ชยานันท์ สิงห์โตทอง: การพัฒนาเทคนิคที่รวดเร็วในการประเมินและติดตามไรโซเบียม (DEVELOPMENT RAPID TECHNIQUE FOR EVALUATION AND MONITORING RHIZOBIA) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร, 62 หน้า

คำสำคัญ: ไรโซเบียม/พืชตระกูลถั่ว/การตรึงไนโตรเจน/หัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพแบบผสม/การควบคุมคุณภาพ/แอนติบอดี้ลูกผสม/เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจ

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และมีความสำคัญมากในการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการผลิตพืชตระกูลถั่ว ทั้งนี้การใช้หัวเชื้อไรโซเบียมในรูปแบบหัวเชื้อผสมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพเมื่อนำไปใช้ในหลากหลายพื้นที่ อย่างไรก็ตามการผลิตหัวเชื้อผสมนี้จำเป็นต้องมีเครื่องมือหรือวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาผลิตได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำเพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ สำหรับวิทยานิพนธ์นี้มุ่งเน้นการประยุกต์ใช้แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมชนิดเส้นเดี่ยวเอสซีเอฟวี (scFv) ที่คัดเลือกจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดผสมที่ใช้สำหรับการปลูกถั่วลิสง โดยใช้หัวเชื้อผสมระหว่าง แบรดีไรโซเบียม สายพันธุ์ SUTN9-2 และ DASA03028 เป็นต้นแบบในการทดสอบ ทั้งนี้แบรดีไรโซเบียม สายพันธุ์ SUTN9-2 สามารถใช้แอนติบอดี yiN92-e10 ที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาสำหรับใช้ในการทดสอบ ในขณะที่วิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการคัดเลือกแอนติบอดี yi028-F11 จากคลังแอนติบอดีมนุษย์ ในการจับจำเพาะกับแบรดีไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA03028 โดยแอนติบอดีทั้งสองนี้ไม่มีปฏิกิริยาการจับข้ามต่อกัน และจากผลการทดสอบพบว่าแอนติบอดี yi028-F11 ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถใช้ในการตรวจจับแบรดีไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA03028 ที่จำนวนเซลล์ตั้งแต่ 10^4 เซลล์ขึ้นไปได้ โดยพบว่าอายุโคโลนีของแบรดีไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA03028 มีผลต่อความสามารถในการจับแบบจำเพาะของแอนติบอดี yi028-F11 ซึ่งเมื่อทดสอบโดยเทคนิคอีไลซา (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) พบว่าความสามารถในการจับจำเพาะของแอนติบอดีลดลงเมื่อโคโลนีมีอายุมากกว่า หรือน้อยกว่า 7 วัน อย่างไรก็ตามไม่พบว่าอายุโคโลนีของสายพันธุ์ SUTN9-2 มีผลต่อความสามารถในการจับจำเพาะของแอนติบอดี yiN92-e10 นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำแอนติบอดีชนิดนี้มาใช้ในเทคนิคฟลูออเรสเซนส์แอนติบอดี (Fluorescent antibody) สำหรับการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อแบรดีไรโซเบียมแต่ละชนิดทั้งในหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมหลังจากการเก็บรักษาทั้งในรูปแบบผลิตภัณฑ์หัวเชื้อเหลว และหัวเชื้อที่ใช้พีทเป็นวัสดุพาหะ อย่างไรก็ตามเมื่อประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวในการติดตามเชื้อแบรดีไรโซเบียมในรูปแบบแบคทีรอยด์ภายในปมถั่ว พบว่าไม่ประสบความสำเร็จกับถั่วลิสงทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่ประสบความสำเร็จในการทดสอบกับปมจากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของการใช้แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมชนิดเส้นเดี่ยวเอสซีเอฟวี (scFv) ในการติดตามเชื้อแบรดีไรโซเบียมในพืชตระกูลถั่วบางชนิด อย่างไรก็ตามวิทยานิพนธ์นี้เป็นการริเริ่มใช้

แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมชนิดเส้นเดี่ยวเอสซีเอฟวี (scFv) เป็นครั้งแรกสำหรับการตรวจสอบจำนวนของแบรดีไรโซเบียมที่ยังมีชีวิตโดยสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้อย่างแม่นยำในหัวเชื้อรูปแบบผสม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566

ลายมือนักศึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

CHAYANAN SINGTOTHONG: DEVELOPMENT RAPID TECHNIQUE FOR EVALUATION AND MONITORING RHIZOBIA. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PANLADA TITTABUTR, Ph.D., 62 PP.

Keyword: *Rhizobium*/Legume plants /Nitrogen fixation/Mixed culture biofertilizer/Quality control/Recombinant scFv/Phage display

Rhizobium, a nitrogen-fixing bacterium, plays an important role in legumes plant production as biofertilizer. To enhance nodulation and nitrogen fixation success in diverse field locations, mixed-culture of effective rhizobia has emerged as a promising strategy. Consequently, developing a robust technique for precise detection and continuous monitoring of each bradyrhizobial strain is necessary for quality control. This study focuses on the application of recombinant human scFv antibodies as a quality control technique for peanut bradyrhizobial mixed-culture inoculant. The mixed-culture inoculant of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 and *Bradyrhizobium* sp. DASA03028 was used as a model in this study. A specific scFv antibody yiN92-e10 for strain SUTN9-2 has been previously characterized, while a specific scFv antibody yi028-F11 targeting strain DASA03028 was selected through biopanning in this study from a naïve human scFv antibody phage display library. There was no cross-binding reactivity between these two scFv antibodies and among other tested bradyrhizobia. The scFv antibody yi028-F11 at concentration of 20 µg/ml was able to detect 10^4 cells of strain DASA03028. The colony age of strain DASA03028 influenced the antibody binding affinity, the colony age younger or older than 7 days after incubation showed reduction in the signal via ELISA detection. However, no influence of colony age on binding activity for antibody yiN92-e10 with strain SUTN9-2. These recombinant scFv antibodies were successfully employed with the fluorescent antibody (FA) technique to assess viable cell counts of individual bradyrhizobial strains in both liquid and peat-based single and mixed-culture inoculants. Unfortunately, bacteroid detection in peanut nodules using these antibodies was unsuccessful in all tested peanut cultivars, but it was successful for the detection in mung bean (*Vigna radiata*) nodules regardless of mung bean cultivars. These results indicate the limitation of using scFv antibody with some legumes. Nevertheless, this study introduced for the first time of using

scFv antibodies for detection of individual viable bradyrhizobial strain in mixed-culture situation.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2023

Student's Signature.....
Advisor's Signature.....
Co-Advisor's Signature.....
Co-Advisor's Signature.....
Co-Advisor's Signature.....