วู เหงียน ซวน : แอนติบอดี้แสดงบนผิวเฟจที่จำเพาะกับ *BRADYRHIZOBIUM YUANMINGENSE* สายพันธุ์ DOA9 และศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในเชิงการเกษตร (PHAGE DISPLAYED ANTIBODY AGAINST *BRADYRHIZOBIUM YUANMINGENSE* STRAIN DOA9 AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN AGRICULTURE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรรณลดา ติตตะบุตร, 108 หน้า.

Bradyrhizobium เป็นแบคทีเรียที่พบในดินชนิดหนึ่ง ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และอยู่อาศัยร่วมกับพืชตระกูลถั่วบางชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกันได้ โดยทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นรูปแบบของปุ๋ยไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ DOA9 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดแยกออกมาจากปมรากของต้นโสนหางไก่ (*Aeschynomene americana*) ในประเทศไทย ทั้งนี้จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทคนิค multilocus DNA sequencing ของยีน 16S rRNA และยีนพื้นฐานอื่น ๆ (ยีน *dnaK*, *recA*, และ *glnB*) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดอยู่ในกลุ่ม *B. yuanmingense* และจากความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในการสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วได้หลากหลายชนิด ดังนั้น DOA9 จึงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพในทางการเกษตร พร้อมทั้งใช้ในการศึกษาด้านปฏิสัมพันธ์กับพืชชนิดต่าง ๆ ต่อไป

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ดำเนินการสร้างคลังของ recombinant scFV แอนติบอดี้ขึ้นจากม้ามของกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรีย สายพันธุ์ DOA9 จากนั้นทำการคัดเลือกหา scFV แอนติบอดี้จากคลังที่สร้างขึ้นนี้ พร้อมทั้งจากคลัง scFV แอนติบอดี้ที่สร้างจากมนุษย์ ที่สามารถจับกันแบบจำเพาะได้กับเซลล์เป้าหมาย DOA9 โดยใช้เทคนิค biopanning จากการทดลองสามารถคัดเลือก scFV phage ได้จำนวน 2 โคลน คือ RB8 และ RG9 จากคลังแอนติบอดี้ที่สร้างจากกระต่าย และอีกจำนวน 1 โคลน คือ RD6/2 จากคลังแอนติบอดี้ที่สร้างจากมนุษย์ ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบยืนยันความจำเพาะเจาะจง ในการจับกันระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี้ที่คัดเลือกได้โดยเทคนิค Phage Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Phage ELISA) โดยผลที่ได้พบว่าแอนติบอดี้จาก phage สามารถจับกับแบคทีเรียสายพันธุ์ DOA9 ทั้งที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) และในรูปแบบ bacteroid ที่อยู่อาศัยในปมรากพืชได้อย่างจำเพาะเจาะจง และพบว่าแอนติบอดี้ที่คัดเลือกได้ ยังสามารถประยุกต์ใช้ได้กับการย้อมเซลล์แบคทีเรีย ด้วยเทคนิค immunofluorescence ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้อง confocal microscope นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการผลิต scFV แอนติบอดี้ในรูปแบบของแอนติบอดี้ที่ละลายได้ โดยวิธีการตัดต่อยีนไป

บนพลาสมิด pETb21 เพื่อให้แสดงออกในเซลล์ *Escherichia coli* HSM 174 จากนั้นแยกแอนติบอดี้ที่ได้ออกมาจากเซลล์โดยใช้ Ni-NTA ซึ่งทำให้ได้ปริมาณแอนติบอดี้บริสุทธิ์ที่มากเพียงพอ และยังคงมีคุณสมบัติในการจับกับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจงเช่นเดิม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำแอนติบอดี้ที่ได้ ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไรโซเบียมชนิดนี้ในขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อในห้องปฏิบัติการ และสามารถใช้ติดตามไรโซเบียมจากปมถั่วเมื่อนำไปใช้ในภาคสนามได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกของการคัดแยกแอนติบอดี recombinant scFV จากคลังแอนติบอดี้ที่สร้างจากกระต่าย และจากมนุษย์ ที่สามารถจับกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ ทำให้เป็นการกระตุ้นให้เกิดการศึกษาเกี่ยวกับแอนติบอดี้ recombinant scFV เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมในทางการเกษตรที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ตลอดจนใช้ในการพัฒนาการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนักศึกษา Vu Nguyen
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

VU NGUYEN XUAN : PHAGE DISPLAYED ANTIBODY AGAINST *BRADYRHIZOBIUM YUANMINGENSE* STRAIN DOA9 AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN AGRICULTURE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PANLADA TITTABUTR, Ph.D., 108 PP.

PHAGE DISPLAY/SCFV/PHAGE DISPLAY ANTIBODY LIBRARY/ *BRADYRHIZOBIUM YUANMINGENSE* STRAIN DOA9

Bradyrhizobium is one of the soil bacteria that generally fix nitrogen in symbiosis with specific leguminous plants and converts nitrogen gas into ammonia, which is a form of nitrogen that plants can directly utilize as fertilizer. *Bradyrhizobium* sp. DOA9 is a bacterial strain originally isolated from the root nodules of *Aeschynomene americana* in Thailand. This strain was classified as *B. yuanmingense* based on a multilocus DNA sequence analysis of its 16S rRNA and housekeeping genes (*dnaK*, *recA*, and *glnB*). Due to its ability to be used with a broad range of hosts , DOA9 is an interesting strain that can also be used as multi-purposes inoculant for biofertilizer and has been investigated for its interaction with plants in other aspects.

In this thesis, the recombinant scFv antibody library was constructed from the spleen of a rabbit immunized with strain DOA9. This library (the immunized rabbit scFv antibody library) as well as the naïve human scFv antibody library were used for selecting specific antibodies which act against the target, strain DOA9 by the biopanning method. After biopanning, two scFv phage clones, RB8 and RG9 were selected from the immunized rabbit library. After sequencing, it was found that the two phage clones were identical. Similarly, after biopanning, one scFv phage clone, RD6/2 was

selected from the naïve human library. The specific binding of the three antibody clones was confirmed by Phage Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Phage ELISA). The phage antibody could bind specifically to DOA9 both as a free-living (pure culture) and as a bacteroid inside the plant nodule stages. Moreover, specific immunofluorescence staining of both free-living bacteria and bacteroid inside the plant nodule could also be observed with a confocal microscope. Also, soluble scFv antibodies were produced by subcloning into a/the pETb21 vector and were expressed in *Escherichia coli* HSM 174. The soluble scFv antibody specimens were purified using Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid). The purifications yielded an appropriate amount of adequate pure scFv's, and the antibody specificity was retained. These results indicate a potential application for verifying this bacterium during a production process or for monitoring this strain from a/the nodule after application in the field. This study also describes, for the first time, the isolation of a/the recombinant scFv antibody against N-fixing bacteria from an immunized rabbit library and also a naïve human library. The result encourages further investigation of a recombinant scFv antibody for the development of new immunoassays for more rapid and simpler detection of *Bradyrhizobium* in agriculture as well as for an in-depth analysis of plant-microbe interactions in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2015

Student's Signature Vu Nguyen

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature