กุณฑลี ร่างน้อย : การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออะฟลาท็อกซินจากคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจ (SELECTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO AFLATOXIN FROM PHAGE DISPLAY ANTIBODY LIBRARY) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 83 หน้า.

อะฟลาท็อกซินเป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งพบปนเปื้อนในอาหารคนและสัตว์ รวมทั้งผลิตผลทางการเกษตรในหลายพื้นที่ วิธีการตรวจหาอะฟลาท็อกซินที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ วิธีโครมาโตรกราฟี แบบแผ่นบาง และแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง หรือวิธีทางอิมมูน ซึ่งเป็นวิธีการที่มีขั้นตอนที่สะดวก รวดเร็ว และมีความคุ้มทุนมากที่สุด โดยวิธีการนี้ต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะฟลาท็อกซินเป็นสารสำหรับตรวจสอบ เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ นับเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตแอนติบอดี งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกโมโนโคนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะฟลาท็อกซินบี 1 จากคลังเฟจซึ่งแสดงแอนติบอดีแบบเส้นเดี่ยว เอสซีเอฟวีบนผิวเฟจ โดยได้ทำการคัดเลือกจำนวน 3 รอบ แล้วนำเฟจจำนวน 96 โคลนที่คัดหามาได้ไปผลิตเป็นโมเลกุลแอนติบอดีเส้นเดี่ยวที่ไม่ติดอยู่บนผิวเฟจ จากแบคทีเรียสายพันธุ์ อีโคไล เอชบี 2151 จากนั้นนำแอนติบอดีเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการจับกับอะฟลาท็อกซิน โดยใช้วิธีการอีไลซ่าแบบแข่งขัน จากนั้นจึงได้นำโคลนที่แสดงความสามารถในการจับอะฟลาท็อกซินอย่างจำเพาะเจาะจงมาศึกษาลำดับเบสของดีเอนเอ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ และนำแอนติบอดีที่ได้นำมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ แล้วทำการศึกษาโครงสร้างโดยใช้วิธีเอสดีเอสเพจ และวิธีเวสเทิร์น บลอต รวมทั้งทำการวิเคราะห์คุณสมบัติในการจับจำเพาะต่ออะฟลาท็อกซินโดยใช้วิธีการอีไลซ่า แบบแข่งขัน นอกจากนั้นแล้ว ได้นำแอนติบอดีที่คัดเลือกแล้วนี้ไปสร้างให้เป็นโมเลกุล เอสซีเอฟวีที่เชื่อมต่อกับ เอนไซม์อาลคาไล ฟอสฟาเตส (scFv-AP) เพื่อให้สะดวกในการตรวจจับด้วยวิธี อีไลซ่า แอนติบอดีเชื่อมต่อที่ได้สร้างขึ้นนี้ มีความสามารถในการจับกับอะฟลาท็อกซินดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ โมเลกุลแอนติบอดีเส้นเดี่ยวประมาณ 3-4 เท่า โดยแอนติบอดีนี้สามารถใช้ในการตรวจจับอะฟลาท็อกซินบี 1 ได้ต่ำสุดประมาณ 0.006 ถึง 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (6-10 ส่วนในล้านส่วน) และพบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งการจับกึ่งหนึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 0.035-0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์อาลคาไล ฟอสฟาเตส นี้ไปทดสอบการจับกับอะฟลาท็อกซินชนิดอื่นๆ ได้แก่ อะฟลาท็อกซิน บี 2, จี 1, จี 2 และ เอ็ม1 พบว่าร้อยละความสามารถในจับกับจี 1 มีมากที่สุด ผลจากการศึกษานี้แสดงว่าสามารถใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจในการคัดเลือกแอนติบอดีชนิดเส้นเดี่ยวที่มีความจำเพาะต่ออะฟลาท็อกซินบี 1 ได้ และยังสามารถทำการตัดต่อยีนเพื่อสร้างเป็นแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์อาลคาไล ฟอสฟาเตส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นชุด

ตรวจสอบ สำหรับตรวจวิเคราะห์สารพิษอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรได้ต่อไป

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

KUNTALEE RANGNOI : SELECTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO AFLATOXIN FROM PHAGE DISPLAY ANTIBODY LIBRARY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 83 PP.

PHAGE DISPLAY/SCFV/ ANTIBODY/ NAÏVE /BIO-PANNING/MONOCLONAL /RECOMBINANT /AFLATOXIN/ALKALINE PHOSPHATASE FUSION

Aflatoxins are one of the major mycotoxins that contaminate several agricultural products and human food in many areas of the world. Several methods for aflatoxin determination have been developed, including thin-layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), and immunological method. Among these, the most cost-effective method is immunological analysis that uses monoclonal antibodies as detection reagents. Phage display technology is a powerful alternative method for the production of monoclonal antibody. A specific antibody to aflatoxin B_1 (AFB_1), the most toxic and prevalence isoform, could be isolated by bio-panning from Phage-displayed human single-chain-variable-fragment (scFv) antibody libraries. After three rounds of affinity selection, ninety-six positive clones were induced for the production of soluble scFv antibody fragments by using *Escherichia coli* non-suppressor strain (HB2151), and tested for their ability to bind soluble AFB_1 by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Amino acid sequence analysis of the selected clones was performed using information obtained from automated DNA sequencing. ScFv antibodies that could be inhibited by soluble AFB_1 were purified to analyze their structure by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis, and confirm their specific binding to AFB_1 by competitive ELISA. In addition, selected scFv clones were engineered to create scFv- alkaline phosphatase (scFv-AP) fusions and used as

reagents for one-step detection in ELISA format. The scFv-AP fusions showed 3-4 fold improved binding property when compared to soluble scFv form. The IC_{50} of scFv-AP by AFB_1 varied between 0.035-0.02 μg/ml and the limit of detection was approximately 0.006-0.03 μg/ml (6-30 ppb). The selected antibodies were specific to AFB_1 and could cross-react with AFG_1, but not to other aflatoxins, namely AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1. These results indicated that phage display technology could be used to obtain a specific antibody against aflatoxin, and that the scFv-AP fusion was an efficient detection reagent that could be further developed to generate a cost-effective diagnostic kit or biosensor for the detection of aflatoxin contamination in agricultural commodities and products in the future.