บทปฏิบัติการที่ 3
การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หลักการ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes หรือ restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียและเชื้อราหลายสปีชีส์ มีหน้าที่ป้องกันการเข้าไปขยายจำนวนของไวรัสต่อแบคทีเรีย (bacteriophage) โดยการตัดหรือย่อยดีเอ็นเอของไวรัสตรงตำแหน่งของลำดับเบสที่จำเพาะซึ่งเป็นกระบวนการของเซลล์เจ้าบ้านในการทำให้เกิดการจำกัด (restriction) การเจริญเติบโตของไวรัสได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้ชื่อว่า restriction enzymes เอนไซม์ทำหน้าที่ในการเร่งสลายพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester) ตรงตำแหน่งที่จำเพาะของดีเอ็นเอเกลียวคู่ จากคุณสมบัติที่จำเพาะนี้เองจึงทำให้เป็นประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เอนไซม์ตัดจำเพาะแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ Type I เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติการตัดดีเอ็นเอ (restriction) และการเติมหมู่เมธิล (methylation) ลงบนเบสของดีเอ็นเอ เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ ATP, Mg^{2+} และ S-adenosylmethionine (SAM) เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ในการทำงาน เอนไซม์ชนิดนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognitition site) ที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 100 - 1,000 คู่เบส (base pairs) ซึ่งตำแหน่งที่จดจำและบริเวณที่ตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์จะเป็นคนละตำแหน่งกัน ส่วน Type II เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติทั้งการตัดและการเติมหมู่เมธิล โดยสามารถจดจำและตัดภายในหรือบริเวณที่ติดกับบริเวณจดจำอย่างจำเพาะ ทำให้ทราบความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แน่นอน สามารถทำงานโดยอาศัย Mg^{2+} เท่านั้น โดยไม่ต้องใช้ ATP และ SAM เป็นโคแฟคเตอร์ ชนิดสุดท้ายคือ Type III เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ Type I คือเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน ต้องการ ATP และ Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ในการทำงาน ไม่ต้องใช้ SAM เอนไซม์กลุ่มนี้จะตัดดีเอ็นเอตรงบริเวณที่อยู่ห่างจากบริเวณจดจำไปทางส่วนหลัง (downstream) ประมาณ 24-26 คู่เบส เนื่องจากเอนไซม์ Type I และ Type III มีบริเวณจดจำและบริเวณ

ที่ตัดดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง จึงมีประโยชน์ไม่มากนักในงานทางด้านพันธุวิศวกรรม เอนไซม์ที่ใช้ในงานพันธุวิศวกรรมเป็นชนิด II (type II) เอนไซม์ชนิดนี้โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่เป็น 4 เบส, 5 เบส และ 6 เบส ซึ่งมีการเรียงลำดับของเบสเป็นลักษณะที่สมมาตร (symmetry) ทั้ง 2 ทิศทาง หรือ เรียกว่า Palindromic sequence เอนไซม์ประเภทนี้จะตัดลำดับของเบสที่จำเพาะได้ 3 ลักษณะ คือ

1. ตัดจากปลาย 5′ ไป 3′ จะทำให้ได้ผลผลิตของดีเอ็นเอที่เป็นปลายเหนียว 5′ (5′-stricky end) เช่น *Eco*RI เป็นเอนไซม์ที่จดจำต่อ 6 เบส

   5′ – GAATTC ⟶ 5′ – G AATTC – 3′

2. ตัดจากปลาย 3′ ไป 5′ จะทำให้ได้ผลิตผลของดีเอ็นเอที่เป็นปลายเหนียว 3′ (3′-stricky end) เช่น *Pst*I เป็นเอนไซม์ที่จดจำต่อ 6 เบส

   5′ – CTGCAG – ⟶ 5′ – CTGCA G – 3′

3. ตัดในลักษณะตรง จะทำให้ผลิตผลดีเอ็นเอที่เป็นปลายทู่ (blunt end) เช่น *Sma*I เป็นเอนไซม์ที่จดจำต่อเบส 6 เบส

   5′ – CCCGGG – 3′ ⟶ 5′ – CCC GGG – 3′

เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถสกัดได้จากจุลชีพหลายชนิด เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง และไวต่ออุณหภูมิ ดังนั้นจึงต้องเก็บในที่อุณหภูมิต่ำๆ เช่น –20°C เพื่อให้มีความเสถียรภาพ ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำๆเช่นนี้สารละลายเอนไซม์จะแข็งตัว (frozen) โครงสร้างการแข็งตัวนี้ทำให้เอนไซม์ถูกทำลายและเสียสภาพ การป้องกันปัญหาการเก็บรักษาเอนไซม์จึงต้องอาศัยกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารละลายเฉื่อยที่มีความหนืด ดังนั้นเอนไซม์เหล่านี้จึงมักจะเตรียมในสารละลายที่มี 50% glycerol เพื่อช่วยให้สารละลายของเอนไซม์ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ –20°C และยังช่วยรักษาการทำงานหรือแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ ถ้าหากมีปริมาณของกลีเซอรอลที่มากเกินไปจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ถ้าหากมีปริมาณของกลีเซอรอลมากกว่า 15% ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดังกล่าว จะเป็นผลให้เอนไซม์ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอนั้นได้

ตารางที่ 3-1 ตัวอย่างและบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด

แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์	ชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ	บริเวณจดจำ
Anabaena variabilis	*Ava*I	C↓[C/T] CG[A/G] G
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G↓GATCC
Bacillus globigii	*Bgl*II	A↓GATCT
Escherichia coli RY13	*Eco*RI	G↓AATTC
Escherichia coli R245	*Eco*RII	↓CC[A/T]GG
Haemophilus aegyptius	*Hae*III	GG↓CC
Haemophilus gallinarum	*Hga*I	GACGC
Haemophilus haemolyticus	*Hha*I	GCG↓C
Haemophilus influenzae Rd	*Hind*II	GT[C/T]↓[A/G]AC
	*Hind*III	A↓AGCTT
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*I	GTT↓AAC
	*Hpa*II	C↓CGG
Klebsiella pneumoniae	*Kpn*II	GGTAC↓C
Moraxella bovis	*Mbo*I	↓GATC
Providencia stuartii	*Pst*I	CTGCA↓G
Serratia marcescens	*Sma*I	CCC↓GGG
Streptomyces stanford	*Sst*I	GAGCT↓C
Xanthomonas malvacearum	*Xma*I	C↓CCGGG

เอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนมากมายจึงจำเป็นต้องมีวิธีการเรียกชื่อเอนไซม์ (nomenclature) แบบสากลที่เรียกว่า ระบบ 3 ตัวอักษร คือ อักษรตัวแรก เป็นตัวใหญ่ ซึ่งเป็นอักษรต้นของชื่อ Genus อักษรตัวที่ 2, 3 เป็นตัวเล็ก ซึ่งเป็นชื่อ Species อักษรตัวที่ 4 (ถ้ามี) เป็นตัวใหญ่ ซึ่งเป็นชื่อ Strain และเลขโรมัน ใช้บอกลำดับการพบเอนไซม์ตัดจำเพาะในแบคทีเรียชนิดนั้น จากตารางที่ 3-1 จะพบว่ามีเอนไซม์ที่มาจากแหล่งเชื้อต่างกันที่จดจำและตัดลำดับเบสเดียวกัน แต่การตัดคนละตำแหน่งกัน เช่น *Sma*I และ *Xma*I เอนไซม์ในลักษณะนี้เรียกว่า Isoschizomer ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในกรณีที่เอนไซม์ที่ใช้อยู่เดิมมีราคาแพงหรือไม่ค่อยคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาหรือระหว่างการตัดดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามจะต้องคำนึงถึงผลที่ได้ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปและต้องเลือกใช้ Isoschizomer ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุด

นอกจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะสูงสุดได้นั้น ขึ้นกับสภาวะที่เหมาะของปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งควบคุมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นของเกลือ สามารถแบ่งเอนไซม์ที่ต้องการสภาวะของเกลือที่แตกต่างเป็น 3 ชนิดด้วยกัน คือ

1. ชนิดที่ต้องการเกลือมาก (high salt)
2. ชนิดที่ต้องการเกลือปานกลาง (medium salt)
3. ชนิดที่ต้องการเกลือน้อย (low salt)

ตารางที่ 3-2 แสดงส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เอนไซม์ตัดจำเพาะต้องการ

ชนิดของบัฟเฟอร์	NaCl (mM)	Tris-HCl, pH 7.5 (mM)	$MgCl_2$ (mM)	DTT* (mM)
เกลือมาก	100	50	10	1
เกลือปานกลาง	50	10	10	1
เกลือน้อย	0	10	10	1

* DTT = Dithiothreitol

หมายเหตุ : บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้มักเตรียมอยู่ในรูปสารละลายที่เข้มข้น 10 เท่า และแบ่งเป็นส่วนย่อยๆ เก็บไว้ที่ -20°C ถ้าเก็บไว้ที่ 4 °C จะใช้งานได้เพียง 1-2 สัปดาห์

ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงต้องคำนึงถึงสภาวะและปริมาณของกลีเซอรอลในปฏิกิริยา รวมทั้งอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ ซึ่งถูกกำหนดเป็นหน่วย unit/μl

1 unit หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอมาตรฐานปริมาณ 1 μg ได้สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-3 ชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด

บัฟเฟอร์ที่มีเกลือน้อย	บัฟเฟอร์ที่มีเกลือปานกลาง	บัฟเฟอรที่มีเกลือมาก
*Avv*II	*Acc*I	*Eco*RI
*Bst*NI*	*Alu*I	*Eco*RII
*Hae*I	*Ava*I, *Ava*II	*Hgi*AI
*Hae*II	*Bam*HI	*Mbo*I
*Hae*III	*Bgl*I, *Bgl*II	*Mn*lI
*Hpa*I	*Bst*EII	*Pvu*I
*Hpa*II	*Cfo*I	*Sac*III
*Hph*I	*Dde*I	*Sal*I
*Kpn*I	*Dpn*I	*Sst*III
*Mbo*II	*Hha*I	*Xba*I
*Msp*I	*Hinc*II	*Xho*I
*Sac*I	*Hind*II, *Hind*III	
*Sac*II	*Pst*I	
*Sst*I, *Sst*II	*Pvu*II	
*Taq*I**	*Rsa*I	
*Tha*I*	*Sau*3AI, *Sau*96I	
*Xma*I		

อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ 37°C ยกเว้น * และ ** ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 60°C และ 65°C ตามลำดับ

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียว

ในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีหลักง่ายๆ คือการบ่มดีเอ็นเอและเอนไซม์เข้าด้วยกันในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วย ปริมาณของเอนไซม์และดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์และความเข้มข้นของเกลือ อุณหภูมิ และระยะเวลา ปัจจัยเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามคุณสมบัติและลักษณะตามธรรมชาติที่เฉพาะตัวของเอนไซม์ ตลอดจนวัตถุประสงค์ของการนำผลที่ได้ไปใช้ต่อ

ตามหลักการเอนไซม์ 1U (unit) จะย่อยหรือตัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ 1 μg อย่างสมบูรณ์ภายใน 60 นาทีในภาวะที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอที่นำมาตัดส่วนใหญ่เป็น crude DNA ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์ 2-5 unit/ดีเอ็นเอ 1 μg เป็นเกณฑ์ และปริมาณของเอนไซม์จะต้องไม่มากกว่า 10% ของ reaction mixture ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว เนื่องจากปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้เก็บรักษาเอนไซม์ จะมีผลรบกวนต่อการทำงานของเอนไซม์และอาจเกิด star activity (เอนไซม์จะตัดลำดับเบสที่ต่างไปจากเดิมเมื่อภาวะของปฏิกิริยาคลาดเคลื่อนไป เช่น การมีเกลือหรือกลีเซอรอลในปริมาณสูง) ได้

โดยทั่วไปเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีจำหน่ายจะมีบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ในความเข้มข้น 10 เท่า มาพร้อมกัน ส่วนประกอบหลักของบัฟเฟอร์ได้แก่ magnesium chloride, sodium หรือ potassium chloride, Tris-HCl, β-mercaptoethanol หรือ dithiothreitol และ magnesium ion ความแตกต่างของบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดจะอยู่ที่ปริมาณของ sodium chloride ดังนั้นการตัดดีเอ็นเอจึงต้องเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ใน reaction mixture ที่ช่วยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้สูงสุด

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด

โดยปกตินิยมใช้เอนไซม์ 2-3 ชนิดไม่มากกว่านี้ หลักการทั่วไปจะเหมือนกันกับการใช้เอนไซม์ชนิดเดียว แต่จะต้องมีเงื่อนไขคือ เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในบัฟเฟอร์และอุณหภูมิในการตัดดีเอ็นเอเหมือนกัน นอกจากนี้เราสามารถเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่อาจเหมาะกับเอนไซม์ชนิดแรกมาก (100%) แต่ไม่ค่อยเหมาะต่อเอนไซม์ชนิดที่สอง (50-80%) โดย

การเติมเอนไซม์ตัวที่สองให้มากกว่าตัวแรกเล็กน้อย และต้องระวังปริมาณของกลีเซอรอลดังกล่าวแล้ว

สำหรับเอนไซม์ 2 ชนิดที่ทำงานได้ดีในบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันมาก เช่น มีความเข้มข้นของเกลือสูงและต่ำ กรณีนี้จำเป็นต้องตัดดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยให้เลือกเอนไซม์ที่ใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือต่ำก่อน แล้วค่อย ๆ ปรับให้สูงขึ้นตามความเหมาะสมต่อเอนไซม์ชนิดที่สอง

ปัญหาและแนวทางแก้ไข

ปัญหาส่วนใหญ่คือไม่มีการตัดดีเอ็นเอ หรือตัดไม่สมบูรณ์โดยที่ทราบอยู่ว่ามี cutting site และเอนไซม์มีประสิทธิภาพดี

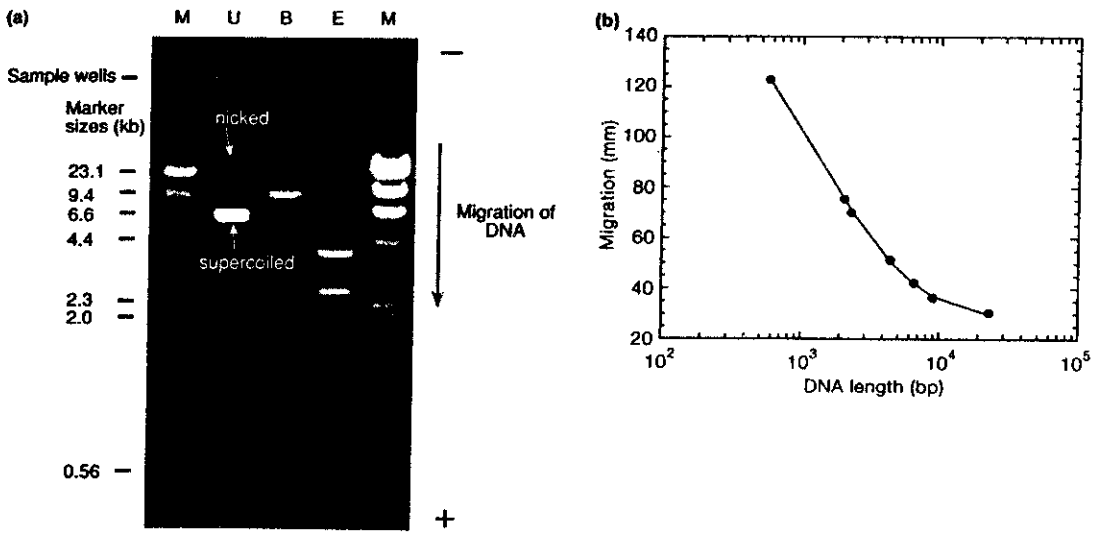
1. เอนไซม์ไม่ตัดดีเอ็นเอเลย สาเหตุจากดีเอ็นเอไม่บริสุทธิ์พอ มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหลืออยู่ ถ้ามีดีเอ็นเอจำนวนมากก็แก้ไขโดยการสกัดด้วย phenol / chloroform และตกตะกอนซ้ำ แต่ถ้ามีปริมาณน้อยควรจะแยกสกัดดีเอ็นเอใหม่

2. ตัดแล้วได้แถบดีเอ็นเอมากกว่าที่ควรได้ สาเหตุจากสภาวะในการตัดดีเอ็นเอคลาดเคลื่อนเกิด star activity แก้ไขโดยการปรับอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือและลดปริมาณของเอนไซม์ลงเล็กน้อย การปนเปื้อนของ endonuclease จากภายนอกก็เป็นสาเหตุของปัญหานี้ได้ ซึ่งควรแก้ไขโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เพียงพอ และลดระยะเวลาของการตัดดีเอ็นเอ หรือใช้ isoschizomer แทน รวมทั้งการใช้ pipette tip และหลอดที่ใหม่และสะอาด

3. เอนไซม์ตัดได้แต่ไม่สมบูรณ์ มีหลายสาเหตุ เช่น ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากการเก็บรักษาไม่ดีพอ (เอนไซม์ควรเก็บที่อุณหภูมิ –20°C) ระยะเวลาที่นำออกมาใช้ควรให้สั้นที่สุดและต้องแช่น้ำแข็งตลอดเวลา ปริมาณกลีเซอรอลเป็นอีกสาเหตุหนึ่ง รวมไปถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ไม่เพียงพอในการตัดดีเอ็นเอที่มี cutting site มาก (site density) ในดีเอ็นเอโมเลกุลนั้นๆ ซึ่งแก้ไขโดยการเพิ่มเอนไซม์อีกเล็กน้อย แล้วบ่มต่อไป

ข้อควรระวังในการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะมีราคาแพงและไม่ค่อยเสถียร ซึ่งนิยมเก็บในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 50% ที่ –20°C ดังนั้นเพื่อระวังการปนเปื้อนจากสารหรือเอนไซม์อื่นๆ ต้องใช้ tip ที่ใหม่ สะอาด และผ่านการทำลายเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) โดยการนึ่งฆ่าเชื้อ และในการดูดแต่ละครั้งต้องมั่นใจว่าได้ดูดเอนไซม์จากหลอด ไม่ได้ดูดแต่กลีเซอรอลเพียงอย่างเดียว เมื่อนำเอนไซม์ตัดจำเพาะออกมาใช้ควรแช่น้ำแข็งในระหว่างการใช้ และควรรีบเก็บที่ –20°C ทันที นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น stock จะมีความเข้มข้นสูง ก่อนนำมาใช้ตัดดีเอ็นเอต้องทำการเจือจางก่อน เพื่อให้ได้ปริมาณที่พอเหมาะในการใช้ทำการทดลอง และในการทดลองการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะควรใช้หลอดพลาสติกแทนการใช้หลอดแก้ว เพราะว่าเอนไซม์และดีเอ็นเอมักจะเกาะติดผนังหลอดแก้วได้ดี



รูปที่ 3-1 (a) ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (B) และ *Eco*RI (E) บนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (b) กราฟมาตรฐานระหว่างขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (base pairs; bp) กับการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ (migration) (จาก Turner และคณะ, 1997)

วัตถุประสงค์

1.เพื่อให้รู้จักชนิดและการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในงานพันธุวิศวกรรม

2. เพื่อให้เข้าใจหลักการและการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดดีเอ็นเอ

สารเคมีที่ใช้

1. ดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng/μl (โดยทั่วไปปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 0.2 – 2 μg)
2. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (ให้จดชื่อและการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ) ความเข้มข้น 5 unit/μl (ในการทำปฏิกริยาจะใช้ 2-5 unit/μg ของดีเอ็นเอ)
3. 10x buffer : เลือกชนิดที่เหมาะสมกับเอนไซม์ (ชนิด high, medium หรือ low salt)
4. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water)
5. สารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยาคือ gel loading buffer หรือ loading dye
6. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน : λDNA/*Hin*dIII (ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของเฟจแลมดาด้วย *Hin*dIII ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 23.4, 9.6, 6.6, 4.4, 2.3, 2.1 และ 0.6 กิโลเบส)

อุปกรณ์

1. ตู้อบ 37°C (incubator)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง microtube (microcentrifuge)
3. เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
4. Micropipette พร้อม tips
5. Microtube
6. Agarose gel apparatus และ เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)
7. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)
8. กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม หรือเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Imaging)

วิธีการทดลอง

1. คำนวณปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา โดยให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 20 μl ที่จะต้องนำไปวิเคราะห์บนเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

2. เติมสารละลายต่างๆในปฏิกิริยาตามลำดับดังนี้

สารละลาย	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำ	12 μl	-
10 x buffer	2 μl	1x
ดีเอ็นเอ (50 ng/μl)	5 μl	250 ng
เอนไซม์	1 μl	5 units

3. ผสมส่วนผสมในข้อ 2 ให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง 3 วินาที แล้วนำไปบ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง (อุณหภูมิที่ใช้นี้ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ เช่น *Eco*RI ที่ 37°C, *Sma*I ที่ 25°C, *Taq*I ที่ 65°C เป็นต้น)
4. หยุดปฏิกิริยาด้วย loading dye (6x loading dye) 3-5 μl
5. นำไปวิเคราะห์บน agarose gel electrophoresis ที่ 1% agarose กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกระทั่ง dye วิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวกก่อนถึงปลายขอบเจลประมาณ 2 ซม.
6. หยุดการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลไปย้อมในสารเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 μg/ml ประมาณ 10 นาที
7. วิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV light) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน
8. บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายรูป

หมายเหตุ : ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปทำปฏิกิริยาขั้นต่อไปได้ เช่น นำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ เป็นต้น แต่จะต้องเพิ่มปริมาตรในการทำปฏิกิริยา และแบ่งส่วนของปริมาณดีเอ็นเอ 0.1-0.5 μg ของดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้ว เพื่อมาวิเคราะห์ดูขนาดและจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

ผลการทดลอง

ดีเอ็นเอ	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เห็น	ระยะทางเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอ (ซม.)	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (กิโลเบส)
1. λDNA/*Hin*dIII	7		23.4, 9.6, 6.6, 4.4, 2.3, 2.1, 0.6
2. ดีเอ็นเอตัวอย่าง			
3. ดีเอ็นเอตัวอย่าง + เอนไซม์ตัดจำเพาะ			

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 3

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดที่นิยมใช้ในงานพันธุวิศวกรรม เพราะอะไร
2. การเติมกลีเซอรอลลงไปในสารละลายของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่ออะไร
3. ถ้าการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จะแก้ไขได้อย่างไร