ตอนที่ 4

10 วิศวกรรมพันธุศาสตร์

- ❑บทนำ
- ❑สารพันธุกรรม
- ❑องค์ประกอบและขั้นตอนในการโคลนดีเอ็นเอ
- ❑การตัดดีเอ็นเอ
- ❑ดีเอ็นเอพาหะ
- ❑การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ
- ❑การเคลื่อนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย
- ❑การตรวจหาโคลนที่ต้องการ
- ❑เทคนิค PCR
- ❑การหาลำดับเบส

บทนำ

วิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering) ความหมายคือ กระบวนการตัดต่อยีนจากหลายแหล่งเข้าด้วยกันตามความเหมาะสม แล้วใส่กลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง เพื่อนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิต เช่น การนำยีนอินซูลินจากคนไปต่อกับดีเอ็นเอของจุลชีพ แล้วทำให้จุลชีพสร้างดีเอ็นเอของคนเพื่อผลิตฮอร์โมนอินซูลิน วิศวกรรมพันธุศาสตร์

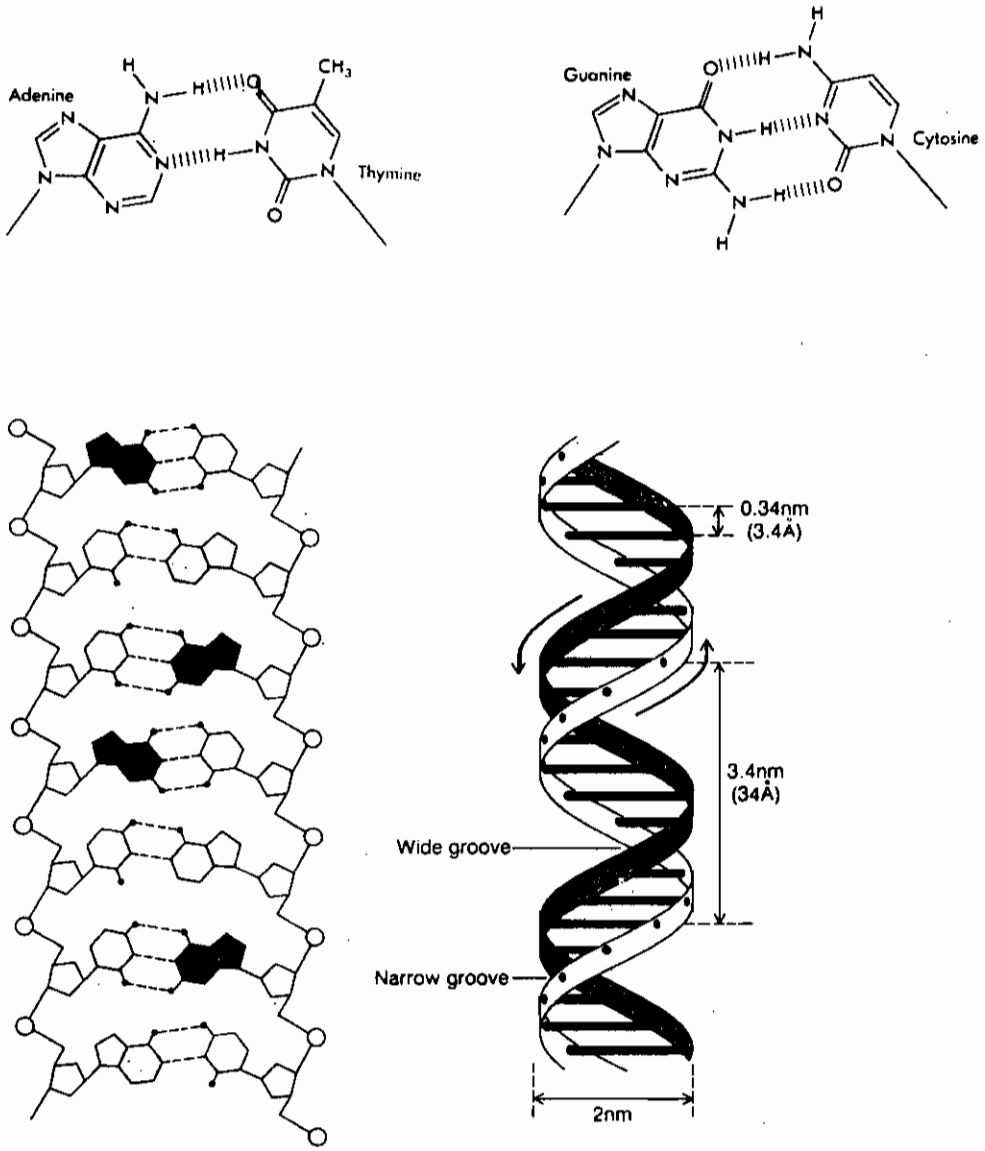
ความหมายเดียวกันกับคำว่า การจัดการเกี่ยวกับยีน (gene manipulation) เทคโนโลยีการสร้างดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA technology) หรือการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning)

สารพันธุกรรม

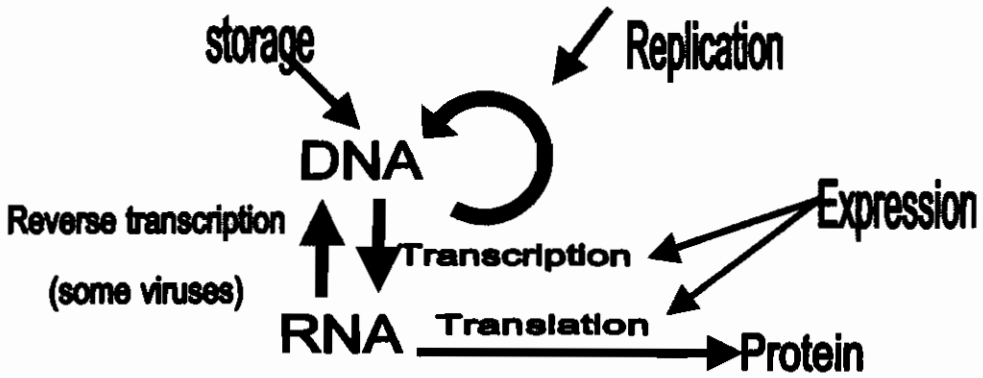
ดีเอ็นเอ หรือ deoxyribonucleic acid (DNA) เป็นสารพันธุกรรม ทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยพื้นฐานที่เรียกว่า "นิวคลีโอไทด์" ซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลของฟอสเฟต น้ำตาลเพนโทส และไนโทรจีนัสเบส ซึ่งเบสจะมีอยู่ 4 ชนิด คือ adenine (A), guanine (G), cytosine (C) และ thymine (T) นิวคลีโอไทด์แต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์

ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบขึ้นจากชุดของนิวคลีโอไทด์จำนวน 2 สาย ที่มาพันเข้าด้วยกันเป็นลักษณะเกลียวคู่หรือบันไดเวียน โดยมีเบสอยู่ภายในสายแต่ละสาย ทำหน้าที่ยึดจับระหว่างสายทั้งสอง เบส A สร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบส T และเบส G สร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบส C ดังรูปที่ 10.1 การจับคู่กันอย่างจำเพาะนี้เรียกว่าเป็นเบสคู่สม (complementary) แต่ละส่วนบนสายดีเอ็นเอนี้เองที่เป็นที่อยู่ของ "ยีน" (gene) ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุข้อมูลสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยยีนที่ต่างกันก็จะมีตำแหน่งที่อยู่และการเรียงลำดับของเบสบนสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไป การส่งผ่านข้อความทางพันธุกรรมเพื่อสร้างโปรตีนผ่านกระบวนการถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ดังรูปที่ 10.2

อาร์เอ็นเอเป็นแหล่งข้อมูลพันธุกรรมของไวรัสบางชนิด ในปี พ.ศ. 2513 ได้มีผู้ค้นพบว่าเชื้อไวรัสบางชนิดมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ หรือ ribonucleic acid (RNA) ซึ่งไวรัสสามารถลอกรหัสพันธุกรรมจากอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านได้ ตัวอย่างไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ ได้แก่ เชื้อไวรัสเอชไอวีซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเอดส์



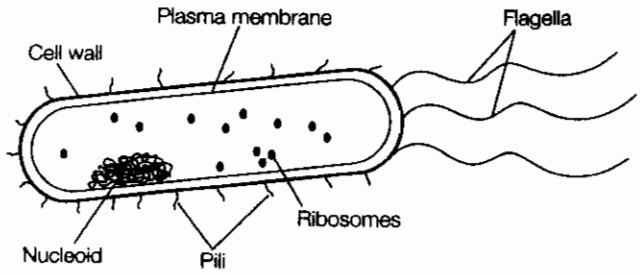
รูปที่ 10.1 โครงสร้างของดีเอ็นเอ



รูปที่ 10.2 กระบวนการส่งผ่านข้อความทางพันธุกรรม

อาร์เอ็นเอประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับดีเอ็นเอ แต่มีความแตกต่างในส่วนของน้ำตาลเพนโทส ซึ่งในดีเอ็นเอเป็นน้ำตาลชนิด deoxyribose ส่วนในอาร์เอ็นเอเป็นน้ำตาลชนิด ribose และเบสที่พบในอาร์เอ็นเอจะประกอบด้วยเบส 4 ชนิด โดยมีเบส 3 ชนิดที่เหมือนกับดีเอ็นเอ คือ A, G, C และเบสที่ต่างกับดีเอ็นเอคือ uracil (U) ซึ่ง U จะจับคู่กับเบส A (แทนเบส T ในดีเอ็นเอ) โดยปกติอาร์เอ็นเอจะถูกลอกรหัสมาจากดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการแปลรหัสสร้างเป็นโปรตีน

สารดีเอ็นเอซึ่งเป็นข้อมูลพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต จะมีขนาดยาวแตกต่างกันมาก ในกรณีของเชื้อไวรัสอาจมีข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมด (genome) เป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเท่านั้น และอาจเป็นสายคู่หรือสายเดี่ยวที่เป็นเส้นยาว (linear) เป็นวงแหวน (circular) หรือเป็นชิ้นแยกกัน (segments) ต่างจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งเป็นโปรตีนรวมกันอยู่กับสายดีเอ็นเอและมีรูปร่างที่เด่นชัด เรียกว่าโครโมโซม (chromosome) และอยู่ภายในนิวเคลียส เชื้อแบคทีเรียจะมีโครโมโซมประกอบด้วยดีเอ็นเอเกลียวคู่ชนิดวงแหวนจับรวมอยู่กับโปรตีนหลายชนิดเป็นกลุ่มเรียกว่านิวคลีออยด์ (nucleoid) แต่จะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสห่อหุ้ม ดังรูปที่ 10.3



รูปที่ 10.3 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย

ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงสายดีเอ็นเอจะอยู่ในลักษณะที่จับรวมกับโปรตีนฮีสโตน (histone) และโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยมีการพันและหดตัวของสายดีเอ็นเอ เพื่อให้สามารถบรรจุเข้าในส่วนนิวเคลียสของเซลล์ได้ นอกจากนิวเคลียสแล้ว ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงยังมียีนที่อยู่ในส่วนของออร์กาเนลอื่นๆ เช่น ในพืชจะมียีนที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาส (chloroplast) เป็นต้น

องค์ประกอบและขั้นตอนในการโคลนดีเอ็นเอ

องค์ประกอบในการโคลนดีเอ็นเอ

1. ชิ้นดีเอ็นเอ (DNA fragment) เป็นดีเอ็นเอที่สนใจที่จะทำการโคลน

2. ดีเอ็นเอพาหะ (vector) เป็นดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติในการถ่ายแบบได้อย่างอิสระจากโครโมโซม

3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์อย่างจำเพาะ

4. ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน โดยการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างปลาย 3′ hydroxyl และ 5′ phosphate ที่อิสระ ทำให้เกิดดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA)

5. เซลล์ให้อาศัย (host cell) เป็นเซลล์หนึ่งที่ใช้รับดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้

ขั้นตอนในการโคลนดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 10.4

1. การเตรียมดีเอ็นเอพาหะและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
2. การเตรียมดีเอ็นเอที่สนใจและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
3. การสร้างดีเอ็นเอลูกผสมในหลอดทดลอง
4. การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย
5. การคัดเซลล์ให้อาศัยที่มีดีเอ็นเอลูกผสมที่ต้องการ

การตัดดีเอ็นเอ

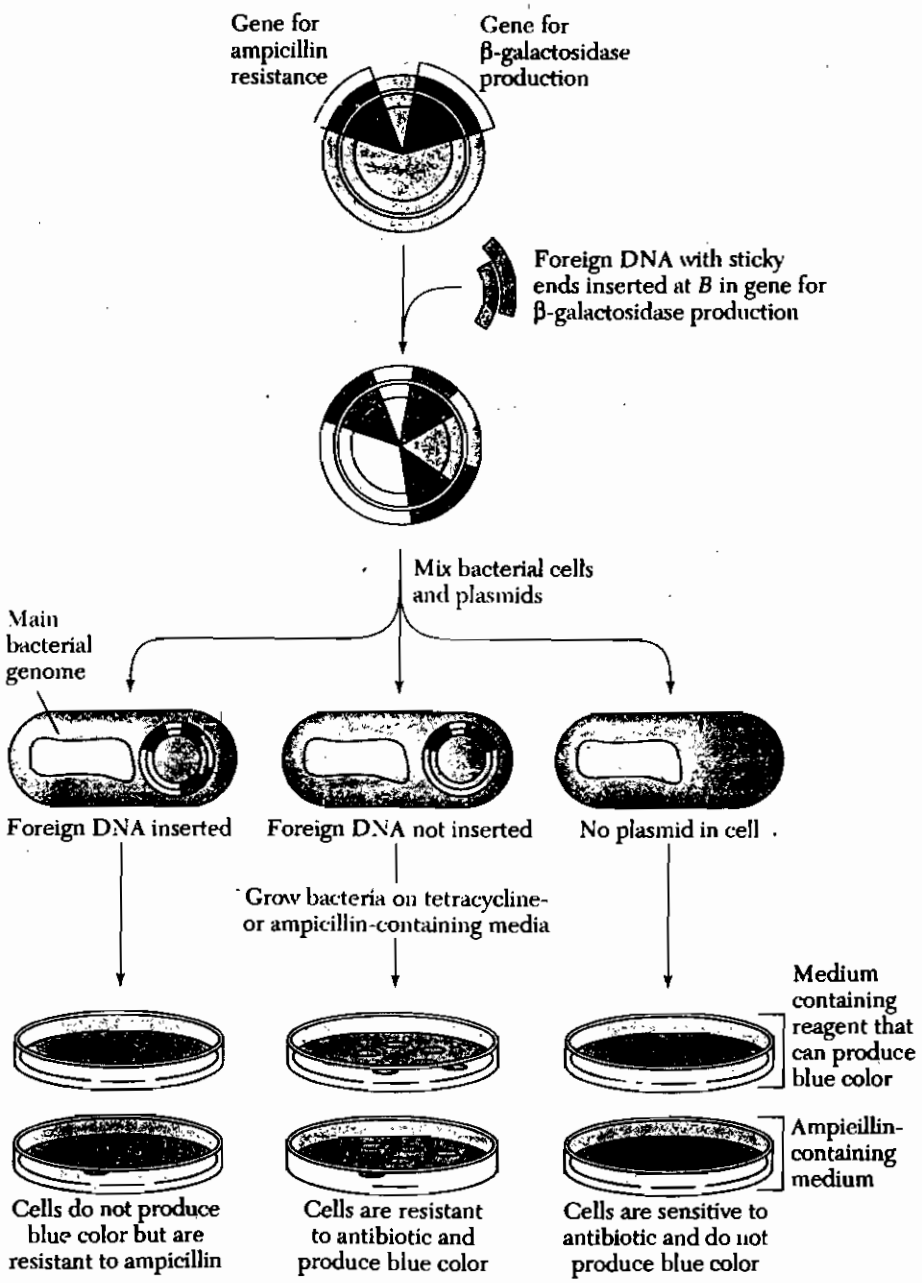
ทำการตัดดีเอ็นเอเกลียวคู่โดยตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่จุดจำเพาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ resriction endonuclease)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอตรงบริเวณที่จำเพาะ เอนไซม์ตัดจำเพาะได้มาจากเซลล์แบคทีเรีย เป็นเอนไซม์ซึ่งเซลล์แบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อตัดดีเอ็นเอแปลกปลอม ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียมีกลไกในการป้องกันดีเอ็นเอของแบคทีเรียเอง โดยกระบวนการเติมหมู่เมทิล (methylation) ปัจจุบันพบเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด สามารถแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตามคุณสมบัติในการตัดดีเอ็นเอเป็นสามแบบ ได้แก่

เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 1 (Type I)

- มีสมบัติในการตัดดีเอ็นเอ (restriction activity) และการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (methylation activity)
- ต้องการ ATP, Mg^{2+} และ S-adenosylmethionine (SAM) ในการทำงาน
- ตัดดีเอ็นเอนอกบริเวณจดจำ โดยห่างออกไป 400-700 คู่เบส ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แน่นอน
- เอนไซม์นี้มีขนาดค่อนข้างใหญ่ คือประมาณ 3,000,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) หลายหน่วยย่อย



Transformation of bacteria and selection with antibiotic resistance markers

รูปที่ 10.4 ขั้นตอนการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning)

เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 (Type II)

- มีสมบัติเฉพาะการตัดดีเอ็นเอ ไม่มีสมบัติการเติมหมู่เมทิล
- ต้องการแต่ Mg^{2+} ในการทำงานของเอนไซม์
- ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะของบริเวณจดจำ จึงได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์แน่นอน
- เป็นโปรตีนสายเดี่ยวและไม่ซับซ้อน

เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 3 (Type III)

- มีสมบัติในการตัดดีเอ็นเอ และการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ
- ต้องการ ATP และ Mg^{2+} ในการทำงานของเอนไซม์ แต่ถ้ามี SAM จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้ดีขึ้น
- ตัดดีเอ็นเอนอกบริเวณจดจำ โดยห่างออกไป 25-27 คู่เบส
- เอนไซม์ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 2 สาย

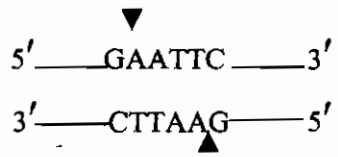
ดังนั้นเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 เอนไซม์นี้แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบแล้วกว่า 400 ชนิด การเรียกชื่อของเอนไซม์ ใช้ระบบอักษร 3 ตัว โดยพิมพ์ตัวเอน อักษรตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ซึ่งเป็นอักษรแรกของชื่อจีนัส อักษรตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็ก ซึ่งเป็นอักษร 2 ตัวแรกของชื่อสปีชีส์

หมายเหตุ ถ้ามีชื่อรหัสของสายพันธุ์ก็ใส่ถัดมา และมีเลขโรมันกำกับเพื่อบอกลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้ ดังตารางที่ 10.1

เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอทั้งสองสายให้เป็น 5′-phosphate และ 3′-hydroxy โดยทั่วไปบริเวณจดจำของเอนไซม์ประกอบด้วยเบส 4 คู่ ถึง 6 คู่ ซึ่งลำดับเบสที่บริเวณจดจำมักมีการเรียงในลักษณะพาลินโดรม (palindromic sequence) คือมีลักษณะแกนสมมาตร ตัวอย่างเช่น *Eco*RI ซึ่งตัดแล้วได้ดีเอ็นเอปลายเหนียว (cohesive end) หรือ *Bal*I ซึ่งตัดแล้วได้ดีเอ็นเอปลายเรียบ (blunt end)

ตารางที่ 10.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2

จุลินทรีย์	ชื่อย่อของเอนไซม์	ลำดับเบสที่ตัด
Agrobacterium gelatinovorum	*Age*I	A CCGGT TGGCC A
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G GATCC CCTAG G
Escherichia coli RY13	*Eco*RI	G AATTC CTTAA G
Haemophilus influenzae R_d	*Hind*III	A AGCTT TTCGA A
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*I	GTT AAC CAA TTG
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*II	C CGG GGC C
Providencia stuartii 164	*Pst*I	CTGCA G G ACGTC
Streptomyces albus G	*Sal*I	G TCGAC CAGCT G



*Eco*RI

*Bal*I

การต่อโมเลกุลดีเอ็นเอจาก 2 แหล่งเข้าด้วยกันนั้น ดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวจะต่อเชื่อมได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอปลายเรียบ เนื่องจากส่วนปลายที่ยื่นออกมาจะเป็นเบสคู่สมกัน (complementary base pair) จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สมได้ ดังนั้นสามารถต่อดีเอ็นเอจาก 2 แหล่งเข้าด้วยกันได้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ DNA lygase

ดีเอ็นเอพาหะ

การนำดีเอ็นเอที่สนใจจากหลอดทดลองเข้าสู่เซลล์ ดีเอ็นเอนั้นต้องเพิ่มจำนวนได้ มิฉะนั้นดีเอ็นเอจะหมดไปเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว ดีเอ็นเอจึงต้องมีจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบ (origin of replication หรือ ORI) ดังนั้นจึงมีการฝากชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งมี ORI แยกอิสระจาก ORI ของโครโมโซม และการเลือกดีเอ็นเอพาหะต้องเลือกให้เหมาะสมกับเซลล์ให้อาศัย

ดีเอ็นเอพาหะมีหลายชนิด การใช้ดีเอ็นเอพาหะชนิดใดต้องพิจารณาถึงเซลล์ให้อาศัย ดังตารางที่ 10.2 ดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมกับเซลล์ให้อาศัยจำพวกแบคทีเรียมี 3 ชนิด

ตารางที่ 10.2 ดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมกับเซลล์ให้อาศัยแต่ละประเภท

ประเภทของเซลล์ให้อาศัย	ดีเอ็นเอพาหะ
เซลล์แบคทีเรีย	พลาสมิด, ฟาจ, คอสมิด
เซลล์สัตว์	ไวรัส เช่น SV40
เซลล์พืช	พลาสมิด เช่น Tumor inducing plasmid (Ti plasmid)
	ไวรัส เช่น Cauliflower Mosaic Virus (CMV)

1. พลาสมิด (plasmid)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) พบในแบคทีเรียหลายชนิด พลาสมิดจะมี ORI ของตัวเอง การถ่ายแบบจึงอิสระจากดีเอ็นเอของโครโมโซม (chromosomal DNA) พลาสมิดทำหน้าที่เก็บข้อมูลที่จะสร้างเป็นโปรตีนที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์ เช่น สร้างยาปฏิชีวนะ (antibiotic), สร้างสารต้านยาปฏิชีวนะ, สร้างสารพิษ, ผลิตเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ modification enzyme ลักษณะของพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่รูปวงแหวน มีขนาดตั้งแต่ 1–200 กิโลเบส เช่น pBR 322 และ pUC 19 ดังรูปที่ 10.5

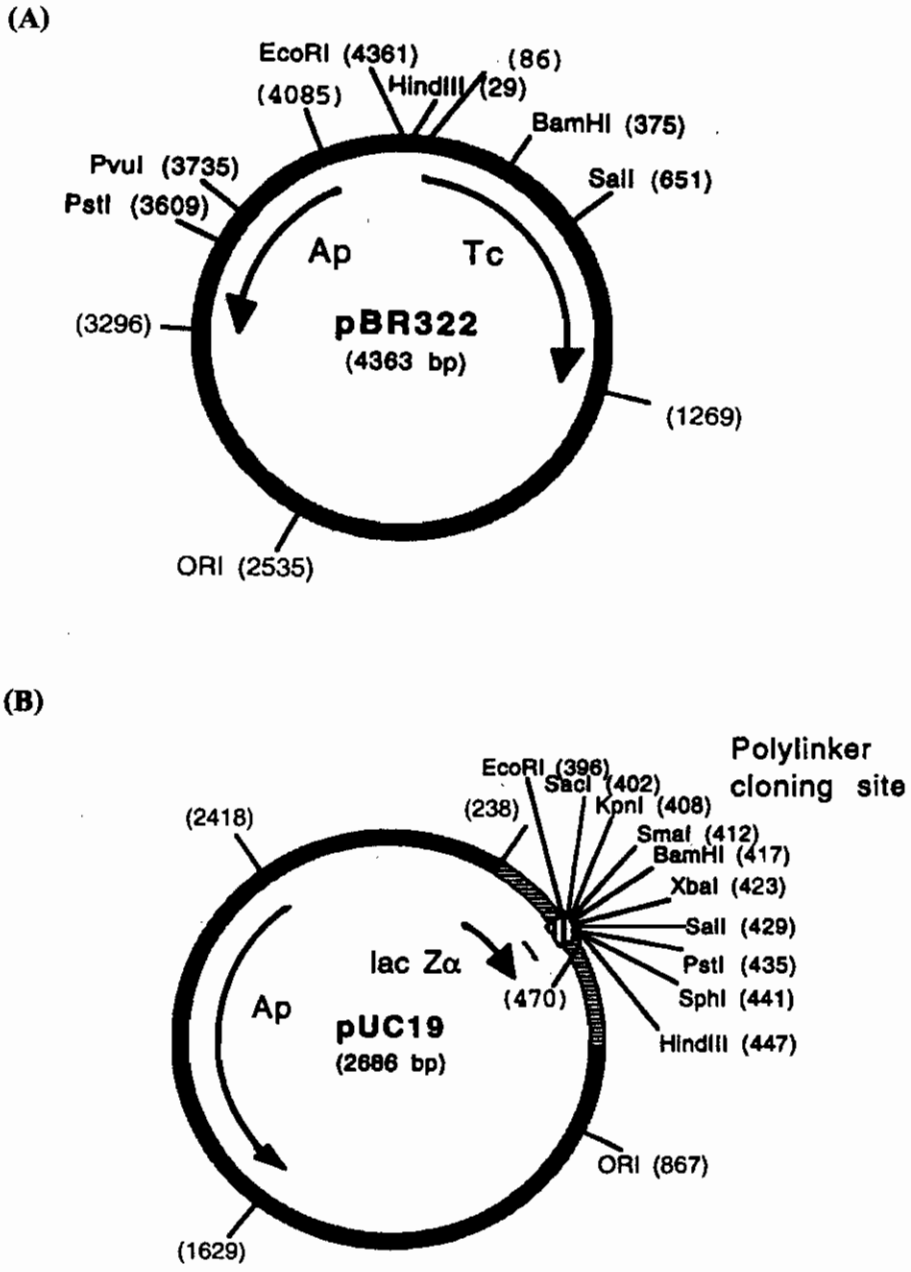
แบ่งพลาสมิดออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.1 stringent control plasmid

- การถ่ายแบบของพลาสมิดเกิดควบคู่กับการถ่ายแบบของ chromosomal DNA
- มีจำนวนพลาสมิด 1-3 ชุดต่อเซลล์

1.2 relaxed control plasmid

- การถ่ายแบบเกิดต่อไปแม้การถ่ายแบบของ chromosomal DNA จะหยุดลง
- สามารถเพิ่มจำนวนเป็นหลายพันชุดเมื่อเติม chloramphenicol ซึ่งจะไปหยุดการสร้างโปรตีนของเซลล์



รูปที่ 10.5 พลาสมิด (A) pBR 322 และ (B) pUC 19

คุณสมบัติที่ดีของพลาสมิด

• มีขนาดเล็ก เนื่องจากแยกพลาสมิดออกจาก chromosomal DNA ได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยสูง

• การถ่ายแบบเป็นแบบ relaxed control เนื่องจากสามารถเตรียมพลาสมิดได้ปริมาณมาก

• มียีนที่แสดงฟีโนไทป์อย่างชัดเจน เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมาย (selective marker) ซึ่งลักษณะฟีโนไทป์ที่นิยมคือ การต้านยาปฏิชีวนะ

• การตัดด้วย restriction enzyme คือถูกตัดด้วย restriction enzyme เพียงจุดเดียว และมีตำแหน่งที่ถูกตัดด้วย restriction engyme หลายชนิด

2. ฟาจ (phage หรือ bacteriophage) เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มาจากไวรัส แบ่งเป็น

2.1 λ phage มีลักษณะเป็น ds DNA ปลายเปิด มีขนาด 48.6 กิโลเบส ปลายเปิดทั้งสองด้านของดีเอ็นเอของ λ phage มีลักษณะเป็นปลายเหนียว (cohesive หรือ sticky end) ซึ่งเรียกว่า COS ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีความยาว 12 นิวคลีโอไทด์ ปลายเหนียวทั้งสองด้านมีลักษณะเป็นเบสคู่สมกัน เมื่อ λ phage บุกรุกเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย จะเปลี่ยนดีเอ็นเอจากปลายเปิดเป็นรูปวงแหวน วงจรชีวิตสามารถแบ่งเป็น 2 แบบ คือ

วงชีวิตแบบไลทิก

ดีเอ็นเอของ λ phage จะเริ่มถอดรหัสและแปลรหัสให้เป็นโปรตีนหลายชนิดที่จำเป็นในการถ่ายแบบของ λ phage การถ่ายแบบนี้จะให้ดีเอ็นเอที่เป็นปลายเปิดจำนวนมาก ช่วงหลังจะมีการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อประกอบเป็นอนุภาคของ λ phage ซึ่งจะได้รุ่นลูก (progeny phage) ประมาณ 100 อนุภาคต่อ 1 เซลล์ให้อาศัย เมื่อเซลล์ให้อาศัยแตก λ phage จะหลุดออกมานอกเซลล์ และบุกรุกเซลล์อื่นต่อไป

ยีนที่เกี่ยวข้องกับวงชีวิตแบบไลทิกของ λ phage จะอยู่ด้านปลายซ้ายขวาของ ds DNA ปลายเปิด คือช่วงประมาณ 0-18 กิโลเบส และช่วง 35-48.6 กิโลเบส ส่วนยีนช่วงกลาง คือช่วง 18-35 กิโลเบส นั้นสามารถตัดออกและใส่ดีเอ็นเออื่นแทนได้

วงชีวิตแบบไลโซจีนิก

เกิดขึ้นเมื่อวงชีวิตของไลทิกถูกยับยั้ง วงชีวิตแบบไลโซจีนิกนี้ ดีเอ็นเอของ λ phage ตรงช่วงกิโลเบสที่ 28-34 จะเข้าไปรวมตัวกับดีเอ็นเอของเซลล์ให้อาศัย ทำให้เซลล์ผลิต lysogen ซึ่งป้องกันการบุกรุกของอนุภาคอื่น การถ่ายแบบของ λ phage จะเกิดควบคู่ไปกับการถ่ายแบบของเซลล์ให้อาศัย

2.2 M13 phage เป็น ss DNA รูปวงแหวน มีขนาด 6.47 กิโลเบส เมื่อ M13 บุกรุกเซลล์ ss DNA จะเกิดการถ่ายเป็น ds DNA รูปวงแหวน ซึ่งเรียกว่าอยู่ในรูป replicative form (RF) จากนั้นจะเกิดการถ่ายแบบได้ ประมาณ 100 ชุด ต่อเซลล์ ในเวลาเพียง 2-3 นาที ต่อมาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอรูป RF จะต่ำลง เพราะขณะที่มีการถ่ายแบบเพื่อสร้างดีเอ็นเอ จะมีการสังเคราะห์โปรตีนและไปจับกับ complementary strand จึงมีการถ่ายแบบของดีเอ็นเอสายเดิมเท่านั้น ในแบบ rolling circle replication ได้ฟาจ 1000 อนุภาคต่อเซลล์ และหลุดออกจากเซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์แตก

จีโนมของ M13 จะมีดีเอ็นเอขนาด 507 เบส (ในช่วง 5498-6005) ที่ไม่จำเป็นต่อวงจรชีวิต จึงใช้ส่วนนี้ในการโคลนยีน

3. คอสมิด (cosmid)

ประกอบขึ้นจากจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบ (ORI) ของพลาสมิด และ COS ของ λ phage ดังนั้นจึงสามารถถ่ายแบบเช่นเดียวกับพลาสมิด และสามารถประกอบตัวเป็นอนุภาคฟาจ คอสมิดเป็นพาหะที่ใช้โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าพาหะอื่นๆ โดยมีขนาดใหญ่ได้มากถึง 44 กิโลเบส

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ

วิธีการดัดแปลงปลายของดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ

1. การเชื่อมดีเอ็นเอปลายเหนียวโดยการดัดแปลงปลาย 5′

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สนใจกับดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ ligase จะเกิดขึ้นได้ง่าย และมีประสิทธิภาพสูง โดยอาศัยการจับคู่ระหว่างเบสคู่สมกันของดีเอ็นเอปลายเหนียว ซึ่งโดยปกติจะจับคู่กันได้พอดี ถ้าชิ้นทั้งสองนั้นถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แต่มีข้อเสียคือดีเอ็นเอพาหะอาจเชื่อมต่อกันเหมือนเดิม หรือเชื่อมต่อกันเป็นไดเมอร์ (dimer) จึงดัดแปลงปลาย 5′ โดยดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5′ ของดีเอ็นเอพาหะออก โดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งทำหน้าที่ตัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5′ ของดีเอ็นเอ

2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเรียบ

ในกรณีที่เชื่อมดีเอ็นเอปลายเรียบ การเชื่อมต่อจะมีประสิทธิภาพต่ำ และต้องใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มาก ดังนั้นจึงดัดแปลงปลายของดีเอ็นเอให้มีปลายที่จับคู่กันได้ก่อนที่จะนำมาเชื่อม

2.1 การต่อกับตัวเชื่อม นำดีเอ็นเอปลายเรียบมาต่อกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวประมาณ 8-10 คู่เบส ซึ่งมีลำดับเบสของบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งได้แก่ linker และ adapter

linker คือชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ท่อนสั้นๆ ซึ่งสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี ประกอบด้วยบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น *Eco*RI linker

CCGAATTCGG

GCCTTAAGCC

*Eco*RI linker

adapter คือโมเลกุลดีเอ็นเอท่อนสั้นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น ประกอบด้วยส่วนปลายเป็นสายเดี่ยวที่เป็นคู่สมกับปลายดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น *Bam*HI adapter

5′-HO-GATCCCCGGG-OH

3′-HO-GGGCCC-P

*Bam*HI adapter

2.2 เชื่อมปลายที่ได้จากการสร้างให้มีเบสคู่สมกัน เป็นการใช้เอนไซม์ terminal transferase เร่งปฏิกิริยาเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′ ของดีเอ็นเอที่สนใจและดีเอ็นเอพาหะ โดยไม่ต้องอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบ ชนิดของนิวคลีโอไทด์ขึ้นกับชนิดของ dNTP ที่เติมลงไปในปฏิกิริยาโดยเลือกใช้นิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกัน

การเคลื่อนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย

วิธีการเคลื่อนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยมีดังนี้

1. Transformation

การนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย โดยทำให้แบคทีเรียนั้นกลายเป็น completent cell ซึ่งจะสามารถยอมให้ดีเอ็นเอผ่านเข้าสู่เซลล์ได้

วิธีการเตรียม completent cell

- เลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะ log phase
- แช่เซลล์ในสารละลาย $CaCl_2$ ที่ 0 °C เป็นระยะเวลาหนึ่ง
- เติม plasmid ลงไป ซึ่งจะเกิดสารเชิงซ้อน (complex) ของ hydroxylcalcium phosphate ที่ทนต่อ DNase และจะติดอยู่ที่ผนังเซลล์
- เปลี่ยนอุณหภูมิมาที่ 42 °C สารเชิงซ้อนจะถูกนำเข้าสู่เซลล์

2. Transfection

เป็นการนำดีเอ็นเอของฟาจ เข้าสู่เซลล์ให้อาศัยโดยตรง โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีดีเอ็นเอของฟาจกระจายอยู่ เมื่อแบคทีเรียได้รับดีเอ็นเอของฟาจแล้ว จะเกิดอนุภาคของฟาจขึ้นเป็นจำนวนมาก หลังจากเซลล์แตก อนุภาคของฟาจจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียข้างเคียง ทำให้เกิดเป็นจุดใส (clear plaque) ขึ้น

3. Transduction

เป็นการเคลื่อนดีเอ็นเอที่บรรจุอยู่ในอนุภาคของฟาจเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย การทำให้ดีเอ็นเอประกอบเป็นอนุภาคของฟาจทำได้ในหลอดทดลอง (*in vitro* packaging) โดยบ่มดีเอ็นเอกับโปรตีนที่สำคัญสำหรับการประกอบตัวเป็นอนุภาคของฟาจในสภาวะที่เหมาะสม

4. Electroporation

การใช้กระแสไฟฟ้าในการทำให้เกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้เซลล์ยอมรับดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ได้ดีขึ้น โดยใช้ขนาดของกระแสไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสม

การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

การต่อชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะแล้วนำเข้าสู่เซลล์ผู้รับ จะได้ประชากรของเซลล์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอต่างกันเป็นจำนวนมาก จึงต้องทำการตรวจหาโคลนที่ต้องการ ซึ่งวิธีที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของดีเอ็นเอพาหะที่นำมาใช้ในการโคลน

1. การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ คัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏซึ่งแตกต่างจากเซลล์ผู้รับเดิม เช่นการต้านยาปฏิชีวนะ หรือการสังเคราะห์สาร

2. การตรวจหาโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี ทำได้เมื่อโคลนที่ต้องการไม่แสดงฟีโนไทป์ที่ชัดเจน จึงไม่สามารถคัดเลือกโดยตรงได้ แต่โคลนที่ต้องการนั้นผลิตพอลิเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถตรวจสอบโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับพอลิเปปไทด์หรือโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบนั้น

วิธีทำ

- นำแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอพาหะลูกผสมมาเลี้ยง เพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีหรือ plaque บนจานเลี้ยงเชื้อ

- ย้ายโคโลนีหรือ plaque ลงบนแผ่น membrane filter

- ทำให้เซลล์แตก

- ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารรังสีหรือสารเคมีบางชนิด

- ตรวจสอบโดยทำ autoradiography, chemiluminescent หรือ colorimetric

3. การตรวจหาโดยวิธี nucleic acid hybridization

วิธีการคัดเลือกแบบนี้ใช้เมื่อโคลนที่ต้องการไม่แสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่จำเพาะ และอยู่ในดีเอ็นเอพาหะใดก็ตาม โดยใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกับส่วนใดส่วนหนึ่งของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งเรียกว่า probe

hybridization จึงหมายถึงการจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีเบสคู่สมกัน เพื่อใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมาย

วิธีทำ

- นำแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอลูกผสมมาเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีหรือ plaque บนจานเลี้ยงเชื้อ

- ย้ายโคโลนีหรือ plaque ลงบนแผ่น membrane filter

- ทำให้เซลล์แตก

- ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ

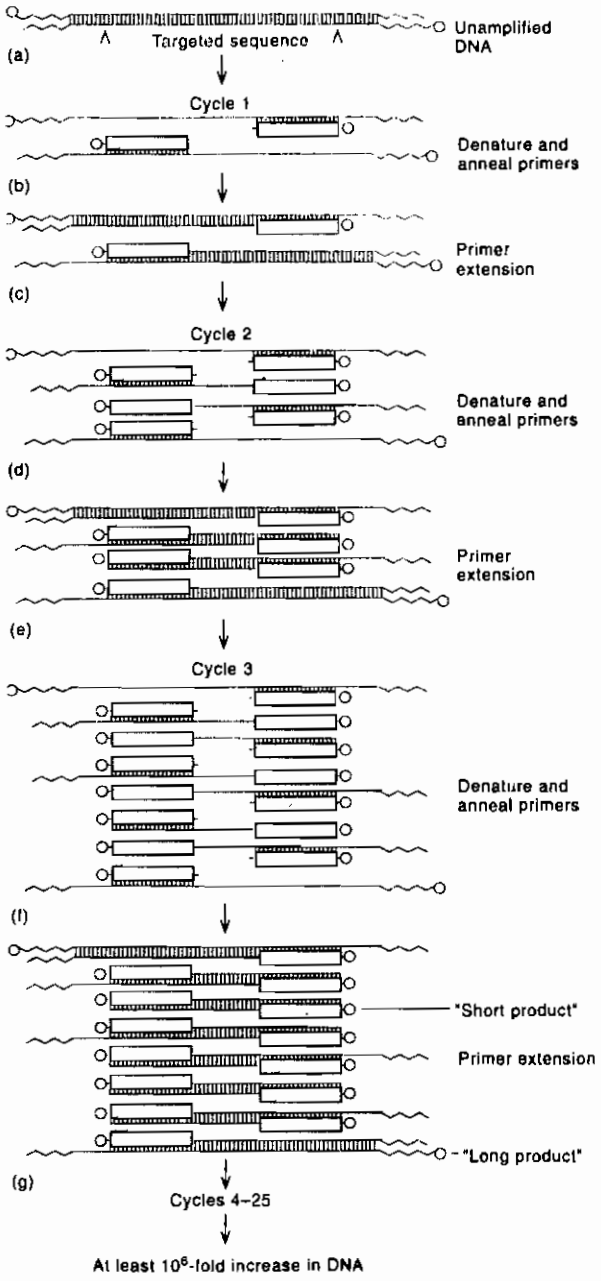
- ทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับกับ membrane filter โดยอบที่ 80 $^{\circ}$C

- นำมา hybridize กับ probe ที่ติดฉลากด้วยสารรังสีหรือสารเคมีบางชนิด

- ตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการจับระหว่าง probe กับดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยทำ autoradiography, chemiluminescent หรือ colorimetric

เทคนิค PCR

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการ DNA replication ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เป็นล้านๆ เท่าในเวลาอันสั้น เทคนิค PCR พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะ เทคนิค PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาในการทำไม่มาก การทำ PCR ใช้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ประมาณ 14-18 เบส จำนวน 2 สายที่จับอย่างจำเพาะกับเบสคู่สมบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยที่ครอบคลุมบริเวณสายดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หลังจากนั้นจะใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายด้าน 3′ ของ primer ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 1) denaturation temperature เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูงที่ 92–95 °C 2) annealing temperature เป็นอุณหภูมิที่ primer สามารถจับกับเบสคู่สมของสายดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิอยู่ในช่วง 37–60 °C และ 3) extension temperature เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ Taq DNA polymerase สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้ดีที่สุด ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72–75 °C จากขั้นตอนที่ 1–3 ซึ่งนับจำนวนเป็น 1 รอบ จะให้ผลิตผลเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ดังรูปที่ 10.6 เนื่องจากสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ในปฏิกิริยารอบแรกๆ สามารถทำหน้าที่เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยาในรอบถัดไปได้ ดังนั้นเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปหลายรอบ จะได้ดีเอ็นเอที่สนใจในปริมาณที่มากขึ้นเป็นทวีคูณ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจะถูกนำมาแยกออกจากกันตามขนาด โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูปที่ 10.6 ปฏิกิริยาการทำ PCR

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจสอบหาดีเอ็นเอจำเพาะ

2. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้าง primer จำเพาะ

3. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

4. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับ primer

5. บัฟเฟอร์สำหรับทำ PCR เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่างๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microtube) ที่มีปริมาตรในการบรรจุสาร 200 หรือ 500 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนด จะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) หรือเครื่อง Thermal cycler เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบ ขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและเวลาได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้ และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นคือ denaturing, annealing และ extension

ประโยชน์ของการทำ PCR

เทคนิค PCR มีความสำคัญต่องานด้านอณูชีววิทยา งานวิจัยที่เกี่ยวกับวิศวกรรมพันธุศาสตร์ การทดลองทางการแพทย์และการเกษตร ด้านการตรวจวินิจฉัยโรค เช่น การตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคเพื่อป้องกันหรือรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในด้านเกษตรกรรม เทคนิค PCR นำมาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์พืช หรือตรวจหาพืชตัดแต่งพันธุกรรม (GMOs)

การออกแบบ primer

การออกแบบ primer โดยทั่วไปสร้าง primer ให้มีความยาวเท่ากับ 18–30 นิวคลีโอไทด์ มี %GC เท่ากับ 40 – 60% ค่า T_m ของ primer คำนวณจากสมการ

$$T_m = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (G+C)$$

ในการทำ PCR ซึ่งใช้ primer จำนวน 2 สาย จะต้องพยายามออกแบบ primer ทั้ง 2 สาย ให้มีค่า T_m ใกล้เคียงกัน ค่า T_m ของ primer มีประโยชน์ในการตั้งอุณหภูมิในขั้นตอน annealing อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing อาจมากกว่าหรือน้อยกว่าค่า T_m เมื่อเริ่มทำการทดลองครั้งแรกอาจใช้ค่า annealing temperature ต่ำกว่าค่า T_m ลำดับเบสของ primer ต้องออกแบบให้มีการจับคู่ของเบสคู่สม เพื่อป้องกันการเกิด primer – dimer

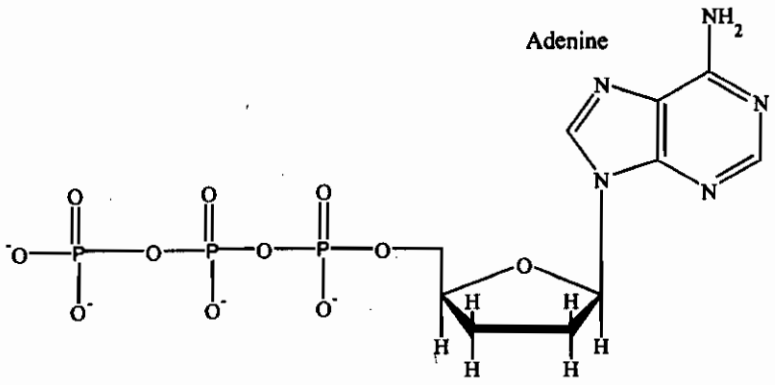
RT – PCR เป็นการทำ PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ เอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาคือ reverse transcriptase (RT)

การหาลำดับเบส

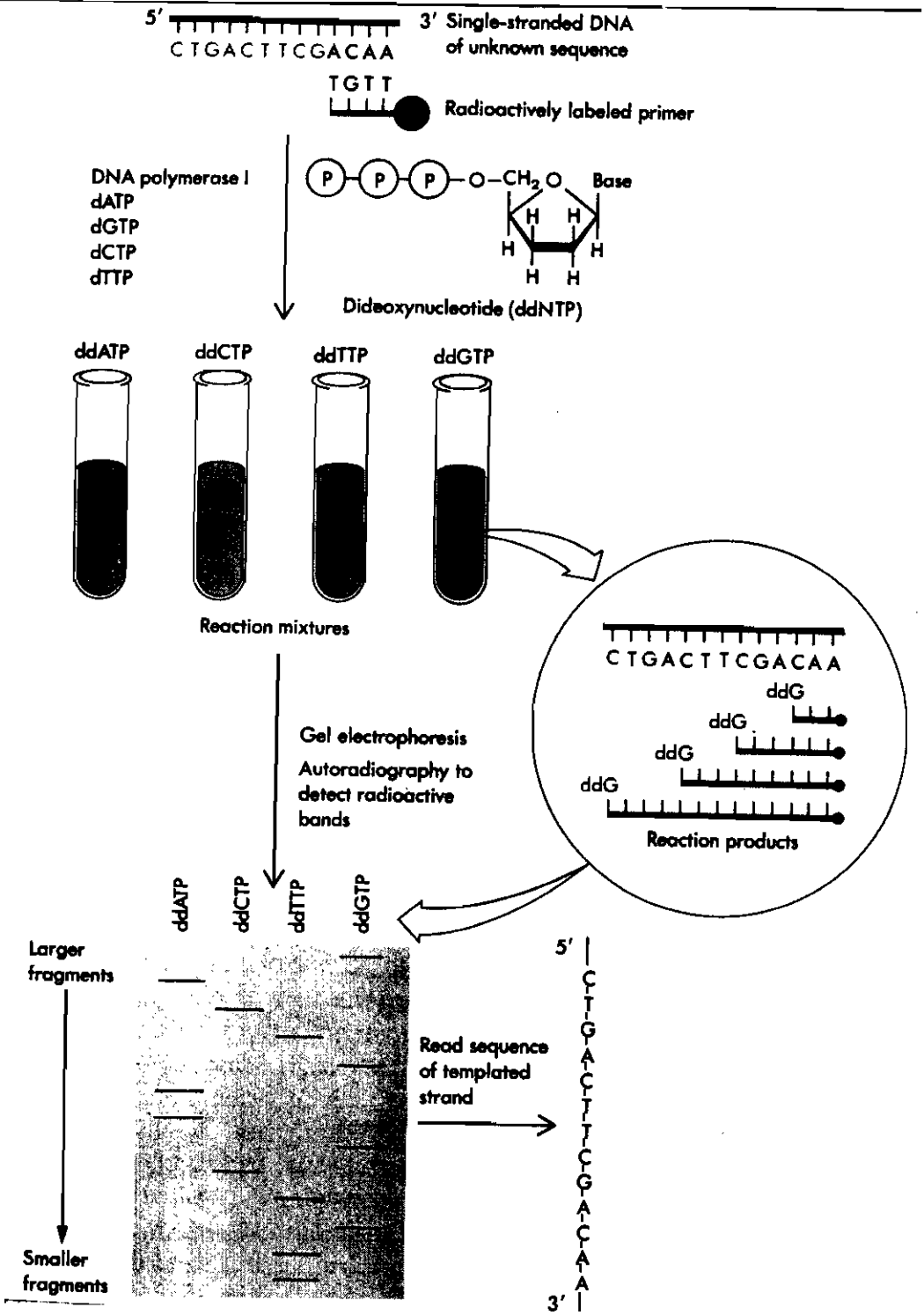
การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอมี 2 วิธี คือวิธีทางเคมี (chemical method) และวิธีทางเอนไซม์ (enzymatic method)

1. วิธีทางเคมีทำโดยติดฉลากที่ปลายด้าน 5′–phosphate แล้วผ่านขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ ที่มีความจำเพาะกับเบสทั้ง 4 ชนิด และแยกดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำ denaturing gel electrophoresis

2. วิธีทางเอนไซม์ วิธีการคือนำดีเอ็นเอสายคู่ที่จะหาลำดับเบสมาแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อน จากนั้นจึงใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมี primer ที่มีความจำเพาะต่อปลายด้าน 3′–hydroxy และเริ่มปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกหยุดการสร้างเมื่อมีการเติมสับสเตรทที่เป็น dideoxynucleotide (ddNTP) มี 4 ชนิด คือ ddATP (รูปที่ 10.7), ddCTP, ddGTP และ ddTTP ดีเอ็นเอสายใหม่มีขนาดแตกต่างกันตามจำนวนของนิวคลีโอไทด์ในปฏิกิริยาทั้ง 4 ปฏิกิริยา ดังรูปที่ 10.8 สายดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเหล่านี้จะถูกนำมาแยกออกจากกันโดยการทำ denaturing gel electrophoresis



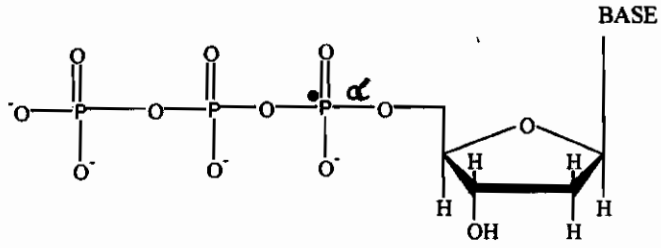
รูปที่ 10.7 โครงสร้างของ ddATP



รูปที่ 10.8 การหาลำดับเบสด้วยวิธีเอนไซม์

วิธีการหาลำดับเบสโดยใช้เอนไซม์สามารถติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีได้ 2 แบบ คือ การติดฉลากที่ปลายด้าน 5′–phosphate ของ primer และการติดฉลากดีเอ็นเอที่กำลังถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยา การใช้สารตั้งต้นจึงแตกต่างกัน โดยการติดฉลากที่ปลายด้าน 5′-phosphate ของ primer จะใช้สารตั้งต้นที่เป็น [γ–^{32}P] dNTP ส่วนการติดฉลากบนสายดีเอ็นเอที่กำลังถูกสร้างขึ้นจะใช้สารที่ตั้งต้นที่เป็น [α–^{32}P] dNTP ดังรูปที่ 10. 9 สำหรับชนิดของสารกัมมันตรังสีที่ใช้นอกจากจะมี ^{32}P แล้ว ยังใช้ ^{33}P หรือ ^{35}S ได้ สารกัมมันตรังสีทั้ง 3 ชนิด ให้พลังงานที่ปล่อยออกมาในรูป β–particle แต่ต่างกันที่ค่าพลังงานที่ปล่อยออกมา

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอัตโนมัติที่เรียกว่า Automatd DNA sequencer ซึ่งเป็นการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์และใช้สารเรืองแสงแทนการใช้สารกัมมันตรังสี โดยทำการติดฉลากสารดังกล่าวที่ปลายด้าน 5′–phosphate ของ primer ที่ใช้หาลำดับเบส (dye–primer sequencing) หรือการใช้ dideoxynucleotide ที่มีสารเรืองแสงแต่ละแบบในการหยุดปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (dye–termination sequencing) วิเคราะห์ผลโดยการตรวจนับช่วงคลื่นของสารเรืองแสง และรายงานผ่านคอมพิวเตอร์



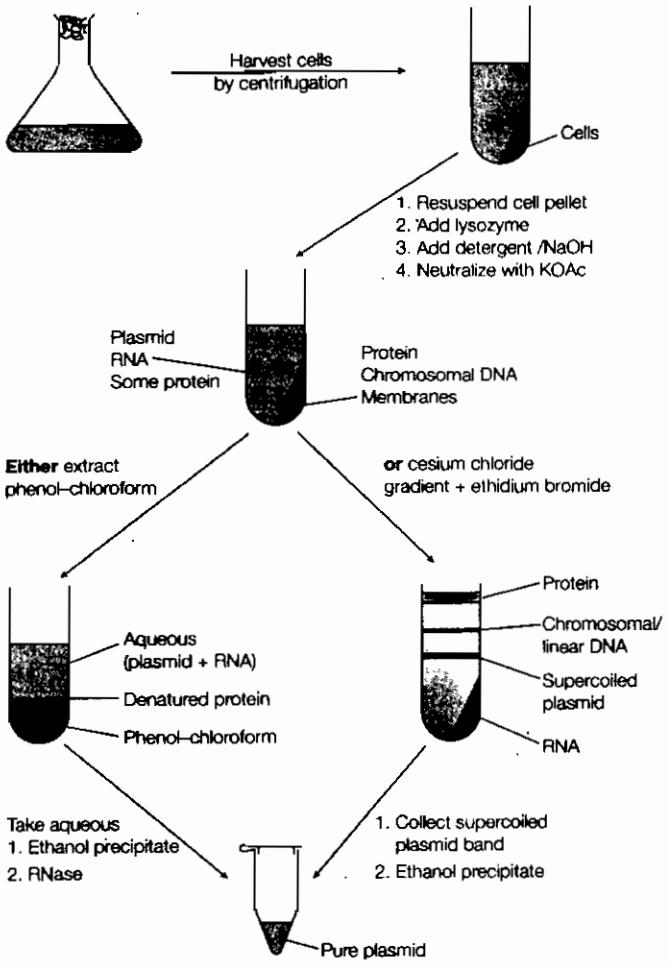
รูปที่ 10.9 โครงสร้างของ nucleotide ที่เป็นสารกัมมันตรังสี ; [α–^{32}P] dNTP

การทดลองที่ 10.1

การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) นิยมใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีน เนื่องจากขั้นตอนหนึ่งในการโคลน คือการนำดีเอ็นเอที่สนใจไปต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะก่อนที่จะนำเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย การเตรียมพลาสมิดเป็นการเตรียมโดยให้มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของโครโมโซม (chromosomal DNA) และสารเจือปนอื่นๆ น้อยที่สุด

ขั้นตอนในการเตรียมพลาสมิดคือ ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยให้เชื้อเจริญอยู่ในระยะล็อกเฟส (log phase) พลาสมิดชนิดที่มีการถ่ายแบบเป็นแบบ relaxed control สามารถเพิ่มจำนวนชุดต่อเซลล์ให้สูงขึ้น โดยการเติมคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้เชื้อเจริญต่อไปอีก 6–16 ชั่วโมง ทำลายผนังเซลล์โดยใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) และทำให้เซลล์แตกโดยใช้ SDS สกัดพลาสมิดในสภาวะที่เป็นเบส เรียก alkaline extraction ซึ่งในสภาวะนี้ดีเอ็นเอของโครโมโซมและพลาสมิดจะเสียสภาพธรรมชาติ (denature) เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สมถูกทำลาย เมื่อทำให้กลับสู่สภาวะที่เป็นกลาง (neutral) โดยการเติม sodium acetate pH 4.8 พลาสมิดจะสามารถคืนสู่สภาพธรรมชาติ (renature) ได้ เพราะพลาสมิดมีขนาดเล็กและมีรูปร่างกลม ส่วนดีเอ็นเอของโครโมโซมยังคงเสียสภาพและรวมตัวกันเป็นกลุ่มและตกตะกอน สามารถแยกพลาสมิดออกจากดีเอ็นเอของโครโมโซม เศษเซลล์ (cell debris) และชีวโมเลกุลอื่นๆ โดยการเซนตริฟิวจ์ การเตรียมพลาสมิดให้บริสุทธิ์อาจทำการสกัดด้วยฟีนอล–คลอโรฟอร์ม หรือเซนตริฟิวจ์แยกในซีเซียมคลอไรด์ผสมกับเอทิเดียมโบรไมด์ ดังรูป



ขั้นตอนการแยกพลาสมิด

1. การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ภาชนะบรรจุน้ำแข็ง

เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)

เครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (microcentrifuge)

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

E. Coli pBR 322

ampicillin

LB broth (1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)

lysozyme solution (50 mM glucose, 25 mM Tris–HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml lysozyme)

lysis solution (0.2 N NaOH, 1% SDS)

neutralize solution (3 M sodium acetate, 3 M acetic acid)

isopropanol

70% ethanol

TE buffer (10 mM Tris – HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

หมายเหตุ อุปกรณ์ที่เป็นแก้วและพลาสติกทุกชนิด รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ต้องทำให้ปราศจากเชื้อและนิวคลีเอส โดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ส่วนยาปฏิชีวนะให้กรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

วิธีการทดลอง

1. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. Coli* ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pBR 322 โดยเขี่ยจากโคโลนีเดี่ยวที่อยู่บน LB agar ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยสำลี นำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่ 37 °C ตลอดคืน

1.2 เขย่าเชื้อให้กระจายทั่วกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิเปตต์เชื้อ 1 มิลลิลิตรใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนซึ่งเป็นน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนซึ่งเป็นเซลล์ของ *E. Coli*

2. การแยกพลาสมิด

2.1 นำตะกอนของเซลล์ *E. Coli* มาเติม lysozyme solution 0.2 มิลลิลิตร ปิดปากหลอด ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

2.2 เติม lysis solution 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง และแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

2.3 เติม neutralize solution ที่เย็น ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

2.4 เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.5 ดูดสารละลายส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ โดยระวังอย่าให้ปนเปื้อน เติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตรเท่ากับส่วนบนที่แยกมา ผสมให้เข้ากัน

2.6 ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอนของพลาสมิดดีเอ็นเอ

2.7 ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล โดยปิเปตต์ 70% เอทานอล 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด ปิดฝาหลอด และเขย่าหลอดให้ตะกอนลอยขึ้นมาจากก้นหลอด

2.8 เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง เปิดฝาหลอด และวางหลอดคว่ำลง รอให้ตะกอนแห้ง

2.9 ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2. การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปตต์แก้ว

หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

ภาชนะบรรจุน้ำแข็ง

เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)

เครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge)

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

E. Coli pBR 322

ampicillin

chloramphenicol

LB broth (1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)

lysozyme solution (50 mM glucose, 25 mM Tris– HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml lysozyme)

lysis solution (0.2 N NaOH, 1% SDS)

neutralize solution (3 M sodium acetate, 3 M acetic acid)

isopropanol

70% ethanol

TE buffer (10 mM Tris – HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

หมายเหตุ อุปกรณ์ที่เป็นแก้วและพลาสติกทุกชนิด รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ต้องทำให้ปราศจากเชื้อและนิวคลีเอส โดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ส่วนยาปฏิชีวนะให้กรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

วิธีการทดลอง

1. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. Coli* ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pBR 322 โดยเขี่ยจากโคโลนีเดี่ยวที่อยู่บน LB agar ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยสำลี นำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่ 37 °C ตลอดคืน

1.2 ปิเปตต์เชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยที่มี LB ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยสำลี เขย่าที่ 37 °C จนเซลล์เจริญถึงระยะล็อกเฟส โดยวัด A_{550} ได้ประมาณ 0.4 – 0.5 ซึ่งใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 3 – 5 ชั่วโมง

1.3 เติมคลอแรมฟีนิคอลที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 37 °C เป็นเวลา 6–16 ชั่วโมง

1.4 แบ่งเชื้อใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 50 มิลลิลิตร 2 หลอด เซนตริฟิวจ์เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อ

2. การแยกพลาสมิด

2.1 นำตะกอนแต่ละหลอดมาเติม lysozyme solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

2.2 เติม lysis solution 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดไปมา แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

2.3 เติม neutralize solution ที่เย็น ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที

2.4 เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.5 ดูดส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ โดยระวังอย่าให้ตะกอนปนเปื้อน เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนบนที่แยกมา ผสมให้เข้ากัน

2.6 เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง

2.7 ล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.8 เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง วางหลอดโดยเอียงหลอดคว่ำลง รอให้ตะกอนแห้ง

2.9 ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

คำถาม

1. เหตุใดจึงสามารถแยกพลาสมิดออกจากดีเอ็นเอของโครโมโซมได้ด้วยวิธี alkaline extraction

.....

.....

2. พลาสมิดที่แยกได้มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

การทดลองที่ 10.2

การสกัดดีเอ็นเอจากใบไม้

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดลักษณะต่างๆ จากบรรพบุรุษไปสู่ลูก โดยทั่วไปประกอบด้วยดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ 2 สายมาพันกันเป็นเกลียวคู่ (double helix) ซึ่งดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์แต่ละสายประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างที่เป็นเบสซึ่งแตกต่างกัน 4 ชนิด (A, C, G, T) เรียงลำดับกันอย่างต่อเนื่อง ลำดับเบสในดีเอ็นเอนี้มีความจำเพาะต่อการสร้างโปรตีนต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต

ดีเอ็นเอในเซลล์สิ่งมีชีวิตขั้นสูงจะอยู่รวมกับโปรตีนเป็น DNA-Protein complex มีการขดพับของดีเอ็นเออยู่ในรูปโครโมโซม

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยบดเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ที่มี hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ซึ่งเป็นสารดีเทอร์เจน มีผลทำให้เซลล์แตก แล้วทำการสกัดโปรตีนออกด้วยคลอโรฟอร์ม

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตของกรดนิวคลีอิก

สารละลายดีเอ็นเอสามารถในการดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง UV โดยจะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คุณสมบัตินี้เกิดจากเบสซึ่งเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นสารประกอบอโรมาติก คุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของกรดนิวคลีอิก

DNA 50 µg/ml มีค่า $A_{260} = 1$

โปรตีนดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีมีอัตราส่วน

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1.8 - 2.0$$

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ครกกระเบื้อง (morta)

หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

หลอดคิวเวตต์ควอทซ์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

เครื่องเซนตริฟิวจ์

สารเคมี

ใบไม้

extraction buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA , 2 % CTAB, 1 % β-mercaptoethanol)

chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)

3 M sodium acetate

absolute ethanol

TE buffer

วิธีการทดลอง

1. นำใบไม้ประมาณ 1 กรัม ใส่ extraction buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บดใบไม้ให้ละเอียด เติม extraction buffer อีก 2 มิลลิลิตร บดใบไม้อีกครั้ง

2. แบ่งส่วนสารละลายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็กจำนวน 4 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที

3. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายโดยกลับหลอดขึ้น – ลง ประมาณ 2 นาที

4. นำสารไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แบ่งสารละลายส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol ซ้ำอีก 1 – 2 ครั้ง

5. นำสารละลายส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอลปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรที่มีอยู่เดิม และ 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่า ผสมเบาๆ โดยกลับหลอดขึ้น – ลง นำไปแช่ที่ –20 °C 10 นาที หรือแช่ข้ามคืน สังเกตว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้นหรือไม่

6. นำสารไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอทานอลทิ้ง เก็บตะกอนและผึ่งให้ตะกอนแห้ง

7. ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

8. นำสารละลายมาทำการเจือจางแล้วนำไปวัด A_{260} และ A_{280}

คำถาม

1. สารแต่ละชนิดที่ใส่ใน extraction buffer มีประโยชน์อะไร

.....

.....

.....

2. ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณเท่าใด

.....

.....

.....

3. ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดีหรือไม่

.....

.....

.....

การทดลองที่ 10.3

การสกัดดีเอนเอจากแมลง

การทดลองนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูงประเภทสัตว์ โดยนำแมลงระยะตัวอ่อนมาบดในบัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์แตกโดยใช้ SDS ใช้เอนไซม์ proteinase K และ ribonuclease A เพื่อทำลายโปรตีนและอาร์เอ็นเอ ตามลำดับ จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วยฟีนอล และทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ปีเปตต์แก้ว

ปีเปตต์อัตโนมัติ

หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า

เครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

STE buffer

TE buffer

20 % SDS

10 mg/ml proteinase K

10 mg/ml ribonuclease A

phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)

chloroform:isoamyl alcohol (24:1)

3 M sodium acetate

absolute ethanol

70% เอทานอล

TBE buffer

อะกาโรส

6 x loading dye

1 μg/ml ethidium bromide

วิธีการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) จากแมลง ทำโดยนำแมลงมาบดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี STE buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร เมื่อบดเนื้อเยื่อจนละเอียดแล้วจึงเติมสารละลาย 20% SDS จำนวน 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร proteinase K จำนวน 25 ไมโครลิตร และสารละลาย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ribonuclease A (Rnase A) จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือบ่มไว้ข้ามคืน

1.2 ทำการเซนตริฟิวจ์แยกสารละลายออกจากตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายที่แยกได้

1.3 นำส่วนของสารละลายมาสกัดโปรตีนออก โดยเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เซนตริฟิวจ์ให้แยกชั้นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.4 นำสารละลายชั้นบนมาเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่แยกได้อีกครั้ง ปั่นแยกสารละลายชั้นบน ทำการสกัดจนไม่มีคราบโปรตีนอยู่ระหว่างชั้น

1.5 เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ผสมสารให้เข้ากันแล้วเซนตริฟิวจ์แยกสารละลายที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.6 นำสารละลายชั้นบนมาเติมสารละลาย 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนโดยการเติมเอทานอล (absolute ethanol) ที่เย็นจำนวน 2.5 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ –70 °C เป็นเวลา 15 นาที หรือแช่ข้ามคืนที่อุณหภูมิ –20 °C

1.7 แยกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วล้างเกลือออกด้วย 70% เอทานอล เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำมาทำให้แห้งหมาดๆ โดยใช้ลมร้อนซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 นาที หรือผึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.8 นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 °C

2. การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางในบัฟเฟอร์ TE จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดย A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{280} ซึ่งควรอยู่ในช่วง 1.80–2.00 ถ้าต่ำกว่า 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากมีโปรตีนปนอยู่

2.2 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

วิเคราะห์ปริมาณ ขนาด และคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ด้วยวิธี submarine horizontal gel electrophoresis โดยใช้ 0.7% อะกาโรสในบัฟเฟอร์ TBE

คำถาม

1. ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดเท่าใด

.....

.....

.....

2. ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่าใด

.....

.....

.....

3. ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีมีคุณภาพดีหรือไม่

.....

.....

.....

4. ถ้าต้องการดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ขึ้นควรทำการทดลองอย่างไร

.....

.....

.....

การทดลองที่ 10.4

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การทดลองนี้เป็นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดแลมป์ดาดีเอ็นเอ (λ-DNA) และนำผลที่ได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ เอนไซม์ที่ใช้คือ *Hind*III และเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เป็น unknown (mystery endonuclease; *Mys*I)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ปิเปตต์อัตโนมัติ

ชุดอุปกรณ์ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C และ 65 °C

ภาชนะบรรจุน้ำแข็ง

สารเคมี

λDNA

λDNA / *Hind*III

*Hind*III

*Mys*I

reaction buffer

TAE buffer

EtBr

วิธีการทดลอง

1. การตัดแลมป์ดาดีเอ็นเอ

1.1 เตรียมหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร 3 หลอด ใส่สารดังตาราง โดยใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นลำดับสุดท้าย

สาร \ หลอดที่	ปริมาตรสารของหลอดที่ (µl)		
	1	2	3
10 x reaction buffer	1	1	1
dd H2O	6	6	5
0.5 µg/µl λDNA	2	2	2
*Hin*dIII	1	-	1
***Mys*I**	-	1	1

1.2 เซนตริฟิวจ์สารละลายให้ผสมกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

1.3 เติม tracking dye 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดทั้ง 3

1.4 หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาแช่ไว้ในน้ำแข็ง หรือเก็บที่ –20 °C

2. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.1 เตรียม 1% อะกาโรสเจลในบัฟเฟอร์ TAE

2.2 เตรียมชุดอุปกรณ์ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่ยางกันรั่ว เท เจลที่เตรียมไว้ใส่ถาดและใส่หวีทันที ตั้งไว้ให้เจลแห้ง

2.3 นำส่วนหวีและยางกันรั่วออก ย้ายเจลใส่ลงในแชมเบอร์

2.4 เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเจล

2.5 ใส่สารทั้ง 3 หลอดที่ได้ทำการตัดแลมป์ดาดีเอ็นเอไว้ลงในช่องเจล ช่องหนึ่งของเจลให้ใส่ λDNA / *Hin*dIII มาตรฐาน

2.6 ต่อวงจรไฟฟ้าให้ครบวงจร เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ตั้งความต่างศักย์คงที่ที่ 120 โวลท์ เมื่อสังเกตเห็นสีน้ำเงินของบลอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงส่วนล่างเหลือประมาณ 1 นิ้ว ให้ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า

2.7 นำอะกาโรสเจลใส่ลงในกล่องพลาสติกที่สะอาด แล้วใช้ช้อนพายตักอะกาโรสเจลใส่ลงในสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ แช่ไว้ 5–10 นาที จากนั้นใช้ช้อนพายตักอะกาโรสเจลขึ้นมาแช่ในน้ำกลั่น 20 นาที เพื่อล้างเอทิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก

2.8 ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และวาดรูปแสดงการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ

คำถาม

1. λDNA มีขนาดเท่าใด เมื่อตัดด้วย *Hin*dIII ได้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดกี่ชิ้น แต่ละชิ้นมีขนาดเท่าใด

   .....

   .....

   .....

2. เมื่อตัด λDNA ด้วยเอนไซม์ unknown (*Mys*I) ได้ชิ้นดีเอ็นเอกี่ชิ้น แต่ละชิ้นมีขนาดเท่าใด เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ชื่ออะไร

   .....

   .....

   .....

การทดลองที่ 10.5

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีสต์โดยเทคนิค PCR

การทดลองนี้เป็นการใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีสต์ เทคนิค PCR สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการคือ SSK1 ได้เป็นจำนวนมากโดยใช้เวลาน้อย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ปิเปตต์อัตโนมัติ

หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

เครื่อง PCR

สารเคมี

yeast DNA

10 x PCR buffer

(20 mM Tris- Cl pH 8.5, 15 mM $MgCl_2$, 250 mM KCl, 0.5 % Tween 20)

DNA template (1 mg/ ml yeast DNA)

DNA primers

SSK1-1 (upstream primer) MW 13,900

GGG AAG CTT CAT ATG CTC AAT TCT GCG TTA CTG TGG AAG GTT TGG

SSK1-2 (downstream primer) MW 11,865

GGG GAA TTC CTA TCA TAA TGT CCT CTA CAC GGT ACA ACC

1.0 mM dNTP

Taq polymerase

วิธีการทดลอง

1. การทำ PCR

1.1 ปิเปตต์สารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR ดังตาราง

สาร	ปริมาณ
10x PCR buffer	10 µl
1.0 ng /µl yeast DNA	10 µl
10 pmol/µl SSK1-1 primer	2 µl
10 pmol/µl SSK1-2 primer	2 µl
10 µg/µl BSA	2 µl
1 mM dNTP	5 µl
Taq polymerase	2 Units
เติม ddH_2O เพื่อปรับปริมาตรรวมเป็น	100 µl

1.2 นำหลอด PCR ใส่เข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิ และเวลาดังนี้

denaturing : 95 ^{o}C , 30 วินาที

annealing : 55 ^{o}C , 30 วินาที

extension : 72 ^{o}C , 90 วินาที

จำนวน 30 รอบ

final extension : 72 ^{o}C , 5 นาที

ตั้งอุณหภูมิคงที่ 4 ^{o}C จนกว่าจะเก็บตัวอย่างไปทดสอบ PCR product

1.3 นำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR ไปวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR

2.1 ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ว่ามีขนาดและปริมาณเท่าใด รวมทั้งตรวจว่ามี non specific PCR product หรือไม่ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับ loading จำนวน 2 ไมโครลิตร

2.2 นำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ในบัฟเฟอร์ TBE ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ นานประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที

2.3 นำเจลไปย้อมในเอทิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ตรวจดูว่าช่องดีเอ็นเอตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นกี่แถบ รวมทั้งสังเกตว่ามี primer dimer หรือไม่

หมายเหตุ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้คือ 100 bp DNA ladder มีดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 11 ชิ้น คือ 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 คู่เบส เมื่อนำ 100 bp DNA ladder จำนวน 5 ไมโครลิตร มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะได้ดีเอ็นเอขนาดต่างๆ มีปริมาณเท่ากับ 150 นาโนกรัม ส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน 50–100 bp DNA ladder มีดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 9 ชิ้น คือ 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100 และ 50 คู่เบส เมื่อนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอทุกขนาดมีปริมาณเท่ากับ 50 นาโนกรัม

3. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

3.1 การใช้คอลัมน์

3.1.1 ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR

3.1.1.1 นำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ purification จำนวน 100

ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร เติมเรซินจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลาประมาณ 3 นาที

3.1.1.2 นำสารทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ที่ต่ออยู่กับด้านปลายของหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ใส่กระบอกสูบลงในเข็มฉีดยา แล้วกดกระบอกสูบลงเพื่อไล่ของเหลวออก ดึงคอลัมน์และกระบอกสูบออกจากหลอดฉีดยาตามลำดับ

3.1.1.3 สวมคอลัมน์เข้าที่ปลายหลอดฉีดยาอีกครั้ง แล้วเติม 80% isopropanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่กระบอกสูบลงในเข็มฉีดยา แล้วกดกระบอกสูบลงจนสุดเพื่อชะคอลัมน์ จากนั้นนำคอลัมน์ไปสวมเข้ากับหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

3.1.1.4 ย้ายคอลัมน์ไปสวมกับหลอดปั่นหลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นจำนวน 20 ไมโครลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 นาที จึงนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

3.1.2 ดีเอ็นเอที่แยกได้จากชิ้นอะกาโรส

3.1.2.1 นำอะกาโรสที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เติมเรซิน 1 มิลลิลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 70 $^{\circ}$C จนกระทั่งอะกาโรสละลายหมด

3.1.2.2 เติมบัฟเฟอร์สำหรับ purification จำนวน 100 ไมโครลิตร และทำตามขั้นตอนในข้อ 3.1.1.1 ต่อไป

3.2 การใช้ Geneclean

3.2.1 นำดีเอ็นเอจาก PCR product หรือดีเอ็นเอที่แยกได้จากชิ้นอะกาโรสมาเติม NaI จำนวน 450 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ TBE modifier จำนวน 50 ไมโครลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C จนกระทั่งอะกาโรสละลายหมด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที จึงใส่ glassmilk 5 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที

3.2.2 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 8,000 รอบต่อนาที แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย new wash 3 ครั้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้ลมร้อน

3.2.3 ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที แล้วเซนตริฟิวจ์แยกเอา glassmilk ออกจากสารละลายดีเอ็นเอ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 °C

คำถาม

1. PCR product ที่ต้องการมีขนาดเท่าใด

.....

.....

.....

2. PCR product มี nonspecific DNA เกิดขึ้นหรือไม่ nonspecific DNA ลักษณะอย่างไร

.....

.....

.....