. The platform consisted of multi-wall carbon nanotubes (MWNTs) supporting layers of the enzyme tyrosinase (TYR), which provide an amplification cycle due to substrate recycling at the electrode. The immobilization of multi-layered TYR on the surface of MWNTs by using stepwise layer-by-layer deposition was demonstrated. The optimal assay conditions were obtained after experimenting with the pH and applied potential. Two TYR layers on the MWNTs provide the maximum response towards catechol. The results indicated that the conjugation of MWNTs and TYR exhibited a high sensitivity toward the catechol substrate (320.8 $mA.M^{-1}$),with a short response time (2 s). Kinetics studies of the TYR on MWNTs toward catechol substrate were performed. The result found that k_{cat} / K_M was one order of magnitude less than the value for free tyrosinase. MWNTs-TYR conjugation was applied to labeling for an electrochemical immunoassay detecting *Salmonella* Typhimurium. Via rabbit anti-salmonella polyclonal antibodies. The results indicate that the system provide a detection limit for *Salmonella* Typhimurium approximately 340 CFU/mL in pure culture and 10^3 CFU/mL in milk samples (spike). The system also provide a colorimetric detection route by monitoring the absorbance of the enzyme product at 410 nm, and provide a detection for *Salmonella* Typhimurium of approximately 10^3 CFU/mL.

The second nano-structured platform consisted of graphene nanoparticles (GO) and bi-enzyme layers of alkaline phosphatase (ALP) and diaphorase (DI) to enhance the detection ability for *Salmonella* Typhimurium detection. The immobilization of multi-layer enzyme on the surface of GO was based on a stepwise layer-by-layer electrostatic deposition. The surface of GO allowed more enzyme molecules to absorb compared with MWNTs, based on optical measurements. The kinetics of GO/PAH/DI modified SPEs were investigated. k_{cat}/K_M of the enzyme could not be determined due to the unproportional response of the system towards PAP concentrations. The result of electrochemical study of the second nano-structured platform indicate that the response was not largely amplified and could not be applied to immunoassay.

Keywords: Alkaline phosphatase / Carbon nanotubes/ Diaphorase / Electrochemical Immunosensor / Enzyme recycling/ Graphene nanoparticles / Layer-by-layer / Tyrosinase

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้เอนไซม์ติดฉลากบนอนุภาคคาร์บอนระดับนาโนเพื่อเพิ่มสัญญาณการตรวจวัด ในการประยุกต์ใช้กับเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา
หน่วยกิต	48
ผู้เขียน	นายปรเมษฐ์ ชุ่มยิ้ม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.มิตรทราน โซมาซันดรัม รศ.ดร.วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย
หลักสูตร	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยที่ศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการพัฒนาตัวติดฉลากขยายสัญญาณการตรวจวัด ที่ประกอบด้วยชั้นของเอนไซม์บนอนุภาคคาร์บอนระดับนาโนเมตร ตัวติดฉลากชิ้นแรกใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสตรึงบนอนุภาคคาร์บอนนาโนทูปส์เพื่อใช้ในการตรวจวัดทางอิมมูโนวิทยาโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตัวติดฉลากชิ้นที่สองใช้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสและไดอะเฟอเรสตรึงบนอนุภาคกราฟีนระดับนาโนเมตรเพื่อใช้ในการตรวจวัดทางอิมมูโนวิทยา

ตัวติดฉลากเพิ่มสัญญาณตัวแรก ได้รับการพัฒนา เพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจวัดทางอิมมูโนวิทยาโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนนาโนทูปส์ชนิดหลายชั้น (multi-wall carbon nanotubes) และชั้นเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสามารถขยายสัญญาณได้โดยคุณสมบัติของการนำสารตั้งต้นกลับมาใช้ใหม่ที่ผิวหน้าอิเล็กโทรด การตรึงชั้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทูปส์โดยการใช้เทคนิคชั้นต่อชั้น (layer-by-layer) และได้ศึกษาหาค่าสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อปัจจัยความเป็นกรดเบสและศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลอง จากการศึกษาพบว่าไทโรซิเนสจำนวนสองชั้นบนพื้นผิวคาร์บอนนาโนทูปส์ให้สัญญาณสูงสุดต่อสารตั้งต้นคาทิคอล และผลการทดลองบ่งชี้ว่าการตรึงเอนไซม์ไทโรซิเนสบนคาร์บอนนาโนทูปส์นั้นมีความไวสูงต่อสารตั้งต้น (320.8 $mA.M^{-1}$) ภายในระยะเวลาสั้น (2 วินาที) จากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสบนคาร์บอนนาโนทูปส์ที่มีต่อสารตั้งต้นคาทิคอลพบว่า ค่า k_{cat} / K_M ของเอนไซม์มีค่าเลขยกกำลังน้อยกว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสอิสระอยู่หนึ่งลำดับ เอนไซม์ไทโรซิเนสบนคาร์บอนนาโนทูปส์ได้ถูกนำไปใช้เป็นฉลากในการตรวจวัดทางอิมมูโนวิทยาโดยอาศัยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีเพื่อ

ตรวจวัดเชื้อซัลโมแนลลา โดยอาศัยแอนติบอดีต่อเชื้อซัลโมแนลลา ผลการทดลองบ่งชี้ว่าระบบสามารถให้ค่าจำกัดของการตรวจวัด (LOD) เชื้อซัลโมแนลลาที่ 340 CFU/mL ของเชื้อซัลโมแนลลาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและ 10^3 CFU/mL ในตัวอย่างนมที่เติมเชื้อ นอกจากนี้ระบบติดฉลากยังสามารถให้ผลการตรวจวัดทางแสงโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดโดยวิธีทางแสงต่อเชื้อซัลโมแนลลาให้ค่าจำกัดการตรวจวัดที่ 10^3 CFU/mL

ตัวติดฉลากที่เป็นโครงสร้างระดับนาโนเมตรตัวที่สองประกอบด้วย อนุภาคกราฟีนระดับนาโนและเอนไซม์สองชนิดคืออัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) และไดอะเฟอเรส (DI) เพื่อใช้เป็นตัวเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดเชื้อซัลโมแนลลา การตรึงเอนไซม์สองชนิดบนอนุภาคกราฟีนอาศัยเทคนิคชั้นต่อชั้น (layer-by-layer) เพื่อให้เกิดการจับกันแบบไฟฟ้าสถิต จากการใช้การตรวจวัดทางแสงพบว่าพื้นผิวของอนุภาคกราฟีนนั้นมีผลทำให้เอนไซม์เข้าจับตัวบนพื้นผิวของกราฟีน มากกว่าพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทูปส์ ผลจากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไดอะเฟอเรสบนกราฟีนที่ตรึงลงบนอิเล็กโทรดพบว่ามีความไม่สัมพันธ์กันของสัญญาณที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น (PAP) ผลการทดลองพบว่าตัวติดฉลากตัวที่สองที่ประกอบด้วยอนุภาคกราฟีนระดับนาโนร่วมกับเอนไซม์สองชนิดไม่สามารถขยายสัญญาณเพิ่มได้ และไม่สามารถนำไปใช้เป็นตัวติดฉลากในการตรวจวัดทางอิมมูโนวิทยาโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

คำสำคัญ : กราฟีนนาโนพาร์ทิเคิล / คาร์บอนนาโนทูปส์ / ไดอะเฟอเรส / เลเยอร์บายเลเยอร์ / ไทโรซิเนส / อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส / เอนไซม์รีไซเคิล / อิเล็กโตรเคมิคัล อิมมูโนเซนเซอร์

ACKNOWLEDGMENTS

It would not have been possible to write this doctoral thesis without the help and support of the kind people around me. First and foremost, I offer my sincerest gratitude to my supervisor, Dr. Mithran Somasundrum, who has been patiently providing me with support throughout the eight years of my study and research. Thank you for believing in me for so many years. You have indeed been most kind, intelligent and a great writer.

To Assoc. Prof. Dr. Werasak Suraruengchai, my co-supervisor, I'm extremely grateful for the advice, support and kindness, which has been invaluable on both academic and personal levels. I remembered since the first time I met you in the interview room, I felt you are someone special, and that makes me privileged to be one of your advisees over since. You have faithfully seen me through the entire process. I'm also grateful for the many opportunities you have provided to undertake new roles and responsibilities such as being a chair of conference, a teacher, a mentor and many more. I truly appreciate your patience and the breaks you have given me which allowed me to take a mentally and physically refreshing tour of Korea and my hometown.

I would also like to acknowledge my formal mentor, Dr. Patsamon Rijiravanich, for her encouragement and effort. Without her, this thesis and my work would not have been completed or written. To Dr. Patsamon Rijiravanich, thank you so much the chances you have given me, and your many years of mentoring. You amaze me with your strength and toughness, but yet you have been incredibly kind.

I gratefully acknowledge a Ph.D. program from the Royal Golden Jubilee project of the Thailand Research Fund (TRF) for the financial support. I would also like to thank Fulbright Scholarship for helping arrange my VISA and my insurance. This project was also funded by the Higher Education research promotion and National Research University Project of Thailand (Office of the Higher Education Commission).

I am also very grateful to Prof. Pulickel Ajayan, Professor of Research & Group leader, nomaterials Laboratory, School of Mechanical Engineering, Rice University, Houston, Texas, USA for internship opportunities in this group, a warm welcome, and guide me for 6 months in USA.

I would like to give many thanks to my family, my grandmother who raised me, my father, my mother, my younger brother and all of my cousins. Even though they may not fully understand what I have been doing throughout these years, their endless and unconditional support has been invaluable. I'll also like to thank my biological father, who passed away when I was at the age of one. To dad, though I have never had the chance to speak with you before, I would like to thank you for bringing me into the world. Mom is healthy and she is the strongest woman I have ever known. I promise to take good care of her. Many people say that I resemble you closely. Thanks dad!

I would like to share my deepest gratitude to the love of my life, Dr. Pathanin Chantree, who has stood by me every single day. To Dr. Pathanin Chantree, thank you for

everything you have done for me, your warmth, your kindness, your indescribable love that has constantly kept me going. I am truly happy and fortunate to have you, holding my hand and walking with me in this path. I love you and I always will.

I also wish to express my thanks to one of my dearest friend, Mr. Nattapon Thanintorn, who has been constantly helping, supporting, and motivating me for many years. To Mr. Nattapon Thanintorn, thank you so much for your endless support. You have been there for me all the time, even throughout the toughest hardships. You have always encouraged me and motivated me. Our trip together was one of the best moments of my life. Thank you so much.

I would like to express my deepest gratitude to Miss Panwipa Supathanapat, for her unconditionally love, care, kindness and unbelievable support. She has always been there especially the hardest time of my life. Her unbelievably energy has always been passing to me and I am grateful for everything she has done for me.

Last but not least, many thanks to all my friends and SST members, for your friendship and support. Thanks to all my fans and followers on Facebook who have been activity reading, commenting and sharing great ideas for my articles. Thanks to all of my students who have been studying in my school ever since I start the job as a tutor. Keep striving for excellence.

This thesis would not have been possible without each and every one of you and I would like to express my deepest heartfelt gratitude.

CONTENTS

PAGE

PAGE

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

NOMINATION SYMBOLS

C_E	enzyme concentration	mol L^{-1}
C_c	catechol concentration	mol L^{-1}
D	diffusion coefficient	cm^2 s^{-1}
E	potential	V
E_{pc}	cathodic peak potential	V
E_{pa}	anodic peak potential	V
i_{pc}	cathodic peak current	A
I	electric current	A
L	thickness	m
t	time	S
V_{ss}	reaction rate	V s^{-1}
V	voltage	V
k_{cat}	turnover number	s^{-1}
K_M	the Michaelis constant	mol L^{-1}

LIST OF ACRONYMS

ALP	alkaline phosphatase
Ab	antibody
Ag	antigen
Ag/AgCl	silver/silver chloride reference electrode
BSA	bovine serum albumin
Ca	catechol
CNTs	carbon nanotubes
CV	cyclic voltemmetry
CVD	chemical vapor deposition
DPV	differential pulse voltammetry
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EIA	enzyme immunoassay
GO	graphene oxide
DI	diaphorase
IgG	lmmunoglobulin G
LOD	limit of detection
LBL	layer-by-layer
MWNTs	multi-walled carbon nanotubes
MWCNTs-COOH	multi-walled carbon nanotubes carboxylic acid functionalized
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
PBS	phosphate buffer solution
PAH	poly allylamine hydrochloride
PAPP	para-amiophenylphosphate
PQI	para-Iminoquinone
SWNTs	single-walled carbon nanotubes
SPE	screen-printed carbon electrodes
SEM	scanning electron microscopy
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tyr	tyrosinase
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
UV-vis	ultraviolet-visible
WE	working electrode