พันธุศาสตร์
และเทคโนโลยีทาง DNA

นำเสนอโดย

ผศ.ดร.สมาน แก้วไวยุทธ

พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีทาง DNA

พันธุศาสตร์ยุคพันธุวิศวกรรม

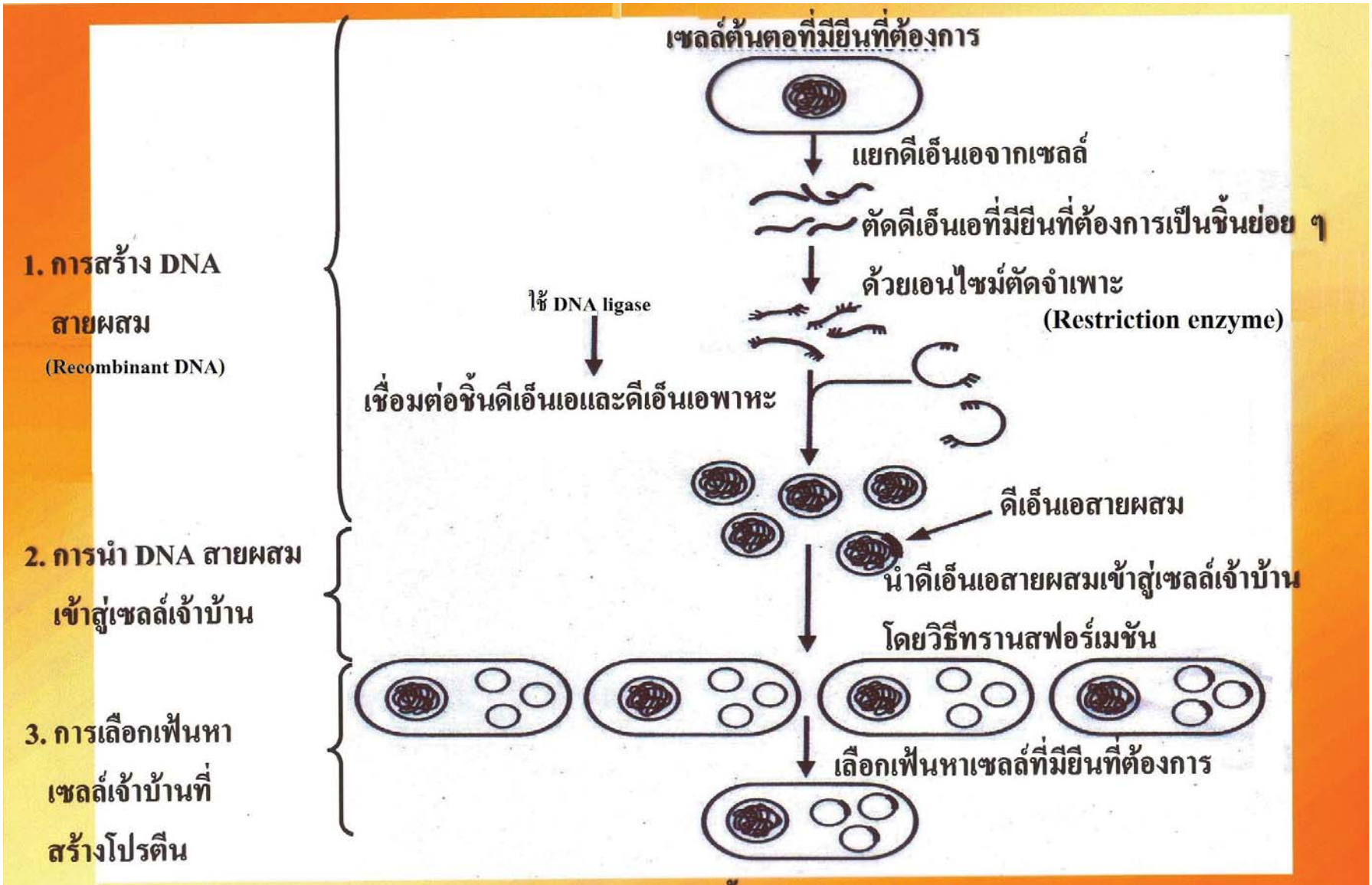
1. พันธุวิศวกรรม (genetic engineering)

หมายถึง กระบวนการตัดต่อยีนจากการสังเคราะห์ขึ้น หรือจากสิ่งมีชีวิตแหล่งต่าง ๆ หลายแหล่งเข้าด้วยกันตามความเหมาะสม แล้วใส่เข้าไปในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง (host) เพื่อให้ผลิตสารโปรตีนตามที่ต้องการ เช่น การตัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้างอินซูลินของคนใส่เข้าไปในแบคทีเรียสร้างอินซูลินได้ เป็นต้น

- การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมโดยกระบวนการธรรมชาติอาจเกิดโดยมิวเทชัน แต่ลักษณะที่ได้มักเป็นลักษณะที่ไม่พึงปรารถนา หรืออาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนในกระบวนการสืบพันธุ์หรือการจัดกลุ่มใหม่ของยีนตามกฎพันธุกรรมของเมนเดล ซึ่งเกิดเฉพาะในสายพันธุ์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (same species) ไม่มีการผสมข้ามพันธุ์และก็เกิดในอัตราที่ช้ามาก แต่โดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมทำให้เกิดการแปรผันของยีนได้รวมเร็วและตรงตามจุดประสงค์ รวมทั้งยังผสมยีนข้ามสายพันธุ์ได้ เช่น คนกับแบคทีเรีย เป็นต้น

2. พันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อ DNA

ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะมีกระบวนการตัด-ต่อ DNA ตามธรรมชาติ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ ในกระบวนการจัดกลุ่มใหม่ของยีน (gene recombination) ซึ่งมักเกิดขึ้นในกระบวนการแบ่งเซลล์ก็เป็นผลจากการตัด-ต่อ DNA พันธุวิศวกรรม โดยการตัด-ต่อ DNA หรืออาจเรียกว่าการสร้าง DNA สายผสม หรือรีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) ก็เป็นการเลียนแบบการตัด-ต่อ DNA ภายในเซลล์ แต่ทว่ากระทำในหลอดทดลองเท่านั้นเอง ความสามารถในการตัด-ต่อ DNA ในหลอดทดลองดังกล่าว ทำให้เราสามารถตัด-ต่อ DNA จากสายพันธุ์ต่างๆ กันโดยไม่มีขอบเขตจำกัด นั่นคือสามารถสร้างสิ่งมีชีวิตใหม่ๆ ขึ้นมาได้



แผนภาพแสดงไดอะแกรมของขั้นตอนทางพันธุวิศวกรรม

พันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อ DNA

- กระบวนการธรรมชาติ
  - **Gene mutation**
    - ทิศทางไม่แน่นอน
    - ได้ลักษณะไม่เหมาะสม
  - **Gene recombination**
    - Same species only
    - เกิดลักษณะที่ต้องการไม่เต็มที่, เกิดช้ามาก
  - **Crossing over**
  - **Allele frequency** → อัตราที่ช้ามาก

เทคนิคขั้นตอนทางพันธุวิศวกรรม

❶ การสร้าง Recombinant DNA

DNA fragment ที่ต้องการโดยใช้ Restriction enzyme ตัด

DNA vector (Plasmid, phage cosmid)

ใช้ DNA ligase เชื่อม

❷ การนำ Recombinant DNA เข้าสู่ host

- Transformation
- Transfection
- Transduction
- Conjugation

GMOs (GMOs) → ชนิดแรกสุดคือมะเขือเทศ

❸ การคัดเลือก host ที่ได้รับ recombinant DNA

ขั้นตอนการทำ Recombinant DNA

การทำ recombinant DNA ในเทคนิควิศวพันธุกรรม มีขั้นตอนดังนี้

❶ แยก DNA ออกจากเซลล์ผู้ให้ที่มียีนที่ต้องการ

❷ ตัด DNA ที่มียีนที่ต้องการเป็นชิ้นย่อย ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

❸ เชื่อมต่อ DNA ชิ้นย่อย ๆ กับ DNA พาหะ ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดเป็น recombinant DNA

❹ นำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย

❺ คัดเลือกเซลล์ของแบคทีเรียที่มียีนที่ต้องการและสร้างโปรตีนที่ต้องการได้

การโคลนยีน หรือ การโคลน DNA (Gene cloning and DNA cloning)

การโคลนยีน หรือ การโคลน DNA หมายถึง กระบวนการทางเทคนิคพันธุวิศวกรรมที่ใช้เพิ่มปริมาณยีนและประมาณ DNA ที่ต้องการ โดยส่วนของ DNA ที่มียีนที่ต้องการจะถูกตัดต่อเชื่อมเข้ากับจีโนมของไวรัสหรือพลาสมิดของแบคทีเรีย

วิธีการโคลนยีน หรือ การโคลน DNA มีหลายวิธี ดังนี้

การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

1. พลาสมิด (plasmid) เป็น DNA วงแหวน (circular DNA) สายคู่ที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรีย (extrachromosome DNA) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 กิโลเบส – 200 กิโลเบส (1,000–200,000 คู่เบส) พบในเซลล์แบคทีเรีย

- แต่ในปัจจุบันพลาสมิดที่นิยมใช้ในการโคลนยีนได้พัฒนามาในมีขนาดประมาณ 3-4 กิโลเบส โดยมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะอยู่เพื่อใช้เครื่องหมาย (marker) ในการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด และจะมีบริเวณของ DNA ที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดเพื่อสอดแทรก DNA ที่ต้องการเข้าไป

2. พลาสมิดของแบคทีเรียจะถูกใช้เป็น DNA พาหะ (DNA vector) สำหรับการโคลน DNA โดยในแบคทีเรีย 1 เซลล์อาจมีพลาสมิด 1 ถึง 300 ยีน เมื่อนำแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดที่สอดแทรก DNA หรือยีนที่ต้องการ

การตั้งชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตั้งชื่อ หรือเรียกเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นได้อาศัยหลักของ smith และ Nathans ระบบอักษร 3 ตัว พิมพ์ตัวเอน ดังนี้

1. ใช้อักษรย่อตัวแรกของชื่อระบุชนิด (Genus) โดยเขียนตัวใหญ่และติดตามด้วยอักษรสองตัวแรกของชื่อระบุชนิด (specific epithet) แต่ให้เขียนตัวเล็ก เช่น เอนไซม์ restriction endonuclease ที่แยกได้จากแบคทีเรีย

Escherichia coli = Eco หรือ

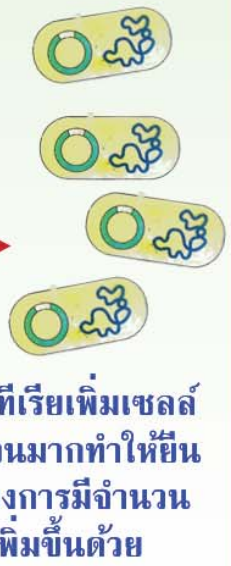
Haemophilus influenzae = Hin

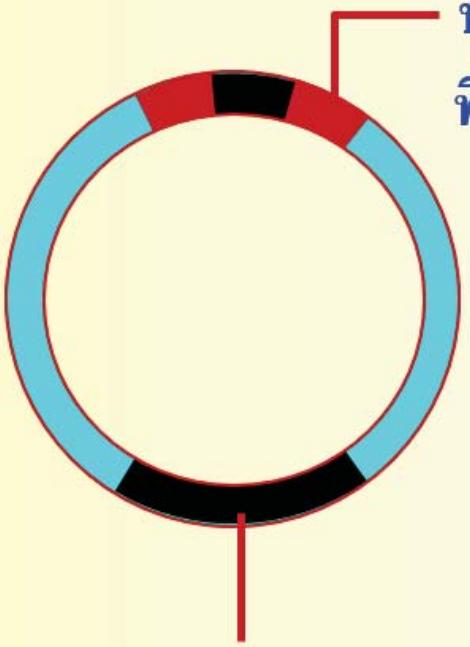
2. เมื่อจำแนกจุลินทรีย์ได้เป็นสายพันธุ์หรือ strain ก็ให้ใส่ชื่อหรือรหัสของสายพันธุ์นั้นตามมา เช่น *Eco*R มาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* RY13 (RY13 เป็นรหัสสายพันธุ์ของแบคทีเรีย)

3. ถ้าสายพันธุ์นั้นมีเอนไซม์จำเพาะ แตกต่างกัน ก็ให้เขียนลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้จากจุลินทรีย์เป็นเลขโรมัน เป็นลำดับสุดท้าย เช่น

ตารางที่ 1 แสดงเอนไซม์ตัดจำเพาะ และจุดตัดจำเพาะ (ลูกศรชี้จุดที่ถูกตัดจำเพาะ)

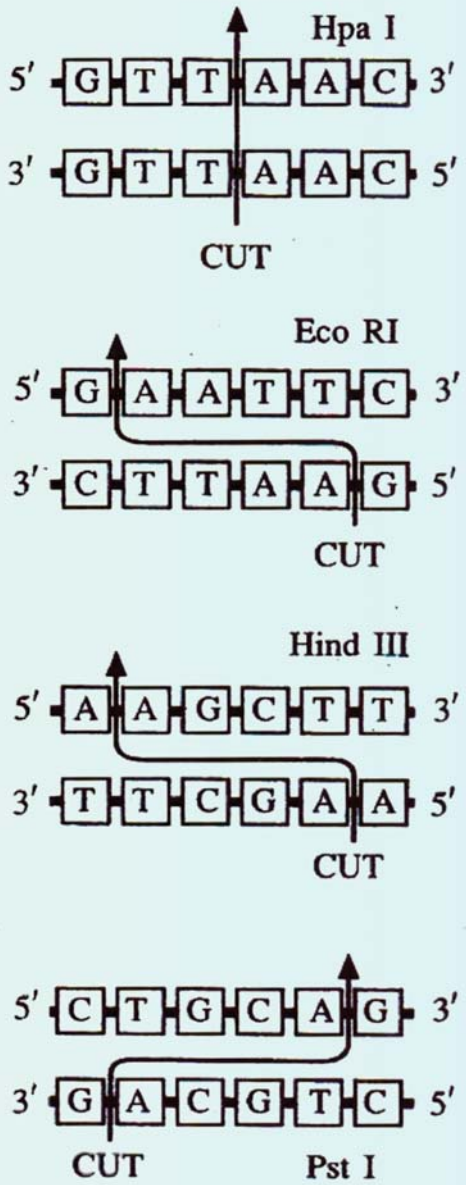
ชนิดของจุลินทรีย์	ชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ	จุดตัดจำเพาะ	ชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้ภายหลังการตัด
Escherichia coli RY13	Eco RI	5′---GAATTC---3′ 3′---CTTAAG--- 5′	5′---G AATTC---3′ และ 3′---CTTAA G--- 5′
Hemophilus influenzae Rd	Hind III	5′---AAGCTT---3′ 3′---TTCGAA--- 5′	5′---A AGCTT---3′ และ 3′---TTCGA A--- 5′
Bacillus amyloliquefaciens H	Bam HI	5′---GGATCC---3′ 3′---CCTAGG--- 5′	5′---G GATCC---3′ และ 3′---CCTAG G--- 5′
Haemophilus parainfluenzae	Hap I	5′---GTTAAC---3′ 3′---CAATTG--- 5′	5′---GTT AAC---3′ และ 3′---CAA TTC--- 5′
Haemophilus parainfluenzae	Hap II	5′---CCGG---3′ 3′---GGCC--- 5′	5′---C CGG---3′ และ 3′---GGC C--- 5′

1. แยกพลาสมิดที่จะใช้เป็นพาหนะและ DNA ที่มียีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิต	2. สอดแทรกสาย DNA ที่มียีนที่ต้องเข้ากับพลาสมิดที่เป็นพาหนะโดยการใช้เอนไซม์ DNA ligase เชื่อม	3. นำพลาสมิดที่เป็นพาหนะและมียีนที่ต้องการใส่ในเซลล์ของแบคทีเรีย	4. โคลนยีนโดยนำแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงแล้วให้พลาสมิดจำลองตัวเองในเซลล์ของแบคทีเรีย	5. คัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มียีนที่ต้องการ
				

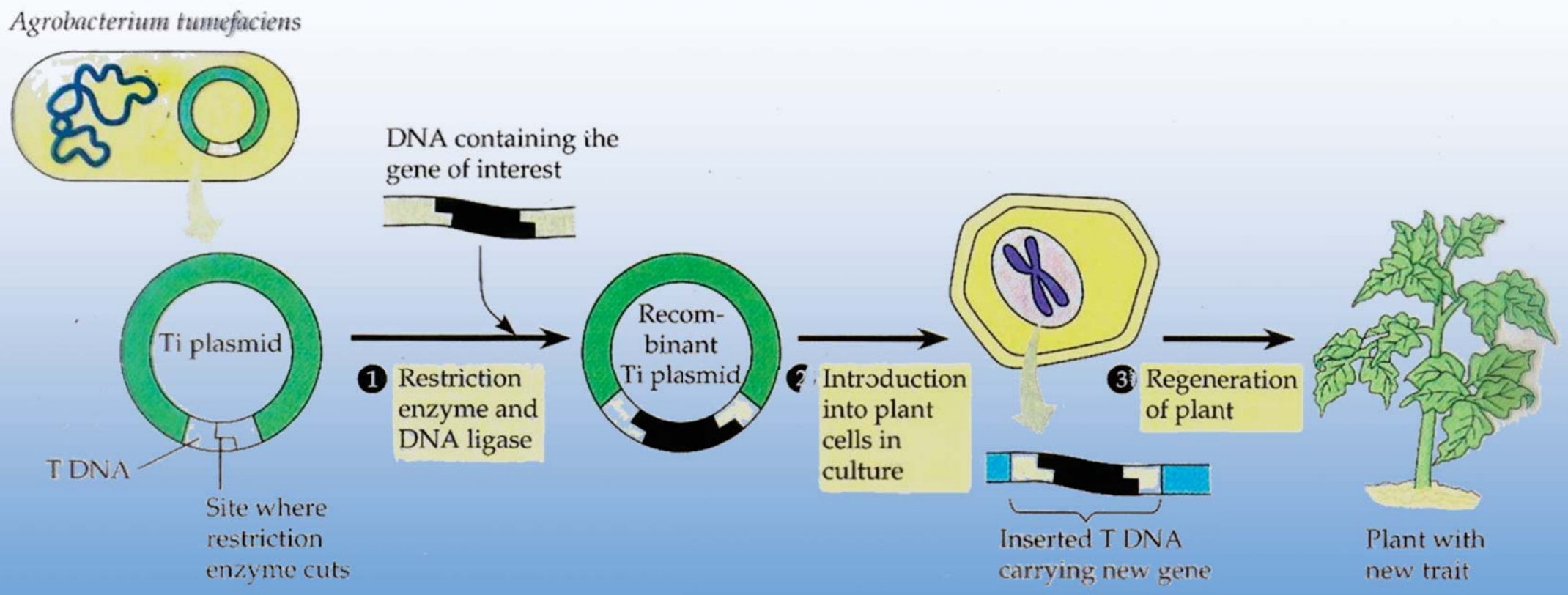


บริเวณของ DNA สำหรับการแทรก DNA ที่ต้องการประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด

ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ



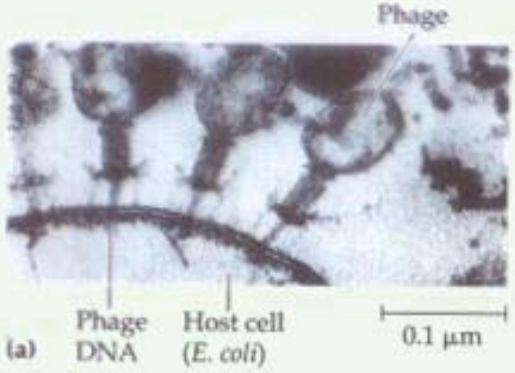
การทำงานของ Restriction nucleases 4 ชนิด


Agrobacterium tumefaciens
DNA containing the gene of interest
Ti plasmid
T DNA
Site where restriction enzyme cuts
1 Restriction enzyme and DNA ligase
Recom-binant Ti plasmid
2 Introduction into plant cells in culture
Inserted T DNA carrying new gene
3 Regeneration of plant
Plant with new trait

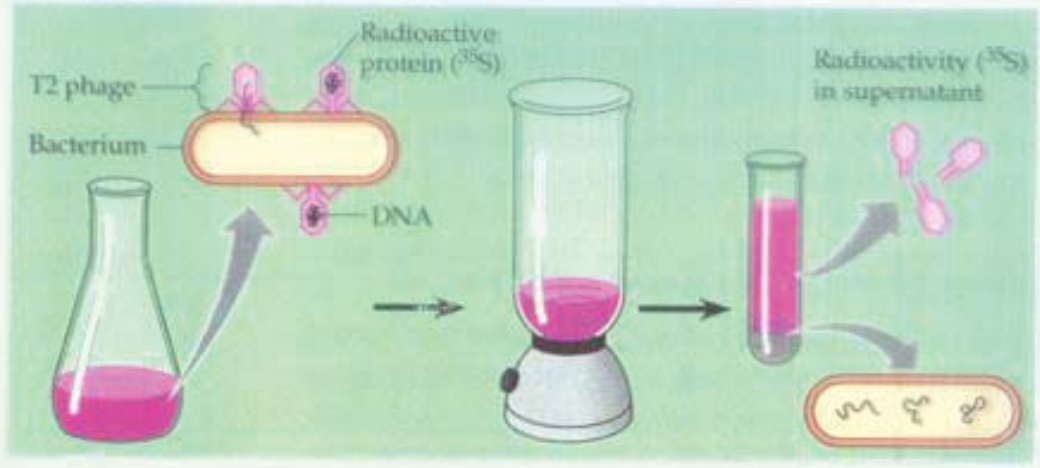
การโคลนยีนโดยอาศัยไวรัส

การโคลนยีนที่ต้องการอีกวิธีหนึ่งก็คือ การใส่ยีนนั้นสอดเข้าไปต่อกับ DNA ของไวรัส เช่น

- การนำเอาส่วนของ DNA ที่มียีนของมนุษย์เชื่อมรวมกับ DNA ของไวรัสที่เข้าทำลายแบคทีเรีย (bacteriophage) เกิดเป็นโมเลกุลของ DNA สายผสม (Recombinant DNA molecule) ขึ้น จากนั้นก็นำไวรัสดังกล่าวนี้เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย ไวรัสจะเพิ่มจำนวนตัวเอง (replication) ทำให้ได้ไวรัสที่มีโมเลกุล DNA มากกว่า 1012 โมเลกุลภายในเวลาเพียง 1 วัน ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ของมนุษย์ที่ใส่ให้กับไวรัส สำหรับไวรัสหรือพลาสมิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนหรือ DNA ที่เรียกว่า cloning vector



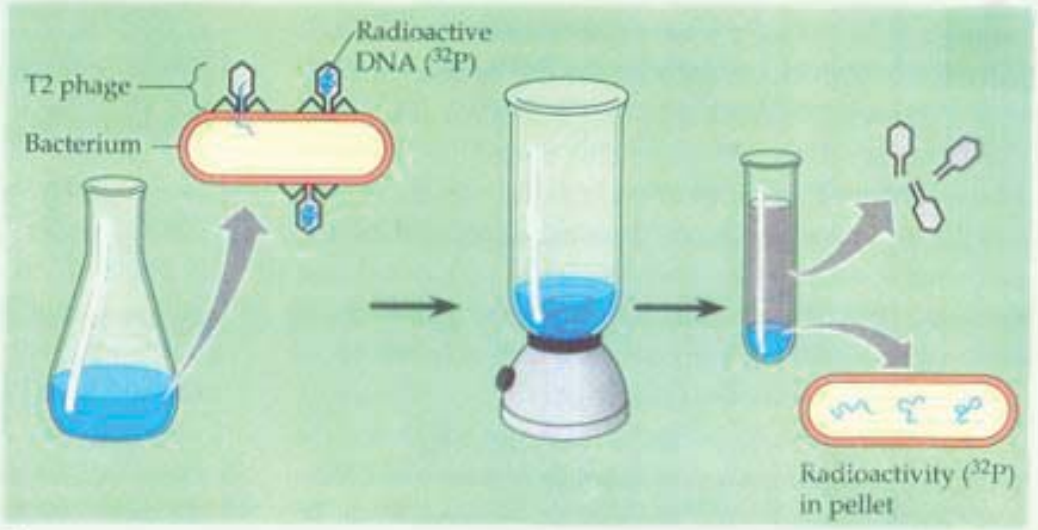
(a)



Mix radioactively labeled phage with bacteria. The phage infects the bacterial cells.

Agitate in a blender to separate phage outside the bacteria from the cells and their contents.

Centrifuge and measure the radioactivity in the pellet and supernatant.



(b)

การโคลนยีนในหลอดทดลองโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ หรือพอลิเมอเรสเชนรีแอกชัน (PCR or Polymerase Chain Reaction)

เทคนิคการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction Technique)

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ DNA ในหลอดทดลอง จึงอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification

ในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิคการทำ PCR จะต้องใช้องค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ

1. DNA แม่แบบ (template DNA) เป็น DNA ที่ต้องการโคลน
2. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (deoxyribonucletide triphosphate [dNTPs])
3. ไพรเมอร์ (Oligonucleotid Primer) เป็น DNA สายสั้นๆ ที่จะจับกับ DNA ที่ต้องการ เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างสาย DNA
4. เครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (Thermal cycler) หรือ เทอร์มอไซเคลอร์ (Thermocycler) เป็นเครื่องมือตั้งโปรแกรมอุณหภูมิให้ปรับเปลี่ยนตามกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ตามที่ต้องการ
5. บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม
6. เอนไซม์ DNA polymerase ชนิดอุณหภูมิสูงได้ ซึ่งจะสกัดมาจากแบคทีเรียในน้ำพุร้อน

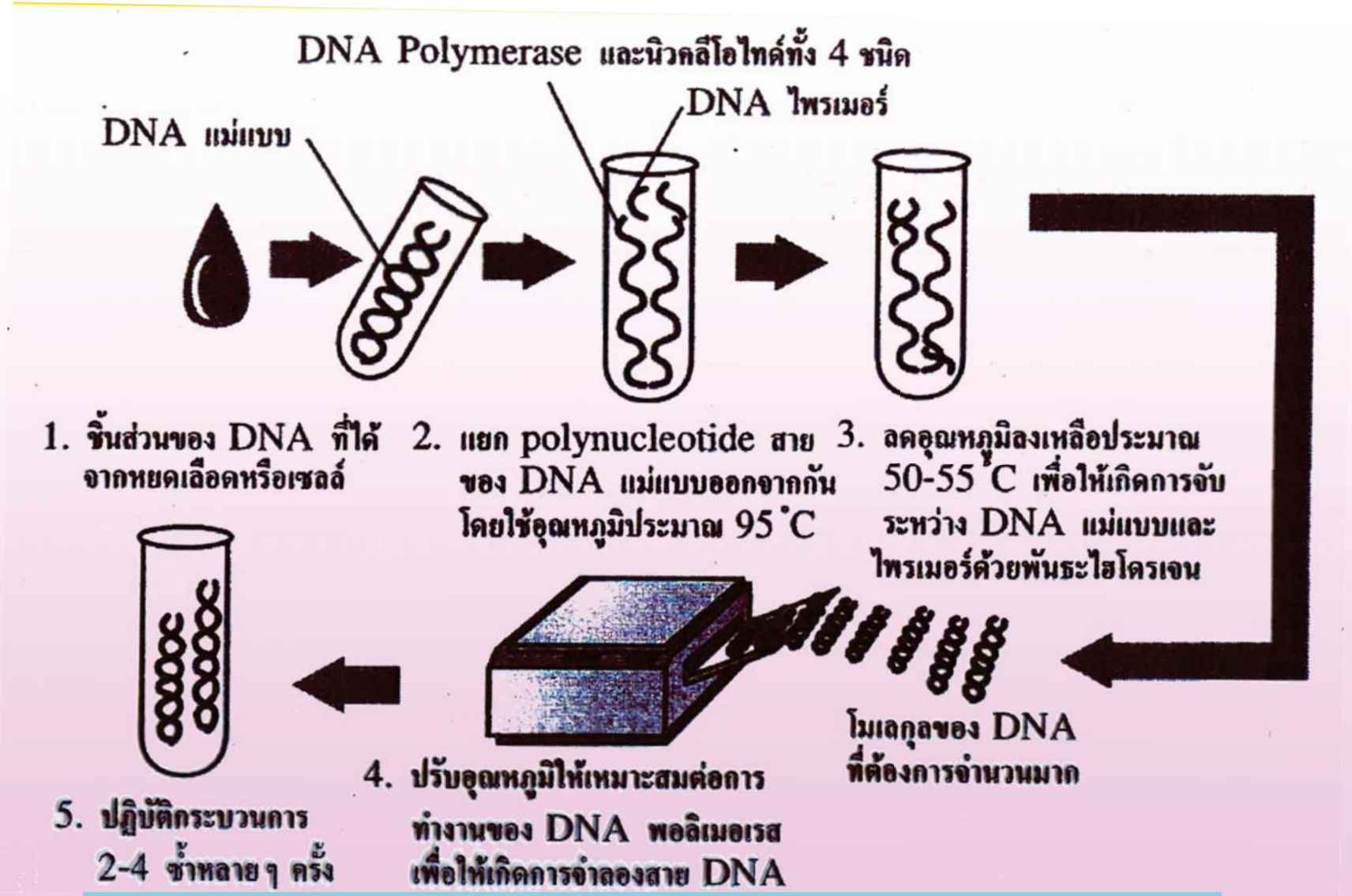
ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ โดยในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ DNA แม่แบบให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90–95 ^{o}C

2. Annealing of Primers เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50–55 ^{o}C เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับ DNA แม่สายแบบเดี่ยว ตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จับคู่กันได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (นิวคลีโอไทด์คู่สม)

3. Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA สายใหม่ต่อขยายจากไพรเมอร์ไปในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ โดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยอุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70–75 ^{o}C

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำ ๆ กัน เป็นจำนวน 20–30 รอบ ทำให้ได้ DNA สายใหม่เพิ่มเป็นจำนวนมาก (amplified product) หรือ ที่เรียกว่า Amplicon



การสร้างสาย DNA โดยพอลิเมอเรสเชนรีเอกชัน (PCR)

ข้อจำกัดของการโคลนยีนโดยเทคนิค PCR

1. เทคนิคนี้ไม่สามารถทำให้ยีนที่โคลนขึ้นมาแสดงออกโดยการสร้างโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งต่างจากการโคลนโดยใช้ พลาสมิดของแบคทีเรีย หรือใช้ไวรัสที่ยีนสามารถแสดงออกโดยการสร้างโปรตีนออกมาได้

2. การเพิ่มจำนวนชุดของ DNA โดยวิธี PCR อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้น เนื่องจากไม่มีกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่สร้างขึ้นเหมือนกับระบบในสิ่งมีชีวิตที่มีการตรวจสอบอย่างละเอียดถูกต้อง

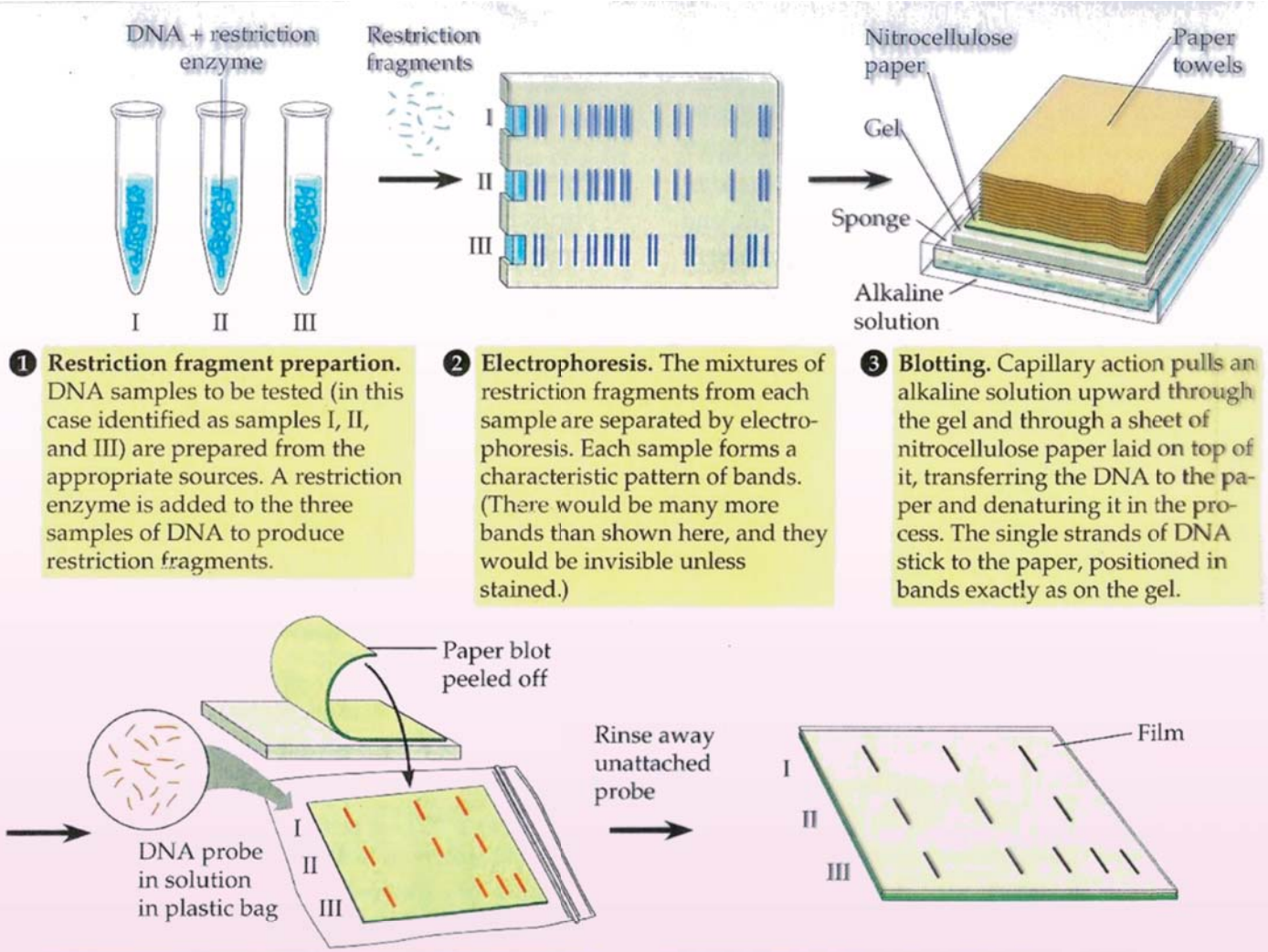
ประโยชน์ของเทคนิค PCR

1. ใช้เพิ่มปริมาณยีนที่มีปริมาณน้อย ๆ ให้มีปริมาณมากพอเป็นจุดเริ่มต้นก่อน แล้วจึงนำยีนนั้นไปโคลนต่อ โดยอาศัยพลาสมิด ของแบคทีเรีย เช่น การเพิ่มปริมาณ DNA จากซากแมมมอธ (mammoth) ที่สูญพันธุ์ไปเมื่อสี่หมื่นปีก่อน ทำให้สามารถศึกษาวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตที่สูญพันธุ์ไปแล้ว
2. สามารถใช้ตรวจสอบ DNA ปริมาณน้อยในชิ้นส่วนเซลล์ คราบเลือด น้ำอสุจิของอาชญากรรมต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ ในด้านนิติเวชหรือนิติวิทยาศาสตร์ในกระบวนการยุติธรรม
3. ใช้ตรวจสอบ DNA ของเซลล์จากเอมบริโอในครรภ์ในแง่ ความผิดปกติทางพันธุกรรม รวมทั้งตรวจการติดเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV)

การศึกษาจีโนม (genome)

จีโนม (genome) หมายถึง สารพันธุกรรมหรือ กรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งประกอบด้วยสารพันธุกรรมในนิวเคลียส (จีโนมในนิวเคลียส) ในไมโทคอนเดรียและในคลอโรพลาสต์ เช่น ขนาดของจีโนมมนุษย์เท่ากับ 3,200 ล้านคู่เบส (3,200 เมกะเบส) ประกอบขึ้นด้วยยีนประมาณ 80,000 ยีน หรือแบคทีเรียน *Eschrichia coli* มีขนาดของจีโนม 4 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนประมาณ 4,000 ยีน เป็นต้น

- จีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างนั้นได้ โดยใช้การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำชิ้นส่วน DNA ไปแยกขนาดโดยวิธีการ เจลอิเล็กโตรโฟริซิส จะได้รูปแบบของแถบ DNA (DNA band) ที่แตกต่างกัน รูปแบบของแถบ DNA จะสามารถเชื่อมโยงถึงจีโนมของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งเชื่อมโยงถึงฟีโนไทป์บางลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ เราเรียกความแตกต่างของรูปของแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะว่า Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ได้



❶ **Restriction fragment prepartion.** DNA samples to be tested (in this case identified as samples I, II, and III) are prepared from the appropriate sources. A restriction enzyme is added to the three samples of DNA to produce restriction fragments.

❷ **Electrophoresis.** The mixtures of restriction fragments from each sample are separated by electrophoresis. Each sample forms a characteristic pattern of bands. (There would be many more bands than shown here, and they would be invisible unless stained.)

❸ **Blotting.** Capillary action pulls an alkaline solution upward through the gel and through a sheet of nitrocellulose paper laid on top of it, transferring the DNA to the paper and denaturing it in the process. The single strands of DNA stick to the paper, positioned in bands exactly as on the gel.

❹ **Hybridization with radioactive probe.** The paper blot is exposed to a solution containing radioactively labeled probe. The probe is single-stranded DNA complementary to the DNA sequence of interest, and it attaches by base pairing to restriction fragments of complementary sequence.

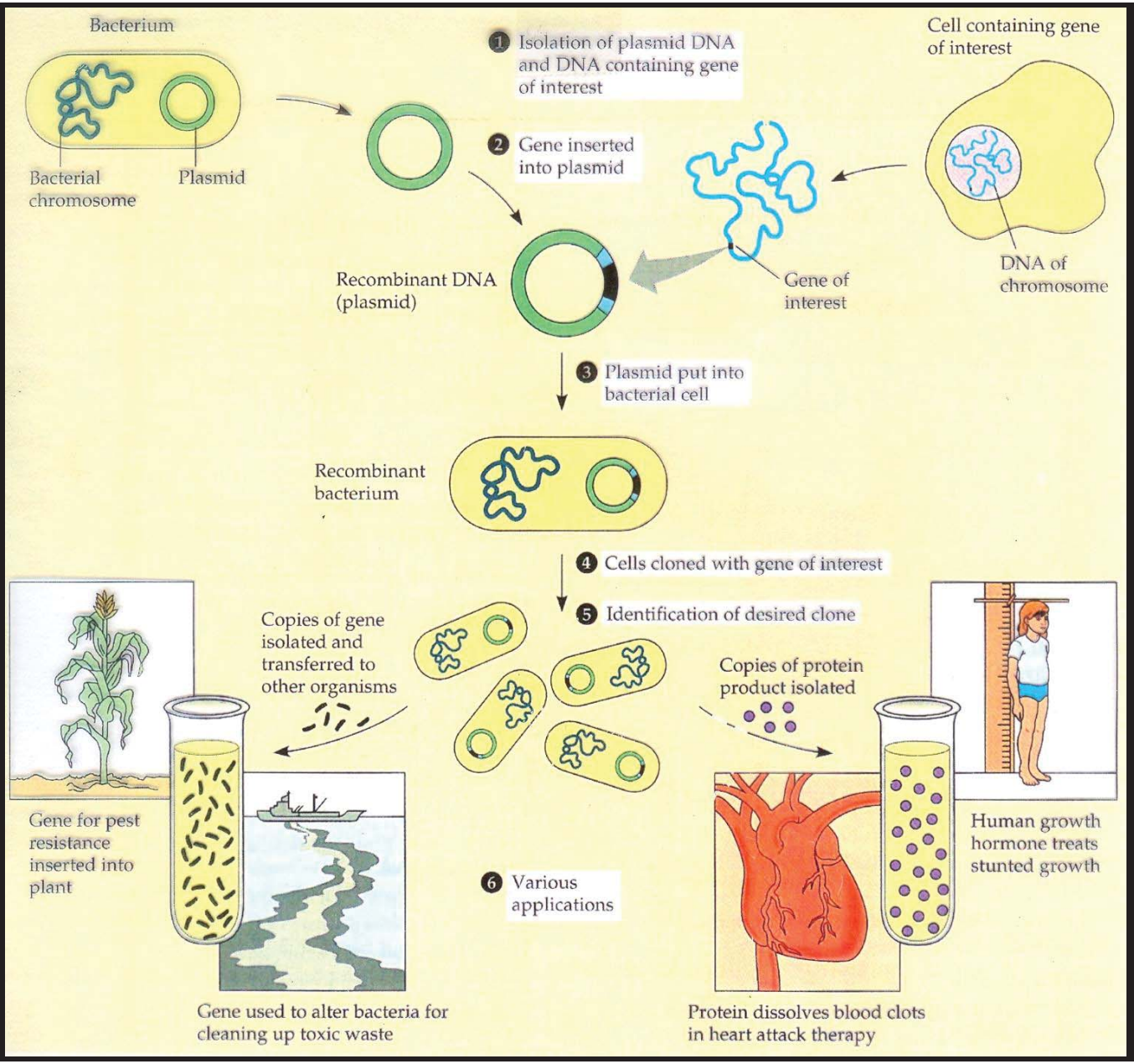
❺ **Autoradiography.** A sheet of photographic film is laid over the paper. The radioactivity in the bound probe exposes the film to form an image corresponding to specific DNA bands—the bands containing DNA that base pairs with the probe. The band patterns for samples I and II are identical, but III is different.

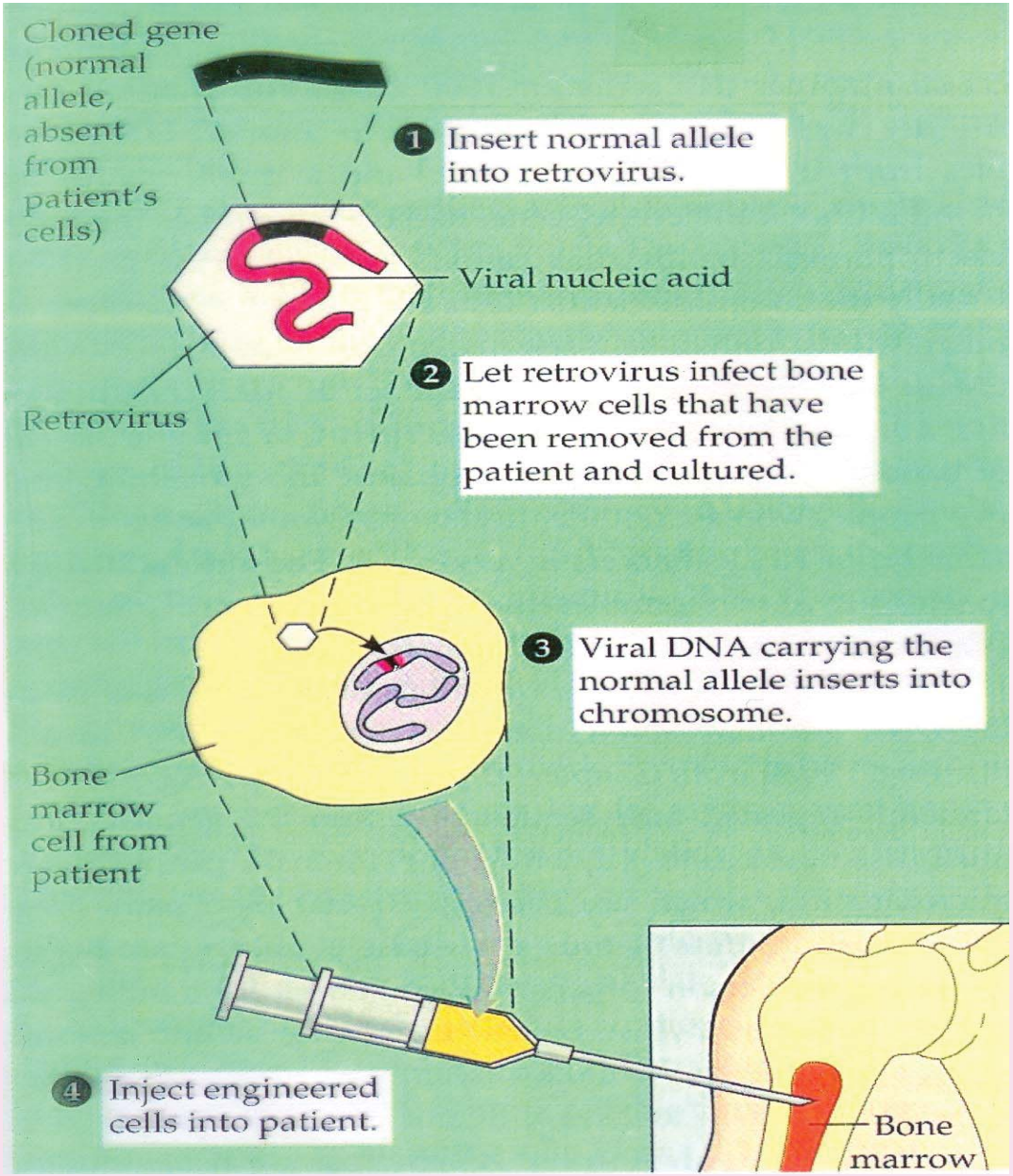
Biotechnology and the future of man

Biotechnology ➲ การประยุกต์ใช้ความรู้เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตเพื่อประโยชน์ ด้านปริมาณ, คุณภาพที่ต้องการโดยอาศัยกระบวนการพันธุวิศวกรรม (**genetic engineering**) และเทคนิคอื่น ๆ

Biotechnology and the future of man

- การสวนทาง Natural Selection
- การพัฒนาเทคโนโลยีการแพทย์และสาธารณสุข
- เทคโนโลยีการพันธุ์
  - Sperm bank
  - Egg bank
  - Cloning
- เทคโนโลยีการเกษตร


Bacterium
Bacterial chromosome
Plasmid
1 Isolation of plasmid DNA and DNA containing gene of interest
Cell containing gene of interest
2 Gene inserted into plasmid
Recombinant DNA (plasmid)
Gene of interest
DNA of chromosome
3 Plasmid put into bacterial cell
Recombinant bacterium
4 Cells cloned with gene of interest
5 Identification of desired clone
Copies of gene isolated and transferred to other organisms
Copies of protein product isolated
Gene for pest resistance inserted into plant
Human growth hormone treats stunted growth
6 Various applications
Gene used to alter bacteria for cleaning up toxic waste
Protein dissolves blood clots in heart attack therapy


Cloned gene (normal allele, absent from patient's cells)
1 Insert normal allele into retrovirus.
Viral nucleic acid
Retrovirus
2 Let retrovirus infect bone marrow cells that have been removed from the patient and cultured.
3 Viral DNA carrying the normal allele inserts into chromosome.
Bone marrow cell from patient
4 Inject engineered cells into patient.
Bone marrow

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีทาง DNA

ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีทาง DNA สามารถประมวลได้ดังนี้

1. พันธุวิศวเป็นพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาเพื่อความเข้าใจทางพันธุศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต

เช่น

- การจัดเรียงตัวของเบสเป็นช่วง ๆ
- ความเข้าใจกลไกการควบคุมการทำหน้าที่ของยีน
- ความเข้าใจในประเด็นที่แตกต่างระหว่างยีนของโพรคาริโอตและยูคาริโอต
- นำยีนของโพรคาริโอตและยูคาริโอตตัดและเชื่อมต่อกัน ทำให้สามารถศึกษาพฤติกรรมของยีนยูคาริโอต (eukaryotic genes) ในเซลล์โพรคาริโอตได้

2. การประยุกต์ใช้ในเชิงการแพทย์และเภสัชกรรม

ตัวอย่างเช่น

2.1 การวินิจฉัยโรคที่มีการติดเชื้อ

- การใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อตรวจสอบว่าจีโนมของไวรัสในสิ่งมีชีวิตนั้นหรือไม่
- ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์การติดเชื้อ HIV เป็นต้น

2.2 การตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม

- ก่อนที่จะมีการแสดงอาการ
- ตรวจหาการเป็นพาหะของโรค

2.3 การบำบัดยีน (gene therapy)

เป็นเทคนิคในการถ่ายยีนที่ปกติเข้าไปยังเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ เนื่องจากความบกพร่องของยีน เพื่อให้ยีนที่เป็นปกตินั้นทำหน้าที่แทน

บำบัดอาการบกพร่องได้โดยใช้ไวรัสเป็นพาหะในการนำยีนเข้าไป

ไวรัสที่ใช้ในการถ่ายยีนจะต้องมีการตัดยีนที่เป็นอันตรายต่อคนทิ้งไป และใส่ยีนปกติที่ต้องการเข้าไปแทนที่เพื่อให้ไวรัสมียีนที่ต้องการแทรกอยู่

ไวรัสมีความสามารถในการแทรกจีโนมของตัวไวรัสเองเข้าสู่โครโมโซมของคนได้โดยไม่สามารถจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวน เนื่องจากยีนที่ทำหน้าที่ในการจำลองตัวเองของไวรัสได้ถูกตัดทิ้งไปแล้ว

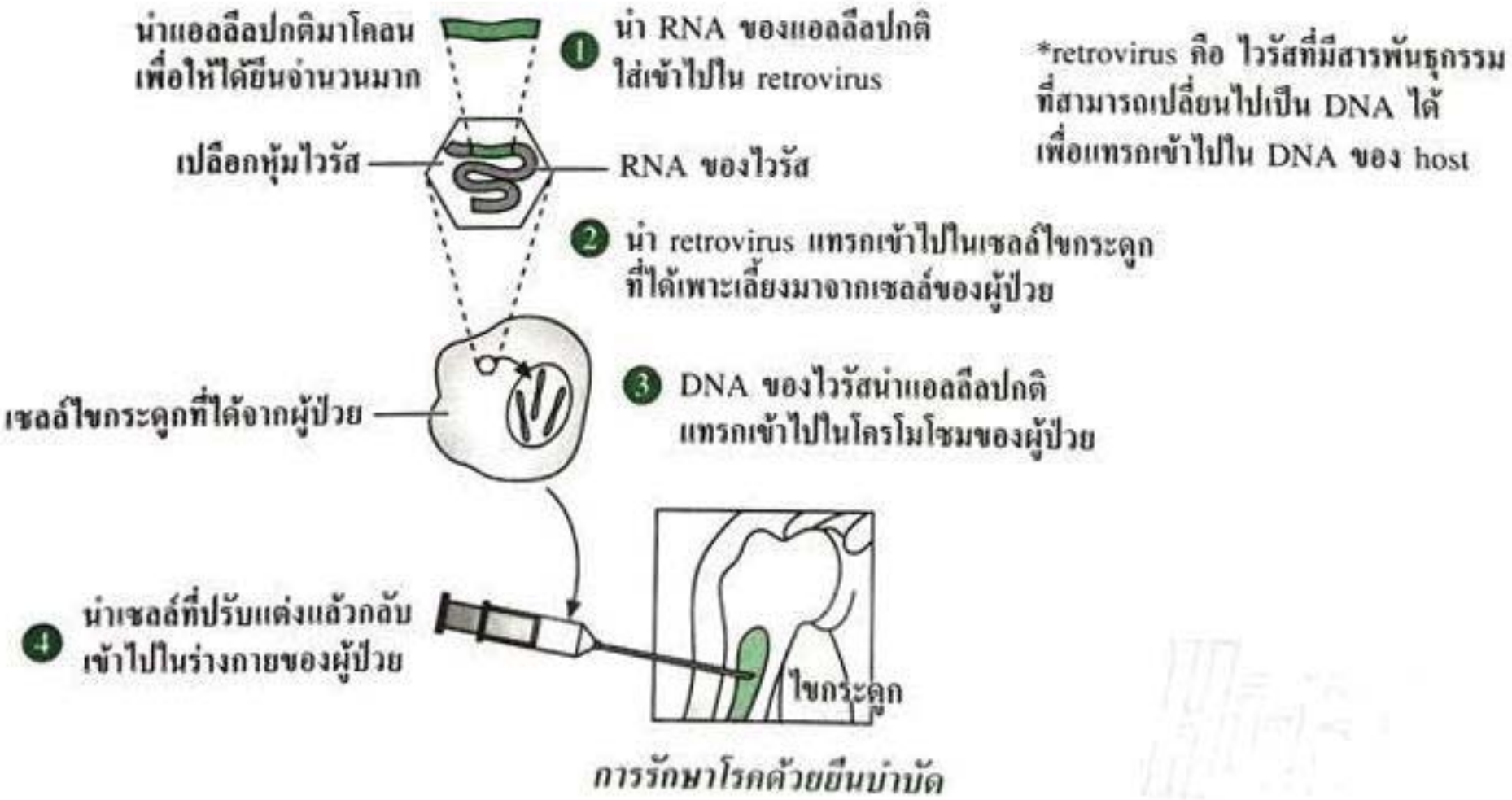
ตัวอย่างของโรคที่มีการรักษาด้วยยีนบำบัดโรค เช่น

- โรค Severe combined immunodeficiency (SCID)

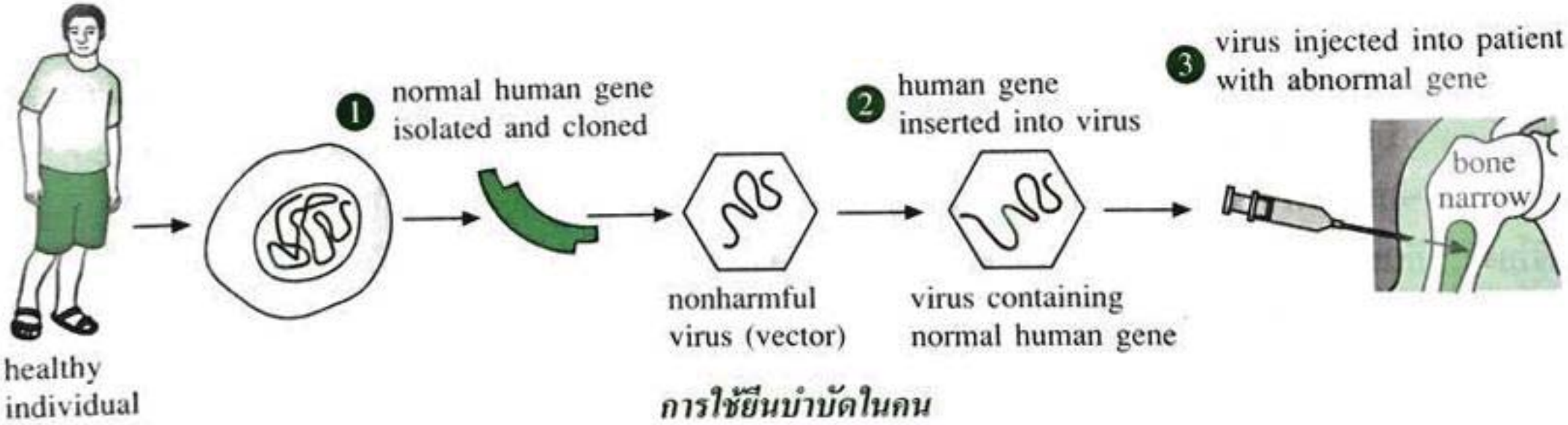
  เป็นโรคทางพันธุกรรม ผู้เป็นโรคนี้ไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้และมักเสียชีวิตจากการติดเชื้อเพียงเล็กน้อย

ข้อจำกัดในการบำบัดด้วยยีนที่ต้องคำนึงถึง คือ

1. การควบคุมกิจกรรมของยีนให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอย่างเหมาะสม
2. การป้องกันไม่ให้การแทรกตัวของยีนเข้าไปในจีโนมของคน ไม่ไปทำให้เกิดมิวเทชันในยีนปกติยีนอื่น
3. ความสามารถในการบรรจุยีนในไวรัสจำกัดเฉพาะยีนขนาดเล็ก



การรักษาโรคด้วยยีนบำบัด



การใช้ยีนบำบัดในคน

2.4 การสร้างผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม

- การผลิตฮอร์โมนอินซูลิน โกรทฮอร์โมน โดยใช้การโคลนยีนด้วยพลาสมิดที่มี DNA สายผสม
- เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มียีนนั้นให้สังเคราะห์โปรตีนที่ต้องการ
- การผลิตยายับยั้งไวรัส HIV โดยการสร้างโมเลกุลโปรตีนเลียนแบบตัวรับที่ HIV ใช้ในการเข้าสู่เซลล์ทำให้ HIV ไปเกาะกับโมเลกุลเหล่านี้ในกระแสเลือดแทนที่จะจับกับตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว จึงสามารถทำลายไวรัสได้
- การผลิตโปรตีนของผิวไวรัสที่เป็นแอนติเจนกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันแทนการใช้ไวรัสฉีดเข้าสู่ร่างกายเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

ตาราง แสดงผลิตภัณฑ์โปรตีนบางชนิดที่ได้จากเทคโนโลยี DNA สายผสม (revombinant DNA technology)

Some protein products of recombinant DNA technology		
ผลิตภัณฑ์ (product)	ผลิตจาก (made in)	การใช้ประโยชน์ (use)
Human insulin	*E. coli*	Treatment for disease (รักษาเบาหวาน)
Human growth hormone (GH)	*E. coli*	Treatment for growth defects (เพิ่มความสูง)
Epidermal growth factor (EGF)	*E. coli*	Treatment for burns, ulcers (รักษาแผลไฟลวก)
Tumor necrosis factor	*E. coli*	Killing of certain tumor cells (ฆ่าเซลล์เนื้องอก)
Interleukin-2 (IL-2)	*E. coli*	Possible treatment for cancer (รักษามะเร็ง)
Prourokinase	*E. coli*	Treatment for heart attacks (บำบัดโรคหัวใจ)
Porcine growth hormone (PGH)	*E. coli*	Improving weight gain in hogs (เพิ่มน้ำหนักสุกร)
Bovine growth hormone (BGH)	*E. coli*	Improving weight gain in cattle (เพิ่มน้ำหนักวัว)

ตารางแสดงผลิตภัณฑ์โปรตีนบางชนิดที่ได้จากเทคโนโลยี DNA สายผสม (revombinant DNA technology)

Some protein products of recombinant DNA technology		
ผลิตภัณฑ์ (product)	ผลิตจาก (made in)	การใช้ประโยชน์ (use)
cellulase	*E. coli*	Breaking down cellulose for animal feeds (ย่อยเซลลูโลสเป็นอาหารสัตว์)
snomax	*Pseudomonas bacterium*	Making snow for ski resort (ผลิตหิมะเพื่อเล่นสกี)
Interferon (alpha and gamma)	S. cerevisiae; *E. coli*	Possible treatment for cancer and virus infections (บำบัดมะเร็งที่เกิดจากไวรัส)
Hepatitis B vaccine	S. cerevisiae	Prevention of hepatitis-virus infection (ป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ)
Colony-stimulating factor (CSF)	Mammalian cells	Treatment for leukemia; boosts resistance to AIDS and other infections disease (บำบัดมะเร็งเม็ดเลือดขาว และต้านเอดส์ รวมทั้งโรคติดเชื้ออื่นๆ)
Erythropoietin (EPO)	Mammalian cells	Treatment for anemia (บำบัดโลหิตจาง)
Factor VIII	Mammalian cells	Treatment for hemophilla (บำบัดโลหิตไหลไม่หยุด)
Tissue plasminogen activator (t-PA)	Mammalian cells	Treatment for heart attacks (บำบัดโรคหัวใจ)

อินซูลินสังเคราะห์ ใช้ชื่อทางการค้า
Humulin R (making humulin)

โรงงานผลิต insulin ที่ใหญ่ที่สุด
ในโลกในประเทศเดนมาร์ก

3. การประยุกต์ใช้ในเชิงนิติวิทยาศาสตร์

- DNA ในคน ๆ เดียวกัน ไม่ว่าจะมาจากเซลล์ส่วนใดของร่างกายก็ตามมาจะมีรูปแบบที่เหมือนกัน และแตกต่างจากคนอื่น

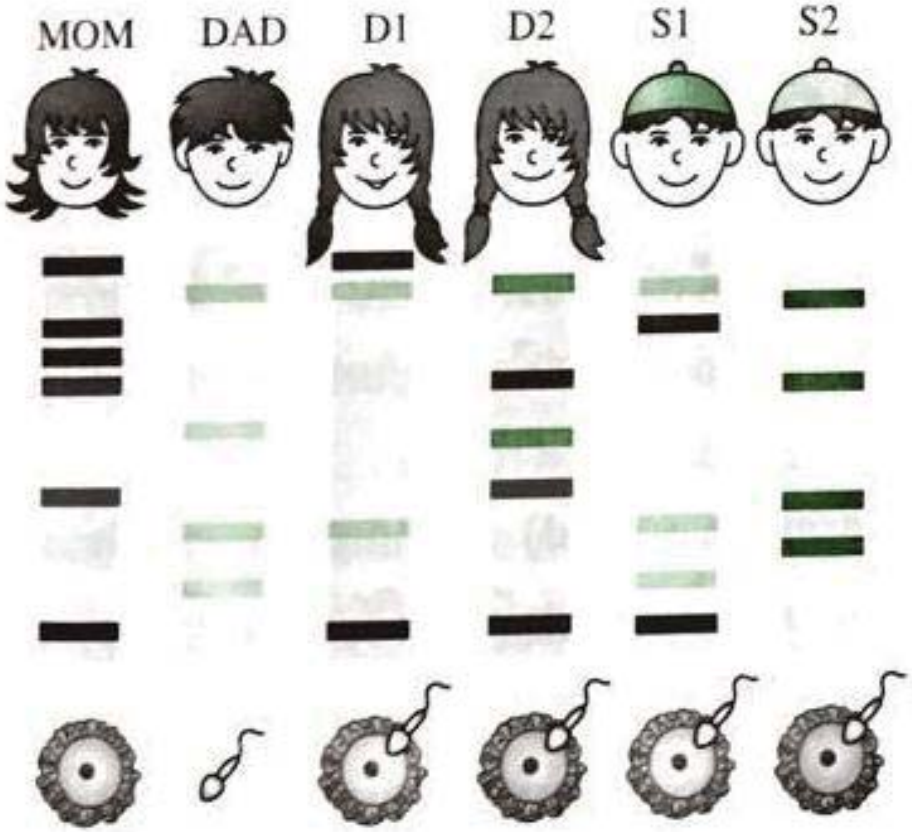
- DNA ในแต่ละคนถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งและเปลี่ยนแปลงไม่ได้ จึงสามารถนำ DNA มาพิสูจน์ตัวบุคคลได้โดยใช้เทคนิค RFLP maker ตรวจสอบรูปแบบ DNA ร่วมกับการทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส เพื่อแยกสลาย DNA ตามขนาดต่าง ๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด เรียกว่าลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) เพราะลายพิมพ์ DNA ของแต่ละคนจะแตกต่างกัน ยกเว้นกรณีฝาแฝดแท้

- ปัจจุบันได้มีการใช้ลายพิมพ์ DNA ตรวจพิสูจน์ความเกี่ยวพันคดีต่าง ๆ เช่น การฆาตกรรม การทำร้ายร่างกาย

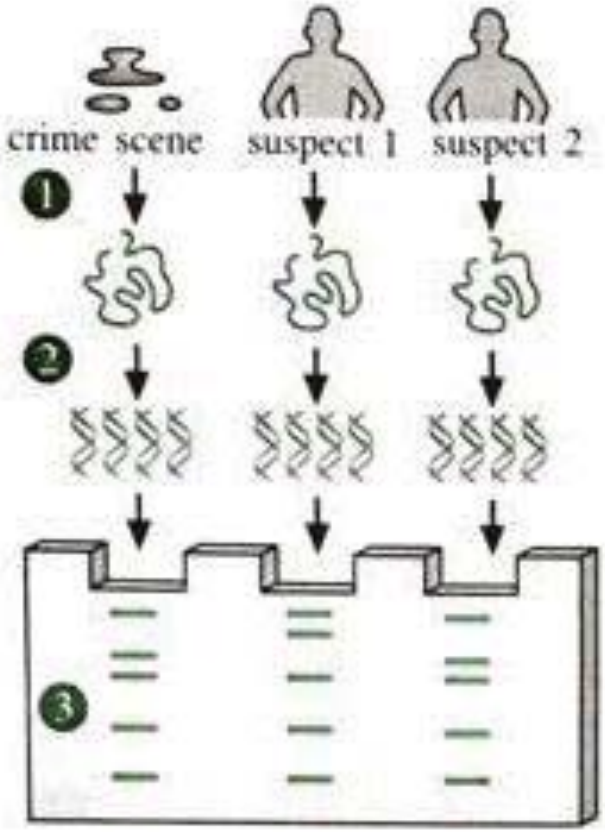
- พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด

พิสูจน์ชาติพันธุ์และการให้สิทธิในการอาศัยบนแผ่นดินไทย การสืบหาบุคคลที่เสียชีวิต เช่น กรณีเครื่องบินตก เหตุการณ์สึนามิ เป็นต้น

<u>ประเทศไทยมีสถาบันที่ตรวจลายพิมพ์ DNA</u> ได้เช่น สถาบันนิติเวช กองพิสูจน์หลักฐาน สังกัดสำนักงานตำรวจแห่งชาติ โรงพยาบาลต่าง ๆ สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม เป็นต้น



การตรวจลายพิมพ์ DNA อาศัยหลักการถ่ายทอด DNA จากพ่อและแม่คนละครึ่งสู่ลูก ทำให้ลายพิมพ์ DNA ของผู้ที่เป็นลูกที่แท้จริง จะต้องตรงกับลายพิมพ์ DNA ของพ่อและแม่ ดังนั้นจากภาพ D1 และ S1 จึงเป็นลูกของพ่อแม่คู่นี้ ส่วน D2 และ S2 ไม่ใช่ลูกที่แท้จริงของพ่อแม่คู่นี้



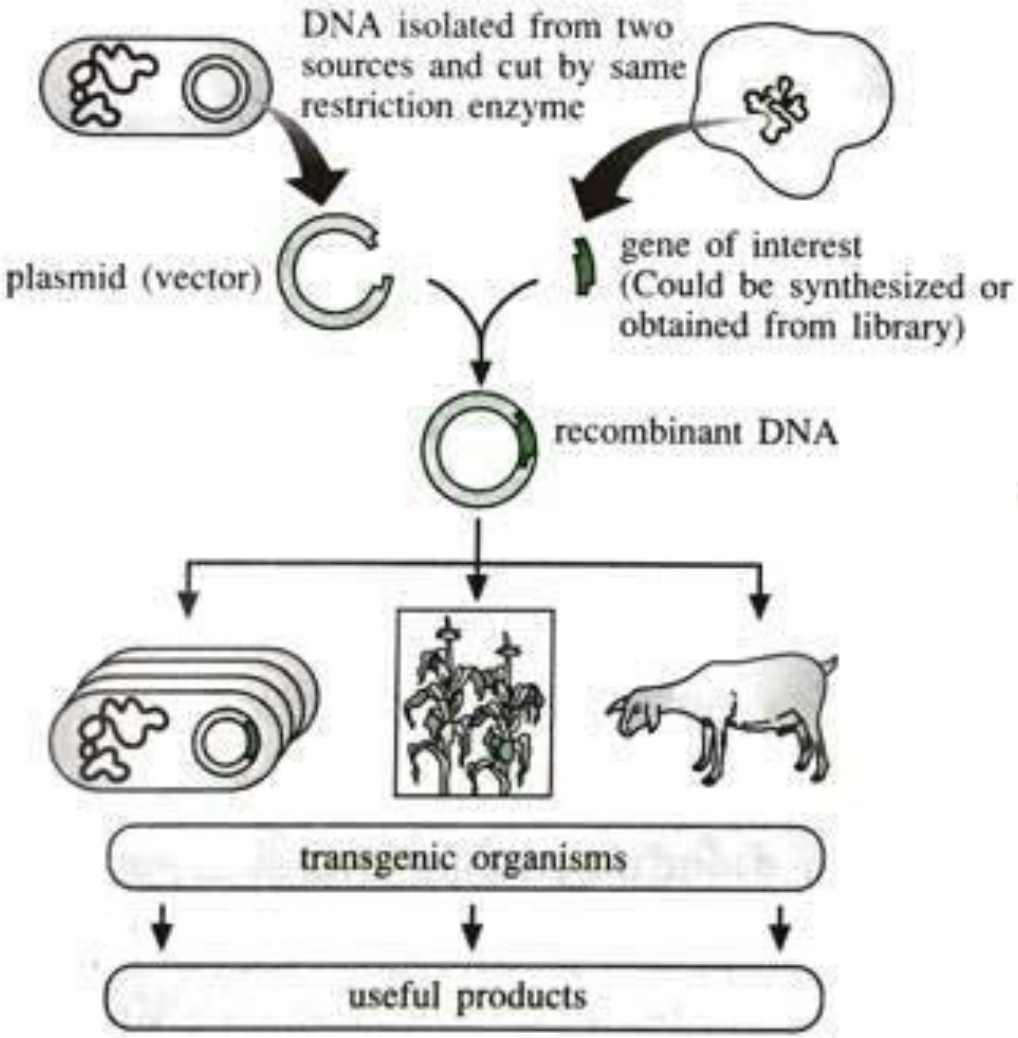
แผนภาพการทำลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprinting) จากภาพ DNA ของบุคคลต้องสงสัย 2 (suspect 2) ตรงกับ DNA จากแหล่งอาชญากรรม

1. *ตัวอย่าง DNA ต้องสงสัยเก็บจากแหล่งอาชญากรรม หรือจากผู้เคราะห์ร้าย และผู้ต้องสงสัย 1 และ 2*
2. *เพิ่มปริมาณ DNA โดย PCR ของทุกตัวอย่าง*
3. *เปรียบเทียบ DNA จากลายพิมพ์ DNA*

4. การประยุกต์ใช้ในเชิงการเกษตร

จากการใช้เทคโนโลยี DNA ทำให้ทราบว่ายีนใดในสัตว์ ทำให้สัตว์นั้นให้ลักษณะตามต้องการได้

เช่น ให้น้ำนมมากขึ้น เป็นต้น



เทคโนโลยีทาง DNA ในการปรับปรุงพันธุ์
จุลินทรีย์ พืช และสัตว์

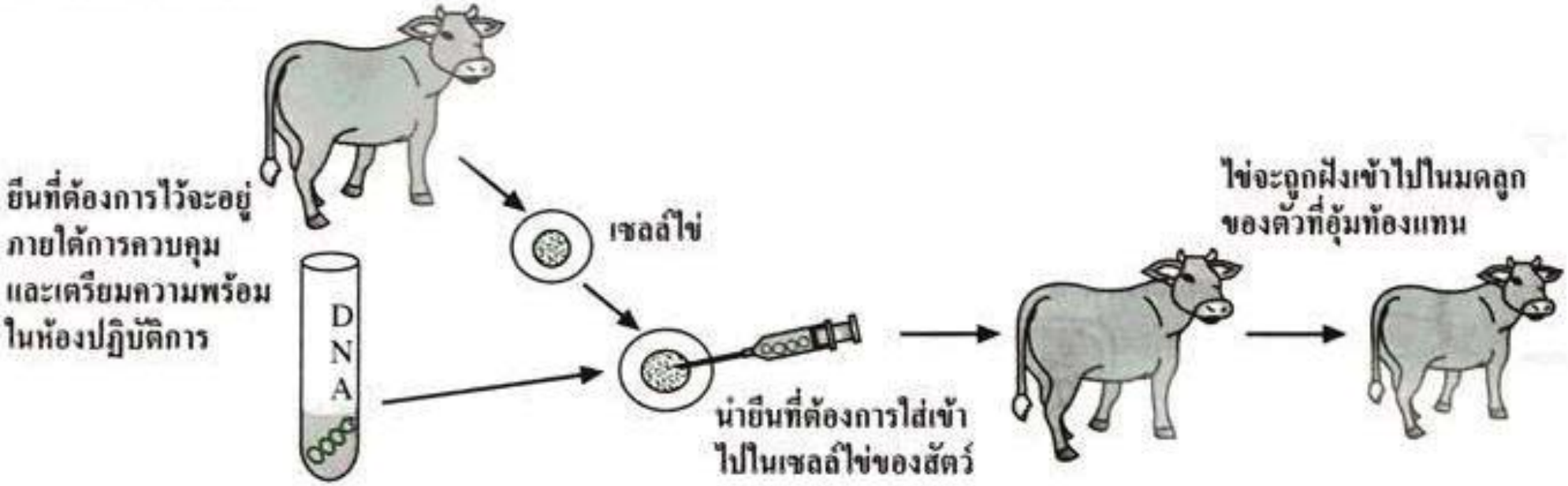
การสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม (genetically modified organism: GMOs หรือ genetically engineered organism: GEOs) และทำขึ้นทั้งในสัตว์และพืช เช่น

4.1 การสร้างฟาร์มสัตว์ที่เสมือนโรงงานผลิตยาด้านการแพทย์

เช่น ผลิตโปรตีนยับยั้งเอนไซม์ที่ทำลายเซลล์ปอดในผู้ป่วยโรคซิสติกโบรซิส (cystic fibrosis) และโรคระบบทางเดินหายใจเรื้อรังชนิดอื่น ๆ

4.2 การสร้างสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic animals)

เริ่มจากการแยกเซลล์ไข่ออกจากเพศเมีย ฉีดยีนที่ต้องการใส่นิวเคลียสของเซลล์ไข่ (microinjection) จะมีเซลล์ไข่บางเซลล์ยอมรับยีนจากนั้นนำไปผสมพันธุ์ในหลอดทดลอง (in vitro fertilization) ถ่ายฝากเข้าตัวแม่ผู้รับเพื่อเจริญเป็นลูกตัวใหม่ที่มียีนที่ต้องการอยู่ โดยไม่จำเป็นต้องมาจากสปีชีส์เดียวกัน



การสร้างสัตว์ดัดแปรพันธุกรรม

4.3 การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant)

เป็นการถ่ายยีนโดยใช้ Agrobacterium ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ตัวอย่างที่นิยมใช้เช่น Agrobacterium tumefaciens หรือใช้ gene gun ยิงยีนที่เกาะอยู่บนผิวอนุภาคของทองให้เข้าไปในเซลล์พืช จากนั้นยีนจะแทรกตัวรวมอยู่กับโครโมโซมของพืชจนกลายเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมพืช

การสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมสามารถทำได้ง่ายกว่าในสัตว์ เนื่องจากมีการศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองซึ่งสามารถสร้างต้นพืชขึ้นใหม่จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ตัวอย่างการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น

1. *พืชต้านทานแมลง* เป็นการถ่ายยีนบีทีที่สร้างพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringensis* ซึ่งสามารถทำลายตัวอ่อนของแมลงบางประเภทอย่างเฉพาะเจาะจง โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น พืชที่มีการถ่ายยีนสร้างสารพิษเข้าไปในเซลล์

   ได้แก่ ฝ้าย ข้าวโพด มันฝรั่ง ยาสูบ มะเขือเทศ เป็นต้น

   ข้อดีคือสามารถลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงลงได้

2. *พืชต้านทานโรค* เช่น การดัดแปรพันธุกรรมมะละกอให้ต้านทานโรคใบด่างจุดวงแหวนซึ่งเกิดจากไวรัส โดยนำยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein gene) ถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์มะละกอ เพื่อชักนำให้มะละกอสร้างโปรตีนดังกล่าว จึงสามารถต้านทานเชื้อไวรัสได้

3. *พืชที่เพิ่มคุณค่าทางอาหาร* เช่น นำยีนจากต้นแดฟโฟดิล (Daffodils) และจากแบคทีเรีย *Erwinia breteria* ถ่ายฝากให้ข้าว ทำให้ข้าวสามารถสร้างวิตามินเอในเมล็ดได้ เรียกว่า ข้าวสีทอง (golden rice) เพื่อช่วยลดภาวะการขาดวิตามินในประเทศที่ขาดแคลนอาหาร

4. *การยืดอายุของผลผลิตให้ยาวนานขึ้น*

โดยนำยีนที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนใส่เข้าไปในผลไม้ทำให้สุกช้าลง สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น

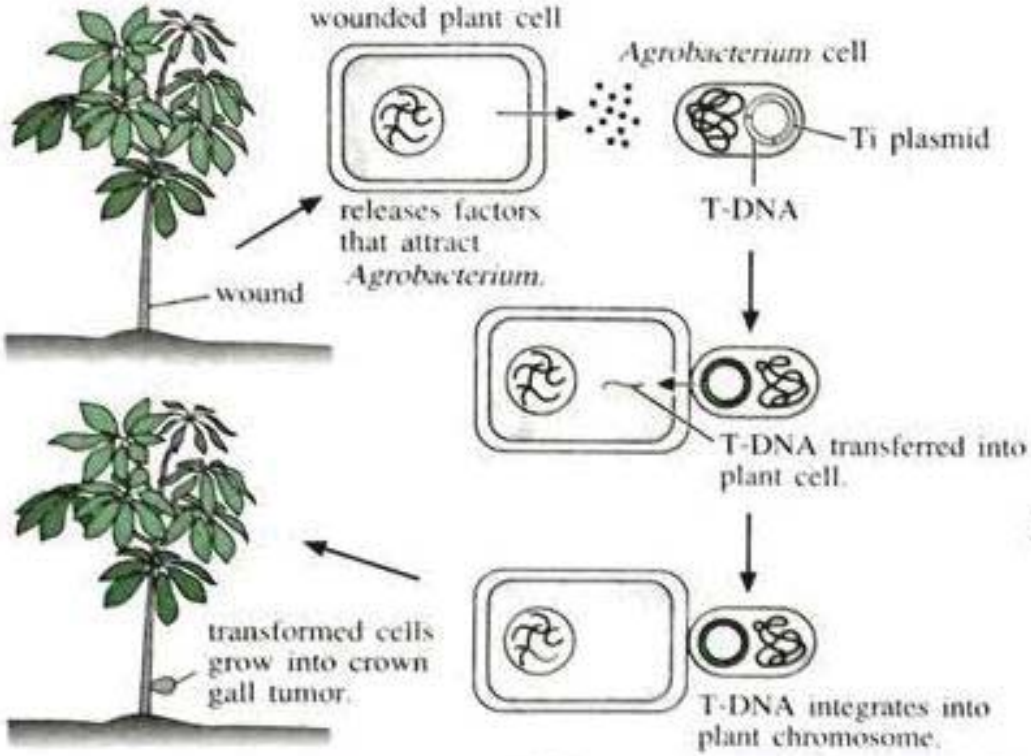
เช่น มะเขือเทศ เป็นต้น

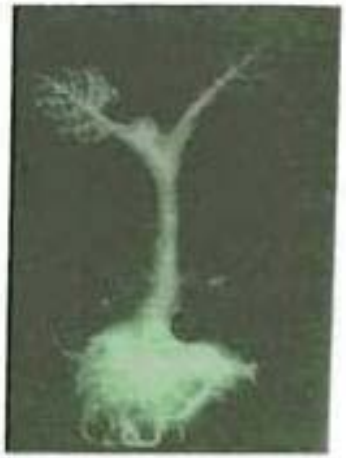
นอกจากนี้ยังได้พยายามดัดแปรพันธุกรรมให้ทนทานความแห้งแล้ง ทนดินเค็ม และทนน้ำท่วมอีกด้วย

นอกจากนี้จากงานวิจัยของ รศ. ดร. พัฒนา (ศรีฟ้า) ฮุนเนอร์ ได้นำยีนที่สร้างสีน้ำเงินของดอกอัญชันถ่ายให้กับกล้วยไม้เพื่อสร้างกล้วยไม้ดอกสีน้ำเงิน

การปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยการผสมพันธุ์ระดับโมเลกุลหรือวิธีโมเลกุลลาร์บรีดดิง (molecular breeding)

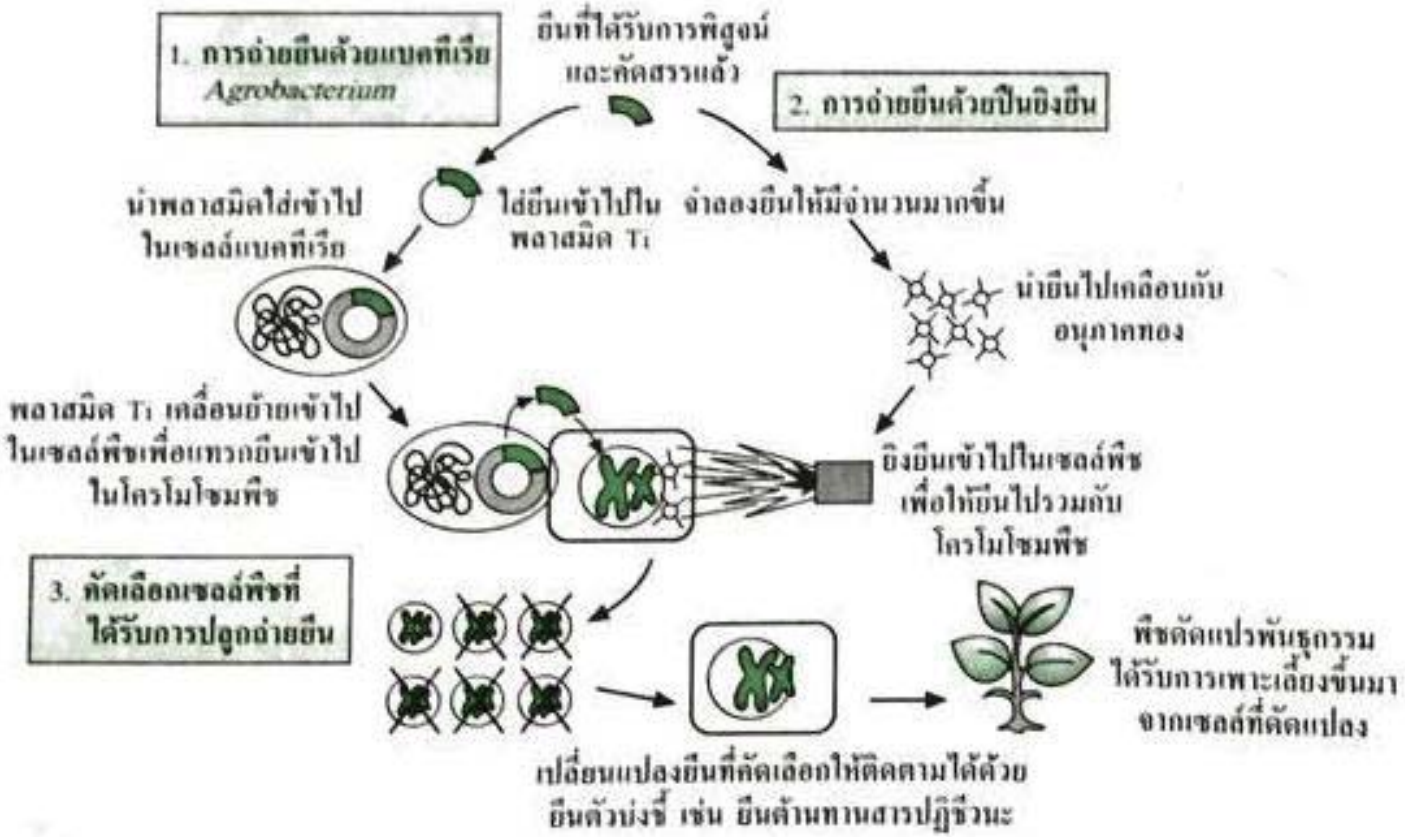
คือ การตรวจหายีนจากเครื่องหมายทางพันธุกรรม แล้วคัดเลือกสารพันธุ์ที่มียีนนั้นอยู่ จากนั้นผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ โดยการตรวจสอบและคัดเลือกเฉพาะรุ่นต่อไปที่มีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ลิงค์เกจยีนที่ต้องการ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์เร็วขึ้น จึงมีโอกาสที่จะได้พืชหรือสัตว์พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะต่าง ๆ ร่วมกันในระยะเวลาที่เร็วกว่าเดิม





การเติบโตของต้นยาสูบกลายพันธุ์ปล่อยไฟ เนื่องจากการได้รับยีนลูซิเฟอเรส (luciferase gene) ที่ถูกถ่ายทอด (transform) เข้าไปในเซลล์พืช

การนำ Ti plasmid ของแบคทีเรีย Agrobacterium tumifaciens โดยแบคทีเรียจะเข้าไปในพืชบริเวณรอยแผลของพืช กระบวนการนี้คล้าย ๆ กับการเกิดคอนจูเกชันของแบคทีเรีย โดยจะมีการถ่าย Ti plasmid และ T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชและก่อเกิด crown gall tumor

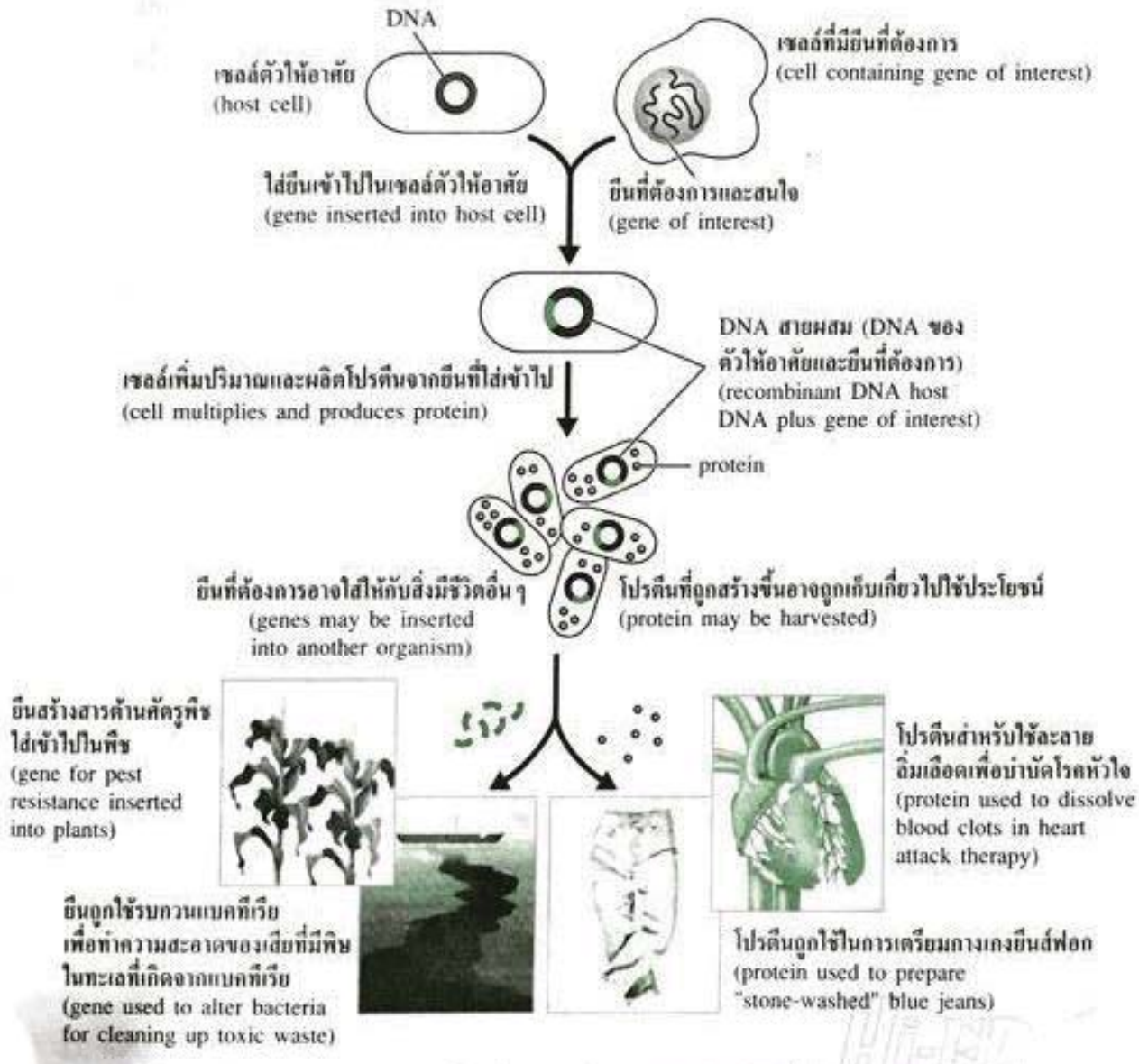


การสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมจากการใช้พลาสมิดและการใช้ปืนยิงยีน

ต้นข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม (genetically modified corn) โดยต้นข้าวโพด GMOs ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนที่ช่วยป้องกันหนอนเจาะฝักข้าวโพด

ข้าวดัดแปรพันธุกรรม (genetically modified rice) ซึ่งเป็นข้าวสีทอง (golden rice) ซึ่งได้รับการถ่ายฝากยีน สร้าง beta-carotene ในปริมาณสูง เพื่อเป็นสาร-ตั้งต้นของวิตามิน A

แกะดัดแปรพันธุกรรม (genetically modified sheep) โดยแกะได้รับการถ่ายฝากยีนสร้างโปรตีนในเลือดของมนุษย์ (human blood protein) ที่มีศักยภาพสูงในการป้องกันโรค cystic fibrosis และโรคทางเดินหายใจเรื้อรัง (chronic respiratory diseases) และโปรตีนเหล่านี้จะถูกรวบรวมจากน้ำนมแกะนำมาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาใช้ในมนุษย์เราต่อไป



recombinant DNA technology *จากพันธุวิศวกรรมในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณประโยชน์ในด้านต่าง ๆ*

5. การใช้พันธุศาสตร์เพื่อศึกษาค้นคว้ายีนและหน้าที่ของยีน

- อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของโปรตีนหรือทำให้โปรตีนทำงานผิดปกติ
- เมื่อศึกษาย้อนกลับไปว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่โปรตีนใดยีนใด จะทำให้ทราบหน้าที่ของยีนนั้นได้ นั่นคือการชักนำทำให้เกิดมิวเทชัน ที่เรียกว่า การสร้างมิวแทนท์ (mutant) ให้มีการเปลี่ยนแปลงของบางฟีโนไทป์ แล้วศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นที่ยีนใด
- ตัวอย่างเช่น รศ. ดร. อภิชาติ วรรณะวิจิตร และคณะ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศึกษาพบว่ายีนควบคุมความหอมของข้าวเหนียวเป็นยีนด้อยอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 8 และสามารถโคลนยีน Os2AP ซึ่งควบคุมลักษณะความหอมของข้าวได้สำเร็จ

  พบว่าโปรตีนที่สร้างยีน Os2AP จะยับยั้งการสร้างสารให้ความหอม ดังนั้นถ้ายับยั้งการแสดงออกของยีน Os2AP จะได้ข้าวที่มีความหอม โดยสารให้ความหอมในข้าวมาจากสารหลักคือ 2-acetyl-1-pyroline ซึ่งมีกลิ่นคล้ายข้าวโพดคั่ว

6. การประยุกต์ใช้เพื่อสิ่งแวดล้อม

- เช่น การสร้ายสายพันธุ์พืชที่ช่วยบำบัดสิ่งแวดล้อม (phytoremediation)
- หรือสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนในดิน น้ำ ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือเหมืองแร่ก่อนปล่อยลงสู่ธรรมชาติ แต่การใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมเหล่านี้ต้องอยู่ภายใต้การควบคุมและสอดคล้องกับกฎหมายการควบคุมการใช้ GMOs ในแต่ละประเทศ