การพัฒนาวิธีอีไลซา ทางอ้อมแบบแข่งขัน สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสกุล Klebsiella และ Azospirillum

นาย สาโรช พรพัฒน์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-925-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016241

i 10309366

Development of Competitive-Indirect ELISA for Detection of Nitrogen-fixing *Klebsiella* spp. and *Azospirillum* spp.

Mr. Saroch Pornputtkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-577-925-3

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Development of Competitive Indirect ELISA for Detection of Nitrogen-fixing Klebsiella spp. and Azospirillum spp.

By Mr. Saroch Pornputtkul

Department Biochemistry

Thesis Advisor Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Assistant Professor Preeda Chaisiri, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.

Thavorn Vajrabhaya
.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D)

Thesis Committee

Piamsook Pongsawasdi
.....Chairman

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.

Jariya Boonjawat
.....Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Preeda Chaisiri
.....Thesis Coadvisor

(Assistant Professor Preeda Chaisiri, Ph.D.)

Kannikar Kalyawong
.....Member

(Associate Professor Kannikar Kalyawong, Ph.D.)

Nantakorn Boonkerd
.....Member

(Nantakorn Boonkerd, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สาโรช พรพัฒน์กุล : การพัฒนาวิธีอีไลซาทางอ้อมแบบแข่งขันสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสกุล Klebsiella และ Azospirillum (Development of Competitive - Indirect ELISA for Detection of Nitrogen-fixing Klebsiella spp. and Azospirillum spp.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. จริยา บุญยวัฒน์ ผศ.ดร. ปรีดา ชัยศิริ, 145 หน้า. IBSN 974-577-925-3

ได้ผลิตแอนติซีราต่อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสกุล Klebsiella สายพันธุ์อาร์15, อาร์17 และ สกุล Azospirillum สายพันธุ์อาร์25ในกระต่ายเพื่อใช้ในการตรวจหา การตรวจสอบและการหาจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับรากข้าว ได้ค่าไตเตอร์โดยปฏิกิริยาแอคกลูติเนชั่นสูงสุดเท่ากับ 1:1,600, 1:2,400 และ 1:3,200 ตามลำดับ ได้ทดลองใช้แอนติซีราเหล่านี้เพื่อการตรวจหาและตรวจสอบแอนติเจนคู่สมที่ระดับเจือจาง 1:100 ด้วยวิธีเอฟเอทางอ้อม พบว่าปัจจัยเกี่ยวกับสภาพแวดล้อม มีผลทำให้ความไวของการตรวจสอบด้วยวิธีเอฟเอทางอ้อมลดลง ได้แก่ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพความเค็มของอาหาร นอกจากนี้ยังได้พัฒนาการตรวจสอบด้วยวิธีอีไลซาทางอ้อมแบบแข่งขันขึ้นมาเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนคู่สมที่อยู่ร่วมกับรากข้าว ให้ความไวในการตรวจสอบแอนติเจนเท่ากับ 1.95×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความถูกต้องวัดโดยเปอร์เซนต์รีคอบเวอร์รีเท่ากับ 90-120% และเปอร์เซนต์ความแปรผัน (%CV) ในการทดลองเดียวกันเท่ากับ 3-10% และระหว่างการทดลองเท่ากับ 3-15% ความจำเพาะของวิธีเอฟเอทางอ้อมและอีไลซาทางอ้อมแบบแข่งขัน ควรจะตรวจสอบได้ถึงระดับสปีชีส์เพราะแอนติซีรัมของอาร์15 และอาร์17 ซึ่งเคยศึกษาด้วยคุณสมบัติทางคีโมแทคโซโนมีว่าคล้ายกัน ได้แสดงปฏิกิริยาข้ามชนิดซึ่งกันและกันเท่ากับ 96-98% ขณะที่แสดงปฏิกิริยาข้ามชนิดกับ Klebsiella oxytoca NG13 เท่ากับ 26-28% ส่วนแอนตีซีรัมของอาร์25 ทำปฏิกิริยาข้ามชนิดกับเชื้อ Azospirillum lipoferum (FS และ 34H) ได้100% แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามชนิดกับเชื้อ Azospirillum สายพันธุ์อื่น สำหรับการวัดปริมาณแบคทีเรีย อาร์15, อาร์17 และอาร์25 ที่เติมไปบริเวณรากข้าวของต้นกล้า 8 พันธุ์โดยวิธีอีไลซาทางอ้อมแบบแข่งขันพบว่าทั้งสามสายพันธุ์สามารถเกาะติดบนรากข้าวได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมงและพบว่ามีการสร้างโคโลนีได้สูงสุดเท่ากับ 10^7-10^9 เซลล์ต่อน้ำหนักรากแห้ง ณ.วันที่ 12 หลังการเติมแบคทีเรีย จากการศึกษาเกี่ยวกับคู่สมระหว่างข้าวกับแบคทีเรียโดยการวัดศักยภาพการสร้างโคโลนี ศักยภาพการตรึงไนโตรเจน และดัชนีการเจริญเติบโตของพืชที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่เติมเชื้อ สามารถจัดแบ่งความสัมพันธ์ระหว่างข้าวกับแบคทีเรียได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่ง มีการเพิ่มศักยภาพการสร้างโคโลนี ศักยภาพการตรึงไนโตรเจน และดัชนีการเจริญเติบโตของพืช และพบว่าข้าวพันธุ์กข7กับเชื้ออาร์15เป็นคู่ที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้ กลุ่มที่สอง มีการเพิ่มเฉพาะค่าศักยภาพการสร้างโคโลนีและดัชนีการเจริญเติบโตของพืช พบว่าข้าวพันธุ์กข6กับเชื้ออาร์25เป็นคู่ที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SAROCH PORNPUTTKUL : DEVELOPMENT OF COMPETITIVE - INDIRECT ELISA FOR DETECTION OF NITROGEN-FIXING Klebsiella spp. AND Azospirillum spp. THESIS ADVISOR: ASSC PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D., ASSIS PROF. PREEDA CHAISIRI, Ph.D. 144 PP.

In order to detect, identify and quantitate nitrogen-fixing bacteria associated with rice root, antisera against Klebsiella strains R15, R17 and Azospirillum strain R25 were produced in rabbit yielding the agglutination titer of 1:1,600, 1:2,400 and 1:3,200, respectively. These antisera were used successfully for the detection and identification of their corresponding antigens at the dilution of 1:100 by indirect fluorescent antibody technique (IND-FA). The environmental factors such as nutrients or high salinity could decrease the sensitivity of IND-FA. For the quantitation of associative diazotrophs, protocols of competitive-indirect-ELISA (COM-IND-ELISA) had been developed for each antiserum, providing the sensitivity of detecting homologous antigens at 1.95×10^6 cells.ml^{-1}, with the accuracy shown by % recovery of 90-120. The precision of intra assay and inter assay were 3-10%CV and 3-15%CV, respectively. The specificity of both IND-FA and COM-IND-ELISA should be species specific because antisera against K.R15 and R17, which had been shown by chemotaxonomy to be very closely related strains, showed 96-98 % cross-reactivity with each other while showed 26-28 % cross-reactivity with K. oxytoca NG13. In addition, antiserum of A. R25 showed 100 % cross-reactivity only with A. lipoferum (FS and 34H), but not with other species of Azospirillum. Quantitation of R15, R17 and R25 inoculated in the rhizosphere of 8 rice cultivars by COM-IND-ELISA indicated that all 3 strains adhered to rice root within 1 h after inoculation and showed maximum colonization potential of 10^7-10^9 cells.g^{-1}root dry weight on day 12 after inoculation. The compatibility between rice and bacteria were also tested by measuring the net gain of colonization potential, N_2-fixing potential, and plant vigor index comparing with uninoculated control plants. The plant-bacterial interaction could be classified into 2 categories: 1) with net gain in colonization potential, N_2-fixation and plant vigor index or root dry weight, the best pair is RD7-R15, and 2) with net gain in colonization potential and plant vigor index, the best pair is RD6-R25.

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต Saroch Pornputtkul
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Jariya Boonjawat
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Preeda Chaisiri

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to my advisor, Dr. Jariya Boonjawat, and Dr. Preeda Chaisiri for their invaluable supervision, encouagement and supports thoughout my study.

Sincere appreciation is expressed to the staff member of BNF Research Center, Soil Science Devision, Department of Agriculture, Minnistry of Agriculture and co-operatives, Thailand for their great helps and suggestions in immunization and agglutination techniques. Thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in laboratory and discussion with sincerity and friendship, and especially to Miss. Yingpit Yodyotee for her constant help. I also thank Capt. Prakorn Girodkunkid for his kind assistance in drawing the figure.

I wish to acknowledge the contributions of the National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science Technology and Energy for financial support, of Biochemistry Department,

Faculty of Science, Chulalongkorn University for all laboratory facilities and equipments and BNF Research Center for ELISA reader.

Finally, I am most grateful to my parents and members of my family for their love, understanding and ecouragement.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....IV

ENGLISH ABSTRACT.....V

ACKNOWLEDGMENT.....VI

CONTENTS.....VIII

LIST OF TABLES..... XII

LIST OF FIGURE..... XIV

ABBREVIATIONS..... XVII

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Rice Cultivation in Thailand.....1

1.2 Biological nitrogen fixation.....2

1.3 Stains Indentification.....6

1.4 Serological techniques.....8

1.5 The aims of this thesis.....21

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacteria.....23

2.2 Rice.....24

2.3 Rabbit.....24

2.4 Chemicals and Biochemicals.....25

2.5 Preparation of Culture media

and cultivation.....25

2.6 The maintenance of cultures.....29

Page

2.7 Cultivation of bacteria.....29

2.8 Preparation of antigens..... 28

2.9 Antisera production.....31

2.10 Indentification of N_2 - fixing bacteria by immunofluorescence.....32

2.11 Salt effect on strain identification by indirect immunofluorescence.....34

2.12 Preparation of rice seedling roots.....35

2.13 Assay for adsorption of bacteria on rice roots by indirect immunofluorescence.....36

2.14 Assay for association bacteria on rice roots by indirect immunofluorescence.....37

2.15 Development of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) procedure....37

2.16 Competitive binding assay of indirect enzyme linked immunosorbent assay (COM-IND-ELISA).....40

2.17 Examination for the specificity of antisera against strain R15, R17 and R25.....41

Page

2.18 Salt effect on quantitative determination by COM-IND-ELISA.....44

2.19 Acetylene Reduction Activity (ARA) Assay.....44

2.20 Determination of plant Vigor index.....45

2.21 Application of COM-IND-ELISA for quantitation of associative N_2-fixing bacteria on the rice root.....46

III RESULTS

3.1 Growth characteristics of R15, R17 and R25.....49

3.2 Preparation of antiserum againt R15, R17 and R25.....54

3.3 Indirect immunofluorescence antibody (IND-FA).....58

3.5 Determination of assosiative N_2-fixing bacteria on the rice root by immunofluorescence.....64

3.5 Development of IND-ELISA method.....68

3.6 Development of competitive indirect ELISA (COM-IND-ELISA).....82

Page

3.7 Determination of the growth characterristic of N_2-fixing bacteria R15, R17 and R25 by COM-IND-ELISA.....97

3.9 Quantitation of associative N_2-fixing bacteria by COM-IND-ELISA.....97

IV DISCUSSION

4.1 Antisera preparation.....111

4.2 Development of competitive IND-ELISA technique.....112

4.3 Detection and identification of bacteria, R15, R17 and R25 by immunofluorescence and competitive indirect ELISA techniques.....116

4.4 Application of quantitative COM-IND-ELISA to select the compatible pair of plant-bacteria interaction.....124

4.5 Relationship between colonization potential and root lectin.....125

4.6 Summary of the results.....126

REFERENCES.....129

BIOGRAPHY.....145

LIST OF TABLES

Page

Table 1.1 Information on bacterial strains.....7

Table 2.1 Example for calculation of per cent competitive binding and per cent cross-reaction.....43

Table 2.2 Example for calculation of plant vigor index.....46

Table 3.1 Growth character of N_2-fixing bacteria, R15, R17 and R25 in NF and RM medium containing various salt concentration.....53

Table 3.2 Optimization of coating antigens and antisera concentrations for Indirect immunofluorescence.....61

Table 3.3 Cross-reactivity of antisera against R15, R17 and R25 with nonhomologous heated and unheated antigens by IND-FA technique.....63

Table 3.4 Salt effect on imunofluorescent intensity.....65

Table 3.5 Detection of N_2-fixing bacteria, R15, R17 and R25 adhered on the rice roots by IND-FA.....67

Table 3.6 Detection of N_2-fixing bacteria, R15, R17 and R25 associated with the rice root by IND-FA.....69

Page

Table 3.7 Effect of tested antigen concentration in COM-IND-ELISA.....86

Table 3.8 The precision of the COM-IND-ELISA method.....91

Table 3.9 The accuracy of COM-IND-ELISA.....94

Table 3.10 Relationship among colonization potential, N_2-fixing potential and seedling vigor index 12 day after inoculation.....103

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1.1 Direct immunofluorescence.....17

Figure 1.2 Indirect immunofluorescence.....17

Figure 2.1 Protocol of COM-IND-ELISA.....42

Figure 2.2 Protocol for detection of associative bacteria.....48

Figure 3.1 Growth curves of Klebsiella R15, R17 and Azospirillum R25.....50

Figure 3.2 Correlation between colony forming unit and optical density.....51

Figure 3.3 Growth pattern of R15, R17 and R25 in NF-medium containing various concentrations of NaCl.....55

Figure 3.4 Growth pattern of R15, R17 and R25 in RM-medium containing various concentrations of NaCl.....56

Figure 3.5 Immunization scheme and antisera titer aganist R15, R17 and R25.....57

Figure 3.6 Fluorescent micrographs of R15, R17 and R25 in various concentrations of NaCl.....59

Figure 3.7 Optinum dilution of anti-R15 for IND-ELISA.....71

Page

Figure 3.8 Optinum dilution of anti-R17 for IND-ELISA.....72

Figure 3.9 Optinum dilution of anti-R25 for IND-ELISA.....73

Figure 3.10 Optimum dilution of FITC-conjugated goat antirabbit globulin for IND-ELISA....75

Figure 3.11 Optinum incubation time of the first antibody for IND-ELISA.....76

Figure 3.12 Saturation of the binding of anti-R15, R17 and R25 to the coated antigens.....77

Figure 3.13 Optimun incubation time of the second antibody for IND-ELISA.....79

Figure 3.14 Saturation of the binding between FITC conjugated goat antirabbit globulin and the first antibodies.....80

Figure 3.15 Optimum incubation time with the substrate for enzymatic reaction.....81

Figure 3.16 Standard curves for determination of R15, R17 and R25 by COM-IND-ELISA.....84

Figure 3.17 Cross reaction of related strain with anti-R15, R17 and R25 by COM-IND-ELISA.....90

Page

Figure 3.18 Comparision of growth character by optical density, plate-count method, and COM-IND-ELISA for R15, R17 and R25....98

Figure 3.19 Standard curves for determination of associative R15, R17 and R25 by COM-IND-ELISA.....100

Figure 3.20 Increasing of colonization potential, N_2-fixing potential and plant vigor index for the associative R15, R17 and R25 in rice RD7 variety.....101

Figure 3.21 Effect of R15, R17 and R25 associated to various varieties of rice (at day 12 after inoculum) on the colonization potential, N_2-fixing potential and plant vigor index.....107

ABBREVIATION

ARA	Acetylene reduction activity
°C	Degree celcius
COM-IND-ELISA	Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay
cfu	Colony-forming unit
cv.	Cultivar
d	Day
dil	Dilution
FITC	Fluorescence isothiocyanate
IND-FA	Indirect fluorescent antibody
h	Hour
l	Litre
µg	Microgram (10^{-6} gram)
mg	Milligram (10^{-3} gram)
min	Minute
µl	Microlitre (10^{-6} liter)
M	Molar
NaCl	Sodium chloride
NF	Nitrogen-free medium
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
PGP	Plant growth promotion

RM	Rich medium
µg	Microgram
µl	Microlitre
wt	weight