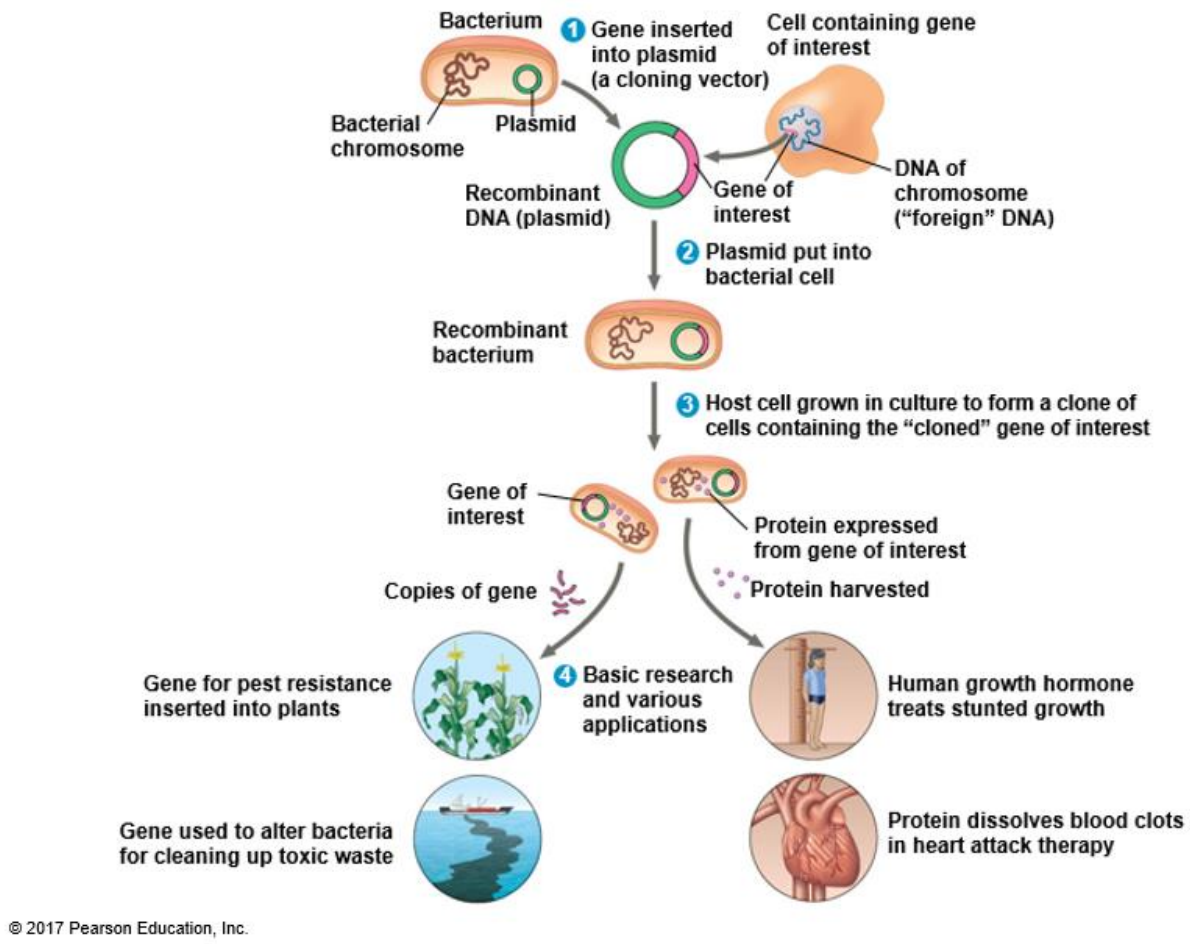
Biotechnology

DNA cloning

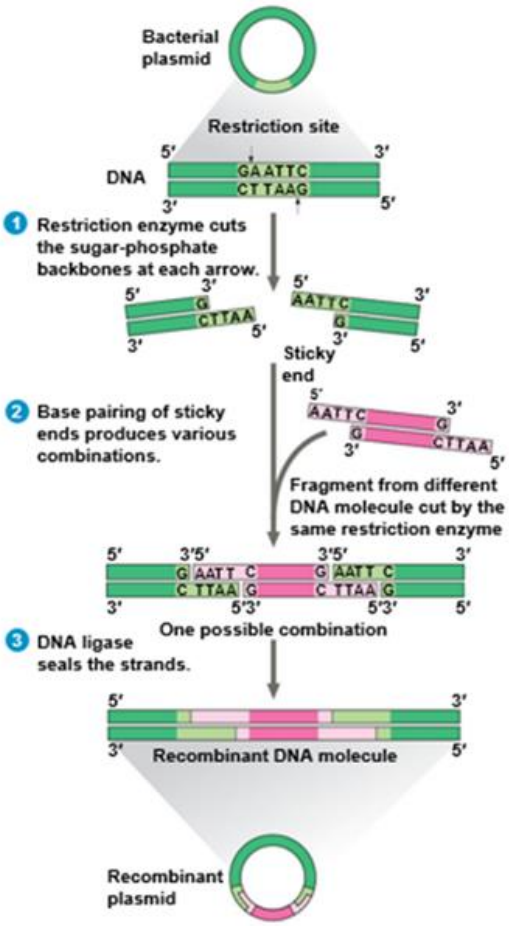
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เหมือนกันโดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจจะถูกนำเข้าไปแทรกในพลาสมิด พลาสมิดคือดีเอ็นเอแบบวงที่เพิ่มจำนวนได้ พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจเมื่อถูกเชื่อมเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ DNA ligase แล้วจะเรียกว่า recombinant plasmid ซึ่ง recombinant plasmidนี้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวก้จะมีพลาสมิดติดไปด้วย วิธีการนี้ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการได้คราวละมากๆ วิธีโคลนนิงนี้นิยมใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อผลิตโปรตีนที่สนใจ

พลาสมิดที่ใช้สำหรับโคลนนิงเรียกว่าcloning vector พลาสมิดของแบคทีเรียเป็นที่นิยมในการใช้เป็นเวคเตอร์เพราะสามารถนำเข้าเซลล์แบคทีเรียได้ง่าย

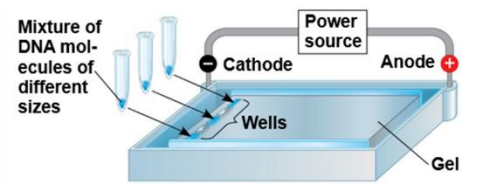
วีที่จะใช้ตรวจสอบว่าrecombinant plasmidที่ได้นั้นมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เราสนใจอยู่หรือไม่ ทำได้โดยตัดพลาสมิดนั้นหรือใช้วิธีpolymerase chain reaction (PCR) แล้วนำมาทำgel electrophoresis



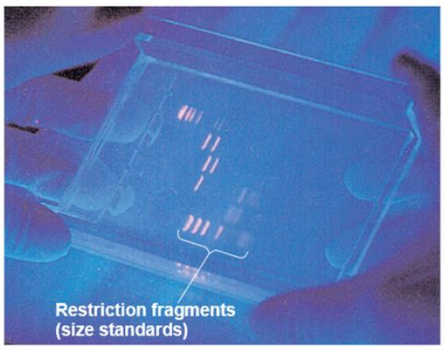
รูปที่ 1 DNA cloning



รูปที่ 2 การสร้างrecombinant plasmid



a) Negatively charged DNA molecules will move toward the positive electrode.



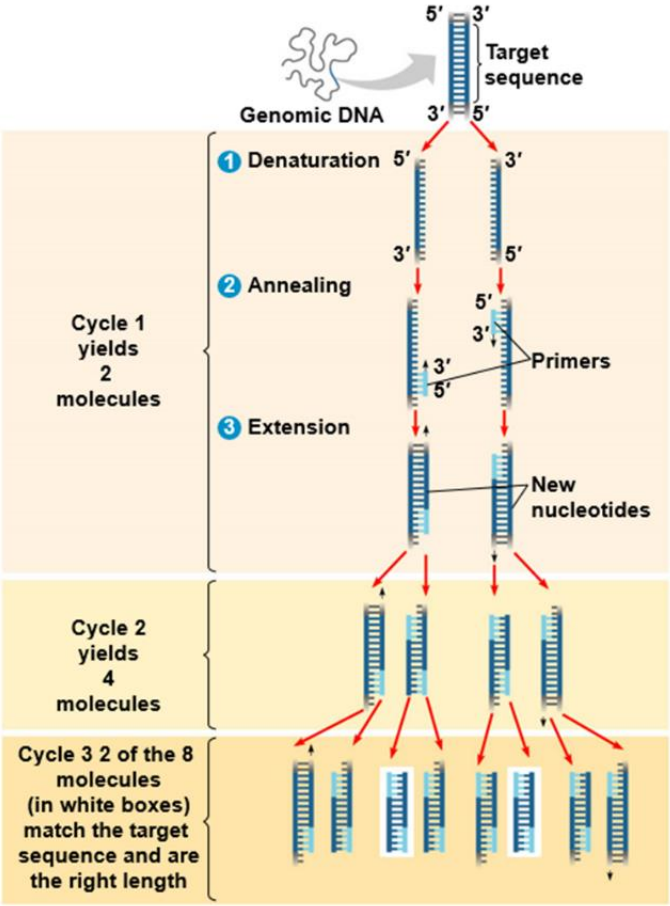
b) Shorter molecules are slowed down less than longer ones, so they move faster through the gel.

รูปที่ 3 Gel electrophoresis

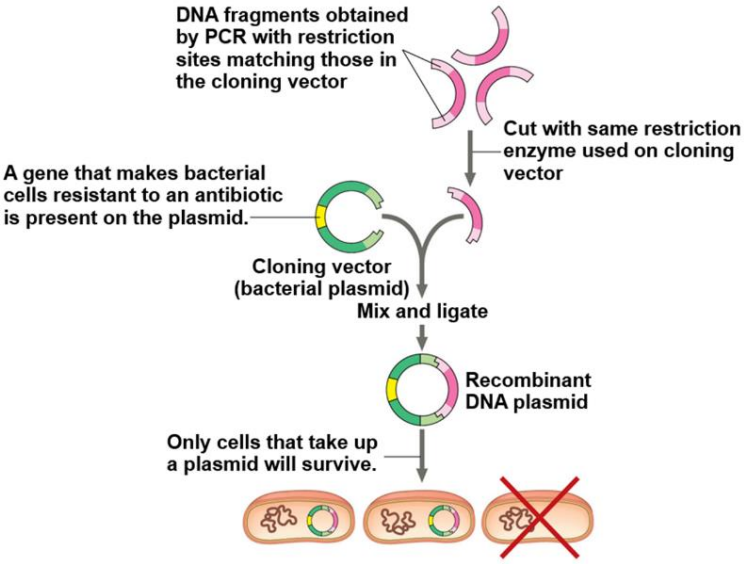
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจ เทคนิคนี้ประกอบด้วยสามขั้นตอน คือ denaturationใช้ความร้อนแยกสายดีเอ็นเอออกจากกัน annealingลดความร้อนลงเพื่อให้DNA primersสามารถเข้าจับกับบริเวณที่เราสนใจ และขั้นตอนสุดท้ายคือextension เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้นิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อกับไพร์เมอร์ สามขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำหลายๆรอบจนในที่สุดได้จำนวนดีเอ็นเอที่สนใจในปริมาณมาก

เทคนิคPCRนี้ใช้เอนไซม์DNA polymeraseที่ทนต่อความร้อนได้ดีคือ *Taq* polymerase

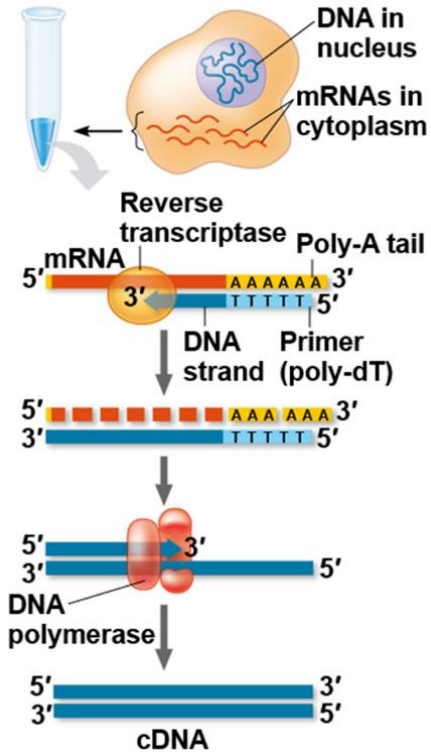


รูปที่ 4 Polymerase Chain Reaction

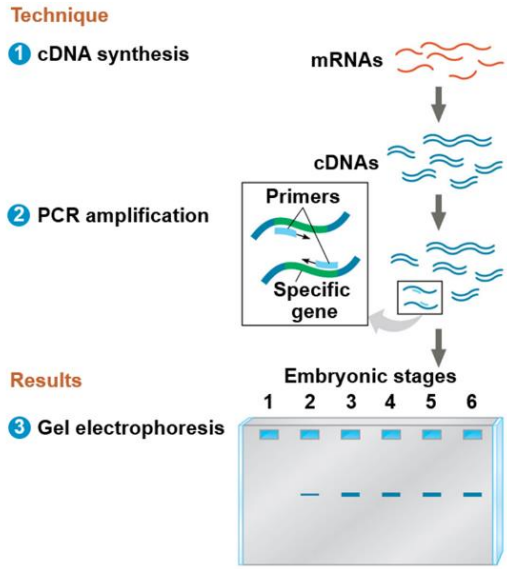


รูปที่ 5 ดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR สามารถนำไปใช้สำหรับ gene cloning

การศึกษาว่ายีนที่สนใจมีการแสดงออกเมื่อไหร่และที่ไหนสามารถทำได้โดยศึกษาผ่านmRNAsที่สร้างขึ้น mRNAสามารถตรวจจับได้เช่นวิธี fluorescence *in situ* hybridization (FISH) หรือการสกัดmRNAจากเนื้อเยื่อที่สนใจ mRNAที่สกัดได้จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่สมกัน (complementary DNA, cDNA)โดยใช้เอนไซม์reverse transcriptaseแล้วนำไปเพิ่มจำนวนโดยใช้PCRซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่า reverse transcriptase-PCR หรือRT-PCR



รูปที่ 6 การสร้าง complementary DNA



รูปที่ 7 Reverse transcriptase-PCR

DNA sequencing

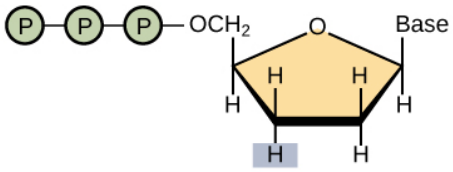
Sanger sequencing: The chain termination method

Sanger sequencing ถูกพัฒนาโดย Fred Sanger และคณะในปี 1977 วิธีนี้ยังเป็นที่นิยมในการศึกษาลำดับเบสของยีนหรือลำดับเบสหนึ่งๆ

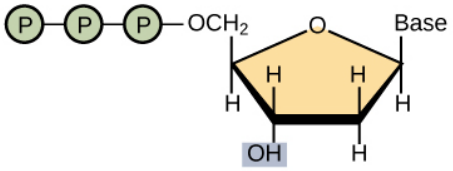
Sanger sequencing ใช้วิธีคล้ายกับการทำPCRนั่นคือมีส่วนประกอบคือ

- 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

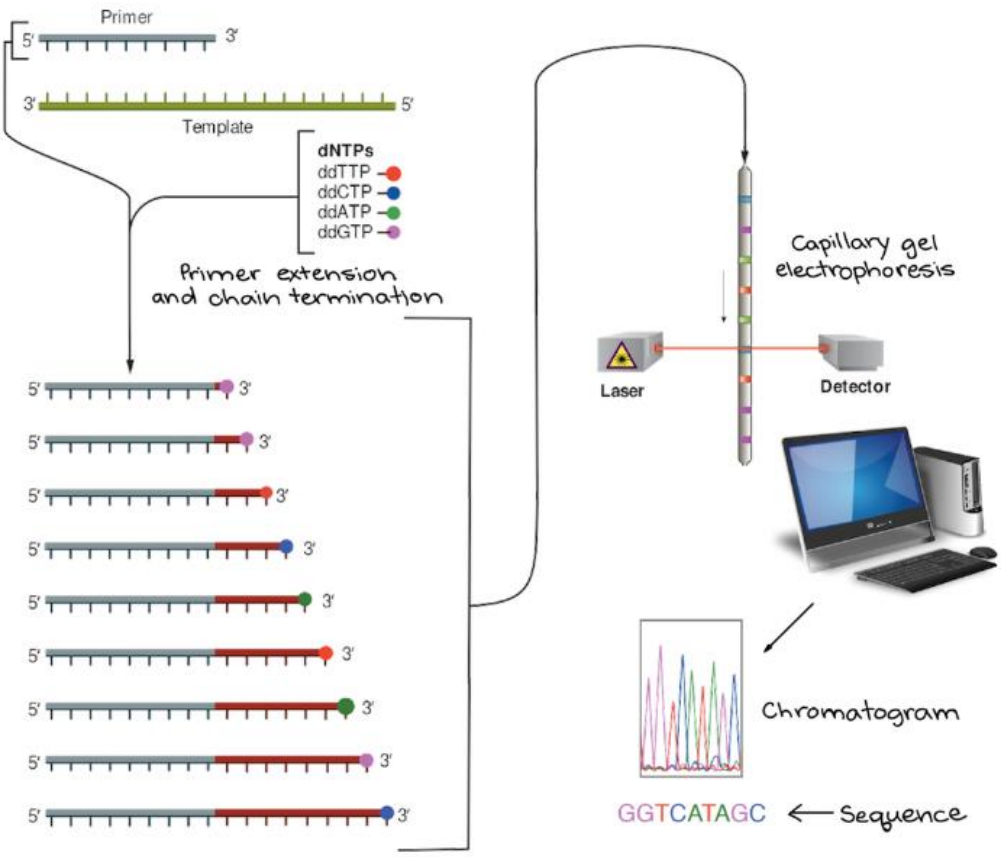


Dideoxynucleotide (ddNTP)

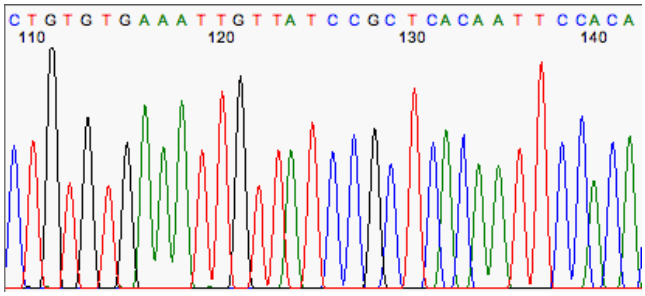


Deoxynucleotide (dNTP)

รูปที่ 8 ddNTP และ dNTP



รูปที่ 9 Sanger sequencing



รูปที่ 10 Chromatogram

Dideoxy nucleotides มีโครงสร้างคล้ายกับ deoxy nucleotides แต่มันไม่มีหมู่ hydroxyl ที่คาร์บอนที่ 3ในน้ำตาล

เมื่อ dideoxy nucleotide ถูกเพิ่มเข้าไปในสายดีเอ็นเอ เพราะว่ามันไม่มีไฮดรอซิลทำให้นิวคลีโอไทด์มาเชื่อมต่ออีกไม่ได้ สายจึงหยุดอยู่เท่านั้นและเนื่องจากมันได้ติดฉลากสีเอาไว้ เมื่อนำมาอ่านจึงเห็นเป็นลำดับเบส

Next Generation Sequencing

"Next Generation Sequencing" (NGS หรือ "massively parallel sequencing") เป็นชื่อรวมๆของเทคนิคที่ใช้หาลำดับเบสได้คราวละมากๆ เช่นการศึกษาจีโนม NGSที่เป็นที่รู้จักได้แก่

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)

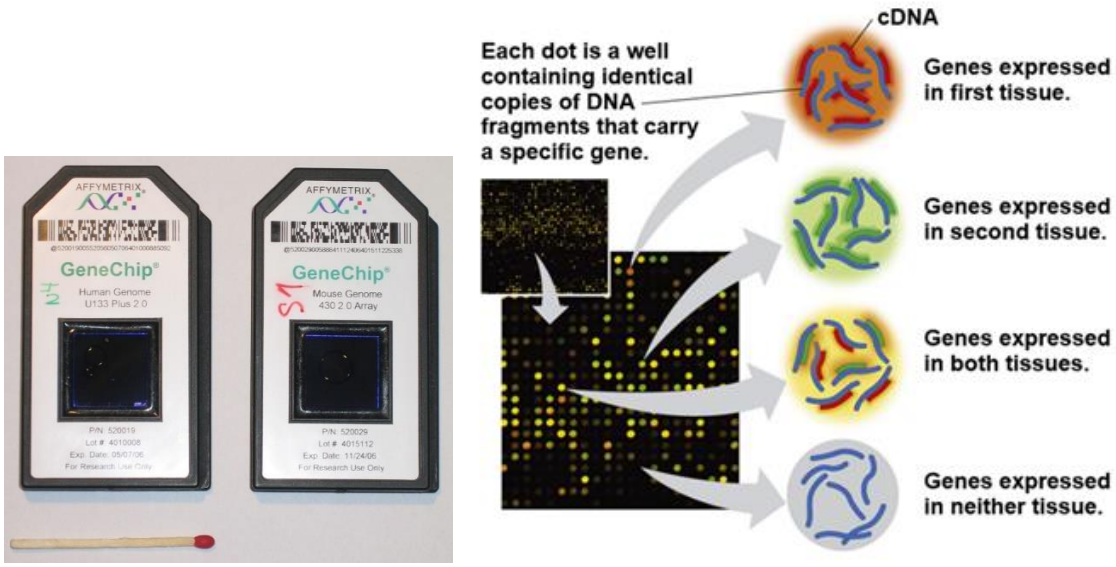
The first machine that can perform Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing.

f) Oxford Nanopore

ศึกษาการแสดงออกของยีนหลายยีน

การศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งจีโนม

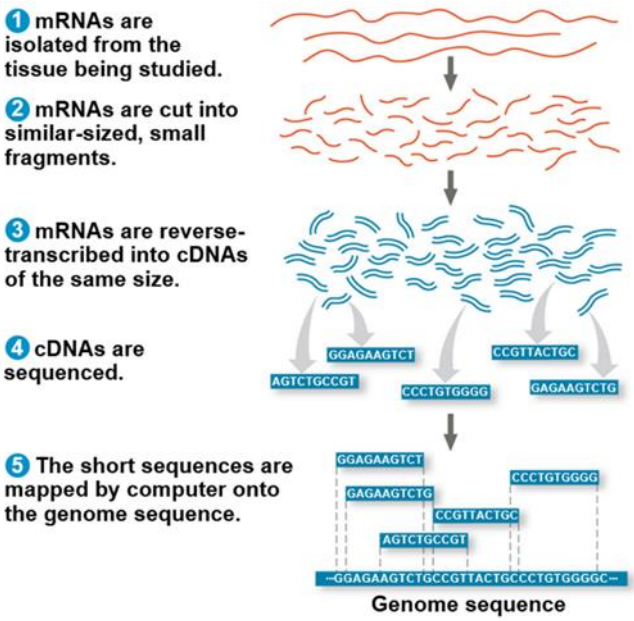
DNA microarrays



รูปที่ 8 Microarrays

RNA sequencing

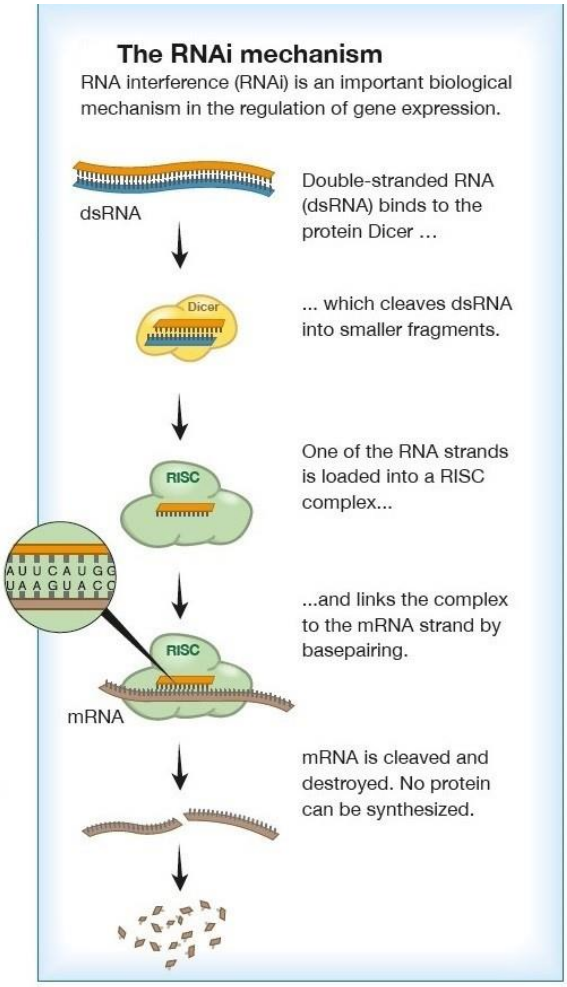
RNAถูกสกัด ตัดและเปลี่ยนเป็นcDNAและถูกsequencedในคราวเดียว วิธีนี้สามารถศึกษายีนได้ทั้งหมดในคราวเดียว



รูปที่ 10 RNA sequencing

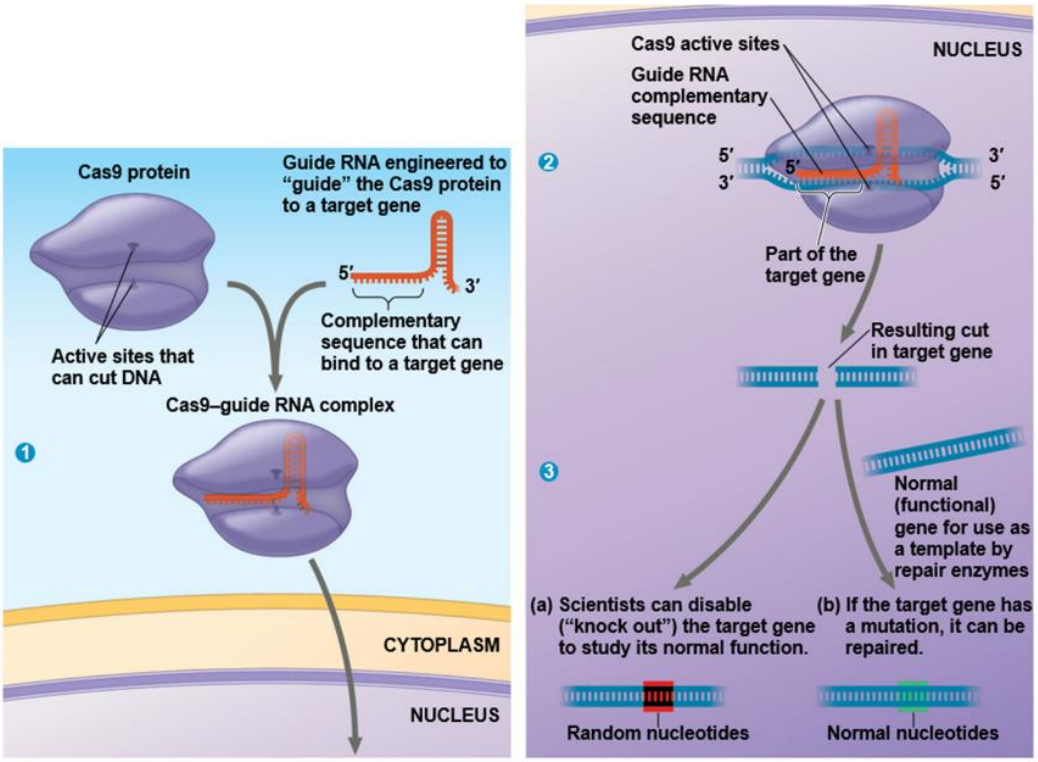
การศึกษาหน้าที่ของยีน

RNA interference (RNAi)



รูปที่ 11 RNA interference

CRISPR-Cas9



รูปที่ 12 CRISPR-Cas9

แบบฝึกหัด

ข้อใดถูกเกี่ยวกับ polymerase chain reaction (PCR)

A. Denaturation - แยกดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิสูง

B. Extension – ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้DNA primersเข้าจับกับDNA template

C. Annealing – นิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อจากprimers โดยใช้เอนไซม์ *Taq* polymerase

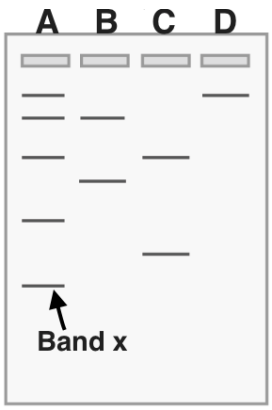
Polymerase chain reaction (PCR) มีวิธีการคล้ายกับกระบวนการใดที่ทำให้ได้ดีเอ็นเอจำนวนมาก

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