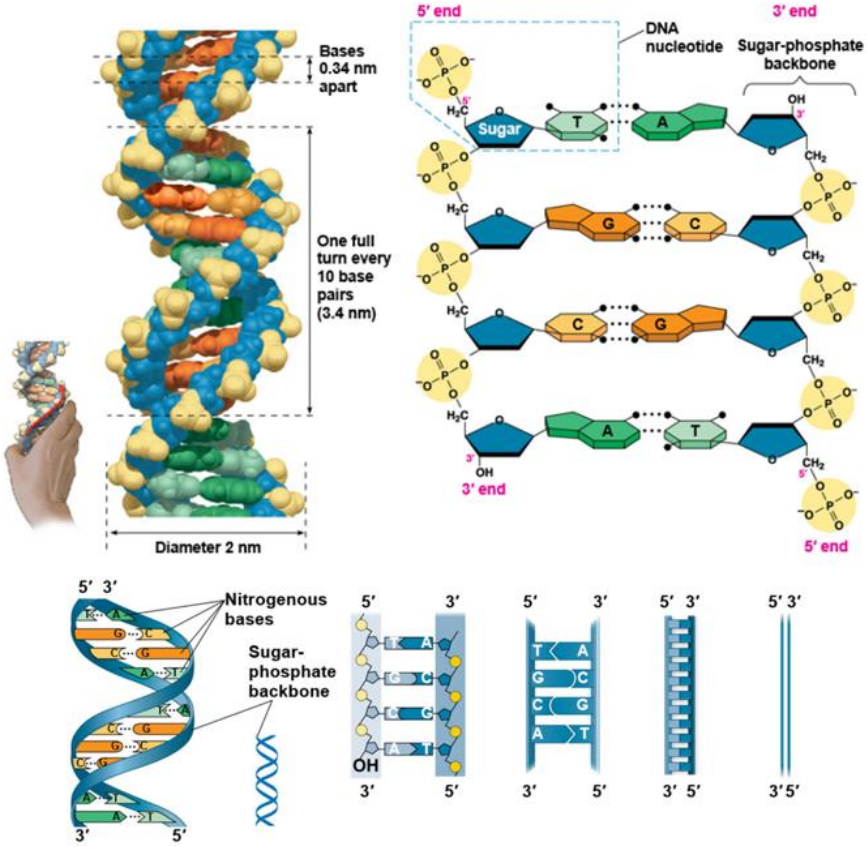
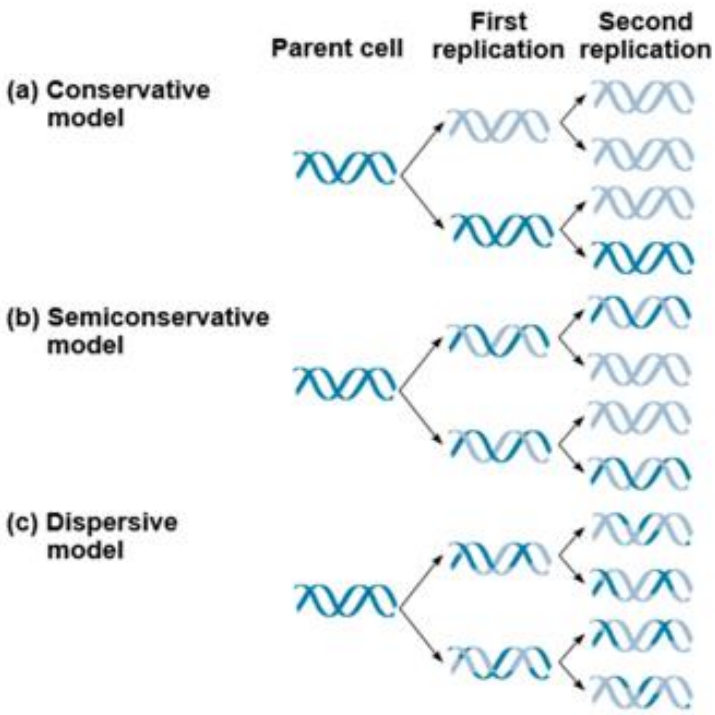
นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเดียวกันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester) ระหว่างคาร์บอนตัวที่สามบนน้ำตาลกับหมู่ฟอสเฟสที่เกาะที่น้ำตาลตัวที่ห้าของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลถัดมา

เพื่อให้เข้าใจ double helix ให้นึกภาพเอามือขวาพันรอบโมเลกุลดีเอ็นเอที่แสดงในรูปโดยให้นิ้วหัวแม่มือชี้ขึ้น นึกภาพนิ้วเลื่อนไปตามด้านนอกของเกลียว มือของคุณควรเคลื่อนไปพร้อมกับเกลียวขึ้นไปในทิศทางที่นิ้วหัวแม่มือชี้




3’-5’phosphodiester bond และโครงสร้างของดีเอ็นเอ

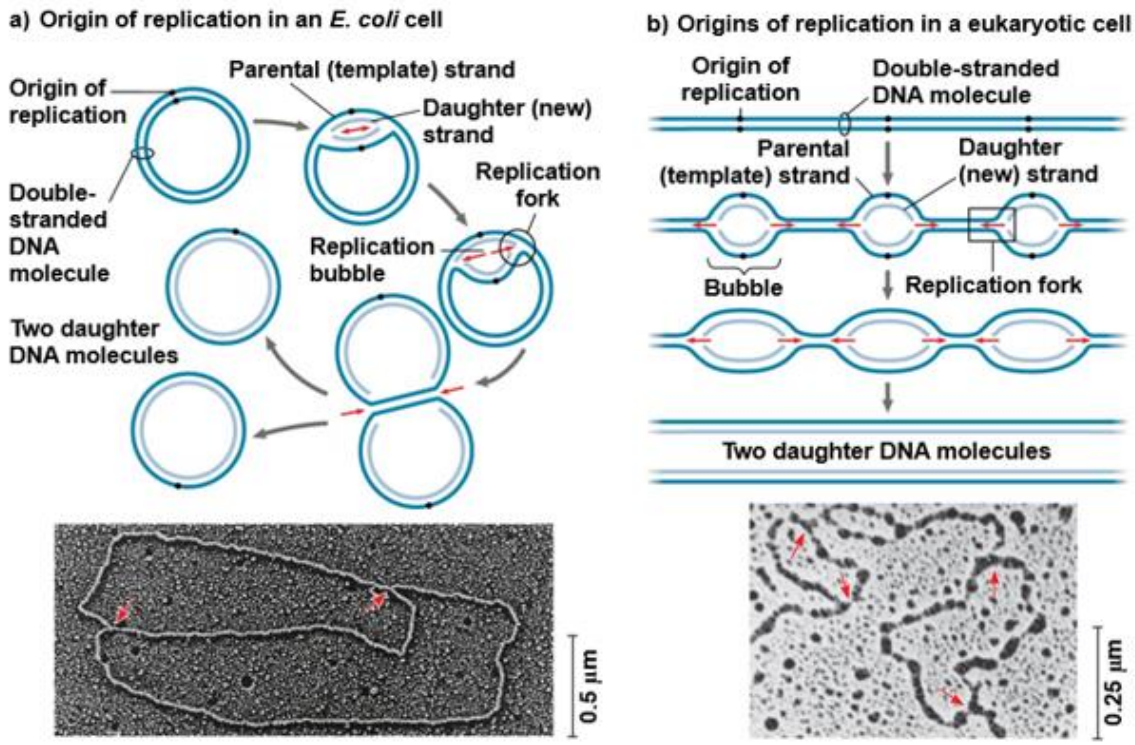
เนื่องจากทั้งสองเส้นของดีเอ็นเอจะประกอบแต่ละกลุ่มสาระการทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับการสร้างสายใหม่ในการเพิ่มจำนวน ในขณะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโมเลกุลสายเดิมจะคลายออกและสายใหม่สองเส้นถูกสร้างขึ้นตามกฎการจับคู่พื้นฐาน รูปแบบการจำลองแบบsemiconservativeของวัตสันและคริกระบุว่าโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่แต่ละตัวจะมีสายเก่าหนึ่งเส้นและอีกหนึ่งเส้นที่สร้างขึ้นใหม่




โมเดลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการทดลองของ Meselson และ Stahl

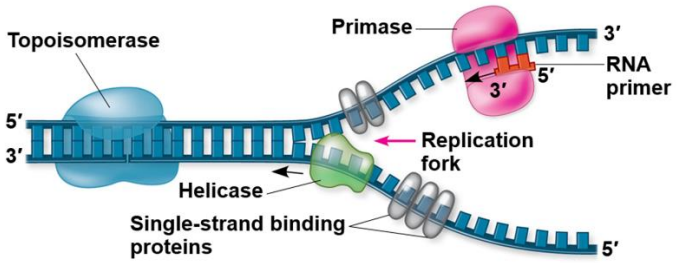
**DNA replication การจำลองแบบดีเอ็นเอ**

DNA replication เริ่มที่จุดเฉพาะที่เรียกว่า origin of replication สองสายดีเอ็นเอจะถูกแยกออก เปิดการจำลองแบบ “bubble” ซึ่งในโครโมโซมของพวก eukaryotic อาจมีหลายร้อยหรือหลายพัน origin of replication การเพิ่มจำนวนนี้เกิดขึ้นในทั้งสองทิศทางจากแต่ละจุดจนกว่าจะคัดลอกโมเลกุลทั้งหมด




การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน prokaryotes และ eukaryotes

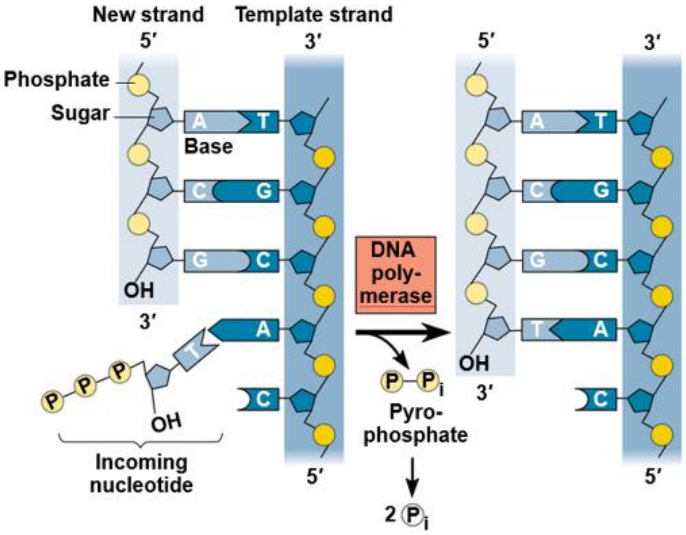
ปลายของแต่ละ replication bubble จะเรียกว่า replication fork มีลักษณะคล้ายรูปตัววาย ซึ่งเป็นบริเวณที่ดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกสร้างขึ้น เอนไซม์helicaseมีหน้าที่คลายเกลียวดีเอ็นเอที่บริเวณreplication forkนี้ โปรตีนSingle strand binding proteinsจะเข้ามาจับและช่วยรักษาให้สายดีเอ็นเอที่ถูกคลายออกคงตัวอยู่ได้ เอนไซม์Topoisomeraseคลายเกลียวบริเวณที่เป็นเกลียวซ้อนเกลียวของดีเอ็นเอ




บริเวณ replication fork

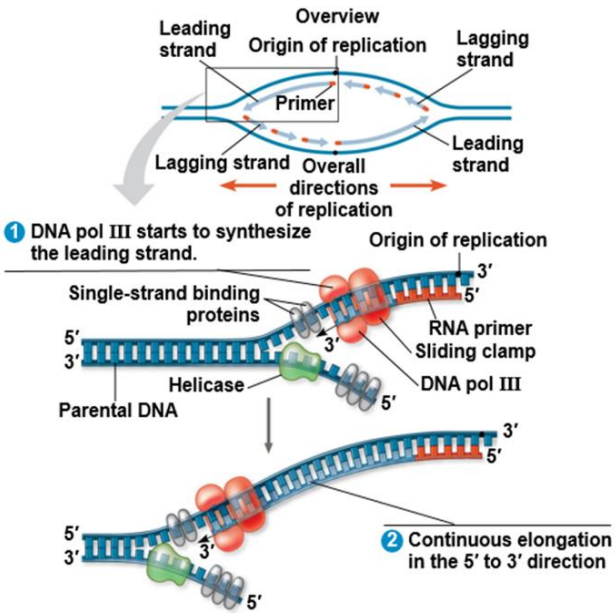
เอนไซม์ DNA polymerases จำเป็นต้องใช้ primer เพื่อจะได้เติมเบสให้กับดีเอ็นเอสายใหม่ primers นี้ถูกสร้างด้วยเอนไซม์primase เอนไซม์นี้จะสร้างRNA primersประมาณ 5-10 เบสก่อน ที่ปลายด้าน 3´จะเป็นบริเวณที่ให้เริ่มต้นการสร้างสายใหม่

เอนไซม์ DNA polymerase นี้มีหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เริ่มบริเวณreplication fork เอนไซม์นี่ส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้primer และสายดีเอ็นเอที่เป็นtemplate การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีอัตราโดยประมาณที่ 500 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาทีในแบคทีเรียและ 50 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาทีในคน แต่ละนิวคลีโอไทด์จะถูกต่อเข้าไปในสายดีเอ็นเอสายใหม่นี้คือnucleoside triphosphate เมื่อnucleoside triphosphateมาต่อกันจะเสียหมู่ฟอสเฟตออกไปสองหมู่



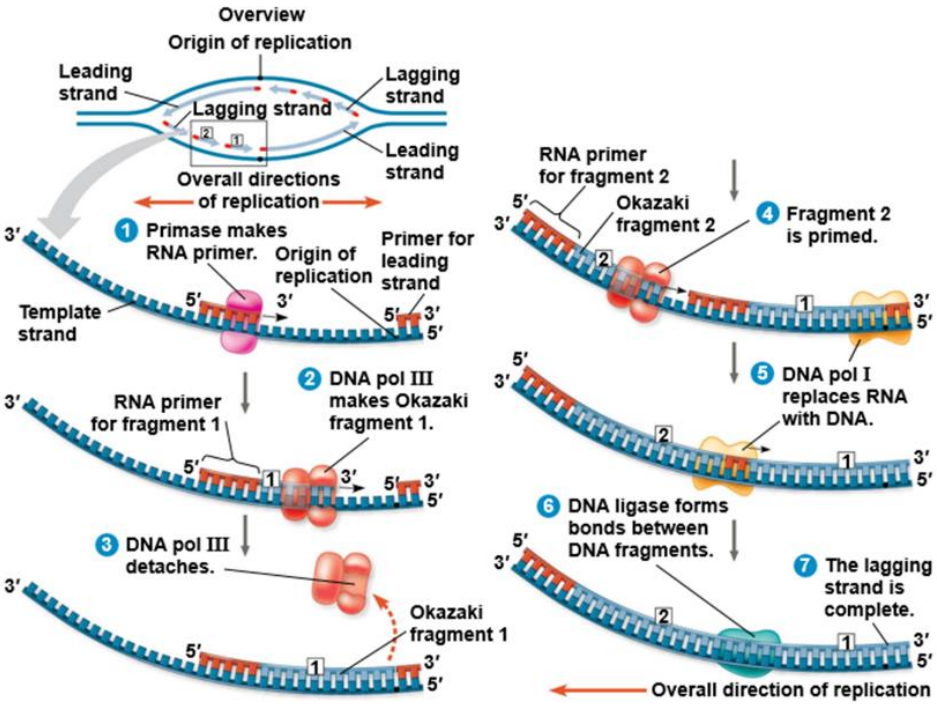

Dephosphorylation

DNA polymeraseจะต่อนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3´ เท่านั้น นั่นคือสายดีเอ้นเอสายใหม่จะถูกสร้างจาก 5´ไป 3´



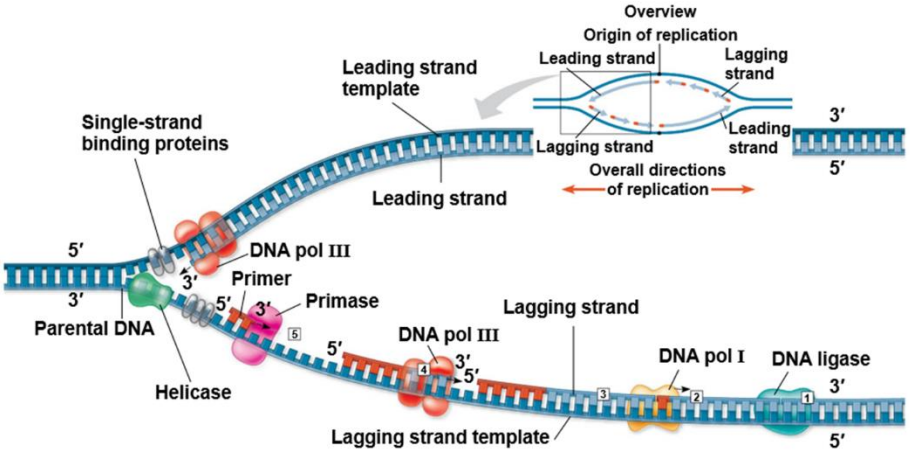

DNA replication ของ leading strand

ลักษณะที่เป็นantiparallelของดีเอ็นเอนี้ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีกระบวนการต่างกันเล็กน้อย สายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่สายหนึ่งจะถูกสร้างได้ต่อเนื่องจาก 5´ ไป 3´ ซึ่งเรียกว่า leading strand แต่อีกสายจะถูกสร้างทีละน้อยจากปลาย5´ไป3´เช่นกัน เรียกว่า lagging strand ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสร้างบนสาย lagging strand นี้จะเป็นช่วงสั้น ๆ เรียกว่า Okazaki fragments ซึ่งจะถูกเชื่อมเข้าด้วยในภายหลังด้วยเอนไซม์ DNA ligase

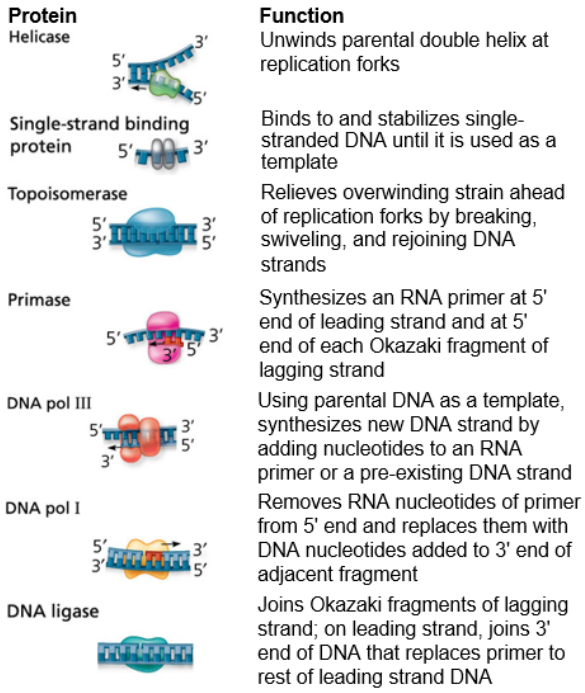



การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บนlagging strand

## สรุปกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ **DNA replication**

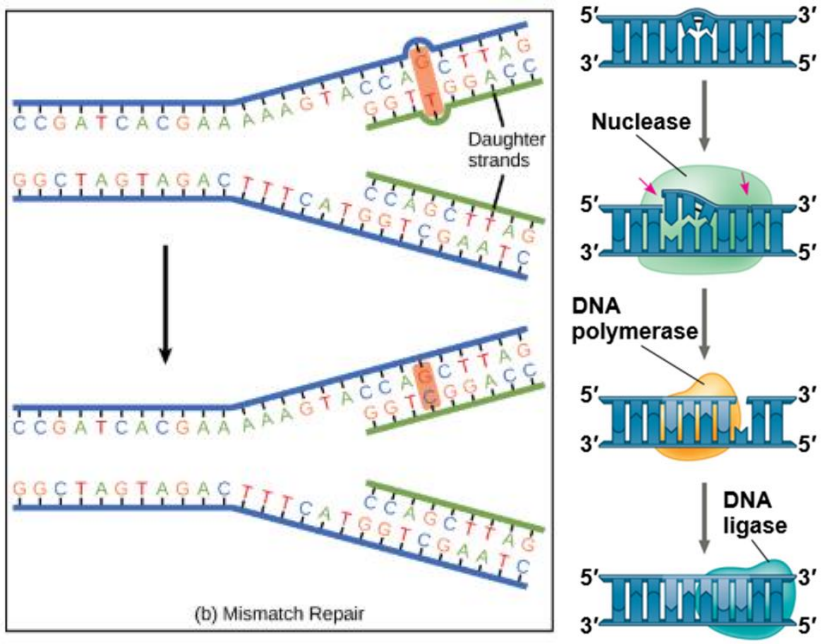



การจำลองดีเอ็นเอ




เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ

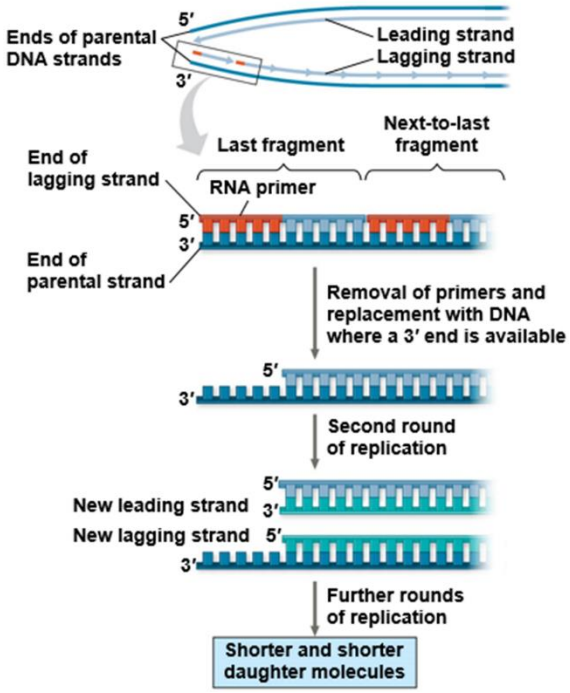
ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างใหม่จะถูกตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยเอนไซม์DNA polymerase เปลี่ยนเบสที่ไม่ถูกต้องออกแล้วเอาเบสที่ถูกต้องใส่เข้าไป ดีเอ็นเอสามารถถูกทำลายด้วยสารเคมีหรือทางกายภาพเช่นรังสีเอ็กซ์หรือควันบุหรี่ การเปลี่ยนแปลงสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว นิวคลีโอไทด์สามารถถูกตัดออกเพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ด้วยเอนไซม์ nuclease




การตัดนิวคลีโอไทด์ออกแล้วแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ใหม่

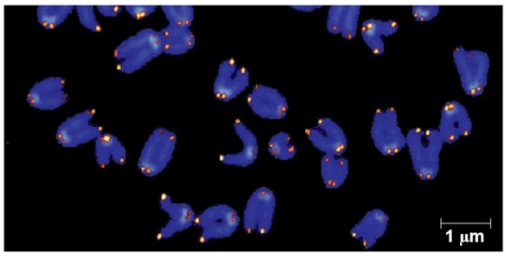
อัตราความผิดพลาดหลังจากการถูกตรวจสอบ (proofreading) ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase นั้นมีค่าต่ำมากแต่ไม่ได้แปลว่าจะไม่ความผิดพลาดเลย ลำดับเบส (sequence) ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอาจอยู่ถาวรและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ การเปลี่ยนแปลง (mutations) นี้เป็นสาเหตุของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) ใช้ซึ่งอาจทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ขึ้นได้

การจำลองดีเอ็นเอจาก5´ไป3´นั้นทำให้ไม่มีทางที่จะมีการจำลองปลาย5´ได้ครบถ้วน ทำให้ปลาย5´นี่สั้นลงทุกครั้งที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ปัญหานี้เกิดขึ้นใน eukayotes แต่ไม่ใช่ใน prokaryotes เพราะในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้มีโครโมโซมเป็นวงกลม




การสั้นลงของปลาย5´

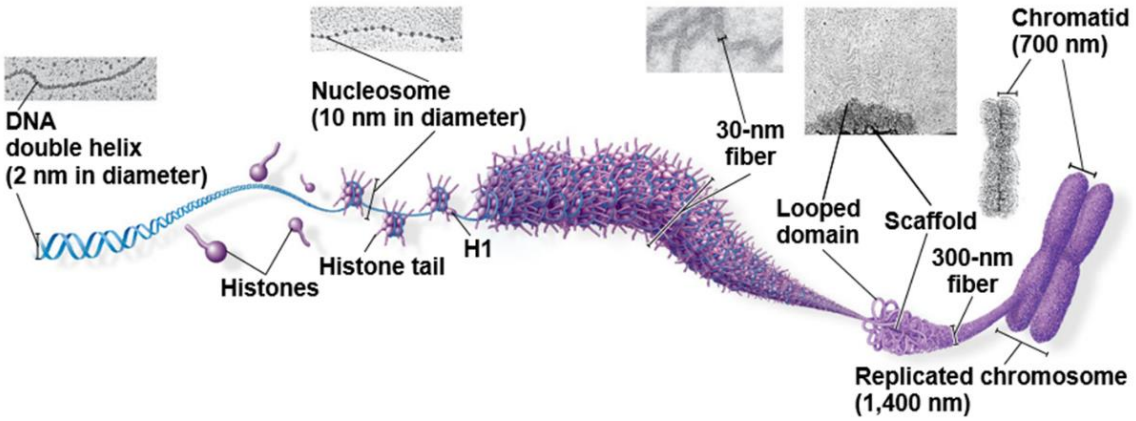
ในโครโมโซมของ eukaryotesจะมีส่วนปลายที่เรียกว่า telomeres ปลายtelomeresนี้ไม่ได้ช่วยป้องกันการสั้นของดีเอ็นเอแต่ช่วยให้ยีนที่อยู่ยนดีเอ็นเอโดยเฉพาะยีนที่อยู่ใกล้ๆปลายไม่ถูกตัดสั้นลงเร็วกว่าที่ควร การสั้นลงของปลาย telomeresนี้ มีความสัมพันธ์กับอายุ เอนไซม์telomeraseช่วยในการสร้างปลายtelomeresในเซลล์สืบพันธุ์

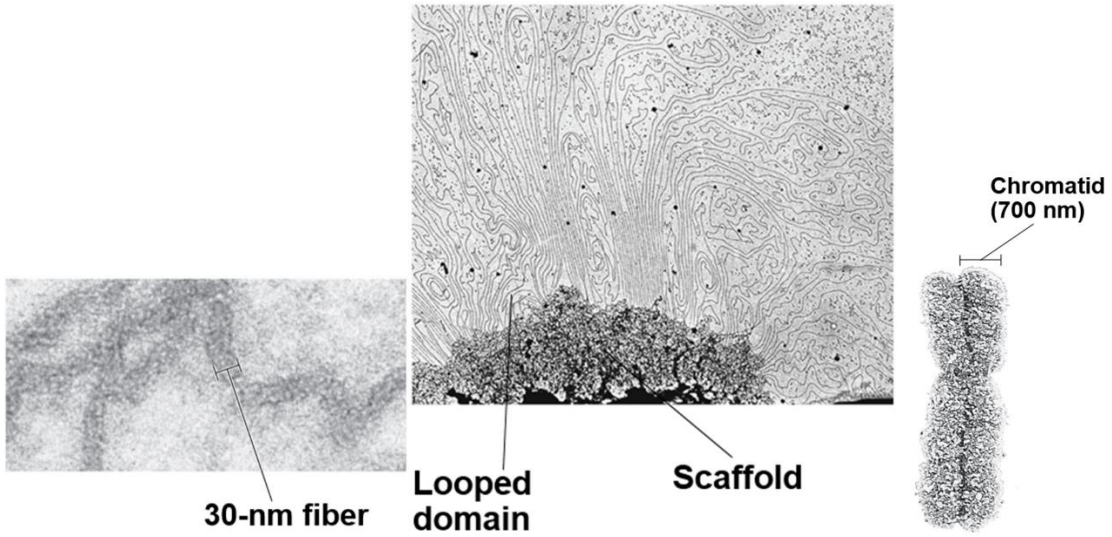



โครโมโซมและtelomeres (สีแดง)

โครโมโซมแบคทีเรียเป็นแบบเกลียวคู่ รูปร่างเป็นวงมีโปรตีนเกาะอยู่บ้าง ในแบคทีเรียดีเอ็นเอเป็นแบบ supercoiled และพบได้ในบริเวณของเซลล์ที่เรียกว่านิวคลีออยด์

โครโมโซมยูคาริโอตมีโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้น มีโปรตีนเกาะจำนวนมาก ในเซลล์ยูคาริโอตดีเอ็นเอจะรวมเข้ากับโปรตีนรวมเรียกว่าโครมาติน โปรตีนที่เรียกว่าฮิสโตนมีหน้าที่แรกในการบรรจุในโครมาติน โครมาตินเมื่อกางออกคล้ายดูคล้ายสายลูกปัด (beads on a string) แต่ละ“ลูกปัด” จะเป็น nucleosome nucleosome เป้นหน่วยพื้นฐานของการบรรจุดีเอ็นเอ แต่ละnucleosomeประกอบด้วยโปรตีนฮิสโตนสี่ชนิด ชนิดละสองโมเลกุลทำให้ในหนึ่งnucleosomeมีฮิสโตนทั้งสิ้นแปดโมเลกุล ปลายหางของโปรตีนฮิสโตนจะยื่นออกมาจาก nucleosome ที่ปลายหางของฮิสโตนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของยีน




การบรรจุโครมาตินใน eukaryotes

**โครโมโซมประกอบด้วยโมเลกุลของดีเอ็นเอที่อัดไปด้วยโปรตีน**

โครมาตินมีการเปลี่ยนแปลงไปตามวัฏจักรของเซลล์ ในการแบ่งเซลล์ระยะinterphaseเส้นใยโครมาตินจะมีขนาดราว ๆ 10นาโนเมตร และบางส่วนมีขนาดราว ๆ 30นาดนเมตรโดยการม้วนขดกันของเส้นใยโครมาติน ส่วนของโครมาตินที่มีการอัดกันอย่างหลวมๆเรียกว่าeuchromatin โครมาตินในช่วงinterphase (centromeres และ telomeres) บางส่วนจะอัดกันแน่นเรียกว่าheterochromatin heterochromatinที่อีดกันอย่างหนาแน่นทำให้เซลล์แสดงข้อมูลทางพันธุกรรมที่อยู่ในบริเวณเหล่านี้ได้ยาก

Concepts of Biology on OpenStax. https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/9-introduction

Discovery of DNA on Khan academy. https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/classic-experiments-dna-as-the-genetic-material

ตัวอย่างมากมายของเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ขึ้นอยู่กับความสามารถในการวิเคราะห์จัดการและตัดวางชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ แนวทางในการจัดลำดับและการจัดการดีเอ็นเอบางครั้งเรียกว่าเทคโนโลยีดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีดีเอ็นเอมีความสำคัญต่อชีววิทยาทั้งพื้นฐานและเชิงประยุกต์ (เชิงปฏิบัติ) เช่นเทคนิคที่ใช้ในการสร้างสำเนาของลำดับดีเอ็นเอจำนวนมากที่เรียกว่า polymerase chain reaction (PCR) ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์และการใช้งานทางนิติเวชรวมถึงการวิจัยในห้องปฏิบัติการขั้นพื้นฐาน

**Polymerase chain reaction (PCR)**

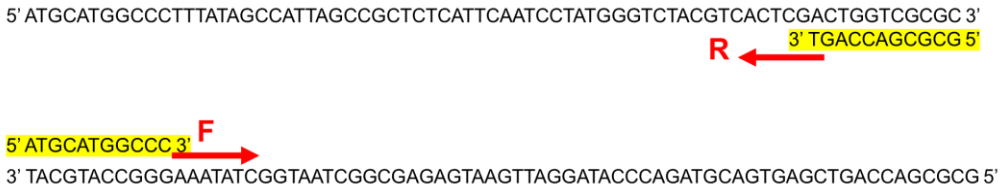
Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจำนวนมากของบริเวณเฉพาะของดีเอ็นเอ บริเวณดีเอ็นเอนี้อาจ**เป็นอะไรก็ได้**ที่ผู้ทดลองสนใจ เช่น**อาจเป็นยีนหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรม**ที่นักนิติวิทยาศาสตร์ใช้เพื่อจับคู่ดีเอ็นเอที่เกิดเหตุกับผู้ต้องสงสัย โดยปกติเป้าหมายของ PCR คือการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายให้เพียงพอที่จะวิเคราะห์หรือใช้ในทางอื่นได้ ตัวอย่างเช่น DNA ที่ถูกเพิ่มโดย PCR อาจถูกส่งไปเพื่อ gel electrophoresis หรือโคลนลงในพลาสมิด

*Taq* polymerase

เช่นเดียวกับการจำลอง DNA ในสิ่งมีชีวิต, PCR ต้องการเอนไซม์ DNA polymerase ที่สร้าง DNA สายใหม่โดยใช้เส้นที่มีอยู่เป็นแม่แบบ โดยทั่วไปแล้ว DNA polymerase ที่ใช้ใน PCR เรียกว่า *Taq* polymerase ได้มาจากแบคทีเรียที่ทนความร้อนซึ่งถูกแยกออกมา (***Thermus aquaticus***) ที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนและช่องระบายความร้อนใต้พิภพ DNA polymerase ของมันมีความเสถียรต่อความร้อนสูงและทำงานได้ดีที่ประมาณ 70 °C เสถียรภาพความร้อนนี้ทำให้ *Taq* polymerase เหมาะสำหรับ PCR อย่างที่เราจะเห็นกันว่าอุณหภูมิสูงจะถูกใช้ซ้ำ ๆ ใน PCR เพื่อทำให้ดีเอ็นเอของแม่แบบแยกเส้นออก

PCR primers

เช่นเดียวกับ DNA polymerases อื่น ๆ *Taq* polymerase สามารถสร้าง DNA ได้ก็ต่อเมื่อได้รับไพรเมอร์ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ ที่เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ใน PCR ผู้วิจัยจะกำหนดบริเวณของดีเอ็นเอที่จะถูกเพิ่มจำนวนโดยไพรเมอร์ที่เลือก PCR primers เป็นดีเอ็นเอสั้น ๆ โดยปกติจะมีความยาวประมาณปี 20 นิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์สองตัวถูกใช้ในปฏิกิริยา PCR แต่ละครั้งและได้รับการออกแบบมาเพื่อให้ขนาบข้างบริเวณเป้าหมาย




ตำแหน่งที่ forward (F) และ reverse (R) PCR primers จับกับสายดีเอ็นเอ

ขั้นตอนของ PCR

ส่วนประกอบสำคัญของ PCR ได้แก่ *Taq* polymerase, primers, DNA และนิวคลีโอไทด์ ส่วนผสมจะรวมตัวกันโดยเอนไซม์และถูกนำไปผ่านความร้อนและความเย็นซ้ำ ๆ ซึ่งทำให้ DNA สามารถสังเคราะห์ได้ ขั้นตอนพื้นฐานมีดังนี้

- Denaturation (ประมาณ 96 °C): ให้ความร้อนแก่ปฏิกิริยาเพื่อแยกสายดีเอ็นเอ
- Annealing (ประมาณ 55 - 65 °C): ทำให้ปฏิกิริยาเย็นลงเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับคู่กับลำดับเบสบนดีเอ็นเอ
- Extension (72 °C): เพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาเพื่อให้ *Taq* polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

ทั้งสามขั้นตอนนี้จะทำซ้ำ 30 - 40 ครั้งในปฏิกิริยา PCR ทั่วไปซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลา 1 - 3 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวน ไม่ใช่แค่ดีเอ็นเอเส้นเดิมที่ใช้เป็นต้นแบบในแต่ละครั้ง แต่ดีเอ็นเอใหม่ที่สร้างขึ้นในรอบหนึ่งสามารถใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบถัดไปได้ ดังนั้นจำนวนโมเลกุลของ DNA จึงสามารถเพิ่มเป็นสองเท่าในแต่ละรอบ

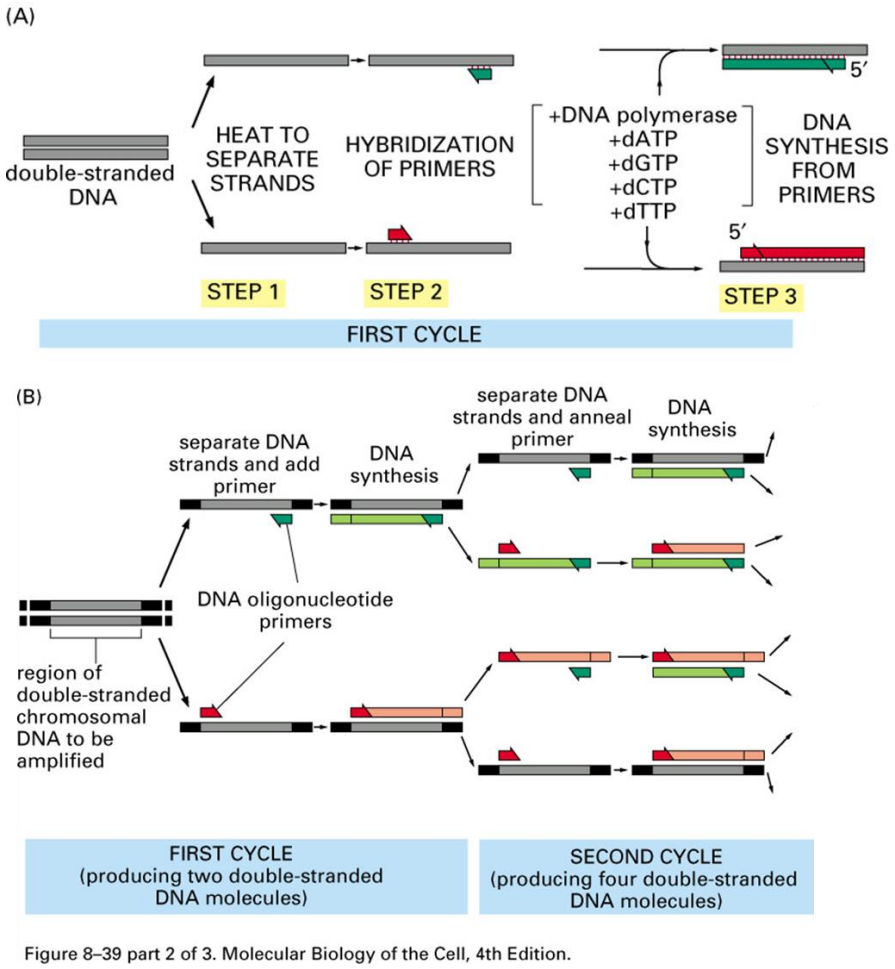
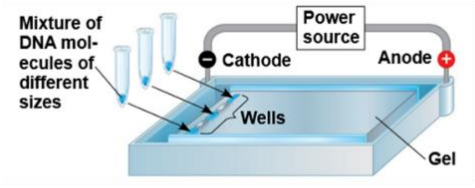



Figure 8–39 part 2 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในกระบวนการ PCR (Alberts, Johnson and Lewis 2015)

**ใช้ gel electrophoresis เพื่อให้เห็นผลลัพธ์ของ PCR**

ผลของ PCR มักจะมองเห็นได้โดยใช้ gel electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคที่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านเมทริกซ์เจลด้วยกระแสไฟฟ้าและแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาด โดยทั่วไปจะมี DNA ladder/marker เพื่อให้รู้ขนาดของชิ้นส่วนใน PCR ได้ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันจะรวมกันเป็น "แถบ"




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.

Gel electrophoresis (a) และเจลที่นำไปส่องด้วยแสง UV (b) (Campbell *et al.* 2020)

โมเลกุลของดีเอ็นเอทั้งหมดมีจำนวนประจุต่อมวลเท่ากัน ด้วยเหตุนี้เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจึงแยกชิ้นส่วนเหล่านี้ตามขนาดเท่านั้น การใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสเราสามารถดูได้ว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่ในตัวอย่างจำนวนเท่าใดและมีขนาดใหญ่เพียงใดเมื่อเทียบกัน

เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเกี่ยวข้องกับเจลซึ่งเป็นแผ่นวัสดุที่มีลักษณะคล้ายเจล เจลสำหรับการแยกดีเอ็นเอมักทำจากโพลีแซ็กคาไรด์ที่เรียกว่าอะกาโรส (agarose) ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดผงแห้ง เมื่ออะกาโรสถูกให้ความร้อนในบัฟเฟอร์และปล่อยให้เย็นมันจะจับตัวเป็นเจลแข็งและนุ่มเล็กน้อย ในระดับโมเลกุลเจลเป็นเมทริกซ์ของโมเลกุลอะกาโรสที่จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและสร้างรูพรุนเล็ก ๆ ที่ปลายด้านหนึ่งเจลจะมีรอยเว้าเหมือนกระเป๋าที่เรียกว่าหลุมซึ่งเป็นที่ที่จะวางตัวอย่างดีเอ็นเอ เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าผ่านเจลโมเลกุลของดีเอ็นเอมีประจุลบเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตจึงเริ่มเคลื่อนที่ผ่านเมทริกซ์ของเจลไปยังขั้วบวก ดีเอ็นเอที่สั้นกว่าจะเดินทางผ่านรูเจลเมทริกซ์ได้เร็วกว่าชิ้นส่วนที่ยาวกว่า ดีเอ็นเอที่สั้นที่สุดจะอยู่ใกล้กับปลายด้านบวกของเจลในขณะที่ดีเอ็นเอที่ยาวที่สุดจะยังคงอยู่ใกล้กับหลุม เมื่อแยกชิ้นส่วนออกแล้วเราสามารถตรวจสอบเจลและดูขนาดของแถบที่พบ เมื่อเจลถูกย้อมด้วยสีย้อมที่จับกับดีเอ็นเอและวางไว้ภายใต้แสงยูวีชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเรืองแสงทำให้เราเห็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ตามความยาวของเจล

## DNA sequencing

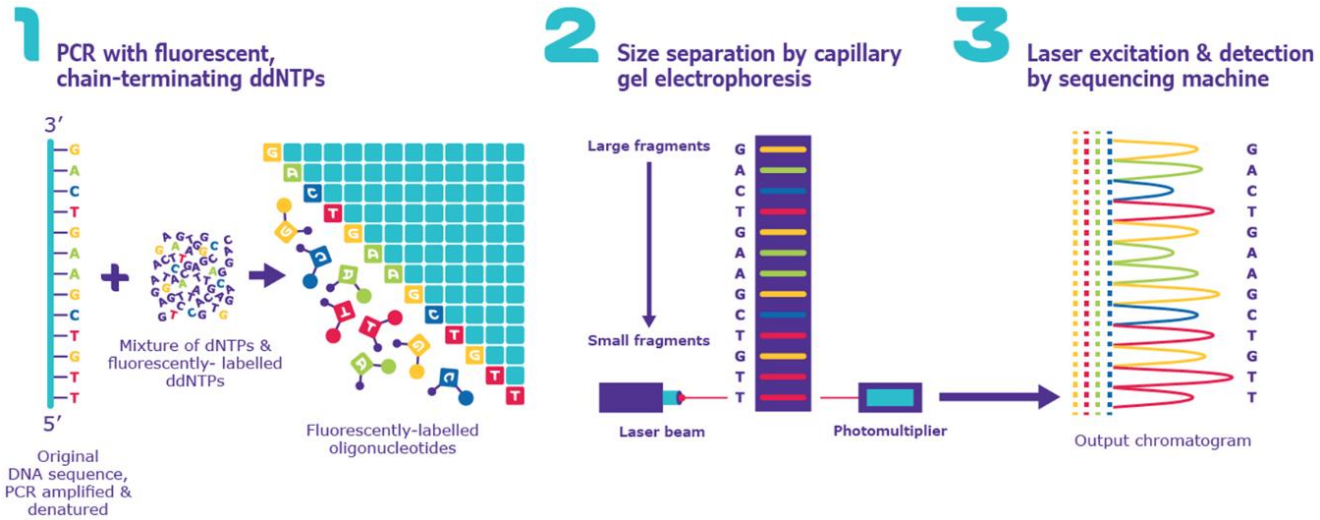
การจัดลำดับดีเอ็นเอเป็นกระบวนการกำหนดลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ (A T C และ G) ในชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ การจัดลำดับจีโนมทั้งหมด (ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด) ยังคงเป็นงานที่ซับซ้อน มันต้องการการทำลายดีเอ็นเอของจีโนมออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวนมากจัดลำดับชิ้นส่วนและประกอบลำดับเป็น "consensus sequences" ที่มีความยาวเพียงครั้งเดียว อย่างไรก็ตามด้วยวิธีการใหม่ ๆ ที่ได้รับการพัฒนาในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาการจัดลำดับจีโนมจึงเร็วกว่ามากและราคาไม่แพงกว่าในโครงการจีโนมมนุษย์ วิธีการหนึ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างดีนั่นคือ Sanger sequencing

เราสามารถใช้ Sanger sequencing (chain termination method หรือ dideoxy method) เพื่อหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่เกิน 900 – 1000 คู่เบสได้ ซึ่ง Sanger sequencing ได้รับการพัฒนาโดย Frederick Sanger นักชีวเคมีชาวอังกฤษและเพื่อนร่วมงานของเขาในปี 1977 เทคนิคนี้ถูกใช้ในโครงการจีโนมมนุษย์ (human genome project) ที่สำเร็จเมื่อปี 2003 แม้ว่าในปัจจุบันมีเทคนิคการหาลำดับเบสใหม่ ๆ ที่เรียกว่า next generation sequencing แต่ Sanger sequencing ยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดสั้น ๆ หรือที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอหรือสร้างขึ้นโดย PCR

Sanger sequencing สร้างดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวนมาก มีส่วนผสมคล้ายกับที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน PCR ได้แก่ เอนไซม์ DNA polymerase DNA primers dNTPs และดีเอ็นเอต้นแบบ อย่างไรก็ตาม Sanger sequencing ยังมีส่วนผสมที่เป็นเอกลักษณ์ คือ dideoxy หรือ chain-terminating ของ dNTPs ที่เรียกว่า ddNTPs (ddATP ddTTP ddCTP และ ddGTP) โดยแต่ละเบสมีสีที่แตกต่างกัน

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะใช้หาลำดับเบสจะรวมกันในหลอดที่มี DNA primers, DNA polymerase, dNTPs และมีการเติม ddNTPs ด้วยแต่ในปริมาณที่น้อยกว่า dNTPs มาก ปฏิกิริยาดำเนินไปเช่นเดียวกับใน PCR โดย DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้โดยเริ่มจากไพรเมอร์ DNA polymerase จะยังคงเพิ่มนิวคลีโอไทด์ให้กับสายดีเอ็นเอจนกว่าจะเพิ่ม dideoxy nucleotide ddNTPs เมื่อถึงจุดนั้นจะไม่สามารถเพิ่มนิวคลีโอไทด์ได้อีก ดังนั้นดีเอ็นเอสายที่สร้างขึ้นจะสิ้นสุดลงด้วย dideoxy nucleotide กระบวนการนี้ทำซ้ำหลายรอบ เมื่อเสร็จสมบูรณ์จะรับประกันได้ว่า ddNTPs จะถูกรวมเข้ากับทุกตำแหน่งของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาอย่างน้อยหนึ่งปฏิกิริยา นั่นคือดีเอ็นเอที่สร้างใหม่แต่ละสายมีความยาวต่างกันไป ส่วนปลายของแต่ละเส้นจะเป็น ddNTP ที่ติดฉลากด้วยสีย้อม

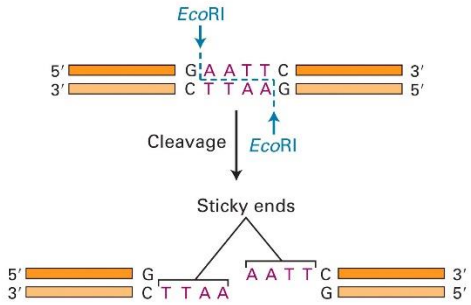
หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จแล้วดีเอ็นเอจะถูกวิ่งผ่าน capillary ที่มีเมทริกซ์เจลในกระบวนการที่เรียกว่า capillary gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนผ่านรูของเจลอย่างรวดเร็วในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่า เมื่อดีเอ็นเอแต่ละชิ้นผ่านจุดตรวจจับสีที่ปลายท่อก็จะส่องแสงทำให้ตรวจจับสีย้อมที่ติดอยู่ได้



Sanger sequencing (จาก https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html)

**การตัด DNA ด้วย restriction enzymes**

Restriction enzymes (เอนไซม์ตัดจำเพาะ) ตัดเกลียวคู่ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่ลำดับ 4-8 bp ที่เป็น palindrome จุดที่เกิดการตัด เรียกว่า restriction site โดย restriction enzymes หลายชนิดตัดสายดีเอ็นเอแล้วทำให้เกิดปลายที่สายหนึ่งยื่นออกมา เรียกว่า sticky ends (ปลายเหนียว) ปลายของดีเอ็นเอที่เป็น sticky ends นี้สามารถนำไปโคลนเข้าพลาสมิดเพื่อสร้างเป็น recombinant plasmid ได้ทันที

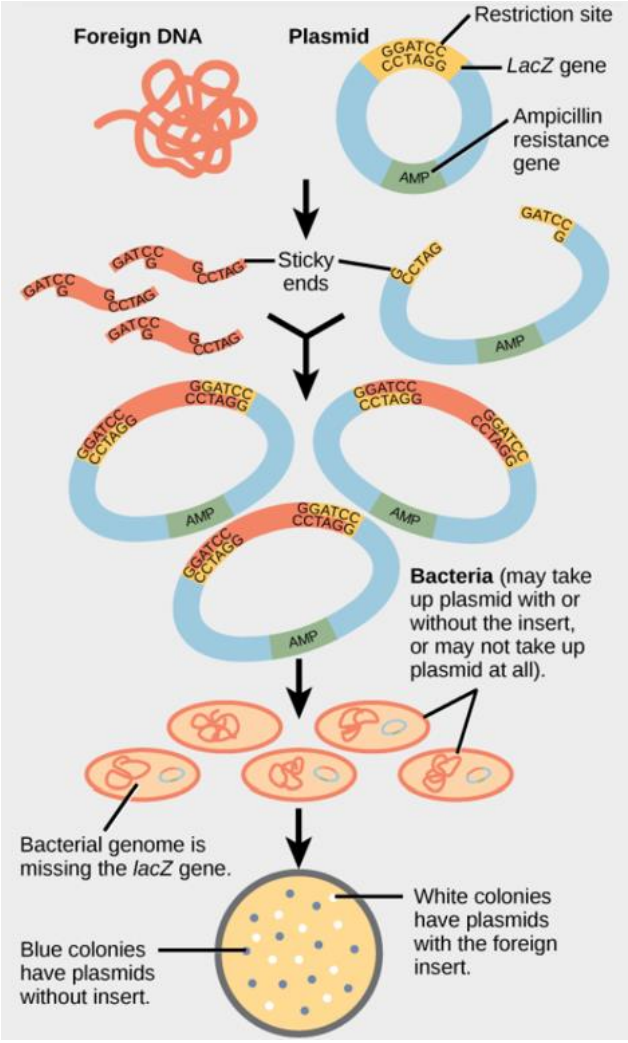



ลำดับเบสที่เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดได้ ผลจากการตัดได้ดีเอ็นเอที่เป็น sticky ends (Campbell *et al.* 2020)

**DNA cloning**

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กช่วยให้นักวิจัยสามารถจัดการและศึกษายีนที่เฉพาะเจาะจง พลาสมิด (plasmid) หรือเวกเตอร์ (vector) คือโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นวงขนาดเล็กที่สามารถเพิ่มจำนวนเองได้ ในการโคลนนิงนักวิทยาศาสตร์สามารถใช้โมเลกุลของพลาสมิดเพื่อใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยปกติแล้วพลาสมิดจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน

พลาสมิดเกิดขึ้นตามธรรมชาติในแบคทีเรียและมียีนที่ดีต่อสิ่งมีชีวิตเช่นการดื้อยาปฏิชีวนะ นักวิทยาศาสตร์ได้ดัดแปลงและออกแบบพลาสมิดเป็นเวกเตอร์สำหรับการโคลนโมเลกุลและการผลิตสารที่สำคัญในปริมาณมากเช่นอินซูลินและฮอร์โมนการเจริญเติบโตของมนุษย์ คุณสมบัติที่สำคัญของเวกเตอร์พลาสมิดคือความสะดวกในการที่นักวิทยาศาสตร์สามารถนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอแปลกปลอมเข้าสู่บริเวณ multiple cloning site (MCS) ซึ่ง MCS เป็นลำดับดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่มีสามารถถูกตัดได้ด้วย restriction enzymes หลายชนิดแล้วส่วนมากจะเกิดเป็นปลาย sticky ends ส่วนที่ยื่นออกมาเหล่านี้สามารถต่อเข้ากับปลายของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนได้ด้วยการใช้เอนไซม์ DNA ligase




ขั้นตอนการโคลนยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (OpenStax, Rice University)

**Intro to biotechnology** https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/intro-to-biotech-tutorial/a/intro-to-biotechnology

**Biotechnology** https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/10-introduction