เจ๊าะ เค คาย : การพัฒนาแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมชนิดเส้นเดี่ยว เอสซีเอฟวี (scFv) เพื่อการตรวจวิเคราะห์ เชื้อแบคทีเรียแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ SUTN9-2 (*Bradyrhizobium* strain SUTN9-2) ในระบบการปลูกพืชหมุนเวียนข้าวสลับถั่ว (DEVELOPMENT OF RECOMBINANT scFv ANTIBODY FOR POINT OF DEMAND (POD) DETECTION OF *Bradyrhizobium* STRAIN SUTN9-2 IN RICE-LEGUME CROPPING SYSTEM) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ภญ.มณฑารพ ยมาภัย, 132 หน้า.

แบรดดี้ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่อาศัยในดินมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศมาให้กับพืชตระกูลถั่วที่เชื้ออยู่อาศัยร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาได้ โดยสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียเพื่อใช้เป็นปุ๋ยให้แก่พืช ภาวะแบบพึ่งพาอาศัยกันนี้กลายเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการเกษตรเนื่องจากเป็นกลไกที่นำแหล่งไนโตรเจนปริมาณมหาศาลกลับสู่ชีวมณฑลของโลก จากคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์นี้ แบคทีเรียชนิดนี้ถูกใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับระบบการปลูกพืชหมุนเวียนข้าวสลับพืชตระกูลถั่วอย่างยั่งยืน ทั้งนี้การตรวจสอบติดตามและการศึกษากระบวนการทางชีวภาพของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่อาศัยร่วมกันกับพืชนี้เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการศึกษาวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ที่มีปฏิสัมพันธ์ต่อพืช ไมโครไบโอมในดิน ตลอดจนการควบคุมคุณภาพของแบคทีเรียที่ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการ ทำเกษตรอินทรีย์ ในขณะที่เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม เพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์ แต่มีรายงานการใช้เทคโนโลยีนี้น้อยมากในภาคเกษตรกรรม ในวิทยานิพนธ์นี้ แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมชนิดเส้นเดี่ยว เอสซีเอฟวี (scFv) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ SUTN9-2 (โคลน yiN92-1e10) และ สายพันธุ์ DOA9 (โคลน yiDOA9-162) ที่ถูกคัดเลือกมาจากคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจของมนุษย์ ซึ่งความจำเพาะในการจับและการวิเคราะห์ปฏิกิริยาการจับแบบข้ามสายพันธุ์แบคทีเรียของเอสซีเอฟวี ได้นำมาทดสอบโดยใช้หลักการ อีไลซ่า (ELISA) และเทคนิคการถ่ายภาพคอนโฟคอล-อิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (confocal-immunofluorescence) ทั้งนี้การใช้วิธีที่ไม่ใช่จีเอ็มโอนี้ สามารถระบุตำแหน่งของเชื้อ SUTN9-2 ได้ทั้งในรูปแบบเอนโดไฟต์ติก (endophytic) ภายในเนื้อเยื่อข้าว และแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปแล้ว (bacteroid) ในปมรากพืชตระกูลถั่วได้ นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบการใช้แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม ในการศึกษาการแข่งขันเข้าครอบครองปมรากของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับวิธีการย้อมสี GUS แบบมาตรฐาน (Gus-staining method) ซึ่งพบว่าวิธีการใหม่นี้ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงเป็นครั้งแรกที่แสดงถึงศักยภาพของการใช้แอนติบอดีมนุษย์บนผิวเฟจแบบเอสซีเอฟวี ในการถ่ายภาพและการตรวจติดตามปุ๋ยชีวภาพ

แบรดดี้ไรโซเบียมที่สามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบติดตามหัวเชื้อแบคทีเรียในระบบการปลูกพืชหมุนเวียนข้าวสลับถั่วได้ จากนั้นเอสซีเอฟวีได้ถูกพัฒนาให้เป็นแอนติบอดีเต็มรูปแบบ (IgG) และประสบผลสำเร็จในการผลิตในเซลล์มนุษย์ (Expi293F™) ซึ่งแอนติบอดีเต็มรูปแบบนี้สามารถพัฒนาเป็นสารตรวจสอบในการตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียแบรดดี้ไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพเชิงพาณิชย์ และในดินจากพื้นที่เกษตรกรรม ทั้งในเชิงคุณภาพ และปริมาณด้วยการวิเคราะห์แบบแถบ (lateral flow) และเทคนิค flow cytometry ได้ในอนาคต นอกจากนี้ได้ทำอิพิโทปแมปปิ้ง (epitope mapping) โดยวิธีการไบโอแพนนิ่ง (bio-panning) จากคลังเฟจแสดงเปปไทด์แบบสุ่ม (SUT 12) ซึ่งเปปไทด์เลียนแบบ (mimotope) ที่ระบุได้นี้ สามารถใช้ในการทำนายแอนติเจนที่อยู่บนผิวของแบคทีเรีย อีกทั้งสามารถนำไปพัฒนาสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมในชุดตรวจสอบสายพันธุ์แบรดดี้ไรโซเบียม ได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

KYAUT KAY KHAING : DEVELOPMENT OF RECOMBINANT scFv ANTIBODY FOR POINT OF DEMAND (POD) DETECTION OF *Bradyrhizobium* STRAIN SUTN9-2 IN RICE-LEGUME CROPPING SYSTEM. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 132 PP.

RECOMBINANT ANTIBODY/BACTERIOPHAGE DISPLAY/MONOCLONAL ANTIBODIES/BRADYRHIZOBIUM/ENDOPHYTES/RICE-LEGUME/ NITROGEN FIXATION/BIOFERTILIZERS/SYMBIOSIS

Bradyrhizobium is one of the soil bacteria that can fix atmospheric nitrogen in symbiosis with specific legumes and convert nitrogen gas into ammonia to be used as fertilizer in plants. This symbiosis becomes one of the significant factors in agriculture because it supplies huge quantity of nitrogen to the world biosphere. In order to take this advantage, this bacterium is currently used as biofertilizer for sustainable legume-rice rotational cropping system. Monitoring and bioimaging of this nitrogen fixing bacterium is essential for the study of plant-microbe evolution, soil microbiome, as well as quality control of its used in organic farming. While phage display antibody technology has been widely used to generate recombinant antibody for numerous medical purposes, very few of its application in agricultural sector has been reported. In this thesis, recombinant single-chain variable fragments (scFv) against *Bradyrhizobium* strains SUTN9-2 (yiN92-1e10) and DOA9 (yiDOA9-162) were isolated from human phage display antibody library. The binding specificity and cross-reactivity of the isolated soluble scFv was evaluated by ELISA and confocal-immunofluorescence imaging techniques. By using this non-GMO method, SUTN9-2

localization in both endophytic and bacteroid forms could be observed inside rice tissue and plant nodule, respectively. Moreover, successful application of the recombinant antibody for the evaluation of nodule occupancy was demonstrated in comparison with standard Gus-staining method. The results of this study revealed for the first time the potential use of human phage display scFv antibody for imaging and monitoring of *Bradyrhizobium* biofertilizer and thus could be further applied for point-of-detection of bacterial inoculum in the legume-rice rotational crop system. In addition, the scFv fragment was engineered to generated full length IgG, successfully expressed in human cell (Expi293F™). This IgG format has potential to be used as detecting reagent for lateral flow and flow cytometry immunoassays to detect *Bradyrhizobium* qualitatively and quantitatively in commercial biofertilizers and soil in agricultural field in the future.

Moreover, epitope mapping was performed by bio-panning of phage display random peptide library (SUT-12). The identified peptide mimotope can be used to predict the antigen on the surface of the bacteria and develop as a control for the point of demand (POD) diagnosis of *Bradyrhizobium* strains in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2020

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-Advisor's Signature_____