เพ็ญสุดา สมภูงา : การพัฒนาแอนติบอดีสายเดี่ยวปรับแต่งพันธุกรรมสำหรับตรวจสอบซีราลีโนนโดยใช้เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจ (DEVELOPMENT OF RECOMBINANT scFv ANTIBODY FOR THE DETECTION OF ZEARALENONE BY PHAGE DISPLAY ANTIBODY TECHNOLOGY) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย, 97 หน้า.

ซีราลีโนนจัดเป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นสารพิษที่ถูกผลิตขึ้นจากเชื้อราในตระกูลฟูซาเรียม (*Fusarium* spp.) สามารถเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร มนุษย์และสัตว์ จากธัญพืชที่ปนเปื้อนและตกค้างในสิ่งปฏิกูลหรือน้ำธรรมชาติ จึงเป็นภัยคุกคามต่อสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่าและมนุษย์ ดังนั้นการตรวจสอบซีราลีโนนจึงเป็นเรื่องที่สำคัญมากในด้านความปลอดภัยในอาหาร วิทยานิพนธ์นี้เป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการการพัฒนาแอนติบอดีชนิดเส้นเดี่ยวที่จำเพาะต่อซีราลีโนน โดยได้ทำการคัดหาจากคลังแอนติบอดีมนุษย์แบบปฐมภูมิ ซึ่งเป็นคลังเฟจที่แสดงแอนติบอดีแบบเส้นเดี่ยว (เอสซีเอฟวี) บนผิวเฟจ (คลังย่าโม) และคลังแอนติบอดีกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยสารพิษจากเชื้อรา โดยในการคัดเลือกแอนติบอดีจากทั้งสองคลังได้ทำการสลับชนิดของโปรตีนที่เชื่อมต่อกับสารพิษ คือใช้ ซีราลีโนนเชื่อมกับ Bovine Serum Albumin (BSA) และซีราลีโนนที่เชื่อมกับ ovalbumin (OVA) เพื่อเพิ่มโอกาสของการคัดหาให้ได้โคลนที่สามารถจับจำเพาะกับสารพิษจากเชื้อราในรูปแบบอิสระที่ปนเปื้อนอยู่ในธรรมชาติ ผลการคัดหาจากคลังแอนติบอดีกระต่าย พบว่าสามารถคัดหาเฟจได้หนึ่งโคลน ตั้งชื่อว่า bZD2B4 สามารถตรวจสอบปริมาณสารพิษจากเชื้อราซีราลีโนนที่ในช่วงสมการเชิงเส้น 50-5,000 ng/ml ค่า IC_{50} คือ 50 ng/ml ส่วนคลังแอนติบอดีมนุษย์ย่าโม ๑ สามารถคัดหาเฟจ ที่แสดงแอนติบอดีเอสซีเอฟวี ที่จำเพาะเจาะจงกับสารพิษจากเชื้อราซีราลีโนนได้ 1 โคลน ตั้งชื่อว่า yZA8B2 จากนั้นได้ทำการตัดชิ้นส่วนของยีนเอสซีเอฟวีไปไว้ในพลาสมิดที่เหมาะสม เพื่อนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปของ scFv และ scFv-AP แล้วได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะต่อสารพิษจากเชื้อราซีราลีโนนโดยวิธีอีไลซ่าแบบยับยั้ง พบว่า ค่า IC_{50} ของ yZA8B2 scFv และ scFv-AP คือ 100 และ 20 ng/ml ตามลำดับ จากนั้นได้ทำการปรับสภาวะการทำปฏิกริยาอิไลซ่าให้เหมาะสมขึ้นจนทำให้ ความไวของแอนติบอดี yZA8B2 scFv และ scFv-AP ได้รับการปรับปรุงให้ดีขึ้น 2 เท่าและ 40 เท่า ตามลำดับ ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีโดยการทดสอบการข้ามไปจับกับสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้แก่ อะฟลาท็อกซินบี 1, โอคราท็อกซิน เอ, ดีออกซีนิวาลีนอล และฟูโมนิซิน พบว่าไม่จับกับสารพิษจากเชื้อราเหล่านั้น นอกจากนั้นแล้วได้นำแอนติบอดีทั้งสองรูปแบบมาตรวจสอบความสามารถในการตรวจซีราลีโนนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวโพดและข้าวสาลี ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่า แอนติบอดีทั้งสองรูปแบบสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ในทางเชิงคุณภาพ จากการศึกษาแบบจำลองโครงสร้างการจับกันระหว่าง

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ปรับแต่งพันธุกรรมกับสารพิษจากเชื้อราซีราลีโนน ได้รับการยืนยันว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์โคลน yZA8B2 สามารถจับแบบจำเพาะเจาะจงกับสารพิษจากเชื้อราซีราลีโนน โดยมีแอนติบอดีส่วนเส้นหนักมีบทบาทสำคัญ ผลงานวิจัยทั้งหมด สรุปได้ว่าสามารถใช้เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ปรับแต่งพันธุกรรมที่สามารถจับกับสารพิษจากเชื้อราซีราลีโนนได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถตรวจหาสารพิษจากเชื้อราซีรารีโนนที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกษตรและธัญพืช ภายใต้ข้อบังคับตามมาตรฐานของประเทศไทย จึงอาจใช้แอนติบอดีที่ได้จากการวิจัยเป็นต้นแบบในการพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อน ด้วยวิธีการทางอิมมูนอื่นๆ อีกทั้งแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นมาได้นี้ยังอาจเป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ในอนาคต เนื่องจากแอนติบอดีนี้มีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา เพ็ญจิดา สัมฤาชา

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

PENSUDA SOMPUNGA : DEVELOPMENT OF RECOMBINANT scFv ANTIBODY FOR THE DETECTION OF ZEARALENONE BY PHAGE DISPLAY ANTIBODY TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 97 PP.

RECOMBINANT scFv ANTIBODY/ZEARALENONE/ELISA/PHAGE DISPLAY ANTIBODY TECNOLOGY

Zearalenone (ZEN) is a nonsteroidal estrogenic mycotoxin, produced as a secondary metabolite of *Fusarium* spp. It enters the food and feed chains from contaminated cereals and infiltrates into sewage or natural waters, posing a potential threat to exposed livestock, wildlife and humans. Therefore, establishing sensitive and specific methods to detect ZEN has become very important for food and feed safety reasons. This thesis involved identification, engineering and characterization of recombinant single chain variable fragment (scFv) antibodies against ZEN from the human phage display antibody library (Yamo I) and the immunized rabbit mix library. The antibodies were selected from these two libraries by switching the conjugated proteins, i.e., bovine serum albumin (BSA)-ZEN and ovalbumin (OVA)-ZEN, to increase the chance of obtaining clones that can bind to free toxin. For the immunized scFv rabbit antibody library, one phage clone, designated bZD2B4, was selected. This phage-displayed scFv could be inhibited by soluble ZEN at the linear range of 50-5,000 ng/ml by competitive ELISA. The detection limit of this clone was approximately 50 ng/ml. However, the antibody in the soluble scFv format could not bind to free ZEN. For the Yamo I library, one phage-displayed scFv clone specific to

free ZEN, designated yZA8B2, was isolated. The yZA8B2 soluble scFv format could bind to free ZEN; therefore, this clone was subcloned into the pET21d+ and pKP300 delta III vectors to express scFv and scFv-AP antibody formats. Competitive ELISA indicated that the median inhibition concentration (IC_{50}) of recombinant yZA8B2 scFv antibody and scFv-AP fusion were 100 and 20 ng/ml. After ELISA optimization by the checkerboard titration method, the sensitivity of recombinant yZA8B2 scFv antibody and scFv-AP fusion was improved approx. 2-fold and 40-fold, respectively. No cross-reactivity to other mycotoxins; i.e., (aflatoxin B1 (AFB1), ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), and fumonisins B1 (FUM)), was observed. Finally, the ability of recombinant yZA8B2 scFv and scFv-AP antibodies for the detections of ZEN contamination in corn and wheat samples were investigated. The yZA8B2 scFv and scFv-AP can be used to qualitatively detect zearalenone contamination in corns and wheat. Homology modeling study illustrated specific binding of the recombinant antibody to ZEN and confirmed the better fit of human yZA8B2 antibody as well as the role of the variable heavy chain in the binding. In conclusion, the recombinant monoclonal antibody specific to zearalenone could be obtained from phage display technology and detected zearalenone contamination in certain agricultural and cereal products, according to the Thai's regulations. This antibody can be used as a template to further develop the quantification of contaminated ZEN in food and feed using different immuno-based methods. Moreover, this antibody could be useful for medical applications in the future because of its human origin.

School of Biotechnology Student's Signature _____

Academic Year 2017 Advisor's Signature _____