บทคัดย่อ

การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชมีความสำคัญและจำเป็นในการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืช ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการระบุเชื้อและการติดตามเชื้อขึ้นมาหลากหลายวิธีโดยเฉพาะการใช้แอนติบอดี้ อย่างไรก็ตามแอนติบอดี้ที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชยังให้ประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเทคโนโลยีการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดี้บนผิวเฟจ มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำ โดยผลการทดลองพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผักกาดเขียวปลี คือ เชื้อ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยยูเรีย ไม่เกิดกระบวนการรีดิวซ์นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถย่อยแป้งและเจลาติน สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ สามารถใช้ประโยชน์จากสารซิเตรตได้ รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร NA ที่มีส่วนผสมของ NaCl ได้สูงถึง 5% สำหรับการพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคผักกาดเขียวปลีได้ โดยแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำสีน้ำตาล ขนาดเล็กกระจายบนก้านและใบภายใน 3 วันหลังจากปลูกเชื้อ และเมื่อเชื้อเข้าทำลายเป็นระยะเวลา 5 วัน ขนาดแผลจะเริ่มขยายใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลและส่งกลิ่นเหม็นการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค พบว่าสามารถกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะสูงและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรั่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (titer) ที่ได้อยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้คือ 1 : 25 ถึง 1:200 จากการคัดเลือกหาเฟจแอนติบอดี้ scFv ที่สามารถจับกับ O-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ biopanning ด้วยคลังของเฟจแอนติบอดีมนุษย์ ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเฟจแอนติบอดี scFv ที่ผลิตได้จำนวน 192 โคลน ไปตรวจความสามารถในการจับกับ O-specific LPS ของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ด้วยวิธีการ ELISA พบว่า เฟจจำนวน 4 โคลน (1ErE3, 1ErE8, 1ErB10 and 1ErF10) สามารถจับกับ O-specific LPS ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูกลืนแสงที่ได้จาก BSA ซึ่งเป็น negative control นอกจากนี้พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน 1ErB10 มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สามารถเข้าทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำ เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาสำคัญที่พบในการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำต่อไป

Abstract

Rapid development of techniques for characterization of bacteria over the past decade has greatly improved pathogen detection and identification. In this study, phage display technologies have been successfully introduced for recombinant antibody production to detect the bacterial soft rot of crucifer plants. After culturing on NA for 24 hours at 28 ^{0}C, the bacterium formed round, white, semitranslucent, glistening colonies. It produced similar symptoms on detached crucifer leaf as observed in the field at 3 days after inoculation. The bacterium was rod shape and gram - negative. The bacterium could utilize citrate and calcium lactate. But it was urease-negative, hydrolyze starch and gelatin and could not denitrify nitrate. It could tolerate NaCl concentration up to 5%. Moreover, the purpose of this study was to develop the monoclonal antibody for virulence strain of *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 by using the phage display technology, which allow to isolate antibodies directly from diverse repertoires of antibody genes. The result showed that human monoclonal antibodies against *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 were selected from non-immunized human scFv library (YAMO-I library) by using phage display technology. After screening by biopanning method, the phage clone 1ErE3, 1ErE8, 1ErB10 and 1ErF10 showed high specificity with *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 strain by using phage ELISA technique. In addition to, polyclonal antibody produce from immunized rabbit with *E. carotovora* pv. *carotovora* Er10 showed low cross reactivity with other genus of bacteria such as Xanthomonas. The result showed that both types of antigen from pure culture could be detected by using phage clone 1ErB10. Thus, this isolated recombinant antibody could be applied for detection pathogenic bacteria in the future