Thesis Title	Development of ELISA Method by Using Monoclonal Antibody for Aflatoxin B_1 Determination
Author	Mr. Suwiwek Lipigorngoson
M.Sc.	Biochemistry

Examining committee :

Assistant Prof. Dr. Porn-ngarm	Limtrakul	Chairman
Associate Prof. Dr. Maitree	Suttajit	Member
Assistant Prof. Dr. Luksana	Makonkawkeyoon	Member
Dr. Damras	Sapyen	Member

Abstract

Several agricultural products such as peanut, corn, dried herbs, nut and animal feedstuffs are always contaminated with aflatoxin B_1 (AFB_1) which is a potent mutagen and hepatic carcinogen. AFB_1 is the important toxic metabolite from fungi, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The contamination leads to health hazard in farm animals and human consumers depending on frequency and quantity of aflatoxin intake. It also causes the loss of exporting economy

for agricultural commodities. The presence of AFB_1 in foods and feeds can be detected chemically by thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry. Such the determination methods can not provide the specificity of aflatoxin and its derivatives, sensitivity and simplicity of procedure. Many clean-up steps, extraction and elution, expensive instrument are needed which are time-consuming and clumsy. Skillful personnels are also required. According to such the problems, this study has aimed to develope a quick and practical method for determining AFB_1 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which is a sensitive, highly specific, economical and suitable for future field work. The studies also include a quality control, validity, sensitivity and aflatoxin specificity of the method.

In the present study, an improved ELISA combined with monoclonal antibody (MAb) and one step extraction method was established for the determination of AFB_1 in corn seeds and ground peanut. Eight stable hybridoma cells, secreting IgG anti-AFB_1 MAbs (AF1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8), were used as the source of MAb production. The direct competitive ELISA (direct cELISA) system was developed for AFB_1 determination by using these anti-AFB_1 MAbs. AFB_1-horseradish peroxidase conjugates was synthesized as the enzyme maker by a carbodiimide method. The levels of AFB_1 in corn seeds and ground peanut determinated by the locally made ELISA were compared

with those from TLC, and commercial ELISA kits (International Diagnostic Systems Corp., USA).

The minimum detectable limits of the direct cELISA with AF1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 were 10, 20, 2, 2.5, 2, 5, 2 and 2.5 pg of standard AFB_1 per assay, respectively. The cross reactivity to other aflatoxin derivatives was that MAbs were reactive with AFG_1 as well as AFB_1, weakly with AFL I > AFL II > AFB_2 > AFG_2 > AFM_1, respectively, except AF5 weakly with AFG_1.

It was concluded that the 80% aqueous methanol extracts of corn seeds and ground peanut, naturally contaminated with AFB_1, were assayed by the direct cELISA without further sample purification and the minimum detectable limit of the ELISA with the most sensitive MAb AF5 was 1 ppb while TLC was 10 ppb. The correlation coefficients between locally made ELISA with commercial ELISA kits and TLC method were 0.92 and 0.87 for corn seeds ($p<0.05$), and 0.94 and 0.84 for ground peanut ($p<0.05$), respectively.

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีอีไลซ่าโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี เพื่อตรวจหาอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

ผู้เขียน นายสุวิเวก ลิปิกรโกศล

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผศ. ดร. พรงาม	ลิ้มตระกูล	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ไมตรี	สุทธจิตต์	กรรมการ
ผศ. ดร. ลักษณา	มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
ดร. ดำรัส	ทรัพย์เย็น	กรรมการ

บทคัดย่อ

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้แก่ ถั่วลิสง ข้าวโพด และอาหารสัตว์ มักมีสารพิษอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (AFB_1) ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งตับปนเปื้อนอยู่ สารพิษนี้สร้างมาจากเชื้อราพวกแอสเปอร์จิลัสฟลาวัสและพาราซิติกัส หากไม่มีการควบคุมอะฟลาทอกซินจะก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของสัตว์และคน ความรุนแรงของพิษที่ได้รับขึ้นอยู่กับปริมาณของอะฟลาทอกซินที่คนและสัตว์ได้รับเข้าไป และยังก่อปัญหาทางด้านเศรษฐกิจในการส่งสินค้าเกษตรออกจำหน่ายต่างประเทศอีกด้วย สำหรับการตรวจวัด AFB_1 ในธัญพืชและผลิตภัณฑ์ทางอาหารมีหลายวิธี อาจใช้วิธีทางเคมี เช่น โครมา

โทรกราฟีผิวบาง (thin-layer chromatography, TLC) หรือโครมาโทรกราฟีสมรรถนะภาพสูง โดยใช้คอลัมน์และความดันร่วม (high-performance liquid chromatography) หรือสเปคโตรเมตรี แยกมวลสาร (mass spectrometry) แต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถแยกความจำเพาะต่อชนิดของอะฟลาทอกซินผลที่ได้อาจขาดความแน่นอน และความไว การวิเคราะห์ต้องทำสารตัวอย่างให้สะอาดบริสุทธิ์เสียก่อน มีขั้นตอนมากทำให้เสียเวลา และค่าใช้จ่ายสูงประกอบกับเครื่องมือในการตรวจสอบล้วนแต่ราคาแพง ต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ และทักษะเป็นอย่างดี ดังนั้น เนื่องจากปัญหาหลายประการดังกล่าว การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการในทางปฏิบัติอย่างรวดเร็วในการตรวจวัดอะฟลาทอกซิน โดยวิธีอีไลซ่า (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) เนื่องจากวิธีทางอีไลซ่านับเป็นวิธีที่ไว มีความจำเพาะสูงและราคาประหยัด เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในสถานที่ต่าง ๆ นอกห้องปฏิบัติการได้สะดวกและง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้และทักษะเป็นอย่างดีก็สามารถนำไปปฏิบัติได้ วิทยานิพนธ์นี้จะได้ประเมินถึงคุณภาพ ความน่าเชื่อถือ ความไวของวิธีการและความจำเพาะต่ออะฟลาทอกซินด้วย

การทดลองนี้ได้ศึกษาการตรวจหา AFB_1 ในเมล็ดข้าวโพดและถั่วลิสงป่นด้วยวิธี ELISA โดยใช้การสกัด AFB_1 จากสารตัวอย่างเพียงขั้นตอนเดียวร่วมกับการใช้ Monoclonal antibody (MAb) ที่มีประสิทธิภาพสูง เซลล์ไฮบริโดมาที่แข็งแรงสมบูรณ์ ที่ผลิต MAbs ชนิด IgG จำนวน 8 โคลน (AF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8) ได้ศึกษาเปรียบเทียบ MAb ที่ได้จากโคลนทั้ง 8 ชนิด ในการตรวจสอบ AFB_1 โดยวิธี direct competitive ELISA (direct cELISA) ร่วมกับสารคอนจูเกตระหว่าง AFB_1 กับเอ็นไซม์ horseradish peroxidase เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา ซึ่งเตรียมโดยวิธี carbodiimide นำผลการวิเคราะห์ AFB_1 ในเมล็ดข้าวโพดและถั่วลิสงป่นที่ได้ โดยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเองมาเปรียบเทียบกับวิธี TLC และน้ำยาสำเร็จรูป ELISA จากต่างประเทศ (น้ำยา International Diagnostic System Corp. สหรัฐอเมริกา)

ผลการทดลองพบว่า ความไวของวิธี direct cELISA ต่อ AF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 คือ 10, 20, 2, 2.5, 2, 5, 2 และ 2.5 pg ของ AFB_1 ตามลำดับ จากการศึกษาปฏิกิริยา cross reaction ของอนุพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ของ AFB_1 โดยวิธี direct cELISA นั้นพบว่า ทุก ๆ MAbs จะทำปฏิกิริยากับ AFG_1 ได้ดีพอ ๆ กับ AFB_1 และทำปฏิกิริยากับอนุพันธุ์อื่น ๆ ตามลำดับ ดังนี้ AFL I > AFL II > AFB_2 > AFG_2> AFM_1 ยกเว้น AF5 จะทำปฏิกิริยากับ AFG_1 ได้น้อยกว่า AFB_1.

สรุปได้ว่าการสกัดสารตัวอย่างด้วย 80% methanol เพียงขั้นตอนเดียวร่วมกับการใช้ MAb ที่ผลิตจาก โคลน AF5 (ที่มีความไวสูงสุด) เพื่อตรวจหา AFB_1 ในเมล็ดข้าวโพดและถั่วลิสงป่น โดยวิธี direct cELISA สามารถวัดได้ค่าต่ำสุดคือ 1 ppb ในขณะที่วิธีการตรวจวัด แบบ TLC ค่าต่ำสุดที่วัดได้ 10 ppb และยังพบว่าวิธี ELISA นี้สามารถใช้ทดแทนวิธี TLC ได้ดี เพราะว่าผลของการวิเคราะห์ระดับ AFB_1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจำนวนมากโดยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเองมีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลของการวัดโดยใช้น้ำยาอีไลซ่าต่างประเทศ และวิธี TLC โดยทางสถิติมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = 0.92 และ 0.87 สำหรับการตรวจวัดในเมล็ดข้าวโพด ($p<0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = 0.94 และ 0.84 สำหรับการตรวจวัดในถั่วลิสงป่น ($p<0.05$).