การถ่ายยีน *VP1* ที่สร้างโปรตีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่แคลลัสของถั่วฮามาต้า โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCABVP1 เป็นพาหะ พลาสมิด pCABVP1 นี้ประกอบด้วยยีน *VP1* และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก และยีนทั้งสองนี้มีโปรโมเตอร์ CaMV35S โดยในการถ่ายยีนใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งมีค่า OD_{600} ในช่วง 0.6-1.0 และระยะเวลา co-cultivation 2 วัน ถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสถั่วฮามาต้าที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนของ hypocotyl โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร pH 5.7 พบว่าจากจำนวนแคลลัสที่ถ่ายยีนทั้งหมด 2,200 ชิ้น ได้แคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 131 ชิ้น จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำยอดจำนวน 300 ยอดมาชักนำให้ออกรากแล้วนำตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* และยีน *hpt* ด้วยวิธี PCR พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *VP1* อย่างเดียวจำนวน 93 ต้น และยีน *hpt* อย่างเดียวจำนวน 97 ต้น และต้นที่พบทั้ง 2 ยีนจำนวน 75 ต้น เมื่อนำต้นที่ตรวจพบยีนไปยืนยันผลด้วยวิธี dot blot hybridization จำนวน 50 ต้นพบว่าทุกต้นยีน *VP1* อยู่ จากนั้นตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *VP1* ที่ถูกถ่ายยีนเข้าไปในถั่วฮามาต้าด้วยวิธี Southern blot ซึ่งจากการทดสอบจำนวน 6 ต้น พบว่าบางต้นมีการสอดแทรกของยีน *VP1* ในจีโนมของถั่วฮามาต้า 1 ตำแหน่งแต่บางต้นมี 2 ตำแหน่ง เมื่อนำต้นที่ผ่านการตรวจสอบโดยวิธี Southern blot แล้วมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR จำนวน 2 ต้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *VP1* ในทั้ง 2 ต้น และเมื่อนำ 2 ต้นที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี western blot โดยใช้ซีรั่มของหมูที่ติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยพบว่ามี 1 ต้นที่มีการแสดงออกของโปรตีน VP1

183629

The *VP1* gene which encodes protein that can induce immunity against the foot and mouth disease virus (FMDV) was transferred to *Stylosanthes hamata* calli via *Agrobacterium* -mediated transformation. The *A. tumefaciens* strain AGL1 possessed plasmid pCABVP1 which contained the *VP1* gene and a selectable marker gene, *hpt*. An *Agrobacterium* suspension at OD_{600} in the range of 0.6-1.0 and a co-cultivation period of 2 days was employed. Only 131 out of 2,200 calli survived in the MS selective medium containing 5 mg/l 2,4-D, 30 mg/l sucrose and 8mg/l agar at pH 5.7 and supplemented with 50 mg/l hygromycin. Surviving calli were regenerated on MS medium containing 15 mg/l BA and rooted on MS medium supplemented with 1mg/l IBA. Of all 300 regenerated plantlets, 93 lines showed PCR positive for only the *VP1* gene, 97 lines showed PCR positive only for the *hpt* gene, while another 75 lines showed positive for both genes. Six lines that showed PCR positive for both, the *VP1* and *hpt* genes, were subjected to Southern blot analysis to confirm the integration of the *VP1* transgene. In some lines, a single copy of the *VP1* gene was found to be inserted into the *S. hamata* genome, however, two copies of the *VP1* gene were also found in the other lines. Two out of six Southern blot positive lines were then subjected to an analysis for the transcription of the *VP1* gene using RT-PCR techniques, and the subsequent result showed positive. In addition the *VP1* protein was detected in these 2 positive lines, using western blot analysis with serum from a FMDV infected pig. Only one line showed the correct expression of the *VP1* gene.