

เอกสารนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาเพื่อให้คนไทย ได้เรียนรู้และเข้าใจเทคโนโลยีในเอกสารสิทธิบัตรนานาชาติ  
และโดยเฉพาะตัวอย่างการเขียนข้อถ้อยสิทธิ เพื่อความเข้าใจประเด็นการประดิษฐ์  
และการลำดับชั้นของการต่อยอดจากข้อถ้อยสิทธิหลัก  
และข้อถ้อยสิทธิรอง (ข้อที่อ้างถึงอิงข้อถ้อยสิทธิข้ออื่น)

ผู้จัดทำไม่รับรองความถูกต้องของการแปล การนำไปใช้อ้างอิงให้อ้างอิงจากเอกสารสิทธิบัตรต้นฉบับเท่านั้น

แปลและคิดต่อยอดโดย นักศึกษา BIOTEC มหาวิทยาลัยมหิดล  
ตรวจสอบปรับปรุงโดย ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ & ทีมงาน Toryod.com

แปลและคิดต่อโดย Utaiwan Kunwong นักศึกษา BIOTECมหาวิทยาลัยมหิดล

ตรวจสอบปรับปรุงโดย ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ & ทีมงาน Toryod.com

US2006260012

Method of transforming soybean

การถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วเหลือง

Publication date: 2006-11-16

Inventor: KHAN RAFIQUL (US)

#### Abstract

The present disclosure provides methods for *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cells or tissue and regeneration of the transformed cells or tissue into transformed plants. The methods may be used for transforming many soybean cultivars.

งานนี้ได้บอกถึงวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของถั่วเหลือง และการสร้างต้นที่ได้รับการถ่ายยีนขึ้นใหม่ วิธีการถ่ายยีนนี้อาจจะใช้ได้ในถั่วเหลืองหลายสายพันธุ์

#### What is claimed is:

1. A method for transforming soybean cells or tissue, comprising:
  - (a) preparing an explant from a soybean seed by:
    - (i) removing a hypocotyl from said soybean seed;
    - (ii) removing one cotyledon along with its adjacent axillary bud, leaving primary leaves attached to a remaining cotyledon; and
    - (iii) removing a portion of a primary leaf from said remaining cotyledon, thereby generating a primary leaf base; and
  - (b) co-cultivating said explant with *Agrobacterium* comprising at least one nucleic acid of interest to be incorporated into a genome of one or more soybean cells.

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อของถั่วเหลืองประกอบด้วย

(a) การเตรียม explant จากเมล็ดถั่วเหลืองโดย

(i) ลอก hypocotyl จากเมล็ดถั่วเหลืองออก

(ii) ลอกใบเลี้ยง 1 ใบที่อยู่ติดกับตาข้างออก แต่ primary leave ยังคงติดอยู่กับใบเลี้ยงที่เหลือ

(iii) ลอกบางส่วนของ primary leaf ออก ซึ่งจะทำให้เกิด primary leaf base

(b) สำหรับการ co-cultivating explant กับ *Agrobacterium* ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก (DNA) ที่สนใจอย่างน้อย 1 ตัว เพื่อที่จะให้ DNA นั้นเข้าไปรวมกับ genome ของเซลล์ถั่วเหลือง

2. The method of claim 1, further comprising cultivating at least one formed shoot in a medium containing a selection agent.

วิธีการตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่ง ยังประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงให้เกิดอย่างน้อย 1 หน่อ ในอาหารที่มีสารที่ช่วยในการคัดเลือก

3. The method of claim 2, wherein said at least one nucleic acid of interest comprises a selectable marker gene.

วิธีการตามข้อถือสิทธิ 2 ที่ซึ่ง กรดนิวคลีอิกที่สนใจอย่างน้อย 1 ตัวประกอบด้วย 1 ยีนที่มีเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก

4. The method of claim 3, wherein said selectable marker gene is a phosphomannose isomerase gene.

วิธีการตามข้อถือสิทธิ 3 ที่ซึ่ง ยีนที่มีเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกเป็นยีน phosphomannose isomerase

5. The method of claim 4, wherein said selection agent is mannose.

วิธีการตามข้อถือสิทธิ 4 ที่ซึ่ง สารที่ช่วยในการคัดเลือก คือ แมนโนส

6. The method of claim 4, wherein co-cultivation with said *Agrobacterium* is carried out in the presence of mannose.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 4 ที่ซึ่ง การ co-cultivation ด้วย *Agrobacterium* ดำเนินการในสภาวะที่มี  
แมนโนส

7. The method of claim 2, further comprising inducing shoot formation from said primary leaf  
base.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 2 ที่ซึ่ง ยังประกอบด้วยการชักนำให้เกิดยอดจาก primary leaf base.

8. The method of claim 7, wherein shoot formation is induced by culturing said primary leaf  
base in a medium comprising a shoot-inducing hormone.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 7 ที่ซึ่ง การเกิดยอดชักนำโดย culture primary leaf base ในอาหารที่  
ประกอบด้วยฮอร์โมนที่ใช้ชักนำให้เกิดยอด

9. The method of claim 8, wherein said shoot-inducing hormone comprises at least one of an  
auxin, a cytokinin, and a gibberellic acid.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 8 ที่ซึ่ง ฮอร์โมนที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดประกอบด้วย อย่างน้อย 1 ชนิด  
ของสารต่อไปนี้ ออกซิน ไทโตโคนิน และจิบเบอเรลลิน

10. The method of claim 9, wherein said auxin is selected from the group consisting of IAA,  
NAA, and IBA.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 9 ที่ซึ่ง ออกซินคัดเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย IAA, NAA และ IBA

11. The method of claim 9, wherein said cytokinin is selected from the group consisting of  
benzylaminopurine (BAP), thidiazuron, kinetin, and isopentenyl adenine.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 9 ที่ซึ่ง ไทโตโคนินคัดเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย benzylaminopurine  
(BAP), thidiazuron, kinetin และ isopentenyl adenine.

12. The method of claim 7, wherein induction of shoot formation comprises removing one or  
more of a primary meristem, a secondary meristem, and an axillary meristem attached to a  
cotyledon.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 7 ที่ซึ่ง การชักนำให้เกิดยอดประกอบด้วยการเอา primary meristem secondary meristem และ axillary meristem ที่ติดอยู่กับใบเลี้ยงออก 1 อันหรือมากกว่า

13. The method of claim 7, further comprising selecting a transformed shoot.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 7 ที่ซึ่ง ยังประกอบด้วยการคัดเลือกยอดที่ได้รับการถ่ายยีน

14. The method of claim 13, further comprising regenerating a selected transformed shoot into a soybean plant.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 13 ที่ซึ่ง ยังประกอบด้วยการชักนำให้เกิดเป็นต้นถั่วเหลืองใหม่จากยอดที่ได้รับการถ่ายยีน

15. The method of claim 1, wherein said soybean seed is a mature seed.

วิธีการจากข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่ง เมล็ดถั่วเหลืองนั้นเป็นเมล็ดที่โตเต็มที่แล้ว

16. The method of claim 1, wherein said soybean seed is an immature seed.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่งเมล็ดถั่วเหลืองนั้นเป็นเมล็ดที่ยังไม่โตเต็มที่

17. The method of claim 1, wherein said soybean seed is a germinated seed.

วิธีการตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่ง เมล็ดถั่วเหลืองนั้นเป็นเมล็ดที่งอกแล้ว

18. A method for producing a stably transformed soybean plant, comprising:

(a) preparing an explant from a soybean seed by:

(i) removing a hypocotyl from said soybean seed;

(ii) removing one cotyledon along with its adjacent axillary bud, leaving primary leaves attached to a remaining cotyledon; and

(iii) removing a portion of each primary leaf from said remaining cotyledon, thereby generating a pair of primary leaf bases;

(b) co-cultivating said explant with Agrobacterium comprising a nucleic acid of interest to be incorporated into a genome of a soybean cell;

- (c) inducing shoot formation from each primary leaf base;
- (d) cultivating at least one formed shoot in a medium containing a selection agent;
- (e) selecting a transformed shoot; and
- (f) regenerating a selected transformed shoot into a soybean plant.

วิธีการผลิตต้นกล้าเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างถาวร (stable transform) ประกอบด้วย

(a) การเตรียม explant จากเมล็ดต้นกล้าเหลืองโดย

(i) ลอก hypocotyl จากเมล็ดต้นกล้าเหลืองออก

(ii) ลอกใบเลี้ยง 1 ใบที่ติดอยู่กับตาข้างออก ส่วน primary leaf ยังคงติดอยู่กับใบเลี้ยงที่

เหลือ

(iii) ลอกบางส่วนของแต่ละ primary leaf ที่ติดอยู่กับใบเลี้ยงออก ซึ่งจะทำให้เกิด primary leaf base 1 คู่

(b) สำหรับการ co-cultivating explant กับ *Agrobacterium* ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก (DNA) ที่สนใจอย่างน้อย 1 ตัว เพื่อที่จะให้ DNA นั้นเข้าไปรวมกับ genome ของเซลล์ต้นกล้าเหลือง

(c) การชักนำให้เกิดยอดจากแต่ละ primary leaf base

(d) การปลูก (culture) ต้นอย่างน้อย 1 ต้นที่เกิดยอดในอาหารที่ใช้ในการคัดเลือก

(e) การคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

(f) การเจริญของยอดที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นกล้าเหลืองที่สมบูรณ์

19. A transgenic soybean plant regenerated from soybean cells or tissue transformed according to the method of claim 1.

ต้นกล้าเหลืองที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมนี้เจริญเติบโตขึ้นมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของต้นกล้าเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนตามวิธีการในข้อถือสิทธิ 1

20. A transgenic seed produced by the transgenic plant of claim 19.

เมล็ดที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม ที่ผลิตขึ้นมาจากพืชที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมตามข้อถือสิทธิ 19

21. A transgenic soybean plant regenerated from soybean cells or tissue transformed according to the method of claim 18.

ต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมนี้เจริญเติบโตขึ้นมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนตามวิธีการในข้อถือสิทธิ 18

22. A transgenic seed produced by the transgenic plant of claim 21.

เมล็ดที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมนี้ผลิตขึ้นมาจากพืชที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมตามข้อถือสิทธิ 21

### การคิดต่อยอดจากสิทธิบัตรนี้

เราสามารถต่อยอดวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ในถั่วเหลืองโดยการนำวิธีการถ่ายยีนนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองยกตัวอย่างเช่น สร้างพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถต้านทานต่อโรคต่างๆ ได้มากขึ้น สร้างพันธุ์ถั่วเหลืองที่ให้ผลผลิตมากกว่าที่ผลิตได้ในปัจจุบัน หรือเพิ่มคุณค่าทางอาหารในถั่วเหลือง เช่น เพิ่มแคลเซียม เพิ่มวิตามินต่างๆ ในถั่วเหลืองให้มีมากขึ้น เป็นต้น โดยการถ่ายยีนตัวอื่นที่เราสนใจและได้ศึกษามาแล้วว่าสามารถทำให้ต้านทานโรค เพิ่มผลผลิต หรือเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการได้ใส่ลงไปใน *Agrobacterium* แทนยีนตัวเก่าที่เขาได้ทำไว้แล้วและใช้วิธีการถ่ายยีนดังกล่าวลงไปเซลล์ของถั่วเหลือง โดยเซลล์ของถั่วเหลืองนั้นอาจจะนำมาจากส่วนต่างๆ ของต้นถั่วเหลือง อาจไม่ใช่ นำมาจากเมล็ดเพียงอย่างเดียว

---

Utaiwan Kunwong

4937298

Biotechnology Department

Faculty of Science, Mahidol University