

การถ่ายยีน VP1 จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่ถั่วฮามาต้า

Transformation of VP1 Gene from Foot and Mouth Disease Virus into *Stylosanthes hamata*

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease, FMD) เป็นโรคติดต่อไวรัสที่มีความรุนแรง ถูกจัดเป็นโรคระบาดที่สร้างความเสียหายอย่างมากต่อสัตว์ปีกคู่ เช่น โค กระบือ สุกร แพะ แกะ และควาย เชื้อไวรัสนี้สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง สร้างความเสียหายร้ายแรงต่อเกษตรกรและประเทศชาติ ผลกระทบที่เกิดจากโรคนี้ทำให้สัตว์มีน้ำนมลดลง เจริญเติบโตช้า และอ่อนแอ โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ โดยประเทศผู้ซื้อจะตั้งเงื่อนไขในการไม่รับซื้อหากประเทศที่ส่งออกนั้นมีรายงานการเกิดโรค สาเหตุของโรคปากและเท้าเปื่อยเกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Picornavirus ที่มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก ซึ่งไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคมีอยู่หลายชนิดและหลายสายพันธุ์ จากการจัดจำแนกเชื้อทางเทคนิคอิมมูโนวิทยา ปัจจุบันพบ 7 ซีโรไทป์ (serotype) คือซีโรไทป์ A O C SAT1 SAT2 SAT3 และ Asia1 (Murphy *et al.*, 1999) สำหรับในประเทศไทยพบอยู่ 3 ซีโรไทป์ คือซีโรไทป์ A O และ Asia1 ส่วนชนิดที่เป็นสาเหตุของการระบาดในประเทศอังกฤษในช่วงต้นปี พ.ศ.2544 ที่ผ่านมาคือซีโรไทป์ O เชื้อไวรัสแต่ละชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคปากและเท้าเปื่อยนั้นจะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคซึ่งกันและกันได้ ดังนั้นสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคเฉพาะซีโรไทป์ O จะยังสามารถติดโรคที่เกิดจากเชื้อซีโรไทป์ A และ Asia1 ได้ ปัจจุบันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสไม่มียารักษาที่มีผลต่อไวรัสโดยตรง การป้องกันที่สำคัญคือการฉีดวัคซีน (ปรีดา, 2543) โดยมีรายงานการผลิต peptide vaccine ของโรคปากและเท้าเปื่อยที่ประกอบด้วยส่วนของโปรตีน VP1 ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้านได้ดี (Brown, 1992)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการพัฒนาการผลิตวัคซีนมากขึ้น และมีความพยายามในการใช้พืชเป็นพาหนะในการแสดงออกของโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น และประสบความสำเร็จในพืชตัดแต่งพันธุกรรมหลายชนิดที่ผลิตโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น โปรตีนจากเชื้อไวรัส โปรตีนที่เป็นสารพิษ (toxin) จากเชื้อแบคทีเรีย และแอนติบอดีหลายชนิด (Daniell *et al.*, 2001) และมีการใช้พืชเป็นแหล่งผลิต biopharmaceutical protein อีกหลายชนิดเนื่องจาก

วิธีนี้มีข้อดีคือ การถ่ายยีนในพืชทำได้ไม่ยากนักทั้งการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ และวิธี particle bombardment และพืชยังเป็นแหล่งผลิต recombinant protein ที่มีต้นทุนถูกกว่าในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากพืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย การเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก ทำให้ผลิต recombinant protein ได้ปริมาณมากและต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการผลิต edible vaccine โดยใช้เซลล์พืชซึ่งไม่จำเป็นต้องแยกสกัดวัคซีนออกจากเซลล์เหมือนการผลิตในเซลล์แบคทีเรียหรือในเซลล์สัตว์ และ edible vaccine จากพืชยังสามารถเก็บรักษาง่ายโดยเก็บในรูปของเนื้อเยื่อพืช เช่น หัว และเมล็ด เป็นต้น นอกจากนี้ edible vaccine จากพืชยังมีข้อดีคือ ไม่มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์เนื่องจากเชื้อโรคของสัตว์ไม่สามารถติดต่อผ่านทางพืชได้ ดังนั้นพืชจึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ทดลองในการถ่ายยีนที่สังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง VP1 เพื่อใช้ในการผลิต edible vaccine ป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีความปลอดภัยสูง (Brown, 1992) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชอาหารสัตว์ให้มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) ซึ่งนอกจากเป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสามารถใช้เป็นอาหารหลักหรือพืชอาหารหยาบที่มีราคาถูกและไม่ทำให้โค

กระป๋องท้องอืดเหมือนกับถั่วที่เป็นพืชอาหารสัตว์บางชนิดแล้วยังเป็นพืชที่ปรับตัวได้ดีในสภาพแห้งแล้ง ทนต่อการแทะเล็มของปศุสัตว์ เช่น โค กระบือ (วรรณกรณ์, 2529; สายัณห์, 2540) จึงเหมาะที่จะนำมาสร้างเป็นพืชที่เป็น edible vaccine สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน VP1 จากเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย (FMDV) เข้าสู่ถั่วฮามาต้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างพืชอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งผลิตโปรตีนที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคปากและเท้าเปื่อยของสัตว์ โดยการนำส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน VP1 ต่อเข้ากับพาหะ (vector) ที่สามารถแสดงออกได้ในพืช ถ่ายเข้าสู่พืชโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะในการถ่ายยีน และคัดเลือกต้นที่ได้รับยีนในอาหารคัดเลือก ตรวจสอบการมีอยู่และการแสดงออกของยีน เพื่อให้ได้พืชที่มีการสร้างโปรตีน VP1 ที่จะนำไปพัฒนาเป็น edible vaccine เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคปากเท้าเปื่อย ซึ่งจะต้องมีการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ ก่อนที่จะนำไปใช้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. พัฒนารูปแบบการถ่ายยีน *VP1* จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่ถั่วฮามาต้า โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะสำหรับการถ่ายยีน และคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน พร้อมทั้งชักนำเนื้อเยื่อให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

2. ศึกษาการคงอยู่ของยีน *VP1* ในถั่วฮามาต้า โดยใช้เทคนิค PCR และ Southern blot hybridization และตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR และ western blot hybridization

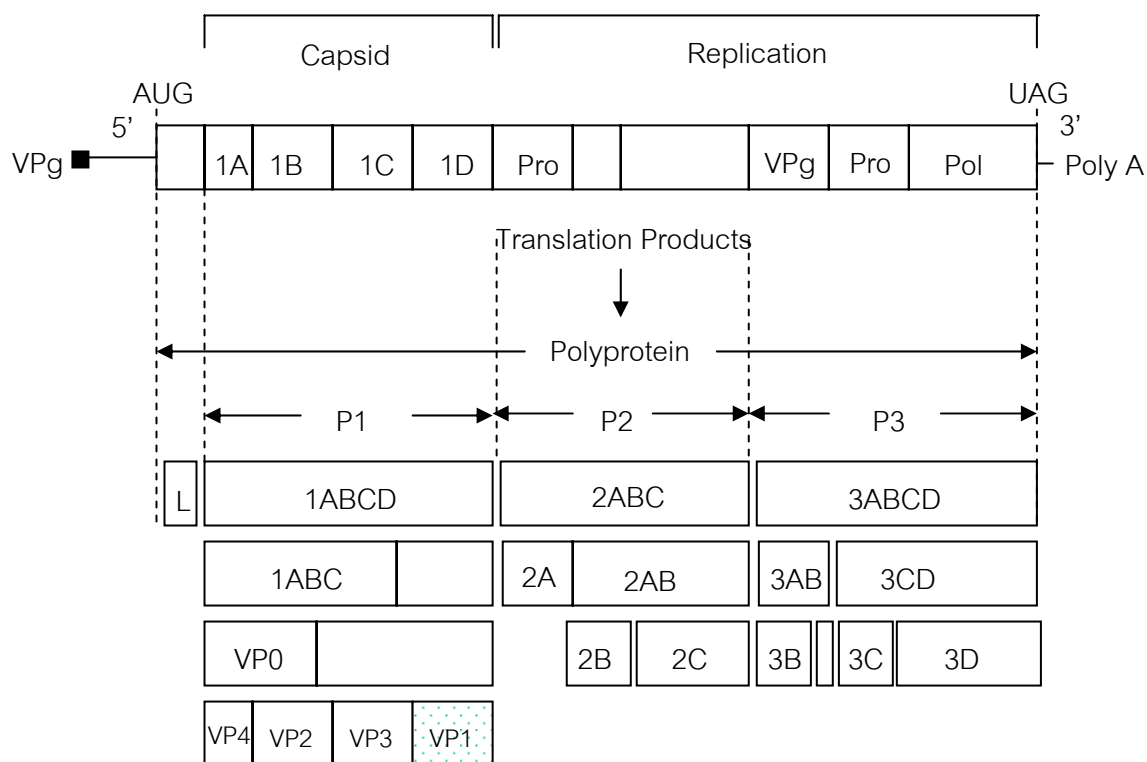
การตรวจเอกสาร

1. ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ในหลายประเทศทั่วโลกมีการตรวจพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease Virus; FMDV) เชื้อ FMDV นี้ จัดอยู่ในวงศ์ Picornaviridae และ สกุล Aphovirus เป็นไวรัสที่ไม่มี envelope อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 27-30 นาโนเมตร ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่พบว่ามี การระบาดในหลายประเทศทั่วโลกมี 7 ซีโรไทป์ ซึ่งซีโรไทป์ A พบในประเทศไทยเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2496 ส่วนซีโรไทป์ Asia1 และ O พบในปี พ.ศ. 2497 และ พ.ศ. 2500 ตามลำดับ (Chaisrisongkram, 1993)

1.1 การจัดเรียงตัวของจีโนมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (genomic organization)

จีโนมของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นอาร์เอ็นเอสายบวกสายเดี่ยว มีขนาดประมาณ 8,500 เบสซึ่งมีหน้าที่เป็น mRNA โดยตรง มีการจำลองตัว (replication) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ อาร์เอ็นเอของไวรัสจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนสายยาวสายเดี่ยวขนาดประมาณ 25,000 ดัลตัน ซึ่งต่อมาโปรตีนนี้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ proteinase ที่มาจากตัวไวรัสเอง และบางส่วนจากเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยโปรตีนสายยาว (polyprotein) จะถูกตัดเป็นส่วน ๆ โดยมีการเรียงตัวของโปรตีนจาก L - P1 - P2 - P3 ซึ่งเรียกเป็น primary cleavage products (ภาพที่ 1) และแต่ละส่วนจะถูกตัดย่อยออกเป็น secondary cleavage products ซึ่งมีหน้าที่ต่าง ๆ กัน (Poster, 1993; Strebel *et al.*, 1986) ทั้งนี้อนุภาคของไวรัสประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein หรือ capsid) ตั้งแต่ VP1-VP4 ซึ่งโครงสร้างของโปรตีน VP1 และ VP3 มีความสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์สำหรับการป้องกันการติดเชื้อ (Saiz *et al.*, 1992)



ภาพที่ 1 ตำแหน่งการเรียงตัวของยีนและโปรตีนในไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ที่มา : Alan (1997)

นอกจากนี้ในจีโนมของไวรัสสามารถแบ่งเป็นส่วนดังนี้

- 1.1.1 บริเวณ 5' untranslated region (UTR)
- 1.1.2 บริเวณ single open reading frame (ORF)
- 1.1.3 บริเวณ structural proteins
- 1.1.4 บริเวณ nonstructural proteins

1.1.1 บริเวณ 5' untranslated region (UTR)

บริเวณนี้มีความยาวประมาณ 1200 นิวคลีโอไทด์ ประกอบไปด้วย บริเวณที่ encode ให้โปรตีน VPg ที่ปลาย 5' (ภาพที่ 1) บริเวณโครงสร้าง S-fragment poly C pseudoknot (PKs) cis acting replication elements (cre) และตำแหน่งที่จดจำได้ของ ไรโบโซม internal ribosome entry site (IRES) และจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (AUG) 2 ตำแหน่ง (Monson *et al.*, 2002) (ภาพที่ 2)

1.1.1.1 บริเวณที่ encode ให้โปรตีน VPg ที่ปลาย 5'

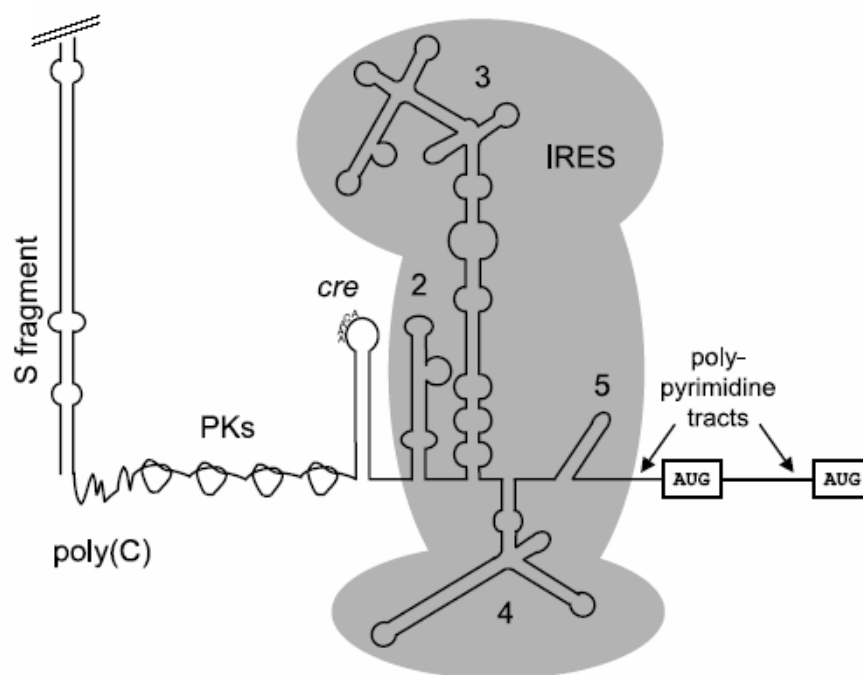
ที่ปลาย 5' ของจีโนมไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นจีโนมอาร์เอ็นเอที่ไม่มีส่วนของ 7-methyl-G cap ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญเกี่ยวข้องกับการแปลรหัสของ mRNA แต่มีอาร์เอ็นเอที่ encode ให้โปรตีน VPg อยู่บริเวณปลาย 5' มีความเกี่ยวข้องกับการเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอ และพบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์แบบเดียวกันนี้พบบริเวณที่ encode ให้โปรตีน 3B และพบว่ามี 3 ซ้ำในไวรัสปากและเท้าเปื่อย และมีความจำเพาะสูง ซึ่งจำนวนซ้ำมีผลต่อความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อและความหลากหลายของเซลล์เจ้าบ้านที่เข้าทำลาย (Saiz *et al.*, 2002)

1.1.1.2 บริเวณโครงสร้าง S-fragment poly C pseudoknot และ cis acting replication elements (cre)

เป็นบริเวณที่ถัดมาจากข้อ 1.1.1.1 ซึ่งอยู่ด้าน 5' untranslated region (UTR) ของไวรัสปากและเท้าเปื่อยยาวประมาณ 1,300 เบส ซึ่งในบริเวณนี้ประกอบไปด้วย S-fragment ที่มีขนาดประมาณ 360 เบส และมีโครงสร้างเป็น stem loop (ภาพที่ 2) การที่มีโครงสร้างของอาร์เอ็นเอโค้งจับกันเป็น loop ช่วยในการป้องกันการถูกทำลายด้วย exonuclease ต่อจากนั้นประมาณ 500 เบส จะพบลำดับเบสที่เป็น polycytidylic acid (poly C) เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรค และ pseudoknots (PKs) เป็นโครงสร้าง hairpin loop บริเวณนี้มีลักษณะเป็น tandemly repeat อยู่บริเวณเดียวกับ cis acting replication elements (cre) ซึ่งมีลักษณะเป็น stem loop ซึ่งมีลำดับเบสซ้ำ AAACA ส่วน cre ที่อยู่ใน loop เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเอง (replication) ซึ่งถ้าเกิดการกลาย (mutation) ของนิวคลีโอไทด์ที่ลำดับดังกล่าว จะทำให้ความสามารถในการจำลองตัว ลดลง แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัส (Monson *et al.*, 2002) บริเวณทั้งหมดข้างต้นนี้มีบทบาทในการจำลองตัวเองของจีโนมไวรัส

1.1.1.3 บริเวณ Internal ribosome entry site (IRES)

เป็นบริเวณที่อยู่ถัดมาจากข้อ 1.1.1.2 (ภาพที่ 2) จีโนมของไวรัสปากเท้าเปื่อยไม่มี 7-methyl-G cap ที่บริเวณ 5' ที่ตำแหน่งเริ่มต้นของการแปลรหัส ดังนั้นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสของไวรัสปากเท้าเปื่อยจึงเริ่มต้นที่บริเวณไรโบโซมเข้ามาเกาะ (IRES) ของไวรัสปากเท้าเปื่อยซึ่งอยู่ต่อจาก cis acting replication elements (cre) บริเวณ IRES นี้มีความยาวประมาณ 450 นิวคลีโอไทด์ ส่วนบริเวณที่ถัดจาก IRES ออกมาทางด้าน 3' พบว่าเป็นบริเวณที่มีไพริมิดีนมาก (polypyrimidine tracts) และต่อจากนั้นเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (AUG) อีก 2 ตำแหน่ง และมีความสำคัญในการจับกับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน (Monsan *et al.*, 2002)



ภาพที่ 2 บริเวณ 5' untranslated region (UTR) ที่ไม่ได้ถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วย S fragment , poly C, pseudonot (PKs), cis acting replicative element (cre), internal ribosome entry site (IRES)

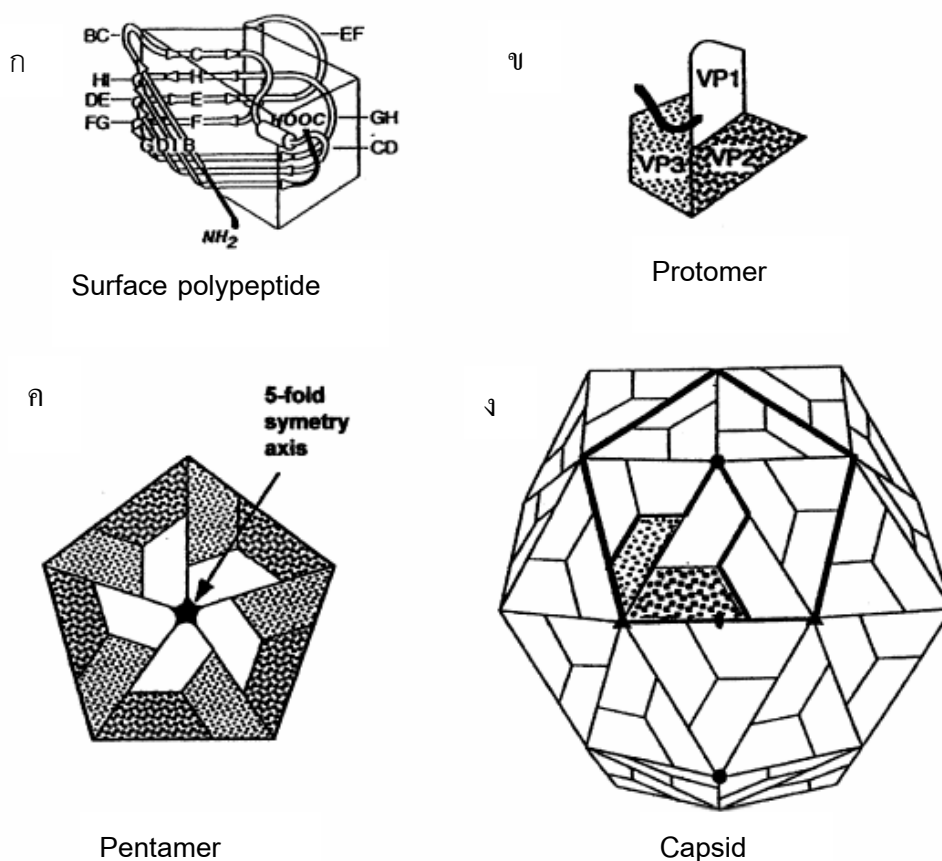
ที่มา: Monsan *et al.* (2002)

1.1.2. บริเวณที่ encode ให้ Leader proteinase

บริเวณที่อยู่ถัดมาจากบริเวณ 5' untranslated region (UTR) ซึ่ง encode ให้โปรตีน L ถูกสร้างขึ้นบริเวณ 5' ของ ORF (ภาพที่ 1) ซึ่งมีจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสอยู่ 2 จุด ทำให้ได้โปรตีน Lab และ Lb ซึ่งโปรตีน L ทำหน้าที่เป็น proteinase ตัดตัวเองออกจากสาย โพลีเพปไทด์ทางด้าน 5' ของโปรตีนห่อหุ้ม และทำหน้าที่เป็น trans proteinase ไปหยุดการทำงานของ host translation initiation factor eIF4G ของเซลล์เจ้าบ้านทำให้เซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถแปลรหัสได้ นอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีน L เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อ และการแพร่กระจายของโรคเข้าสู่สัตว์ (Monsan *et al.*, 2002)

1.1.3. บริเวณที่แปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins)

บริเวณที่ติดกับ 5' untranslated region (UTR) ซึ่งอาร์เอ็นเอส่วนนี้เมื่อแปลรหัสจะได้เป็นโปรตีนโครงสร้างประกอบด้วยโปรตีน VP1 VP2 VP3 และ VP4 มารวมตัวกัน โดย VP1-VP3 เป็นผิวด้านนอก และ VP4 อยู่ด้านในรวมเป็น protomer (ภาพที่ 3ข) และ 5 protomer มาเรียงตัวกันเป็น pentamer (ภาพที่ 3ค) จากนั้น 12 pentamer มารวมตัวกันเป็นโปรตีนเปลือกหุ้ม (capsid) (ภาพที่ 3ง) โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสปากและเท้าเปื่อยมีลักษณะผิวเรียบ และมี G-H loop (ภาพที่ 3ก) ซึ่งเป็นลักษณะโปรตีน VP1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 residues ระหว่างตำแหน่งที่ 140-160 เป็นบริเวณ antigenic site ที่จะถูกจดจำได้ด้วยแอนติบอดี (Saiz *et al.*, 2002)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสปากและเท้าเปื่อย

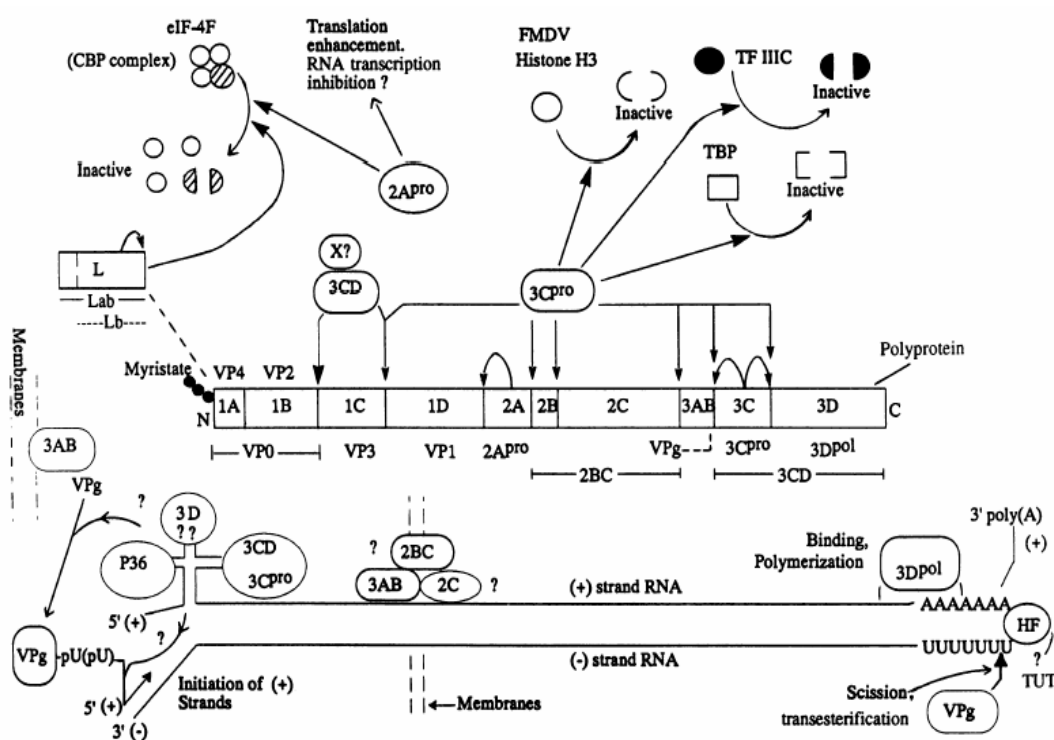
(ก) โครงสร้างสามมิติ wedge-shaped ของโปรตีน VP1 VP2 และ VP3 (ข) การเรียงตัวของ VP1-VP3 ในโปรโตเมอร์ (ค) การเรียงตัวของ 5 protomer เพื่อประกอบขึ้นเป็น 1 pentamer (ง) โครงสร้างของเปลือกหุ้ม ซึ่งประกอบด้วย การรวมกันของ protomer เป็น pentamer และ pentamer รวมเป็นเปลือกหุ้ม (capsid)

ที่มา: Saiz *et al.* (2002)

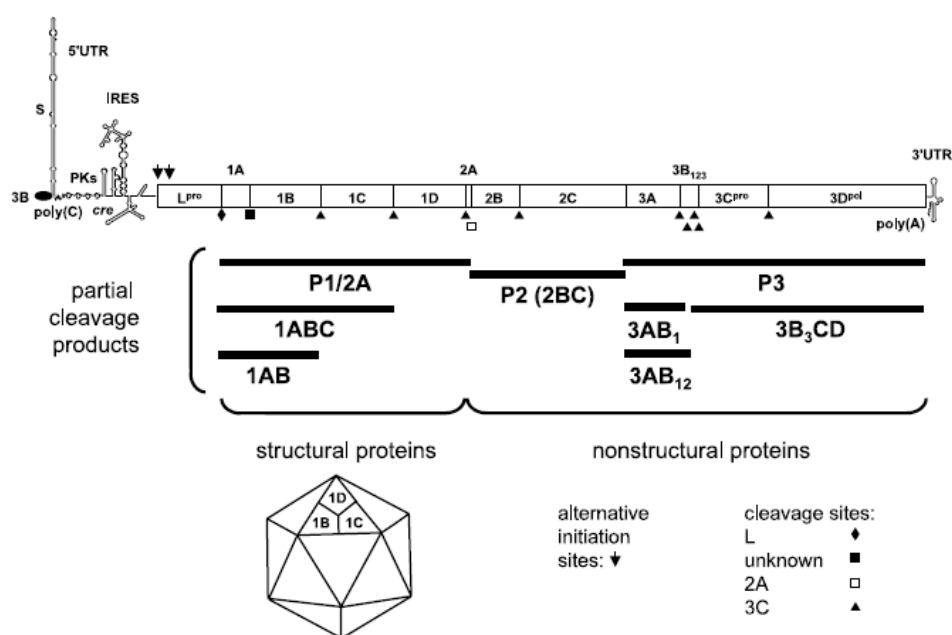
1.1.4. บริเวณ nonstructural proteins

บริเวณ nonstructural protein เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัสปากและเท้าเปื่อย ได้มาจากบริเวณ polypeptide P2 และ P3 โดยโปรตีน 2A 2B และ 2C ได้มาจากส่วนของ polypeptide P2 และโปรตีน 2A ทำหน้าที่เป็น proteinase ในการตัดบริเวณ P1 ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนโครงสร้างให้หลุดออกจาก polypeptide ในการตัดครั้งแรก (primary

cleavage) ส่วนโปรตีน 2B ทำหน้าที่ใช้ในการตรวจสอบโปรตีนที่จะผ่านเข้าออกเมมเบรน ทั้ง 2B และ 2C จำกัดอยู่บริเวณผิวด้านนอกของ endoplasmic reticulum ของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งเป็นบริเวณที่มีการจำลองตัวเองของจีโนม บริเวณ P3 ประกอบไปด้วยโปรตีน 3A 3B 3C และ 3D ในไวรัสปากและเท้าเปื่อยมีโปรตีน 3A ยาวกว่าใน picornavirus กลุ่มอื่นๆ ส่วนโปรตีน 3B มีความเหมือนกับโปรตีน VPg ที่อยู่บริเวณด้าน 5' ของจีโนม แต่ VPg มีบทบาทต่อการเริ่มต้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โดยที่ VPg-pU ทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โปรตีน 3C เป็น proteinase ซึ่งทำหน้าที่ตัด polypeptide ได้ถึง 10 ตำแหน่ง และสามารถตัดโปรตีนบางตัวของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งทำให้เซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถแปรรหัสได้ โปรตีน 3D ทำหน้าที่เป็น RNA polymerase (ภาพที่ 4 และ 5)



ภาพที่ 4 nonstructural protein ของไวรัสกลุ่ม piconavirus และบางโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านในการจำลองตัวเอง และการยับยั้งหน้าที่ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ที่มา: Poster (1993)



ภาพที่ 5 จีโนมของไวรัสปากและเท้าเปื่อย แสดงส่วนที่ encode สำหรับ structural protein และ nonstructural protein

ที่มา: Monsan *et al.* (2002)

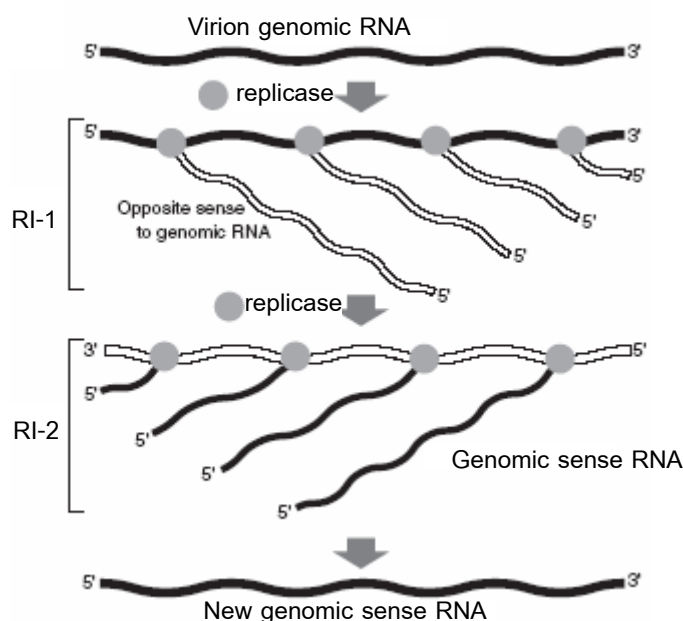
1.1.5. บริเวณ 3' untranslated region

บริเวณปลาย 3' ของจีโนมไวรัสในกลุ่ม piconavirus ประกอบด้วย poly A (ภาพที่ 4) เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับ post transcription หลาย ๆ กระบวนการและมีบทบาทในการจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอของไวรัสปากและเท้าเปื่อย

1.2. การจำลองตัวเองของไวรัส (viral replication)

การจำลองตัว (replication) ของไวรัสปากและเท้าเปื่อยเกิดในไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ อาร์เอ็นเอของไวรัสจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนสายยาวสายเดียวขนาดประมาณ 25,000 ดัลตัน การจำลองตัวเองของจีโนมอาร์เอ็นเอสายบวกสายเดียวมี 2 ขั้นตอน ดังภาพที่ 6 เริ่มจากการลอกรหัสของสายอาร์เอ็นเอ ได้อาร์เอ็นเอสายใหม่ที่ complementary กับสายเดิม (opposite polarity) ซึ่งการจำลองตัวเองนี้เกิดต่อเนื่องกันไป โดยอาศัยการทำงานของ viral transcriptase (replicase) ดังนั้นอาร์เอ็นเอที่ได้ใน replicative intermediate I (RI-1) จะ

เป็น antisense ของจีโนมอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะใช้เป็นแม่แบบสำหรับการจำลองตัวเองในรอบต่อไป (RI-2) หลังจากที่มีการจำลองตัวใน RI-2 จะทำให้ได้อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เหมือนกับเส้นเริ่มต้น (sense strand) การจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอที่มีอาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบ (RNA directed RNA synthesis) มีโอกาสที่จะเกิดการผิดพลาดได้มากประมาณ 1 ต่อ 10^5 ในขณะที่ DNA directed DNA synthesis มีโอกาสผิดพลาด 1 ต่อ 10^7 - 10^9 ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าไม่มี proofreading สำหรับอาร์เอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นมา (Wagner and Hewlett, 2004)



ภาพที่ 6 การจำลองตัว (replication) โดยใช้ RNA directed RNA ในการถอดรหัส การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอเส้นใหม่จะมีทิศทาง 5' ไป 3' เสมอ สายอาร์เอ็นเอที่ได้ใน replicative intermediate I (RI-1) จะเป็น antisense ให้เป็นแม่แบบสำหรับการจำลองตัวเองใน RI-2 หลังจากที่มีการจำลองตัวเองใน RI-2 จะทำให้ได้อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เหมือนกับเส้นเริ่มต้น (sense strand)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wagner and Hewlett (2004)

2. การป้องกันและรักษาโรคปากและเท้าเปื่อย

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มียาที่สามารถรักษาได้โดยตรง การป้องกันการติดเชื้อเป็นวิธีการที่ปฏิบัติโดยทั่วไปเพื่อหลีกเลี่ยงจากการได้รับเชื้อ วิธีการป้องกันที่นิยมใช้มากคือการฉีดวัคซีน และการแยกและทำลายสัตว์ที่ติดเชื้อ (Gebauer *et al.*, 1988) ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้ในโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย (inactivated vaccine) ร่วมกับ oil adjuvant วัคซีนชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดี ทำให้สัตว์ที่ได้รับวัคซีนมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส FMD นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการผลิต peptide vaccine ซึ่งจัดเป็นวัคซีนที่มีความปลอดภัยสูง ซึ่งวัคซีนดังกล่าวประกอบไปด้วยส่วนของโปรตีน VP1 ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้านได้ดีเท่านั้น (Brown, 1992) และนอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะใช้พืชเป็นแหล่งผลิตโปรตีน VP1 เพื่อใช้พืชเป็น edible vaccine (Santos *et al.*, 2002) ซึ่ง edible vaccine นี้เมื่อสัตว์กินเข้าไปจะสามารถใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ได้ ทำให้ลดต้นทุนในการผลิตและเป็นการลดขั้นตอนการทำวัคซีนให้กับสัตว์ ซึ่งแต่เดิมใช้วิธีการฉีดวัคซีนเข้าไปในร่างกายสัตว์ และยังช่วยลดความเสี่ยงที่จะเกิดจากการติดเชื้อเนื่องจากการใช้วัคซีนแบบเดิมอีกด้วย

3. Edible vaccine

ปัจจุบันได้มีความพยายามในการใช้พืชเป็นพาหะในการแสดงออกของโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม ประโยชน์ของการสร้างโปรตีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันในพืชคือ มีความปลอดภัยเนื่องจากเชื้อโรคของสัตว์ไม่สามารถติดผ่านทางพืชได้ และต้นทุนการผลิตถูกกว่าในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Daniell *et al.*, 2001) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตโปรตีนหลายชนิดได้สำเร็จในพืช ได้แก่ การผลิตแอนติบอดีหลายชนิด (During *et al.*, 1990) การแสดงออกทางด้าน immunogens โดยโปรตีนที่ผลิตจากพืช (Mason *et al.*, 1992) ต่อมา มีรายงานโปรตีนจากเชื้อไวรัสโดยพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Thanvala *et al.*, 1995) การผลิตโปรตีนที่เป็นสารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย (bacterial toxins) (Haq *et al.*, 1995) หลังจากนั้นได้มีนักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ กลุ่มใช้พืชเพื่อศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจากไวรัสและแบคทีเรีย (Arakawa *et al.*, 1998; Carrillo *et al.*, 2001)

ในส่วนของยีน *VP1* ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนี้ พบว่ามีการทดลองผลิตโปรตีน *VP1* ในพืชหลายชนิด เช่น *Arabidopsis* อัลฟัลฟา และมันฝรั่ง ซึ่งโปรตีนเหล่านี้สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงได้ (Santos *et al.*, 2002; Carrillo *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามที่ผ่านมาพืชได้รับการถ่ายยีนเพื่อให้สามารถสร้างโปรตีน *VP1* นั้นยังไม่มีพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ที่เหมาะสมสำหรับเขตร้อน ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยเพื่อถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน *VP1* เข้าสู่พืชอาหารสัตว์ที่มีการส่งเสริมให้ปลูกสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น ถั่วฮามาต้า และหญ้ารูซี่

4. ถั่วฮามาต้า

ถั่วฮามาต้าเป็นพืชอาหารสัตว์ที่กรมปศุสัตว์ส่งเสริมให้ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย ซึ่งถั่วชนิดนี้มีข้อดีคือเป็นพืชที่ให้โปรตีนสูง และไม่ทำให้สัตว์ท้องอืดเหมือนถั่วชนิดอื่น สามารถปลูกได้ง่ายและทนต่อสภาพแล้งได้ดี นอกจากนี้ยังเป็นพืชผสมตัวเองซึ่งหลังจากการถ่ายยีน *VP1* เข้าไปแล้วสามารถสร้างพืชที่เป็นพันธุ์แท้ได้ง่ายกว่าพืชผสมข้าม

ถั่วฮามาต้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stylosanthes hamata* จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae เป็นถั่วพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหาร มีถิ่นกำเนิดอยู่ในหมู่เกาะอินเดียตะวันตก และอเมริกากลาง มีการนำเข้ามาในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2514 เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค และกระบือ โดยการปล่อยให้สัตว์เข้าแทะเล็มที่เรียกว่า pasture crops หรือใช้โดยการเก็บเกี่ยวมาให้สัตว์กิน (forage crops) ถั่วฮามาต้าจัดเป็นพืชอายุ 1-2 ปี และเป็นพืชผสมตัวเองตามธรรมชาติ ลำต้นของถั่วฮามาต้าเป็นลำต้นตั้งตรงมีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน มีขนาดเล็ก ผิวเกลี้ยงมีขนเล็กน้อย และเมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีกิ่งก้านแผ่ออกทางด้านข้าง (prostrate) ประกอบไปด้วยใบและกิ่งเล็ก ๆ จำนวนมาก สูงประมาณ 60-100 เซนติเมตร กิ่งที่แตกจากแกนกลางมีการแตกกิ่งก้านแบบ sympodial branching type คือ กิ่งจะเจริญมาจากตาที่อยู่บริเวณซอกใบ เมื่อเจริญเติบโตได้ระยะหนึ่งจะมีการออกดอกที่ปลายยอด มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ต้านทานโรคและแมลง ทนทานต่อการแทะเล็มและเหยียบย่ำของสัตว์ได้ดี ปลูกขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ให้ผลผลิตน้ำหนักร้างประมาณ 1.5-2.0 ตันต่อไร่ต่อปี มีโปรตีนประมาณ 16-18 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะทั้งให้สัตว์แทะเล็มและเก็บเกี่ยวให้สัตว์กิน การนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์ จะตัดครั้งแรกเมื่อมีอายุ 60-70 วัน โดยตัดสูงจากพื้นดิน 10-15 เซนติเมตร แต่ถ้าปล่อยให้สัตว์เข้าแทะเล็ม จะปล่อยให้เข้าแทะเล็มครั้งแรกเมื่อหญ้ามีอายุ 70-80 วัน หลังจากนั้นจะสามารถตัดหรือปล่อยให้แทะเล็มทุก ๆ 30-45 วัน (สายัณห์, 2540) จาก

คุณสมบัติของตัวสามาต้าที่กล่าวแล้วนี้จึงเป็นพืชเหมาะที่จะนำมาใช้ในการสร้างพืชที่สามารถผลิตโปรตีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง

5. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชในปัจจุบันสามารถทำได้สำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้รองรับการถ่ายยีนนั้นมีความก้าวหน้ามาก ทำให้การสร้างพืชแปลงพันธุ์เพื่อให้มีลักษณะตามที่ต้องการทำได้กว้างขวางมากขึ้น (สุรินทร์, 2543) เทคนิคการถ่ายยีนในพืชมีหลายวิธีโดยแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

5.1 การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) ซึ่งเป็นวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยไม่มีพาหะเป็นตัวนำมีหลายวิธีการ เช่น

5.1.1 การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี เป็นการถ่ายยีนโดยผ่านโปรโตพลาสต์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากพืช แล้วนำไปบ่มรวมกับสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ โดยนิยมใช้สาร polyethylene glycol (PEG) ร่วมด้วย ซึ่ง PEG จะทำให้เยื่อหุ้มโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง ซึ่งมีโอกาสทำให้ดีเอ็นเอจากภายนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น (สุรินทร์ และคณะ, 2539)

5.1.2 การถ่ายยีนโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (electroporation) เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยการนำเนื้อเยื่อบ่มรวมกับสารละลายดีเอ็นเอ แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปทำให้เกิดช่องเปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ดีเอ็นเอสามารถแทรกผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ (สุรินทร์ และคณะ, 2539)

5.1.3 การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) นิยมใช้ในเซลล์สัตว์มากกว่าเซลล์พืช เนื่องจากเซลล์พืชมีเวกคิวโอลขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นที่เก็บเอนไซม์และสารพิษ การฉีดต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกเวกคิวโอล ข้อดีของวิธีนี้คือมีความเที่ยงตรงสูง แต่ข้อเสียคือเครื่องมือมีราคาแพง ซับซ้อนและต้องอาศัยความชำนาญในการปฏิบัติงานสูง จึงไม่ค่อยได้รับความนิยม (อารีย์, 2541)

5.1.4 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) เป็นการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยอาศัยหลักการให้แรงดันของก๊าซเฉื่อย เช่น ก๊าซฮีเลียม ขับดันอนุภาค

โลหะขนาดเล็กประมาณ 1 ไมครอน ซึ่งโดยทั่วไปใช้อณูภาคทั้งสเต็มหรือทองคำ อณูภาคเหล่านี้จะถูกเคลือบด้วยดีเอ็นเอ และขับเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงทะลุผ่านผนังเซลล์ของพืช ทำให้สามารถนำยีนเข้าสู่เซลล์ของพืชได้ การถ่ายยีนวิธีนี้นิยมกันมากเนื่องจากสามารถใช้ได้กับเนื้อเยื่อพืชทั้งใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว แต่มีข้อเสียคือเครื่องมือมีราคาแพงและมีความเที่ยงตรงต่ำ (สนธิชัย, 2543)

5.2 การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ

การถ่ายยีนให้กับเซลล์พืชโดยใช้พาหะนั้น พาหะที่นิยมใช้กันมากคือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เป็นสาเหตุของโรค crown gall โดยพืชอาศัยส่วนใหญ่ของเชื้อชนิดนี้เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ และปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาให้ใช้ได้กับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว *A. tumefaciens* สามารถจะถ่ายดีเอ็นเอที่เรียกว่า T-DNA ที่อยู่บนพลาสมิด Ti เข้าไปสอดแทรกอยู่บนโครโมโซมของพืชได้โดยอาศัยสารบางชนิดที่ผลิตจากยีน virulence (*vir*) ที่อยู่บนพลาสมิด Ti ช่วยในการส่งถ่ายยีน T-DNA เข้าสู่เซลล์ของพืช ดังนั้นถ้าสามารถสอดใส่ยีนที่ต้องการไปเข้าในบริเวณ T-DNA ได้ก็จะสามารถนำยีนนั้นเข้าสู่เซลล์พืช

ส่วนของ T-DNA มีขอบเขตที่กำหนดโดยลำดับซ้ำ 25 คู่เบส อยู่สองข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) โดยมีบริเวณกลุ่มของยีน *vir* ประกอบด้วยยีน *virA virB virC virD* และ *virE* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ส่วนยีน *chromosomal virulence (chv)* อยู่บนโครโมโซมของเชื้ออะโกรแบคทีเรียทำหน้าที่รวมกับกลุ่มยีน *vir* ในการควบคุมการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช เมื่อ T-DNA เข้าไปรวมอยู่ในโครโมโซมของพืชแล้ว ยีน *oncogenic (onc)* ซึ่งอยู่บน T-DNA สามารถแสดงออกได้สูงและทำให้ปริมาณฮอร์โมนในพืชเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้พืชแบ่งเซลล์แบบผิดปกติเกิดเป็นลักษณะปุ่มปม

ในเซลล์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียจะพบโปรตีน VirA และ VirD ทำงานเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบ phenolic ที่หลั่งมาจากบาดแผลพืช โดยทำให้เกิดขบวนการ autophosphorylation ของโปรตีน VirA ซึ่งมีผลทำให้โปรตีน VirG เกิดการ phosphorylation เช่นกัน ขบวนการดังกล่าวส่งผลให้เกิดการลอกรหัสของยีน *vir* ต่าง ๆ ออกมาอย่างรวดเร็ว การกระตุ้นของยีน *virD1* และ *virD2* ทำหน้าที่กระตุ้น endonuclease ที่จดจำตำแหน่งจำเพาะที่เป็นลำดับเบสขนาด 25 คู่เบส

บริเวณ LB และ RB ของ พลาสมิด Ti ซึ่งอยู่ปลายทั้งสองด้านของ T-DNA ทำให้เกิดการตัดได้เป็น T-DNA จากนั้นโปรตีน VirD2 เข้าจับที่ตำแหน่งปลาย 5' ของเส้น T-DNA สายเดี่ยว สารประกอบเชิงซ้อน VirE2/VirE1 เข้าจับรอบ ๆ เส้น T-DNA สายเดี่ยว และทำหน้าที่ป้องกันเส้น T-DNA ไม่ให้ถูกทำลายในระหว่างการส่งผ่านเข้าไปในไซโตพลาสซึมของพืช โปรตีน VirB ทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายช่องบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ T-DNA สายเดี่ยวที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีน ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ และอาจจะช่วยให้เกิดการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสพืช ส่วนกลไกการรวมตัวของ T-DNA ในโครโมโซมของเซลล์พืชนั้นยังไม่แน่ชัดแต่มีรายงานว่า โปรตีน VirE2 ทำหน้าที่คล้ายสัญญาณนำ T-DNA เข้าสู่นิวเคลียส และอาจก่อให้เกิดกระบวนการ recombination ระหว่าง T-DNA และโครโมโซมพืช โดยที่โปรตีน VirD2 ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์ไลเกส ดังนั้นถ้าใส่ยีนที่ต้องการเข้าไปบริเวณ T-DNA ก็จะสามารถนำยีนนั้นเข้าสู่เซลล์และเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืชได้ (Zupan *et al.*, 2000)

6. ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกและยีนรายงานผล (selectable marker gene and reporter gene)

ปัจจุบันการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนิยมถ่ายยีนคัดเลือก (selectable marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) เข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนที่ต้องการ ยีนคัดเลือกนี้ไม่ได้มุ่งที่จะใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์โดยตรง แต่ใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อเป็นตัวคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

6.1 ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene)

การเลือกใช้ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการถ่ายยีน เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนเครื่องหมายที่ควบคุมลักษณะเฉพาะบางประการ เช่น การต้านทานสารปฏิชีวนะ จะทำให้เซลล์ดังกล่าวเจริญเติบโตได้ในอาหารที่เติมสารคัดเลือก (selective agent) เช่น สารปฏิชีวนะชนิดที่สอดคล้องกับยีนนั้น ซึ่งจากการศึกษาด้านการถ่ายยีนที่ผ่านมาได้มีการทดลองใช้สารคัดเลือก และยีนที่ต้านทานต่อสารคัดเลือกต่าง ๆ หลายชนิดด้วยกัน ยีนเครื่องหมายและสารคัดเลือกที่นิยมใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่

6.1.1 ยีน *neomycin phosphotransferase (nptII)*

ยีน *neomycin phosphotransferase (nptII)* เป็นยีนที่ได้มาจาก *Escherichia coli* นี้เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) neomycin geneticin และ paramomycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside ที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้พืชไม่สามารถสร้างโปรตีนเพื่อนำมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ได้ จึงทำให้เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ตาย มีรายงานการนำกานามัยซินมาใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชหลายชนิด เช่น พืชเนื้อเยื่อ และยาสูบ (Fraley *et al.*, 1983; Bevan *et al.* 1983) นอกจากนี้การตอบสนองของพืชต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินจะขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนของพืช ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิดจะมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้สูง การใช้สารนี้จึงต้องใช้ในความเข้มข้นที่สูง เพื่อให้สามารถกำจัดเซลล์ปกติได้หมด เช่น พืชในวงศ์หญ้า (Gramineae) เซลล์ปกติจะตายหมดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกานามัยซินมากกว่า 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และข้าวจะใช้ที่ความเข้มข้นของกานามัยซินมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของกานามัยซินเพียง 35 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถฆ่าเนื้อเยื่อของ *Brassica napus* ได้หมด (Charest *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตามโดยส่วนใหญ่แล้วความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะอยู่ในช่วง 50-300 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่น การถ่ายยีนในยาสูบ ใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน (Horsch *et al.*, 1985)

6.1.2 ยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)*

ยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่ม aminoglycoside เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รา และเซลล์ยูคาริโอต โดยมีความสามารถในการยับยั้งโปรตีน เนื่องจากไฮโกรมัยซินจะไปขัดขวางการจดจำตำแหน่งของ aminoacyl tRNA และการเข้าเกาะที่ตำแหน่ง A-site ของ ribosome พืชโดยทั่วไปมักมีการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมากกว่ากานามัยซิน เช่น ในยาสูบ *Arabidopsis* ข้าวโพด ข้าว และพืชวงศ์หญ้าต่าง ๆ โดยทั่วไปแล้วพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Potrykus and

Spangenberg, 1995) อย่างไรก็ตามการเลือกใช้นิธินอาหารในการคัดเลือกก็มีผลต่อพืชด้วยเช่นกัน โดย Lin *et al.* (1999) พบว่าเมื่อใช้อาหารแข็งที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารคัดเลือก มีผลยับยั้งการพัฒนารากของต้นยาสูบ แต่ถ้าคัดเลือกโดยใช้อาหารเหลว พบว่าความเข้มข้นเพียง 25 มิลลิกรัมต่อลิตรก็สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ เนื่องจากขึ้นเนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารที่มีสารปฏิชีวนะทั้งขึ้นเนื้อเยื่อทำให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าในอาหารแข็งที่สัมผัสเพียงบางส่วน

6.2 ยีนรายงานผล (reporter gene)

ยีนรายงานผล (reporter gene) เป็นยีนที่นิยมใช้เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของการถ่ายยีนและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ยีนเหล่านี้ไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะด้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารคัดเลือกอื่น ๆ แต่เป็นยีนที่เมื่อแสดงออกในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วสามารถตรวจสอบได้ง่าย เช่น ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นแล้วได้สารสีต่าง ๆ หรือเรืองแสงได้เป็นต้น ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้แก่ ยีน *gus* หรือ *uid A* ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase (GUS) ได้มาจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K12 การแสดงออกของยีนนี้สามารถตรวจสอบได้ง่าย โดยเมื่อโปรตีน GUS ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นคือ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide ผลที่ได้จะแสดงในรูปสารสีน้ำเงิน (Jefferson *et al.*, 1987) ส่วนยีนที่สามารถตรวจสอบได้โดยการเรืองแสง เช่น ยีน *luc* ได้จากหิ่งห้อยสายพันธุ์ North America fire fly (*Photinus pyralis*) เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ luciferase สามารถทำการตรวจสอบได้ง่ายโดยนำเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับสาร luciferin แล้วตรวจสอบการแสดงออกในรูปสารเรืองแสง (Nilsson *et al.*, 1992) และยีน *gfp* เป็นยีนที่ได้จากแมงกะพรุน *Aequorea victoria* สร้างโปรตีน green fluorescent protein (GFP) ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ง่ายภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (Khan and Maliga, 1999)

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

7.1 สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium strain)

การเลือกสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีความสำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่าง ๆ เนื่องจากสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย มีความจำเพาะต่อชนิดพืช Byrne *et al.*

(1987) รายงานว่าอะโกรแบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่สามารถบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อแก้วเหลืองได้ เนื่องจากยีน *vir* มีความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการทำงานของยีนกลุ่มนี้ต้องอาศัยการกระตุ้นจากสารที่ปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของพืช แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มีระดับของความรุนแรงที่ต่างกัน เช่น สายพันธุ์ Ach5 ไม่สามารถชักนำการเกิดเนื้อเยื่อปุ่มปมได้ แต่สายพันธุ์ A281 สามารถชักนำการสร้างเนื้อเยื่อปุ่มปมได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และการทำงานของยีน *vir* นี้ต้องอาศัยการกระตุ้นจากสารที่ปลดปล่อยมาจากบาดแผลของพืช เช่น acetosyringone ซึ่งพืชปล่อยออกมาภายหลังเกิดบาดแผล (Godwin *et al.*, 1992)

7.2 เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการถ่ายยีน

เนื้อเยื่อพืชที่มีอายุต่างกันมีผลต่อการถ่ายยีนโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้แตกต่างกัน จากงานวิจัยของ Yamashita *et al.* (1991) พบว่าชนิดและอายุของเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนมีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งแบบชั่วคราวและในแบบถาวร เนื่องจากชนิดและอายุของเนื้อเยื่อพืชที่ต่างกันมีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกัน และ Pang and Sandford (1993) พบว่าเนื้อเยื่อใบมะละกอที่มีอายุมากกว่า 1 ปี จะมีอัตราการถ่ายยีนได้สูงกว่าเนื้อเยื่อที่มีอายุเพียง 40 วัน เนื่องจากเนื้อเยื่อที่มีอายุมาก เซลล์มีการจับตัวกันอย่างหลวม ๆ ทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมากกว่าเนื้อเยื่อที่มีการอัดตัวกันแน่นที่พบในใบที่มีอายุน้อย

7.3 วิธีการทำให้เกิดบาดแผลของเนื้อเยื่อเป้าหมาย

การทำให้เกิดบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมายมีผลต่อการบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เนื่องจากการเกิดบาดแผลทำให้พืชเกิดการขับสารประกอบที่จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้ยีน *Vir* ทำงาน และเป็นจุดที่ทำให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าไปจับกับเนื้อเยื่อของพืชได้ง่ายขึ้น วิธีการทำให้เกิดบาดแผลทำได้หลายวิธี ได้แก่ การทำบาดแผลโดยใช้มีดกรีด ใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) การใช้สารเคมี เช่น silicon carbide และการใช้ภาชนะสุญญากาศร่วมกับการทำบาดแผล ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดแตกต่างกัน Humara *et al.* (1999) ได้ทดลองวิธีการทำให้เกิดบาดแผลกับเนื้อเยื่อข้อใบเลี้ยงของต้นสน *Pinus pinna* L. 4 วิธีการคือ (1) ไม่ได้ทำบาดแผล (2) ใช้มีดกรีด (3) ใช้เครื่องยิงอนุภาค และ (4) ใช้เครื่อง sonicator ซึ่งพบว่าการใช้วิธีการที่ 4 ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus*

มากที่สุด รองลงมาได้แก่วิธีที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ แต่ก็พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดตายอด แสดงผลออกมาในลักษณะตรงกันข้ามคือ วิธีที่ 1 ให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่ 2 3 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่ 4 เป็นวิธีการที่ทำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุดแต่ มีการเกิดตายอดน้อยที่สุด

7.4 ผลของสาร acetosyringone ที่มีต่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย เป็นพาหะ

สารนี้มีชื่อทางเคมี 3', 5' dimethoxy 4' hydroxy acetophenone สารนี้ได้จาก เนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล และเชื้ออะโกรแบคทีเรียต้องการเพื่อใช้ในการกระตุ้นส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่พืช (Strachel *et al.*, 1985) สารนี้ถูกสร้างขึ้นระหว่างการเกิดบาดแผลของเซลล์พืชและ แสดงออกโดยกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของยีน *vir* ใน *A. tumefaciens* โดยทำงาน ร่วมกับ transmembrane receptor protein (Melchers *et al.*, 1989) acetosyringone มี ประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในพืช โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ (Sheikholeslam and Week, 1987) และ Alt-Moerbe *et al.* (1988) พบว่าสารประกอบฟีนอล น้ำตาล อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างของอาหาร มีผลต่อความรุนแรงของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และความสามารถในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ acetosyringone ช่วยในการกระตุ้นให้ยีนที่มีหน้าที่ ในการส่งถ่าย T-DNA ทำงาน โดยในการทดลองส่วนมากใช้ระดับความเข้มข้นประมาณ 100-200 ไมโครโมลาร์ (Bond and Roose, 1998)

7.5 ผลของ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังจากการถ่ายยีน

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะนั้น มีความจำเป็นจะต้องกำจัด เชื้ออะโกรแบคทีเรียให้หมดภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการถ่ายยีน ในปัจจุบันมีการใช้ สารปฏิชีวนะหลายชนิดในการกำจัด ได้แก่ carbenicillin cefotaxime และ paromomycin เนื่องจากสารปฏิชีวนะดังกล่าวเข้าจับกับ penicillin binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็น องค์ประกอบของ inner membrane ใช้ในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าและยังมีฤทธิ์ทางเภสัชสูงกว่า carbenicillin (Mathais and Boyd, 1986)

จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 และ C58 โดยการเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหาร MS พบว่า carbenicillin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ timentin ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ถ้าใช้ carbenicillin ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ timentin ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้ (Nauerby *et al.*, 1997)

8. การสร้างเวกเตอร์เพื่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) ที่เรียกว่า crown gall disease เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *A. tumefaciens* จะมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid) ขนาดประมาณ 20 กิโลเบสถูกถ่ายทอดเข้าไป และแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชเรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T(transferred)DNA ขอบเขตของ T-DNA ที่จะถูกส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) พบว่ายีน *virulence* (*vir*) มีผลต่อการส่งยีนที่อยู่ระหว่าง RB และ LB ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีตำแหน่งอยู่ใกล้หรืออยู่บนพลาสมิดเดียวกับส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง RB กับ LB นั้น (สุรินทร์, 2543) การสร้างเวกเตอร์เพื่อถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียจึงมี 2 แบบคือ

8.1 Cointegrate vector

เป็นเวกเตอร์ที่มีการดัดแปลงพลาสมิด Ti โดยตัดส่วนของยีนที่สร้างฮอร์โมนพืช และสารอินบินบางส่วนออกไป จากนั้นแทรกยีนที่สนใจเข้าแทนที่ในส่วนของ T-DNA เดิมที่อยู่บนพลาสมิด Ti ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยมีการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจใน *E. coli* ซึ่งประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่คัดเลือกในแบคทีเรีย และยีนเครื่องหมายที่คัดเลือกในพืชบริเวณที่สอดใส่ยีนที่ต้องการ และจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E. coli* แล้วเคลื่อนย้ายพลาสมิดที่มียีนที่สนใจเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียโดยเกิดรีคอมบิเนชันระหว่าง T-DNA ของพลาสมิดที่เพิ่มปริมาณใน *E. coli* กับ T-DNA ของพลาสมิด Ti ที่อยู่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ทำให้พลาสมิดที่มียีนที่สนใจ

เข้าไปแทรกอยู่ในขอบเขตของ T-DNA ทั้งหมด เรียกเวกเตอร์นี้ว่า cointegrate vector แล้วจึงทำการคัดเลือกโดยนำเซลล์อะโกรแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดหรือยีนที่ต้องการถ่ายเข้าพืช (Bevan, 1984)

8.2 Binary vector

เวกเตอร์ชนิดนี้แยกเอาส่วนของ T-DNA มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 10 กิโลเบส ส่วนยีน *vir* ยังคงอยู่ในพลาสมิด Ti ที่มีขนาดใหญ่ในเซลล์อะโกรแบคทีเรีย ภายในขอบเขต LB และ RB ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกในพืช และตำแหน่งที่ต้องการสอดใส่ยีนที่ต้องการลงไป ส่วนนอกบริเวณ LB และ RB ของพลาสมิดขนาดเล็กประกอบไปด้วยจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลในเซลล์อะโกรแบคทีเรีย และใน *E. coli* และยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการลงไปตำแหน่งภายในขอบเขตของ T-DNA เดิมแล้วนำมาใส่ใน *E. coli* แล้วจึงถ่ายพลาสมิดที่เพิ่มปริมาณใน *E. coli* เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย ที่มีพลาสมิด Ti แต่เป็นพลาสมิดที่ไม่มีส่วนของ T-DNA เมื่อนำเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีทั้งพลาสมิดถ่ายเข้าสู่พืช จะมีการส่งชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง LB ถึง RB ซึ่งรวมเอายีนที่ต้องการ และยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนเข้าไปในเซลล์พืช โดยการทำงานของยีน *vir* และยีน *chv* ที่อยู่บนโครโมโซมของเซลล์อะโกรแบคทีเรีย (Klee et al., 1987)

9. งานวิจัยที่ใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชวงศ์ถั่ว

Manners (1987) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่พืชสกุล *Stylosanthes* spp. โดยใช้ *A. tumefaciens* ถ่ายยีนแบบ binary vectors โดยนำพลาสมิด pGA472 และ BIN6 ซึ่งมียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือก ถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนของใบทำให้ต้นพืชที่ได้รับยีน มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน แล้วตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *neomycin phosphotransferase* ในเซลล์พืชโดยการ hybridization ที่ตำแหน่ง coding region ของยีน ตรวจสอบปฏิกิริยาของยีน *nptII* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อ พบว่าปมปมที่เกิดขึ้นสามารถสร้างยอดที่มีการแสดงออกของยีน *nptII* แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

Meijer (1982) ชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบของถั่ว *Stylosanthes humilis* ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกันกับถั่วสามาต้า เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 78 เปอร์เซ็นต์

และต่อมา Manners (1988) ถ่ายยีนเข้า *S. humilis* พันธุ์ Paterson โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะสำหรับการถ่ายยีนแบบ binary vector (pGV3850:1103neo) ซึ่งมียีน *Tn5 neomycin phosphotransferase II (nptII)* และยีน *nopaline synthase* เป็นยีนคัดเลือกเข้าสู่เนื้อเยื่อใบ ใช้สารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารคัดเลือก และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nptII* โดยวิธี biochemical analysis และ Southern blot ของยีน *nptII* ในต้นพืชแปลงพันธุ์ รุ่น R2

Aoki *et al.* (2002) ศึกษาผลของการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ใบเลี้ยงของ *Lotus japonicus* โดยใช้ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21 วัน และตามด้วยไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือใช้ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 วัน และตามด้วยไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Santos *et al.* (2002) ศึกษาการถ่ายยีน FMDV peptide-based vaccine เข้าสู่อัลฟัลฟา (alfalfa) โดยการสร้างพลาสมิดที่มียีน *VP1* ต่อกับยีน *gus A* เป็นยีนรายงานผล ทำการตรวจสอบพืชด้วยวิธี PCR พบว่าได้ต้นที่เป็นพืชแปลงพันธุ์ และทำการทดสอบการตอบสนองของ antibody ต่อ plant-expressed VP1 135-160 epitope ในหนู โดยใช้ วิธี ELISA และ western blot พบว่ามีการกระตุ้นการสร้าง antibody ได้

Pensa *et al.* (1991) ทดลองถ่ายยีน *gus* โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ถ่ายเข้าสู่ส่วนของคัพภะของ *Vigna unguiculata* ที่ตัดใบเลี้ยงออกแล้วชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าแคลลัสบางส่วนได้รับยีนและบางส่วนไม่ได้รับยีน ศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี dot blot และ Southern blot hybridization พบว่าการทำ co-cultivation แคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เป็นเวลา 3 วัน

มีการแสดงออกของยีน *gus* และเมื่อทดสอบในอาหารคัดเลือกมีบางยอดที่พัฒนาขึ้นจากแคลลัส แต่ตายในที่สุด

Yamada *et al.* (2001) ถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 AGL-1 และ EHA105 ที่มีพลาสมิด pIG 121 และ pSG65T เข้า epicotyl ของถั่ว azuki 5 สายพันธุ์ พบว่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงกว่าสายพันธุ์ LBA4404 และสามารถนำต้นถั่วที่ได้จากการถ่ายยีนมาเย็นย่นผล ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot analysis พบว่ามีการรวมตัวของยีน *gus* และยีน *nptII* กับจีโนมของถั่ว azuki ที่ถ่ายยีน โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105