บทที่ 8
พันธุวิศวกรรม

วัตถุประสงค์

1. บอกประโยชน์ของพันธุวิศวกรรมทางด้านการแพทย์ การเกษตร และสิ่งแวดล้อมได้
2. อธิบายวิธีการถ่ายทอด DNA เข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้ Agrobacterium และใช้ gene gun ได้
3. อธิบายความหมายของคำว่าพืชดัดแต่งพันธุกรรมและสัตว์ดัดแต่งพันธุกรรมได้
4. ระบุองค์ประกอบที่ใช้ในการโคลน DNA ได้
5. อธิบายความแตกต่างระหว่าง genomic DNA และ Complementary DNA ได้
6. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง restriction enzyme type I, II และ III ได้
7. อธิบายความหมายของคำต่อไปนี้ได้ palindrome, sticky end, blunt end, 5′ – protruding end และ compatible end ได้
8. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง stringent plasmid กับ relaxed plasmid ได้
9. อธิบายวงจรชีวิตแบบไลทิก และ แบบไลโซจีนิกได้
10. อธิบายการเพิ่มจำนวนของ M13 phage ใน host cell ได้
11. อธิบายคุณสมบัติของ cosmid ได้
12. อธิบายวิธีการเชื่อมต่อชิ้น DNA กับ Vector ด้วยวิธีการ cohesive end ligation และวิธีการ blunt end ligation ได้
13. อธิบายวิธีการนำ vector ลูกผสม เข้าสู่ host cell ด้วยวิธีการ transformation, transfeotion, transduction และ electroporation ได้
14. อธิบายวิธีการตรวจคัดเลือก host cell ที่มี vector ลูกผสมด้วยวิธีการ phenotypic screening, immunochemical screening และ nucleic acid hybridization screening ได้
15. อธิบายวิธีการวิเคราะห์และตรวจสอบ DNA ที่โคลน ได้
16. อธิบายวิธีการหาลำดับเบสของ DNA โดยวิธีการทางเคมีและใช้เอนไซม์ได้
17. อธิบายหลักการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCRได้

เค้าโครงเรื่อง

พันธุวิศวกรรม

8.1 ประโยชน์ของพันธุวิศวกรรม

8.1.1 ประโยชน์ทางด้านการแพทย์

8.1.2 ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

8.1.3 ประโยชน์ทางด้านการเกษตร

8.2 หลักการพื้นฐานของพันธุวิศวกรรม

8.3 การโคลน DNA

8.3.1 การเตรียม DNA ที่สนใจ

8.3.1.1 Genomic DNA

8.3.1.2 Complementary DNA

8.3.1.3 DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการทางเคมี

8.3.2 การเตรียม Vector หรือ DNA พาหะ

8.3.2.1 Plasmid

8.3.2.2 Phage

8.3.2.3 Cosmid

8.3.3 การสร้าง Recombinant DNA

8.3.3.1 Cohesive end ligation

8.3.3.2 Blunt end ligation

8.3.4 การนำ Recombinant DNA เข้าสู่ host cell

8.3.4.1 Transformation

8.3.4.2 Transfection

8.3.4.3 Transduction

8.3.4.4 Electroporation

8.3.5 การตรวจคัดเลือก host cell ที่มี recombinant DNA ที่สนใจ

8.3.5.1 Phenotypic screening

8.3.5.2 Immunochemical screening

8.3.5.3 Nucleic acid hybridization screening

8.3.6 การวิเคราะห์และตรวจสอบ DNA ที่โคลนได้

8.3.6.1 การหาขนาดของ DNA

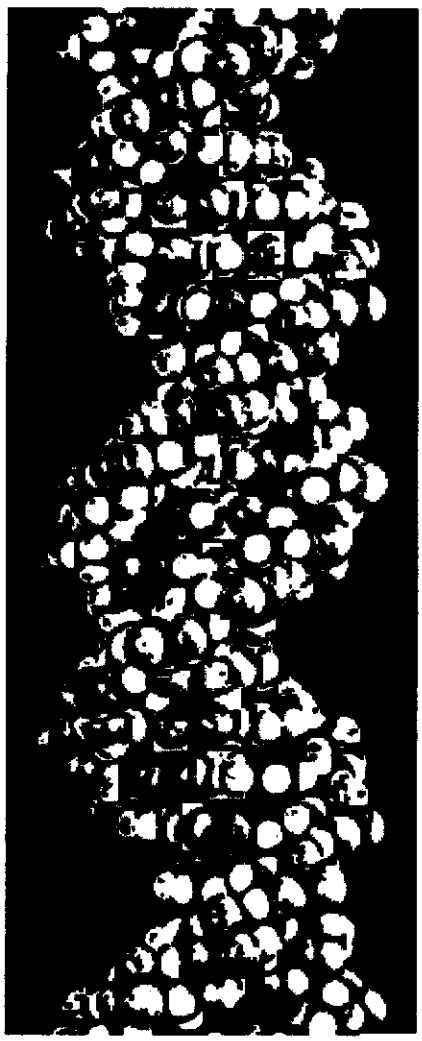
8.3.6.2 การหาลำดับเบสของ DNA

8.4 Polymerase Chain Reaction

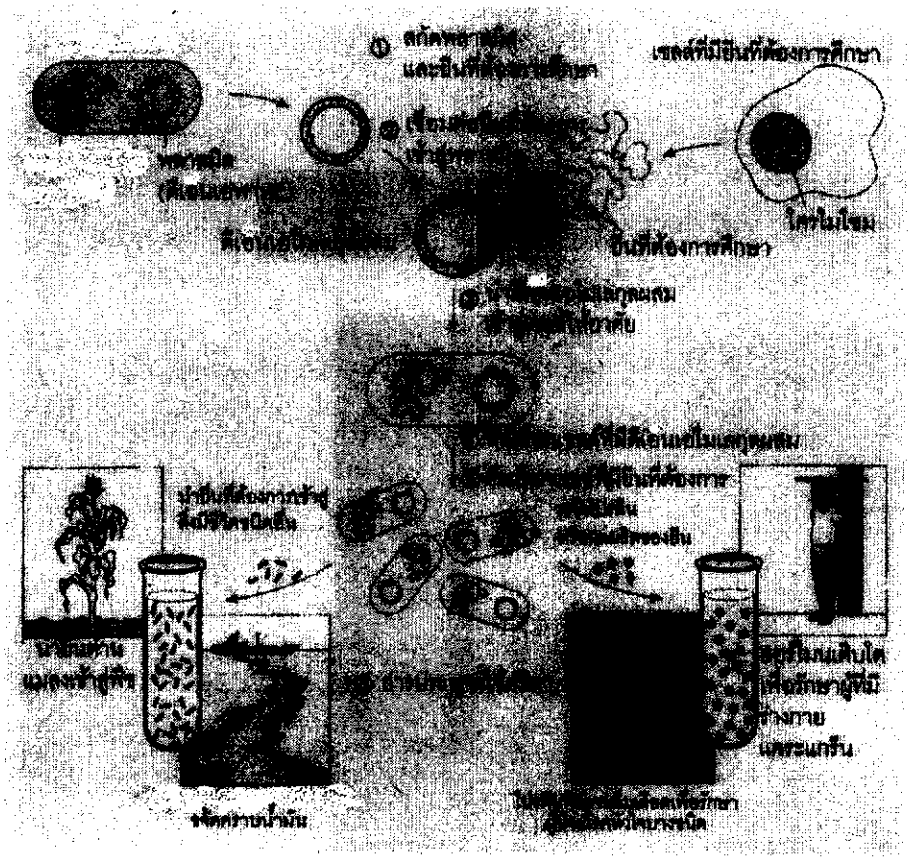
พันธุวิศวกรรม

ครึ่งศตวรรษที่ผ่านมา หลังจากเจมส์ วัตสัน และฟรานซิส คลิก (รูปที่ 8.1) ได้ค้นพบโครงสร้างของ DNA (รูปที่ 8.2) เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับพันธุวิศวกรรมจึงเกิดขึ้น และขยายตัวอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน อันก่อให้เกิดประโยชน์แก่มนุษย์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ทางด้านสิ่งแวดล้อม ทางด้านการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์ (รูป ที่ 8.3) เป็นต้น

รูปที่ 8.1 ฟรานซิส คลิก และ เจมส์ วัตสัน



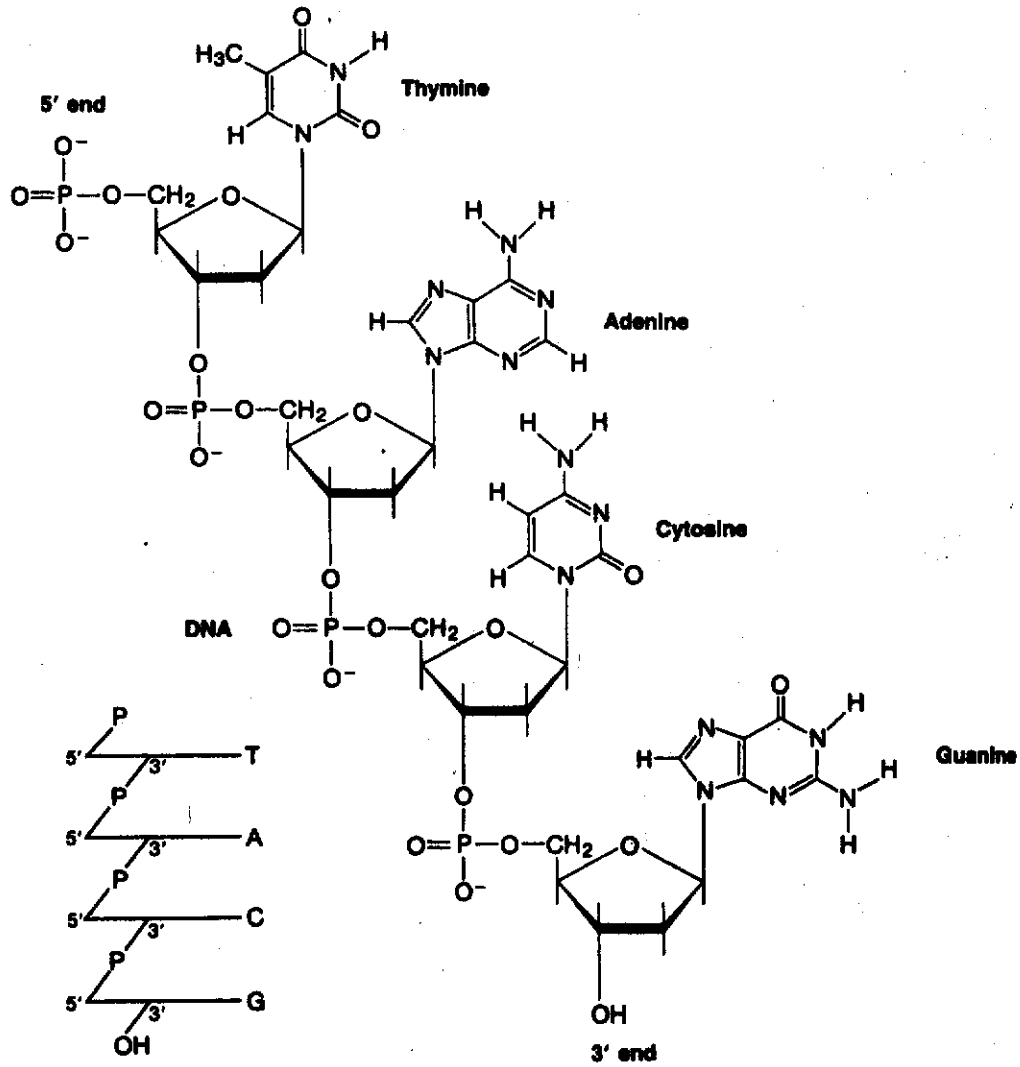
รูปที่ 8.2 โมเดลของ DNA แบบ วัตสัน – คลิก



รูปที่ 8.3 ประโยชน์ของเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม

8.1 ประโยชน์ของพันธุวิศวกรรม

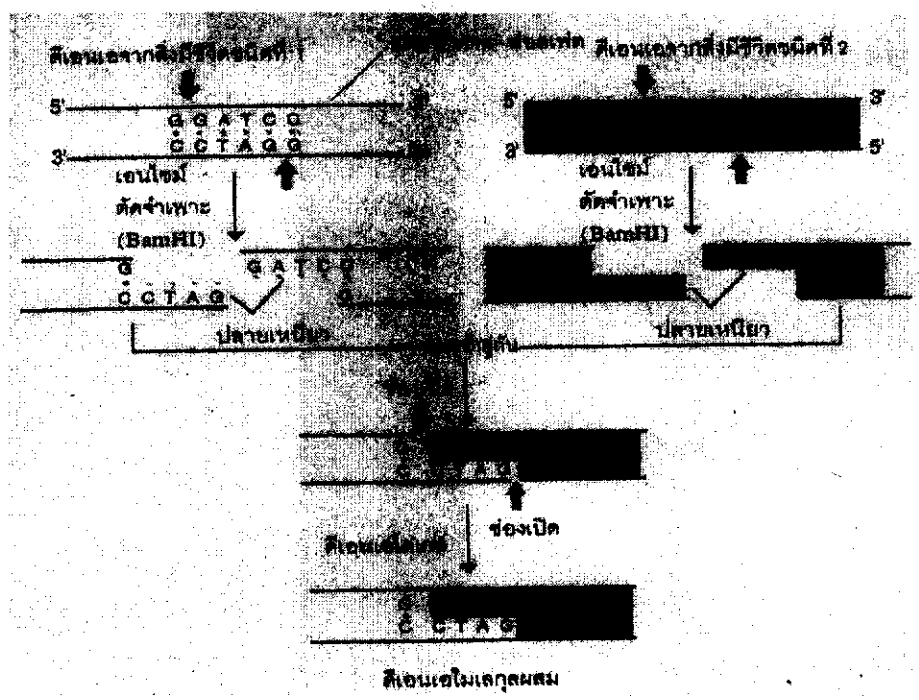
โดยทางเทคนิคกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม เป็นกระบวนการตัด DNA จากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันแล้วนำมาต่อเข้าด้วยกัน โดยยีน หรือ DNA ที่นำมาตัดต่อกันนั้น อาจมาจากจุลินทรีย์ พืช สัตว์ หรือมนุษย์ก็ได้ เนื่องจากองค์ประกอบพื้นฐานของ DNA ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะเหมือนกัน นั่นคือประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส หมู่ฟอสเฟท และเบส 4 ชนิด (รูปที่ 8.4) ดังนั้นจะ



รูปที่ 8.4 องค์ประกอบของ DNA

เห็นได้ว่าพันธุวิศวกรรมสามารถจะถ่ายทอดยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ได้อย่างไม่มีขอบเขตจำกัด กล่าวอีกนัยหนึ่งว่ากระบวนการทางพันธุวิศวกรรม สามารถทำให้เกิดการผสมของยีนข้ามสายพันธุ์ (species) ได้ (รูปที่ 8.5) ในขณะที่กระบวนการทางธรรมชาติ การ

เปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมจะเกิดการผสมของยีนในกระบวนการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์เดียวกันเท่านั้น จากหลักการพื้นฐานดังกล่าว จึงมีการคิดค้นกระบวนการตัดต่อยีน เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม และด้านการเกษตร



รูปที่ 8.5 DNA โมเลกุลผสมจากสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด

8.1.1 ประโยชน์ทางด้านการแพทย์

ในทางปฏิบัติพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หมายถึงกระบวนการตัดต่อ DNA ในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ DNA ที่มีลำดับเบสที่ต้องการ แล้วนำ DNA ที่ผ่านกระบวนการตัดต่อนั้นเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต อันจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้น จากหลักการนี้ พันธุวิศวกรรมจึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มากมาย เช่น การตัดยีนสำหรับสร้างฮอร์โมนอินซูลิน (insulin hormone) ของคนไปต่อกับ DNA ของบักเตรี E. coli ในหลอดทดลอง แล้วนำ DNA ที่ตัดต่อแล้วกลับคืนเข้าสู่บักเตรี ทำให้บักเตรีที่ได้รับ DNA ที่ตัดต่อแล้วมีความสามารถในการสร้างฮอร์โมนอินซูลินของคนได้ และที่สำคัญคือสามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินได้

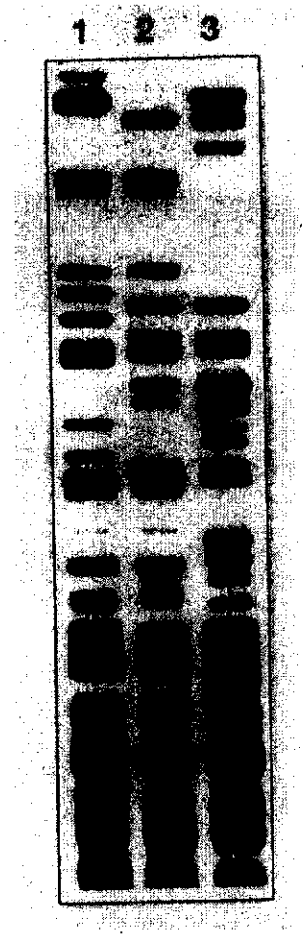
เป็นจำนวนมาก ภายในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากบักเตรีเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว พบว่าถ้าเพาะเลี้ยงบักเตรีที่มียีนสำหรับสร้างฮอร์โมนอินซูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2,000 ลิตร จะสามารถนำมาสกัดฮอร์โมนอินซูลินบริสุทธิ์ได้ถึง 100 กรัม ฮอร์โมนอินซูลินนับว่าเป็นสารที่ผลิตโดยใช้กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมที่ได้รับอนุญาตให้ใช้กับมนุษย์เป็นชนิดแรก อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน เดิมอินซูลินที่นำมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวานจะสกัดมาจากตับอ่อนของหมูหรือวัว พบว่าผู้ป่วยบางคนจะเกิดอาการแพ้ เพราะอินซูลินจากสัตว์จะแตกต่างจากของคนอยู่เล็กน้อย ดังนั้นผู้ป่วยเหล่านี้จึงต้องได้รับอินซูลินที่สกัดจากตับอ่อนของคนที่ตายแล้วเท่านั้น ซึ่งกระบวนการที่ได้มาค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมจึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ปัจจุบันอินซูลินที่ใช้ในทางการแพทย์ประมาณร้อยละ 92 ได้จากเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม อีกร้อยละ 8 ยังคงสกัดจากตับอ่อนของสัตว์

นอกจากฮอร์โมนอินซูลินแล้ว ปัจจุบันยังใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของคน (growth hormone) นำไปใช้รักษาผู้ป่วยที่ร่างกายแคระแกร็นทางกรรมพันธุ์ (hypopituitary dwarfism) เนื่องจากร่างกายผลิต growth hormone ได้น้อย ดังนั้นถ้าร่ายกายได้รับ growth hormone ก็จะสามารถเติบโตได้เช่นเดียวกับคนปกติ เดิม growth hormone สกัดจากต่อมใต้สมองที่เรียกว่าพิทูอิทารี (pituitary gland) ของคนตาย พบว่า growth hormone ที่สกัดจากศพ 70 ศพ จึงจะเพียงพอต่อการนำไปใช้รักษาผู้ป่วยได้ 1 ราย ราคาจึงแพงมาก นอกจากนี้ growth hormone ที่ได้อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากศพซึ่งเป็นอันตรายต่อสมองของผู้ป่วยด้วย

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมใช้ในทางการแพทย์อื่น ๆ อีก เช่น การผลิตวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี การผลิตสาร interferon ใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด และการผลิต Tissue plasminogen activator (TPA) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นพลาสมิโนเจน ทำหน้าที่เป็นสารที่ป้องกันไม่ให้เกิดลิ่มเลือดหรือการแข็งตัวของเลือด ดังนั้นจึงป้องกันไม่ให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดในหัวใจ และยังใช้ในการสลายลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคหัวใจบางชนิด

ในปัจจุบันทางการแพทย์ยังได้ประยุกต์ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ด้วย เพราะตามหลักการถ่ายทอดพันธุกรรมนั้น ลูกย่อมเกิดการผสมของตัวอสุจิจากพ่อและไข่จากแม่ นั่นหมายถึงลูกต้องได้รับ DNA จากทั้งพ่อและแม่ ดังนั้น

ถ้านำแถบ DNA ได้จากลูกมาเปรียบเทียบกับแถบ DNA ของพ่อและแม่ แถบ DNA ของลูกทุกแถบ จะต้องได้มาจากบางแถบของพ่อและบางแถบของแม่รวมกัน (รูปที่ 8.6)



รูปที่ 8.6 แถบ DNA ของแม่ (แถวที่ 1) ลูก (แถวที่ 2) และ พ่อ (แถวที่ 3)

8.1.2 ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

สำหรับทางด้านสิ่งแวดล้อมก็มีการตื่นตัวนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เช่นกัน เช่น การผลิตบักเตรีที่มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของสารที่อยู่ใน

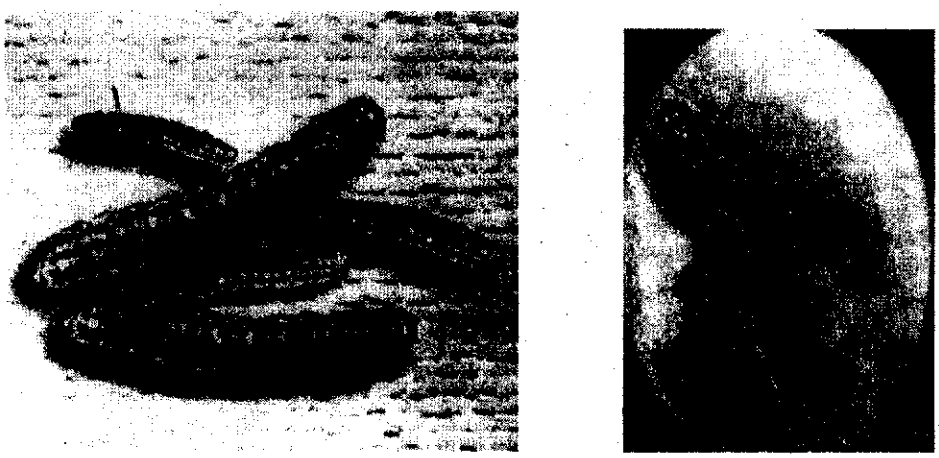
ปิโตรเลียมได้ จึงสามารถนำบักเตรีดังกล่าวไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงาน หรือกำจัดคราบน้ำมันที่เกิดจากอุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันล่มในน่านน้ำต่าง ๆ ได้ เป็นต้น

8.1.3 ประโยชน์ทางด้านการเกษตร

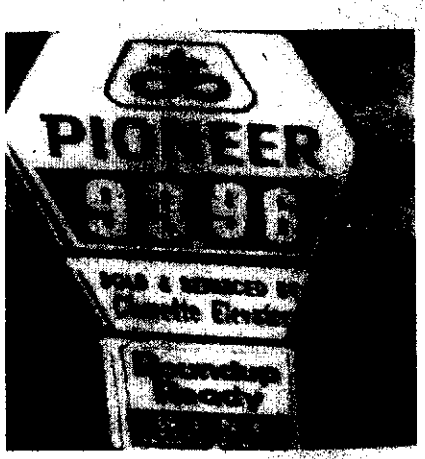
ทางด้านการเกษตร พันธุวิศวกรรมก็เข้ามามีบทบาทต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ เพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์ที่ดีกว่า เจริญเติบโตเร็วกว่า มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่า ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูงกว่าและผลิตได้เป็นปริมาณมากกว่า ได้ผลผลิตเป็นพืชตัดแต่งพันธุกรรม และสัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม

8.1.3.1 พืชตัดแต่งพันธุกรรม

พืชตัดแต่งพันธุกรรม หรือที่รู้จักกันว่า พืชจีเอ็มโอ (Genetically Modified Plants) รุ่นแรกทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ด้วยการปรับปรุงให้พืชสามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานหนอน (รูปที่ 8.7) แมลง หรือ ไวรัส เช่น ถั่วเหลือง



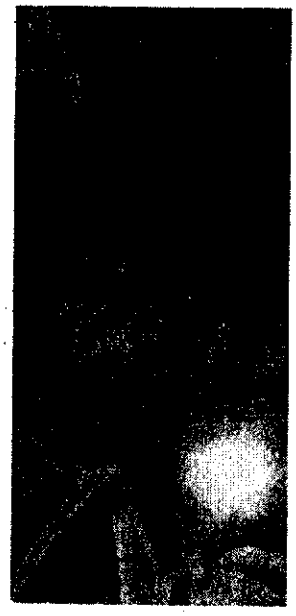
รูปที่ 8.7 หนอนข้าวโพดและหนอนสมอฝ้าย



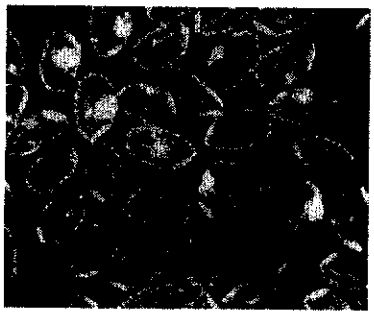
รูปที่ 8.8 แปลงถั่วเหลืองตัดแต่งพันธุกรรม

รูปที่ 8.9 ฝ้ายตัดแต่งพันธุกรรมกับฝ้ายทั่วไปมีหนอนเจาะ

(รูปที่ 8.8) ฝ้าย (รูปที่ 8.9) และข้าวโพด เป็นต้น หรืออาจทำให้ผลผลิตที่ได้สุกช้าลง เช่น มะเขือเทศ (รูปที่ 8.10) กล้วย เป็นต้น ต่อมาวัตถุประสงค์ในการผลิตพืชจีเอ็มโอนั้นส่วนใหญ่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น เช่น ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีไวตามินเอ (รูปที่ 8.11) มากขึ้น เรียกกันว่าข้าวสีทอง (golden rice) เพราะมีสีเหลืองเนื่องจากมีสาร β - carotene ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไวตามินเอ เป็นต้น



รูปที่ 8.10 มะเขือตัดแต่งพันธุกรรมให้สุกช้าลง

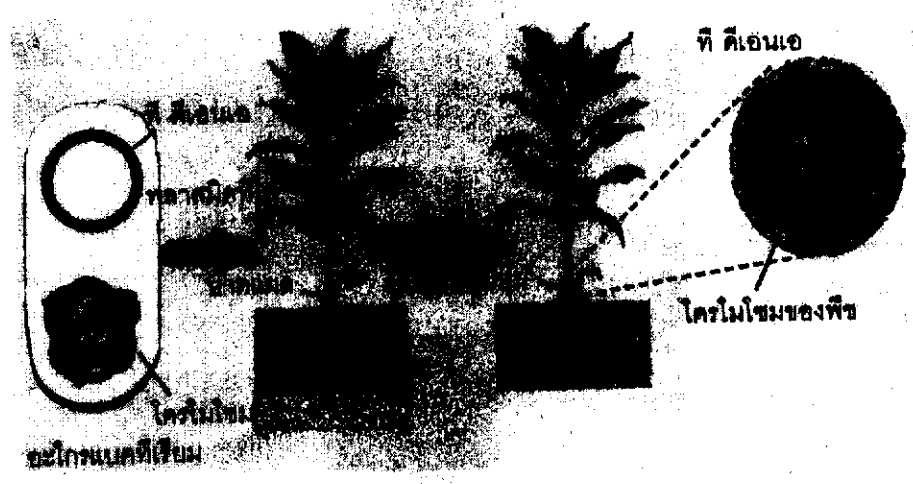


รูปที่ 8.11 ข้าวตัดแต่งพันธุกรรมให้มี β - carotene

กระบวนการสร้างพืชตัดแต่งพันธุกรรม ก็คือกระบวนการตัดและต่อ DNA เพื่อนำ DNA ที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งการถ่ายทอด DNA เข้าสู่เซลล์พืชทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ถั่วเหลืองและมะเขือเทศ คือ การใช้บักเตรีที่ชื่อว่า

Agrobacterium tumefaciens ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว และข้าวโพด มักใช้เครื่องยิง DNA เข้าสู่เซลล์พืช

เราสามารถใช้ Agrobacterium ในกระบวนการพันธุวิศวกรรมของพืชได้เนื่องจากในสภาวะปกติ Agrobacterium สามารถถ่ายทอด ที – ดีเอ็นเอ (T – DNA = Transferred DNA) ที่อยู่ในพลาสมิดทีไอ (Ti plasmid = Tumor inducing plasmid) ซึ่งพบอยู่ภายในเซลล์ของ Agrobacterium บุกรุกเข้าสู่พืชตรงบริเวณที่มีบาดแผลได้ (รูปที่ 8.12) ซึ่งเรามักจะเห็นเป็นปุ่มปม

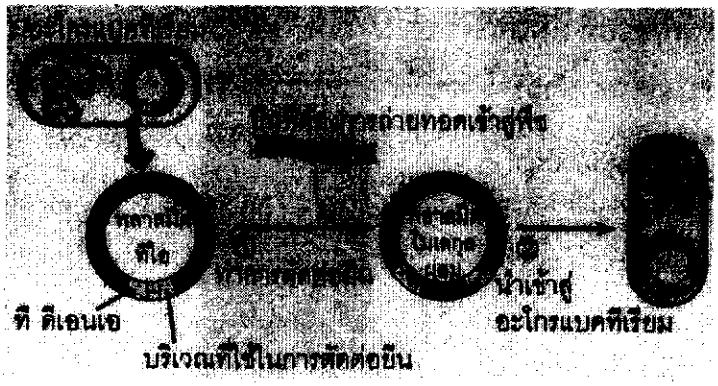


รูปที่ 8.12 Agrobacterium บุกรุกเข้าสู่พืชบริเวณบาดแผล

คล้ายก้อนเนื้อมะเร็ง (crown gall tumor) บนต้นไม้ที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อ Agrobacterium (รูปที่ 8.13) ดังนั้นจึงใช้ประโยชน์จากความรู้ตรงนี้ นำมาสร้างพืชตัดแต่งพันธุกรรมขึ้น โดยการแยก Ti plasmid ออกจาก Agrobacterium แล้วทำการตัดยีนส่วนที่เป็น T – DNA ออกไป แล้วนำยีนที่ต้องการ เช่นยีนต้านทานแมลง หรือยีนต้านทานต่อสารปราบศัตรูพืช เข้าไปแทนที่ส่วนของ T – DNA พลาสมิดที่เกิดขึ้นใหม่จะมียีนที่ต้องการอยู่ด้วย เรียกว่าพลาสมิดทีไอโมเลกุลผสม ซึ่งจะถูกนำกลับเข้าไปใส่ใน Agrobacterium (รูปที่ 8.14) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้ Agrobacterium มีปริมาณมากขึ้น จากนั้นนำ Agrobacterium ที่มีพลาสมิดทีไอโมเลกุลผสมไปเพาะเลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบเลี้ยง ราก หรือลำต้นอ่อนที่ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อให้เกิดบาดแผล ซึ่งทำให้ Agrobacterium ที่มีพลาสมิดทีไอโมเลกุลผสมสามารถบุกรุกเข้าไปในเซลล์พืชทางบาดแผลได้

จากนั้นนำชิ้นส่วนของพืชที่มียีนที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืชที่ได้รับพลาสมิดทีไอโมเลกุลผสมเรียกว่าพืชจีเอ็มโอ (รูปที่ 8.15)

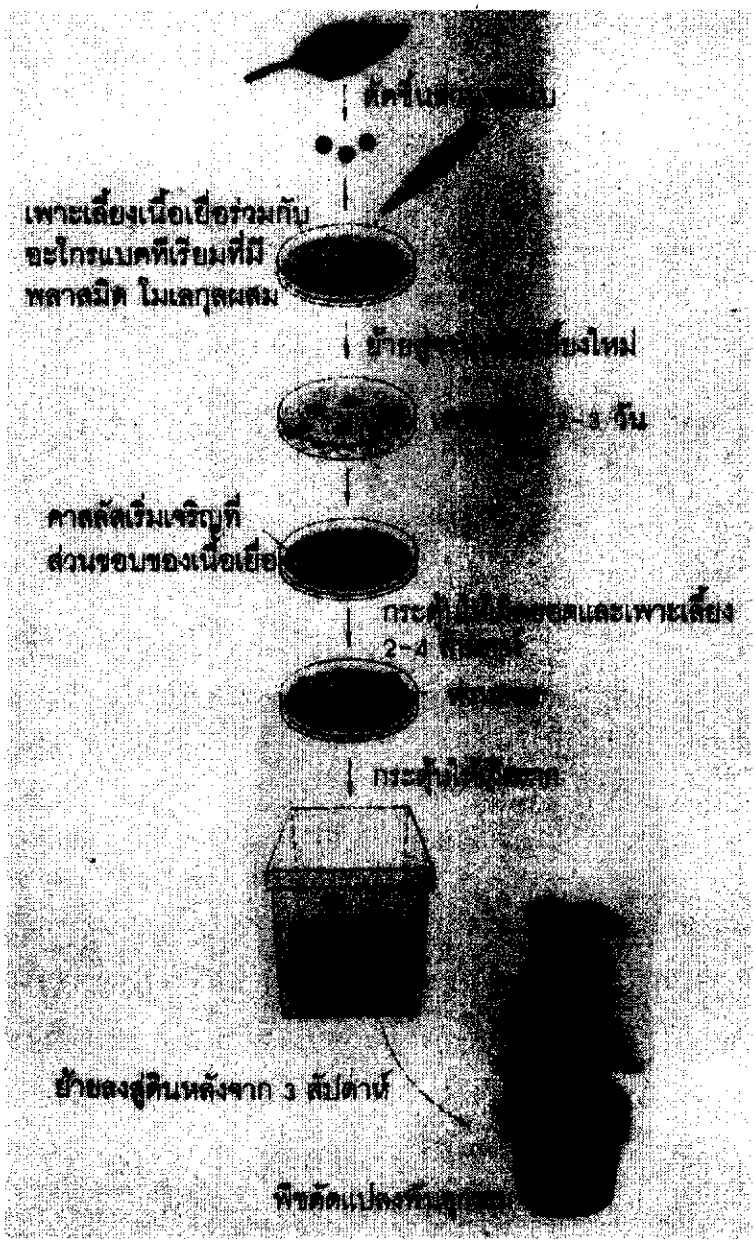
รูปที่ 8.13 crown gall tumor ของต้นมะเขือเทศ



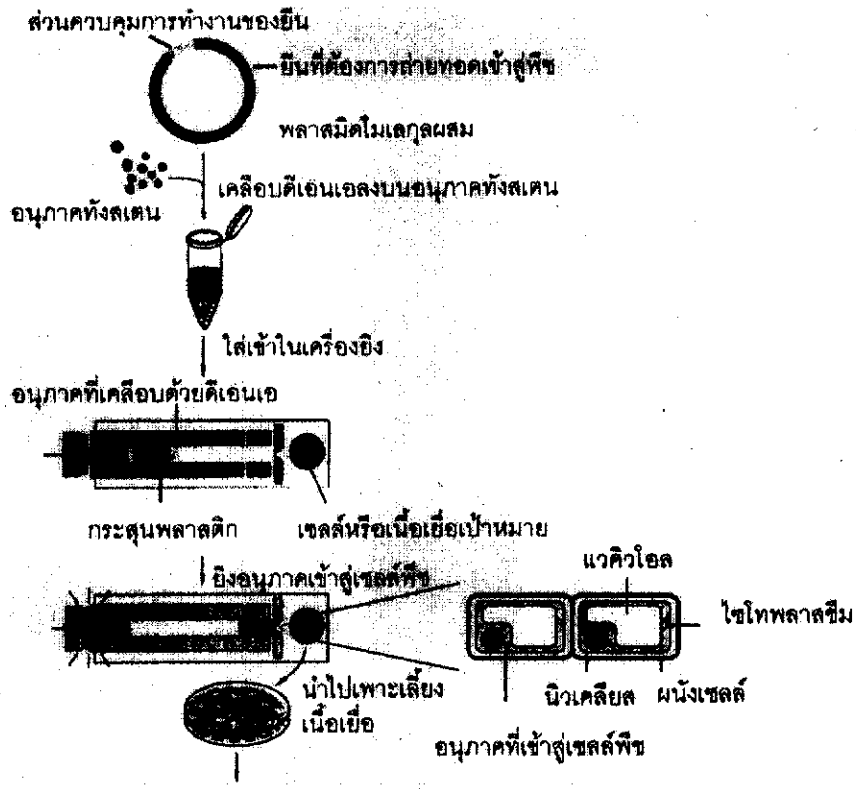
รูปที่ 8.14 กระบวนการสร้างพลาสมิดทีไอโมเลกุลผสม

สำหรับการถ่ายทอด DNA โดยใช้เครื่องยิง DNA (gene gun) ทำได้โดยนำอนุภาคทังสเตนหรือทองขนาดเล็กที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 – 2 ไมโครเมตร มาเคลือบด้วย DNA ที่ต้องการถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์พืชแล้วใส่เข้าในเครื่องยิง ซึ่งยิงอนุภาคที่เคลือบด้วย DNA ที่ต้องการแทรกผ่านผนังเซลล์ (cell wall) เข้าสู่เซลล์พืชได้ด้วยความเร็วประมาณ 500 เมตรต่อวินาที จาก

นั้นก็นำเซลล์พืชที่ได้รับ DNA ที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เติบโตเป็นพืชจีเอ็มโอต่อไป (รูปที่ 8.16)



รูปที่ 8.15 การสร้างพืชดัดแต่งพันธุกรรมโดยใช้ Agrobacterium



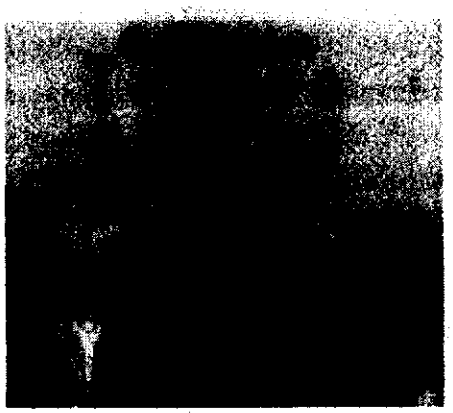
รูปที่ 8.16 การถ่ายทอด DNA เข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้ gene gun

พืชจีเอ็มโอปลูกมากที่สุดในประเทศสหรัฐอเมริกา (ตารางที่ 8.1) รองลงมาคืออาร์เจนตินา ปัจจุบันพบว่าทั่วโลกมีแนวโน้มจะใช้พื้นที่เพาะปลูกพืชจีเอ็มโอเพิ่มขึ้นอีกหลายประเทศ กล่าวคือในปี พ.ศ. 2539 ประเทศที่เพาะปลูกพืชจีเอ็มโอมีเพียง 6 ประเทศเท่านั้น และเพิ่มขึ้นเป็น 13 ประเทศในปี พ.ศ. 2543 สำหรับประเทศไทยเราอนุญาตให้มีการวิจัย และทดสอบภาคสนามได้ตั้งแต่ พ.ศ.2538 แต่ยังไม่มีการอนุญาตให้มีการนำไปผลิตในเชิงการค้า อย่างไรก็ดีมีหลาย ๆ กลุ่มและหลายประเทศออกมาต่อต้าน และประท้วงพืชตัดแต่งพันธุกรรม ในรูปแบบต่าง ๆ หลายประเด็น ทั้งประเด็นที่มีผลต่อสุขภาพของคนโดยตรง เช่น ทำให้มีสารก่อภูมิแพ้เกิดขึ้นในร่างกาย หรือผลต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ปัญหาเรื่องระบบนิเวศ เพราะพืชตัดแต่งพันธุกรรมทำให้หนอน หรือแมลงศัตรูพืชตาย ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อแมลงหรือสัตว์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อระบบนิเวศ นอก

ประเทศ	2542		2543	
	เปอร์เซนต์พื้นที่เพาะปลูก	พื้นที่เพาะปลูก (ล้านไร่)	เปอร์เซนต์พื้นที่เพาะปลูก	พื้นที่เพาะปลูก (ล้านไร่)
สหรัฐอเมริกา	72	180	68	188
อาร์เจนตินา	17	42	23	64
แคนาดา	10	25	7	19
จีน	1	2.5	1	2.7
ประเทศอื่น ๆ 9 ประเทศ	1	2.5	1	2.7
รวม	100	252	100	276.4

ตารางที่ 8.1 พื้นที่เพาะปลูกพืชตัดแต่งพันธุกรรมในประเทศต่าง ๆ

จากนี้อาจก่อให้เกิดปัญหาการถ่ายทอดยีนจากพืชตัดแต่งพันธุกรรมเข้าสู่พืชในธรรมชาติ ซึ่งอาจส่งผลร้ายแรงต่อระบบนิเวศในธรรมชาติต่อไป แต่ถึงกระนั้นผลิตภัณฑ์จีเอ็มโอหลายชนิดก็มีวางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งบางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกาจะมีการติดฉลากผลิตภัณฑ์จากพืชตัดแต่งพันธุกรรม (รูปที่ 8.17) เป็นการให้สิทธิแก่ผู้บริโภคในการเลือกซื้อสินค้า



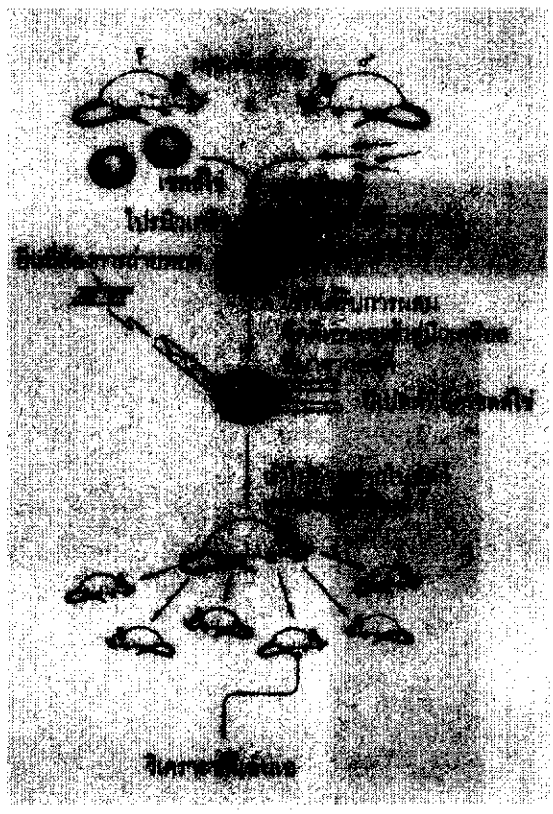
รูปที่ 8.17 ฉลากผลิตภัณฑ์จากพืชตัดแต่งพันธุกรรม

8.1.3.2 สัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม

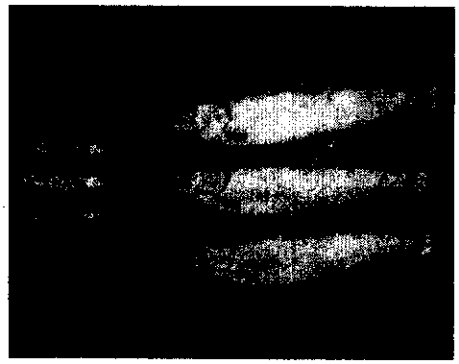
สัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม หมายถึงสัตว์ที่ได้รับการถ่ายทอด DNA จากภายนอกเข้าสู่เซลล์สืบพันธุ์ หลักการพื้นฐานโดยทั่วไป คือ การนำเซลล์ไข่ที่เพิ่งได้รับการผสมและยังอยู่ในระยะการสร้างนิวเคลียส (pro – nucleous) ออกมาจากสัตว์ แล้วถ่ายทอด DNA ที่ต้องการเข้าสู่เซลล์ไข่ จากนั้นจึงนำเซลล์ไข่ที่ได้รับ DNA ที่ต้องการ ไปถ่ายฝากในครรภ์ของสัตว์เพศเมีย ลูกที่เกิดมาจัดว่าเป็นสัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม วิธีการถ่ายทอด DNA เข้าสู่นิวเคลียสอาจทำได้โดยการฉีด DNA เข้าสู่นิวเคลียสโดยตรง (microinjection of DNA) (รูปที่ 8.18) หรืออาจใช้วิธีการผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่สารละลายที่มี DNA ที่ต้องการและเซลล์ไข่เป็นระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อทำให้เกิดรูที่เยื่อเซลล์ชั่วคราว DNA จึงสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ตัวอย่างสัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม เช่น การทดลองถ่ายทอดยีนที่สร้าง growth hormone ของคนเข้าสู่หนู (รูปที่ 8.19) พบว่าหนูตัดแต่งพันธุกรรมมีขนาดใหญ่กว่าหนูปกติถึง 2 เท่า (รูปที่ 8.20) และเมื่อถ่ายทอดยีนที่สร้าง growth hormone ของคนเข้าสู่ปลาแซลมอน พบว่าปลาตัดแต่งพันธุกรรมมีน้ำหนักโดยเฉลี่ยมากกว่าปลาปกติถึง 11 เท่า (รูปที่ 8.21)

ประมาณกลางปี พ.ศ. 2540 มีข่าวใหญ่ที่ดังไปทั่วโลกเกี่ยวกับความสำเร็จในการโคลนแกะชื่อดอลลี่ (Dolly) (รูปที่ 8.22) อย่างไรก็ดีดอลลี่ซึ่งเป็นแกะที่เกิดจากการโคลนไม่ถือว่าเป็นสัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม เนื่องจากไม่มีการถ่ายทอด DNA ที่ต้องการจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ของสัตว์ที่ทำการโคลน แต่เป็นการสร้างสัตว์ที่มีชีวิตโดยไม่อาศัยนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียเป็นแหล่งสร้างสารพันธุกรรม สำหรับการโคลนดอลลี่ (รูปที่ 8.23) ได้ใช้นิวเคลียสจากเซลล์เต้านมของแกะพันธุ์ฟินน์ดอร์เซตซึ่งมีใบหน้าสีขาวมาใช้ในการโคลน โดยการแยกเซลล์เต้านมมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมต่ำ เป็นการกระตุ้นเซลล์เต้านมเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการแบ่งตัว หรือ G_0 ในขณะเดียวกันทำการแยกเซลล์ไข่ของแกะพันธุ์สกอตทิชซึ่งมีใบหน้าสีดำออกมาจากรังไข่ แล้วนำไปดูดนิวเคลียสออกจากเซลล์ไข่ จากนั้นนำเซลล์ไข่ที่ไม่มีนิวเคลียสไป fuse เข้ากับเซลล์เต้านมที่มีนิวเคลียส โดยใช้กระแสไฟฟ้าช่วยทำให้นิวเคลียสของเซลล์เต้านมเข้าสู่เซลล์ไข่

รูปที่ 8.18 การฉีด DNA เข้าสู่นิวเคลียส



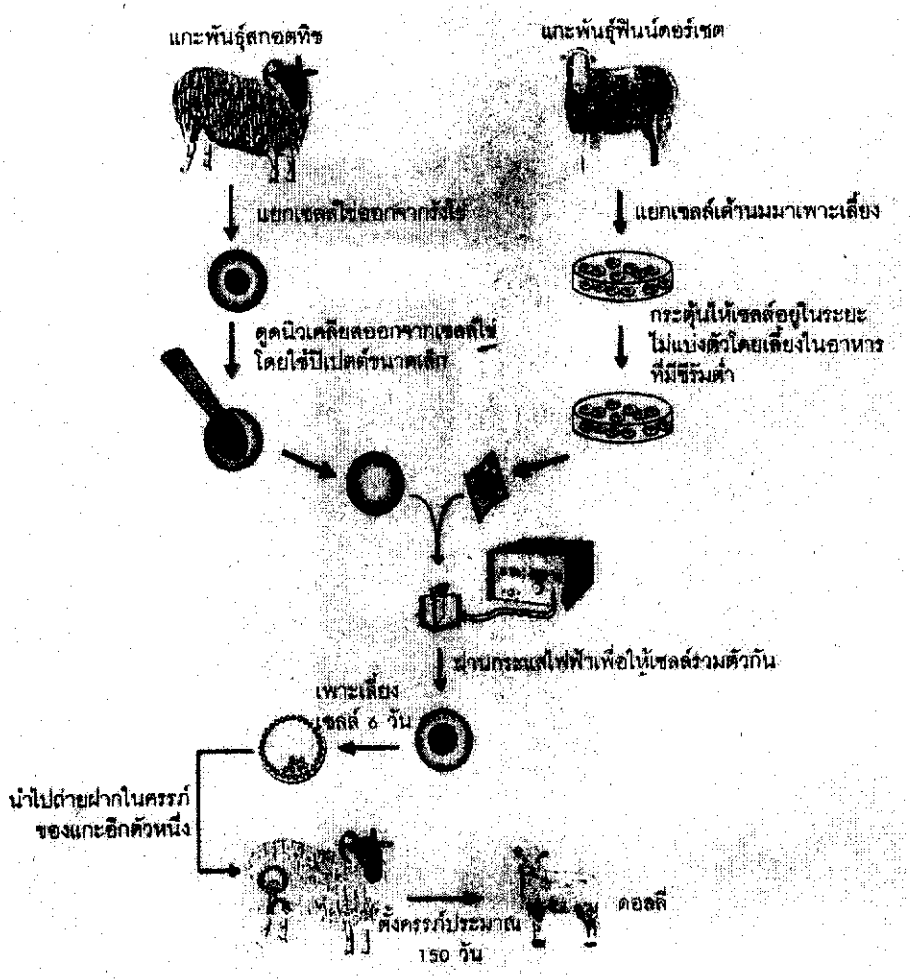
รูปที่ 8.19 การถ่ายทอดยีนที่สร้าง Growth hormone ของคนเข้าสู่หนู



รูปที่ 8.20 หนูปกติและหนูตัดแต่งพันธุกรรม รูปที่ 8.21 ปลาปกติและปลาตัดแต่งพันธุกรรม

รูปที่ 8.22 แกะดอลลี่ สัตว์ที่เกิดจากการโคลนตัวแรก

ได้ นำเซลล์ไข่ที่ได้รับนิวเคลียสจากเซลล์เต้านมไปเพาะเลี้ยงให้พัฒนาเป็นเซลล์ตัวอ่อนระยะแรก ประมาณ 6 วัน แล้วจึงนำไปถ่ายฝากในท่อนำไข่ของแกะพันธุ์สกอตทิชในหน้าสีดำ ซึ่งใช้เวลาในการตั้งครรภ์ประมาณ 150 วัน เมื่อให้กำเนิดออกมาพบว่าลูกแกะมีใบหน้าสีขาวเหมือนแกะพันธุ์ฟินน์ดอร์เซตซึ่งเป็นแหล่งของนิวเคลียส

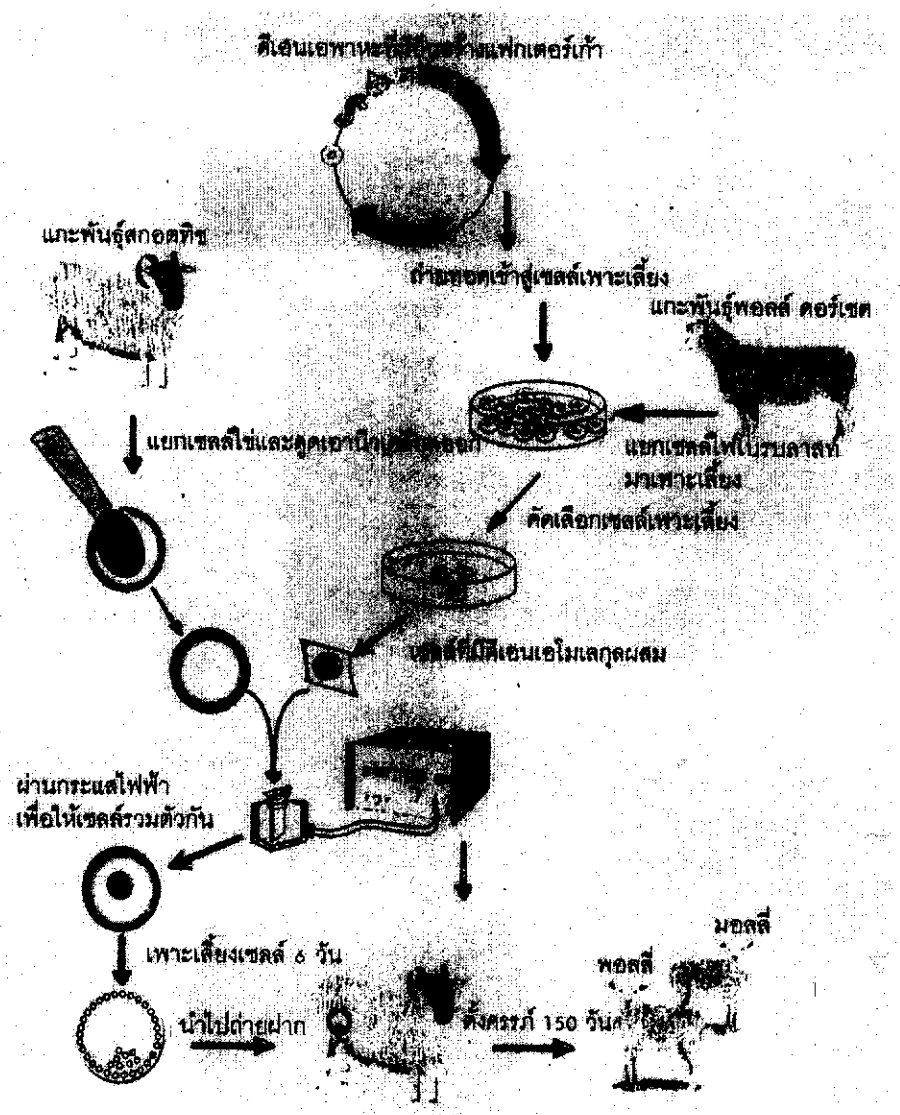


รูปที่ 8.23 กระบวนการโคลนดอลลี่

สำหรับประเทศไทยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก็ประสบความสำเร็จในการโคลนวัวเช่นกัน โดยใช้เซลล์ใบหูของวัวเป็นแหล่งของนิวเคลียสที่นำไป fuse เข้าสู่เซลล์ไข่ ลูกวัวที่ได้จากการโคลนตัวแรกของไทยเป็นเพศเมียชื่อ อิง (รูปที่ 8.24) เกิดวันที่ 6 มีนาคม 2543 ถือเป็นวัวตัวแรกของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นตัวที่หกของโลก

รูปที่ 8.24 อิง ลูกวัวที่เกิดจากการโคลนตัวแรกของประเทศไทย

ต่อมามีการสร้างแกะตัดแต่งพันธุกรรม 2 ตัวแรกของโลกขึ้นมาโดยใช้เทคนิคการโคลนเช่นเดียวกัน แต่ก่อนที่จะมีการโคลนได้มีการถ่ายทอดยีนที่สามารถผลิตแฟคเตอร์เก้าของคนเข้าไปในเซลล์ fibroblast ของแกะพันธุ์พอลล์ ดอร์เซตก่อนการทำโคลน (รูปที่ 8.25) จากนั้นจะคัดเลือกเฉพาะเซลล์ fibroblast ที่รับยีนสำหรับผลิตแฟคเตอร์เก้าของคนเข้าไปด้วย แล้วนำไป fuse เข้ากับเซลล์ไข่ของแกะพันธุ์สกอตทิชที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับการโคลนดอลลี่ เมื่อแม่แกะพันธุ์สกอตทิชให้กำเนิดลูกแฝดที่เป็นสัตว์ตัดแต่งพันธุกรรมออกมา พบว่า ลูกแกะทั้งคู่ซึ่งได้ชื่อว่าพอลลี่และมอลลี่ สามารถผลิตแฟคเตอร์เก้าออกมาในน้ำนมได้ แฟคเตอร์เก้านี้เป็นสารที่มีประโยชน์ในการทำให้เลือดแข็งตัวใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคฮีโมฟีเลียชนิดบี



รูปที่ 8.25 แกะพอลลี่และมอลลี่ สัตว์ตัดแต่งพันธุกรรม 2 ตัวแรกของโลก

8.2 หลักการพื้นฐานของพันธุวิศวกรรม

หลักการพื้นฐานของพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เป็นการเปลี่ยนแปลง DNA โดยการตัดต่อชิ้น DNA หรือยีนของสิ่งมีชีวิตที่สนใจเข้ากับ DNA ของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่าพาหะของการโคลน (cloning vector) DNA ที่ได้จากการตัดต่อนี้เรียกว่า recombinant DNA หรืออาจเรียกว่า vector ลูกผสม จากนั้นนำ vector ลูกผสมเข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้มากเท่าที่ต้องการ และคัดเลือกนำมาใช้ (รูปที่ 8.26) กระบวนการเปลี่ยนแปลง DNA หรือ ยีน ตามขั้นตอนดังกล่าวเรียกว่า การโคลน DNA (DNA cloning) หรือการโคลนยีน นอกจากนี้พันธุวิศวกรรมยังรู้จักกันในชื่อที่แตกต่างกันออกไปอีก เช่น Recombinant DNA technology หรือ Gene manipulation เป็นต้น

นั่นคือในการโคลน DNA ต้องมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

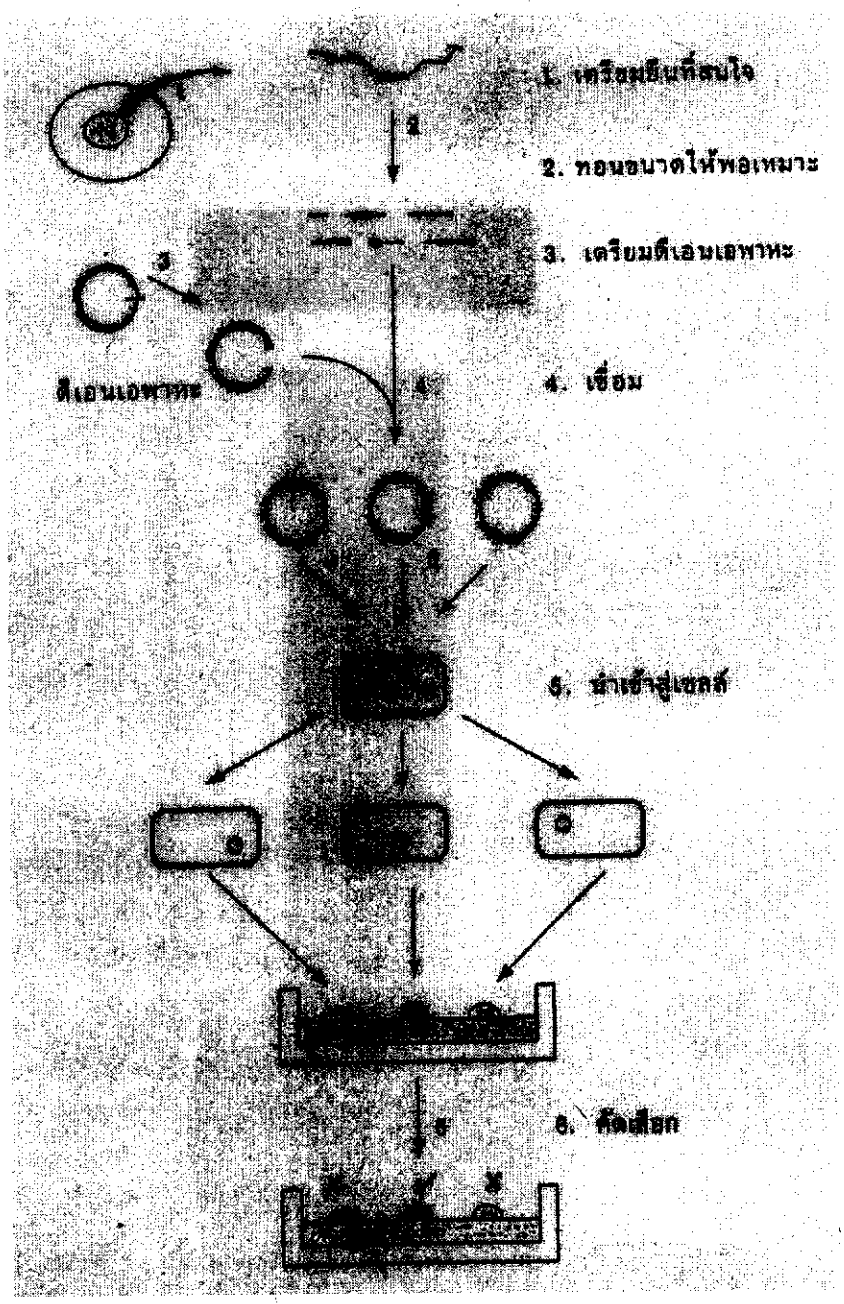
1. ชิ้น DNA (DNA fragment) ที่สนใจจะนำไปโคลน

2. พาหะของการโคลน (cloning vector) หรือเรียกว่า DNA พาหะซึ่งจะต้องเป็น DNA ที่มีคุณสมบัติในการ replicate ได้อย่างอิสระจากโครโมโซม

3. เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดต่อ DNA ได้แก่เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme or restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ของ DNA ที่มีการเรียงลำดับของเบสอย่างจำเพาะ และเอนไซม์ DNA ligase ซึ่งทำหน้าที่เชื่อม DNA เข้าด้วยกันโดยการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 3′ – hydroxy กับปลาย 5′ – phosphate ที่อิสระของชิ้น DNA

4. เซลล์เจ้าของบ้าน (host cell) เป็นเซลล์ซึ่งใช้รับ recombinant DNA หรือ vector ลูกผสมที่เตรียมได้ host cell ที่ใช้ควรเป็นเซลล์ที่เลี้ยงง่ายโตเร็ว เช่น บักเตรี รา หรือ ยีสต์ เป็นต้น host cell ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ บักเตรี โดยเฉพาะ E. coli เพราะมีวงจรชีวิตที่ง่าย ไม่ซับซ้อนและมีจำนวนยีนน้อย

เมื่อมีองค์ประกอบสำหรับการโคลนครบถ้วนแล้ว ก็สามารถทำการโคลน DNA ได้เลย



รูปที่ 8.26 ขั้นตอนพื้นฐานของการโคลน DNA

8.3 การโคลน DNA

ในการนำองค์ประกอบต่าง ๆ มาใช้ในการโคลน DNA จะต้องดำเนินการในรายละเอียดดังต่อไปนี้ คือ การเตรียม DNA ที่สนใจ การเตรียม vector หรือ DNA พาหะ การสร้าง recombinant DNA การนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell การตรวจคัดเลือก host cell ที่มี recombinant DNA ที่สนใจ การวิเคราะห์และตรวจสอบ DNA ที่โคลนได้

8.3.1 การเตรียม DNA ที่สนใจ

การเตรียม DNA ที่สนใจ สามารถเตรียมได้จาก 3 แหล่งใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ DNA ที่แยกได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งเป็น DNA ทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เรียกว่า genomic DNA หรือ chromosomal DNA อีกวิธีหนึ่งคือการเตรียม DNA จาก mRNA ซึ่ง DNA ที่สังคราะห์จาก mRNA เรียกว่า complementary DNA หรือ cDNA วิธีสุดท้ายเป็น DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการทางเคมี

8.3.1.1 Genomic DNA

Genomic DNA เป็นการเตรียม DNA จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งอาจจะได้จากพืชหรือสัตว์ มีหลักการเตรียมคล้าย ๆ กัน คือ จะต้องทำให้เซลล์แตกโดยใช้ detergent เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อสกัด DNA ที่อยู่ภายใน ต่อมาทำการแยกโปรตีนหรือเศษเซลล์ออก ถ้าเป็นเซลล์สัตว์อาจใช้สารละลายฟีนอล ถ้าเป็นเซลล์พืชอาจเติมโปแตสเซียมอซีเตทแล้วตกตะกอน DNA ด้วยอัลกอฮอล์ และทำให้ DNA บริสุทธิ์ขึ้นโดยนำไป centrifuge

หลังจากเตรียม DNA ได้แล้ว จะต้องตัด DNA ให้มีขนาดเล็กตามที่ต้องการ โดยขนาดจะเป็นเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ vector ที่จะนำมาใช้ กล่าวคือ ถ้า vector เป็น plasmid ชิ้น DNA ควรมีขนาดไม่เกิน 10 กิโลเบส ถ้า vector เป็น λ phage ชิ้น DNA ควรมีขนาดไม่เกิน 25 กิโลเบส ถ้า vector เป็น cosmid ชิ้น DNA ควรมีขนาดไม่เกิน 45 กิโลเบส เป็นต้น การตัด DNA มีหลายวิธีอาจตัดด้วยวิธีกล หรือการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

● **การตัด DNA ด้วยวิธีกล**

การตัด DNA ด้วยวิธีกล ทำได้โดยการฉีดสารละลาย DNA ผ่านเข็มฉีดยา (hydrodynamic shear) ทำให้ DNA ที่เป็นสายยาวเกิดแรงเสียดทานและขาดออกแบบสุ่ม จะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดต่างกันไม่เหมาะในการนำไปต่อกับ vector โดยเฉพาะ vector ที่ต้องการขนาด DNA ที่ใกล้เคียงกัน เช่น λ phage และ cosmid ดังนั้นจึงต้องนำ DNA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เหล่านี้ไปแยกขนาดโดยการนำไป centrifuge ในสารละลาย sucrose gradient ซึ่งจะแยก DNA ตามขนาด ทำให้สามารถเลือกนำไปใช้ได้

การตัด DNA ด้วยวิธีกลอีกวิธีหนึ่งคือการเฉือนโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) ทำให้เกิดแรงสั่นสะเทือน และตัด DNA ขาดเป็นท่อนเล็กลง เป็นวิธีที่นิยมใช้มากกว่าวิธีแรก เพราะชิ้น DNA ที่ได้จะมีขนาดใกล้เคียงกัน เนื่องจากสามารถควบคุมเวลา และความแรงในการ sonicate ได้ แต่การตัดด้วยวิธีนี้จะได้ชิ้น DNA ที่เป็นปลายเรียบ (blunt end) ซึ่งมักจะนำไปดัดแปลงให้เป็นปลายเหนียว (cohesive end) ก่อนที่จะนำไปเชื่อมกับ vector

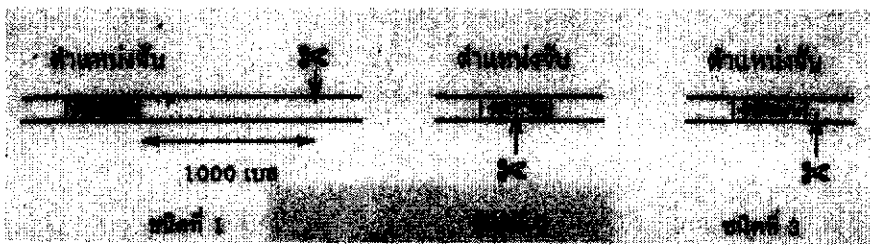
● **การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เป็นเอนไซม์ที่พบในบักเตรีหลายชนิด ปกติเอนไซม์เหล่านี้บักเตรีใช้ในการทำลาย DNA แปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ เช่น DNA ของไวรัส โดยเอนไซม์เหล่านี้จะตัดตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะทุกตำแหน่งบนโมเลกุลของ DNA ไวรัส ทำให้ DNA ของไวรัสหลุดออกเป็นชิ้น ๆ เป็นการจำกัด (restriction) การเจริญเติบโตของไวรัสได้ ด้วยสาเหตุนี้เอนไซม์กลุ่มนี้จึงได้ชื่อว่า restriction enzyme ตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะซึ่งเอนไซม์ตัดนี้เรียกว่าบริเวณจดจำ (recognition site) โดยบริเวณจดจำนี้ก็มีปรากฏอยู่บนโมเลกุลของ DNA บักเตรีด้วยเช่นเดียวกัน แต่เซลล์บักเตรีจะมีการป้องกัน DNA ของตนเองจากเอนไซม์เหล่านี้ด้วยการเติมหมู่เมธิล เพื่อเปลี่ยนแปลง DNA (modification methylase) ที่บริเวณจดจำนี้ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ methylase เป็นผลทำให้บริเวณนี้ไม่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์อีกต่อไป เรียกระบบการเปลี่ยนแปลง DNA ลักษณะเช่นนี้ว่า restriction modification

เอนไซม์ตัดจำเพาะนี้เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ภายในโครงสร้างเกลียวคู่ของ DNA โดยมีตำแหน่งจับเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเรียงอย่างจำเพาะ (specific recognition sequence) จึงเรียกเอนไซม์นี้อีกชื่อหนึ่งว่า restriction endonuclease DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ จะได้สาย DNA ที่มีหมู่ฟอสเฟทอยู่ที่ปลาย 5′ (5′ - phosphate) และหมู่ไฮดรอกซีอยู่ที่ปลาย 3′ (3′ - hydroxy) เสมอ เอนไซม์นี้แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ restriction enzyme type I (เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 1) type II (แบบที่ 2) และ type III (แบบที่ 3)

■ **restriction enzyme type I**

restriction enzyme type I เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) หลายหน่วย มีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 300,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติที่สามารถตัด DNA (restriction activity) และสามารถทำให้ DNA เปลี่ยนแปลงได้ด้วยการเติมหมู่เมธิล (methylation activity) เข้าที่เบส Adenine และ Cytosine ของ DNA เอนไซม์แบบที่ 1 นี้จะจับกับ DNA ที่บริเวณจดจำที่จำเพาะ แต่จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ DNA นอกบริเวณจดจำ ในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะเจาะจงห่างออกไป 400 – 1,000 คู่เบส (รูปที่ 8.27) ดังนั้นชิ้น DNA ที่ตัดได้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แน่นอน เอนไซม์แบบที่ 1 นี้จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน การทำงานของเอนไซม์แบบที่ 1 นี้จำเป็นต้องมี ATP, Mg^{+2} และ S-adenosyl methionine (SAM) เป็น cofactor ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าในขณะที่เอนไซม์แบบที่ 1 นี้ตัดสาย DNA จะมีการสลาย ATP ควบคู่กันไปด้วย



รูปที่ 8.27 ตำแหน่งจับและจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด

■ **restriction enzyme type II**

restriction enzyme type II เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้มากในงานพันธุวิศวกรรม เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดียว มีคุณสมบัติเฉพาะตัด DNA ได้เพียงอย่างเดียว ไม่มีสมบัติในการเติมหมู่เมธิล และต้องการเฉพาะ Mg^{+2} เท่านั้นเป็น cofactor ในการทำงาน การตัด DNA จะเกิดที่ตำแหน่งเฉพาะในบริเวณจดจำ (ดูรูปที่ 8.27) ทำให้ได้ชิ้น DNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอน

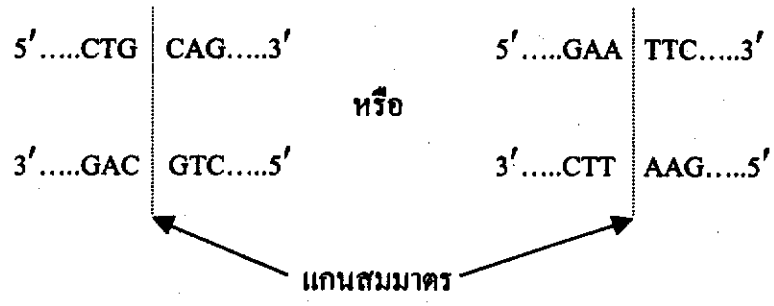
เอนไซม์แบบที่ 2 นี้ แยกได้จากบักเตรีชนิดต่าง ๆ กว่า 400 ชนิดและนำมาใช้ประโยชน์ในการโคลน DNA มากมาย จึงมีการสร้างระบบการเรียกชื่อให้เป็นสากล โดยใช้ระบบตัวอักษร 3 ตัว พิมพ์ตัวเอน อักษรตัวแรกพิมพ์ตัวใหญ่เป็นชื่อสกุล (genus) อักษรตัวที่ 2 และ 3 พิมพ์ตัวเล็กเป็นชื่อของชนิด (species) ถ้ามีชื่อของสายพันธุ์ก็ใส่เป็นอักษรตัวที่ 4 ไม่ต้องพิมพ์ตัวเอน และสุดท้ายเป็นเลขโรมันซึ่งจะบอกลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้จากบักเตรีชนิดนั้น ๆ (ตารางที่ 8.2)

ชื่อเอนไซม์	ได้มาจาก	สายพันธุ์	ลำดับที่แยก
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	H	1
*Bgl*I	*Bacillus globigu*	-	1
*Eco*RI	*Escherichia coli*	RY 13	1
*Fnu*DII	*Fusobacterium nucleatum*	D	2
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	-	3
*Pst*I	*Providencia stuartii*	-	1
*Xma*I	*Xanthomonas malvacearum*	-	1

ตารางที่ 8.2 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2

บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบประมาณ 400 ชนิดนี้จะมีประมาณ 90 แบบ ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยเบส 4 คู่ หรือเบส 6 คู่ โดยที่ลำดับเบสที่บริเวณจดจำนี้มีการเรียงตัวของเบสสมมาตรกันทั้ง 2 ทิศทาง (two fold symmetry) โดยมีแกนสมมาตร (axis of symmetry) อยู่กึ่ง

กลาง กล่าวคือถ้าพับตรงแกนสมมาตรในแต่ละสายจะได้เบสคู่สมกันพอดี หรือถ้าอ่านลำดับเบสจากปลาย 5′ ไป 3′ ไม่ว่าจะอ่านจากสายบนหรือสายล่างก็จะอ่านลำดับเบสได้เหมือนกัน ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า palindrome (รูปที่ 8.28)



รูปที่ 8.28 การเรียงตัวของเบสแบบ palindrome

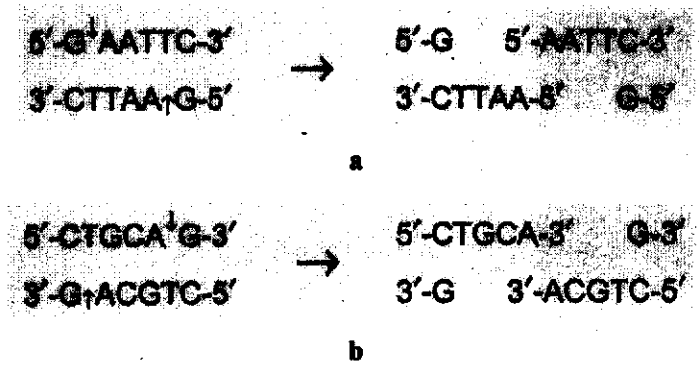
อย่างไรก็ดีพบว่าไม่ว่าลำดับเบสที่บริเวณจดจำจะเป็นแบบ 4 คู่ หรือ 6 คู่ เมื่อเอนไซม์ตัดโมเลกุลของ DNA จะได้ชิ้น DNA ที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบใหญ่ ๆ คือ cohesvie end และ blunt end

▲ Cohesive end

Cohesive end เกิดจาก DNA ที่เมื่อถูกตัดให้ขาดจากกันแล้ว ชิ้น DNA ทั้ง 2 ที่ได้จะมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน เรียกว่าปลายเหนียว (cohesive end หรือ sticky end) เกิดจากเอนไซม์ตัดสาย DNA ตรงตำแหน่งที่เยื้องกันไปทั้ง 2 ข้างจากแกนสมมาตรในระยะเท่ากัน (traggered cut) (ตารางที่ 8.3) ถ้า DNA ที่ตัดได้มีปลาย 5′ ยาวกว่าปลาย 3′ เรียกว่า 5′- protruding end เช่น การทำงานของเอนไซม์ *Eco*RI (รูปที่ 8.29 a) แต่ถ้าตัดแล้ว DNA มีปลาย 3′ ยาวกว่าปลาย 5′ เรียกว่า 3′- protruding end เช่นการทำงานของเอนไซม์ *Pst*I (รูปที่ 8.29 b) จะพบว่าเบสที่มีปลายเหนียวดังกล่าวพร้อมที่จะกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนได้อีก เพราะมีเบสที่เป็นคู่สมกัน

Enzyme	Recognition and Cleavage Site
BamHI	5'-GGATCC- -CCTAGG-5'
BglI	5'-GCCNNNNNGGC- -CGGNNNNNCCG-5'
ClaI	5'-ATCGAT- -TAGCTA-5'
EcoRI	5'-GAATTC- -CTTAAG-5'
HaeIII	5'-GGCCRY- -YRCCGG-5'
HindIII	5'-AAGCTT- -TTCGAA-5'
HpaII	5'-CCGG- -GGCC-5'
HpeII	5'-CCGG- -GGCC-5'
MboI & SauIIA	5'-GATC- -CTAG-5'
NlaIII	5'-CATG- -GATC-5'
NotI	5'-GCGGCCGC- -CGCCGGCG-5'
PstI	5'-CTGCAG- -GACGTC-5'
TaqI	5'-TCGA- -AGCT-5'
XmaI	5'-CCCGGG- -GGGCCC-5'

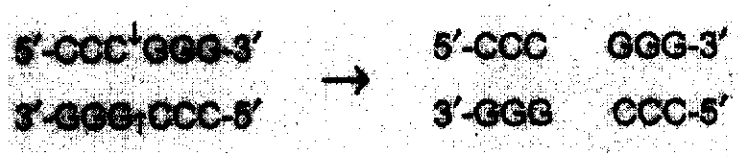
ตารางที่ 8.3 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัด DNA ได้ปลายเหนียว



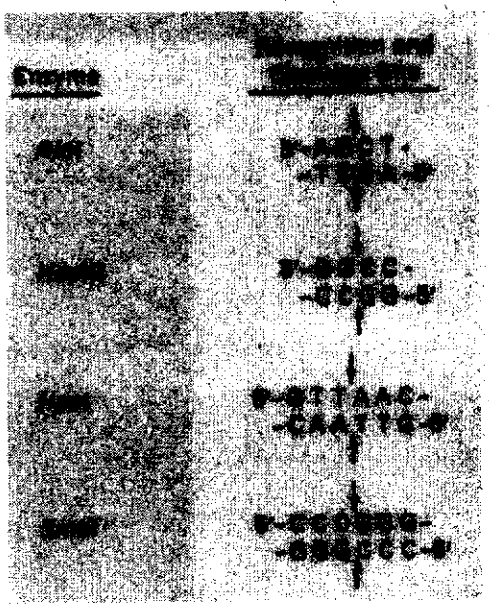
รูปที่ 8.29 5′- protruding end (a) และ 3′- protruding end (b)

▲ Blunt end

Blunt end เป็นการตัด DNA อีกแบบหนึ่ง นั่นคือเมื่อตัด DNA แล้ว ชิ้น DNA ทั้ง 2 จะมีปลายที่ยาวเท่ากัน ไม่มีสายใดสายหนึ่งยื่นล้ำ DNA ของอีกสายออกมา เรียกปลายแบบนี้ว่าปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) (ตารางที่ 8.4) เกิดจากเอนไซม์ตัดสาย DNA ตรงตำแหน่งกลางของบริเวณจดจำ หรือตัดตรงแกนสมมาตรนั่นเอง เช่นการทำงานของเอนไซม์ *Sma*I (รูปที่ 8.30)

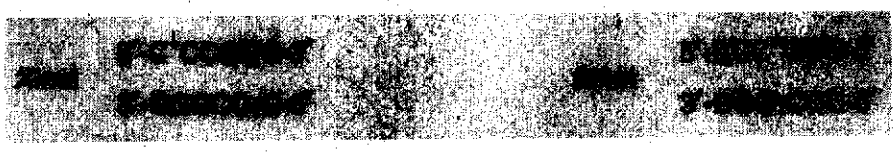


รูปที่ 8.30 blunt end



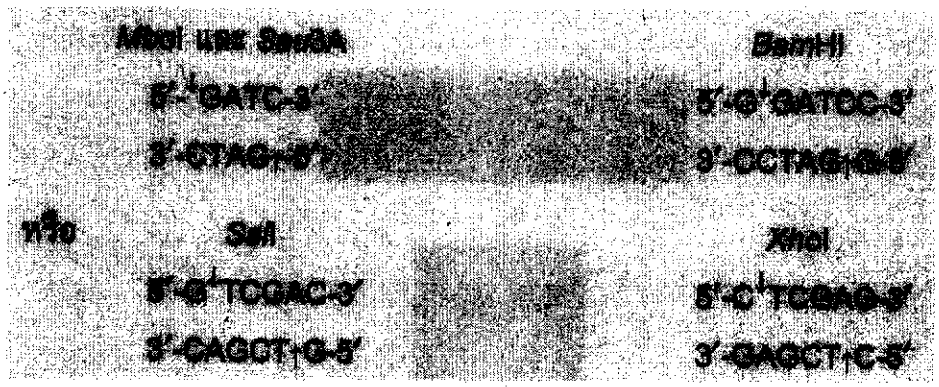
ตารางที่ 8.4 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัด DNA ได้ปลายทู่

ดังกล่าวแล้วว่าเอนไซม์มีหลายร้อยชนิด แต่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันเพียง 90 แบบเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเอนไซม์ต่างชนิดกัน มีบริเวณจดจำเหมือนกัน เอนไซม์ในลักษณะเช่นนี้เรียกว่า isoschizomer อย่างไรก็ดีแม้ว่าเอนไซม์เหล่านี้จะมีบริเวณจดจำเหมือนกัน แต่จะตัดคนละตำแหน่งกัน เช่น *Xma*I หรือ *Sma*I (รูปที่ 8.31)



รูปที่ 8.31 isoschizomer enzymes

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ต่างชนิดกัน และมีบริเวณจดจำแตกต่างกัน แต่เมื่อนำไปตัด DNA แล้ว ทำให้ DNA เกิดปลายคู่สมกันที่เรียกว่า compatible ends เช่นการทำงานของเอนไซม์ *Sal*I และ *Xho*I หรือ *Mbo*I และ *Bam*HI (รูปที่ 8.32)



รูปที่ 8.32 การเกิด compatible ends

และยังพบว่าถ้าเอา DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sal*I และ *Xho*I มาเชื่อมต่อกัน DNA ที่เกิดขึ้นใหม่ จะไม่สามารถนำมาตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ได้อีก แต่ในกรณีของ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo*I และ *Bam*HI เมื่อนำมาเชื่อมต่อกันแล้ว พบว่า DNA ที่ต่อขึ้นใหม่ยังคงสามารถตัดได้ด้วย *Mbo*I หรือ *Bam*HI ได้อีก

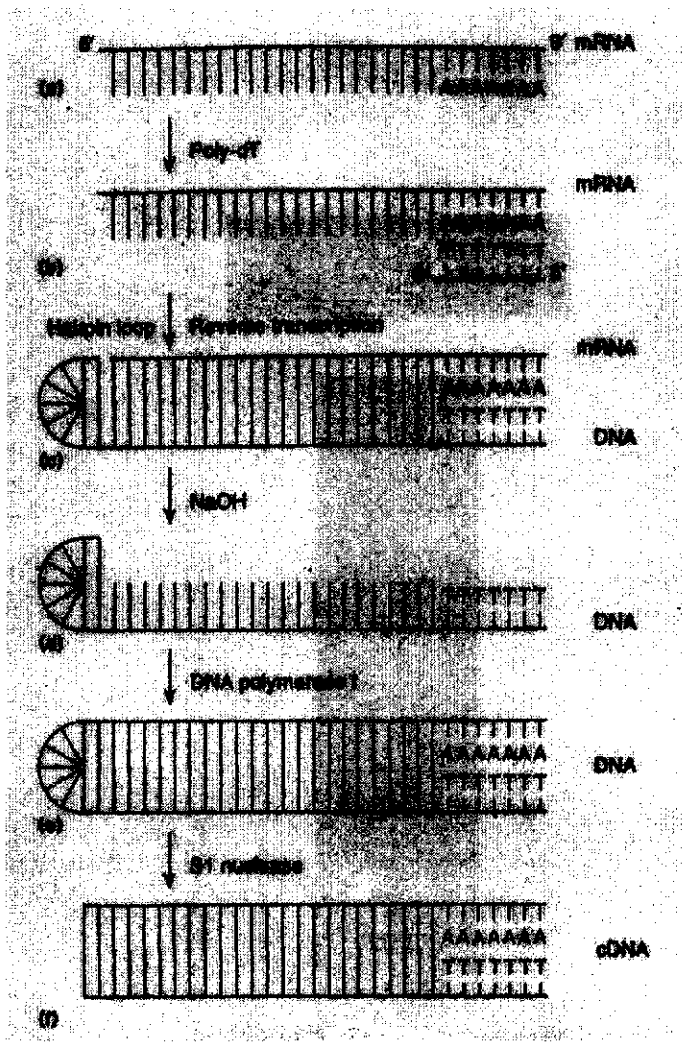
อย่างไรก็ดีเนื่องจากการเรียงตัวของเบสในสาย DNA เป็นแบบสุ่ม ดังนั้นโอกาสที่จะพบบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มี 4 คู่เบสจะเป็น 1 ครั้งในทุก ๆ 4^4 คู่เบสหรือเท่ากับ 256 คู่เบส หรือถ้าบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะมี 6 คู่เบส ก็จะมีโอกาสพบบริเวณจดจำดังกล่าวทุก 4^6 คู่เบส หรือเท่ากับ 4,096 คู่เบสเป็นต้น อย่างไรก็ตามค่าที่คำนวณได้เป็นเพียงโอกาสที่จะเกิดการตัดของเอนไซม์ ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์จะตัดสาย DNA ทุกระยะดังกล่าว เพราะการเรียงตัวของ DNA เป็นแบบสุ่มนั่นเอง ฉะนั้นชิ้น DNA ที่ได้จากการตัดของเอนไซม์อาจสั้นหรือยาวกว่านี้ก็ได้

▲ **restriction enzyme type III**

restriction enzyme type III ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติในการตัด DNA และเติมหมู่เมธิลบน DNA ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์แบบที่ 1 การตัด DNA จะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25 – 27 คู่เบส (ดูรูปที่ 8.27) ดังนั้น DNA ที่ตัดได้จะมีขนาดที่ไม่แน่นอน จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการโคลน DNA เช่นกัน การทำงานของเอนไซม์แบบที่ 3 ต้องการ Mg^{2+} และ ATP เป็น cofactor ไม่จำเป็นต้องมี SAM แต่ถ้ามี SAM จะช่วยกระตุ้นให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น

8.3.1.2 Complementary DNA

การเตรียม DNA วิธีนี้จะใช้ mRNA เป็นแม่พิมพ์ ขั้นแรกต้องศึกษาก่อนว่ายีนที่สนใจนั้นมีการแสดงออกในอวัยวะใด ช่วงเวลาใด แล้วทำการแยกสกัด mRNA จากเซลล์ดังกล่าวมาใช้ในการสังเคราะห์ DNA DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์นี้เรียกว่า complementary DNA (cDNA) วิธีการสังเคราะห์ cDNA อาศัยคุณสมบัติของ mRNA ที่มีปลาย 3′ เป็นเบส A จำนวนมาก (poly A) (รูปที่ 8.33) จึงเริ่มต้นโดยการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบส T หลาย ๆ เบส (oligo dT) เป็น primer โดย primer จะเข้าไปจับที่ปลาย 3′ ของ mRNA ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส T และ A การสังเคราะห์ cDNA สายแรกจึงเกิดขึ้นในทิศทาง 5′ ไป 3′ โดยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นจึงทำลาย RNA ที่เป็นแม่พิมพ์ออกโดยใช้ NaOH เมื่อเหลือเพียง cDNA สายเดี่ยวจึงเริ่มสังเคราะห์ cDNA สายคู่จากปลาย 3′ ของ cDNA สายเดี่ยวนั้นซึ่งขณะนี้ถือเป็นแม่พิมพ์ เนื่องจาก cDNA สายเดี่ยวนี้จะมีปลาย 3′ ที่วกกลับมาเป็น hairpin loop จึงสามารถสังเคราะห์ cDNA สายคู่ได้โดยไม่ต้องใช้ primer การสังเคราะห์ในขั้นตอนนี้ใช้เอนไซม์ DNA polymerase I ผลิตผลที่ได้จะเป็น cDNA เกลียวคู่ที่ปลายข้างหนึ่งเป็นปลายปิด ต้องใช้เอนไซม์ S_1 nuclease มาตัดปลายด้านนี้ อย่างไรก็ดี cDNA ที่ได้จะมีปลายทู่ซึ่งยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการโคลน ต้องมีการเปลี่ยนให้กลายเป็นปลายเหนียวเสียก่อน จึงนำไปใช้โคลนต่อไป

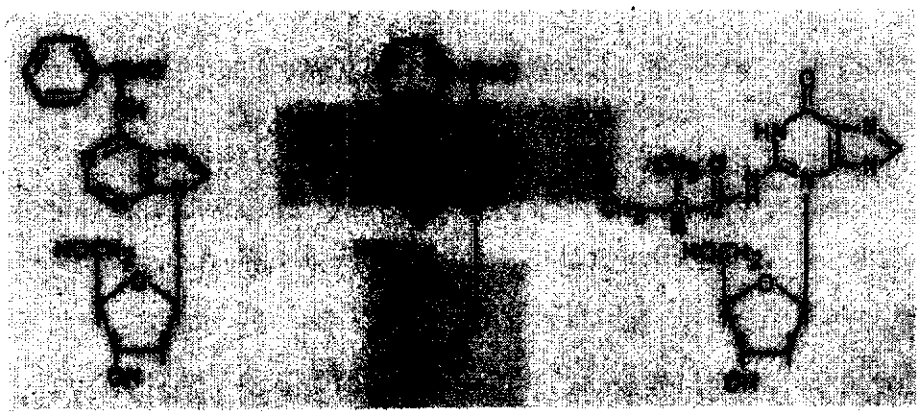


รูปที่ 8.33 การสังเคราะห์ cDNA

8.3.1.3 DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการทางเคมี

ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธีการทางเคมีได้ถึง 50 นิวคลีโอไทด์ และด้วยวิธีการทางเคมีนี้อาจใช้สังเคราะห์ยีนให้สมบูรณ์ได้ ถ้าทราบลำดับกรดอะมิโนของยีนดังกล่าว โดยสังเคราะห์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ก่อน แล้วนำแต่ละสายมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ ligase ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ฮอร์โมน somatostatin ซึ่งมีความยาว 51 คู่เบส แต่สร้างขึ้นโดยเชื่อมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 8 เส้นเข้าด้วยกัน หรือการสังเคราะห์ยีนของอินเตอร์เฟียรอน ซึ่งมีความยาวถึง 514 คู่เบส โดยเชื่อมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 66 เส้นเข้าด้วยกัน เป็นต้น

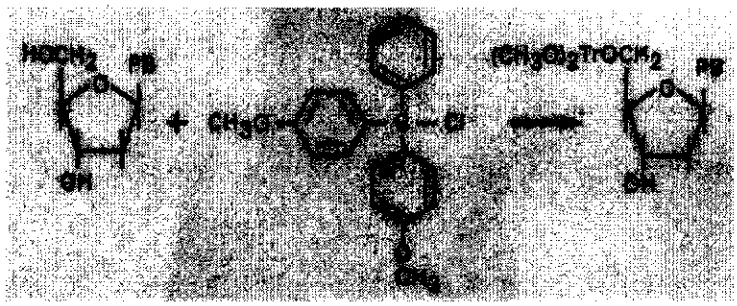
การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มีหลายวิธี แต่วิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางซึ่งมีการผลิตเป็นเครื่องสังเคราะห์ DNA แบบอัตโนมัติแล้วมี 2 วิธีคือ phosphate triester และ phosphite triester ทั้ง 2 วิธีมีหลักการคล้ายกันคือ การต่อนิวคลีโอไทด์เข้าไปในสาย DNA ทีละโมเลกุล แต่ก่อนจะให้ปฏิกิริยาดำเนินไป จะต้องป้องกันหมู่อะมิโนของ เบส A,C และ G ก่อนเพื่อไม่ให้เกิดพันธะที่ไม่ต้องการ โดยเติมหมู่ benzoyl เข้าที่เบส A และ C และเติมหมู่ isobutyryl เข้าที่เบส G (รูปที่ 8.34)



รูปที่ 8.34 การป้องกันหมู่อะมิโนของเบส A, C และ G

ในขณะเดียวกันก็ต้องป้องกันตำแหน่งที่ 5′ ของน้ำตาล โดยเติมหมู่ dimethoxytrityl chloride (รูปที่ 8.35) หลังจากการสังเคราะห์ DNA สิ้นสุดลง ก็กำจัดหมู่ที่ป้องกันเบส (protected base = PB) ออกโดยใช้ด่างอ่อน และใช้กรดอย่างอ่อนทำลายหมู่ dimethoxytrityl chloride

ในทางปฏิบัติโดยทั่วไป การสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธีการทางเคมี มักใช้สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ เพื่อใช้เป็นตัวติดตาม (probe) ใช้เป็น primer ใช้เป็น linker หรือใช้เป็น adaptor เป็นส่วนใหญ่



รูปที่ 8.35 การป้องกันตำแหน่งที่ 5′ ของน้ำตาล

8.3.2 การเตรียม Vector หรือ DNA พาหะ

ในการโคลนยีนจำเป็นต้องอาศัยพาหะ (vector) ที่จะนำชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจเข้าไปในเซลล์ของผู้รับ หรือ host cell โดย DNA นั้นยังคงสามารถ replicate และถ่ายทอดไปยังลูกหลานของ host cell ได้ ดังนั้นจำเป็นต้องนำ DNA ที่สนใจไปเชื่อมกับ vector โดย vector นั้นจำเป็นต้องมีคุณสมบัติดังนี้ คือ

1. มีคุณสมบัติในการ replicate ได้อย่างอิสระใน host cell หรือกล่าวได้ว่า vector นั้นจะต้องมีจุดเริ่มต้นของการ replicate (origin of replication) เรียกสั้น ๆ ว่า ori โดย ori ของ vector นั้นต้องแยกอิสระจาก ori ของโครโมโซม ori นี้จะเป็นลำดับเบสที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของ DNA นั้น บางทีเรียกลำดับเบสเหล่านี้ว่า replicon พบว่าการเลือกใช้ vector ใด ๆ จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับ host cell ด้วย เพราะถ้าเลือก vector ที่มี ori ที่ไม่เหมาะสมกับ host cell vector นั้นก็จะไม่มีการ replicate ใน host cell เมื่อเซลล์แบ่งตัว vector นั้นก็จะสูญหายไปได้

2. vector ต้องมีเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ายีนเครื่องหมายสำหรับคัดเลือก (selectable marker) genetic markerใช้สำหรับคัดเลือก host cell ที่ได้รับ vector ที่มี DNA ที่สนใจเข้าไป ส่วนมาก genetic marker เป็นยีนที่จำเป็นต่อการเกิดสีของโคโลนีของ host cell ในอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ เช่น ยีนสร้างเอนไซม์ β – galactosidase หรือยีนที่ใช้แสดงลักษณะภายนอก (phenotype) อย่างชัดเจน เช่น ยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเป็นต้น

3. คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของ vector คือ มีตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับแทรกยีนที่สนใจ (insert site or cloning site) ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเพียง 1 ตำแหน่ง insert site นี้อาจอยู่ภายใน genetic marker ยีนใดยีนหนึ่งก็ได้ ถ้ามี genetic marker มากกว่า 1 ยีน จุดตัดนี้จะเป็นจุดที่ตัดเพื่อแทรก (insert) ยีนที่สนใจเข้าไปนั่นเอง อย่างไรก็ดี insert site นี้จะต้องอยู่นอกบริเวณ ori ไม่เช่นนั้นจะทำลายความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ vector ใน host cell ได้

ปัจจุบันมีการพัฒนา vector ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก แบ่งได้เป็น 3 ชนิดคือ พลาสมิด (plasmid) ฟาจ (phage) และคอสมิด (cosmid)

8.3.2.1 Plasmid

Plasmid เป็น DNA ที่อยู่นอกโครโมโซม พบในบักเตรีหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวนเกลียวคู่ พันเกลียวแบบ super coil มีขนาดตั้งแต่ 1,000 คู่เบสถึง 200,000 คู่เบส plasmid จะมี ori ของตัวเอง การ replicate จึงเกิดขึ้นอิสระจาก DNA ของโครโมโซม plasmid ทำหน้าที่เก็บข้อมูลที่จะสร้างโปรตีนที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์ เช่น ผลิตยาปฏิชีวนะได้ ทำให้เกิดการต้านต่อยาปฏิชีวนะได้ หรือสร้างสารโคลิซินซึ่งสามารถฆ่าบักเตรีที่ผลิตสารนี้ไม่ได้ เป็นต้น อย่างไรก็ดี plasmid ไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์ของบักเตรี ยกเว้นบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจพบหรือไม่พบ plasmid อยู่ในบักเตรี plasmid แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ stringent plasmid และ relaxed plasmid

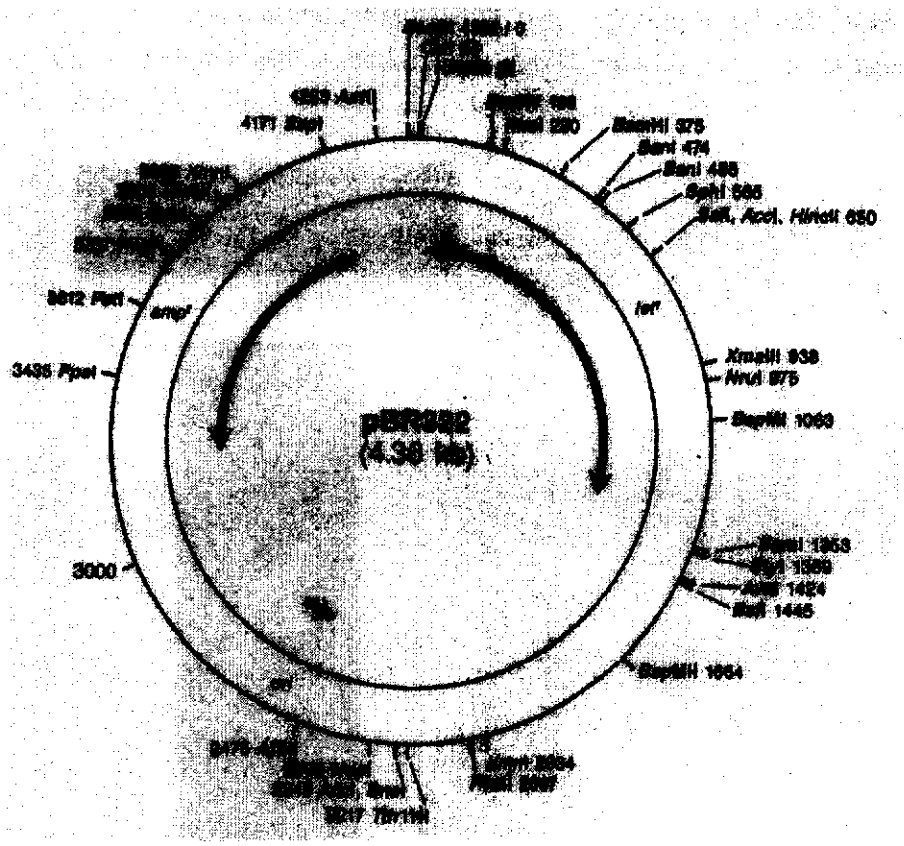
- **stringent plasmid**

stringent plasmid มักมีขนาดใหญ่ และมีจำนวนน้อยในเซลล์ อาจมีเพียง 1 หรือ 2 โมเลกุลเท่านั้น plasmid ชนิดนี้มีวิธีการ replicate ภายใต้การควบคุมแบบเดียวกับโครโมโซมของบักเตรี ดังนั้นถ้าไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน โครโมโซมของเซลล์และ stringent plasmid ก็จะไม่สามารถ replicate ได้

- **relaxed plasmid**

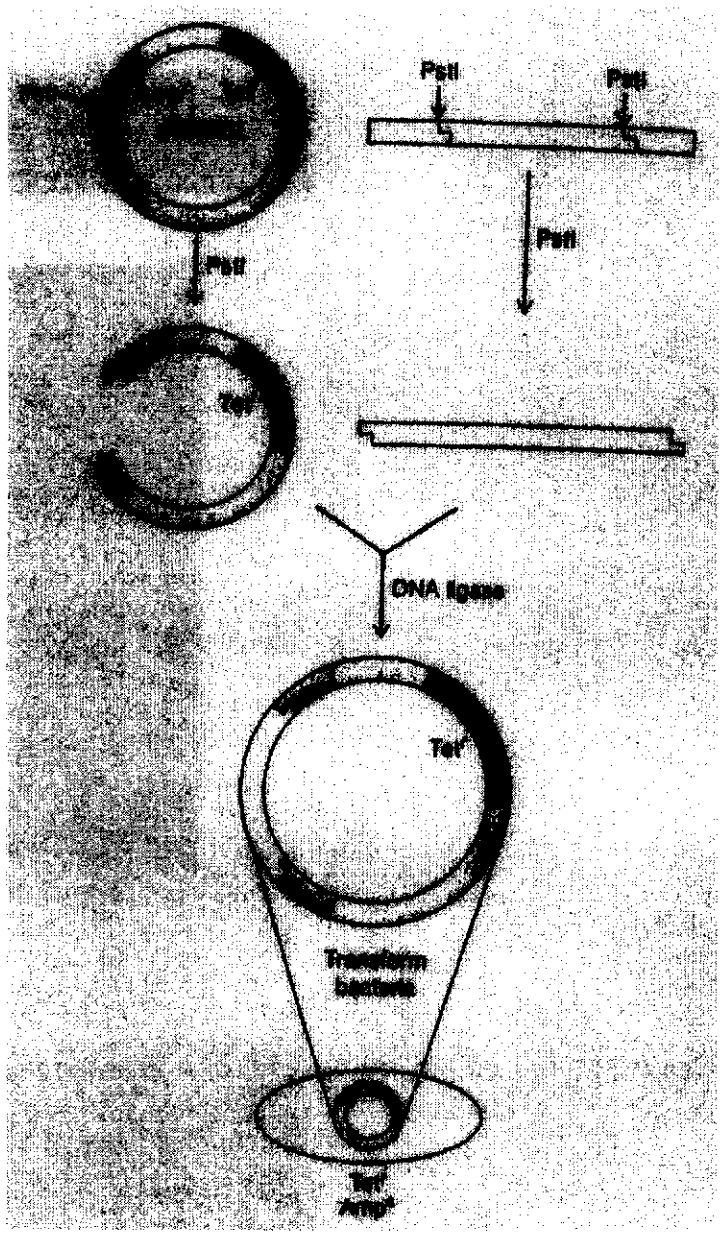
relaxed plasmid มีขนาดเล็ก การ replicate ของ relaxed plasmid ไม่ขึ้นอยู่กับการ replicate ของโครโมโซม กล่าวคือแม้การ replicate ของ chromosomal DNA หยุดลง การ replicate ของ plasmid ชนิดนี้ยังคงดำเนินต่อไปได้ กล่าวได้ว่าการ replicate สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาอย่างอิสระ ทำให้ plasmid ชนิดนี้มีจำนวนหลายโมเลกุลในหนึ่งเซลล์ บางชนิดอาจมีมากถึง 100โมเลกุลต่อหนึ่งเซลล์ และสามารถเพิ่มจำนวนได้มากถึง 1,000 โมเลกุลต่อเซลล์

ดังนั้นจึงพบว่า plasmid ที่ใช้ในการโคลนยีน จึงเป็น relaxed plasmid เพราะมีการ replicate ได้อย่างอิสระ และมีขนาดเล็ก การที่มีขนาดเล็กนอกจากจะทนต่อการขาดในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ แล้ว เมื่อแทรก DNA ที่สนใจเข้าไปแล้วขนาดจะได้ไม่ใหญ่มากนัก สะดวกต่อการถ่ายฝากเข้าสู่ host cell การแทรก DNA ที่สนใจเข้าใน plasmid มักใส่ตรงตำแหน่งภายใน genetic marker เพราะเมื่อแทรก DNA เข้าไปแล้วจะทำให้ activity ของ gene marker ดังกล่าวเสียไป ทำให้สามารถจำแนก host cell ที่ได้รับ plasmid ที่มี DNA ที่สนใจซึ่งเรียกว่า transformant ออกจาก host cell อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการได้ เรียกวิธีการนี้ว่า insertional inactivation เช่น การใช้ plasmid pBR322 (รูปที่ 8.36) pBR322 เป็น vector ซึ่งเป็น plasmid ที่มีการ replicate แบบ relaxed plasmid และมี genetic marker 2 ยีน คือ ยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดได้เพียง 1 ตำแหน่งอยู่หลายชนิด โดยตำแหน่งตัดของเอนไซม์มีทั้งที่อยู่ในส่วนของยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เช่น *Ppa*I และ *Pst*I เป็นต้น หรืออยู่ในส่วน



รูปที่ 8.36 plasmid pBR322

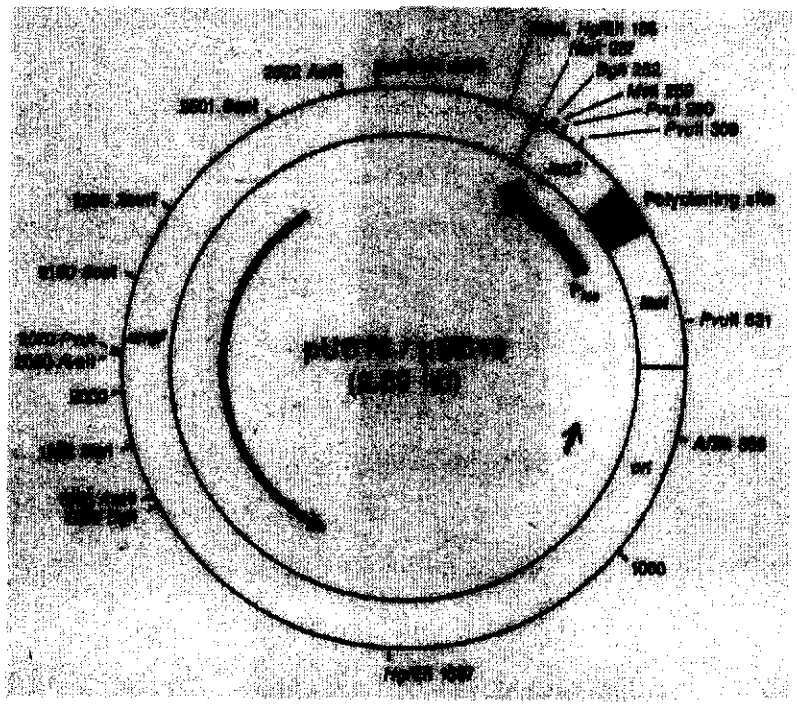
ของยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน เช่น *Bam*HI หรือ *Sph*I เป็นต้น ดังนั้น ถ้าใช้เอนไซม์ *Pst*I ตัด pBR322 แล้วแทรก DNA ที่สนใจซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I เช่นกัน จะทำให้เกิดปลายเหนียวซึ่งเชื่อมต่อกันได้ด้วยเอนไซม์ ligase (รูปที่ 8.37) ทำให้ได้ recombinant DNA หรือเรียกว่า plasmid ลูกผสมซึ่งเมื่อถ่ายฝากเข้าไปในบักเตรีแล้ว หลังจากนั้นจะสามารถคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้ โดยการเลี้ยงบักเตรีในอาหารที่ใส่ยาเตตราไซคลิน จะพบว่าบักเตรีที่ได้รับ plasmid pBR322 เดิมที่ไม่ถูกตัด ซึ่งยังคงมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด หรือบักเตรีที่รับ plasmid pBR322 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I ซึ่งเป็นเซลล์ที่ยังคงต้านทาน



รูปที่ 8.37 การโคลนยีนโดยใช้ plasmid pBR322

ต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน แต่ไม่ต้านทานต่อยาปฏิชีวินะแอมพิซิลินเสียแล้วจะขึ้นได้ เพราะ plasmid ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวยังคงมีคุณลักษณะของการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินดังกล่าว ส่วนบักเตรีที่ไม่ได้รับ plasmid จะไม่ต้านทานต่อยาทั้ง 2 ชนิดก็จะตายไป หลังจากนั้นย้ายโคโลนีของบักเตรีจากจานเลี้ยงเชื้อเดิมมาเลี้ยงในจานอาหารใหม่ที่ใส่ยาแอมพิซิลิน โดยให้ตำแหน่งของโคโลนีทั้งหมดอยู่ในลักษณะเดิม เรียกว่า replica plating โคโลนีใดที่มี plasmid เดิมที่ไม่ถูกตัดจะยังขึ้นได้ แต่โคโลนีที่ plasmid ถูกตัดด้วย *Pst*I จะขึ้นไม่ได้ เพราะสูญเสียคุณลักษณะของการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินไปเสียแล้ว จึงสามารถคัดเลือกเอา plasmid ถูกผสมชนิดนี้ได้ โดยย้อนกลับไปใช้โคโลนีจากจานเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (master plate)

ปัจจุบันมีการพัฒนา plasmid ขึ้นมาอีกเป็นจำนวนมาก แล้วแต่จุดประสงค์ที่ต้องการ เช่น มีการรวมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดที่ตัด plasmid ได้ตำแหน่งเดียว มาไว้ใกล้ ๆ กันเรียกว่า multiple cloning site หรือ polycloning site เช่น plasmid ในกลุ่ม pUC มีการพัฒนาขึ้นมาหลายหมายเลข เช่น pUC18 และ pUC19 (รูปที่ 8.38) plasmid กลุ่มนี้มี genetic marker 2 ชนิดคือยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และยีน β – galactosidase (*Lac* Z) ในการโคลนมักตัดตรงตำแหน่งของยีน *Lac* Z เพื่อใช้ในการแทรกชิ้น DNA ที่สนใจเข้าไป จึงทำให้ activity ของยีนนี้เสียไป นั่นคือเกิด insertional inactivation จึงทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ plasmid ถูกผสมออกจากเซลล์อื่น ๆ ได้ โดยนำเซลล์ต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและใส่สาร isopropyl – β – D – thiogalactoside (IPTG) ซึ่งเป็นสารที่เหนี่ยวนำ (induce) ให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β – galactosidase พร้อมกับใส่สาร 5 – bromo – 4 – chloro – 3 – indolyl – β – D – galactoside (X – gal) ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์นี้ลงไปด้วย ผลก็คือ บักเตรีที่ไม่ได้รับ plasmid จะขึ้นไม่ได้ แต่บักเตรีที่ได้รับ plasmid เดิมจะขึ้นได้ และสามารถผลิตเอนไซม์ β – galactosidase ขึ้นมาซึ่งจะย่อย X – gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้าขึ้น ส่วนบักเตรีที่รับ plasmid ถูกผสมซึ่งขึ้นได้ แต่ไม่มี activity ของเอนไซม์ โคโลนีจึงไม่เกิดสี ด้วยวิธีนี้จึงสามารถแยกเซลล์ที่มี plasmid ถูกผสมได้ในขั้นตอนเดียว ไม่ต้องทำ replica plating อีก



รูปที่ 8.38 plasmid pUC18 และ pUC19

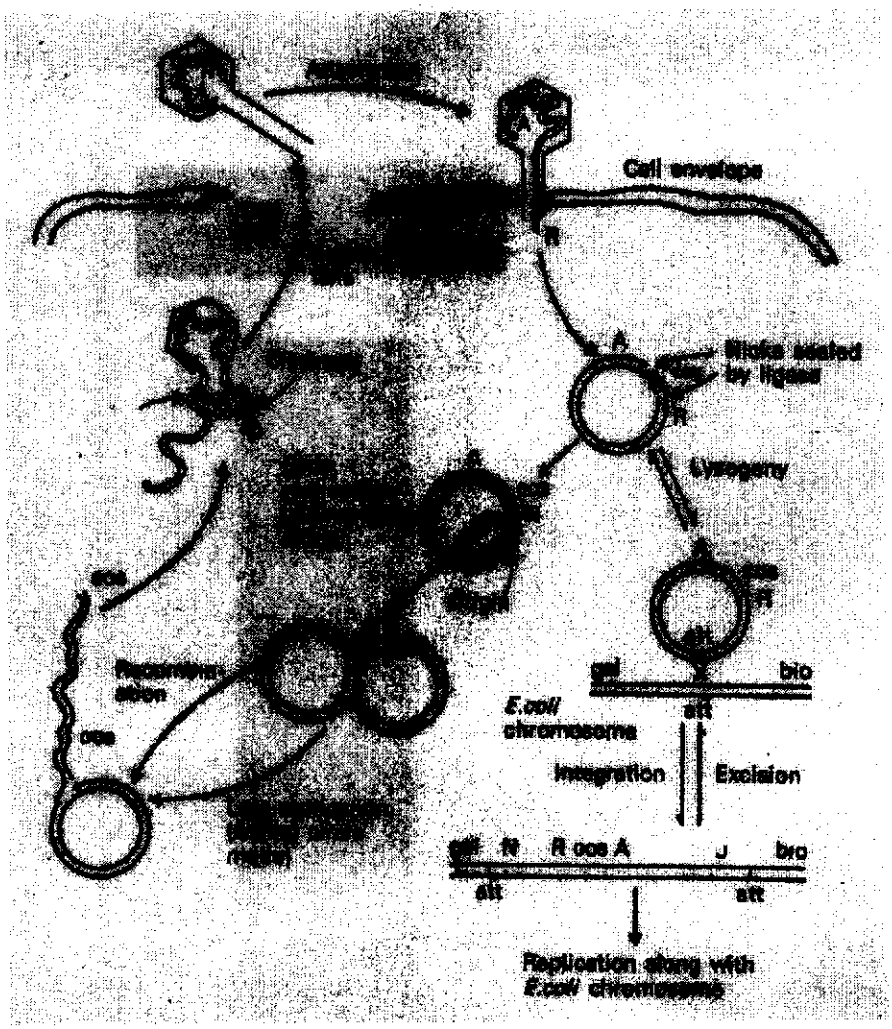
8.3.2.2 Phage

Phage หรือ Bacteriophage เป็น vector ที่มาจากไวรัส ที่ใช้เป็น vector ในการโคลนมี 2 พวกใหญ่ ๆ คือ phage ที่มีจีโนมเป็น DNA เกลียวคู่ ได้แก่ λ phage (lambda phage) และพวกที่มีจีโนมเป็น DNA สายเดี่ยวได้แก่ M13 phage

- λ phage

λ phage เป็นไวรัสที่มีจีโนมเป็น DNA เกลียวคู่ มีขนาดประมาณ 48,500 คู่เบส เมื่อ DNA นี้อยู่ในส่วนหัวของ λ phage จะอยู่ในสภาพที่เป็นสายยาว ปลายเปิดทั้ง 2 ข้าง

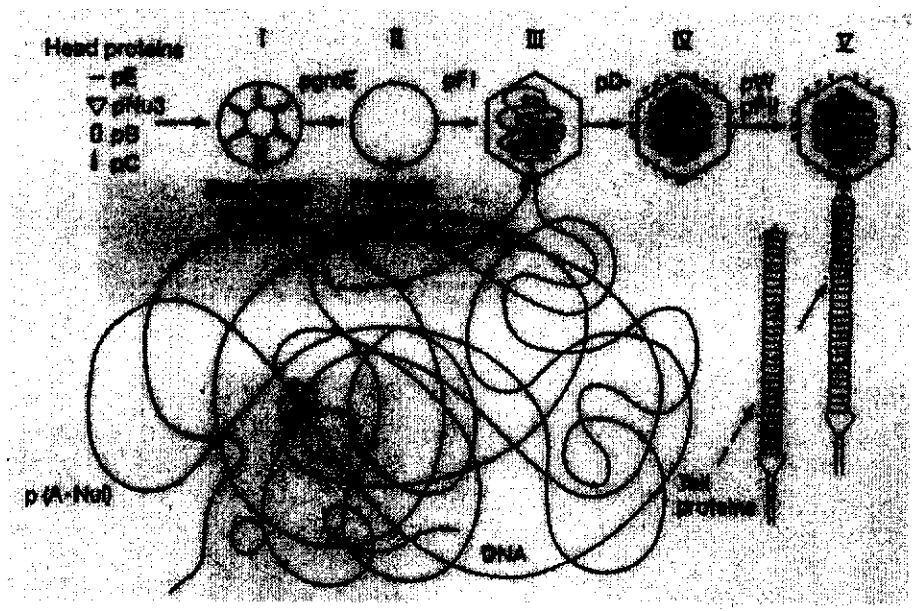
และมีลักษณะเป็นปลายเหนียวเรียกว่า cos (cohesive – end site) ซึ่งประกอบด้วย DNA สายเดี่ยวที่มีความยาว 12 เบส ปลายเหนียวทั้ง 2 ด้านมีลักษณะเป็นเบสคู่สมกัน พบว่าเมื่อ λ phage บุกรุกเข้าสู่บักเตรีซึ่งเป็น host cell DNA ปลายเปิดของ λ phage จะเปลี่ยนเป็น DNA รูปวงแหวน โดยการจับกันของเบสคู่สมที่ cos (รูปที่ 8.39) แล้วพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์จะถูกเชื่อมด้วยเอนไซม์ ligase จากนั้น λ phage ก็จะดำเนินชีวิตต่อไปในบักเตรี ซึ่งวงจรชีวิตของ λ phage จะแบ่งเป็น 2 แบบ คือ วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) กับวงจรชีวิตแบบไลโซจีนิก (lysogenic cycle)



รูปที่ 8.39 การดำรงชีวิตของ λ phage

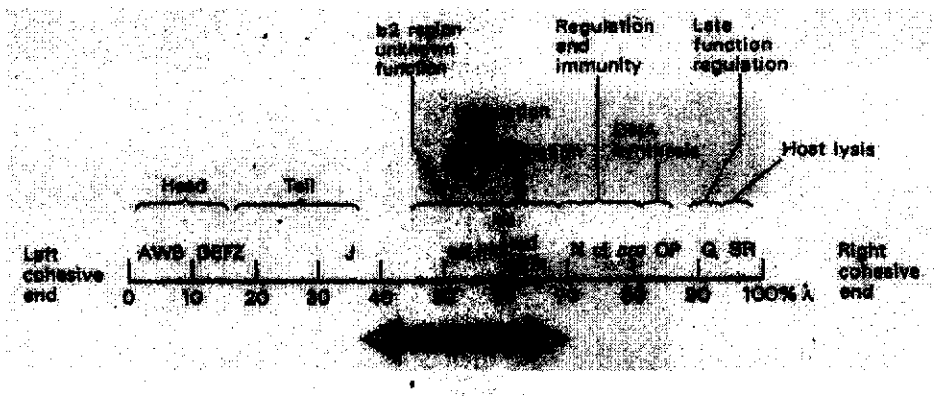
■ **Lytic cycle**

เมื่อ DNA ของ λ phage เข้าสู่บักเตรี DNA ของ λ phage ก็จะเริ่มกระบวนการ transcription และ translation ให้โปรตีนหลายชนิด รวมทั้งโปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการ replication ของ DNA ของ λ phage ด้วย ทำให้ได้ DNA ที่เป็นปลายเปิดจำนวนมาก และโปรตีนที่เป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของ λ phage จากนั้นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ของ λ phage และ DNA ที่สังเคราะห์ขึ้น จะประกอบกันเป็นอนุภาคของ λ phage ที่สมบูรณ์ (รูปที่ 8.40) ซึ่งสามารถออกจากบักเตรีได้โดยทำให้เซลล์แตก



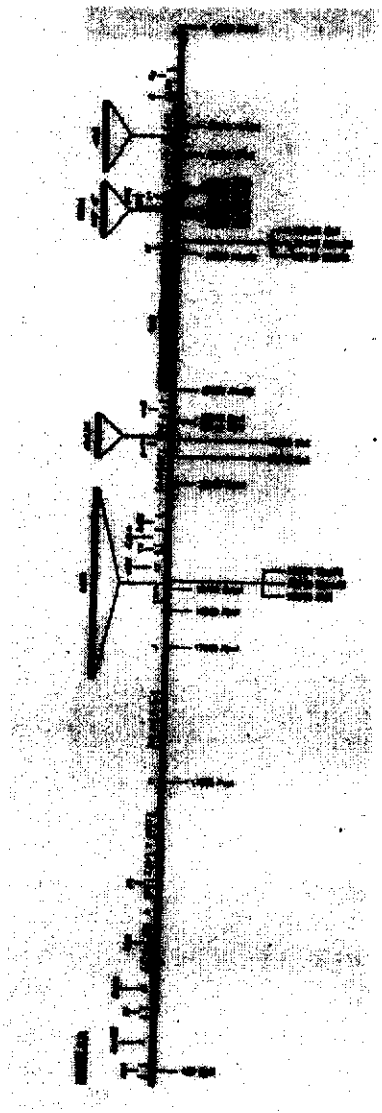
รูปที่ 8.40 การประกอบเป็นอนุภาคของ λ phage

พบว่ายีนต่าง ๆ ที่จำเป็นในวงจรชีวิตแบบไลติกของ λ phage จะอยู่ที่ด้านปลายทั้งซ้ายและขวาของ DNA เกลียวคู่ปลายเปิดในช่วง 0 – 11 กิโลเบส และช่วง 35 – 48.6 กิโลเบส ส่วนยีนช่วงกลาง คือประมาณ 18 – 35 กิโลเบส ไม่มีความจำเป็นสำหรับวงจรชีวิตนี้เลย (รูปที่ 8.41) จึงสามารถตัดออกและแทรก DNA อื่นลงไปแทนได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำ λ phage มาใช้เป็น vector ในการโคลน DNA ทั้งนี้เพราะ DNA ของ λ phage ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะใด ๆ ที่

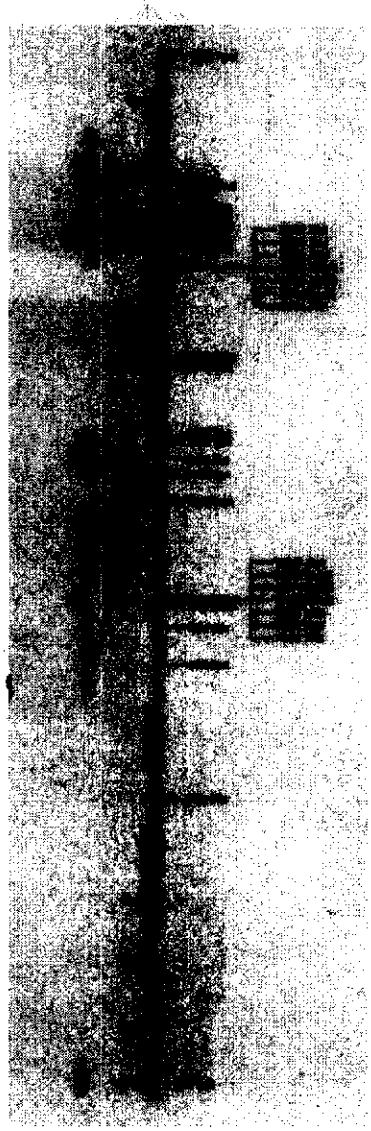


รูปที่ 8.41 ยีนต่าง ๆ ในวงจรชีวิตแบบไลติกของ λ phage

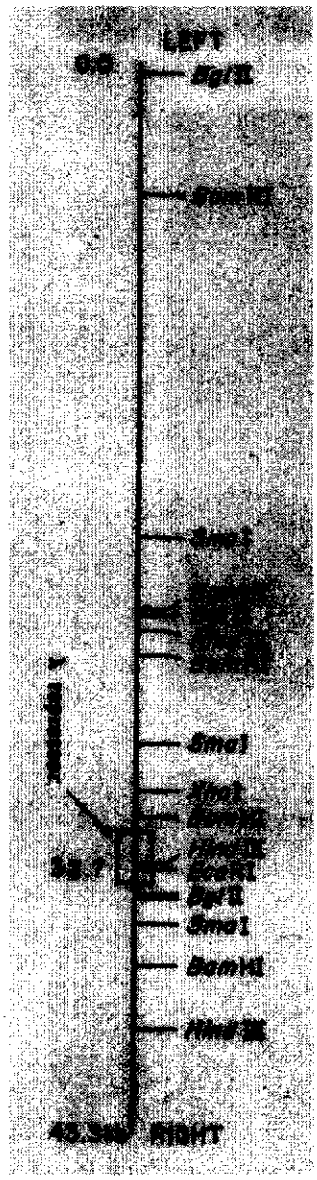
สามารถตัด DNA ได้เพียงจุดเดียวเลย เช่นในกรณีของ λ phage ที่มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 จุดที่อยู่ห่างกัน ก็สามารถนำมาใช้เป็น vector ได้ โดยการตัดเอาชิ้นส่วนที่ไม่จำเป็นออกไป แล้วแทนที่ด้วย DNA ที่สนใจจะโคลน วิธีการนี้เรียกว่า replacement vector อย่างไรก็ดี สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือปริมาณของ DNA ที่ตัดออกและใส่เข้าไป กล่าวคือปริมาณของ DNA จะต้องสามารถบรรจุลงในหัวของ λ phage ได้และยังทำให้อนุภาคนั้นสามารถบุกรุกเข้าสู่บักเตรีแล้วทำให้เกิด plaque ได้ตามปกติ (infective plaque) พบว่าปริมาณ DNA จะต้องอยู่ในช่วง 78 – 105 % ของปริมาณ DNA ปกติเท่านั้น เช่น λ EMBLA (รูปที่ 8.42) และ λ 2001 (รูปที่ 8.43) อีกกรณีหนึ่งสามารถนำ λ phage มาใช้เป็น vector ได้เช่นกัน แต่ต้องมีการสร้างพันธุ์กลาย ที่ทำให้สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว สำหรับแทรกยีนเข้าไป เรียกวิธีการนี้ว่า insertion vector เช่น λ gt 10 (รูปที่ 8.44) และ λ gt 11 (รูปที่ 8.45) อย่างไรก็ดีแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ก็ยังพบว่า DNA ของ λ phage ที่สร้างขึ้นใหม่นี้ยังคงมีส่วนของ DNA ที่จำเป็นสำหรับการประกอบเป็นอนุภาคของ λ phage ได้ครบถ้วน แต่จะมีความแตกต่างที่สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการตรวจคัดเลือกหา host cell ที่รับ λ phage ลูกผสมเข้าไปได้ โดยการดูลักษณะของ plaque ที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับคัดเลือกเซลล์ เช่น λ gt 10 มีจีโนมขนาด 43.3 กิโลเบส สามารถแทรก DNA ที่สนใจเข้าไปได้ไม่เกิน 7 กิโลเบส ที่ตำแหน่งของเอนไซม์ *Eco*RI ซึ่งอยู่ภายในยีน cI เมื่อมีชิ้น DNA ที่สนใจแทรกอยู่ λ phage ลูก



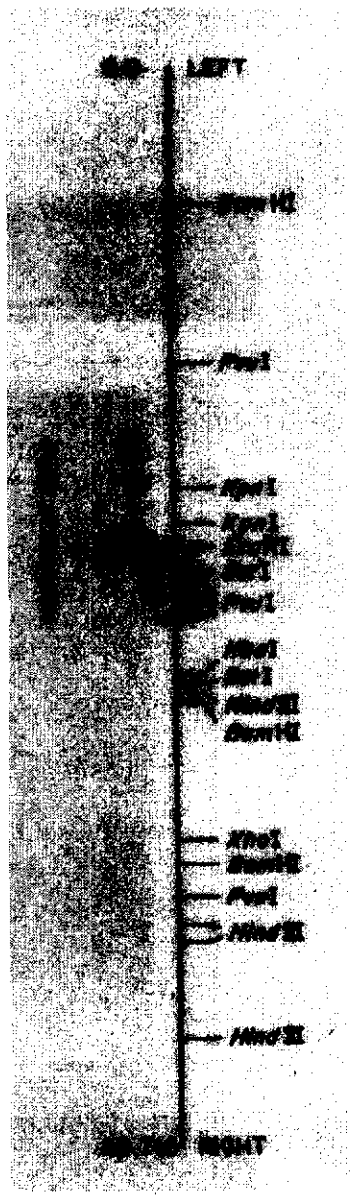
รูปที่ 8.42 λ EMBLA



รูปที่ 8.43 λ 2001



รูปที่ 8.44 λ gt 10



รูปที่ 8.45 λ gt 11

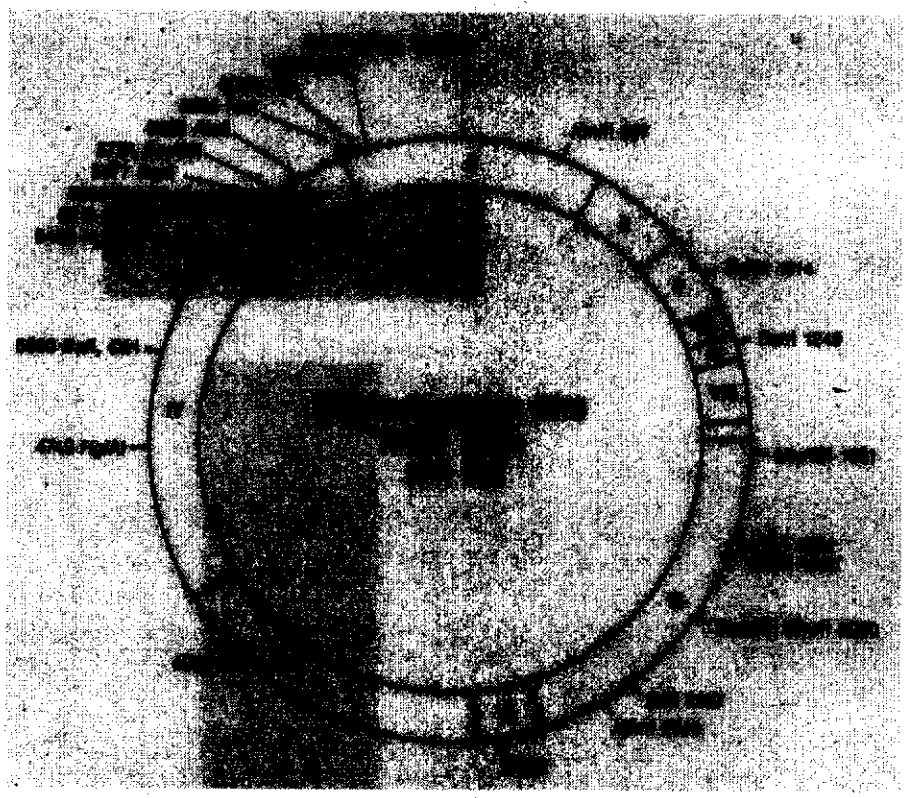
ผสมนี้จะแสดง phenotype เป็น cI^- หรือเกิด insertional inactivation นั่นเอง ทำให้เกิด plaque ใส (clear plaque) ส่วนบักเตรีที่ได้รับ λ phage ที่ไม่มีชิ้น DNA ที่สนใจอยู่ จะแสดง phenotype เป็น cI^+ ซึ่งทำให้เกิด plaque แบบทึบแสง (cloudy plaque) หรือกรณีของ λ gt 11 ซึ่ง vector นี้มี genetic marker เป็น *lac* Z ก็สามารถตรวจสอบความแตกต่างจากปฏิกิริยาการเกิดสีฟ้าเมื่อใส่สาร IPTG และ X – gal เช่นเดียวกับ plasmid ที่กล่าวไปแล้ว ด้วยวิธีการเหล่านี้จึงสามารถแยกเซลล์ที่มี λ phage ถูกผสม ออกจากเซลล์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการได้

■ **Lysogenic cycle**

Lysogenic cycle เกิดขึ้น เมื่อวงจรชีวิตแบบไลทิกถูกยับยั้ง วงจรชีวิตแบบนี้ DNA ของ λ phage ซึ่งจับตัวเป็นวงแหวนตรงช่วงประมาณกิโลเบสที่ 28 – 34 จะเข้าไปเกาะกับโครโมโซมของบักเตรีที่ตำแหน่งจำเพาะ att (ดูรูปที่ 8.39) แล้วเข้ารวมตัวเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมของบักเตรีเรียกว่า prophage และจะเกิดกระบวนการ replication ควบคู่กันไปกับกระบวนการ replication ของ DNA ของบักเตรี เมื่อบักเตรีมีการแบ่งเซลล์ prophage นี้ก็ถูกส่งต่อไปยังเซลล์ลูกได้ด้วย นอกจากนี้ผลการรวมตัวของ DNA ของ phage และของบักเตรี ทำให้บักเตรีสามารถผลิต lysogen ซึ่งส่งผลให้บักเตรีที่มี prophage อยู่นี้ มีภูมิคุ้มกันต่อการบุกรุกของ λ phage อนุภาคอื่นได้ อย่างไรก็ดีถ้า prophage นี้หลุดออก (excision) จากบักเตรีได้ จะทำให้ λ phage นี้กลับไปดำเนินชีวิตแบบไลติกได้อีก

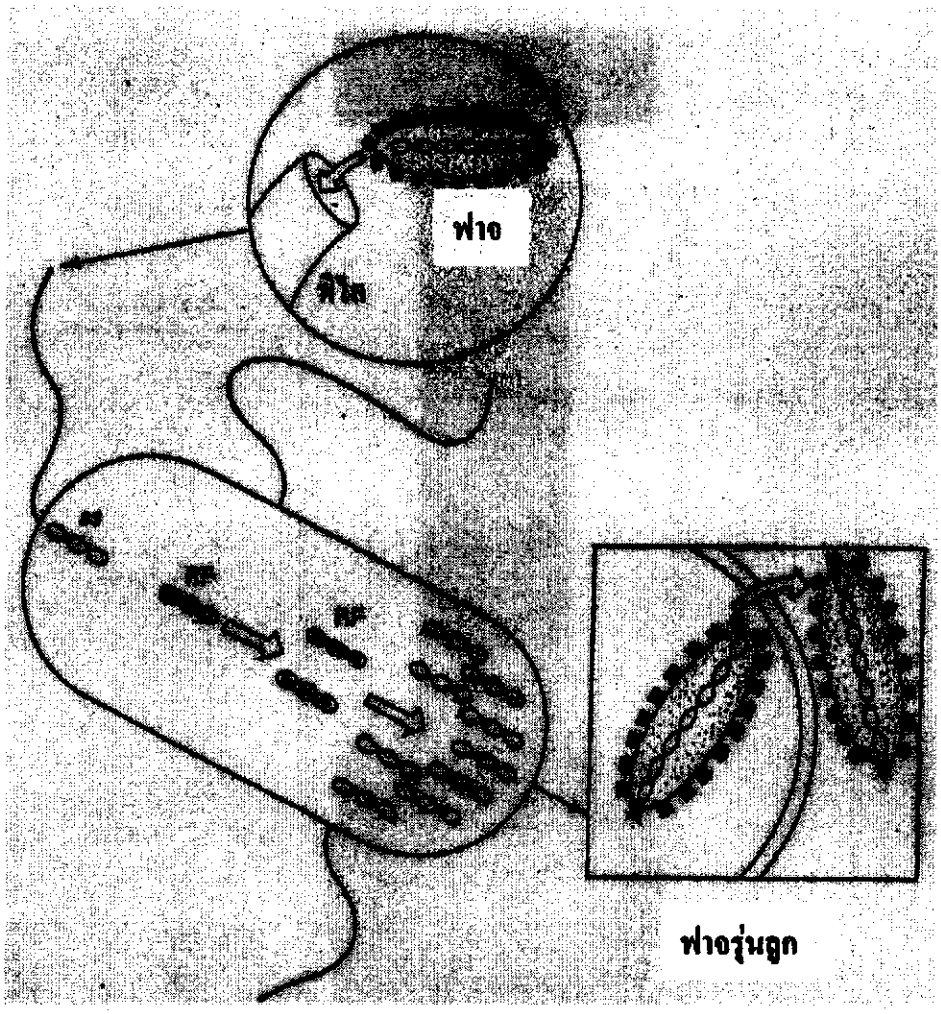
● **M13 phage**

M13 phage มีจีโนมเป็น DNA สายเดี่ยวขนาด 6407 เบส (รูปที่ 8.46) M13 phage บุกรุกเข้าสู่เซลล์บักเตรีทาง sex pilus (รูปที่ 8.47) แล้วจะมีการ replicate โมเลกุลของ DNA โดยใช้ DNA ของ M13 phage ที่เรียกว่า DNA (สาย +) เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ DNA (สาย -) ที่เป็นเบสคู่สมกันขึ้นมา ได้ DNA ที่เป็นวงแหวนเกลียวคู่เรียกว่า replicative form หรือ RF ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก ต่อมาการสังเคราะห์ DNA ในรูป RF จะน้อยลง ทั้งนี้เพราะในขณะที่สร้าง DNA ดังกล่าว จะมีการสังเคราะห์โปรตีนของ M13 phage ขึ้นมาด้วย และโปรตีนนี้จะเข้าจับกับ DNA (สาย -) ซึ่งเป็น complementary strand นั่นเอง แต่ M13 phage ก็จะมีการ



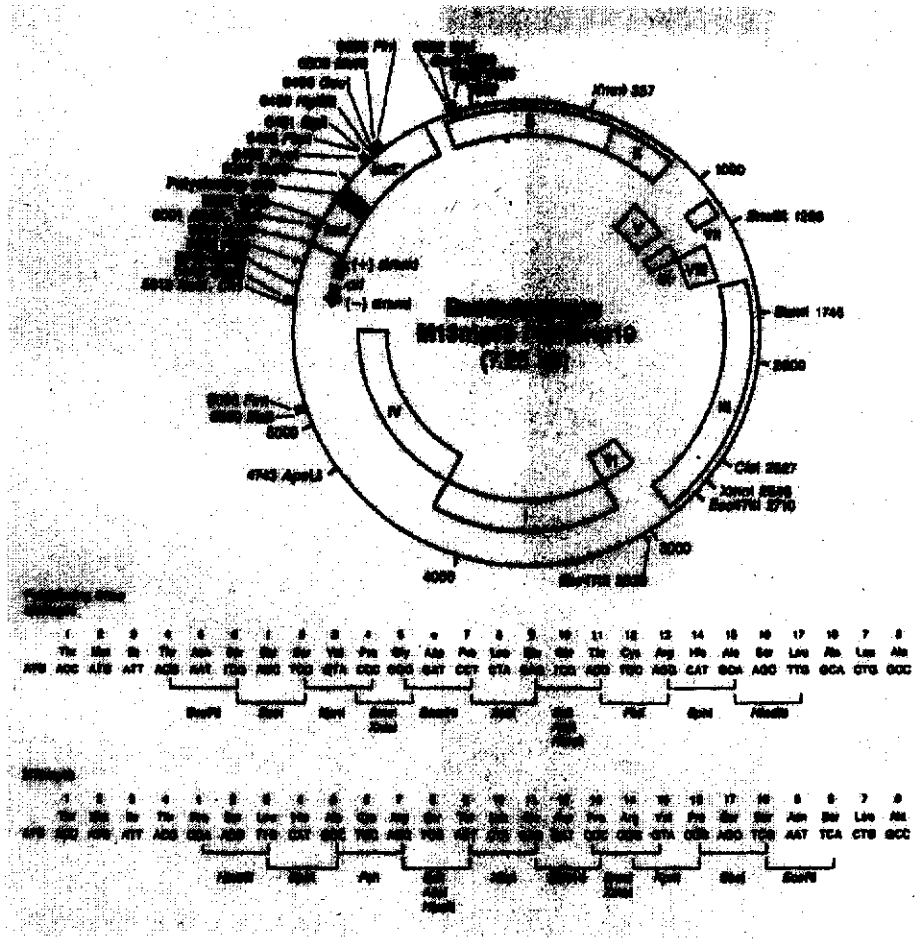
รูปที่ 8.46 จีโนมของ M13 phage

replicate ของ DNA ต่อไป ในรูปแบบใหม่ที่เรียกว่า rolling circle โดยจะมีการตัดโมเลกุลของ DNA (สาย +) ออกและใช้ DNA (สาย -) เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์แทน แต่การสังเคราะห์นี้จะเกิดขึ้นเฉพาะในสายนำ (leading strand) เท่านั้น ไม่มีการสังเคราะห์ในสายตาม (lagging strand) เนื่องจากมีโปรตีนของ M13 phage มายึดเกาะเอาไว้ ทำให้ได้ DNA สายเดี่ยวเฉพาะที่เป็น (สาย+) ซึ่งเป็นจีโนมเกิดขึ้นมากมาย ในขณะเดียวกันโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ M13 phage ก็ถูกสร้างขึ้น จึงเกิดการประกอบกันเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ของ M13 phage ขึ้น และอนุภาคเหล่านี้จะออกจากเซลล์บักเตรีได้โดยไม่ทำให้เซลล์แตก



รูปที่ 8.47 การบุกรุกเข้าสู่เซลล์บักเตรีของ M13 phage

โดยปกติในจีโนมของ M13 phage จะมี DNA ขนาด 507 นิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณที่ 5498 – 6005 ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่จำเป็นต่อวงจรชีวิตของ M13 phage จึงใช้ส่วนนี้ในการโคลนยีน แต่ในการใช้ M13 phage เป็น vector จะใช้ในรูปที่เป็น RF vector ที่สร้างขึ้นเช่น M13 mp18 และ M13 mp19 (รูปที่ 8.48) เมื่อตัดต่อยีนเข้าไปใน vector นี้แล้ว เซลล์ที่รับ vector ลูกผสมนี้เข้าไปจะเป็น plaque ที่ใสหรือบางกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกบุกรุกด้วย M13 phage

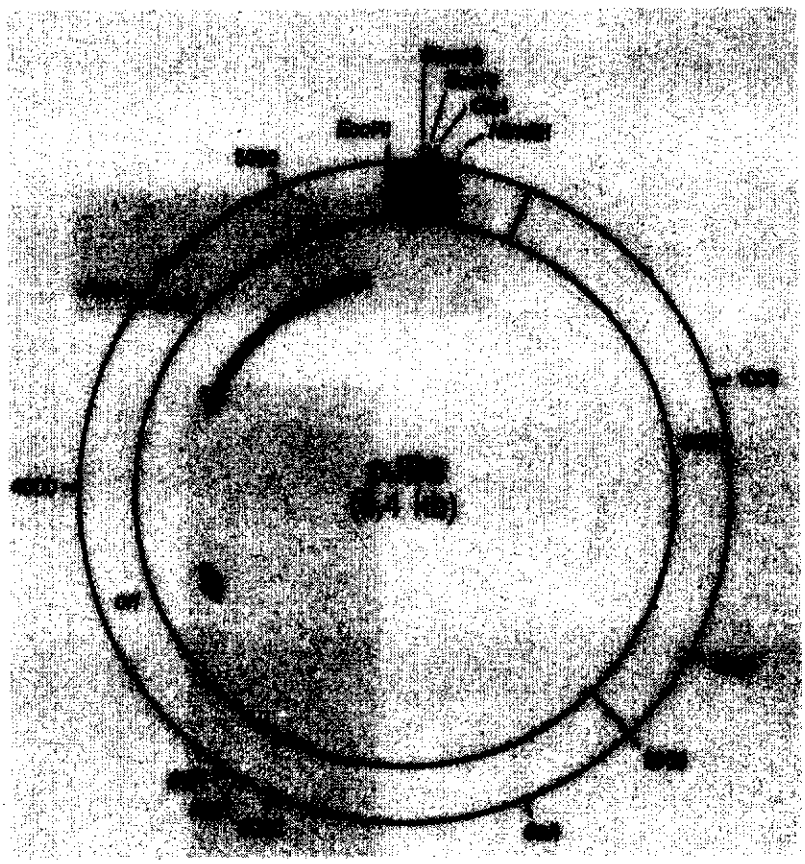


รูปที่ 8.48 M13 mp18 และ M13 mp19

8.3.2.3 Cosmid

Cosmid เป็น vector ที่ใช้โคลนชิ้น DNA ที่สนใจที่มีขนาดใหญ่กว่า vector ชนิดอื่น ๆ เกิดจากการนำตำแหน่ง cos ของ λ phage และชิ้นส่วนของ DNA ของ plasmid ที่มีจุดเริ่มต้นของการ replicate เข้ามารวมไว้ด้วยกัน ด้วยเหตุนี้จึงได้ชื่อว่า cosmid ดังนั้น cosmid จึง

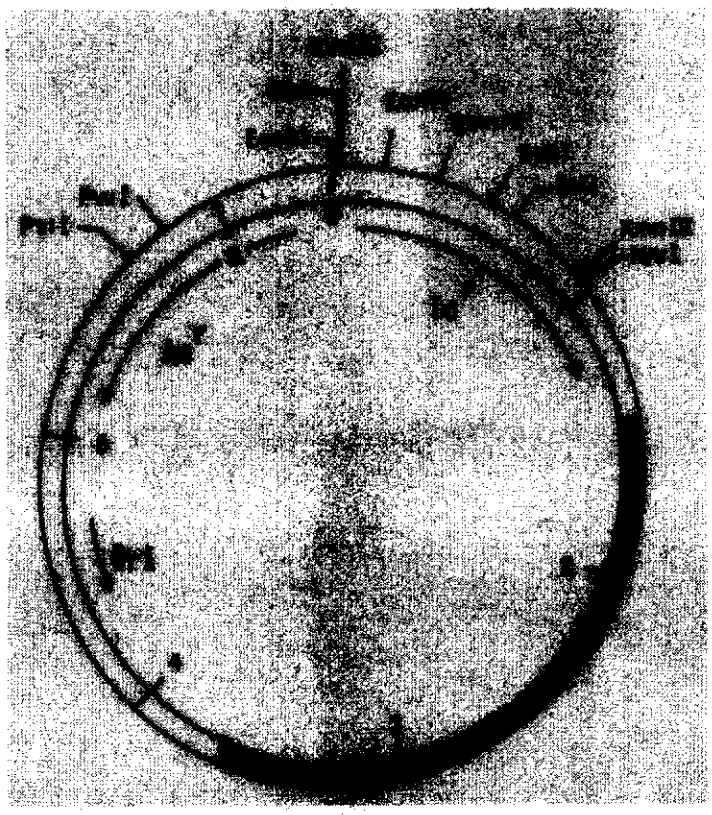
สามารถ replicate แบบ plasmid ในบักเตรีได้ และมี cos site ของ λ phage ที่ช่วยให้สามารถบรรจุ DNA ลงในโปรตีนห่อหุ้มของ λ phage ได้ และยังมี genetic marker สำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ vector นี้ด้วย เช่น pJB8 cosmid (รูปที่ 8.49) ซึ่งมีขนาด 5.4 กิโลเบส สามารถใส่ชิ้น DNA ที่



รูปที่ 8.49 pJB8 cosmid

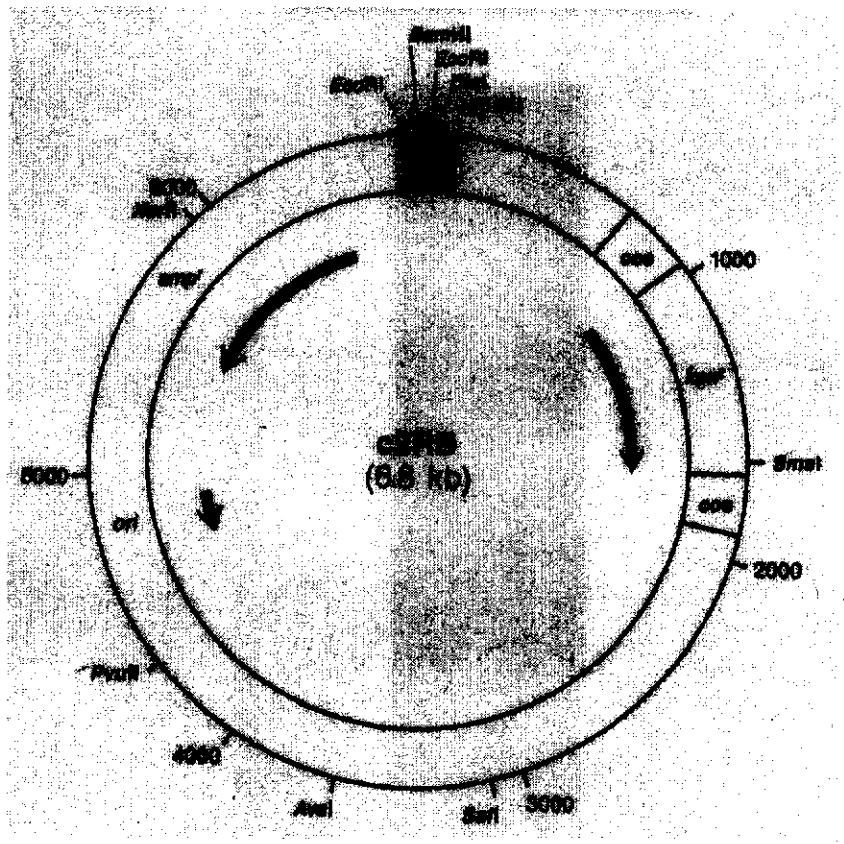
สนใจขนาด 32 – 46 กิโลเบสเข้าไปได้ เมื่อตัดต่อชิ้น DNA ที่สนใจเข้ากับ cosmid แล้ว นำ cosmid ลูกผสมนี้ไปบรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มของ phage ในหลอดทดลอง แล้วจึงนำคอสมิดลูกผสมที่อยู่ในรูปอนุภาคของ phage เข้าสู่เซลล์บักเตรี เมื่อ DNA ของ cosmid เข้าสู่เซลล์จะไม่สามารถสร้างอนุภาคของ phage ได้ แต่จะ replicate โมเลกุลของ DNA ในกรณีของ pJB8

cosmid สามารถคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินได้ สำหรับ pHC79 cosmid (รูปที่ 8.50) เกิดจากการผสมของ DNA ที่มีตำแหน่ง cos ของ λ phage แสดงด้วยสีดำ กับ DNA



รูปที่ 8.50 pHC79 cosmid

ส่วนที่เหลือได้มาจาก pBR322 plasmid ซึ่งมี genetic marker 2 ยีน คือลักษณะที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินและแอมพิซิลิน ทำให้สะดวกต่อการคัดเลือกเซลล์ที่มีคอสมิดถูกผสม ต่อมามีการพัฒนา cosmid ที่มี cos site 2 ตำแหน่ง (double cos site vector) และมี genetic marker 2 ยีน ช่วยให้การโคลนยีนในคอสมิดทำได้ง่ายขึ้นไปอีก เช่น c2RB (รูปที่ 8.51)



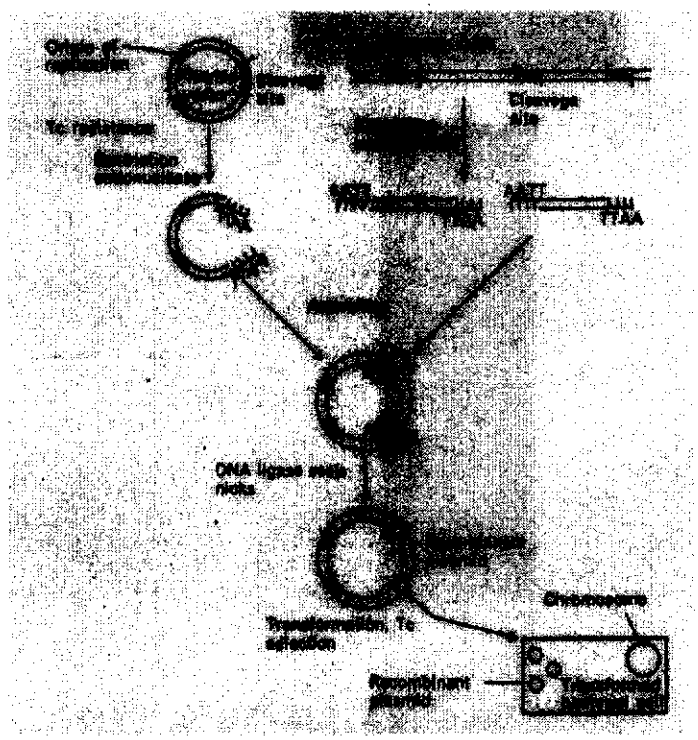
รูปที่ 8.51 c2RB

8.3.3 การสร้าง Recombinant DNA

เมื่อเตรียมชิ้น DNA ที่สนใจได้แล้ว ไม่ว่าจะเป็น genomic DNA หรือ cDNA ก็ตาม จะต้องนำมาเชื่อมเข้ากับ vector ผลผลิตที่ได้คือ recombinant DNA หรืออาจเรียกว่าเวคเตอร์ลูกผสม จึงนำไปถ่ายฝากเข้าสู่ host cell ได้ การเชื่อมต่อชิ้น DNA ที่สนใจเข้ากับ vector เพื่อสร้าง recombinant DNA มี 2 วิธีคือ Cohesive end ligation กับ Blunt end ligation

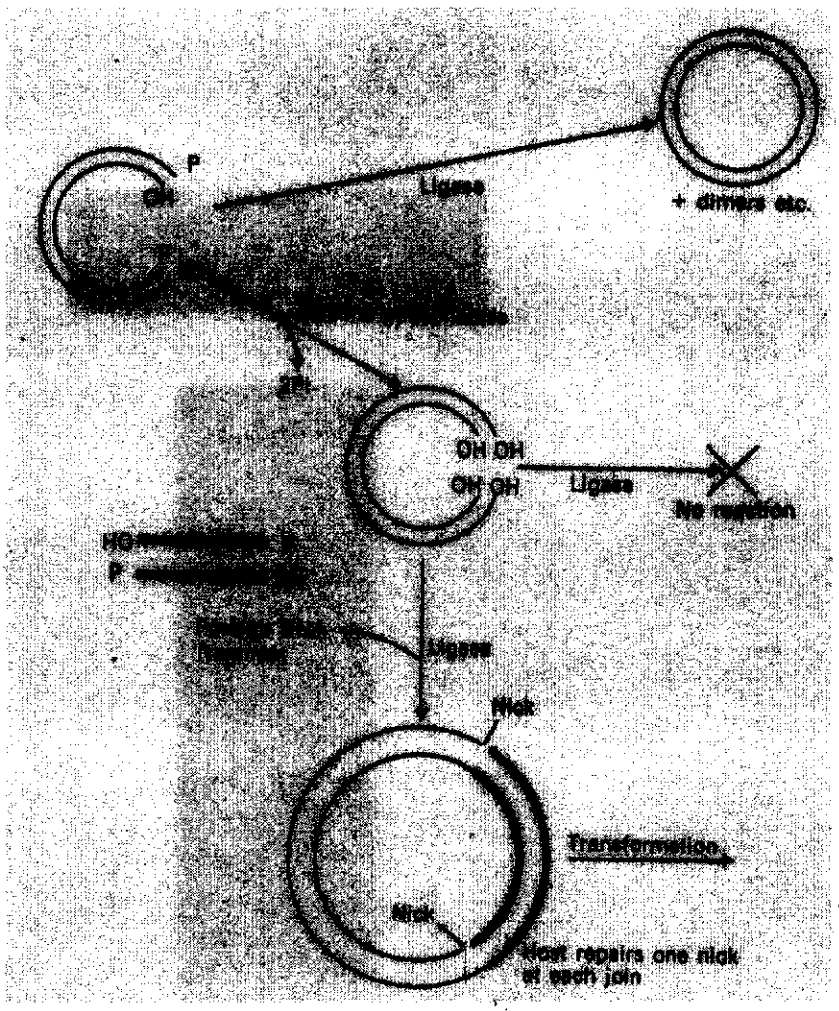
8.3.3.1 Cohesive end ligation

Cohesive end ligation เป็นการเชื่อมต่อ DNA ปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ ligase การเชื่อมนี้จะเกิดขึ้นได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูง ถ้าชิ้น DNA ทั้ง 2 ที่จะนำมาเชื่อมกันถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัวเดียวกัน กล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ เอนไซม์ชนิดนั้นต้องมีตำแหน่งจดจำบนชิ้น DNA ที่สนใจ และมีตำแหน่งจดจำบน vector ในบริเวณที่จะใช้โคลนด้วย เช่น การใช้เอนไซม์ *Eco*RI ตัดชิ้น DNA ที่สนใจ และ vector (รูปที่ 8.52) ก็จะได้ปลายเหนียวของ DNA ทั้ง 2 ชิ้นที่เป็นเบสคู่สมกัน จึงสามารถนำมาเชื่อมต่อกันได้



รูปที่ 8.52 Cohesive end ligation

ทันที อย่างไรก็ดีวิธีนี้จะมีข้อเสีย กล่าวคือ vector อาจเชื่อมต่อกลับเข้าไปเหมือนเดิม หรือ vector อาจเชื่อมกันเป็น dimer จึงต้องมีการดัดแปลงด้วยวิธีการตัดหมู่ฟอสเฟทที่ปลาย 5′ ของ vector ออกโดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase (รูปที่ 8.53) เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาย vector มาเชื่อมกันเองได้ ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ ligase จะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้เฉพาะ DNA ที่ปลาย 5′ มีหมู่ฟอสเฟท กับปลาย 3′ ที่มีหมู่ไฮดรอกซีเท่านั้น



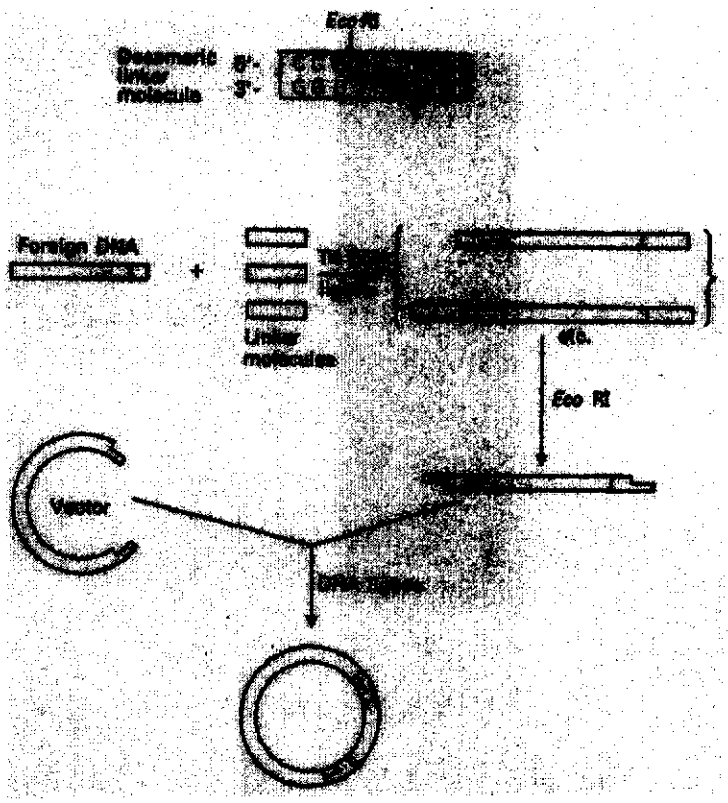
รูปที่ 8.53 การป้องกันไม่ให้เวคเตอร์มาเชื่อมกันเองโดยเอนไซม์ alkaline phosphatase

8.3.3.2 Blunt end ligation

Blunt end ligation เป็นการเชื่อมต่อ DNA ปลายทู่เข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ ligase การเชื่อมต่อวิธีนี้ยากกว่าวิธีแรก และต้องใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ ligase มากกว่าที่ใช้ในการเชื่อมต่อ DNA ปลายเหนียวหลายเท่า จึงมักมีการดัดแปลงชิ้น DNA ให้มีปลายที่จับคู่กันได้ก่อนที่จะนำมาเชื่อม ซึ่งทำได้โดยใช้ Linker, Adaptor หรือการดัดแปลงปลายให้มีเบสเป็นคู่สมกัน

- **Linker**

Linker เป็น DNA เกลียวคู่ท่อนสั้น ๆ ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการทางเคมีดังกล่าวไปแล้ว มีความยาวประมาณ 8 –10 คู่เบส และมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ



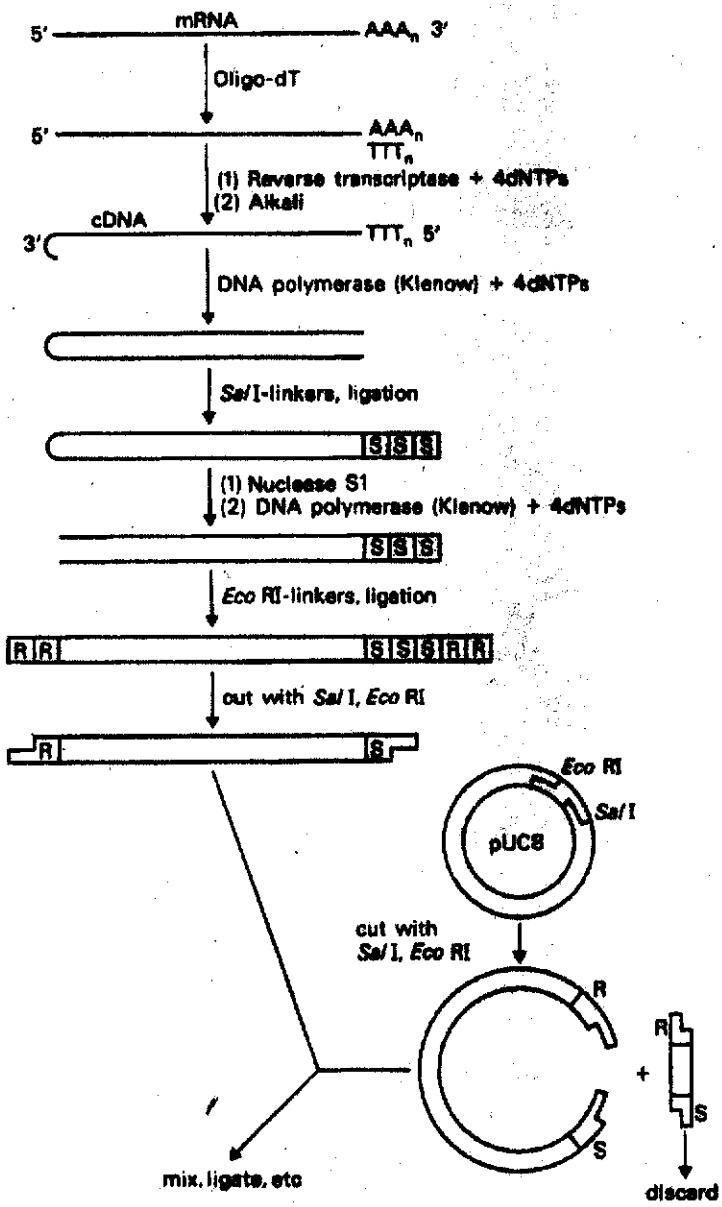
รูปที่ 8.54 การเชื่อมต่อ DNA โดยใช้ *Eco*RI linker

ชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น *Eco*RI linker (รูปที่ 8.54) จากนั้นนำ linker มาต่อกับชิ้น DNA ที่สนใจ (Foreign DNA) โดยจำเป็นต้องใส่ปริมาณ linkerให้มากเกินพอ เพื่อเปิดโอกาสให้ linker เข้าไปต่อที่ปลายทั้ง 2 ข้างของ DNA ที่สนใจทุกโมเลกุลด้วยการทำงานของเอนไซม์ ligase โดยอาจจะเกิดปฏิกิริยาต่อ linker เข้าที่ปลาย DNA มากกว่า 1 โมเลกุลก็ได้ ต่อไปทำการตัด linker ที่ต่ออยู่ที่ปลายทั้ง 2 ข้างของ DNA ที่สนใจด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ทำให้เป็นปลายเหนียวแล้วนำไปเชื่อมต่อกับ vector ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ซึ่งเกิดเป็นปลายเหนียวที่มีเบสคู่สมกัน

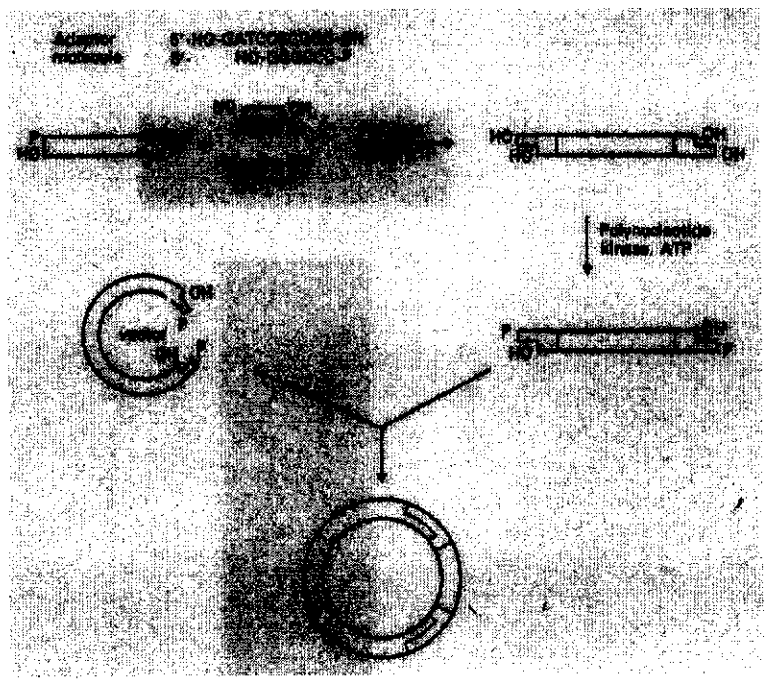
ต่อมามีการประยุกต์ต่อ linker ต่างชนิดกันเข้าที่ปลายทู่ทั้ง 2 ด้านของ DNA ควบคู่ไปกับการสังเคราะห์ cDNA โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อกำหนดทิศทางของชิ้น DNA นั้นขณะที่ต่อเข้ากับ vector ดังนั้นจึงต้องตัด vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด จึงจะเชื่อมต่อกับชิ้น DNA ที่มี linker 2 ชนิดที่ต่ออยู่ที่ปลายทั้ง 2 ด้านของ DNA ได้ (รูปที่ 8.55) โดยมีทิศทางที่แน่นอน

- **Adaptor**

Adaptor ก็เป็น DNA ท่อนสั้น ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นเช่นกัน โครงสร้างจะแตกต่างกับ linker กล่าวคือจะมีปลายข้างหนึ่งเป็นปลายทู่ (รูปที่ 8.56) ซึ่งสามารถใช้เชื่อมต่อกับ DNA ที่สนใจได้เลยด้วยเอนไซม์ ligase ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจะเป็นปลายเหนียวที่มีลำดับเบสที่เหมือนกับถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งเช่น *Bam*HI adaptor ยกเว้นที่ปลายด้านปลายเหนียวของ adaptor นี้ไม่ว่าจะเป็นปลาย 5′ หรือปลาย 3′ จะเป็นหมู่ไฮดรอกซีทั้งหมด จึงต้องใช้เอนไซม์ polynucleotide kinase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่ฟอสเฟทจากปลายโมเลกุลของ ATP ไปยังปลาย 5′ ของ adaptor ที่ต่ออยู่กับ DNA ที่สนใจก่อน จากนั้นก็สามารถนำไปเชื่อมต่อกับ vector ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ได้เลย



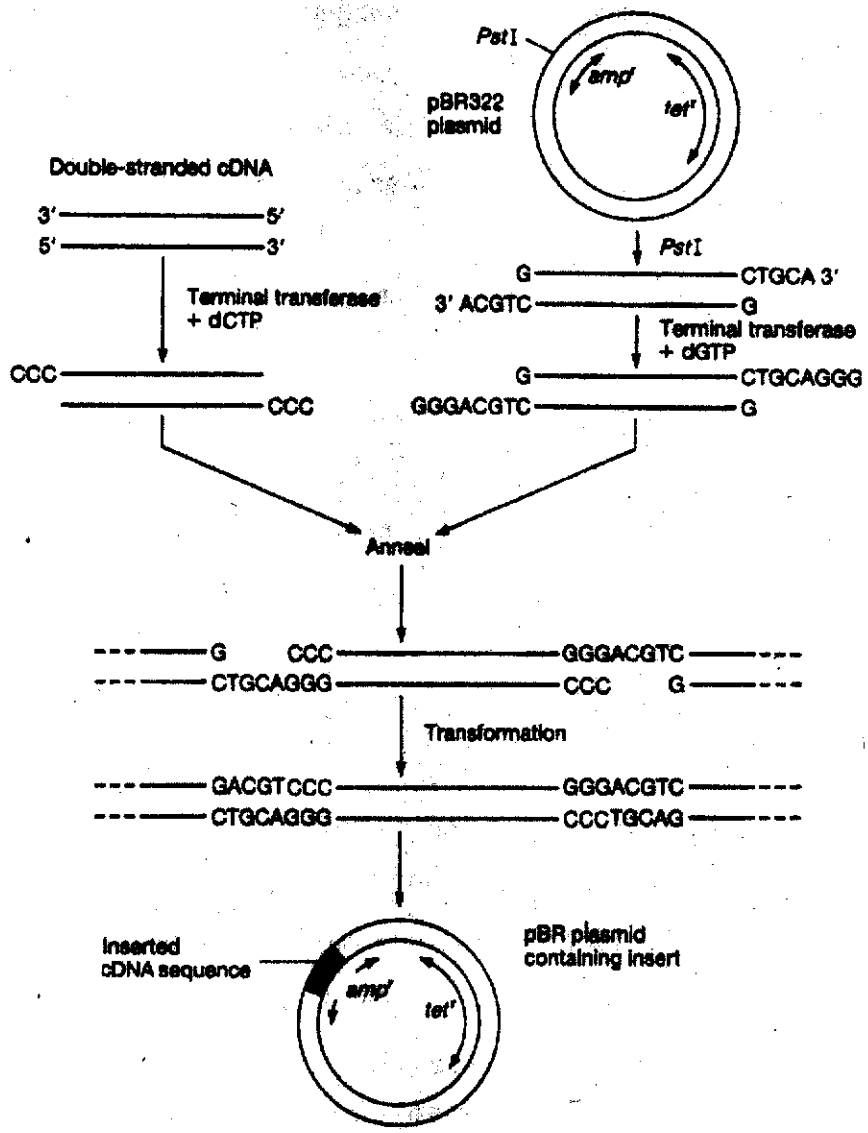
รูปที่ 8.55 การเชื่อมต่อ DNA โดยใช้ linker 2 ชนิด



รูปที่ 8.56 การเชื่อมต่อ DNA โดยใช้ *Bam*HI adaptor

- **การดัดแปลงปลายให้มีเบสเป็นคู่สมกัน**

การดัดแปลงปลายให้มีเบสเป็นคู่สมกันทำได้โดยการเติมเบสชนิดหนึ่งเข้าที่ปลาย 3′ ของชิ้น DNA ปลายทู่ที่สนใจ (รูปที่ 8.57) เช่น เติมเบส poly C จากนั้นเติมเบสที่เป็นคู่สม คือ poly G เข้าที่ปลาย 3′ ของ vector โดยการทำงานของเอนไซม์ Terminal transferase เอนไซม์ชนิดนี้ใช้ในการเติม homopolymer เข้าที่ปลาย DNA สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องอาศัย



รูปที่ 8.57 การเชื่อมต่อ DNA โดยการดัดแปลงปลายให้มีเบสเป็นคู่สมกัน

primer และแม่พิมพ์ พบว่า DNA ปลายเหนียวที่เป็น 3′ protruding end จะเป็น substrate ได้ดีกว่า DNA ปลายเหนียวที่เป็น 5′ protruding end หรือ DNA ปลายทู่ เมื่อเติมเบสที่เป็นคู่สมกันที่ปลาย 3′ ของ DNA ที่สนใจและ vector เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำชิ้น DNA ที่สนใจกับ vector มาเชื่อมกันโดยจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างปลาย 3′ ที่มีเบส C และ G ที่ต่อไว้ แต่จะมีช่อง

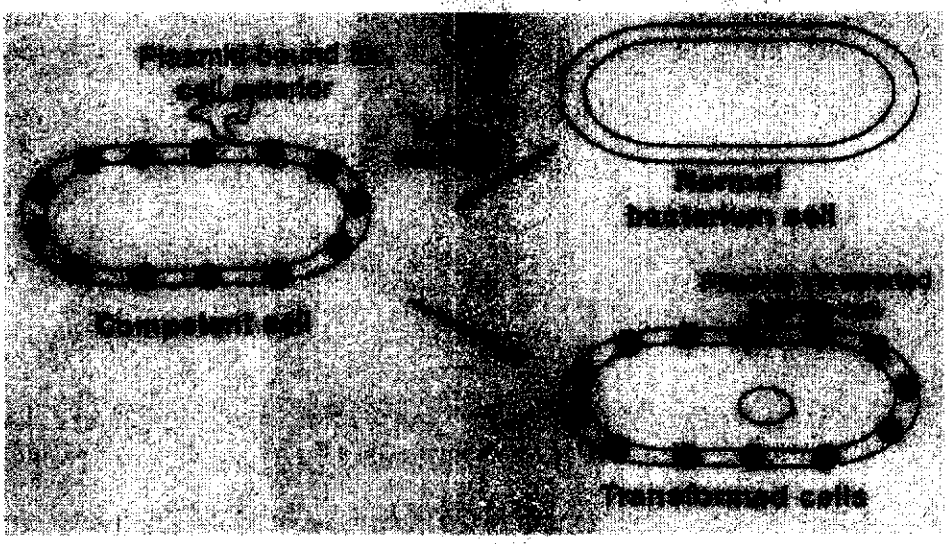
ว่างอยู่ระหว่างชิ้น DNA กับ vector พบว่าช่องว่างนี้จะถูกเติมเต็มเมื่อถ่ายฝาก vector ลูกผสมนี้เข้าไปใน host cell วิธีการเชื่อม DNA วิธีนี้เรียกว่า complementary ligation วิธีการนี้จะช่วยป้องกันไม่ให้โมเลกุลของ vector วกกลับมาต่อกันเองได้ เนื่องจากมีการเติมเบสที่ปลายทั้ง 2 ด้านเหมือนกัน (homopolymer tail) จึงไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้

8.3.4 การนำ Recombinant DNA เข้าสู่ host cell

เมื่อเชื่อม DNA ที่สนใจกับ vector เกิดเป็น recombinant DNA หรือ vector ลูกผสมแล้วก็จะต้องนำ vector ลูกผสมนี้เข้าสู่ host cell ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของ host cell และ vector ที่นำมาใช้ เช่น transformation, transfection, transduction และ electroporation เป็นต้น

8.3.4.1 Transformation

Transformation เป็นวิธีการนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell โดยตรง ส่วนใหญ่ vector ที่ใช้วิธีการนี้จะเป็น plasmid ก่อนอื่นต้องทำให้ host cell อยู่ในสภาพที่พร้อมที่จะรับ DNA จากภายนอก นั่นคือทำให้มีสภาพเป็น competent cell (รูปที่ 8.58) โดยการทำให้ผนังเซลล์รั่วชั่วคราวด้วยการผสมกับสารละลายบางชนิดเช่น $CaCl_2$ หรือ dimethyl sulfoxide (DMSO) หรือใช้ไอออนบวกอื่น ๆ เช่น Mg^{2+}, Rb^{2+}, Co^{2+} หรือ K^+ เป็นต้น จากนั้นนำไปใส่รวมกับ recombinant DNA ที่อุณหภูมิ $0^\circ C$ DNA จาก plasmid จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อการทำลายด้วยเอนไซม์ Dnase เข้าจับที่ด้านนอกผนังเซลล์ของ host cell หลังจากนั้นทำ heat shock โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็วด้วยการนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ $42^\circ C$ เป็นเวลา 90 วินาที ซึ่งจะทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์เคลื่อนที่และดูดเอา recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นรูรั่วที่ผนังเซลล์จะถูกซ่อมแซมเข้าสู่สภาพเดิม plasmid ซึ่งมี ori ก็สามารถเพิ่มจำนวนใน host cell ได้ การนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell วิธีนี้มีประสิทธิภาพต่ำประมาณ $10^5 - 10^6$ เซลล์ต่อ 1 ไมโครกรัมของ DNA อย่างไรก็ดีประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์บักเตรีด้วยวิธีการ transformation นี้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ขนาด



รูปที่ 8.58 กระบวนการ Transformation

ของพลาสมิด พบว่าพลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่บักเตรีได้ดีกว่าขนาดใหญ่ และรูปร่างของพลาสมิดก็มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์บักเตรีเช่นกัน กล่าวคือพลาสมิดที่เป็นวงแหวนปลายปิด โดยเฉพาะที่พันธะเป็นเกลียวซ้อน จะเข้าสู่ host cell ได้ดีกว่ารูปที่เป็นเส้นตรง นอกจากนี้การเตรียม competent cell ก็มีผลต่อประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ด้วย พบว่าถ้าใช้ DMSO ในการเตรียม competent cell จะได้ผลดีกว่าการใช้สารละลาย $CaCl_2$ ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ตัว host cell เองพบว่าควรเลือกเซลล์ที่เจริญเติบโตถึงระยะ log phase จึงจะดีที่สุดในการนำมาใช้ในกระบวนการ transformation

8.3.4.2 Transfection

Transfection เป็นการนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์โดยตรงเช่นกัน แต่เป็น recombinant DNA ที่เกิดจากการใช้ phage ที่มีขนาดเล็กเป็น vector อันได้แก่ M13 phage นั่นเอง เมื่อ host cell ได้รับ DNA แล้ว ก็จะมีการเพิ่มปริมาณ DNA พร้อมทั้งสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ phage แล้วรวมตัวกันเป็นอนุภาคของไวรัส หลังจาก host cell แตก

อนุภาคของไวรัสก็จะสามารถ infect host cell ที่อยู่ใกล้เคียงได้ นั่นคือ transfection เท่ากับเป็นการนำ DNA ที่สามารถออกฤทธิ์ในการ infect เข้าสู่เซลล์นั่นเอง จากการ infect DNA ของ phage เข้าสู่เซลล์ จะมองเห็นเป็นจุดใส ๆ ของ clear plaque เกิดขึ้น พบว่าประสิทธิภาพของการเข้าสู่ host cell ด้วยวิธีนี้ต่ำมาก คือจะมีเซลล์ที่รับ DNA ได้ประมาณ 10^3 เซลล์ต่อ 1 ไมโครกรัมของ DNA จึงไม่เป็นที่นิยมใช้กัน

8.3.4.3 Transduction

Transduction เป็นวิธีเคลื่อน recombinant DNA ของ λ phage หรือ cosmid ที่บรรจุอยู่ในอนุภาคของ phage เข้าสู่ host cell เนื่องจาก DNA มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าสู่ host cell โดยตรงได้ เพราะมีประสิทธิภาพต่ำมาก จึงต้องใช้วิธีการบรรจุ DNA ลงในโปรตีนห่อหุ้มของ phage ก่อนด้วยวิธีการ in vitro packaging เมื่อได้เป็นอนุภาคของ phage ที่สมบูรณ์แล้วจึงนำเข้าสู่เซลล์ วิธีนี้จะให้ประสิทธิภาพสูงประมาณ $10^7 - 10^8$ เซลล์ต่อ 1 ไมโครกรัมของ DNA

8.3.4.4 Electroporation

Electroporation เป็นวิธีการนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่วทำให้ recombinant DNA สามารถเข้าสู่ host cell ได้โดยตรง วิธีนี้ค่อนข้างมีประสิทธิภาพสูง อาจสูงถึง $10^9 - 10^{11}$ เซลล์ต่อ 1 ไมโครกรัมของ DNA ถ้าใช้ขนาดของไฟฟ้าและเวลาที่พอเหมาะ และที่สำคัญคือไม่ต้องจำกัดขนาดของ DNA เหมือนวิธี transformation หรือ transfection

8.3.5 การตรวจคัดเลือก host cell ที่มี recombinant DNA ที่สนใจ

ในการตัดชิ้น DNA ไม่ว่าจะเป็นด้วยวิธีการใด ๆ ก็ตาม DNA ที่ตัดได้จะมีขนาดแตกต่างกันไป สั้นบ้าง ยาวบ้าง เป็นชิ้น DNA ที่ไม่มียีนที่สนใจบ้าง และเป็นชิ้น DNA ที่มียีนที่สนใจอยู่ด้วย เมื่อนำชิ้น DNA เหล่านี้ไปแทรกเข้าใน vector แล้วนำ vector ถูกผสม หรือ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะพบว่ามีเซลล์เป็นจำนวนมากที่ไม่ได้รับ recombinant DNA

เข้าไป หรือ recombinant DNA ที่ได้รับเข้าไปอาจไม่มียีนที่สนใจอยู่ ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของวิธีการต่าง ๆ ในการนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ดังกล่าวไปแล้ว อย่างไรก็ดียังมีเซลล์จำนวนหนึ่งที่ได้รับ vector ลูกผสมที่มี DNA ที่สนใจอยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจคัดเลือก host cell ที่ได้รับ vector ลูกผสมที่มี DNA ที่สนใจในกลุ่มเซลล์ทั้งหมดจึงสำคัญมาก วิธีการคัดเลือกเพื่อตรวจหา host cell ที่ต้องการมีหลายวิธี ที่สำคัญได้แก่ การตรวจหาจากลักษณะที่แสดงออกภายนอก (phenotypic screening) การตรวจหาโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี (immunochemical screening) และการตรวจหาโดยวิธีทางนิวคลีอิคแอซิดไฮบริไดเซชัน (nucleic acid hybridization screening)

8.3.5.1 Phenotypic screening

Phenotypic screening วิธีนี้อาศัยการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (phenotype) ของ host cell เมื่อได้รับ recombinant DNA ซึ่งสามารถแสดงออกได้ใน host cell นั้น ดังนั้นในการโคลนยีนต้องเลือกใช้ vector ที่เอื้ออำนวยให้ยีนสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับหรือ host cell ซึ่งจะส่งผลให้ host cell ที่ได้รับ vector ลูกผสมที่มียีนที่สนใจ สามารถแสดงลักษณะภายนอกตามที่ต้องการซึ่งจะแตกต่างไปจาก host cell เดิมหรือ host cell ที่รับ vector อื่น ๆ ที่ไม่มียีนที่สนใจ ได้แก่คุณลักษณะในการต้านทานยาปฏิชีวนะ เช่นลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และแอมพีซิลิน หรือความสามารถในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เช่น การสร้างเอนไซม์ β - galactosidase ซึ่งได้กล่าวไปแล้ว

8.3.5.2 Immunochemical screening

Immunochemical screening เป็นวิธีการนำมาใช้ตรวจสอบ host cell ที่ต้องการ เมื่อ host cell ดังกล่าวมี vector ที่เอื้ออำนวยให้ยีนสามารถแสดงออกโดยการผลิตโปรตีนได้คล้ายกับวิธีแรก เพียงแต่ไม่สามารถแสดง phenotype ให้เห็นได้ชัดเจนเหมือนวิธีแรก ทำให้ไม่สามารถคัดเลือก host cell ได้โดยตรง จึงต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์ ซึ่งถือเป็นแอนติเจนเป็นตัวตรวจสอบ โดยมีวิธีการตรวจสอบตามขั้นตอนดังนี้

1. นำ host cell ที่รับเอา recombinant DNA หรือ vector ลูกผสมเข้าไปแล้ว มาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้โคโลนี หรือ plaque

2. ย้ายโคโลนี หรือ plaque ลงบนแผ่น nitrocellulose filter

3. ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลอโรฟอร์ม เพื่อทำให้โปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ expose ออกมา

4. นำไป incubate กับแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ โดยติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารกัมมันตรังสีก่อนนำไปทำปฏิกิริยา

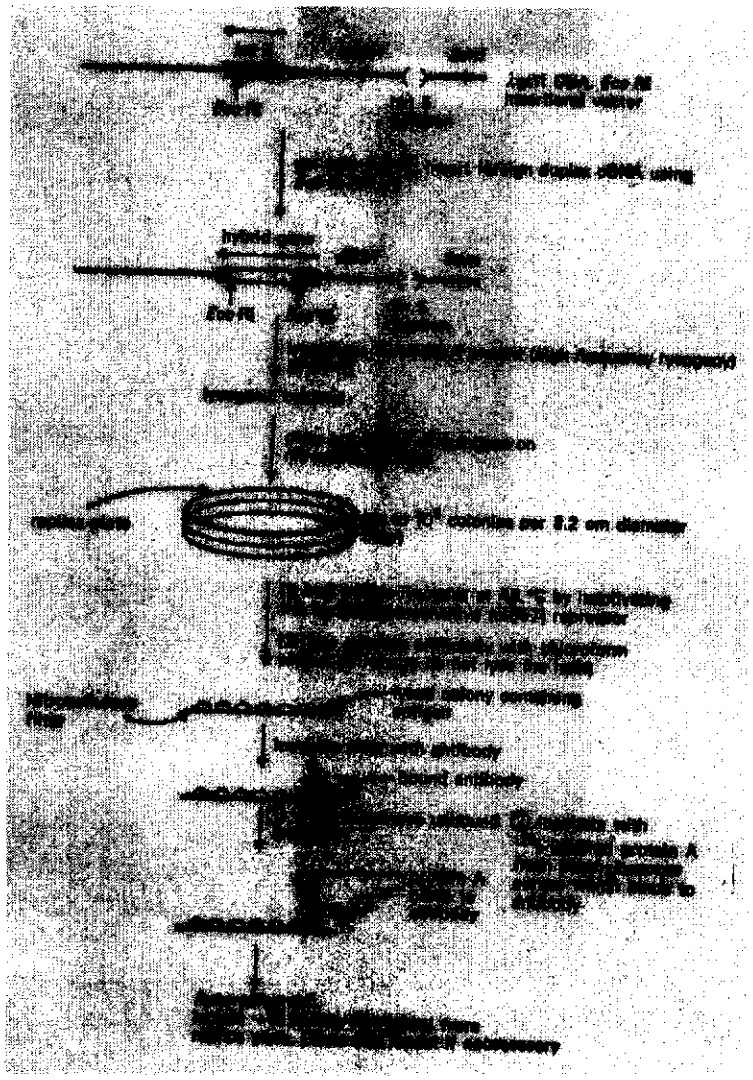
5. ตรวจสอบโดยการทำ autoradiograph ถ้าบริเวณใดมีโปรตีนที่ต้องการก็จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนจากเซลล์กับแอนติบอดีซึ่งจะเห็นเป็นจุดสีดำบนแผ่นฟิล์ม

6. นำฟิล์มไปเปรียบเทียบตำแหน่งกับจานเลี้ยงเชื้อ ก็สามารถแยกโคโลนี หรือ plaque ที่ต้องการออกมาได้

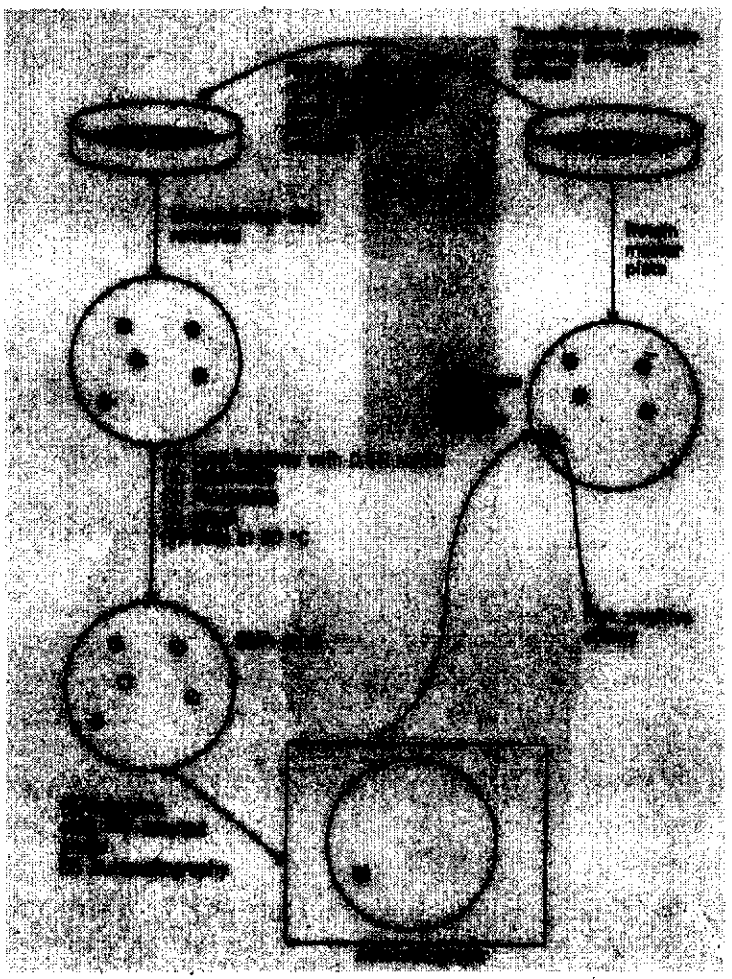
ในกรณีที่แอนติบอดีที่ใช้ไม่ได้ติดฉลากก่อนนำไปทำปฏิกิริยา ก็สามารถตรวจสอบได้อีก 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ใช้โปรตีน A ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีของไอโอดีน (^{125}I – protein A) (รูปที่ 8.59) เพราะโปรตีน A สามารถจับกับแอนติบอดี (Ig G) ทุกชนิดจากสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างไม่จำเพาะเจาะจง แล้วจึงตรวจสอบผลโดยการทำ autoradiograph เช่นกัน อีกวิธีหนึ่งทำได้โดยใช้แอนติบอดีชนิดที่ 2 ซึ่งเชื่อมอยู่กับเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ horseraddish peroxidase หรือเอนไซม์ alkaline phosphatase ก่อน แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิดที่ 1 ซึ่งจับอยู่แล้วกับ host cell ที่มีโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับ substrate ของเอนไซม์ซึ่งจะให้ผลผลิตที่มีสี จึงบอกตำแหน่งของโคโลนี หรือ plaque ได้ วิธีการนี้เรียกว่า Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

8.3.5.3 Nucleic acid hybridization screening

Nucleic acid hybridization เป็นวิธีการตรวจสอบ host cell ที่ไม่แสดงลักษณะภายนอกใด ๆ อาจจะผลิตโปรตีนหรือไม่ก็ได้ หลักการคือใช้ DNA หรือ RNA ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันกับส่วนใดส่วนหนึ่งของชิ้น DNA ที่สนใจเป็นตัวตรวจสอบ โดยเรียก DNA หรือ RNA ที่ใช้ตรวจสอบนี้ว่า ตัวติดตามหรือ probe โดยมีวิธีการดังขั้นตอนต่อไปนี้ (รูปที่ 8.60)



รูปที่ 8.59 การตรวจหาโดยวิธีการทางอิมมูโนเคมี



รูปที่ 8.60 การตรวจหาโคลนโดยวิธี Nucleic acid hybridization

1. นำ host cell ที่ต้องการตรวจสอบทั้งหมดมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ และย้ายลงบนแผ่น nitrocellulose filter เหมือนวิธีอิมมูโนเคมี

2. ทำให้เซลล์แตก และทำให้ DNA เสียสภาพด้วยด่างเกิดเป็น DNA สายเดี่ยวซึ่งสามารถทำให้ตรึงอยู่บนแผ่น filter ได้ โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C ภายใต้สูญญากาศ แล้วนำไป hybridize กับ probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P

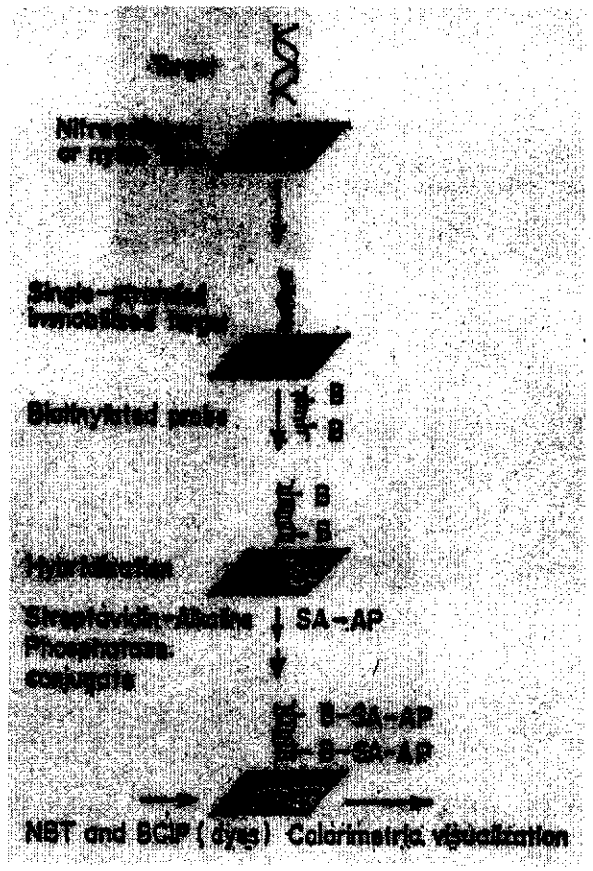
3. ตรวจสอบโดยการทำ autoradiograph ซึ่งจะเห็นเป็นจุดสีดำบนแผ่นฟิล์มตรงจุดที่เกิด hybridization

4. นำแผ่นฟิล์มไปเปรียบเทียบตำแหน่งกับจานเลี้ยงเชื้อเดิม เพื่อแยกโคโลนี หรือ plaque ที่ต้องการ

ในกรณีที่ probe นั้นติดฉลากด้วยสารเคมีก็สามารถตรวจสอบจากปฏิกิริยาการเกิดสี (colorimetric) ได้ เช่นใช้ probe ติดฉลากด้วย biotin แล้วทำให้เกิดสีโดยการเติม streptavidin – alkaline phosphatase และ substrate (รูปที่ 8.61) หรือทำปฏิกิริยาให้เกิดการเปล่งแสงทางเคมี (chemiluminescent) แล้วตรวจสอบแสงที่เปล่งออกมาด้วยฟิล์มที่มีความไวต่อแสงดังกล่าว ซึ่งจะเห็นเป็นจุดดำบนแผ่นฟิล์มเช่นเดียวกับการทำ autoradiograph

8.3.6 การวิเคราะห์และตรวจสอบ DNA ที่โคลนได้

เมื่อคัดเลือก host cell ที่มี recombinant DNA ที่มี DNA ที่สนใจได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือต้องแยก recombinant DNA ที่ต้องการออกจาก host cell เช่นพลาสมิดก็ต้องแยกออกจากบักเตรี หรือถ้า vector เป็น phage ก็ต้องแยก phage ให้บริสุทธิ์เสียก่อนไม่มีการปะปนกับ DNA, RNA และโปรตีนของ host cell แล้วจึงนำไปตรวจสอบว่าชิ้น DNA ที่สนใจแทรกอยู่ใน vector อย่างไร เพราะว่าโดยทั่วไปชิ้นของ DNA ที่โคลนได้มักมีขนาดยาวกว่า หรือสั้นกว่าส่วนที่สนใจสามารถตรวจสอบได้ โดยการนำไปหาขนาดของชิ้น DNA หลังจากนั้นเมื่อทำให้ DNA ที่สนใจบริสุทธิ์ก็สามารถนำไปหาลำดับเบสของ DNA ได้



รูปที่ 8.61 ปฏิกิริยาการเกิดสีของ probe ที่ติดฉลากด้วย biotin

8.3.6.1 การหาขนาดของ DNA

การหาขนาดของชิ้น DNA ที่สอดแทรกใน vector ทำได้โดยใช้วิธีอิเล็กโตรโฟเรซีส โดยอาศัยหลักการที่ว่า DNA มีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยหมู่ฟอสเฟท เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า DNA จึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยต้องทำให้โมเลกุลของ DNA เสียสภาพมีโมเลกุลเป็นเส้นตรงก่อน DNA จะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าได้ระยะทางที่เป็นสัดส่วน

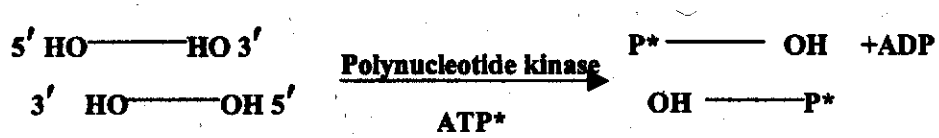
กับขนาดโมเลกุล แล้วเปรียบเทียบการเคลื่อนที่กับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว ก็จะบอกขนาดของชิ้น DNA ที่สนใจได้ วิธีการทำมี 2 วิธี คือ นำ recombinant DNA ทั้งชิ้นซึ่งหมายถึง DNA ที่ยังแทรกอยู่ใน vector มาใช้ทำอิเล็กโตรโฟเรซีส เนื่องจาก vector ที่ใช้โคลนยีนทั่วไปจะทราบขนาดอยู่แล้ว หรืออาจทำอีกวิธีหนึ่งโดยการตัด DNA ที่สนใจออกจาก vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ใช้เพื่อโคลนชิ้น DNA ตอนแรกเสียก่อน แยก DNA ที่สนใจให้บริสุทธิ์ปราศจาก vector แล้วจึงนำไปทำอิเล็กโตรโฟเรซีส

8.3.6.2 การหาลำดับเบสของ DNA

การหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing) เป็นการหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดในโครงสร้างของ DNA มีหลักการที่สำคัญคือ การทำให้ชิ้น DNA มีขนาดต่างกันเพียง 1 เบส โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้ชิ้น DNA ที่ต้องการหาลำดับเบสถูกตัดที่เบสจำเพาะ หรือใช้วิธีสังเคราะห์ DNA ให้ได้ชิ้น DNA ที่มีปลายเป็นเบสจำเพาะ แล้วจึงแยกชิ้น DNA ดังกล่าวด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซีส วิธีการหาลำดับเบสของ DNA มี 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีการใช้เอนไซม์

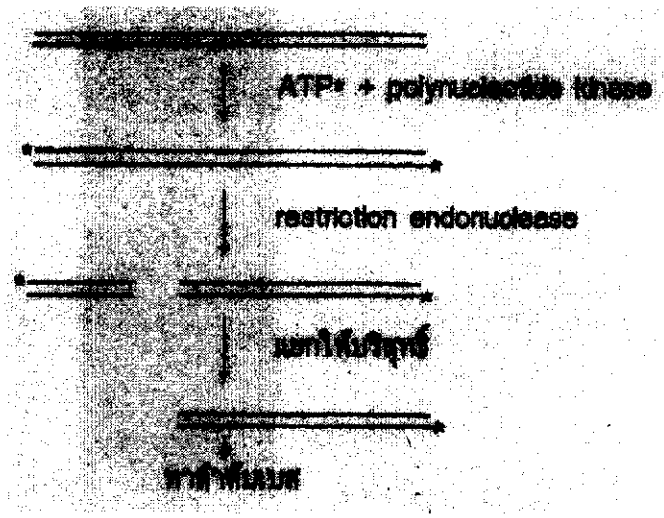
- **การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเคมี**

การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเคมี (chemical sequencing) คิดค้นขึ้นโดย Maxam และ Gilbert จึงเรียกกันว่า Maxam and Gilbert method วิธีการนี้ทำได้โดยนำชิ้น DNA ที่ต้องการหาลำดับเบสมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P (รูปที่ 8.62) เพื่อใช้ในการติดตาม



รูปที่ 8.62 การติดฉลาก DNA ด้วย ^{32}P

ผลการหาลำดับเบส โดยปกติการติดฉลากมักเกิดขึ้นกับปลายทั้ง 2 สาย ดังนั้นหลังจากติดฉลากแล้ว ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้น DNA ให้ค่อนไปทางปลายข้างหนึ่ง และแยกชิ้น DNA ไว้หาลำดับเบสต่อไป (รูปที่ 8.63)



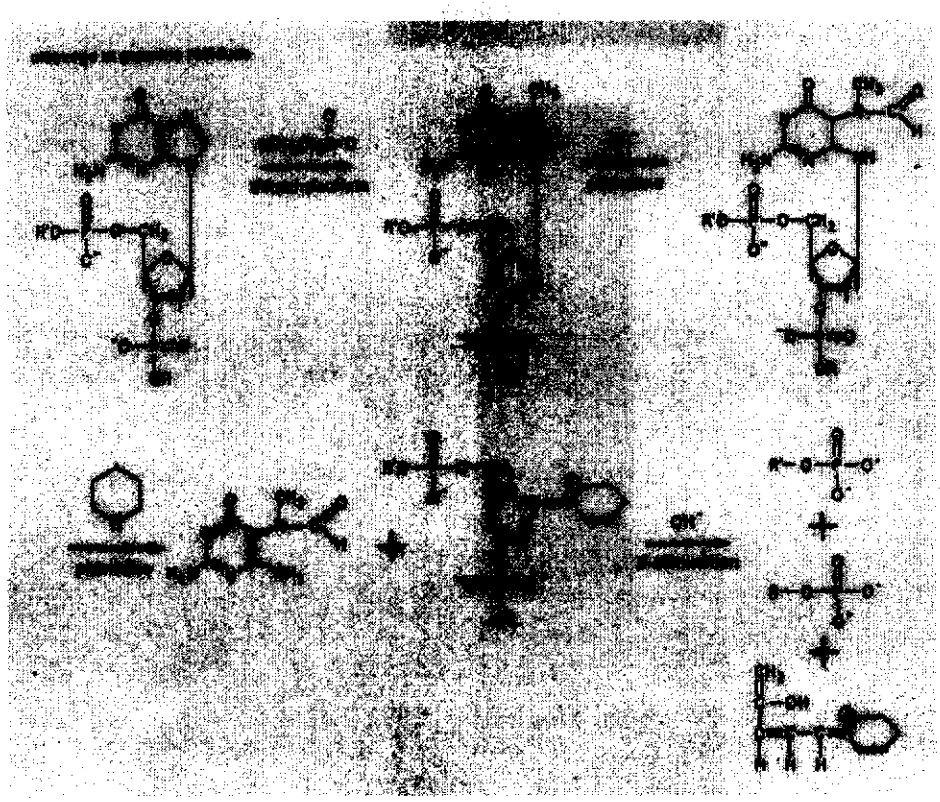
รูปที่ 8.63 การแยกชิ้น DNA ที่ติดฉลากที่ปลายด้านเดียว

นำชิ้น DNA ที่ติดฉลากที่ปลายข้างหนึ่งซึ่งแยกไว้มาแบ่งเป็น 4 หลอด หลอดที่ 1 นำมาทำปฏิกิริยาเพื่อตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบส G (รูปที่ 8.64) หลอดที่ 2 ตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะที่เบส G และ A (รูปที่ 8.65) หลอดที่ 3 ตัดที่เบส T และ C (รูปที่ 8.66) และหลอดที่ 4 ตัดที่เบส C โดยใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยาเพื่อตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะแตกต่างกันไปดังตารางที่ 8.5 โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี 3 ขั้นตอนคือ

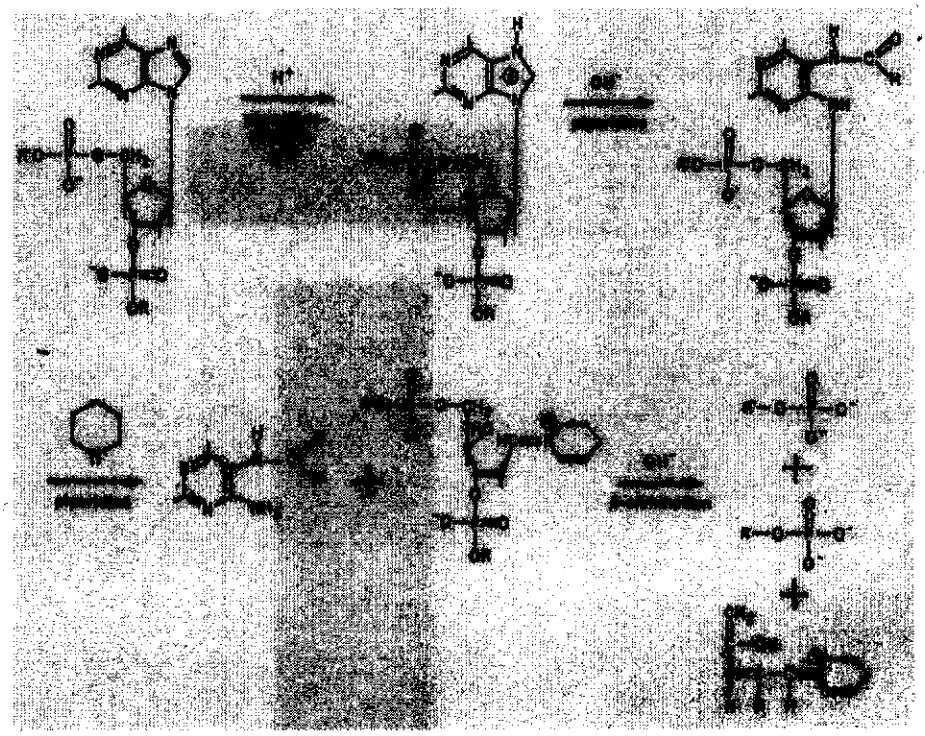
1. DNA ในแต่ละหลอดจะทำปฏิกิริยากับสารจำเพาะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสใดเบสหนึ่ง หรือ 2 เบส
2. กำจัดเบสนั้นออกจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์
3. ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งที่ไม่มีเบสออก

ชนิดของเบส	สารที่ทำปฏิกิริยากับเบส	สารที่ใช้กำจัดเบส	สารที่ใช้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์
1. G	Dimethyl sulfate	Piperidine	Piperidine
2. G + A	Acid	Acid	Piperidine
3. T + C	Hydrazine	Piperidine	Piperidine
4. C	Hydrazine + NaCl	Piperidine	Piperidine

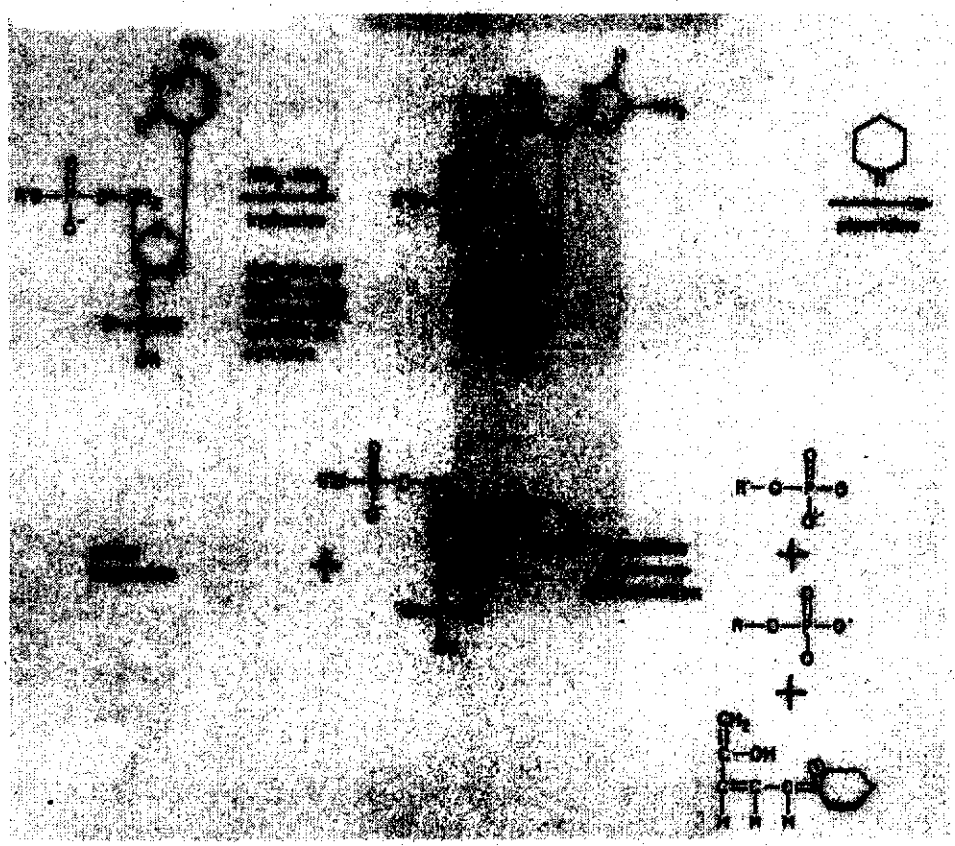
ตารางที่ 8.5 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเพื่อตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะ



รูปที่ 8.64 ปฏิกิริยาการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบส G

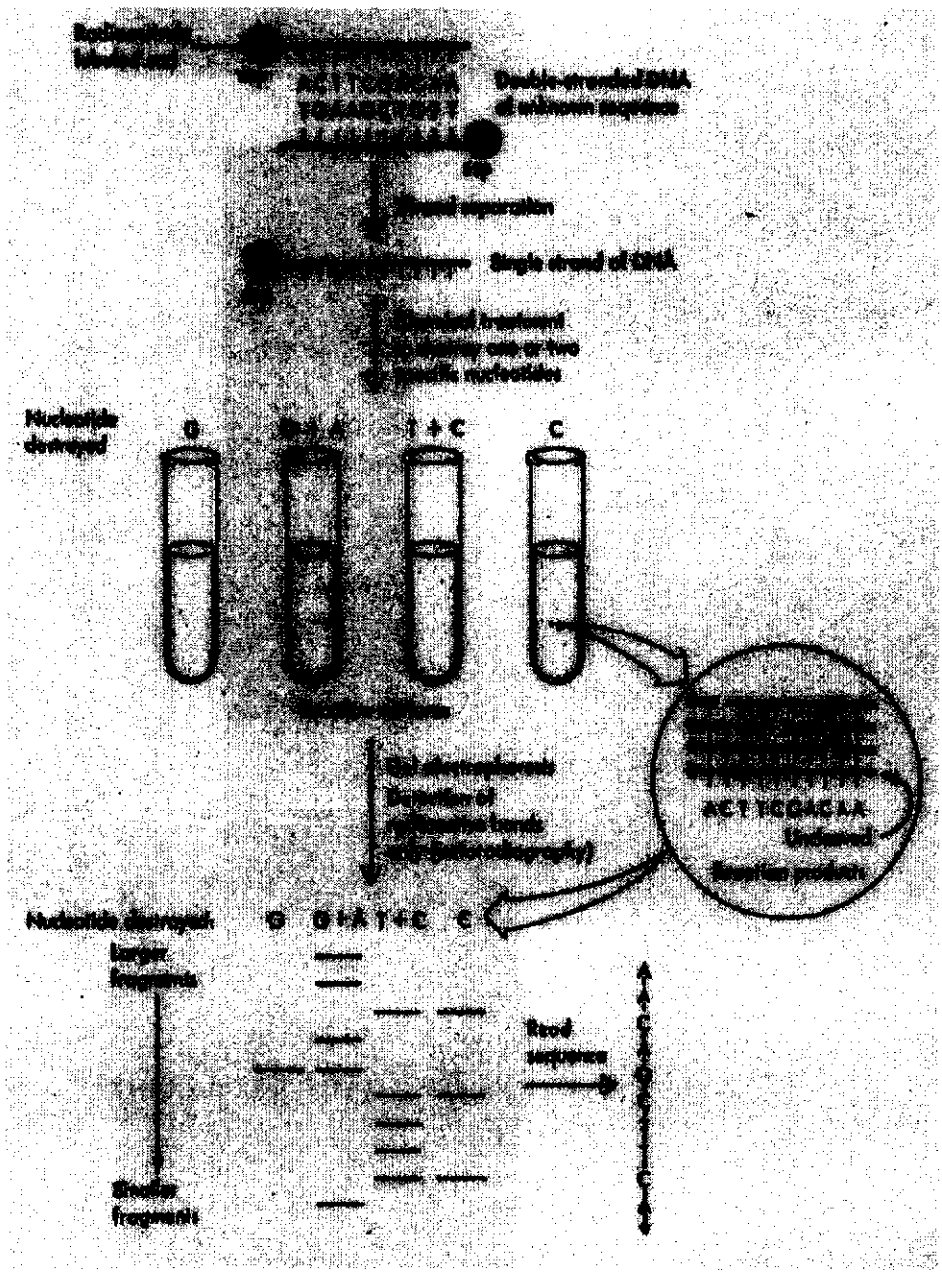


รูปที่ 8.65 ปฏิกิริยาการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบส G และ A



รูปที่ 8.66 ปฏิกิริยาการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบส T และ C

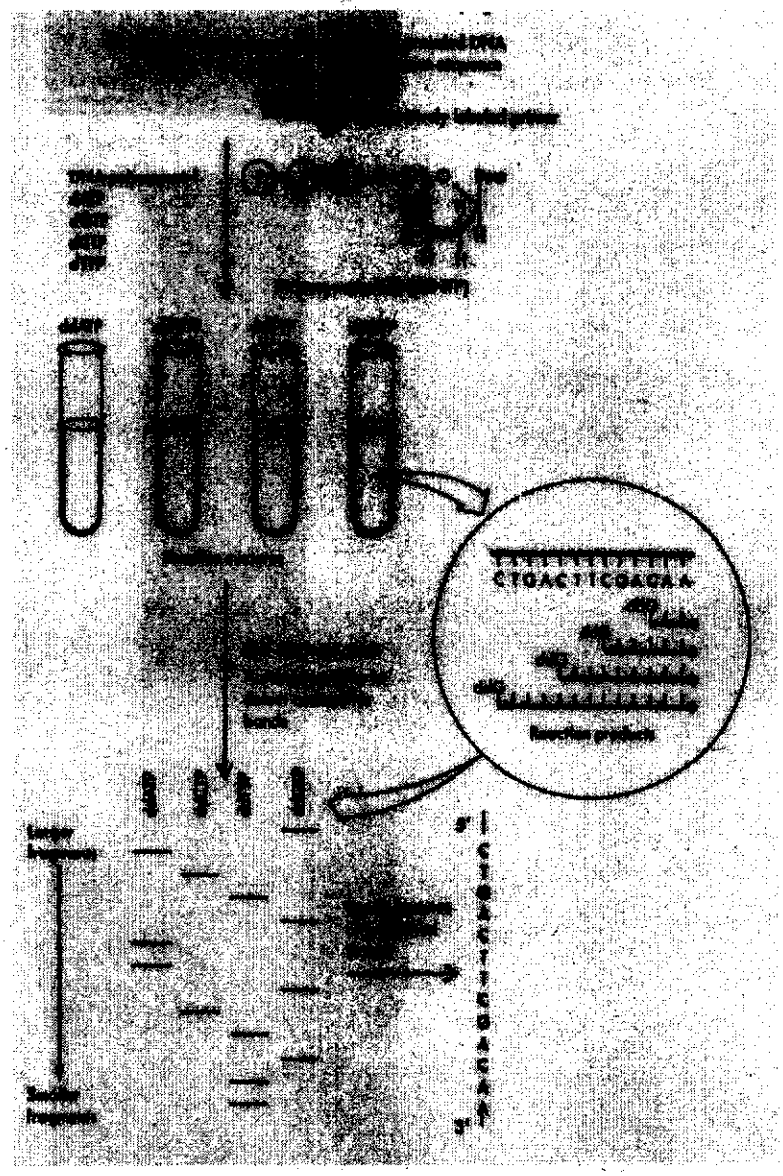
เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันไปแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซีส (รูปที่ 8.67) แล้วตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี autoradiograph จะปรากฏเป็นแถบสีดำ ซึ่งแปรผลเป็นลำดับเบสเรียงจากปลายที่ติดฉลากไว้ โดยอ่านจากแถบล่างสุดมายังด้านบนสุดตามลำดับ



รูปที่ 8.67 การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเคมี

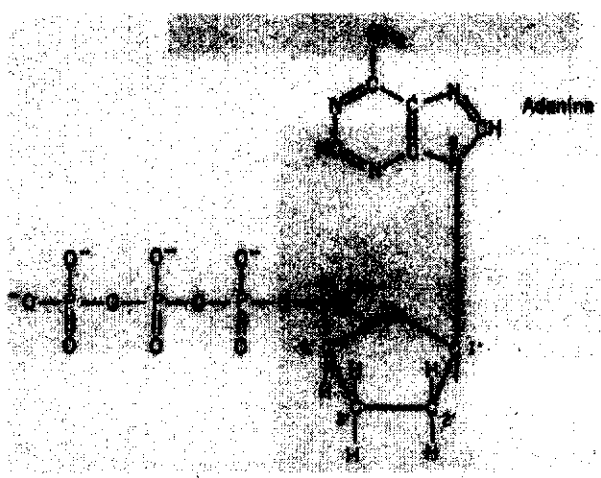
● **การหาลำดับเบสโดยวิธีการใช้เอนไซม์**

การหาลำดับเบสโดยวิธีการใช้เอนไซม์ (Enzymatic sequencing) ค้นพบโดย Frederick Sanger จึงเรียกว่า Sanger metod (รูปที่ 8.68) วิธีการนี้ทำได้โดยนำ DNA ที่



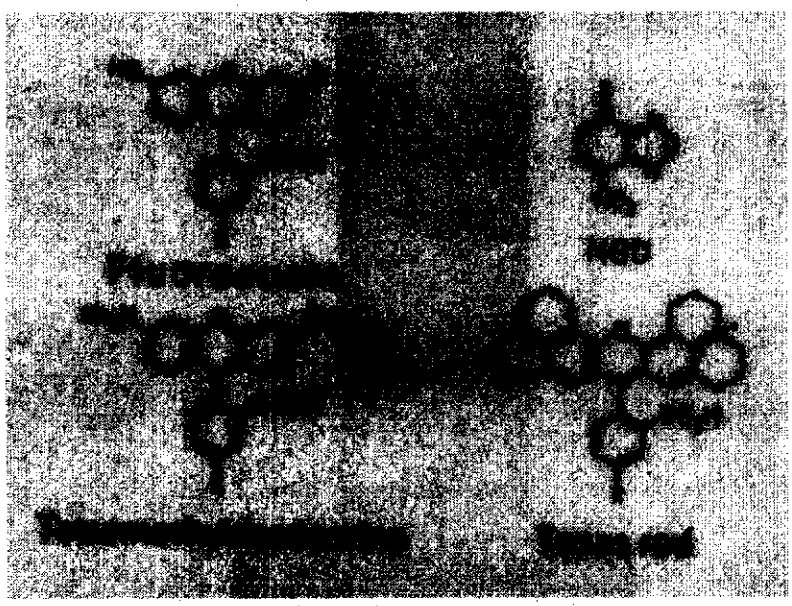
รูปที่ 8.68 การหาลำดับเบสโดยวิธีการใช้เอนไซม์

ต้องการหาลำดับเบสมาทำให้อยู่ในรูปสายเดี่ยว แล้วสร้าง DNA สายใหม่ซึ่งเป็นสายคู่สมขึ้นมา โดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase I แต่การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ primer ที่จำเพาะต่อปลาย 3′ ของ DNA ที่ต้องการหาลำดับเบส ติดฉลากที่ปลาย 5′ ของ primer ด้วยสารกัมมันตรังสี แบ่ง DNA ที่เตรียมได้ออกเป็น 4 หลอด ในแต่ละหลอดที่นำมาทำปฏิกิริยาการสร้างสาย DNA จะมี dATP, dGTP, dCTP และ dTTP หรือ dNTP เป็นสับสเตรท แต่ในแต่ละหลอดจะมีไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (ddNTP) ชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาการสร้างสาย DNA ดังนี้ หลอดที่ 1 ใส่ ddATP, หลอดที่ 2 ใส่ ddCTP, หลอดที่ 3 ใส่ ddTTP และหลอดที่ 4 ใส่ ddGTP โดย ddNTP ที่ใส่ลงไปจะเป็นตัวแข่งขันในการเป็น substrate เมื่อมีการใช้ ddNTP เป็นสับสเตรทจะทำให้การสังเคราะห์สาย DNA สิ้นสุดลง เนื่องจากการต่อสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ต้องอาศัย DNA ที่มีปลาย 3′ เป็นหมู่ไฮดรอกซีเท่านั้น แต่ ddNTP ไม่มีหมู่ไฮดรอกซี (รูปที่ 8.69) เอนไซม์จึงทำปฏิกิริยาการต่อสาย DNA ต่อไปไม่ได้ ทำให้ DNA สายใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมามีขนาดแตกต่างกันไป สามารถนำไปแยกขนาดโดยวิธีการอิเล็กโตรโฟเรซีส และตรวจสอบแถบ DNA ด้วย autoradiograph เช่นเดียวกับวิธีการทางเคมี แต่การแปลผลจะแตกต่างกัน เนื่องจากลำดับเบสที่ได้จากแถบ DNA เป็นลำดับเบสของสายคู่สม ต้องแปรลำดับเบสใหม่ที่เป็นสายคู่สมอีกครั้งหนึ่งจึงจะเป็นลำดับเบสของสาย DNA ที่ต้องการ

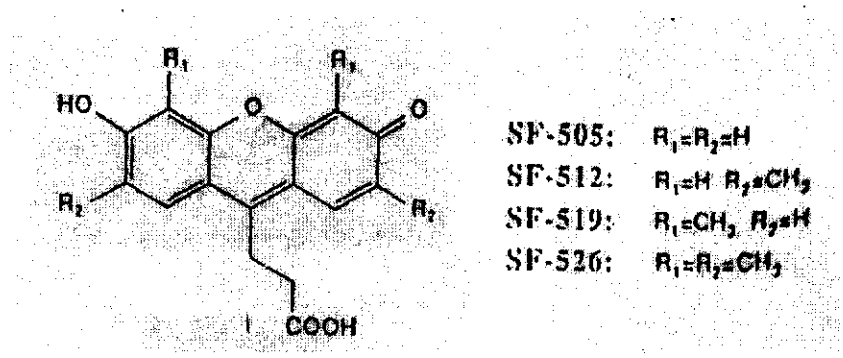


รูปที่ 8.69 ddATP

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการหาลำดับเบสโดยวิธีการใช้เอนไซม์ เพื่อให้สามารถอ่านลำดับเบสได้มากขึ้นในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง โดยมีการประยุกต์ใช้สีเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี เช่นสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) (รูปที่ 8.70) ได้แก่ fluorescein , NBD, Tetramethylrhodamine และ Texas red หรือใช้สีเรืองแสงในกลุ่ม succinylfluorescein 4 ชนิดที่มีโครงสร้างแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 8.71) ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติที่เรียกว่า Automated DNA sequencer อ่านลำดับเบส และบันทึกผลโดยคอมพิวเตอร์



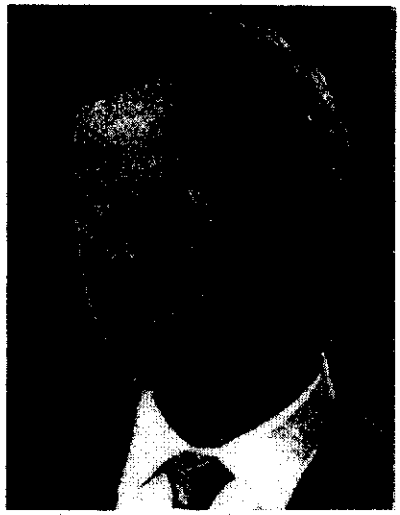
รูปที่ 8.70 fluorescent dye



รูปที่ 8.71 สีในกลุ่ม succinylfluorescein

8.4 Polymerase Chain Reaction

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยไม่ต้องนำไปขยายหรือเพิ่มปริมาณในบักเตรี หรือไม่ต้องโคลน DNA นั่นเอง เทคนิคดังกล่าวเรียกว่า polymerase chain reaction หรือ PCR เทคนิคนี้เพิ่งพัฒนาขึ้นมาได้ไม่นานนัก โดยการค้นพบของ Kary Mullis (รูปที่ 8.72)



รูปที่ 8.72 Kary Mullis

ในการทำ PCR ต้องมีองค์ประกอบดังนี้

1. มีสาย DNA ที่สนใจซึ่งเป็น double stranded DNA ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาจจะทราบเฉพาะช่วงปลายของ DNA นั้นก็ได้ ใช้เป็น DNA ต้นแบบ

2. มี Primer 2 สาย ซึ่งได้จากการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวประมาณ 20 – 35 เบส ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3′ ของ DNA ที่สนใจนั้น ใช้เป็น DNA ตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์ DNA สายใหม่

3. เอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย DNA เป็นลูกโซ่ แต่ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เพราะเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ที่ 95 องศาเซลเซียส

4. สับสเตรท 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dCTP และ d GTP

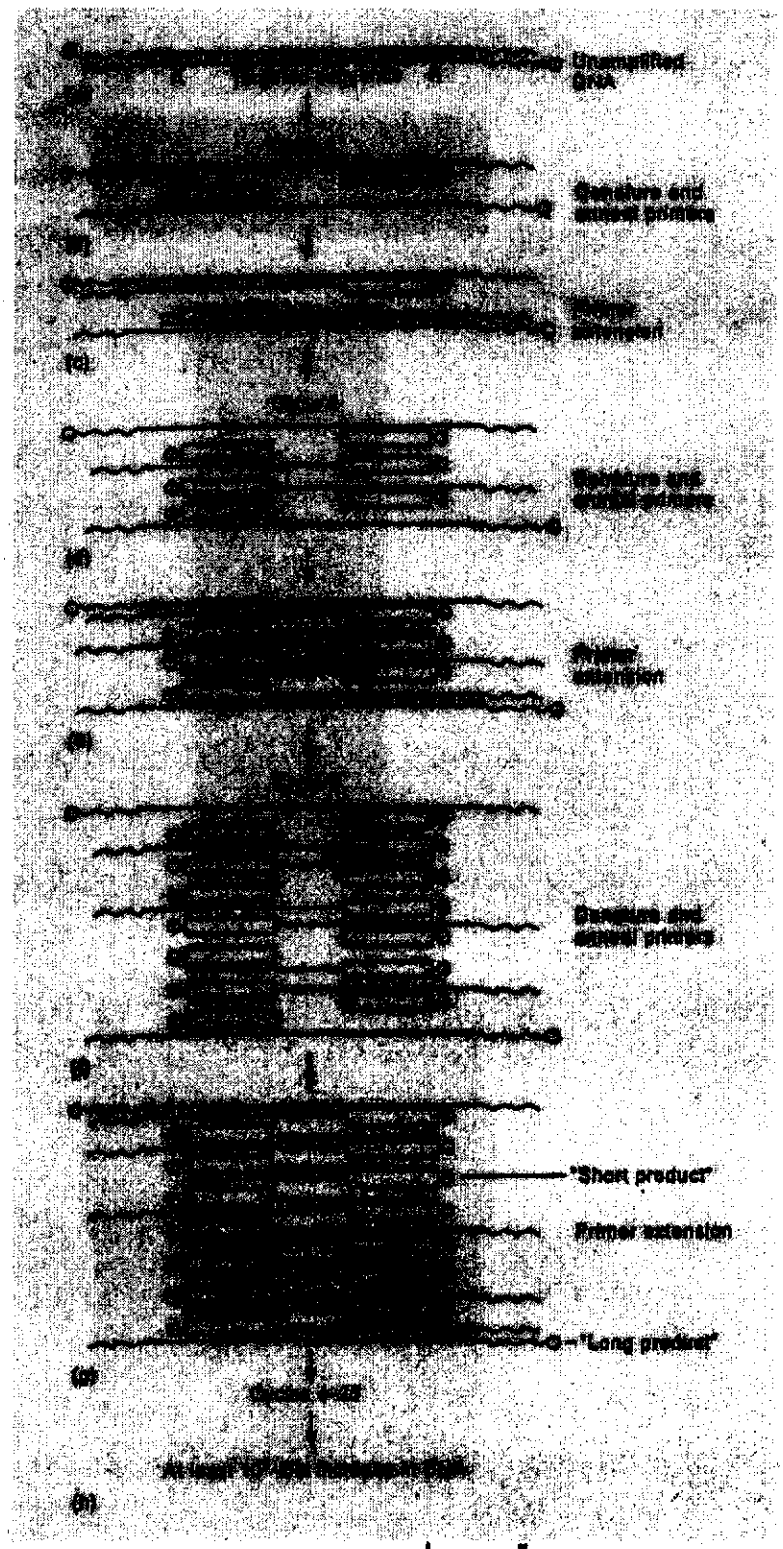
เมื่อมีองค์ประกอบครบถ้วน สามารถนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการได้ มีวิธีการ 3 ขั้นตอน (รูปที่ 8.73) ซึ่งแต่ละขั้นตอนควบคุมอุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้

1. Denaturation เป็นขั้นตอนแรก ขั้นตอนนี้ทำการแยกสาย DNA สายคู่ที่สนใจให้เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 91 – 95 องศาเซลเซียสซึ่งจะทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึด DNA 2 สายไว้ด้วยกัน

2. Annealing ขั้นตอนนี้จะทำการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40 – 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ DNA primers เข้าจับ (anneal) กับปลาย 3′ ของ DNA ต้นแบบที่มีเบสเป็นคู่สมกัน

3. Primer extension เป็นขั้นตอนสังเคราะห์ DNA สายใหม่ต่อออกไปจาก primer ทั้ง 2 สาย ในทิศทาง 5′ ไป 3′ โดยใช้ DNA ต้นแบบที่เป็นเส้นเดี่ยวทั้ง 2 เส้นเป็นต้นแบบ (template) นั่นคือในปฏิกิริยาจะต้องมีเอนไซม์ DNA polymerase และ dNTP ทั้ง 4 ชนิด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 70 – 75 องศาเซลเซียส

เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดใน 1 รอบ ก็จะได้ DNA เป็น 2 เท่าของจำนวนคู่เมื่อเริ่มต้น และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ (exponential rate) คือ 2^n เท่า (เมื่อ n = จำนวนรอบ) นั่นคือเมื่อสิ้นสุดรอบแรกจะได้ DNA เส้นคู่จำนวน 2 ชุด ต่อมาในรอบที่ 2 DNA เส้นคู่ 2 ชุดจะแยกเป็น DNA เส้นเดี่ยว 4 เส้นทำหน้าที่เป็นต้นแบบในรอบต่อไป เมื่อปฏิกิริยารอบนี้สิ้นสุดลงจะได้ DNA เป็น 4 คู่ จะเห็นได้ว่า DNA ต้นแบบคู่แรกกับ DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จะถูกใช้เป็นต้นแบบทั้งหมดในการสังเคราะห์ DNA รอบต่อไปนั่นเอง ในทางปฏิบัติมักจะให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้น 30 – 40 รอบ ทำให้ได้ปริมาณ DNA ที่สนใจมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1- 10 ล้านเท่า



รูปที่ 8.73 ขั้นตอนการทำ PCR

สรุปสาระสำคัญ

ครึ่งศตวรรษที่ผ่านมา เมื่อมีการค้นพบโครงสร้างของ DNA เทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรมจึงเกิดขึ้น และนำมาใช้ประโยชน์แก่มนุษย์ทั้งในด้านการแพทย์ การเกษตร และแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม หลักการพื้นฐานของพันธุวิศวกรรม หรือการโคลน DNA นั้น ก็คือการตัดต่อ DNA ในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ DNA ที่มีลำดับเบสที่ต้องการ แล้วนำ DNA ที่ผ่านกระบวนการตัดต่อนั้นเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อเพิ่มจำนวน และคัดเลือกนำมาใช้ ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียม DNA ที่สนใจ ซึ่งอาจได้จากจีโนมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต ถ้าสังเคราะห์จาก mRNA เรียกว่า complementary DNA หรืออาจสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการทางเคมี DNA ที่เตรียมได้ต้องนำมาตัดให้มีขนาดเล็กลงโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งจะได้ DNA ที่มีปลายเหนียวหรือปลายทู่ก็ได้ ขนาดของ DNA ที่ได้จะมีผลต่อการเลือกใช้ vector ที่จะนำ DNA ที่สนใจเข้าสู่ host cell vector มี 3 ชนิดคือ plasmid, phage และ cosmid โดย vector ต้องมีจุดเริ่มต้นของการ replicate มี genetic marker สำหรับคัดเลือก และมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์บางชนิดเพียง 1 ตำแหน่ง สำหรับแทรกยีนที่สนใจเข้าไป ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ตัด DNA ที่สนใจ นำมาตัด vector ก็สามารถเชื่อม DNA ที่สนใจเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของ vector ได้ ถ้าตัดได้ DNA ปลายเหนียวก็จะมีการเชื่อมแบบ cohesive end ligation ถ้าเป็น DNA ปลายทู่ก็จะมีการเชื่อมแบบ blunt end ligation โดยจะต้องดัดแปลงปลาย DNA ด้วย linker, adaptor หรือดัดแปลงปลายให้มีเบสเป็นคู่สมกัน เมื่อเชื่อมกันเป็น recombinant DNA แล้ว อาจนำเข้าสู่ host cell ด้วยวิธีการ transformation, transfection, transduction และ electroporation การเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีการเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพต่างกัน อย่างไรก็ดีจะมี host cell จำนวนหนึ่งเท่านั้นที่ได้รับ recombinant DNA ที่ต้องการ จึงต้องมีการตรวจคัดเลือก host cell ดังกล่าว ด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้คือ phenotypic screening, Immunochemical screening และ nucleic acid hybridization screening จากนั้นแยก recombinant DNA ออกจาก host cell และสกัด DNA ที่สนใจให้บริสุทธิ์ปราศจาก vector ก็สามารถนำ DNA ไปใช้ประโยชน์ได้ ปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR มาใช้เพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการโคลน

บรรณานุกรม

1. ธีรนุช วิชญานันต์. "คู่มือชีวเคมีเบื้องต้น." สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ. 2545.
2. ธัญนีย์ สิมะโรจน์. "วิธีป้องกันโรค อาหารต้านมะเร็ง." โรงพิมพ์รุ่งแสงการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 2540.
3. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. "จุลชีววิทยาทั่วไป." พิมพ์ครั้งที่ 3 . สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 2544.
4. นวพรรณ จารุรักษ์. "วัฏจักรของเซลล์และอณูชีววิทยาของการเกิดมะเร็ง." สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 2544.
5. ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. "พันธุศาสตร์." พิมพ์ครั้งที่ 2 . สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2543
6. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร. "จีเอ็มโอ." โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, กรุงเทพฯ. 2544.
7. พิไลวรรณ พงษ์ทูล และบัญญัติ สุขศรีงาม. "จุลชีววิทยา (เล่ม 1)." สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 2521.
8. พิไลวรรณ พงษ์ทูล และบัญญัติ สุขศรีงาม. "จุลชีววิทยา (เล่ม 2)." สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 2521.
9. ไพรัช เทพมงคล. "โรคมะเร็ง." สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 9. พิมพ์ครั้งที่ 9 . บริษัทรุ่งศิลป์การพิมพ์จำกัด, กรุงเทพฯ. 2543.
10. มนตรี จุฬาวัฒนทล, ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. "ชีวเคมี." จิรรัชการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 2541.
11. ไมตรี สุทธิจิตต์. "สารพิษรอบตัวเรา" โรงพิมพ์ดาวคอมพิวกราฟิค, เชียงใหม่. 2531.
12. ยุวดี จอมพิทักษ์. "วิธีป้องกันโรคมะเร็ง" โรงพิมพ์รุ่งแสงการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 2540.

13. รัชนี เมฆมณี. "ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา ของยาปรับภูมิคุ้มกัน ยาต้านมะเร็ง และยาลดความดันโลหิต." พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ. 2539.
14. วรชัย รัตนธราธร. "ตำราการรักษาโรคมะเร็ง." บริษัทโฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 2538.
15. วรชัย รัตนธราธร. "ตำราการรักษาโรคมะเร็ง 2." บริษัทโฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 2541.
16. วสันต์ ลีนะสมิต และสมเกียรติ ศรีสุพรรณดิฐ. "ตำรามะเร็งนรีเวชวิทยา." บริษัท โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 2542.
17. วิชาญ หล่อวิทยา, ไพรัช เทพมงคล, ประมุข พรหมรัตนพงศ์ และ ชนวัธน์ เทศะวิบูล. "Manual of Radiation Oncology." โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 2544.
18. วิวัฒน์ สิทธิสรเดช. "DNA." วารสารวิทยาศาสตร์ฉบับพิเศษสาขาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล, ปีที่ 57 : ฉบับที่ 2 มีนาคม – เมษายน. บริษัทด่านสุทธาการพิมพ์จำกัด, กรุงเทพฯ. 2546.
19. ศักดิ์ บวร. "วิตามิน อี." เจริญวิทย์การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 2539.
20. ศิริพร สิทธิประณีต. "พันธุวิศวกรรม : ปฏิบัติการเบื้องต้น." โรงพิมพ์ ส. วิชาญการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 2531.
21. สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์, ธารารัชต์ ธารากุล และสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. "อิมมูโนวิทยา." พิมพ์ครั้งที่ 4 . บริษัท เด.พี. พริ้นติ้ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 2537.
22. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. "พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น." พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2545.
23. ไหม รัตนวรารักษ์, ปรียาจิต เจริญวงศ์, กำจร ตติยกวี, อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์, ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ และเกียรติ รักษ์รุ่งธรรม. "วิทยาภูมิคุ้มกันเบื้องต้น" สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ ฯ. 2539.

24. Cooper, G.M. "Elements of Human Cancer." Jones and Bartlett, Boston. 1992.

26. Cooper, G.M. "Oncogenes." Jones and Bartlett, Boston. 1990.

26. Friedberg, E.C. "DNA repair." W.H. Freeman, New York. 1985.

27. Kingsman S.M. and A.J. Kingsman. "Genetic Engineering." Blackwell Scientific Publication, Oxford. 1988.

28. Lehninger, A.L. "Biochemistry." Second edition. Worth Publishers, Inc, New York. 1975.

29. Matthews, H.R., Freedland, R.A. and R.L. Miesfeld. "Biochemistry A Short course." Wiley – Liss, Inc., New York. 1997.

30. Rawn, J.D. "Biochemistry." Harper and Row, Publishers, Inc.,New York. 1983.

31. Roitt, I.M. "Roitt's Essential Immunology." Ninth edition. Blackwell Science, Inc., 1997.

32. Ruddon, R.W. "Cancer biology." Second edition. Oxford University Press, New York. 1987.

33. Singer, M. and P. Berg. " Genes and Genomes." Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1991.

34. Stryer, L, "Biochemitry." Second edition. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 1981.

35. Voet, D. and J.G. Voet. "Biochemistry." Second edition. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1995.

36. Zubay, G. "Biochemistry." Second edition. Mcmillan Publishing Co., Inc., New York. 1988.

37. Zubay, G. "Genetics." The Benjamin/Cumming Publishing Co., Inc., California. 1987.

38. Whikehart, D.R. "Biochemistry of the Eye." Second edition. Elsevier Inc., Philadelphia. 1994.

Index

acetyl CoA 168
activated macrophage 211,225
active transport 154
Active vaccination 272
acute inflammation 219
acutely transforming virus 96,98
Adaptor 316,339,340
ADCC 226,365,366
additive activity 156
Adenine 122
Adherence 219,220
Adjuvant 225
adjuvant chemotherapy 160,161
Aerated cells 54
Aflatoxin - 2, 3 epoxide 73
aflatoxin 69,73
AFP 260,258,359
Agrobacterium 291
alfa – fetoprotein 256
alkaline phosphatase 338,348
Alkylating agent 66,147
Allergy 210
alopecia 159
Alpha 237
alternate pathway 215
alternating chemoradiotherapy 160
alternative pathway 218
amine 75
amino terminal 233
Amplification 214
Anaphase 7
anaphylaxis 207,210,212,240
Anaplasia 52
Anchorage dependent 41
Anchorage independent 41
Angiogenesis 53,57
Antibiotics 147,149
antibody 223
antibody dependent cell – mediated cytotoxicity 226,248,264
antibody 214
antibody excess 249
antigen – antibody complex 249
antigen – binding fragment 236
antigen – binding site 241
antigen – presenting cell 270
antigen 222
antigen binding site 233,237
antigen complexs 214

Antigen derived from the overexpression of normal proteins 257
antigen excess 249
antigen presenting cell 266
antigenic determinant 223,230,233,261,263,267,270
Antimetabolites 147,149
Antioxidant 195
antiviral proteins 216
APC 266,267
apoptosis 21,25,26,107,116,121
apoptosis inducer genes 121
apoptosis repressor genes 121
Apoptotic bodies 26
Artificial active immunity 254
Artificial passive immunity 254
ascorbic acid 180,195
autocrine 9,107
Autonomy 52
autophosphorylation 12
autoradiograph 348
axis of symmetry 307
B lymphocyte 232
B lymphocyte response 226
Bacteriophage 322
basal cell 88
Basement membrane 57,59
Basophil 206
Benign 31
Benign tumor 49,63,88,123,133
benzo (a) pyrene 69,73,187
benzo (a) pyrene – 7, 8 diol 71
benzo(a) pyrene – 4, 5 epoxide 71
benzo(a) pyrene – 7, 8 diol – 9, 10 epoxide 71
Bilaminar embryo 7
biotin 180
biphosphate 13
Bispecific anti – tumor 274
Blastocyst 7
Blocking agent 193
blood platelet 107
blunt end 305,308,310
Blunt end ligation 336,339
bone marrow toxicity 158
brachytherapy 136
Brake 23
budding 96
bursa equivalent organ 232
C terminal 233
calcium mobilization 13
Cancer 30,31,32
capsid 94,96
carbonium ion 75
carboxy terminal 233

carcinoembryonic antigen 256
carcinogen 66,79,106,193
Carcinoma 32,63
carnitine 167
Carrier 224
catalase 87
$CD4^+$ T cell 266,267
$CD8^+$ T cell 266,267
cdk 16,17
cDNA 304,313,336
CDR 241
CEA 258,261
cell cycle – nonspecific agents 148
cell – cycle checkpoints 20
Cell – Mediated Cytotoxicity 227
cell – mediated immune response 226
cell cycle – nonspecific agents 144,149
cell cycle – specific agents
144,146,149,152,153
Cell cycle 5
Cell death 30
cell differentiation 3,30,180,197
Cell division 3
Cell growth 30
Cell injury 30
cell lysis 213
cell membrane 10,154,157
Cell proliferation 3,197
Cell senescence 34,42
cell surface receptor 11
cell transformation 96
cell wall 292
Cellular homeostasis 25
Cellulose 168
cGMP 75
Chemoimmunoconjugates 373,275
Chemopreventive agents 197,193
chemotaxin 260,207,210,213,218
chemotaxis 57,213,219
chemotherapeutic drugs 144
chemotherapy 132,141
chromosomal DNA 304,318
chromosome condensation 19
Cilia 205
classical activation 241
classical pathway 214
clear plaque 330,346
Clonal selection 49,52
clonal selection theory 233
Clonality 52
cloning site 371
cloning vector 302

Co – stimulatory molecule B7 270
Co – stimulatory molecule 267
cocarcinogen
Coenzymes 180
cofactor 306
cohesive – end site 323
cohesive end 305,308
Cohesive end ligation 336,337
Combination chemotherapy 155
compatible ends 312
competent cell 207,213,344,345
complement fixation 213
Complement dependent cytotoxicity 265
Complement lysis 266
Complementarity Determining 240
complementary strand 330
complementary DNA 304,313
complementary ligation 344
concurrent chemoradiotherapy 160
Constant Heavy Chain Segment 238
Constant Light Chain Segment 237
Constant region 237,242
Contact inhibition 39
cos 323,335
cos site 334,352
cosmid 304,317333,334,335
Cross linked DNA 66
crosslinks 195
Croton tiglium 77
crown gall tumor 291
crystallizable fragment 236
cyclin A 17,18
cyclin A – cdk 2 complex 18
cyclin B – cdk 1 complex 19
cyclin B 17,19
cyclin D – cdk 4 complex 18,21
cyclin D 17,18
cyclin dependent protein kinases 16
cyclin E – cdk 2 complex 18
cyclin E 17,18
cyclin protein 16,17
Cytokinesis 6
cytolysin 230
cytoplasm 10,94,96
Cytosine 87,122,123
cytotoxic T lymphocyte 229,230
Cytotoxic T cell 29,265,266,267,270,271,274
deamination 122
Decline phase 246
degranulation 219,264
deletion 126,127
Delta 237
dephosphorylation 17

Deposit 59
detergent 304
diacylglycerol 13
diapedesis 206
Dietary fiber 174
dietary supplements 192
different mechanism of action 156
Differentiation antigen 257
dimer 12,338
dimethoxytrityl chloride 316
dimethyl sulfoxide 344
Direct acting carcinogen 66
direct repair 119
disulfide bond 12,239
disulfide crosslinkage 224
DMSO 34
DNA 116,119,122,123,134,141,148,149,189
195,88,91,6,66,71,82,91,93,94,96
DNA cloning 302
DNA fragment 302
DNA ligase 121
DNA polymerase I 121,313
DNA repair genes 119
DNA synthetic phase 5
Dolly 296
domain 239
dose 150,152,153,155,187,192
dose – limiting toxicity 152,153,158
Dose – response effect 150
double – stranded 91
double cos site vector 335
double helix 71
double immunodiffusion 250
double strand 82
drug absorption 150,154
drug distribution 150,154
drug excretion 150
ductal carcinoma 184
dust cell 211
E2F 18,23
early responder 134,135
Ectoderm 7,33
Effector T cell 229
Egg 3
electromagnetic radiations 79
electron deficiency 68
electron rich 68
Electron transport chain 173
electrophile 68
electroporation 344,346
ELISA 348
Emboli 57

Embryo 7
endocrine 9
endocytosis 94
Endoderm 7,33
endometrium 186
endoplasmic reticulum 13
envelope 94
envelope proteins 96
enzyme 141
Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay 348
Eosinophil 206
Epithelium 32
epitope 224
Epsilon 237
equivalence precipitation 249
ester bond 73,82
Estrogen 10,186
excision 330
excision repair 119
expanding cells 7,135
external beam therapy 136
External defense mechanism 205
extracellular domain 11
extracellular killing 248
Extravasation 59
Fab 236
fat – soluble vitamins 180
fatty acid 167
Fc 236
Fertilized egg 3
fibroblast 300
first line of defense 243
fixed macrophage 210
flush end 310
folic acid 180
Foreign substance 204,223
FR 241
fractionated dose 139
Framework Region 241
free radicals 82,140,195
Fructose 168
G_1 phase 6 ,18
G_1 / S checkpoint 20,21,23,70,116
G_2 phase 6,19
G_2 / M checkpoint 20
β - galactosidase 317,321,347
Gamma 237
gastrointestinal toxicity 158,159
gene expression 10
gene gun 292
Gene manipulation 302
gene marker 318

Genes 3
Genetic alteration 45
genetic engineering 285
genetic marker 330,334,335,371
Genetic mutation 45
Genetically Modified Plants 288
genome – guarding function 21
genomic DNA 304,336
genus 307
glucagon 11
Glucose 168
glutathione 87
glutathione peroxidase 196
Glycogen 168
Glycolysis pathway 168
glycoprotein 223
glycosidic bond 82
golden rice 289
Gompertzian 141
Granzyme 227
growth factor 34,107,110
Growth factor receptor 11,34,107
Growth factors 8,9
growth hormone 11,286
Guanine 66,70,73,75,110,123
Hapten 224,273
heat waves 79
heavy chain 237,240,263
Helper T lymphocyte 229
hereditary 114
Heteroconjugated antibodeis 273,274
Heterogeneous population 269
Heterogeniety 52
Hinge like region 241
hinge region 233,236,241
Histamine 207,208,210,212,217,218,219,236
homopolymer 342
homopolymer tail 344
hormone 11
horseraddish peroxidase 348
horseshoe – shaped nucleous 210
host cell 92,93,94,96,302,316,336
Humoral immune response 226
hybrid cell 111
hydrodynamic shear 305
hydrogenperoxide 87,264
hydrogen radical 83
hydroperoxy radical 87
hydrophillic 79
hydroxyl radical 83
hypervariable regions 240
hypopituitary dwarfism 286

Hypoxanthine 55,122,135,140,143,155
icosahedral 94
IgA 237,243
IgD 237,243
IgE 237,245
IgG 237,243
IgM 237,243
Immortal cells 42
Immune system 204
immunochemical screening 347
Immunogen 223
Immunogenicity 223,224,225
Immunoglolulin 233
immunological adjuvant 272
Immunological suppression 269,270,271
Immunoselection 269
immunotoxin 275
incorporate 101
incubate 348
independent activity 156
Indirect acting carcinogen 68,193
induce 79,321
Inductive period 245
infective plaque 325
Inflammation 217
inhibit 193
inhibitors 149
Initiating agent 66,68
initiation 43,188,241
inositol 1,4,5, - triphosphate 13
insert site 317
insertion 126,127
insertion vector 325
insertional inactivation 321
insulin 11
insulin hormone 285
integrate 96
interferon 213,286
intermediate 68
Internal defense mechanism 205
Interphase 5
interstitial 136
Intiating agent. 45
intracavitary
intracellular domain 11
intracellular receptor 10
Intravasation 57
invade 132,141,204
Invasion 31,49
ionizing radiation 79,80,82,88,134
IPTG 330
Irreversible process 25

isobutyryl 315
isopropyl – β – D – thiogalactoside 321
isoschizomer 311
Isothiocyanates 195
isotope 80
J chain 243
Killer T cell 229
Killing and digestion 219,264
kinase 19
Krebs cycle 164,168
Lac Z 321,330
Lactose 168
lagging strand 331
lambda phage 322
Large adenoma 49
late responder 134,135
lattice theory 249
leading strand 331
Leukemia 32
leukotriene 212
ligase 315,319,337,339,340,
light chain 237
light chain 238,240,263
line of identity
line of nonidentity 252
linker 316,339,340
lipase 167
lipophillic 79
lipopolysaccharide 215
lipoprotein 223
littoral cell 211
living antigen vaccine 254
localized cancer
log phase 345
Logarithmic increase 245
Loop 239
Low immunogenicity 270
Lymphocytes 222
Lymphoid cells 57
lymphokine 211,272
Lymphoma 32
lysogen 330
lysogenic cycle 323,330
lysogenic mode 93
lysosomal enzyme 264
lytic cycle 323
lytic mode 93
M phase 6
Macronutrients 183
Macrophage 206
Major histocompatibility antigen 266
Major histocompatibility complex 266

Malignant 31
malignant immunoproliferation 263
Malignant tumor 49,63,88,132,133
Mast cell 206,212
mastectomy 133
master plate 321
Maturation 55
maximum tolerated dose 152,153
Membrane activation 219
Membrane attack 214
memory cell 247
Memory T lymphocyte 229
Mesenchyme 33
Mesoderm 7,33,34
Metaphase 7
metastasis 31,52,57,132,133,141,161
methylation 123
MHC I 266,268,270
MHC II 266
microinjection of DNA 296
micrometastasis 141,16
Micronutrients 183
microwaves 79
minerals 182
Miscellaneous agents 147
mismatch repair 119
missense mutation 126
Mitotic inhibitors 147,149
Mitotic phase 4
mixed function oxidase 67,69,71,73
modification methylase 305
Molecular policeman 23
monoclonal antibody 261,263
monoclonal gammopathy 263
monoclonal immunoglobulin 261
Monocyte 206
monocyte chemotactic factor 210
Monolayer 37
Mononuclear leucocyte 206
Monospecific anti – tumor 274
Morula 7
Mu 237
mucins 257
Multilayer 38
multiple cloning site 321
multiple drug resistance 157
mutate 45,88,117,121,189,193,195,197
Natural active immunity 253
Natural killer cell 264
Natural passive immunity 253
NCMC 227
neoadjuvant chemotherapy 160
Neoplasia 31
neurotransmitter 11

Neutrophil 206
nicotinic acid 180
nitrocellulose filter 348
nitrosamine 69
NK cell 226,264
non – living antigen vaccine 254
non – sense mutation 126
Non – specific immune response 204
non cross – resistant 157
nonacutely transforming virus 96,98
Nonspecific 226
Nontumor – specific immunotherapy 271,272
Nontumorigenic cell 112
normal tissue response 150
nuclear envelope breakdown 19
Nucleic acid hybridization 348
nucleic acid hybridization screening 347)
nucleocapsid 94
nucleophile 68
nucleoprotein 223
Oncofetal antigen 256
oncogene 96,99,101,107,111
oncogenesis 256
Oncogenic virus 89
oncoprotein 107
opsonin 220
opsonization 213,220,247
ori 316,317
origin of replication 316
Original precursor cell 52
Oxic zone 54,140,143
β – oxidation 167
P21 23
P53 21,23,32,113,117
P53 21,70,73,112,116,117
palindrome 308
pantothenic acid 180
papain 236
passive diffusion 10
Passive immunotherapy 272,273
pepsin 236,337
peptidoglycan 215
perforin 227,230
permeability 217,219
phage 317,322
Phagocyte 220
phagocytosis 26,217,264
Phagosome 219
phenotype 317,330,347
phenotypic screening 347
Philadelphia chromosome 124
phorbol ester 77

phosphatase 19
phosphate triester 315
phosphatidylinositol 4,5 – 12
phosphite triester 315
Phosphoglycerid 167
phospholipase 167
phospholipase C 12
phosphorylation 17
photon 79
plaque 325,348
plasma cell 232
plasmid 304,317
Platelet – Derived Growth Factor 11
platelet – derived growth factor receptor 12
point mutation 126
poly C 341
poly G 341
polyclonal antibody 261
polyclonal immunoglobulin 261
polycloning site 321
Polycyclic Aromatic Hydrocarbon 70
Polymorphonuclear leucocyte 206
polynucleotide kinase 340
polysaccharide 215
Pre – synthetic phase 5
Pre – mitotic phase 5
Precipitation in gel 249
Precipitation in gel 250
Precipitation in solution 249
Primary immune response 229,245
primary tumor 57,132,134
primer 313,316
pro – nucleous 296
probe 316,348
procarcinogen 69,79
Production of immunosuppressive factor 271
Production of soluble tumor antigen 271
Progesterone 187
Progression 43,45,49
promoting agent 45,77,79
promotion 43,45,187,188,189,197
prophage 7,330
prostatecomy 133
prosthetic group 196
protease 57,164
protease enzyme 264
protected base 316
Protein – serine / threonine kinase 15
protein – tyrosine kinase 12
protein kinase C 13
protein kinase 16
proto – oncogene 99,101,107,111

3′ - protruding end 308,343
5′- protruding end 308,343
pyrimidine 88
pyruvate dehydrogenase 168
Quiescence stage 3
radio waves 79
radiotherapy 132,133
Rapid proliferation 8
Rb 112,13
Rb 18,23,113
Reactive immunoproliferation 261
Receptor 9,208
recognition site 305
recognition unit 214
recombinant DNA
101,302,304,319,336,346,347
Region 241
relaxed plasmid 317,318
renewing cells 8,121,135,141
reoxygenation 140
repair enzyme 119
replica plating 321
replication 6,71,93,96
replicative form 330
replicon 316
Respiratory chain 173
Resting phase 3
restriction endonuclease 302
restriction enzyme 302,305
restriction enzyme type I 306
restriction enzyme type II 307
restriction enzyme type III 313
restriction modification 305
reticular cell 211
Retinoblastoma 18,63,113,114
retinoic acid 10
retrovirus 93,94,96
reverse transcriptase 93,94,313
RF 330
Risk factors 45,65
RNA 6,91,94,96,148,149
rolling circle 331
route 224
S phase 6,18
S_1 nuclease 313
S-adenosyl methionine 306
SAM 306
Sarcoma 63,32,150,153
schedule dependent drugs 152,153
Secondary immune response 29,243,
245,247
Secretory antibody 243

segment 239
selectable marker 371
Selenite 196
serine/ threonine kinase 110
Serum alfa – fetoprotein 259
Serum carcinoembryonic antigen 261
sex pilus 330
side effect 135,150
silent mutation 126
simultaneous chemoradiotherapy 159
Single immunodiffusion 252
single – stranded 82,91
single immunodiffusion 250
Site of origin 49
skin toxicity 159
Slow proliferation 7
Small adenoma 49
soluble antigen 271
somatostatin 315
species 284,307
Specific immune response 204
Specific reactivity 223,224
specific recognition sequence 306
Sperm 3
spindle assembly 19
spontaneous occuring tumor 255,270
sporadic 114
Starch 168
static cells 7,135
Steady state 246
Stem cell 228,232
steroid hormone 10
sticky end 308
stigmasterol 70
stringent plasmid 371,318
subacute inflammation 219,233
substrate 321
Sucrose 168
sucrose gradient 305
super coil 317
Supportive tissue 33,34
Suppresser T lymphocyte 229
Suppressing agents 193,197
surgery 132
T – DNA = Transferred DNA 291
T cell recepter 229
T lymphocyte 211,223,228,272
T lymphocyte response 226
Tamoxifen 198
TCR 229,230,266

technology 302
teletherapy 136
Telomerase 7,42
Terminal transferase 341
therapeutic index 150
Thymine 70,73,83,88,110,123
thymine dimers 88,119
Thymus 228
thyroxine 10
Ti plasmid = Tumor inducing plasmid 291
Tissue plasminogen activator 286
TNF 227
toxic free radical 264
toxicity 152,153,155,160,161
Toxin neutralization 247
trace elements 183
traggered cut 308
transcription 15,18,23,71,93,110,149,344,346
transformant 318
transformation 344,345
transformed cell 96,107,108,193,197
transition point 20
translation 93,96
transmembrane domain 11
Triglyceride 167
Trilaminar embryo 7
Tumor – associated antigen 254,256
tumor cell 111
Tumor – specific antigen 254,255
Tumor – specific immunotherapy 271,272
Tumor 31
tumor antigen 254,257,263,266,257,273
tumor cell heterogeneity 45,155
Tumor Immunotherapy 271
Tumor marker 254,257,263,266,258
Tumor necrosis factor 227,264
tumor response 150
tumor suppressor gene 107,111,112
Tumor virus 89,96
two fold symmetry 307
tyrosine kinase 110
ultrasonication 305
ultraviolet 79
unchanged drug 155
Uracil 87,122
Urea cycle 164
urease 190
Variable Heavy Chain Segment 238
Variable Light Chain Segment 237
Variable region 237,240,242
vector 302,304,316,317,366
vinyl chloride 69
vinyl chloride epoxide 69
visible light 79

vitamin B_1 180

vitamin B_{12} 180

vitamin B_2 180

vitamin B_6 180

vitamin D 10

wandering macrophage 210

water – soluble vitamins 180

X – gal 321

X- rays 82

Xanthine 123

พิมพ์ที่... สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง
Ramkhamhaeng University Press.