กุณฑลี ร่างน้อย : การพัฒนาแอนติบอดีดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน (DEVELOPMENT OF RECOMBINANT ANTIBOY FOR THE DETECTION OF AFLATOXIN) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย, 128 หน้า.

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ซึ่งผลิตมาจากจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* พบปนเปื้อนในอาหารคนและสัตว์ รวมทั้งผลิตผลทางการเกษตรอื่นๆ ด้วยความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินจึงทำให้ในหลายประเทศต้องมีการกำหนดระดับที่สามารถปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้ง อาหารมนุษย์และสัตว์เพื่อความปลอดภัย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ในการตรวจหาอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยวิธีทางอิมมูน เป็นวิธีการที่มีขั้นตอนที่สะดวก รวดเร็ว และมีความคุ้มทุนมากที่สุด วิธีการดังกล่าวนี้ อาทิเช่น การตรวจบนจานหลุมทดสอบ (อีไลซ่า) หรือแผ่นตรวจสอบ เป็นวิธีการที่ต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะ และความไว ในการจับกับอะฟลาทอกซินเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบสำหรับตรวจสอบ จากงานวิจัยที่ผ่านมา ได้ทำการคัดเลือกแอนติบอดีเส้นเดี่ยวที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซิน ชื่อ YAF-C3 จากคลังเฟจที่แสดงแอนติบอดีมนุษย์แบบปฐมภูมิ ซึ่งเป็นคลังเฟจซึ่งแสดงแอนติบอดีมนุษย์แบบเส้นเดี่ยว (เอสซีเอฟวี) บนผิวเฟจ (คลังย่าโม) อย่างไรก็ตามเอสซีเอฟวีนี้ไม่สามารถตรวจจับอะฟลาทอกซินได้ในระดับที่นานาชาติยอมรับ ดังนั้น จึงได้มีการทำการสลับสับเปลี่ยนชิ้นส่วนแอนติบอดี เพื่อทำการปรับปรุงประสิทธิภาพของเอชซีเอฟวีนี้ ให้มีความจำเพาะ และมีความไวต่ออะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น โดยหลังจากทำการคัดเลือกจำนวน 3 รอบ พบว่า โคลนชื่อ sAFH-3E11, sAFH3F11 และ sAFH-3E3 มีความไวในการจับกับอะฟลาทอกซินได้ดีกว่าโคลนเริ่มต้นตั้งแต่ 3-7.5 เท่า โดยโคลน sAFH-3E3 มีความไวในการจับกับอะฟลาทอกซินมากที่สุด จึงได้นำโคลนนี้มาศึกษาโครงสร้างสามมิติ และศึกษากลไกการจับกันของโมเลกุล เพื่อเปรียบเทียบกับโคลนต้นแบบ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโคลนsAFH-3E3 พบว่ามีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากโคลนเริ่มต้นที่บริเวณ แกนหลักชิ้นที่ 1 และ ซีดีอาร์ 1 ในส่วนของแอนติบอดีที่มีความแปรปรวนสูงสายหนัก รวมทั้งสิ้น 5 กรดอะมิโน หลังจากนั้น เอชซีเอฟวีแอนติบอดีนี้ได้นำมาดัดแปลงให้อยู่ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ เอชซีเอฟวีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์อาลคาไลฟอสฟาเตส (scFv-AP) เอชซีเอฟที่เชื่อมอยู่กับส่วนคงที่ของสายแอนติบอดี (scFv-Fc) และแอนติบอดีเต็มรูปแบบ (IgG) ซึ่งแอนติบอดีรูปแบบ scFv-AP สามารถผลิตได้ในอีโคไล ส่วน scFv-Fc และIgG สามารถถูกผลิตได้ปริมาณสูงในเซลล์มนุษย์ (HEK293-6E) จากนั้นได้นำแอนติบอดีรูปแบบเหล่านี้มาตรวจสอบความไวในการจับกับอะฟลาทอกซินด้วยวิธีอีไลซ่าแบบแข่งขัน ซึ่งพบว่ารูปแบบ scFv-AP มีความไวสูงที่สุด และมีความสะดวกที่สุด จึงมีความเหมาะสมที่จะพัฒนา

ใช้แอนติบอดีรูปแบบนี้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินด้วยวิธีอีไลซ่า นอกจากนั้นแล้วยังได้นำแอนติบอดีรูปแบบ IgG ที่มีความไวในการจับใกล้เคียงกับรูปแบบเอสซีเอฟวี มาพัฒนาด้วยการเชื่อมต่อกับอนุภาคทองและลาเท็กซ์ เพื่อใช้เป็นสารตรวจสอบบนแผ่นตรวจสอบ หลังจากทำการทดสอบโดยการเติมอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้นต่างๆลงในสารสกัดจากข้าวโพด แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอีไลซ่า และวิธีอิมมูโนบนแผ่นตรวจสอบ พบว่าแอนติบอดีที่พัฒนามาได้นี้สามารถใช้ในการตรวจจับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ค่าต่ำสุดประมาณ 20 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลจากการศึกษาแสดงว่า แอนติบอดีที่พัฒนามาได้นี้ มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำมาพัฒนาให้เป็นชุดตรวจสอบสำหรับตรวจวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรในรูปแบบต่างๆได้ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

KUNTALEE RANGNOI : DEVELOPMENT OF RECOMBINANT ANTIBODY FOR THE DETECTION OF AFLATOXIN. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 128 PP.

RECOMBINANT ANTIBODY/AFLATOXIN/CHAIN SHUFFLING/ELISA/ LATERALFLOW/IMMUNOASSAY

Aflatoxins are carcinogenic toxins that produced from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. These toxins are commonly found to contaminate in agricultural products, human food and animal feed. Because of their effects on human and animal health, many countries around the world have set their maximum level for aflatoxin contamination. Therefore, an effective method for aflatoxin detection is required. Immuno-based method, such as Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) and lateral flow immunoassay, is a rapid, sensitive and cost-effective method for the detection of aflatoxin. This method needs high sensitivity antibody as a detection reagent. Previously, an anti-aflatoxin scFv antibody, named YAF-C3 was isolated from a naïve phage display antibody library (YAMO library). However, this clone was not sensitive enough for detecting the aflatoxin at the limit concentration, provided by CODEX international standard legislation. Therefore, the chain shuffling and phage display techniques were used to improve the affinity and sensitivity of the scFv antibody (affinity maturation). After three round of affinity selection, three clones designated sAFH-3E11, sAFH3F11 and sAFH-3E3, showing 3-7.5-folds sensitivity improvement over the original scFv clone, were isolated. The three dimensional structure of clone sAFH-3E3 scFv which, showed the highest sensitivity was predicted

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

and the interaction with aflatoxin was studied by molecular docking. Amino acid sequence analysis indicated five amino acid mutations in framework 1 (FR1) and CDR1 regions of variable domain of heavy chain (V_H). In addition, the affinity matured scFv fragments were engineered to generate three formats of recombinant antibodies, i.e., scFv-AP, scFv-Fc and full length IgG. The scFv-AP was successfully expressed in *Eschericia coli*, while the scFv-Fc and IgG could be expressed at high yields in human cell (HEK293-6E). Competitive ELISA was performed to compare the sensitivity of these various formats. The scFv-AP showed the highest sensitivity in ELISA. Therefore, this format was further developed for the detection of aflatoxin in agricultural products. Moreover, the full-length antibody clone sAFH-3E3 IgG, which showed the similar sensitivity to scFv fragment, was conjugated with colloidal gold and latex particles, and used as detection reagent in a lateral flow immunoassay. Spike experiment using corn sample indicated that the detection limit of scFv-AP and IgG were 20 and 5 ng/ml for ELISA and lateral flow immunoassay, respectively. This improved clone has potential to be used as detecting reagent for aflatoxin contamination in agricultural products in various immune-detection kits in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2016 Advisor's Signature_____