

กัญญา แซ่เตียว 2549: การถ่ายยีน *VP1* จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่ถั่วฮามาต้า
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประสานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ
จันทร์เปรม, Ph.D. 113 หน้า
ISBN 974-16-1515-9

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 OD₆₀₀ 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 พบว่าจากจำนวน แคลลัสที่ถ่ายยีนทั้งหมด 2,200 ชิ้น ได้แคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ ไสโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 131 ชิ้น จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำยอดที่ได้จำนวน 300 ยอดมาชักนำให้ออกรากแล้วนำมา ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* และยีน *hpt* ด้วยวิธี PCR พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *VP1* อย่างเดียวจำนวน 93 ต้น และยีน *hpt* อย่างเดียวจำนวน 97 ต้น และต้นที่พบทั้ง 2 ยีนจำนวน 75 ต้น เมื่อนำต้นที่ตรวจพบยีนไป ยืนยันผลด้วยวิธี dot blot hybridization จำนวน 50 ต้นพบว่าทุกต้นมียีน *VP1* อยู่จากนั้นตรวจสอบจำนวนชุด ของยีน *VP1* ที่ถูกถ่ายเข้าไปในถั่วฮามาต้าด้วยวิธี Southern blot ซึ่งจากการทดสอบจำนวน 6 ต้น พบว่าบาง ต้นมีการสอดแทรกของยีน *VP1* ในจีโนมของถั่วฮามาต้า 1 ตำแหน่งแต่บางต้นมี 2 ตำแหน่ง เมื่อนำต้นที่ผ่านการ ตรวจสอบโดยวิธี Southern blot แล้ว มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR จำนวน 2 ต้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *VP1* ในทั้ง 2 ต้น และเมื่อนำ 2 ต้นที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี western blot โดยใช้ ซีรัมของหนูที่ติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่ามี 1 ต้นที่มีการแสดงออกของโปรตีน VP1

Kanjana Saetiew 2006: Transformation of *VP1* Gene from Foot and Mouth Disease Virus into *Stylosanthes hamata*. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 113 pages.
ISBN 974-16-1515-9

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 OD₆₀₀ 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.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ธนรัชย์ จันทร์เปรม ผศ.ดร.ธีระพล ศิริณฤมิตร ดร. อรรวรรณ ชัชวาลการพานิชย์ กรรมการที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รศ.นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุเมธ อรัญนารถ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์ ที่ให้ความรู้ในการทำงานทดลอง คุณสิริรักษ์ ศรณียารักษ์ ที่ช่วยดูแลต้นไม้ คุณนงลักษณ์ เทียนเสรี คุณเกศณี มณีภาส คุณศิริพร วิหคโต รวมทั้ง พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการและศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า อีกทั้งเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนาระบบการผลิตพืชและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ คุณพ่อ และขอบคุณพี่น้อง ที่ให้ความรักกำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

กัญจนา แซ่เตียว

พฤษภาคม 2549