รหัสโครงการ SUT3-304-51-24-04

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจในการผลิตแอนติบอดีต่อสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตร

Application of Phage Display Technology for the Production of Antibodies against Agricultural Contaminant Haptens

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-51-24-04

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจในการผลิตแอนติบอดีต่อสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตร

Application of Phage Display Technology for the Production of Antibodies against Agricultural Contaminant Haptens

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๑
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม/๒๕๕๕

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๑- ๒๕๕๓ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาว กุลฑลี ร่างน้อย นักศึกษามหาบัณฑิต ที่เป็นกำลังสำคัญหลักในการทำวิจัยเรื่องนี้ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ดร. พจมาศ แพนศรีที่ได้ช่วยคัดหาแอนติบอดีจากคลังย่าโม ๑ และ Prof. Dr. Richard O' Kennedy ที่ได้รับเป็น host professor ให้กับกุลฑลี เพื่อไปทำการวิเคราะห์ความสามารถของ แอนติบอดีในการจับกับอะฟลาทอกซิน ที่ประเทศไอร์แลนด์ ภายใต้ทุน Duo-Thailand รวมทั้งขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน เป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจในการผลิตแอนติบอดีต่อสารอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารพิษปนเปื้อนโมเลกุลเล็กจากเชื้อรา ที่เป็นสารก่อมะเร็งร้ายแรง และเป็นปัญหาต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย และประเทศอื่นๆ ที่อยู่ในสภาวะร้อนชื้น ทั่วโลก โดยสามารถทำการคัดหาแอนติบอดี ส่วน scFv ที่ความสามารถสูงในการจับกับ อะฟลาทอกซิน จากคลังแอนติบอดี ของมนุษย์ ชื่อคลัง “ย่าโม ๑” ซึ่งเป็นคลังที่ได้สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย โดยแอนติบอดีที่คัดหามาได้นี้ มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อ ทั้งเพื่อการรักษา และการตรวจวิเคราะห์ โดยในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้แสดงถึงศักยภาพของการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อน ด้วยการนำแอนติบอดีที่คัดหามาได้ ไปพัฒนาให้มีคุณสมบัติเหมาะสมยิ่งขึ้น ด้วยกระบวนการวิศวกรรมแอนติบอดี โดยการนำยีนของแอนติบอดีส่วน scFv ที่ได้คัดหามาจากคลังย่าโม ๑ ไปเชื่อมต่อกับยีนของเอนไซม์ อัลคาไล ฟอสฟาเทส แล้วนำมาแสดงออกในระบบการผลิตโปรตีนของแบคทีเรีย อีโคไล เพื่อสร้างให้เป็นตัวตรวจสอบแบบสำเร็จในขั้นเดียว ที่สะดวกต่อการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยจากการวิเคราะห์คุณสมบัติ และประสิทธิภาพของ แอนติบอดี แบบ scFv-AP ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นพบว่า แอนติบอดีชนิด scFv-AP ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ มีความไวในการตรวจวัดสาร อะฟลาทอกซิน มากกว่าแบบ scFv เปล่าๆ ถึง ๗ เท่า นอกจากนั้นแล้ว ผลจากโครงการวิจัยนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่า คลังของแอนติบอดี ย่าโม ๑ ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมานั้น มีคุณสมบัติเด่นกว่าคลังทั่วไป เพราะสามารถใช้เป็นแหล่งในการคัดหาแอนติบอดีต่อสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตรที่มีคุณสมบัติดี ซึ่งอาจเป็นเพราะเป็นคลังที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างที่เป็นคนไทยในแถบจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีอัตราเสี่ยงต่อการบริโภคอาหารที่มี อะฟลาทอกซิน ปนเปื้อนสูง จึงอาจมีแอนติบอดีต่อสารนี้อยู่มาก กว่าคลังแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากประชากรในแถบอื่น หรือแบบกึ่งสังเคราะห์ ผลสำเร็จจากโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะเป็นนวตกรรม ต่างๆ ได้แก่ ยีน และ แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อ อะฟลาทอกซิน วิธีการในการคัดหาแอนติบอดีจากคลัง และรวมทั้งวิธีการทางวิศวกรรมแอนติบอดี เพื่อพัฒนาคุณสมบัติให้มีประสิทธิภาพดี ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนทางการเกษตร อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพสูง แล้ว ยังได้สร้างองค์ความรู้ใหม่ ซึ่งสามารถนำไป ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ที่ต้องผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิอีกด้วย ซึ่งผลสำเร็จที่ได้ทั้งหมดนี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอด ในการตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอื่นๆ ทั้งที่เป็นสารโมเลกุลเล็ก และโมเลกุลใหญ่ ที่มีความสำคัญต่อผลผลิตทางการเกษตร ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ABSTRACT

A unique human phage display library was used to successfully generate a scFv to the highly carcinogenic toxin aflatoxin B1. Such an antibody has major potential applications in therapy and diagnostics. To further exploit its analytical capacity, the scFv was genetically fused to alkaline phosphatase, thereby generating a novel and highly sensitive self-indicating reagent. The performance of this reagent was further characterized, demonstrating its efficacy. The sensitivity of scFv-AP fusion was three-fold better than that of the scFv form. The ability of this human library to generate antibodies to a small hapten was clearly demonstrated and this is linked to its intrinsic diversity, which exceeds many existing conventional human libraries. Our results indicate that demography may influence the diversity of the repertoire of the library in terms of its capacity to generate antibodies to specific targets. Equally, the approach demonstrated should also be applicable for other haptens and larger antigens. This research project generated not only innovations on the development of novel method to detect agricultural contaminants, but also a novel body of knowledge that could be published in a rigorous peer-review international journal. The outcome of this project could be future adapted for the research and development of diagnostic tools for various agricultural contaminants in the industrial level in the future.

สารบัญ

สารบัญภาพ **2**

บทนำ **2**

ความเป็นมา 2

วัตถุประสงค์ 3

ขอบเขตการวิจัย 4

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework) 4

วิธีการดำเนินการวิจัย 5

เนื้อเรื่อง **7**

การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 7

เอกสารอ้างอิง 11

วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการทดลอง 15

ข้อวิจารณ์ **26**

สรุป และข้อเสนอแนะ **27**

ภาคผนวก **28**

ก. การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการจากโครงการวิจัยนี้ 28

ก.๑ การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มี peer review (impact factor 3.471) *28*

ก.๒ การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ *28*

ประวัตินักวิจัย **29**

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 29

บทนำ

ความเป็นมา

สารพิษที่ปนเปื้อนมากับผลผลิตทางการเกษตรเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมการเกษตรของประเทศ และสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค จึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมโดยรวม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีที่จะตรวจสอบการปนเปื้อนเหล่านี้ เพื่อป้องกันไม่ให้มีผลผลิตที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และมีแต่เฉพาะผลผลิตที่มีคุณภาพมาตรฐาน เหมาะสมต่อการบริโภคทั้งในประเทศ และเพื่อการส่งออก

สารพิษที่ปนเปื้อนมากับผลผลิตทางการเกษตรนั้นส่วนใหญ่เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก ซึ่งได้แก่สารในกลุ่ม ยาฆ่าเชื้อราและแมลง (pesticides) สารป้องกันการเน่าบูด (food preservative) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ในทางภูมิคุ้มกันวิทยา อาจเรียกสารประกอบเหล่านี้ว่าเป็น haptens (Janeway et al., 2005) วิธีการหลักที่ใช้ในการตรวจสอบและวิเคราะห์สารปนเปื้อนเหล่านี้มี 2 วิธีคือ ทางกายภาพและเคมี และทางชีวภาพ (International, 2006) วิธีการทางกายภาพและเคมีนั้นสามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างแน่นอนและแม่นยำทั้งในทางปริมาณและคุณภาพ (qualitative and quantitative) และเป็นที่ยอมรับตามระเบียบมาตรฐานสากล โดยใช้หลักการวิเคราะห์ด้วยการคัดแยกผ่านตัวกลาง (chromatography) เช่น HPLC (High Performance Liquid Chromatography), GC (Gas Chromatography), และ TCL (Thin Layer chromatography) การตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลด้วยเครื่อง mass spectrometry หรือใช้หลักการทำปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะเจาะจง เช่น การทำปฏิกิริยากับ functional group ของ antibiotics, hormones, และสารพิษจากเชื้อราบางชนิด (Anderson, 1999; International, 2006; Oka et al., 1995) ข้อจำกัดของวิธีทางกายภาพเหล่านี้คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เพราะต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีความสลับซับซ้อน ราคาแพง รวมทั้งต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ และในหลายกรณีต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างสารเพื่อการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยมต่อการใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตามแหล่งประกอบการทางการเกษตรโดยทั่วไป วิธีการอีกวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนทางการเกษตรคือการใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) ซึ่งเป็นการใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจสอบ (Schneider et al., 2004; van Amerongen et al., 2005; Zheng et al., 2006) วิธีการนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถทำการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องการใช้เครื่องมือที่มีความยุ่งยาก และยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย เหมาะแก่การใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพผลผลิตจำนวนมากในแหล่งประกอบการต่างๆ หลักการสำคัญที่จะต้องใช้ในการตรวจสอบแบบ ELISA นี้คือ จะต้องมีสารแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงและสามารถจับได้ดีกับสารที่ต้องการตรวจสอบ ในปัจจุบันสามารถเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงเหล่านี้ได้จากการฉีดสารพิษโมเลกุลเล็กที่ถูกเชื่อมกับโปรตีนนำส่งเช่น BSA (bovine serum albumin) (BSA-conjugated haptens) เข้าไปในสัตว์เช่น แกะ, กระต่าย, หนู เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เหล่านี้ให้สร้าง antibody ต่อ hapten จากนั้นจึงทำการสกัดแยก polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ hapten นั้นๆ ออกมาจาก serum หรือนำมาเข้าสู่กระบวนการทางชีววิทยาเพื่อสร้างเป็น monoclonal antibody ต่อไป (Abbas et al., 2005; Janeway et al., 2005) ในกรณีของการผลิตเป็น polyclonal antibody นั้นมีข้อดีคือ มักจะได้ antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ haptens ได้อย่างดีและเฉพาะเจาะจง สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำสูง และใช้ได้ทั้งการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณและคุณภาพ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือวิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก และมีปริมาณจำกัด เมื่อใช้หมดแล้วจะต้องทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองใหม่ แต่เนื่องจากในการฉีดกระตุ้นสัตว์แต่ละครั้งนั้นจะผลิตได้เป็น polyclonal antibody ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในแต่ละครั้ง (lot) จึงทำให้ต้องเสียเวลาทำการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อในการใช้เป็นสารตรวจสอบใหม่ รวมทั้งอาจทำให้มาตรฐานของชุดตรวจสอบแต่ละ lot ไม่เท่ากัน นอกจากนั้นแล้วยังทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตชุดตรวจสอบต่อหน่วยสูงด้วย ส่วนวิธีการที่ใช้ monoclonal antibody เป็นตัวตรวจสอบนั้นมีข้อดีคือ monoclonal antibody ที่สร้างขึ้นมาได้นั้นสามารถนำมาผลิตได้โดยไม่จำกัด โดยไม่จำเป็นต้องทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองอีก แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ มักได้ antibody ที่ไม่มี

ความจำเพาะเจาะจงสูงและจับได้ดีเพียงพอ โดยเฉพาะในกรณีที่สารที่ต้องการตรวจสอบเป็น haptens คือ มีขนาดโมโลกุลเล็ก นอกจากนั้นแล้ววิธีการในการผลิตให้ได้เป็น monoclonal antibody นั้นยังมีความยุ่งยากมากและต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง เพราะต้องเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงหนูทดลอง และเซลล์ของสัตว์ในสภาวะปลอดเชื้อที่ต้องใช้สารเคมีและครุภัณฑ์ที่มีราคาแพง

วิธีการใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต antibody คือการใช้เทคโนโลยีฟาจ (phage display technology) (Smothers et al., 2002) เพราะสามารถใช้ในการสร้าง antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและจับได้ดีกับสารหลายประเภท ภายในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถผลิตได้ไม่จำกัดโดยวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการผลิต monoclonal antibody มาก เพราะใช้หลักการบ่มแบคทีเรียในถังหมักแล้วทำการสกัดให้บริสุทธิ์เหมือนการผลิต recombinant protein โดยทั่วไป ดังนั้นจึงมีการคาดการณ์ว่าในอนาคตเทคโนโลยีนี้จะเข้ามาทดแทนวิธีการผลิต antibody แบบดั้งเดิมทั้งสองแบบที่กล่าวมาข้างต้น (Hoogenboom et al., 1998; Laurino et al., 1999; McCafferty et al., 1990; Rapley, 1995) อย่างไรก็ตามถึงแม้ในระยะยาวจะสามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิต antibody ต่อสารปนเปื้อนทางการเกษตรชนิดต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัด แต่ในขั้นต้นนั้นจะต้องมีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการวิจัยที่มีประสิทธิภาพและมีความชำนาญในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ รวมทั้งจะต้องมีคลังของฟาจที่มีคุณภาพดี เพื่อใช้เป็นแหล่งในการคัดหา antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารพิษต่างๆได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการคัดหา antibody ต่อสารพิษจำพวก haptens ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (Persson et al., 2006) ซึ่งยากต่อการคัดหา antibody ที่มีความเจาะจงและมีความสามารถในการจับที่ดี อย่างไรก็ตามเมื่อสามารถพัฒนาคลังของฟาจและวิธีการคัดหาและตรวจสอบคุณลักษะของ antibody ที่มีประสิทธิภาพแล้ว ในระยะยาวจะสามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิต antibody ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาให้เป็นชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรที่มีความสำคัญที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป รวมทั้งยังอาจพัฒนาเป็น antibody เพื่อใช้ในการรักษาภาวะผิดปกติที่เกิดจากผลของสารพิษ (anti-dote, therapeutic antibody) (Humphreys and Glover, 2001) หรือพัฒนาเป็น biosensors ได้ด้วย (Krska et al., 2005)

วัตถุประสงค์

เพื่อประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการผลิตตัวตรวจสอบที่มีความไว และราคาถูก เพื่อใช้ในการตรวจสอบ อะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนทางการเกษตรที่เป็นสารโมเลกุลเล็ก (hapten) เพื่อเป็นแนวทางใหม่ในการพัฒนามาตราฐานสินค้าเกษตรให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเพื่อการส่งออก แบ่งเป็นหัวข้อย่อยได้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการคัดหา antibody ต่อ hapten (Aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ปนเปื้อนผลิตผลทางการเกษตร
2. เพื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ antibody ชนิด ScFv ที่มีความสามารถในการจับกับ hapten ได้อย่างเฉพาะเจาะจง
3. เพื่อผลิต antibody ต้นแบบที่สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษทางการเกษตรได้ต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้คือ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการคัดหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงและจับได้ดีกับสาร haptens โดยใช้สาร Aflatoxin ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) เป็นตัวแทนสารประเภท hapten เพราะเป็นสารซึ่งปนเปื้อนมากในธัญพืชที่เป็นอาหารของทั้งคนและสัตว์ เพื่อเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้กับสารอื่นๆต่อไป โดยในการคัดหา (select) antibody นั้นจะใช้คลังของฟาจที่ได้สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยหลัก และจากต่างประเทศ (Cambridge Antibody Technology, CAT) เป็นแหล่งในการคัดหา ซึ่ง antibody จากคลังที่จะใช้นี้มีโครงสร้างเป็น ScFv โดยในโครงการวิจัยนี้จะได้ทำการพัฒนาวิธีการในการคัดหาฟาจที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูงที่สุด จากนั้นจะได้ทำการผลิตให้เป็นโมเลกุล ScFv ที่มีความเหมาะสม เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาเป็นสารตรวจสอบ หรือสารที่ใช้ในการรักษาต่อไป โดยหลังจากที่สามารถคัดหาฟาจที่แสดง ScFv ที่มีความจำเพาะเจาะจงแล้ว จะได้ทำการผลิตให้ได้เป็นเฉพาะส่วน ScFv antibody โดยการนำไปสร้างจากแบคทีเรีย *E. coli* ที่เหมาะสม รวมทั้งจะได้สร้างเป็นโมเลกุลของ ScFv antibody ที่เชื่อมอยู่กับ enzyme Alkaline phosphatase (AP) และ 6xHistidine หรือ ScFv-AP-6xHis conjugate ด้วย โดยจะได้ทำการตรวจสอบความสามารถของ antibody ในการจับกับสารพิษด้วยเทคนิค ELISA ทั้งความไวในการจับ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (cross-reactivity) นอกจากนั้นแล้วยังจะได้ทำการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล ScFv ที่ผลิตขึ้นมาได้ โดยเฉพาะในส่วน hyper-variable regions หรือ complementarity-determining regions (CDRs) ที่มีหน้าที่ในการจับกับ antigen เพื่อความเข้าใจในหลักการมีอันตรกริยา (interaction) ระหว่าง antigen-antibody โดยจะทำการศึกษาจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ที่ควบคุมการสร้างชิ้น ScFv ด้วยวิธีการทาง bioinformatics

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

Antibody คือ สารที่ผลิตโดยระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการจับกับ antigen หลากหลายชนิดได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับ (antigen binding site) นี้อยู่ตรงส่วนปลายของโมเลกุล ที่ประกอบด้วยส่วน heavy และ light chain ประกอบด้วย 6 hypervariable loops เชื่อมต่อกันด้วย beta-sheet ให้เกิดเป็นพื้นผิวที่มีความเหมาะสมในการจับกับ antigen ต่างๆได้อย่างเหมาะสม โดยทั้งรูปร่าง และ functional group ของ amino acids ที่ประกอบกันเป็นพื้นผิว antigen binding site นี้ จะเป็นตัวกำหนดความจำเพาะเจาะจงในการจับกับ antigen ชนิดต่างๆ (Janeway et al., 2005) โดยสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้คือ เราสามารถแบ่งประเภทของพื้นผิวของ antigen binding site ได้ออกเป็น 3 ประเภท ตามขนาดของ antigen ได้แก่ 1) พื้นผิวแบบ planar สำหรับ antigen ขนาดใหญ่ เช่น protein 2) พื้นผิวแบบ groove สำหรับ antigen ขนาดกลาง เช่น peptide หรือ carbohydrate และ 3) พื้นผิวแบบ cavity สำหรับ antigen ขนาดเล็ก เช่น hapten ดังนั้นโครงสร้างของ antibody ที่สามารถจับกับ hapten อย่างเฉพาะเจาะจงนั้นน่าจะมีพื้นผิวที่เป็น cavity จากสมมติฐานนี้จึงอาจอธิบายได้ว่าในทำไมบางครั้งจึงมีปัญหาในการผลิตให้ได้เป็น antibody ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงในการใช้เป็นสารตรวจสอบการปนเปื้อนของสารประเภท haptens ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะในการเตรียม antibody โดยการฉีด hapten เพื่อไปกระตุ้นสาร antibody ในสัตว์ทดลองนั้น ต้องทำการเชื่อม hapten กับโปรตีนนำส่ง (carrier) ก่อน เรียกว่า conjugated antibody ดังนั้น antibody ที่สัตว์สร้างขึ้นจึงมักจะจับกับ ทั้ง ส่วน hapten และส่วนของ carrier ซึ่งมีขนาดกว้าง และเข้ากันได้ดีกับพื้นผิวแบบ planar หรือ groove เมื่อนำ antibody เหล่านี้มาใช้ตรวจวัด haptens ที่เป็นโมเลกุลอิสระที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตผลทางการเกษตรจริง จึงเกิดปัญหาคือไม่สามารถจับได้ดีพอ เพราะสาร hapten โมเลกุลอิสระมีขนาดเล็กกว่ามาก (Persson et al., 2006; Yau et al., 2003) ซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ได้โดยใช้เทคโนโลยีฟาจ เพราะใช้หลักการในการคัดหา antibody ที่แตกต่างออกไปคือใช้การคัดหาความสามารถในการมีอันตรกริยา (affinity selection) ในหลอดทดลองโดยไม่ต้องพึ่งระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น DNA shuffling (Crameri et al., 1996) ในการพัฒนาคุณสมบัติให้เหมาะสมขึ้นได้อีกด้วย

ความหลากหลาย (diversity) ของโมเลกุล antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ antigen ได้อย่างมากมายนั้นเกิดขึ้นในธรรมชาติจากการจัดเรียงและเชื่อมต่อของส่วนของยีนที่มีหน้าที่สร้างโมเลกุล antibody (immunoglobulin genes) อย่างสลับซับซ้อนในเม็ดเลือดขาว ซึ่งได้แก่ ความหลากหลาย (combinatorial diversity) จากการเชื่อมต่อ (rearrangement) ของยีนส่วน V (D) J ของทั้ง heavy และ light chains ความหลากหลายตรงรอยต่อ (junctional diversity) และการกลายพันธุ์ในส่วนของ V gene (somatic mutations) ในระหว่างการพัฒนาของ B cell (B cell maturation) ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วจะสามารถมีความหลากหลายได้ถึง 10^9-10^{10} (Abbas et al., 2005) จากความรู้เกี่ยวกับกลไกการสร้างโมเลกุล antibody ที่มีความหลายในธรรมชาตินี้เองจึงทำให้เราสามารถสร้างคลังของ antibody ที่มีความหลากหลายสูงได้ โดยการสกัดเอา mRNA จากเม็ดเลือดขาวที่เป็น mature lymphocyte และมียีนที่ควบคุมการสร้าง antibody ที่มีคุณสมบัติต่างๆกันมาแสดงบนโปรตีนบนผิวฟาจ จากนั้นจึงทำการคัดหาฟาจที่แสดง antibody ที่สามารถจับกับ antigen ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยใช้วิธีการคัดหาความสามารถในการจับกันระหว่าง antigen และ antibody (affinity selection) ในห้องทดลอง ซึ่งคลังของฟาจที่จะนำมาใช้จะมี antibody ที่มีพื้นผิวคลอบคลุมทั้ง 3 แบบ

จากทฤษฎี และสมมุติฐานดังกล่าวข้างต้น จึงมีความน่าจะเป็นไปได้สูงว่าจะสามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิต antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อสารปนเปื้อนทางการเกษตร ซึ่งจะสามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นชุดตรวจสอบทางการเกษตรได้ต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการที่จะใช้ในการคัดหาแอนติบอดีนั้น จะใช้วิธีการคัดเลือกจากความสามารถในการมีอันตรกริยา (affinity selection) ของฟาจ โดยวิธีการ bio-panning มาตรฐานที่ใช้ในเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจทั่วไป (Kay et al., 1996; O'Brien and Aitken, 2002) โดยจะทำการทดลองคัดเลือกทั้งบนจาน ELISA และ immuno-tube ที่อุณหภูมิ 4°C, 30°C, และ 37°C โดยจะทำการคัดเลือกประมาณ 1-3 รอบ เพื่อให้ได้แอนติบอดีจากฟาจประมาณ 10-40 ชนิด โดยจะใช้ conjugated haptens ที่สามารถซื้อได้ จากบริษัท เช่น Sigma ส่วนการ elute นอกจากจะทำการ elute โดยวิธีการมาตรฐานแล้ว ยังจะทำการ elute โดยใช้ free haptens ด้วย เพราะมีรายงานว่าการ elute ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ antibody ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกว่าในการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ (Moghaddam et al., 2001) โดยจะใช้วิธีการ ELISA เป็นวิธีการในการตรวจสอบคุณสมบัติการมีอันตรกริยา (affinity และ specificity) โดยจะทดสอบความสามารถในการจับของ antibody ใน 3 รูปแบบ คือ 1) antibody ที่อยู่บนผิวฟาจ 2) ชิ้น free ScFv ซึ่งสามารถผลิตได้โดยการนำฟาจไป infect *E.coli* strain HB2151 (Kay et al., 1996; O'Brien and Aitken, 2002) และ 3) ScFv ที่เชื่อมอยู่กับ Alkaline phosphatase และ 6xHistidine (ScFv-AP6xHis) เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นตัวตรวจที่สะดวก (Yamabhai and Kay, 1997) และง่ายต่อการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยวิธีการ affinity chromatography (QIAexpress™, Qiagen, Germany)

การตรวจสอบโดยวิธีการ ELISA เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของ antibody ที่ได้พัฒนาขึ้นว่ามีความเหมาะสมในการที่จะพัฒนาต่อยอดไปเพื่อผลิตชุดตรวจสอบหรือไม่นั้น จะทำการตรวจสอบทั้ง ก) ความจำเพาะเจาะจง (cross reactivity) และ ข) ความไวในการจับ (sensitivity) โดยวิธี Direct Competitive ELISA, Indirect Competitive ELISA, หรือ Sandwich ELISA แล้วแต่ความเหมาะสม (Gee et al., 1996) โดยจะทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเหล่านี้กับ polyclonal และ monoclonal antibody ที่เตรียมได้จากวิธีมาตรฐานดั้งเดิมด้วย (conventional method)

นอกจากกิจกรรมดังกล่าวข้างต้น โครงการวิจัยนี้จะได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ (structure-function relationship) ของ Antibody ที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจที่คัดหามาได้ด้วย โดยวิธีการศึกษานั้นจะทำได้โดย

การหาลำดับเบสของ DNA ที่ทำหน้าที่สร้างชิ้น ScFv โดยจะทำการสกัด DNA แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นจะได้นำข้อมูลนี้มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ antibody ต่อไป โดยใช้ software ทาง bioinformatics ทั่วไปที่หาได้จากฐานข้อมูลทาง internet เช่น NCBI, EXPASY รวมทั้งโดย software สำหรับการศึกษาโครงสร้างของ antibody โดยเฉพาะคือ program WAM (Whitelegg and Rees, 2000)

สถานที่ที่จะใช้ในการดำเนินการวิจัยคือห้องปฏิบัติการที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เนื้อเรื่อง

การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การผลิต antibody ด้วยเทคโนโลยีฟาจ

เทคโนโลยีฟาจเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจ และได้รับการพัฒนาเป็นอย่างยิ่งในช่วงเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมานี้ ทั้งนี้เป็นเพราะเทคโนโลยีนี้มีข้อเด่นที่สำคัญคือสามารถคัดเลือกได้ทั้งยีน และโปรตีนจากยีนนั้น ที่มีความสามารถในการมีอันตรกริยา (interaction) ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการคัดเลือกความสามารถในการจับกับสารเป้าหมาย (target) ที่สะดวกและรวดเร็ว ภายในห้องทดลอง (*in vitro*) (Smith, 1985) โปรตีนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเปปไทด์ (peptide) เส้นสั้นๆ หรือโปรตีนขนาดต่างๆกันตั้งแต่ความยาว 10-500 กรดอะมิโน รวมทั้งแอนติบอดีประเภทต่างๆ (Kay et al., 1996) ดังนั้นจึงพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการศึกษาการมีอันตรกริยาระหว่างโปรตีนหลายประเภท เช่น การจับกันของเปปไทด์กับโปรตีนโดเมนชนิดต่างๆ หรือการใช้เป็นแหล่งคลังของ cDNA เพื่อใช้ในการคัดหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา (Rodi et al., 2002) คลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์เส้นสั้นๆยังถูกใช้เป็นแหล่งในการหาตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ เปปไทด์เส้นสั้นๆที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนายา (drug lead) ต่อไปได้ (Kay and Hamilton, 2001; Kay et al., 2001)

การให้ความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีฟาจมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี 2533 (McCafferty et al., 1990) โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของแอนติบอดีจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนแล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของแอนติบอดีที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab (Chang et al., 1991; Garrard et al., 1991; Hoogenboom et al., 1991) หรือสร้างเป็นแอนติบอดีเส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ (scFv) (McCafferty et al., 1990) แอนติบอดีเหล่านี้จะถูกแสดงออกบนโปรตีนที่ปกคลุมบนผิวฟาจได้หลายรูปแบบ เช่นโปรตีนปกคลุมชนิดรอง (pIII) หรือชนิดหลัก (pVIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลายชนิด (Burton et al., 1991; Cai and Garen, 1995; Clackson et al., 1991; Graus et al., 1997; Persson et al., 1991) แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีฟาจมาใช้ในการคัดเลือก และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

การพัฒนาก้าวสำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง ทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เริ่มต้นในเวลา 2 ปีต่อมา เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างคลังของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ na¨ve library) (Marks et al., 1991) คลังชนิดนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้กว้างขวางกว่าคลังที่สร้างจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนหลายเท่า เพราะสามารถใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนเกือบทุกชนิดที่ต้องการ เนื่องจากคลังของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนี้เป็นตัวแทนความเป็นไปได้ทั้งหมดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกมาได้นั้นมีคุณภาพดีคือมีความสามารถในการจับ (affinity, ในช่วง 1-200 nM) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูงเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก hybridoma (Winter et al., 1994)

ถึงแม้ว่าการสร้างคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนนี้จะสามารถใช้สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้หลากหลาย และได้รับความสนใจเป็นอันมาก (Dall'Acqua and Carter, 1998; Hoogenboom et al., 1998) แต่ก็มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ คลังของแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีจริงนั้นจะต้องเป็นคลังที่มีขนาด

ใหญ่มาก คือประกอบไปด้วยแอนติบอดีประมาณ 10^{9-11} ชนิดอยู่ด้วยกัน (Griffiths et al., 1994; Vaughan et al., 1996) ชนิดในที่นี้หมายถึงลักษณะของส่วนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน (binding site) ที่แตกต่างกัน คลังที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น ความแตกต่างในชนิดของโปรตีนปกคลุมผิวที่ใช้แสดงแอนติบอดี (pIII หรือ pVIII) แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง โครงสร้างของแอนติบอดีที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phagemid) พันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียที่ใช้ในการเลี้ยงฟาจ หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวฟาจ ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหนนั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญประสบการณ์ และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนั้นแล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้นดีเอ็นเอสังเคราะห์อีกด้วย (synthetic oligonucleotide) (Barbas et al., 1992; Hoogenboom et al., 1991) คลังชนิดนี้จะมีประโยชน์สูงในงานวิจัยที่ใช้หุ่นยนต์ทำงาน เช่น ในการวิจัยที่เกี่ยวกับ proteomics (Lueking et al., 1999).

เทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมในการสร้างแอนติบอดีให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) คือการนำแอนติบอดีที่คัดได้จากคลังมาพัฒนาให้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีขึ้น (maturation) โดยใช้หลักการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) (Hoogenboom, 1997) ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การทำให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างสุ่มด้วยเทคนิคทาง PCR ที่มีความแม่นยำต่ำ (error prone PCR) หรือการใช้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (DNA shuffling) (Crameri et al., 1996) การปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้างแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับสูงมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ตัวอย่างเช่น พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดีชนิดหนึ่งได้ถึง 10 เท่า ทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับสูงถึง 10^{11} M^{-1} ซึ่งสูงกว่าค่าที่จะได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยวิธีการเดิม (คือ 10^{10} M^{-1}) (Schier et al., 1996; Yang et al., 1995) นอกจากการปรับปรุงคุณภาพในการจับแล้ว ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการปรับปรุงคุณสมบัติอื่นๆตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น ความสามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่น การกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) (Mani et al., 1998; Poul et al., 2000) หรือการใช้เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้ง (agonist หรือ antagonist) โปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ (Xie et al., 1997) นอกจากนั้นแล้วยังใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีที่ทนต่อสภาวะบางอย่าง เช่น สภาวะกรด ด่าง หรือทนต่อเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) (Yang et al., 1995) หรือที่สภาวะ reducing (Proba et al., 1998) รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) (Clark, 2000; Gavilondo and Larrick, 2000; Merluzzi et al., 2000) หรือติดฉลาก (tag) (Carter and Merchant, 1997; Hughes-Jones et al., 1994; Huston and George, 2001; Wu and Yazaki, 2000; Zamora et al., 1994) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ชัดเจนว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีประโยชน์มาก ดังจะได้สรุปไว้เป็นข้อๆดังนี้

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีฟาจ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่า และข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง
2. สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับแอนติเจนที่เป็นพิษต่อสัตว์ แอนติเจนที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นแอนติเจนก็ได้ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้กับแอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen)
3. สามารถใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจำนวนมาก ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน
4. สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody)

5. สามารถปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามต้องการ เช่น มีความสามารถในการจับ หรือความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะต่างๆ
6. สามารถนำไปผลิตเป็นจำนวนมากได้ง่าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไป เพื่อใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

การตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรโดยวิธีการ ELISA

สารพิษที่ปนเปื้อนมากับผลผลิตทางการเกษตรนั้นส่วนใหญ่เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก ซึ่งได้แก่สารในกลุ่ม ยาฆ่าเชื้อราและแมลง (pesticides) สารป้องกันการเน่าบูด (food preservative) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ในทางภูมิคุ้มกันวิทยา อาจเรียกสารประกอบเหล่านี้ว่าเป็น haptens (Janeway et al., 2005) วิธีการหลักที่ใช้ในการตรวจสอบและวิเคราะห์สารปนเปื้อนเหล่านี้มี 2 วิธีคือ ทางกายภาพและเคมี และทางชีวภาพ (International, 2006) วิธีการทางกายภาพและเคมีนั้นสามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างแน่นอนและแม่นยำทั้งในทางปริมาณและคุณภาพ (qualitative and quantitative) และเป็นที่ยอมรับตามระเบียบมาตรฐานสากล โดยใช้หลักการวิเคราะห์ด้วยการคัดแยกผ่านตัวกลาง (chromatography) เช่น HPLC (High Performance Liquid Chromatography), GC (Gas Chromatography), และ TCL (Thin Layer chromatography) การตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลด้วยเครื่อง mass spectrometry หรือใช้หลักการทำปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะเจาะจง เช่น การทำปฏิกิริยากับ functional group ของ antibiotics, hormones, และสารพิษจากเชื้อราบางชนิด (Anderson, 1999; International, 2006; Oka et al., 1995) ข้อจำกัดของวิธีทางกายภาพเหล่านี้คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เพราะต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีความสลับซับซ้อน ราคาแพง รวมทั้งต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ และในหลายกรณีต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างสารเพื่อการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยมต่อการใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตามแหล่งประกอบการทางการเกษตรโดยทั่วไป วิธีการอีกวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนทางการเกษตรคือการใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) ซึ่งเป็นการใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจสอบ (Schneider et al., 2004; van Amerongen et al., 2005; Zheng et al., 2006) วิธีการนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถทำการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องการใช้เครื่องมือที่มีความยุ่งยาก และยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย เหมาะแก่การใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพผลผลิตจำนวนมากในแหล่งประกอบการต่างๆ หลักการสำคัญที่จะต้องใช้ในการตรวจสอบแบบ ELISA นี้คือ จะต้องมีสารแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงและสามารถจับได้ดีกับสารที่ต้องการตรวจสอบ ในปัจจุบันสามารถเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงเหล่านี้ได้จากการฉีดสารพิษโมเลกุลเล็กที่ถูกเชื่อมกับโปรตีนนำส่งเช่น BSA (bovine serum albumin) (BSA-conjugated haptens) เข้าไปในสัตว์เช่น แกะ, กระต่าย, หนู เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เหล่านี้ให้สร้าง antibody ต่อ hapten จากนั้นจึงทำการสกัดแยก polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ hapten นั้นๆ ออกมาจาก serum หรือนำมาเข้าสู่กระบวนการทางชีววิทยาเพื่อสร้างเป็น monoclonal antibody ต่อไป (Abbas et al., 2005; Janeway et al., 2005) ในกรณีของการผลิตเป็น polyclonal antibody นั้นมีข้อดีคือ มักจะได้ antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ haptens ได้อย่างดีและเฉพาะเจาะจง สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำสูง และใช้ได้ทั้งการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณและคุณภาพ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ วิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก และมีปริมาณจำกัด เมื่อใช้หมดแล้วจะต้องทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองใหม่ แต่เนื่องจากในการฉีดกระตุ้นสัตว์แต่ละครั้งนั้นจะผลิตได้เป็น polyclonal antibody ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในแต่ละครั้ง (lot) จึงทำให้ต้องเสียเวลาทำการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อในการใช้เป็นสารตรวจสอบใหม่ รวมทั้งอาจทำให้มาตรฐานของชุดตรวจสอบแต่ละ lot ไม่เท่ากัน นอกจากนั้นแล้วยังทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตชุดตรวจสอบต่อหน่วยสูงด้วย ส่วนวิธีการที่ใช้ monoclonal antibody เป็นตัวตรวจสอบนั้นมีข้อดีคือ monoclonal antibody ที่สร้างขึ้นมาได้นั้นสามารถนำมาผลิตได้โดยไม่จำกัด โดยไม่จำเป็นต้องทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองอีก แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือมักได้ antibody ที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและจับได้ดีเพียงพอ โดยเฉพาะในกรณีที่สารที่ต้องการตรวจสอบเป็น haptens คือมีขนาดโมโลกุลเล็ก (Yau et al., 2003) นอกจากนั้นแล้ววิธีการในการผลิตให้ได้เป็น monoclonal antibody นั้นยังมีความยุ่งยากมากและต้องใช้ค่า

ใช้จ่ายสูง เพราะต้องเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงหนูทดลอง และเซลล์ของสัตว์ในสภาวะปลอดเชื้อที่ต้องใช้สารเคมีและครุภัณฑ์ที่มีราคาแพง

ส่วนวิธีการตรวจสอบทางชีวภาพ อย่างอื่นเช่นการทดสอบความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิต หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นไม่เป็นที่นิยมเพราะมีความจำเพาะเจาะจงต่ำ ใช้เวลานานในการวิเคราะห์และไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

ในปัจจุบัน มีบริษัทที่ผลิตชุดตรวจการปนเปื้อนของสารพิษ haptens ทางการเกษตรในต่างประเทศอยู่มากพอสมควร ส่วนใหญ่เป็นบริษัทใน ยุโรป และ สหรัฐอเมริกา นอกจากนั้นแล้วยังมีองค์กรอิสระ ชื่อ AOAC (THE ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES) International [www.aoac.org] ซึ่งมีฐานข้อมูลขนาดใหญ่ที่รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการวิเคราะห์สารปนเปื้อนต่างๆ เป็นจำนวนมาก ชุดตรวจสอบเหล่านี้ใช้ polyclonal หรือ monoclonal antibody เป็นสารตรวจสอบ ในปัจจุบันยังไม่มีชุดตรวจสอบใดที่ใช้ recombinant antibody จาก phage display technology วางขายในท้องตลาด ซึ่งชุดตรวจสอบที่บริษัทต่างๆทำออกขายนั้น มีราคาสูงเกินกว่าที่เกษตรกรไทยจะซื้อมาใช้ได้ นอกจากนั้นแล้วชุดตรวจสอบเหล่านี้ยังเน้นการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารที่เป็นปัญหาในกลุ่มประเทศทางยุโรป และ สหรัฐอเมริกา จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในภาคอุตสาหกรรมเกษตรในประเทศไทย หรือแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะสร้าง antibody ที่มีความจำเพาะต่อสารพิษทางการเกษตรที่เป็นปัญหาของประเทศ ด้วยเทคโนโลยีใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง และประหยัดกว่าเพื่อจะใช้เป็นต้นแบบเป็นในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมทางเกษตรของประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (2005). Cell and Molecular Immunology, 4 edn).

Anderson, K. (1999). Analytical Techniques for Inorganic Contaminants, AOAC International).

Barbas, C. F., 3rd, Bain, J. D., Hoekstra, D. M., and Lerner, R. A. (1992). Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 4457-4461.

Burton, D. R., Barbas, C. F., 3rd, Persson, M. A., Koenig, S., Chanock, R. M., and Lerner, R. A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 10134-10137.

Cai, X., and Garen, A. (1995). Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 6537-6541.

Carter, P., and Merchant, A. M. (1997). Engineering antibodies for imaging and therapy. Curr Opin Biotechnol *8*, 449-454.

Chang, C. N., Landolfi, N. F., and Queen, C. (1991). Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. J Immunol *147*, 3610-3614.

Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. Nature *352*, 624-628.

Clark, M. (2000). Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? Immunol Today *21*, 397-402.

Crameri, A., Cwirla, S., and Stemmer, W. P. (1996). Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. Nat Med *2*, 100-102.

Dall'Acqua, W., and Carter, P. (1998). Antibody engineering. Curr Opin Struct Biol *8*, 443-450.

Garrard, L. J., Yang, M., O'Connell, M. P., Kelley, R. F., and Henner, D. J. (1991). Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. Biotechnology (N Y) *9*, 1373-1377.

Gavilondo, J. V., and Larrick, J. W. (2000). Antibody engineering at the millennium. Biotechniques *29*, 128-132, 134-126, 138 passim.

Gee, S. J., Emon, J. M. V., and Hammock, B. D. (1996). Environmental Immunochemical Analysis for Detection of Pesticides and Other Chemicals: A User's Guide (Westwood, New Jersey, Noyes Publications).

Graus, Y. F., de Baets, M. H., Parren, P. W., Berrih-Aknin, S., Wokke, J., van Breda Vriesman, P. J., and Burton, D. R. (1997). Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies. J Immunol *158*, 1919-1929.

Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., and et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. Embo J *13*, 3245-3260.

Hoogenboom, H. R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. Trends Biotechnol *15*, 62-70.

Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., and Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. Immunotechnology *4*, 1-20.

Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res *19*, 4133-4137.

Hughes-Jones, N. C., Gorick, B. D., Bye, J. M., Finnern, R., Scott, M. L., Voak, D., Marks, J. D., and Ouwehand, W. H. (1994). Characterization of human blood group scFv antibodies derived from a V gene phage-display library. Br J Haematol *88*, 180-186.

Humphreys, D. P., and Glover, D. J. (2001). Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification. Curr Opin Drug Discov Devel *4*, 172-185.

Huston, J. S., and George, A. J. (2001). Engineered antibodies take center stage. Hum Antibodies *10*, 127-142.

International, A. (2006). Official Methods Of Analysis Of AOAC International, 18 edn, AOAC International).

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2005). Immunobiology.

Kay, B. K., and Hamilton, P. T. (2001). Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries. Comb Chem High Throughput Screen *4*, 535-543.

Kay, B. K., Kasanov, J., and Yamabhai, M. (2001). Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. Methods (Duluth) *24*, 240-246.

Kay, B. K., Winter, G., and McCarthy, B. J., eds. (1996). Phage Display of Peptides and Proteins, 1 edn (San Diego, Academic Press).

Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., and Mizaikoff, B. (2005). Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. Food Addit Contam *22*, 345-353.

Laurino, J. P., Shi, Q., and Ge, J. (1999). Monoclonal antibodies, antigens and molecular diagnostics: a practical overview. Ann Clin Lab Sci *29*, 158-166.

Lueking, A., Horn, M., Eickhoff, H., Bussow, K., Lehrach, H., and Walter, G. (1999). Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Anal Biochem *270*, 103-111.

Mani, J. C., Noel, D., Marin, M., Navarro-Teulon, I., Biard-Piechaczyk, M., Pau, B., and Piechaczyk, M. (1998). Affinity of recombinant antibody and antibody fragment binding to human thyroglobulin: potential applications in gene therapy. J Mol Recognit *11*, 117-118.

Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol *222*, 581-597.

McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature *348*, 552-554.

Merluzzi, S., Figini, M., Colombatti, A., Canevari, S., and Pucillo, C. (2000). Humanized antibodies as potential drugs for therapeutic use. Adv Clin Path *4*, 77-85.

Moghaddam, A., Lobersli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M., and Marvik, O. J. (2001). Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries. J Immunol Methods *254*, 169-181.

O'Brien, P. M., and Aitken, R., eds. (2002). Antibody Phage Display (Totowa, New Jersey, Humana Press).

Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., and MacNeil, J. D., eds. (1995). Chemical Analysis of Antibiotics Used in Agriculture (AOAC International).

Persson, H., Lantto, J., and Ohlin, M. (2006). A focused antibody library for improved hapten recognition. J Mol Biol *357*, 607-620. Epub 2006 Jan 2019.

Persson, M. A., Caothien, R. H., and Burton, D. R. (1991). Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 2432-2436.

Poul, M. A., Becerril, B., Nielsen, U. B., Morisson, P., and Marks, J. D. (2000). Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. J Mol Biol *301*, 1149-1161.

Proba, K., Worn, A., Honegger, A., and Pluckthun, A. (1998). Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. J Mol Biol *275*, 245-253.

Rapley, R. (1995). The biotechnology and applications of antibody engineering. Mol Biotechnol *3*, 139-154.

Rodi, D. J., Makowski, L., and Kay, B. K. (2002). One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. Curr Opin Chem Biol *6*, 92-96.

Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., and Marks, J. D. (1996). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. J Mol Biol *263*, 551-567.

Schneider, E., Curtui, V., Seidler, C., Dietrich, R., Usleber, E., and Martlbauer, E. (2004). Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. Toxicol Lett *153*, 113-121.

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science *228*, 1315-1317.

Smothers, J. F., Henikoff, S., and Carter, P. (2002). Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries. Science *298*, 621-622.

van Amerongen, A., Barug, D., and Lauwaars, M., eds. (2005). Rapid Methods for Biological, Chemical Contaminants in Food and Feed (The Netherlands, Wageningen Academic Publishers).

Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J., and Johnson, K. S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nat Biotechnol *14*, 309-314.

Whitelegg, N. R., and Rees, A. R. (2000). WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. Protein Eng *13*, 819-824.

Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol *12*, 433-455.

Wu, A. M., and Yazaki, P. J. (2000). Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging. Q J Nucl Med *44*, 268-283.

Xie, M. H., Yuan, J., Adams, C., and Gurney, A. (1997). Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. Nat Biotechnol *15*, 768-771.

Yamabhai, M., and Kay, B. K. (1997). Examining the specificity of Src homology 3 domain--ligand interactions with alkaline phosphatase fusion proteins. Anal Biochem *247*, 143-151.

Yang, W. P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., and Barbas, C. F., 3rd (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. J Mol Biol *254*, 392-403.

Yau, K. Y., Lee, H., and Hall, J. C. (2003). Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies. Biotechnol Adv *21*, 599-637.

Zamora, P. O., Sass, K., Cardillo, A. S., Lambert, C. R., Budd, P., Marek, M. J., and Rhodes, B. A. (1994). Affinity thin-layer chromatography test of the immunoreactive fraction of radiolabeled antibodies. Biotechniques *16*, 306-311.

Zheng, M. Z., Richard, J. L., and Binder, J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. Mycopathologia *161*, 261-273.

วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการทดลอง

นอกจากแอนติบอดีต้นแบบที่ได้พัฒนาขึ้น วิธีการดำเนินการวิจัย และผลการทดลองที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ยังได้นำไปเผยแพร่ในรูปแบบผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ที่ต้องผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ คือ Molecular Biotechnology ซึ่งมีค่า impact factor 2.444 ดังนี้

K, Jaruseranee N, O'Kennedy R, Pansri P, Yamabhai M. One-Step Detection of Aflatoxin-B(1) Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library. Mol Biotechnol. 2011.

(10 หน้า)

ส่วนรายละเอียดเกี่ยวกับคลัง และวิธีการสร้างคลังเฟจ YAMO-I สามารถดูได้จากรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง “การพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี” รหัสโครงการ SUT3-304-47-24-11

Mol Biotechnol
DOI 10.1007/s12033-011-9398-2

RESEARCH

One-Step Detection of Aflatoxin-B_1 Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library

Kuntalee Rangnoi · Nanthnit Jaruseranee · Richard O'Kennedy · Potjamas Pansri · Montarop Yamabhai

© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract A unique human phage display library was used to successfully generate a scFv to the highly carcinogenic toxin aflatoxin B1. Such an antibody has major potential applications in therapy and diagnostics. To further exploit its analytical capacity, the scFv was genetically fused to alkaline phosphatase, thereby generating a novel and highly sensitive self-indicating reagent. The performance of this reagent was further characterized, demonstrating its efficacy. The sensitivity of scFv-AP fusion was three-fold better than that of the scFv form. The ability of this human library to generate antibodies to a small hapten was clearly demonstrated and this is linked to its intrinsic diversity, which exceeds many existing conventional human libraries. Our results indicate that demography may influence the diversity of the repertoire of the library in terms of its capacity to generate antibodies to specific targets. Equally, the approach demonstrated should also be applicable for other haptens and larger antigens.

Keywords Phage display · scFv · Antibody engineering · Alkaline phosphatase · ELISA · Aflatoxin · Human · Hapten · Competitive · Recombinant antibody

Abbreviations

AFB	Aflatoxin B
AFG	Aflatoxin G
AFM	Aflatoxin M
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
scFv	Single chain fragment variable
AP	Alkaline phosphatase
BAP	Bacterial alkaline phosphatase
IC_{50}	Inhibitory concentration at 50%
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

Introduction

Haptens are low molecular weight molecules that cannot elicit an immune response unless they are coupled to appropriate carriers [1]. Examples of common haptens include pesticides, herbicides, insecticides, drugs, vitamins, steroids, hormones, explosives, dyes, and toxins. Other haptens are reagents commonly used in biological research such as fluorescein, biotin, digoxigenin, and dinitrophenol [2]. Thus, obtaining antibodies that can interact specifically with these haptens will be very important and beneficial for various applications, such as immunoassays, immunobiosensors, immunotherapy, and affinity purification. The major difficulty related to generation of an antibody to haptens is to find the right conjugate, as the hapten is not intrinsically

K. Rangnoi · N. Jaruseranee · P. Pansri · M. Yamabhai (✉)
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
e-mail: montarop@sut.ac.th; montarop@gmail.com

K. Rangnoi
e-mail: kuntaleerang@gmail.com

N. Jaruseranee
e-mail: nanthanitjaruseranee@gmail.com

P. Pansri
e-mail: potjamas@gmail.com

R. O'Kennedy
School of Biotechnology and National Centre for Sensor Research, Dublin City University, Dublin 9, Ireland
e-mail: richardokennedy@gmail.com

Present Address:
P. Pansri
Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Science Park, Denmark

Published online: 05 April 2011

immunogenic [3]. Moreover, many antibodies that can bind very well to conjugated haptens, cannot recognize the soluble free form of the haptens, and this is required for diagnostic tests and certain therapeutic applications [4].

Aflatoxin B_1 or AFB_1 is an extremely potent and carcinogenic mycotoxin that is produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. These two strains of *Aspergillus* also produce other alflatoxins such as AFB_2, AFG_1, and AFG_2. However, they are not as abundant and toxic as AFB_1 [5]. Aflatoxin M_1 is a metabolite of AFB_1, which can be found in milk of animals that consume aflatoxin-contaminated feeds [6]. The structures of various aflatoxins are illustrated in Fig. 1. Aflatoxins are often found to contaminate agricultural products in Thailand and other countries in tropical and subtropical regions, where the surroundings are warm and humid, favoring the growth of aflatoxin-producing *Aspergillus* both during and post harvesting period [7–10]. AFB1 has been classified as Group 1 carcinogen by WHO-IARC (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer) as it can lead to mutation in the gene that can result in the development of liver cancer [11]. Therefore, aflatoxin contamination is a serious problem and there is a very urgent need to develop a rapid, highly sensitive, reliable, and inexpensive assay to monitor agricultural products, to protect consumers and animals, and to meet regulatory requirements. There is also potential to use such antibodies in analyses of complex matrices where preliminary sample 'clean-up' and concentration is needed prior to analysis.

Many techniques have been developed to analyze aflatoxins such as thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), near infrared spectroscopy (NIR), and immunoassay [12]. Among these, immunological methods that use polyclonal or monoclonal antibody are appropriate and necessary for rapid, high-throughput, highly sensitive, and specific analysis.

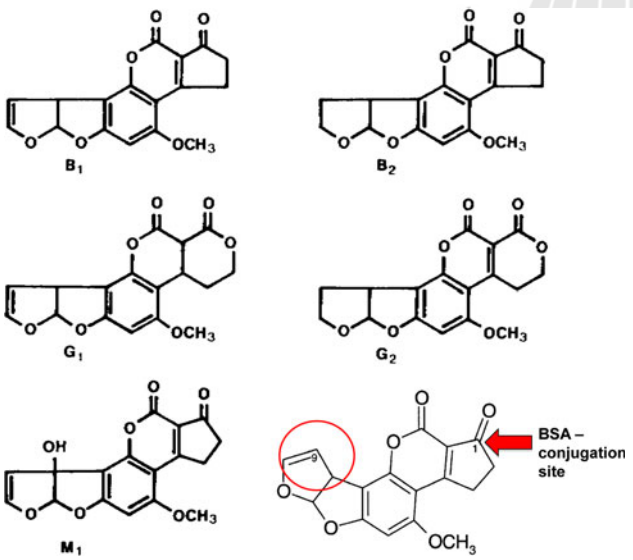

Fig. 1 Structures of different types of aflatoxins. C1 position used for conjugation of $AFB_1$to BSA is indicated. The area around C9 where the scFv antibodies bind is highlighted with a circle. AFM_1 and AFM_2 are metabolic products of AFB_1 and AFB_2, respectively

This research reports the engineering and characterization of human single chain variable fragment (scFv) antibodies against AFB_1 from two human phage display antibody libraries. The first library is Yamo1, a compact human non-immunized phage display library generated from 140 healthy individuals in Northeastern Thailand [13], and the second library is Tomlinson I&J, a semi-synthetic library that is based on one framework but has different amino acids on 18 positions that are diverse in the primary repertoire. Binding properties of antibody selected from these two libraries were studied. In addition, selected scFv antibodies were further engineered to create scFv-alkaline phosphatase fusions (scFv-AP) and used as convenient one-step detection probes for competitive ELISA. The sensitivity and specificity of scFv and scFv-AP to different aflatoxins were determined.

Materials and Methods

Materials

Yamo 1, a human non-immunized scFv library, was constructed in our laboratory using B-lymphocytes from 140 healthy individuals in the Northeastern Thailand [13]. Tomlinson I&J, two similar semi-synthetic libraries, were kindly provided by the MRC, Cambridge. They are based on a single human framework and variation at 18 residues (H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 and L96) that are responsible for antigen binding. KM13 helper phage was provided with the Tomlinson libraries and was propagated as described in the MRC phage display protocols. Aflatoxins B1 conjugated with BSA (AFB_1-BSA), and soluble aflatoxins B1, B2, G1, G2, and M1 were obtained from Sigma, Germany. *E. coli* TG1 and HB2151 were obtained from the MRC, Cambridge, UK, and used for cloning and amplification of phage, or production of soluble scFv fragments, respectively. The anti-M13/HRP detection kit was purchased from Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), and Protein L peroxidase HRP was from Sigma. *E. coli* TG1 was used for cloning and expression of scFv-AP fusions.

Biopanning

The selection was performed on Nunc Maxisorp immuno tubes (Nunc, Denmark). Various concentrations of

aflatoxin B1-BSA conjugate, in 100 µl phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH 7.4) were used. The amounts of AFB_1-BSA conjugate used for the first, second, and third rounds of selection were 50 µg, 15 µg, and 5 µg per tube (4 ml), respectively. After overnight incubation (16–18 h) at 4 °C, the immune tubes were washed three times with PBS and blocked with PBS supplemented with 4% (w/v) skimmed milk (4%, w/v, MPBS) for 2 h at room temperature. After removal of the blocking solution, the tubes were washed three times with PBS. The libraries were pre-incubated with 4% (w/v) MPBS and 1% (w/v) BSA for 30 min at room temperature. The libraries were then added into the immuno-tubes and incubated at room temperature for 2 h. Unbound phage was washed away three times with PBS supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) and three times with PBS. For the Tomlinson library, bound phage was eluted by adding 500 µl of 1 µg/ml trypsin buffer (in PBS) and incubated at room temperature for 20 min with rotation. For the Yamo1 library, an additional acid elution step was carried out after treatment with trypsin. Five hundred µl of 50 mM glycine–HCl, pH 2.0 was added into the tube and immediately after incubation for 10 min, 500 µl of neutralization buffer (200 mM $NaHPO_4$, pH 7.5) was added. The eluted phage was recovered by infecting 350 µl of exponentially growing *E. coli* TG1 and by incubation at 37 °C for 30 min without shaking. Infected cells were subjected to 10-fold-serial dilution (10^2–10^6) and spread on TYE (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 8 g NaCl and 15 g bacto-agar in 1 L) agar plates supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 1% (w/v) glucose. The agar plates (inverted) were incubated overnight at 37 °C.

For the Yamo1 library, one round of selection was sufficient to obtain specific binding phage, whereas for Tomlinson libraries, two more rounds of selection were performed. To continue with the next round of selection, 1 ml of 2 × YT (16 g tryptone, 10 g yeast extract and 5 g NaCl in 1 l) media was added on agar plates containing a lawn of infected bacteria, and the cells were loosened with a glass spreader. The scraped cells were kept as a 15% (v/v) glycerol stock at −70 °C, and 10 µl of scraped bacteria were added into 10 ml of 2 × YT supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 1% (w/v) glucose, and incubated at 37 °C with shaking until the OD_{600} was 0.4 (approximately 2 h). After this procedure, phage were was rescued by super-infecting the cells with 5×10^{10} helper phage KM13 and incubated at 37 °C, without shaking, for 30 min. Afterward, the culture media was exchanged by centrifugation at 4,000 rpm at 4 °C for 15 min, the supernatant was removed, and the pelleted bacteria were resuspended in 5 ml of 2 × YT containing 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamycin, and 0.1% (w/v) glucose. Later, it was incubated at 30 °C with shaking overnight. On the following day, the overnight culture was centrifuged at 4,000 rpm and 4 °C for 15 min. Phage was precipitated by adding 1 ml of PEG/NaCl (20% (v/v) polyethylene glycol 6000 in 2.5 M NaCl) into 4 ml of the supernatant and kept on ice for 1 h, and later centrifuged at 4,000 rpm, at 4 °C for 30 min. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 100 µl PBS for the next round of selection.

Individual Phage Rescue

Individual phage-infected colonies were randomly picked from the TYE plate and grown in wells of a 96-well plate (Nunc, Denmark) containing 100 µl 2 × YT plus 100 µg/ml ampicillin and 1% (w/v) glucose. After overnight incubation at 37 °C, small inocula (5 µl) from each well were transferred to a second 96-well plate containing 200 µl of 2 × YT plus 100 µg/ml ampicillin and 1% (w/v) glucose. The first plate was kept as master stock by adding glycerol to a final concentration of 20% (v/v) and kept at −20 °C. The second plate was incubated with shaking at 37 °C for 2 h, and later phage was rescued by adding 10^{10} helper phage to each well. Following this they were then incubated at 37 °C for 1 h before centrifugation of the plate at 4,000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 200 µl of 2 × YT containing 100 µg/ml ampicillin and 50 µg/ml kanamycin, and cultured at 30 °C overnight (20 h) with shaking (250 rpm). The overnight culture was spun at 4,000 rpm for 10 min, and 50 µl of the supernatant-containing phage was used in monoclonal phage ELISA.

Phage ELISA

The wells of 96 MicroWell™ plates (Nunc, Denmark) were coated with 5 µg of aflatoxin B1-BSA in PBS buffer, or 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in 100 µl PBS (control). After incubation at 4 °C overnight, the plates were washed three times with PBS. The wells were then blocked with 4% (w/v) MPBS for 2 h at room temperature. The wells were re-washed three times with PBS. Fifty µl of phage supernatant and 50 µl of 4% (w/v) MPBS were added to each well and incubated at room temperature for 2 h. Unbound phage was removed by washing three times with PBST and 3 times with PBS. Subsequently, 100 µl of HRP-labeled anti-M13 (1:5000 dilution in 2% (w/v) MPBS) was added into each well. After incubation for an additional 1 h at room temperature, the wells were washed again, as described previously, and 100 µl of substrate solutions (TMB or ABTS, Sigma) were added into each well and incubated at 37 °C for 30 min. The resulting absorbance was read at 450 nm for TMB or 405 nm for ABTS.

Expression and Purification of scFv Antibody in Microtiter Plates

Escherichia coli non-suppressor strain HB2151, which reads the amber codon as a stop signal, thereby solubly expressing the antibody fragments, was infected with individual phage clones to express soluble scFvs. Five µl of individual phage particles from the master glycerol stock were mixed with 150 µl of exponentially growing *E.coli* HB2151 ($OD_{600} = 0.4$), and incubated at 37 °C for 30 min, without shaking. the solution. Infected bacteria were then streaked onto TYE agar plates containing 100 µg/ml ampicillin and 1% (w/v) glucose. The plates were incubated at 37 °C overnight. On the next day, single colonies were picked and cultured in the wells of a 96-well plate containing 100 µl of 2 × YT plus 100 µg/ml ampicillin and 1% (w/v) glucose.The culture was incubated with shaking at 37 °C overnight. On the next day, 8 µl of culture was transferred to another 96 deep-well plate containing 800 µl of 2 × YT plus 100 µg/ml ampicillin and 0.1% (w/v) glucose, and incubated with shaking at 37 °C until the OD_{600} reached 0.9. Later, 100 µl of 2 × YT containing 100 µg/ml ampicillin and 9 mM isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG)was added to a final concentration of 1 mM IPTG. The incubation was continued at 30 °C with shaking overnight (18–20 h). The secreted antibody could be found in the supernatant. The first plate was kept as a master stock by adding glycerol to a final concentration of 15% (v/v) and was then stored at −70 °C.

Large-Scale Production of Soluble scFv

Production of soluble scFv antibodies was carried out as previously described [13]. In some cases, the crude scFv products were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Germany)The resins were washed twice with washing buffer 1 (20 mM Tris; pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM imidazole) and washing buffer 2 containing 20 mM imidazole before scFv fragments were collected with elution buffer (20 mM Tris; pH 8.0, 150 mM NaCl, 250 mM imidazole).

ScFv Antibody ELISA

The procedure was similar to the phage ELISA method described previously, except that 50 µl of culture supernatant containing the scFv antibody and 50 µl 3% (w/v) BSA were added into each of the wells instead of individual phage clones. Bound scFv was detected by addition of 100 µl of peroxidase-labeled Protein L (1:5000 dilution in 3% (w/v) BSA) using TMB as substrate.

Cloning and Expression of scFv-AP Fusion

The scFv gene from the phagemid vector was cut with *Nco* I and *Xho* I restriction enzymes and subcloned into pKP300ΔIII, an alkaline phosphatase fusion vector (Kay. B.K. unpublished). The integrity of the constructs was confirmed by automated DNA sequencing. To prepare scFv-alkaline phosphatase (scFv-AP) fusions, a single colony of *E. coli* TG1 harboring recombinant plasmid was inoculated into 10 ml of low phos media (3.75 g ammonium sulphate, 0.71 g sodium citrate dehydrate, 1.07 g KCl, 5.36 g Yeast extract, 5.36 g Hy-case SF casein hydrolysate, 7 mM $MgSO_4$, 14 mM glucose per liter, pH 7.3 (adjusted by addition of KOH)). The culture was allowed to grow for 20 h before the culture supernatant containing the secreted scFv-AP fusion product was collected and kept at 4 °C for no more than 1 week. No further purification is required for the assay.

scFv-AP ELISA

Five µg of aflatoxin B1-BSA or 1% (w/v) BSA (control) in 100 µl PBS were immobilized into wells of an immuno 96 Wells™ plate. The plate was washed three times with Tris-buffered saline (TBS; 25 mM Tris–HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 3 mM KCl) supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20 (TBST) and blocked with 3% (w/v) BSA in TBS. After incubation for 1 h at room temperature, the wells were washed 5 times with TBST. Later, 50 µl of scFv-AP supernatant and 50 µl of 3% (w/v) BSA were added into each well and incubated at room temperature for 2 h. The plate was then washed five times with TBST. Subsequently, 100 µl *p*-Nitrophenyl phosphate substrate (pNPP; SIGMA, USA) was added to each well. After incubation for 20 min at room temperature, absorbance was measured at 405 nm.

Competitive ELISA

Competitive or inhibition ELISA was performed as described in the normal ELISA methods, except that optimal amount of the phage particle, scFv or scFv-AP were pre-incubated with increasing amount of soluble AFB_1 ranging from 0.019 to 5.0 µg/ml before adding into previously coated, blocked, and washed wells of ELISA plates. For every assay, appropriate dilutions of scFv or scFv-AP that showed a linear relationship by direct ELISA (Fig. 3), was used.

Determination of Cross-Reactivity

Selected scFv or scFv-AP antibodies were assayed for binding against a range of soluble aflatoxins; B_1, B_2, G_1,

G_2, and M_1. Stock solutions of aflatoxins were prepared in 100% (v/v) methanol and diluted using TBST containing 5% (v/v) methanol. The assays were performed following the competitive ELISA protocol, as described above, for each of the aflatoxins tested.

Results

Bio-Panning of Aflatoxin-Specific scFv Antibodies

A simple bio-panning procedure was carried out to select phage that displays specific antibody to soluble AFB_1 from two human phage display scFv libraries. The libraries were pre-incubated with 3% (w/v) BSA to minimize the possibility of non-specific binding to BSA since the AFB_1-BSA conjugate was used as an affinity selection target. For semi-synthetic libraries (Tomlinson I & J), three rounds of bio-panning was performed according to the manufacturer's protocol, whereas for a compact non-immunized Yamo1 library, we have previously reported that only one round of bio-panning was sufficient to obtain specific phage [13]. A summary of bio-panning results is listed in Table 1. Enrichment of AFB_1-specific phage after each round of affinity selection was observed for the Tomlinson libraries. After three rounds of affinity selection, 2.2×10^5 and 2×10^6 phage clones could be obtained from Tomlinson I and J, respectively. For Yamo1 library, 2.5×10^2 phage clones could be obtained after one round of selection. Confirmation by ELISA revealed that 71, 32, and 4 phage clones from Tomlinson I, J, and Yamo1, respectively, were authentic binders to AFB_1-BSA. The frequency of specific binders from Tomlinson and Yamo1 libraries was the same after one round of selection; however, none of the clones from round one of Tomlinson biopanning could bind to soluble AFB_1 in the next step.

Specific Binding of scFv Antibody to Soluble AFB1

For diagnostic or therapeutic purposes, it is necessary to obtain antibody that can bind to free (soluble) AFB_1, and thus we performed competitive ELISAs to identify these scFv-secreting clones. Soluble scFv fragments were first generated by infecting selected phage clones into *E. coli* HB2151, which reads the amber stop codon (TAG) as a stop signal, allowing secretion of soluble scFv into the periplasm, upon induction with IPTG. From the selected phage clones tested, 19, 2, and 3 clones from Tomlinson I, J, and Yamo1, respectively, could be successfully induced for expression, and from these soluble scFv clones, only 3 and 1 clone from Tomlinson I, and Yamo1, respectively, showed specific competitive binding to soluble AFB_1 by competitive ELISA. Amino acid sequence analysis of selected scFv clones revealed that the three clones that were isolated from Tomlinson I (TomI-F6, TomI-H2, and TomI-E9) have an identical DNA sequence, thus there was one scFv fragment from each Tomlinson I and Yamo1 library that could be selected by our bio-panning procedure. These two clones (TomI-F6 and YM1-C3) were used for further study. Amino acid sequence analyses of these two scFv fragments are shown in Fig. 2. The TomI-F6 scFv antibody was based on a single human framework for VH (IGHV3-23*05, DP47) and Vκ (IGKVID-39*01, DPK9), which belong to subgroup VH3 and VK1, respectively. The positions of amino acid different from the germ lines are located in CDR2 and CDR3 regions of the VH and VL, respectively. The second scFv antibody, YM1-C3 was obtained from Yamo I. The VH and VL fragments were derived from germlines IGHVI-3*01 (DP25) and IGKVID-39*01 (DPK9), which belong to subgroup VH1 and VK1, respectively. There is no amino acid different from the germline gene in VH fragment, whereas there are four amino acid differences from germline gene in the framework region 1, 2, and 3 of VL fragment.

Table 1 Overview of selection of antibodies against aflatoxin B1-BSA

Results from each step	Tomlinson I	Tomlinson J	YAMO 1
Number of clone after 1st panning	3.2×10^3	4×10^2	2.5×10^2
Number of clone after 2nd panning	1×10^5	1.4×10^5	–
Number of clone after 3rd panning	2.2×10^5	2×10^6	–
Number of positive phage clones after 1st round from ELISA	6/96[a]	8/96[a]	4/56[a]
Number of positive phage clones after 3rd round from ELISA	71/96[a]	32/96[a]	–
Number of expressed soluble scFv	19/62[a]	2/34[a]	3/4[a]
Number of scFv fragments that can bind soluble Aflatoxin B_1	3/8[a]	0	1/3[a]
Number of different scFv clones	1	0	1

[a] The number of positive clones/the number of tested clones

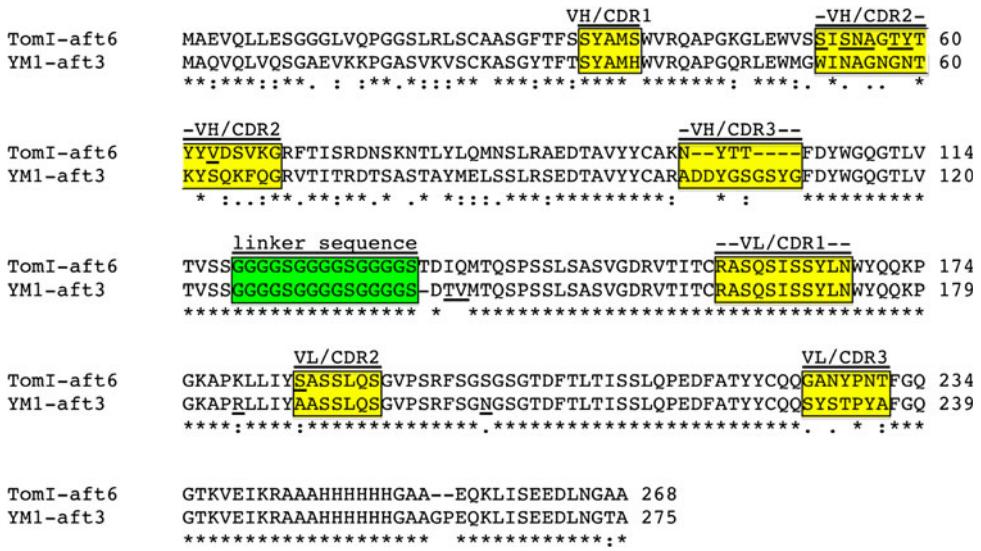

Fig. 2 Amino acids sequence analysis The amino acid sequence of the whole scFv antibody fragments of TomI-F6 (TomI-aft6, *upper panel*) and YM1-C3 (YM1-aft3, *lower panel*) are shown. The GC-rich sequence that links V_H and V_L segments is indicated. The three complementarity determining regions (CDRs) are shown. The *underlined letters* are amino acids that are different from the germ line. Structure analysis was carried out based on IgBLAST software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) and reconfirmed by DNAPLOT from V BASE. (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/). Sequence alignment of the two scFv antibodies was done using CLUSTALW 2.1 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

Cloning and Characterization of scFv-Alkaline Phosphatase (scFv-AP) Fusions

To create a convenient one-step detection reagent for diagnostic purposes, we cloned the TomI-F6 and Yamo1-C3 scFv DNA fragments into an alkaline phosphatase (AP) expression vector. The scFv-AP fusions could be induced for expression in *E. coli* and secretion into the periplasmic space. Culture supernatant can then be used directly in ELISA as illustrated in Fig. 3. The signal was excellent and the background was low. Directed ELISA using AFB_1-BSA conjugated as a target revealed that the optical density using YM1-C3-AP fusion at 405 nm was 3-fold higher than that of the TomI-F6-AP. This result suggested that scFv-AP could be used as a convenient reagent for detecting soluble AFB1 by competitive ELISA.

To compare the binding properties of soluble scFv and scFv-AP, competitive ELISA was performed on the two forms of the YM1-C3 antibody. Various concentrations of free AFB_1 were pre-incubated with appropriate dilutions of scFv or scFv-AP before adding into well of an ELISA plate coated with the 3–5 μg of AFB1-BSA conjugate. Bound scFv or scFv-AP was detected by use of a protein-L-peroxidase, followed by TMB substrate, or pNP substrate, as appropriate. The IC_{50} values (Fig. 4), being the concentration of soluble AFB_1 that results in 50% inhibition, for the scFv and scFv-AP fusion, were 0.12 and 0.04 μg/ml, respectively (Fig. 4). This result indicated that scFv-AP fusion has 3-fold higher sensitivity than soluble scFv form. Therefore, the scFv-AP fusion format was subsequently used to characterize the binding properties of the two scFv antibodies in the next step.

YM1-C3 scFv-AP has Higher Binding Sensitivity than TomI-F6 scFv-AP

Competitive or inhibition ELISA was successfully used as an indirect method to estimate the binding affinity of an antibody [14]. In addition, it has also been used to determine binding constant (IC_{50}) of modular binding domain-AP fusions to peptide [15]. Thus, we performed competitive ELISA to estimate the binding affinity and compare the binding sensitivity of the two scFv fragments that were isolated from two different phage libraries, as shown in Fig. 5. Various concentrations of free AFB_1 wwere pre-incubated with the appropriate dilution of scFv-AP fusions and the ratio of OD of bound scFv-AP over the OD in an absence of free AFB_1 was plotted against the log of concentration of free AFB_1. The IC_{50} values for YM1-C3 and TomI-F6 were 0.034 and 0.14 μg/ml, respectively, suggesting that the binding sensitivity of YM1-C3 is approximately 4 fold higher than that of TomI-F6. The useful assay range for YM1-C3 and TomI-F6 was between 0.007–0.2 and 0.04–1.0 μg/ml.

Cross-Reactivity to Various Aflatoxins

To evaluate the binding specificity of the selected scFv antibody, we compared IC_{50} values derived from inhibition ELISA of structurally related aflatoxins, i.e., B2, G1, G2,

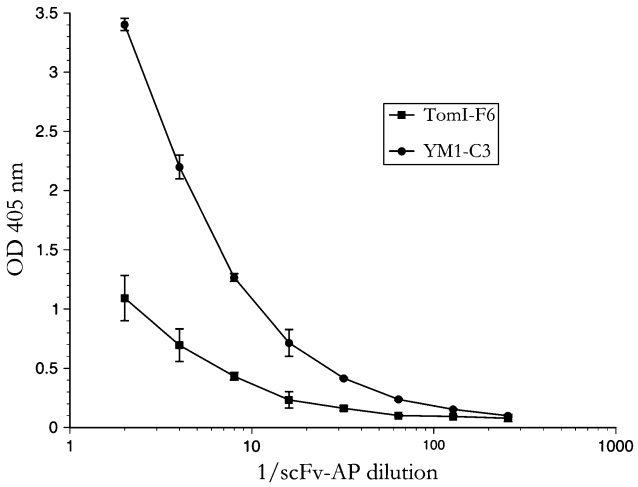

Fig. 3 Direct ELISA of scFv-AP antibody fusions. Various 2-fold dilutions of culture supernatant containing scFv-AP fusions from ½ to 1/256 were assayed on an ELISA plate coated with AFB_1-BSA. Bound antibodies were detected by colorimetric assay with pNPP (p-Nitrophenyl Phospate) as substrate. The average OD_{405} values and standard errors are shown. Antibody dilutions of 1/10 (TomI-F6) and 1/20 (YM1-C3), which was in the linear range of the curve, were chosen for competitive ELISA

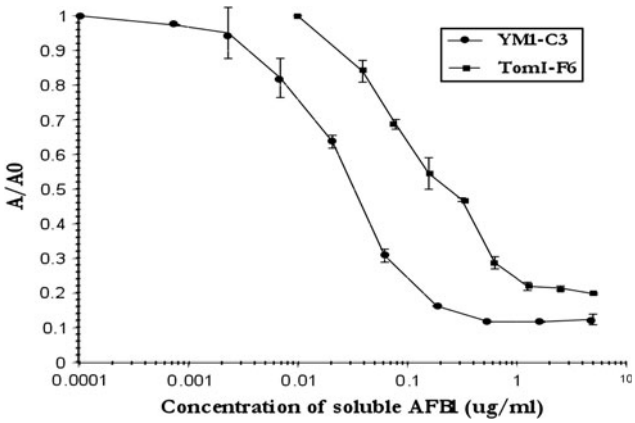

Fig. 5 Comparison of binding properties of TomI-F6 and YM1-C3 scFv-AP antibodies. Various concentration of soluble AFB_1 from 5.0 μg/ml to 0.762 ng/ml were incubated with two scFv-AP (TomI-F6, YM1-C3) antibodies at 37 °C for 30 min before addition to wells of Immuno 96 MicroWell™ plates, coated with 5 μg AFB_1-BSA. The plates were washed five times with TBS-T after a 1 h incubation. Bound antibodies were demonstrated by colorimetric detection using the AP substrate, pNPP. The average absorbance at 405 nm and S.Ds are shown. Normalized absorbance values (expressed as A/A_0) were plotted against the logarithm of AFB_1 concentration. The IC_{50} values for the TomI-F6-AP and YM1-C3-AP were found to be 0.14 and 0.034 μg/ml, respectively

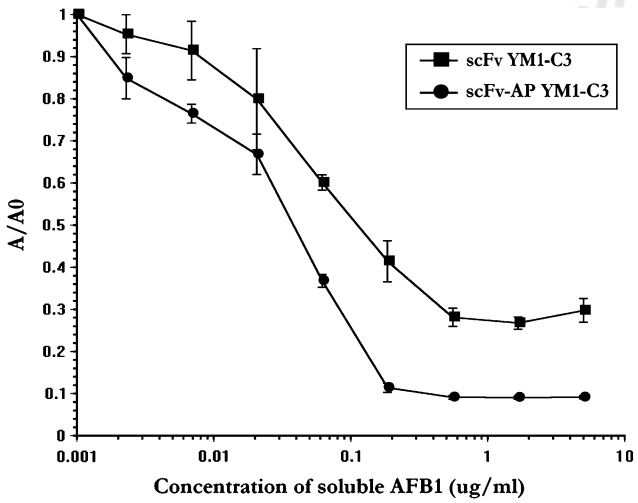

Fig. 4 Comparison of binding properties of soluble scFv and scFv-AP antibody. Two formats of YM1-C3 scFv antibody were compared by competitive ELSIA. Optimal dilutions of soluble scFv or scFv-AP were incubated with equal volumes of various amounts of free AFB_1 in TBST containing 5% (v/v) methanol to reach a final concentration ranging from 2.3 ng to 5,000 ng/ml. The IC_{50} values for the scFv YM1-C3, and YM1-C3-AP were found to be 0.12 and 0.04 μg/ml, respectively. The scFv-AP fusions showed improved binding sensitivity of approximately 3 fold better than the soluble scFv format

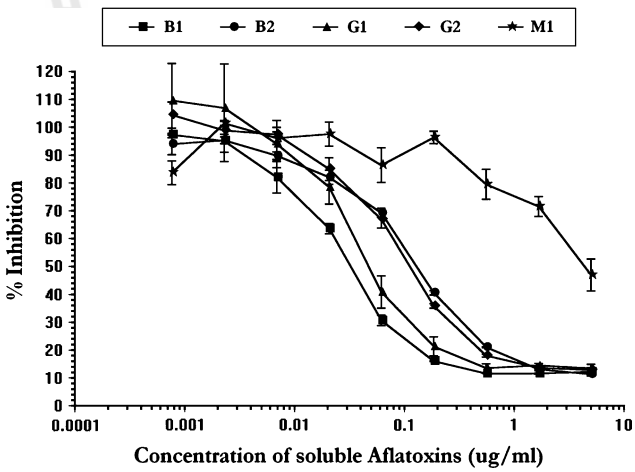

Fig. 6 Cross-reactivity against different aflatoxins. Competitive ELISA of YM1-C3 scFv-AP antibody with various structurally related aflatoxins (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1) is demonstrated. Results were plotted as the mean percent inhibition vs. concentration of soluble aflatoxins. Percent inhibition of aflatoxin antibody was calculated from this type of competitive ELISA

and M1 as demonstrated for YM1-C3 scFv-AP in Fig. 6. Standards of each potential cross-reactive aflatoxins, ranging from 2.3 to 5,000 ng/ml in TBST containing 5% (v/v) methanol, were mixed with an equal volume of scFv-AP antibody at the optimal concentration, before incubation on wells of an ELISA plate that were coated with AFB_1-BSA conjugates. The cross-reactivity potential was approximated as the percent inhibition according to the equation: % inhibition = [(OD sample/OD control)] × 100. The percentage cross-reactivity determined at IC_{50} (%CR50) was expressed as 50% inhibitory concentration of aflatoxin B1 divided by the 50% inhibitory

Table 2 Percentage cross-reactivity values of the TomI-F6 and YM1-C3 scFv-AP antibody to various structurally related aflatoxins

Aflatoxins	TomI-F6		YM1-C3	
	IC_{50} (ug/ml)	CR_{50} (%)	IC_{50} (ug/ml)	CR_{50} (%)
B_1	0.22	100	0.035	100
B_2	1.3	16.92	0.13	26.92
G_1	0.32	68.75	0.05	70
G_2	1.6	13.75	0.12	29.17
M_1	1.7	12.94	4	0.88

The cross-reactivity potential was approximated at the IC_{50} value, which was estimated at 50% A/A_0

concentration of other aflatoxins and multiplied by 100. Percentage cross-reactivity values of the TomI-F6 ad YM1-C3 scFv-AP antibodies to various potential cross-reactive aflatoxins are reported in Table 2. Both scFv-AP antibodies showed a high degree of cross-reactivity, especially to AFG1 > AFB2 > AFG2 > M1 (in decreasing order). The highest levels of cross-reactivity with aflatoxin G1 were 68.75% and 70% for TomI-F6 and YM1-C3, respectively. There is no significant difference in percent cross-reactivity against AFB_2, AFG_2, and AFM_1 for TomI-F6, whereas for YM1-C3, percent cross-reactivity to AFB_2 and AFG_2 were similar, i.e., 27 and 30%, respectively. However, YM1-C3 showed very low cross-reactivity (0.9%) to AFM_1, which is a metabolite form of aflatoxin B_1 found in milk. These results are in accordance with those obtained from using soluble scFv forms (data not shown).

Discussion

Phage display is a powerful method to generate human monoclonal antibodies. This research reports the advantage of using a phage display antibody library generated from a non-immunized population that had previously experienced high exposure to certain antigens of interest, for the selection of a specific and sensitive antibody. In addition, we also demonstrated that the alkaline phosphatase fusion of scFv antibody (scFv-AP) is an attractive format for the detection of hapten by inhibition ELISA. Since the antibody is human, its potential application encompasses therapeutic purposes, such as the treatment of acute toxicity or drug addiction [16, 17].

Since obtaining specific antibody to free hapten is often very difficult with either naïve libraries or libraries derived from immunized animals, many strategies have been developed to increase the chance of selecting specific antibodies from a phage display antibody library. These include modification of the elution step by competing with free hapten [18], alternative hapten-carrier conjugates [6], selection from a focused library that favors binding haptens (cavity library) [19], or selection from an immunized library [20]. However, in this study, we were able to isolate specific antibody by using a simple bio-panning procedure. The discrepancy of affinity selection results from various publications could be due to differences in the libraries used. Biopanning from Yamo1, a human non-immunized library that is generated from a large population, including those that are highly exposed to mycotoxin, could increase the likelihood of obtaining highly specific antibody. Therefore, our results suggested that some of these Thai people, whose B-cells are the source of library, have mounted an immune response against this toxin. Indeed, there have been two previous reports indicating antibody activity against aflatoxin B1 in serum from individuals in Kenya who experience high exposure to AFB1 [21], and in Danish workers who are laboring in animal-feed processing plants [22]. Therefore, this finding should be applicable for other antigens such as other mycotoxins, pesticides, and viruses, to which certain populations are commonly exposed.

In general, the main reason for performing only a single round of biopanning is to maximize the diversity of binders selected. Increasing the number of panning rounds affects the outcome with regard to the number of weaker binders. The stronger binders usually overgrow and dominate in the final output of panning when multiple panning rounds are employed. Therefore the weaker binders, which may express unique characteristics, e.g., specificity for potentially relevant antigens or cross-reactivity to related toxins, are often lost during repeated panning rounds. To address this issue, only one round of panning was used in this study. Moreover, the Yamo library used was generated by using the KM13 helper phage, which could help in reducing the background of non-displaying antibody phage during biopanning [23]. Consequently, bona fide binders could be obtained after a single round of panning. Our result was a 'proof-of-principle' to demonstrate that the library was indeed capable of generating anti-hapten antibodies, and that the population used to make the library would have had exposure to the toxin. In addition, another advantage of obtaining antibody from a single round of panning is that the isolated antibody may be able to cross react with other related toxins (aflatoxin G1, B2, G2) with similar structures more so than antibodies from the TomI library obtained after three rounds of panning. While it is possible to obtain the highest affinity and most specific scFvs by performing more rounds of biopanning, the affinity, stability, or specificity of the isolated antibody from a single round of panning can also be further improved by affinity maturation [4].

The scFv format has many advantages over other antibody formats, i.e., it is more efficient for display on phage

coats [24], it may pass through the blood–brain-barrier [25], and the library is more stable [26]. However, one key disadvantage of this format is the formation of dimers or higher order multimers [27]. This complicates standard affinity measurement by systems such as surface plasmon resonance (SPR) analysis. The formation of multimeric antibody molecules depends on the amino acid sequence of individual clones and the linker length, and can be unpredictable. Indeed, both of the two scFv antibodies described in this study did form several multimers as observed by SDS-PAGE analysis (data not shown). Purified monomeric scFv antibodies isolated by gel filtration chromatography could re-aggregate when left in solution.

Analysis of binding sensitivity by competitive ELISA revealed that the IC_{50} of YM1-C3 was approximately 0.04 μg/ml or 40 ppb, whereas, the IC_{50} of TomI-F6 was approximately 0.14 μg/ml or 140 ppb. These values are in the same range as previously published clones that were isolated from pre-immunized or naïve libraries [6, 18, 28]. The detection limit of YM1-C3 was 0.007 μg/ml (7 ppb). In several regions where aflatoxin contamination is prevalent, the acceptable limits of aflatoxin contamination in agricultural products are 20 ppb [29], thus, this YM1-C3-AP fusion could be applicable for analytical purposes.

Determination of cross-reactivity to structurally related aflatoxin (B2, G1, G2, and M1) revealed that YM1-C3 scFv could cross react with AFG_1 (70%), with slight cross-reactivity (~30%) with AFB_2 and AFG_2, but showed almost no binding to AFM_1. Judging from the structure of these aflatoxins (Fig. 1), it seems that the antibody interacts near the C9 position. These data are in accordance with previous reports that also used AFB_1-BSA conjugate as a target for affinity selection [18, 28], confirming that the type of conjugates used could dictate the outcome of affinity selection results. A wide specificity of antibody could be very useful in the following cases: (a) extraction of toxins from complex food or environmental matrices for analysis or in the purification of expensive food ingredients, (b) application as an antidote in food to sequester the toxin or to reduce potential toxicity, and (c) broad specificity toxin detection e.g., on an array.

One important outcome from this study is that we have demonstrated that the isolated antibodies could be further engineered to create a scFv-alkaline phosphatase fusion (scFv-AP) protein and this could be used as a convenient one-step detection probe for competitive ELISA. Bacterial alkaline phosphatase (BAP) is a homodimeric enzyme and fusions of various proteins or peptides to this enzyme have been previously demonstrated to be useful reagents for various detection formats [30]. Our results indicated that the sensitivity of scFv-AP fusion was approximately 3-fold better than the soluble scFv form and 20-fold better than the phage-displayed format [13]. This result is in accordance with previous reports that demonstrate higher specificity and sensitivity of peptide-AP fusion when compared to free biotinylated peptides or peptides that display on phage [31]. It is possible that the increased affinity is due to a higher proportion of the secreted AP-fused scFv being present in a correctly folded—and therefore active format than in the case of soluble scFv. The AP-fused proteins are likely to be dimeric, because AP itself is a homodimer, hence the binding avidity is increased. Ease of engineering, expression, and purification makes scFv-AP fusion antibodies attractive for large-scale production for the diagnostics industry.

Although the IC_{50} or detection limit of the antibody in this study is comparable to other antibodies isolated from a naïve library, it is approximately ten times less sensitive than antibodies from some immunized mouse libraries [12]. However, it is important to note that this antibody is 100% human and it is not possible to directly immunize humans with toxins for ethical and safety reasons. Nevertheless, the sensitivity of these antibodies can be further improved by various methods of affinity maturation [4].

Conclusions

Our results demonstrate the value of phage display antibody technology to engineer human recombinant antibodies for carcinogenic haptens such as aflatoxins. This knowledge should be applicable to a host of other haptens or antigens to which human populations may have been exposed. The library and approach used should be advantageous over other human library-based systems.

Acknowledgments This research was supported by National Research Council of Thailand (NRCT), Duo-Thailand Fellowship 2008, and Suranaree University of Technology. We would like to thank Jenny Fitzgerald for valuable advice.

References

1. Shreder, K. (2000). Synthetic haptens as probes of antibody response and immunorecognition. *Methods, 20*, 372–379.
2. Singh, M. K., Srivastava, S., Raghava, G. P., & Varshney, G. C. (2006). HaptenDB: A comprehensive database of haptens, carrier proteins and anti-hapten antibodies. *Bioinformatics, 22*, 253–255.
3. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2005). *Immunobiology* (6th ed.). New York: Garland Science Publishing.
4. Sheedy, C., MacKenzie, C. R., & Hall, J. C. (2007). Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnology Advances, 25*, 333–352.
5. Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews, 30*, 460.
6. Daly, S., Dillon, P., Manning, B., Dunne, L., Killard, A., & O'Kennedy, R. (2002). Production and characterization of murine single chain Fv antibodies to aflatoxin B1 derived from a

pre-immunized antibody phage display library system. *Food and Agricultural Immunology, 14*, 255–274.
7. Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G., & Cotty, P. J. (2007). Aflatoxin-producing Aspergillus species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology, 114*, 153–159.
8. Ruangwises, S., & Ruangwises, N. (2009). Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized milk of the School Milk Project in Thailand. *Journal of Food Protection, 72*, 1761–1763.
9. Tassaneeyakul, W., Razzazi-Fazeli, E., Porasuphatana, S., & Bohm, J. (2004). Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. *Mycopathologia, 158*, 239–244.
10. Waenlor, W., & Wiwanitkit, V. (2003). Aflatoxin contamination of food and food products in Thailand: an overview. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 34*(Suppl 2), 184–190.
11. RC, I. A. (1993). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances food items and constituents heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs, 56*, 245.
12. Li, P., Zhang, Q., & Zhang, W. (2009). Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry, 28*, 1115–1126.
13. Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., & Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnology, 9*, 6.
14. Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohaniance, L., & Goldberg, M. E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods, 77*, 305–319.
15. Yamabhai, M., Hoffman, N. G., Hardison, N. L., McPherson, P. S., Castagnoli, L., Cesareni, G., et al. (1998). Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *The Journal of Biological Chemistry, 273*, 31401–31407.
16. Eddleston, M., & Persson, H. (2003). Acute plant poisoning and antitoxin antibodies. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 41*, 309–315.
17. Peterson, E. C., Gunnell, M., Che, Y., Goforth, R. L., Carroll, F. I., Henry, R., et al. (2007). Using hapten design to discover therapeutic monoclonal antibodies for treating methamphetamine abuse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 322*, 30–39.
18. Moghaddam, A., Løbersli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M., & Marvik, O. J. (2001). Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries, *Journal of Immunological Methods, 254*, 169–181.
19. Persson, H., Lantto, J., & Ohlin, M. (2006). A focused antibody library for improved hapten recognition. *Journal of Molecular Biology, 357*, 607–620.
20. Kalinichenko, A., Toporova, V., Panina, A., Aliev, T., Kryukova, E., Shemchukova, O., et al. (2010). Development and characterization of antibodies against aflatoxins. *Russain Journal of Bioorganic Chemistry, 36*, 114–123.
21. Autrup, H., Seremet, T., & Wakhisi, J. (1990). Evidence for human antibodies that recognize an aflatoxin epitope in groups with high and low exposure to aflatoxins. *Archives of Environmental Health, 45*, 31–34.
22. Autrup, J. L., Schmidt, J., & Autrup, H. (1993). Exposure to aflatoxin B1 in animal-feed production plant workers. *Environmental Health Perspectives, 99*, 195–197.
23. Kristensen, P., & Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding and Design, 3*, 321–328.
24. Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., et al. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95*, 6157–6162.
25. Kasturirangan, S., & Sierks, M. (2010). Targeted hydrolysis of beta-amyloid with engineered antibody fragment. *Current Alzheimer Research, 7*, 214–222.
26. Hoogenboom, H. R., & Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology Today, 21*, 371–378.
27. Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO Journal, 13*, 3245–3260.
28. Yang, L., Ding, H., Gu, Z., Zhao, J., Chen, H., Tian, F., et al. (2009). Selection of single chain fragment variables with direct coating of aflatoxin B1 to enzyme-linked immunosorbent assay plates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 57*, 8927–8932.
29. Shephard, G. S. (2008). Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 25*, 1246–1256.
30. Yamabhai, M. (2008). BAP-fusion: A versatile molecular probe for biotechnology research. In F. W. Richter (Ed.), *Biotechnology: Research, technology and applications* (pp. 327–345). Hauppauge, NY: NOVA Science Publishers, Inc.
31. Yamabhai, M., & Kay, B. K. (1997). Examining the specificity of Src homology 3 domain–ligand interactions with alkaline phosphatase fusion proteins. *Analytical Biochemistry, 247*, 143–151.

ข้อวิจารณ์

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจไปประยุกต์ใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตร ได้เป็นอย่างดี โดยในกรณีนี้ได้ใช้สารอะฟลาทอกซิน เป็นตัวแทนสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตร (hapten) เพราะเป็นสารพิษก่อมะเร็งร้ายแรง และเป็นปัญหาต่อผลผลิตทางการเกษตรมานานทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในแถบร้อนชื้น จึงได้มีการศึกษาวิจัย และมีข้อมูลเชิงวิชาการเกี่ยวกับสารพิษนี้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ประเมินผลการวิจัย ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากผลการวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจ ในการคัดหาแอนติบอดีส่วน scFv ของมนุษย์ แล้วนำไปทำวิศวกรรมแอนติบอดี ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมให้ยีนของแอนติบอดีส่วน scFv เชื่อมต่อกับยีนของเอนไซม์ alkaline phosphatase เพื่อใช้เป็น ตัวตรวจสอบขั้นเดียว (one-step detection probe) ที่สะดวกต่อการใช้งาน และที่สำคัญคือ แอนติบอดีในรูป scFv-AP นั้น มีความไวในการตรวจสอบอะฟลาทอกซินมาก กว่าแบบ scFv เปล่าๆ ถึง ๓ เท่า ดังนั้นแนวทางการทำวิศวกรรมแอนติบอดีที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแอนติบอดีต่อสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กอย่างอื่นได้ดี

เหตุผลสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้โครงการวิจัยนี้ได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี น่าจะเป็นเพราะแหล่งที่มาของแอนติบอดีหรือคลังของแอนติบอดีนั้น ได้ถูกสร้างขึ้นมาจากเม็ดเลือดขาวของประชาชนที่มีสุขภาพดีในเขตจังหวัดนครราชสีมา ประมาณ ๑๕๐ คน (คลังย่าโม ๑) ซึ่งประชาการเหล่านี้ น่าจะมีจำนวนค่อนข้างสูง ที่เคยสัมผัสกับอาหารที่ปนเปื้อน ด้วยอะฟลาทอกซินมาก่อน ทำให้ร่างกายได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นต้านทานไว้แล้ว ดังนั้น คลังที่สร้างขึ้นจากประชาการกลุ่มนี้จึงมีแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติดี เมื่อเทียบกับคลังอื่น เช่นคลังกึ่งสังเคราะห์ หรือคลังที่สร้างจากประชากรในทวีปอเมริกาเหนือ ดังที่ได้วิจารณ์ไว้โดยละเอียดในบทความที่ได้ตีพิมพ์ไปแล้ว เพราะสามารถคัดหาแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีได้จากการ ทำ biopanning จากคลังย่าโม ๑ เพียงครั้งเดียว ดังนั้นจึงน่าจะสามารถนำคลังนี้ไปใช้ในการคัดหา แอนติบอดีต่อ สารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตรอื่นๆ ได้อีก โดยเฉพาะที่มักปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ แอนติบอดี scFv-AP ต่ออะฟลาทอกซิน ที่พัฒนาขึ้นมาได้จากโครงการนี้จะสามารถจับกับ สารพิษ อะฟลาทอกซินในรูปโมเลกุลเดี่ยว (soluble) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ปนเปื้อนมาในอาหาร ได้ดี และมีความไวในระดับที่ดีกว่า หรือเท่ากับแอนติบอดี อื่นๆ ที่ผลิตได้ด้วยเทคโนโลยีนี้ และมีความไวสูงพอที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนในอาหาร ได้ เพราะปริมาณขั้นต่ำของการปนเปื้อน อะฟลาทอกซินในอาหารจะอนุญาตให้มีได้ถึงระดับ 20 ppb แต่แอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นมาได้นี้ก็ยังมีความไวต่ำกว่า แอนติบอดีจากชุดตรวจสอบที่มีขายในท้องตลาด และที่เคยมีรายงานมาก่อน ทั้งที่เป็น polyclonal antibody และ monoclonal antibody ถึง ๑๐ เท่า คือ scFv-AP สามารถตรวจสอบความปนเปื้อนที่ระดับ 10 ppb แต่ แอนติบอดีแบบดั้งเดิมที่ใช้ในชุดตรวจสอบที่มีคุณภาพดีมักตรวจได้ถึงระดับ 1 ppb ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาความไวของแอนติบอดีนี้ให้ขึ้น ด้วยกระบวนการ affinity maturation ซึ่งเป็นวิธีการทางวิศวกรรมแอนติบอดี ที่มีประสิทธิภาพ ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วโดยละเอียดเนื้อหาของรายงานการวิจัยนี้ ต่อไป

สรุป และข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจในการผลิตแอนติบอดีต่อสารอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารพิษปนเปื้อนโมเลกุลเล็กจากเชื้อรา ที่เป็นสารก่อมะเร็งร้ายแรง และเป็นปัญหาต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย และประเทศอื่นๆ ที่อยู่ในสภาวะร้อนชื้น ทั่วโลก โดยสามารถทำการคัดหาแอนติบอดี ส่วน scFv ที่ความสามารถสูงในการจับกับ อะฟลาทอกซิน จากคลังแอนติบอดี ของมนุษย์ ชื่อคลัง “ย่าโม ๑” ซึ่งเป็นคลังที่ได้สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย โดยแอนติบอดีที่คัดหามาได้นี้ มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อ ทั้งเพื่อการรักษา และการตรวจวิเคราะห์ โดยในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้แสดงถึงศักยภาพของการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อน ด้วยการนำแอนติบอดีที่คัดหามาได้ ไปพัฒนาให้มีคุณสมบัติเหมาะสมยิ่งขึ้น ด้วยกระบวนการวิศวกรรมแอนติบอดี โดยการนำยีนของแอนติบอดีส่วน scFv ที่ได้คัดหามาจากคลังย่าโม ๑ ไปเชื่อมต่อกับยีนของเอนไซม์ อัลคาไล ฟอสฟาเทส แล้วนำมาแสดงออกในระบบการผลิตโปรตีนของแบคทีเรีย อีโคไล เพื่อสร้างให้เป็นตัวตรวจสอบแบบสำเร็จในขั้นเดียว ที่สะดวกต่อการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยจากการวิเคราะห์คุณสมบัติ และประสิทธิภาพของ แอนติบอดี แบบ scFv-AP ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นพบว่า แอนติบอดีชนิด scFv-AP ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ มีความไวในการตรวจวัดสาร อะฟลาทอกซิน มากกว่าแบบ scFv เปล่าๆ ถึง ๓ เท่า นอกจากนั้นแล้ว ผลจากโครงการวิจัยนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่า คลังของแอนติบอดี ย่าโม ๑ ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมานั้น มีคุณสมบัติเด่นกว่าคลังทั่วไป เพราะสามารถใช้เป็นแหล่งในการคัดหาแอนติบอดีต่อสารปนเปื้อนโมเลกุลเล็กทางการเกษตรที่มีคุณสมบัติดี ซึ่งอาจเป็นเพราะเป็นคลังที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างที่เป็นคนไทยในแถบจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีอัตราเสี่ยงต่อการบริโภคอาหารที่มี อะฟลาทอกซิน ปนเปื้อนสูง จึงอาจมีแอนติบอดีต่อสารนี้อยู่มาก กว่าคลังแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากประชากรในแถบอื่น หรือแบบกึ่งสังเคราะห์ ผลสำเร็จจากโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะเป็นนวตกรรม ต่างๆ ได้แก่ ยีน และ แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อ อะฟลาทอกซิน วิธีการในการคัดหาแอนติบอดีจากคลัง และรวมทั้งวิธีการทางวิศวกรรมแอนติบอดี เพื่อพัฒนาคุณสมบัติให้มีประสิทธิภาพดี ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนทางการเกษตร อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพสูง แล้ว ยังได้สร้างองค์ความรู้ใหม่ ซึ่งสามารถนำไป ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ที่ต้องผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิอีกด้วย ซึ่งผลสำเร็จที่ได้ทั้งหมดนี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอด ในการตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรอื่นๆ ทั้งที่เป็นสารโมเลกุลเล็ก และโมเลกุลใหญ่ ที่มีความสำคัญต่อผลผลิตทางการเกษตร ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ภาคผนวก

ก. การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการจากโครงการวิจัยนี้

ก.๑ การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มี peer review (impact factor 2.444)

Rangnoi K, Jaruseranee N, O'Kennedy R, Pansri P, Yamabhai M. **One-Step Detection of Aflatoxin-B(1) Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library**. Mol Biotechnol. 2011.

ก.๒ การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Rangnoi K, Pansri P, Kennedy RO, Yamabhai M. Selection of scFv antibody fragment specific to Aflatoxin by using phage display technology. Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environment. Queen Sirikit National Convention Center, 22-25 September2009.

Yamabhai M. Construction and application of a compact phage display human antibody library. BIT's 2nd Annual International Congress of Antibodies-2010,. Convention Center, Beijing, China, March 24-26 2010.

ประวัตินักวิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๙ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ post-doctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ดญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๓๖ เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต ๔ คน และดุษฎีบัณฑิต ๔ คน และเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยทั้งหมด ๒๒ โครงการ แล้วเสร็จ ๑๘ โครงการ

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐
โทร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๒-๔ ๒๒๔๒๓๔ หรือ ๒๔๔๓๘๘ โทรสาร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๐
Email: montarop@g.sut.ac.th