

# NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) AS A METHOD OF CHARACTERIZING ANTIGEN SYNTHESIS FOR SUCCESSFUL ANTIBODY PRODUCTION

Lusiani Dewi Assaat<sup>1\*</sup>, Endang Saepudin<sup>2\*\*</sup>, Retno Damayanti Soejoedono<sup>3\*\*\*</sup>, Rahmat Setya Adji<sup>4\*\*\*\*</sup>, Sofa Fajriah<sup>5\*\*\*\*\*</sup>, Tribidasari Anggraningrum Ivandini<sup>6\*\*\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Departemen of Chemistry Education, Faculty of Teacher Training and Education, Sultan Ageng Tirtayasa University, Banten, Indonesia.

<sup>2,6</sup> Departement of Chemistry, Faculty of Mathematics and natural Sciences, Indonesia University, Depok, Indonesia.

<sup>3</sup> Departement of Animal Disease and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agriculture University, Bogor, Indonesia.

<sup>4</sup> Centre of Veterinary Research, Bogor, Indonesia.

<sup>5</sup> Research Center For Chemistry, LIPI, Tangerang, Banten, Indonesia.

<sup>1</sup> Bioengineering and Biomedical laboratory, Faculty of Engineering, Sultan Ageng Tirtayasa University, Banten, Indonesia.

E-mail: \*assaatlusi@gmail.com

Received: 06 Juni 2021. Accepted: 19 Mei 2023. Published: 31 Mei 2023

DOI: 10.30870/educhemia.v8i1.15572

**Abstract :** Antibody production is becoming a trend, especially during a pandemic like now, although there have been many developments in antibody production in previous research. Antigen synthesis and characterization is one of the determining factors for the success of antibody production. This research developed a method of antigen characterization using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method. The research conducted in these 4 stages begins with antigen synthesis, then continues with antigen characterization using NMR, then antibody production, and the last stage is antibody characterization using the Enzyme Linked ImmunoAssay (ELISA) method. The results of antigen characterization using NMR show that NAS has been perfectly conjugated with BSA and produces a NAS-BSA conjugate. This is shown by the presence of 1 methylene (CH<sub>2</sub>) olefinic at  $\delta$ H chemical shift of 6.27 ppm with an integral of 4 and having 1 piece of methine (CH) sp<sup>2</sup> at  $\delta$ H chemical shift of 5.73 ppm with an integral of 2. NAS-BSA antigens have been shown to successfully produce antibodies. This is shown from the anti-NAS-BSA, NAS, and Acrylamide antibodies that begin to appear in the second, third and fourth boosting (respectively).

**Keywords:** Nuclear Magnetic Resonance (NMR), characterization, antigen, antibody production

**Abstrak :** Produksi antibody sedang menjadi trend terutama pada masa pandemi seperti sekarang, meskipun telah banyak pengembangan produksi antibody pada riset sebelumnya. Sintesis dan karakterisasi antigen merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan produksi antibody. Riset ini mengembangkan suatu metode karakterisasi antigen menggunakan metode *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR). Riset yang dilakukan dalam 4 tahapan ini diawali dengan sintesis antigen, kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi antigen menggunakan NMR, selanjutnya produksi antibody, dan tahap terakhir adalah karakterisasi antibody menggunakan metode *Enzyme Linked ImmunoAssay* (ELISA). Hasil karakterisasi antigen menggunakan NMR menunjukkan bahwa NAS telah terkonjugasi sempurna dengan BSA dan menghasilkan suatu konjugat NAS-BSA. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 1 buah metilen ( $\text{CH}_2$ ) olefinik pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  6,27 ppm dengan integral sebanyak 4 dan memiliki 1 buah metin (CH)  $\text{sp}^2$  pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  5,73 ppm dengan integral sebanyak 2. Antigen NAS-BSA yang terbukti telah berhasil menghasilkan antibody. Hal ini ditunjukkan dari antibody anti NAS-BSA, NAS, dan Akrilamida yang mulai muncul pada boosting kedua, ketiga dan keempat (berturut-turut).

**Keywords:** Nuclear Magnetic Resonance (NMR), characterization, antigen, antibody production

---

## PENDAHULUAN

Produksi antibody menjadi trend beberapa tahun belakangan ini. Terlebih lagi di era pandemik, kekuatan antibody menjadi penentu utama yang menjadi tameng ketika seseorang terpapar penyakit. Sebetulnya, produksi antibody ini bukanlah suatu hal yang baru di dunia riset imunologi. Telah banyak dikembangkan berbagai riset produksi antibody untuk suatu keperluan di bidang kesehatan, baik sebagai deteksi penyakit (Wu et al, 2014; Zhou et al, 2008; Hu et al, 2015), atau sebagai peningkat imunitas.

Keberhasilan suatu produksi antibody tidak terlepas dari beberapa faktor, diantaranya adalah antigen yang digunakan, jalur dan dosis penyuntikan,

dan hewan uji yang digunakan. Antigen merupakan salah satu factor keberhasilan produksi antibody. Antigen dapat berupa protein, karbohidrat, lipid, asam nukleat atau senyawa kimia yang disebut sebagai haptan (Delves *et al.*, 2011). Haptan merupakan senyawa organik kecil yang bersifat antigenik, tetapi tidak immunogenik. Haptan dapat dikonjugasikan dengan suatu antigen agar dapat memicu terbentuknya imun di dalam tubuh, sehingga konjugat haptan-antigen ini dapat bersifat immunogen. Haptan dapat terkonjugasi dengan antigen, dikarenakan memiliki gugus fungsi yang bisa bereaksi spesifik dengan protein pembawa (antigen).

Antigen harus memiliki berat molekul setidaknya 10.000 Da agar dapat

memiliki sifat immunogenik (Kindt, T., J., *et al.* 2007). Oleh karena itu desain dan sintesis antigen merupakan factor awal yang paling menentukan dalam produksi antibody. Untuk memastikan antigen yang digunakan, setidaknya harus dilakukan karakterisasi terhadap antigen yang berhasil disintesis. Spektrofotometer Uv-Visible, IR lazim digunakan sebagai instrumen untuk karakterisasi antigen. Sedangkan penggunaan NMR belum banyak diaplikasikan untuk karakterisasi antigen. Pada riset ini, kami mengembangkan suatu metode karakterisasi antigen, menggunakan NMR sebagai penentu keberhasilan produksi antibody. Riset ini bertujuan untuk mengembangkan metode karakterisasi antigen hasil sintesis menggunakan metode NMR untuk keberhasilan produksi antibody.

## METODE

Bahan yang digunakan meliputi *N-acryloxysuccinimide (NAS)*, *bovine serum albumin (BSA)*, *phosphate buffer saline (PBS)*, *polyethylene glycol (PEG) 2000*, *3,3', 5,5'Tetramethylbenzidine (TMB)*, *Tween 20*, *goat antirabbit IgG-HRP*, *Freund's complete* dan *incomplete adjuvants*, *protein A antibody purification kits*, dan berbagai bahan kimia dari *Sigma Aldrich*. *Double*

*distilled water (maximum conductivity of 18 MΩ)*, *pap pens*, dan *plastic backing sheet* dari *Daido Sangyo, Japan*.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi microDrop ND-1000 spectrophotometer UV-Visible (Thermo Scientific Multiscan Go.), a vortex mixer (Thermo Scientific), an MPW-352R centrifuge (Med Instrument), a Fourier Transform Infra Red (FTIR; Agilent) instrument, an HR-transmission electron microscopy (TEM; Hitachi H-8100), dan H NMR JEOL Resonance ECZ500R.

Penelitian ini didesain menjadi 4 tahap berikut:

### ***Tahap 1: Sintesis Antigen***

0,1 mL NAS (20 mg/mL NAS dalam DMSO) ditambahkan ke dalam 1 mL BSA (1 mg/mL BSA dalam bufer fosfat pH 8) kemudian di aduk selama 3 jam pada suhu 36 °C. Larutan kemudian di dialisis menggunakan 0,01 mol/L PBS pada suhu 4 °C selama 24 jam dengan 6 kali penggantian PBS. Dialisis dilanjutkan dengan air selama 48 jam dengan 8x penggantian air. Larutan kemudian di liofilisasi dan disimpan pada suhu -20 °C. Hasil konjugasi NAS-BSA selanjutnya dilakukan karakterisasi menggunakan spektrofotometer Uv dan NMR.

### **Tahap 2: Karakterisasi Antigen menggunakan NMR**

Antigen yang telah disintesis dilakukan pemurnian menggunakan filtrasi 0.45  $\mu\text{m}$ . Selanjutnya dimasukkan ke dalam instrument H NMR JEOL Resonance ECZ500R.

### **Tahap 3: Produksi Antibodi**

Produksi antibody di awali dengan menyuntikkan antigen kepada tiga new Zealand white rabbit betina melalui jalur penyuntikan intramuskular untuk primer immunization dan subcutan untuk penyuntikan lanjutan.

### **Tahap 4: Karakterisasi Antibody Menggunakan Metode ELISA.**

*Indirect* ELISA dilakukan sesuai prosedur sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Wu et al, 2014; Hnasko et al, 2011). 96 sumur (*well plates*) dilapisi dengan lapisan antigen (1 mg/L, 100 $\mu\text{L}$ /well) dalam (0,05 M, pH 9,6) karbonat bikarbonat buffer pada suhu 4  $^{\circ}\text{C}$  selama semalam. *Microplate* kemudian dicuci sebanyak 3 kali menggunakan PBS Tween-20 (PBST 0,05%) dan di *blocked* menggunakan PBST-casein 2% pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. *Microplate* kemudian dicuci sebanyak 3 kali menggunakan PBST. Kemudian well diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam menggunakan 100  $\mu\text{L}$  serum yang telah dilarutkan dalam

PBST-casein 0.2%. *Microplate* kemudian dicuci sebanyak 3 kali menggunakan PBST. Ditambahkan 100  $\mu\text{L}$ /well *HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG* (pengenceran 1:5000) untuk serum kelinci, sedangkan *HRP-conjugated goat anti-guinea pig IgG* (pengenceran 1:10000) ditambahkan untuk serum marmut. 100 uL larutan substrat TMB (5 mL akuades+ 2.6 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2.4 mL citric acid + 100 uL TMB + 10 uL  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ditambahkan ke dalam *microplate*. *Microplate* kemudian diinkubasi pada ruang gelap selama 2x15 menit. Ditambahkan 100 uL stop solution berupa larutan 2M asam sulfat. *Microplate* dibaca absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan  $\lambda=450$  nm.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Sintesis Antigen**

Akrilamida merupakan molekul kecil yang memiliki berat molekul sebesar 71,09 Da, sehingga tidak memiliki kemampuan untuk dapat menginisiasi respon imun. Antigen harus memiliki berat molekul setidaknya 10.000 Da agar dapat memiliki sifat immunogenik (Kindt, T., J., *et al.* 2007). Sintesis antigen diawali dengan menyiapkan hapten yang memiliki struktur mirip akrilamida. Pada umumnya, gugus fungsi

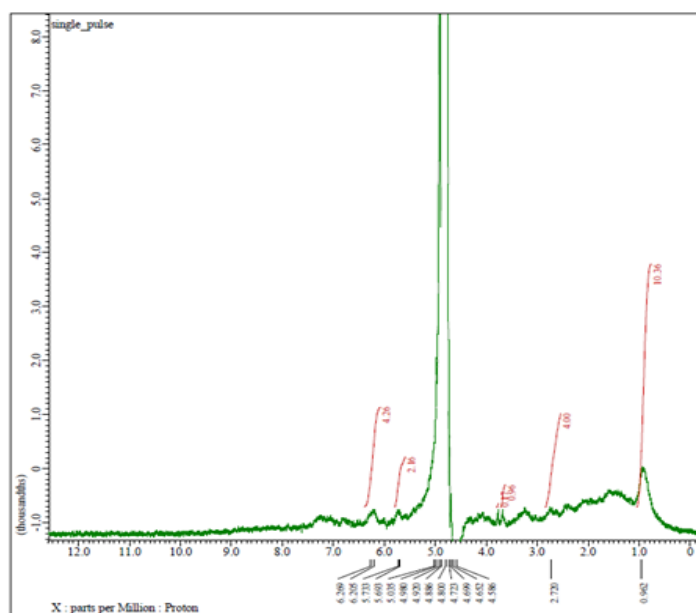
pada hapten diaktivasi oleh *linker* sehingga dapat berikatan secara kovalen dengan gugus amina pada protein membentuk ikatan amida. Sedangkan pada penelitian ini tidak digunakan *linker* untuk mengkonjugasi hapten dengan antigen. Konjugasi dapat berlangsung dikarenakan terjadi alkilasi gugus  $-SH$  dan  $-NH$  pada protein sehingga dapat kehilangan ikatan vinil. Oleh karena itu, hapten dapat membentuk ikatan dengan protein sehingga terbentuk konjugat hapten-antigen (Zhou et al, 2008).

Konjugat hapten-antigen yang diperoleh berupa larutan yang agak kental dan tak berwarna. *Yield* yang diperoleh adalah 16 mL dari 2 mL larutan NAS ditambah 20 mL larutan BSA yang direaksikan selama 3 jam dan didialisis. Konjugat ini kemudian diberi label antigen NAS-BSA dan disimpan pada

suhu  $4^{\circ}C$  untuk dilakukan karakterisasi spektrofotometer Uv dan NMR.

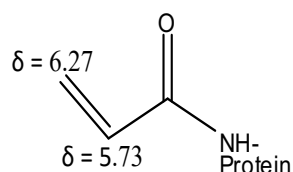
### **Karakterisasi Antigen menggunakan NMR**

Karakterisasi dilakukan menggunakan Nuclear Magnetic Resonance (NMR) terhadap antigen NAS-BSA sebagai sampel serta akrilamida dan NAS komersil sebagai standar. Dengan NMR diharapkan akan terlihat struktur ujung hapten pada antigen NAS-BSA, sehingga dapat menambah keyakinan bahwa antigen NAS-BSA telah terbentuk. Karakterisasi ini dilakukan di Kimia, LIPI, Serpong, Banten, Indonesia. JEOL Resonance ECZ500R digunakan untuk memperoleh hasil  $^1H$  NMR. Berikut adalah hasil karakterisasi menggunakan NMR diberikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Spektrum  $^1H$ -NMR

Berdasarkan data  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz), antigen yg terbentuk mempunyai 1 buah metilen ( $\text{CH}_2$ ) olefinik pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  6,27 ppm dengan integral sebanyak 4. Selanjutnya, antigen memiliki 1 buah metin ( $\text{CH}$ )  $\text{sp}^2$  pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  5,73 ppm dengan integral sebanyak 2 yang diduga adanya gugus akrilamida yang terbentuk. Berdasarkan kedua pergeseran ini, diduga memiliki struktur yang ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Struktur antigen hasil pembacaan spektrum  $^1\text{H-NMR}$

Hasil karakterisasi ini juga dilakukan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis, sebagai bahan perbandingan. Berikut adalah data hasil spektrofotometer Uv:

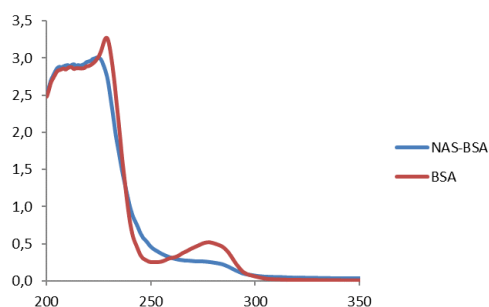
Berdasarkan karakterisasi spektrofotometer Uv, BSA murni mempunyai puncak absorpsi spesifik pada panjang gelombang 219 dan 275nm, ketika BSA dikonjugasikan dengan hapten, akan menunjukkan serapan pada panjang gelombang yang sama dengan nilai absorbansi yang berbeda. Perbedaan absorbansi ini menunjukkan sejumlah hapten yang terkonjugasi pada protein (Eleftherios, 1996). Karakterisasi

konjugat menggunakan spektrofotometer Uv-vis dilakukan untuk membandingkan serapan konjugat NAS-BSA dengan BSA. Gambar 3 menunjukkan spektrum absorbansi NAS-BSA dengan BSA. Spektrum absorbansi BSA menunjukkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 229 dan 275nm. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh spektrum absorbansi NAS-BSA yang memiliki panjang gelombang maksimum yang tidak berbeda secara signifikan dengan BSA. Tetapi konjugat NAS-BSA mengalami penurunan absorbansi dibandingkan dengan BSA. Hal ini menunjukkan bahwa NAS telah terkonjugasi dengan sebagian dari BSA hingga membentuk konjugat NAS-BSA. Penurunan absorbansi BSA menunjukkan semakin tinggi konsentrasi konjugatnya (Dixit, 1986).

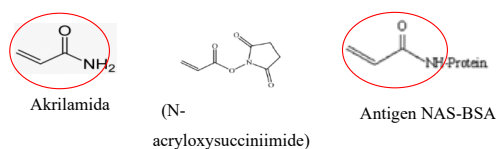
Terdapat perbedaan pada absorbansi NAS-BSA dengan BSA. Perbedaan absorbansi ini menunjukkan sejumlah hapten telah terkonjugasi pada protein, sehingga diperoleh konjugat NAS-BSA yang tunjukkan pada Gambar 3.

Dengan demikian, berdasarkan hasil analisis spektrum Uv dapat disimpulkan bahwa NAS-BSA telah berhasil dikonjugasi. Konjugat yang telah dikonjugasi memiliki memiliki ujung hapten yang struktur nya mirip dengan

struktur akrilamida. Gambaran hapten ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 3.** Spektrum UV-Visible BSA dan NAS-BSA



**Gambar 4.** Struktur kimia akrilamida, NAS, dan konjugat NAS-BSA

Baik hasil karakterisasi menggunakan NMR ataupun Uv-Vis menunjukkan bahwa NAS yang terkonjugasi sempurna dengan BSA, akan menghasilkan konjugat NAS-BSA sebagai antigen (Zhou et al, 2008).

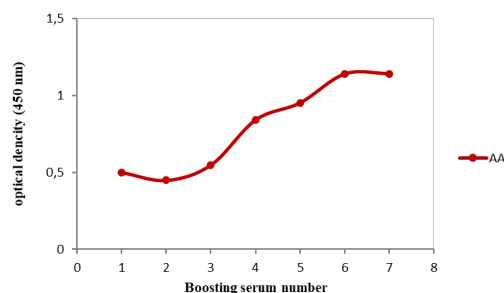
### **Produksi Antibodi**

Produksi antibody dilakukan setelah antigen berhasil disintesis yang dibuktikan dengan karakterisasi menggunakan NMR dan Uv Vis. Antigen kemudian disuntikkan kepada tiga new Zealand white rabbit betina melalui jalur penyuntikan intramuskular untuk primer immunization dan subcutan untuk penyuntikan lanjutan. Pemilihan jalur penyuntikan ini memberikan pengaruh

yang sangat kuat terhadap organ mana yang akan dilibatkan di dalam pembentukan respon imun (Kindt, T., J., et al. 2007). Identifikasi titer antibody setiap tahapan boosting diguider menggunakan ELISA (Wu et al, 2014; Akter et al, 2017; Hnasko et al, 2011; Kong et al, 2016).

### **Karakterisasi Antibody Menggunakan Metode ELISA.**

Karakterisasi antibody dilakukan menggunakan metode *Indirect* ELISA. Metode *Indirect* ELISA dilakukan terhadap serum kelinci untuk setiap boosting. Tahap ini dilakukan untuk mengetahui perolehan titer antibody kelinci untuk setiap boosting. Adapun sampel kontrol positif yang digunakan adalah serum kelinci yang disuntik antigen, sampel kontrol negatif yang digunakan berupa larutan aquades, dan antigen yang digunakan berupa akrilamida. Berikut adalah diagram OD hasil pembacaan ELISA reader pada  $\lambda = 450$  nm yang ditunjukkan pada Gambar 5 dan Tabel 1.



**Gambar 5.** Diagram OD ELISA untuk setiap boosting

**Tabel 1 .** Nilai OD, S/P ratio, dan titer serum untuk setiap *boosting*

<i>Boosting</i>	OD	S/P	titer
1	0.499	0.286	28.634
2	0.448	0.249	24.927
3	0.548	0.322	32.195
4	0.841	0.535	53.488
5	0.952	0.616	61.555
6	1.14	0.752	75.218
7	1.141	0.753	75.291

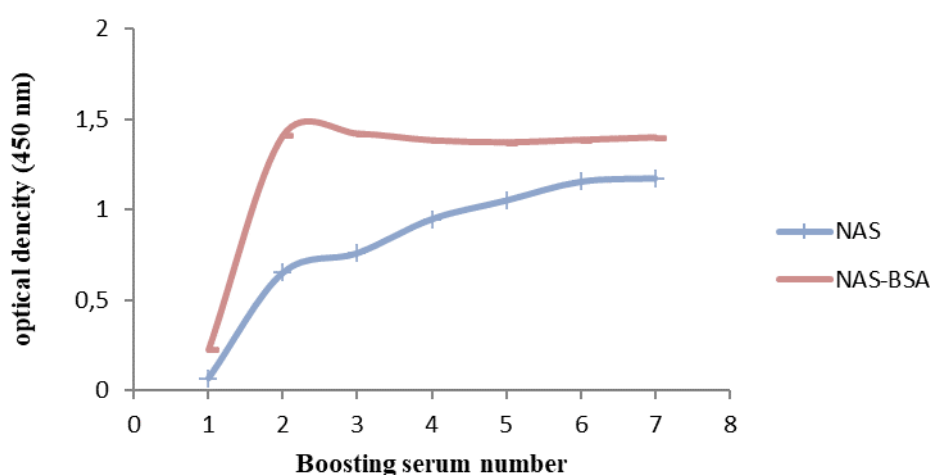
$$\frac{\text{Sampel}}{\text{Positif}} \text{ ratio} = \frac{OD_{\text{sampel}} - OD_{\text{negatif}}}{OD_{\text{positif}} - OD_{\text{negatif}}}$$

$$\text{Titer} = \frac{S}{P} \text{ ratio} \times 100$$

Hasil *Indirect* ELISA menunjukkan bahwa mulai *boosting* ke 4 menunjukkan reaksi yang positif untuk antibodi yang spesifik terhadap akrilamida, diagram terus menunjukkan kenaikan hingga

*boosting* ke 7. Hal ini ditunjukkan dengan nilai titer yang naik secara signifikan mulai *boosting* ke 4 (tabel 4.25). Oleh karena itu, panen darah untuk tahap produksi antibodi dapat dilakukan mulai *boosting* ke 4 hingga ke 7.

Metode *Indirect* ELISA juga dilakukan untuk antigen lainnya yang mirip akrilamida, diantaranya adalah NAS, dan NAS-BSA. Hal ini dilakukan untuk melihat spesifisitas antibodi terhadap antigen yang disuntikannya. Berikut adalah diagram OD hasil pembacaan ELISA reader pada  $\lambda = 450 \text{ nm}$  yang ditunjukkan pada Gambar 6.

**Gambar 6.** Diagram OD ELISA setiap *boosting* untuk antigen yang mirip akrilamida

OD hasil pembacaan ELISA menunjukkan hasil yang cukup signifikan terutama untuk senyawa senyawa kimia yang memiliki struktur mirip akrilamida. Berdasarkan diagram 4.27, Diagram antigen NAS yang berwarna biru

menunjukkan kenaikan yang cukup signifikan untuk antibodi terhadap NAS mulai pada *boosting* ke 2 dan 3, dan terus menunjukkan kenaikan hingga *boosting* ke 7. Hal yang sangat berbeda terlihat untuk antigen NAS-BSA, diagram



menunjukkan kenaikan yang sangat signifikan pada awal boosting ke 2, tetapi, setelah boosting ke 2 tidak ada kenaikan lagi, dan stabil hingga boosting ke 7. Hal ini diduga dikarenakan NAS merupakan bahan utama pembentuk antigen NAS-BSA, maka dengan mudahnya sistem imun kelinci mengenali dan mencetak NAS sebagai benda asing di dalam tubuhnya sehingga dihasilkan antibodi anti terhadap NAS.

Begitu juga untuk antibodi NAS-BSA, yang mulai terbentuk dengan drastis pada boosting ke 2. Hal ini menunjukkan bahwa, NAS-BSA merupakan kandungan utama yang

## KESIMPULAN

Kesimpulannya, kami telah melakukan karakterisasi antigen menggunakan NMR yang menunjukkan bahwa NAS telah terkonjugasi sempurna dengan BSA dan menghasilkan suatu konjugat NAS-BSA. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 1 buah metilen ( $\text{CH}_2$ ) olefinik pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  6,27 ppm dengan integral sebanyak 4 dan memiliki 1 buah metin ( $\text{CH}$ )  $\text{sp}^2$  pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  5,73 ppm dengan integral sebanyak 2. Spektrofotometer UV Vis kemudian digunakan untuk

kelimpahannya sangat banyak di dalam antigen yang disuntikkan pada kelinci. Selain itu, antigen NAS-BSA memiliki bobot molekul yang sangat besar yaitu  $>60.000$  Dalton, sehingga hal ini sangat mudah dikenali oleh tubuh kelinci sebagai antigen, karena salah satu persyaratan antigen adalah memiliki bobot molekul  $>10.000$  Dalton (Wibawan et al., 2013). Oleh karena itu, berdasarkan data *Indirect* ELISA antibody yang disuntikkan menggunakan antigen NAS-BSA menghasilkan antibody yang anti terhadap akrilamida, NAS, dan NAS-BSA.

memperkuat data ini. Selanjutnya, konjugat NAS-BSA yang telah disintesis memenuhi persyaratan sebagai antigen yang mampu menghasilkan antibody yang spesifik. Hal ini ditunjukkan dari antibody anti NAS-BSA, NAS, dan Akrilamida yang mulai muncul pada boosting kedua, ketiga dan keempat (berturut-turut).

## ACKNOWLEDGEMENT

Terimakasih penulis ucapkan kepada Kimia, LIPI atas kesempatannya menggunakan NMR untuk penelitian ini.

**DAFTAR RUJUKAN**

- Akter T, Atanelishvili I, Noguchi A, Silver RM, Bogatkevich GS. Establishment of an indirect ELISA for detection of the novel antifibrotic peptide M10. *PLoS One* 2017; 12(11):e0188588; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188588>
- Arora S, Ayyar BV, O’Kennedy R. Affinity chromatography for antibody purification. *Methods Mol Biol* 2014;4 1129:497–516; [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2\\_35](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_35)
- Choe W, Durgannavar T, Chung S. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: an overview of high affinity proteins and peptides. *Materials* 2016; 9(12):994; <https://doi.org/10.3390/ma9120994>
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. 2011. *Essential Immunology*. Twelfth edititon. New York: John Wiley & Sons, pp: 54-36.
- Dixit R., Das M., Seth P. K., Mukhtar H. (1986). Interaction of Acrylamide with Bovine Serum Albumin. *Environmental Research*, 40, 365-371.
- Eleftherios, P., Diamandis. Theodore, K., Christopoulos. 1996. *Immunoassay*. Academic Press. 1st Edition.
- Hnasko R, Lin A, McGarvey JA, Stanker LH. A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410(4):726–31; <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.005>
- Ji F, Mokoena MP, Zhao H, Olaniran AO, & Shi J. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of zearalenone in wheat from Jiangsu province, China. *PLoS One* 2017; 12(5):e0175282; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175282>
- Kindt, T., J., Goldsby, R., A., Osborne, B., A. (2007). *Immunology*. W.H. Freeman and Company
- Kong D, Xie Z, Liu L, Song S, Kuang H, Cui G, Xu C. Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay trip for the detection of sterigmatocystin in cereal products. *Food Agric Immunol* 2016; 28(2):260–70; <https://doi.org/10.1080/09540105.2016.1263985>
- Putri DD, Handharyani E, Soejoedono RD, Setiyono A, Poetri ON. Production and characterization of

- Newcastle disease antibody as a reagent to develop a rapid immunodiagnostic test tool. *Vet World* 2018; 11:895–901; <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.895-901>
- Tam JO, de Puig H, Yen C, Bosch I, Gómez-Márquez J, Clavet C, et al. A comparison of nanoparticle-antibody conjugation strategies in sandwich immunoassays. *J Immunoassay Immunochem* 2016; 38(4):355–77; <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1269338>
- Wu J, Shen YD, Lei HT, Sun YM, Yang JY, Xiao ZL, et al. Hapten synthesis and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for acrylamide in food samples. *J Agric Food Chem* 2014; 62(29):7078–84; <https://doi.org/10.1021/jf5015395>
- Zhou S, Zhang C, Wang D, Zhao M. Antigen synthetic strategy and immunoassay development for detection of acrylamide in foods. *Analyst* 2008; 133(7):903–9; <https://doi.org/10.1039/b716526a>