

รหัสโครงการ SUT3-304-62-12-17



รายงานการวิจัย

การผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารพิษ
จากเชื้อรา

Development of recombinant antibody for the detection
of mycotoxins

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-62-12-17



รายงานการวิจัย

การผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารพิษ
จากเชื้อรา

Development of recombinant antibody for the detection
of mycotoxins

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภักย์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

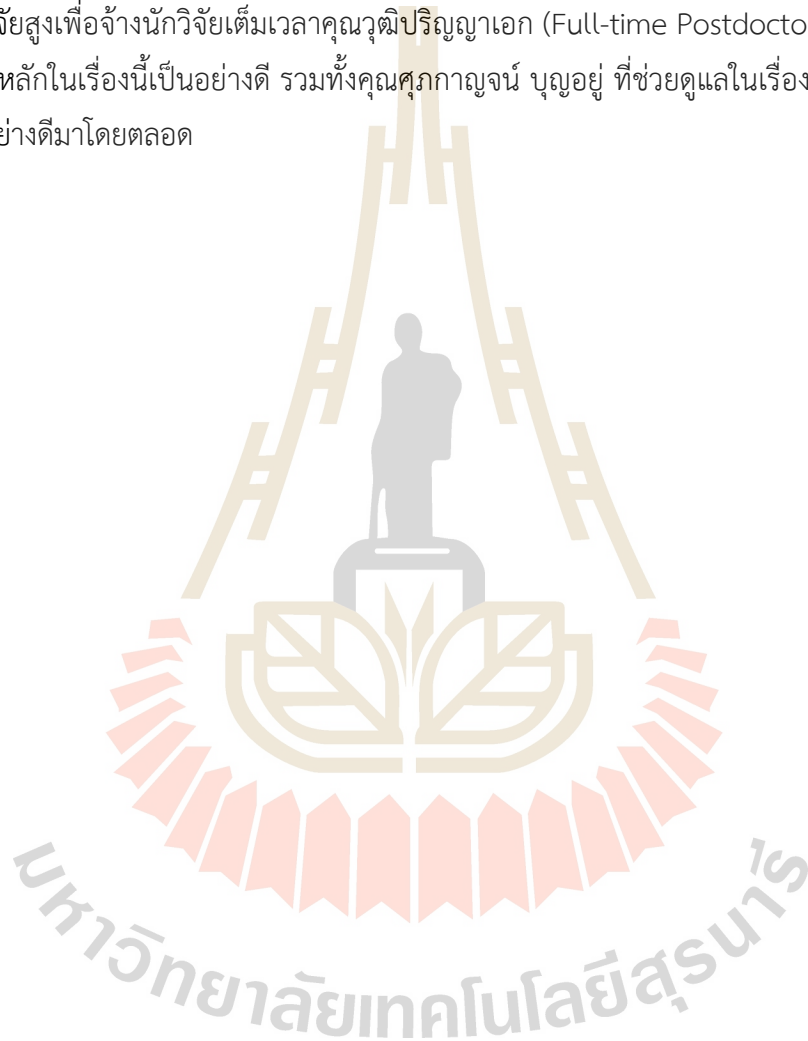
สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๖๒ – ๒๕๖๒
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม ๒๕๖๔

กิตติกรรมประกาศ

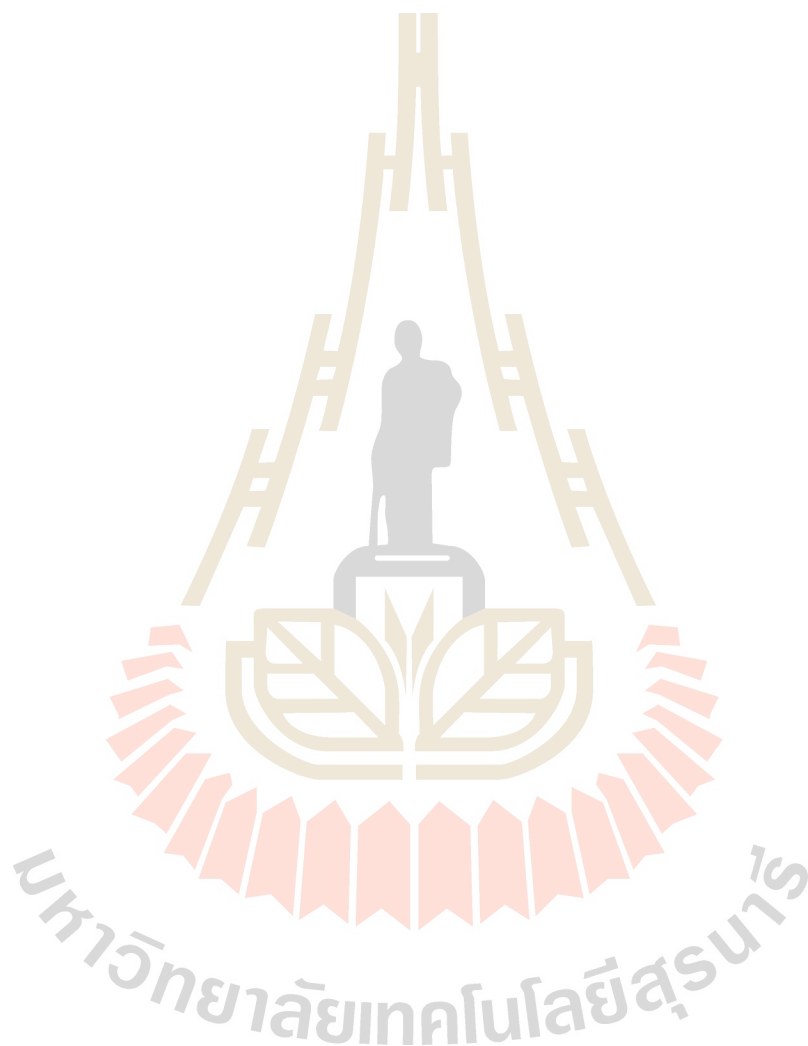
การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๒ เพียง ๑ ปี โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวเพ็ญสุตา สมภูงา ผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาโท และ ดร. กุณทลี รังน้อย นักวิจัยหลังปริญญาเอกทุนสนับสนุนคณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาเอก (Full-time Postdoctoral Researcher) ที่เป็นทำงานวิจัยหลักในเรื่องนี้เป็นอย่างดี รวมทั้งคุณศุภกัญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด



บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการ การผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา นี้ อันที่จริงเป็นโครงการที่วางแผนการดำเนินการเป็นระยะเวลา ๓ ปี แต่ได้รับการสนับสนุนในปีแรกเพียงปีเดียว แล้วต้องปิดโครงการไปก่อน แม้กระนั้น ผู้วิจัยยังสามารถดำเนินการวิจัยมาได้ระดับหนึ่ง จนได้ผลที่น่าสนใจมารายงาน โดยมีงานหลักที่ได้ทำ ๓ ส่วน ส่วนแรกเป็นการต่อยอดผลโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สวทช. ซึ่งผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการใช้เทคโนโลยีเฟจ ในการสร้างแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมต่อ สารพิษจากเชื้อรา ๒ ชนิดคือ aflatoxin และ zearalenone ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่อยู่ในรูป scFv และ scFv-AP ในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติแอนติบอดีในรูป scFv, scFv-AP, scFv-GFP, scFv-Fc และรูปแบบธรรมชาติคือ IgG ในการใช้ตรวจวัด mycotoxin โดยแอนติบอดีที่อยู่ในรูปแบบ scFv, scFv-AP, และ scFv-GFP นั้น ใช้สำหรับการตรวจสอบแบบ ELISA ส่วนแอนติบอดีแบบ scFv-Fc และ IgG นั้น ใช้ในการตรวจแบบ lateral flow หรือ strip test ซึ่งต้องมีการ conjugate antibody กับตัวให้ สัญญาณ ที่เหมาะสม ผลการศึกษาในส่วนนี้ สรุปได้ว่า แอนติบอดีแบบ scFv-AP มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด ในการใช้ ในการตรวจสอบบน ELISA plate สามารถผลิตออกมาจากระบบการผลิตใน *E. coli* ได้ แต่ยังอยู่ในปริมาณ ที่ค่อนข้างต่ำ ส่วนแอนติบอดีในรูปแบบ IgG นั้นพบว่ามันสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแบบแถบ วิเคราะห์ lateral flow หรือ strip test ได้ดี และสามารถผลิตออกมาได้ในปริมาณค่อนข้างสูง จากระบบ การผลิตในเซลล์สัตว์ ส่วนที่ ๒ เกี่ยวของกับแอนติบอดีในรูปแบบ IgG ที่พบในธรรมชาติ และถูกใช้ประกอบ เป็นชุดตรวจวิเคราะห์ ทางการค้าในปัจจุบัน โดยในงานวิจัยที่ผ่านมา ผู้วิจัยใช้ platform ของผู้ร่วมวิจัยใน ต่างประเทศในการผลิตแอนติบอดีแบบ IgG จึงมีข้อจำกัดในการใช้งาน โดยเฉพาะหากต้องการนำออกสู่เชิง พาณิชย์ ดังนั้นในส่วนที่ ๒ ของโครงการ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะสร้าง platform สำหรับการเปลี่ยนแอนติบอดี ในรูปแบบ scFv ให้เป็น IgG ขึ้นในห้องปฏิบัติการเอง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา และผลิตชุดตรวจสอบสำหรับ ใช้ในประเทศในระยะยาวต่อไป ผลการดำเนินงานสรุปได้ว่าสามารถสร้าง platform ที่มีประสิทธิภาพในการ ผลิต IgG เพื่อใช้ตรวจสอบ mycotoxin ตามเป้าหมายของโครงการวิจัยได้สำเร็จ ในส่วนที่ ๓ ผู้วิจัยได้ริเริ่ม ทำงานวิจัยต่างๆ ที่จะเป็พื้นฐานในการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการใช้ประยุกต์ใช้แอนติบอดีประกอบเป็นชุด ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน mycotoxin อย่างรวดเร็วและแม่นยำเพิ่มเติม ได้แก่ การทำ epitope mapping เพื่อหา mimotope ของ แอนติบอดี โดยใช้แอนติบอดีต่อ Aflatoxin และ Zearalenone เป็นต้นแบบ โดย ผู้วิจัยสามารถค้นพบ mimotope ของทั้ง ๒ antibody จากการทำ biopanning ด้วย phage display peptide library SUT12 ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งหากทำการทดลองเพิ่มเติมต่อไป อาจนำไปใช้แทนที่ conjugated mycotoxins ในชุดตรวจสอบแบบ rapid test ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และปลอดภัยขึ้นด้วย นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยยังได้ริเริ่มลอง เชื่อม antibody กับตัวให้สัญญาณประเภท Silver nanocomposite โดยถือเป็นการริเริ่มความร่วมมือกับ อาจารย์รุ่นใหม่จาก มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งผลงานในส่วนนี้ ยังอยู่ ในช่วงต้นของการทดลอง ในเบื้องต้นพบว่าสามารถ conjugate ได้แล้ว แต่จะต้อง optimize สภาวะต่างๆ อีกหลายขั้นตอน ก่อนจะสามารถนำมาใช้ประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ใน

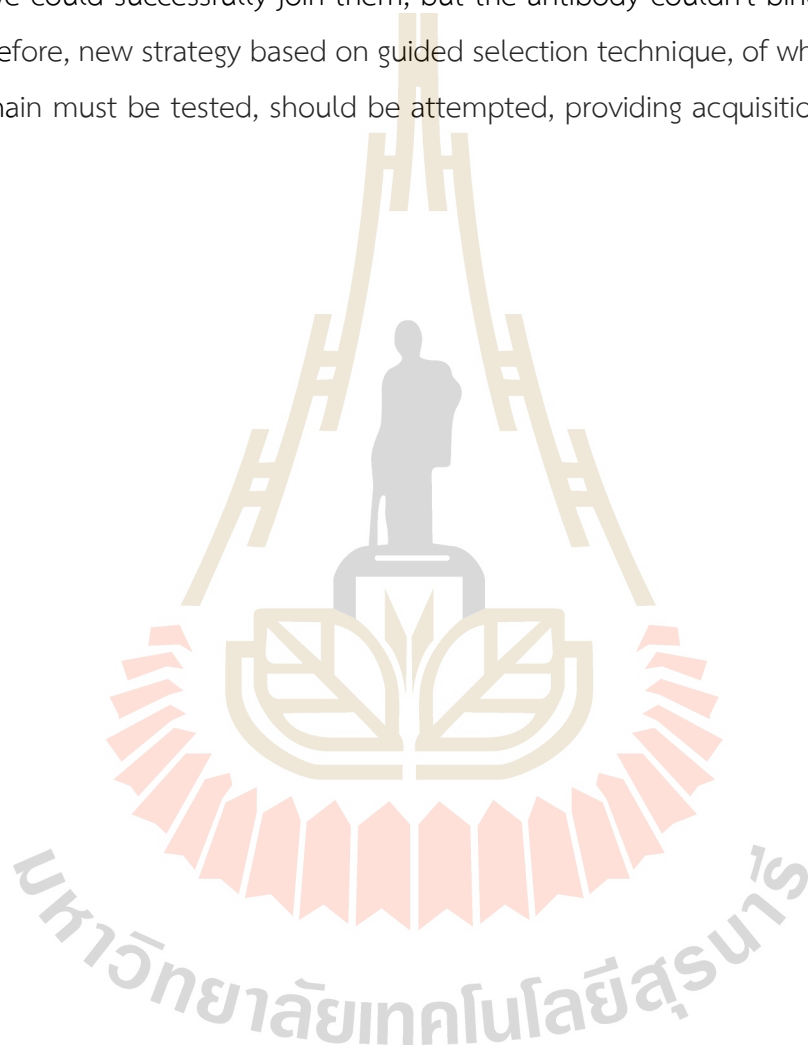
พื้นที่จริงต่อไปได้ และท้ายสุด ผู้วิจัยได้พยายามริเริ่ม ใช้เทคนิค chain shuffling พัฒนาความแรงในการจับของแอนติบอดี โดยใช้แอนติบอดีจากหนุ่ส่วน heavy chain มารวมกับ light chain แอนติบอดีมนุษย์จากโครงการนี้ แต่เมื่อรวมแล้วพบว่า แอนติบอดีทำงานไม่ได้คือไม่จับกับเป้าหมาย จึงต้องพัฒนาต่อด้วยวิธี guided selection คือเลือกคู่จาก library ของ light chain ทั้งหมดที่มีอยู่ ซึ่งอาจมีโอกาสำเร็จ หากได้รับทุนสนับสนุนต่อไป



บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research project entitled "Development of recombinant antibody for the detection of mycotoxins" was originally planned for a period of 3-year. Unfortunately, the project was only supported for the first year; therefore, only the first part of the project is reported. Nevertheless, interesting results have been achieved. These results can be divided into 3 main parts. The first part is the continuation of the outputs from the research projects granted by ARDA, of which two recombinant antibodies against two mycotoxins, namely aflatoxin and zearalenone have been successfully created using phage display technology. These antibodies are in the form of scFv and scFv-AP. In this research project, the binding property of various formats of anti-mycotoxin antibodies, i.e., scFv, scFv-AP, scFv-GFP, scFv-Fc, and IgG, which is the natural form have been compared. The antibody in scFv, scFv-AP and scFv-GFP were investigated using ELISA-based method; while scFv-Fc and IgG were tested using lateral flow or strip test, of which the antibodies must be conjugated with appropriate tag. The results indicated that the scFv-AP performed the best in ELISA-based assay and can be produced from *E. coli* expression system at a relatively low level. For lateral flow or strip-test, the best performance format of antibody is IgG, which could be produced from animal expression system at a relatively high level. The second part of the project involved IgG, the form of antibody that is found in nature and currently use in all commercial test kits. In the previous work, the IgG was constructed using a platform of our international collaborators, which has limitation for further distributions and commercialization. Therefore, the second part of this project is focused on the development of our laboratory's platform for the conversion of scFv to IgG, which will be used for further studies as well as incorporation into test kits for commercial uses in Thailand. In summary of our results in the second part of the projects suggested that an effective platform for the production of IgG for mycotoxin detection has been successfully established. The third part of our project deals with various basic research experiments that can be used as the basis for the development of novel techniques for rapid point-of-detection of mycotoxin in the field. These include epitope mapping to identify mimotope of two model antibodies, namely anti-aflatoxin and anti-zearalenone. The mimotopes of both antibodies were successfully obtained using the laboratory's phage display random peptide library, named SUT12. These mimotopes could be further developed to replace conjugated mycotoxins in a rapid test kit, which can reduce the cost and increase safety. Next, we have initiated a collaborative research project with a

young staff from Ubon Ratchathani University, on the conjugation of recombinant antibody with silver nanocomposite. This project is ongoing. So far, we successfully conjugated our recombinant antibody with the nanomaterial, but various conditions must be optimized before it can be used in a rapid test kit. Finally, we have also tried to implement chain shuffling technique to further increase binding affinity of our antibody by joining the heavy chain of mouse antibody with the light chain of human antibody. However, we found that even though we could successfully join them, but the antibody couldn't bind to the target anymore. Therefore, new strategy based on guided selection technique, of which a library of human light chain must be tested, should be attempted, providing acquisition of adequate funding.



สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1.....	1
บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2.....	3
ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สารพิษจากเชื้อรา และการตรวจวิเคราะห์.....	3
2.1 ขนาด แนวนุ่ม และโอกาสทางการตลาด	5
2.2 แนวทางการพัฒนาเทคโนโลยีต้นแบบในการผลิต recombinant antibody ต่อ mycotoxin	5
บทที่ 3.....	6
วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย	6
3.1 การศึกษาความสามารถในการทำงานของแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนจากเชื้อรา	6
3.2 การพัฒนา platform การเปลี่ยน แอนติบอดีในรูป scFv เป็น IgG.....	7
3.2.1 การสร้าง expression vector	7
3.2.2 การนำ expression vector เข้าเซลล์.....	8
3.2.3 การผลิต และการทำแอนติบอดีที่ผลิตออกมาได้ให้บริสุทธิ์.....	9
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการจับกับเป้าหมายของแอนติบอดีที่ได้ผลิตขึ้นมา.....	11

3.3 การริเริ่มพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อนำแอนติบอดีไปใช้เป็นชุดตรวจสอบจริง.....	12
3.3.1 การทำ epitope mapping เพื่อหา mimotope ของ แอนติบอดีต่อ Aflatoxin และ Zearalenone	12
3.3.3 การเชื่อม antibody กับตัวให้สัญญาณ เพื่อการประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบรวดเร็ว	13
3.3.3 การพัฒนาความแรงในการจับด้วยวิธีการ chain shuffling และ guided selection	14
บทที่ 4 บทสรุป	19
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	19
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย.....	21
ภาคผนวก.....	24
ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร.....	24
ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน.....	25
ภาคผนวก ค งานวิจัยที่กำลังรอดตีพิมพ์.....	26
ประวัตินักวิจัย	44



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ ๑ ภาพ expression vector สำหรับผลิต H-chain และ L-chain เพื่อประกอบเป็น IgG ของแอนติบอดีต่อ Aflatoxin	8
รูปที่ ๒ ภาพ expression vector สำหรับผลิต H-chain และ L-chain เพื่อประกอบเป็น IgG ของแอนติบอดีต่อ Zearalenone	8
รูปที่ ๓ ภาพแสดงขั้นตอนการ transfection H-chain และ L-chain vector เข้าสู่เซลล์	9
รูปที่ ๔ ภาพแสดงการผลิต และการทำบริสุทธิ์ แอนติบอดีแบบ IgG ต่อ aflatoxin	10
รูปที่ ๕ ภาพแสดงการผลิต และการทำบริสุทธิ์ แอนติบอดีแบบ IgG ต่อ zearalenone	10
รูปที่ ๖ ภาพแสดงว่าแอนติบอดียังคงความสามารถในการจับกับเป้าหมายคือ aflatoxin	11
รูปที่ ๗ ภาพแสดงว่าแอนติบอดียังคงความสามารถในการจับกับเป้าหมายคือ aflatoxin	11
รูปที่ ๘ ภาพแสดงผลการทำ epitope mapping แอนติบอดีต่อ aflatoxin	12
รูปที่ ๙ ภาพแสดงผลการทำ epitope mapping แอนติบอดีต่อ zearalenone	13
รูปที่ ๑๐ ภาพแสดงขั้นตอนการ conjugate แอนติบอดีกับ Ag ₃ PO ₄ /Ag nanocomposite	14
รูปที่ ๑๑ ภาพแสดงผลการวิเคราะห์การเชื่อมต่อของแอนติบอดีกับ nanoparticle ด้วยวิธี fluorescence scanning spectrometry	14
รูปที่ ๑๒ ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนแอนติบอดีส่วน heavy chain ของหนูที่จับกับ aflatoxin	15
รูปที่ ๑๓ ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนยีนแอนติบอดีหนูและมนุษย์	15
รูปที่ ๑๔ ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนยีน scFv และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการ gel purification	16
รูปที่ ๑๕ ภาพแสดงขั้นตอนการโคลน scFv เข้าสู่ pMOD1.1	17
รูปที่ ๑๖ ภาพแสดงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนแอนติบอดี scFv ที่ทำการ chain shuffling ระหว่าง VH ของหนู และ VL ของมนุษย์ ที่จับกับ aflatoxin	18

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ผลผลิตทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของทั้งมนุษย์และสัตว์ ด้วยเหตุนี้ทั่วโลกจึงให้ความสำคัญทางด้านความปลอดภัยของอาหารทั้งด้านปริมาณและคุณภาพในการผลิต เพื่อสนองคามต้องการของผู้บริโภค ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีทั้งแหล่งปลูก ความหลากหลายของพันธุ์พืช และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถผลิตสินค้าเกษตรได้ตลอดทั้งปี มีการลงทุนในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีทั้งปริมาณและคุณภาพ เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะปลูก และหลังการเก็บเกี่ยวที่อาจส่งผลกระทบต่อความสูญเสียของผลผลิต มีสาเหตุหลักส่วนใหญ่มาจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อรา และแบคทีเรีย เป็นต้น โดยเฉพาะเชื้อรา ที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเกิดการเน่าเสีย คุณภาพไม่ได้มาตรฐาน และที่สำคัญคือ เชื้อราหลายชนิดผลิตสารเมตาบอไลต์ ซึ่งเป็นสารพิษ ที่เป็นอันตรายร้ายแรงต่อผู้บริโภค

ปัจจุบันทุกประเทศทราบและตระหนักถึงอันตรายของสารพิษจากราที่อาจปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นแหล่งอาหารทั้งมนุษย์และอาหารสัตว์ ซึ่งนอกจากจะได้รับผลกระทบโดยตรงจากสารพิษแล้ว มนุษย์ยังมีโอกาสได้รับสารพิษอีกทางอ้อม จากการบริโภคเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้นด้วย เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้มีสุขภาพดี และได้บริโภคอาหารที่ปลอดภัย จึงได้มีการกำหนดปริมาณสูงสุดของสารพิษที่อนุญาตให้มีปนเปื้อนได้ในผลิตผลเกษตรที่เป็นอาหารของมนุษย์ และสัตว์ขึ้น ซึ่งหนึ่งในการเฝ้าระวังไม่ให้มีสารพิษปนเปื้อนผลผลิตทางการเกษตร และผลิตภัณฑ์อาหารเกินกว่าเกณฑ์มาตรฐานตามกฎหมายกำหนดนี้ คือการตรวจหาการปนเปื้อนปริมาณสารพิษจากเชื้อรา ซึ่งมีวิธีการตรวจหาหลักๆ อยู่ ๒ วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีการทางแอนติบอดี แต่วิธีทางเคมีต้องทำในห้องปฏิบัติการชั้นสูงโดยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญและทักษะเป็นอย่างมาก อีกทั้งการวิเคราะห์ ต้องทำสารตัวอย่างให้สะอาดบริสุทธิ์เสียก่อน ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ทำให้เสียเวลา และค่าใช้จ่ายสูงมาก อาจทำได้เฉพาะในหน่วยงานของรัฐ หรือเอกชนที่ทำหน้าที่เฉพาะด้านนี้ ส่วนวิธีการอีกอย่างหนึ่งที่นิยมคือ ใช้วิธีการทางแอนติบอดี ด้วยเทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และตรวจแบบแถบวิเคราะห์ (lateral flow) ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องมีความเชี่ยวชาญพิเศษ ก็สามารถทำการวิเคราะห์ได้ ซึ่งคุณภาพในการวิเคราะห์ขึ้นกับแอนติบอดี ที่เตรียมได้จากสัตว์ชนิดต่างๆ หากมีแอนติบอดีที่ดี ก็จะมี ความแม่นยำในการตรวจวัดได้สูงมาก

คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงอันตรายร้ายแรงของสารพิษจากเชื้อรา ที่ปนเปื้อนผลผลิตทางการเกษตร จึงได้มุ่งมั่นที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราชนิดต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นให้ใช้งานได้ง่าย ราคาถูก เหมาะสมสำหรับเกษตรกรและบุคคลทั่วไปที่ห่วงใยในสุขภาพ โดยใช้หลักการตรวจสอบแบบ

ELISA โดยจะพัฒนาปรับปรุงให้มีความไวต่อ สารพิษกว่าเดิมด้วยเทคโนโลยีเฟจและวิศวกรรมแอนติบอดี โดยมีความมุ่งหวังว่า การพัฒนานี้จะช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบสารพิษที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ ทำให้เกษตรกรตั้งแต่ในระดับรากหญ้า จนถึงผู้ผลิตขนาดใหญ่ สามารถเข้าถึงได้ เพิ่มประสิทธิภาพการป้องกัน และเฝ้าระวังไม่ให้เกิดภัยคุกคามทางการเกษตรมีการปนเปื้อนด้วยสารพิษจากเชื้อราทำให้ทั้งมนุษย์และสัตว์ได้บริโภคอาหารที่ปลอดภัย ไม่เกิดปัญหาในการส่งออกสินค้าและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นของคนไทย และมนุษยชาติอย่าง ยั่งยืนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสร้าง platform การผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่จับจำเพาะต่อสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญทางการเกษตร ที่มีโครงสร้าง (format) ต่างๆ กัน เพื่อให้มีความเหมาะสมในการนำไปปรับใช้ในการตรวจการปนเปื้อน สารพิษในอาหาร และวัตถุดิบทางการเกษตร แบบรวดเร็ว และแม่นยำ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้เป็นโครงการ ๑ ปี ทำต่อเนื่องจากโครงการที่ได้รับทุนจาก สวก เป็นการศึกษาเฉพาะ การผลิตแอนติบอดีต่อ อะฟลาทอกซิน และ ซีราลีโนน และการพัฒนาโครงสร้างให้เหมาะสมกับการนำไปประกอบเป็น test kit รูปแบบต่างๆ โดยจะทำการพัฒนาระบบการผลิตใน *E. coli* และเซลล์สัตว์ HEK293 เฉพาะในระดับห้องปฏิบัติการ (lab scale) เท่านั้น

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ห้องปฏิบัติการอนุเทคโนโลยีชีวภาพ มทส ได้ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ (phage display technology) ต่อสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซินและซีราลีโนน มาแล้ว[1,2] โดยแอนติบอดีนั้น อยู่ในรูปโมเลกุลเล็กเส้นเดี่ยวเฉพาะส่วนที่จับกับสารพิษจากเชื้อรา หรือ single chain variable fragment (scFv) และ แบบที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase (scFv-AP) แม้แอนติบอดีในรูปแบบนี้จะมีประสิทธิภาพดีในระดับหนึ่ง แต่การนำไปปรับใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม ยังมีข้อจำกัด เพราะ รูปแบบนี้ไม่เหมาะกับการนำไปประกอบกับ แอบริเคราะห์ และสามารถผลิตออกมาได้ค่อนข้างน้อยในระบบการผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* หากปรับไปผลิตในแบบแอนติบอดีเต็มรูปแบบ จะสามารถผลิตในปริมาณสูงจากเซลล์สัตว์ ในลักษณะเดียวกับ therapeutic antibody จากนั้นหากหาวิธีการ conjugate เข้ากับตัวให้สัญญาณที่เหมาะสม อาจนำไปใช้ทดแทนการใช้แอนติบอดีที่ผลิตจากวิธีการดั้งเดิม เพื่อลดต้นทุนการผลิตในระยะยาวได้ อีกทั้งยังมีเอ็นของแอนติบอดี ทำให้สามารถทำพันธุวิศวกรรมเพิ่มเติม ให้แอนติบอดีมีคุณสมบัติดียิ่งขึ้นต่อไป อาทิ จับแรงขึ้น หรือ มีความคงตัวมากขึ้น เมื่อได้แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติดีแล้ว อาจนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และทำการทดสอบด้วยมาตรฐานที่เหมาะสม เพื่อการวิเคราะห์จริงในพื้นที่แบบ point-of-detection diagnostic ได้ต่อไปอีกด้วย [26]

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารพิษจากเชื้อรา และการตรวจวิเคราะห์

สารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนผลผลิตและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรม การเกษตรของประเทศ และต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค จึงส่งผลถึงระบบเศรษฐกิจของประเทศ เพราะมีการลงทุนในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีทั้งปริมาณ และคุณภาพเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งใน และต่างประเทศ แต่อาจมีอุปสรรคและปัญหาเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว การขนส่ง รวมไปถึงการเก็บรักษา ก่อนถึงผู้บริโภคที่อาจส่งผลกระทบต่อความสูญเสียของผลผลิต ทั้งด้านปริมาณ และคุณภาพ ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเกิดการเน่าเสีย คุณภาพไม่ได้มาตรฐาน และไม่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งการสูญเสียของผลผลิตผลเกษตรทั้งด้านคุณภาพ และความปลอดภัย ส่วนใหญ่ จะมีสาเหตุจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งนอกจากจะเป็นสาเหตุ ของการเน่าเสียของผลผลิตผลเกษตรโดยตรงแล้ว เชื้อราบางกลุ่มยังสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นพิษทั้งไว้ในผลผลิตผลเกษตรด้วย ดังนั้นเพื่อป้องกัน และเฝ้าระวังผลผลิตและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ไม่ได้มาตรฐาน จึงมีความจำเป็นในการตรวจหาและคัดกรองผลผลิตและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรก่อนส่งถึงผู้บริโภค

สารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนผลผลิตทางการเกษตรโดยส่วนใหญ่ เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก สารพิษจากเชื้อราที่มีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญและมักพบปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรและอาหาร ได้แก่ สารอะฟลาทอกซิน (aflatoxins: AF) สารโอคราทอกซิน (ochratoxins: OT) สารพิษฟูโมนิซิน (fumonisins: FM) สารพิษพาทูลิน (patulin) สารพิษไทรโคทีซิน (trichothecenes) และสารพิษซีราลีโนน (zearalenone) [3] บางครั้งพบสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิดในผลผลิตผลเกษตรชนิดเดียวกัน เช่น พบสารอะฟลาทอกซินกับสารพิษฟูโมนิซิน และสารโอคราทอกซินกับสารอะฟลาทอกซิน เป็นต้น [4] นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ ของสารพิษจากเชื้อราในหลายประเทศ ซึ่งมีรายงานการพบสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตร อาทิเช่น ที่ประเทศอินเดีย พบว่าประชากรเป็นโรค Aflatoxicosis ซึ่งการตายครั้งนี้พบว่าเกิดจากการที่ประชาชนบริโภคข้าวโพดที่มีการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน [5] ที่ประเทศเคนย่า พบว่า 60% ของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเสียชีวิต เนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน [6] ขณะที่ประเทศจีน พบว่าประชากรป่วยเป็นโรคมะเร็งหลอดอาหาร เนื่องจากได้รับสารพิษฟูโมนิซินที่ปนเปื้อนในธัญพืช และผลิตภัณฑ์ที่บริโภค [7] ที่ประเทศอังกฤษเกิดการระบาดของโรค Turkey X disease ทำให้ไก่วงตายเป็นจำนวนมาก ตั้งแต่นั้นมาผู้เกี่ยวข้อง และประชาชนเริ่มมีความตระหนักถึงผลร้ายที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อรา และเริ่มศึกษาวิจัยด้วยสหวิทยาการอย่างเป็น ระบบจนในที่สุดก็ค้นพบว่า การตายของไก่วงเกิดจากการที่ไก่วงกินกากถั่วลิสงที่ปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารอะฟลาทอกซินสร้างโดยเชื้อรานั่น เป็นต้น[8] วิธีการตรวจหาปริมาณสารพิษมีด้วยกันหลายวิธี อาทิเช่นวิธีทางเคมี ได้แก่ วิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) หรือ โครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) และ วิธี

สเปกโตรเมตรีแยกมวลสาร (Mass Spectrometry) แต่ทั้ง 3 วิธีดังกล่าว ต้องทำในห้องปฏิบัติการขั้นสูงโดยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญและทักษะเป็นอย่างมาก อีกทั้งการวิเคราะห์ ต้องทำสารตัวอย่างให้สะอาดบริสุทธิ์เสียก่อน ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ทำให้เสียเวลา และค่าใช้จ่ายสูงมาก อาจทำได้เฉพาะในหน่วยงานของรัฐ หรือเอกชนที่ทำหน้าที่เฉพาะด้านนี้ วิธีการอีกอย่างหนึ่งที่นิยมคือ ใช้วิธีการทางแอนติบอดีด้วยเทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) [9] และตรวจแบบแถบวิเคราะห์ (lateral flow) [10] ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องมีความเชี่ยวชาญพิเศษ ก็สามารถทำการวิเคราะห์ได้ ซึ่งคุณภาพในการวิเคราะห์ขึ้นกับแอนติบอดี ที่เตรียมได้จากสัตว์ชนิดต่างๆ หากมีแอนติบอดีที่ดี ก็จะมีความแม่นยำในการตรวจวัดสูงมาก

ในปัจจุบันสามารถเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงได้จากการฉีดสารพิษ (hapten) โมเลกุลเล็กที่ถูกเชื่อมกับโปรตีนนำส่งเข้าไปในสัตว์ เช่น แกะ กระต่าย ม้า และหนู เป็นต้น เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เหล่านี้ให้สร้างแอนติบอดีต่อสารพิษนั้น จากนั้นทำการสกัดแยกโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารพิษนั้นๆ ออกมาจากซีรัม หรือนำมาเข้าสู่กระบวนการทางชีววิทยาเพื่อสร้างเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป [11-13] ในกรณีที่เกิดเป็นโพลีโคลนอลมีข้อดีคือ แอนติบอดีในการจับกับสารพิษได้อย่างดี และเฉพาะเจาะจง สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบและมีความแม่นยำสูง และใช้วิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ แต่มีข้อจำกัดคือ วิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก และมีปริมาณจำกัด เมื่อใช้หมดแล้วต้องฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองใหม่ ซึ่งการฉีดกระตุ้นในแต่ละครั้งนั้น จะสามารถผลิตโพลีโคลนอลที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในแต่ละครั้ง จึงทำให้เสียเวลาทำการตรวจสอบคุณสมบัติเพื่อใช้เป็นสารตรวจสอบใหม่ ทำให้มาตรฐานของชุดตรวจสอบที่ผลิตในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ทั้งยังส่งผลถึงค่าใช้จ่ายในการผลิตชุดตรวจสอบต่อหน่วยสูงขึ้น ส่วนการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจสอบนั้นมีข้อดีคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมานั้นสามารถนำมาผลิตได้โดยไม่จำกัด โดยไม่จำเป็นต้องฉีดกระตุ้นอีก ซึ่งผลิตโดยการเชื่อมต่อเซลล์ 2 เซลล์จาก B lymphocytes จากม้ามของหนูซึ่งถูกฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนและเซลล์มะเร็งที่กำเนิดจากเซลล์พลาสมา (myeloma cell) ทำให้ได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่าไฮบริโดมา (hybridoma) จากนั้นจะนำมาคัดเลือกเซลล์ที่มีการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ดีที่สุด สามารถสร้างและเพิ่มจำนวนได้โดยไม่มีสิ้นสุด แต่มีข้อเสียคือ ในหลายกรณี hybridoma ไม่เสถียร ทำให้ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีที่ดีออกมาได้เพียงพอ และวิธีการผลิต monoclonal แอนติบอดีก็ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งไม่สามารถรู้ลำดับยีนของแอนติบอดี ทำให้นำไปทำการ engineer ต่อได้ยาก

อย่างไรก็ตาม ยังมีเทคโนโลยีใหม่ ที่เกิดจากการพัฒนาใช้ bacteriophage เรียกว่า เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) [14] ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ผู้คิดค้นได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมีในปี 2561 เป็นเทคโนโลยีที่ว่าด้วยการตัดต่อยีนที่สนใจเข้ากับพันธุกรรมของ filamentous phage ทำให้เกิดการแสดงออกโดยการสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์นั้นต่อกับ capsid protein ซึ่งอยู่บนผิวของ phage จึงสามารถใช้เป็นเครื่องมือพื้นฐานของการทำ วิศวกรรมโปรตีน ในกรณีที่ต้องการ สร้างเปปไทด์ โปรตีน หรือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับโมเลกุล ที่สนใจศึกษาค้นคว้า อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการคัดหาจาก phage display libraries [15] เทคนิคนี้มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน

ได้อย่างหลากหลาย เป็นวิธีที่ใช้หลักการ การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมตามที่ต้องการจากการจับของโปรตีนบน phage กับตัวรับหรือแอนติเจนที่สนใจ โดยความโดดเด่นของเทคโนโลยีนี้คือ สามารถทราบยีนที่สร้างโปรตีนที่คัดหามาได้ อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถทำได้รวดเร็ว ผลิตแอนติบอดีได้ไม่จำกัด จากการเลี้ยงเซลล์ โดยวิธีการไม่ยุ่งยาก เพราะใช้หลักการผลิตในแบคทีเรีย หรือเซลล์สัตว์ที่เป็นที่รู้จักมานาน ดังนั้นจึงคาดการณ์ว่าเทคโนโลยีเฟจจะเข้ามามีบทบาท และอาจสามารถแทนที่การผลิตแอนติบอดีแบบดั้งเดิมได้ต่อไป [16-18] โดยอาจสามารถใช้เทคนิควิศวกรรมแอนติบอดีมาใช้ ปรับปรุงแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมต่อแอนติเจนในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนผลผลิตทางการเกษตรที่มีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งพัฒนาเป็น biosensors ได้อีกด้วย [19]

2.1 ขนาด แนวโน้ม และโอกาสทางการตลาด

ในปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิตชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในต่างประเทศอยู่มากพอสมควร ส่วนใหญ่เป็นบริษัทในยุโรป และสหรัฐอเมริกา ชุดตรวจสอบเหล่านี้ใช้โพลีโคลนอล หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นสารตรวจสอบ ชุดตรวจสอบที่บริษัทต่างๆขายนั้น มีราคาที่สูงเกินกว่าเกษตรกร หรือบุคคลทั่วไป จะซื้อมาใช้ได้ นอกจากนั้นชุดตรวจสอบยังเน้นการตรวจสอบวิเคราะห์การปนเปื้อนสารที่เป็นปัญหาในกลุ่มประเทศยุโรป และสหรัฐอเมริกา จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในภาคอุตสาหกรรมเกษตรในประเทศไทย และแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งไม่มีชุดตรวจสอบใดที่ใช้แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมจากเทคโนโลยีเฟจวางขายในตลาด ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะ จุดประกายการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นปัญหาในประเทศ และในแถบทวีปเอเชีย ด้วยเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ และประหยัดกว่า เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่เป็นประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรม เกษตรกร และบุคคลทั่วไปต่อไป

2.2 แนวทางการพัฒนาเทคโนโลยีต้นแบบในการผลิต recombinant antibody ต่อ mycotoxin

การพัฒนาปรับแต่งแอนติบอดีให้มีความไวในการตรวจสอบสารปนเปื้อนจากเชื้อราเพิ่มขึ้น อาจทำได้โดยใช้เทคโนโลยีเฟจร่วมกับวิศวกรรมแอนติบอดี โดยนำแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออะฟลาทอกซินที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ มาทำการปรับปรุงโดยเทคนิคพันธุวิศวกรรม ให้มีความสามารถในการจับต่อสารพิษอะฟลาทอกซินได้รวดเร็ว แม่นยำขึ้น ได้โดยใช้เทคนิค Affinity maturation [20-23] ซึ่งอาจทำได้ด้วยเทคนิคต่างๆ ที่เคยทำสำเร็จมาแล้วในห้องปฏิบัติการ อาทิ site directed mutagenesis และ saturation mutagenesis [24], DNA shuffling และ error-prone PCR [25], รวมทั้งเทคนิค chain-shuffling [27] เป็นต้น โดยสามารถทำการพัฒนาปรับเปลี่ยนรูปแบบแอนติบอดีเป็น รูปแบบต่างๆ เช่น เชื่อมต่อกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) เพื่อ พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบบนจานหลุม ELISA และ พัฒนาเป็นแอนติบอดีเต็มรูปแบบ (Full-length antibody) เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 การศึกษาความสามารถในการทำงานของแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนจากเชื้อรา

โครงการวิจัยนี้เป็นการต่อยอดผลโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สวก ซึ่งผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการใช้เทคโนโลยีเฟจ ในการสร้างแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมต่อสารพิษจากเชื้อรา ๒ ชนิดคือ aflatoxin [1,27] และ zearalenone [2] โดยแอนติบอดีนี้อยู่ในรูปแบบของ scFv และ scFv-AP เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากคลังเฟจนั้น สามารถนำไป engineer ต่อเป็นรูปแบบต่าง ๆ ได้ ในขั้นต่อไปผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสามารถของแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ ในการใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนจากเชื้อรา โดยจะทำการเปรียบเทียบแอนติบอดีในรูปแบบ scFv, scFv-AP, scFv-GFP, scFv-Fc และรูปแบบธรรมชาติคือ IgG โดยแอนติบอดีที่อยู่ในรูปแบบ scFv, scFv-AP, และ scFv-GFP นั้น จะใช้ในการตรวจสอบ ELISA ส่วนแอนติบอดีแบบ scFv-Fc และ IgG นั้น จะใช้ในการตรวจแบบ lateral flow หรือ strip test ซึ่งต้องมีการ conjugate antibody กับตัวให้สัญญาณ ที่เหมาะสม ผลการศึกษาในส่วนนี้ อยู่ในระหว่างการนำไปตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการที่ต้องผ่านการประเมินโดยผู้เชี่ยวชาญ (ตามรายละเอียดในภาคผนวก ค)

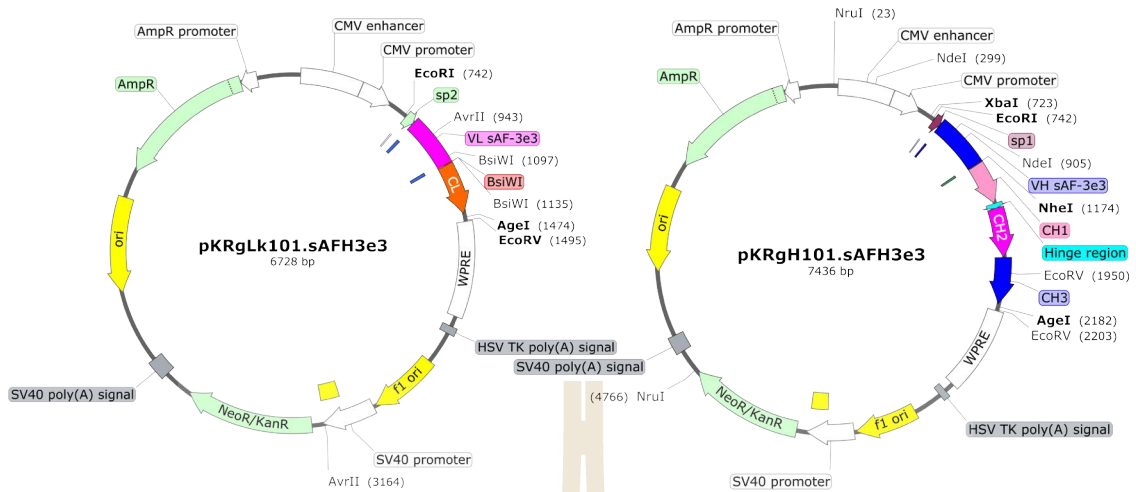
3.2 การพัฒนา platform การเปลี่ยน แอนติบอดีในรูป scFv เป็น IgG

เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ในปัจจุบัน เป็นแอนติบอดีในรูปแบบธรรมชาติคือ IgG ทั้งหมด แต่แอนติบอดีที่ได้จากคลังเฟจ นั้น เป็นเพียงชิ้นส่วนแอนติบอดีเส้นเดี่ยวชนิด scFv ซึ่งมีขนาดเล็กมาก จากรายงานในหัวข้อที่ 3.1 ในหัวข้อผลการศึกษาศักยภาพในการทำงานของแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนจากเชื้อรา ได้แก่ scFv, scFv-AP, scFv-GFP, scFv-Fc และ IgG พบว่าแอนติบอดีแบบ scFv-AP มีคุณสมบัติในการใช้ในการตรวจสอบด้วย ELISA plate สามารถผลิตออกมาจากระบบการผลิตใน *E. coli* ได้ แต่ยังคงอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ส่วนแอนติบอดีในรูปแบบ IgG นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแบบแถบวิเคราะห์ lateral flow หรือ strip test ได้ดี และสามารถผลิตออกมาได้ในปริมาณค่อนข้างสูง จากระบบการผลิตในเซลล์สัตว์ ในงานวิจัยที่ผ่านมา ผู้วิจัยใช้ platform ของผู้ร่วมวิจัยในต่างประเทศ จึงมีข้อจำกัดในการใช้งาน โดยเฉพาะหากต้องการนำออกสู่เชิงพาณิชย์ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะสร้าง platform สำหรับการเปลี่ยนแอนติบอดีในรูปแบบ scFv ให้เป็น IgG ขึ้นในห้องปฏิบัติการเอง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา และผลิตชุดตรวจสอบสำหรับใช้ในประเทศในระยะยาวต่อไป ในการพัฒนา platform นี้เริ่มต้นจากการสร้าง expression vector สำหรับผลิตแอนติบอดี จากนั้นทำการตัดต่อยีนของแอนติบอดี หลังจากวิเคราะห์ความถูกต้องของ expression vector ด้วยวิธีการ automate DNA sequencing แล้ว จึงนำ vector เข้าไปแสดงออกใน เซลล์ HEK293 แล้วทำการผลิตออกมา ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปตรวจสอบความสามารถในการจับกับเป้าหมายด้วยวิธีการ ELISA เพื่อยืนยันประสิทธิภาพ ก่อนนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบต่อไป

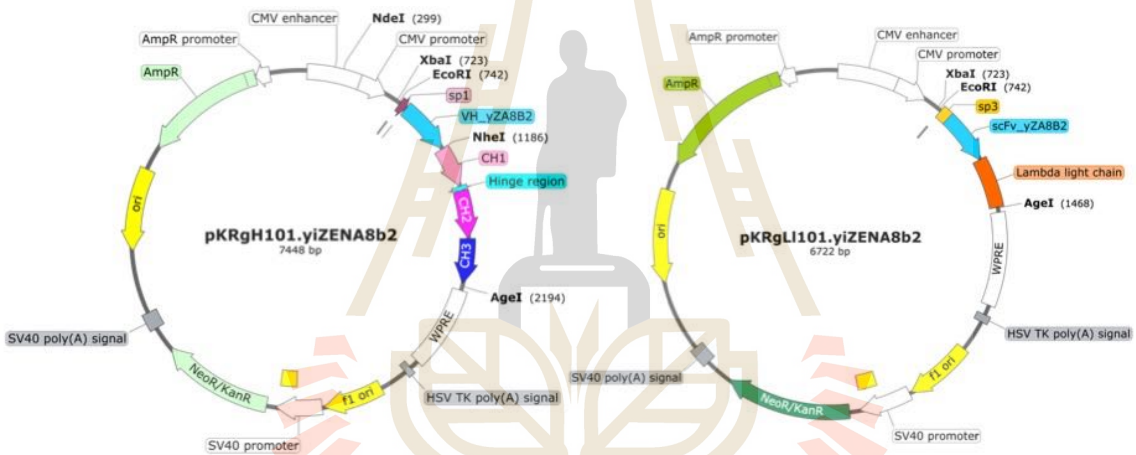
ในโครงการนี้ ได้ใช้แอนติบอดีต่อ aflatoxin และ zearalenone เป็นต้นแบบในการทดสอบ platform มีผลการทำดังแสดงดังรูป

3.2.1 การสร้าง expression vector

ขั้นตอนแรกในการพัฒนา platform การผลิตแอนติบอดีในรูป IgG คือการสร้าง expression vector ซึ่งผู้วิจัยได้ clone ยีน แอนติบอดีเข้าไปยัง vector ที่ได้พัฒนาขึ้นมา และเป็น platform ของห้องปฏิบัติ ด้วยวิธีการ clone แบบ Gibson Assembly ซึ่งประสบผลสำเร็จ โดยได้ยืนยันความถูกต้องด้วยวิธีการ automated DNA sequencing ได้ผล ของ expression vector สำหรับผลิต แอนติบอดีต่อ aflatoxin และ zearalenone ดังรูปด้านล่าง



รูปที่ ๑ ภาพ expression vector สำหรับผลิต H-chain และ L-chain เพื่อประกอบเป็น IgG ของ แอนติบอดีต่อ Aflatoxin

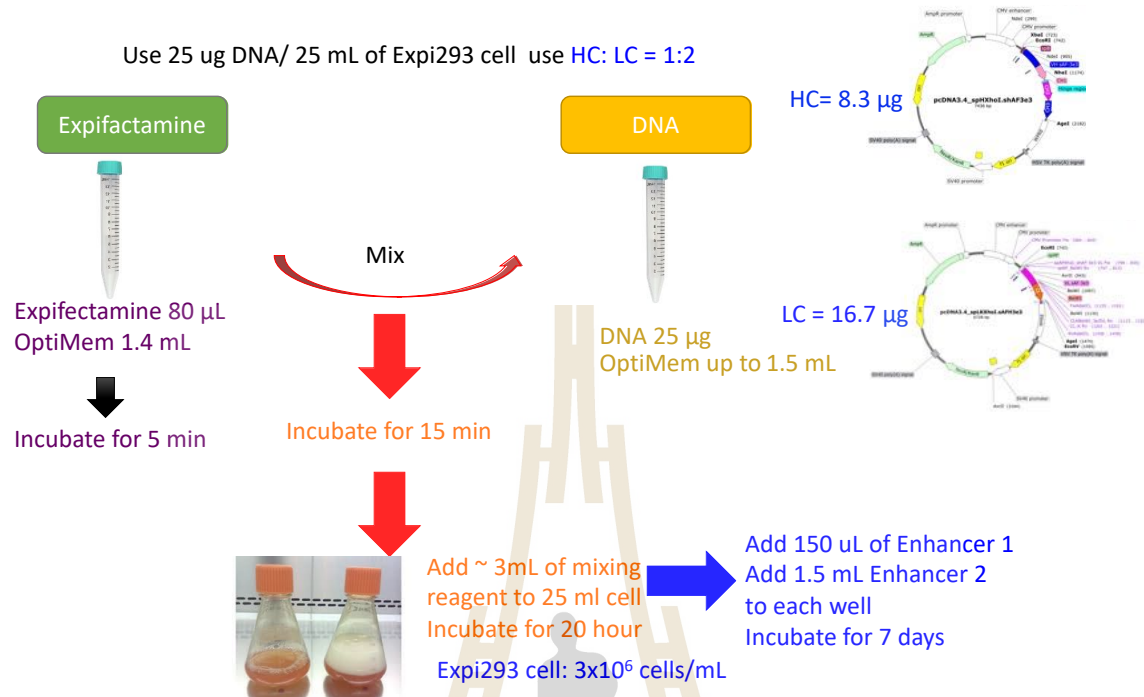


รูปที่ ๒ ภาพ expression vector สำหรับผลิต H-chain และ L-chain เพื่อประกอบเป็น IgG ของ แอนติบอดีต่อ Zearalenone

3.2.2 การนำ expression vector เข้าเซลล์

ในขั้นต่อไปคือการ transfection vector ที่ได้สร้างขึ้นในขั้นที่ 3.2.1 เข้าสู่เซลล์ ซึ่งอาจอธิบายได้ตามแผนภาพในรูปด้านล่าง

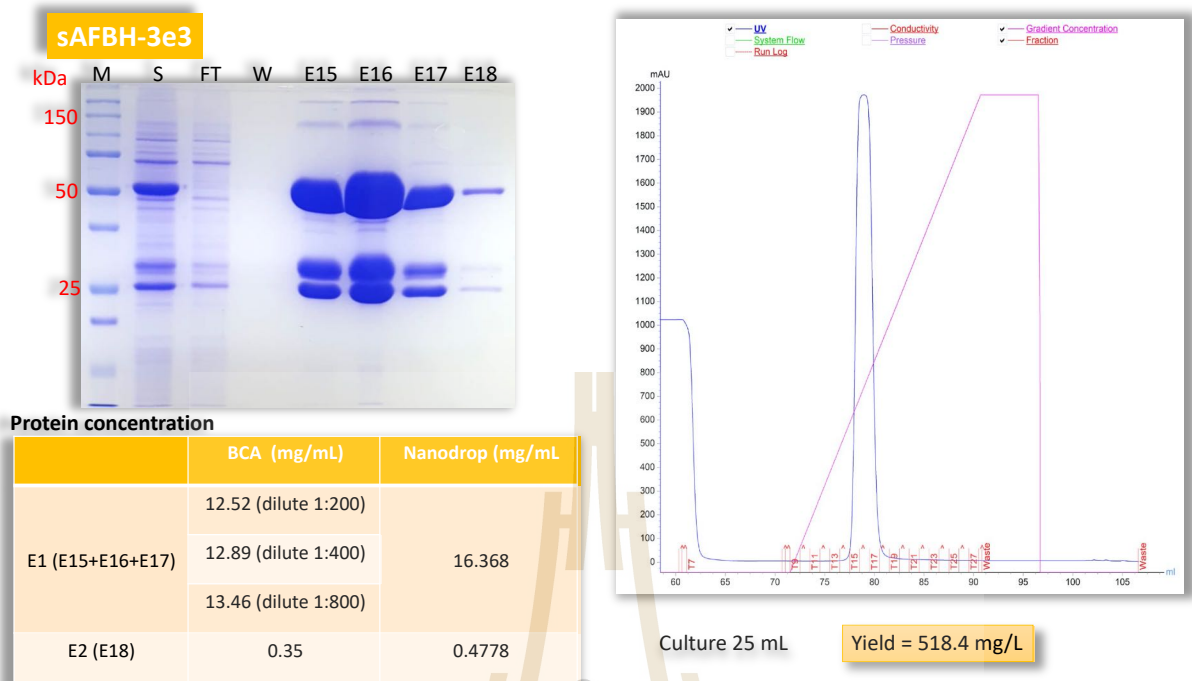
Transfection



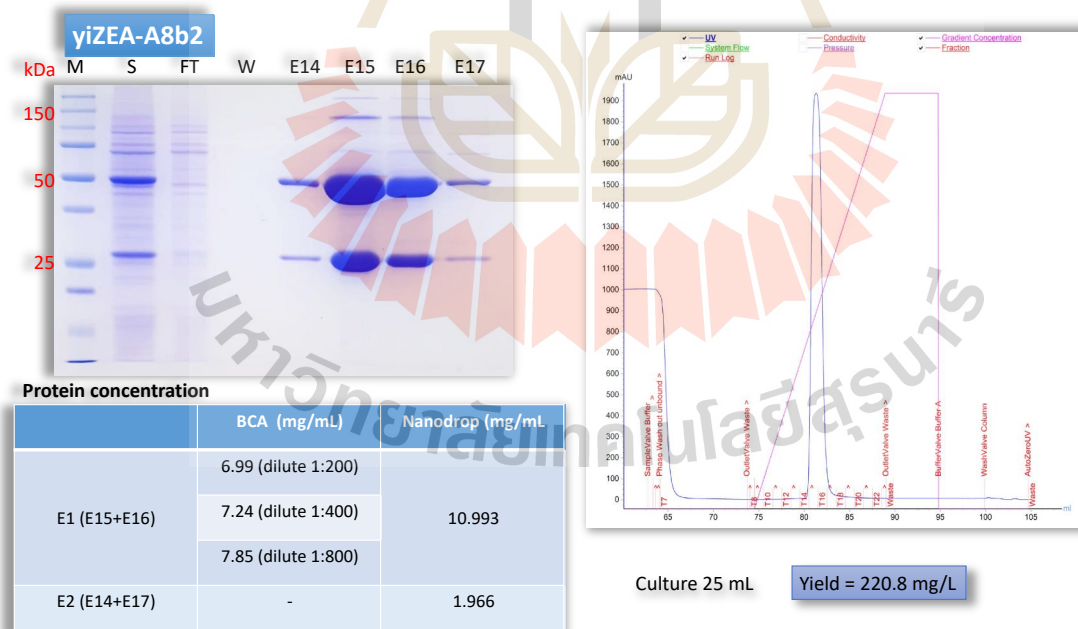
รูปที่ ๓ ภาพแสดงขั้นตอนการ transfection H-chain และ L-chain vector เข้าสู่เซลล์

3.2.3 การผลิต และการทำแอนติบอดีที่ผลิตออกมาได้ให้บริสุทธิ์

หลังจากนั้นจะทำการแอนติบอดีที่เซลล์สามารถผลิตออกมาได้ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) จากนั้นทำการวิเคราะห์ดู antibody ทั้งก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการ SDS-PAGE. ผลการศึกษาพบว่าผู้วิจัย สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณที่น่าพอใจคือ 200-500 mg/L ดังแสดงในภาพด้านล่าง ซึ่งใช้วิธีการ denaturing gel electrophoresis ทำให้ยีนแอนติบอดีส่วน heavy และ light chain แยกออกจากกันเป็น ๒ แถบ ในกรณีโคลน sAFH-3e3 ซึ่งเป็น antibody ต่อ aflatoxin นั้น พบว่ามี แถบ light chain ซ้อนกัน ๒ เส้น คาดว่าเกิดจากเติมหมู่น้ำตาล ๒ แบบ ซึ่งจะต้องวิเคราะห์ โดยละเอียดเพื่อหาคำตอบที่แท้จริงต่อไป



รูปที่ ๔ ภาพแสดงการผลิต และการทำบริสุทธิ์ แอนติบอดีแบบ IgG ต่อ aflatoxin ซึ่งเห็นแถบแอนติบอดี heavy และ light chain ที่ประมาณ 50 และ 25 kDa ตามลำดับ โดยสามารถผลิตแอนติบอดีได้ค่อนข้างสูง คือประมาณ 500 mg/L

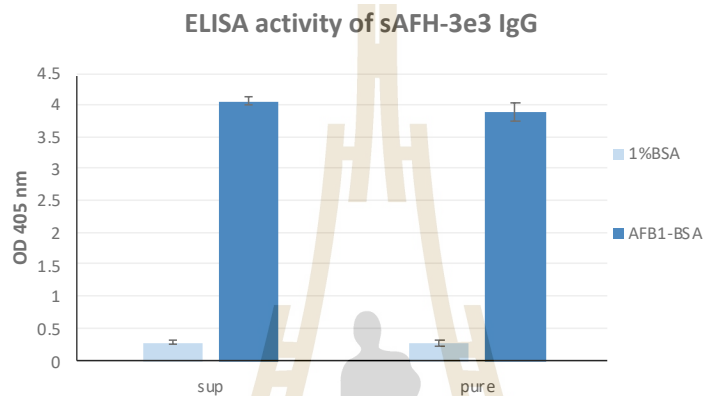


รูปที่ ๕ ภาพแสดงการผลิต และการทำบริสุทธิ์ แอนติบอดีแบบ IgG ต่อ zearalenone ซึ่งเห็นแถบแอนติบอดี heavy และ light chain ที่ประมาณ 50 และ 25 kDa ตามลำดับ โดยสามารถผลิตแอนติบอดีได้ประมาณ 220 mg/L

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการจับกับเป้าหมายของแอนติบอดีที่ได้ผลิตขึ้นมา

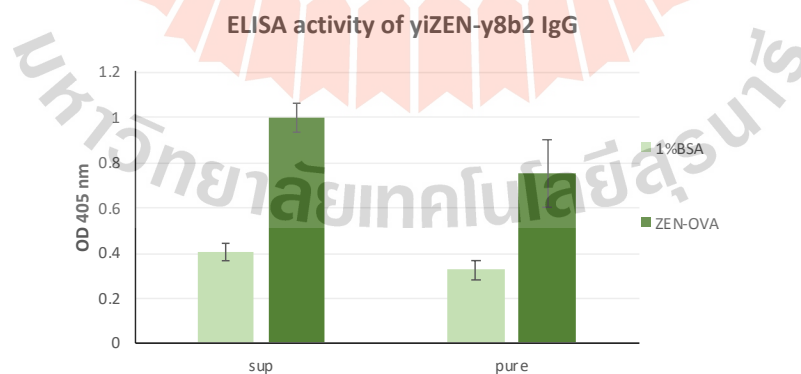
หลังจากผลิตแอนติบอดีได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือตรวจสอบว่ายังจับกับเป้าหมายได้หรือไม่ เพราะมีการเปลี่ยนโครงสร้างจาก scFv เป็น IgG ซึ่งแตกต่างไปจากเดิมมากพอควร ซึ่งในกรณีของทั้ง ๒ แอนติบอดีที่ได้ปรับโครงสร้างไปแล้วนี้ พบว่ายังจับได้ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ direct ELISA ดังผลที่แสดงด้านล่าง

IgG against AFB1



รูปที่ ๖ ภาพแสดงว่าแอนติบอดียังคงความสามารถในการจับกับเป้าหมายคือ aflatoxin เมื่อเปลี่ยนโครงสร้างจาก scFv ไปเป็น IgG แล้ว โดยทั้งแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ ให้ผลดีเหมือนกัน

IgG against ZEN



รูปที่ ๗ ภาพแสดงว่าแอนติบอดียังคงความสามารถในการจับกับเป้าหมายคือ aflatoxin เมื่อเปลี่ยนโครงสร้างจาก scFv ไปเป็น IgG แล้ว โดยทั้งแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ ให้ผลดีเหมือนกัน

3.3 การริเริ่มพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อนำแอนติบอดีไปใช้เป็นชุดตรวจสอบจริง

หลังจากที่ผู้วิจัยบรรลุเป้าของโครงการตามที่ได้วางแผนไว้แล้วคือการพัฒนา platform การผลิตแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ เพื่อวิจัยได้ริเริ่มทำงานวิจัยต่างๆ เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการใช้แอนติบอดีตรวจวิเคราะห์ อาทิ

3.3.1 การทำ epitope mapping เพื่อหา mimotope ของ แอนติบอดีต่อ Aflatoxin และ Zearalenone

ผู้วิจัยได้ใช้ phage display technology ในการทำ biopanning เพื่อค้นหา epitope ของแอนติบอดีต่อ mycotoxin ทั้ง ๒ โดยใช้ random 12-amino acid phage display peptide library ในการค้นหา ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพด้านล่าง

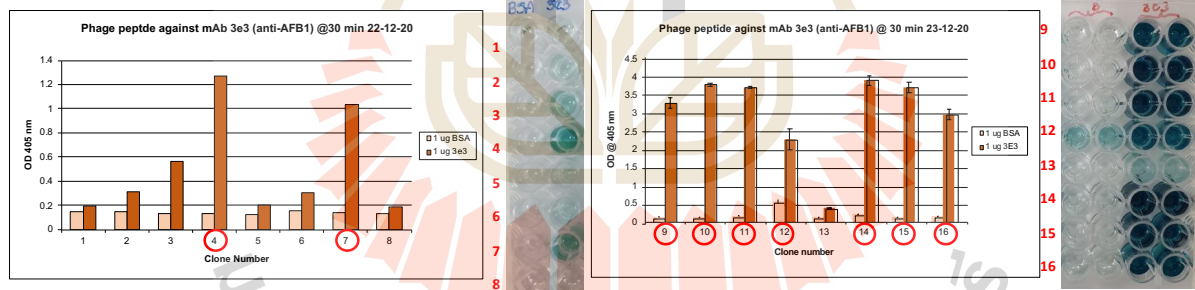
Bio-panning Phage peptide against sAFH-3e3

After 3rd round of Bio-panning

round	sAFH-3e3 (μg)	plaques	sAFH-3e3 (anti-AFB1)
1 st	18	0	175
2 nd	8	10^{-1}	11
3 rd	4	10^{-2}	0
		10^{-3}	0

sAFH-3e3-4, 7, 9, 11, 16
sAFH-3e3-10
sAFH-3e3-12
sAFH-3e3-14

no peptide sequence
sequence is not good
MRVGTSLVEANA
VMLTQGVVEGES



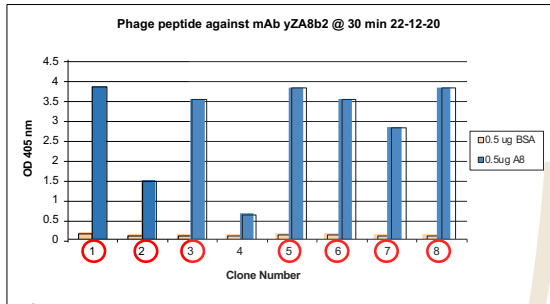
รูปที่ ๔ ภาพแสดงผลการทำ epitope mapping แอนติบอดีต่อ aflatoxin ได้ conserve motif เป็น TxxVE

Bio-panning Phage peptide against yZEN-a8

round	yZEN-a8 (μg)
1 st	10
2 nd	5
3 rd	2

After 3rd round of Bio-panning

plaques	yZEN-a8 (anti-ZEN)
0	TMTC
10^{-1}	~500
10^{-2}	48
10^{-3}	3



yzenA8-1	WPALKEGETVFN
yzenA8-2	IPCGDCSLISLE
yzenA8-3	AWGPWLEKQVS
yzenA8-5	MPIKPGENVLED
yzenA8-6	AWSSLPSKPHTQ
yzenA8-7	no peptide sequence
yzenA8-8	MKQIDTWMVNES

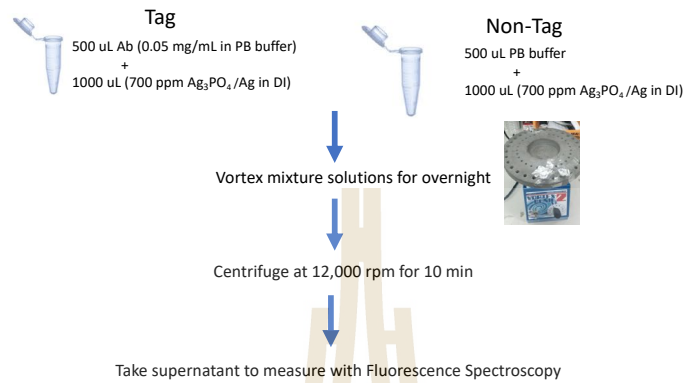
รูปที่ ๙ ภาพแสดงผลการทำ epitope mapping แอนติบอดีต่อ zearalenone ได้ conserve motif เป็น AWxxxL

ทั้งนี้ peptide เหล่านี้อาจนำไปศึกษาเพิ่มเติม แล้วพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการทำเป็นชุดตรวจสอบแบบ แข่งขันทดแทนการใช้ conjugate mycotoxin ซึ่งทำได้ยาก อันตราย และราคาสูงได้ต่อไป

3.3.3 การเชื่อม antibody กับตัวให้สัญญาณ เพื่อการประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบรวดเร็ว

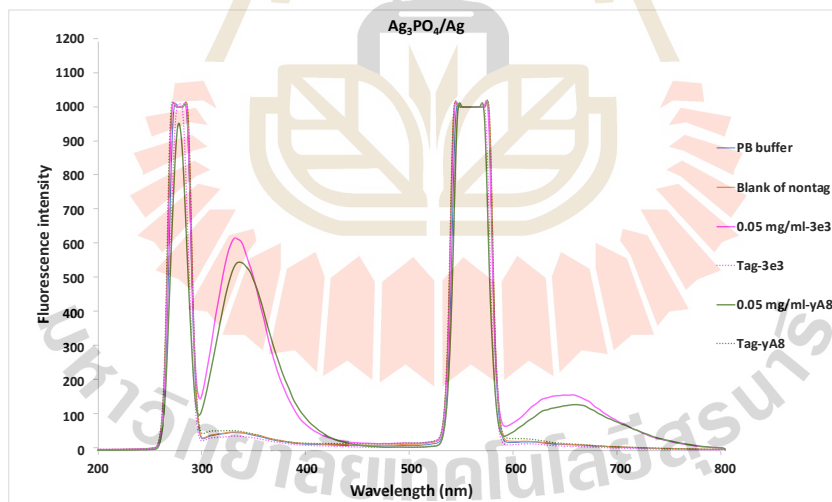
งานวิจัยในส่วนนี้ ได้ร่วมกับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุริม จารุจรัส ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี ต. เมืองศรีโค อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190 เป็นการศึกษาการเชื่อมต่อแอนติบอดีกับ $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{Ag}$ nanocomposite ซึ่งเป็นวัสดุเชิงประกอบเงินซิลเวอร์ฟอสเฟตขนาดนาโนทำหน้าที่เป็นตัวติดฉลากแทนการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแบบดั้งเดิม ซึ่งวัสดุเชิงประกอบเงินซิลเวอร์ฟอสเฟตขนาดนาโนนี้จะทำหน้าที่ออกซิไซด์ซัสเตรต ทำให้สีของซัสเตรตเปลี่ยนแปลงไปภายใต้สภาวะกรดโดยไม่ต้องอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ช่วยในการเกิดปฏิกิริยาทางสี และใช้กล้องถ่ายภาพดิจิทัลร่วมกับโปรแกรมประมวลผลภาพ ซึ่งมีราคาถูกและรวดเร็วในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยสามารถใช้แทนเครื่องอ่านค่าสีบนไมโครเพลตแบบดั้งเดิมที่มีราคาสูง โดยผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสามารถ conjugate antibody กับ $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{Ag}$ nanocomposite ได้แล้ว วิธีการ conjugate แสดงดังภาพด้านล่าง

- The Ag_3PO_4/Ag was sonicated for 30 min and leave on bench to cool it down before used
- Vortex before use



รูปที่ ๑๐ ภาพแสดงขั้นตอนการ conjugate แอนติบอดีกับ Ag_3PO_4/Ag nanocomposite

ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี fluorescence scanning spectrometry พบว่าทำสำเร็จ คือ peak เส้นประที่แสดงว่าแอนติบอดีเชื่อมกับ nanoparticle อยู่แยกจาก peak antibody เปล่าๆ อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบสัญญาณด้วย paper-based ELISA พบว่ายังให้สัญญาณไม่ได้ดี ต้องทำการปรับปรุงต่อไป



รูปที่ ๑๑ ภาพแสดงผลการวิเคราะห์การเชื่อมต่อของแอนติบอดีกับ nanoparticle ด้วยวิธี fluorescence scanning spectrometry

3.3.3 การพัฒนาความแรงในการจับด้วยวิธีการ chain shuffling และ guided selection

ถึงแม้ว่าแอนติบอดีต่อ aflatoxin จะใช้ตรวจสอบสารพิษที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร ได้ดีระดับหนึ่ง แต่ถ้าเทียบกับแอนติบอดีที่เตรียมได้จากหนู พบว่ายังไม่แรงเท่า ผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนาความแรงให้ดียิ่งขึ้นไปอีก ด้วยแนวทาง guided selection โดยได้นำ sequence antibody ส่วน heavy chain ของ

หนูซึ่งหาได้จาก database มาเชื่อมกับ light chain ของแอนติบอดีโคลนที่มีอยู่ ขั้นตอนการทำแสดงดังภาพด้านล่าง

ขั้นที่ ๑ การสังเคราะห์ยีนแอนติบอดีส่วน heavy chain ของหนูที่จับกับ aflatoxin ได้ดี

Sequence name / optimized for
sAFB1C11/ Homo sapiens

ORF	Protected sites	Protected areas	Motifs to avoid
22-372 [CAA...TCT]			

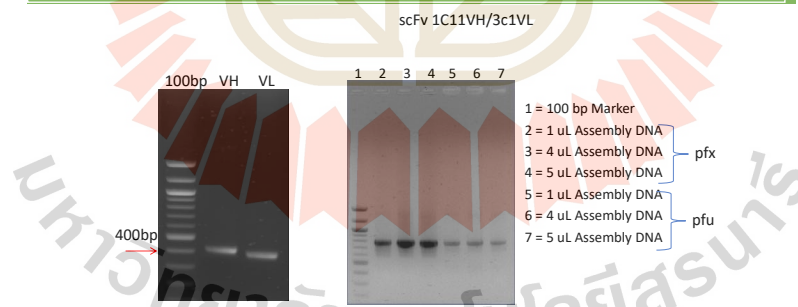
```

1.   GCGGCCAGCGGCCATGGCCCAAGTTCAACTTCAAGAGTCTGGCGGGGACTGGTTAAGCCTGGCGGA
70.  S L K L S C S A S G F T F S N Y G M S W L R Q
    TCTCTGAAGCTGAGCTGTAGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGGCATGAGCTGGCTGAGACAG
    T A E K R L E W V A S I S G G G Y S Y P D S
139. ACCGCCGAGAAGAGACTGGAATGGGTGGCTCTATCAGCGGGGAGGCTACAGCTACTACCCGATTCT
    V K G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S S L
208. GTGAAGGGCAGATTACCCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTG
    K S E D T A L Y F C A S H D Y A W S F G V W G
277. AAGTCCGAGGATACAGCCCTGTACTTCTGCGCCAGCCAGGATTACGCCTGGTCTTTGGAGTTTGGGGC
    Q G T T V T V S S
346. CAGGGCACAAACCGTGACCGTTCTTCTGGTGGTGGTGGTAGCGGGCGGCGGGCTCTGGTGGT
  
```

รูปที่ ๑๒ ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนแอนติบอดีส่วน heavy chain ของหนูที่จับกับ aflatoxin

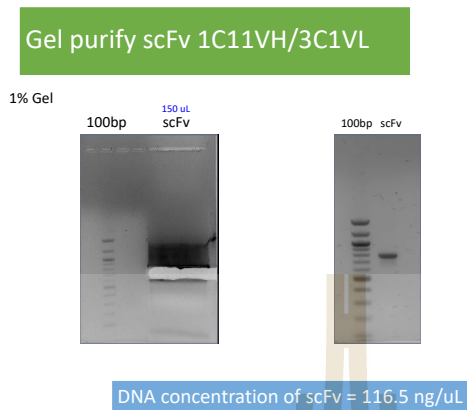
ขั้นที่ ๒ การเพิ่มจำนวนยีน VH ของแอนติบอดีหนู และ VL ของแอนติบอดีมนุษย์ และการเชื่อมยีน VH ของแอนติบอดีหนู และ VL ของแอนติบอดีคน ให้เป็น scFv

Amplified 1C11VH and 3C1VL



รูปที่ ๑๓ ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนยีนแอนติบอดีหนูและมนุษย์ ยีนแอนติบอดีส่วน VH ของหนู และ VL ของมนุษย์ (ซ้าย) และ การเชื่อมยีน VH ของแอนติบอดีหนู และ VL ของแอนติบอดีคน ให้เป็น scFv ด้วย DNA polymerase ที่ต่างกัน (ขวา)

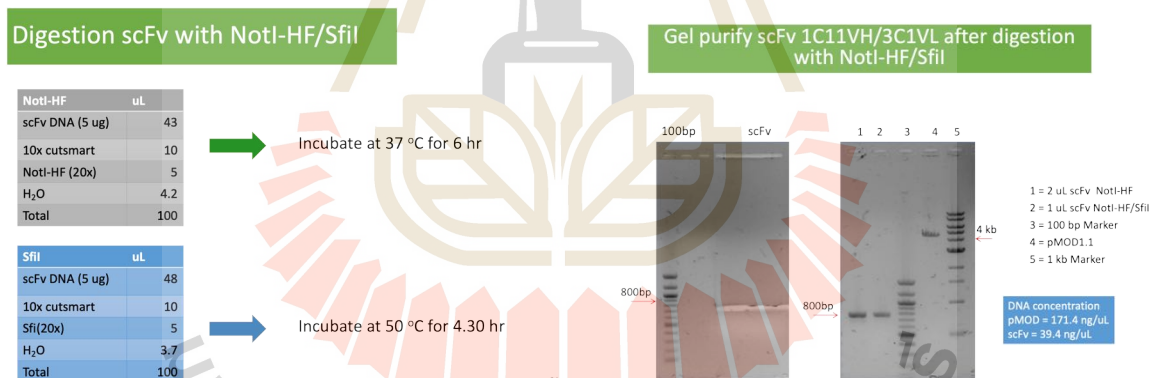
ขั้นที่ ๓ การเชื่อมยีน VH ของแอนติบอดีหนู และ VL ของแอนติบอดีคน ให้เป็น scFv แล้วทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการ gel purification



20

รูปที่ ๑๔ ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนยีน scFv และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการ gel purification

ขั้นที่ ๔ การโคลนยีนแอนติบอดี scFv เข้า plasmid pMOD1 โดยการตัดยีน scFv และ pMOD1.1 ด้วยเอนไซม์ *SfiI* และ *NotI* และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดจากอะกาโรสเจล ดังแสดงในภาพด้านล่าง จากนั้นทำการ โคลนยีน scFv เข้าสู่ pMOD1 ด้วยเอนไซม์ DNA ligase



21

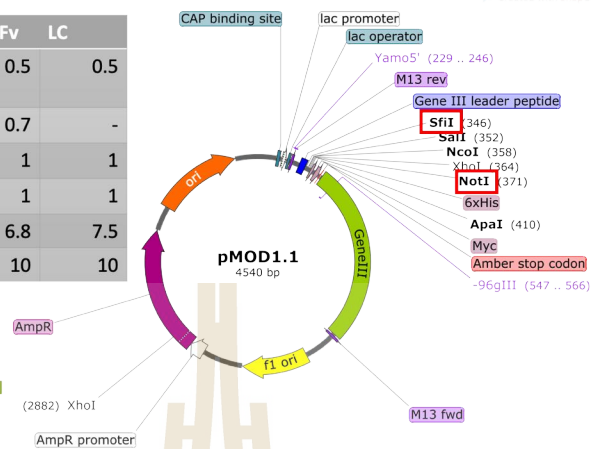
22

Ligate scFv to pMOD1.1

	L scFv	LC
Vector (100 ng)	0.5	0.5
Insert (26.43 ng)	0.7	-
10x ligase	1	1
DNA ligase (NEB)	1	1
H ₂ O	6.8	7.5
Total	10	10

Incubate at 16 °C for O/N

21 colonies on All plate



23

รูปที่ ๑๕ ภาพแสดงขั้นตอนการโคลน scFv เข้าสู่ pMOD1.1

อย่างไรก็ตามหลังจากโคลนแอนติบอดีส่วน scFv เข้าไปแสดงบนผิวเวฟเรียบร้อยแล้วพร้อมกับการตรวจสอบความถูกต้องด้วย DNA sequencing (รูปที่ ๑๖) กลับพบว่า แอนติบอดีไม่สามารถจับกับ aflatoxin ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำเพิ่มต่อด้วยการนำ heavy chain ไปเชื่อมกับทั้ง library ของ light chain เพื่อค้นหาแอนติบอดีที่ดีขึ้น หรืออาจสร้าง hybridoma จากหนูขึ้นมาแล้วค้นหายีนใหม่ขึ้นมาเอง



รูปที่ ๑๖ ภาพแสดงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนแอนติบอดี scFv ที่ทำการ chain shuffling ระหว่าง VH ของหนู และ VL ของมนุษย์ ที่จับกับ aflatoxin

บทที่ 4 บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการต่อยอดผลโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สวทช. ซึ่งผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการใช้เทคโนโลยีเฟจ ในการสร้างแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมต่อสารพิษจากเชื้อรา ๒ ชนิดคือ aflatoxin [1,27] และ zearalenone [2] ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่อยู่ในรูป scFv และ scFv-AP ด้วยแอนติบอดีที่ได้จากคลังเฟจนั้น สามารถนำไป engineer ต่อเป็นรูปแบบอื่นๆ อีก ได้อย่างหลากหลาย ในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสามารถของแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ ในการใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนจากเชื้อรา โดยจะทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติแอนติบอดีในรูปแบบ scFv, scFv-AP, scFv-GFP, scFv-Fc และรูปแบบธรรมชาติคือ IgG โดยแอนติบอดีที่อยู่ในรูปแบบ scFv, scFv-AP, และ scFv-GFP นั้น ใช้สำหรับการตรวจสอบแบบ ELISA ส่วนแอนติบอดีแบบ scFv-Fc และ IgG นั้น ใช้ในการตรวจแบบ lateral flow หรือ strip test ซึ่งต้องมีการ conjugate antibody กับตัวให้สัญญาณ ที่เหมาะสม ผลการศึกษาในส่วนนี้ สรุปได้ว่า แอนติบอดีแบบ scFv-AP มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด ในการใช้ในการตรวจสอบบน ELISA plate สามารถผลิตออกมาจากระบบการผลิตใน *E. coli* ได้ แต่ยังคงอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ส่วนแอนติบอดีในรูปแบบ IgG นั้น พบว่านั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแบบแถบวิเคราะห์ lateral flow หรือ strip test ได้ดี และสามารถผลิตออกมาได้ในปริมาณค่อนข้างสูง จากระบบการผลิตในเซลล์สัตว์ อีกทั้งแอนติบอดีรูปแบบ IgG นี้ ยังเป็นรูปแบบตามธรรมชาติ ที่ถูกใช้ประกอบเป็นชุดตรวจวิเคราะห์ ทางการค้าในปัจจุบัน ในงานวิจัยที่ผ่านมา ผู้วิจัยใช้ platform ของผู้ร่วมวิจัยในต่างประเทศในการผลิตแอนติบอดีแบบ IgG จึงมีข้อจำกัดในการใช้งาน โดยเฉพาะหากต้องการนำออกสู่เชิงพาณิชย์ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะสร้าง platform สำหรับการเปลี่ยนแอนติบอดีในรูปแบบ scFv ให้เป็น IgG ขึ้นในห้องปฏิบัติการเอง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา และผลิตชุดตรวจสอบสำหรับใช้ในประเทศในระยะยาวต่อไป ในการพัฒนา platform นี้เริ่มต้นจากการสร้าง expression vector สำหรับผลิตแอนติบอดี จากนั้นทำการตัดต่อยีนของแอนติบอดี หลังจากวิเคราะห์ความถูกต้องของ expression vector ด้วยวิธีการ automate DNA sequencing แล้ว จึงนำ vector เข้าไปแสดงออกใน เซลล์ HEK293 แล้วทำการผลิตออกมา ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปตรวจสอบความสามารถในการจับกับเป้าหมายด้วยวิธีการ ELISA เพื่อยืนยันประสิทธิภาพ ความสามารถในการจับกับเป้าหมาย ซึ่งทุกขั้นตอนประสบความสำเร็จตามที่ได้ตั้งไว้ สรุปว่ามี platform ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต IgG เพื่อใช้ตรวจสอบ mycotoxin ตามเป้าหมายของโครงการวิจัยในช่วงแรกแล้ว

แม้โครงการวิจัยจะไม่ได้รับการสนับสนุนต่อไปในปีถัดไป แต่ผู้วิจัยยังพอมั่งมีงบประมาณ และบุคลากรอยู่ แม้จะบรรลุเป้าของโครงการตามที่ได้วางแผนไว้แล้ว ผู้วิจัยจึงได้ริเริ่มทำงานวิจัยต่างๆ เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการใช้ประยุกต์ใช้แอนติบอดีประกอบเป็นชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน mycotoxin อย่างรวดเร็วและแม่นยำเพิ่มเติม ได้แก่ การทำ epitope mapping เพื่อหา mimotope ของ แอนติบอดี โดยใช้แอนติบอดีต่อ Aflatoxin และ Zearalenone เป็นต้นแบบ โดยผู้วิจัยสามารถค้นพบ mimotope ของ

ทั้ง ๒ antibody จากการทำ biopanning ด้วย phage display peptide library SUT12 ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งหากทำการทดลองเพิ่มเติมต่อไป อาจนำไปใช้แทนที่ conjugated mycotoxins ในชุดตรวจสอบแบบ rapid test ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และปลอดภัยขึ้นด้วย นอกจากนั้นแล้วผู้วิจัยยังได้ริเริ่มลองเชื่อม antibody กับตัวให้สัญญาณประเภท Silver nanocomposite โดยถือเป็นการริเริ่มความร่วมมือกับ อาจารย์รุ่นใหม่จาก มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในส่วนนี้ยังอยู่ในช่วงต้นของการทดลอง ในเบื้องต้นพบว่าสามารถ conjugate ได้แล้ว แต่จะต้อง optimize สภาวะต่างๆ อีกหลายขั้นตอน ก่อนจะสามารถนำมาใช้ประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ในพื้นที่จริงต่อไปได้ และท้ายสุด ผู้วิจัยได้พยายามริเริ่ม ใช้เทคนิค chain shuffling และ guided selection มาพัฒนาความแรงในการจับของแอนติบอดี โดยใช้แอนติบอดีจากหนูส่วน heavy chain มารวมกับ light chain แอนติบอดีมนุษย์จากโครงการนี้ แต่เมื่อรวมแล้วพบว่า แอนติบอดีทำงานไม่ได้คือไม่จับกับเป้าหมาย จึงต้องพัฒนาต่อด้วยวิธี guided selection คือเลือกคู่จาก library ของ light chain ทั้งหมดที่มี ซึ่งอาจมีโอกาสดำเนินสำเร็จต่อไป หากได้รับทุนสนับสนุน

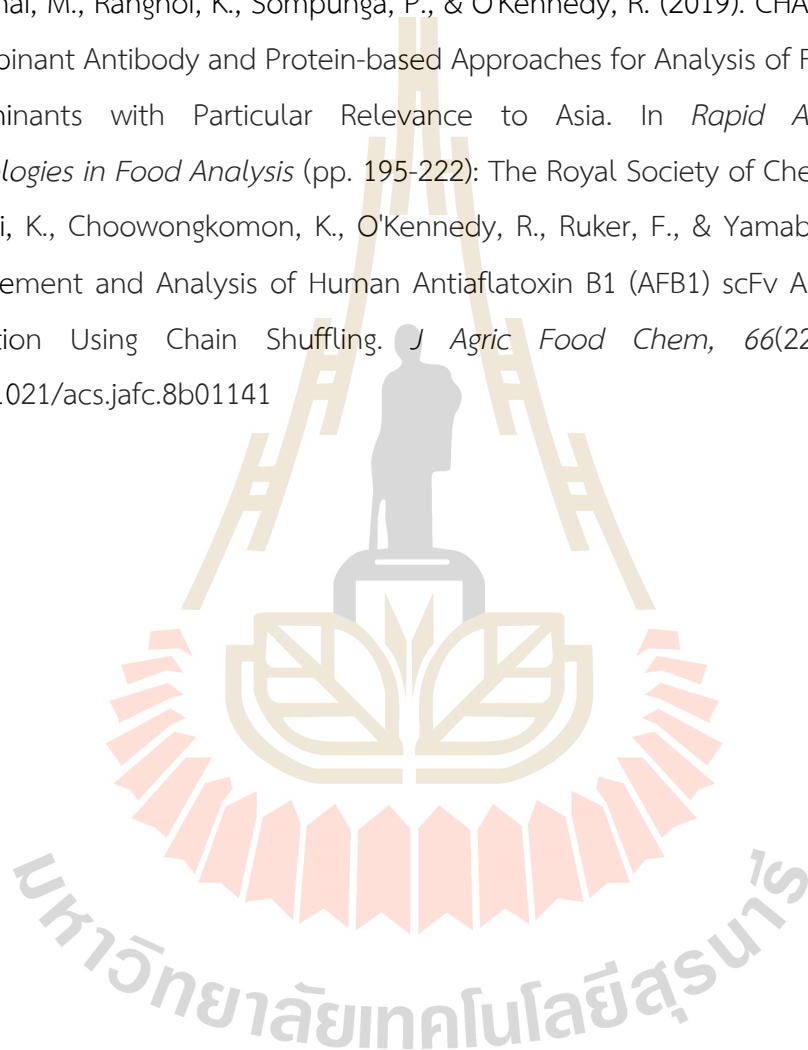
โดยสรุปแม้โครงการถูกระงับไป แต่ผู้วิจัยได้ตั้งความรู้ และประสบความสำเร็จในการสร้าง platform สำหรับผลิต recombinant antibody แบบ IgG ที่เป็น prototype ที่มีศักยภาพดีแล้ว อาจสามารถพัฒนาต่อเป็นชุด kit เพื่อใช้เชิงพาณิชย์ได้ต่อไป หากมีทุนสนับสนุน เพื่อการวิจัย และศึกษาพัฒนาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- 1 Rangnoi, K., Jaruseranee, N., O'Kennedy, R., Pansri, P., & Yamabhai, M. (2011). One-step detection of aflatoxin-B(1) using scFv-alkaline phosphatase-fusion selected from human phage display antibody library. *Molecular Biotechnology*. 49(3): 240-249. doi:10.1007/s12033-011-9398-2.
- 2 Sompunga, P and Yamabhai, M. (2017). Generation of recombinant human scFv antibody against zearalenone using phage display technology. *Proceeding of The 13rd The Asian Congress on Biotechnology 2017 (ACB2017)*, Khon Kaen, Thailand July 23-27, 2017.
- 3 Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*. 137, 265-282.
- 4 Youssef, M.S., Abo-Dahab, N.F., and Abou-Seidah, A.A. (2000). Mycobiota and mycotoxin contamination of dried raisins in Egypt. *African Journal of Mycology and Biotechnology*. 8, 69-86.
- 5 Krishnamachari K.A, Nagaarajan V, Bhat R.V., Tilak T.B. (1975). Hepatitis due to aflatoxicosis an outbreak in Western India. *Lancet*. 305, 1061-3.
- 6 Probst, C., Njapau, H., and Cotty, J.P. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2762-2764.
- 7 Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J., and Cleveland, T.E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162. 155-166.
- 8 Blout, W. P. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys*. 9:52, 55-58, 61, 77.
- 9 Xiaoqian Tang, X. L., Peiwu Li, Qi Zhang, Ran Li, Wen Zhang, Xiaoxia Ding, Jiawen Lei, & , Z. Z. (2014). Development and Application of an Immunoaffinity Column Enzyme Immunoassay for Mycotoxin Zearalenone in Complicated Samples. *Plos One*. 9(1), e85606. doi:10.1371/journal.pone.0085606.
- 10 Yaning, S. Guangxu, X. Jifei, Y., Fangyu, W., Ruiguang, D., Gaiping, Z., Xiao, f., and Yong, Z., (2015), Development of an immune chromatographic test strip for simultaneous qualitative and quantitative detection of ochratoxinA and zearalenone in cereal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96, 3673-3678.

- 11 Clackson, T., Hoogenboom, R.H., Griffith, D.A., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628.
- 12 Mccafferty, J., Griffiths, D.A., Winter, G., and Chiswell, J.D. (1990). Phage antibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- 13 Nelson, L.A., Dhimolea, E. and Reichert, M.J. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 9, 767-774.
- 14 Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 228: 1315-1317.
- 15 Yau, K. Y. F., Lee, H., and Hall, J.C. (2003). Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies. *Biotechnology advances* 21, 599-637.
- 16 Hoogenboom, R.H., Griffiths, D.A., Johnson, S.K., Chiswell J.D., 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 Research* 19, 4133-4137.
- 17 Rapley, R. (1995). The biotechnology and applications of antibody engineering. *Molecular Biotechnology*. 3(2), 139-154.
- 18 Persson, H., Lantto J., and Ohlson, M., (2006), A focused antibody library for improved hapten recognition. *Journal of Molecular Biology*. 357(2), 607-620.
- 19 Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., and MiZaikoff, B., (2005), Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives & Contaminants*. 22(4), 345-353.
- 20 Yang, W.-P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., and Barbas III, C.F. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *Journal of molecular biology* 254, 392-403.
- 21 Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M., and Schirrmann, T. (2009). Affinity maturation by phage display. *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*. 309-322.
- 22 Park, S.-G., Lee, J.-S., Je, E.-Y., Kim, I.-J., Chung, J.-H., and Choi, I.-H. (2000). Affinity maturation of natural antibody using a chain shuffling technique and the expression of recombinant antibodies in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 275, 553-557.
- 23 Sheedy, C., MacKenzie, C.R., and Hall, J.C. (2007). Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnology advances* 25. 333-352.

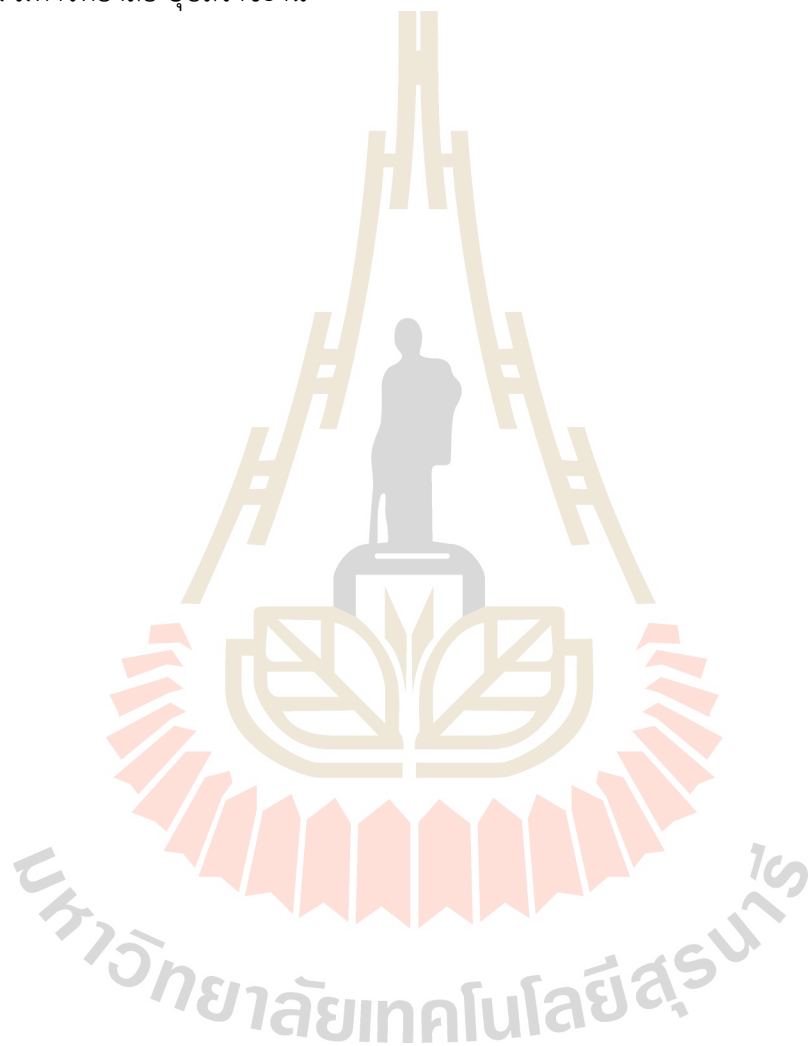
- 24 Spadiut, O., Radakovits, K., Pisanelli, I., Salaheddin, C., Yamabhai, M., Tan, T.C., Divne, C., and Haltrich, D. (2009). A thermostable triple mutant of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* with improved properties for biotechnological applications. *Biotechnology journal* 4. 525-534.
- 25 Songsiriritthigul, C., Pesatcha, P., Eijssink, V.G., and Yamabhai, M. (2009). Directed evolution of a *Bacillus chitinase*. *Biotechnology journal* 4, 501-509.
- 26 Yamabhai, M., Rangnoi, K., Sompunga, P., & O'Kennedy, R. (2019). CHAPTER 10 Novel Recombinant Antibody and Protein-based Approaches for Analysis of Food and Food Contaminants with Particular Relevance to Asia. In *Rapid Antibody-based Technologies in Food Analysis* (pp. 195-222): The Royal Society of Chemistry.
- 27 Rangnoi, K., Choowongkamon, K., O'Kennedy, R., Ruker, F., & Yamabhai, M. (2018). Enhancement and Analysis of Human Antiaflatoxin B1 (AFB1) scFv Antibody-Ligand Interaction Using Chain Shuffling. *J Agric Food Chem*, 66(22), 5713-5722. doi:10.1021/acs.jafc.8b01141



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ผลงานวิจัยนี้ เป็นกลไกการพัฒนาบัณฑิตวิจัยระดับปริญญาเอก ๑ คน คือ ดร. กุณฑลลี รังน้อย และ อาจารย์รุ่นใหม่ ๑ คน คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุริม จารุจำรัส ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี



ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ก. งานประชุมระดับนานาชาติ

Yamabhai, M. (2021). *MY Directed Evolution*. Paper presented at the IUPAC Global Women's Breakfast 2021, Phillippines, Thailand, India (online).

Yamabhai, M. (2020). *Molecular Biotechnology for Human Well-being*. Paper presented at the Bio Asia Pacific 2020, BITEC, Bangkok, Thailand and Virtual Conference 28-30 October.

Yamabhai, M. (2020). *Molecular Evolution Biotechnology for Human Well-being*. Paper presented at the The 32th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Online, November 26.

Yamabhai, M. (2019). *Antibody Engineering for Agricultural and Biomedical Applications*. Paper presented at the Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019), Taipei, Taiwan, July 01-04.

Rangnoi, K., Rüker, F., O'Kennedy, R., & Yamabhai, M. (2019). *The effects of various formats of antibody on the detection of aflatoxin*. Paper presented at the Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019), Taipei, Taiwan, July 01-04.

ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

อยู่ในระหว่างการส่งผลงานไปตีพิมพ์

ค. สิทธิบัตร

-

ง. รางวัล

Outstanding oral presentation งานประชุม Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019), Taipei, Taiwan, July 01-04.

ภาคผนวก ค งานวิจัยที่กำลังรอตีพิมพ์

Binding characteristic of various antibody formats against mycotoxin

Kuntalee Rangnoi[§], Florian Rüker[¥], Gordana Wozniak-Knopp[¥], Barbara Cvak[£], Richard O’Kennedy[€] and Montarop Yamabhai^{§*}

[§] Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agriculture Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

[¥] Department of Biotechnology, University of Natural Resource and Life Sciences Vienna (BOKU), Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria

[£] Romer Labs Division Holding GmbH, Technopark 5, 3430 Tulln, Austria

[€] School of Biotechnology and National Centre for Sensor Research, Dublin City University, Dublin 9, Ireland

*Corresponding author: Montarop@g.sut.ac.th

ABSTRACT

The application of recombinant antibodies for the analysis of foods and food contaminants is now a major focus given their capacity to be engineered to tailor their specificity, enhance their stability and modify their structural formats to fit the desired analytical platform. In this study, human scFv antibody fragments generated against aflatoxin B1 (AFB1), were selected as the model antibody to explore the effect of antibody formats on their binding activity and to evaluate their potential use as immuno-reagents for food contaminant analysis. Four human scFv antibody fragments against aflatoxin B1 (AFB1), previously isolated and engineered by chain shuffling, were converted into various formats i.e., scFv-AP fusions, scFv-Fc, and whole IgG molecules. For all of the scFv clones, the scFv-AP fusion format showed the highest sensitivity by competitive ELISA, while the effects on the binding activity after conversion to scFv-Fc or IgG format varied, depending on the amino acid sequence of the antibodies. The sAFH-3e3 antibodies that showed the best performance by competitive ELISA were selected for further investigation. The sAFH-3e3 was converted to the scFv-GFP format and tested by fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) which showed that its binding property was equivalent to those of scFv-Fc and IgG formats. The potential applications of the sAFH-3e3 in a rapid test kit format based on ELISA (scFv-AP) and in a lateral flow immunochromatography assay (LFIA) (IgG) were demonstrated. A comparison of methods for extraction of AFB1 from matrices for use with these assay formats indicated that PBS and TBST are better than 70% methanol.

Key words: recombinant antibody, formats, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), lateral flow immunoassay (LFIA), scFv, scFv-AP, scFv-GFP, alkaline phosphatase, AP, IgG, fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA), Aflatoxin B1

INTRODUCTION

Polyclonal and monoclonal antibodies are the most widely used reagents for food immuno-analysis. However, their production is laborious, time-consuming, costly, requires animal immunization and sacrifice¹. Recombinant antibody has been proven to be highly advantageous overing these limitations. Moreover, recombinant antibodies can be genetically engineered into different formats thus enhancing their utility for different purposes, including effective clinical applications². Recently there is much more focus on generating recombinant antibodies given their flexibility and the need to be able to engineer antibodies to perform much more effectively in newly developing assay platforms such as sensors.

Recent trends in antibody engineering are focusing on small antibody fragments, which can be easily expressed in *E. coli* or other expression systems. These formats include the single-chain variable-fragment (scFv), antigen-binding fragment (Fab) and the single-domain antibody (sdAb). However, such antibody fragments may need to be further engineered to suit different diagnostic purposes and, consequently, may or may not lose binding affinity when some of the non-specificity-associated portions of the antibody are modified^{3,4}. These issues are explored in this study, where a recombinant antibody against aflatoxin was used as a model to investigate the effect of antibody format on binding activity and to evaluate use as an immuno-reagent for food contaminant analysis.

MATERIALS AND METHODS

Materials and chemicals. All reagents were molecular grade or analytical grade. Ani-aflatoxin scFv antibody yAFB1-c3 (parental clone) and three mutant clones (sAFH-3e11, sAFH-3f11 and sAFH-3e3) were produced in our laboratory^{5,6}. Standard aflatoxin B1 (AFB1), B2, G1, G2, M1 and AFB1-BSA conjugate for ELISA and lateral flow assays were obtained from Aokin, Germany and Romer Labs, Austria, respectively. TMB substrate (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine), PNPP substrate (*p*-Nitrophenyl Phosphate) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). *Escherichia coli* TG1 was obtained from the MRC, Cambridge, UK, and used for the production scFv-AP. *E. coli* SHuffle® T7 Express was obtained from New England Biolabs (NEB, Massachusetts, USA). A HiTrap protein A HP and HisTrap HP affinity column were purchased from GE Healthcare (Chicago, USA). Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ fragment (goat anti-human IgG (H+L)) was purchased from Jackson ImmunoResearch Inc. (PA, USA). The HEK293-6E and pTT28 vector were originally developed at the NRC-BRI in Montreal, Canada. The 25 kDa PEI was purchased from Polysciences (Polysciences Europe GmbH, Germany). Serum-free Freestyle™17 (F17) expression medium was obtained from Life Technologies Inc. (Burlington, Ontario, CA). L-glutamine and Pluronic®F-68 were purchased from Sigma-Aldrich® (Oakville, Ontario, CA). Colloidal gold was purchased from BBI solutions (Crumlin, UK).

Estapor Microspheres (Green latex microspheres) size 70 nm (K007) and 169 nm (K3-020) was obtained from Merk Millipore (Darmstadt, Germany).

Conversion of anti aflatoxin scFv to scFv-Fc and IgG. The pTT28 (NRC-BRI, Canada) was used as a framework for the generation of monocistronic IgG and scFv-Fc expression vectors. The vector consisted of a bacterial origin of replication (ori); ampicillin resistance gene (AmpR) for plasmid amplification and selection in *E. coli*, a CMV promoter, which is suitable for expression in HEK 293-6E cells and had the synthetic and codon optimized human signal peptide for protein secretion ⁷.

A schematic diagram for the construction of expression vectors used in this study is shown in Fig. 1. To construct heavy chain expression vector, pKR-CH (Fig. S1-A), the constant heavy chain regions of human IgG1 from pRom108-3D6H chain (gift from Kunert's lab, BOKU, Austria) was amplified with primers containing *NheI* site at 5' end (CH-*NheI*Fw) and *AgeI* site at 3' end (CH-*AgeI*Rv) of constant heavy chain gene and cloned into pTT28 that was cut with respective restriction enzymes (NEB, USA). Cloning of four anti-aflatoxin VH clones (sAFH-3e11, sAFH-3f11 and sAFH-3e3 and yAFB1-c3) ⁵ were performed in a similar manner via the *NheI/NheI* site of the pTT28 vector.

For light chain expression vector, the kappa (κ) light chain was amplified from MIS104 vector (pTT5-3D6 L chain, a gift from Florain's lab, BOKU, Austria) with primer introducing *BsiMI* site at the 5' end and *AgeI* site at the 3' end of the constant light chain gene. The anti-aflatoxin VL (yAFB1-c3) was amplified with primer introducing *NheI* site at the 5' end and *BsiMI* site at the 3' end of VL gene. The kappa (κ) light chain and VL genes were cloned into pTT28 between *NheI/AgeI* sites, resulting in the lambda light chain expression vector pKR-CL_yAFB1.c3 (Fig. S1-B).

For the conversion of scFv to scFv-Fc, the Fc region was amplified from pRom108 by PCR with a primer introducing *BspEI* site at the 5' end (Fc-*BspEI*Fw) and *AgeI* site at 3' end (CH-*AgeI*Rv); while, the 4 anti-aflatoxin scFv genes were amplified with primer introducing *NheI* site at the 5' end and *BspEI* site at the 3' end of scFv gene. Then, the scFv and Fc regions were subcloned into pTT28 via *NheI* and *AgeI* sites. This scFv-Fc vector was designated as KR-scFv-Fc- (yAFB1-c3, sAFH-3e11, sAFH-3f11 and sAFH-3e3) vectors (Fig. S1-C).

All of the PCR reactions were comprised of 0.2 μ M each of primers, 0.2 mM dNTP, 0.25 μ L (1.25 U) of One Taq[®] polymerase (NEB, USA), 0.5 μ L of vector template and made up to 50 μ L with distilled water. Primers for vector construction are listed in Table 1. After digestion of the insert and vector with corresponding restriction enzymes, the vector and insert were joined using T4 DNA ligase (400U/ μ L, NEB, USA) at 25°C for 1 h before transformation into *E. coli* TOP 10 (Thermo Fisher Scientific, USA). The individual colonies were picked and cultured overnight for plasmid preparation using Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer's protocol. The integrity of the plasmids were confirmed by DNA sequencing. Large-scale plasmid preparation for antibody expression was performed by using Nucleobond extra Midi (Macherey-Nagel Germany) from 100-mL culture volume of *E. coli* TOP 10.

Table 1 Primers for the construction scFv-Fc and IgG expression vectors used in this study.

Primer	Sequence
Fc-BspEIFw	5'AGT <u>CTC CGG AGA</u> GCC CAA GAG CTG CGA C3'
CH-NheIFw	5'ATG <u>CGC TAG CAC</u> CAA GGG CCC CAG CGT GTT CC3'
CH-AgeIRv	5'GCC <u>ACC GGT TCA</u> CTT GCC GGG GGA CAG GCT3'
C3 VLNheIFw	5'AGT <u>GCC GCT AGC</u> GAC ACC GTG ATG ACC CAG TCT3'
LC conAgeIRv	5'AGT GCC <u>ACC GGT</u> CTA ACA CTC TCC CCT GTT3'
C3 VHNheIFw	5'GCC <u>GCT AGC</u> CAG GTG CAG CTG GTG CAG TC3'
3E3 VHNheIFw	5'AGT <u>GCC GCT AGC</u> GGG GTG CAG CTG GTG GAG TC3'
VL BspEIRv	5'GCA CAG <u>TCC GGA</u> ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT3'
C3 VHNheIRv	5'TTG GTG <u>CTA GCT</u> GAG GAG ACG GTG ACC AGG G3'
C3 VLNheIFw	5'AGT <u>GCC GCT AGC</u> GAC ACC GTG ATG ACC CAG TCT3'

Sequences corresponding to *NheI*, *BspEI*, *BsiWI* and *AgeI* restriction sites are underlined

Construction of the scFv-AP fusion. The three anti-aflatoxin scFv gene from the phagemid vector⁵ were sub-cloned into the pKP300 Δ III vector⁸ between the *NcoI* and *NotI* sites. The integrity of the construct was confirmed by automated DNA sequencing.

Expression and purification of scFv and scFv-AP. The expression and purification of scFv were done as previously described⁵. The scFv-APs were expressed according to a previously published protocol⁶. For purification, after 18-20 h, the cultures were centrifuged at 7,455 g for 10 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 8 ml of ice-cold periplasmic buffer (1xPBS, 1 M NaCl and 1 mM EDTA) and left on ice for 20 min. The resuspended solution was centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C. The supernatants, comprised of the periplasmic fractions containing scFv fragments, were collected, then MgCl₂ was added to a final concentration of 1 mM. The periplasmic fraction was purified with ÄKTA purifier using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, USA). Before purification, cell debris was removed from cell lysate by filtration (0.45 μ m; Corning, Newyork, USA). A one-ml His-Trap column (GE Healthcare, USA) was equilibrated with 10 mL wash buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.9) before the sample was loaded. The scFv was eluted by performing a linear gradient from 0-100% using high concentration of imidazole (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.9). The gradient length was 2 CVs. Then the antibody fraction was dialyzed with 2 L of TBS buffer containing 1 mM MgCl₂ using 10 kDa snakeskin dialysis tubing (Thermo Scientific, USA) to remove imidazole.

Expression and purification of IgG and scFv-Fc. IgG and scFv-Fc expression vectors were expressed in HEK293-6E cell (NRC-BRI, Canada). Before transfection, the cells were passaged and cultured in F17 media (Invitrogen, USA) supplemented with 4 mM L-Glutamine, 0.1% (v/v) Pluronic F68, and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ G418, at 37 °C, under 5% CO₂ in hydrated atmosphere with shaking at 130 rpm until the cell density reached 1.7-2.0 $\times 10^6$ cells/ml. Then, the cells were transfected with 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of plasmid DNA by slowly adding a 3 mL complex solution of plasmid DNA and PEI (polyethylenimine) (Polysciences, USA) at a ratio of 1:2 ratio. For IgG expression, the 25 mL HEK-293-6E cells were transfected with 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each heavy chain and light chain plasmid DNA. The cells were fed with 0.5% (v/v) TN1 medium (Tekniscience, Canada) 48 h after transfection. The scFv-Fc or IgG were harvested from the culture supernatant after another 72 h of cultivation by centrifugation at 1,300 g for 5 min. The supernatant was passed through a 0.45 μm filter before purification.

Human IgG and scFv-Fc were purified using a 1 mL HiTrap Protein-A HP column (GE Healthcare, USA). The column was equilibrated and washed with PBS buffer. The scFv-Fc or IgG were eluted in 0.1 M glycine-HCl, pH 3.5. The elution fractions were neutralized with 2 M Tris-HCl, pH 8.0 and dialyzed with PBS buffer. The samples were kept at 4 °C until further analysis.

Competitive ELISA using different antibody formats. The purified antibodies were used to test binding sensitivity (scFv-AP, scFv-Fc and IgG) and specificity (scFv-AP) by competitive ELISA as previously described⁶. Briefly, 1 μg AFB1-BSA conjugate (Aokin, Germany) was immobilized on the wells of an ELISA plate and blocked with 2% (w/v) skimmed milk. The optimal concentration of scFv-AP that showed a linear relationship by indirect ELISA was pre-incubated with increasing amounts of soluble AFB1, ranging from 0.028 to 5000 ng mL⁻¹ at 37°C for 30 min before adding into the previously coated wells of the ELISA plates. To develop color, the PNPP substrate was added and the absorbance measured at 405 nm by Sunrise™ Tecan ELISA reader (Männedorf, Switzerland). The data obtained were used to plot inhibition curve as A/A_0 vs logarithm of analyte concentration. A half-maximum inhibition (IC_{50}) was estimated at 50% A/A_0 .

To evaluate binding specificity, the scFv-AP antibody constructs were assayed against a range of soluble aflatoxins, i.e., B1, B2, G1, G2, M1, ochratoxin A (OTA), and zearalenone (ZEN). Stock solutions were diluted using TBST. The assays were performed following the competitive ELISA protocol, as described above. The percentage cross-reactivity (%CR₅₀) was determined by IC_{50} value of aflatoxin B1 divided IC_{50} value of other aflatoxins, multiplied by 100.

For IgG and scFv-Fc, an HRP-conjugated goat anti-human IgG (F(ab')₂) secondary antibody was added and incubated for 1 h. After that, the plate was washed with 3 times PBST and 2 times PBS. Then, TMB substrate was added. The reaction was stopped with 10% (v/v) HCl after incubation for 10-30 min. Triplicate measurements of absorbance values at 450 nm were performed and the average values with SD (standard deviations) were reported.

Cloning and expression of scFv-EmGFP. The gene of the sAFH-3e3 anti-aflatoxin scFv, which showed the best sensitivity,⁵ was sub-cloned from the phagemid vector into the pWS-Green vector (constructed in our laboratory), between the *NcoI* and *NotI* sites. The integrity of the construct was confirmed by automated DNA sequencing.

To express scFv-EmGFP, the sAFH-3e3-EmGFP vector was transformed into *E. coli* SHuffle® T7 Express. A single colony of *E. coli* harboring recombinant plasmid was inoculated into 5 ml of LB media containing 100 µg mL⁻¹ of ampicillin and cultured at 30 °C with shaking at 250 rpm overnight. Four mL of this overnight culture were used to inoculate 400 mL of LB medium containing 100 µg mL⁻¹ of ampicillin. Cells were cultured at 30 °C until an OD₆₀₀ of 0.9 was reached. Then the culture was induced with 0.4mM IPTG and grown with shaking at 25°C, 250 rpm for 16 h.

The cell pellet was harvested by centrifugation at 7,455 g for 10 min, and re-suspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole, pH 7.4) containing 1 mg mL⁻¹ lysozyme. After adding 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), cells were disrupted by intermittent sonication at 40% amplitude for 5 min on ice using 30 s pulse and 30 s break for cooling. The cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C, followed by filtering through a 0.45 µm filter. The antibody was purified using a 1 mL His-Trap column (GE Healthcare, USA) first equilibrated with 10 mL binding buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) before the clear supernatant containing the crude antibody was loaded. Then, the column was washed with 20 mL of the same buffer. The scFv-EmGFP was eluted by performing a linear gradient from 0-100% using a high concentration of imidazole (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4). The gradient length was 3-5 CVs. Fractions containing the scFv-EmGFP fusion protein were pooled and exchanged by dialysis into PBS buffer at 4°C, using 10 kDa MWCO Snakeskin™ dialysis tubing (ThermoFisher Scientific, USA) at 4°C.

Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA). Binding activity of sAFH-3e3-EmGFP antibodies was determined by FLISA. Black Nunc-Immuno 96 well plates (Nunc, Denmark) were coated with 0.25 µg of AFB1-BSA in 100 µL 1XPBS. After incubation at 4 °C overnight, the plates were blocked with 2% (w/v) MPBS at room temperature for 1 h. The plate was washed 3 times with PBS. The optimal dilution of scFv-emGFP that showed a linear relationship by indirect ELISA was pre-incubated with increasing amounts of soluble AFB1 ranging from 0.762 to 5,000 ng mL⁻¹ at 37°C for 30 min before adding into previously coated wells of the FLISA plates. After that, the plate was washed 3 times with 0.05% (v/v) of Tween-20 in PBS (PBST), followed by twic washing with PBS. Finally, 100 µL of PBS was added into the plate wells. The fluorescence intensity was measured by a fluorescence-based microplate reader (ThermoFisher Scientific, USA). The excitation-emission wavelengths were set at 484-509 and 478-506 nm. Standard curves were plotted as A/A₀ vs logarithm of analyte concentration. A half-maximum inhibition (IC₅₀) was estimated at 50% A/A₀

Passive adsorption of antibodies to colloidal gold. Colloidal gold at a particle size of 40 nm (BBI solutions, UK) was used in this study. For conjugation, 5 µg mL⁻¹ of sAFH-3e3 IgG and 5 µg mL⁻¹ of BSA in 100 µL of 0.2 M borate buffer, pH 8.55 were slowly mixed with 10 mL of colloidal gold solution. After 30

min, 100 μL of 1% (w/v) BSA was added to block the surface of colloidal gold particles and incubated for 30 min at room temperature. Centrifugation at 9000 g, at 4°C for 20 min followed and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 20 mL of deionized water. The centrifugation step was repeated. Then 600 μL of deionized water containing 1.2% (w/v) BSA and 0.08% NaN_3 (v/v) were used to resuspend the pellet for stabilizing the conjugate. The antibody-gold complex was diluted with conjugation buffer to 5%-10 % (v/v) before use.

Passive adsorption of antibodies to latex microspheres. The adsorption of purified scFv-Fc and IgG to latex microspheres was modified from a previously described method ⁹. Different concentrations of the antibodies (0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 mg mL^{-1}) and two sizes of latex particles were tested (70 nm and 169 nm, Merk Millipore, Darmstadt, Germany) (see supporting information). To test for the optimal amount of antibody for use, 5 μL of 70 nm green color microspheres were diluted in 445 μL of 10 mM borate buffer, pH 8.7, before conjugation with different concentration of antibodies. To determine optimal size of latex particles for utilisation, 50 μL of 70 and 179 nm latex particles were diluted in 450 μL of 10 mM borate buffer, pH 8.7, before conjugation with appropriate concentrations of antibody. The mixture was centrifuged at 10,000 g for 5 min. The supernatant was carefully discarded. The pellet was resuspended in 250 μL of 10 mM borate buffer, pH 8.7. An equal volume of the sAFH-3e3 scFv-Fc and IgG antibodies in the same borate buffer were added and incubated for 90 min at room temperature with rocking. After incubation, 10% (w/v) BSA was added to block non-specific binding, and further incubated for 45 min. Then, the particles were washed with buffer and centrifuged at 10000 g, 20°C for 5 min. After that, the pellet was resuspended in 500 μL of 100 mM borate buffer, pH 8.7. The antibody- latex particles complex was diluted at 1:3 with borate buffer before use.

Analysis of corn samples spiked with AFB1 using scFv-AP by competitive ELISA. Two grams of corn sample containing 0 ppb AFB1 (Trilogy, USA) were mixed with 20 mL TBST or 70% (v/v) methanol in a glass bottle. This was then vortexed for 3 mins and allowed to stand to let the matrix settle for 10-15 min. After that the solution was filtered through Whatman filter paper No.1. Various concentrations of AFB1 standard (4, 10, 20, 40, 100, 200 and 400 ng mL^{-1}) were spiked into different tubes of the filtered solution. These were diluted in TBST or 70% (v/v) methanol at a ratio of 1:3. Analysis was performed by competitive ELISA, using scFv-AP as described above, except that the spiked AFB1 samples were used instead of AFB1 standards. ELISA plate wells were coated with 0.25 μg of AFB1-BSA and the scFv-AP at a ratio of 1:20 was used. A competitive curve between A/A_0 and concentration of spiked AFB1 was plotted. The IC_{50} and the limit of detection was estimated at 50% A/A_0 and a detection limit was estimated at 70% A/A_0 , respectively.

Detection of AFB1 contaminated in corn samples using lateral flow immunoassay (LFIA). AgraStrip® Aflatoxin WATEX® Quantitative Tests were provided by Romer Labs Division Holding GmbH (Tulln, Austria). The antibodies conjugated with colloidal gold or latex particles were used instead of the conjugated

antibody from the company. The detection of aflatoxin was done according to the instructions from the test kit. Here the LFIA is based on a competitive ELISA. The test strip contained mouse monoclonal antibody and aflatoxin conjugated BSA on the control line and test line, respectively (Fig. S1). Gold and latex particles complex were diluted with their conjugation buffer before use as describe above . For LFIA, 10 grams of corn sample (Romer labs, Austria) were weighed into a bag (provided by Romer labs) and 20 mL of PBS buffer or 70% (v/v) methanol were added. The bags were shaken for 2 min in PBS extraction buffer or 70% (v/v) methanol,. After that, the corn samples were settled by standing the bag for 2 min. Before testing with the lateral flow assay, the extraction sample solution from the bag was diluted in 1:10 with PBS buffer. Then, A 50 μL of different concentrations of AFB1 (100, 50, 25 and 6.25 ppb; Romer Labs) were mixed with 50 μL of antibody-latex complex or colloidal gold conjugated-antibody in the microwell by pipetting up and down. One test strip was put into one microwell for 3 minutes. The signal was measured using a AgraVisionTM Reader (Romer labs, Tulln, Austria). A competitive curve between A/A_0 and logarithm of concentration of spiked AFB1 was plotted. A half-maximum inhibition (IC_{50}) was estimated at 50% A/A_0 and a detection limit was estimated at 70% A/A_0 .

RESULTS AND DISCUSSION

Aflatoxin B1 (AFB1), the model mycotoxin used in this study belongs to a group of mycotoxins that are harmful to human and animal health, due to both acute and chronic effects, including allergic reactions, mutagenicity, immunosuppression, and potent carcinogenicity. It can be found in agricultural commodities and animal feed¹⁰. Maximum level for different type of mycotoxins, especially aflatoxin B1 has been set by many national and international governments and organizations, including the international CODEX standard¹¹.

Among a variety of established methodologies for analyzing mycotoxins, namely thin layer chromatography, ultra-pressured layer chromatography, immunoaffinity chromatography, high-performance liquid chromatography and near infrared spectroscopy¹²⁻¹⁴, immunological methods are among the most rapid, most simple, cheapest, sufficiently sensitive, and most suitable for on-site screening. In the developing countries, which are the major exporters of food and agricultural products such as South-East Asia, Africa, and the Middle East, there is an ever increasing demand for simpler and cheaper methods for the easy detection of mycotoxin contamination¹⁵. The two main immunoassay methods commonly utilized for detecting mycotoxins are ELISA and Lateral flow immunoassay (LFIA). These methods require antibody as the vital reagent for detection. Determining the most appropriate recombinant antibody formats for use in these assays is key step for their optimal exploitation to generate more effective aflatoxin tests.

In this study various formats of anti-aflatoxin B1 antibody were investigated. The expression cassettes and their resulting antibodies are summarized in Fig 1.

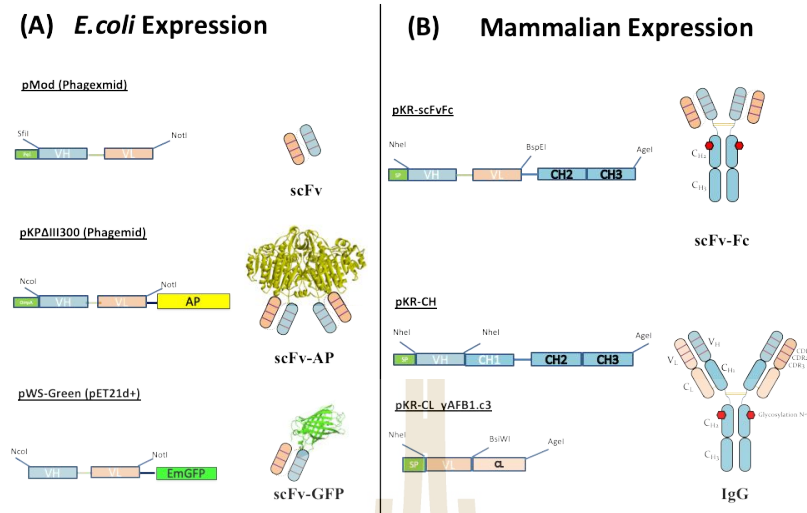


Figure 1. Schematic illustration of phage display and mammalian cassette vectors for the expression scFv, scFv-AP, scFv-GFP, IgG and scFv-Fc in this study. The pMOD, pKPAIII300 phagemids and pWS-Green were used to generate scFv, scFv-AP and scFv-GFP, respectively (A). The restriction sites for cloning scFv fragments are shown. Co-transfection of pKR-CH and pKR-CL_yAFB1.c3 in HEK293-6E cells can produce human IgG₁ (B). The pKR-scFv-Fc was used to express scFv-Fc. The restriction sites for cloning the V regions and scFv fragment are indicated.

Expression and purification of various antibody formats. The four anti-aflatoxin scFvs were converted into IgG and scFv-Fc formats by subcloning into mammalian expression vectors as depicted in Fig. 1. Anti-aflatoxin IgG were produced from 2 monocistronic vectors; i.e., pKR-HC (Fig. 1A) and pKR-CL_yAFB1.c3 (Fig. 1B) by co-transfection of both plasmids into HEK293-6E cells. The mammalian expression vector pKR-scFv-Fc (Fig. 1C) was used for the expression of scFv-Fc. Both IgG and scFv-Fc were produced in HEK293-6E cells on a 25 mL-scale. These antibody formats were purified by protein A affinity chromatography. Purity and apparent molecular weight of purified antibodies was assessed by SDS-PAGE analysis (Fig. S2). Under non-reducing conditions, apparent molecular sizes were approximately 120 and 150 kDa for scFv-Fc and IgG, respectively. Under reducing condition, both heavy and light chains could be observed, of which doublet bands of light chain were detected (Fig. S2-A). This could be because of the heterogeneity in glycosylation that did not interfere with its binding activity as was previously observed¹⁶. Yields of the four different scFv-Fc and IgG antibodies were between 270 to 389 mg L⁻¹, and 277 to 480 mg L⁻¹, respectively. The scFv-Fc formats of the three mutant clones could be purified at a higher yields than those of the parental clones and in IgG formats. These results corresponded with previous observation that the scFv-Fc generated from scFv expressed in higher yields than those of IgG¹⁷. These yields were much higher than that of scFv-AP format that was expressed in *E. coli*, under the control of PhoA promoter and produced in low phosphate media to preserve the alkaline phosphatase activity¹. The scFv-AP bands appeared at the expected size of approximately 80 kDa (Fig. S-2B). The yields of the four different scFv-AP ranged between 0.7 – 2.7 mg L⁻¹.

Competitive ELISA. To determine the sensitivity of various formats of the four antibodies clones (yAFB1-c3, sAFH-3e11, sAFH-3f11 and sAFH-3e3), indirect competitive ELISA was performed. The graphs were plotted from the absorbance values (expressed as A/A_0) and the concentrations of AFB1. The IC_{50} values for the scFv⁵, scFv-AP, scFv-Fc and IgG are shown in Table 2. The results indicated that the sensitivity of antigen detection by different antibodies was influenced by the conversion into different formats. Overall, the scFv-AP format showed the highest sensitivity to aflatoxin with the IC_{50} ranging from 0.007 to 0.06 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For clones sAFH-3e11 and sAFH-3f11, the scFv-Fc format had IC_{50} values close to those of scFv formats, whereas the IgG format showed lower sensitivity. Loss of affinity after conversion of scFv fragment to IgG was previously reported for human anti-CD30¹⁸. However, the yAFB1-c3 IgG format showed higher sensitivity than the scFv and scFv-Fc formats. For sAFH-3e3 clone, which has the highest sensitivity, the IC_{50} of scFv-Fc and IgG formats were similar to that of the scFv format. These results are correlated with several previous studies which demonstrated that conversion of antibody fragments back to full length IgG or scFv-Fc resulted in similar or improved antigen binding¹⁹⁻²¹.

In summary the results from competitive ELISA showed that the conversion of scFv to IgG and scFv-Fc formats did not help to improve the sensitivity of the antibody. However, the yields of IgG and scFv-Fc formats were much higher when produced in a mammalian system, when compared to those in the *E.coli* system. The antibody in the scFv-AP format showed the highest sensitivity by ELISA, which could be because AP is a very efficient enzyme²², and also less washing steps, which could reduce the signal, were required for one-step detection using the scFv-AP format²³. Moreover, since AP is a dimeric enzyme; therefore, scFv-AP is bivalent. An increase in avidity by constructing bivalent scFv-Fc has been reported to increase binding affinity to C-reactive protein (CRP) 50-fold, compared to the monovalent scFv fragment²⁴. Since in this study, the scFv-AP formats showed the highest sensitivity, it was further used to investigate the binding specificity of each antibody in the next step.

Table 2 IC_{50} of different formats of antibody.

	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	scFv (*)	scFv-AP	scFv-Fc	IgG
yAFB1-c3	0.120	0.060	0.230	0.060
sAFH-3e11	0.042	0.009	0.038	0.090
sAFH-3f11	0.055	0.009	0.040	0.070
sAFH-3e3	0.018	0.008	0.022	0.022

*Results from a previous study⁵

Specificity of scFv-AP format against aflatoxin. Cross-reactivity of four scFv-AP clones were determined against structurally related aflatoxins; namely aflatoxin B2, G1, G2, and M1 (a metabolite of B1). Different scFv-AP clones showed various degrees of cross-reactivity against different related aflatoxin

except for AFM1, as shown in Table 3. For sAFH-3e11 the degree of cross reactivity was in decreasing order from AFG1>AFB2>AFG2, whereas the other two mutant clones showed decreasing degree of cross reactivity from AFG1>AFG2>AFB2. Interestingly, clone sAFH-3e3, which has the highest sensitivity against AFB1 (sAFH-3e3) showed cross reactivity to AFM1 and a high percentage of cross reactivity against AFG1 in a similar manner to another previously published clone²⁵. None of these clones showed cross reactivity against non-related mycotoxins; namely, ochratoxin and zearalenone (see supporting information Figure S3). Therefore, these antibodies could be applicable for detection of total aflatoxins.

Table 3 Results of cross-reactivity of four scFv-AP against aflatoxin.

	Cross-reactivity (%)				
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1
yAFB1-c3	100	30.0	70.6	34.3	0.0
sAFH-3e11	100	33.3	83.33	28.6	0.5
sAFH-3f11	100	22.5	75.0	52.9	0.3
sAFH-3e3	100	30.8	125.0	111.0	18.2

Binding activity of scFv-GFP to free mycotoxin by competitive FLISA.

GFP has been successfully used in biosensors²⁶ Hence the binding of recombinant anti-aflatoxin antibody in the scFv-GFP format was investigated to explore the possibility for use in a mycotoxin biosensor detection. The sAFH-3e3 clone, which showed the highest binding activity was fused with EmGFP, and the binding sensitivities were determined by competitive fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA)^{27,28}. The optimal concentrations of conjugated mycotoxins and recombinant scFv-GFP proteins were first determined by checkerboard titration (data not shown). Competitive FLISA indicated that the IC₅₀ of sAFH-3e3-GFP were 26 and 30 ng mL⁻¹ when measured with the excitation/emission wavelengths of 484/509 and 478/506 nm, respectively (Fig. 2). The IC₅₀ values of sAFH-3e3-GFP were close to those of scFv-Fc and IgG but not as low as that of scFv-AP format.

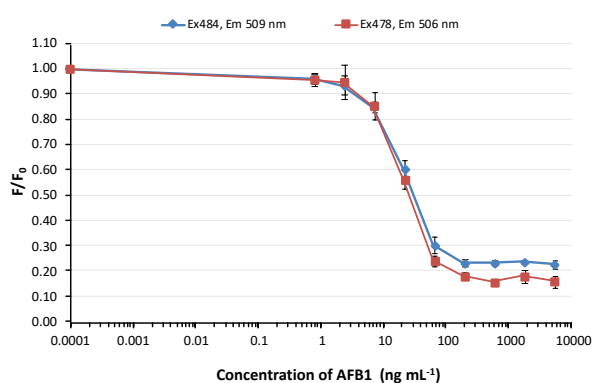


Figure 2. Competitive FLISA of sAFH-3e3 scFv-GFP against AB1-BSA.

Concentrations of soluble AFB1 from 0.762 to 5000 ng mL⁻¹ were incubated with purified sAFH-3e3-GFP antibodies at 37°C for 30 min before addition to wells of Immuno 96 MicroWell plates, coated with 0.25 µg AFB1-BSA. Bound antibodies were detected by fluorescence intensity. Fluorescence values (expressed as F/F₀) were plotted against the logarithm of AFB1 concentration. The IC₅₀ of sAFH-3e3-GFP were 0.26 and 0.030 µg mL⁻¹ when measured with the excitation and emission wavelengths at 484-509 and 478-506 nm, respectively.

Detection of AFB1 from grain samples using scFv-AP. To demonstrate the feasibility of employing recombinant scFv-AP, which showed the best binding performance, for the detection of mycotoxin contamination in agricultural products, competitive ELISA was performed using spiked samples. The IC₅₀ and limit of detection was determined from graph plotted with A/A₀ versus log of concentration of spiked AFB1 (Fig. 3). The result indicated that a suitable buffer for extraction of reference sample was TBST, showing the IC₅₀ value of 9 ng mL⁻¹. Interestingly, the IC₅₀ value was 90 ng mL⁻¹, which was 10 times-lower in sensitivity when 70% methanol was used as extraction buffer. An increase in IC₅₀ is likely due to matrix interferences, which could be decreased by diluting the sample extract with phosphate buffered-tween (PBST) solution¹⁵. The detection limits of scFv-AP when extracted with TBST and 70% methanol were 1.5 and 35 ng mL⁻¹, respectively. While this limit of detection (LOD) is still too high for the CODEX standard, further improvement of binding affinity could be performed to increase the binding affinity using antibody engineering^{29,30}. Nevertheless, these results confirmed the previous observation that recombinant antibody in the format of scFv-AP could be used to detect mycotoxin contamination in agricultural samples¹.

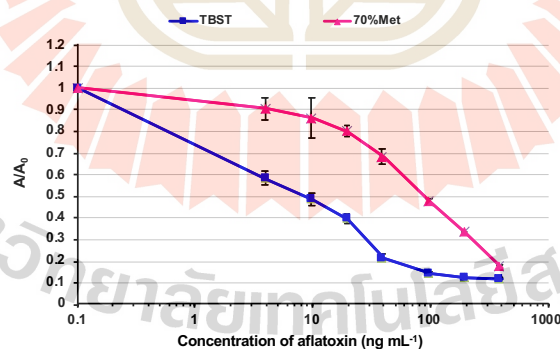


Figure 3. Detection of aflatoxin contamination in agricultural sample using sAFH-3e3-AP. The extraction buffers (TBST or 70% (v/v) methanol; Met) were compared. The spiked AFB1 at various concentration (4, 10, 20, 40, 100, 200 and 400 ng mL⁻¹) were incubated with sAFH-3e3-AP. Absorbance values (expressed as A/A₀) were plotted against the logarithm of AFB1 concentration. The IC₅₀ values of sAFH-3e3-AP when using TBST or 70% (v/v) methanol as extraction buffer were 9 and 90 ng mL⁻¹, respectively.

Recently, several recombinant antibodies have been produced and successfully used for aflatoxin detection in ELISA-based assay on microtiter plate³¹. These included the use of various formats of antibody such as scFv fragment^{6,32-35}, Fab³⁶ and VHH³⁷. So far there have been only a few examples of applying recombinant antibody for lateral flow immuno assay (LFIA) or strip test, e.g., the detection of morphine by using scFv conjugated with colloidal gold³⁸. Since there has been no report on using recombinant antibody as an immunoreagent for the detection of aflatoxin by LFIA; therefore, in the next step, we further investigated the potential use of recombinant antibody for the detection of AFB1 by LFIA.

LFIA for the detection of aflatoxin using colloidal gold-IgG

Colloidal gold is commonly used to conjugate with traditional polyclonal and monoclonal antibodies for incorporation into LFIA or test strips. In this study, quantitative detection of AFB1 was investigated using an AgraStrip (Romer Labs). Colloidal gold conjugated to sAFH-3e3 IgG acted as the prob. The anti-mouse mAb and AFB1-BSA were applied to a strip as a control line (C) and test line (T), respectively.

The corn samples were extracted with PBS. Then, different concentrations of AFB1 were spiked into the extracted solution. These spiked solutions were mixed with IgG labeled with colloidal gold and added to microwells. Then, a test strip was dipped into the well. The IgG-colloidal gold complex flowed along the membrane, encountered the coated AFB1-BSA and was captured. Thus a red color appeared at the test line (T). When AFB1 was present in the sample, the binding of the IgG-colloidal gold to the AFB1-BSA was inhibited and the colour on the test line was reduced. The control line is visible because of the reaction between colloidal gold- sAFH-3e3 IgG and anti mouse IgG, indicating good functionality of the test. The red color intensity of the test lines decreased with increasing AFB1 concentrations. The intensity of the test line on a strip was evaluated using an AgraStrip reader (Romer Labs, Austria). Graphs were plotted from the peak values. There was an inverse relationship between the signal intensity and aflatoxin concentration. The result showed that the IC_{50} value was 28 ppb. The limit of detection was estimated from the graph at $0.7 A/A_0$ as 6 ppb (Fig. 4).

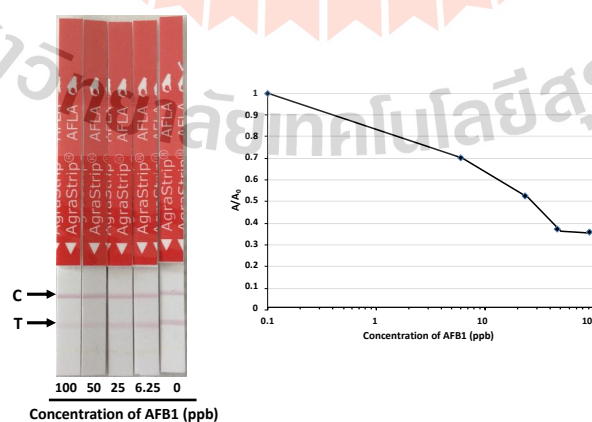


Figure 4. LFIA analysis of extracted corn sample spiked with AFB1 standard using colloidal gold-sAFH-3e3 IgG antibody. Various concentration of soluble AFB1 mixed with colloidal gold-antibody conjugated were tested. The red color at the test line (T) decreased when the concentration of AFB1

increased. The graph was plotted from A/A_0 against log of the concentration of AFB1; A= peak area value of each concentration of spiked AFB1, A_0 = peak area value at 0 ppb.

LFIA for the detection of aflatoxin using latex-IgG

Colloidal gold is widely used as a labels for LFIA, but appears mainly as as red color. Latex particles offer a wider range of colors, which will be useful for multiplexing LIFA for the detection of multiple mycotoxins. Therefore, the sAFH-3e3 IgG–latex was generated to investigate its potential use for the detection of mycotoxin contamination in LFIA. The procedure was the same as that used for the colloidal gold conjugated antibody, except that the IgG-latex conjugation gave a green color on the test line and control line. As illustrated in Fig. 5, the result showed that the IC_{50} value was 18 ppb. When 70% methanol was used as the extraction buffer, the IC_{50} values was 70 ppb. This result and a previous observation³⁹ indicated that water-based buffer is a suitable extraction buffer for LFIA. The limit of detection when using PBS as an extraction buffer was at 5 ppb. In this study, the extraction solution was diluted 1:3, as a multifold dilution has been shown to reduce matrix interference and improve sensitivity⁴⁰.

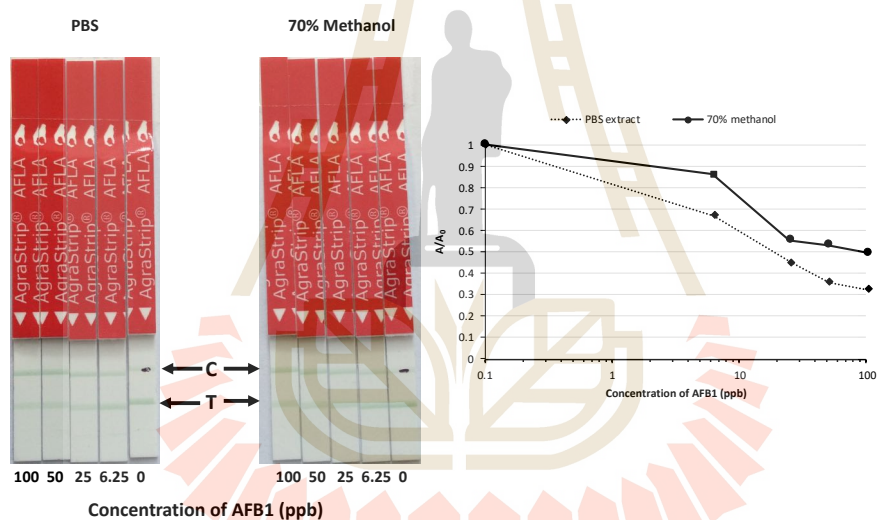


Figure 5. LFIA analysis of extracted corn sample spiked with AFB1 standard using latex microsphere-sAFH-3e3 IgG antibody. Corn sample was extracted with PBS buffer or 70% (v/v) methanol and spiked with various concentration of AFB1. The green color in the test line (T) decreased when the concentration of AFB1 was increased. Graph was plotted from A/A_0 against log of concentration of aflatoxin; A= peak area of each concentration of spiked AFB1, A_0 = peak area at 0 ppb.

This is the first preliminary study on using recombinant antibody based conjugation with latex particles as a detection probe for LFIA. The results showed that both gold and latex can be used to conjugate with recombinant IgG for in LFIA. To improve the performance of LFIA, various parameters can be optimized, e.g., the conjugation methods, types of strip utilised, and concentrations of reagents on the test and control lines⁴¹.

CONCLUSIONS

In this study, the effects of recombinant antibody formats on their performance were investigated by using an antibody against AFB1 as a model. Four recombinant antibodies against AFB1 were engineered into 4 different formats, i.e., scFv-AP, scFv-Fc, IgG, and scFv-EmGFP. The binding properties of these antibodies were compared. The results showed that when scFv were converted to different formats, they can retain, increase or loss binding activity, depending on the variable sequence of the clones. The scFv-AP format was found to be highly suitable for the detection by ELISA; however, the production yield is relatively low, when compared to scFv-Fc or IgG constructs. The IgG format, conjugated to either gold or latex particles, was highly applicable for the detection of mycotoxin by LFIA.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Tel: +66 44 224388. Fax: +66 44 224154. Email: montarop.g@sut.ac.th

Notes

Any additional relevant notes should be placed here.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Suranaree University of Technology (SUT), grant number SUT3-304-62-12-17, Thailand Science Research and Innovation (TSRI), grant number RTA6180012, National research and Innovation Information System, grant no. CRP550701085 and Ernst Mach Grant, Nachbetreuungsstipendium/EZA from Federal Ministry of Education, Science and Research (BMBWF), grant no. ICM-2019-14954. KR were supported by SUT Full-time Doctoral Research [grants no.61/13/2561]. We would like to thank Dr. Milica Sevo for her help with the design and construction of IgG vector. We are grateful to Romer Laboratories Co., especially Julia Mayer, in Tulln, Austria, for the facility and expertise that involve aflatoxin analysis and lateral flow assay. We also greatly appreciate Dr. Jenny Fitzgerald, Dr. Paul Leonard, and Dr Hui Ma from Dublin City University for their excellent technical support.

REFERENCES

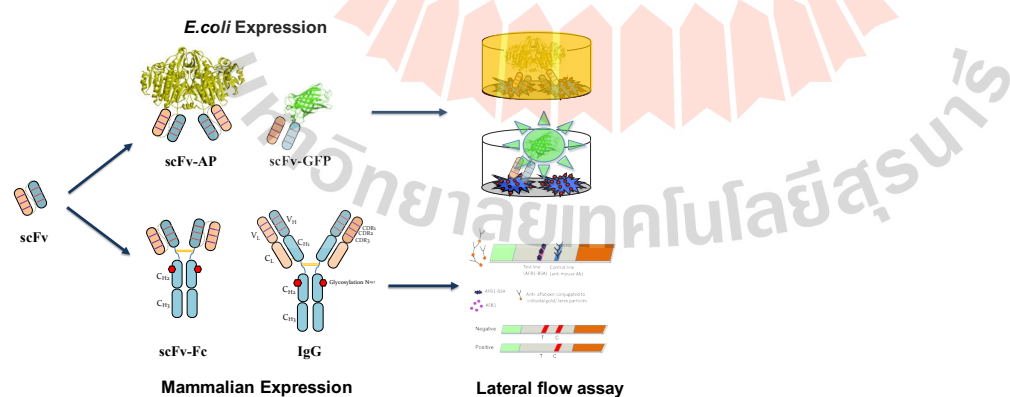
- (1) Sompunga, P.; Pruksametanan, N.; Rangnoi, K.; Choowongkamon, K.; Yamabhai, M. Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of Zearalenone by phage display antibody technology. *Talanta* **2019**, *201*, 397-405.
- (2) Wan, L.; Zhu, S.; Zhu, J.; Yang, H.; Li, S.; Li, Y.; Cheng, J.; Lu, X. Production and characterization of a CD25-specific scFv-Fc antibody secreted from *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, *97*, 3855-3863.
- (3) Wang, S.-H.; Du, X.-Y.; Huang, Y.-M.; Lin, D.-S.; Hart, P. L.; Wang, Z.-H. Detection of deoxynivalenol based on a single-chain fragment variable of the antideoxynivalenol antibody. *FEMS Microbiology Letters* **2007**, *272*, 214-219.

- (4) Yuan, Q.; Clarke, J. R.; Zhou, H. R.; Linz, J. E.; Pestka, J. J.; Hart, L. P. Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol* **1997**, *63*, 263-269.
- (5) Rangnoi, K.; Choowongkamon, K.; O’Kennedy, R.; Rüker, F.; Yamabhai, M. Enhancement and analysis of human antiaflatoxin b1 (AFB1) scFv antibody–ligand interaction using chain shuffling. *Journal of agricultural and food chemistry* **2018**, *66*, 5713-5722.
- (6) 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. *Molecular biotechnology* **2011**, *49*, 240-249.
- (7) Tole, S.; Mukovozov, I. M.; Huang, Y. W.; Magalhaes, M. A.; Yan, M.; Crow, M. R.; Liu, G. Y.; Sun, C. X.; Durocher, Y.; Glogauer, M. The axonal repellent, Slit2, inhibits directional migration of circulating neutrophils. *Journal of leukocyte biology* **2009**, *86*, 1403-1415.
- (8) Pershad, K.; Sullivan, M. A.; Kay, B. K. Drop-out phagemid vector for switching from phage displayed affinity reagents to expression formats. *Analytical biochemistry* **2011**, *412*, 210-216.
- (9) Brüning, A.; Bellamy, K.; Talbot, D.; Anderson, J. A rapid chromatographic strip test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus. *Journal of virological methods* **1999**, *81*, 143-154.
- (10) Shephard, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and contaminants* **2008**, *25*, 146-151.
- (11) Yamabhai, M.; Rangnoi, K.; Sompunga, P.; O’Kennedy, R. In *Rapid Antibody-based Technologies in Food Analysis*; The Royal Society of Chemistry, 2019, pp 195-222.
- (12) Goryacheva, I. Y.; Saeger, S. d.; Eremin, S. A.; Peteghem, C. V. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. *Food additives and contaminants* **2007**, *24*, 1169-1183.
- (13) Li, P.; Zhang, Q.; Zhang, D.; Guan, D.; Liu, D. X.; Fang, S.; Wang, X.; Zhang, W. In *Aflatoxins-Detection, Measurement and Control*; Citeseer, 2011.
- (14) Zheng, M. Z.; Richard, J. L.; Binder, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* **2006**, *161*, 261-273.
- (15) Masinde, L. A.; Sheng, W.; Xu, X.; Zhang, Y.; Yuan, M.; Kennedy, I. R.; Wang, S. Colloidal gold based immunochromatographic strip for the simple and sensitive determination of aflatoxin B1 and B2 in corn and rice. *Microchimica Acta* **2013**, *180*, 921-928.
- (16) Chan, C. E.; Chan, A. H.; Lim, A. P.; Hanson, B. J. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *Journal of immunological methods* **2011**, *373*, 79-88.
- (17) Steinwand, M.; Droste, P.; Frenzel, A.; Hust, M.; Dübel, S.; Schirrmann, T. In *MAbs*; Taylor & Francis, 2014, pp 204-218.
- (18) Menzel, C.; Schirrmann, T.; Konthur, Z.; Jostock, T.; Dübel, S. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood* **2008**, *111*, 3830-3837.

- (19) Ames, R. S.; Tornetta, M. A.; Deen, K.; Jones, C. S.; Swift, A. M.; Ganguly, S. Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins. *J Immunol Methods* **1995**, *184*, 177-186.
- (20) Huls, G. A.; Heijnen, I. A.; Cuomo, M. E.; Koningsberger, J. C.; Wiegman, L.; Boel, E.; van der Vuurst de Vries, A. R.; Loyson, S. A.; Helfrich, W.; van Berge Henegouwen, G. P.; van Meijer, M.; de Kruijff, J.; Logtenberg, T. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* **1999**, *17*, 276-281.
- (21) Liu, B.; Conrad, F.; Roth, A.; Drummond, D. C.; Simko, J. P.; Marks, J. D. Recombinant full-length human IgG1s targeting hormone-refractory prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* **2007**, *85*, 1113-1123.
- (22) Yamabhai, M.; Kay, B. K. Mapping protein-protein interactions with alkaline phosphatase fusion proteins. *Methods in enzymology* **2001**, *332*, 88-102.
- (23) Yamabhai, M. BAP-fusion: A versatile molecular probe for biotechnology research. *Biotechnology: Research, technology and applications* **2008**, 327-345.
- (24) Pohl, S. C.; Schwarz, S.; Frenzel, A.; Schirrmann, T. A cassette vector system for the rapid cloning and production of bispecific tetravalent antibodies. *Antibodies* **2012**, *1*, 19-38.
- (25) Moghaddam, A.; Løbersli, I.; Gebhardt, K.; Braunagel, M.; Marvik, O. J. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries. *Journal of immunological methods* **2001**, *254*, 169-181.
- (26) Crone, D. E.; Huang, Y.-M.; Pitman, D. J.; Schenkelberg, C.; Fraser, K.; Macari, S.; Bystroff, C. In *State of the Art in Biosensors-General Aspects*; IntechOpen, 2013.
- (27) Magnusson, K.-E.; Bartonek, E.; Nordkvist, E.; Sundqvist, T.; Asbrink, E. Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) for quantification of antibodies to food antigens. *Immunological investigations* **1987**, *16*, 227-240.
- (28) Chen, M.; Ding, S.; Wen, K.; Xie, S.; Wang, Q.; Pei, X.; Xie, J.; Wang, Z.; Jiang, H. Development of a fluorescence-linked immunosorbent assay for detection of avermectins using a fluorescent single-domain antibody. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 3728-3734.
- (29) Ducancel, F.; Muller, B. H. In *MABs*; Taylor & Francis, 2012, pp 445-457.
- (30) Tiller, K. E.; Tessier, P. M. Advances in antibody design. *Annual review of biomedical engineering* **2015**, *17*, 191-216.
- (31) Yamabhai, M.; Rangnoi, K.; Sompunga, P.; O'Kennedy, R. In *Rapid Antibody-based Technologies in Food Analysis*, 2019, pp 195-222.
- (32) Yang, L.; Ding, H.; Gu, Z.; Zhao, J.; Chen, H.; Tian, F.; Chen, Y. Q.; Zhang, H.; Chen, W. Selection of single chain fragment variables with direct coating of aflatoxin B1 to enzyme-linked immunosorbent assay plates. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, *57*, 8927-8932.
- (33) Li, X.; Li, P.; Zhang, Q.; Li, Y.; Zhang, W.; Ding, X. Molecular characterization of monoclonal antibodies against aflatoxins: a possible explanation for the highest sensitivity. *Analytical chemistry* **2012**, *84*, 5229-5235.

- (34) Li, X.; Li, P.; Lei, J.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Li, C. A simple strategy to obtain ultra-sensitive single-chain fragment variable antibodies for aflatoxin detection. *RSC advances* **2013**, *3*, 22367-22372.
- (35) Min, W. K.; Kim, S. G.; Seo, J. H. Affinity maturation of single-chain variable fragment specific for aflatoxin B(1) using yeast surface display. *Food Chem* **2015**, *188*, 604-611.
- (36) Edupuganti, S. R.; Edupuganti, O. P.; Hearty, S.; O’Kennedy, R. A highly stable, sensitive, regenerable and rapid immunoassay for detecting aflatoxin B1 in corn incorporating covalent AFB1 immobilization and a recombinant Fab antibody. *Talanta* **2013**, *115*, 329-335.
- (37) He, T.; Wang, Y.; Li, P.; Zhang, Q.; Lei, J.; Zhang, Z.; Ding, X.; Zhou, H.; Zhang, W. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol. *Analytical chemistry* **2014**, *86*, 8873-8880.
- (38) Gandhi, S.; Banga, I.; Maurya, P. K.; Eremin, S. A. A gold nanoparticle-single-chain fragment variable antibody as an immunoprobe for rapid detection of morphine by dipstick. *RSC advances* **2018**, *8*, 1511-1518.
- (39) Anfossi, L.; d’Arco, G.; Calderara, M.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Giraudi, G. Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. *Food Additives and Contaminants* **2011**, *28*, 226-234.
- (40) Yan-Jun, X.; Ying, Y.; Wei-Jun, K.; Shi-Hai, Y.; Mei-Hua, Y. Application of nanoparticle probe-based lateral flow immunochromatographic assay in mycotoxins detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2015**, *43*, 618-628.
- (41) Garcia, V. S.; Guerrero, S. A.; Gugliotta, L. M.; Gonzalez, V. D. A lateral flow immunoassay based on colored latex particles for detection of canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica* **2020**, *212*, 105643.

“for TOC only”



ประวัตินักวิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2510 เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. 2532 แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา 1 ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี 2536 ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา 9 เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. 2541 จากนั้นในปี พ.ศ. 2543-2545 ได้ทุน NIH ไปทำ postdoctoral research ที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. 2546-2547 ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Institute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าห้องปฏิบัติการ อนุเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอนุ (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยี เฝจ (phage display technology) และ เทคนิคอนุวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) เพื่อสร้าง ชีวเภสัชภัณฑ์ มูลค่าสูง มีผลงานตีพิมพ์ใน ฐาน ISI 52 เรื่อง h-index 21, citation 1999 ฐาน Scopus 65 เรื่อง h-index 23, citation 2238 ฐาน Google Scholar 70 เรื่อง h-index 26, citation 3267 เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาระดับ หลังปริญญาอก 9 คน ปริญญาเอก 13 คน ระดับปริญญาโท 9 คน และมัธยมศึกษา 10 คน

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร 044 224152-4 224234 หรือ 244388 โทรสาร 044 224150

Email: montarop@gs.sut.ac.th;

[Website](http://mylab.sut.ac.th/home.html) : <http://mylab.sut.ac.th/home.html>