

เทคโนโลยีดีเอ็นเอทางการแพทย์ DNA Technology in Medicine

การประชุมเชิงปฏิบัติ
ประจำปี 2541



จัดโดย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
สาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

สวทช.

สก.6

0060

2541

ฉ.1



7-28 เมษายน พ.ศ. 2541

ศิริศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

เทคโนโลยีดีเอ็นเอทางการแพทย์

DNA Technology in Medicine

การประชุมเชิงปฏิบัติ

ประจำปี 2541

จัดโดย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
สาขาชีวเคมี สหประชาชาติแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

วันที่ 27 – 28 เมษายน พ.ศ. 2541

อาคารสรีรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

ส.ก. ๖
0060
2541
ฉ. ๑

สงวนลิขสิทธิ์

ลิขสิทธิ์ของสาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

บรรณาธิการ

เจริญศรี มั่งกรกาญจน์ ภ.บ. วท.ม.

รัชนิกร กัลล์ประวิทย์ Ph.D.

พัชรีย์ วิชยานุวัติ พ.บ. Ph.D.



แบบปก

เจริญศรี มั่งกรกาญจน์

พิมพ์ที่ P.P. Center

77/11-12 ถนนพรานนก แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

เมษายน พ.ศ. 2541

ISBN 974-589-587-3

สารบัญ

หน้า

สารจากประธานคณะกรรมการจัดการประชุม

ผศ. ดร. รัชนีกร กัลล์ประวิทย์

I

สารจากประธานสาขาชีวเคมี ฯ

รศ. ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ

III

โครงการศึกษาจีโนมของมนุษย์

รศ. ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์

1

ดีเอ็นเอในทัศนะของผู้ใช้ประโยชน์

รศ. ดร. ภิญโญ พานิชพันธ์

11

ความรู้พื้นฐานของเทคโนโลยีดีเอ็นเอ

ผศ. ดร. คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร

15

ผศ. ดร. เนตรนภิส ชีระวัลย์ชัย

29

เทคโนโลยีดีเอ็นเอทางการแพทย์

ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชยานุวัติ

39

การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม และโคลนนิ่งในสิ่งมีชีวิต

ดร. จรรยาภรณ์ ฟูเจริญ

47

ปฏิบัติการ

ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชยานุวัติ

61

ภาคผนวก

72

รายนามวิทยากร

91

รายนามคณะกรรมการบริหารสาขาชีวเคมี ฯ

93

รายนามที่ปรึกษาคณะกรรมการบริหารสาขาชีวเคมี ฯ

97

รายนามคณะกรรมการจัดการประชุม

99

รายนามผู้สนับสนุนการประชุม

101

กำหนดการประชุม

103

สารจากประธานคณะกรรมการจัดการประชุม

ในปัจจุบันความรู้ทางอณูชีววิทยาได้ก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว และมีการนำเอาเทคนิคต่าง ๆ ในการศึกษาดีเอ็นเอ มาใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ การเกษตรกรรมและการอุตสาหกรรมค่อนข้างมาก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และสาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ จึงได้ตกลงจัดการประชุมเชิงปฏิบัติ เรื่อง เทคโนโลยีดีเอ็นเอทางการแพทย์ ขึ้น ในวันที่ 27-28 เมษายน 2541 นี้ โดยได้รวบรวมความรู้พื้นฐาน และความก้าวหน้าของเทคโนโลยีดีเอ็นเอ ที่ใช้ในทางการแพทย์ มานำเสนอในรูปแบบของการบรรยายและภาคปฏิบัติการพร้อมทั้งสาธิตเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดีเอ็นเอ

ในการประชุมครั้งนี้ คณะกรรมการจัดการประชุม ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และบริษัทต่าง ๆ ที่สนับสนุนการประชุม และขอขอบคุณท่านวิทยากร และผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่านที่ทำให้การประชุมครั้งนี้สำเร็จด้วยดี และหวังว่าความรู้ที่ท่านได้รับจากการประชุมครั้งนี้ คงจะนำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

วิมล กัลป์ประวิทย์

ผศ.ดร. รัชนิกร กัลป์ประวิทย์

ประธานคณะกรรมการจัดการประชุม

สารจากประธานสาขาชีวเคมี
สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
ในพระบรมราชูปถัมภ์

การจัดประชุมเชิงปฏิบัติการภาคฤดูร้อน เป็นกิจกรรมทางวิชาการอย่างหนึ่งที่สาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยฯ ได้เป็นเจ้าภาพร่วมกับสถาบันต่างๆ จัดประชุมทุกปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2518 เป็นต้นมา โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะเผยแพร่ความรู้ทางชีวเคมีแก่สมาชิก ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ ครู อาจารย์ และผู้สนใจทั่วไป

ปีนี้ เป็นปีที่ประเทศไทยประสบภัยทางเศรษฐกิจ เข้าสู่ยุค IMF ทุกคนและทุกหน่วยงาน ต้องประหยัดการใช้จ่ายทุกด้าน สาขาชีวเคมี จึงได้พิจารณาร่วมกับภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จัดประชุมเชิงปฏิบัติการ ครั้งที่ 23 ระหว่างวันที่ 27-28 เมษายน 2541 ให้สอดคล้องกับภาวะเศรษฐกิจ โดยไม่เก็บเงินค่าลงทะเบียนการเข้าประชุม เพื่อให้สมาชิกและผู้สนใจได้มีโอกาสเข้าร่วมประชุมได้มากที่สุด

หัวข้อการประชุมในปีนี้เป็น “เทคโนโลยีดีเอ็นเอ ทางการแพทย์” มี ผศ.ดร.รัชนิกร กัลลภ์ประวิทย์ เป็นประธานจัดการประชุม มีแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และผู้ทรงคุณวุฒิที่มีความรู้และประสบการณ์สูง มาเป็นวิทยากรหลายท่าน เทคโนโลยีดีเอ็นเอ เป็นสิ่งที่มีประโยชน์หลายด้าน เช่น ช่วยในการวิเคราะห์หาสมมุติฐานของโรคเพื่อการบำบัดรักษา หรือใช้ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ต้องสงสัย ในกรณีที่ต้องการหาหลักฐานข้อมูลประกอบการพิจารณาคดี หวังว่า การประชุมครั้งนี้ คงจะเป็นประโยชน์ต่อสมาชิกและผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่าน

ในโอกาสนี้ สาขาชีวเคมี ใคร่ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะกรรมการทุกท่าน ที่ได้มีส่วนร่วมในการจัดประชุมครั้งนี้ ขอขอบคุณวิทยากรและผู้เข้าร่วมประชุมที่ได้มีส่วนให้การประชุมบรรลุวัตถุประสงค์ด้วยดี และท้ายนี้ ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ บริษัท อินเทอร์เน็ตประเทศไทย จำกัด และบริษัท ห้างฯ ร้าน อื่นๆ ที่ได้ให้การสนับสนุนการจัดประชุมครั้งนี้



รองศาสตราจารย์ ดร. ชารัตน์ สุกศิริ

ประธานสาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยฯ

HUMAN GENOME PROJECT

Prapon Wilairat
Department of Biochemistry
Faculty of Science, Mahidol University
Rama 6 Road, Bangkok 10400

The Human Genome Project is an ambitious but achievable goal of sequencing the entire human genome, which consists of 3,000 million base pairs. This was initiated in 1991, and is planned to be completed in 2005, covering a period of 15 years. In the process genetic and physical maps of all 24 chromosomes (22 autosomal, X and Y chromosome) will be constructed as well as the acquisition of DNA sequences for actively expressed genes.

This lecture will briefly review the progress made to date and also indicate the methodologies employed in fulfilling the objectives indicated above.

Historical background

A workshop was held in Alta, Utah, USA, in December 1984 to discuss the status of detection of human gene mutations and to consider what future technologies would be required to speed up the process. It was realized that, although individual laboratories were identifying, cloning and sequencing human genes, this was wasteful of scientists' time and money, and the current rate of progress was unlikely to achieve the goal of the complete understanding of the genetic basis of human disease. As one of the sponsor of the workshop, the US Department of Energy (DOE) initiated the idea of a coordinated effort to order and sequence human DNA clones representing the entire human genome and issued a Report of the Human Genome Initiative in 1987 which contained three major objectives: generation of detailed physical maps of the human chromosomes; development of support technologies and facilities in human genome research; and establishment of a communication network with computational and database capabilities. As other US agencies began to sponsor similar research activities, the US National Institutes of Health (NIH) established a National Center for Human Genome Research to coordinate among the various groups involved in human genome studies. The US Congress has approved funding amounting to some \$ 3,000 million for the 15-year US project.

International nature of the Human Genome Project

In the US, the major sites of genome research activities are at the NIH National Center for Human Genome Research and at DOE-supported Lawrence Berkeley National Laboratory, Los Angeles National Laboratory and Lawrence Livermore National Laboratory. Outside the USA national genome projects have been initiated in Europe (Denmark, France, Germany, Italy, the Netherlands, the UK, and the USSR (CIS), as well as a transnational program sponsored by the European Union), and in Australia, Canada, Japan, Korea and New Zealand. The Human Genome Organization (HUGO) was established in 1988 to coordinate these different efforts as well as to promote exchange of information and techniques and to inform the public concerning issues and implications of the human genome project. In addition to government laboratories, a number of private companies have been established to obtain information of human genes and other DNA sequences for commercial exploitation.

Basic strategy

In its simplest term, the human genome project involves generating and sequencing cloned DNA molecules, and ordering them along the 24 chromosomes. This strategy is shown schematically in Figure 1. A fragment of DNA (average size of 400 kb) is first cloned into a yeast artificial chromosome (YAC, constructed from the telomeric, centromeric and replication origin sequences allowing for replication in yeast cells). A smaller fragment (40 kb) is then cloned into a cosmid (plasmid vector containing *cos* gene of phage lambda allowing it to be packaged into phage particles for infection in *E. coli* in which it replicates as a plasmid). Finally fragments of 5 kb can be cloned into plasmids for sequencing. Once the sequences of these DNA fragments have been determined, the order of these pieces along the chromosome is constructed by aligning overlapping sequences.

Genome maps

Although the ultimate goal of the Human Genome Project is to sequence all the chromosomes, two important intermediate objectives are the construction of a high-resolution genetic linkage map and the production of a variety of physical maps that will enable the DNA accessible for further investigation.

The value of a genetic map is that it allows the inheritance of a genetic disease to be detected in affected individuals by following the presence of a DNA marker, although the responsible gene or molecular basis of the

disease has not been identified. The first comprehensive human genetic map was obtained in 1987 based on the use of 403 polymorphic loci, including 393 restriction fragment length polymorphic (RFLP) markers. This provided 23 linkage groups (linear array of linked markers) corresponding to the 22 autosomes and the X chromosome, but the resolution was poor (>10 Mb between the markers). Greater resolution is now available using microsatellite markers (also known short tandem repeat polymorphisms, or STRPs) as they are abundant ($> 10^4$ loci), have many alleles, are dispersed throughout the genome, and can be readily typed by polymerase chain reaction (PCR). A comprehensive genetic map of the human genome using 5,264 microsatellites (short tandem (AC/TG) repeat polymorphisms) was released in 1996. The map spans a genetic distance of 3,699 cM (1 cM is equivalent to 1 Mb), comprising of 2,335 positions of which 2,032 could be ordered. The average distance between the markers is 1.6 cM.

A physical map, on the other hand, gives the locations of identifiable markers on DNA regardless of inheritance. At the lowest resolution for the human genome, this consists of the banding patterns on the 24 different chromosomes. Nevertheless, this allows for identification of the localization of DNA probes on the chromosome. This has been facilitated by the use of fluorescent in situ hybridization (FISH) technique which can distinguish between probes located 100 kb apart. At the next level of resolution is a contig map. A contig is a contiguous region of genomic DNA which has been cloned as a series of identifiable overlapping DNA clones. Figure 2 shows schematically how a clone contig is constructed for a region LM of a chromosome. A genomic DNA library of the region LM is produced by partial digestion with a restriction enzyme. Clones with overlapping sequences are identified and the fragments aligned. This can be achieved either through the technique of chromosome walking (directional process) or by random fingerprinting of all clones in the library. In the former method, a fragment of a DNA clone is used as a probe to identify all other clones containing that sequence. Another fragment from one of the newly identified clone is used as a second "walking" probe. This approach has been useful for finding genes localized in a small region (< 2 Mb), but it is labor intensive and cannot extend over large stretches of DNA. Random fingerprinting to identify clones with overlapping sequences relies on locating sequence-tagged sites (STSs) in the clones. STS is a piece of DNA that is specifically amplified by a pair of primers, i.e. is tagged by the primer set. Clones containing common STSs can be quickly recognized, sequenced and subsequently aligned.

There has been debate from the outset of launching the Human Genome Project whether to attempt to sequence the total genome or concentrate at first just on obtaining the sequences of genes, which constitutes between 3-10% of the genome. The number of human genes has been estimated to range from 50,000-100,000. These coding DNAs can be determined from sequencing cDNA clones from such tissues as brain, heart, liver, lymphocyte, skeletal muscle and testis. By sequencing the 3'-untranslated region (3'UTR) of a cDNA clone, a pair of primers can be constructed to produce an expressed sequence tag (EST) (similar to STS) for this piece of coding DNA. Current EST databases now represent about half of all human genes. As ESTs are nonpolymorphic, they can be used to locate genes from which they are derived on the physical map, thereby producing a comprehensive human gene map. In October 1996, Science Magazine published a human transcript map, based on data from a consortium of laboratories located in Canada, France, Japan, UK and USA. 16,354 genes were mapped relative to a framework map containing about 1000 polymorphic markers. Altogether, 21% of the mapped genes encode protein products that have been identified.

When one considers that in 1994 only 5131 human genes had been mapped, the remarkable progress made since then indicate that the goal set for the compilation of the complete sequence of 3 billion bases in the human genome in 2005 will be met, and possibly even ahead of schedule. However large scale sequencing of the human genome has barely begun (see Table 1). Approximately 60 million base pairs have been determined to date. The longest contiguous stretch of human DNA sequence in a public database is less than 1.5 million base pairs. It has been estimated that seven large-scale sequencing centers, starting in 1998, would need to complete about 75 Mb/year if the goal of 2005 is to be met (current centers are able to sequence from 2 to 30 Mb/year). Completely automated sequencing production lines will have to be established which will keep track of the clones, analyze the data produced and keep records of reagents, protocols and machine performance. The rate limiting step is the reliance on skilled and experienced human "finishers" who examine data, resolve discrepancies between conflicting sequence results, direct any required additional sequencing, and evaluate the precision of a consensus sequence.

Genome centers are required to release their data to the community in a timely manner. Sequences are available from four large data bases: GenBank and GSDB in the US, EMBL in Europe and DDDJ in Japan. Finished sequences are minimally annotated - identification of repeat sequences, similarity analyses, and some indication of the quality of the data.

To be useful to the biological and medical researchers, it has become essential that the biological information in these sequences be more fully reported. Thus there has been a shift in emphasis from “structural genomics”, i.e. the construction of high-resolution genetic, physical and transcript map of an organism, to “functional genomics”. i.e. an understanding of the function of all genes or proteins at once, conducted in a systematic fashion, providing new insights into the behavior of biological systems not available from previous studies involving only single genes or proteins. An example of a functional genomic approach is the recent work of Zhang et al (1997) comparing gene expression of cancer with normal cells, employing a technique called serial analysis of gene expression (SAGE) to identify and quantify 303,706 transcripts derived from gastrointestinal cancers. These transcripts represented about about 49,000 different genes that ranged in expression from 1 copy per cell to as many as 5,300 copies per cell. Although there were many similarities between the expression profiles, more than 500 transcripts were found to be expressed at significantly different levels in normal and neoplastic cells. These data provide insight into the differences in gene expression underlying malignancy, and should reveal genes that may be useful as diagnostic or prognostic markers as well as identifying targets for potential therapeutic intervention.

The complete human genome sequence will be a composite of a few individuals chosen at random. The Human Genome Diversity Project (HGDP) was proposed in 1991 by Luigi Luca Cavalli-Sforza, Stanford University, USA, as an international collaborative effort to collect genetic material from a large number of indigenous peoples of the world for systematic genetic studies. The purpose is to understand human diversity, both normal variation and that responsible for inherited diseases. Nuclear and mitochondrial DNA are to be obtained from isolated populations that were likely to be linguistically and culturally distinct, and surrounded by geographical barriers. Although the original purpose of the project was anthropological, the results of HGDP will have medical implications as the prevalence and distribution of disease genes in the world population will become available. For instance, understanding of the gene or genes responsible for adult-onset diabetes can be obtained from studies of the Pima tribe in Arizona, the Old Order Amish, the ‘Gullah’ Islanders in the American Southeast and some West Africans, all of whom suffer from an unusually high incidence of this disease. Concern has been raised regarding the commercial aspects of HGDP, and whether individuals from whom the genetic information was obtained would derive any benefit from the studies. One solution to this problem is to provide any drugs developed from genetic information free of charge during the life of the patient of the sample population, as has been agreed upon by the company

deCode Genetics, Inc. (Reykjavik, Iceland), This commercial enterprise was established by Kari Stefansson, a Harvard geneticist and native of Iceland, in order to look for useful genes in the native population of Iceland since the the island is geographically isolated, has good records of marriage and medical history, and the population is genetically homogeneous through two bottle necks - a bubonic plague in the 1400s that reduced the population from 70,000 to 25,000, and a vulcano eruption in the 1700s which resulted in widespread famine. The race to find other suitable populations has already begun.

The human genome project has now moved from structural genomics and entered into functional genomics. "Evolutionary genomics" is on the horizon.

Further Reading

Books

Tom Strachan and Andrew P. Read , "Human Molecular Genetics", BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 1996.

United States Department of Energy, "Human Genome 1991-92 Program Report", Office of Health and Environmental Research, Washington, D.C., 1992.

Articles

Dib C et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380: 152-154.

Schuler GD et al. A gene map of the human genome. *Science* 1996; 274: 540-546.

Science 1997; 278: October 24. Genome issue: building gene families.

Shang L et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276: 1268-72.

Wallace BW. The Human Genome Diversity Project: medical benefits versus ethical concerns. *Molecular Medicine Today* 1998; 4: 59-62.

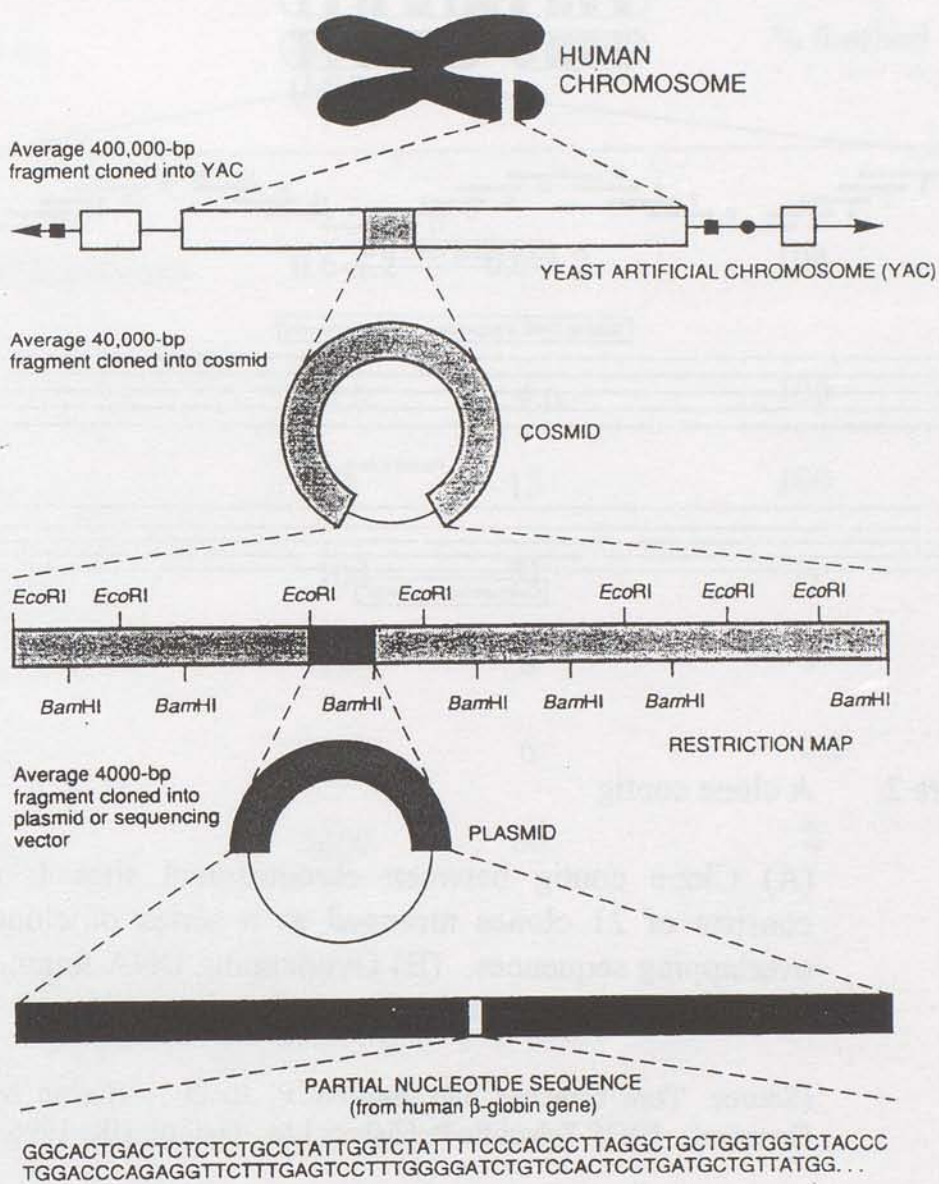


Figure 1. Construction of human DNA clones for sequencing

Cloned DNA sequences must be made progressively smaller in order to be sequenced. The results are then compiled to produce longer stretches.

(Source: United States Department of Energy, "Human Genome 1991-92 Program Report", Office of Health and Environmental Research, Washington, D.C., 1992, p. 207.)

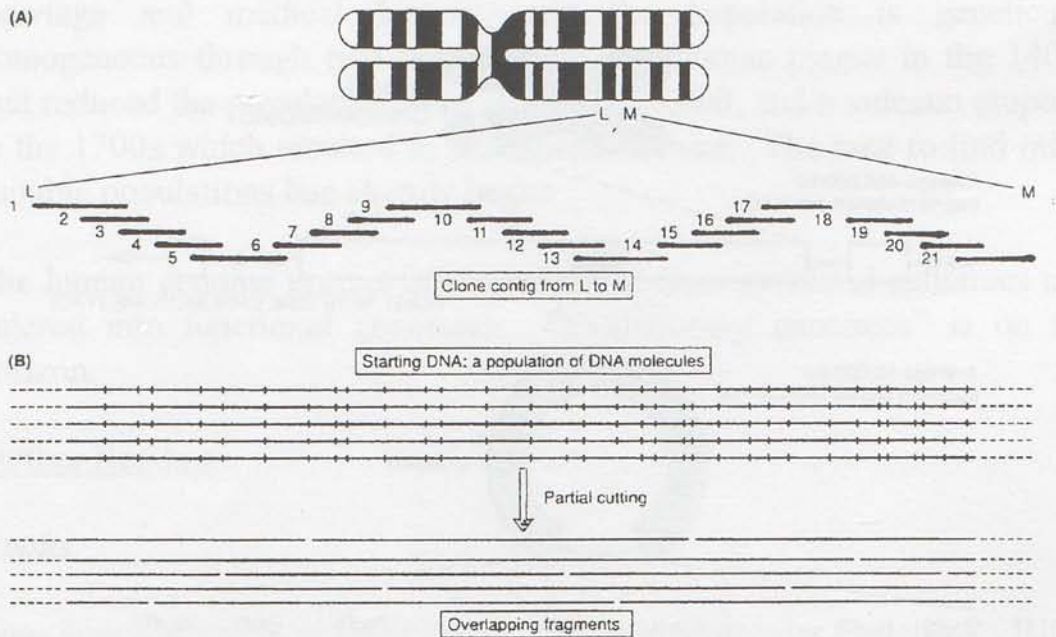


Figure 2. A clone contig

(A) Clone contig between chromosomal sites L and M consists of 21 clones arranged as a series of clones with overlapping sequences. (B) Overlapping DNA fragments are generated by partial restriction enzyme digestion.

(Source: Tom Strachan and Andrew P. Read , "Human Molecular Genetics", BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 1996, p. 289.)

Table 1. Current status of genome sequence, as of September 1997.

Organism	Size (Mb)	Sequenced	% finished
Microbial genomes (~11)	0.6-4.2	0.6-4.2	100
<i>E. coli</i>	4.6	4.6	100
Yeast	13	13	100
Nematode	100	71	71
<i>Drosophila</i>	130	8	6
Mouse	3000	6	0.2
Human	3000	60	2

(From Rowen L, Mahairas G, Hood L. Science 1997; 278: 605.)

Table I. Current status of business operations as of September 1997

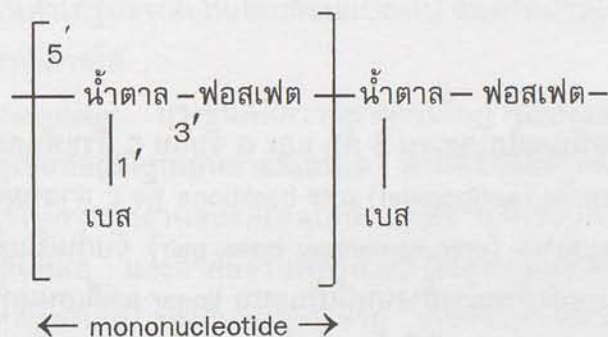
Organization	1996-1997		1997-1998		1998-1999	
	Revenue	Profit	Revenue	Profit	Revenue	Profit
1. General	100	10	100	10	100	10
2. Sales	100	10	100	10	100	10
3. Marketing	100	10	100	10	100	10
4. Finance	100	10	100	10	100	10
5. Human Resources	100	10	100	10	100	10
6. Information Technology	100	10	100	10	100	10
7. Legal	100	10	100	10	100	10
8. Other	100	10	100	10	100	10

ดีเอ็นเอในทัศนะของผู้ใช้ประโยชน์

รศ. ดร. ภิญญ พานิชพันธ์
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

1. โครงสร้างทั่วไปของดีเอ็นเอมีคุณสมบัติที่นำมาใช้ประโยชน์ได้

ดีเอ็นเอ (DNA หรือ Deoxyribonucleic acid) เป็นสารพันธุกรรม โครงสร้างของโมเลกุลมีลักษณะ linear คือมี backbone เป็นสายยาวที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา โดยที่ backbone เป็นหมู่ฟอสเฟตที่อยู่สลับกับน้ำตาล deoxyribose หน่วยที่เล็กที่สุด (residue) ของดีเอ็นเอ คือ mononucleotide ที่ประกอบด้วยน้ำตาล deoxyribose 1 หน่วย จับกับหมู่ฟอสเฟต 1 หมู่ และเบส 1 ตัว โดยพันธะโควาเลนต์โดยอาศัยตำแหน่งบนตัวน้ำตาลดังนี้



รูปที่ 1

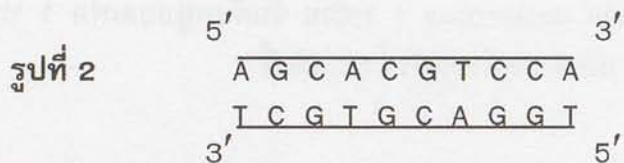
เบสโดยทั่วไปจะเป็นวงแหวนแอมโรแมติกประเภทเพียวรีน คือ adenine (A) และ guanine (G) และประเภทพิริมิดีน คือ cytosine (C) และ thymine (A) จึงทำให้ดีเอ็นเอสามารถ absorb แสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 nm ได้ โดยที่ค่า absorbance เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนหรือความเข้มข้นของเบสที่อยู่ในดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ฉะนั้น จึงสามารถตรวจหาดีเอ็นเอและประมาณความเข้มข้นของเบสได้โดยใช้ค่า UV absorbance

เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตจับกับน้ำตาลด้วยพันธะประเภทเอสเทอร์ (phosphodiester) จึงสามารถทำให้ตัดสายดีเอ็นเอให้สั้นลงหรือย่อยให้เล็กลงที่หมู่ฟอสเฟต โดยอาศัย DNases ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท hydrolase ที่มีความจำเพาะในการตัดหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน ความจำเพาะนี้ขึ้นอยู่กับตัวเอนไซม์และการเรียงตัวของเบส (นับจากปลาย 5' ไป 3') บนสายของเอนไซม์แต่ละสาย ที่ pH ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ หมู่ฟอสเฟตแต่ละหมู่ของ nucleotide บนสายดีเอ็นเอธรรมชาติมีประจุลบหนึ่ง ดังนั้น ดีเอ็นเอจึงมีจำนวนประจุมากตามความยาวของสายดีเอ็นเอ ทำให้ charge/mass ratio มีค่าค่อนข้างคงที่ เราจึงสามารถแยกดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในน้ำได้ด้วย

กระแสไฟฟ้าตรง โดยที่ดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่รูปทรงคล้ายกันจะเคลื่อนไปยังขั้วบวกในลักษณะที่สายที่สั้นจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสายที่ยาว จึงทำให้เราสามารถแยกเอาดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กันมาใช้ได้ ดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าจะมีลักษณะคล้าย bar-code สามารถนำมาใช้ดูเอกลักษณ์ของคน สัตว์ และพืช เช่น RFLP และ DNA fingerprinting

2. ดีเอ็นเอมักพบในลักษณะ 2 สายคู่กันและอยู่ในสภาพเกลียวคู่ซึ่งนำมาใช้เป็นประโยชน์ได้

ดีเอ็นเอมักพบในลักษณะ 2 สายที่เป็นคู่กัน เนื่องมาจากว่าเบสของสายหนึ่งเรียงตัว ($5' \rightarrow 3'$) ในลักษณะที่สามารถจับคู่กับเบสอีกสายหนึ่งที่เรียงตัว ($(5' \rightarrow 3')$) คล้องจองกันดังต่อไปนี้

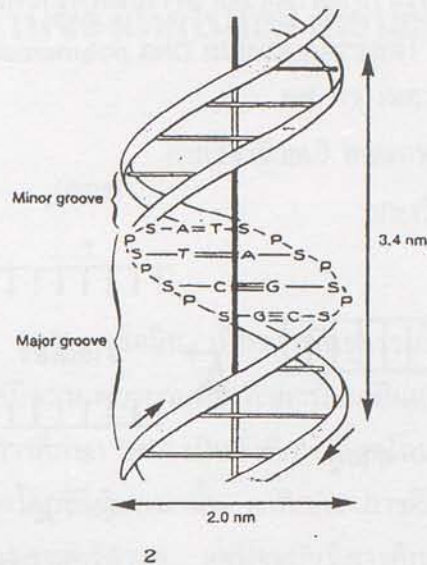


คือมี A จับกับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 อัน และ G จับกับ C ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 อัน โดยทิศทางของทั้ง 2 สายสวนกัน (antiparallel) และ backbone ทั้ง 2 สายหมุนเป็นเกลียวเวียนขวาหรือซ้ายอยู่ด้านนอก และคู่เบส (complementary base pair) จับกันเป็นชั้นบันไดเวียนขวา (หรือซ้าย) อยู่ด้านใน ดีเอ็นเอตั้งตัวอย่างข้างบนนี้เป็นแบบ linear แต่ดีเอ็นเอที่ไม่มีปลาย (เป็นวงกลม) ก็พบบ้าง เช่น ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ของไมโตคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ อยู่กันเป็นเกลียวคู่ (เวียนซ้ายหรือขวา) โครงสร้างของดีเอ็นเอที่เป็น linear หรือวงกลมอาจทำเกลียวซ้อนเกลียวคู่ขึ้นมาได้ จึงทำให้อัดแน่นกันขึ้น

ดีเอ็นเอเกลียวคู่จากแหล่งต่าง ๆ มักจะมีเบสเพียวรีน G เบสเพียวรีน A ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการลอยตัวในสารละลาย CsCl ที่เข้มข้นต่างกันเมื่อถูกปั่นด้วยความเร็วสูงในเครื่อง ultracentrifuge ซึ่งทำให้แยกดีเอ็นเอที่มี percentage ของ G ที่ต่าง ๆ กันได้เป็นชั้น ๆ จึงแยกดีเอ็นเอเหล่านี้ออกจากกันได้

ดีเอ็นเอเกลียวคู่นี้มีรูปร่างเหมาะสำหรับจับกับเอนไซม์และโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของดีเอ็นเอ ยา และสารเคมีต่าง ๆ ได้ การจับกันระหว่างดีเอ็นเอและสารดังกล่าวข้างต้นเกิดได้จากสมบัติของเกลียวคู่คือ มีประจุลบเรียงกันเป็นระยะทางเท่า ๆ กันอยู่ด้านนอก มีชั้นบันไดของคู่เบสอย่างสม่ำเสมออยู่ด้านใน และมีการเรียงตัวของคู่เบสต่าง ๆ อย่างมี pattern บ้างไม่มี pattern บ้างในบางช่วงของดีเอ็นเอ

ชั้นบันไดของคู่เบสทำให้สารหรือยาบางประเภทสามารถแทรกเข้าไประหว่างคู่ที่อยู่ติดกัน



รูปที่ 3

(intercalation) จนทำให้รูปร่างดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป จนทำหน้าที่ไม่ปกติ เช่น เกิดการกลายพันธุ์ หรือทำให้เซลล์ตายได้

สาร intercalator บางชนิดมีความสามารถในการเรืองแสงดีขึ้นเมื่อจับกับดีเอ็นเอโดยแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่อยู่ติดกันบนสายดีเอ็นเอ ทำให้เราติดตามดีเอ็นเอได้ด้วยตาเปล่า สารหรือยาบางตัวทำให้การทำงานของดีเอ็นเอผิดปกติจากการจับกับดีเอ็นเอโดยอาศัยประจุที่ backbone ของดีเอ็นเอ และอาศัยส่วนที่ทำพันธะไฮโดรเจนได้ของเบสที่ไพล่ออกมาในร่องของเกลียว (ทั้งร่องใหญ่และเล็ก) ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ สารหรือยาเหล่านี้บางตัวเรืองแสงได้ดีขึ้นเมื่อจับกับดีเอ็นเอ จึงสามารถนำมาใช้ติดตามดีเอ็นเอหรือติดตามการออกฤทธิ์ของสารได้

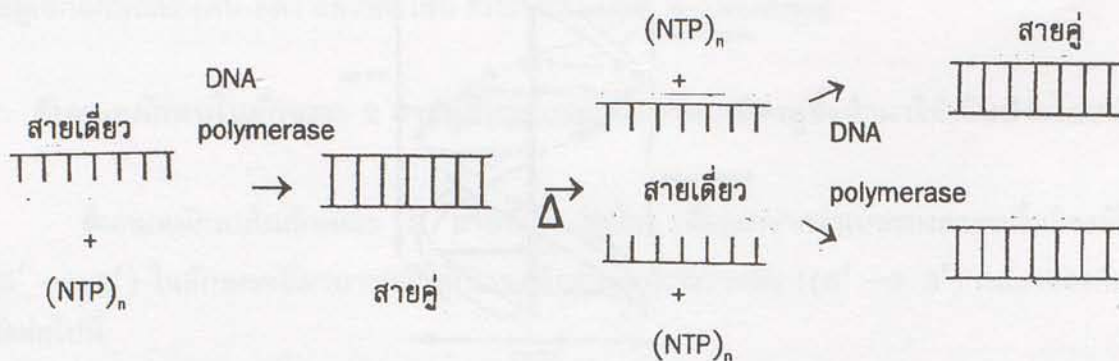
โปรตีนควบคุมการทำงานของดีเอ็นเอ รวมทั้งเอนไซม์ที่ใช้ตัดต่อดีเอ็นเอ มีความจำเพาะในการทำงานโดยอาศัยการเรียงตัวของเบสและรูปร่างดีเอ็นเอ โปรตีนเหล่านี้สามารถจับกับดีเอ็นเอโดยอาศัยประจุของหมู่ฟอสเฟต และส่วนของคู่เบสที่ทำพันธะไฮโดรเจน แรנגแวนเดอร์วาลส์ และไฮโดรโฟบิก การศึกษาลำดับของเบสที่จับกับโปรตีนหรือเอนไซม์ช่วยให้เกิดความเข้าใจการทำงานของยีน โครงสร้างของยีน และการนำยีนมาใช้เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรม

3. การเข้าใจกลไกการสร้างดีเอ็นเอนำมาใช้เป็นประโยชน์ได้

การสร้างดีเอ็นเอสายที่สองต้องพึ่งการเรียงตัวของเบสในสายที่เป็นแม่พิมพ์ และต้องอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการต่อหน่วยต่าง ๆ ของ nucleoside triphosphate (NTP)

เข้าด้วยกัน

จากความรู้ส่วนนี้ทำให้เราสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (polymerase chain reaction) โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ดังใน diagram รูปที่ 4



รูปที่ 4

หากจะเพิ่มดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธี polymerase chain reaction ควรจะต้องมีดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์อยู่บ้าง แล้วจึงใช้เอนไซม์ DNA polymerase เพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณโดยการทำให้เกิดดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยวสลับกัน โดยใช้เอนไซม์ polymerase ทำให้สายเดี่ยวเป็นสายคู่ และแยกสายคู่เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน สลับกันไป

การยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ อาจทำได้โดยใช้ nucleoside หรือสิ่งคล้ายคลึงที่ไม่สามารถกลายเป็น NTP ที่ต่อกันเข้าเป็นสายดีเอ็นเอ มาเป็นยาหรือตัวยับยั้งการต่อเติมของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งมีผลทำให้เราสามารถรักษาหรือบรรเทาโรคที่เกิดจากไวรัสบางชนิดได้ เช่น ยา AZT หรือ ddI และยั้่นำ NTP แปลกปลอมมาช่วยในการหาการเรียงลำดับเบส (DNA sequencing) ได้ด้วย เพราะเป็นตัวทำให้เกิด DNA ที่มีความยาวต่าง ๆ กันขึ้น

ความรู้พื้นฐานของเทคโนโลยี ดีเอ็นเอ

ผศ. ดร. เนตรนภิส วีระวัลย์ชัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

ดังที่ได้ทราบกันแล้วว่า DNA หรือยีน เป็นสารพันธุกรรมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่จะถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลานได้ จึงได้มีความพยายามที่จะทำการแยกยีนแต่ละยีนออกมาศึกษาอย่างจำเพาะเจาะจง เดิมทีก่อนปี ค.ศ. 1970 การศึกษา DNA เป็นสิ่งที่ยากที่สุดในเซลล์สำหรับนักชีวเคมี เนื่องจาก DNA มีขนาดใหญ่มาก ต้องศึกษาโดยวิธีอ้อมเท่านั้น อาทิเช่น การศึกษาการแสดงออกของ DNA จากโปรตีน หรือการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ต่างๆ แต่ปัจจุบันนี้การศึกษา DNA นั้น จัดว่าง่ายที่สุดในบรรดาสารชีวโมเลกุลทั้งหลาย เราสามารถตัด DNA ที่บริเวณจำเพาะหรือมีการเพิ่มจำนวนอย่างไม่จำกัด และทำการหาลำดับเบสของ DNA นั้นๆ ได้ นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่ก้าวหน้ามากขึ้น เช่น เราสามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งกระทำได้โดยการเปลี่ยนแปลง DNA ที่เบสตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง (mutation) ก่อนใส่กลับเข้าไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อให้ DNA ที่เราทำให้เปลี่ยนแปลงไปนั้นถูก incorporate เข้าไปใน host chromosomal DNA และมีการแสดงออกของยีนนั้นๆ ต่อไปในทางที่ดีขึ้น

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุลนั้นมีชื่อเรียกได้หลายอย่าง ได้แก่ DNA cloning หรือ genetic engineering หรือ recombinant DNA technology ซึ่งเทคนิคเหล่านี้จัดได้ว่าเป็นการปฏิวัติการศึกษา DNA ให้ลึกซึ้งมากขึ้น เทคนิคดังกล่าวประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญๆ ดังต่อไปนี้

- 1) การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction endonucleases) ซึ่งทำให้การแยกยีนที่ต้องการศึกษาออกมาได้ง่ายขึ้น
- 2) การเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจโดยการทำ DNA cloning
- 3) การทำ nucleic acid hybridisation ที่ทำให้การค้นหายีนที่สนใจเป็นไปได้ง่ายขึ้น
- 4) การหาลำดับเบสของ DNA (sequencing) ซึ่งทำให้การศึกษาขอบเขตของยีนและชนิดของโปรตีนที่ยีนนั้นๆ ถอดและแปลรหัสออกมาเป็นไปได้ง่ายขึ้น
- 5) การเปลี่ยนแปลงยีนที่สนใจนั้นที่เบสใดเบสหนึ่งอย่างจำเพาะเจาะจง แล้วใส่กลับเข้าไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อปรับปรุงการแสดงออกของยีนนั้นให้ดีขึ้น

ในบทนี้จะขอกล่าวถึง หลักการเบื้องต้นในการศึกษา DNA โดยใช้เทคนิคต่างๆ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งจะเป็นเรื่องเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวน DNA ที่เราสนใจซึ่งกระทำได้ 2 วิธี คือ

- A) การเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้เซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์, รา ฯลฯ
- B) การเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR)

1) การเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจศึกษา (foreign DNA) โดยใช้เซลล์สิ่งมีชีวิต

เซลล์สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในที่นี้จะเน้นที่แบคทีเรียเป็นสำคัญ ซึ่งอาจเรียกได้ว่าการทำ DNA cloning มีการทำได้ 2 แบบ คือ genomic DNA (gDNA) และ complementary DNA (cDNA) cloning การที่ DNA cloning นี้มีความสำคัญก็เนื่องมาจากเราสามารถที่จะเลือกทำการเพิ่มจำนวนยีนแต่ละยีนได้ ดังนั้นด้วยการทำ DNA cloning เราสามารถศึกษาโครงสร้างและการแสดงออกของยีนแต่ละยีนได้ง่ายขึ้น

1) การทำ gDNA cloning มีหลักการพอสรุปได้ดังนี้ (รูปที่1)

- a) การเตรียม DNA ที่จะใช้สร้าง DNA ลูกผสม (chimaera หรือ recombinant DNA) ซึ่งประกอบด้วย DNA 2 ส่วน ได้แก่ vector DNA และ DNA ที่เราสนใจจะศึกษา (foreign DNA)
- b) การสร้าง recombinant DNA (r-DNA)
- c) การใส่ r-DNA นั้นเข้าไปในเซลล์สิ่งมีชีวิต หรือเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อให้เพิ่มจำนวน DNA ที่เราสนใจศึกษานั้น ซึ่งเรียกว่าการทำ transformation
- d) การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับ recombinant DNA เข้าไปแล้ว (positive clones) โดยใช้เทคนิค DNA hybridisation
- e) การวิเคราะห์ DNA ที่เราสนใจ โดยการแยกบนวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) ซึ่งเป็นการหาขนาดของ DNA นั้น

ขั้นตอนของการทำ gDNA cloning จะกล่าวโดยละเอียดได้ดังต่อไปนี้

a) การเตรียม DNA ที่จะใช้สร้าง r-DNA

ดังได้กล่าวแล้วว่า r-DNA ประกอบด้วย DNA 2 ส่วน ได้แก่ vector DNA และ gDNA ที่เราสนใจศึกษา (foreign DNA) และเราต้องการเพิ่มจำนวนโดยการทำ DNA cloning เพราะฉะนั้น เราจึงต้องมีการเตรียม DNA ทั้ง 2 ชนิดให้บริสุทธิ์เสียก่อน ดังนี้

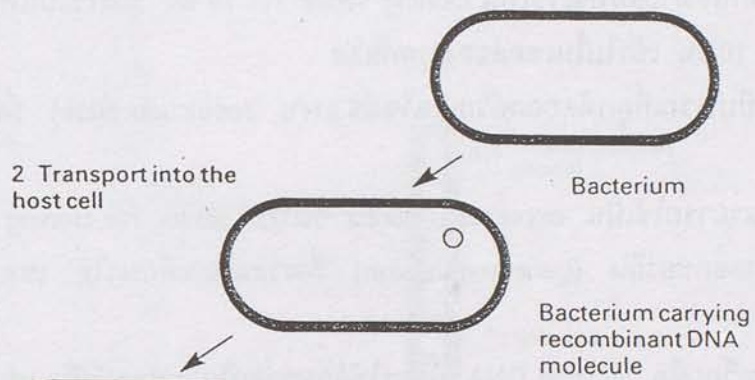
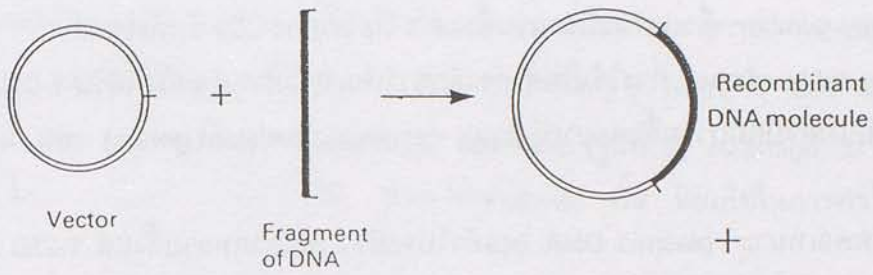
1) การเตรียม vector DNA

DNA ชนิดนี้จะเป็นตัวพา (vehicle) DNA ที่เราสนใจเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) DNA ที่จะใช้เป็น vector DNA นั้นสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่

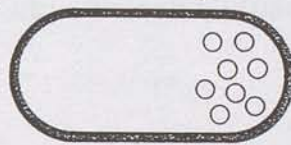
1.1) Plasmid DNA

เป็น DNA เกลิยวูที่มีรูปร่างกลมเป็นวงแหวนปิด (closed circular DNA) พบได้ในเซลล์ของแบคทีเรีย, ยีสต์, รา, พืชจำพวก *Agrobacterium tumefaciens*

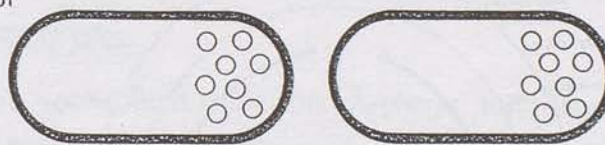
1 Construction of a recombinant DNA molecule



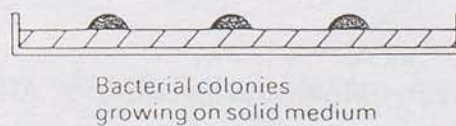
3 Multiplication of recombinant DNA molecule



4 Division of host cell



5 Numerous cell divisions resulting in a clone



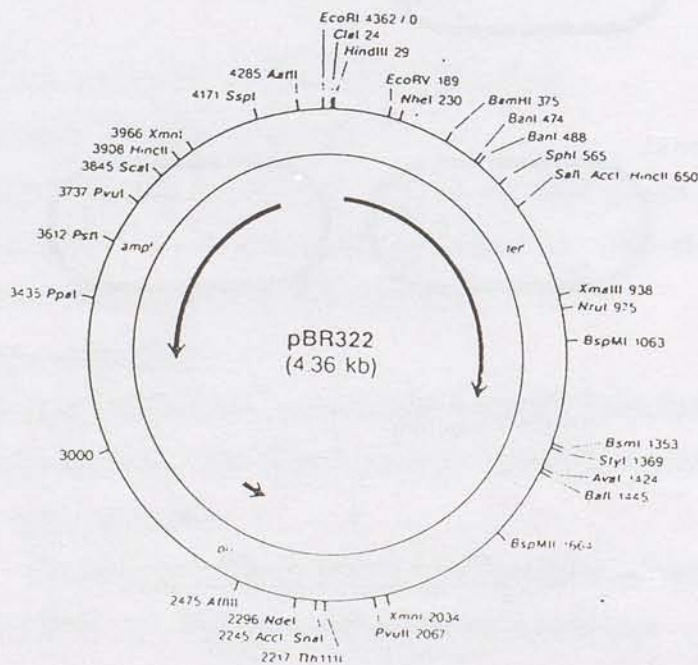
รูปที่ 1 ขั้นตอนของการทำ gDNA cloning

คุณสมบัติของ plasmid DNA

คุณสมบัติที่เหมาะสมของ plasmid DNA ที่จะใช้เป็น vector มีดังนี้

- สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เจ้าบ้านอย่างเป็นอิสระ ไม่ขึ้นกับการสร้าง DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากมีบริเวณที่เรียกว่าเป็น origin of replication และจำนวน plasmid DNA ในเซลล์เจ้าบ้านเรียกว่า copy number ซึ่งปกติจะมีจำนวนตั้งแต่ 1 ถึง มากกว่า 50 อันต่อเซลล์
- มี selectable marker ที่จะใช้เป็นตัวคัดเลือกว่าเซลล์เจ้าบ้านเซลล์ใดได้รับ r-DNA เข้าไปแล้ว ซึ่งมักจะเป็นยีนที่ควบคุมความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistant genes) เช่น แอมพิซิลลิน, เตตราไซคลิน ฯลฯ
- มีขนาดพอเหมาะ plasmid DNA โดยทั่วไปจะมีขนาดหลากหลายตั้งแต่ 1-250 kilobases (kb) แต่ขนาดที่เหมาะสมที่จะใช้เป็น cloning vector คือ 10 kb และใช้เป็นพาหะพา foreign DNA ที่มีขนาดไม่เกิน 10 kb เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย
- มีบริเวณที่ถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction sites) ที่เหมาะสมในอันที่จะใช้เป็น cloning site
- สามารถใช้เป็น expression vector ซึ่งเป็น vector ที่มี cloning site ที่เหมาะสมในการที่จะมีการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่เราสนใจจะศึกษาได้ เช่น plasmid ตระกูล pUC ทั้งหลาย

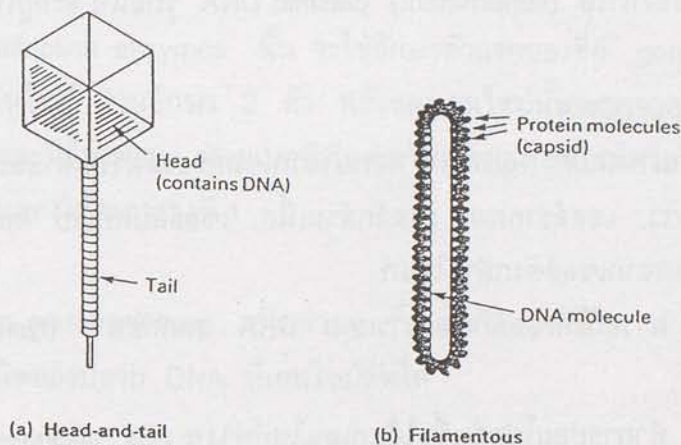
การเรียกชื่อ plasmid DNA นั้นจะใช้อักษรย่อเป็น p นำหน้าชื่อ เช่น pBR322 (รูปที่ 2) ซึ่งเป็น plasmid ที่นิยมใช้กันมาก



รูปที่ 2 แผนภูมิของ pBR322 DNA แสดง restriction sites และ antibiotic resistant genes

1.2) Bacteriophage DNA

เป็นไวรัสชนิดหนึ่งอาจเรียกสั้นๆ ว่า phage ที่สามารถ infect แบคทีเรียได้ ประกอบด้วยส่วนสำคัญๆ คือ DNA (หรือบางประเภทอาจเป็น RNA ก็ได้) และส่วนที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หุ้มเซลล์ (capsid) phage ที่นิยมใช้เป็น cloning vector จะสามารถพา foreign DNA ที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 20 kb เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้ มี 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ λ และ M13 phages ซึ่งมีลักษณะเป็น head-and-tail และ filamentous ตามลำดับ (รูปที่ 3) λ -phage บางชนิด เช่น λ gt11 สามารถใช้เป็น expression vector ได้ ส่วน M13-phage นั้น นิยมใช้ในการทำ DNA sequencing กันอย่างแพร่หลาย



รูปที่ 3 แสดง λ และ M13 DNA ซึ่งเป็น head-and-tail (4a) และ filamentous phages (4b) ตามลำดับ

1.3) Cosmid DNA

เป็น vector ที่ปรับปรุงมาจาก λ -phage และ plasmid DNA สามารถใช้เป็น พาหะที่จะพา foreign DNA ขนาดใหญ่ ตั้งแต่ 20-45 kb เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้

1.4) Yeast artificial chromosomes (YACS)

เป็น vector ที่จะเพิ่มจำนวนได้ทั้งในแบคทีเรีย และในยีสต์ สามารถใช้เป็น พาหะนำ foreign DNA ขนาดใหญ่มากๆ (>200 kb) เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้ จึงเหมาะที่จะใช้ในการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนของสัตว์ชั้นสูง (eukaryotic gene expression)

การเตรียม vector DNA ซึ่งปกติจะอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย ในที่นี้จะขอกล่าวถึง plasmid DNA เป็นสำคัญ มีได้หลายวิธี แต่วิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจะเป็นการแยกโดยใช้ด่าง (alkaline denaturation) ตามวิธีของ Birnboim และ Doly (1979) ซึ่งมีหลักการดังนี้

ปกติ plasmid DNA จะมีโครงสร้าง (conformation) ได้ 3 แบบ คือ supercoiled, open-circular และ linear DNA ถ้าต้องการเตรียม plasmid DNA เราก็ต้องเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมาก ก่อนที่จะทำให้เซลล์แตกเพื่อปลดปล่อย plasmid DNA ออกมา จากนั้นจึงเติมด่างลงไปเพื่อให้ pH อยู่ระหว่าง 12-12.5 ซึ่งที่สภาวะนี้ plasmid DNA ที่มีโครงสร้างเป็นแบบ supercoiled จะไม่ถูกทำให้เสียสภาพ (denature) แต่ plasmid DNA ที่มีโครงสร้างเป็นแบบอื่นจะถูกทำให้เสียสภาพไปได้ DNA สายเดี่ยว (single-stranded DNA) ต่อจากนั้นจึงเติมกรดเพื่อปรับสภาวะให้เป็นกลาง DNA ที่ถูก denature ไปจะกลับมาจับตัวกันได้ใหม่ (renature) ซึ่งจะเป็นไปอย่างไม่มีระเบียบ แต่ DNA เกลียวคู่ของ plasmid DNA ที่อยู่ในรูป supercoiled จะไม่แยกจากกันอยู่แล้ว ดังนั้นเราจึงสามารถแยก plasmid DNA ที่อยู่ในรูป supercoiled นี้ออกมาได้ โดยการปั่น (centrifugation) ซึ่ง DNA ดังกล่าวจะอยู่ในส่วนของน้ำใส (supernatant) plasmid DNA รูปอื่นๆ จะอยู่ในส่วนตะกอน (pellet) ที่เราจะแยกทิ้งไป

2) การเตรียม gDNA

เราสามารถแยก gDNA ออกมาจากเซลล์ของสัตว์ชั้นต่ำและสัตว์ชั้นสูงได้หลายชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว, เซลล์รากผม, เซลล์กล้ามเนื้อ, เซลล์แบคทีเรีย ฯลฯ หลักการสำคัญที่ใช้ในการแยก DNA ออกมาจากเซลล์ดังกล่าวได้แก่

2.1) การทำให้เซลล์ที่ต้องการแยก DNA แตกก่อน (lysis) โดยใช้สารเคมีที่เป็น detergent

2.2) ทำการย่อยโปรตีนซึ่งได้แก่เอนไซม์ต่างๆ เช่น nucleases, โปรตีนฮิสโตนที่จับอยู่กับ DNA ของสัตว์ชั้นสูง เป็นต้น โดยใช้เอนไซม์ protease ดังนั้นจะเหลือส่วนที่เป็นกรดนิวคลีอิกเท่านั้น

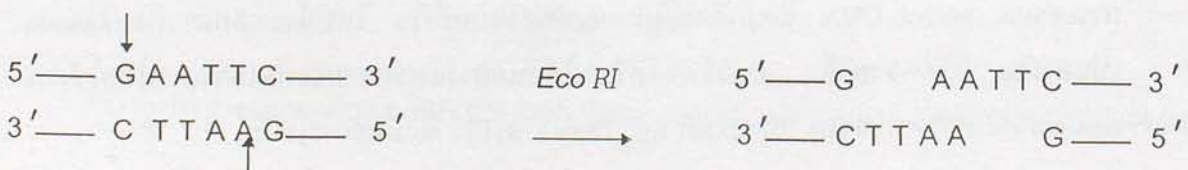
2.3) ทำการย่อย RNA โดยอาศัยเอนไซม์ RNase ดังนั้นจะเหลือส่วนที่เป็น DNA เท่านั้น

2.4) ทำการตกตะกอน DNA ที่แยกได้ด้วย ethanol แล้วละลาย DNA นั้นด้วยน้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

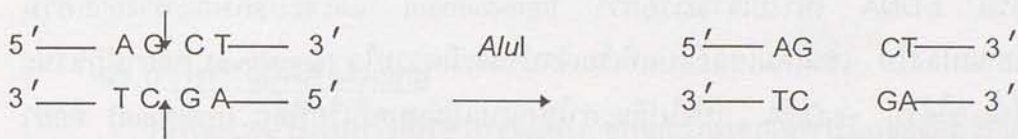
b) การสร้าง r-DNA

1) การตัด gDNA และ vector DNA ด้วยเอนไซม์จำเพาะ (endonucleases)

Restriction enzymes เป็นเอนไซม์ชนิด type II restriction endonucleases ที่แยกจากแบคทีเรียหลายชนิด และจะมีความพิเศษคือสามารถตัด DNA สายคู่ที่บริเวณจำเพาะที่เรียกว่า palindromic sequence ซึ่งมีลักษณะดังต่อไปนี้



จะเห็นได้ว่าถ้าเราอ่านลำดับเบสจากทิศทาง 5' ไป 3' ของ DNA สายบนและสายล่าง ลำดับเบสนั้นจะเหมือนกันทุกตัว ส่วนตำแหน่งที่ลูกศรชี้ จะเป็นตำแหน่งที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งเอนไซม์นี้จะจับ (recognise) กับ DNA ได้โดยใช้เบส 6 ตัว จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่าเป็น 6-cutter หลังจากตัดแล้วจะได้ DNA ปลายเหนียว (sticky end) ดังรูป นอกจากนี้ยังมี restriction enzymes อื่นๆ ที่เป็น 4 หรือ 5-cutter และหลังจากตัดแล้วจะได้ DNA ปลายเหนียวหรือปลายทู่ (blunt end) ก็ได้ เช่น เอนไซม์ *AluI* จะจับกับ DNA โดยใช้เบส 4 ตัว และหลังจากตัดแล้วจะได้ DNA ปลายทู่



การเรียกชื่อ restriction enzymes นั้น จะใช้อักษรตัวแรกของชื่อ genus ของแบคทีเรียเป็นอักษรตัวแรกของชื่อเอนไซม์ ส่วนอักษร 2 ตัว หลังของเอนไซม์นั้นจะมาจากชื่อ species ของแบคทีเรียดังกล่าว และอาจจะมีชื่อ strain ของแบคทีเรียต่อท้ายชื่อของเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ ตัวอย่าง restriction enzymes ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Restriction endonucleases ชนิดต่างๆ ที่แยกจากแบคทีเรีย, ลำดับเบส, ตำแหน่งเบสและชนิดของปลาย DNA ที่เอนไซม์ตัดได้

เอนไซม์	ชื่อแบคทีเรีย	ลำดับเบส	ชนิดของปลาย DNA ที่ตัดได้
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	G↓AATTC	sticky
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	A↓GATCT	sticky
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC	blunt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	T↓CGA	sticky

ดังนั้นเพื่อที่จะเตรียม gDNA และ vector DNA ให้พร้อมสำหรับการทำ DNA cloning จะต้องตัด DNA ทั้ง 2 ชนิด ด้วย restriction endonuclease(s) เพื่อให้เกิดปลาย ที่พร้อมจะเชื่อม DNA ทั้ง 2 ชนิด เข้าด้วยกันเสียก่อน (รูปที่ 1)

2) การเชื่อม gDNA และ vector DNA

หลังจากที่ตัด DNA ทั้ง 2 ชนิดด้วย restriction enzymes แล้วจะทำการเชื่อม DNA ทั้ง 2 ด้วยเอนไซม์ ligase ทำให้ได้ r-DNA (รูปที่ 1)

c) การใส่ R-DNA เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

จะทำได้โดยวิธีการที่เรียกว่า transformation โดยมีหลักการคือ เราต้องทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น *E coli* เกิดรูพรุนเสียก่อน โดยใช้สารเคมีเช่น CaCl_2 ทำให้ได้เซลล์ที่เรียกว่า competent ซึ่งเมื่อนำ r-DNA ผสมลงไปในหลอดทดลองที่มีเซลล์เหล่านี้อยู่ r-DNA จะไปเกาะอยู่บนผิวของเซลล์ดังกล่าวและ r-DNA จะถูกนำเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของเซลล์อย่างรวดเร็วจาก 42°C ไปที่ 4°C ขบวนการนี้เรียกว่า heat shock เซลล์ที่ได้รับ r-DNA เข้าไปเราจะเรียกว่า transformant และจะมีลักษณะทางกายภาพ (phenotype) เปลี่ยนแปลงไป เช่นเดิมเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านจะมีความไว (sensitive) ต่อยาปฏิชีวนะมาก แต่ถ้าเซลล์นั้นๆได้รับ r-DNA เข้าไปก็จะทำให้กลายเป็นแบคทีเรียที่ดื้อ (resistant) ต่อยาปฏิชีวนะและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะอยู่

d) การคัดเลือก positive clones

เป็นการทดสอบว่า transformant ใด ได้รับ r-DNA ที่มี DNA ที่เราสนใจ (insert DNA) อยู่ด้วย จะกระทำได้อย่างไร วิธีหนึ่งที่นิยมกันก็คือ การทำ colony hybridisation ที่มีหลักการว่า DNA สายเดี่ยวที่มีเบสเป็นคู่ผสม (complementary bases) กัน จะสามารถจับคู่กันหรือ hybridise กันได้ ดังนั้นถ้าเรามีชิ้นส่วนของ DNA ที่เราสนใจ ที่เรียกว่า DNA probe หรือถึงแม้ว่าเราจะไม่มียา probe แต่ถ้าเราทราบลำดับเบสของยีนที่เราสนใจเพียงแค่ 10-20 เบส เราก็สามารถสังเคราะห์ (synthesise) oligonucleotide สายเดี่ยวนี้ขึ้นมาได้ เพื่อใช้เป็น oligonucleotide probe เราสามารถใช้ probe ดังกล่าวเป็นตัวติดตามหา clone ที่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เราสนใจศึกษาได้ต่อไป ตามขั้นตอนดังนี้

1) ทำการติดฉลาก DNA probe หรือ oligonucleotide probe ด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P , ^{33}P หรือในปัจจุบันเราอาจใช้สารเคมีอื่นที่ไม่ใช่สารกัมมันตรังสีเป็นตัวติดฉลากก็ได้ เช่น biotin ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นตัวติดตามหา transformant ที่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เราสนใจอยู่

2) ทำการเตรียมเซลล์แบคทีเรียซึ่งปกติจะเจริญเติบโตอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มาเจริญเติบโตอยู่บนแผ่น nylon membrane หรือ nitrocellulose โดยการทำให้ replica plating

3) ทำให้เซลล์แบคทีเรียบนแผ่น nylon membrane แตก โดยการเติม detergent และล้าง เพื่อให้มีการปล่อย DNA ออกมาอยู่ในรูปของ DNA สายเดี่ยว ที่ถูกตรึงไว้กับแผ่น nylon membrane นั้น

4) นำ DNA probe ที่ติดฉลากแล้วไป hybridise กับแผ่น nylon membrane ที่เตรียมไว้

5) ทำการตรวจหา positive colony ที่มีชิ้น DNA ที่เราสนใจ insert อยู่ โดยใช้เทคนิค autoradiography

e) การวิเคราะห์ gDNA ที่ต้องการศึกษา โดยวิธี agarose gel electrophoresis

วิธีนี้เป็นการแยกชิ้น DNA ตามขนาดบนวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า โดยหลังจากตัด gDNA ที่เราเชื่อมเข้าไปกับ vector DNA ที่บริเวณ cloning site ออกมาด้วย restriction enzyme แล้วก็นำ DNA ที่ได้ไปแยกบนวุ้น agarose ด้วยกระแสไฟฟ้า DNA ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่มีขนาดใหญ่ ด้วยวิธีนี้จะทำให้เราทราบขนาดของชิ้น gDNA ที่เราสนใจที่ถูกเชื่อมเข้าไปกับ vector DNA ได้

2) การทำ cDNA cloning

วิธีนี้จะเหมาะกับการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเฉพาะยีนของสัตว์ชั้นสูงที่จะประกอบด้วย exon และ intron หลักการของเทคนิคนี้ก็คือ เราจะแยก mRNA ของเซลล์พืชหรือสัตว์ที่เราสนใจศึกษาออกมาก่อน นำ mRNA ดังกล่าวไปสร้าง first-strand DNA หรือ complementary DNA (cDNA) strand โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นจึงทำการสร้าง second-strand DNA ขึ้นมา แล้วนำ DNA สายคู่ที่ได้ไปทำการ cloning ตามวิธีต่างๆ ดังได้กล่าวไว้เบื้องต้นแล้ว ต่อไป

2) การเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิคนี้เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงครั้งสำคัญในการศึกษาทางอณูชีววิทยา ได้มีการค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1985 โดย Saiki และคณะ ทำให้เราสามารถเพิ่มจำนวนยีนที่เราสนใจอย่างจำเพาะเจาะจงในหลอดทดลองได้ หลักการของวิธีนี้ก็คือ การสร้าง DNA (replication) ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ (repeated cycles) (รูปที่ 4) ซึ่งการเพิ่มจำนวนของยีนที่เราสนใจนี้เราจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของยีนที่เราสนใจบางส่วนด้วยเพื่อที่เราจะสามารถสร้าง oligonucleotide primer มาจับกับยีนนั้น และเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้

ขั้นตอนของการทำ PCR

แต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนใหญ่ๆ 3 ขั้นตอนได้แก่

1) Denaturation เป็นการทำให้ DNA สายคู่ แยกออกเป็น DNA สายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 95 °C

2) Primer annealing เป็นขั้นตอนที่ oligonucleotide primers จะเข้าไปจับกับ DNA บริเวณที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่ผสม (complementary base) จะเกิดที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยขึ้นกับปริมาณของเบส G+C ถ้ามีปริมาณ GC มากจะทำให้ annealing temperature สูงตามไปด้วย โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 40-60 °C

3) Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA จาก oligonucleotide primers ที่เข้าไปจับกับยีนที่ต้องการศึกษาดังกล่าว จะเกิดที่อุณหภูมิประมาณ 72 °C

การเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษาโดยวิธี PCR นี้ จะกระทำในหลอดทดลองที่ประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญๆ 4 อย่างได้แก่

1) DNA template ซึ่งเป็น DNA สายคู่ ที่แยกมาจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจศึกษา

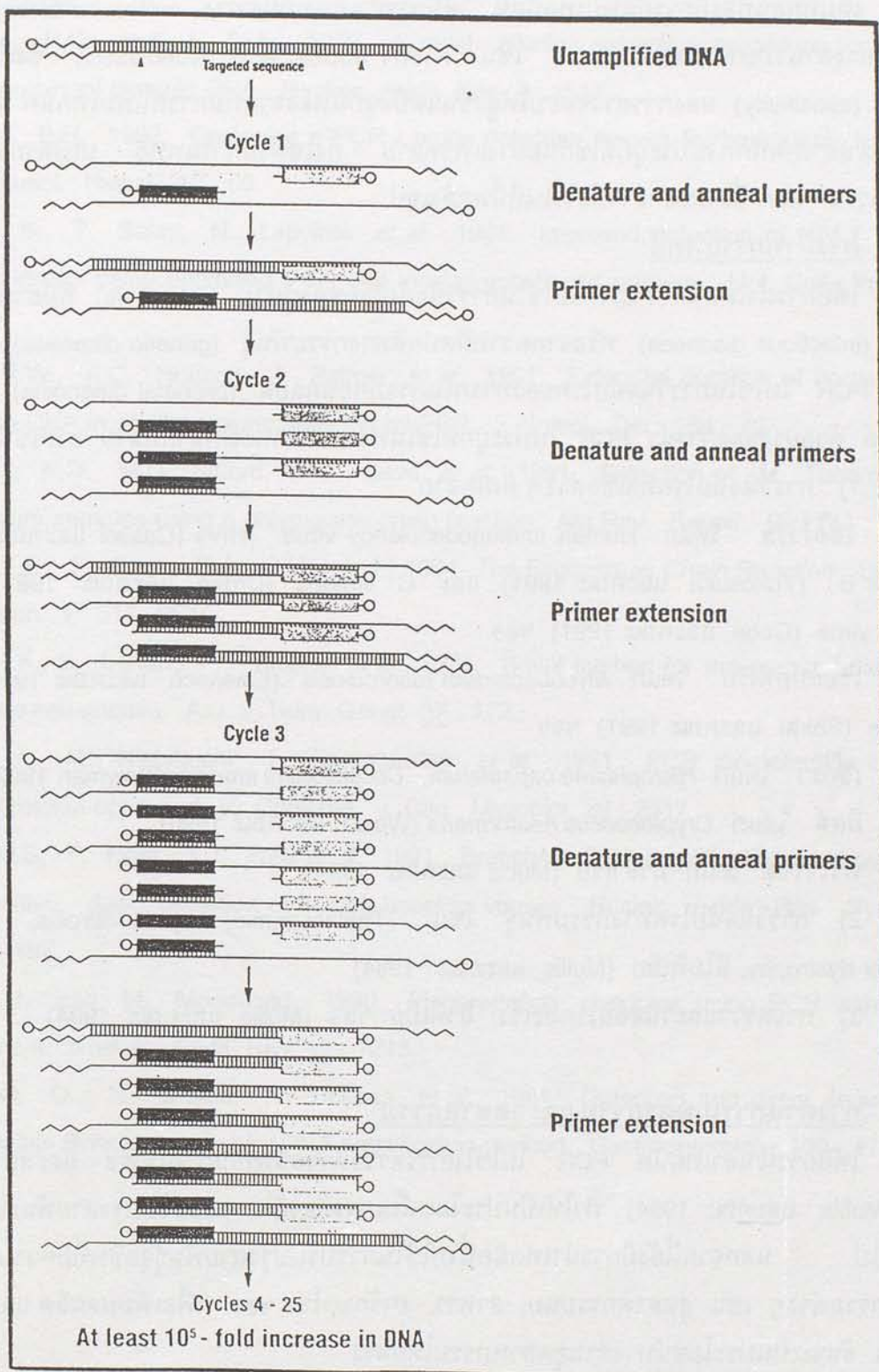
2) เอนไซม์ Taq DNA Polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และทำหน้าที่สร้างสาย DNA ที่อุณหภูมิสูงๆ ได้ดี (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์นี้แยกมาจากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* ที่อาศัยอยู่ในบ่อน้ำพุร้อน ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ได้จากหลายๆ บริษัท

3) Deoxynucleotide ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP

4) Oligonucleotide primers ซึ่งเป็น DNA สายสั้นๆ ขนาดประมาณ 20-30 bases อาจเรียกง่ายๆ ว่าเป็น forward และ reverse primers สำหรับจับ DNA template ทั้ง 2 สาย

นอกจากนี้ยังมีสารที่จำเป็นต่อการทำ PCR อื่นๆ เช่น เกลือ $MgCl_2$, KCl ใน PCR buffer โดยทั่วไป การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR นี้จะใช้จำนวนรอบประมาณ 25-30 รอบ ซึ่งจะทำให้จำนวน DNA molecule ที่ amplify ได้เป็น 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำ PCR ถ้าประสิทธิภาพของการทำ PCR เป็น 100%

ปัจจุบันนี้การทำ PCR เป็นสิ่งที่ย่าง สะดวก รวดเร็ว และเป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำสูงเราสามารถซื้อเครื่อง Thermal cycler ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีการเปลี่ยนอุณหภูมิตามโปรแกรมที่ตั้งไว้โดยอัตโนมัติได้จากหลายๆ บริษัท



รูปที่ 4 หลักการของการทำ Polymerase Chain Reaction

ประโยชน์ของ PCR และการนำไปประยุกต์ใช้

เดิมทีก่อนที่จะมีการค้นพบเทคนิคนี้ ได้มีการนำเอาเทคนิคทาง molecular biology ไปใช้ในงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น การทำ nucleic acid hybridisation ซึ่งเป็นการเพิ่มความไว (sensitivity) ของการตรวจสอบให้สูงขึ้นแต่ปัจจุบันหลังจากที่มีการค้นพบเทคนิค PCR แล้ว ได้มีการนำเอาเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม ฯลฯ ซึ่งจะขอกล่าวถึงไว้ในที่นี้พอสังเขป

ทางด้านการแพทย์

ได้มีการนำเทคนิค PCR ไปใช้ในการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วย (diagnosis) ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infectious diseases) หรือจากความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ (genetic diseases) แม้กระทั่งการนำ PCR ไปใช้ในการวินิจฉัยโรคของทารกในครรภ์ก่อนคลอด (prenatal diagnosis) ก็สามารถทำได้ ตัวอย่างของการนำ PCR ไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มีหลากหลาย อาทิเช่น

1) การวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่างๆ ที่เกิดจาก

เชื้อไวรัส ได้แก่ Human immunodeficiency virus (HIV) (Cassol และคณะ, 1991), Hepatitis B (Yokosuka และคณะ 1991) และ C viruses (Urdea และคณะ 1991), herpes simplex virus (Cone และคณะ 1991) ฯลฯ

เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis* (Eisenach และคณะ 1991), *Vibrio cholerae* (Shirai และคณะ 1991) ฯลฯ

เชื้อรา ได้แก่ *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* (Bowman 1992)

ยีสต์ ได้แก่ *Cryptococcus neoformans* (Welsh และคณะ 1990)

พาราไซต์ ได้แก่ มาลาเรีย (Mullis และคณะ 1994)

2) การวินิจฉัยโรคทางกรรมพันธุ์ เช่น Thalassaemia, cystic fibrosis, duchenne muscular dystrophy, ฮีโมฟีเลีย (Mullis และคณะ 1994)

3) การตรวจและวินิจฉัยโรคมะเร็ง, ลิวคีเมีย ฯลฯ (Mullis และคณะ 1994)

ทางด้านการเกษตรกรรม และอุตสาหกรรม

ได้มีการนำเอาเทคนิค PCR ไปใช้ในการตรวจหาจุลชีพที่ก่อโรคในพืช และสัตว์อย่างมาก (Mullis และคณะ 1994) ทำให้เป็นประโยชน์ในการป้องกัน และปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไป

นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลชีพที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมนม, อาหาร, ยารักษาโรค ฯลฯ เพื่อเพิ่มผลผลิต และลดต้นทุนการผลิต อันจะเป็นประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมโดยตรง

เอกสารอ้างอิง

- Birnbiom, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7 : 1513.
- Bowman, B.H. 1992. Designing a PCR / probe detection system for pathogenic fungi. *Clin. Immunol. Newsl.* 12 : 65.
- Cassol, S., T. Salas, N. Lapointe *et al.* 1991. Improved detection of HIV-1 envelope sequences using optimised PCR and inosine-substituted primers. *Mol. Cell Probes* 5 : 157.
- Cone, R.W., A.C. Hobson, J. Palmer *et al.* 1991. Extended duration of herpes simplex virus DNA in genital lesions detected by PCR. *J. Infect. Dis.* 164 : 757
- Eisenach, K.D., M.D. Sifford, M.D. Cave *et al.* 1991. Detection of *M. Tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev. Respir. Dir.* 144 : 1160.
- Mullis, K.B., F. Ferre, R.A. Gibbs (ed.) 1994 *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser, Boston. P. 317 PCR
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona *et al.* 1985. Novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia. *Am J Hum Genet* 37 : 172.
- Shirai, H., M. Nishibuchi, T. Ramamurthy *et al.* 1991. PCR for detection of cholera enterotoxin operon of *V. Cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 2517.
- Urdea, M.S, T. Horn, T.J. Fultz *et al.* 1991. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 24 : 197.
- Welsk, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 7213.
- Yokosuka, O., M. Omata, K. Hosoda *et al.* 1991. Detection and direct sequencing of hepatitis B virus genome by DNA amplification method. *Gastroenterology* 100 : 175.

ความรู้พื้นฐานของเทคโนโลยี ดีเอ็นเอ

ผศ. ดร. กล้ายอัสพร พงศ์พีพร

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

เทคนิคพื้นฐานที่จะกล่าวถึงในที่นี้ได้แก่ Restriction mapping, DNA sequencing, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ DNA fingerprinting สามเทคนิคแรกเป็นเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทาง DNA ทั่วไป ส่วน DNA fingerprinting นั้น เป็นการนำความรู้และเทคนิคทางด้าน DNA มาประยุกต์ใช้ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติเวชวิทยา

Restriction mapping

Restriction mapping (Physical mapping) เป็นการวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ clone ได้หรือทำ PCR ได้โดยการตัด DNA ดังกล่าวด้วย restriction endonucleases (RE) แล้วดูตำแหน่งและระยะระหว่างแต่ละตำแหน่งที่ตัดได้ว่าเป็นกิโลเบสหรือกิโลเบส การวิเคราะห์นั้นสามารถทำได้โดยที่ไม่ต้องรู้เลยว่า ชิ้น DNA นี้ มีโครงสร้างหรือหน้าที่อะไรหรือมีลำดับเบสเป็นอย่างไร restriction map ที่ได้จึงเป็น physical map ไม่ใช่ genetic map.

ข้อมูลที่ได้จาก restriction map นี้ จะทำให้รู้ว่าเราควรจะศึกษาชิ้น DNA นี้ได้อย่างไร เช่นส่วนไหนที่เราสนใจก็อาจตัดเอาเฉพาะส่วนนั้นไป subclone ต่อ หรือถ้ามีส่วนที่เป็นยีนก็อาจตัดเฉพาะส่วนที่เป็นยีนเพื่อนำไป subclone ต่อ ใน expression vector ที่เหมาะสมเพื่อดูผลผลิตที่เป็นโปรตีนของยีนนี้ การเปรียบเทียบ restriction map ระหว่าง cDNA กับยีนเดียวกันที่ clone ได้จาก genomic DNA ก็จะทำให้เราทราบว่าส่วนใดในชิ้น DNA เป็น exon และส่วนใดเป็น intron เป็นต้น

การทำ restriction map จะเริ่มด้วยการนำ DNA มาตัดด้วย เอนไซม์ restriction endonucleases ชิ้น DNA ที่ตัดได้จะนำมาแยกออกจากกันด้วย gel electrophoresis ซึ่งจะทำให้ DNA แยกตามขนาด DNA ชิ้นสั้น จะวิ่งเร็วกว่า DNA ชิ้นยาว หลังจากย้อม gel ด้วย ethidium bromide เราจะสามารถมองเห็นชิ้น DNA ได้โดยอาศัยแสง UV ขนาดของ DNA ทราบได้จากการใช้ DNA marker (ซึ่งทราบขนาด) วิเคราะห์เทียบใน gel เดียวกัน

รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสร้าง restriction map จากชิ้นของ DNA ขนาด 7.0 kb. ที่ถูก clone ไว้ ในตัวอย่างนี้ ชิ้นของ DNA มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ Hind III และ Sal I เราจะเริ่มต้นด้วยการนำ DNA ที่ clone ไว้มา 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างแรกตัดด้วย Hind III ตัวอย่างที่สองตัดด้วย Sal I ส่วนตัวอย่างที่สามตัดด้วยทั้ง Hind III และ Sal I ชิ้นของ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์เหล่านี้ และ DNA marker ที่ทราบขนาดจะถูกนำมาแยกออกจากกันด้วย gel electrophoresis. ซึ่งจะทำให้ประมาณขนาดของชิ้น DNA ในตัวอย่างได้ ในการสร้าง restriction map, เราจะดูจากขนาดของชิ้น DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ ดังนี้

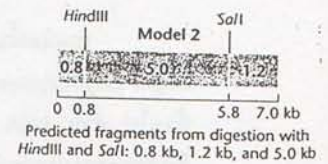
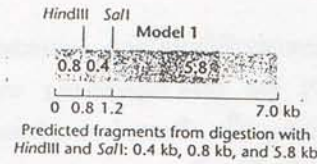
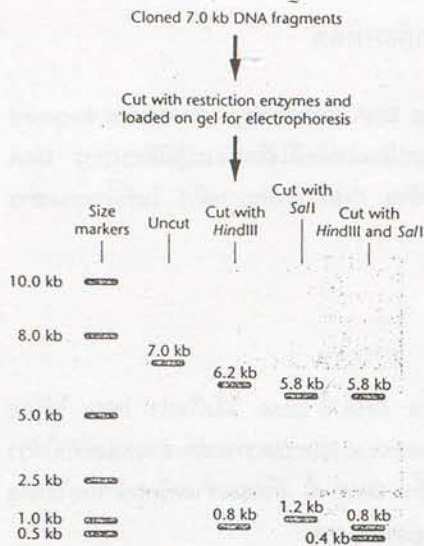
1. เมื่อตัดชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ Hind III จะได้ DNA 2 ชิ้น ขนาด 0.8 kb. และ 6.2 kb. ซึ่งแสดงว่าชิ้น DNA นี้มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย Hind III 1 ตำแหน่ง
2. เมื่อตัดชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ Sal I จะได้ DNA 2 ชิ้นเช่นกันขนาด 1.2 kb. และ 5.8 kb. ซึ่งแสดงว่าชิ้น DNA นี้มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย Sal I 1 ตำแหน่ง

จาก 2 ตัวอย่างนี้แสดงว่า DNA ชิ้นนี้มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย Hind III และ Sal I อย่างละ 1 ตำแหน่ง แต่ความสัมพันธ์ของตำแหน่งทั้ง 2 บนชิ้น DNA นี้เรายังไม่รู้ ข้อมูลเฉพาะตรงนี้ทำให้เราคาดได้ว่า ชิ้น DNA อาจมีตำแหน่งของเอนไซม์ทั้ง 2 เป็นแบบ model ที่ 1 หรือ model ที่ 2 (ในรูปที่ 1)

ใน model ที่ 1 ตำแหน่ง Hind III อยู่ห่างจากปลายข้างหนึ่งของ DNA 0.8 kb. และตำแหน่งของ Sal I อยู่ห่างจากปลายข้างเดียวกันนี้ 1.2 kb. ส่วน model ที่ 2 ตำแหน่ง Hind III อยู่ห่างจากปลายข้างหนึ่งของ DNA 0.8 kb. เช่นเดียวกับใน model ที่ 1 แต่ ตำแหน่ง Sal I อยู่ห่างจากปลายอีกข้างหนึ่ง 1.2 kb.

การที่จะดูว่า model ใดถูก เราจะต้องมาดูผลของการตัด DNA ชิ้นนี้ด้วยเอนไซม์ ทั้ง 2 พร้อมกัน model ที่ 1 จะทำให้มี DNA ที่เกิดจากการย่อย 2 เอนไซม์พร้อมกันมีขนาดเป็น 0.4, 0.8, และ 5.8 kb. ในขณะที่ model 2 จะ

ทำให้ DNA ที่เกิดจากการย่อย 2 เอนไซม์ พร้อมกันมีขนาดเป็น 0.8, 1.2 และ 5.0 kb. จะเห็นได้ว่าผลที่ได้จากการตัดชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ 2 ตัว พร้อมกัน เป็น 5.8, 0.8 และ 0.4 kb. แสดงว่า model ที่ 1 ถูกต้อง



Fragments generated by cutting with HindIII and SalI are 0.4, 0.8 and 5.8 kb in length, indicating that model 1 is correct.

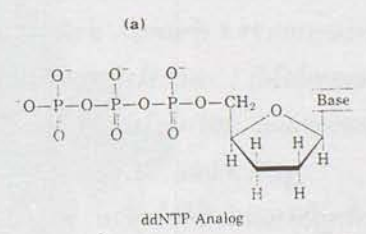
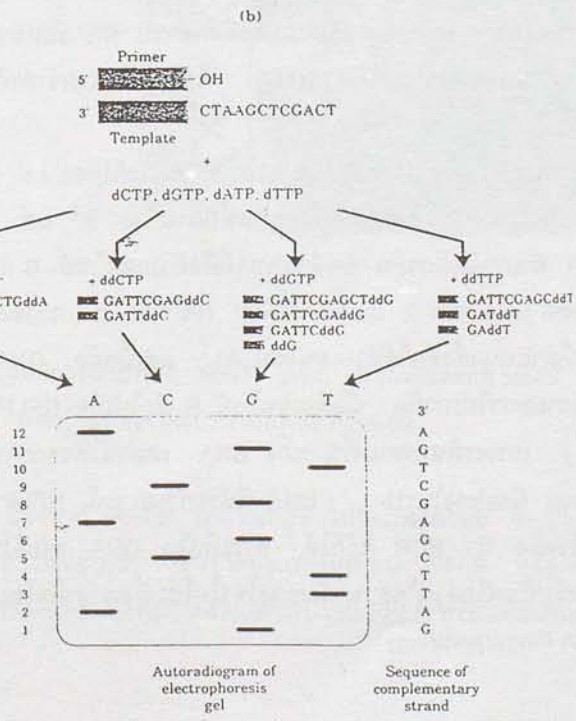
รูปที่ 1 DNA ที่ clone ไว้ถูกตัดด้วย RE แล้ววิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis เทียบกับ DNA marker ผลจากการตัดด้วย RE แต่ละตัวถูกนำมาสร้าง restriction map ได้แก่ model ที่ 1 และ 2 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ตัวทำให้รู้ว่า model ที่ 1 ถูกต้อง

ตัวอย่างที่ให้นี้เป็นตัวอย่างแบบง่าย ๆ การทำ restriction map จะใช้เอนไซม์หลายตัวและงานจะค่อนข้างยุ่งยาก restriction map เป็นการวิเคราะห์คุณสมบัติของ DNA แบบหนึ่ง และเมื่อเราใช้เทคนิคนี้ร่วมกับเทคนิคอื่น จะทำให้หาขอบเขตและขนาดของยีนได้ ทำให้เรารู้ว่ายีนประกอบด้วยส่วนไหนบ้างและส่วนไหนมีหน้าที่อย่างไรเช่น รู้ว่าตรงไหน เป็น Flanking regions, หรือตรงไหนเป็น promotor region เป็นต้น mapping ยังเป็นจุดเริ่มต้นในการเตรียม ยีนจาก DNA ที่ clone ได้ และยังสามารถช่วยให้เราหาตำแหน่งของ mutation ในยีนได้อีกด้วย

DNA sequencing

โดยทั่วไปขั้นตอนสุดท้ายของการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติของ DNA ที่ clone ได้หรือทำ PCR ได้ก็คือการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้น DNA นั้น จากการทราบลำดับเบสของ DNA จะทำให้เราสามารถเข้าใจถึงโครงสร้างและกลไกที่ควบคุมการทำงานของยีนได้ เทคนิคในการวิเคราะห์ว่า DNA ประกอบด้วยเบสอะไรบ้างได้พัฒนาไว้ตั้งแต่ทศวรรษ 40 แต่การพัฒนาหาลำดับเบสนั้นเกิดขึ้นในช่วงทศวรรษ 60 ในปี 1965 Robert Holley ได้หาลำดับเบสใน tRNA ชนิดหนึ่งซึ่งประกอบด้วย 74 เบส งานนี้ต้องใช้ความพยายามเป็นเวลาถึง 1 ปีจึงแล้วเสร็จ ในทศวรรษ 70 ได้มีความพยายามที่จะหาลำดับเบสใน DNA อีก การพัฒนาคราวนี้ทำให้เราสามารถหาลำดับเบสได้นับพันเบสในช่วงเวลาหนึ่งสัปดาห์ ปัจจุบันได้มีเครื่องมือหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) ทำให้มีผู้คาดการณ์ว่า ในอนาคตอันใกล้เราจะสามารถหาลำดับเบสใน DNA ได้นับเป็นพันๆ เบส ในเวลาเพียงวันเดียว การหาลำดับเบสใน DNA ถูกพัฒนาได้สำเร็จในปี 1977 มี 2 วิธี วิธีหนึ่งเป็นวิธีทางเคมีพัฒนาโดย Alan Maxam และ Walter Gilbert วิธีนี้เป็นการใช้สารเคมีตัด DNA ที่เบสอย่างจำเพาะเจาะจง (Base-specific chemical cleavage) และวิธีนี้ได้ถูกใช้ในการหาลำดับเบสจำนวน 4,362 เบสในพลาสมิด pBR 322 อีกวิธีหนึ่งใช้เอนไซม์ (Enzymatic method) ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Fredrich Sanger และคณะ วิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่าโมเลกุลของ DNA ถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ DNA polymerase I ในทิศทางจาก 5' ไป 3' การหาลำดับเบสทั้ง 2 วิธีเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสาย DNA (สายเดี่ยว) ที่มีความยาวต่าง ๆ กัน และปฏิกิริยาต้องทำแยกกันเป็น 4 หลอดสำหรับเบสแต่ละตัวจากนั้นสาย DNA เหล่านี้จะถูกแยกออกจากกันด้วย gel electrophoresis แต่ละปฏิกิริยาจะแยกวิเคราะห์เรียงกัน ใน 4 ช่องของ gel ผลที่ได้คือจะเกิดแถบของเส้น DNA

เรียงกันแบบขั้นบันไดใน gel สาย DNA เหล่านี้จะแยกออกจากกันได้แม้จะมีความแตกต่างกันเพียง 1 เบส ก็ตาม จากนั้นลำดับเบสก็จะอ่านได้จากแถบ DNA เหล่านี้ ในที่นี้จะขอลำดับเบสเพิ่มเติมเฉพาะการหาลำดับเบสโดยวิธีของ Sanger และคณะ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลาย วิธีนี้สาย DNA ที่จะหาลำดับเบสจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้นมาโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase I และต้องอาศัย dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP) ซึ่งที่ตำแหน่ง 3' (ของ ribose) จะเป็น 3'-H แทน 3'-OH (รูป 2 a แสดงโครงสร้างของ ddNTP) ทำให้นิวคลีโอไทด์นี้สามารถเข้าไปต่อสาย DNA ที่กำลังสังเคราะห์ได้ แต่นิวคลีโอไทด์ตัวถัดไปจะเข้ามาต่อไม่ได้ (เพราะที่ตำแหน่ง 3' ของ ribose เป็น -H แทน -OH ดังกล่าว) ทำให้การสังเคราะห์สาย DNA ต้องหยุดลงตรงตำแหน่งที่มันเข้าไปต่อ ดังนั้นวิธีการหาลำดับเบสนี้จึงเรียกว่า Dideoxy chain termination method (เพราะว่า เกิด DNA chain termination จาก dideoxynucleotides) การหาลำดับเบสโดยวิธีนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 b ในแต่ละปฏิกิริยา (4 ปฏิกิริยาสำหรับเบสทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้น) จะประกอบด้วย DNA ที่เป็นแม่แบบ, primer 1 ข้าง, เอนไซม์ DNA polymerase, deoxynucleotide (dNTP) ทั้ง 4 ตัว (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) และ dideoxynucleotide 1 ตัว สำหรับแต่ละปฏิกิริยา เพื่อเป็นตัวยุติ (DNA chain terminator) การสร้างสาย DNA ในแต่ละปฏิกิริยา dideoxynucleotide นี้จะมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดเพื่อให้การหยุดปฏิกิริยาสร้างสาย DNA เป็นการหยุดแบบสุ่ม ซึ่งจะทำให้สาย DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมีความยาวไม่เท่ากัน (ขึ้นอยู่กับว่า dideoxynucleotide บังเอิญเข้าไปที่ตำแหน่งใด) และแต่ละสายที่มีความยาวเท่ากันก็จะมีอยู่ปริมาณหนึ่ง ยกตัวอย่างเช่น ในปฏิกิริยาที่ใช้ ddGTP จะมีการสร้างสาย DNA ที่หยุดตรงตำแหน่งที่เป็นเบส dGTP การหยุดเป็นการหยุดแบบสุ่มเพราะฉะนั้น บางครั้งก็จะได้สาย DNA ที่ยาวหรือสั้นมากน้อยต่างกันไปแล้วแต่ตรงตำแหน่ง dGTP นั้น ได้มี dGTP เข้าไป หรือ ddGTP เข้าไป ถ้า dGTP เข้าไปก็จะมีการสร้างสาย DNA นั้นต่อได้ แต่ถ้า ddGTP เข้าไปก็การสร้างสาย DNA นั้นก็ต้องหยุดลง เป็นต้น หลังจากนั้นสาย DNA เหล่านี้ในแต่ละปฏิกิริยาจะถูกนำมาแยกออกจากกันด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผลที่ได้จะดูด้วยเทคนิค autoradiography โดยที่เราอาจติดฉลาก primer ไว้ด้วย ^{32}P (ด้วยเอนไซม์ DNA polynucleotide kinase) ก่อนทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบส หรือเราอาจใช้นิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งที่ติดฉลากด้วย ^{32}P หรือ ^{35}S (ในขณะที่ทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบส) ก็ได้ ถ้าเราไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีดังที่กล่าวมา เราก็อาจนำ gel มาย้อมด้วยเทคนิค silver stain ก็ได้ กรณีที่ใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวจะถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์แทนสารรังสี



รูปที่ 2 (a) โครงสร้างของ dideoxynucleoside triphosphate (b) การหาลำดับเบส โดยวิธีของ Sanger และคณะ

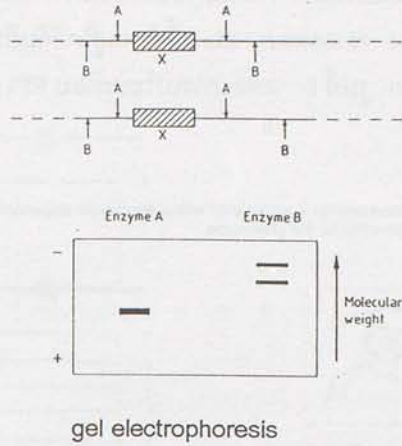
การหาลำดับเบสโดยวิธีนี้มักเกิดปัญหาจากการที่ DNA ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดย DNA Polymerase I มีจำนวนน้อยทำให้ผลที่ได้อ่านยากเพราะแถบของ DNA ใน autoradiogram ไม่เข้มพอ จึงได้มีการนำเทคนิค PCR มาช่วยเพิ่มการสังเคราะห์สาย DNA ในปฏิกิริยาการหาลำดับเบส เทคนิคนี้เรียกว่า PCR cycle sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวมเทคนิค PCR กับเทคนิคของ Sanger เข้าด้วยกัน โดยเทคนิคนี้, สาย DNA จะถูกสังเคราะห์ด้วย Taq DNA polymerase และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA นี้ จะถูกปล่อยให้เกิดขึ้นเป็นจำนวนหลายๆ รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณของสาย DNA ซึ่งจะทำให้แถบของ DNA ใน autoradiogram (หรือจากการย้อมด้วย Silver stain) เข้มมากขึ้นจนเห็นแถบ DNA ได้ชัดเจน

เทคนิคการหาลำดับเบสใน DNA ได้นำมาซึ่งความรู้เกี่ยวกับยีน เกี่ยวกับการจัดเรียงลำดับของส่วนต่างๆ ของยีน รวมถึงส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ทำให้ได้ข้อสรุปว่ายีนและโปรตีนมีความสัมพันธ์กันอย่างไร ยีนที่กลายพันธุ์มีผลต่อโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์อย่างไร ลำดับเบสในยีนทำให้เราประเมินได้ว่าโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ควรจะเป็นอย่างไรมีหน้าที่ใด มีขนาดใด มีจำนวนโดเมนเท่าใดและแต่ละโดเมนมีลักษณะและทำหน้าที่อย่างไร นอกจากนี้เรายังสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนชนิดเดียวกันแต่ต่าง species หรือในทางกลับกันเราอาจประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง species ได้โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ DNA ที่ให้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำหน้าที่แบบเดียวกัน

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

ความแตกต่างของ Restriction map ในยีน DNA ซึ่งทำหน้าที่แบบเดียวกัน (เช่นเกี่ยวข้องกับการผลิตหรือให้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน) แต่มาจากแหล่งต่างกันทำให้เกิด Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ความแตกต่างนี้เป็น DNA polymorphism ที่เกิดจากการที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไปทำให้ตำแหน่งที่ตัดด้วย restriction endonuclease (RE) หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ เมื่อตัดชิ้น DNA นี้ด้วย RE จึงทำให้เรามองเห็น polymorphism ของ DNA จากความยาวของสาย DNA ที่แตกต่างกันหลังการตัด ดังนั้น DNA polymorphism แบบนี้จึงถูกเรียกว่า restriction fragment length polymorphism ดังกล่าว การเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีผล (mutation) หรือไม่มีผล (neutral polymorphism) ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนก็ได้ ในใจโนมของคนที่ได้มีการพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบที่ไม่มีผลต่อโปรตีนประมาณทุกๆ 1 ใน 200 เบส ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่ได้โค๊ดโปรตีน นอกจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งแล้ว การเปลี่ยนแปลงของ DNA ที่เป็นการขาดหายไป (deletion) หรือการเพิ่มเข้ามา (insertion) ของเบสมากกว่า 1 ตำแหน่ง ล้วนทำให้เกิด RFLP ได้ทั้งสิ้นถ้าหากว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมี RE ที่เหมาะสมตัดได้ (หรือเคยตัดได้) อย่างไรก็ตามบาง polymorphism ก็ไม่สามารถทำให้เกิด RFLP ได้ ถ้าหากว่าลำดับเบสของ polymorphism เหล่านั้นไม่มี RE ที่ตัดได้

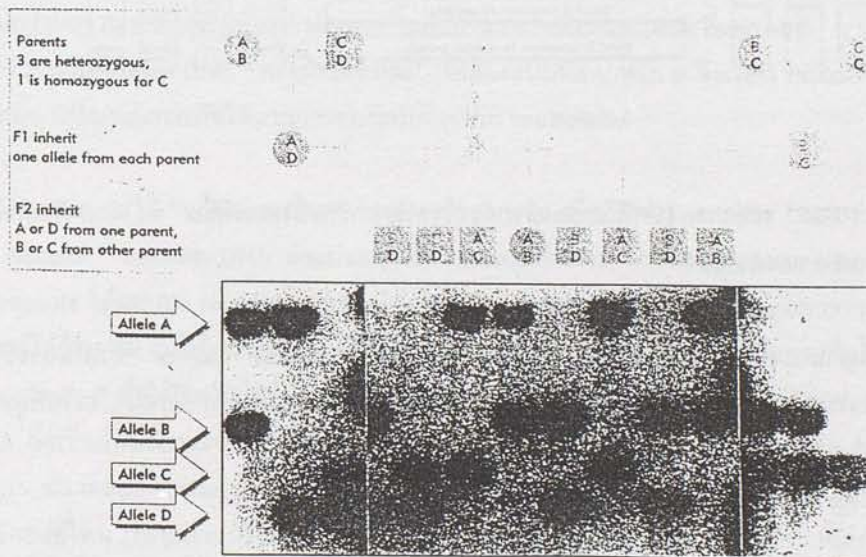
รูปที่ 3 แสดงถึงหลักการของ RFLP ในรูปแสดงให้เห็น DNA 2 สาย (2 alleles) ที่ต่างก็โค๊ดยีน x เหมือนกัน และทั้งคู่มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE 'A' และ 'B' อย่างละ 2 ตำแหน่งอยู่นอกยีนที่ปลายข้าง 5' และ 3' ตามลำดับ ยีน (alleles) ทั้ง 2 ถูกตัดได้ด้วย เอนไซม์ A ตำแหน่งเดียวกัน แต่ตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ B แตกต่างกันอยู่หนึ่งตำแหน่ง (ที่นอกยีนปลายข้าง 3') ดังนั้นเมื่อตัด DNA ของ 2 alleles นี้ด้วย เอนไซม์ A จะได้สาย DNA ขนาดเท่ากันไม่มีความแตกต่าง (ไม่มี polymorphism ที่ตำแหน่งซึ่งตัดได้ด้วยเอนไซม์ A) แต่เมื่อตัด DNA ของ 2 alleles นี้ด้วยเอนไซม์ B จะได้สาย DNA ที่มีความยาวไม่เท่ากัน นั่นคือเอนไซม์ B ทำให้เกิด RFLP (เพราะมี polymorphism ที่ตำแหน่งซึ่งอยู่นอกยีนปลายข้าง 3') เราจะเห็นแพทเทิร์น ของ DNA เหล่านี้ได้จากการนำ DNA ที่ตัดแล้วมาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ดังแสดงในรูป DNA ที่นำมาวิเคราะห์ RFLP อาจเป็น DNA จากจีโนมเลย หรืออาจเป็น DNA ที่ clone ไว้หรือ ทำ PCR ไว้ก็ได้ กรณีที่เป็น DNA จากจีโนมเราจะดู RFLP ได้จากการใช้ DNA probe ที่เหมาะสมสำหรับยีนหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมซึ่งเราสนใจโดยใช้เทคนิค Southern Blotting (จะขอกล่าวถึงเทคนิคนี้ในเรื่อง DNA Fingerprinting)



รูปที่ 3 แสดงหลักการของ RFLP

gel electrophoresis

เราสามารถนำ RFLP หรือตำแหน่งการตัดของ RE (restriction site) เป็น genetic marker ได้ RFLP จะถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบลักษณะเด่น (codominant alleles) ตามกฎของเมนเดล ดังนั้นเราจึงสามารถติดตามดู genotype ที่เห็นได้จาก RFLP หรือ restriction site จากคนรุ่นหนึ่งไปยังคนอีกรุ่นหนึ่งในตระกูลเดียวกันได้ แบบเดียวกับที่เราติดตาม phenotype รูปที่ 4 แสดงให้เห็น RFLP ซึ่งถูกถ่ายทอดตามกฎของเมนเดลในคน 3 รุ่น

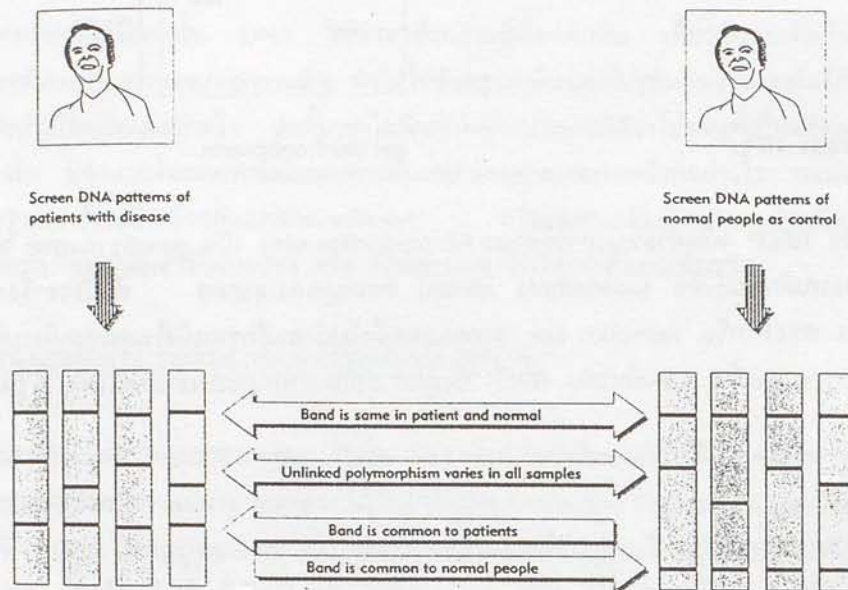


รูปที่ 4 แสดงการถ่ายทอด RFLP หรือ polymorphism ของสี่ alleles (A, B, C และ D) ที่เกิดจาก restriction site ในคน 3 รุ่น การถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล

เนื่องจาก RFLP เกิดขึ้นอยู่ทั่วไปในโครโมโซม จึงเป็นไปได้ว่าบาง RFLP อาจอยู่ใกล้กับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางพันธุกรรม ถ้าเราลองเปรียบเทียบ RFLP หรือ restriction map ระหว่างคนปกติและคนป่วยด้วยโรคพันธุกรรมโรคใดโรคหนึ่งที่เราสนใจแล้วพบว่า RFLP หรือมีตำแหน่งของ restriction site หนึ่งแตกต่างกันอยู่ตลอดเวลา

เช่นพบว่ามี RFLP ที่เป็นลักษณะเฉพาะของผู้ป่วยหรือมีตำแหน่ง restriction site ที่พบเสมอในผู้ป่วย แต่ไม่พบเลยในคนปกติแสดงว่าตำแหน่งของ restriction site นี้ต้องอยู่ใกล้กับยีนกลายพันธุ์ที่ก่อโรคนั้น จึงทำให้ไม่เคยแยกจากกัน โดยขบวนการ recombination รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบ RFLP ระหว่างคนปกติ และคนป่วยด้วยโรคพันธุกรรม

If a restriction marker is associated with a phenotypic characteristic, the restriction site must be located near the gene responsible for the phenotype.

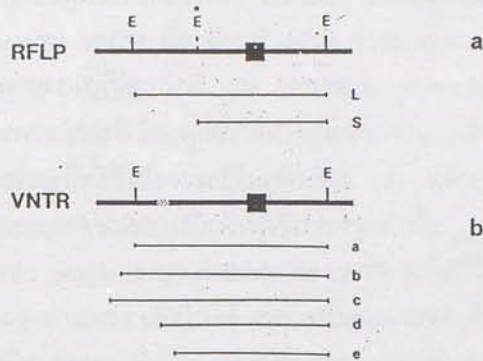


รูปที่ 5 เปรียบเทียบ RFLP ระหว่างคนปกติและคนป่วยด้วยโรคพันธุกรรมซึ่งสมมติขึ้น ทั้งคนปกติและคนป่วยต่างก็มี RFLP ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของตัวเอง

ในกรณีเช่นนี้เราสามารถนำ restriction site หรือ RFLP นั้น มาเป็น marker ช่วยในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมดังกล่าวได้ในขณะเดียวกันเราอาจใช้ marker นี้ติดตามศึกษา ยีนกลายพันธุ์ที่ก่อโรคนั้น ได้ในที่สุด.

DNA FINGERPRINTING

หลังจาก RFLP แล้ว ได้มีการพบ DNA polymorphism แบบอื่นอีก เรียกว่า "variable number of tandem repeats" (VNTR) RFLP เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ทำให้มีการหายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ของตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE ดังกล่าวแล้ว และเมื่อดูความแตกต่างนี้จะเห็นชั้น DNA หลังการตัดเป็นสองแบบคือชั้นเล็ก (S) หรือชั้นใหญ่ (L) แล้วแต่ตำแหน่งการตัดที่เปลี่ยนแปลงไปเราเรียก polymorphism แบบนี้ว่าเป็น "biallelic" (ดูรูปที่ 6 a. ประกอบ) VNTR เกิดจากการที่มีเบสจำนวนหนึ่งซึ่งเป็น repetitive DNA เกิดขึ้นและเรียงตัวซ้ำๆกัน (tandem repeats) แทรกอยู่ระหว่างสองตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE และเมื่อเราตัดชั้น DNA นี้ด้วย RE ดังกล่าวจะทำให้เกิด polymorphism แบบที่เรียกว่า "multiallelic" เพราะหลังการตัดจะมีสาย DNA เกิดขึ้นได้มากกว่าสองขนาด ขึ้นอยู่กับว่ามีเบสซ้ำดังกล่าวแทรกอยู่มากน้อยแค่ไหนระหว่างตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE (ดูรูป 6 b. ประกอบ)



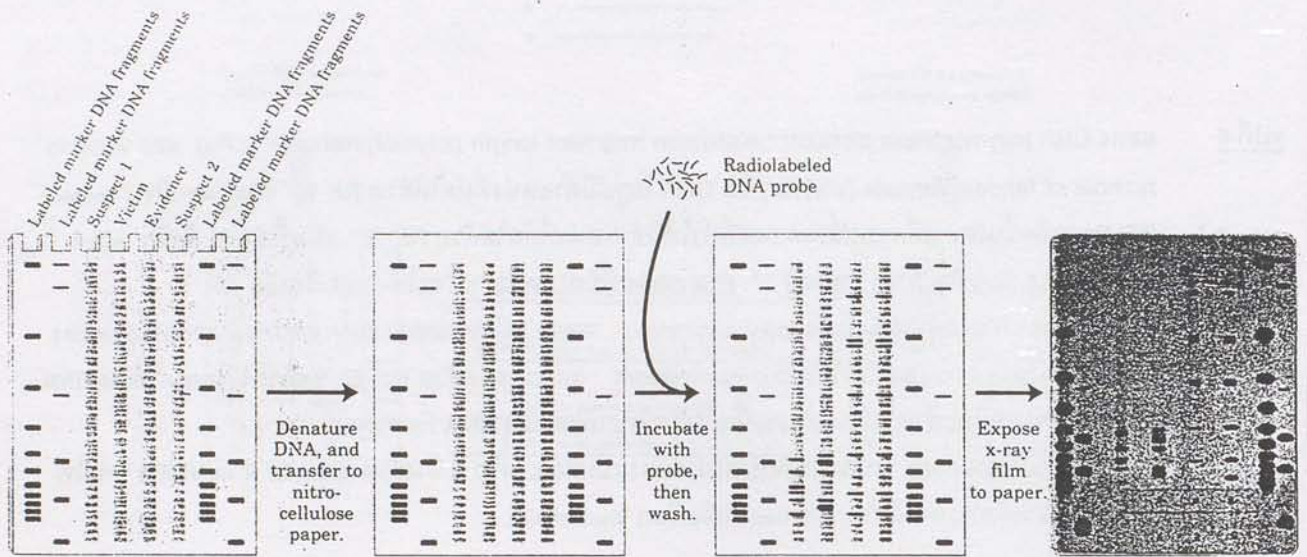
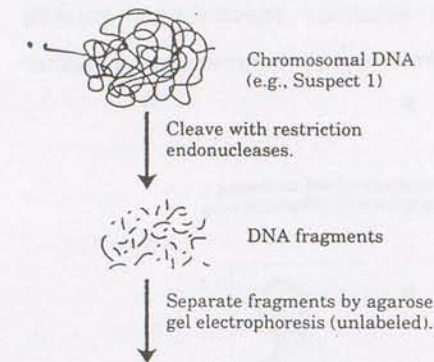
รูปที่ 6

แสดง DNA polymorphism สองแบบ : restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) และ variable number of tandem repeats (VNTRs) ชิ้น DNA ในรูปมีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE 'E' ซึ่งอยู่นอกยีน (■)

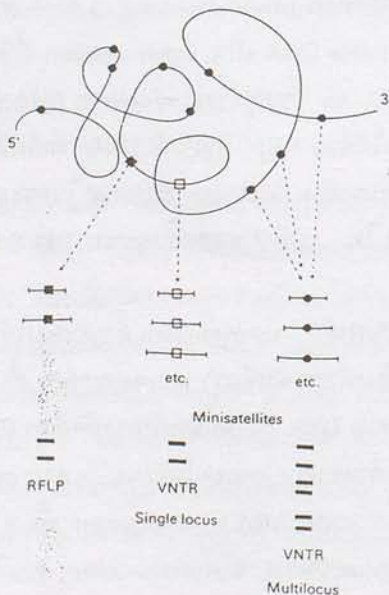
- RFLPs : เกิดขึ้นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE "E" เพิ่มขึ้น (*E) ดังนั้น allele ที่ไม่มีตำแหน่ง *E จะให้ DNA ชิ้นใหญ่ 'L' ส่วน allele ที่มีตำแหน่ง *E จะให้ DNA ชิ้นเล็ก 'S'
 - VNTR : เกิดจากตรงตำแหน่งที่เป็น polymorphism (■) มี repetitive DNA แทรกอยู่ การเปลี่ยนแปลงของจำนวน repetitive DNA ทำให้เกิด polymorphism หลังการตัดด้วย RE 'E' จะทำให้มีโอกาสดูชิ้น DNA ที่มีความยาวมากน้อยต่างกันหลายขนาดขึ้นกับจำนวน repetitive DNA ที่แทรกอยู่
- RFLP ทำให้เกิดชิ้น DNA หลังการตัดเป็นไปได้อสองแบบคือ L หรือ S จึงเรียก 'biallelic' ส่วน VNTR ทำให้เกิดชิ้น DNA หลังการตัดได้มากกว่าสองแบบจึงเรียก 'multiallelic'

ในจีโนมของคนมี "repetitive DNA" อยู่สองแบบ พวกหนึ่งเรียกว่า satellite DNA ส่วนอีกพวกหนึ่งเรียกว่า Interspersed repeats. Satellite DNA ยังแบ่งออกเป็น Microsatellites, Minisatellites และ Macrosatellites ส่วน Interspersed repeats ได้แก่ Alu repeats และ Kpn (หรือ L1) repeats การพบว่า DNA polymorphism มีหลายแบบซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วย RE ทำให้เกิดแนวความคิดในการนำเอาการวิเคราะห์แบบนี้มาใช้ในการพิสูจน์บุคคล วิธีการนี้เรียกว่า "DNA fingerprinting" ซึ่งได้เริ่มต้นในปี 1985 เมื่อ Jeffreys แสดงให้เห็นว่า minisatellite DNA สามารถทำให้เกิดแพทเทิร์นของ DNA ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละคนได้ minisatellite DNA เป็น polymorphism ที่มีประโยชน์มากในงานด้านนิติเวชวิทยา ขนาดของ minisatellite จะมีได้ตั้งแต่ 1 ถึง 30 kb ขึ้นอยู่กับว่า repetitive DNA ที่เป็นแกน (common core) มีมากน้อยแค่ไหน (ในระหว่างตำแหน่งสองตำแหน่งที่ตัดได้ด้วย RE) ในกรณี DNA ที่เกิดขึ้นหลังการตัดเป็นชิ้นใหญ่เพราะมี repetitive DNA ที่เป็นแกนจำนวนมาก เราต้องใช้เทคนิค Southern Blotting ในการดูผล แต่ถ้าขนาดของ DNA ที่เกิดขึ้นหลังการตัดมีขนาดเล็กเราสามารถใช้นี้เทคนิค PCR ได้ รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการทำ Southern Blotting ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้ในงาน DNA fingerprinting

Polymorphism ที่ได้จาก minisatellite จะเป็นแบบ "VNTR" minisatellites อาจจะได้ทั้งแบบ "multilocus" (พบหลายตำแหน่งในจีโนม) และ "single locus" (พบในจีโนมเพียงตำแหน่งเดียว) polymorphism ที่เกิดจาก minisatellite แบบ multilocus จะเป็นแบบ multiallelic VNTR กล่าวคือจะมีสาย DNA ที่เกิดขึ้นหลังการตัดด้วย RE หลายขนาดขึ้นอยู่ กับจำนวนของ repetitive DNA ที่เป็นแกนและขึ้นอยู่กับการจำนวนตำแหน่ง (locus) ในจีโนม ส่วน polymorphism ที่เกิดจาก minisatellite แบบ single locus จะเป็นแบบ biallelic รูปที่ 8 แสดง DNA polymorphism ทั้ง 3 แบบเปรียบเทียบกัน คือ RFLP, single locus VNTR จาก minisatellites และ multilocus VNTR จาก minisatellites เช่นกัน



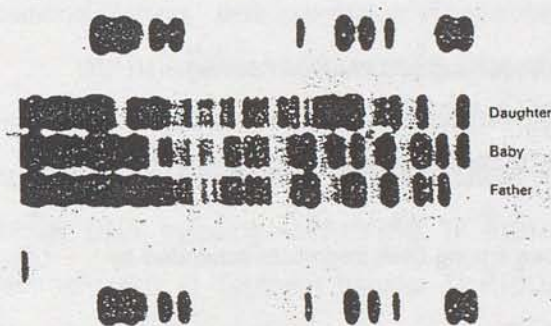
รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนของเทคนิค Southern Blotting
ซึ่งใช้หลักการเดียวกับการทำ Colony Hybridization
ในที่นี้เป็นกรนำเทคนิค Southern Blotting มาใช้ทำ
DNA Fingerprint



รูปที่ 8 แสดง DNA polymorphism 3 แบบ คือ
RFLP, single locus VNTR และ multilocus VNTR
จาก minisatellites

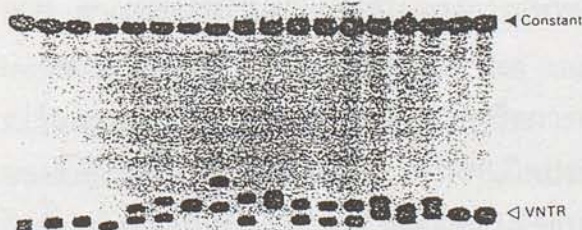
โอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างสอง alleles โดยดูจาก polymorphism ที่เกิดจาก minisatellites นั้นสูงมาก เราสามารถนำแพทเทิร์นของ polymorphism ที่เกิดจาก minisatellites แบบ multilocus VNTR มาใช้เป็น "DNA fingerprint" ในการพิสูจน์บุคคล (เช่นบุคคลผู้ต้องสงสัยในคดีฆาตกรรม) หรือพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกได้ อย่างไรก็ตามการใช้ multilocus minisatellite VNTR นั้นค่อนข้างยาก ด้วยเหตุผลบางประการได้แก่ (1) ในแง่เทคนิคต้องมีความชำนาญเพื่อให้ได้แพทเทิร์นของ DNA ออกมาดี (2) เทคนิค Southern Blotting ต้องการปริมาณ DNA ค่อนข้างมาก ในกรณีพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่ และลูกจะไม่ใช่ปัญหาแต่ในกรณีที่เป็นการคดีฆาตกรรม ตัวอย่างที่ได้จากที่เกิดเหตุ มักจะมีปริมาณจำกัดทำให้ DNA ที่สกัดได้อาจจะมีไม่เพียงพอ (3) แพทเทิร์นของ DNA ที่ได้จะมีจำนวนสาย DNA เกิดขึ้นจำนวนมาก ทำให้การอ่านผลค่อนข้างยาก ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเท่านั้น

ด้วยเหตุดังกล่าวทำให้มีการนำ single locus minisatellite VNTR มาใช้ VNTR แบบนี้ เป็น biallelic ดังนั้นจึงได้มีการใช้ VNTR แบบนี้ประมาณ 4-6 ตำแหน่ง เพื่อให้ได้ แพทเทิร์นของ DNA ที่มี polymorphism สูง และเป็นแพทเทิร์นเฉพาะบุคคล ในบางกรณีโอกาสที่คนสองคน จะมีแพทเทิร์นซ้ำกันจากการใช้ VNTR แบบนี้หลายๆ ตำแหน่งอาจเป็นไปได้เพียง 1 ในล้านเท่านั้น รูปที่ 9 แสดงการใช้ multilocus minisatellite VNTR ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่าง พ่อ, ลูก และหลาน ส่วนรูปที่ 10 แสดง single locus minisatellite VNTR



รูปที่ 9 แสดง DNA fingerprints ซึ่งใช้ DNA probe สำหรับ multilocus minisatellite VNTR

แพทเทิร์นของ DNA ในสามช่องตรงกลางเป็นของลูกสาว, ลูกของลูกสาว และพ่อ (ซึ่งมีศักดิ์เป็นปู่ของเด็กที่เกิดจากลูกสาว) แพทเทิร์นของ DNA จากทั้ง 3 ตัวอย่าง มีบางส่วนที่เหมือนกันคือ พ่อและลูกสาวเหมือนกัน 62 % ส่วนพ่อและลูกของลูกสาว เหมือนกัน 78 % ผลที่ได้นี้ แสดงว่าพ่อคนนี้เป็นพ่อของเด็กที่เกิดจากผู้ที่เป็นลูกสาวด้วย



รูปที่ 10 แสดงแพทเทิร์นของ DNA ที่เกิดจาก single locus minisatellite VNTR แต่ละ VNTR ที่เห็นมาจากสอง alleles ของยีนหนึ่ง (immunoglobulin heavy chain gene) ในที่นี้จะเห็นว่า แต่ละคนมี DNA ชิ้นใหญ่ที่มีขนาดเท่ากันหมด (Constant band) และมี polymorphism (VNTR) ซึ่งทำให้เห็น DNA ชิ้นเล็ก 2 ชิ้นที่ต่างจากกันทุกคน

ในสหรัฐอเมริกา DNA fingerprints ได้ถูกใช้เป็นหลักฐานในศาลตั้งแต่ปี 1988 ผลที่ได้จาก DNA fingerprints จะต้องถูกนำมาวิเคราะห์และตีความโดยอาศัยการคำนวณทางสถิติ (statistics), โอกาสของความน่าจะเป็น (probability) และประชากรพันธุศาสตร์ (population genetics) VNTR allele แต่ละตำแหน่งจะถูกคำนวณว่ามีโอกาสพบบ่อยเพียงใดในประชากรทั่วไป เมื่อนำ VNTR จากหลาย alleles มาใช้ก็จะทำให้เราสามารถหาได้ว่า DNA fingerprint ที่เกิดขึ้นจะพบได้บ่อยเพียงใดในประชากรทั่วไป ยิ่งใช้ VNTR มากตำแหน่ง ก็จะทำให้ DNA fingerprint ที่ได้เป็นลักษณะเฉพาะบุคคลใดบุคคลหนึ่งมากขึ้น โอกาสที่จะพบในประชากรทั่วไปก็จะลดลง ยกตัวอย่างเช่น ถ้า VNTR 3 ตำแหน่ง มีโอกาสพบในประชากรทั่วไปเป็น 1 ใน 300, 1 ใน 100 และ 1 ใน 1,000 ตามลำดับ DNA fingerprint ที่ได้จากการใช้ VNTR ทั้ง 3 ตำแหน่งนี้รวมกันจะมีโอกาสพบในประชากรทั่วไปเพียง 1 ใน 30 ล้านคน เท่านั้น คาดกันว่าในอนาคต DNA fingerprint จะเข้ามามีบทบาทสำคัญอย่างมากในงานด้านนิติเวชวิทยา ทำให้เทคโนโลยีนี้ กำลังได้รับความสนใจ และมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลา

เอกสารอ้างอิง

- 1) Klug WS and Cummings MR (1997). Concepts of genetics (5th ed). Prentice-Hall, Inc.
- 2) Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993). Principles of Biochemistry (2nd ed.). Worth Publisher.
- 3) Lewin B (1994). Genes V. Oxford University Press.
- 4) Maxam AM and Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 : 560-564.
- 5) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 : 5463-5467.
- 6) Smith HO and Birnstiel ML (1976). A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res.* 3, 2387-2398
- 7) Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517.
- 8) White R *et.al.* (1985). Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* 313, 101-105.
- 9) Winnacker E-L (1987). From genes to clones : Introduction to gene technology. VCH Publishers.

เทคโนโลยีดีเอ็นเอทางการแพทย์

พัชรีย์ วิทยานูวัติ พ.บ., Ph.D.

ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

การนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอมาใช้ในการแพทย์ได้เริ่มมาเป็นเวลากว่า 10 ปีแล้ว ที่เห็นได้ชัดเจนคือ การนำเทคโนโลยีของการเชื่อมต่อยีน (recombinant DNA technology) มาใช้ในการสร้างวัคซีน เป็นต้น ในปัจจุบันนี้ เทคโนโลยีดีเอ็นเอหลายชนิด นอกเหนือจากการเชื่อมต่อยีน ได้เข้ามามีบทบาทในแง่ต่างๆทางการแพทย์มากขึ้น ทั้งในแง่ การป้องกันโรค, การช่วยการวินิจฉัย, การรักษา, การพยากรณ์โรคและการติดตามผลของการรักษา รวมทั้ง การชันสูตรต่างๆในทางนิติเวชวิทยา ในที่นี้ จะยกตัวอย่างของการนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอมาใช้ในการแพทย์ด้านต่างๆ เทคโนโลยีดีเอ็นเอที่นำมาใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบันคือ DNA mapping, DNA amplification, DNA cloning, DNA sequencing, mutation analysis, chromosome analysis, functional and positional cloning, และ expression of recombinant DNA

เทคโนโลยีดีเอ็นเออย่างแรกคือ DNA หรือ gene mapping หมายถึงเทคนิคที่ใช้ดูแบบแผน (pattern) ของยีนที่สนใจภายหลังจากที่ตัดชิ้นดีเอ็นเอนั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งแบบแผนของยีนหรือดีเอ็นเอนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงถ้ายีนนั้นมีการเรียงตัวผิดไป (DNA rearrangement) เทคนิค DNA mapping นี้ต้องอาศัย 1) ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ 2) เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3) electrophoresis 4) Southern transfer 5) ดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) และ 6) autoradiography ตัวอย่างเช่น การตรวจยีน α thalassemia เป็นต้น

เทคนิคต่อไปและเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นประโยชน์อย่างมากคือ เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งเทคนิคนี้แทบจะถือได้ว่าเป็นเทคนิคพื้นฐานในการประยุกต์ใช้กับเทคนิคอื่นๆต่อไปด้วย เทคนิค PCR ยังมีการปรับเปลี่ยนและประยุกต์ในการใช้งานในชื่อต่างๆกัน เช่น multiplex PCR, nested PCR, in situ PCR, RT-PCR, long PCR เป็นต้น เทคนิค PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ได้เกือบทุกด้าน และเป็นส่วนสำคัญของเทคนิค mutation analysis โดยเทคนิค mutation analysis นี้หมายถึง เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดโรคหรือการทำงานผิดปกติของยีนนั้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดโรคหรือการทำงานผิดปกติของยีนนั้น อาจเป็นได้ทั้งแบบที่มีการขาดหายไปตั้งแต่ หนึ่งเบสขึ้นไป (DNA deletion) หรือแบบที่มีการแทนที่เบสตำแหน่งนั้นๆด้วยเบสชนิดอื่น (point mutation, หรือ base substitution) เทคนิคนี้ประกอบไปด้วยการใช้เทคนิคหลายอย่างรวมกัน ได้แก่ physical mapping, DNA cloning หรือ DNA amplification, screening DNA เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ, electrophoresis เพื่อแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ และ DNA sequencing

การตรวจหาการขาดหายไปของยีน (DNA deletion) อาจทำได้ด้วยเทคนิค PCR ในกรณีที่ ดีเอ็นเอที่ขาดหายไปมีขนาดเล็ก ถ้าดีเอ็นเอที่ขาดหายไปมีขนาดใหญ่ขึ้น ก็อาจใช้เทคนิค Southern analysis แต่ถ้าดีเอ็นเอที่ขาดหายไปมีขนาดใหญ่มาก จะต้องใช้เทคนิค PFGE (pulse field gel electrophoresis หรือ FISH (fluorescence in situ hybridisation) สำหรับการตรวจหา point mutation ซึ่งเกิดขึ้นได้มากกว่าและเป็นสาเหตุของโรคมกกว่าการขาดหายไปของดีเอ็นเอนั้น ตรวจได้ยากกว่า และ PCR เป็นเทคนิคที่สำคัญอย่างมากในการตรวจนี้ เทคนิคนี้อาจจะนำมาใช้ เดี่ยวๆ หรือที่นิยมอีกอย่างคือใช้ร่วมกับ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) แล้วดูว่า การเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนที่สนใจนั้น ทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดดีเอ็น เอหรือยีนนั้นได้หรือไม่ แตกต่างจากเมื่อก่อนเกิดการกลายพันธุ์หรือไม่ วิธีนี้อาจเรียกได้ว่าเป็น restriction enzyme analysis แต่ถ้าต้องการดูแบบแผน (pattern) ของยีนด้วยความแตกต่างของ ขนาดของสายดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์แล้ว อาจเรียกได้ว่าเป็นวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) ตัวอย่างของการใช้เทคนิคนี้ในการป้องกันหรือทำนายโรค เช่น การดูแบบ แผนของยีน apo E (apo E genotype) ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสสร้างโปรตีนที่ช่วยในการขนส่งโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดไปยังตับ ทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลง มีความสัมพันธ์กับการ เกิดโรคหัวใจขาดเลือดมาเลี้ยงที่เกิดจากหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบ (coronary heart disease) พบ ว่าผู้ป่วยที่มียีน apo E ที่มีแบบแผน เป็นแบบที่มีความเสี่ยงสูง จะมีโอกาสมีระดับไขมันในเลือด สูงได้มากกว่าผู้ป่วยที่มียีน apo E ที่มีแบบแผนเป็นแบบที่มีความเสี่ยงต่ำ อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ดังนั้นผู้ที่มียีนแบบแผนของยีนนี้เป็นแบบที่มีความเสี่ยงสูง จึงต้องมีการควบคุมอาหาร หรือ ต้องได้รับยาลดไขมันในเลือด และต้องได้รับการติดตามดูแลอย่างเข้มงวดและใกล้ชิด เพื่อปอง กันหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบ และเกิดโรคหัวใจขาดเลือดมาเลี้ยงต่อไป

อีกตัวอย่างหนึ่งได้แก่โรคความจำเสื่อมในผู้ป่วยสูงอายุ (Alzheimer's disease) ในปัจจุบัน พบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคนี้มี 4 ยีนด้วยกันคือ ยีน amyloid precursor, ยีน presinillin 1, ยีน presinillin 2 และยีน apo E ชนิดที่ 4 พบว่าแบบแผนของยีนเหล่านี้ สามารถทำนายการเกิดโรคนี้ เมื่อผู้ป่วยมีอายุมากขึ้นได้

ตารางที่ 1. ตัวอย่างโรคที่สามารถทำนายการเกิดได้ จากการตรวจดูแบบแผนของยีนโดยใช้ เทคนิคโอลลีดีเอ็นเอ

โรค	ยีนที่เกี่ยวข้อง
Hypercholesterolemia	Apo E
Huntington's disease	tandem repeat (CAG) _x
Familial breast cancer	BRCA 1, BRCA 2
Alzheimer disease	Presinillin 1, 2 Amyloid precursor protein Apo E

ส่วนเทคนิคที่ใช้ในการ screening DNA นั้น เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอส่วนต่างๆว่า จะมี mutation เกิดในส่วนนั้นหรือไม่ เทคนิคเหล่านี้ได้แก่ DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), SSCP (single-stranded conformation polymorphism) และ CCM (chemical cleavage of mismatch method) โดยที่เทคนิคเหล่านี้จะบอกให้เราทราบว่าดีเอ็นเอส่วนที่เราศึกษานี้มี mutation อยู่หรือไม่ แต่ถ้าต้องการทราบอย่างละเอียดแน่นอนว่า mutation นั้น เกิดที่ตำแหน่งใด เป็นลักษณะไหน จะต้องทำการตรวจยืนยัน ซึ่งจะได้โดยใช้เทคนิค DNA sequencing โดยที่เทคนิคนี้ถือเป็น gold standard ในการตรวจสอบ mutation อีกเทคนิคหนึ่งที่ใช้ยืนยันการเกิด point mutation ที่มีลักษณะพิเศษคือทำให้ได้ stop codon เมื่อเกิด mutation ขึ้นคือเทคนิค protein truncation test ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในโรคที่เกี่ยวข้องกับยีนที่มีขนาดใหญ่ และเกิด mutation แบบ multiple nonsense หรือ frameshift mutation เช่นในยีน APC (adenomatous polyposis coli) ในโรค familial adenomatous polyposis และ ยีน BRCA 1 ในมะเร็งเต้านมเป็นต้น

การใช้เทคนิค mutation analysis ที่สำคัญอย่างมากในทางการแพทย์อีกด้านหนึ่งคือ ใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรค โรคที่ในปัจจุบันนี้เทคโนโลยีดีเอ็นเอมีส่วนช่วยในการวินิจฉัยคือ โรคทางพันธุกรรม และโรคติดเชื้อจุลชีพต่างๆ สำหรับโรคทางพันธุกรรมนั้น เทคโนโลยีดีเอ็นเอ นอกจากจะช่วยวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยแล้ว ยังมีส่วนช่วยตรวจผู้ที่มียีนผิดปกติในครอบครัวที่อาจถ่ายทอดได้ และยังมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรคพันธุกรรมก่อนเกิดแก่ทารกในครรภ์ได้อีกด้วย ส่วนการช่วยวินิจฉัยโรคติดเชื้อจุลชีพนั้น นอกจากวิธี PCR แล้ว เทคโนโลยีดีเอ็นเอที่นิยมใช้และได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย และมีบริษัทต่างๆผลิตขายคือ การใช้ nucleic acid probe หลักการของเทคนิคนี้คือตรวจหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมของเชื้อจุลชีพในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย เช่น เลือด เสมหะ และอื่นๆ ซึ่งได้ทดสอบแล้วว่า จะไม่ให้ผลบวกกับสารพันธุกรรมของผู้ป่วย โดยมีความจำเพาะต่อเชื้อจุลชีพเท่านั้น ข้อดีของการใช้เทคนิคนี้ช่วยคือ สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของจุลชีพในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย และจุลชีพนั้นไม่จำเป็นต้องมีชีวิตอยู่ และได้ผลอย่างรวดเร็ว ทำให้แพทย์สามารถให้การรักษาและให้ยาที่ถูกต้องอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นแล้ว เทคโนโลยีดีเอ็นเอ ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ เพื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อที่มีการระบาด รวมทั้งใช้ในการตรวจหาชนิดของจุลชีพต่างๆ สามารถทำนายการดื้อยาของเชื้อจุลชีพด้วยการดูแบบแผนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ตัวอย่างเช่น การขาดหายไปของยีน catalase-peroxidase จะเกี่ยวเนื่องกับการดื้อยา isoniazid หรือการ กลายพันธุ์แบบการแทนที่เบสในยีน RNA polymerase beta subunit จะเกี่ยวเนื่องกับการดื้อยา rifampicin ของเชื้อก่อโรควัณโรค เป็นต้น

ตารางที่ 2. รายชื่อจุลชีพที่ปัจจุบันสามารถใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอตรวจสอบได้ และมีการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปจำหน่าย

ชนิดของจุลชีพ	เชื้อ
Bacteria	Chlamydia trachomatis Neiseria gonorrhea Group A Streptococcus Legionella pneumophila Gardnerella vaginalis Mycobacterium tuberculosis
Virus	Human papillomavirus Herpesviruses Human immunodeficiency virus Hepatitis B virus
Fungi	Candida species
Protozoa	Trichomonas vaginalis Plasmodium falciparum

สำหรับการช่วยวินิจฉัยโรค นอกจากเทคนิค PCR แบบต่างๆ รวมทั้ง allele-specific PCR แล้วนั้น ดังได้กล่าวข้างต้น เทคนิคของ nucleic acid probe เช่น dot blot hybridization, Southern blot hybridization ก็เป็นที่นิยมนำมาใช้ด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะ dot blot hybridization จะถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบ การกลายพันธุ์แบบ point mutation, ส่วน Southern blot hybridization นั้น นิยมใช้กับการตรวจสอบ การขาดหายไปของยีนที่มีขนาดใหญ่

ในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมบางโรค ซึ่งตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแล้วทำให้เกิดโรค มีได้หลายตำแหน่ง การตรวจด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะไม่สะดวก เนื่องจากว่าต้องทำการตรวจทุกตำแหน่งที่น่าจะเป็นไปได้ จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีดีเอ็นเอขึ้นมาอีกวิธีหนึ่งคือ วิธีที่เรียกว่า reverse dot blot probe ซึ่งจะใช้ ดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe) ไปติดอยู่กับแผ่น membrane แทน ดีเอ็นเอของผู้ป่วยทำการ hybridize กับดีเอ็นเอตรวจสอบตัวใด ก็แสดงว่าผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่งนั้น ตัวอย่างเช่นในโรค เบต้าธาลัสซีเมีย สามารถเกิดจากความผิดปกติของยีน เบต้าไกลบิน ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งได้มากกว่า 20 ตำแหน่ง การใช้เทคนิคนี้จึงเป็นประโยชน์ และประหยัดเวลาได้มาก

ในด้านการพยากรณ์โรคนั้น เทคนิค mutation analysis ก็มีส่วนสำคัญเช่นกัน ตัวอย่างที่นำมาใช้คือการพยากรณ์การดำเนินโรคมะเร็งรังไข่, มะเร็งเต้านม โดยที่ผู้ป่วยโรคนี้จะมีการ

พยากรณ์โรคดี ถ้าพบว่าผู้ป่วยมียีน p53 ปกติ แต่การพยากรณ์โรคจะไม่ดีถ้าพบว่าผู้ป่วยมี mutation เกิดขึ้นในยีนนี้ เป็นต้น

สำหรับเทคนิค chromosome analysis นั้น คือการตรวจรูปร่างของโครโมโซมนั้น และดูการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมด้วย ซึ่งทำได้โดยวิธีการที่เรียกว่า karyotype, FISH (fluorescence in situ hybridization) และ somatic cell hybrids

เทคนิคใหม่ que เริ่มนำมาใช้มากในการหาตำแหน่งของยีน คือ positional cloning (เดิมเรียกว่า reverse genetic) ใช้ในการหาตำแหน่งของยีนโดยเริ่มจากการพยายามหาโครโมโซมที่สัมพันธ์กับโรคก่อน จากนั้นจึงมองหา ยีนบนโครโมโซมนั้นที่สัมพันธ์กับโรค มีการสร้าง genetic map และ physical map จนในที่สุดสามารถที่จะหาตำแหน่งของยีนที่ทำให้เกิดโรคได้ วิธีนี้แตกต่างจาก functional cloning ซึ่งเริ่มต้นจากการพยายามหาโปรตีนที่ผิดปกติในโรคนั้นก่อน แล้วใช้โปรตีนนั้นทำการค้นหายีนที่ผลิตโปรตีนนั้นโดยยีนนั้นมาจากการ clone จากนั้นจึงนำยีนนั้นไปศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ส่วนเทคโนโลยีของการเชื่อมต่อยีน (recombinant DNA technology หรือ expression of recombinant DNA) และ ดีเอ็นเอโคลนนิ่ง (DNA cloning) นั้น มีบทบาทสำคัญ ทั้งในด้านการป้องกันโรคและการรักษาโรค ในแง่ของการป้องกันโรคที่เห็นได้ชัดเจนคือ การผลิตวัคซีนที่เรียกว่า recombinant vaccine ตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตโดยวิธีนี้ และได้ผลดี นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี (recombinant hepatitis B vaccine) โดยที่วัคซีนที่ใช้แต่เดิมนั้น ได้มาจากการแยกโปรตีนของไวรัสในส่วนที่กระตุ้นให้ร่างกายมนุษย์สร้างภูมิคุ้มกัน (antigen) ออกมาจากเลือดของผู้ป่วยโรคนี้ มาทำให้บริสุทธิ์และฆ่าเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมา และจึงนำมาใช้ การผลิตโดยวิธีนี้ ไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากว่าอาจมีตัวเชื้อไวรัสตับอักเสบบีปนอยู่ หรืออาจมีเชื้อโรคอื่นเช่น ไวรัสโรคเอดส์ปนเปื้อนอยู่ด้วยได้ ในการสร้างวัคซีนป้องกันโรคนี้ โดยใช้เทคโนโลยีของการเชื่อมต่อยีน (recombinant DNA technology) นี้ทำได้โดย นำยีนส่วนที่ถอดรหัสสร้างโปรตีนที่เป็น แอนติเจน ของเชื้อไวรัสนี้ มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกันแล้วนี้ใส่เข้าไปในเซลล์สัตว์ เมื่อเซลล์สร้างโปรตีน โปรตีนที่ถอดรหัสเป็นแอนติเจนที่ใส่เข้าไปจะถูกสร้างด้วยเช่นกัน จากนั้นจะทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้

ในปัจจุบันนั้นนอกจากการผลิตวัคซีนเพื่อให้ได้โปรตีนที่เป็นแอนติเจน แล้วใส่โปรตีนนั้นๆ เข้าไปในร่างกายแล้ว ยังได้มีการคิดสร้างวัคซีนโดยวิธีการอื่นๆอีกเช่น การฉีดสาย polypeptide ที่สังเคราะห์ให้เหมือนกับโปรตีนของจุลชีพก่อโรคส่วนที่มีคุณสมบัติกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน แล้วฉีดเข้าไปในร่างกาย วิธีนี้ยังไม่ให้ผลที่ดีนัก อีกวิธีหนึ่งโดยการใส่ยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นแอนติเจนเข้าไปในร่างกายโดยตรง เรียกว่า ดีเอ็นเอวัคซีน และอีกวิธีหนึ่งเรียกว่า chimaeric vaccine คือการตัดต่อยีนของไวรัสพวก adenovirus หรือ ไวรัสก่อโรคโปลิโอ ให้สามารถแสดงออก (express) แอนติเจนของไวรัสตัวอื่นๆ หลายตัว แล้วฉีดเข้าไปในร่างกาย ซึ่งจะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานต่อไวรัสหลายตัวในเวลาเดียว ซึ่งวิธีการ 2 วิธีหลังนี้ ขณะนี้อยู่ในระยะเริ่มต้นของการศึกษา

เทคนิคการเชื่อมต่อยีน (recombinant DNA technology) ยังสามารถนำมาใช้ในด้าน การรักษา โดยเฉพาะการรักษาโดยการใส่โปรตีนที่ร่างกายขาด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคนั้นๆ เข้าไป ใน

การรักษาโดยการใส่โปรตีนที่ร่างกายขาดเข้าไป โปรตีนที่ใส่เข้าไปนี้ จะผลิตโดยใช้วิธีการเดียวกับการผลิตวัคซีนดังกล่าวข้างต้น ตัวอย่างโปรตีนที่ผลิตโดยวิธีนี้และได้ผลดี และมีการผลิตขายโดยบริษัท คือ โปรตีนฮอร์โมน insulin สำหรับใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งแต่เดิมมีการใช้ฮอร์โมนนี้ที่สกัดจาก ตับอ่อนของหมู และวัว และอาจเกิดปัญหาได้จากการที่ร่างกายมีปฏิกิริยากับโปรตีนแปลกปลอมที่ให้เข้าไป การผลิตโปรตีนฮอร์โมน insulin โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอทำได้โดย แยกยีนของคนที่ทำหน้าที่ถอดรหัสให้สร้างโปรตีนนี้ออกมา นำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกันแล้วนี้ใส่เข้าไปในเซลล์ยีสต์ เมื่อยีสต์สร้างโปรตีน โปรตีนที่ถอดรหัสเป็นฮอร์โมนตัวนี้จะถูกสร้างด้วยเช่นกัน จากนั้นจะทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ต่อไป

ในการรักษาโดยการใส่โปรตีนที่ร่างกายขาดเข้าไป นอกจากจะใช้เทคนิคการเชื่อมต่อยีนแล้ว ยังมีอีกเทคนิคหนึ่งซึ่งกำลังเป็นที่สนใจกันมาก คือการผลิตโปรตีนของคนในสัตว์ทดลองที่เรียกว่า transgenic animal โดยทำให้โปรตีนนั้นถูกขับออกทางน้ำนม หรือทางเลือด ซึ่งเราสามารถสกัดมาใช้ได้โดยไม่ต้องฆ่าสัตว์เหล่านั้น และสัตว์นั้นก็จะสร้างโปรตีนจากยีนที่เราใส่เข้าไปตลอดชีวิตของมัน วิธีนี้มีข้อได้เปรียบคือ โปรตีนที่ผลิตได้เป็นการสร้างในร่างกายของสัตว์ทดลอง จึงควรมีคุณสมบัติเหมือนโปรตีนที่ใช้ในร่างกายมนุษย์มากที่สุด ซึ่งโปรตีนที่ผลิตในหลอดทดลอง หรือใช้เซลล์แบคทีเรีย เซลล์ยีสต์ อาจทำให้ได้โปรตีนที่มีความแตกต่างจากโปรตีนที่ผลิตในร่างกาย ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ ตัวอย่างโปรตีนที่ผลิตโดยวิธีนี้คือ โปรตีนการแข็งตัวของเลือด coagulation factor IX ซึ่งผลิตในแกะ ทำให้ได้แกะที่สามารถผลิต factor IX ในน้ำนมได้ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้เพิ่งจะเริ่มต้นพัฒนา คาดว่าในอนาคตคงจะมีการพัฒนาและนำมาใช้อย่างจริงจังมากขึ้น

ตารางที่ 3. ตัวอย่างของ therapeutic agents ที่ผลิตได้จากเทคนิคการเชื่อมต่อยีน

ชนิดของสาร	ผลผลิตที่ได้และนำไปใช้
ยา	erythropoietin insulin growth hormone coagulation factors (VIII, VII) plasminogen activator DNase
วัคซีน	Hepatitis B
สาร cytokines	GM-CSF G-CSF interleukins interferons

สำหรับการรักษาโดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเออีกริธีหนึ่งคือ การรักษาโดยวิธียีนบำบัด ซึ่งทำได้โดยการนำยีนซึ่งผลิตโปรตีนที่สามารถแก้ไขความผิดปกติของผู้ป่วย เข้าไปในเซลล์ของผู้ป่วย โดยยีนที่จะนำเข้าไปนี้จะถูกนำมาใส่เข้าไปในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นเซลล์มนุษย์ (in vivo) หรือเซลล์เพาะเลี้ยง (in vitro) หรือเซลล์ของผู้ป่วยคนนั้นที่ได้นำออกมาเพาะเลี้ยง และจะใส่กลับเข้าไปในตัวผู้ป่วยคนเดิมเมื่อได้ทำการใส่ยีนที่ต้องการเข้าไปแล้ว (ex vivo) ในการนำยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์อาจทำได้โดยใช้ไวรัสที่ได้รับการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางอย่างแล้ว หรือใช้เม็ดไขมัน (liposome) เป็นพาหนะนำยีนที่ต้องการใส่เข้าไป หรืออาจใช้วิธีอื่นๆก็ได้ เมื่อยีนที่ต้องการเข้าไปอยู่ในเซลล์แล้ว ก็นำเซลล์เหล่านั้นเข้าไปในตัวผู้ป่วยต่อไป การรักษาโดยวิธียีนบำบัดนี้ นอกจากจะทำได้โดยการใส่ยีนที่สร้างโปรตีนที่ร่างกายขาดแล้วทำให้เกิดโรค เข้าไปในร่างกายแล้ว ยีนบำบัดยังมีความหมายรวมไปถึง การใส่ยีนหรือดีเอ็นเอเข้าไป เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นที่เมื่อแสดงออกแล้วทำให้เกิดโรคเช่น เทคนิคการใช้ ribozyme, เทคนิค antisense, เทคนิคการแทนที่ยีนเดิมที่มีปัญหาด้วยยีนใหม่ (replacing gene) เป็นต้น

ตารางที่ 4. ตัวอย่างโรคที่ปัจจุบันมีการรักษาโดยวิธียีนบำบัดที่ใส่เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยง

ชื่อโรค	ยีนที่เกี่ยวข้อง
Severe combined immuno deficiency (SCID)	Adenosine deaminase (ADA)
Severe combined immuno deficiency (SCID)	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)
Lesch-Nyhan syndrome	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)
Gaucher disease	Glucocerebrosidase
Familial hypercholesterolemia (FH)	LDL receptor
Phenylketonuria (PKU)	Phenylalanine hydroxylase
β -thalassemia	β globin
Hemophilia B	Factor IX

นอกจากจะนำวิธียีนบำบัดมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากยีนผิดปกติ ยังมีการนำวิธีนี้มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งและโรคเอดส์ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัย

สำหรับเทคโนโลยีดีเอ็นเอที่เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (finger printing) นิยมนำมาใช้ในการติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยและใช้ในทางนิติเวชวิทยา โดยเทคโนโลยีดีเอ็นเอที่เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) นั้น มีหลักการคือ ดีเอ็นเอของมนุษย์นั้น 30% เป็นดีเอ็นเอซึ่งไม่ได้ถอดรหัส หรือเกี่ยวข้องกับการแสดงออกใดๆของยีนใดเลย และดีเอ็นเอ 30% นี้ประกอบไปด้วยลำดับเบสที่ซ้ำๆกัน (repetitive DNA) และดีเอ็นเอที่ซ้ำๆกันนี้แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ satellite DNA และ interspersed repeats โดยนิยมใช้ satellite DNA ในการศึกษา ความแตกต่างในแบบ

แผนของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ซึ่งจะเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคล จำนวนที่ซ้ำอาจเป็นไปได้ตั้งแต่ซ้ำ 2 ครั้ง จนถึง 1000 ครั้ง ขนาดที่ซ้ำกันก็เป็นได้ตั้งแต่ 100 bp ถึง 30 kb และจำนวนความซ้ำของเบสเหล่านั้นนั่นเอง ที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล ทำให้เกิดความหลากหลายของดีเอ็นเอ เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้ววิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ จะได้ลายพิมพ์ของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (restriction fragment length polymorphism) เกิดเป็นแบบแผนที่เรียกว่า DNA fingerprinting ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อทำการตรวจสอบความซ้ำของดีเอ็นเอนี้ ด้วยวิธีการที่เรียกว่า minisatellite, multilocus minisatellite VNTRs ซึ่งจะใช้เทคนิคของ Southern blotting analysis เป็นสำคัญ ส่วนวิธีการที่เรียกว่า microsatellite ใช้สำหรับขนาดที่ซ้ำกันนั้น น้อยกว่า 1 kb และใช้เทคนิคของ PCR เป็นสำคัญ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนในทางการแพทย์คือ การติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยการปลูกถ่ายไขกระดูก ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกจะมีไขกระดูกเปลี่ยนไปเป็นเหมือนผู้ให้ ถ้าการรักษาประสบผลสำเร็จ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ป่วยก่อนการปลูกถ่ายไขกระดูกจะแตกต่างจากหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก โดยจะเปลี่ยนไปเหมือนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ให้

ในทางนิติเวชวิทยาก็เช่นกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีประโยชน์อย่างมากในการพิสูจน์บุคคล ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ในการพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก หรือสืบหาตัวผู้ร้ายในคดีความต่างๆ ได้ ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงวิธีการนี้ให้แม่นยำและใช้ตัวอย่างตรวจให้น้อยลง

เอกสารอ้างอิง

1. Trent RJ 1997 Molecular medicine, 2nd edn. Churchill Livingstone Edinburgh
2. Duly EB, Ward AJ, Kirk CW et al. Apo E genotype and familial hypercholesterolemia. Ann Clin Biochem 1997 Sep;34(Pt5):534-6
3. Moore JH, Reilly SL, Ferrell RE and Sing CF. The role of apolipoprotein E polymorphism in the prediction of coronary artery disease age of onset. Clin Genet 1997 Jan;51(1):22-5
4. Buck GE. The polymerase chain reaction: a revolutionary new procedure for the laboratory diagnosis of infectious disease. J Ky Med Assoc 1996 Apr;94(4):148-52
5. Lendon CL, Ashall F and Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. JAMA 1997 March;277(10):825-31
6. Gil F. Hereditary breast cancer risk: factors associated with the decision to undergo BRCA 1 testing. Eur J Cancer Prev 1996 Dec;5(6):488-90
7. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgardsdottir R et al. BRCA 2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. Cancer Res 1998 Mar 1;58(5):859-62
8. Friedmann T. Overcoming the obstacles to gene therapy. Scientific American 1997 June; :80-5
9. Sitidilokratana N, Wongteerasupaya C, Tassanakajon A and Boonsaeng V. DNA profiling: applications in paternity testing and monitoring bone marrow transplantation. Chula Med J 1996 Nov;40(11):907-14
10. Boonsaeng V. DNA fingerprinting and forensic medicine. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1995;26:296-300

การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม และโคลนนิ่งในสิ่งมีชีวิต

ดร.จรรยาภรณ์ ฟูเจริญ

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

การศึกษาทางพันธุศาสตร์ได้เริ่มมาว่าหนึ่งศตวรรษแล้ว ในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการเปลี่ยนแปลง การค้นพบวิธีการและสิ่งใหม่ ๆ ตลอดเวลา จากสมัยที่เมนเดลอธิบายกฎเกณฑ์การถ่ายทอดทางพันธุกรรม มาถึงสมัยที่สามารถทราบการเรียงตัว สามารถตัดต่อชิ้นส่วนของยีนเพื่อสร้างสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ตามที่ต้องการได้

พันธุวิศวกรรม (Genetics Engineering) หมายถึงกระบวนการตัดต่อยีนจากหลายแหล่งเข้าด้วยกัน แล้วใส่กลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง โดยใช้เทคนิคในการแยก เพิ่มจำนวน ตัดต่อและเปลี่ยนแปลง DNA เพื่อสร้าง DNA สายผสม (Recombinant DNA) ตามความต้องการ เทคนิคนี้ได้มีการเริ่มต้นมาตั้งแต่ ปี 1970 โดยมีการค้นพบวิธีการต่าง ๆ ทางชีวเคมีเช่นการแยกเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA (DNA polymerase) เอนไซม์ที่ใช้ในการตัด DNA ที่ตำแหน่งเฉพาะ (Restriction enzyme) มีการตัดต่อ DNA ทำให้เกิด DNA สายผสม ปรับปรุงประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง และการส่งถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์บางชนิดเพื่อทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ขึ้นมา

จนถึงปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถแยกยีนชนิดใดชนิดหนึ่งออกมาจากสิ่งแวดลอมเดิม นำมาวิเคราะห์ เลี้ยงหรือเพิ่มจำนวนยีนดังกล่าว อาจจะดัดแปลงยีนโดยทำให้มีการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งที่ต้องการ หรือเพิ่ม ลด ตัดต่อยีนส่วนที่ต้องการศึกษาเข้าด้วยกัน แล้วใส่กลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิต เดิมหรือต่างชนิดก็ได้ โดยยีนนั้นทำหน้าที่ได้ตามที่มีการเปลี่ยนไป

พันธุวิศวกรรมเป็นวิชาใหม่ ที่เพิ่งเกิดมาไม่นานแต่มีบทบาทมากมายต่อวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และวิทยาศาสตร์สาขาอื่น ความก้าวหน้าของงานด้านนี้เป็นไปอย่างรวดเร็ว มีการค้นพบใหม่ ๆ เกิดขึ้นทุกวัน การประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านนี้มีทั้งทางด้านการศึกษาวิจัยถึงกลไกหรือกระบวนการต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต การประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และทางการแพทย์ เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมนี้ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาการทำงานของยีน การควบคุมการแสดงออกของยีน กลไกต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต ใช้ในการผลิตสารบางอย่างให้มีปริมาณมาก ปรับปรุงคุณภาพของสิ่งมีชีวิต เช่น พืชที่มีการต้านทานโรคดีขึ้น สัตว์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น แบคทีเรียที่สามารถทำลายสารพิษจากสิ่งแวดลอม เป็นต้น

Genetic Engineering Organisms

การถ่ายฝากยีนเข้าไปในเซลล์ของพืชหรือสัตว์ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นอกร่างกายนั้นมีการเริ่มทำมา กว่า30 ปีแล้ว นักวิทยาศาสตร์พบว่า เซลล์สามารถรับยีนจากภายนอกได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ยีนเหล่านั้น สามารถแทรกตัวเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ โดยใช้สารและกลไกในเซลล์เพื่อการเพิ่มจำนวน ทำให้ทำงานได้ตามปกติ และยังถ่ายทอด ลักษณะนั้นไปยังเซลล์ลูกหลานได้ด้วย

ในเซลล์สัตว์ที่เลี้ยงปกติ นั้น เมื่อมีการฝากถ่ายยีนเข้าไปแล้ว เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นสัตว์ได้เนื่องจากคุณสมบัติของเซลล์เองที่ไม่สามารถ differentiate ไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ได้ แต่นักวิทยาศาสตร์ก็มีการพยายามที่จะสร้างสัตว์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยริเริ่มมีการทำในปี 1977 โดยฉีดนิวเคลียสจากเซลล์ลำไส้ เข้าไปในไข่ของคางคกที่เอานิวเคลียสออกไปแล้ว แล้วเลี้ยงต่อจนกลายเป็นคางคกตัวเต็มวัย ต่อมามีการพัฒนาขึ้นมาเรื่อย ๆ ปัจจุบันนี้ เทคนิคนี้สามารถทำได้ในสัตว์หลายชนิด (Nuclear Transfer method) หลังจากนั้นได้มีการฉีด DNA เข้าไปในไข่ที่ผสมแล้ว ที่ยังอยู่ในระยะ 1 ถึง 2 เซลล์ ก่อนนำมาใส่คืนให้มีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนในร่างกายและเป็นตัวเต็มวัยในที่สุด สัตว์ที่เกิดใหม่นี้ มียีนที่ฉีดเข้าไปในนั้นแทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ เมื่อมีลูกก็สามารถถ่ายทอด ยีนใหม่นี้ต่อไปยังรุ่นลูกได้

นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา มีการพัฒนาวิธีการที่จะสร้างสัตว์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมรูปแบบและโดยวิธีการต่าง ๆ กัน เราสามารถแบ่งชนิดของสัตว์ที่มีพันธุวิศวกรรมเปลี่ยนแปลง (Genetic Engineering animal) ได้เป็นกลุ่มดังนี้

1. สัตว์ที่มีการเพิ่มขึ้นของ DNA ชนิดใดชนิดหนึ่ง (transgenic animal)
2. สัตว์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA เฉพาะตำแหน่ง (Gene-targeting animal)
3. สัตว์ที่มีความเหมือนกันทุกอย่าง (genetic Identical animal)

สัตว์ทั้งสามชนิดมีวัตถุประสงค์และมีวิธีที่ใช้รวมทั้งชนิดของสัตว์ที่ใช้ต่างกัน แต่ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงยีนที่อยู่ในเซลล์ วิธีที่ใช้มากในการเปลี่ยนแปลงคือ

1. การฉีด DNA เข้าไปในนิวเคลียสของไข่โดยตรง (Nucleus micro-injection)
2. การใช้ retrovirus infection เพื่อเป็นตัวพา DNA เข้าไปในเซลล์
3. การใส่ DNA เข้าไปใน ES Cell (Embryonic Stem Cell)
4. การฝากถ่าย นิวเคลียส จากเซลล์ชนิดหนึ่งไปสู่เซลล์อีกชนิดหนึ่ง (Nuclear transfer)

มีสัตว์หลายชนิดที่ถูกนำมาทดลองสร้างเป็นสัตว์ชนิดใหม่ โดยวิธีการต่าง ๆ แต่สัตว์ที่มีการใช้มากที่สุดคือหนู (mice) เพราะเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็ก เพิ่มจำนวนได้เร็ว และมีการศึกษาทางพันธุกรรมในหลายสาขา วิทยาการเกี่ยวกับการทำ Genetic Engineering animal จึงเริ่มและมีการพัฒนาในหนูมากที่สุด ในขณะที่สัตว์ชนิดอื่นเช่น วัว แกะ นั้นจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์ที่ทำหรือศึกษาไม่ได้ในหนูเท่านั้น เช่นการศึกษาการผลิตโปรตีนในน้ำนม เป็นต้น ทั้งนี้เพราะการศึกษาในสัตว์ใหญ่นั้นยาก ล้มเปลืองและใช้เวลานาน

การถ่ายฝากยีนในพืชทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิดแล้ว เพราะเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความก้าวหน้ามาก สามารถเลี้ยงส่วนต่างๆของพืชจนกลายเป็นต้นสมบูรณ์ได้ การเพิ่มจำนวนของ DNA ที่

ต้องการเข้าไปในต้นใหม่ เป็นวิธีที่ส่วนมากใช้ในการทำพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม วิธีที่ใช้ในการสร้าง พืชเหล่านี้มีหลายวิธีเช่น การฝากถ่ายยีนโดยตรงด้วยสารละลาย PEG ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อ่อนลง การฝากถ่ายยีนด้วยกระแสไฟฟ้า การใช้เครื่องมือ particle gun และการใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*

เนื่องจากการประยุกต์ใช้ เทคนิค transgenic และ cloning ทางการแพทย์ส่วนมากจะเป็นการใช้วิธีการสร้างที่เหมือนกัน แตกต่างที่ยีนและชนิดของสัตว์ที่คงจะกล่าวถึงรายละเอียดได้ไม่ครบถ้วนในหนึ่งบทความ เอกสารนี้จะขอกกล่าวถึงการสร้าง Genetic Engineering animal ทั้งสามวิธีอย่างคร่าว ๆ เพื่อเป็นพื้นฐานต่อการเข้าใจตัวอย่างของ Genetic Engineering animal ที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ที่จะกล่าวถึงต่อไป การประยุกต์ใช้ในแต่ละเรื่องจะกล่าวถึงในการบรรยายเท่านั้นเพราะคงไม่มีประโยชน์ที่จะเขียนส่วนที่เปลี่ยนแปลงข้อมูลเร็ว ในส่วนของการสร้างพืชนั้นจะกล่าวถึงเฉพาะวิธีที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างที่นำมาเสนอเท่านั้น ทั้งนี้การทราบพื้นฐานน่าจะเป็นประโยชน์มากกว่าที่จะทราบการประยุกต์ใช้โดยตรง เพราะการนำไปใช้จะเปลี่ยนไปตลอดเวลา แต่อยู่บนพื้นฐานที่เหมือนกัน

การสร้าง transgenic animal

วัตถุประสงค์ของการสร้างสัตว์ชนิดนี้คือเพื่อเพิ่มจำนวนของยีนที่ต้องการศึกษาในร่างกายตั้งแต่เป็นตัวอ่อนจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย แล้วดูผลของการที่ยีนนี้เพิ่มขึ้น เช่นผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน การทำหน้าที่ของเซลล์ การสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น เป็นต้น ยีนที่ใส่เพิ่มเข้าไปสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ขั้นตอนในการสร้าง transgenic animal นั้นแบ่งเป็นดังนี้

1. การศึกษาและแยกยีนที่ต้องการศึกษา (Gene characterization and cloning)
2. การตัดต่อชิ้นส่วนของยีนนั้นกับส่วนควบคุมการทำงาน เช่น promoter, enhancer, terminator และ stabilizer (Gene Construction)
3. การใส่ชิ้นส่วนของยีนเข้าไปในเซลล์ โดยวิธี micro-injection หรือ retroviral transfection
4. การเลี้ยงเซลล์นั้นให้เป็นตัวเต็มวัยและคัดเลือกเฉพาะตัวที่มีการแทรกตัวของยีนที่ฉีดเข้าไป และมี การแสดงออกจำนวนมาก (Selection)

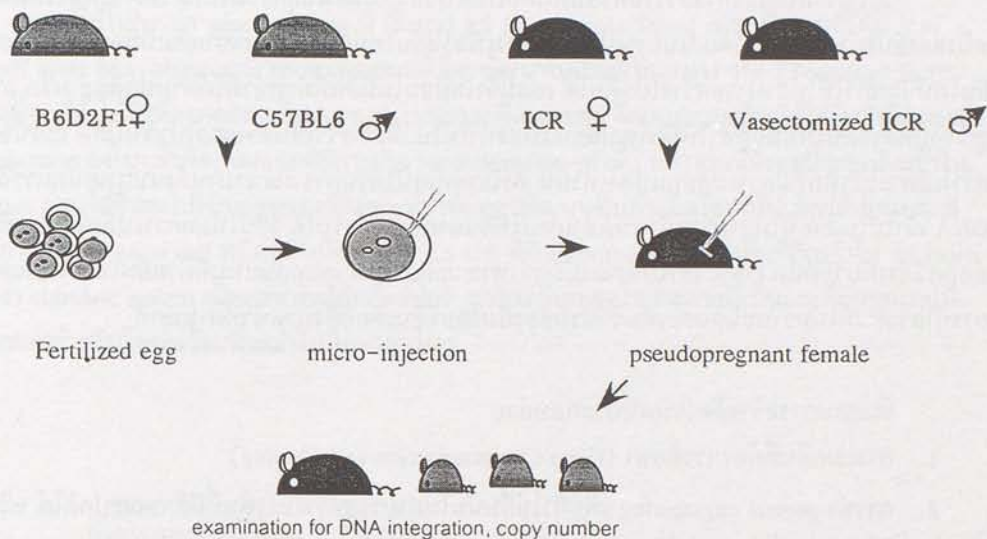
ยีนที่จะใช้ศึกษานั้นอาจเป็นยีนที่มาจากสัตว์ชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันก็ได้ โดยจะต้องมีการแยกยีนนั้นออกมาได้ก่อน ยีนที่จะใช้ในการทำอาจใช้เฉพาะบางส่วนหรือทั้งหมดของยีนก็ได้ แล้วแต่ชนิดและหน้าที่ของยีนนั้น ควรจะมีศึกษาในหลอดทดลองก่อนที่จะทำในสัตว์ เช่นยีนจากส่วนของ Envelop protein หรือ Core protein ของไวรัส ให้ผลต่อลักษณะของสัตว์ที่สร้างขึ้นต่างกัน ยีนที่ใช้อาจเป็นได้ทั้ง cDNA หรือ genomic DNA การเพิ่มจำนวนยีนในเซลล์ไม่จำเป็นที่จะทำให้ผลที่เกิดขึ้นเป็นการเพิ่มหน้าที่ของโปรตีนเสมอไป อาจมีการออกแบบเพื่อให้เป็นผลในการลดหน้าที่ของโปรตีนก็ได้ เช่น ถ้ายีนที่เป็นยีนที่ทำให้มีการสร้างโปรตีนที่มีการทำงานปกติ การเพิ่มจำนวนยีนมากขึ้นในเซลล์ ก็ทำให้โปรตีนนั้นมีจำนวนและทำหน้าที่ได้มากขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าโปรตีนนั้นถูกทำให้เปลี่ยนแปลงโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม โดยทำให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติแต่มีรูปร่างเหมือนกับโปรตีนปกติ เมื่อมีจำนวนมากขึ้นทำให้แย่งกับโปรตีนปกติในการจับหรือใช้สารคู่ปฏิกริยาในเซลล์นั้น โปรตีนปกติจึงทำหน้าที่ได้น้อยลง วิธีนี้เรียกว่า dominant negative effect หรือ การใช้ antisense DNA ฉีดเพิ่มเข้าไปในเซลล์ antisense DNA นี้เมื่อมีการ transcribe เป็น RNA แล้วสาย antisense RNA ที่สร้างขึ้นก็จะไปจับกับ sense RNA ที่เกิดจากยีนปกติใน

เซลล์ ทำให้ไม่สามารถ translate เป็น โปรตีนได้ ก็จะเป็นการทำลายโปรตีนปกติ ดังนั้นวิธีนี้สามารถใช้ได้ทั้งในกรณีที่ต้องการเพิ่ม หรือลดปริมาณและหน้าที่ของยีนและโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง

นอกจากการคัดเลือกยีนที่จะใช้แล้วส่วนสำคัญอีกอย่างก็คือต้องใส่ส่วนควบคุมการทำงานที่เหมาะสมกับยีนนั้นลงไป ปัจจุบันนี้เราทราบว่าเราสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้โดยใช้ promoter ที่มีหลายแบบ เช่น constitutive promoter ที่กระตุ้นให้ยีนนั้นทำงานอยู่ตลอดเวลา inducible promoter จะทำงานเมื่อได้รับสารบางชนิด ใช้กรณีที่ต้องการให้ยีนที่ฉีดเข้าไปทำงานเฉพาะบางเวลา เช่น MT promoter จะทำงานเมื่อได้รับ heavy metal นั่นคือสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนได้โดยให้สัตว์ทานน้ำที่มี Aluminium อยู่เป็นต้น เพราะถ้ามียีนบางชนิดที่ถ้าทำงานและมีการแสดงออกมาก ๆ ตั้งแต่เป็นตัวอ่อนจะทำให้สัตว์ตายหรือมีลักษณะผิดปกติ promoter อีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากคือ tissue specific promoter เป็น promoter ที่ควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนที่เซลล์บางชนิดเท่านั้น ทำให้เซลล์อื่นที่มียีนอยู่ไม่ได้รับผลกระทบจากการที่มียีนแปลกปลอมเข้าไป มักจะใช้ในกรณีที่ต้องการผลของการเปลี่ยนแปลง หรือการแสดงออกในเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง promoter ชนิดนี้ยังใช้ในการทำลายเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ด้วย โดยถ้ายีนที่ฉีดเป็น ยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ เฉพาะเซลล์นั้นก็จะถูกทำลายไป จะเห็นได้ว่าในขั้นตอนการตัดต่อยีนนั้น เราสามารถที่จะควบคุมการทำงานของยีนทั้งในส่วนของตัวเอง และส่วนที่ควบคุมการทำงานเพื่อให้ได้สัตว์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ หลังจากได้ยีนที่ต้องการใช้แล้ว ก็จะเป็นการใส่ยีนนั้นเข้าไปในเซลล์ การสร้างสัตว์ชนิดนี้ทำได้ด้วย 2 วิธีคือ

1. การฉีด DNA เข้าไปโดยตรงใน nucleus ของไข่ (micro-injection) ใช้ในการสร้างหนู แกะ และ วัว
2. วิธี retrovirus infection ใช้ในการสร้าง transgenic chicken

ในกรณีของหนู เซลล์ที่ใช้ในการฉีดนั้น มักจะใช้ one cell fertilized egg ในการฉีด DNA เข้าไปในเซลล์นั้นจะใช้เครื่องมือที่เรียกว่า micromanipulator หลังจากฉีดแล้ว ไข่จะถูกใส่คืนเข้าไปในหนูอีกตัวหนึ่งเพื่อให้มีการเจริญเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (รูปที่ 1) การใช้ retroviral infection นั้นใช้ใน chicken embryo ทั้งนี้เพราะ pronucleus ของ chicken embryo ไม่สามารถฉีดยีนโดยวิธี nuclear micro-injection ได้ วิธี retroviral infection นั้นมีข้อจำกัดที่ขนาดของชิ้นยีนที่ใส่ ยีนที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมได้ และชิ้นของยีนที่แทรกเข้าไปมักจะเป็นเพียง หนึ่งชิ้นเท่านั้น ในขณะที่การทำ nucleus micro-injection นั้น สามารถใส่ยีนที่มีขนาดใหญ่ได้ และชิ้นของยีนที่แทรกเข้าไปในโครโมโซมนั้นยังมีจำนวนมาก ตั้งแต่หนึ่งถึงกว่าพันชิ้น โดยมักจะแทรกเข้าไปที่ตำแหน่งเดียวแต่เรียงตัวต่อกัน วิธีการ nucleus microinjection จึงเป็นวิธีที่นิยมและดีที่สุดในการทำ transgenic animal (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การสร้าง transgenic animal โดยวิธี nucleus-microinjection

ในการทำ transgenic animal โดยทั้งสองวิธีนี้มีข้อเสียคือ เราไม่สามารถควบคุมตำแหน่งของการแทรกตัวของยีนที่ฉีดเข้าไปได้ ดังนั้นจะมีบางกรณีที่ยีนที่ใส่เข้าไปใหม่นั้นไปทำลายยีนสำคัญในร่างกายทำให้สัตว์นั้นตายหรือผิดปกติ (positioning effect) ที่เป็นผลของการทำลายยีนที่สำคัญของเซลล์ ไม่ได้เป็นผลของยีนใหม่ที่ฉีดเข้าไป การแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษาดังแต่เป็นตัวอ่อนมีผลต่อการเติบโต บางครั้งทำให้สัตว์ตายก่อนได้ศึกษาผลของยีนนั้นในตัวเต็มวัย นอกจากนี้เรายังไม่สามารถกำหนดจำนวนชิ้นของยีนที่จะแทรกเข้าไปในโครโมโซมได้ ทำให้ต้องมีการคัดเลือกตัวที่มีจำนวนชิ้นที่แทรกเข้าไปมากจึงจะมีการแสดงออกของยีนนั้นมาก จะเห็นได้ว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่จะทำให้มีการแสดงออกของยีนที่ฉีดเข้าไป ดังนั้นเมื่อได้สัตว์ที่มีการแทรกตัวของยีนที่ฉีดเข้าไปแล้ว จึงต้องเลือกตัวที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนมากที่สุด และตรวจสอบว่าโปรตีนนั้นทำงานได้อย่างถูกต้องก่อนที่จะนำสัตว์นั้นไปผสมพันธุ์และนำไปศึกษาทดลองต่อไป

ปัญหาและข้อควรระวังของการทำ transgenic animal คือเทคนิคการฉีด DNA เข้าไปในเซลล์นั้นต้องการเครื่องมือเฉพาะ (Micromanipulator) ซึ่งมีราคาแพงและเทคนิคการฉีดยากและต้องการการฝึกฝนเป็นอย่างดี นอกจากนี้ผู้ทำยังต้องมีความรู้ทางด้าน molecular เพราะการเลือกชิ้นส่วนของยีน ส่วนควบคุม และส่วนอื่นที่จะใช้ในการฉีดนั้นมีความสำคัญมาก การทำสัตว์ชนิดนี้ยังต้องการความรู้เกี่ยวกับสัตวศาสตร์ในการศึกษาทดลองในสัตว์อีกด้วยหลังจากที่ได้สัตว์มาแล้วต้องมีความรู้ในการที่จะใช้ประโยชน์จากสัตว์นั้นเช่น ความรู้เกี่ยวกับกลไกการทำงานของเซลล์ การสกัดโปรตีน เป็นต้น

การสร้าง Gene targeting animal

วัตถุประสงค์ของการสร้างสัตว์ชนิดนี้คือเพื่อเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในสัตว์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของยีนอย่างจำเพาะ โดยเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อใส่ยีนใหม่เข้าไปแทนที่ยีนเดิมที่มีอยู่แล้วในเซลล์ โดยยีนใหม่นี้ถูกทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ เซลล์จึงเสมือนไม่มียีนที่ทำหน้าที่ได้ตามปกติอยู่ หรือ อาจจะถูกแทนที่ด้วยยีนใหม่ที่ถูกทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นต่างจากโปรตีนปกติ เซลล์จึงมีการสร้างเฉพาะโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น ทั้งนี้เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนามาหลังจากเทคนิคการฉีด DNA เข้าไปในเซลล์ ที่ไม่สามารถกำหนดตำแหน่งที่ยีนแทรกตัวเข้าไปได้ วิธีนี้ให้ผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อสัตว์ต่างกับวิธีที่ฉีด DNA เข้าไปซึ่งจะไม่มีการทำงานยีนเดิมในเซลล์ก่อนแทนที่ด้วยยีนใหม่ หากแต่เป็นการทำลายยีนที่ไม่ทราบชนิดและเพิ่มจำนวนของยีนโดยที่ยีนเดิมก็ยังทำหน้าที่ตามปกติ

ขั้นตอนการสร้างสัตว์ชนิดนี้ประกอบด้วย

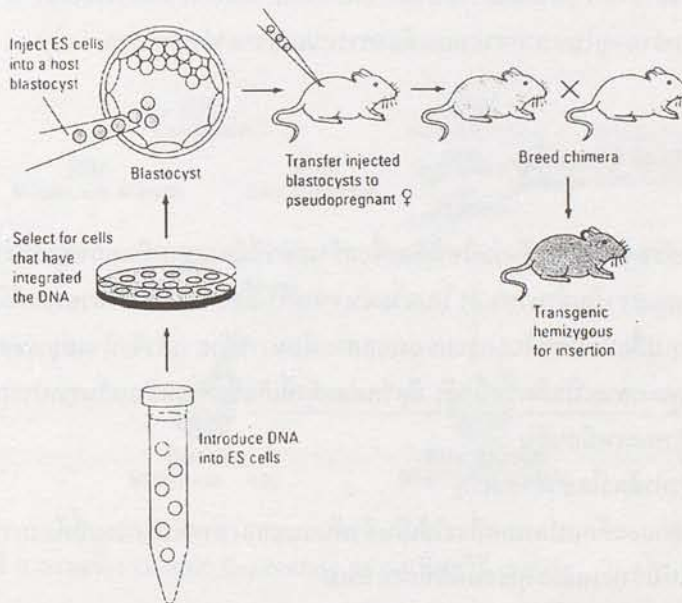
1. การแยกยีนที่ต้องการศึกษา (Gene Characterization and Cloning)
2. การทำ genetic engineering เพื่อทำให้ยีนนั้นไม่สามารถสร้างโปรตีนที่มีลักษณะปกติได้ หรือ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงที่ยีนแล้วทำให้ผลิตโปรตีนที่มีลักษณะต่างจากปกติ (Design gene-targeting vector)
3. การใส่ยีนที่เตรียมไว้เข้าไปใน ES cell (Embryonic Stem Cell)
4. การคัดเลือก ES cell ที่มีการแทนที่ของยีนเดิม ด้วยยีนใหม่ที่ฉีดเข้าไป
5. การฉีด ES cell นั้นเข้าไปใน blastocyst เพื่อให้มีการเติบโตเป็นตัวเต็มวัยพร้อมที่จะศึกษาต่อไป

เราสามารถใส่ยีนใหม่เข้าไปในเซลล์ได้ด้วยหลายวิธี เช่น electroporation, transfection หรือ retroviral infection กลไกที่จะทำให้ยีนที่ใส่เข้าไปใหม่ในเซลล์แทนที่ยีนเดิมบนโครโมโซมเรียกว่า recombination ซึ่งเป็นกลไกที่พบในธรรมชาติอยู่แล้ว กลไกนี้ต้องการ ความเหมือนกันของ nucleotide sequence ของยีนที่ต้องการไปแทนที่ และ sequence ของยีนที่จะถูกแทนที่ โดยเราเปลี่ยนแปลงยีนที่จะเอาไปแทนที่นั้นไว้แล้ว เมื่อยีนทั้งสองชนิดมาอยู่ใกล้กัน เซลล์ก็จะมีโอกาสที่จะใช้ยีนใหม่ที่ใส่เข้าไปแทนที่ยีนเดิมยีนที่สามารถจะนำมาใช้ในการทำ targeting นั้นต้องมีความยาวไม่น้อยกว่า 4-9 kb ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่า ถ้าจำนวนความเหมือนกันของยีนที่จะนำมาทำ gene targeting น้อย ทำให้ประสิทธิภาพของการเกิดการแทนที่(recombination) น้อย ปกติ 1 ใน 100-100000 เซลล์สามารถเกิด recombination ได้

เมื่อมีบางเซลล์เท่านั้นที่เกิด recombination ได้ ก็ต้องมีกระบวนการที่จะคัดเลือกเซลล์เหล่านั้นออกมาจากเซลล์ที่ไม่มี recombination การคัดเลือกนี้ต้องใช้ marker บางตัวที่ติดไปกับยีนที่ฉีดเข้าไป การใส่ marker ชนิดได้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ ปกติแล้ว neomycin resistant gene จะใช้เป็น marker โดยใส่เข้าไปในยีนใหม่ที่ต้องการนำไปแทนที่ยีนเดิม การเติม marker ลงไปนี้มีประโยชน์ 2 อย่างคือทำลายการสร้างโปรตีนปกติของยีนนั้นโดยใส่แทรกลงไปชั้นยีน และใช้เป็นตัวติดตามการแทรกตัวของยีนนี้ในโครโมโซม เซลล์ที่มีการแทรกตัวของยีนใหม่ที่มี neomycin resistant gene ก็จะเจริญในอาหารที่มี Neomycin ได้ (Positive selection) แต่เนื่องจากบางครั้งก็จะมีพบว่าการแทรกตัวของยีนใหม่ในตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องทำให้ไม่มีการทำลายยีนเดิมลง ปัจจุบันจึงมักจะมีการเพิ่ม marker อีกหนึ่งตัวลงไป (Thymidine kinase, tk gene) ซึ่งเป็น toxin gene ถ้ามีการแทรกตัวของยีนนี้ในตำแหน่งที่ถูกต้องแล้ว tk gene ก็จะหลุดไป ในขณะที่ถ้าเป็นการแทรกตัวในตำแหน่งที่ไม่ถูกต้อง tk gene ก็ยังคงค้างอยู่ และทำให้เซลล์ตาย (Positive-Negative

selection) เซลล์ที่มีการแทนที่ยีนเดิมอย่างถูกต้องก็จะมี neomycin resistant gene อยู่ ในขณะที่ tk gene ถูกทำลายไป

เซลล์ที่ใช้ในการทำ gene targeting นี้ เรียกว่า ES (Embryonic Stem) cell เป็นเซลล์ที่ได้มาจาก inner cell mass ของ blastocysts เซลล์นี้มีคุณสมบัติที่จะพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ ได้ (Totipotent) และสามารถที่จะเลี้ยงได้ในห้องทดลองเป็นเวลานานในสภาวะที่เหมาะสม จึงเหมาะสมที่จะใช้สายที่ต้องการทำ recombination ลงไปแล้วคัดเลือกเซลล์ที่มีการเกิด recombination เท่านั้น หลังจากนั้นเซลล์นี้จะถูกฉีดเข้าไปใน blastocyst ก่อนใส่คืนลงไปในมดลูกของตัวสัตว์เพื่อให้มีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยต่อไป สัตว์ที่เกิดมาจะมีบางอวัยวะรวมทั้ง germ cell ที่มีต้นกำเนิดมาจาก ES cell ที่มี recombination ของยีนที่ฉีดเข้าไป สัตว์ชนิดนี้เรียกว่า chimeric animal เมื่อผสมพันธุ์กับสัตว์ปกติ ลูกก็จะมีทุกเซลล์ในร่างกายที่เป็นเซลล์ที่มีการแทนที่ยีนปกติด้วยยีนใหม่พร้อมที่จะนำไปศึกษาต่อไป



รูปที่ 2. การสร้าง Gene-targeting animal โดยทำ ES cell ให้มีการเกิด recombination ก่อนฉีดเข้าไปใน blastocyst ก่อนเลี้ยงให้เป็น chimeric animal

ในการใช้ recombination ในการแทนที่ยีนใดยีนหนึ่งนั้น เป็นผลของการแทนที่ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนของเซลล์ ถ้ายีนนั้นมีความสำคัญมากการทำลายยีนตั้งแต่ต้น ทำให้สัตว์ไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ หรือบางกรณีเราต้องการให้มีการเกิด recombination ขึ้น ในบางชนิดของเซลล์และในบางช่วงเวลาเท่านั้น มีผู้คิดเทคนิคที่สามารถควบคุมการเกิด recombination แบบนี้ได้ เรียกว่า tissue-specific gene-targeting วิธีโดยย่อคือใช้ tissue specific promoter เชื่อมเข้ากับยีน Cre recombinase สร้าง transgenic animal ขึ้นมา แล้วสร้างสัตว์อีกชนิดหนึ่งซึ่งมี loxP gene เชื่อมเข้ากับชิ้นส่วนของยีนตำแหน่งที่ต้องการให้เกิด recombination โดย loxP จะทำงานร่วมกับ Cre protein เท่านั้นในการทำให้เกิด recombination สัตว์ที่เป็น

ลูกผสมของสัตว์ทั้งสองชนิดก็จะมี Cre protein ไปกระตุ้นให้มีการทำงานของ loxP protein ทำให้เกิด recombination ในตำแหน่งเฉพาะทำให้มีการแทนที่ของยีนใหม่และเฉพาะในเซลล์ที่ต้องการ หรือถ้าใช้ inducible promoter ในการสร้าง transgenic animal ก็จะมีการแทนที่เฉพาะเวลาที่มีการกระตุ้น promoter นี้ เท่านั้น (4)

ปัญหาและข้อควรระวังของการทำ gene-targeting animal คือ ES cell ที่จะใช้ต้องมีการทดสอบความสามารถที่จะเกิด recombination และความสามารถในการพัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ รวมทั้ง germ cell ได้ ปัจจุบันนี้ ES cell ของหนูได้รับการศึกษาทดลองมากที่สุด และมีการผลิตเพื่อจำหน่าย ส่วนในสัตว์ชนิดอื่นแทบจะไม่มีการศึกษาเลย เทคนิคการเลี้ยง ES cell ก็ต้องการผู้ที่มีความชำนาญในการเลี้ยงทั้งนี้เพราะต้องมีการเลี้ยงเป็นเวลานานและต้องมีการใส่สารบางชนิด (Leukocyte Inhibiting Factor) ในอาหารที่ใช้เลี้ยง เพื่อให้เซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ความรู้ ความชำนาญทางด้านอื่นได้แก่ การออกแบบ DNA vector สำหรับทำให้เกิด recombination ต้องการความเข้าใจทาง molecular biology เป็นอย่างดี การใส่ ES cell เข้าไปใน blastocyst และเลี้ยง ดูแล สังเกต สัตว์ก็ต้องการความรู้ทางสัตวศาสตร์ หลังจากได้สัตว์มาแล้ว ก็ต้องมีความรู้ในสาขานั้นๆที่จะสามารถทำการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองได้ การทดลองทางด้านนี้จึงต้องการความชำนาญในหลายสาขาและต้องการทุนและเวลาจำนวนมาก

การสร้างสัตว์โดยวิธี Cloning

วัตถุประสงค์ของการสร้างสัตว์ชนิดนี้คือเพื่อสร้างสัตว์ที่มีความเหมือนกันทุกประการทางด้านพันธุกรรม (Genetic Identical) เป็นจำนวนมาก โดยเริ่มต้นจากการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีความเหมือนกันในขั้นตอนนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ตามต้องการด้วย แล้วจึงนำแต่ละเซลล์นี้ไปทำให้เกิดเป็นสัตว์ โดยหนึ่งเซลล์จะกลายเป็นสัตว์หนึ่งตัว สัตว์แต่ละตัวที่เกิดขึ้นจะเหมือนกันทุกประการทั้งนี้เนื่องจากแต่ละเซลล์เริ่มต้นมีลักษณะเหมือนกัน

ขั้นตอนการทำสัตว์โดยวิธี cloning

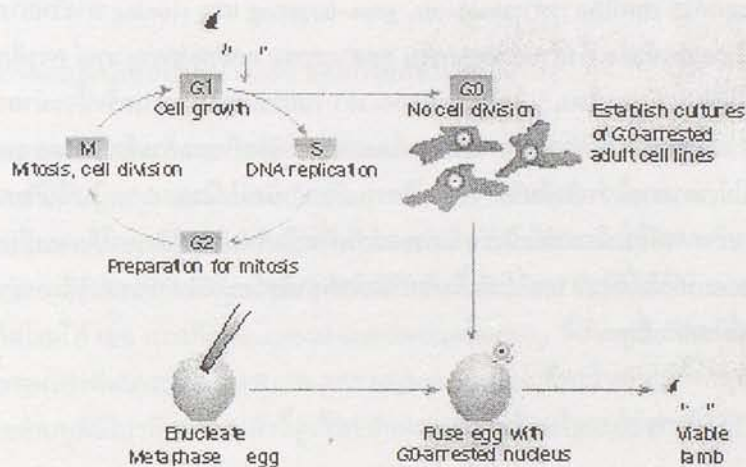
1. คัดเลือกและดัดแปลงเซลล์ที่จะใช้เป็นตัวต้นแบบของสารพันธุกรรมที่ต้องการ
2. เลี้ยงให้มีจำนวนและคุณสมบัติที่เหมาะสม
3. ผ่านกระบวนการที่จะสร้างเซลล์ให้เป็นสัตว์โดยวิธีต่าง ๆ

เซลล์ที่ใช้ในวิธี cloning นั้นมีได้หลายชนิด ปกติแล้วจะใช้เซลล์ตัวอ่อน (Embryonic cell) ทั้งนี้เพราะเซลล์เหล่านี้มีความสามารถที่จะพัฒนาเป็นอวัยวะและสิ่งมีชีวิตต่อไป (Totipotent cell) เซลล์เหล่านี้ควรจะสามารถที่จะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในเซลล์ เราสามารถเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้จำนวนมากตามต้องการ เมื่อจะทำ cloning โดยใช้สารพันธุกรรมของเซลล์นี้เป็นแม่แบบแล้ว nucleus ของเซลล์เหล่านี้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการที่เรียกว่า nuclear transfer

วิธี nuclear transfer มีกระบวนการคร่าว ๆ คือ ใช้เซลล์ที่ต้องการใช้เป็นแม่แบบของสารพันธุกรรมมาเลี้ยงพร้อมทั้งเปลี่ยนพันธุกรรมตามต้องการ แล้วแยกเฉพาะ nucleus ของเซลล์ออกมา ก่อนที่จะนำมา fuse กับ เซลล์ fertilized egg ที่ถูกแยก nucleus ออกแล้ว (Enucleated egg) เซลล์ใหม่นี้ก็จะมีสารพันธุกรรมที่มาจาก nucleus ของเซลล์หนึ่งในขณะที่ได้รับโปรตีนที่จำเป็นต่อการแบ่งตัวและพัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ จาก cytoplasm ของไข่ทำให้เจริญเป็นตัวสัตว์ได้ nucleus ที่แยกได้ทั้งหมดมีลักษณะเหมือนกันเพราะได้มาจาก

เซลล์กันกำเนิดเดียวกัน สัตว์แต่ละตัวที่มาจากแต่ละ nucleus จึงมีสารพันธุกรรมเหมือนกัน (Genetic identical) เราจึงเรียกวิธีนี้ว่า การ clone (cloning)

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการรายงานที่ใช้เทคนิค cloning ในการผลิตแกะชนิดหนึ่งขึ้นมา ให้ชื่อว่า Dolly รายงานฉบับนี้ได้สร้างความตื่นตะลึงให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก ทั้งนี้เพราะเป็นการสร้างแกะโดยใช้ nucleus จากเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature cell) มา fuse เข้ากับ cytoplasm ของ fertilized egg ความแปลกของรายงานฉบับนี้อยู่ที่สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติ ของ nucleus ของเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วให้ไปมีคุณสมบัติ totipotent อีกครั้งหนึ่งได้ เรียกว่า การเกิด reprogram ซึ่งก่อนหน้านี้มีความเชื่อกันว่าเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วไม่สามารถกลับไปมีคุณสมบัติ totipotent ได้อีก ผู้ที่ทำการทดลองนี้ได้ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะอดอาหารก่อน (Serum starvation) ซึ่งจะทำให้เซลล์และยีนใน nucleus ของเซลล์อยู่ในสภาวะนิ่ง (Quiescent stage) เมื่อ nucleus นี้ได้เข้าไปอยู่ในเซลล์ไข่ที่เหมาะสมสำหรับการแบ่งและพัฒนาเป็นตัวอ่อนจึงได้เกิดเป็นตัวอ่อนได้ การค้นพบนี้นับเป็นการจุดประกายให้มีการนำเอาเทคนิคนี้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ในมนุษย์ อันจะกล่าวถึงต่อไป (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การสร้าง Genetic Engineering animal โดยวิธี cloning

เมื่อปลายปีที่ผ่านมาได้มีการรายงานการศึกษาที่เซลล์ซึ่งใช้ในการเป็น nuclear donor ที่แม้ว่าจะได้ รับการแทรกของยีนใหม่ที่เป็นยีนจาก species อื่น (human gene) ก็ยังมีความสามารถที่จะเจริญพัฒนาเป็น ตัวต่อไปได้ และสัตว์ที่เกิดขึ้นยังสร้างโปรตีนที่เกิดจากยีนใหม่ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมได้ด้วย การค้นพบนี้มี ประโยชน์มากต่อการผลิตโปรตีนบางชนิดจำนวนมากในสัตว์

การผลิตสัตว์ที่มี genetic identical อาจทำได้โดยวิธีอื่นอีกเช่น การเลี้ยง fertilized egg ให้แบ่งตัว มาถึงระดับหนึ่ง เช่น 4-8 เซลล์ เมื่อนำแต่ละเซลล์มาเลี้ยงก็จะเจริญเป็นสัตว์แต่ละตัวที่มีสารพันธุกรรมเหมือน กันทุกประการ เพราะเซลล์เหล่านี้เริ่มต้นมาจากเซลล์เดียวกัน

การทำ cloning จนถึงปัจจุบันนี้สามารถทำได้ในสัตว์บางชนิดเท่านั้น ที่ประสบความสำเร็จได้แก่ ในแกะ วัว มีผู้พยายามทำในหนูแต่ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์หนูเอง หัวข้อที่มี การวิพากษ์วิจารณ์กันมากคือ การทำ cloning ในมนุษย์ซึ่งปัจจุบันมีหลายประเทศที่มีกฎหมายห้ามการทำ

และยังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการทดลองหรือทำ cloning ของมนุษย์ แต่การไม่มีรายงานไม่ได้หมายความว่าไม่มีการทดลองทำ การทำ cloning ของมนุษย์มีปัจจัยทางมนุษยธรรมเข้ามาเกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์ด้วย จึงต้องมีการพิจารณาอย่างละเอียดถี่ถ้วน

ข้อจำกัดและข้อควรระวังในการทำ cloning คือการเลี้ยงเซลล์และเทคนิคการทำให้เกิดเป็นตัวสัตว์นั้นต้องอาศัยนักวิทยาศาสตร์ที่มีการฝึกอย่างเชี่ยวชาญ นอกจากนี้ยังใช้เงินและเวลาจำนวนมากเทียบกับการวิจัยในสาขาอื่น ดังนั้นก่อนการทดลองต้องมีวัตถุประสงค์ที่ชัดเจน สัตว์ที่เกิดจากการ cloning ยังมีความแตกต่างจากสัตว์ที่เกิดด้วยกลไกทางธรรมชาติ เช่น DNA ของสัตว์ที่เกิดจากการ cloning ได้มาจากเซลล์ที่แก่แล้ว เซลล์ที่เกิดขึ้น อาจจะ มีความแก่เกินอายุของเซลล์จริง ๆ สัตว์ชนิดนี้อาจมีปัญหาที่ยังไม่พบในขณะนี้เช่น ปัญหาเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ อายุขัย และปัญหาอื่น ๆ

Application in Medicine

การประยุกต์ใช้ เทคนิคการทำ transgenic, gene-targeting และ cloning ทางวิทยาศาสตร์นั้นมีความหลากหลายในหลายหัวข้อ ทั้งด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และทางการแพทย์ การศึกษาเป็นไปอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการค้นพบใหม่ ๆ เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ในการเสนอผลงานครั้งนี้จะนำการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ใน 3-4 หัวข้อมากล่าวถึง การรายงานโดยส่วนมากยังเป็นผลการศึกษาทดลองเบื้องต้น ข้อมูลบางชนิดที่ต้องใช้เวลาานกว่าจะเห็นผล จึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ในอนาคต ในที่นี้จึงขอกล่าวถึงหลักการและ พื้นฐาน ของการศึกษาในแต่ละหัวข้อ แต่ละกล่าวเพิ่มเติมถึงผลการศึกษาโดยละเอียดในการบรรยาย ผู้ที่สนใจขอแนะนำให้อ่านเพิ่มเติมในหนังสือโดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานของวิธีการทำจากเอกสารนี้ จะทำให้ได้ข้อมูลที่ทันสมัยที่สุด

1. การผลิตสาร Biological Molecules

สาร biological molecule คือสารที่ทำหน้าที่และสร้างในสิ่งมีชีวิต มี biological molecule หลายตัวที่นำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรค โดยการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์ ที่ไม่สามารถผลิตสารนี้ได้หรือผลิตได้น้อยกว่าปกติ เมื่อมีความต้องการมากขึ้นการสกัดสารเหล่านี้จากเซลล์จึงไม่เพียงพอและบางครั้งสารที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตไม่บริสุทธิ์พอ ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เหมือนในร่างกาย จึงมีการพยายามใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วย เนื่องจากสารเหล่านี้ผลิตและทำงานในร่างกาย การผลิตในหลอดทดลองหรือใช้เซลล์แบคทีเรียทำให้ได้โปรตีนที่มีความแตกต่างจากโปรตีนที่ผลิตในร่างกาย และไม่สามารถทำงานได้ จึงต้องมีการสร้างโปรตีนเหล่านี้ในสัตว์ทดลองแทน

มีโปรตีนหลายชนิดที่ได้ทดลองสร้างขึ้นในสัตว์โดยใช้ยีนของคนเป็นตัวต้นแบบในการสร้าง เนื่องจากการทำผลผลิตเหล่านี้มีผลประโยชน์ทางธุรกิจเข้ามาเกี่ยวข้อง การรายงานทางวิทยาศาสตร์จึงมักเป็นการรายงานเบื้องต้นเท่านั้น วิธีการโดยละเอียดมักจะไม่เป็นที่เปิดเผย

มีวิธีการ 2 ชนิดที่ใช้ในการสร้างสัตว์ที่มีโปรตีนมาก คือการใช้เทคนิค transgenic และ cloning โดยจะเป็นการทำให้โปรตีนนั้นขับออกมาทางน้ำนม หรือทางเลือดอันจะเป็นการทำให้สามารถเก็บโปรตีนนั้นเรื่อยๆโดยไม่จำเป็นต้องฆ่าสัตว์ สัตว์ที่ใช้ในการทำจึงต้องเป็นสัตว์ที่ผลิตน้ำนมหรือให้เลือดใน

การเก็บเป็นจำนวนมากพอ ทั้งสองชนิดมีหลักการในการทำพันธุวิศวกรรมเหมือนกันคือ ใช้ promoter ที่เป็น tissue specific ในกรณีที่ต้องการให้มีการโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งเช่น promoter ที่ควบคุมให้ยีนแสดงออกที่ mammary gland ทำให้มีการสร้างโปรตีนในน้ำนม หรือ inducible promoter ในกรณีที่ต้องการโปรตีนจำนวนมาก promoter เหล่านี้จะถูกเชื่อมต่อกับยีนที่เป็นต้นแบบของการสร้างโปรตีนที่ต้องการ แล้วจึงฉีดยีนนี้เข้าในเซลล์ เช่น fertilized egg หรือ fibroblast ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการทำให้เป็นสัตว์ต่อไป สัตว์ตัวนี้ก็จะสร้างสารตามยีนที่ฉีดเข้าไป เช่นการผลิต factor IX ในแกะทำโดยใช้ β -galactoglobulin promoter ซึ่งควบคุมการแสดงออกที่ mammary gland เชื่อมต่อกับ Human Factor IX gene ผลิตแกะที่หลั่ง Factor IX ในน้ำนมได้ (5)

โปรตีนที่สร้างขึ้นจะต้องถูกนำมาแยกเอาเฉพาะโปรตีนที่ต้องการ รวมทั้งต้องทดสอบหลายอย่างก่อนนำมาใช้จริง เช่นการทดสอบ คุณสมบัติ การทำหน้าที่ และความปลอดภัยของสาร ทั้งนี้เนื่องจากการทำพันธุวิศวกรรมและการใช้สัตว์ต่าง species เป็นตัวผลิตสารอาจเกิดผลที่ไม่อาจคาดเดาได้ มีโปรตีนของสัตว์หลายชนิดที่มีความพยายามที่จะสร้างโดยใช้ transgenic plant โดยการรับประทานพืชชนิดนี้อาจจะทำให้ได้รับโปรตีนนั้นโดยตรง

2. การผลิตสัตว์เพื่อใช้เป็น model ของการศึกษาโรค

มีโรคหลายชนิดในคนที่สามารถใช้สัตว์เป็น model ในการศึกษาได้ ส่วนมากเป็นโรคที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม เช่นมะเร็งที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของยีนใดยีนหนึ่งเช่น myc gene เชื้อไวรัสบางชนิดที่ infect เฉพาะในคนแล้วทำให้เกิดโรคแต่ไม่ infect ในสัตว์ ก็สามารถใส่เฉพาะยีนของไวรัสทำ transgenic animal พบว่าสัตว์ที่เกิดมีลักษณะของโรคคล้ายกับที่พบในคน สัตว์นี้ใช้เป็น model ทำให้ทราบกลไกของการเกิดโรคได้ เช่น การเกิด multifocal leukoencephalopathy ที่เกิดจาก JV human papova virus (6) การเพิ่มขึ้นของโปรตีนบางชนิดเช่น Renin และ angiotensinogen ที่พบในคนไข้ตั้งครรภ์ที่มีภาวะความดันโลหิตสูง เมื่อทำหนูที่มีโปรตีนทั้งสองตัวนี้สูงก็พบลักษณะอาการที่พบในคนไข้เช่นกัน (7)

อีกรูปแบบหนึ่งของสัตว์ที่ใช้เป็น model ก็คือการใช้ gene-targeting animal ซึ่งใช้ในโรคที่เกิดจากการขาดหายไปของยีน เช่นมะเร็งบางชนิดที่เกิดจากการหายไปของยีน p53 บางส่วนหรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงบางตำแหน่งของยีน หรือ เกิดการเปลี่ยนของหนึ่งนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป แล้วทำให้เกิดโรคเช่น โรค Familial Hypertrophic Cardiomyopathy (8) หรือการเปลี่ยนของหลายนิวคลีโอไทด์เช่นโรค Alzheimer (9) บางโรคก็ต้องการทั้ง 2 รูปแบบของสัตว์ในตัวเดียวกันเช่นสัตว์ที่ใช้เป็นต้นแบบของโรค sickle cell anemia คือต้องการการทำลายยีนหนึ่งพร้อม ๆ กับการเพิ่มของอีกยีนหนึ่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วย(10)

การสร้างสัตว์ที่จะใช้เป็น model ในการศึกษากลไกการเกิด อาการ ลักษณะทางพยาธิสภาพ การทดลองยาหรืออื่น ๆ นั้น ผู้ทำต้องใช้วิจารณ์ญาณในการใช้และอธิบายผลที่เกิดขึ้นอย่างระมัดระวัง ทั้งนี้เนื่องจากผลการทดลองจากสัตว์อาจต่างจากผลที่จะพบในคน แม้จะมีลักษณะของโรคเหมือนกัน กลไกของร่างกายซับซ้อนกว่าที่ความรู้ของเราจะเข้าใจได้ทั้งหมดและยังมีความแตกต่างกันระหว่างสัตว์แต่ละตัวอีกด้วย มีบางครั้งถึงแม้จะสร้างสัตว์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมให้เหมือนกับที่พบในคนไข้แล้วก็ไม่ได้เกิดความผิดปกติเหมือนกับที่พบในคน หรือบางครั้งมีความผิดปกติที่ไม่เหมือนกับที่เกิดในคนเกิดขึ้น

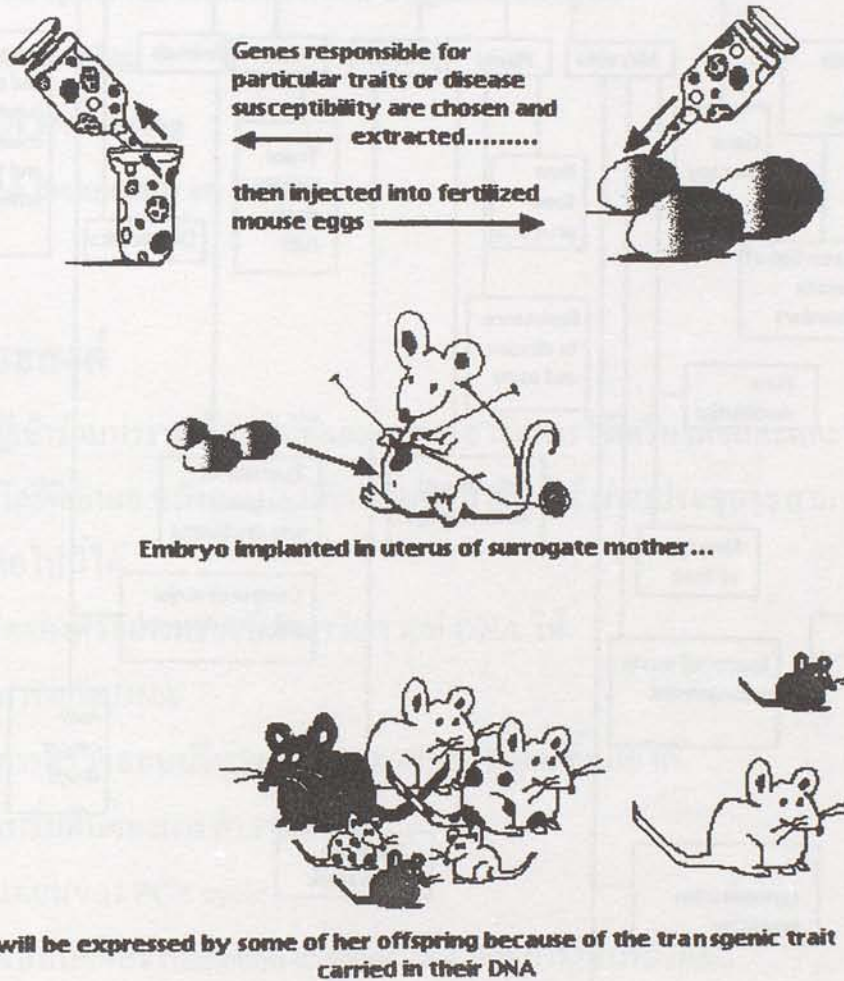
3. การผลิตสัตว์เพื่อใช้ในการศึกษากลไกพื้นฐานของเซลล์

มีกลไกหลายชนิดของร่างกายที่ไม่สามารถศึกษาได้ในหลอดทดลอง เช่นกระบวนการ development ของ embryo เช่นการที่จะบอกได้ว่ายีนใดยีนหนึ่งควบคุมการพัฒนาของอวัยวะใดเป็นต้น มีการทดลอง delete ยีน *hox11* ในหนูแล้วพบว่าหนูตัวนั้นไม่มีม้าม แสดงว่ายีนนี้ควบคุมการ differentiate ของเซลล์ที่จะกลายไปเป็นม้าม หรือการเติมยีนที่ควบคุมการเจริญไปเป็นตาเข้าไปในแมลงหวี่ก็พบว่าแมลงหวี่ตัวนั้นมียตาเพิ่มขึ้น การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันวิทยาก็เป็นตัวอย่างที่สำคัญในการใช้สัตว์ในการทดลองทั้งนี้ เพราะเป็นระบบที่ต้องการการทำงานของเซลล์หลายชนิดในเวลาเดียวกัน เหมือนกับการทำงานของระบบประสาทและสมอง เช่นการศึกษาที่เมื่อทำลายยีน *fosB* ในหนูแล้วพบว่าหนูตัวนั้นมีความสามารถในการดูแลลูกอ่อนที่เกิดมาน้อยลง การศึกษาเหล่านี้ล้วนแล้วแต่มีความสำคัญไม่ทางตรงก็ทางอ้อมต่อการแพทย์ และไม่สามารถทำได้ หรือทำได้ไม่ครบถ้วนในหลอดทดลอง การเพิ่มหรือลดยีนบางชนิดในเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการทำหน้าที่หรือต่อการแสดงออกของยีนอื่นในเซลล์นั้น ทำให้ทราบหน้าที่และการทำงานของยีนภายในเซลล์ เช่นการเพิ่มยีน *fos* ในเซลล์ของสัตว์ทำให้ทราบว่า *fos* ทำงานร่วมกับ *cyclin gene* ในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย (11)

Reference

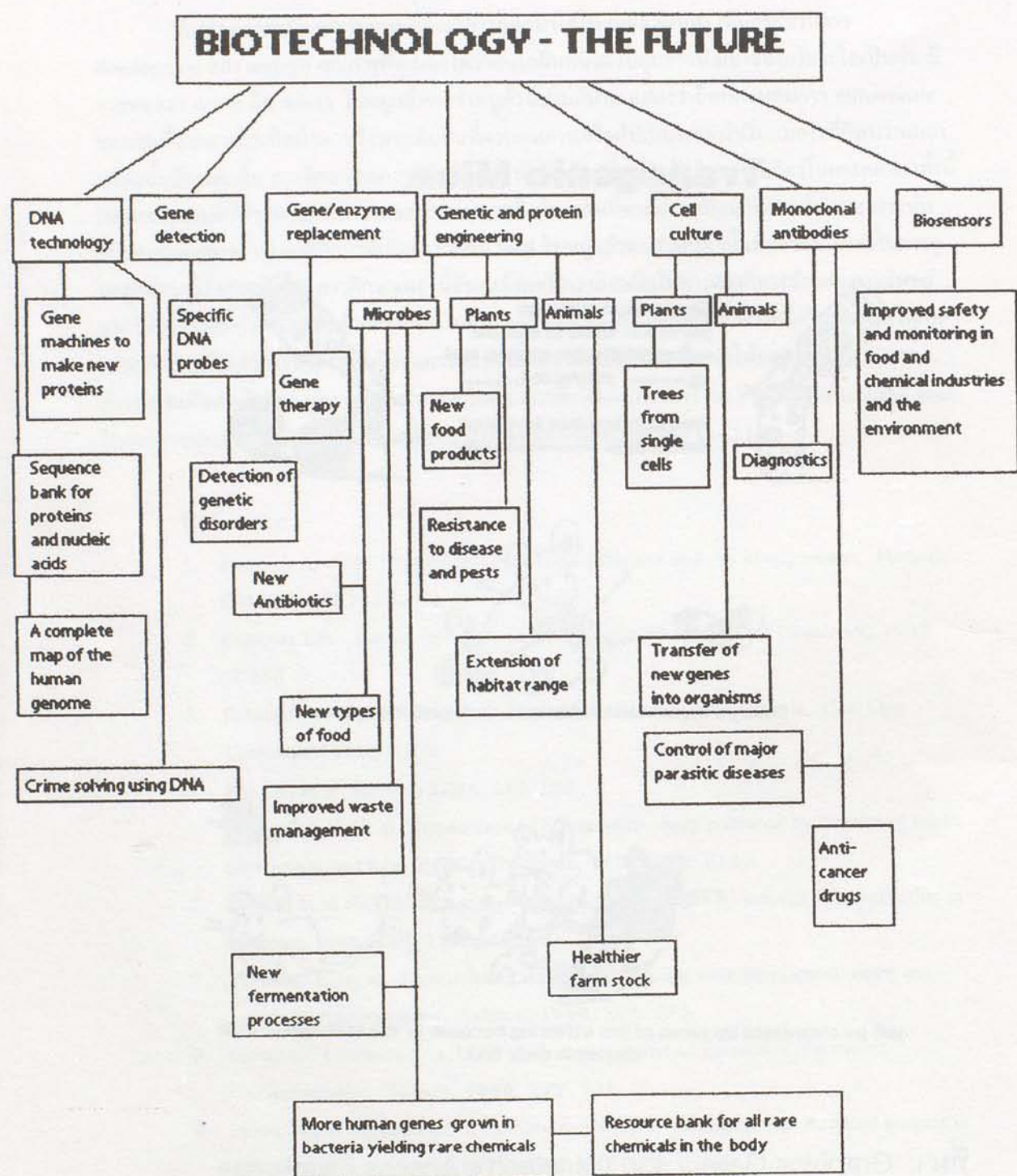
1. Faerman A, et al. Transgenic mice: Production and analysis of expression. *Methods Cell Biol.* 1997; 52:373
2. Cameron ER. Recent Advances in transgenic technology. *Mol Biotechnol.* 1997; 7:253
3. Echelard, Y. Recombinant Protein production in transgenic animals. *Curr Opin Biotechnol.* 1996; 7:536
4. Hua Gu, et al. *Science*, 1994; 265:103
5. Schnieke A.E., et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblast. *Science*, 1997; 278: 2130.
6. Small J.A, et al. The early region of human papavavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell*, 1996; 46: 13
7. Takimoto E., et al. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science*, 1996; 274: 995.
8. Geisterfer-Lawrance A.A.T., et al. A mouse model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Science*, 1996; 272: 731.
9. Hsiao, K., et al. Correlative memory deficits, a B elevation, and Amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 1996; 274: 99.
10. Ryan, T.M., et al. Knockout-Transgenic mouse model of sickle cell disease. *Science*, 1997; 278: 873.
11. Phuchareon J. and Tokuhisa, T. Deregulated c-Fos/AP-1 modulates expression of the cyclin and the cdk gene in splenic B cells stimulated with lipopolysaccharide. *Can Lett*, 1995; 92: 203.

Transgenic Mice



ที่มา: Graphics Gallery จาก Genetech's Access Excellence

<http://www.gene.com>



ที่มา: Graphics Gallery จาก Genetech's Access Excellence

<http://www.gene.com>

ปฏิบัติการ

หัวข้อปฏิบัติการที่สำคัญมีดังนี้

1. DNA extraction
2. PCR
3. Electrophoresis and restriction fragment analysis
4. Gene cloning
5. DNA sequencing
6. DNA technology on WWW

จุดประสงค์

เพื่อให้ผู้เข้าร่วมประชุมได้ปฏิบัติและชมการสาธิตการใช้เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในเทคโนโลยีดีเอ็นเอ หลังการปฏิบัติและดูการสาธิต ผู้เข้าร่วมประชุมจะสามารถตอบคำถามในหัวข้อต่อไปนี้ได้

1. ชนิดของตัวอย่างตรวจที่นำมาวิเคราะห์ DNA ได้
2. วิธีการสกัด DNA
3. วิธีการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้
4. สารเริ่มต้นของการทำ PCR
5. ขั้นตอนของ PCR cycle
6. คุณสมบัติของ restriction endonuclease และการใช้ประโยชน์
7. หลักการสำคัญที่ใช้แยก DNA fragment ด้วย electrophoresis
8. วิธีอ่านขนาดของ DNA fragment บน agarose gel หลังทำ electrophoresis
9. Gene cloning ใน host cell ที่เป็นแบคทีเรีย
10. วิธีการแยกและทดสอบ positive clone
11. หลักการสำคัญของ DNA sequencing โดยใช้ dideoxynucleotide
12. การอ่านลำดับเบสจาก autoradiogram ของ sequencing gel

เทคนิคทางอณูชีววิทยา

การศึกษาทางอณูชีววิทยามีจุดสนใจที่ gene ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม โดยหลัก การ การศึกษา gene มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาส่วนประกอบอื่นๆ ของร่างกาย คือ ต้องมีการแยก, identify, และทดสอบหน้าที่ในร่างกาย

โครงสร้างพื้นฐานของยีนในคนเป็น DNA การศึกษาทางอณูชีววิทยาจึงทำให้มีการพัฒนาเทคนิค และวิธีการที่เรียกว่า DNA technology ในหลายรูปแบบ

เทคนิคเบื้องต้นของการศึกษาทาง อณูชีววิทยา ได้แก่

1. DNA extraction
2. Electrophoresis
3. Southern blotting
4. DNA fingerprinting
5. DNA cloning
6. DNA sequencing
7. Polymerase chain reaction (PCR)

DNA extraction

การศึกษาโครงสร้างและดูการทำหน้าที่จาก gene expression ของ gene ชนิดใดชนิดหนึ่ง ต้องสกัด gene คือ DNA ออกมาจากเนื้อเยื่อก่อน DNA สามารถสกัดได้จากตัวอย่างเลือด (5-10 ml) หรือจากเนื้อเยื่อ ที่ต้องการตรวจ

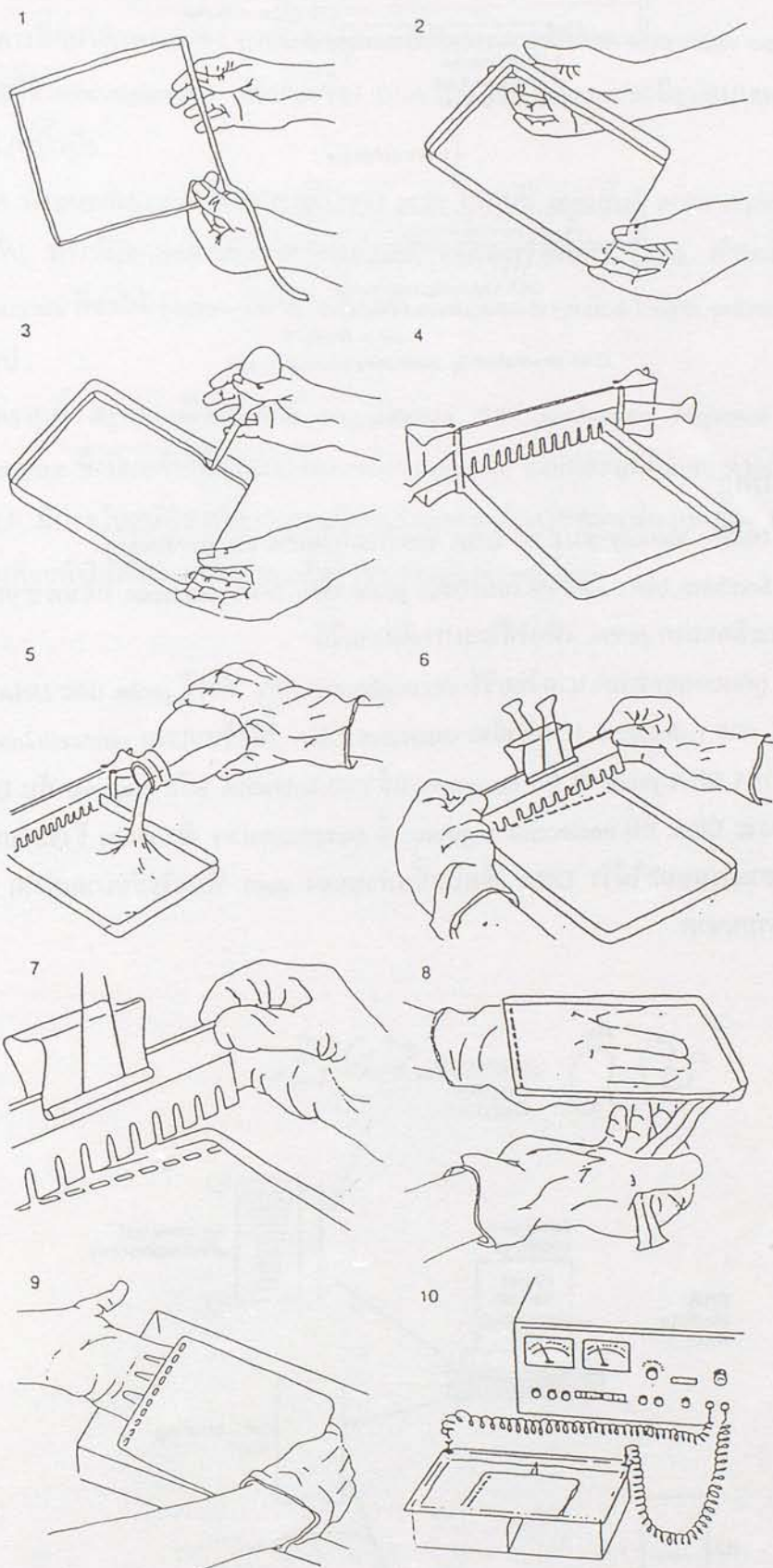
การสกัด DNA ออกมาจาก nucleus ของ cell ทำได้โดยนำเนื้อเยื่อมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ นำมาย่อยด้วย enzyme proteinase K และ SDS ซึ่งจะช่วยให้ cell membrane และ nuclear membrane แตก DNA จะถูกปล่อยออกจาก nucleus มาอยู่ในสารละลาย จากนั้นนำสารละลายมาปั่นแยก เอาเศษของ cell ออก เหลือ DNA ละลายอยู่ในส่วนน้ำ (supernatant) นำส่วนน้ำมาตกตะกอน DNA ด้วยเกลือ และ alcohol แล้วจึงนำตะกอน DNA มาละลายในน้ำหรือบัฟเฟอร์เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป เช่น การตัดสาย DNA และแยกเป็น fragment โดย electrophoresis

การตัดสาย DNA ใช้ restriction enzyme ซึ่งเป็น DNase ที่มีความจำเพาะต่อ nucleotide sequence ทำให้ทราบการเรียงลำดับเบสที่ปลายทั้งสองข้างได้

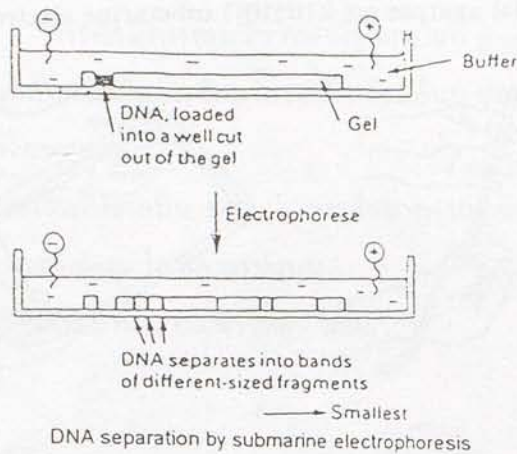
Electrophoresis

เป็นวิธีการแยกสารที่มีประจุโดยใช้กระแสไฟฟ้า ส่วนใหญ่ใช้ในการแยกโปรตีนและ DNA การแยกโปรตีนอาศัยความแตกต่างทางประจุ ขนาด และรูปร่าง แต่สำหรับ DNA ซึ่งมีรูปร่างและจำนวนประจุต่อหน่วยน้ำหนักเหมือนกัน การแยก DNA จึงขึ้นอยู่กับความยาวของสาย DNA เพียงอย่างเดียว อนุที่มีสายสั้นจะวิ่งไปได้ไกลกว่าสายยาว Gel ที่ใช้เป็น matrix ในการแยก DNA ส่วนใหญ่เป็น agarose

การเตรียม horizontal agarose gel สำหรับทำ submarine electrophoresis



A preparation of a horizontal agarose gel

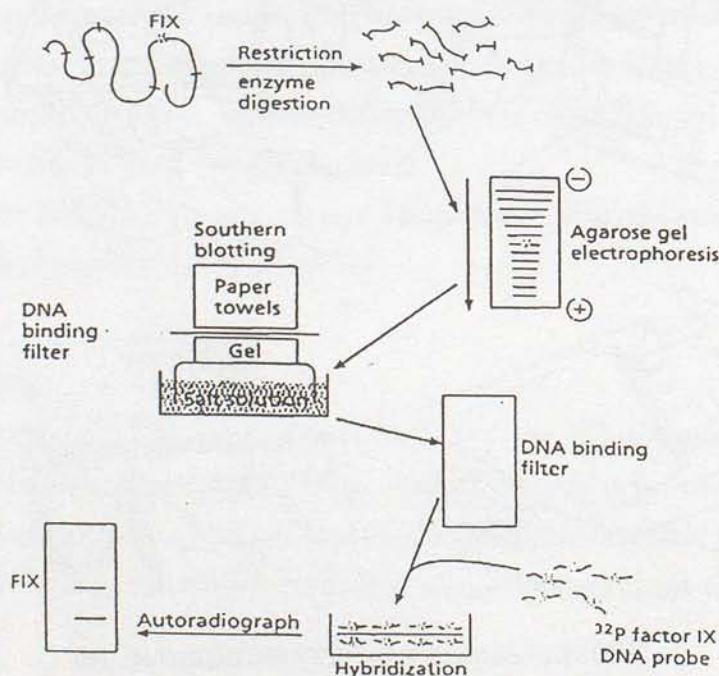


Southern Blotting

มีจุดประสงค์เพื่อ identify ชิ้นส่วน DNA ที่แยกออกโดยวิธี electrophoresis

ในการทำ Southern blot , ต้องเตรียม DNA probe ซึ่งมี DNA sequence ที่จำเพาะของ gene ที่จะศึกษาไว้ก่อน และติดฉลาก probe เพื่อให้สามารถติดตามได้

เมื่อ DNA ถูกแยกออกตามขนาดโดยวิธี electrophoresis แล้ว ทำให้ probe และ DNA บน agarose gel แยกออกเป็น 2 สาย (denature) แล้วย้าย denatured DNA ไปไว้บนแผ่น nitrocellulose หรือ nylon membrane แล้วนำ DNA probe ที่ ถูก denatured แล้ว มา hybridize หรือ reanneal กับ DNA บนแผ่น nitrocellulose เฉพาะ DNA ที่มี nucleotide sequence ที่ complementary กับ probe จึงจะจับกับ probe ได้ โดยวิธีการนี้ทำให้สามารถบอกได้ว่า DNA ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของ gene ที่สนใจมีขนาดเท่าใด โดยเทียบกับ DNA marker ที่ทราบขนาด



DNA fingerprinting

เป็นการศึกษาลักษณะของ DNA fragment ที่เกิดจากการตัดด้วย restriction enzyme แล้วแยกออกตามขนาดโดยวิธี electrophoresis ลักษณะของ DNA บน electrogram จะมีรูปแบบเฉพาะในแต่ละบุคคลเหมือนลายพิมพ์นิ้วมือ

DNA fingerprinting เกิดจากบางแห่งของ gene ในคนมี sequence polymorphisms คือการเรียงตัวของเบสต่างกัน ทำให้มีผลต่อการตัดของ restriction enzyme เมื่อนำ DNA ส่วนนั้นมาทำการย่อยด้วย restriction enzyme ก็จะทำให้ pattern ที่ต่างกัน เรียกว่า restriction fragment length polymorphism (RFLP) ดังแสดงในรูป

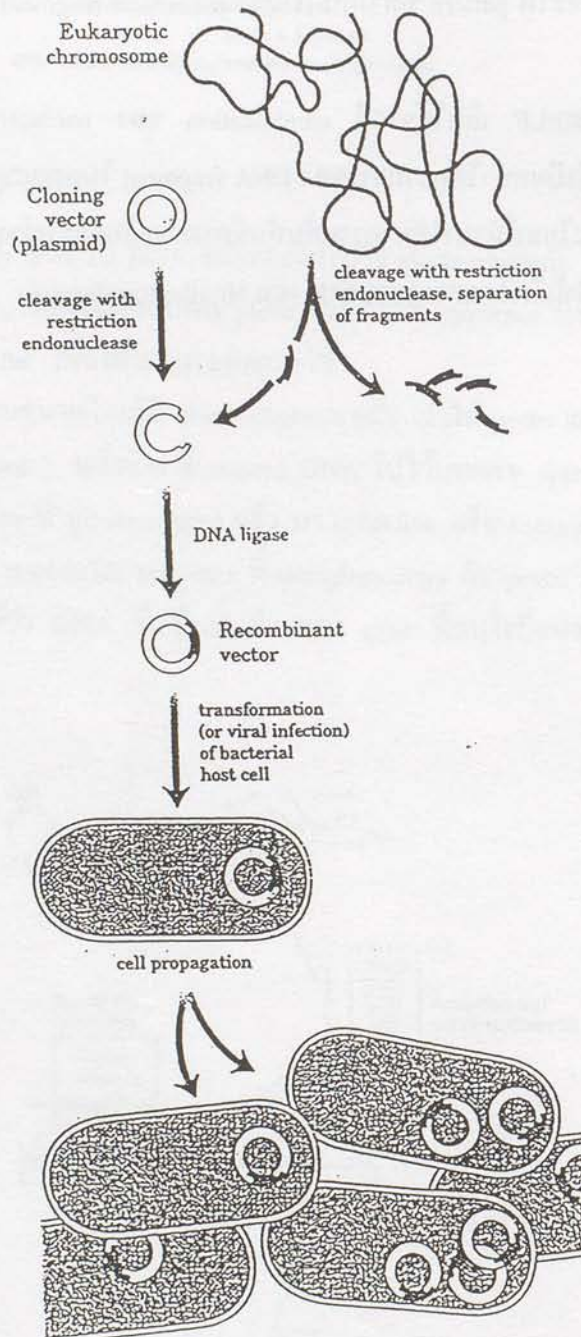
นอกจากนี้ RFLP เกิดได้จากมี amplification ของ nucleotide sequence ระหว่างจุดตัดของ restriction enzyme ซึ่งมีผลทำให้ความยาวของ DNA fragment ในแต่ละบุคคลแตกต่างกันได้

RFLP มีประโยชน์นำมาใช้หาความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-แม่-ลูก และสามารถนำมาใช้หาความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคทางกรรมพันธุ์ เช่น Huntington disease

DNA cloning

มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณ gene หรือ DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษาให้มากขึ้นเพียงพอที่จะนำไปศึกษาได้

ในการทำ DNA cloning หรือ gene cloning, จะต้องตัด DNA ส่วนที่ต้องการศึกษาออกจากโครโมโซมหรือ gene, นำมาต่อกับ DNA ที่เป็น cloning vector ในหลอดทดลอง



Cloning vector เป็นโมเลกุลของ DNA ซึ่งมีความสามารถที่จะแบ่งตัวได้เมื่ออยู่ใน host cell ที่เหมาะสม, ในการทำ DNA cloning, ต้องนำชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการศึกษามาต่อเข้ากับ cloning vector เพื่อให้ได้เป็น recombinant DNA (rDNA) , หลังจากนั้น นำ rDNA ใส่เข้าไปใน host cell เช่น *E. coli*, yeast, เซลล์สัตว์ หรือเซลล์พืช เมื่อ host cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์, rDNA ที่อยู่ในเซลล์ก็จะแบ่งตัว (replicate) และเพิ่มปริมาณตามไปด้วย จึงเป็นผลให้มีการเพิ่มจำนวนของ DNA ที่ต่ออยู่กับ cloning vector, รอให้เซลล์แบ่งตัว เพื่อให้ได้ DNA มากพอที่จะนำไปศึกษาส่วนของ DNA นั้นๆ ได้

DNA sequencing analysis

เป็นวิธีการหาลำดับเบสของ DNA ที่ต้องการศึกษา

หลักการ sequencing โดยวิธีของ Sanger อาศัยการทำหน้าที่ของ DNA polymerase ซึ่งจะทำงานได้ต้องมี DNA template , primer และ deoxynucleotide และอาศัยหลักการ competition ระหว่าง dideoxynucleotide (ddNTP) กับ deoxynucleotide (dNTP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น

ตัวอย่างเช่น ถ้าเราจะทำการ sequence DNA ที่อยู่ใน plasmid cloning vector, จะต้อง denature DNA เพื่อให้ DNA สายคู่แยกออกเป็น DNA สายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน แล้วนำมา anneal กับ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายสั้นๆ เพื่อให้ primer ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่

Oligonucleotide primer จะถูกออกแบบให้มี sequence complementary กับ plasmid DNA และมีด้านปลาย 3' อยู่ตรงส่วนที่ใกล้เคียงกับ sequence ที่เราต้องการทราบลำดับเบส

Primer จะ anneal กับสาย DNA สายเดี่ยวเท่านั้น

เมื่อ oligonucleotide primer anneal กับ DNA template, เอ็นไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA สายที่ complement กับ template ต่อไป

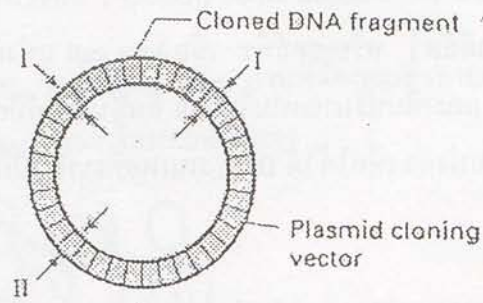
เนื่องจากการใช้ทั้ง ddNTP และ dNTP ในการต่อสาย DNA, ถ้า dideoxynucleotide ถูก incorporated เข้าไปในสาย DNA ที่กำลังสร้างอยู่ การสร้าง DNA สายนั้นก็จะหยุดลง ส่วนสายที่มี deoxynucleotide incorporate เข้าไป ก็สามารถจะสังเคราะห์ไปได้เรื่อยๆ จนกว่าจะมีการ incorporate dideoxynucleotide เข้าไป

ดังนั้น ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ที่มี ddNTP ร่วมอยู่ด้วย จะเกิดการหยุดได้ทุกตำแหน่งที่มี incorporation ของ dideoxynucleotide เข้าไปในสาย DNA

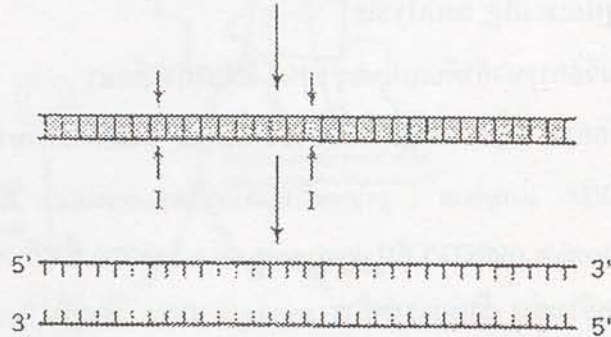
ใน ddA reaction (ปฏิกิริยาที่มี dNTP ทุกชนิดกับ ddA) จะมีการสร้าง DNA สายใหม่ขนาดต่างๆ ที่มีปลายสุดท้ายเป็น ddA ทุกสาย ในขณะที่เดียวกัน ใน ddG, ddC, ddT reaction ก็จะมี DNA สายใหม่ที่มีเบสสุดท้ายเป็น ddG, ddC และ ddT ทั้งสิ้น จากนั้นสาย DNA จะถูกนำมาแยกขนาด โดย polyacrylamide gel electrophoresis และสาย DNA จะสามารถมองเห็นได้โดย autoradiogram

PREPARATION OF A TEMPLATE DNA FOR DIDEOXY SEQUENCING

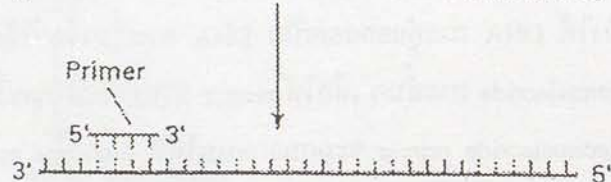
1. Cloned DNA fragment in a plasmid cloning vector; I and II are restriction sites



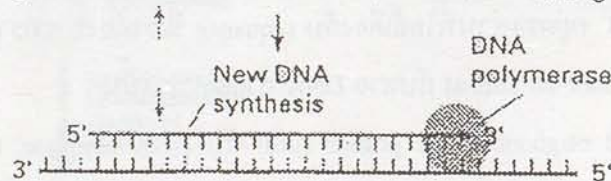
2. Cut with II to produce linear DNA and denature to single strands



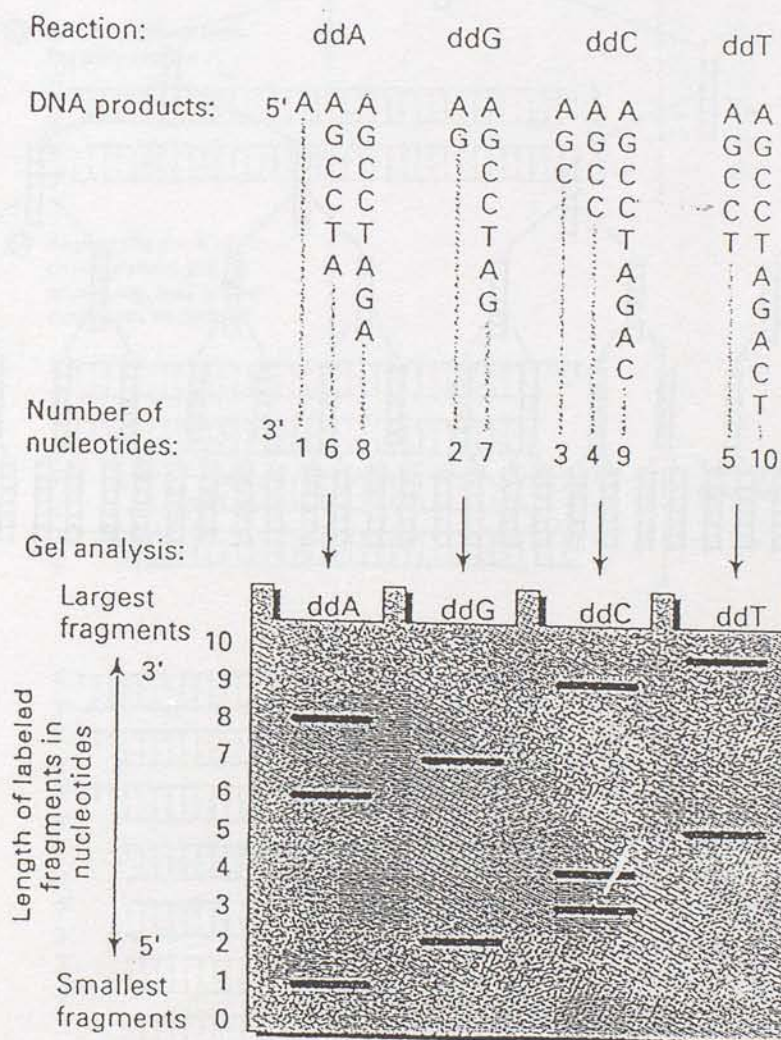
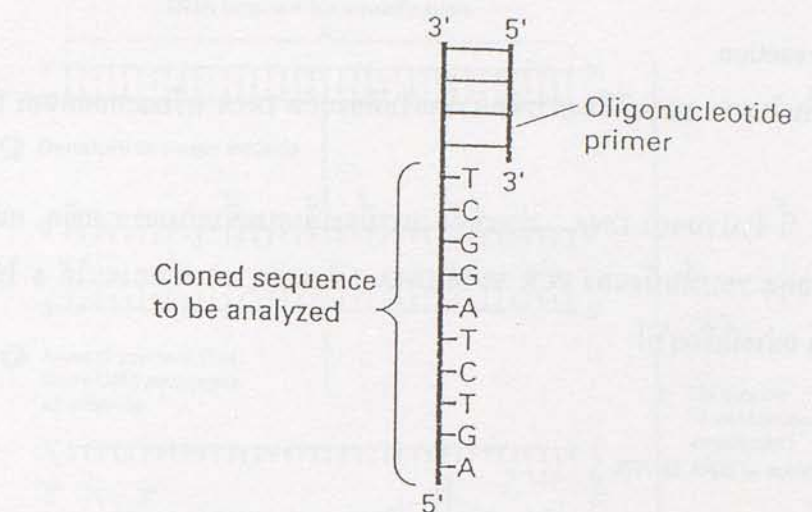
3. Anneal and oligonucleotide primer that is complementary to plasmid next to a I site



4. Extend primer with DNA polymerase



Dideoxy DNA sequencing of a theoretical DNA fragment.



Sequence deduced from banding pattern of autoradiograph made from gel:

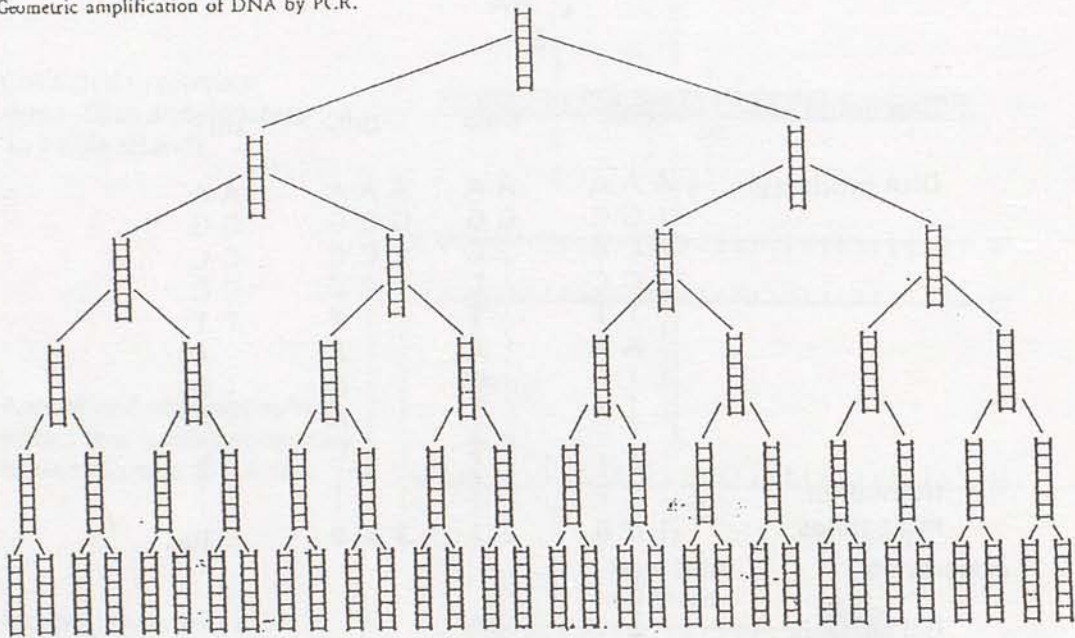
5' A-G-C-C-T-A-G-A-C-T 3'

Polymerase chain reaction

เป็นวิธีการเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการศึกษาโดยไม่ต้องสกัด DNA หรือแยกออกจาก DNA รวมทั้ง
หมด

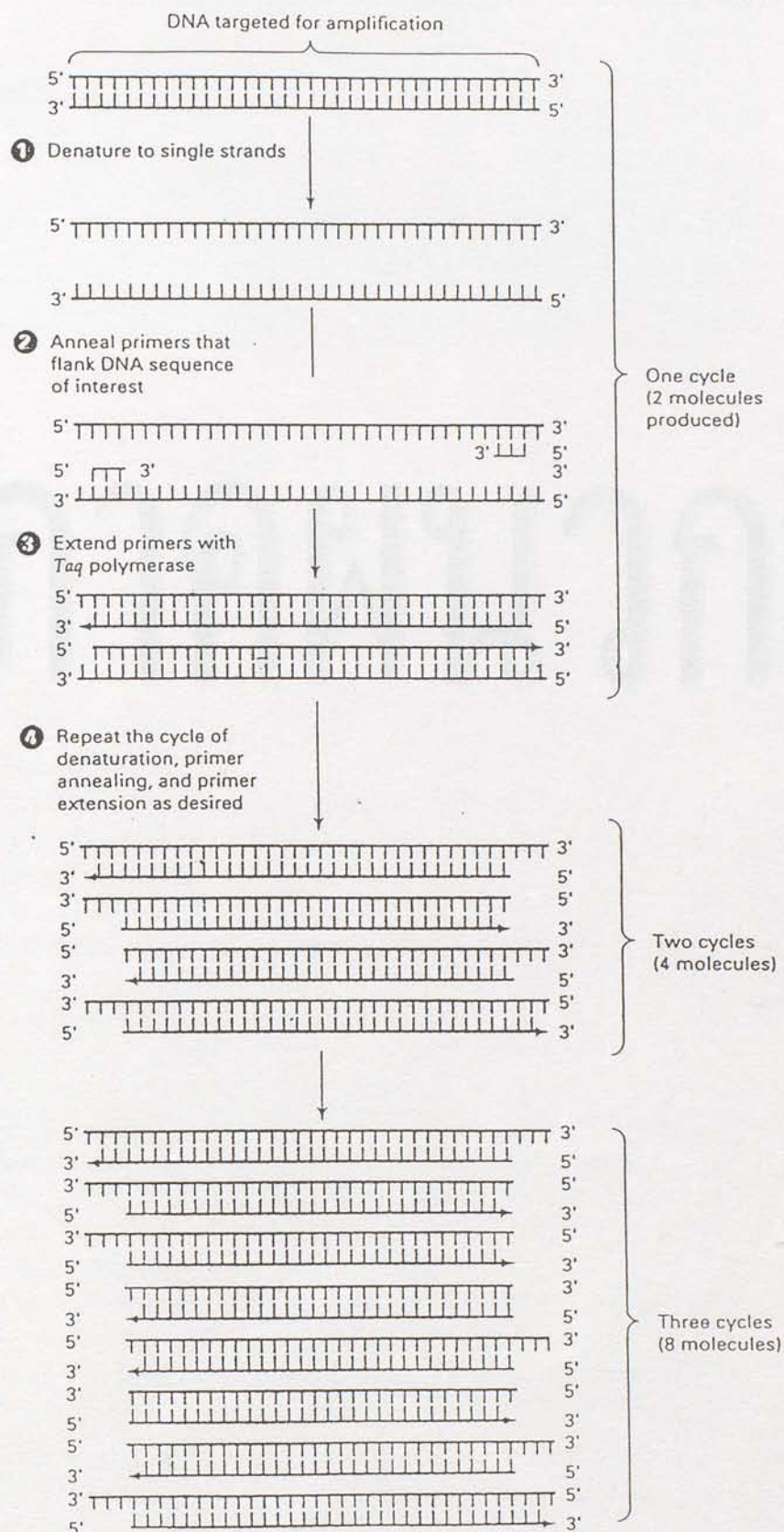
โดยวิธี PCR นี้ จำนวนของ DNA ส่วนที่ต้องการนี้จะเพิ่มมากขึ้นแบบเรขาคณิต กล่าวคือ ถ้าเริ่มต้นจาก DNA 1 โมเลกุล รอบที่หนึ่งของ PCR จะได้ DNA 2 โมเลกุล, รอบที่สองจะได้ 4 โมเลกุล รอบที่สามจะได้ 8 โมเลกุล อย่างนี้เรื่อยไป

Geometric amplification of DNA by PCR.



รูปภาพแสดงการเกิด polymerase chain reaction

The polymerase chain reaction (PCR) for selective amplification of DNA sequences.

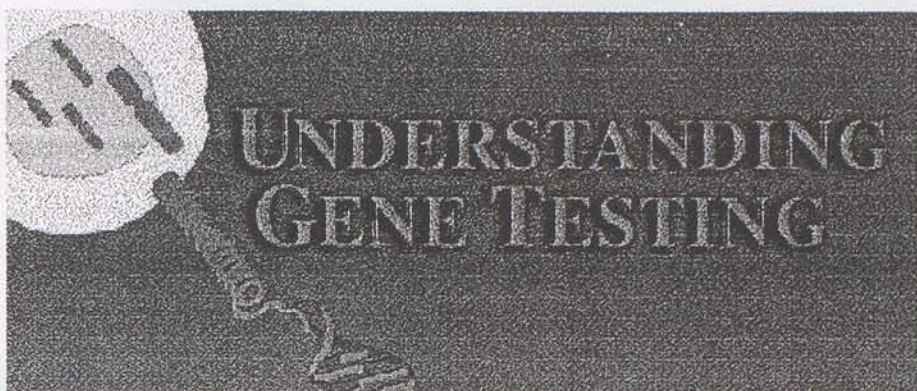




U.S. DEPARTMENT OF

ภาคผนวก

- 1. Introduction
- 2. Objectives
- 3. Scope
- 4. Methodology
- 5. Results and Discussion
- 6. Conclusion
- 7. References
- 8. Appendix
- 9. Glossary
- 10. Acronyms
- 11. Abbreviations
- 12. Figures and Tables
- 13. Data Sources
- 14. Limitations
- 15. Acknowledgments
- 16. Contact Information
- 17. Revision History
- 18. Approval
- 19. Distribution
- 20. Version Control



U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Public Health Service
National Institutes of Health
National Cancer Institute

	<u>Foreword</u>
	<u>Introduction</u>
	<u>What are genes?</u>
	<u>How do genes work?</u>
	<u>How are genes linked to disease?</u>
	<u>How does a faulty gene trigger disease?</u>
	<u>How do gene mistakes occur?</u>
	<u>How does heredity influence disease?</u>
	<u>What is gene testing?</u>
	<u>What are the uses of genetic testing?</u>
	<u>How are disease genes identified?</u>
	<u>What types of diseases can be predicted with gene tests?</u>
	<u>What is the relationship between genes and cancer?</u>
	<u>What does a predictive gene test tell you?</u>
	<u>How do scientists develop predictive gene tests?</u>
	<u>What is the current status of predictive gene testing for cancer?</u>
	<u>What are the benefits of gene testing?</u>
	<u>What additional benefits may be expected from gene testing?</u>
	<u>What are the limitations of gene testing?</u>
	<u>What are the risks of gene testing?</u>
	<u>What is the role of genetic counseling?</u>
	<u>Who are candidates for gene testing?</u>
	<u>What obstacles stand in the way of wide-scale testing?</u>
	<u>How can someone decide whether to have a gene test?</u>
	<u>What are today's options?</u>
	<u>Reader Survey</u>
	<u>Glossary</u>

Estimated Sizes for Human Chromosomes

Chromosome	Length (Mb)
1	263
2	255
3	214
4	203
5	194
6	183
7	171
8	155
9	145
10	144
11	144
12	143
13	114
14	109
15	106
16	98
17	92
18	85
19	67
20	72
21	50
22	56
X	164
Y	59
Total	3286

ที่มา : Magee PT. Department of Genetics and Cell Biology,

University of Minnesota, USA.

<http://alces.med.umn.edu/>

Understanding Gene Testing

Glossary

Acquired mutations:

gene changes that arise within individual cells and accumulate throughout a person's lifetime; also called somatic mutations. (See Hereditary mutation.)

Alleles:

variant forms of the same gene. Different alleles produce variations in inherited characteristics such as eye color or blood type.

Alzheimer's disease:

a disease that causes memory loss, personality changes, dementia and, ultimately, death. Not all cases are inherited, but genes have been found for familial forms of Alzheimer's disease.

Amino acid:

any of a class of 20 molecules that combine to form proteins in living things.

Amyotrophic lateral sclerosis:

an inherited, fatal degenerative nerve disorder; also known as Lou Gehrig's disease.

Autosome:

any of the non-sex-determining chromosomes. Human cells have 22 pairs of autosomes.

Base pairs:

the two complementary, nitrogen-rich molecules held together by weak chemical bonds. Two strands of DNA are held together in the shape of a double helix by the bonds between their base pairs. (See Chemical base.)

BRCA1:

a gene that normally helps to restrain cell growth.

BRCA1 breast cancer susceptibility gene:

a mutated version of BRCA1, which predisposes a person toward developing breast cancer.

Carrier:

a person who has a recessive mutated gene, together with its normal allele. Carriers do not usually develop disease but can pass the mutated gene on to their children.

Carrier testing:

testing to identify individuals who carry disease-causing recessive genes that could be inherited by their children. Carrier testing is designed for healthy people who have no symptoms of disease, but who are known to be at high risk because of family history.

Cell:

small, watery, membrane-bound compartment filled with chemicals; the basic subunit of any living thing.

Chemical base:

an essential building block. DNA contains four complementary bases: adenine, which pairs with thymine, and cytosine, which pairs with guanine. In RNA, thymine is replaced by uracil.

Chromosomes:

structures found in the nucleus of a cell, which contain the genes. Chromosomes come in pairs, and a normal human cell contains 46 chromosomes, 22 pairs of autosomes and two sex chromosomes.

Clone:

a group of identical genes, cells, or organisms derived from a single ancestor.

Cloning:

the process of making genetically identical copies.

Contig maps:

types of physical DNA maps that consist of overlapping segments of DNA (contigs) that, taken together, completely represent that section of the genome. (See Physical maps.)

Colonoscopy:

examination of the colon through a flexible, lighted instrument called a colonoscope.

Crossing over:

a phenomenon, also known as recombination, that sometimes occurs during the formation of sperm and egg cells (meiosis); a pair of chromosomes (one from the mother and the other from the father) break and trade segments with one another.

Cystic fibrosis:

an inherited disease in which a thick mucus clogs the lungs and blocks the ducts of the pancreas.

Cytoplasm:

the cellular substance outside the nucleus in which the cell's organelles are suspended.

Dementia:

severe impairment of mental functioning.

DNA:

the substance of heredity; a large molecule that carries the genetic information that cells need to replicate and to produce proteins.

DNA repair genes:

certain genes that are part of a DNA repair pathway; when altered, they permit mutations to pile up throughout the DNA.

DNA sequencing:

determining the exact order of the base pairs in a segment of DNA.

Dominant allele:

a gene that is expressed, regardless of whether its counterpart allele on the other chromosome is

dominant or recessive. Autosomal dominant disorders are produced by a single mutated dominant allele, even though its corresponding allele is normal. (See Recessive allele.)

Enzyme:

a protein that facilitates a specific chemical reaction.

Familial adenomatous polyposis:

an inherited condition in which hundreds of potentially cancerous polyps develop in the colon and rectum.

Familial cancer:

cancer, or a predisposition toward cancer, that runs in families.

Functional gene tests:

biochemical assays for a specific protein, which indicates that a specific gene is not merely present but active.

Gene:

a unit of inheritance; a working subunit of DNA. Each of the body's 50,000 to 100,000 genes contains the code for a specific product, typically, a protein such as an enzyme.

Gene deletion:

the total loss or absence of a gene.

Gene expression:

the process by which a gene's coded information is translated into the structures present and operating in the cell (either proteins or RNAs).

Gene markers:

landmarks for a target gene, either detectable traits that are inherited along with the gene, or distinctive segments of DNA.

Gene mapping:

determining the relative positions of genes on a chromosome and the distance between them.

Gene testing:

examining a sample of blood or other body fluid or tissue for biochemical, chromosomal, or genetic markers that indicate the presence or absence of genetic disease.

Gene therapy:

treating disease by replacing, manipulating, or supplementing nonfunctional genes.

Genetic linkage maps:

DNA maps that assign relative chromosomal locations to genetic landmarks—either genes for known traits or distinctive sequences of DNA - on the basis of how frequently they are inherited together. (See Physical maps.)

Genetics:

the scientific study of heredity: how particular qualities or traits are transmitted from parents to offspring.

Genome:

all the genetic material in the chromosomes of a particular organism.

Genome maps:

charts that indicate the ordered arrangement of the genes or other DNA markers within the chromosomes.

Genotype:

the actual genes carried by an individual (as distinct from phenotype that is, the physical characteristics into which genes are translated).

Germ cells:

the reproductive cells of the body, either egg or sperm cells.

Germline mutation:

(See Hereditary mutation.)

Hereditary mutation:

a gene change in the body's reproductive cells (egg or sperm) that becomes incorporated in the DNA of every cell in the body; also called germline mutation. (See Acquired mutations.)

Human genome:

the full collection of genes needed to produce a human being.

Human Genome Project:

an international research effort (led in the United States by the National Institutes of Health and the Department of Energy) aimed at identifying and ordering every base in the human genome.

Huntington's disease:

an adult-onset disease characterized by progressive mental and physical deterioration; it is caused by an inherited dominant gene mutation.

Imprinting:

a biochemical phenomenon that determines, for certain genes, which one of the pair of alleles, the mother's or the father's, will be active in that individual.

Inborn errors of metabolism:

inherited diseases resulting from alterations in genes that code for enzymes.

Leukemia:

cancer that begins in developing blood cells in the bone marrow.

Li-Fraumeni syndrome:

a family predisposition to multiple cancers, caused by a mutation in the p53 tumor-suppressor gene.

Linkage analysis:

a gene-hunting technique that traces patterns of heredity in large, high-risk families, in an attempt to locate a disease-causing gene mutation by identifying traits that are co-inherited with it.

Melanoma:

a cancer that begins in skin cells called melanocytes and spreads to internal organs.

Molecule:

a group of atoms arranged to interact in a particular way; one molecule of any substance is the

smallest physical unit of that particular substance.

Mutation:

a change in the number, arrangement, or molecular sequence of a gene.

Newborn screening:

examining blood samples from a newborn infant to detect disease-related abnormalities or deficiencies in gene products.

Nucleotide:

A subunit of DNA or RNA, consisting of one chemical base plus a phosphate molecule and a sugar molecule.

Nucleus:

the cell structure that houses the chromosomes.

Oncogenes:

genes that normally play a role in the growth of cells but, when overexpressed or mutated, can foster the growth of cancer.

p53:

(See Tumor-suppressor genes.)

Penetrance:

a term indicating the likelihood that a given gene will actually result in disease.

Phenylketonuria (PKU):

an inborn error of metabolism caused by the lack of an enzyme, resulting in abnormally high levels of the amino acid phenylalanine; untreated, PKU can lead to severe, progressive mental retardation.

Physical maps:

DNA maps showing the location of identifiable landmarks, either genes or distinctive short sequences of DNA. The lowest resolution physical map shows the banding pattern on the 24 different chromosomes; the highest resolution map depicts the complete nucleotide sequence of the chromosomes. (See Contig maps.)

Precancerous polyps:

growths in the colon that often become cancerous.

Predictive gene tests:

tests to identify gene abnormalities that may make a person susceptible to certain diseases or disorders.

Prenatal diagnosis:

examining fetal cells taken from the amniotic fluid, the primitive placenta (chorion), or the umbilical cord for biochemical, chromosomal, or gene alterations.

Probe:

a specific sequence of single-stranded DNA, typically labeled with a radioactive atom, which is designed to bind to, and thereby single out, a particular segment of DNA.

Proofreader genes:

(See DNA repair genes.)

Prophylactic surgery:

surgery to remove tissue that is in danger of becoming cancerous, before cancer has the chance to develop. Surgery to remove the breasts of women at high risk of developing breast cancer is known as prophylactic mastectomy.

Protein:

a large, complex molecule composed of amino acids. The sequence of the amino acids and thus the function of the protein is determined by the sequence of the base pairs in the gene that encodes it. Proteins are essential to the structure, function, and regulation of the body. Examples are hormones, enzymes, and antibodies.

Protein product:

the protein molecule assembled under the direction of a gene.

Recessive allele:

a gene that is expressed only when its counterpart allele on the matching chromosome is also recessive (not dominant). Autosomal recessive disorders develop in persons who receive two copies of the mutant gene, one from each parent who is a carrier. (See Dominant allele.)

Recombination:

(See Crossing over.)

Renal cell cancer:

a type of kidney cancer.

Reproductive cells:

egg and sperm cells. Each mature reproductive cell carries a single set of 23 chromosomes.

Restriction enzymes:

enzymes that can cut strands of DNA at specific base sequences.

Retinoblastoma:

an eye cancer caused by the loss of a pair of tumor-suppressor genes; the inherited form typically appears in childhood, since one gene is missing from the time of birth.

RNA:

a chemical similar to DNA. The several classes of RNA molecules play important roles in protein synthesis and other cell activities.

Sarcoma:

a type of cancer that starts in bone or muscle.

Screening:

looking for evidence of a particular disease such as cancer in persons with no symptoms of disease.

Sex chromosomes:

the chromosomes that determine the sex of an organism. Human females have two X chromosomes; males have one X and one Y.

Sickle-cell anemia:

an inherited, potentially lethal disease in which a defect in hemoglobin, the oxygen-carrying pigment in the blood, causes distortion (sickling) and loss of red blood cells, producing damage to organs throughout the body.

Somatic cells:

all body cells except the reproductive cells.

Somatic mutations:

(See Acquired mutations.)

Tay-Sachs disease:

an inherited disease of infancy characterized by profound mental retardation and early death; it is caused by a recessive gene mutation.

Transcription:

the process of copying information from DNA into new strands of messenger RNA (mRNA). The mRNA then carries this information to the cytoplasm, where it serves as the blueprint for the manufacture of a specific protein.

Translation:

the process of turning instructions from mRNA, base by base, into chains of amino acids that then fold into proteins. This process takes place in the cytoplasm, on structures called ribosomes.

Tumor-suppressor genes:

genes that normally restrain cell growth but, when missing or inactivated by mutation, allow cells to grow uncontrolled.

Wilms' tumor:

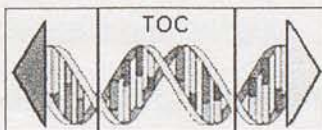
a kidney cancer (tumor) that occurs in children, usually before age 5.

X chromosome:

a sex chromosome; normal females carry two X chromosomes.

Y chromosome:

a sex chromosome; normal males carry one Y and one X chromosome.



Previous page: [Attention: All Readers](#)

TOC page: [Table of Contents](#)

Next page: [Table of Contents](#)

[Search](#) | [Home](#) | [Questions](#)

Glossaries of Human Genetics / Genome Project Terms

- Understanding Gene Testing Glossary - U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute
 - Genome Project Glossary from *Molecular Genetics Primer*, Department of Energy (also at this [site](#))
 - Glossary from "Blazing a Genetic Trail" Online Book, Howard Hughes Medical Institutes
 - University of Medicine and Dentistry Glossary, New Jersey
 - HHIRR Glossary (*Hereditary Hearing Impairment Resource Registry*), Boys Town, Omaha, NE
 - Access Excellence Program Glossary, Genentech, Inc., San Francisco, CA
 - Glossary of Genetic terms, Genetics Education Center, Univ. Kansas Medical Center
 - A Genetics Glossary, cross referenced, University of Edinburgh
 - Dictionary of Cell Biology, Academic Press
 - Genetics Glossary from Growth, *Genetics and Hormones Journal*
 - Key Terms - Genetics, University of Kansas Medical School, MTEC 705: Review of Mendelian Genetics Course
 - Life Science Dictionary, BioTech, Indiana Institute for Molecular and Cellular Biology
 - Genetics Glossary, CaF (*Contact a Family with rare conditions*), London, England
 - Diving Into The Gene Pool - Glossary, The Exploratorium, San Francisco, CA
 - Genetic Glossary, Biology Teaching Organisation, University of Edinburgh, Biology Curriculum Information
 - Dictionary of Cell Biology, with graphics, searchable, Academic Press
-

GENETIC
PROFESSIONAL
HOME PAGE



Genetics
Education
Center



เครือข่ายสารสนเทศทางการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์และพันธุศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

<http://www.mahidol.ac.th>

Mahidol University Library Information Center Network (MULINET)

<http://www.li.mahidol.ac.th>

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

<http://www.nstda.or.th>

ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)

<http://www.nectec.or.th>

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

<http://www.biotec.or.th>

SchoolNet@1509

<http://www.school.net.th/>

Classroom 2000 <http://ntl.nectec.or.th/classroom/>

Genetic Education Center, University of Kansas Medical Center

<http://www.kumc.edu/gec/>

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

<http://www.genome.ad.jp/kegg/>

Frontiers in Bioscience: Gene Knockout

<http://www.bioscience.org/knockout/>

Genentech's Access Excellence : DNA analysis tool page

<http://www.gene.com/ae/AB/IWT/aapost/>

BioTech: Indiana University

http://biotech.chem.indiana.edu/pages/human_genetics.html

Study Web

<http://www.studyweb.com/>



Learning About the Human Genome Project and Genetics Through the World Wide Web

The Web offers the easiest path to learning about the Human Genome Project and related genetics topics. Some useful sites to visit are included in the list below compiled by *Denise K. Casey, Science Writer/Editor, Human Genome News, Human Genome Management Information System, Phone: 423/574-0597; Fax: 423/574-9888, Email: caseydk@ornl.gov*

Human Genome Project

Human Genome Project Information, <http://www.ornl.gov/hgmis>

Comprehensive site covering topics related to the U.S. and worldwide Human Genome Projects. Useful for updating scientists and providing educational material for nonscientists, in support of DOE's commitment to public education. Developed and maintained for DOE by the Human Genome Management Information System (HGMIS) at Oak Ridge National Laboratory.

U.S. DOE Human Genome Program, http://www.er.doe.gov/production/ober/hug_top.html

Devoted to the DOE component of the U.S. Human Genome Project and to the DOE Microbial Genome Program. Links to many other sites.

NIH National Human Genome Research Institute, <http://www.nhgri.nih.gov>

Site of the NIH sector of the U.S. Human Genome Project.

DOE Human Genome Program Publications

[indicates hard copy available from HGMIS]*

***Human Genome News, <http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/publications.html>**

Quarterly newsletter reporting on the worldwide Human Genome Project.

***To Know Ourselves, 1996, <http://www.ornl.gov/hgmis/tko>**

Booklet reviewing DOE's role, history, and achievements in the Human Genome Project and introducing the science and other aspects of the project.

***Primer on Molecular Genetics (1992)**

<http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/publications.html#primer>

Explains the science behind the genome research.

Ethical, Legal, and Social Issues Related to Genetics Research

HGMIS Gateways Web page, <http://www.ornl.gov/hgmis/links.html> Choose "Ethical, Legal, and Social Issues."

National Bioethics Advisory Commission (NBAC) home page,

<http://www.nih.gov/nbac/nbac.htm>

The bioethics committee offers advice to the National Science and Technology Council and others on bioethical issues arising from research related to human biology and behavior.

National Center for Genomic Resources, <http://www.ncgr.org>

Comprehensive Genetics and Public Issues page; includes congressional bills related to genetic privacy.

Center for Bioethics, University of Pennsylvania, <http://www.med.upenn.edu/~bioethic>,

Full-text articles about such ethical issues as human cloning; includes a primer on bioethics.

Eubios Ethics Institute, <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~macer/index.html>

Site includes newsletter summarizing literature in bioethics and biotechnology.

ELSI in Science, <http://www.lbl.gov/Education/ELSI/ELSI.html>

Teaching modules designed to stimulate discussion on implications of scientific research.

MCET- The Human Genome Project, <http://phoenix.mcet.edu/humangenome/index.html>

ELSI issues for high school students and a selection of images.

Courts and Science On-Line Magazine (CASOLM), <http://www.ornl.gov/courts>

Coverage of genetic issues affecting the courts.

Genetic Privacy Act, <http://www.ornl.gov/hgmis/resource/elsi.html>

Model legislation written with support of the DOE Human Genome Program.

The Gene Letter, <http://www.geneletter.org>

Bimonthly newsletter to inform consumers and professionals about advances in genetics and encourage discussion about emerging policy dilemmas.

Your Genes, Your Choices, <http://www.nextwave.org/ehr/books/index.html>

Booklet written in simple English, describing the Human Genome Project; the science behind it; and how ethical, legal, and social issues raised by the project may affect people's everyday lives.

Medical Genetics

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

A comprehensive, authoritative, and up-to-date human gene and genetic disorder catalog that supports medical genetics and the Human Genome Project.

List of inherited-disease genes found by positional cloning,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Baxevani/CLONE/index.html>

Links to OMIM

GeneCards, <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>

A database of more than 6000 genes; describes their functions, products, and biomedical applications.

Support groups for people with genetic diseases and their families,

<http://www.kumc.edu/gec/support/groups.html>

Directory of National Genetic Voluntary Organizations and Related Resources.

Gene Therapy, <http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/index.html>

Web course covering the basics, with links to other sites.

NIH Office of Recombinant DNA Activities, <http://www.nih.gov/od/orda>

Includes a database of human gene therapy protocols.

Blazing a Genetic Trail, <http://www.hhmi.org/GeneticTrail>

Illustrated booklet from the Howard Hughes Medical Institute on hunting for disease genes.

Understanding Gene Testing, <http://www.gene.com/ae/AE/AEPC/NIH/index.html>

Illustrated brochure from the National Cancer Institute.

Promoting Safe and Effective Genetic Testing in the United States (1997),

<http://www.med.jhu.edu/tfgtelsi>

Principles and recommendations by a joint NIH-DOE Human Genome Project group that examined the development and provision of gene tests in the United States.

General Genetics and Biotechnology

Many of the following sites contain links to both educational and technical material.

HGMIS Community Education and Outreach Gateways Web page,

<http://www.ornl.gov/hgmis/links.html>

Access Excellence site, <http://outcast.gene.com/ae/index.html>

Extensive genetic and biotechnology resources for teachers and nonscientists

MIT Biology Hypertextbook, <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/7001main.html>

All the basics.

Virtual Courses on the Web, <http://lenti.med.umn.edu/~mwd/courses.html>

Links to Web tutorials in biology, genetics, and more.

Genetics Education Center, University of Kansas Medical Center, <http://www.kumc.edu/gec>

Educational information on human genetics, career resources.

The Why Files, <http://whyfiles.news.wisc.edu>

Illustrated explanations of the science behind the news.

Classic papers in genetics, <http://www.esp.org>

Covers the early years, with introductory notes. See also Access Excellence site above for genetics history.

Mendel Web, <http://www.netspace.org/MendelWeb>

Explores the origins of classical genetics, introductory data analysis, elementary plant science, and the history of science.

Human Genome Education Program at Stanford Human Genome Center,

<http://www-shgc.stanford.edu/bio-ed>

*Includes genome curricula and numerous resources, especially for K*12 teachers.*

Cell & Molecular Biology Online, <http://www.cellbio.com>

Links to electronic publications, current research, educational and career resources, and more.

CERN Virtual Library, Genetics section, Biosciences division,

http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/genetics.html

Includes an organism index linking to other pertinent databases, information on the U.S. and international Human Genome Projects, and links to research sites.

Genetic and biological resources links,

http://www.er.doe.gov/production/ober/bioinfo_center.html

Welch Web, <http://www.welch.jhu.edu>

Links to many Internet biomedical resources, dictionaries, encyclopedias, government sites, libraries, and more, from the Johns Hopkins University Welch Library.

Howard Hughes Medical Institute, <http://www.hhmi.org>

Home page of major U.S. philanthropic organization that supports research in genetics, cell biology, immunology, structural biology, and neuroscience. Excellent introductory information on these topics.

BIO Online (Biotechnology Industry Organization), <http://www.bio.com>

Comprehensive directory of biotechnology sites on the Internet.

BioTech, <http://biotech.chem.indiana.edu>

An interactive educational resource and biotech reference tool; includes a dictionary of 6000 life science terms.

Careers in Genetics, <http://www.faseb.org/genetics/gsa/careers/bro-menu.htm>

Online booklet from the Genetics Society of America, including several profiles of geneticists. See also career sections of sites specified above, such as Access Excellence.

Cloning: In Our Own Image,

<http://www.latimes.com/HOME/NEWS/SCIENCE/REPORTS/CLONING>

Special report from the Los Angeles Times, with links to bioethics sites.

Bugs 'N Stuff, <http://www.ncgr.org/microbe>

List microbial genomes being sequenced, research groups, genome sizes, and facts about selected organisms. Links to related sites.

Microbial Database, <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html>

Lists completed and in-progress microbial genomes, with funding sources.

Carolina Biological Supply Company, <http://www.carosci.com/Tips.htm>

Teaching materials for all levels. Includes mini-lessons on selected scientific topics, two online magazines, What's New, software, catalogs, and publications.

Database of Genome Sizes, <http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html>

Lists numerous organisms with genome sizes, scientific and common names, classifications, and references.

Genetics Glossary, <http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/glossary.html>

Glossary of terms related to genetics.

Hispanic Educational Genome Project, <http://vflylab.calstatela.edu/hgp>

Designed to educate high school students and their families about genetics and the Human Genome Project. Links to other projects.

Natural History of Genes, <http://raven.umnh.utah.edu>

Genetic science activities and hands-on experiments for teachers and students.

Science and Mathematics Resources, <http://www-sci.lib.uci.edu>

More than 2000 Web references, including Frank Potter's Science Gems and Martindale's Health Science Guide. For teachers at all levels.

Opportunities for student internships around the United States:

Tripod: Internships, <http://www.tripod.com/work/internships>

Genome Data Repositories

HGP goals are to generate maps for 24 different human chromosomes with biochemical landmarks spaced at least every 100,000 bases and, ultimately, to determine the sequence of the 3 billion DNA bases in each chromosome.

Genome Database, <http://gdbwww.gdb.org>

GDB is the worldwide repository of human genome chromosome mapping data.

Genome Sequence DataBase, <http://www.ncgr.org/gsdb>

Relational database containing nucleotide sequence data from all known organisms.

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>

Annotated collection of all publicly available DNA sequences.

Try It! Images on the Web

Gene map from the 1996 Genome Issue of Science, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96>

Click on particular areas of chromosomes and find genes.

Lawrence Livermore National Laboratory chromosome 19 physical map,

<http://www-bio.llnl.gov/bbrp/genome/genome.html>

Los Alamos National Laboratory chromosome 16 physical map,

<http://www-ls.lanl.gov/DBqueries/QueryPage.html>

Cells Alive!, <http://www.cellsalive.com>

Images (some moving) of different types of cells.

Cytogenetics Gallery, <http://www.pathology.washington.edu:80/Cytogallery>
Photos (karyotypes) of normal and abnormal chromosomes.

Bugs in the News!, <http://falcon.cc.ukans.edu/~jbrown/bugs.html>
Microbiology information and a nice collection of images of biological molecules.

Images of Biological Molecules, <http://www.cc.ukans.edu/~micro/picts.html>
3-D structures of proteins and nucleic acids obtained from Brookhaven National Laboratory Protein Database and others.

DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory, <http://darwin.cshl.org/index.html>
Animated images of PCR and Southern Blotting techniques.

Cn3D (See in Three-Dee), <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Structure/cn3d.html>
3-D molecular structure viewer allowing the user to visualize and rotate structure data entries from Entrez. Highly technical for researchers.

Journals and Magazines

HGMIS Journals Gateways Web page, <http://www.ornl.gov/hgmis/links.html> Choose
"Journals, Books, Periodicals."

Biochemistry and Molecular Biology Journals,
<http://biochem.arach-net.com/beasley/journals.html>
Comprehensive list.

Nature, Nature Genetics, and Nature Biotechnology, <http://www.nature.com>
Abstracts of articles, full text of letters and editorials.

Science, <http://www.sciencemag.org>
Abstracts and some full-text articles.

Science News, <http://www.sciencenews.org>
Online version of weekly popular science magazine with full text of selected articles.

Science in the News

The Science Guide, <http://www.scienceguide.com>
Daily news and information service and free science news e-mailer. Also contains directories of newsgroups, grant and funding resources, employment, and online journals.

Genomics Today, <http://www.phrma.org/genomics/documents/today.html>
A daily update on the latest news in the field. Many links. Website a joint project of the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America and the American Institute of Biological Sciences.

EurekAlert!, <http://www.eurekalert.org>
Short summaries of major stories.

HMS Beagle, <http://biomednet.com/hmsbeagle>
Web magazine featuring science news, essays, book reviews, and bioweekly e-mail

notification of this site's contents.

Science Daily, <http://www.sciencedaily.com>

Headline stories, articles, and links to news services, newspapers, magazines, broadcast sources, journals, and organizations. Also offers weekly bulletins for updates by e-mail.

ScienceNow, <http://www.sciencenow.org>

Daily online news service from Science magazine offers articles on major science news.

Web Search Tools

"Search the Net," <http://metro.turnpike.net/adorn/search.html>

Comprehensive list of search tools, libraries, world fact books, and other useful information.

Yahoo!, <http://www.yahoo.com>

Biosciences Index to WWW Virtual Library, <http://golgi.harvard.edu/htbin/biopages>

GENETIC
PROFESSIONAL
HOME PAGE



Genetics
Education
Center



รายนามวิทยากร

วิทยากรบรรยาย

รศ. ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์

รศ. ดร. ภิญโญ พานิชพันธ์

ผศ. ดร. เนตรนภิส ชีระวัลย์ชัย

ผศ. ดร. คล้ายอัปสร พงศ์พิพร

ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชาญวัติ

รศ. พญ. จินตนา ศิรินาวิน

ดร. จรรยาภรณ์ พู่เจริญ

วิทยากรประจำห้องปฏิบัติการ

ผศ. ดร. คล้ายอัปสร พงศ์พิพร

อ. พญ. อรุณพร กิจเลิศบรรจง

อ. พญ. นวลผ่อง เจริญมณี

กานต์ยุพา จิตติวัฒนา

จิตติรัตน์ เครืออารีรัตน์

ชยานนท์ พิระพิทยมงคล

อ. ธนรรณ ชูขจร

นำดี ทิพย์ปรักมาศ

ประภารัตน์ คำรงค์เดช

เพลินพิศ ลักษณะนิล

รัตติยา เจริญศักดิ์

รุ่งนภา สุภวิไล

ศุภา คันพิบูลย์ศักดิ์

อ. อภินันท์ ลิ้มมงคล

อัมพรพรรณ เก่งลือชา

อุษณีย์ ศิริบุญฤทธิ์

อ. ดร. นพ. อติศักดิ์ วงศ์จักรศิลป์

อ. นพ. กนกกริน บุญวิสุทธิ

อ. พญ. ธัญลักษณ์ อุษยานนท์

จงดี แดงรัตน์

เฉลิมชัย มิตรพันธ์

ชนนิกัญ ชูพยอมค์

นุสรา สิทธิศิลป์

ปานันท์ กาญจนภูมิ

พูนทรัพย์ ผลาขจรศักดิ์

อ. ชานี ครอบพานิช

รุ่งทิพย์ สร้อยอัมพรกุล

ดร. ศศิชัย กังสดาลอำไพ

แสงจันทร์ เสนาปิน

อ. อริสา อิ่มตำราญ

อารีย์ พุตระกูล

Table of Contents

Page 100: The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Web Search Tips

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest



Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

Section: (A) The World's Largest

รายนามคณะกรรมการบริหาร
สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
ประจำปี 2541-2542

1. รศ. ดร. ชารารัตน์ สุภศิริ ประธาน
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110
E-mail: thararat@psm.swu.ac.th
2. รศ. ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์ รองประธาน
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 246-1225-31 ต่อ 1312 โทรสาร 251-1952
3. รศ. ดร. ฤดี สุราฤทธิ์ รองประธาน
ภาควิชาสรีรวิทยาและชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนโยธี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 246-1225-31 ต่อ 1312 โทรสาร 246-0051
4. ผศ. ดร. เอมอร เบญจวงสกุลชัย เหรัญญิก
ภาควิชาชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 218-8673 โทรสาร 218-8671
E-mail: Bemon@chula.ac.th
5. รศ. ดร. คณิต กฤษณังกูร กรรมการ
คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10140
E-mail: Bemon@chula.ac.th
6. อ. ธีรรัตน์ เอกสิทธิ์กุล กรรมการ
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 10240
โทรศัพท์ 314-2036 โทรสาร 314-2035

7. ผศ. ดร. พรทิพย์ ชัยมณี กรรมการ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตทับแก้ว นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 034-255797 โทรสาร 034-255820
8. พ.อ.หญิง ดร. ยุวดี พรพิบูลย์ กรรมการ
ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 246-8108, 246-0066 ต่อ 3612 โทรสาร 246-8108
9. รศ. ดร. รัชนา ศานติยานนท์ กรรมการ
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 254-1931 โทรสาร 250-1409
E-mail: srachana@netserv.chula.ac.th
10. ผศ. ดร. รัชนิกร กัลล์ประวิทย์ กรรมการ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 419-7581, 419-7587 โทรสาร 411-1428
E-mail: sirkp@mahidol.ac.th
11. รศ. ดร. วรชาติ ศิริวรารมณี กรรมการ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 246-0063 ต่อ 6309 โทรสาร 248-0375, 245-5195
E-mail: scwsr@mucc.mahidol.ac.th
12. ผศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ กรรมการ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพระราม 4 กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์/โทรสาร 256-4482
E-mail: fmewan@md2.md.chula.ac.th

13. ดร. สุนันทา รัตนโก กรรมการ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ถนนพหลโยธิน กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 942-8281, 579-0113 ต่อ 1475 โทรสาร 579-0514
E-mail: fscisnr@nontri.ku.ac.th
14. รศ.ดร. อาภัสสรฯ ชมิคท์ กรรมการ
ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ถนนพหลโยธิน กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 579-7538 โทรสาร 579-7538, 561-1591
E-mail: fvetapsc@nontri.ac.th
15. รศ.ดร. ประหยัด โกมารทัต กรรมการและเลขานุการ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 246-0063 ต่อ 6304 โทรสาร 248-0375, 245-5195
E-mail: scpkr@mahidol.ac.th

1. The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem of the existence of solutions of the system of equations (1) for arbitrary values of the parameters α and β . It is shown that the system has solutions for all values of α and β if and only if the conditions (2) are satisfied.

2. In the second part of the paper the problem of the uniqueness of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has at most one solution for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (3) are satisfied.

3. In the third part of the paper the problem of the stability of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has stable solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (4) are satisfied.

4. In the fourth part of the paper the problem of the asymptotic stability of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has asymptotically stable solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (5) are satisfied.

5. In the fifth part of the paper the problem of the boundedness of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has bounded solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (6) are satisfied.

6. In the sixth part of the paper the problem of the periodicity of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has periodic solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (7) are satisfied.

7. In the seventh part of the paper the problem of the ergodicity of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has ergodic solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (8) are satisfied.

8. In the eighth part of the paper the problem of the mixing of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has mixing solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (9) are satisfied.

9. In the ninth part of the paper the problem of the transitivity of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has transitive solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (10) are satisfied.

10. In the tenth part of the paper the problem of the topological transitivity of solutions of the system (1) is considered. It is shown that the system has topologically transitive solutions for arbitrary values of the parameters α and β if and only if the conditions (11) are satisfied.

**รายนามที่ปรึกษาคณะกรรมการบริหาร
สาขาชีวเคมี สหาคมหาวิทยาลัยแห่งประเทศไทยฯ
ประจำปี 2541-2542**

- | | | |
|-----|-----------------------|---------------|
| 1. | รศ. ดร. กำจัด | มงคลกุล |
| 2. | รศ. ดร. จริยา | บุญญวัฒน์ |
| 3. | ศ. ดร. ม.ร.ว. ชัยยุทธ | สวัสดิวัฒน์ |
| 4. | รศ. ดร. ธนิต | กูตำราญ |
| 5. | รศ. ดร. ประพนธ์ | วิไลรัตน์ |
| 6. | รศ. ดร. พิณทิพ | รีนวงษา |
| 7. | รศ. ดร. ภิญโญ | พานิชพันธ์ |
| 8. | ศ. ดร. มนตรี | จุฬาวัฒนทล |
| 9. | ศ. ดร. ยงยุทธ | ยุทธวงศ์ |
| 10. | ผศ. ทญ. ลมุลยง | โพวาทอง |
| 11. | ศ. ดร. สิริินทร์ | พิบูลนิยม |
| 12. | ผศ. สุวดี | จันทร์กระจ่าง |

๑. รายชื่อผู้บริจาคเงินช่วยเหลือ
 ๒. รายชื่อผู้บริจาคเงินช่วยเหลือ
 ๓. รายชื่อผู้บริจาคเงินช่วยเหลือ

นาย...	๑๐๐.๐๐	๑
นาย...	๑๐๐.๐๐	๒
นาย...	๑๐๐.๐๐	๓
นาย...	๑๐๐.๐๐	๔
นาย...	๑๐๐.๐๐	๕
นาย...	๑๐๐.๐๐	๖
นาย...	๑๐๐.๐๐	๗
นาย...	๑๐๐.๐๐	๘
นาย...	๑๐๐.๐๐	๙
นาย...	๑๐๐.๐๐	๑๐
นาย...	๑๐๐.๐๐	๑๑
นาย...	๑๐๐.๐๐	๑๒

คณะกรรมการดำเนินการจัดการประชุม

ที่ปรึกษา

กรรมการที่ปรึกษาสาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
กรรมการบริหารสาขาชีวเคมี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
ศ. พญ. นิโบล เนืองตัน หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รศ. สมทรง เกษะกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

คณะกรรมการดำเนินงาน

ผศ. ดร. รัชนิกร กัดลัประวิทย์
ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชาญวดี
อ. เจริญศรี มังกรกาญจน์

ประธานกรรมการดำเนินงาน
กรรมการและเลขานุการ
กรรมการ

ฝ่ายเอกสารและงานทะเบียน

ผศ. ดร. รัชนิกร กัดลัประวิทย์
รุ่งนภา สุทวีไล
นฤมล พานิชกุล

เจริญศรี มังกรกาญจน์
รัตติยา เจริญศักดิ์
สุรตวันดี เรืองศรี

ฝ่ายสถานที่และโสตทัศน

รศ. สมพงษ์ อองอาจยุทธ
สุรินทร์ ชันหยก
เสาวนีย์ บุญเกตุ

รศ. อธิป ลิขิตลิลิต
สมพงษ์ เหลี่ยมมงคลกุล

ฝ่ายต้อนรับและลงทะเบียน

ผศ. ดร. คล้ายอัปสร พงศ์พีพร
อ. พญ. อรุณพร กิจเลิศบรรจง
อ. พญ. นवल่อง เจริญภูมิ
รุ่งนภา สุทวีไล
รุ่งทิพย์ สร้อยอัมพรกุล
อุษะณี วงศ์มณี

ผศ. ดร. เนตรนภิส ชีระวัลย์ชัย
อ. พญ. ธัญลักษณ์ อุษุทยานนท์
อ. นพ. กนกกริน บุญวิสุทธิ
รัตติยา เจริญศักดิ์
เสาวนีย์ บุญเกตุ
นฤมล พานิชกุล

ฝ่ายจัดเตรียมงานห้องปฏิบัติการ

ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชยานุวัติ

รุ่งนภา ศุภวิไล

ประภารัตน์ คำรงค์เดช

อารีย์ พุทธระกูล

รัตติยา เจริญศักดิ์

รุ่งทิพย์ สร้อยอัมพรกุล

นฤมล พานิชกุล

ฝ่ายจัดเลี้ยง

เจริญศรี มังกรกาญจน์

ปนัดดา ชูติกุล

รุ่งทิวา ผ่องนพคุณ

วรรณเพ็ญ กัตัญญ

สุปราณี อัมพรศิริรัตน์

ขอขอบคุณ



สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ



ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ



ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ



ขอขอบคุณ

Aviation Services Co., Ltd.

GIBTHAI Co., Ltd.

International Aviation Co., Ltd.

Novo Nordisk Pharma (Thailand) Ltd.

P. Intertrade Equipments Co., Ltd

กำหนดการประชุมเชิงปฏิบัติ

วันจันทร์ที่ 27 เมษายน 2541

08.00น. - 09.00น.	ลงทะเบียน
09.00น. - 09.15น.	พิธีเปิดการประชุม
09.15น. - 10.15น.	การบรรยายเปิดประชุม “โครงการศึกษาจีโนมของมนุษย์” (The Human Genome Project) รศ. ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
10.15น. - 10.30น.	อาหารว่าง
10.30น. - 11.30น.	โครงสร้างและหน้าที่ของดีเอ็นเอ รศ. ดร. ภิญโญ พานิชพันธ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
11.30น. - 13.00น.	อาหารกลางวัน
13.00น. - 14.30น.	ความรู้พื้นฐานของเทคโนโลยี ดีเอ็นเอ ผศ. ดร.เนตรนภิส ชีระวัลย์ชัย ผศ. ดร.คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
14.30น. - 14.45น.	อาหารว่าง
14.45น. - 15.45น.	เทคโนโลยี ดีเอ็นเอทางการแพทย์ ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชยานุวัติ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

09.00น. – 10.30น.	การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ ดีเอ็นเอ (DNA-Based Diagnosis of Genetic Diseases) รศ. พญ. จินตนา ศิรินาวิน สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
10.30น. – 10.45น.	อาหารว่าง
10.45น. – 11.45น.	การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม และโคลนนิ่งในสิ่งมีชีวิต ดร. จรรยาภรณ์ ฟูเจริญ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
11.45น. - 13.00น.	อาหารกลางวัน
13.00น. - 13.45น.	อธิบายปฏิบัติการ ผศ. ดร. พญ. พัชรีย์ วิชยานวัติ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
13.45น. - 14.00น.	อาหารว่าง
14.00น. - 16.30น	ปฏิบัติการ

