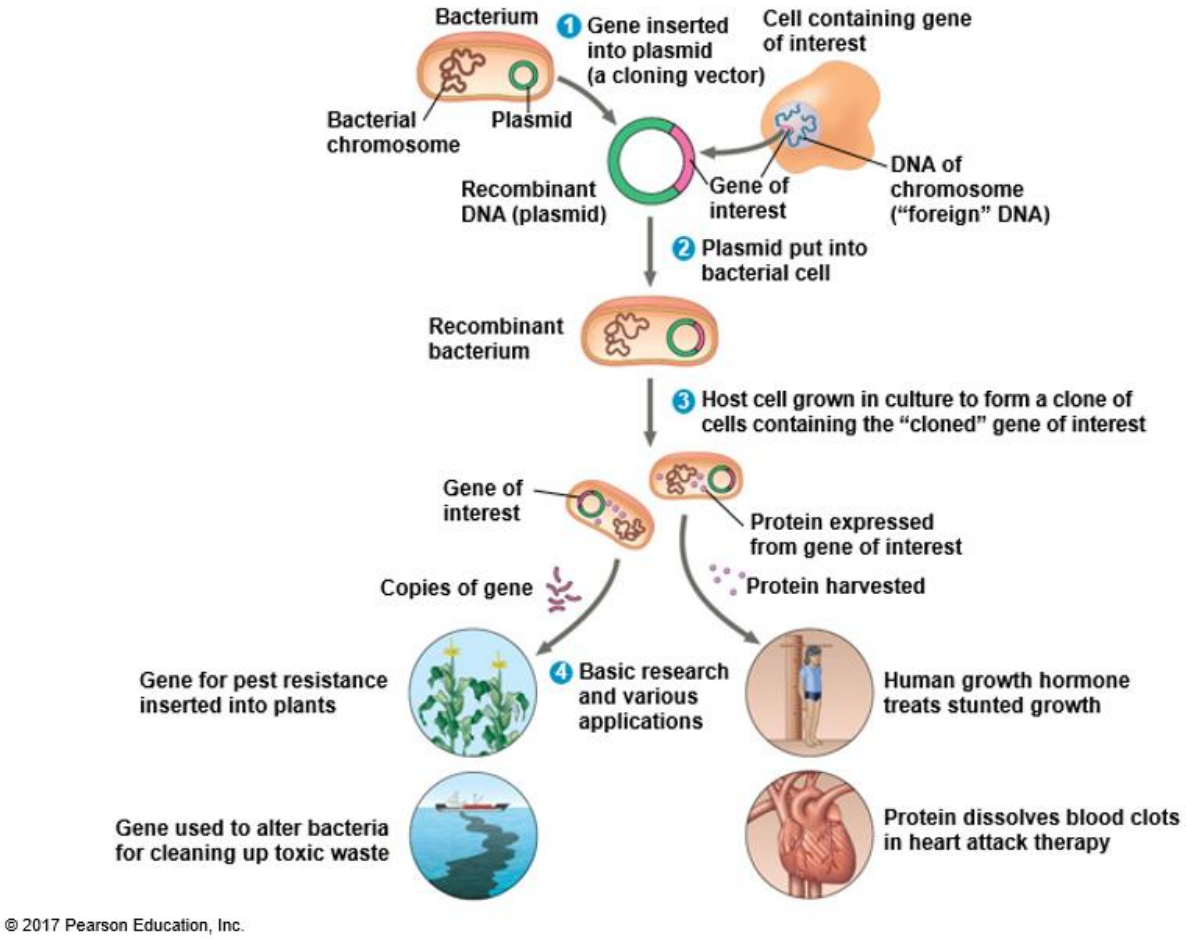
## Biotechnology

### DNA cloning

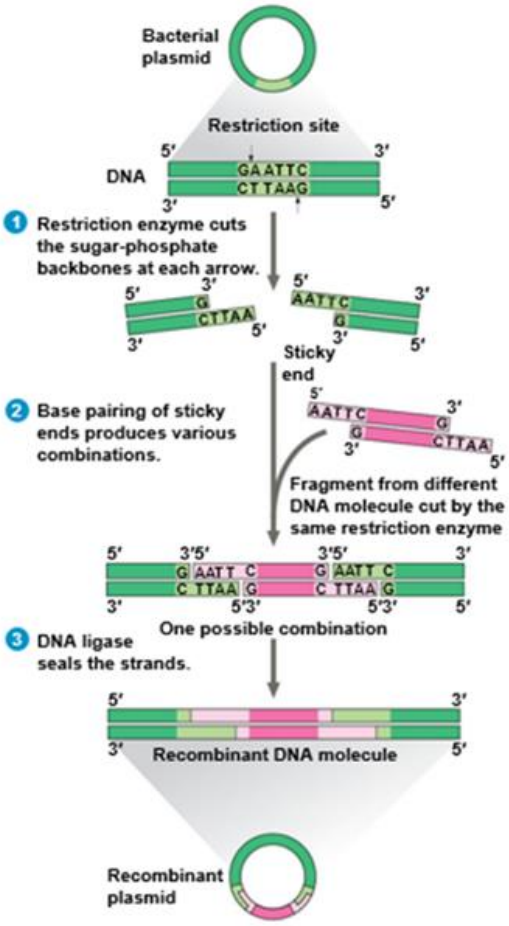
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เหมือนกันโดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจจะถูกนำเข้าไปแทรกในพลาสมิด พลาสมิดคือดีเอ็นเอแบบวงที่เพิ่มจำนวนได้ พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจเมื่อถูกเชื่อมเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ DNA ligase แล้วจะเรียกว่า recombinant plasmid ซึ่ง recombinant plasmid นี้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวก็จะมีพลาสมิดติดไปด้วย วิธีการนี้ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการได้คราวละมาก ๆ วิธีโคลนนิงนี้นิยมใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อผลิตโปรตีนที่สนใจ

พลาสมิดที่ใช้สำหรับโคลนนิงเรียกว่า cloning vector พลาสมิดของแบคทีเรียเป็นที่นิยมในการใช้เป็นเวคเตอร์เพราะสามารถนำเข้าเซลล์แบคทีเรียได้ง่าย

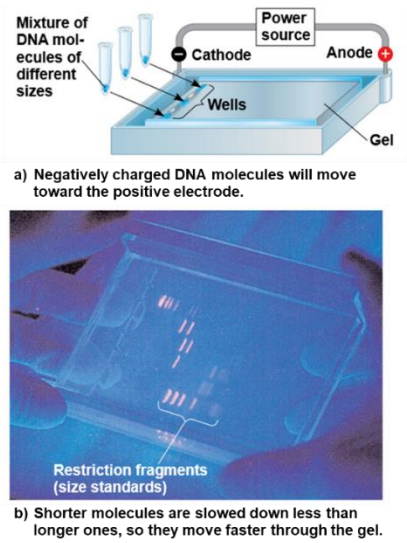
วีที่จะใช้ตรวจสอบว่า recombinant plasmid ที่ได้นั้นมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เราสนใจอยู่หรือไม่ ทำได้โดยตัดพลาสมิดนั้น หรือใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วนำมาทำ gel electrophoresis




**รูปที่ 1** DNA cloning




**รูปที่ 2** การสร้าง recombinant plasmid

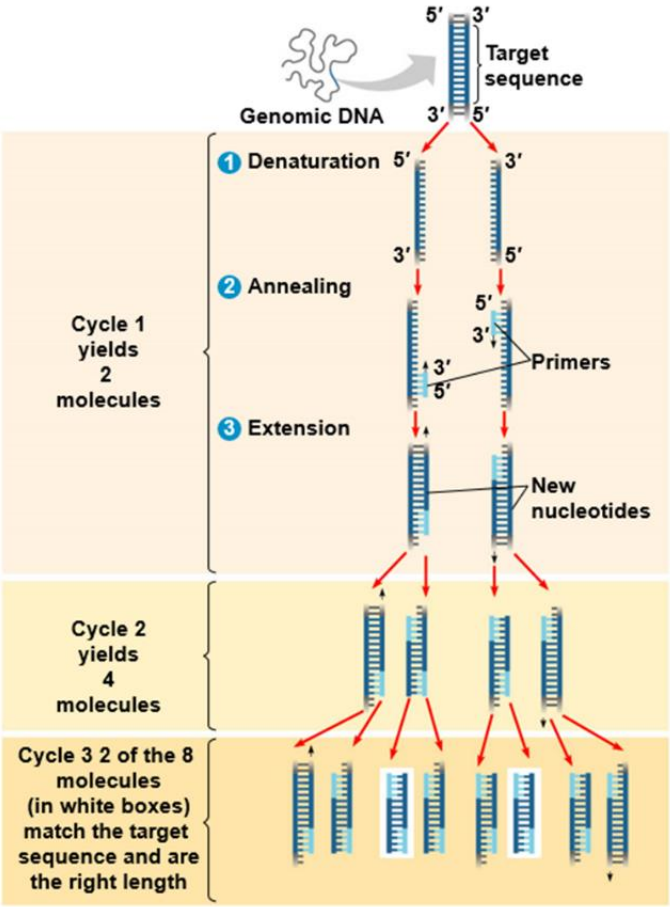



**รูปที่ 3** Gel electrophoresis

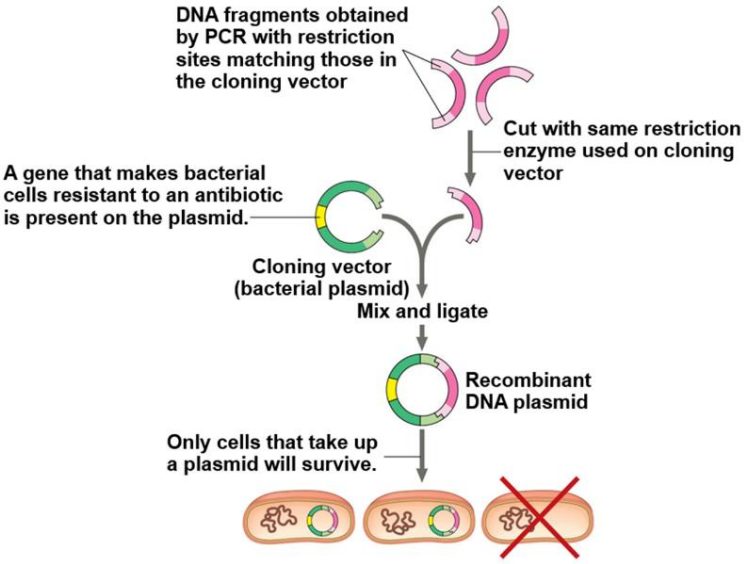
**การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ**

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจ เทคนิคนี้ประกอบด้วยสามขั้นตอน คือ (1) denaturation ใช้ความร้อนแยกสายดีเอ็นเอออกจากกัน (2) annealing ลดความร้อนลงเพื่อให้ DNA primers สามารถเข้าจับกับบริเวณที่เราสนใจ และขั้นตอนสุดท้ายคือ (3) extension เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้นิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อกับไพร์เมอร์ สามขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำหลาย ๆ รอบจนในที่สุดได้จำนวนดีเอ็นเอที่สนใจในปริมาณมาก

เทคนิค PCR นี้ใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อนได้ดีคือ *Taq* polymerase

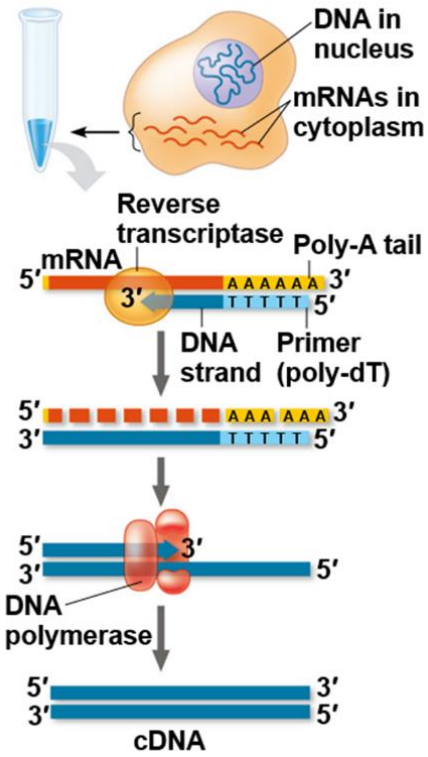



**รูปที่ 4** Polymerase Chain Reaction

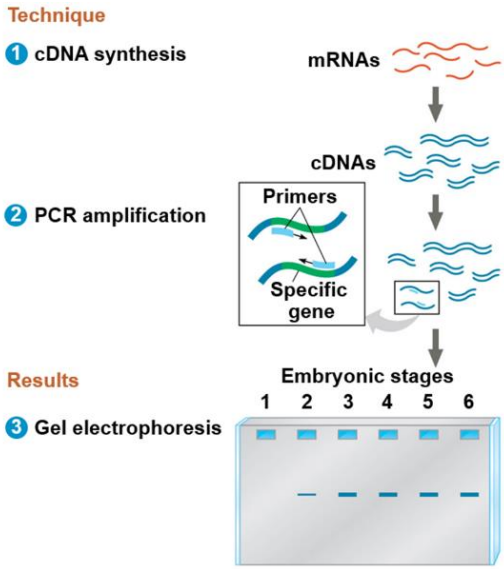



**รูปที่ 5** ดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR สามารถนำไปใช้สำหรับ gene cloning

การศึกษาว่ายีนที่สนใจมีการแสดงออกเมื่อไหร่และที่ไหนสามารถทำได้โดยศึกษาผ่าน mRNAs ที่สร้างขึ้น mRNA สามารถตรวจจับได้เช่นวิธี fluorescence *in situ* hybridization (FISH) หรือการสกัด mRNA จากเนื้อเยื่อที่สนใจ mRNA ที่สกัดได้จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่สมกัน (complementary DNA, cDNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase แล้วนำไปเพิ่มจำนวนโดยใช้ PCR ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่า reverse transcriptase-PCR หรือ RT-PCR




**รูปที่ 6** การสร้าง complementary DNA




**รูปที่ 7** Reverse transcriptase-PCR

**DNA sequencing**

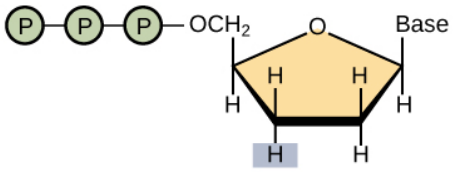
Sanger sequencing: The chain termination method

Sanger sequencing ถูกพัฒนาโดย Fred Sanger และคณะในปี 1977 วิธีนี้ยังเป็นที่นิยมในการศึกษาลำดับเบสของยีนหรือลำดับเบสหนึ่งๆ

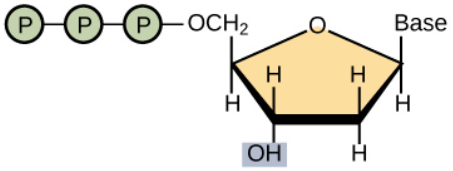
Sanger sequencing ใช้วิธีคล้ายกับการทำ PCR นั่นคือมีส่วนประกอบคือ

- DNA polymerase
- Primer ที่จับกับส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ
- DNA nucleotides (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- template DNA

แต่ Sanger sequencing จะใช้ ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP ที่ติดฉลากฟลูออเรสเซนส์ไว้ แทนที่ dATP, dTTP, dCTP, dGTP ตามลำดับ

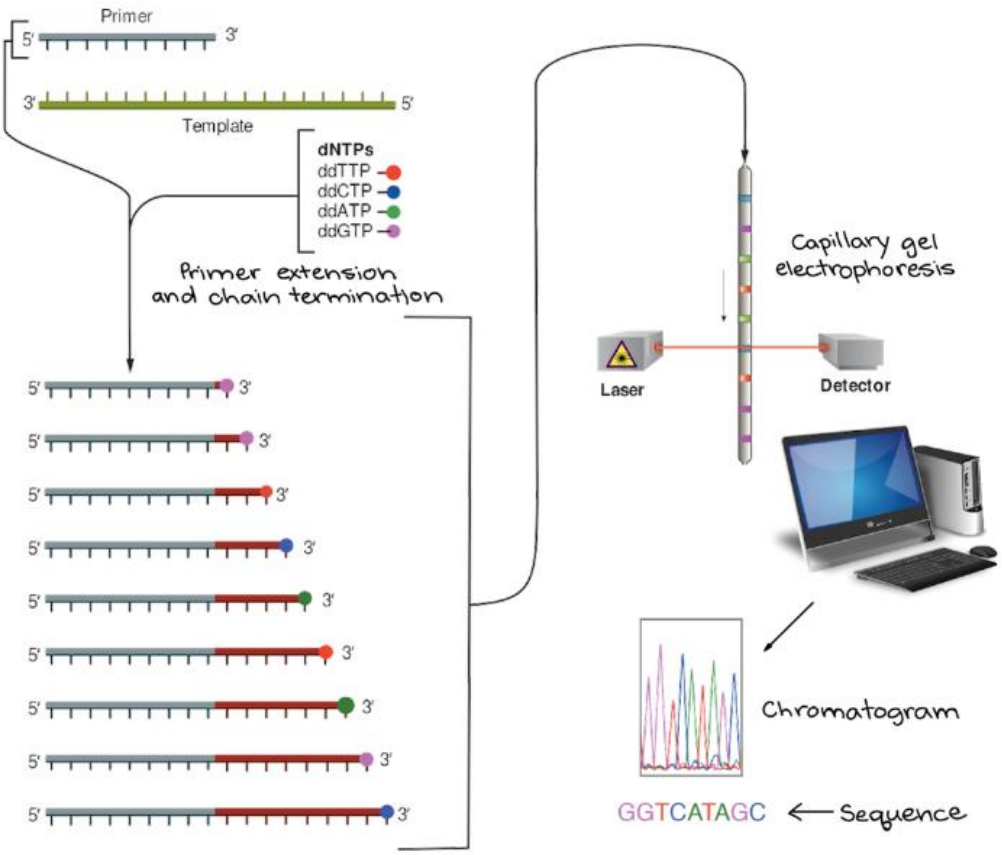



**Dideoxynucleotide (ddNTP)**

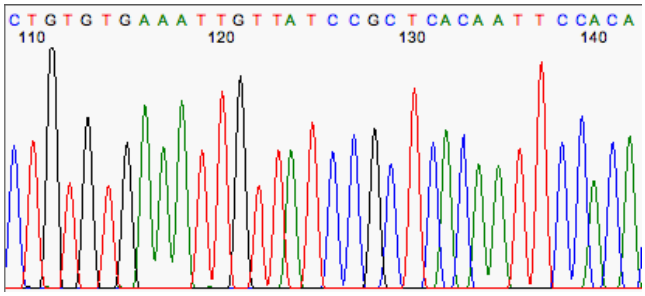



**Deoxynucleotide (dNTP)**

**รูปที่ 8** ddNTP และ dNTP




**รูปที่ 9** Sanger sequencing




**รูปที่ 10** Chromatogram

Dideoxy nucleotides มีโครงสร้างคล้ายกับ deoxy nucleotides แต่มันไม่มีหมู่ hydroxyl ที่คาร์บอนที่ 3' ในน้ำตาล

เมื่อ dideoxy nucleotide ถูกเพิ่มเข้าไปในสายดีเอ็นเอ เพราะว่ามันไม่มีไฮดรอซิลทำให้นิวคลีโอไทด์มาเชื่อมต่ออีกไม่ได้ สายจึงหยุดอยู่เท่านั้นและเนื่องจากมันได้ติดฉลากสีเอาไว้ เมื่อนำมาอ่านจึงเห็นเป็นลำดับเบส

**Next Generation Sequencing**

"Next Generation Sequencing" (NGS หรือ "massively parallel sequencing") เป็นชื่อรวม ๆ ของเทคนิคที่ใช้หาลำดับเบสได้คราวละมากๆ เช่นการศึกษาจีโนม NGS ที่เป็นที่รู้จักได้แก่

a) 454 (หรือ pyrosequencing หรือ Roche GS FLX) "sequencing by synthesis"

b) Illumina (หรือ Solexa) "sequencing by synthesis"

c) SOLiD "sequencing by ligation"

ปัจจุบันมีเทคนิคที่ทันสมัยขึ้นทำให้การอ่านลำดับเบสได้ยาวมากขึ้น ได้แก่

d) Ion Torrent

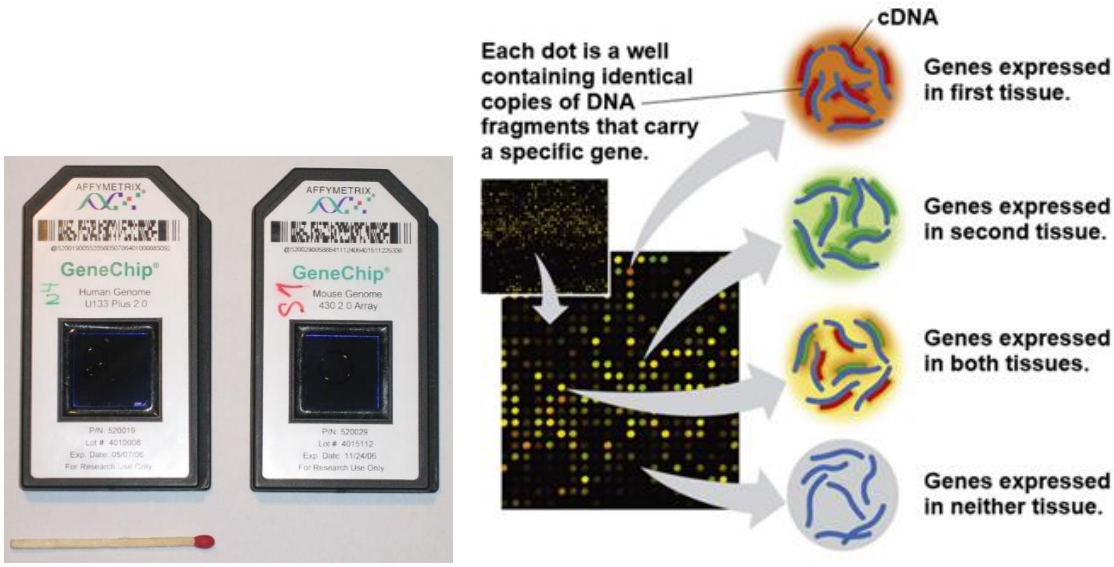
e) Pacific Biosciences (PacBio)

f) Oxford Nanopore

**ศึกษาการแสดงออกของยีนหลายยีน**

การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งจีโนม

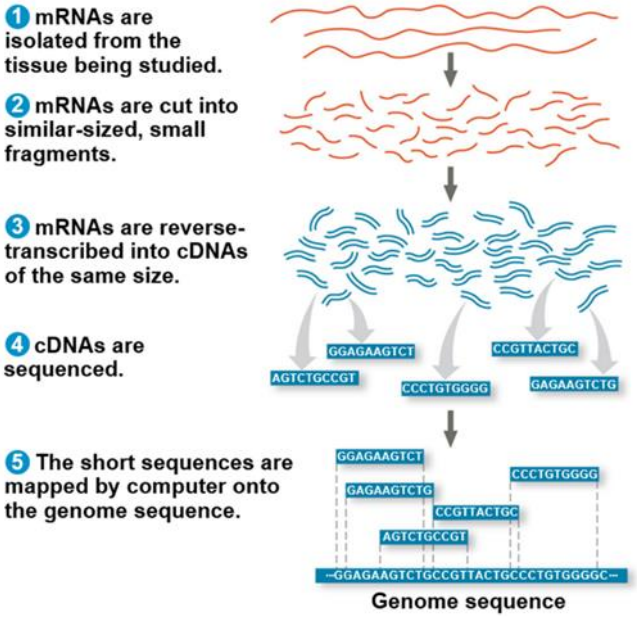
DNA microarrays




**รูปที่ 8** Microarrays

RNA sequencing

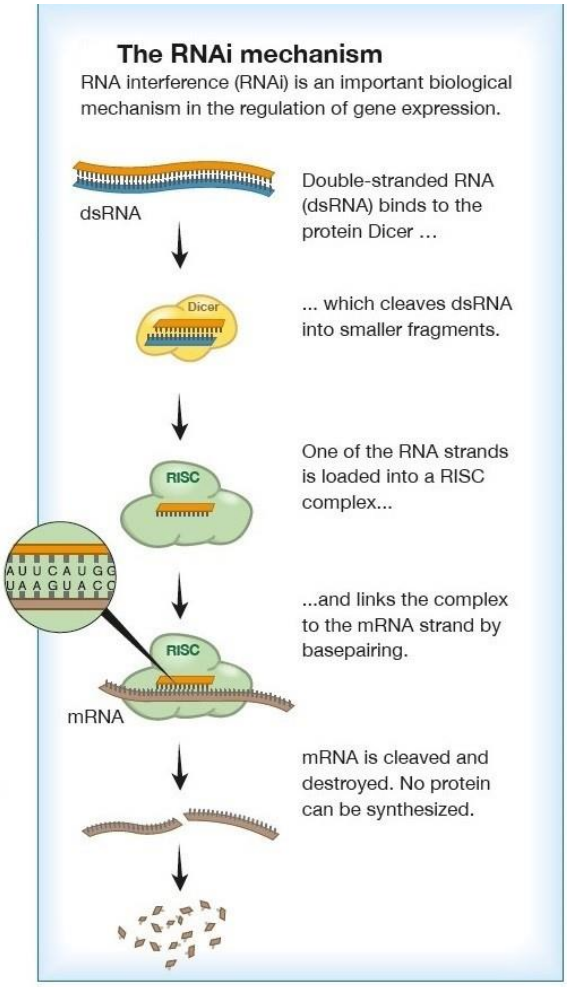
RNA ถูกสกัด ตัดและเปลี่ยนเป็น cDNA และถูก sequenced ในคราวเดียว วิธีนี้สามารถศึกษายีนได้ทั้งหมดในคราวเดียว




**รูปที่ 10** RNA sequencing

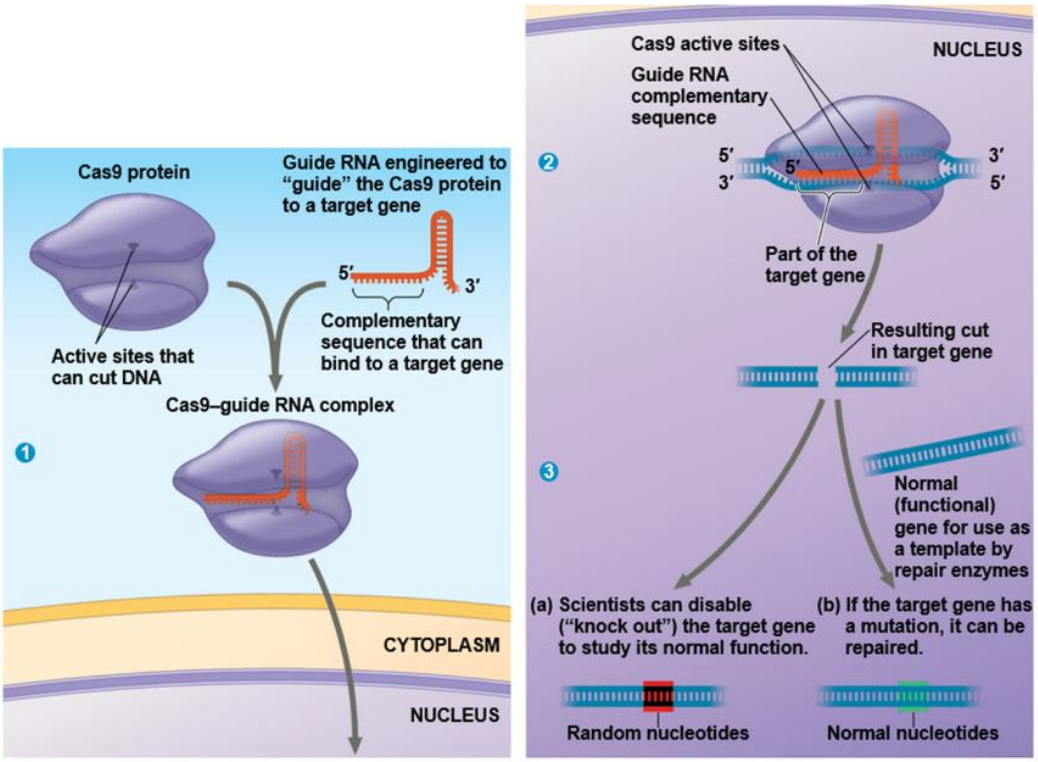
การศึกษาหน้าที่ของยีน

RNA interference (RNAi)




**รูปที่ 11** RNA interference

CRISPR-Cas9




**รูปที่ 12** CRISPR-Cas9

**แบบฝึกหัด**

ข้อใดถูกเกี่ยวกับ polymerase chain reaction (PCR)

A. Denaturation - แยกดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิสูง

B. Extension – ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ DNA primers เข้าจับกับ DNA template

C. Annealing – นิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อจาก primers โดยใช้เอนไซม์ *Taq* polymerase

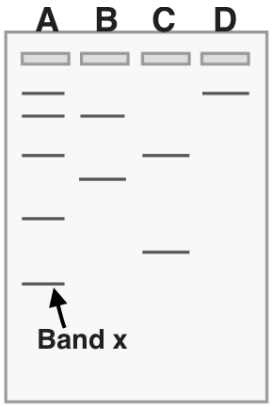
Polymerase chain reaction (PCR) มีวิธีการคล้ายกับกระบวนการใดที่ทำให้ได้ดีเอ็นเอจำนวนมาก

A. Translation

B. Replication

C. Transcription

D. Mitosis




ผลจาก gel electrophoresis ของสิ่งมีชีวิตสี่ชนิด ด้านล่างมีแถบ X แถบนี้มีความหมายว่าอย่างไร

A. DNA ชิ้นใหญ่ที่สุด เคลื่อนที่ได้ช้าสุด

B. DNA ชิ้นเล็กสุด เคลื่อนที่ช้าสุด

C. DNA ชิ้นเล็กสุด เคลื่อนที่เร็วสุด

D. DNA ชิ้นใหญ่ที่สุด เคลื่อนที่ได้เร็วสุด