

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

ชื่อเรื่องภาษาไทย: การพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโรคสมองเสื่อมอย่างรวดเร็วเพื่อนำไปสู่การพึ่งพาตนเอง
และการพัฒนาอย่างยั่งยืน

ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ: Development of rapid screening tests for neurodegenerative diseases
for self-reliance and sustainable development

ข้อตกลงเลขที่: สวรส. 59-019

หัวหน้าโครงการ

ดร.ประพิมพรรณ วงศ์จิตรรัตน์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
บทสรุปเพื่อการสื่อสารสู่สาธารณะ	3
1. บทนำ	4
2. วัตถุประสงค์	6
3. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง	
3.1 การตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ชนิด beta amyloid 1-42 โดยเทคนิค ELISA	7
3.2 การพัฒนา dot Blot Assay สำหรับการตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ของโรคสมองเสื่อมชนิด beta amyloid 1-42	11
3.3 การพัฒนา sandwich-lateral flow immunoassay สำหรับการตรวจวัดปริมาณ ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ชนิด beta amyloid 1-42	18
4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	21
5. ตารางสรุปภาพรวมการดำเนินโครงการ	22
6. แผนงานและกิจกรรม ที่จะดำเนินการในปีที่ 2	24
7. เอกสารในการเผยแพร่องค์ความรู้	25
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิงที่ 1: เอกสารอนุมัติการทดลองในมนุษย์โดยคณะกรรมการจริยธรรม (EC)	27
เอกสารอ้างอิงที่ 2: Poster	29
เอกสารอ้างอิงที่ 3: Proceeding	30

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย.....	9
ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดความแตกต่างของวัสดุ membrane ที่เลือกใช้ในการทดสอบเลือกวัสดุที่เหมาะสมต่อการพัฒนา dot blot assay.....	16

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1	แสดงการกระจายตัวของข้อมูลและปริมาณเฉลี่ย (pg/mL) ของ beta amyloid 1-42 ในตัวอย่าง plasma ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (AD) และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (Old).....	10
รูปที่ 2	UV-vis spectra แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ที่ 520 nm และผลสีของ AuNPs ซึ่งมีสีแดง	13
รูปที่ 3	แสดง TEM images จากการวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของอนุภาค AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้อง Transmission electron microscopy.....	13
รูปที่ 4	ผลของความเข้มข้นของ antibody ในการเตรียม AuNP-Antibody conjugation.....	14
รูปที่ 5	ผลของ pH ที่เหมาะสมในการเตรียม anti-beta amyloid conjugated AuNPs	15
รูปที่ 6	แสดงผลของ dot blot assay โดยการตรึง beta amyloid oligomer บน membrane สามชนิด และตรวจสอบสัญญาณสีด้วย anti-beta amyloid oligomers antibody Conjugated AuNPs.....	17
รูปที่ 7	แสดงผลการตรวจวัด beta amyloid 1-42 oligomer ด้วยวิธี dot blot assay ที่พัฒนาขึ้นได้ ที่ความเข้มข้น 1 - 100 μ M.....	18
รูปที่ 8	รูปแบบของ strip test แบบ sandwich-lateral flow immunoassay สำหรับการตรวจวัด beta amyloid 1-42.....	19
รูปที่ 9	ผลการทดลองในการตรวจวัด beta amyloid 1-42 antigen ที่ความเข้มข้น 1 - 5 μ M โดยวิธี sandwich immunoassay บน test strip เปรียบเทียบกับวิธี direct dot blot assay.....	20

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคในกลุ่มของ age-associated neurodegenerative diseases ชนิดหนึ่งที่มักเกิดขึ้นในผู้สูงอายุ โดยมีจำนวนผู้ป่วยทั่วโลกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การตรวจวินิจฉัยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ตั้งแต่เนิ่นๆ นั้นนับว่าเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งสามารถช่วยในการป้องกันและรักษาโรคได้อย่างทันท่วงที ก่อนที่พยาธิสภาพจะดำเนินไปจนถึงระดับที่รุนแรง มีรายงานพบตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์คือ โปรตีน beta amyloid โดยสามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย และสามารถใช้ในการพยากรณ์โรคที่มีความน่าเชื่อถือได้อย่างไร้ก็ตามวิธีการตรวจสอบ beta amyloid ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาแล้วในปัจจุบันนั้น แม้จะมีการพัฒนาให้มีความไวในการตรวจวัดได้ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการ เช่น ส่วนใหญ่เป็นวิธีใช้เวลานาน ต้องใช้เครื่องมือและขั้นตอนการใช้งานที่มีความซับซ้อน และต้องการผู้เชี่ยวชาญในการใช้งานและอ่านผล ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ ในการพัฒนาวิธีสำหรับการตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ชนิด beta-amyloid 1-42 โดยอาศัยหลักการของ immunoassays ร่วมกับการประยุกต์ใช้ gold nanoparticle ในการตรวจสอบสัญญาณสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เพื่อต่อยอดและนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ beta amyloid ชนิด rapid test ให้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ และมีความง่ายในการใช้งานมากขึ้นในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

Alzheimer's disease (AD) is a primary common neurodegenerative disorder worldwide and increases prevalence in elder ages of life span. The critical detection of early diagnosis is the mostly important to support treatments to defense this incapacitating disease. Amyloid-beta proteins have various significant physiological or pathophysiological effects on AD progression. It was affirmed that amyloid-beta protein levels are detected for preclinical diagnosis and prognosis as a reliable biomarker for neurodegeneration. The available methods for detection of amyloid-beta proteins are time consuming and complicated operations. Herein, a gold nanoparticle-labelled dot blot immunoassays was had been developed for detection of beta amyloid 1-42 oligomers providing high potential early diagnosis for AD. The optimization of direct dot blot immunoassay assay was investigated and the interpretation of the colorimetric results can be visualized by naked eyes.

บทสรุปเพื่อการสื่อสารสู่สาธารณะ

การพัฒนาเครื่องมือในการตรวจวัดบ่งชี้ทางชีวภาพ ที่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์มีความสำคัญ เพื่อใช้ในการพยากรณ์ ป้องกัน และรักษาโรคได้อย่างทันท่วงที โดยการพัฒนาวีธี dot blot immunoassays เพื่อตรวจวัดปริมาณ beta-amyloid 1-42 ซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดบ่งชี้ทางชีวภาพบนกระดาษ (paper-based analytical device) เป็นวิธีการที่มีความจำเพาะ สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้ง่าย รวดเร็ว และมีราคาไม่แพง ซึ่งอาจพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจวัด ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point-of-care test หรือ POCT) ต่อไปในอนาคต

1. บทนำ

ปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมทั่วโลกมากถึง 33.9 ล้านคน และคาดว่าจะเพิ่มเป็น 3 เท่าในอีก 40 ปีข้างหน้า จากการสำรวจในปี 2557 พบว่าในสหรัฐอเมริกาโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์นั้น เป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 6 ของสาเหตุการตายทั้งหมด และเป็นอันดับ 5 ของสาเหตุการตายในกลุ่มผู้มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป โดยมีจำนวนผู้เสียชีวิตถึง 500,000 รายต่อปี สำหรับประเทศไทยจากการสำรวจปี พ.ศ. 2554 ผู้สูงอายุที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป มีจำนวน 8.3 ล้านคน ในจำนวนกลุ่มเสี่ยงดังกล่าว ร้อยละ 10 มีแนวโน้มจะเป็นโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ หรือราว 830,000 ราย จากจำนวนผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นก่อให้เกิดผลกระทบมากมายทั้งกับผู้ป่วยและบุคคลในครอบครัวของผู้ป่วย โดยผู้ป่วยจะมีความทุกข์ทรมานจากอาการของโรค และในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง จะต้องมียาดูแลตลอดเวลา ซึ่งหมายถึงการสูญเสียกำลังและเวลาของคนในวัยทำงานเพื่อการดูแลผู้ป่วย ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียรายได้และสร้างความเครียดนำไปสู่ความเจ็บป่วยอื่นๆ ให้แก่ผู้ดูแลและคนในครอบครัวได้ นอกจากนี้จำนวนผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ โดยรัฐบาลจะต้องสูญเสียงบประมาณในการรักษาพยาบาล เวชภัณฑ์ อุปกรณ์ทางการแพทย์ สถานที่ในการบำบัดรักษาผู้ป่วย สำหรับประเทศไทยค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลและดูแลผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 200,000-600,000 บาทต่อคนต่อปี ดังนั้นองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และองค์การโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ระหว่างประเทศ (Alzheimer's Disease International, ADI) จึงเล็งเห็นถึงปัญหาดังกล่าวและได้กระตุ้นเตือนให้นานาประเทศทั่วโลกเล็งเห็นถึงความสำคัญของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ให้มากขึ้น เพราะเป็นปัญหาทางสุขภาพที่คุกคามคนทั่วโลก โดยหากเราสามารถป้องกัน หรือสามารถตรวจหาภาวะความผิดปกติก่อนที่ความผิดปกติเหล่านั้นจะพัฒนาจนเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้จะสามารถชะลอการดำเนินโรคและช่วยชีวิตคนได้เป็นจำนวนมากต่อไป

ในปัจจุบันมีรายงานพบตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ คือการเกิด extracellular plaques ของโมเลกุลโปรตีนที่เรียกว่า beta-amyloid และ intracellular neurofibrillary tangles ซึ่งเกิดจากการรวมกลุ่มของ cytoskeletal fibers ที่ผิดปกติไป ในผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์พบว่าการสะสมรวมกันของ amyloid plaques อยู่ภายนอกเซลล์ประสาท โดยพบร่วมกับการเสื่อมของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณ cerebral cortex และ hippocampus โดยในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ส่วนใหญ่มักพบ amyloid protein ชนิด beta amyloid 1-42 ซึ่งมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน 42 โมเลกุล และยังพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์สมองมากกว่า amyloid protein ชนิดอื่นๆ ซึ่งโมเลกุลอิสระของ amyloid-beta molecule เองนั้นมีคุณสมบัติเป็น prooxidant โดย Fenton-reactive จากการสร้างพันธะกับ copper ซึ่งเกิดเป็น hydroxyl radical ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress ชักนำไปให้เกิดการตายของเซลล์สมองในที่สุด และพบว่า beta amyloid ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ intracellular H_2O_2 และ lipid peroxides ซึ่งเป็นเหตุให้มีการสร้าง free radical เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเกิด amyloid plaques ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ในเซลล์ประสาทของผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์จะพบสิ่งแปลกปลอมในไซโตพลาสซึม คือ neurofibrillary tangles ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด

hyperphosphorylation ของโปรตีนที่เรียกว่า tau ซึ่งเป็น microtubule-associated protein ชนิดหนึ่ง จากกระบวนการข้างต้นส่งผลให้เกิดการ misfolding และการสะสมของโปรตีนดังกล่าวร่วมกับ microtubules ทำให้ทำหน้าที่ได้ผิดปกติไป และเมื่อมีการสะสมทั้ง amyloid plaques และ tangles มากขึ้นเรื่อยๆ จะส่งผลทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นและทำให้การรักษาโรคอัลไซเมอร์ยากขึ้น

สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ในปัจจุบันจะวินิจฉัยตามเกณฑ์ของ Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd edition (revised) หรือ 4th edition (DSM-III R หรือ DSM-IV) โดยมีลักษณะที่สำคัญคือ มีความบกพร่องทั้งความจำระยะสั้นและระยะยาว โดยเกี่ยวข้องกับความคิดเชิงนามธรรม มีความบกพร่องของการตัดสินใจ สมรรถภาพของสมองและพฤติกรรมเปลี่ยนแปลง ความผิดปกติเหล่านี้มีความรุนแรงซึ่งส่งผลต่อการทำงาน และกิจกรรมในชีวิตประจำวัน โดยอายุแพทย์เฉพาะทางจะสามารถวินิจฉัยได้เมื่อผู้ป่วยแสดงอาการชัดเจน และการวินิจฉัยนั้นมักเป็นไปเพื่อการดูแลรักษาผู้ที่มีอาการป่วยให้สามารถช่วยเหลือตนเองในชีวิตประจำวันได้ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยประกอบด้วย การทดสอบก่อนการวินิจฉัยด้วยการซักประวัติจากผู้ป่วยและญาติ การตรวจร่างกาย การตรวจสภาพจิต การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อหาสาเหตุของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ การประเมินพุทธิปัญญาหรือการทำหน้าที่ของสมอง (โดยใช้แบบทดสอบมาตรฐาน Thai mental state examination, TMSE) การถ่ายภาพรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า และใช้เทคนิคการสแกนภาพถ่ายสมอง เช่น Transcranial doppler ultrasonography (TCD), Radiolabeled tracer imaging และ Magnetic resonance imaging เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสมอง นอกจากนี้ยังมีการตรวจระดับโปรตีน beta-amyloid ในน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid, CSF) ด้วยการใช้เทคนิค immunoprecipitation, western blot และ ELISA การวินิจฉัยโรคต้องอาศัยบุคลากรทางการแพทย์เฉพาะทาง ใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ

การตรวจโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์เพื่อวินิจฉัยภาวะเสี่ยง และติดตามการรักษายังต้องอาศัยการตรวจที่มีต้นทุนสูง และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ ทำให้ผู้ป่วยหลายกลุ่มไม่สามารถเข้าถึงการตรวจวินิจฉัย และได้รับการรักษาได้อย่างทันทั่วถึง จึงส่งผลให้การดำเนินของโรครุนแรงจนยากที่จะเยียวยา หากสามารถตรวจพบความเสี่ยงในการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้ตั้งแต่เริ่มต้น จะทำให้การรักษาและป้องกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดภาระทางการเงิน และสังคมในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์อีกด้วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการพัฒนาการตรวจคัดกรองโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ให้มีความไว ง่าย รวดเร็ว และราคาไม่แพง สามารถนำไปใช้ตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคอัลไซเมอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการตรวจระดับ beta-amyloid ควบคู่กับการทดสอบด้วย TMSE หรือ MMSE นำไปสู่การวินิจฉัยสถานะสุขภาพ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการพัฒนาอาการของโรค และยังช่วยในการติดตามและวางแผนการรักษาหรือป้องกันความรุนแรงของโรค โดยมุ่งพัฒนาชุดทดสอบตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาและตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพบนกระดาษ (lab-on-paper หรือ paper-based analytical device) ซึ่งอุปกรณ์สามารถออกแบบเป็นรูปแบบต่างๆ ได้ง่าย โดยของเหลวสามารถเคลื่อนที่และซึมผ่านบนวัสดุกระดาษได้โดยแรงคาปิลารีจึงไม่ต้องใช้พลังงานภายนอกในการ

นำเสนอ สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้ง่ายด้วยตาเปล่า มีความถูกต้องแม่นยำและมีความไวในการตรวจยิ่งขึ้น ที่สำคัญมีราคาไม่แพง

2. วัตถุประสงค์

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการและอุปกรณ์ lab-on-paper ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์เชิงแสงสำหรับตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด beta amyloid 1-42 โดยวิธี Dot Blot Assay และทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ในตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ โดยเปรียบเทียบผลกับวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณ beta amyloid 1-42 ในตัวอย่างเลือด

3. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

3.1 การตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ beta amyloid 1-42 โดยเทคนิค ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ในการศึกษาวิจัยเพื่อการพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโรคสมองเสื่อมอย่างรวดเร็วในครั้งนี้ จะทำการทดสอบวัดปริมาณ beta amyloid 1-42 ในตัวอย่างเลือดโดยใช้เครื่องมือที่พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัย และเทียบผลการทดสอบกับวิธี ELISA ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของชุด Human Amyloid β 42 ELISA kit (Merck-Millipore, USA) ที่เลือกใช้เพื่อตรวจวัดปริมาณ beta-amyloid 1-42 ในตัวอย่าง plasma จากผู้ป่วยจึงมีความสำคัญต่อการศึกษาในขั้นต่อไป และยังเป็นการทดสอบเพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณ beta-amyloid 1-42 ที่มีในเลือด และยังเป็นการทดสอบวิธีการเก็บตัวอย่าง plasma เพื่อการตรวจ beta-amyloid 1-42 ได้อย่างถูกต้อง

3.1.1 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับอนุมัติโครงการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต เลขที่ COA 065/2559 โดยทำการเก็บตัวอย่างที่หน่วยประสาทวิทยา โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

1) การแบ่งกลุ่มเพื่อทำการศึกษา

แบ่งผู้เข้าร่วมวิจัยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จำนวน 40 คน และกลุ่มควบคุม (อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี) จำนวน 40 คน โดยแพทย์จะเป็นผู้ตรวจวินิจฉัยและแบ่งกลุ่มผู้เข้าร่วมวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยกลุ่มควบคุม

แพทย์ทำการคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยกลุ่มควบคุม ดังเกณฑ์การคัดเลือกต่อไปนี้

- เป็นประชากรไทยทั้งชายและหญิงที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป
- อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่เคยมีประวัติเป็นโรคอัลไซเมอร์ หรือโรคสมองเสื่อม

- ไม่เจ็บป่วยด้วยโรคทางกายหรือจิตอย่างรุนแรงจนเป็นอุปสรรคต่อการวิจัย ซึ่งวินิจฉัยจากแพทย์
 - ยินยอมเข้าร่วมโครงการ (มี Informed consent)
- ขั้นตอนการวิจัยกลุ่มผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์
- แพทย์ทำการคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยกลุ่มผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ดังเกณฑ์การคัดเลือกต่อไปนี้
- เป็นประชากรไทยทั้งชายและหญิงที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป
 - ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยหลักเป็นโรคอัลไซเมอร์จากแพทย์เฉพาะทางด้านประสาทวิทยา โดยเกณฑ์การวินิจฉัยประกอบไปด้วยด้วยการซักประวัติจากผู้ป่วยและญาติ การตรวจร่างกาย การตรวจสภาพจิต การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อหาสาเหตุของโรคสมองเสื่อม การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เพื่อการเปลี่ยนแปลงของสมอง การประเมินพุทธิปัญญาหรือการทำหน้าที่ของสมอง โดยใช้แบบทดสอบมาตรฐาน Thai mental state examination (TMSE) โดยจะคัดเลือกผู้ป่วยที่มี cognitive capacity ทุกระดับคะแนนที่น้อยกว่า 23 และมีปัญหาความจำเสื่อม
 - ไม่เจ็บป่วยด้วยโรคทางกายหรือจิตอย่างรุนแรงจนเป็นอุปสรรคต่อการวิจัย ซึ่งวินิจฉัยจากแพทย์
 - ยินยอมเข้าร่วมโครงการ (มี Informed consent)

ผู้วิจัยจะพบผู้ที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ตามวัน-เวลาและสถานที่ ตามที่ได้รับนัดหมายจากผู้ประสานงาน ซึ่งสถานที่ที่จะใช้พบผู้เข้าร่วมวิจัยนั้น จะระบุให้ผู้ประสานงานจัดหาห้องที่มีลักษณะมืดชิด ความเป็นส่วนตัว ไม่มีผู้คนเดินผ่านและเข้าออกอย่างพลุกพล่าน

เริ่มชี้แจงข้อมูลงานวิจัยในเรื่องของขั้นตอนการวิจัย ความปลอดภัย การรักษาข้อมูลและการปกปิดข้อมูลของผู้เข้าร่วมการวิจัยพร้อมทั้งแจกเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมวิจัย และหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัยในโครงการนี้โดยที่ผู้เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิถอนตัวออกจากโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า และการไม่เข้าร่วมการวิจัยหรือถอนตัวออกจากโครงการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการบริการและการรักษาที่สมควรจะได้รับแต่ประการใด เมื่อผู้เข้าร่วมการวิจัยลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย และเอกสารแสดงเจตนายินยอมให้เก็บเลือด จะเริ่มเก็บข้อมูลจากการสอบถามข้อมูลส่วนบุคคล และผู้วิจัยจะขอเจาะเลือดเพื่อตรวจเพียงครั้งเดียว โดยให้นักเทคนิคการแพทย์หรือพยาบาลเป็นผู้ดำเนินการในปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) จากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยรวมเวลาทั้งสิ้นประมาณ 30 นาที โดยตัวอย่างเลือดที่ได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีจะถูกนำมากำหนดเป็น code ก่อนที่จะนำไปทำการศึกษาโดยจะทำการเป็น double code specimens ผู้ที่สามารถเข้าถึงรหัสนี้ได้คือแพทย์ผู้ทำการตรวจวินิจฉัยโรคสมองเสื่อม และหัวหน้าโครงการวิจัยเท่านั้น

2) การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลประวัติกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ (40 คน) และกลุ่มควบคุม (40 คน) ซึ่งประกอบด้วย

- ข้อมูลพื้นฐาน เช่น ชื่อ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง เป็นต้น

- ข้อมูลการตรวจร่างกายและสุขภาพ เช่น ความดัน โรคประจำตัว เป็นต้น
- ข้อมูลการทดสอบสภาพสมองเบื้องต้น TMSE
- ข้อมูลการตรวจวัดระดับ beta-amyloid 1-42 ในตัวอย่างเลือด

3) การเตรียมตัวอย่างเลือด

นำเลือดที่ได้กลับมาที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และทำการปั่นเลือดเพื่อเก็บ plasma โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บ plasma และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจสอบปริมาณ beta-amyloid 1-42 ด้วยเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยและด้วยวิธี ELISA

4) การทดสอบ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

เทคนิค ELISA เป็นวิธีทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการวัดปริมาณโมเลกุลที่สนใจโดยใช้หลักการของปฏิกิริยา antigen-antibody assay ซึ่งการศึกษานี้ทำการตรวจวัดปริมาณโมเลกุล beta amyloid 1-42 ใน plasma โดยใช้ชุดทดสอบที่มีความจำเพาะต่อ human beta amyloid 1-42 (Merck-Millipore, USA) โดยมีขั้นตอนการทดสอบโดยสังเขปดังนี้ นำสารที่ต้องใช้มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งเตรียมตัวอย่าง plasma ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเตรียมสารละลาย Standard ของ beta-amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น Std 1 = 500 pg/mL, Std 2 = 250 pg/mL, Std 3 = 125 pg/mL, Std 4 = 62.5 pg/mL, Std 5 = 31.25 pg/mL, Std 6 = 16 pg/mL และ Blank (Standard and Sample Diluent) = 0 pg/mL จากนั้นทำการเตรียมความพร้อม Antibody-coated microtiter plate ที่จำเพาะต่อ human beta amyloid 1-42 โดยนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม Antibody Conjugate Solution 50 μ L ลงใน well จากนั้นเติม Blank และ standard อย่างละ 50 μ L ลงใน well ตามลำดับ และตามด้วย 50 μ L ของตัวอย่าง plasma แบบ duplicate ใน well ที่เหลือตามลำดับให้เสร็จครบภายใน 30 นาที จากนั้นปิด plate ด้วย sealer และผสมให้เข้ากันด้วย orbital plate shaker (500 - 600 rpm/min) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 16 ชั่วโมง ทำการล้างแต่ละ well ด้วย Washing Solution อย่างน้อย 5 รอบ และเติม Enzyme Conjugate Solution 100 μ L ลงในแต่ละ well ปิด plate ด้วย sealer และบ่มที่อุณหภูมิห้องบน orbital shaker (500-600 rpm/min) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้าง plate 5 ครั้งด้วย Washing Solution ซับให้พอแห้งด้วยกระดาษซับ จากนั้นเติม Substrate Solution 100 μ L และเขย่าเป็นเวลา 5 - 30 นาที จะเกิดสีฟ้าขึ้น และทำการเติม Stop Solution 100 μ L เมื่อความเข้มของสีฟ้าเป็นที่ต้องการโดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ทำการอ่านค่า absorbance ที่ 450 nm and 590 nm ภายใน 5 นาที โดยความเข้มของสารจะแปรผันตรงกับปริมาณของ beta amyloid 1-42 ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจ และคำนวณปริมาณโดยการเทียบกับ standard curve

5) การวิเคราะห์ผลการวิจัย

สถิติที่ใช้ทดสอบหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ T-test กำหนดที่ค่า P-value < 0.05 โดยทำการเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐาน ข้อมูลการทดสอบสภาพสมองเบื้องต้น TMSE และปริมาณ beta amyloid ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์และกลุ่มควบคุมที่ได้จากตัวอย่างเลือด โดยใช้เครื่องมือที่ได้พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ และจากการใช้วิธี ELISA โดยแสดงผลเป็นค่า means $\pm$ standard error of measurement (SEM) จากจำนวนตัวอย่าง 40 รายต่อกลุ่ม

3.1.2 ผลการทดลอง

1) ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการ

จากการดำเนินการคัดกรองอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการโดยแพทย์เฉพาะทางประสาทวิทยา ตารางที่ 1 แสดงถึงข้อมูลต่างๆ ของอาสาสมัครกลุ่มละ 23 ราย โดยพบว่าอายุของผู้เข้าร่วมโครงการทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่าผลการทดสอบ TMSE score มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง TMSE score เป็นค่าที่บ่งบอกถึง cognitive capacity โดยในผู้ที่มีความจำเสื่อมจะมีคะแนนที่น้อยกว่า 23 จากผลการทดลองพบว่าอาสาสมัครกลุ่มสุขภาพดี (Old) มีค่าเฉลี่ยมากกว่า 23 นั่นคือประมาณ 28 และค่าเฉลี่ยคะแนน TMSE ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์มีค่าประมาณ 17 นั่นคือต่ำกว่า 23 แสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครกลุ่มนี้มีปัญหาความจำเสื่อม

ตารางที่ 1 แสดงผลข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

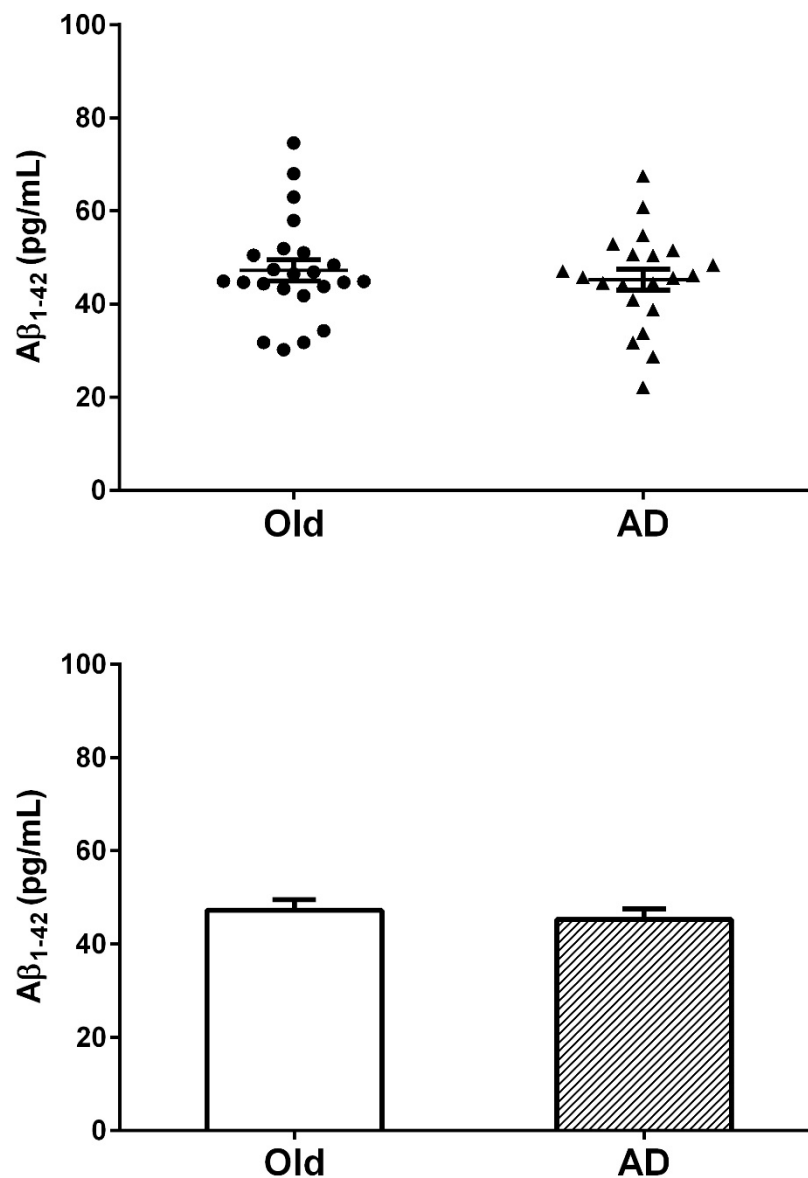
	Healthy control (Old)	Alzheimer's patient (AD)	P-value
Age (year)	69.02 $\pm$ 1.23	72.67 $\pm$ 2.78	> 0.05
TMSE score	29.43 $\pm$ 0.27	17.59 $\pm$ 1.98	< 0.05

AD = ผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์, Old = อาสาสมัครสุขภาพดี

2) ผลการทดสอบวัดปริมาณ beta amyloid 1-42

การผลการทดสอบวัดปริมาณ beta amyloid 1-42 ในตัวอย่าง plasma ของอาสาสมัครผู้ร่วมโครงการซึ่งแสดงในรูปแบบของกราฟแท่งค่าเฉลี่ยปริมาณ beta amyloid 1-42 (รูปที่ 1) ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าชุดตรวจ ELISA มีความจำเพาะต่อการวัดโมเลกุล beta amyloid 1-42 ในตัวอย่าง plasma ของมนุษย์ และสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับ picogram (pg) เป็นที่น่าสนใจพบว่าปริมาณ beta amyloid 1-42 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (AD) มีค่าสูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (Old) อย่างไรก็ตามยังไม่พบ

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบทางสถิติระหว่างกลุ่ม Old และกลุ่ม AD ทั้งนี้เป็นการทดสอบกับตัวอย่างกลุ่มละ 21 - 23 ราย ดังนั้นการเพิ่มจำนวนตัวอย่างอาจจะทำให้เห็นผลได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งคณะผู้วิจัยจะดำเนินการทดสอบต่อไป



รูปที่ 1 แสดงการกระจายตัวของข้อมูล (ภาพบน) และปริมาณเฉลี่ย (pg/mL) ของ beta amyloid 1-42 (ภาพล่าง) ในตัวอย่าง plasma ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (AD) และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (Old)

3.2 การพัฒนา dot blot assay สำหรับการตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ชนิด beta-amyloid 1-42

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ด้วยวิธี dot blot assay สำหรับตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด beta amyloid 1-42 โดยมุ่งหมายที่จะพัฒนาออกแบบให้การตรวจวัดมีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะ มีต้นทุนในการผลิตไม่สูงมาก ใช้งานและสามารถอ่านผลได้ง่ายโดยการเกิดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ dot blot assay ยังเป็นการพัฒนาเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจแบบ sandwich-lateral flow immunoassay ต่อไป

3.2.1 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

1) การศึกษา antibody ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษา

beta-amyloid เป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ของ amyloid precursor protein หรือ APP ซึ่งมีขนาด 100-140 kDa กรดอะมิโนที่อยู่บนสาย APP จะมีส่วนของ amyloid เป็นส่วนประกอบ APP สามารถถูกส่งจากภายในสมองออกสู่ภายนอกทางเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีหลายเอมไซม์ที่จำเพาะจะสามารถตัด จะได้ลัทธิเป็นโปรตีนขนาดเล็กซึ่งพบทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งชิ้นส่วนจากการตัดนั้น บางชิ้นส่วนคือ Beta-amyloid เมื่อมีการรวมชิ้นส่วนเล็กๆ ของ beta amyloid เป็น oligomers, fibrils และเพิ่มรวมกันมากขึ้นจะได้ plaques ชิ้นส่วนที่ถูกตัดและสะสมอยู่ภายนอกนำไปสู่การเกิดโรคอัลไซเมอร์ ลักษณะการรวมตัวดังกล่าวส่งผลเสียต่อเซลล์ประสาทในสมอง คือ ขัดขวางการทำงาน การสื่อสารของเซลล์ประสาท กระตุ้น immune cells ทำให้เกิดการอักเสบ และส่งผลต่อการตายของเซลล์ที่สุด ดังนั้นการเลือก antibody ที่จำเพาะจะเป็นประโยชน์และความถูกต้องต่อการนำมาศึกษาในครั้งนี้

การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้ rabbit anti-amyloid oligomer polyclonal antibody (AB9234, Chemicon) ซึ่งมีความจำเพาะกับ beta amyloid ที่เป็น oligomer ซึ่ง antibody ดังกล่าวไม่สามารถจับได้กับ 1) โปรตีนทั่วไป (native protein) 2) beta amyloid ในรูป monomer 3) beta-amyloid ในรูป fibrils โดย anti-amyloid oligomer polyclonal antibody นี้ประกอบด้วยโมเลกุลของ antibody ที่มีความสามารถในการจับส่วนต่างๆ ของ amyloid antigen

ก. วิธีการเตรียม beta-amyloid antigen (A9810, Sigma Aldrich)

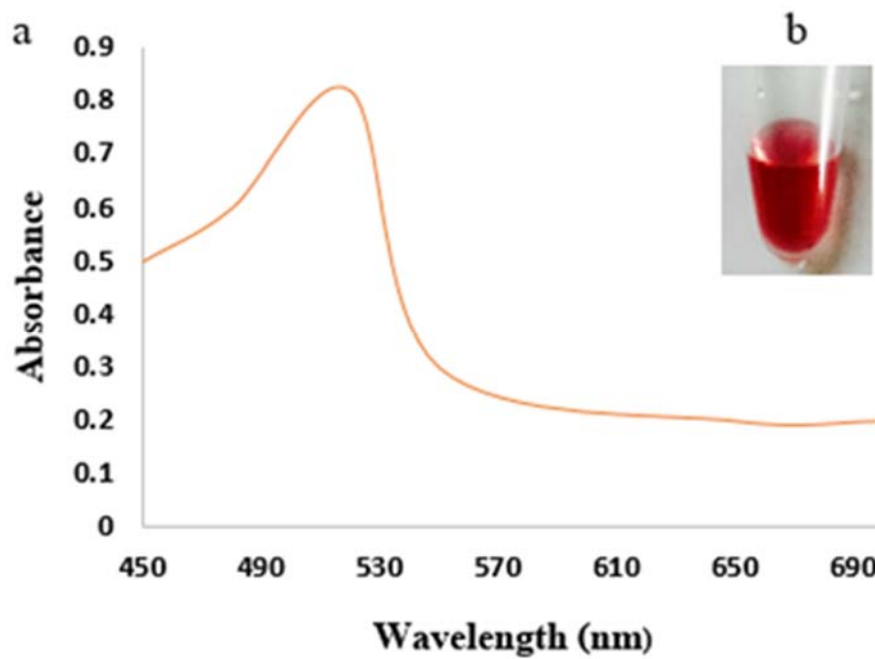
ดำเนินการเตรียม beta-amyloid โดยอ้างอิงจากการศึกษาใน *in vitro* ของ Sotthibundhu A. et al., 2008 โดยงานวิจัยนี้ได้มีการทดสอบถึงการ aggregation และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแล้ว ซึ่งมีความเสมือนจริงกับลักษณะของ beta amyloid 1-42 ที่มีอยู่จริงในผู้ป่วย โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ทำการเติมน้ำเกรด Mili Q ปริมาณ 1.2 mL เพื่อทำละลาย beta amyloid 1-42 ปริมาณ 1.1 mg จากนั้นทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง หรือ 1 ค่ำ จากนั้นทำการแบ่งเก็บในปริมาณที่ต้องการใช้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อลดการเสียสภาพในการนำไปละลายเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ข. การตรวจสอบขนาดของ beta amyloid 1-42 antigen และความจำเพาะของ antibody

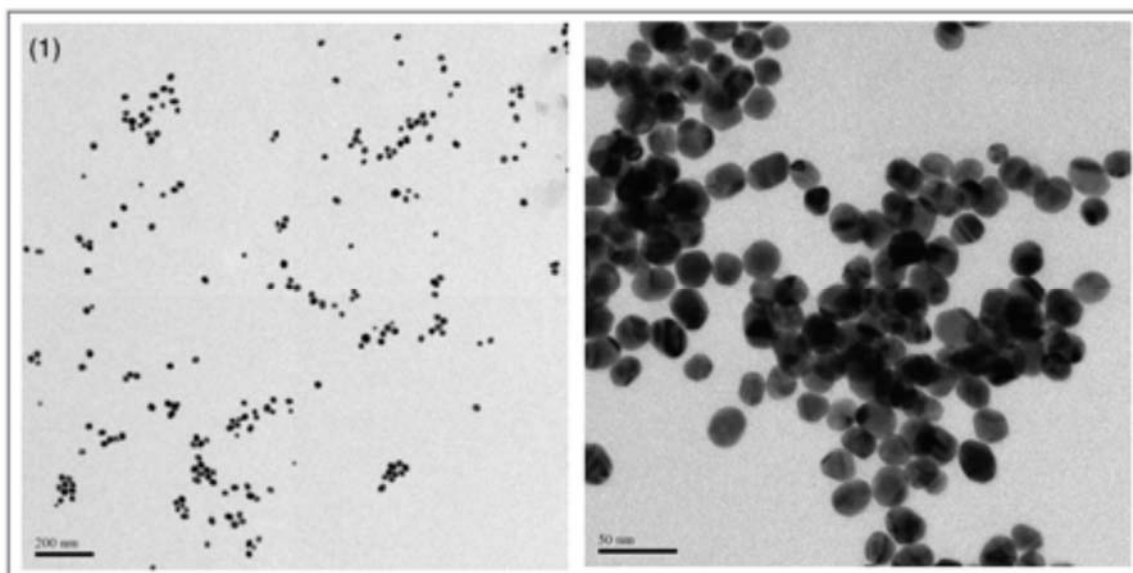
ทำการทดสอบ beta amyloid 1-42 antigen ที่เตรียมขึ้นได้ ด้วยวิธี Western Blotting เพื่อตรวจสอบขนาดของโปรตีน โดยการเตรียม 12% Tris-Tricine gel ขนาด 1 mm. จากนั้นเตรียม beta amyloid 1-42 antigen โดยนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ผสม dye และทำการ load ที่ปริมาตร 20 μ L/well ทำการ run gel ที่อุณหภูมิห้อง ที่ 100 V ด้วย electrophoresis buffer (Tris-Tricine-SDS) เป็นเวลา 90-100 นาที (ทำการหยุดเมื่อระดับของสี dye ห่างจากขอบเจลด้านล่าง 0.5 cm จากนั้น transfer โปรตีนจากเจลลงบน nitrocellulose membrane ด้วย transfer buffer (25 mM Tris-192 mM glycine-20% (v/v) methanol, 0.02% SDS, pH 8.3) ทำการ block non-specific protein ด้วย 5% (w/v) non-fat dry milk in TBS-T buffer เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ incubate ด้วย Rabbit anti-amyloid oligomer polyclonal antibody (AB9234, Chemicon) ระยะเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง หรือ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้าง nitrocellulose membrane ด้วยสารละลาย TBS-T buffer จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที และนำไป incubate ด้วย secondary antibody (HRP-linked anti-rabbit whole molecule IgG) ที่ทำลายละใน TBS-T buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1.50 ชั่วโมง จากนั้นล้าง nitrocellulose membrane ด้วย TBS-T buffer จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของโปรตีน beta-amyloid ที่อยู่บน membrane โดยการ incubate ด้วย ECL substrate และ transfer signal ไปยัง x-ray film ซึ่งจะให้แถบสีดำเข้มบนแผ่น film และตรวจสอบเทียบขนาดโปรตีน beta amyloid 1-42 กับโปรตีน marker ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าได้แถบตรงกับขนาดของ beta amyloid 1-42 ที่เตรียมได้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถเตรียม antigen และ antibody ที่เลือกใช้มีความจำเพาะ และเหมาะสมที่เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2) การสังเคราะห์อนุภาคทอง (gold nanoparticle, AuNPs)

ทำการสังเคราะห์ gold nanoparticles โดยใช้ตัวรีดิวซ์ trisodium citrate เพื่อเปลี่ยนไอออนของ Au^{3+} เป็นอะตอมของทอง Au^0 ซึ่งจะรวมตัวกันเป็นอนุภาคขนาดนาโนเมตร นอกจากนี้ที่ผิวของ gold nanoparticles จะมีสภาพเป็นประจุลบ ทำให้อนุภาคทองมีขนาดนาโนเมตร ซึ่งเรียกว่า gold nanoparticles (AuNPs) หรือ อนุภาคทองขนาดนาโนเมตร ซึ่งจะมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ 520 nm (รูปที่ 2) โดยการตรวจวัดด้วยเครื่อง UV spectrometer หลังจากนั้นทำการศึกษาวิเคราะห์ morphology และขนาดของอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นได้ด้วยกล้อง Transmission electron microscopy (TEM) พบว่ามีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคอยู่ที่ 25 nm (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการทดลองลำดับต่อไป



รูปที่ 2 UV-vis spectra แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ที่ 520 nm และผลสีของ AuNPs ซึ่งมีสีแดง

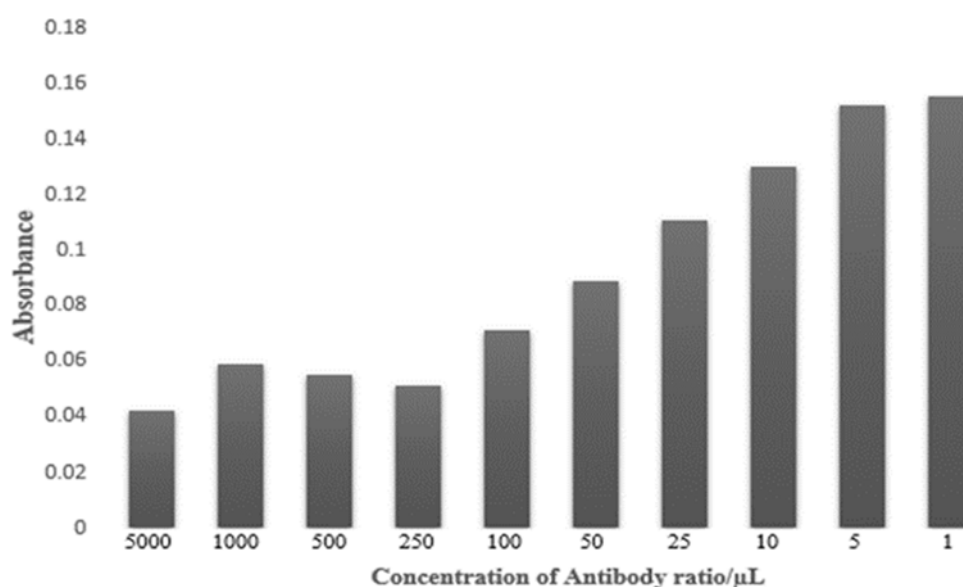


รูปที่ 3 แสดง TEM images จากการวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของอนุภาค AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยกล้อง Transmission electron microscopy

3) การสังเคราะห์ anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs

ก. ความเข้มข้นของ anti-beta-amyloid antibody ที่เหมาะสม

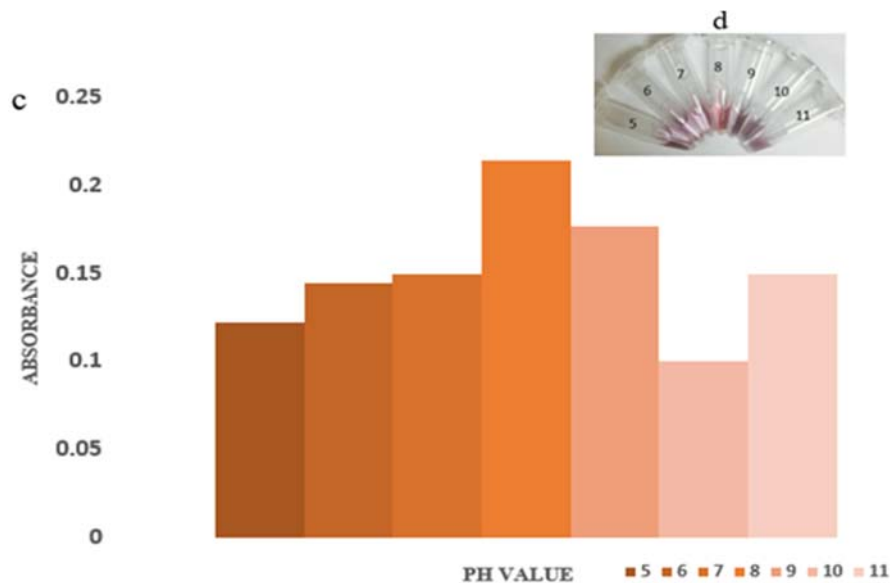
ทำการหาความเข้มข้นของ anti-beta amyloid antibody ที่เหมาะสมโดยใช้ NaCl เนื่องจาก cation ของเกลือมีผลให้ประจุลบที่พื้นผิวของ AuNPs หายไป ทำให้คุณสมบัติการผลักกันระหว่างอนุภาคหายไป และเกิดการรวมกลุ่มของ AuNPs สีของอนุภาคนี้อาจจะเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีม่วง แต่เมื่อมี antibody มากพอจะติดกับผิวของ AuNPs ทำให้ป้องกันการรวมกลุ่มของ AuNPs จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ anti-beta-amyloid antibody ที่ความเข้มข้น 1:5 (V/V) จากความเข้มข้นเริ่มต้นละลายด้วย PBS buffer (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นของ antibody ในการเตรียม AuNP-Antibody conjugation

ข. ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ

จากนั้นทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสำหรับการติด antibodies กับ AuNPs โดยทำการศึกษาในช่วง pH = 5-11 เมื่อปรับ pH ของ AuNPs ที่ค่าต่างๆ แล้วทำการ incubate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปติดกับ antibodies แล้วเติม 10% NaCl วัดค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 525 nm จากผลการทดลองพบว่าที่ค่า pH 8 ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH อื่นๆ ที่ศึกษา ดังนั้น pH ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs มีค่าเท่ากับ 8 (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลของ pH ที่เหมาะสมในการเตรียม anti-beta amyloid conjugated AuNPs

ค. การติดฉลาก (conjugate) AuNPs ที่สังเคราะห์ได้กับ anti-beta amyloid antibody

ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาจากข้างต้น ทำการติด AuNPs กับ antibody ที่เลือกใช้ โดยการผสม anti-beta amyloid oligomers antibody (ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$) ปริมาตร 50 μL ด้วยสารละลาย 10 mM PBS buffer pH 7.4 ปริมาตร 50 μL ลงใน AuNPs ที่ pH 8 แล้วเติม 10% bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 100 μL โดยคนสารละลายตลอดเวลา เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำการ incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วน non-conjugated antibodies ซึ่งจะอยู่ในส่วนของสารละลายออกจาก AuNPs-conjugated antibodies ซึ่งจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง หลังจากนั้นทำการละลายตะกอน AuNPs-conjugated antibodies ที่เป็น pellet ด้วย 0.5 mL PBS ที่ pH 7.4 ผสมกับ 2% BSA และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

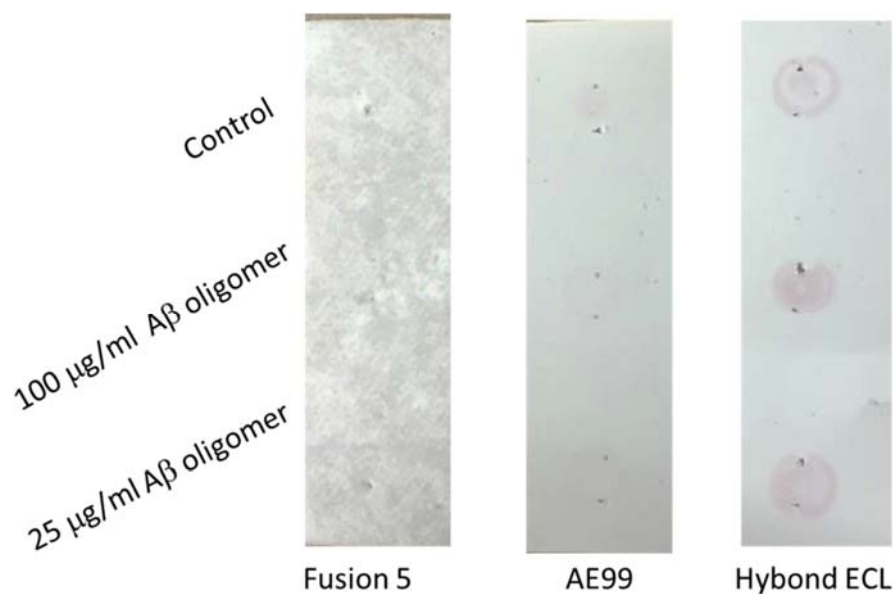
4) การเลือกวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการทำ dot blot assay

ทำการทดสอบ dot blot assay ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยทำการตรึง beta amyloid 1-42 oligomer ที่เตรียมได้ลงบนวัสดุ membrane สามชนิด ได้แก่ AE99, fusion 5 และ Hybond ECL ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในขนาดของ pore size ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 แล้วทดสอบด้วยการเติม anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs เมื่อมีการจับกันระหว่าง beta amyloid oligomer กับ anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs จะเกิด complex บน membrane จะทำให้เห็นสีแดงของ AuNPs ที่ทดสอบ หลังจากการล้างส่วนที่เกินออก แล้วตรวจวัดความเข้มสีของ AuNPs ด้วยตาเปล่าเทียบกับตัว control ซึ่งไม่ได้ตรึง beta amyloid oligomer บนแผ่น membrane จากการทดลอง (รูปที่ 6) พบว่าไม่เกิดผลสีที่บริเวณทดสอบบนกระดาษชนิด fusion 5 ในขณะที่ กระดาษ AE

99 ให้สัญญาณพื้นหลัง (background) สูง และไม่สามารถสังเกตได้ชัดด้วยตาเปล่า สำหรับกระดาษ Hybond ECL ให้ความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่าง control กับ beta amyloid oligomer ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้วัสดุชนิด Hybond ECL

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดความแตกต่างของวัสดุ membrane ที่เลือกใช้ในการทดสอบเลือกวัสดุที่เหมาะสมต่อการพัฒนา dot blot assay

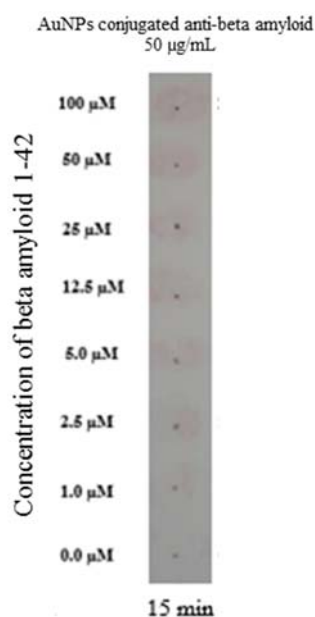
Membranes	Pore Size	Thickness	Capillary Flow Rate	Properties
Whatman AE99	8.00 μm	1.50 mm	120-160 s/4cm	Provides a good combination of sensitivity with fast wicking in a LFA, constructed of 100% nitrocellulose
Fusion 5	2.30 μm	370 μm	38 s/4cm	Hydrophilic material, easy, fast and efficient for traditional modular components from a lateral flow testing
Hybond ECL	0.45 μm	2.50 mm	No	Provides excellent sensitivity, resolution and low background in fluorescence blotting detection applications, High binding capacity



รูปที่ 6 แสดงผลของ dot blot assay โดยการตรึง beta amyloid oligomer บน membrane สามชนิด และตรวจสอบสัญญาณสีด้วย anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs

5) การหาปริมาณ beta amyloid 1-42 oligomer ด้วยวิธี dot blot assay

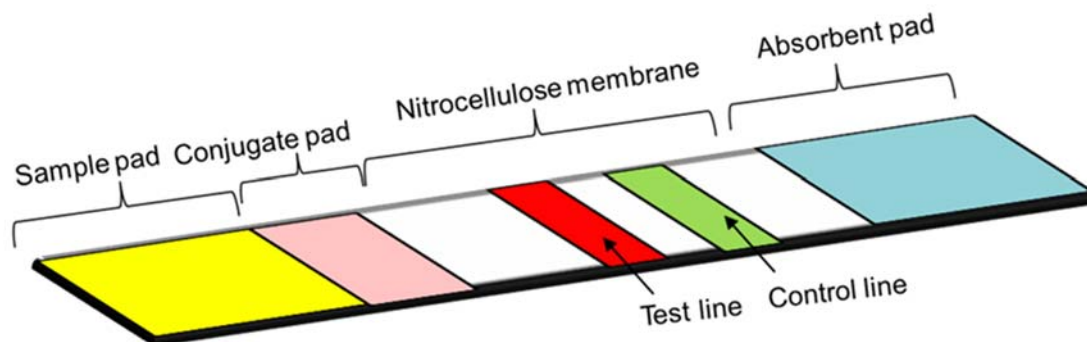
ขั้นตอนการการตรวจวัดหาปริมาณ beta amyloid 1-42 oligomer ด้วย direct dot blot assay ในขั้นต้นทำการทดสอบกับสารละลายตัวอย่าง beta amyloid 1-42 ที่สังเคราะห์ขึ้นและรู้ปริมาณที่แน่นอนก่อนที่จะนำไปทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งทำได้โดยการตรึง beta amyloid 1-42 oligomer ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 µL ลงบน Hybond ECL membrane โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (triplicate) ปล่อยให้แห้งด้วยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการ block non-specific antigen ด้วย 5% non-fat milk ใน TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.8% NaCl, 0.1% v/v tween-20) หลังจากนั้นนำมาใช้ทดสอบโดยการเติม 50 µg/mL anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs ปริมาตร 1 µL แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้าง Hybond ECL membrane โดยการแช่ในสารละลาย TBS-T เป็นเวลา 10 นาที ผลการทดลองในการตรวจวัด beta amyloid oligomer ที่ความเข้มข้น 0.1- 100 µg/mL แสดงในรูปที่ 7 ผลการทดสอบวัดปริมาณ beta amyloid 1-42 oligomer ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มของสัญญาณสีที่ปรากฏมีความแปรผันตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ ปริมาณ beta amyloid 1-42 oligomer โดยความเข้มข้นต่ำที่สุด (Lowest concentration) ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี direct dot blot assay นี้คือ 1 µM หรือ 4 µg/mL (Limit of detection) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า Limit of detection นี้ ไม่สามารถอ่านผลสัญญาณสีด้วยตาเปล่าได้



รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจวัด beta amyloid 1-42 oligomer ด้วยวิธี dot blot assay ที่พัฒนาขึ้นได้ ที่ความเข้มข้น 1- 100 μM

3.3 การพัฒนา sandwich-lateral flow immunoassay สำหรับการตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ชนิด beta amyloid 1-42

จากการทำวิจัยที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่าในการพัฒนาวิธี sandwich-lateral flow immunoassay นั้นสามารถทำการตรึงโมเลกุล beta amyloid 1-42 oligomers บนวัสดุ AE 99 membrane ได้ดี และวัสดุดังกล่าวยังมีความเหมาะสมสำหรับการทำ flow chromatography เนื่องจากคุณสมบัติของรูพรุน (ตารางที่ 2) ซึ่งวิธี sandwich immunoassay เป็นรูปแบบของการพัฒนา strip test ที่แพร่หลาย โดยรูปแบบ sandwich-lateral flow immunoassay ที่จะพัฒนาเพื่อตรวจวัด beta amyloid 1-42 มีรูปแบบดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งจะได้เสนอวิธีการพัฒนาในลำดับต่อไป



รูปที่ 8 รูปแบบของ strip test แบบ sandwich-lateral flow immunoassay สำหรับการตรวจวัด beta amyloid 1-42

3.3.1 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

1) การเตรียม strip platform

ก. การตรึง 1st antibody บนพื้นผิว membrane

ทำการตรึง 1st antibody (goat anti-beta amyloid 1-42 oligomer, Santacruz, USA) 200 µg/mL บน AE 99 membrane แล้วทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

ข. การเตรียม antigen เพื่อการทดสอบ strip

ทำการเตรียม beta amyloid 1-42 oligomer ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.1 µg/mL และ 0.0 µg/mL ใช้เป็น control โดยทำละลายในน้ำเกรด Mili Q

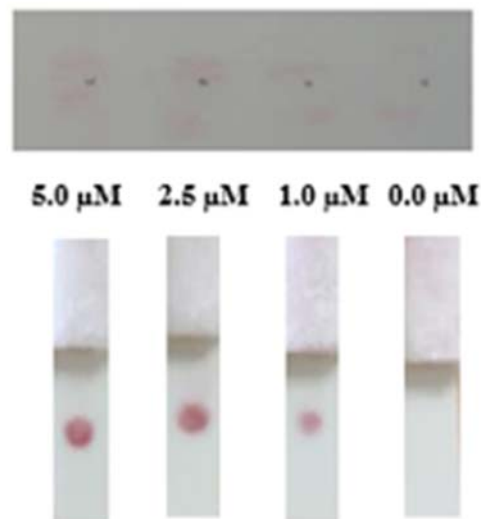
2) การทำ flow chromatography

นำ strip ที่มีการตรึง 1st antibody ที่เตรียมไว้ข้างต้นมาจุ่มในสารละลาย beta amyloid 1-42 oligomer เป็นระยะเวลา 15 นาที และนำ strip ดังกล่าวมาจุ่มในสารละลาย 50 µg/mL anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs ที่เตรียมได้ ซึ่งเป็น 2nd antibody เป็นเวลา 15 นาที โดยจะเกิดการเคลื่อนที่ของสารละลายต่างๆ แบบ chromatography เมื่อครบเวลานำ strip มาจุ่มใน washing buffer เพื่อเป็นการ ลด background

3) การหาปริมาณ beta amyloid 1-42 oligomer ด้วย sandwich immunoassay บน test strip

ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมทำการทดสอบหาปริมาณ beta amyloid 1-42 antigen เมื่อนำ strip มาจุ่มในสารละลายตัวอย่าง antigen จะจับกับ 1st antibody ที่ test line และจับกับ 2nd antibody นั่นคือ anti-

beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs เป็น sandwich form ทำให้เห็นสีแดงจาก gold nanoparticle ด้วยตาเปล่า โดยรูปที่ 9 เป็นการแสดงผลการทดสอบ beta amyloid 1-42 antigen ที่ความเข้มข้น 1 - 5 μM หรือ 4 - 20 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าที่ความเข้มข้นของ beta amyloid 1-42 antigen ที่เท่ากันนั้น วิธี sandwich immunoassay บน test strip ให้สัญญาณสีในการตรวจวัดที่ดีกว่าวิธี direct dot blot assay



รูปที่ 9 ผลการทดลองในการตรวจวัด beta amyloid 1-42 antigen ที่ความเข้มข้น 1 - 5 μM โดยวิธี sandwich immunoassay บน test strip (รูปล่าง) เปรียบเทียบกับวิธี direct dot blot assay (รูปบน)

จากผลการทดลอง sandwich immunoassay บน strip จะเห็นว่าผลที่ได้มีความชัดเจนมากขึ้นซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบที่ความเข้มข้นต่ำลงไปได้ ซึ่งทางทีมนักวิจัยจะทำการทดสอบหาค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดต่อไปและเพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้เซ็นเซอร์สำหรับการวัด beta amyloid 1-42 ในตัวอย่าง plasma ที่ได้จากอาสาสมัคร ได้ถึงระดับ pg/mL จึงจะทำการพัฒนาระบบเพิ่มประสิทธิภาพของสัญญาณ (enhancing system) ด้วยการใช้ silver nanoparticle ต่อไป

4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นพัฒนา lab-on-paper สำหรับตรวจวิเคราะห์ bata-amyloid แบบรู้ผลเร็ว และให้ความไวในการตรวจวัดสูง โดยการออกแบบสำหรับการตรวจวัดโดยใช้หลักการ immunoassay และติดตามสัญญาณด้วยอนุภาค AuNPs ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี direct dot blot assay เพื่อการตรวจโมเลกุล beta amyloid 1-42 oligomers ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดหนึ่งของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ โดยการตรึง beta amyloid 1-42 oligomers antigen ไว้บนพื้นผิว Hybond ECL membrane และตรวจสอบสัญญาณสีด้วย anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้มี limit of detection อยู่ที่ 4 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งยังสูงเกินกว่าปริมาณที่มีอยู่จริงในตัวอย่างเลือด โดยปริมาณที่ตรวจวัดได้จากวิธีมาตรฐานหรือ ELISA มีปริมาณเฉลี่ยของ beta amyloid 1-42 ในตัวอย่างทางคลินิกชนิด plasma จากอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 30-80 pg/mL (รูปที่ 1) ซึ่งทำให้วิธี direct dot blot assay ที่พัฒนาขึ้นยังไม่สามารถนำไปทดสอบในตัวอย่าง plasma ของผู้ป่วยได้จริง

ทั้งนี้สันนิษฐานว่าการที่วิธี dot blot assay ไม่สามารถเห็นตรวจวัด beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับ $\mu\text{g/mL}$ ได้ อาจเกิดจากความสามารถในการยึดติดของโมเลกุล antigen ที่ใช้ทดสอบนั้น คือ beta amyloid 1-42 oligomer ที่ถูกตรึงบนพื้นผิว membrane นั้นมีความไม่เสถียรมากพอ เป็นผลทำให้การทำปฏิกิริยากันระหว่าง antigen และ antibody เกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อหยดสารละลาย anti-beta amyloid oligomers antibody conjugated AuNPs ลงบน membrane ที่ตรึงด้วย antigen (test sample) หรือ buffer สำหรับ control ทำให้เกิดการหลุดออกของ antigen โดยจะเห็นได้ว่าผลการทดสอบระหว่าง test sample และ control ให้สัญญาณสีพื้นหลัง (background) ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าที่ความเข้มเท่ากัน

ดังนั้นเพื่อเป็นปรับปรุงการยึดเกาะของโมเลกุล beta amyloid 1-42 กับวัสดุ membrane ให้มีความเสถียรและเพื่อปรับปรุงความสามารถในการตรวจวัดปริมาณ beta amyloid 1-42 ให้สามารถลดลงถึงระดับ nanogram หรือ picogram ได้ตามลำดับ จึงได้ทดลองพัฒนาวิธี sandwich-lateral flow immunoassay ซึ่งมีลักษณะเป็น flow chromatography ที่เป็นรูปแบบของการพัฒนา strip test ที่มีในท้องตลาด ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เสนอการพัฒนาวีติดังกล่าวไว้ในปีที่ 2 ของโครงการ และได้ทดลองพัฒนาวีติดังกล่าวขึ้นมา ซึ่งได้ผลการทดลองเบื้องต้นมีความน่าสนใจ โดยพบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการวัดปริมาณ beta amyloid 1-42 ได้ที่ระดับ 4 $\mu\text{g/mL}$ โดยให้สัญญาณสีของ gold nanoparticle ที่ชัดเจนกว่าวิธี direct dot blot assay อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถทดสอบเพื่อหา limit of detection ที่ความเข้มข้นต่ำว่านี้ได้ในลำดับต่อไป โดยผู้วิจัยวางแผนพัฒนาอุปกรณ์ดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพของการวัดโมเลกุล beta amyloid 1-42 ให้ได้ถึงระดับ pg/mL โดยเพิ่มวิธีการในการเพิ่มขยายสัญญาณ ซึ่งจะดำเนินการในลำดับต่อไป

5. ตารางสรุปภาพรวมการดำเนินโครงการผลผลิตและผลลัพธ์ รวมถึงการเสนอต่อผู้กำหนดนโยบาย หรือ การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ชื่อโครงการ การพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโรคสมองเสื่อมอย่างรวดเร็วเพื่อนำไปสู่การพึ่งพาตนเองและการพัฒนาอย่างยั่งยืน

ลำดับที่	ผลผลิต (ปีที่ 1)	ผลลัพธ์	การใช้ประโยชน์
1	ชุดตรวจวินิจฉัยต้นแบบชนิด Dot blot assay เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ชนิด beta amyloid 1-42 จำนวน 1 ชุด	สามารถพัฒนาวิธีการตรวจ beta amyloid 1-42 โดยอาศัยหลักการ immuno-assay และติดตามสัญญาณด้วย AuNPs ซึ่งเป็นการพัฒนางานวิจัยเพื่อมุ่งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ โดยยกระดับงานวิจัยที่เน้นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการแก้ปัญหาของประเทศ	ใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ beta amyloid เบื้องต้นได้ ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้ต่อยอดไปสู่การพัฒนาชุดตรวจ beta amyloid ชนิด rapid test ให้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ และมีความง่ายในการใช้งานมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้าชุดตรวจที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ
2	ผลงานวิจัยรูปแบบ Proceeding ในวารสารงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง (ภาคผนวก: เอกสารอ้างอิงที่ 3)	สามารถเผยแพร่และนำเสนอองค์ความรู้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยต้นแบบชนิด Dot blot assay แก่ผู้สนใจในและนักวิชาการ	เกิดองค์ความรู้ที่จะใช้ต่อยอดในการพัฒนาชุดตรวจให้มีความไว และความจำเพาะต่อ beta amyloid เพิ่มขึ้น และการเผยแพร่ความรู้สู่สาธารณะช่วยให้เกิดความตระหนักเกี่ยวกับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ และผู้เกี่ยวข้องจะได้ร่วมกันพัฒนากระบวนการตรวจวินิจฉัยให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
3	การนำเสนอผลงานที่เป็นองค์ความรู้ต่อยอดจากการดำเนินโครงการ แบบ Poster	สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ amyloid ในระดับเซลล์ สามารถเผยแพร่	-การเผยแพร่ความรู้สู่สาธารณะช่วยให้เกิดความตระหนักเกี่ยวกับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ และผู้เกี่ยวข้อง

	จำนวน 1 เรื่อง (ภาคผนวก: เอกสารอ้างอิงที่ 2)	และนำเสนอผลงานแก่ผู้สนใจ และนักวิชาการ	เกี่ยวข้องจะได้ร่วมกันพัฒนา กระบวนการตรวจวินิจฉัยให้มี ประสิทธิภาพยิ่งขึ้น -เป็นองค์ความรู้ในการนำไป ต่อยอดเพื่อศึกษาวิธีการ ป้องกันการสร้าง amyloid หรือพัฒนายาเพื่อใช้ในการ ป้องกันและรักษาโรคสมอง เสื่อม
4	นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวน 1 คน	การพัฒนาและส่งเสริมการ ผลิตบัณฑิตระดับบัณฑิตศึกษา ที่มีความรู้ ความสามารถตาม มาตรฐานสากล	-เพิ่มจำนวนบุคลากรที่มีความ เชี่ยวชาญที่มีทักษะในการคิด พัฒนางานวิจัยในอนาคต -ช่วยเพิ่มขีดความสามารถของ กำลังคนด้านการวิจัยพัฒนา ทางการแพทย์ของประเทศ ซึ่ง จะเป็นกำลังสำคัญในการ คิดค้นนวัตกรรมเพื่อการ พัฒนาประเทศต่อไป
5	ความร่วมมือทางด้านวิชาการ และงานวิจัย ระหว่าง หน่วยงาน ระหว่างหน่วย ประสาทวิทยา โรงพยาบาล ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ กับคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	เกิดความร่วมมืออันดีระหว่าง หน่วยงาน ทำให้เกิดการ ร่วมกันวิจัยพัฒนาชุดตรวจ beta amyloid ต้นแบบ เกิดขึ้น	เกิดการบูรณาการระหว่าง หน่วยงาน ทำให้มีการ ประสานความเชี่ยวชาญ และ ทรัพยากรระหว่างหน่วยงาน ในการสร้างงานวิจัย และ นวัตกรรมเพื่อการพัฒนา ประเทศสู่ความยั่งยืนต่อไป

6. แผนงานและกิจกรรม ที่จะดำเนินการในปีที่ 2

	รายละเอียดกิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการวิจัย (เดือนที่)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	ศึกษาและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยแบบ sandwich-lateral flow immunoassay สำหรับการตรวจวัด beta-amyloid	•	•	•									
2	ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการตรวจวัดหาปริมาณ และหาภาวะการทดลองที่เหมาะสม			•	•	•							
3	พัฒนาระบบเพิ่มขยายสัญญาณผลการตรวจวัด ปริมาณ beta-amyloid					•	•	•					
4	ทำการตรวจวัดหาปริมาณ beta-amyloid และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวัด					•	•	•	•	•			
5	นำอุปกรณ์ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ beta-amyloid ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์									•	•	•	
6	สรุป วิเคราะห์ เผยแพร่ผลงาน										•	•	•

7. เอกสารในการเผยแพร่องค์ความรู้

ผลงานการดำเนินการโครงการนี้ ส่วนหนึ่งได้นำไปเผยแพร่องค์ความรู้ในรูปแบบต่างๆ ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติในโอกาสที่เหมาะสม โดยผลงานที่ได้ใส่กิจกรรมประกาศถึง the Health Systems Research Institute มีดังนี้

7.1 Poster presentation

1) ชื่อเรื่อง: The expression of Presenilin1 and A Disintegrin And Metalloproteinase17 in Alzheimer's disease (ภาคผนวก: เอกสารอ้างอิงที่ 1)

ชื่องานประชุม: 14th Annual Meeting of Asian-Pacific Society for Neurochemistry 2016,

วันที่: 27-30 สิงหาคม 2559

สถานที่: Hotel Istana, Kuala Lumpur, Malaysia

7.2 Proceeding

1) ชื่อเรื่อง: Development of signal enhanced dot blot immunoassay for determination of amyloid beta (ภาคผนวก: เอกสารอ้างอิงที่ 2)

ชื่องานประชุม: The National and International Graduate Research Conference 2017

วันที่: 10 มีนาคม 2560

สถานที่: อาคารพจน์ สารสิน, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก

เอกสารอ้างอิงที่ 1: เอกสารอนุมัติการทดลองในมนุษย์โดยคณะกรรมการจริยธรรม (EC)



Certificate of Approval

Human Research Ethics Committee of Thammasat University No.1 (Faculty of Medicine)

95 Moo 8, Paholyotin Road, Auphur Klongluang, Pathumthani. Thailand 12120,

Tel 662-9269704 and Fax 662-5644444 ext 7535

.....

Number of COA 065/2559

Title of Project Development of rapid screening tests for neurodegenerative diseases for self-reliance and sustainable development.

Project No MTU-EC-IM-4-045/59

Principal Investigator Dr.Prapimpun Wongchitrat
Associate Professor Pornpatr Dharmasaroja(M.D.)
Assistant Professor Praween Lolckha (M.D.)
Thammanard Charernboon(M.D.)
Dr.Amara Apilux
Dr.Wilasinee Suwanjang
Dr.Kamonrat Phopin
Assistant Professor Dr.Tanawut Tantimongcolwat
Dr.Sumana Kladsomboon

Study Center Thammasat University Hospital

Responsible Department Internal Medicine, Faculty of medicine
Thammasat University, Prathumthani, Thailand 12120
Tel. 02-441-4371-5

Document Reviewed

1. Protocol Revise No.2 dated 30/03/2559
2. Information Sheet(Control) Revise No.2 dated 30/03/2559
3. Information Sheet(Alzheimer) Revise No.2 dated 30/03/2559
4. Consent Form (Control) Revise No.2 dated 30/03/2559
5. Consent Form (Alzheimer) Revise No.2 dated 30/03/2559
6. Case Record Form Revise No.2 dated 30/03/2559

The Human Ethics Committee of Thammasat University No.1 (Faculty of Medicine) is in full compliance with international such as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guidelines and the International Practice (ICH-GCP)

This document is a record of review and approval / acceptance of a clinical study protocol. The Human Research Ethics Committee of Thammasat University No.1 (Faculty of Medicine) has approved the above study and the following documents for use in the study at the Ethics Committee meeting on March 22, 2016. (5/559)

Approval period 1 year.

Progress report deadline : October 21, 2017

Signed: 

(Assistant Professor Sumalee Kondo)

Assistant Secretary of the Human Research Ethics Committee of Thammasat University No.1 (Faculty of Medicine)

Signed: 

(Associate Professor Waipoj Chanvimalueng (M.D.))

Chairman of the Human Research Ethics Committee of Thammasat University No.1 (Faculty of Medicine)

Date of Approval: April 22, 2016

Date of Expire : April 21, 2017

The expression of Presenilin1 and A Disintegrin And Metalloproteinase 17 in Alzheimer's disease

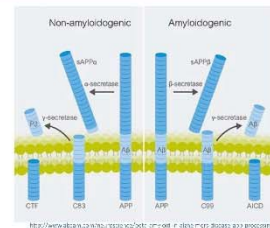
Nattaporn Pakpian¹, Prapimpun Wongchitrat², Kamonrat Phopin², Piyarat Govitrapong^{1,3,4,*}

¹Research Center for Neuroscience, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakornpathom, Thailand ²Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Salaya, Nakorn Pathom, Thailand ³Center for Neuroscience, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand ⁴Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand *Corresponding author, E-mail: piyarat.govitrapong@mahidol.ac.th

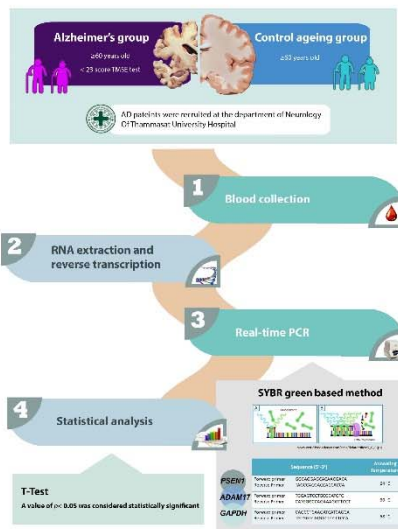


Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most prevalent form of dementia, is a chronic neurodegenerative disease. Amyloid beta plaque and neurofibrillary tangles aggregations in brain are the neuropathological hallmarks in AD[1]. Amyloid beta peptide is derived by proteolysis from the larger amyloid precursor protein (APP). Here, we interested in the expression of APP cleaving enzymes including presenilin1 (*PSEN1*), enzymes in amyloidogenic pathway which finally proteolyse APP into amyloid peptide. In different way, non-amyloidogenic pathway, there is A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM family) can cleavage APP in A β region[2], thus it prevent A β peptide generation. The aim of this study was to investigate the expression of *PSEN1* and *ADAM17* mRNA in blood sample of aging patients with AD compared to healthy control.



Methods



Results

1. Participants' Demographic

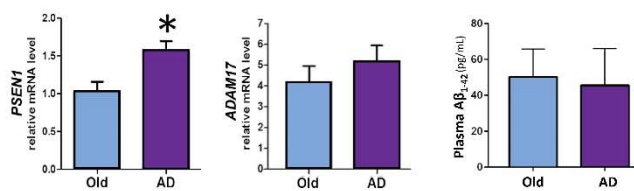
Participants included 17 healthy controls and 33 AD patients. The result demonstrated that age was not statistically significant, demonstrating that age do not influence the dependent variable. Importantly, TMSE scores of AD group were less than 23 and significantly lower when compared with healthy control, indicating that all patients in AD group are dementia.

Parameter	Old	AD	p-Value
Cases (n)	17	33	
Age (mean $\pm$ SD)	66.18 $\pm$ 4.9	72.36 $\pm$ 7.12	0.09
Female (%)	12 (66.67%)	17 (45.95%)	
TMSE (mean $\pm$ SD)	28.65 $\pm$ 1.06	19.18 $\pm$ 3.07	<0.001
Plasma A β_{1-42} (pg/mL; mean $\pm$ SD)	50.31 $\pm$ 14.66	45.92 $\pm$ 18.29	0.93

Table 1. Participants' demographic T-test was used in all variables.

2. *PSEN1*, *ADAM17* mRNA expression and A β_{1-42}

The *PSEN1* expressions significantly increased in AD group compared with healthy aged group ($P < 0.05$). However, no significant difference in *ADAM17* gene expression was observed.



Conclusion

We found that *PSEN1* mRNA also significantly increased in AD. Our data were consistent with previous work in postmortem brains and cerebrospinal fluid[3]. Despite, *ADAM17* expression has no different between AD and healthy aged. It was compatible to previous study that there was no change in *ADAM17* expression in AD brain[4]. We conclude that the higher level of *PSEN1* expression in patients can be further developed by using peripheral blood as a biomarker for AD.

References

1. Fjell, A.M., et al., What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog. Neurobiol.*, 2014, 117: p. 20-40.
2. Christian, H., et al., Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012, 2(5).
3. Maria-Salud, et al., CSF Presenilin-1 complexes are increased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2013, 1(1): p. 46.
4. Munke, G., ADAM-17: The Enzyme That Does It All. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 45(2): p. 146-160.

Acknowledgement

This study was supported by TRF and HSRI. The authors are also thankful for all volunteers participated in this study, Thammasat University Hospital and Mahidol University, Thailand for the facilitation.

Development of signal enhanced dot blot immunoassay for determination of amyloid beta

Soe Htut Win* Dr. Prapimpun Wongchitrat** Dr. Wilasinee Suwanjang** Dr. Sumana Kladsomboon **

Dr. Amara Apilux**

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a primary common neurodegenerative disorder worldwide and increases prevalence in elder ages of life span. The critical detection of early diagnosis is the most important to support treatments to defence this incapacitating disease. Amyloid-beta proteins have various significant physiological or pathophysiological effects on AD progression. It was affirmed that amyloid-beta protein levels are detected for preclinical diagnosis and prognosis as a reliable biomarker for neurodegeneration. The available methods for detection of amyloid-beta proteins are time consuming and complicated operations. Herein, a silver-enhanced nanoparticle-labelled dot blot immunoassays had been developed for detection of A β (1-42) providing high potential early diagnosis for AD. The optimization of direct immunoassay assay was investigated and interpretation of the colorimetric results can be visualized by naked eye.

Keywords: Amyloid Beta, Dot blot assay, Silver enhancement

** Student, Master of Science Program in Medical Technology, Mahidol University*

***Lecturer, Department of Centre for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University*

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common age related neurodegenerative disorder which pathologically characterized by modification of diffusible assemblies (oligomers) of amyloid-beta ($A\beta$) protein that are dominant neurotoxic species and complex fibrillary amyloid plaques (Yan *et al.*, 2015). The previous study reported $A\beta$ peptide comprising of 39 - 42 amino acids is the primary constituent of plaques are mostly found in cerebrospinal fluid (CSF) and brain of patients who suffered from AD (Hardy *et al.*, 1992). They can either associated to other events including inflammation and tau aggregation as neurofibrillary tangles (Hardy. *et al.*, 2010). Therefore, $A\beta$ peptides have been considered important biomarkers to monitor Alzheimer's diseases (AD) for diagnostic purposes (Andreasen *et al.*, 1999)

Recent year, there are many of detection method in $A\beta$ such as electrochemiluminescence immunoassay (Gravina *et al.*, 1995), capillary electrophoresis, immunoprecipitation-mass spectrometry (Picou *et al.*, 2010), flow cytometry-fluorescence resonance energy transfer assay (Wang *et al.*, 1996), surface plasma resonance-immunochip assay (Santos *et al.*, 2007), resonance light scattering assay (Wang *et al.*, 2011) and enzyme-linked immunosorbent assay (Wang *et al.*, 2012) which still have limitations due to need of sophisticated instruments, time consuming, need of skillful person for their applications (Gagni *et al.*, 2013). These complicated operations limited their applications to extend for rapid and routine analysis of $A\beta$ protein levels in the clinical samples such as blood of AD patients.

By developing effective technologies in health-related diagnostics for developing countries and coupling these technologies to existing communication infrastructures, healthcare in areas without access to trained medical personnel may be possible. Dot blot immunoassay is one technique of immunoassay that can also be used to analyze the presence or identify of soluble antigens as known as a dot blot immunoassay. Samples are spotted onto the nitrocellulose membrane and let the dots are dried. Membrane is blocked and incubated with antibody detection system in this technique. It can be divided into direct and indirect immunoassay (Kavruk *et al.*, 2013). Accordingly, there is simple, rapid, highly sensitive and non-invasive detection of $A\beta$ could be more interesting and high effectiveness of helping to the world.

In this study, gold nanoparticle- conjugated rabbit antibody $A\beta_{1-42}$ immunoassays for detection of $A\beta_{1-42}$ antigen have developed. The parameters including pH condition, antibody concentration, membrane substrate that influence dot-blot assay were investigated. In order to enhance the sensitivity of device, signal enhancement system by sandwich assay and silver enhancer was developed.

Objective of study

This study is to develop dot blot immunoassay with signal enhancement system for the rapid screening of $A\beta_{1-42}$ antigen. In order to hit the objective of this study, we are going to develop dot blot immunoassay method by using gold nanoparticles with silver enhancer to signal simplify. Then, developed assay will be applied to detect amyloid beta in real blood sample analysis.

Materials and Methods

Gold nanoparticle-based immunoassays was developed for the detection of A β ₁₋₄₂ antigen. The prerequisite materials for this method are AE99, Fusion 5, Hybond ECL nitrocellulose (Lot.9549062, GE Healthcare, UK), Buffer solution: 5% non-fat dry Milk in TBS-T (20 mM Tris-HCL, pH 7.5), 0.8% (W/V) NaCl (Lot.D00130978, CALBIOCHEM, Germany), 0.1% (V/V) Tween-20, Antibody A β (1-42) b1220015, Human Beta Amyloid 1-42 full length protein (ab82795). TMB as Substrate. Trisodium citrate, hydroquinone, silver nitrate (AgNO₃) were used as an enhancing agents.

Synthesis of Gold nano particles

100 μ l of an aqueous HAuCl₄ (5%) was added into a flask containing 80 ml deionized water, then the solution was brought to boil, with constant stirring. 3.5 ml of an aqueous sodium citrate (1%) solution was needed to add urgently. The solution was heated for another 20 min until a deep-red solution was occurred. That solution was centrifuged for 10 min at 3500 rpm and supernatant was collected (Turkevich *et al.*, 1951). The gold nanoparticles (AuNPs) were characterized by UV spetrometer (fig.1). The maximum wavelenght was 520 nm.

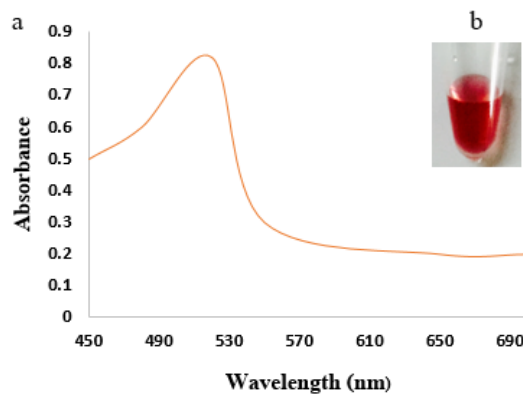


Figure 1. (a) a UV spectra of synthesised AuNPs (b) image of synthesized AuNPs solution

Optimization of pH in AuNPs solution

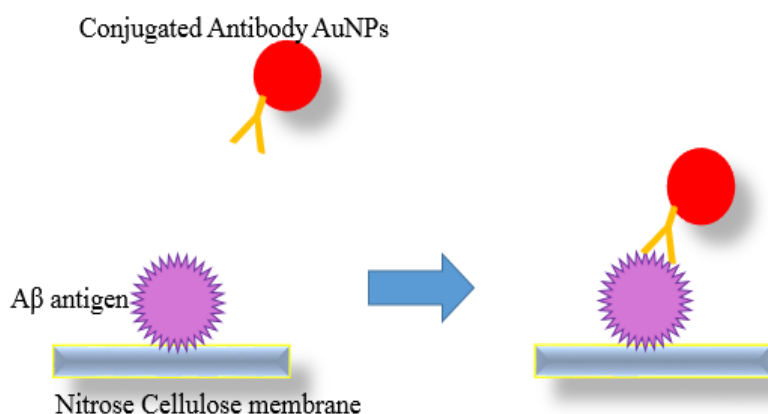
After determining the optimal concentration of binding A β oligomers antibody gold conjugated were prepared. An aliquot (50 μ l) of A β oligomers antibody prepared in PBS (0.1 M, pH 7.4) was added slowly to 2 ml colloidal gold solution pH 8 (adjusted by 0.5 M NaOH) followed by the addition of bovine serum albumin (BSA) (100 μ l, 10%) under gentle stirring after 45 min. The mixture was incubated for another 1 h at 4°C and then centrifuged (10 000 rpm for 15 min at 4°C) to remove supernatant unconjugated antibody. The pellet obtained was washed with PBS once again. The pellet was finally re-dispersed in 0.5 ml PBS (pH 7.4) containing 2% BSA and stored at 4°C.

Optimization of Ab for AuNPs-Ab conjugates

The optimal concentration of rabbit A β oligomer antibody for conjugation was determined by titrating aliquots of diluted antibody with colloidal AuNPs. Rabbit A β oligomer antibody was diluted to different concentration of ratio (1:5000 to 1:1) dil in PBS (0.1 M, pH 7.4). The pH of colloidal gold solution and the diluted rabbit A β oligomer antibody was adjusted to pH 8.0 with 0.1 N NaOH of variable concentrations. Added separately to 50 μ L of AuNPs in 5 μ L of antibody incubate 15 mins at RT then follow 5 μ L of 10% NaCl additional. After that these solution were measure by UV-vis spectra of absorbance of wavelength at 520 are recorded high significant level.

Dot blot immunoassay for amyloid beta detection

The Schematic diagram of direct dot blot immunoassay for amyloid beta detection was shown in Scheme 1.



Scheme 1. Schematic diagram of direct dot blot immunoassay for determination of A β ₁₋₄₂

In this dot blot assay, 1 μ L of amyloid beta antigen aliquots are spotted three times on dry Hybond ECL nitrocellulose and allowed to dry 10 mins in room temperature. The blot is blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T (20 mM Tris-HCL, pH7.5, and 0.8% NaCl (W/V), and 0.1% Tween-20 (V/V) for one hour at room temperature. After that spotted the conjugated antibody and blots incubated for 15 min at 4°C. Blots are washed three times in 10 mins with TBS-T solution. Finally, read the results by naked eyes.

Results

Effect of pH condition for antibody-conjugated gold nanoparticle

The pH of 2 ml colloidal gold aliquots was adjusted from pH 5 to 11 by 0.5 M NaOH. The effect of pH value in AuNPs is significantly color change from red to blue occurred immediately causing the aggregation of the nanoparticles in solution after adding 0.1 M NaCl. The results were measured by UV-vis spectra at wavelength at 520 nm (fig. 2). The optimal pH of AuNPs was found to be pH 8 which was given high absorbance .

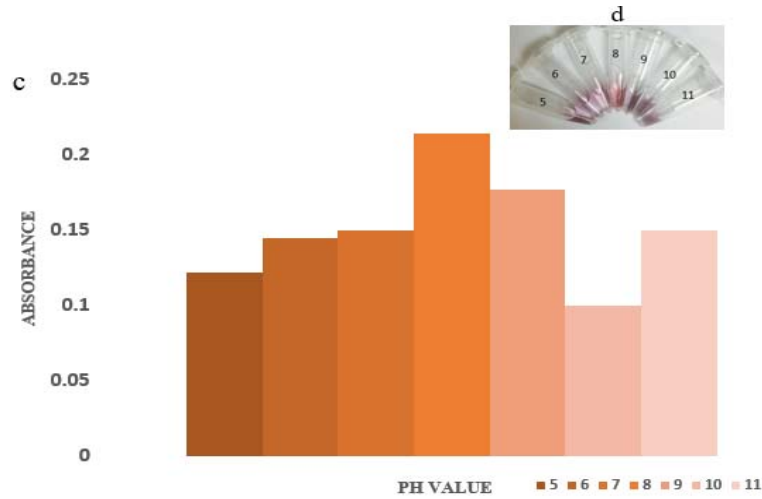


Figure 2. The optimal pH for binding antibody to AuNPs was determined between pH 5 and 11 (a). UV-vis spectra measured signal effect of AuNPs bond with antibody concentration 1:5000 dilution. (b) The color image of AuNPs solution in different pH.

Effect of Ab concentration on binding AuNPs

The concentration of A β antibody was optimized for preparation of AuNPs conjugated Antibody. 5 μ L of variable concentrations of antibody ratio from 1:5000 to 1:1 in 0.1 M PBS, was added separately to colloidal gold solution. The appeared different color absorbance shown in figure 3. The significant absorbance of ratio of antibody and AuNPs solution was 1:5 dilution. Therefore, the ratio of (1:5 dil) AuNPs and antibody combined was selected to use in further experiment.

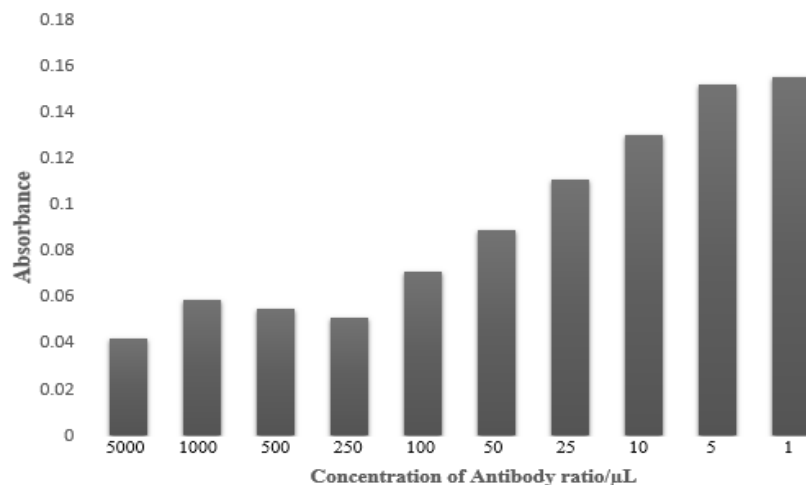


Figure 3. UV vis spectra of gold nanoparticle with various concentration (1:1 to 1:5000 (Ab: PBS buffer)) measure at wavelength 520 nm.

Effect of paper types

Next, the effect of membrane properties on dot blot assay were investigated including fusion 5, AE99 and Hybond ECL. It was indicated the properties of three different type of filter paper in table 1. The result show that color intensity of AuNPs are significantly different in three types of paper fig. 4.

Table 1 the properties of three different type of filter paper

Membranes	Pore Size	Thickness	Capillary Flow Rate	Properties
Whatman AE99	8.00 μm	1.5 mm	120 – 160 s/4cm	provides a good combination of sensitivity with fast wicking in a LFA, constructed of 100% nitrocellulose
Fusion 5	2.3 μm	370 μm	38 s/4cm	hydrophilic material, easy, fast, and efficient for traditional modular components from a lateral flow testing
Hybond ECL	0.45 μm	2.5 mm	No	provides excellent sensitivity, resolution, and low background in fluorescence blotting detection applications, High binding capacity

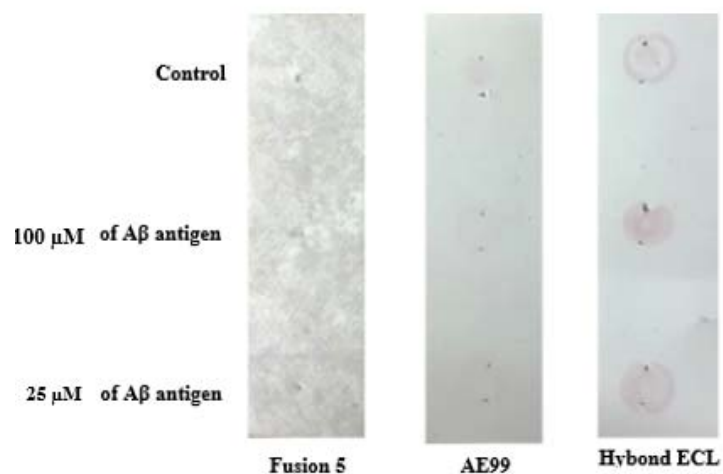


Figure 4. Effect of membrane materials on dot blot assay.

Effect of incubation time

There is the need of incubation time in antigen-antibody binding step to obtained high performance of colored signal in direct dot blot assay. It had left in three different incubation (10 min, 15 min, 30 min) times after combined with AuNPs conjugated antibody as shown in Fig. 5.

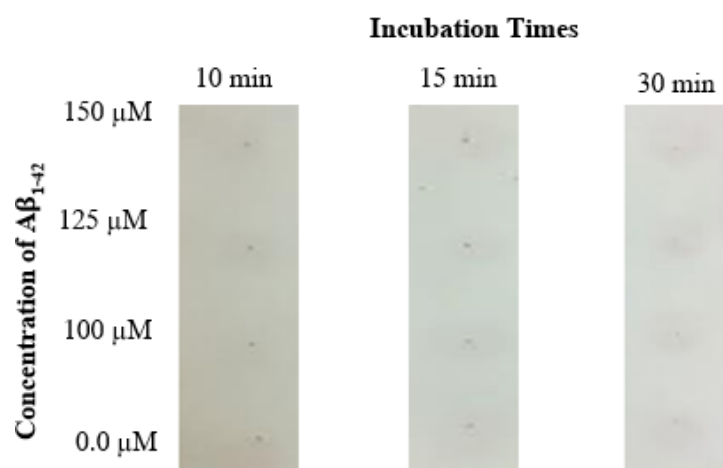


Figure 5. Effect of incubation time on dotblot assay

Under optimized conditions of the dotblot immunoassay was performed for Aβ₁₋₄₂ antigen detection. The results were shown in Fig. 6. The color intensity was increased with increasing of Ag concentration. The limit of detection was 1.0 μM can be seen by naked eye.

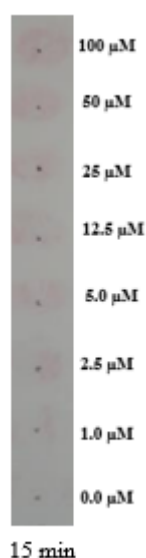


Figure 6. Optimized conditions of the dot-blot immunoassay was performed for Aβ₁₋₄₂ antigen detection

Signal enhancing system

In order to enhance signal binding antigen-antibody complex with AuNPs, It has been used silver-enhancer solution was composed of 1.0 g hydroquinone, 35 mg AgNO₃, 50 ml citrate buffer and 50 ml distilled water (Chu *et al.*, 2005): stock solution is kept from light.

Firstly, Spots 1.0 ul of primary antibody (goat anti A β oligomer) were immobilized in NC membrane in both controls and test strips and incubate at RT in 1 hr. Six micro wells were prepared different concentration of synthetic A β₁₋₄₂ antigen (100 μM, 50 μM, 25 μM, 5.0 μM, 1.0 μM, 0.0 μM) with distilled water. Next, add with AuNPs conjugated

antibody in each wells. After drying for 1 hr at RT, strips are dipped into the each wells including negative control as used D/W. Then wait until antigen attached with conjugated antibody flow to target primary antibody let them be antigen-antibody sandwich immunoassay reaction.

To get high sensitivity of the signal, 20 ul of silver enhancement solution were prepared in another six micro wells then strips are transferred into enhancing solutions.

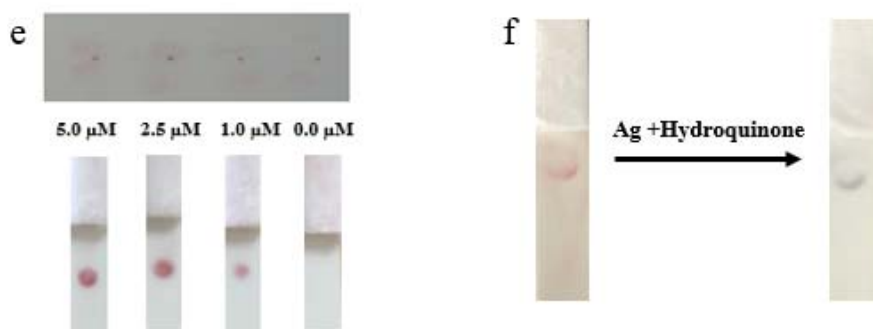


Figure 7. (a) Comparison of direct Dotblot immunoassay and sandwich immunoassay for determination of amyloid beta antigen, (b) Silver-enhanced nanoparticle-labelled sandwich immunoassays for detection of A β_{1-42} .

Discussion

Optimization of pH

The effect of pH value was tested by adding 0.1 M NaCl in AuNPs solution. The color solution is significantly change from red to blue occurred immediately causing the aggregation of the nanoparticles in solution at pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11. The colloidal AuNPs formed by citrate reduction were stable in a colloidal state and the presence of cations in salt solutions negated this charge repulsion and caused these particles to agglomerate and eventually precipitate (Yamamoto et al., 2004). The results were measured by UV-vis spectra (fig. 2). The maximum absorbance of AuNPs at wavelengths 520 nm was obtained at pH 8. This mean AuNPs was stabilized by Antibody absorbed on their surface.

Optimization of Ab concentration for AuNPs-Ab conjugate

The best results for an optimal conjugation between antibodies and AuNPs was observed at antibody concentration ratio (1:5). The UV-vis spectra of antibody-gold nanoparticles exhibited maximum absorbance at a wavelength of 520 nm as shown in figure 3. Demonstrate that antibody concentration ratio (1:5) enough to attach the surface of AuNPs.

Optimization of type of membranes

A β oligomer antibodies labelled AuNPs specifically interacted with A β surface antigen of to form a complex between conjugated antibody and antigen at the test zone. By the second state, the intensely red color which were produced by the accumulation of AuNPs in the dots are increasing of Ag concentration. As a result, demonstrates the evidence for specify detecting antigen. There are three different paper types including (whatman AE99, fusion 5, Hybond ECL) were investigated for providing high performance of dot-blot assay. The result in fig. 4 showed that the direct dot-blot assay cannot be performed on fusion 5 which is glass filter. While, Hybond ECL membrane which is standard NC membrane for dot-blot assay provide clearly results compared with AE 99. Therefore, Hybond ECL membrane was used in this experiment.

Effect of incubation time

The optimization of antigen-antibody binding step incubation was assumed that increase of incubation time, detection sensitivity increased significantly in fig. 5. As the incubation time reached 15 min after binding with conjugated antibody, a simply color appeared highly. Therefore, 15 min was chosen in the further experiment as in fig.6.

Signal enhancement system

Although the dot-blot immunoassay reached a sensitivity for amyloid beta antigen, a more sensitive to apply for detection of A β_{1-42} in real sample was needed. The comparison of results obtained by dot-blot assay and sandwich assay for beta amyloid detection were shown in fig. 7(a). Sandwich immunoassay is binding of antigen or antibody only occurs in the epitope of an antigen or antigen-binding site of an antibody. Since, there is a complementary relationship between epitope and antigen-binding site both in chemical structure and spatial configuration, therefore it provided reaction between antigen and antibody shows a strong specific higher sensitivity.

In order to enhance signal, the sandwich immunoassay with signal-amplifying system using silver enhancer was developed binding antigen-antibody complex with AuNPs. Silver enhancement method was applied on final step by adding the mixing of silver Nitrate and hydroquinone (v/v, 1:1) on test zone . The results were shown in fig. 7(b). The red color of AuNPs lables on test zone was change to blue color. This is due to the Ab-AuNPs conjugates reduce the silver ion to silver metal in the present of hydroquinone which absorbed at the surface of AuNPs. The results obtained can be easily distinguished by naked eye.

Conclusion

Dot blot immunoassay was successfully used for detection of A β ₁₋₄₂ antigen. In this technique, sample 1 μ L of three times are applied on the NC membrane followed by blocking, incubation and adding of antibody conjugated AuNPs. The color intensity of AuNPs was increased with increasing of Ag concentration. The limit of detection was 1.0 μ M. Additionally, the sandwich immunoassay with signal-amplifying system using silver enhancer has been developed. Silver nitrate used as an enhancing agent and hydroquinone to reduce formation of bulks in AuNPs attached sandwich immunocomplex and also gives high signal measured by naked eyes.

Acknowledgement

This research project is supported by the Health Systems Research Institute (HSRI 59-019).

References

- Andreassen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid (1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Archives of neurology*. 1999;56(6):673-80.
- Chu X, Fu X, Chen K, Shen G-L, Yu R-Q. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005;20(9):1805-12.
- Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L, Younkin LH, et al. Amyloid β Protein (A β) in Alzheimer's Disease Brain Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A β 40 or A β 42 (43). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(13):7013-6.
- Gagni P, Sola L, Cretich M, Chiari M. Development of a high-sensitivity immunoassay for amyloid-beta 1-42 using a silicon microarray platform. *Biosens Bioelectron*. 2013;47:490-5.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184.
- Kavruk M, Özalp VC, Öktem HA. Portable bioactive paper-based sensor for quantification of pesticides. *Journal of analytical methods in chemistry*. 2013;2013.
- Murphy MP, LeVine III H. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;19(1):311-23.
- Picou R, Moses JP, Wellman AD, Kheterpal I, Gilman SD. Analysis of monomeric A β (1-40) peptide by capillary electrophoresis. *Analyst*. 2010;135(7):1631-5.
- Santos AN, Torkler S, Nowak D, Schlittig C, Goerdes M, Lauber T, et al. Detection of amyloid- β oligomers in human cerebrospinal fluid by flow cytometry and fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2007;11(1):117-25.
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;11:55-75.

- Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS. The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media Detection and quantification of amyloid β protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(50):31894-902.
- Wang C, Liu D, Wang Z. Resonance light scattering as a powerful tool for sensitive detection of β -amyloid peptide by gold nanoparticle probes. *Chemical Communications*. 2011;47(33):9339-41.
- Wang C, Liu D, Wang Z. Gold nanoparticle based dot-blot immunoassay for sensitively detecting Alzheimer's disease related β -amyloid peptide. *Chemical Communications*. 2012;48(67):8392-4.
- Yamamoto S, Fujiwara K, Watarai H. Surface-enhanced Raman scattering from oleate-stabilized silver colloids at a liquid/liquid interface. *Analytical sciences*. 2004;20(9):1347-52.
- Yang T, T O'Malley T, Kanmert D, Jerecic J, Zieske LR, Zetterberg H, et al. A highly sensitive novel immunoassay specifically detects low levels of soluble A β oligomers in human cerebrospinal fluid. *Alzheimer's research & therapy*. 2015;7(1):1.