SUT3-304-55-12-34

รายงานการวิจัย

การใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและติดตามปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

(Application of Phage Display Technology for detection and monitoring of rhizobial biofertilizer)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-55-12-34

รายงานการวิจัย

การใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและติดตามปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม (Application of Phage Display Technology for detection and monitoring of rhizobial biofertilizer)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ภญ. มณฑารพ ยมาภัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง เครื่องมือวิเคราะห์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลองโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรมวิชาเกษตรสำหรับการสนับสนุนเชื้อไรโซเบียมในงานวิจัย และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้หัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพที่มีคุณภาพและปลอดการปนเปื้อน การระบุเชื้อและการติดตามเชื้อจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้แน่ใจว่าเกษตรกรจะได้รับประโยชน์จากการใช้ปุ๋ยชีวภาพได้เต็มประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการระบุเชื้อและการติดตามเชื้อขึ้นมาหลากหลายวิธีโดยเฉพาะการใช้แอนติบอดี้ แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการผลิตยังมีความยุ่งยาก ราคาแพง และให้ประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเทคโนโลยีการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดี้บนผิวเฟจ มาใช้ในการระบุเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 โดยผลการทดลองพบว่าโมโนโคนอลแอนติบอดีที่ได้จาก คลังยาโม ๑ ซึ่งเป็นคลังแอนติบอดีมนุษย์ โคลนที่ RD6/2 มีความจำเพาะเจาะจงกับ DOA9 สูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามยังพบการทำปฏิกิริยาจับกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม SUT1-12 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับเชื้อ DOA9 สูง แต่ไม่พบการทำปฏิกิริยาจับกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ดินอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบด้วยเทคนิค ELISA ในขณะที่โพลีโคลนอลแอนติบอดี้ที่ผลิตได้จากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นโดยการฉีดเชื้อ DOA9 พบว่าทำปฏิกิริยาจับกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมอื่น ๆ ได้ จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในรูปแบบของหัวเชื้อชนิดเหลว และในปมรากถั่วโดยใช้เทคนิค Immunofluorescence พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน RD6/2 มีความจำเพาะเจาะจงกับ DOA9 สามารถเข้าทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในรูปแบบหัวเชื้อชนิดเหลว และในปมรากถั่ว ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้บนผิวเฟจนี้มาประยุกต์ใช้ระบุเชื้อได้อย่างแม่นยำทั้งในระบบการผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ และการติดตามเชื้อในแปลงเกษตรกรต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

The identification and monitoring of selected organisms in biofertilizers are very important to predict their effectiveness of biofertilizers and ensure the highest usefulness received by the farmers. Techniques based on antibody-antigen reactions have been developed in the analysis of rhizobial inoculants. However, these techniques are complicate, expensive and many times have cross reactivity with other rhizobia or soil bacteria. Thus, the purpose of this study was to develop the monoclonal antibody for *Bradyrhizobium* sp. DOA9 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 *Bradyrhizobium* sp. DOA9 were selected from non-immunized human scFv library (YAMO-I library) by using phage display technology. After screening by biopanning method, the phage clone RD6/2 showed high specificity with DOA9 strain by using phage ELISA technique. However, phage clone RD6/2 still have low level of interaction with *Bradyrhizobium* sp. SUT1-12, which is similar to DOA9 strain based on phylogenetic tree. On the other hand, polyclonal antibody produce from immunized rabbit with DOA9 strain showed high cross reactivity with other bradyrhizobia. The efficiency of phage clone RD6/2 in identification and monitoring of DOA9 was confirmed by immunofluorescence technique. The result showed that both types of antigen from pure culture and nodule could be detected by using phage clone RD6/2. Thus, this isolated recombinant antibody could be applied for detection and monitoring bacteria during inoculant production process as well as in the field condition.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	4
2.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี	4
2.1.1 การเตรียมแอนติเจน (antigen)	4
2.1.2 การกระตุ้นกระต่ายเพื่อให้เกิดการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดี	4
2.1.3 การตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรั่ม	5
2.2 การคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ คลังย่าโม ๑ (biopanning)	5
2.2.1 การเตรียมคลังเฟจสำหรับการทดสอบ (Rescuing phagemid libraries)	5
2.2.2 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะจากคลังเฟจ (Biopanning)	6
2.2.3 การคัดแยกเฟจจากโคโลนี *E. coli* ที่คัดเลือกได้ (Individual Phage Rescue)	7
2.2.4 การตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ได้จากเฟจ ด้วยเทคนิค Phage ELISA	8
2.2.5 การตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่ได้กับแอนติเจนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ในรูปของสารละลายเชื้อ และแบคทีเรียจากปมถั่วโดยวิธีการ ELISA	8
2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจับกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเฟจกับแอนติเจนโดยใช้เทคนิค Immunofluorescence assay	10
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	11
3.1 การผลิต Polyclonal antibody	11
3.2 การคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ คลังย่าโม ๑ (biopanning)	11

3.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่คัดเลือกได้..... 12
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลว และในปมรากถั่ว..... 15
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง..... 19
เอกสารอ้างอิง..... 20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 วิธีการและปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย..... 5

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การคัดเลือกแอนติบอดีส่วน scFv ที่จับจำเพาะต่อแอนติเจนของ DOA9 โดยวิธี ELISA 12

รูปที่ 2 แสดงผลการจับจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดี ต่อ DOA9 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น โดยวิธี ELISA 13

รูปที่ 3 แสดงผลการจับจำเพาะเจาะจงต่อ DOA9 ของแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลนเปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี ELISA..... 14

รูปที่ 4 แสดงผลการทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะเจาะจงต่อ DOA9 ทั้งในหัวเชื้อชนิดเหลว (B) และปมรากถั่ว (N) ของแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA..... 16

รูปที่ 5 ภาพแสดง Immunofluorescence จากการใช้ (A) polyclonal antibody และ (B) monoclonal antibody จากเฟจโคลน RD6/2 ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในหัวเชื้อชนิดเหลว..... 17

รูปที่ 6 ภาพแสดง Immunofluorescence จากการใช้ (A) calcofluor; (B) calcofluor และ polyclonal antibody และ (C) calcofluor และ monoclonal antibody จากเฟจโคลน RD6/2 ในการย้อมปมรากเพื่อการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในปมรากถั่ว..... 18

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันเกษตรกรหันมาใช้ปุ๋ยชีวภาพแทนการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ใส่ใจในสุขภาพและสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ปุ๋ยชีวภาพที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันชนิดหนึ่ง คือ ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม (Rhizobium) ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่ว โดยอาศัยประโยชน์จากแบคทีเรียไรโซเบียม ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ทำให้ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และส่งผลให้เกษตรกรลดต้นทุนการผลิตในที่สุด ไรโซเบียมที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่ง คือ แบรดดี้ไรโซเบียม (*Bradyrhizobium*) แบรดดี้ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ในดินและสามารถเข้าสร้างปมอาศัยอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่วแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ในงานวิจัยนี้ให้ความสนใจเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 (*Bradyrhizobium* sp. DOA9) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมที่ไม่สังเคราะห์แสง โดยแยกได้จากปมของโสนขน (*Aeschynomene americana*) ที่มักพบเจริญเติบโตได้ทั่วไปในนาข้าว (Noisangiam et al., 2012) DOA9 เป็นแบคทีเรียในจีนัสแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแรกของประเทศไทยที่ได้มีการอ่านลำดับเบสจีโนมอย่างสมบูรณ์ (whole genome analysis) โดยจากการวิเคราะห์พบว่า DOA9 มีทั้งโครโมโซม และพลาสมิดขนาดใหญ่ (megaplasmid) ขนาด 0.7 Mbp (Okazaki et al., 2015) ซึ่งพบว่า DOA9 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยของแบรดดี้ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว เช่น การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation genes) และการสร้างปมในพืชตระกูลถั่ว (nodulation genes) ไม่ได้อยู่บนโครโมโซมเพียงอย่างเดียวเหมือนกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมทั่วไป แต่พบมีอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ด้วยเช่นกัน (Okazaki et al., 2014) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ symbiosis อยู่บนพลาสมิดมาก่อนในเชื้อไรโซเบียม ดังนั้น DOA9 จึงเป็นเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์แรกที่พบ symbiotic plasmid อยู่บนโครโมโซม นอกจากนี้ยังพบว่า DOA9 มีความสามารถในการเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชอื่นที่ไม่ใช่ถั่ว หรือที่รู้จักกันในนาม endophytic bacteria โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเข้าอยู่ในเนื้อเยื่อข้าวได้ สำหรับการเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วนั้น DOA9 ยังแตกต่างไปจากแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดอื่นๆ คือ DOA9 สามารถเข้าสร้างปมกับถั่วในหลายกลุ่ม เช่น คราม (*Indigofera tintoria*), ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*), ถั่วซิราโต้ (*Macroptilium atropurpureum*), ถั่วโลตัส (*Lotus*

japonicus) และ ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) เป็นต้น (Teamtisong et al., 2014) เนื่องจาก DOA9 สามารถที่จะเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วได้หลากหลายชนิด DOA9 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาและใช้ในการผลิตเป็นหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพต่อไป

เพื่อที่จะพัฒนา DOA9 ให้เป็นหัวเชื้อที่มีคุณภาพและปลอดการปนเปื้อน วิธีการตรวจสอบและการติดตามเชื้อจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อไรโซเบียมที่ใช้เป็นเชื้อ DOA9 ที่เข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจน ไม่มีปัญหาของการปนเปื้อนจากเชื้อไรโซเบียมหรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งจะสามารถติดตามเชื้อ DOA9 ได้ว่าสามารถแข่งขันกับเชื้อไรโซเบียมท้องถิ่นที่อยู่ในดินเพื่อเข้าสร้างปมกับพืชได้หรือไม่ ซึ่งทั้งหมดนี้เพื่อให้แน่ใจว่าเกษตรกรจะได้หัวเชื้อ DOA9 ที่มีคุณภาพและได้ประโยชน์จากการใช้หัวเชื้ออย่างเต็มประสิทธิภาพ ทั้งนี้วิธีการตรวจสอบและติดตามเชื้อไรโซเบียมสามารถทำได้หลายรูปแบบ โดยวิธีการทางด้าน serology เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบและติดตามเชื้อไรโซเบียมได้อย่างรวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายไม่มาก โดยทั่วไปวิธีการนี้อาศัยการผลิตแอนติบอดีจากกระต่าย โดยจะได้แอนติบอดีในรูปโพลีโคลนอลแอนติบอดี้ (Somasegaran and Hoben, 1994) การตรวจสอบโดยใช้แอนติบอดีนั้นมีความสะดวกกว่าและให้ความน่าเชื้อถือได้มากกว่าการใช้เทคนิคทางด้านจุลินทรีย์ หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งให้ความรวดเร็วกว่าการตรวจสอบในระดับ ดีเอนเอ (Schloter et al., 1995) ทั้งนี้การนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการระบุและติดตามเชื้อ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immune agglutination หรือ immunofluorescence เป็นต้น ซึ่งจะสามารถติดตามเชื้อตัวอย่างไรโซเบียมได้ทั้งในอาหารเหลวและในต้นพืช หรือปมรากพืช แม้กระทั่งตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อตัวอย่างไรโซเบียมในดินหลังจากการใช้หัวเชื้อ (Asanuma et al., 1985; Fuhrmann and Wollum II, 1985; Moawad et al., 2005; da Silva-Froufe et al., 2009; Rose et al., 2011).

อย่างไรก็ตาม การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของการเกิด cross reaction กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะเมื่อทำการตรวจสอบเชื้อไรโซเบียมในแปลงที่มักจะมีไรโซเบียมชนิดอื่น ๆ ปะปนอยู่ในดิน ทำให้ยากต่อการระบุและติดตามเชื้อไรโซเบียมดังกล่าว (Olsen and Rice, 1984; Fuhrmann and Wollum II, 1985; Thies et al., 1991) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงให้ความสนใจกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแทนการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงและมีความเหมาะสมต่อการใช้ระบุหรือจำแนกเชื้อไรโซเบียมได้ดีกว่าการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพในแปลงของเกษตรกร (Conway et al., 1983) ทั้งนี้มีการรายงานแล้วว่าได้มีการผลิตและใช้ monoclonal antibodies มาบ้างแล้วในการตรวจสอบเชื้อ

ไรโซเบียม เช่น มีการใช้กับ *Rhizobium trifolii* 162X95 ((Nitragin Co., Milwaukee,Wisconsin) โดยวิธีการ indirect-ELISA พบว่ามีประสิทธิภาพดี ทั้งในการตรวจสอบเชื้อในปม และในอาหารเหลว (Wright et al., 1986) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีดั้งเดิมมีความยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีแนวความคิดในการนำเทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเฟจ ซึ่งสามารถคัดเลือกได้อย่างรวดเร็วในห้องทดลองจากคลังเฟจที่มีอยู่แล้ว (คลังย่าโม ๑) มาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไรโซเบียมที่ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพทั้งในขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อ และการติดตามเชื้อที่อยู่ในปมรากถั่วต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากเชื้อไรโซเบียมโดยใช้กระต่ายในการผลิต

1.2.2 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไรโซเบียมโดยใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเฟจ

1.2.3 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบและติดตามเชื้อไรโซเบียมเป้าหมาย

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้วิธีการกระตุ้นในกระต่าย และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้เทคโนโลยีการแสดงออกบนผิวเฟจเพื่อคัดเลือกเพปไทด์จากคลังเฟจ (คลังย่าโม ๑) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไรโซเบียมเป้าหมาย คือ *Bradyrhizobium* sp. DOA9 แล้วทำการตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจสอบเชื้อไรโซเบียมเป้าหมาย ทั้งในขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ และในการติดตามเชื้อไรโซเบียมนภายในปมรากถั่ว รวมทั้งตรวจสอบโอกาสการเกิด cross interaction ของแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ที่ได้กับไรโซเบียมสายพันธุ์อื่น ๆ

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1.4.1. ได้เทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อไรโซเบียมในขั้นตอนการผลิต และการติดตามผลการใช้

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 1 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

2.1.1 การเตรียมแอนติเจน (antigen)

การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระต่าย นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. DOA9 เพาะเลี้ยงในอาหาร Yeast Extract Mannitol medium (YM) เลี้ยงแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 ในขวดรูปชมพูขนาด 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วยน้ำเกลือ (0.85%) ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นละลายเซลล์ในน้ำเกลือแล้วนำปรับจำนวนเซลล์โดยวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร (Ab600) ให้ได้ 0.45 เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $1x10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้ไปต้มในน้ำเดือด 1 ชม. เพื่อทำลาย flagella และโปรตีน antigens ตัวอื่น ๆ จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดวัดโดยใช้วิธี Bradford และเติม merthiolate ที่ความเข้มข้น 1:10,000 เพื่อป้องกันการปนเปื้อน หลังจากนั้นให้เก็บแอนติเจนที่เตรียมได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ (Somasegaran and Hoben 1994)

2.1.2 การกระตุ้นกระต่ายเพื่อให้เกิดการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดี

นำกระต่ายเพศผู้ สายพันธุ์ New Zealand White มาเจาะเก็บเลือด เพื่อใช้เป็น normal serum แล้วจึงฉีดแอนติเจนที่เตรียมได้จากเชื้อ DOA9 ที่เตรียมไว้ข้างต้น ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (vein) ที่บริเวณใบหูของกระต่าย โดยมีกำหนดการ และปริมาณที่ฉีด ดังตารางที่ 1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 วิธีการและปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

วันที่	วิธีการ	ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีด
1	ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ intravenously (IV)	0.5 มิลลิลิตร
2	IV	0.5 มิลลิลิตร
3	IV	1.0 มิลลิลิตร
4	IV	1.5 มิลลิลิตร
5	IV	2.0 มิลลิลิตร
6-12	พักการกระตุ้น	
13	การตรวจคุณภาพของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ DOA9	

2.1.3 การตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรั่ม

การตรวจคุณภาพของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ DOA9 ทำได้โดยการเจือจางแอนติซีรั่มที่ได้ด้วย conjugated buffer ที่ระดับ 1:1,000, 1:10,000, 1:20,000, 1:40,000, 1:80,000, 1:100,000 และ 1:200,000 (v/v) และ normal serum ในอัตราส่วน 1:1,000 (v/v) และทำการเจือจางแอนติเจน (DOA9) ในระดับ 100, 10, 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 100 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แล้วดำเนินการตรวจสอบตามวิธีมาตรฐาน Agglutination test (Somasegaran and Hoben 1994)

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 2 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.2 การคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ คลังย่าโม๑ (biopanning)

การทำ biopanning เพื่อคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ คลังย่าโม ๑ เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติจำเพาะในการตรวจสอบและติดตามกับ *Bradyrhizobium* sp. DOA9 โดยใช้วิธีการตามแบบของ Pansri et al. (2009)

2.2.1 การเตรียมคลังเฟจสำหรับการทดสอบ (Rescuing phagemid libraries)

นำคลังเฟจ คลังย่าโม ๑ ที่เก็บไว้ในสต็อกกลีเซอรอล มาเจือจางแล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 เพื่อให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ $8x10^8$ เซลล์ หลังจากนั้นนำคลังเฟจที่

เจือจางแล้ว 10 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหาร 2xYT ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่ใส่ ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ทำการวัดค่า OD ที่ 600 nm ได้ค่า 1.227 เท่ากับมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 6.14 x 10^8 เซลล์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชม. จนถึงระยะ mid-log phase วัดค่า OD ที่ 600 ให้ได้ค่า 0.56 หลังจากนั้นเติม helper phage M13K07 ที่มีจำนวนเซลล์ 2x10^{10} เซลล์ อัตราส่วนของ แบคทีเรีย:helper เท่ากับ 1:1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000xg 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร 2xYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่เติม ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และ kanamycin 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน หลังจากนั้นแยก phage ที่มีแอนติบอดีส่วนของ ScFv โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000xg 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ (supernatant) ไปผสมกับสารละลาย PEG/2.5 M NaCl ปริมาตร 0.2 เท่า แช่ในน้ำแข็ง 1 ชม. ก่อนนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000xg 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในบัปเฟอร์ PBS ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 15% (v/v) คลังเฟจที่ได้ ให้แบ่งเก็บในหลอดๆ ละ 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้น (titer) โดยการทำการเจือจางเฟจครั้งละ 100 เท่า ต่อเนื่องจำนวนหกครั้ง (10^{-12}) แล้วนำเฟจที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตรไปผสม *E. coli* สายพันธุ์ TG11 ที่อยู่ในระยะ mid-log phase บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง TYE ที่เติม ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และเติมกลูโคส 1% (w/v)

2.2.2 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะจากคลังเฟจ (Biopanning)

ทำการคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ โดยการนำแอนติเจน 20 ไมโครลิตรมาตรึง (immobized) ในหลอด immunotube (Nunc, Dendark) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน ในบัฟเฟอร์ $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมล พีเอช 8.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร วันต่อมาล้างตัวอย่าง 3 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์ PBS เพื่อป้องกันการจับที่ไม่จำเพาะของเฟจ ให้เติม skim milk (blocking solution) ความเข้มข้น 2% (w/v) ในบัฟเฟอร์ MPBS (2% MPBS) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับหมุน เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นเทสารละลายออก แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้นให้เติมแอนติบอดีจากคลังเฟจที่อยู่ในบัฟเฟอร์ MPBS ที่ความเข้มข้น 10^{12} ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มไว้ในตู้บ่มที่มีการหมุนเป็นเวลา 1 ชม. และบ่มไว้อีก 1 ชม. โดยไม่ต้องหมุนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่มี

tween 20 ความเข้มข้น 0.1% (v/v) 3 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์ PBS อีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นให้เขย่าเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างให้หมด ทำซ้ำขั้นตอนการล้างอย่างน้อย 10-15 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์ PBS อีก 10-15 ครั้ง แอนติบอดีเฟจที่เกาะกับเอนติเจน สามารถทำการชะล้างได้ด้วยวิธี trypsinization ทำได้โดยการเติมบัฟเฟอร์ทริปซิน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (การเตรียมบัฟเฟอร์ทริปซิน โดยการเติมทริปซินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ซึ่งเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ในบัฟเฟอร์ PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) ลงในตัวอย่างนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หรือ การใช้ตัวชะที่เป็นบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด (50mM glycine-HCl pH, 2.0) โดยการเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นต้องทำให้เป็นกลางโดยการเติม netralization solution (200 mM $NaHPO_4$ pH 7.5) นำแอนติบอดีจากคลังเฟจที่คัดเลือกได้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนใน *E. coli* TG1 ที่เลี้ยงให้โตที่ระยะ mid-log โดยการวัดค่า OD ที่ 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.4 ในอัตราส่วน ปริมาตร 175 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับการประมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีจากคลังเฟจที่คัดเลือกได้ ให้ทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ต่อเนื่องไปสามครั้ง (10^{-3}) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง TYE ที่มีการเติม ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และเติมกลูโคส 1% (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

2.2.3 การคัดแยกเฟจจากโคโลนี *E. coli* ที่คัดเลือกได้ (Individual Phage Rescue)

แต่ละโคโลนีของ *E. coli* ที่มีเฟจเจริญอยู่ (Individual Phage Rescue) จะถูกคัดเลือกโดยการสุ่มจากอาหารแข็ง TYE แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร 2x YT ที่เติม ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และกลูโคส 1% (w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแต่ละ well ที่บรรจุอยู่ใน 96-well plate (Nunc, denmark) หลังจากเลี้ยงไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน ทำการย้ายตัวอย่างจากในแต่ละ well ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ไปที่ 96-well plate อันใหม่ที่มีอาหาร 2x YT ที่มีการเติม ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และเติมกลูโคส 1% (w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละ well โดยตัวอย่างที่ได้จาก 96-well plate อันแรกจะนำไปเก็บไว้เป็น master stock โดยมีการเติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% (v/v) แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ส่วน 96-well plate อันที่สองนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชม. หลังจากนั้นให้เติม 10^{10} helper phage บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำ plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายในอาหาร 2x

YT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่เติม ampicilin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และเติม kanamycin 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน (20 ชม.) หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส ข้างบน (supernatant) ที่มีเฟจอยู่ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบ monoclonal phage ELISA

2.2.4 การตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ได้จากเฟจ ด้วยเทคนิค Phage ELISA

เชื้อแบคทีเรียที่เตรียมโดยใช้วิธีการเตรียมดังในหัวข้อ 2.2.2 (Biopanning) นำมาเจือจางด้วย sodium carbonate buffer แล้วจึงคำนวณความเข้มข้นของแอนติเจนให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5 µg ต่อ well ใน 96 Micro well™ plate (Nunc, Denmark) การทดลองควบคุมจะใช้เพียง 2% BSA ผสมกับ sodium carbonate buffer จากนั้นจึงบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำตัวอย่างมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เพื่อทำการบล็อกตัวอย่างด้วย 4% (w/v) MPBS เป็นเวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง และล้างอีก 3 ครั้ง ด้วย PBS ทำการเติม Phage ปริมาตร 100 µl และเติม 4% (w/v) MPBS ปริมาตร 50 µl ลงใน well จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชม. ส่วน Phage ที่ไม่ได้จับกับแอนติเจนจะถูกล้างออกด้วย PBST และล้างออกด้วย PBS อย่างละ 3 ครั้ง ก่อนนำไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชม. แล้วจึงเติม HRP-labeled anti-M13 (1:5000 dilution in 2% (w/v) MPBS) ปริมาตร 100 µl และล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ในขั้นตอนสุดท้ายให้เติมสารละลายซับสเตรทปริมาตร 100 µl (ใช้ TMB หรือ ABTS sigma) แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างที่ได้สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD เท่ากับ 405 nm

2.2.5 การตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่ได้กับแอนติเจนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ในรูปของสารละลายเชื้อ และแบคทีเรียจากปมถั่วโดยวิธีการ ELISA

ตัวอย่างสารละลายเชื้อหรือแอนติเจน: สามารถเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. DOA9, SUTN9-2, SUTN9-12 และ USDA 110 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 g เวลา 20 นาที ณ อุณหภูมิ 4 °C แล้วจึงปรับปริมาตรเชื้อให้ได้

$1x10^9$ cells/ml โดยใช้น้ำเกลือ (0.85% NaCl) หรืออาจใช้การวัดการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer เพื่อวัดความเข้มข้นของเชื้อที่ OD600 nm เท่ากับ 0.45 แล้วนำเชื้อที่เจือจางไปต้มใน water bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายส่วนของโปรตีนที่ได้จาก Flagella และโปรตีนอื่นที่ไม่ทนความร้อน ทำการวัดปริมาณโปรตีนโดยรวมด้วยวิธี Bradford เพื่อหาความเข้มข้นสุดท้าย ตัวอย่างแอนติเจนที่ได้จะถูกเติมด้วย merthiolate เพื่อรักษาคุณภาพของแอนติเจน ก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมตัวอย่างปมถั่ว: นำเมล็ดถั่ว sirato (*Macroptilium atropurpureum*) ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยการแช่ในกรดซัลฟูริก เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 5 ครั้ง แล้วจึงแช่เมล็ดไว้ในน้ำเป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง นำเมล็ดถั่วที่แช่น้ำไว้วางบนอาหารแข็งที่ผสม agar ประมาณ 0.8 เปอเซ็นต์ แล้วนำไปบ่มในห้องมืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ถั่วที่งอกแล้วถูกนำไปวางบนกระป๋องปลูก (Leonard's jars) แล้วแยกใส่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ $1x10^9$ cells/ml/seed ปลูกถั่วเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยใช้อาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free medium) เพื่อรดต้นถั่ว นำปมถั่วที่คัดเลือกมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการล้างกับน้ำสะอาดแล้วเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่บรรจุด้วยเม็ด silica จนกว่าจะถึงเวลาวิเคราะห์ โดยปมจะมีลักษณะเหมือนเดิมหลังจากแช่ในน้ำสะอาดประมาณ 1-2 ชม. (Payakapong et al. 2003)

วิธี ELISA ในการทดลองนี้ปรับปรุงจากวิธีจากงานวิจัยของ Jaruseranee et al. (2009) โดยการบีบและบดปมในโกร่งบดยา ซึ่งใช้ปมจำนวน 4 ปม ต่อหนึ่ง well ของ 96 Micro well plate ปมที่บดในโกร่งถูกเติมด้วย sodium carbonate buffer (pH 8.5) จากนั้นจึงนำน้ำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 200 µl ใส่ลงในช่องตัวอย่าง และเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางด้วย sodium carbonate buffer นำมาคำนวณความเข้มข้นของแอนติเจนให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม ต่อ well ของ 96 Micro well™ plate (Nunc, Denmark) ก่อนนำไปบ่มที่ 4°C เป็นเวลาหนึ่งคืน โดยปิดฝาให้แน่นเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย เมื่อบ่มเสร็จแล้วนำตัวอย่างมาล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS และบล็อกด้วย 2% skim milk in phosphate buffer saline (MPBS) ก่อนนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 ชม. ณ อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำมาล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 3 ครั้ง เพื่อนำมาเติมด้วย phage ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10^{12} pfu ในสารละลาย 4% MPBS ปริมาตร 50 µl ส่วนโพลีโคนอลแอนติบอดีที่ใช้ต้องเจือจางเท่ากับอัตราส่วน 1:7500 ด้วย PBS buffer แล้วจึงเติมโพลีโคนอลแอนติบอดีที่เจือจางไว้ลงใน well ในปริมาตร 100 µl/well และเติม

50 µl ของ 4% MPBS ในแต่ละ well ทั้งนี้ทำการบ่ม 1 ชม. เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา โดยวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST (PBS with 0.1% Tween 20) และล้างอีกด้วย PBS อย่างละ 3 ครั้ง

สำหรับ Secondary antibody ที่ใช้ตรวจสอบการจับของ phage ได้ใช้ anti-M13 phage-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden) ที่เจือจางเท่ากับ 1:5000 ในสารละลาย 2% MPBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงไปในแต่ละ well แล้วนำตัวอย่างไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นจึงล้างด้วยสารละลายต่างๆ ดังที่กล่าวในข้างต้น แล้วนำมาเติม ด้วย ABTS (2, 2-azino-di-3-ethyl-benzthiazoine-6-sulfonate) peroxidase substrate (Fluka, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผสมด้วย 0.05% ของ H_2O_2 นำไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ในการหยุดปฏิกิริยาของตัวอย่างต้องเติมด้วย 50 ไมโครลิตร ของ 1% sodium dodecyl sulfate ทำการตรวจวัดค่าความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 450 nm ด้วยเครื่อง ELISA plate reader (Sunrise, TECAN, Austria)

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 3 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจับกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเฟจกับแอนติเจนโดยใช้เทคนิค Immunofluorescence assay

นำตัวอย่างแอนติเจนจากปม และเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว มาเกลี่ยบนสไลด์สะอาด หลังจากรอให้สไลด์แห้ง ทำการยึดแอนติเจนโดยการผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ทดสอบการจับตัวอย่างแอนติเจนด้วยการเติม polyclonal antibody (1:7500) และ phage clone (10^{13}) เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมแอนติบอดี้ จากนั้นจึงนำสไลด์ไปบ่ม เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วย PBST ประมาณ 4 ครั้ง แล้วนำมาย้อมทับด้วย secondary FITC- labelled anti-rabbit Ig antibody (สำหรับ polyclonal antibody) และด้วย M13-FITC (สำหรับ phage clone) ก่อนนำไปบ่มที่กล่องที่ใส่กระดาษเปียกไว้ เป็นเวลา 45 นาที นำสไลด์ไปผ่านน้ำปลอดเชื้อ ประมาณ 2-5 วินาที ก่อนจะทำให้แห้ง เพื่อนำมาหยดน้ำมันสำหรับปิดทับตัวอย่างด้วยแผ่นสไลด์ ส่องดูการเรืองแสงตัวอย่างบนสไลด์ด้วยกล้อง Epi-fluorescence

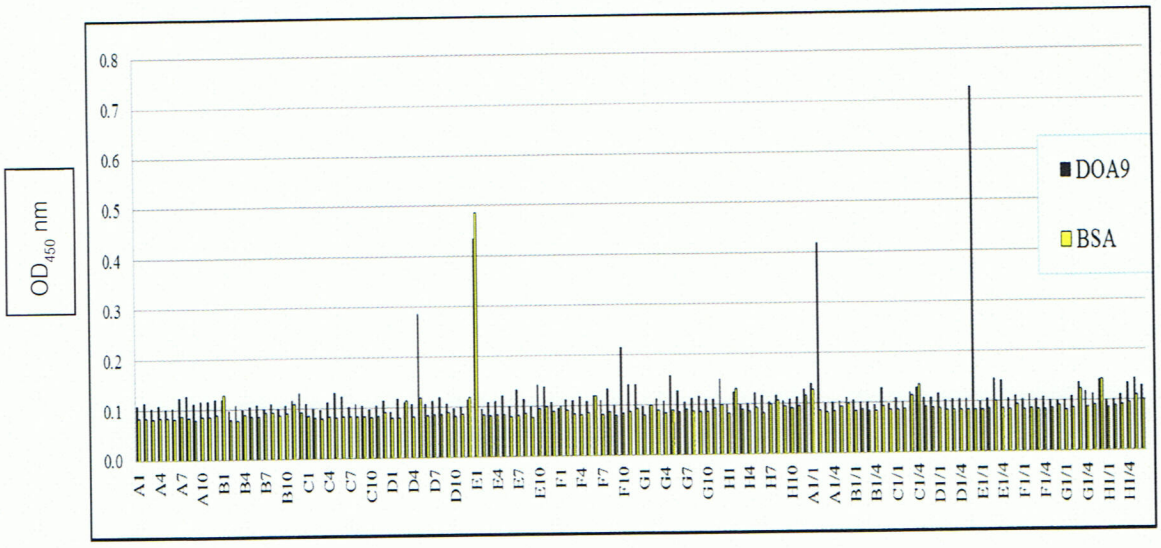
บทที่ 3
ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การผลิต Polyclonal antibody

จากการเตรียมแอนติเจนของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 โดยแบ่งเป็น Working antigen ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^9 cells/ml ทั้งนี้ใช้สำหรับการฉีดเข้ากระต่ายเพื่อให้สร้าง antibody และได้เตรียม Concentrated antigen ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์มากกว่า 10^9 cells/ml เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นการสร้าง antibody ในกระต่าย โดยทำการฉีด antigen เพื่อเข้าไปกระตุ้นให้เกิดการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ DOA9 ในกระต่ายจำนวน 3 ตัว (3 replications) ทั้งนี้หลังจากครบกำหนดการกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี สามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายโดยความเข้มข้นของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมายได้อย่างชัดเจน (titer) ในกระต่ายแต่ละตัวแตกต่างกัน โดยให้ปริมาณ titer ในช่วงตั้งแต่ 1/6,400 ถึง 1/12,800 ทั้งนี้อาจเกิดจากความผันแปรจากกระต่ายที่ใช้ในการผลิตซึ่งเป็นปัจจัยที่ควบคุมได้ยาก อย่างไรก็ตามปริมาณ titer ที่ได้นี้ถือว่าสูงมากเพียงพอที่สามารถนำไปใช้ทดสอบกับ antigen ในการทดลองขั้นต่อไปได้

3.2 การคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังเฟจ คลังย่าโม๑ (biopanning)

การคัดหาแอนติบอดีที่มีเฉพาะส่วนจับ (scFv) จากคลังเฟจที่มีขนาด 1.5×10^{12} เพื่อทำการหาแอนติบอดีส่วน scFv ที่จับจำเพาะต่อแอนติเจนของ DOA9 โดยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่าจากโคโลนีของ *E. coli* ที่มีเฟจเจริญอยู่จำนวน 141 โคโลนี พบว่า โคลน (clone) หมายเลข RD6/2, RA2/2 และ RD5 มีการจับจำเพาะกับแอนติเจนของ DOA9 สูงกว่า โปรตีนควบคุม (negative control) BSA ถึง 2 เท่า แสดงดังรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าคลังเฟจย่าโม ๑ ที่เป็นคลังแอนติบอดีที่ได้จากมนุษย์มีส่วนของแอนติบอดีที่มีเฉพาะส่วนจับ (scFv) ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่เตรียมได้จากเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. DOA9 ซึ่งถือว่าเป็นรายงานครั้งแรกที่สามารถค้นพบแอนติบอดีที่เตรียมจากคลังเฟจของมนุษย์ที่สามารถจับกันได้กับแอนติเจนจากแบคทีเรีย ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือก clones เหล่านี้ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

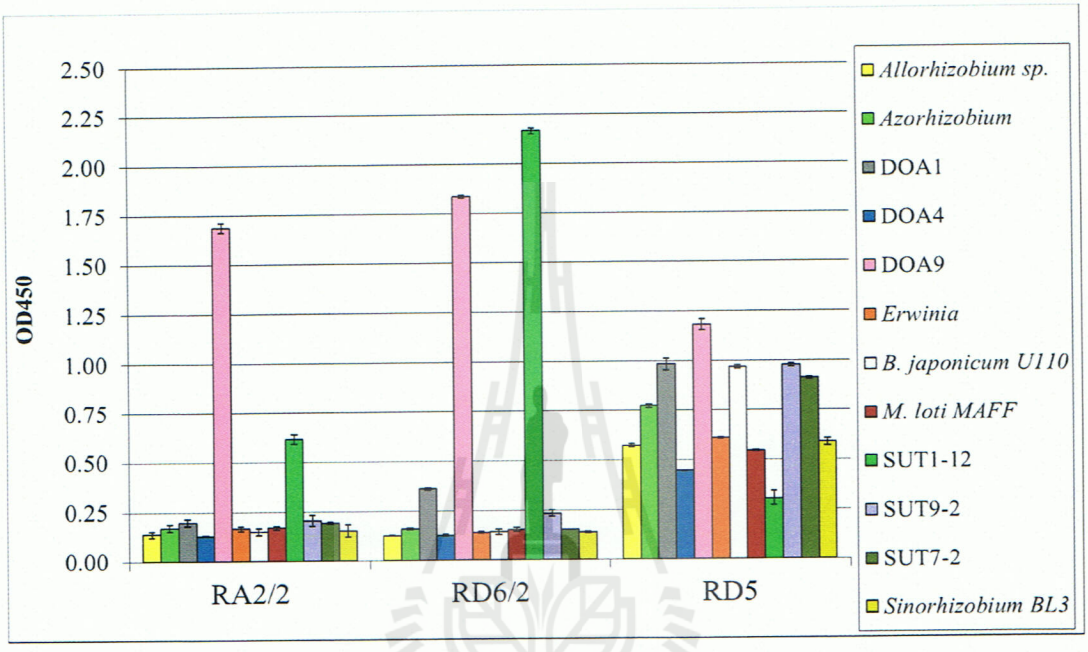


รูปที่1 การคัดเลือกแอนติบอดีส่วน scFv ที่จับจำเพาะต่อแอนติเจนของ DOA9 โดยวิธี ELISA

3.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

นำ clone ของ *E. coli* ที่มีเฟจเจริญอยู่ที่คัดเลือกได้ มาทำการทดสอบเพื่อคัดกรองหาความสามารถในการจับจำเพาะกับแอนติเจนของ DOA9 อีกครั้ง และทำการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (cross reactivity) ของแอนติบอดีต่อ DOA9 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียต่างชนิด รวมทั้งเชื้อไรโซเบียมชนิดอื่น ๆ ด้วยวิธี ELISA โดยผลการทดลองพบว่า โคลน RD6/2 และ RA2/2 มีความจำเพาะเจาะจงต่อDOA9 มากที่สุด ในขณะที่โคลน RD5 ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่ได้จาก DOA9 โดยพบว่าสามารถจับกับแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไรโซเบียมชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย (รูปที่ 2) ในขณะที่โคลน RD6/2 และโคลน RA2/2 สามารถจับกับแอนติเจนที่เตรียมจาก ***DOA9*** ได้โดยมีระดับสัญญาณในการจับสูงไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ทั้งสองโคลนจะไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น แต่พบว่าทั้งสองโคลนนี้สามารถจับกับแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUT1-12 ได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ SUT1-12 เป็นเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 มากจากการตรวจสอบด้วยการวิเคราะห์ Phylogenetic tree โดยใช้ยีน 16S rRNA และยีนอื่น ๆ ที่เป็น Housekeeping genes ในการสร้าง phylogenetic tree (Noisangiam et al., 2012) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SUT1-12 จะสามารถมีแอนติเจนที่คล้ายคลึงกับ

แอนติเจนบนเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 อย่างไรก็ตามผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดี้ที่คัดเลือกได้โคลน RD6/2 และ RA2/2 ไม่ทำปฏิกิริยาจับกัน (cross reactivity) กับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ใช้เป็นหัวเชื้อทางการค้าโดยทั่วไปคือ *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 รวมทั้งเชื้อไรโซเบียม หรือแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีโอกาสพบในดิน ดังนั้นแอนติบอดีที่ได้มีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเพื่อการตรวจสอบในสภาพไร่ต่อไปได้

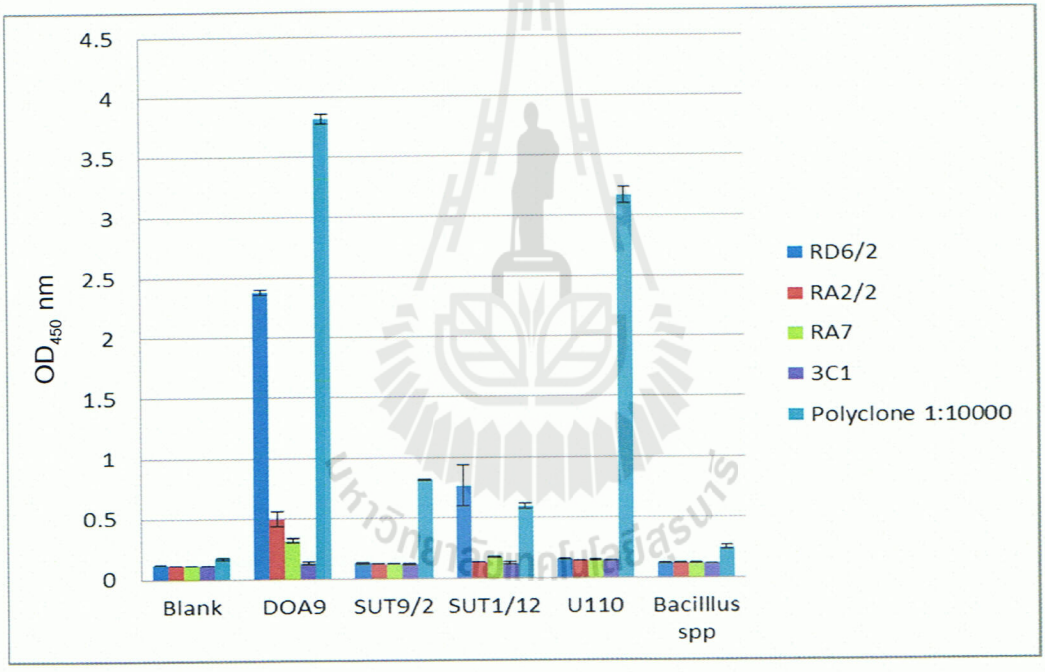


รูปที่ 2 แสดงผลการจับจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดี ต่อ DOA9 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น โดยวิธี ELISA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากนั้นนำโคลน RD6/2 และ RA2/2 ที่ได้จากคลังมนุษยน์มาทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ *polyclonal antibody* ที่เตรียมจากการผลิตในกระต่ายโดยใช้เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม DOA9 เป็นแอนติเจน โดยใช้ความเข้มข้นของ polyclonal antibody ที่ 1:10,000 รวมทั้งเปรียบเทียบกับแอนติบอดีอื่น ๆ ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า (RA7 และ 3C1) เพื่อใช้เป็นแอนติบอดีควบคุม (negative control) โดยทำการทดสอบปฏิกิริยาการจับกันกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9, SUTN9-2, SUT1-12, USDA110 และใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ BSA เป็นแอนติเจนควบคุม ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีที่นำมาทดสอบทั้งหมดไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ BSA และเชื้อ *Bacillus* spp. ในขณะที่ polyclonal antibody ที่เตรียมได้จากกระต่ายโดยการใช้เชื้อ DOA9

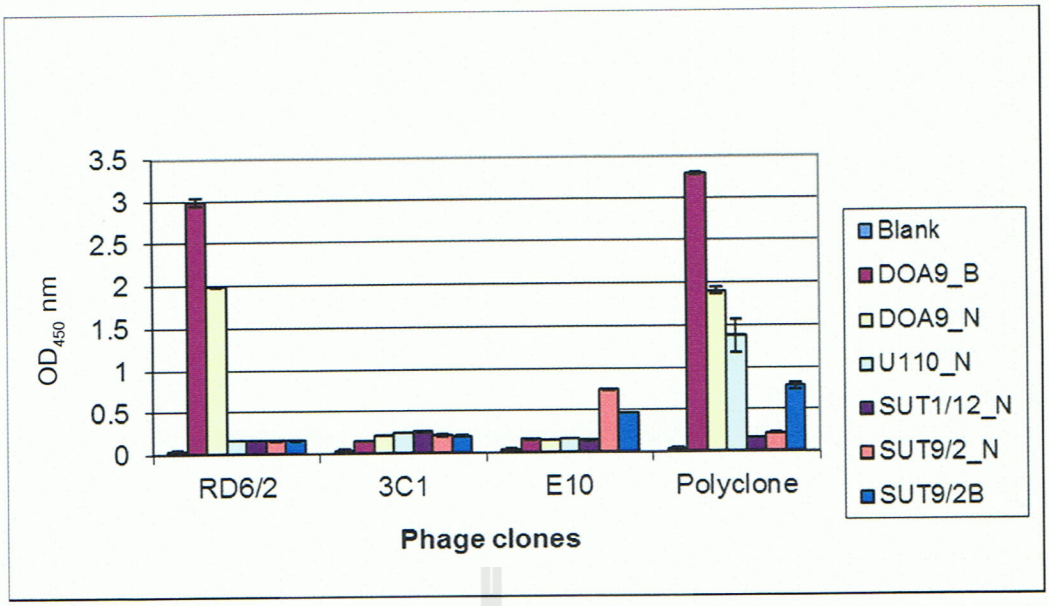
สามารถทำปฏิกิริยาจับกันได้ (cross reactivity) กับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมทุกชนิดที่นำมาทดสอบ แสดงให้เห็นว่า polyclonal antibody ไม่มีความจำเพาะเจาะจงและไม่เหมาะสมในการนำไปตรวจสอบในสภาพไร่ที่มักมีเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมท้องถิ่น (indigenous bradyrhizobia) อาศัยอยู่ซึ่งอาจทำให้เกิด false positive โดยในการทดลองนี้พบว่าโคลน RD6/2 จากคลังมนุษย์มีการจับจำเพาะเจาะจงต่อ DOA9 มากที่สุดและทำปฏิกิริยาได้ดีกว่าโคลน RA2/2 แต่อย่างไรก็ตามโคลน RD6/2 ยังพบการทำปฏิกิริยากับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SUT1-12 ที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความมั่นใจของแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน RD6/2 ที่มีความจำเพาะกับ DOA9 มากกว่า และไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงผลการจับจำเพาะเจาะจงต่อ DOA9 ของแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลนเปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี ELISA

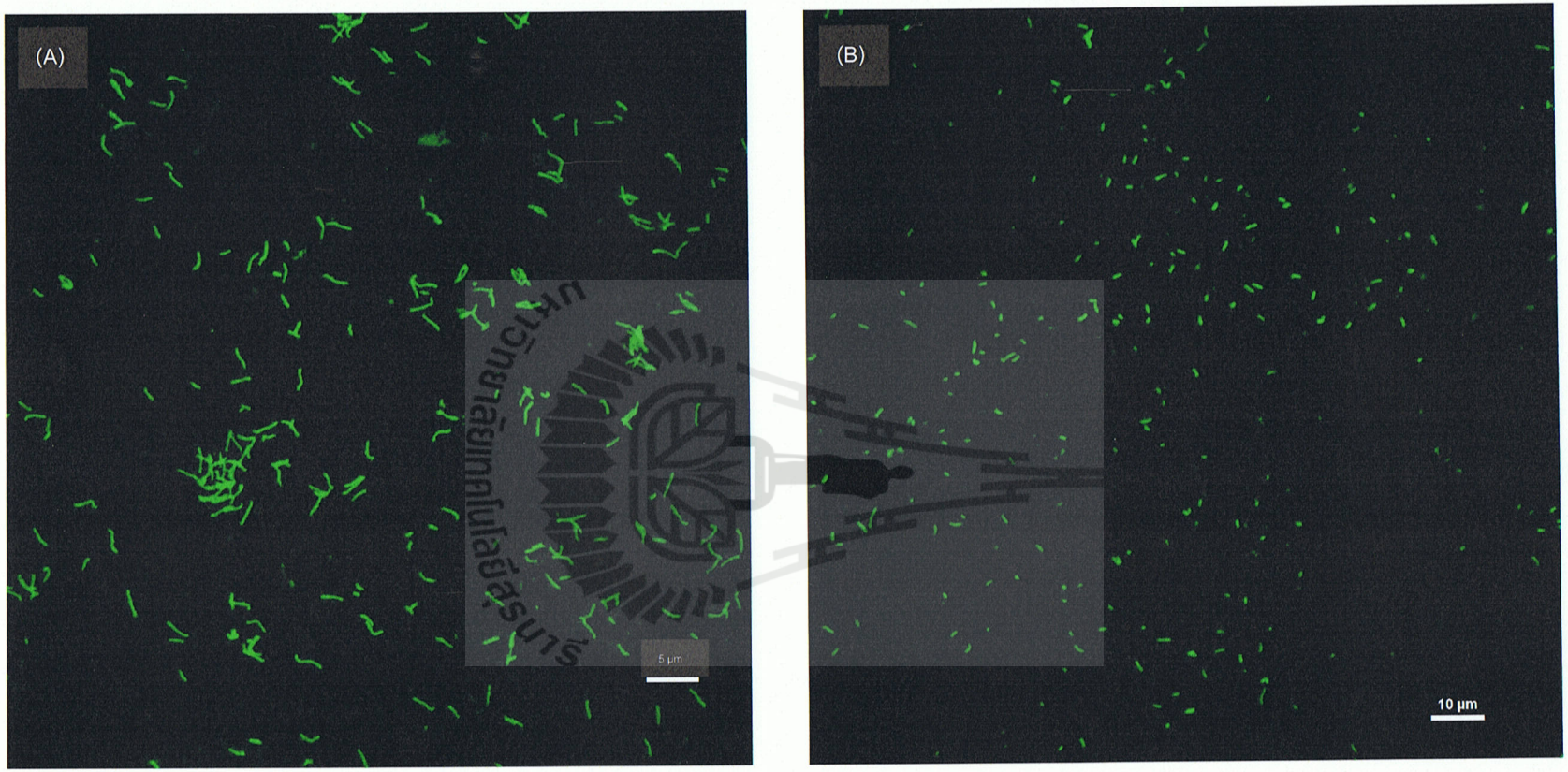
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลว และในปมรากถั่ว

ทดสอบประสิทธิของการจับจำเพาะต่อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ของเฟจโคลน RD6/2 เมื่ออยู่ในรูปแบบหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลว และในรูปแบบของแบคทีรอยด์ (bacteroid) ในปมรากถั่ว ด้วยวิธี ELISA โดยได้ทำการปลูกเชื้อ (inoculation) แบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9, USDA110, SUT1-12 และ SUTN9-2 ลงในเมล็ดถั่ว siratro ซึ่งใช้เป็นพืชทดสอบ โดยหลังจากได้ปมรากแล้วนำปมรากที่ได้มาบดเพื่อสกัด bacteroid จากปมที่เกิดจากเชื้อแต่ละชนิดเพื่อมาทดสอบ โดยทดสอบทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน RD6/2 และ polyclonal antibody ที่ได้จากกระต่ายที่กระตุ้นด้วยเชื้อ DOA9 รวมทั้งใช้เฟจโคลน 3C1 และ E10 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็นชุดควบคุม โดยผลการทดลองพบว่าเฟจโคลน 3C1 และ E10 ไม่สามารถจับกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมในรูปหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลวของเชื้อ DOA9 หรือในรูป bacteroid จากปมถั่วได้ รวมทั้งเชื้ออื่น ๆ ยกเว้นเฟจโคลน E10 สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ SUTN9-2 ทั้งในรูปหัวเชื้อชนิดเหลวและในรูป bacteroid จากปมถั่วได้เล็กน้อย ในขณะที่พบว่าการใช้เฟจโคลน RD6/2 สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม DOA9 ได้ทั้งในรูปแบบหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลว และในรูป bacteroid จากปมรากถั่ว และเป็นที่น่าสนใจว่าเฟจโคลน RD6/2 ไม่สามารถจับกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม SUT1-12 ที่อยู่ในรูปแบบ bacteroid ได้ ทั้ง ๆ ที่เชื้อ SUT1-12 มีความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ DOA9 และเฟจโคลน RD6/2 สามารถจับได้ในรูปแบบเชื้อชนิดเหลวเท่านั้น (จากการทดลองที่ผ่านมา) แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนที่อยู่บน bacteroid ของเชื้อ SUT1-12 มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ในขณะที่แอนติเจนของเชื้อ DOA9 ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับเฟจโคลน RD6/2 ยังคงอยู่ทั้งในรูปแบบเชื้อชนิดเหลว และในรูปแบบ bacteroid ซึ่งส่งผลดีให้สามารถใช้แอนติบอดีจากเฟจโคลน RD6/2 เป็นแอนติบอดีที่สามารถมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ DOA9 ที่สามารถใช้ตรวจสอบและติดตามเชื้อแบคทีเรียได้ตลอดกระบวนการผลิตและการนำไปใช้ติดตามในสภาพไร่ ซึ่งแตกต่างจากการใช้ polyclonal antibody ที่พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ DOA9 ในรูปแบบของหัวเชื้อชนิดเหลวและรูปแบบ bacteroid จากปมถั่วได้เช่นกัน แต่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับ bacteroid ที่ได้จากปมที่ปลูกด้วยเชื้อ USDA110 เช่นกัน จึงไม่เหมาะในการนำ polyclonal ไปใช้ต่อไป (รูปที่ 4)

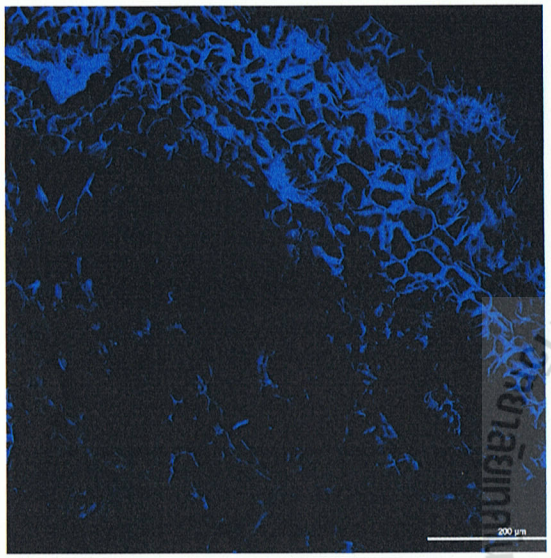


รูปที่ 4 แสดงผลการทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะเจาะจงต่อ DOA9 ทั้งในหัวเชื้อชนิดเหลว (B) และปมรากถั่ว (N) ของแอนติบอดีที่ได้จากเฟจโคลน เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

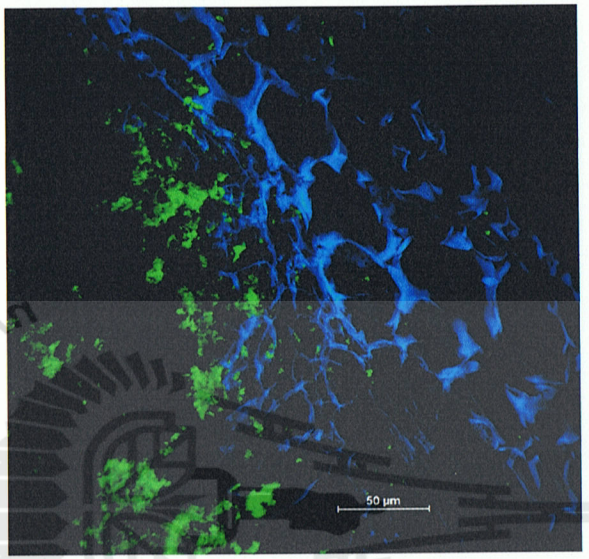
จากนั้นนำเฟจโคลน RD6/2 มาทดสอบการติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมโดยตรงในปมรากถั่วโดยการย้อม secondary antibody ที่จำเพาะกับเฟจโคลน และ polyclonal antibody จากกระต่าย ที่มีการเชื่อมต่อกับสารเรืองแสง (immunofluorescence) จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้อง confocal microscope พบว่าทั้ง polyclonal antibody และเฟจโคลน RD6/2 สามารถจับกับเซลล์ของ DOA9 ในรูปของหัวเชื้อชนิดเหลวได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รูปที่ 5) โดยการใช้ polyclonal antibody สามารถเห็นเป็นรูปร่างของเซลล์ที่ชัดเจนได้มากกว่าการใช้ monoclonal antibody ที่ได้จากเฟจโคลน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก polyclonal antibody สามารถจับกับ antigen บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้หลายชนิด ทำให้สามารถเห็นการเรืองแสงได้รอบ ๆ เซลล์ ในขณะที่การใช้ monoclonal antibody ที่ได้จากเฟจโคลนอาจมีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนเพียงชนิดเดียวที่ไม่ได้มีตำแหน่งอยู่ทั่วไปบนผนังเซลล์ จึงอาจทำให้ไม่สามารถเห็นในลักษณะของรูปร่างเซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามสามารถตรวจสอบและติดตามการมีอยู่และความถูกต้องของเชื้อได้จากการเรืองแสง ซึ่งแตกต่างจากเซลล์พืชที่ให้สีฟ้าจากการย้อมด้วยสาร calcofluor ทำให้สามารถเห็นเซลล์ของ bacteroid ภายในปมรากพืชได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 6)



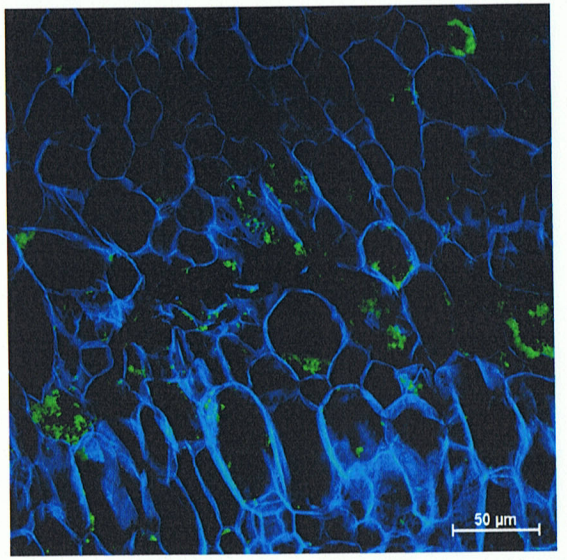
รูปที่ 5 ภาพแสดง Immunofluorescence จากการใช้ (A) polyclonal antibody และ (B) monoclonal antibody จากเฟจโคลน RD6/2 ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้โรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในหัวเชื้อชนิดเหลว



(A) Nodule stained with calcofluor



(B) Nodule stained with calcofluor and polyclonal antibody for DOA9



(C) Nodule stained with calcofluor and monoclonal antibody from phage clone RD6/2

รูปที่ 6 ภาพแสดง Immunofluorescence จากการใช้ (A) calcofluor; (B) calcofluor และ polyclonal antibody และ (C) calcofluor และ monoclonal antibody จากเฟจโคลน RD6/2 ในการย้อมปมรากเพื่อการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ในปมรากถั่ว

บทที่ 4

บทสรุปการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 โดยใช้กระต่ายในการผลิตเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดนี้ทางการเกษตร โดยเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างมาจากคลังย่าโม ๑ ซึ่งเป็นคลังแอนติบอดีที่สร้างจากมนุษย์ และจากการคัดเลือกพบเฟจโคลน RD6/2 เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม DOA9 มากที่สุด โดยไม่ทำปฏิกิริยาจับกันกับเชื้อไรโซเบียม และเชื้อจุลินทรีย์ดินอื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ SUT1-12 ซึ่งมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับเชื้อ DOA9 แต่อย่างไรก็ตามเฟจโคลน RD6/2 สามารถจับกับเชื้อ SUT1-12 ได้ในรูปแบบของหัวเชื้อชนิดเหลวเท่านั้นไม่สามารถจับกับเชื้อในรูปแบบ bacteroid ที่สกัดออกมาจากปมรากถั่วได้ ในขณะที่เฟจโคลน RD6/2 สามารถทำปฏิกิริยาจับกับเชื้อ DOA9 ได้ในทั้งสองรูปแบบ โดยเมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบและติดตามเชื้อไรโซเบียมเป้าหมาย พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี้จากเฟจโคลน RD6/2 สามารถใช้ในการติดตามและตรวจสอบเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ DOA9 ได้ดี ในขณะที่การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยาจับกับเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดอื่น ๆ (cross reactivity) จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบหรือติดตามในสภาพไร่ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในอนาคตที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไรโซเบียมหรือแบคทีเรียอื่น ๆ ทางการเกษตรโดยใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเฟจ ทดแทนการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี หรือการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิม แล้วนำมาใช้ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อที่มีประโยชน์ทางการเกษตรเหล่านี้ในระหว่างกระบวนการผลิต หรือในสภาพไร่ได้ต่อไป

บรรณานุกรม

Asanuma S, Thottappilly G, Ayanaba A, Ranga Rao V (1985) Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in detection of *Rhizobium* both in culture and from root nodules of soybeans and cowpeas. Can. J. Microbiol. 31:524-528.

Conway de Macario E, Macario AJL (1983) Monoclonal antibodies for bacterial identification and taxonomy. ASM News 49:1-7.

da Silva-Froufe LG, Boddey RM, Reis VM (2009) Quantification of natural populations of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. in sugar cane (*Saccharum* spp.) using different polyclonal antibodies. Braz. J. Microbiol. 40:866–878.

Fuhrmann J, Wollum II AG (1985) Simplified enzyme linked immunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1010-1013.

Moawad H, Abd El-Rahim WM, Abd El-Aleem D, Abo Sedera SA (2005) Persistence of two *Rhizobium etli* inoculant strains in clay and silty loam soils. J. Basic Microbiol. 45:438– 446.

Noisangiam R, Teamtisong K, Tittabutr P, Boonkerd N, Uchiumi T, Minamisawa K, Teaumroong N (2012) Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 78: 6236-6250.

Okazaki S, Noisangiam R, Okubo T, Kaneko T, Oshima K, et al. (2015) Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. PLoS ONE 10(2): e0117392. doi: 10.1371/journal.pone.0117392.

Olsen PE, Rice WA (1984) Minimal antigenic characterization of *Rhizobium meliloti* strains by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Can. J. Microbiol. 30:1093-1099.

Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M (2009) A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol. 29: 9

Payakapong W, Tittabutr P, Boonkerd N (2003) Strain-specific antisera to identify Thai *Bradyrhizobium japonicum* strains in preserved soybean nodules. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 19: 981-983.

Rose MT, Deaker R, Potard S, Tran CKT, Vu NT, Kennedy IR (2011) The survival of plant growth promoting microorganisms in peat inoculant as measured by selective plate counting and enzyme-linked immunoassay. World J. Microbiol. Biotechnol. 27:1649–1659.

Schloter M, Assmus B, Hartmann A (1995) The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. Biotechnol. Adv. 13:75–90.

Somasegaran P, Hoben HJ (1994) Handbook for rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology. Edwards Brothers, Inc., USA.

Teamtisong K, Songwattana P, Noisangiam R, Piromyou P, Boonkerd N, Tittabutr P, Minamisawa K, Nantagij A, Okazaki S, Abe M, Uchiumi T, Teaumroong N (2014) Divergent nod-containing *Bradyrhizobium* sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. Microbe Envi. 29: 370-376.

Thies YE, Singleton PW, Bohlooh BB (1991) Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia in field grown legumes. Appl. Environ. Microbiol. 57: 19 – 28.

Wright SF, Foster JG, Bennett OL (1986) Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*, Appl. Environ. Microbiol. 52:119-123.