บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมาเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์ให้ได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน เพื่อนำกลีเซอรอลและกรดไขมันเหล่านั้นมาใช้ในขบวนการต่างๆในสิ่งมีชีวิตนั้น ในสภาวะที่เหมาะสมไลเปสจากสิ่งมีชีวิตจะสามารถเร่งปฏิกิริยา 1,3 specific transesterification ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การเพิ่มคุณค่าทางอาหารแก่อาหารไขมัน การกำจัดรอยเปื้อนไขมัน การสังเคราะห์เอสเทอร์และเปปไทด์และย่อยไขมันในสิ่งเหลือทิ้ง[1]

แหล่งผลิตไลเปสที่สำคัญได้แก่ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ไลเปสที่ได้จากแหล่งผลิตที่ต่างกันจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันด้วย โดยทั่วไปจุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่เสถียรต่อความร้อนและขับออกมานอกเซลล์ได้ดีกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ ซึ่งไลเปสที่ผลิตได้นี้มีความสามารถในการทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง การนำไลเปสที่มีคุณสมบัติทนความร้อนและเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้ในงาน จะเกิดผลดีหลายประการคือ ลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ อายุการใช้งานของเอนไซม์นานขึ้นและอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เอนไซม์ทนความร้อนส่วนใหญ่ได้จากการแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ เช่น จากแหล่งน้ำพุร้อนซึ่งในระยะแรกมีขบวนการแยกที่ยุ่งยาก ซับซ้อน และได้ไลเปสปริมาณน้อย แต่ในระยะเวลาต่อมาได้มีการนำเอาความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ในการผลิตไลเปสทนความร้อน เพื่อให้ได้ไลเปสปริมาณมากขึ้น และลดข้อจำกัดต่างๆในการผลิตไลเปสลง[2]

แบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 เป็นแบคทีเรียทนความร้อนที่แยกจากแหล่งน้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ สามารถผลิตไลเปสนอกเซลล์ทนความร้อนได้ 2900 U/dm^3 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิเหมาะสมระหว่าง 60 – 70°C และสามารถย่อยสับสเตรทได้หลายชนิด[3] จึงเหมาะสมแก่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม และประโยชน์ด้านต่างๆ แต่เนื่องจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 ผลิตไลเปสทนความร้อนได้ปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จึงนำความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณไลเปสทนความร้อนจากแบคทีเรียทนความร้อนให้มากขึ้น ดังนั้น ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ร่วมกับ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการศึกษาการโคลนยีนไลเปสจาก

แบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 เพื่อเพิ่มการผลิตไลเปสให้มากขึ้น โดยตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3AI ให้มีขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบส แล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI แล้วจึงทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ *Escherichia coli* DH5α พบว่าแอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (5800 U/dm^3) เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเพิ่มการแสดงออกของยีน (Gene expression) ของไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมใส่เข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้านที่เหมาะสมและหาลักษณะเฉพาะบางประการของไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตได้ ทั้งนี้ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในระดับลึก และนำเอาเอนไซม์ไลเปสที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ให้เหมาะสมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เนื่องจากไลเปสทนความร้อนเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญด้านอุตสาหกรรมและกำลังเป็นที่สนใจกันอย่างกว้างขวาง ทนต่อการถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติในสภาวะอุณหภูมิสูงได้และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วงอุณหภูมิสูง แบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ต่างๆ สามารถผลิตไลเปสทนความร้อนได้แต่มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการในการนำไปใช้ประโยชน์ ในงานวิจัยนี้ได้เล็งเห็นความสำคัญของไลเปสที่ผลิตได้ จึงนำความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ เพื่อวัตถุประสงค์ดังนี้

1 ศึกษาการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนไลเปสจากโคลน *Bacillus stearothermophilus* TP811 โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ซึ่งเป็น expression vector ใส่เข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4] เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ทนความร้อนให้มากขึ้น

2 ศึกษาสมบัติเฉพาะบางประการของไลเปสที่ส่งออกนอกเซลล์ที่ผลิตได้จากโคลนยีนไลเปสดังกล่าว

3 ศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์โดยการเติมสารที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และเพิ่มแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

1.3 ไลเปส

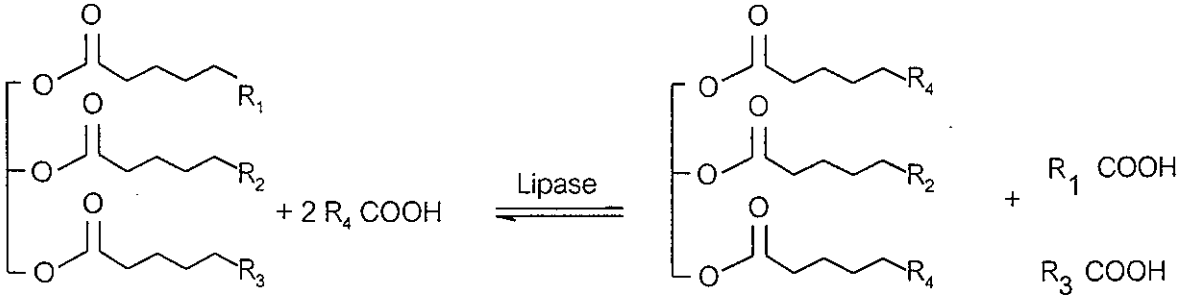
ไลเปส (triacylglycerol acylhydrolase, E.C. 3.1.1.3) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำ ทำให้ได้กรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) และสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) จากกรดไขมันและกลีเซอรอลซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับหรือแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ (transesterification และ interesterification) ดังนั้นจึงนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์และปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและไขมันชนิดต่างๆ[1] ข้อดีของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยไลเปสที่เหนือกว่ากรรมวิธีทางเคมี คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาจะมีองค์ประกอบและคุณสมบัติใกล้เคียงกับความต้องการ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท (substrate specificity) และความจำเพาะต่อตำแหน่งที่เร่งปฏิกิริยา (position specificity) ของไลเปสที่เลือกมาใช้งาน เป็นต้น[4] โดยทั่วไปไลเปสจะมีความจำเพาะอยู่หลายชนิด ดังนี้

1.3.1 ความจำเพาะของไลเปส (Specificity of Lipases)

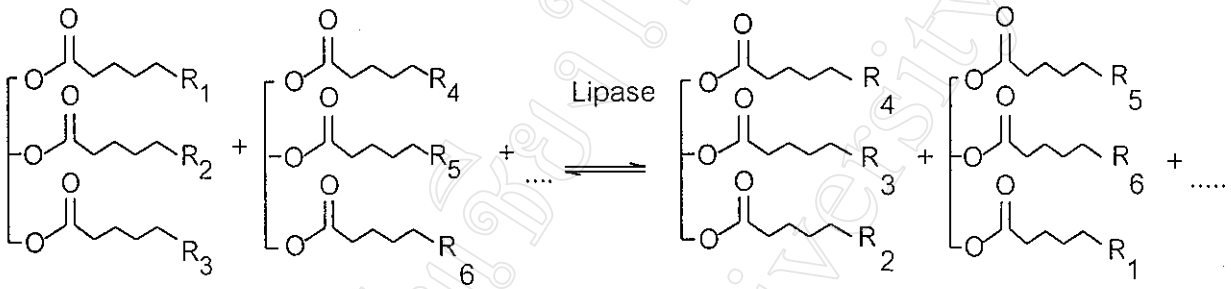
ไลเปสมีความจำเพาะอยู่หลายแบบ สามารถแบ่งเป็น 3 แบบง่ายๆ ได้แก่

ก. ความจำเพาะต่อกรดไขมัน ไลเปสเกือบทุกชนิดมักมีความจำเพาะต่อกรดไขมันชนิดต่างๆ เช่น ไลเปสจากรา *Geotrichum candidum* จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเฉพาะที่มีพันธะคู่แบบ cis ในตำแหน่งที่ 9 และพันธะแบบ cis ในตำแหน่งที่ 9 และ 12 ของกรดไขมันที่มีคาร์บอน (C) 18 ตัว (18:1 Δ^9 และ 18:2 Δ^9, Δ^{12}) เท่านั้น[5]

ข. ความจำเพาะต่อตำแหน่ง (regio- or position specific) ไลเปสทั่วไปมักมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง ซึ่งมักจะเป็นความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1,3 – position specific) ซึ่งเป็นไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือเอสเทอริฟิเคชัน ได้ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ซึ่งเป็นตำแหน่งด้านนอกของไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นไปตามกฎของการบดบัง (steric effect) เช่น ไลเปสจากแบคทีเรีย *Aeromonas sobria* LP004[6] ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens*[7] เป็นต้น



ค. ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (non – position specific) หมายถึง ไลเปสที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือเอสเทอริฟิเคชัน อย่างไม่เจาะจงอาจเป็นตำแหน่งที่ 1, 2 หรือ 3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอลก็ได้ เช่น ไลเปสจาก *Candida rugasa* (ดั้งเดิมชื่อ *Candida cylindracea)*[8]



1.3.2 **แหล่งไลเปส**

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ทั่วไป ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดใช้ไขมันเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญต่อการดำรงชีพ[1]

1.3.2.1 **ไลเปสจากสัตว์** มักพบในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ ไลเปสที่พบในทางเดินอาหาร ไลเปสจากเนื้อเยื่อ (tissue lipases) ไลโปโปรตีนไลเปส (lipoprotein lipase) และไลเปสในนม (milk lipases)[2,9]

- ไลเปสที่พบในทางเดินอาหาร ได้แก่ ไลเปสที่สร้างจากตับอ่อน (pancreatic lipase) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอาหารประเภทไตรเอซิลกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังพบไลเปสจากกระเพาะอาหารและลำไส้ (gastric and intestinal lipases)
- ไลเปสจากเนื้อเยื่อที่พบมากได้แก่ ไลเปสจาก adipose tissue นอกจากนี้ยังพบไลเปสจาก fibroblasts จากตับและซีรัม
- ไลเปสที่พบในไลโปโปรตีนมีหน้าที่สลายสารอาหารประเภทไตรเอซิลกลีเซอรอลที่อยู่ในไลโปโปรตีนซึ่งไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด
- ไลเปสในนม น้ำนมวัวและสิ่งมีชีวิตที่เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีไลเปสอยู่ด้วย โดยมักมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนในน้ำนมดิบได้

1.3.2.2 **ไลเปสจากพืช** เมล็ดพืชเป็นแหล่งใหญ่ของไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในระหว่างที่พืชใหม่กำลังงอกจากการย่อยสลายโดยไลเปส ไลเปสที่พบและมีการศึกษากัน

มากได้แก่ ไลเปสจากเม็ดละหุ่ง (castor bean lipases) นอกจากนี้ยังพบในข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด และในผลปาล์ม

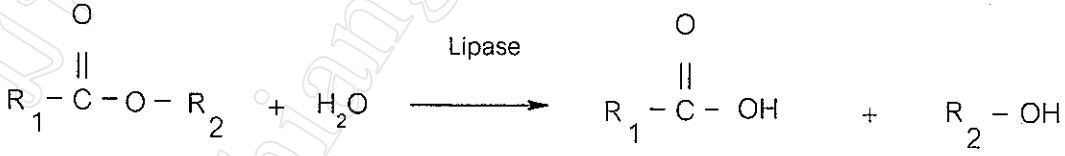
1.3.2.3 **ไลเปสจากจุลินทรีย์** ความสนใจไลเปสในจุลินทรีย์มีผลเนื่องมาจากเกิดความเสียหายในอาหารขึ้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารที่เกี่ยวกับนม กรดไขมันสั้นๆ ถูกปล่อยออกมาทำให้มีผลต่อกลิ่นและรสชาด ในขณะที่กรดไขมันสายยาวไม่มีผลเปลี่ยนแปลง แต่ในทางตรงข้ามกันกรดไขมันในผลิตภัณฑ์นมบางประเภทโดยเฉพาะพวกเนยแข็ง (cheese) กลับมีกลิ่นและรสชาดดีขึ้น เช่น ในการเตรียม Roquefort cheese ได้มีการเติมสปอร์ของ *Penicilium roquefort* ลงไป ไลเปสจากราที่เจริญจะมีผลทำให้กลิ่นและรสชาดของเนยดีขึ้น ในอาหารหลายประเภทได้มีการใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์ร่วมด้วย ทำให้ได้กลิ่น รสชาด และเนื้อสัมผัสของอาหารเป็นไปตามต้องการ[10]

1.3.3 **ชนิดของปฏิกิริยาที่เร่งโดยไลเปส**[1,2]

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทด้วยน้ำอย่างไรก็ตามไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับในตัวทำละลายอินทรีย์ได้

1.3.3.1 **ปฏิกิริยาในสารละลายน้ำ**

ธรรมชาติการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสในสารละลายน้ำ คือ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำได้ดังนี้

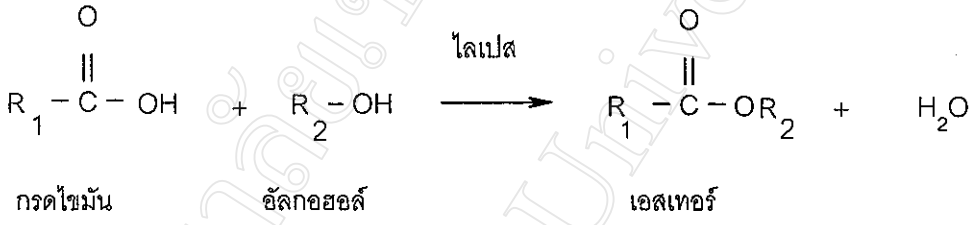


เนื่องจากสับสเตรทของไลเปส คือ ไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันที่เป็นสายยาว ซึ่งไม่ละลายในน้ำแต่จะอยู่ในรูปของไมเซลล์ (micelles) ไลเปสจึงเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ที่ผิวระหว่างสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำกับสารละลายซึ่งมีเอนไซม์ละลายอยู่ ได้ผลผลิตที่เป็นกรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล ตัวอย่างเช่น ไลเปสจาก *Candida cylindracea* สามารถสลายพันธะเอสเทอร์ของไขมันสังเคราะห์รวมทั้ง p – nitrophenyl esters และพวกเอสเทอร์ของขี้ผึ้งด้วย[8]

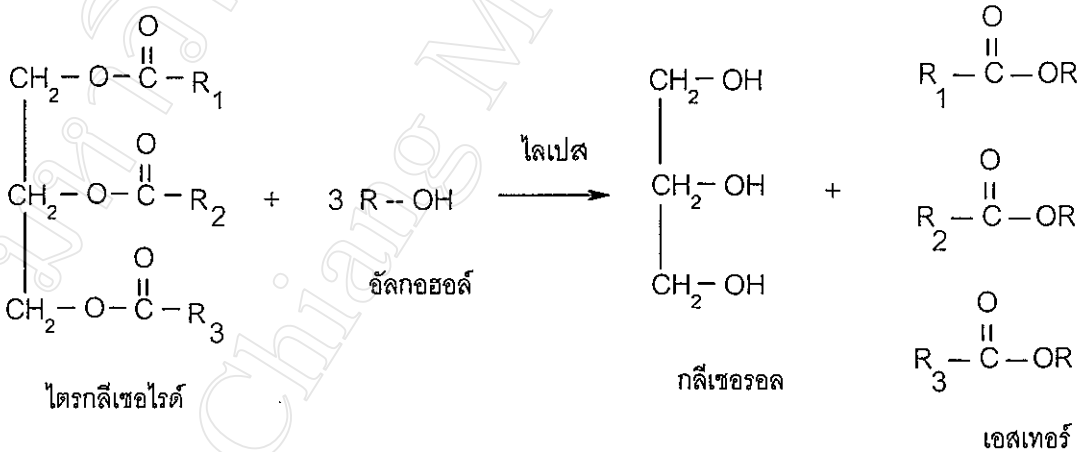
1.3.3.2 **ปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์**

ปฏิกิริยาของไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส กล่าวคือ ไลเปสเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ จะเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ (Esterification) หรือสร้างและทำลายพันธะเอสเทอร์พร้อมกัน ซึ่งได้แก่ ปฏิกิริยา Interesterification ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาอัลกอฮอไลซิส (alcoholysis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยอัลกอฮอล์ ดังสมการในรูป 1.1

ก. เอสเทอริฟิเคชัน



ข. อัลกอฮอไลซีส

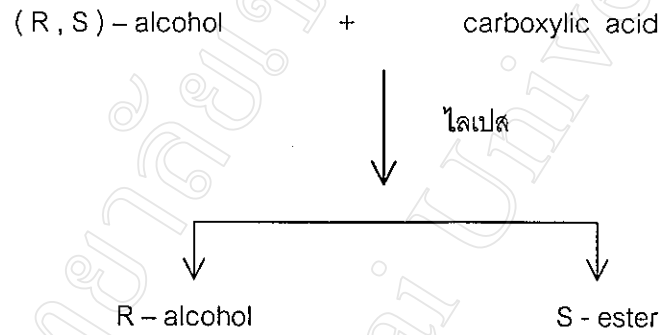


รูป 1.1 ปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยไลเปส (ก) เอสเทอริฟิเคชัน และ (ข) อัลกอฮอไลซิส

1.3.3.3 ปฏิกิริยาอื่นๆ

ไลเปสสามารถแยกสารที่เป็น optical isomer กันได้ โดยจะเกิดปฏิกิริยากับ isomer form เพียงตัวเดียวในสารผสม ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาระหว่าง Racemic mixture ของอัลกอฮอล์กับกรดคาร์บอกซิลิค ดังปฏิกิริยาในรูป 1.2

จากปฏิกิริยาดังที่กล่าวมานี้ ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เอสเทอริฟิเคชัน หรือการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ หรือปฏิกิริยาอื่นๆ ได้ โดยจะเกิดปฏิกิริยาใดๆ เด่นกว่ากันนั้นจะอยู่กับสภาวะของการทดลองที่เลือกใช้



รูป 1.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดคาร์บอกซิลิคกับ Racemic alcohol ซึ่งเร่งด้วยไลเปส

1.3.4 **การหาแอคติวิตีของไลเปส** [10,11]

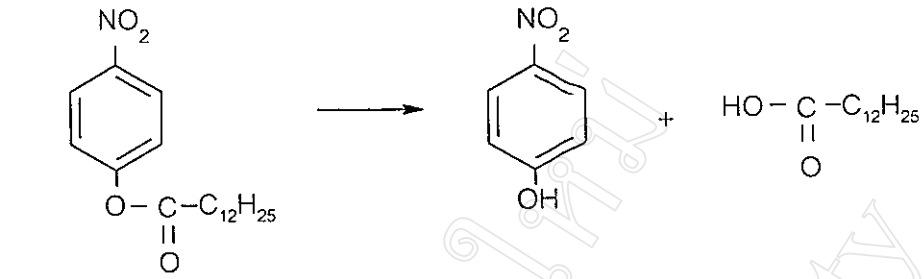
ในการศึกษาแอคติวิตีของไลเปสนั้น สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด อย่างไรก็ตามวิธีที่นิยมใช้กันนั้นจะใช้ไตรกลีเซอไรด์ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำและเกิดเป็นอิมัลชัน การใช้เอสเทอร์ที่ละลายน้ำได้ไม่นิยมเพราะว่าค่าที่ได้ไม่ได้มาจากการทำงานของไลเปสเพียงชนิดเดียว แต่อาจมาจากการทำงานของเอสเทอเรส (esterase) อื่นๆ ด้วย ไตรกลีเซอไรด์ที่ใช้เป็นสับสเตรทควรจะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิที่ศึกษา เพราะว่าการไฮโดรไลส์ไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นของแข็งจะเกิดได้ช้ามาก สับสเตรทที่ดีที่สุดอาจเป็นไตรโอลีอิน (triolein) ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่บริสุทธิ์และมีราคาแพง ดังนั้นเพื่อความสะดวกอาจใช้น้ำมันมะกอกซึ่งมีราคาถูกกว่า และมีกรดโอลีอิคอยู่มากกว่า 70% แทน ในการทำให้ไตรโอลีอินหรือน้ำมันมะกอกอยู่ในรูปอิมัลชันที่ถาวรสามารถเตรียมได้โดยการเขย่าอย่างแรง หรือการใช้อัลทราโซนิค (Ultrasonic) ช่วยผสมน้ำมันกับสารละลายของอิมัลชันสเตบิไลเซอร์ (emulsion stabilizer) เช่น gum arabic, polyvinyl alcohol หรือ

carboxymethyl cellulose เป็นต้น การเติมแคลเซียมลงไปเพื่อตกตะกอนกรดไขมันที่ถูกสลายออกมาจากไตรกลีเซอไรด์ เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดเกลือโซเดียมที่ละลายน้ำได้ ซึ่งไปยับยั้งการเกิดไลโปไลซิส (Lipolysis)

ประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสตรวจสอบได้โดยการวัดปริมาณกรดไขมันที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยทั่วไปการทำปฏิกิริยาจะยุติด้วยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อัลกอฮอล์ หรืออะซีโตนลงไป กรดไขมันที่ปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาจะถูกไทเทรท โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนหรือไทมอลบูลเป็นอินดิเคเตอร์ หรือใช้ pH – stat ที่ตั้งจุดยุติไว้ที่ 9.0 หรืออีกวิธีจะใช้การไทเทรทด้วย pH – stat ซึ่งต่อเข้ากับ automatic burette และ recorder วิธีนี้จะให้ค่าที่ดีกว่าเพราะสามารถวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาตอนเริ่มต้นได้

ในการหาแอคติวิตีของไลเปสส่วนมากจะใช้ไตรบิวทีรินเป็นสับสเตรท เนื่องจากใช้ได้สะดวกกว่าน้ำมันมะกอกและไตรโอลีอิน เพราะว่าอิมัลชันสามารถเกิดได้โดยไม่ต้องเติมอิมัลชันสเตบิไลเซอร์ นอกจากนี้กรดบิวทีริคที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้อย่างสมบูรณ์ที่พีเอชต่ำกว่ากรดไขมันที่โมเลกุลเป็นสายยาว ทำให้ใช้เทคนิคการไตเตรทแบบต่อเนื่องได้ในช่วงพีเอชที่กว้างกว่า และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการไฮโดรไลส์ไตรบิวทีรินสามารถละลายน้ำได้ และไม่ไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาด้วยการไปรวมกันอยู่ที่ชั้นรอยต่อของน้ำมันและน้ำดังเช่นกรดไขมันที่มีสายยาว อย่างไรก็ตามไตรบิวทีรินเป็นสับสเตรทที่ไม่ดีในการศึกษาแอคติวิตีของไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิด เพราะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ช้าและเอสเทอเรสบางชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของไตรบิวทีรินได้

การหาแอคติวิตีของไลเปสอีกวิธีหนึ่งคือ วิธี Colorimetry เป็นการหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร (A_{715}) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างกรดโอลีอิคและ copper reagent แล้วนำค่าที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดโอลีอิคเพื่อหาปริมาณของกรดโอลิคที่เกิดขึ้น นอกจากนี้การหาแอคติวิตีของไลเปสยังสามารถใช้สับสเตรตสังเคราะห์ประเภท p – nitrophenyl ester ซึ่งวิธีนี้จะติดตามปริมาณของ p – nitrophenol ซึ่งเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ p–nitrophenyl ester ให้ได้ p – nitrophenol ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) โดยกำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สลาย p – nitrophenyl ester 1 จำนวนนาโนโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



p-nitrophenyl laurate (p-NPL) p-nitrophenol (yellow) lauric acid

รูป 1.3 ปฏิกิริยาการสลาย p – nitrophenyl laurate (p – NPL) โดยไลเปส

วิธีการที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าในการตรวจสอบแอคติวิตีของไลเปส คือ การใช้ Fluorometric และ Radiochemical assay

1.3.5 **การหาปริมาณโปรตีน**

โดยทั่วไปการหาปริมาณโปรตีนใช้หลักการของการเกิดสีจากปฏิกิริยาของสารเคมีกับกรดอะมิโนบางกลุ่มในโปรตีน แล้วจึงวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งได้แก่ วิธีไบยูเรท วิธีลาวรี่ (Lowry) วิธีกรดไบซินโคนินิค (Bicinchoninic acid) และวิธีแบรดฟอร์ด(Bradford)[12] ซึ่งใช้ Coomassie Brilliant Blue G – 250 ใน Bradford's reagent และจะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วเพราะว่าใช้เพียงขั้นตอนเดียว และเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจสอบปริมาณโปรตีนในช่วง 0.2 – 1.4 มก./ซม.^{3} ได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ถูกรบกวนได้โดยสาร Detergents ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.1% และสารบัฟเฟอร์ที่มีฤทธิ์เป็นด่างมากๆ

สิ่งสำคัญที่สุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ กราฟมาตรฐาน ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนดังกล่าวข้างต้น จึงต้องนำโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนมาทำการตรวจสอบไปพร้อมๆ กับสารตัวอย่างด้วย โปรตีนมาตรฐานที่นิยมใช้ คือ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมและขึ้นอยู่กับความไวของการตรวจสอบในแต่ละวิธี

1.3.6 **การประยุกต์ใช้ไลเปส** [10,13]

ในอดีตไลเปสถูกใช้เป็นส่วนผสมของยาเพื่อช่วยย่อยอาหาร แต่ในปัจจุบันได้มีการนำไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสบู่, การผลิตเนยแข็ง, อุตสาหกรรมกระดาษ, การปรับปรุงกลิ่นรสในนม และในผลิตภัณฑ์ซักล้างและทำความสะอาด

1.3.6.1 **ไฮโดรไลซิสของน้ำมันและไขมัน**

การใช้ไลเปสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันและไขมัน เพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอล ได้มีมานานแล้ว ในอดีตมีการใช้ไลเปสจากเมล็ดของละหุ่ง (*Ricinus communis*) เพื่อผลิตกรดไขมันบริสุทธิ์จากน้ำมันจากพืช เมื่อไม่นานมานี้บริษัท Miyoshi Yushi แห่งเมือง Nayoya ประเทศญี่ปุ่น ได้ใช้ไลเปสจาก *Candida rugosa* ไฮโดรไลส์น้ำมันและไขมันเพื่อใช้สำหรับผลิตสบู่เพื่อให้ได้กลิ่นและสีที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถให้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอลถึง 20% อีกด้วย ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันที่ไม่เสถียร เช่น น้ำมันปลา ด้วยไลเปสจากจุลินทรีย์ทำให้ได้กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้มาก และไลเปสจากจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ตัวอย่างเช่น *Penicillium roquefort* สามารถนำไปใช้ผลิตโมโนกลีเซอไรด์ จากไตรกลีเซอไรด์เพื่อแข่งขันกับกระบวนการกลีเซอโรไลซิส (Glycerolysis) ทางเคมีที่ใช้ผลิตโมโนกลีเซอไรด์ในปัจจุบัน

1.3.6.2 **การเกิดอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมัน**

ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน ที่ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันและไขมันเพื่อใช้ปรับปรุงโครงสร้าง องค์ประกอบ และสมบัติทางกายภาพของไตรกลีเซอไรด์ ในกระบวนการนี้ทางเคมีจะใช้โลหะโซเดียมหรือโซเดียมเมทธอกไซด์ (sodium methoxide) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิล (acyl) ระหว่างโมเลกุลของกลีเซอไรด์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะประกอบด้วยส่วนผสมของกลีเซอไรด์และหมู่ fatty acyl กระจายอยู่อย่างอิสระทั่วไปในโมเลกุล ถ้านำไลเปสชนิดที่ไม่จำเพาะต่อตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกผลิตขึ้นจะคล้ายกับที่ผลิตได้จากกระบวนการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันโดยปฏิกิริยาของตัวเร่งทางเคมีแต่ถ้าใช้ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่กลุ่ม acyl ของกรดไขมันตำแหน่งที่ 1 และ 3 เท่านั้น ซึ่งจะช่วยให้ได้กรดไขมันจากส่วนประกอบในไตรกลีเซอไรด์เดิมและสามารถนำไปใช้ตามต้องการได้

ความสามารถในการผลิตองค์ประกอบของกรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์ และส่วนผสมของไตรกลีเซอไรด์ได้รับความสนใจจากโรงงานผลิตน้ำมันและไขมัน เช่น ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของ 1,3 – dipalmitoyl – 2 – oleoyl glycerol (POP) ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์หลักในน้ำมันปาล์ม เมื่อใช้ทั้งกรดสเตียริค (stearic acid) และสเตียริน (tristearin) ในปฏิกิริยา จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1(3) – palmitoyl – 3(1) – stearoyl – 2 – oleoyl glycerol (POSt) และ 1,3 – distearoyl – 2 – oleoyl glycerol (StOSt) เนื่องจาก POSt และ StOSt เป็นองค์ประกอบหลักของเนยโกโก้ จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทดแทนเนยโกโก้ในธรรมชาติซึ่งมีราคาแพง ไลเปสที่ใช้ในการผลิตองค์ประกอบของเนยโกโก้ ตัวอย่างเช่น *Rhizomueor miehei*

1.3.6.3 การปรับปรุงกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์นม

ในอดีตได้มีการใช้ไลเปสจากกระเพาะอาหารของวัวและแกะ เช่น pregastric esterase ในการเพิ่มกลิ่นรสในเนยแข็งและใช้ผลิตเนยเหลว ในปัจจุบันได้มีการนำเอาไลเปสจากจุลินทรีย์ เช่น *Mucor michei* และ *Aspergillus sp.* มาทดแทนไลเปสจากสัตว์ เพื่อปรับปรุงกลิ่นในอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์จากนม

ตาราง 1.1 ไลเปสที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งและเนยเหลว[10]

Cheese type	Lipase
romano, domiati, feta	Pregastric lipase from lamb or goat, *Mucor miehei*
mozarella, permesan, provolone	Pregastric lipase from lamb or goat
fontina, ras, romi	*Mucor miehei*
chedder, manchego, blue	*Aspergillus oryzae, Aspergillus niger*

1.3.6.4 ผลิตภัณฑ์ซักล้างและทำความสะอาด

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ผงซักฟอกหลายชนิด มีการเติมไลเปสลงในผลิตภัณฑ์ เช่น การใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์เป็นสารเพื่อกำจัดไขมันตกค้างโดยผสมลงไปกับน้ำยาล้างจาน และเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง และใช้ไลเปสในการบำบัดน้ำทิ้ง

ตาราง 1.2 ไลเปสที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ซักล้างและทำความสะอาด[10]

Brand Name	company	Origin of lipase	pH optimum	T optimum
Lipolase	Novo-Nordisk	*Humicola lanuginosa*, cloned and expressed in *Aspergillus oryzae*	10.0	40°C
Lipomax	Gist-Brocades	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*, recloned and expressed in the same orgamism	11.0	45°C
Lumafast	Genencor[a]	*Pseudomonas mendocina*, cloned and expressed in *Bacillus spec.*	10.5	40°C

[a] The enzyme business of Gist – Brocades was acquired in 1995 by Genencor International B.V. (Delft, The Netherlands)

การประยุกต์ไลเปสในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ตัวอย่างเช่น ในประเทศญี่ปุ่นได้นำไลเปสในการไฮโดรไลซิสไตรกลีเซอไรด์ในไม้ดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น

1.4 การศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนและการแสดงออกของยีนไลเปสจากจุลินทรีย์ (งานที่มีผู้ศึกษามาแล้ว)

การนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการผลิตไลเปสนั้นมีการศึกษาอย่างแพร่หลายดังรายงานการศึกษาของ Iizumi T. และคณะ[14] ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas sp.* KWI – 56 ยีนไลเปสขนาด 2.9 กิโลเบสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II และ *Eco* RI ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM 103 โดยใช้ pUC 19 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบว่ายีนไลเปสประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกคือ lip gene มีขนาด 1092 นิวคลีโอไทด์ และส่วนที่สองคือ act gene มีขนาด 1032 นิวคลีโอไทด์ โดยที่ act gene จะอยู่ต่อจากส่วนของ lip gene นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเป็น 200 เท่าใน *E. coli* ที่มีทั้ง lip gene และ act gene เมื่อเทียบกับ *E. coli* ที่มี lip gene เพียงอย่างเดียว ดังนั้นส่วนของ act gene จึงมีความสำคัญในการแสดงออกของยีนไลเปสเป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นส่วนของ precursor ที่ช่วยในการพับตัวของไลเปส หรือเป็นตัวกระตุ้นทำให้เพิ่มระดับการทรานสเลชัน (translation)

ในปี 1991 Chung G.H. และคณะ[7] ได้นำแบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* SIK WI มาศึกษาเพื่อเพิ่มจำนวนยีนไลเปสในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM83 โดยใช้ pUC 19 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ดีเอ็นเอขนาด 4 – 20 กิโลเบสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3AI ได้ถูกเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะที่ถูกตัดด้วย *Bam* HI พบแอคติ-วิตีของเอสเทอร์เรส จำนวน 20 โคโลนี เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติม tributyrin 1% (v/v) และพบเพียง 1 โคโลนี ที่มีแอคติวิตีของไลเปสบนอาหารวุ้น LB ที่เติมน้ำมันมะกอก 1% (v/v) และ Rhodamine – B 0.001% (w/v) ไลเปสทนความร้อนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 446 ตัว มีลำดับของกรดอะมิโน Gly – X – Ser – X – Gly เป็นหน่วยซ้ำๆ กัน

จากรายงานการศึกษาของ Schmidt D.C. และคณะ[15] ได้ทำการแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสนอกเซลล์ทนความร้อนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus thermocatenulatus* จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่ามี 5 สายพันธุ์มีแอคติวิตีของไลเปสและพบว่าสายพันธุ์ *Bacillus thermocatenulatus* DSM 370 มีแอคติวิตีของไลเปสทนความร้อนสูงที่สุด จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (apolar amino acid) จำนวน 53% ที่ปลาย N และการทดสอบคุณสมบัติบางประการพบว่ามี

พีเอชและอุณหภูมิที่ไลเปสทำงานได้สูงสุด คือ 7.5 – 8.0 และ 60 – 70 °C ตามลำดับ โดยใช้ p – nitrophenyl caproate และน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท

ต่อมา Schmidt D.C. และคณะ[16] ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสทนความร้อนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus thermocatenulatus* I ซึ่งจัดอยู่ในไลเปสชนิด Thermoalkalophilic Lipase ในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5α โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pUC 18 ร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3A พบว่าไลเปสทนความร้อนที่ผลิตได้จากการเพิ่มจำนวนยีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 388 ตัว ลำดับของกรดอะมิโนเป็น Gly – X – Ser – X – Gly ที่มีหน่วยซ้ำๆ กัน น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน และมีแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 8.0 – 9.0 และที่อุณหภูมิ 60 – 70°C เมื่อใช้ tributyrin และน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท นอกจากนี้ไลเปสยังแสดงคุณสมบัติทนต่อการทำให้เสียสภาพธรรมชาติที่พีเอชระหว่าง 9.0 – 10.0 ต่อมา Rua M.L. และคณะ[17] ได้พัฒนาการเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสทนความร้อนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus thermocatenulatus* 2 ในแบบอุตสาหกรรม ในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* BL 321 โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pCYTEXP 1 ซึ่งมี γpL promoter ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมความคงทนต่ออุณหภูมิ จากการทดลองพบว่าปริมาณของไลเปสที่ผลิตได้แบบอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นจากเดิม 5 เท่าเมื่อเลี้ยงจนปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 54000 U/g wet cells นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติวิตีของไลเปสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม 1% (w/v) sodium cholate ลงไป

ในปี ค.ศ. 1998 Kim, H.K. และคณะ[18] ได้ทำการศึกษาเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสในแบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ *Bacillus stearothermophilus* L2 โดยใช้เอนไซม์ตัดยีน *Hind* III ตัด จีโนมิคดีเอ็นเอให้มีขนาด 2 – 6 กิโลเบส แล้วเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* RRI พบว่ายีนของไลเปสมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1254 คู่เบส และประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว น้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ signal sequence มีจำนวนกรดอะมิโน 29 ตัว และ mature lipase มีจำนวนกรดอะมิโน 388 ตัว นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนเป็น Gly – X – Ser – X – Gly ซ้ำๆ กัน ไลเปสที่ได้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 9 – 10 และ 60 – 65 °C ตามลำดับ และยังสามารถย่อย Triproionin และสับสเตรทสังเคราะห์ p–nitrophenyl caprylate ได้ดีที่สุด และย่อยน้ำมันปาล์ม (parm oil) และน้ำมันสัตว์ (beef tallow) ได้ดีกว่าน้ำมันมะกอกที่อุณหภูมิ 50°C

นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสทนความร้อนที่ได้จากแบคทีเรียทนความร้อนชนิดอื่นๆ เช่น การศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสทนความร้อนจาก

แบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ *Bacillus thermoleovoran* ID-1 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* โดยใช้ pET-22b เป็นดีเอ็นพาหะ[19] จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobactor calcoaceticus* RAG-1[2] เช่นเดียวกับการทดลองของ วรชาติ สิรวราภรณ์ มหาวิทยาลัยมหิดล (personal communication) ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสทนความร้อนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus stearothermophilus* TP811 ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH 5α โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 จากการทดลองพบว่าไลเปสทนความร้อนที่ได้มีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 6.7 – 8.0 และ 50 – 80 °C ตามลำดับ และให้แอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 7.2 อุณหภูมิ 65 °C ไลเปสค่อนข้างเสถียรในช่วงพีเอช 4.0 – 10.0 ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าโคลน pUC-TP811 สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าปริมาณไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ธรรมชาติประมาณ 2 เท่า[3] อย่างไรก็ตามไลเปสนอกเซลล์ที่ผลิตได้ยังถือว่ามีปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่จะแยกบริสุทธิ์ และเพื่อศึกษาคุณสมบัติไลเปสได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนของไลเปสในแบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ *Bacillus stearothermophilus* TP811 ในดีเอ็นพาหะที่เหมาะสมกว่า และการศึกษาการแสดงออกของยีนไลเปสในแบคทีเรียเจ้าบ้านเพื่อให้แบคทีเรียเจ้าบ้านผลิตไลเปสปริมาณมากขึ้น

1.5 เวคเตอร์ชนิดต่างๆ สำหรับการโคลนยีน[21-23]

หลักการโคลนยีน คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (DNA insert) ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำมาศึกษาหรือวิเคราะห์ต่อไป แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนนั้นมักจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวในเซลล์เจ้าบ้านโดยตรงได้ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์เจ้าบ้าน คือ ดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ (vector) นั่นเอง โมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะจะประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัว (origin of replication) ซึ่งทำงานได้ในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นดีเอ็นเอพาหะจะเป็นดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์เจ้าบ้านนั้น ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้กับแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนโดยทั่วไป มี 3 ประเภท คือ พลาสมิด (plasmid), ฝาจ (bacteriophage), คอสมิด (cosmid)

1.5.1 พลาสมิด (plasmid)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีการพันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoiled) มีขนาดตั้งแต่ 1 พันคู่เบสจนถึง

มากกว่า 200,000 คู่เบส หรือประมาณ 0.2 – 4% ของโครโมโซม พลาสมิดมักจะมียีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียในบางสภาวะ ทำให้แบคทีเรียเจ้าของพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น ทำให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ผลิตยาปฏิชีวนะได้ ย่อยทำลายโมเลกุลบางชนิด ผลิตสารโคลิซิน (colicin) ซึ่งจะฆ่าแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตสารนี้เป็นต้น อย่างไรก็ดีพลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์ของแบคทีเรีย ยกเว้นในบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจจะพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียหนึ่งๆ

ก. ประเภทของพลาสมิด

พลาสมิดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

ก.1 พลาสมิดซึ่งถ่ายทอดระหว่างเซลล์ (conjugative plasmid) คือ พลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดพลาสมิดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่มีพลาสมิดนั้น จะเกิดขึ้นโดยกระบวนการที่คล้ายกับการ conjugation นั่นเอง เนื่องจากในพลาสมิดประเภทนี้มียีนที่ควบคุมการส่งถ่ายชิ้นพลาสมิด คือ ยีน tra (transfer) อยู่พลาสมิดประเภทนี้มักมีขนาดใหญ่และมีปริมาณจำกัด ระหว่าง 1 - 2 โมเลกุลต่อเซลล์

ก.2 พลาสมิดซึ่งไม่ถ่ายทอดระหว่างเซลล์ (non conjugative plasmid) คือ พลาสมิดที่ไม่ถ่ายทอดพลาสมิดจากเซลล์เดิมไปสู่เซลล์ใหม่ได้ ซึ่งเนื่องจากไม่มียีน tra อยู่ในส่วนหนึ่งส่วนใด พลาสมิดประเภทนี้มักเป็นพลาสมิดขนาดเล็กและมีปริมาณหลายโมเลกุลในเซลล์แต่ละเซลล์ พลาสมิดประเภทนี้จะส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ที่ต้องการได้ในห้องปฏิบัติการ โดยแยกพลาสมิดนี้ออกจากเซลล์เดิมก่อนแล้วส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่ โดยทำให้เซลล์เจ้าบ้านเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cell) และสามารถรับเอาดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปได้โดยกระบวนการ transformation นอกจากนี้พลาสมิดประเภทนี้ยังสามารถส่งถ่ายข้ามเซลล์ได้ถ้าอยู่ในเซลล์เดียวกันกับพลาสมิดที่เป็นแบบ conjugative โดยอาศัยคุณสมบัติของพลาสมิดแบบ conjugative ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายพลาสมิดดังกล่าวไปสู่อีกเซลล์หนึ่งได้

พลาสมิดมีคุณสมบัติเป็นหน่วยที่จำลองตัวได้ แต่พลาสมิดแต่ละชนิดมีวิธีการจำลองตัวที่แตกต่างกัน เช่น เอฟ-แฟคเตอร์ (F – factor) ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดหนึ่งมีวิธีการจำลองตัวและแยกตัวภายใต้การควบคุมแบบเดียวกับโครโมโซมของแบคทีเรีย จึงมีจำนวนเพียง 1 หรือ 2 โมเลกุลเท่านั้นใน 1 เซลล์ เรียกว่า stringent plasmid การจำลองตัวของพลาสมิดอีกแบบหนึ่งมีการควบคุมที่แตกต่างออกไป ไม่ขึ้นกับการจำลองตัวของโครโมโซม ทำให้มีจำนวนหลายโมเลกุลในหนึ่งเซลล์ เรียกว่า relaxed plasmid บางชนิดมีมากถึง 100 โมเลกุลต่อเซลล์ และสามารถเพิ่มปริมาณได้มากถึงพันโมเลกุลต่อเซลล์ โดยทำให้การสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์หยุดชะงักลง โดย

ใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล เมื่อไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนโครโมโซมและพลาสมิดแบบ stringent จะไม่สามารถจำลองตัวได้ แต่พลาสมิดที่เป็นแบบ relaxed จะจำลองตัวได้ตลอดเวลา ทำให้ปริมาณเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว conjugative plasmid มักมีขนาดใหญ่ มีจำนวนน้อยเพียง 1 – 2 โมเลกุลในเซลล์ คือเป็น stringent plasmid ส่วน relaxed plasmid มักจะมีขนาดโมเลกุลเล็ก และเป็นแบบ non conjugative

ข. การใช้พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอพาหะ

พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนนิยมใช้ที่มีขนาดเล็กและมีการจำลองตัวแบบ relaxed นอกจากนี้ต้องมียีนเครื่องหมาย (marker gene) ที่กำหนดลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้ และมีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียง 1 ตำแหน่ง (unique site) สาเหตุที่ต้องเลือกใช้พลาสมิดที่มีขนาดเล็กเพราะพลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะทนต่อการขาดในระหว่างขั้นตอนต่างๆ แยกออกจากเซลล์ที่เป็นเจ้าของได้ง่าย และเมื่อนำไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนแล้ว ขนาดต้องไม่ใหญ่มากนัก ถ้าขนาดใหญ่มากเวลานำไปถ่ายลงในเซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี transformation จะเกิดได้ยาก

การใส่ชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปในพลาสมิด มักจะใส่เข้าไปตรงตำแหน่งภายในยีนใดยีนหนึ่งของพลาสมิดเมื่อมีการใส่ชิ้นดีเอ็นเอลงไป กิจกรรมของยีนดังกล่าวจะเสียไป ทำให้จำแนกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดดั้งเดิมได้ เรียกว่า insertional inactivation ซึ่งมีประโยชน์ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด แต่ถ้ายีนที่ต้องการโคลนมีคุณสมบัติพิเศษอยู่แล้วก็สามารถตรวจสอบได้โดยไม่ต้องใช้คุณสมบัติข้อนี้

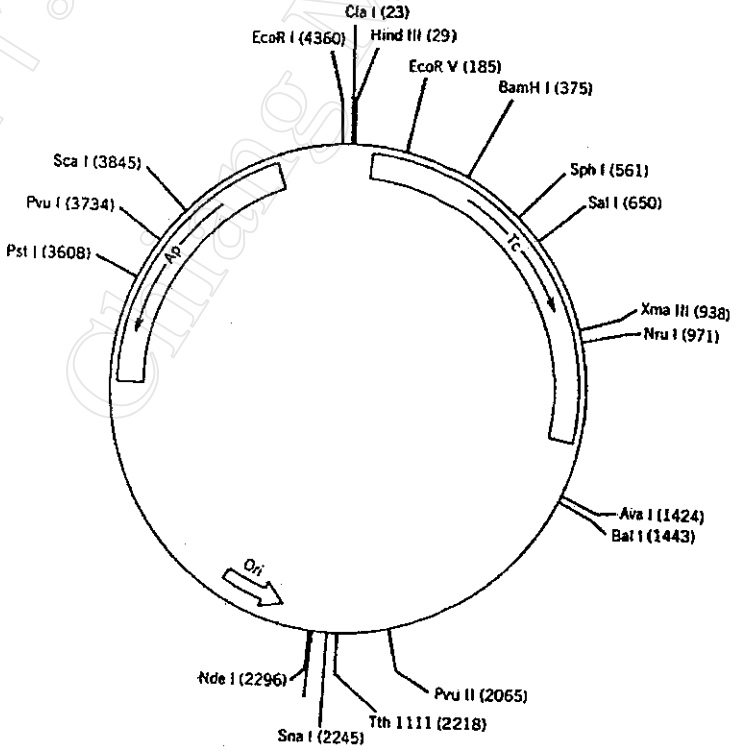
พลาสมิดที่พบในธรรมชาติมีข้อเสียหลายอย่างไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเวคเตอร์ เช่น ตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่เหมาะสม หรือมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง ไม่มีลักษณะเฉพาะที่จะใช้จำแนกเซลล์ที่มีและไม่มีพลาสมิด มีขนาดใหญ่แยกออกจากเซลล์ได้ยาก เป็นต้น ตัวอย่าง พลาสมิดแสดงในตารางที่ 1.3

จึงมีการสร้างพลาสมิดขึ้นมาใหม่ โดยตัดต่อมาจากพลาสมิดที่พบในธรรมชาติร่วมกับการสังเคราะห์หรือดัดแปลงเบสเพิ่มเติมตามต้องการ การทดลองเกี่ยวกับการสร้างดีเอ็นเอสายผสมในระยะแรกๆ ใช้พลาสมิด pSC 101 เป็นเวคเตอร์ พลาสมิดชนิดนี้สามารถจำลองตัวได้ใน *E.coli* มียีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI, *Hind* III, *Bam* HI และ *Sal* I เพียงเอนไซม์ละ 1 ตำแหน่ง เมื่อทำ insertional inactivation ในตำแหน่ง *Hind* III, *Bam* HI และ *Sal* I ซึ่งอยู่ในส่วนของยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน พบว่าไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่มีพลาสมิดแต่อย่าง

ใด นอกจากนี้พลาสมิด pSC 101 ยังมีการจำลองตัวแบบ stringent ทำให้การขยายยีนและผลผลิตของพลาสมิดต่อเซลล์ต่ำ จึงมีการพัฒนาพลาสมิดขึ้นมาใหม่สำหรับใช้เป็นเวคเตอร์ โดยให้มียีนเครื่องหมายสำหรับตรวจสอบ 2 ยีน และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์จำเพาะบางชนิดเพียง 1 ตำแหน่งอยู่ภายในยีนเครื่องหมายยีนใดยีนหนึ่ง พลาสมิด ดังกล่าว คือ pBR 322 แสดงดังรูป 1.4

ตาราง 1.3 คุณสมบัติของพลาสมิดบางชนิด[22]

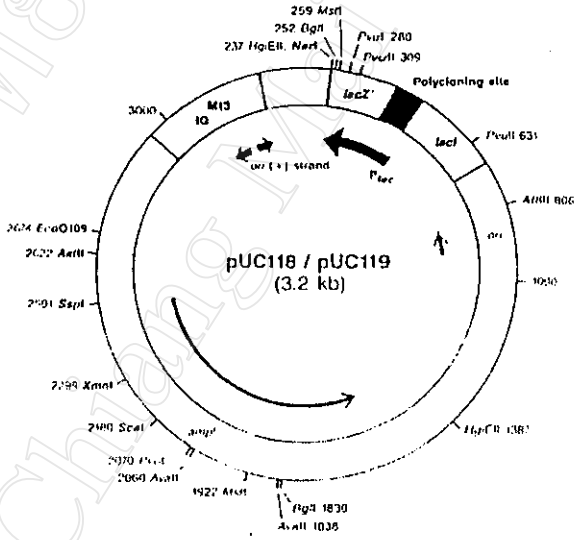
พลาสมิด	ขนาดโมเลกุล (ล้านดาลตัน)	จำนวนต่อเซลล์	การส่งถ่ายข้ามเซลล์ (conjugative)	คุณสมบัติ
ColE 1	4.2	10-15	-	ผลิตโคลิซิน
RSF 1030	5.6	20-40	-	ต้านทานแอมพิซิลิน
clo DF 13	6.0	10	-	ผลิต cloacin
R 6 K	25.0	13-38	+	ต้านทานแอมพิซิลินและสเตร็ปโตมัยซิน
F	62.0	1-2	+	-
RI	62.5	3-6	+	ต้านทานยาหลายชนิด
Ent P 307	65.0	1-3	+	ผลิต enterotoxin



รูป 1.4 พลาสมิด pBR 322[21]

pBR 322 มียีนเครื่องหมาย 2 ยีน คือยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเตตระไซคลินซึ่งมาจากพลาสมิด pSC 101 และยีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินมาจาก พลาสมิด RSF 2124 ส่วนบริเวณที่ควบคุมการจำลองตัวมาจากพลาสมิด ColE 1 ซึ่งเป็นแบบ relaxed ทำให้มีจำนวนพลาสมิดต่อเซลล์สูง

นอกจากพลาสมิด pSC 101 และ pBR 322 แล้วมีการสร้างพลาสมิดขึ้นมาอีกมากมาย แล้วแต่จุดประสงค์ที่ต้องการ เช่น พลาสมิดในกลุ่ม pUC ซึ่งมีการพัฒนาขึ้นมาหลายหมายเลข พลาสมิด pUC มียีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและมีส่วนของยีน β– galactosidase (lac Z) อยู่ด้วยนอกจากนี้มีการรวบรวมเอาบริเวณจดจำของเอนไซม์ที่นำมาเรียงต่อกันนี้มีเพียง 1 ตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ดังกล่าว เรียกบริเวณดังกล่าวนี้ว่า multiple cloning site พลาสมิด pUC นี้มักมีเป็นคู่ แต่ละคู่มียีนหรือส่วนประกอบเหมือนกัน ยกเว้นบริเวณ multiple cloning site จะมีลำดับกลับกันเมื่อเทียบกับทิศทางของยีน lac Z ตัวอย่างเช่น pUC 18 และ pUC 19 แสดง ดังรูป 1.5

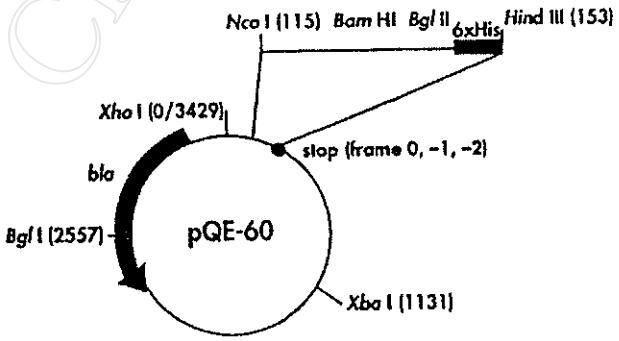


รูป 1.5 ดีเอ็นเอพาหะ pUC 18 และpUC 19 แสดงลำดับเบสบริเวณ multiple cloning site ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ[24]

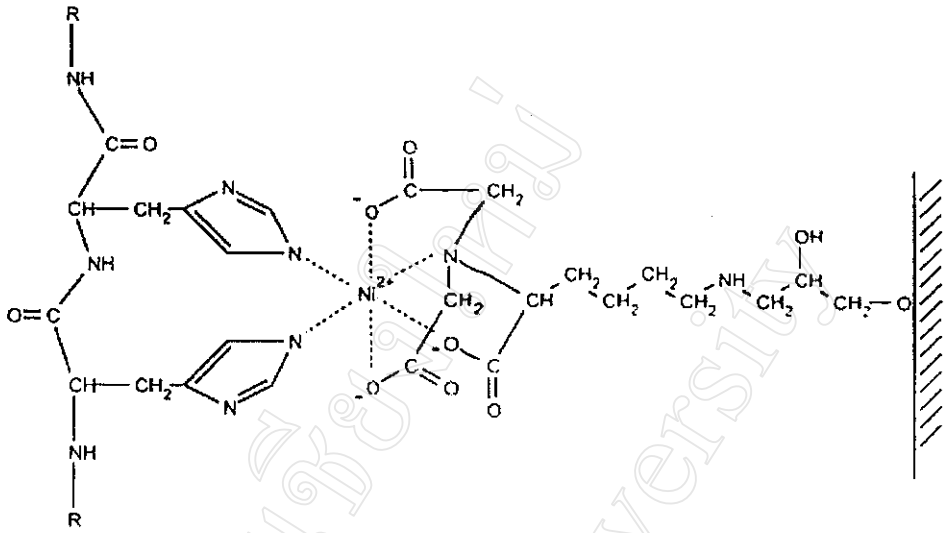
ตำแหน่งที่ใส่ชิ้นดีเอ็นเอนั้น อยู่ในส่วนของยีน lac Z ดังนั้นเมื่อมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ทำให้ส่วนของยีน lac Z ถูกแยกออกจากกันเกิด insertional inactivation จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเดิมออกจากกันได้ โดยตรวจสอบกิจกรรม

ของเอนไซม์ β - galactosidase โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และ IPTG (isopropyl – β – D – thiogalactoside) ในอาหารเลี้ยงซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β - galactosidase และเติมสาร X – gal (5 – bromo – 4 – chloro – 3 – indolyl - β - D – galactoside) ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์นี้ลงไปด้วย เซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญได้ เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเดิมจะเจริญได้และผลิตเอนไซม์ β - galactosidase ที่มีกิจกรรมได้จะเกิดการย่อยสาร X – gal เกิดเป็นสีฟ้าทำให้มีโคโลนีเป็นสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมจะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่สามารถจะย่อยสาร X – gal ได้ โคโลนีจึงไม่เกิดสีสามารถแยกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดต่างกันได้ในขั้นตอนเดียว ทั้งนี้เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้กับพลาสมิดชนิดนี้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีบางส่วนของยีน lac Z ขาดหายไป (deletion) ไม่สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โดยตัวเองได้

พลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะ นอกจากมีการพัฒนาเพื่อให้ได้พลาสมิดที่สามารถใช้ผลิตดีเอ็นเอสายเดี่ยว ยังมีการเติมส่วนของโปรโมเตอร์ของฝาจอื่นๆ ลงไปข้างๆ บริเวณที่ใส่ยีนด้วยเพื่อให้สังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และโปรตีนจากยีนที่อยู่ในพลาสมิดได้ในหลอดทดลอง เช่น พลาสมิด pQE 60 (ที่ใช้ในการวิจัย) ดังรูป 1.6 มีโปรโมเตอร์ของฝาจ T5 อยู่บริเวณที่ใช้โคลน ซึ่งได้มาจาก พลาสมิดกลุ่ม pDS และอนุพันธุ์ของพลาสมิด pDS/RBS II และ pDS 781/RBS II – DHFRS และมียีนที่ด้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและส่วนบริเวณที่ควบคุมการจำลองตัวมาจากพลาสมิด ColE 1 ซึ่งเป็นแบบ relaxed ทำให้มีจำนวนพลาสมิดต่อเซลล์สูงและมียีนสำหรับสังเคราะห์ 6xHis tag เพื่อง่ายต่อการทำโปรตีนที่ต้องการให้บริสุทธิ์ โดย 6xHis tag สามารถจับกับสาร Ni – NTA (Nickle Nitrolotriacetic acid) ซึ่งเกาะติดกับ agarose, silica หรือ resin เป็นต้น ซึ่งพัฒนาโดยบริษัท QIAGEN แสดงดังรูป 1.7

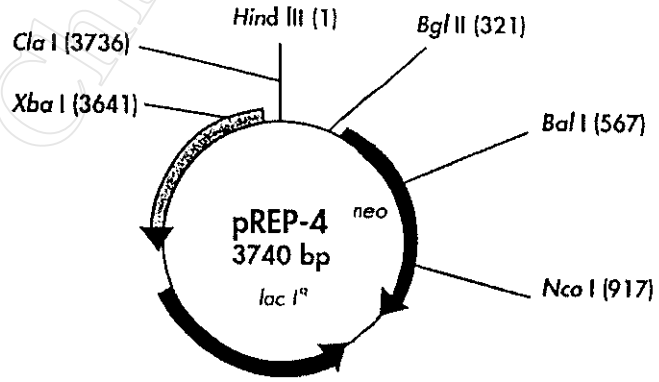


รูป 1.6 พลาสมิด pQE – 60[25]



รูป 1.7 การจับระหว่างโปรตีน 6xHis tag กับ Ni – NTA matrix[25]

การแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากพลาสมิดสายผสมเมื่อใช้พลาสมิด pQE – 60 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเติม IPTG ปริมาณเพียงเล็กน้อย สายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้กับพลาสมิดชนิดนี้คือ *E. coli* สายพันธุ์ M15 [pREP4] และ SG 13009 [pREP4] เนื่องจากมีพลาสมิด repressor [pREP4] ซึ่งช่วยในการผลิตโปรตีนจากพลาสมิดสายผสมให้แสดงออกในปริมาณมาก และยังง่ายต่อการปฏิบัติ ดังรูป 1.8



รูป 1.8 พลาสมิด p[REP4] ใน *E. coli* M15 [pREP4] และ SG 13009 [pREP4][25]

1.5.2 ฝาจ (Bacteriophage)

ฝาจเวคเตอร์สำหรับการโคลนยีน โดยทั่วไปแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ฝาจแลมบ์ดา (Bacteriophage λ) และฝาจที่มีดีเอ็นเอเป็นวงแหวนสายเดี่ยว (single stranded DNA phage)

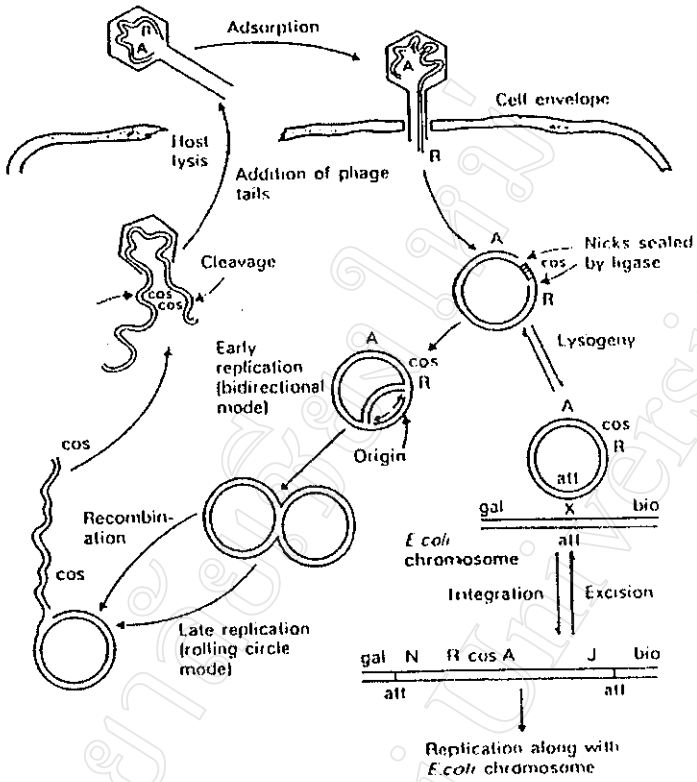
1.5.2.1 ฝาจแลมบ์ดา (Bacteriophage λ)

ฝาจแลมบ์ดามีจีโนมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาดประมาณ 48,500 คู่เบส เมื่ออยู่ภายในอนุภาคของฝาจดีเอ็นเอจะเป็นสายยาว มีปลาย 5' เป็นสายเดี่ยวยาว 12 เบส เข้าคู่กันได้กับอีกปลายหนึ่งเรียกตำแหน่งปลายเหนียวนี้ว่า ตำแหน่งคอส (COS site) หลังจากที่อนุภาคของฝาจเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียเจ้าบ้านแล้ว จะฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ เรียกว่า การบุกรุก (Infection) ทันทีที่ดีเอ็นเออยู่ภายในเซลล์ตำแหน่งคอสจะวกกลับจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวนและมีการลอกรหัสเป็นอาร์เอ็นเอหรือจำลองตัวในแบบวงแหวน ฝาจแลมบ์ดามีการดำรงชีวิตได้ 2 แบบ

1) วงจรชีพแบบทำลายเซลล์ (Lytic cycle)

หลังจากฝาจบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านแล้ว จะมีการจำลองตัว (Replicate) ดีเอ็นเอจำนวนมากมาย แล้วลอกรหัสเป็นอาร์เอ็นเอและแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ได้ผลผลิตของยีนต่างๆ ของฝาจเอง เพื่อประกอบขึ้นเป็นปลอกหุ้มสำหรับบรรจุดีเอ็นเอที่จำลองขึ้นใหม่ รวมทั้งองค์ประกอบต่างๆ ซึ่งจำเป็นต่อการสร้างอนุภาคของฝาจ จนในที่สุดฝาจจะทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก เป็นการเปิดทางให้อนุภาคของฝาจรุ่นใหม่หลุดออกมา ดังรูป 1.9 หากเกลี่ยเซลล์เจ้าบ้านที่บุกรุกด้วยฝาจบนอาหารวุ้น แล้วเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จะเห็นวงกลมโปร่งในขนาดเล็กตรงบริเวณที่มีการทำลายเซลล์เรียกวงกลมใสนี้ว่า Plaque

การจำลองตัวของดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ระยะ โดยระยะแรกเกิดขึ้น ณ จุดตั้งต้นการจำลองตัว (ORI) โดยดำเนินไปในสองทิศทาง (Bidirectional) ต่อมาจึงเข้าสู่ระยะที่สองซึ่งมีการจำลองตัวลักษณะหมุน (Rolling circle) โมเลกุลดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากการจำลองอย่างหลังนี้ จะติดต่อกันเป็นสายยาว เรียกว่า concatemer ลักษณะโมเลกุลเช่นนี้เป็นสิ่งจำเป็นต่อการบรรจุ (Packing) เข้าไปในปลอกหุ้มฝาจ เพราะดีเอ็นเอที่ได้รับการบรรจุเข้าไปต้องอยู่ระหว่างตำแหน่งคอส 2 ลักษณะ และมีความยาว 38 – 53 กิโลเบส ขณะบรรจุนั้นตำแหน่งคอสทั้งสองจะเข้ามาอยู่ใกล้กัน ก่อนถูกตัดให้ขาดออกเพื่อเปิดปลายเหนียว



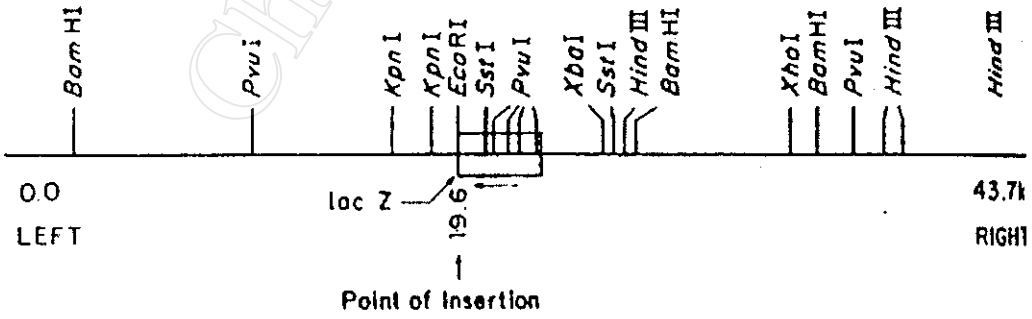
รูป 1.9 การดำรงชีวิตของฝาจแลมบ์ดา[24]

2) **วงจรชีพแบบแฝงตัวในเซลล์** (Lysogenic cycle)

วงจรชีพแบบนี้ดีเอ็นเอของฝาจซึ่งจับตัวกันเป็นวงแหวนจะไปเกาะกับโครโมโซมของแบคทีเรียที่ตำแหน่งเฉพาะแล้วเกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของดีเอ็นเอ (recombination) ทำให้จีโนมของฝาจแทรกตัวเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย (integration) เป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมเรียกว่า โปรฝาจ (prophage) เมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของโครโมโซม และแบคทีเรียแบ่งเซลล์ ส่วนโปรฝาจนี้ก็จะจำลองโมเลกุลและถูกส่งต่อไปยังเซลล์ลูกด้วย แบคทีเรียที่มีโปรฝาจอยู่ด้วยนี้เรียกว่า lysogen ตลอดระยะเวลาที่แฝงตัวอยู่ในเซลล์ ดีเอ็นเอของฝาจจะควบคุมให้มีการสร้างโปรตีนชนิดหนึ่ง คือ cI ซึ่งเป็นโปรตีนสำหรับยับยั้งการทำงานของยีนสำคัญๆ ในวงจรชีพแบบทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เจ้าบ้านดำรงสภาพไลโซเจนไว้ได้ บางครั้งโปรฝาจที่อยู่ร่วมกับโครโมโซมของแบคทีเรียนี้อาจจะหลุดออกมา (excision) และเปลี่ยนกลับมาดำเนินชีวิตแบบ Lytic ทำให้เซลล์ตายและผลิตอนุภาคฝาจอีกครั้งหนึ่ง

การพัฒนาดีเอ็นเอของฝาจแลมบ์ดาเพื่อใช้เป็นเวคเตอร์ อาศัยความรู้ที่ว่ายีนต่างๆ บริเวณตอนกลางของดีเอ็นเอเป็นยีนที่ไม่มีความจำเป็นต่อการวงจรชีพแบบทำลายเซลล์แม้จะตัดทิ้งไปก็ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการบุกรุกเซลล์ ฉะนั้นจะเห็นว่าเมื่อกำจัดดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวทิ้งไปแล้วทำให้สามารถใช้ส่วนของดีเอ็นเอที่เหลือเป็นเวคเตอร์ได้ สิ่งเดียวที่ต้องคำนึงถึงคือ จะไม่มีการบรรจุดีเอ็นเอเข้าไปในปลอกหุ้มฝาจ หากดีเอ็นเอนั้นมีขนาดสั้นกว่า 75% หรือยาวกว่า 105% ของขนาดดีเอ็นเอปกติ

การโคลนยีนในฝาจแลมบ์ดามีข้อดีกว่าการใช้พลาสมิด คือ สามารถใส่ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้ถึงประมาณ 20 กิโลเบส และการนำฝาจสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยวิธี transduction ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าการนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยวิธี transformation นอกจากนี้การตรวจหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากไม่ได้ เพราะขนาดยิ่งใหญ่เท่าไรประสิทธิภาพในการเข้าเซลล์ก็จะยิ่งลดลง การตรวจหาโคลนจากโคโลนีก็ยุ่งยากกว่าการตรวจหาจาก plaque แต่การเตรียมพลาสมิดบริสุทธิ์ทำได้ง่ายกว่า การใช้งานหรือการตรวจวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไปทำได้ง่ายกว่าในฝาจ และในทางปฏิบัตินั้น เมื่อเลือกได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจากประชากรของฝาจแล้วต้องการจะนำมาวิเคราะห์หรือศึกษาคุณสมบัติของดีเอ็นเอนั้นๆ ก็มักจะทำโดยย้ายชิ้นดีเอ็นเอจากฝาจแลมบ์ดามายังพลาสมิด (subcloning) โดยอาจจะย้ายมาทั้งชิ้นถ้าขนาดไม่ใหญ่มากนัก หรือตัดให้เป็นชิ้นเล็กลงก่อนแล้วย้ายแต่ละชิ้นมาใส่ลงในพลาสมิดก็ได้ ปัจจุบันมีเวคเตอร์สำเร็จรูปที่เป็นอนุพันธุ์ของฝาจแลมบ์ดามากมาย เช่น λgt 11, λZAP, λ GFM-2 ดังรูป 1.10



รูป 1.10 แผนภาพของ λgt 11[22]

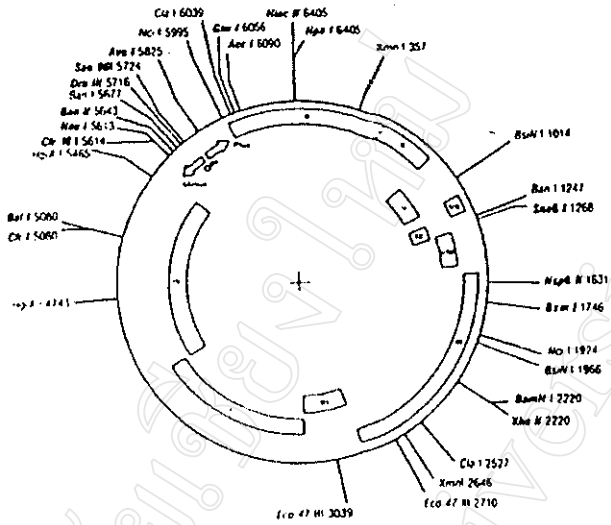
การใช้แลมบ์ดาเป็นดีเอ็นเอพาหะ จะต้องเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมด้วย ดังตาราง 1.4 แสดงชนิดของดีเอ็นเอพาหะและเซลล์เจ้าบ้านซึ่งใช้คู่กัน

ตาราง 1.4 ชนิดของเวคเตอร์และเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้คู่กัน[22]

ชนิดฝาจแลมบ์ดา	เซลล์เจ้าบ้าน
ชุด CHARON	LE 392
ชุด EML	NM 538, NM 539
ชุด λgt	
- λgt 10	C600 (BNN 93) สำหรับเพิ่มจำนวนเวคเตอร์
	BNN 102 (C600 hflA) สำหรับการเลือกเฟ้น
- λgt 11	Y 1090 (hsdR)
ชุด ORF	MC 1061, MBM 7014.5
ชุด ZAP	BB 4 (สำหรับ ZAP และ ZAP II)
	XL 1-BLUE (สำหรับ ZAP II เท่านั้น)

1.5.2.2 **ฝาจที่มีดีเอ็นเอเป็นวงแหวนสายเดี่ยว** (single stranded DNA phage)

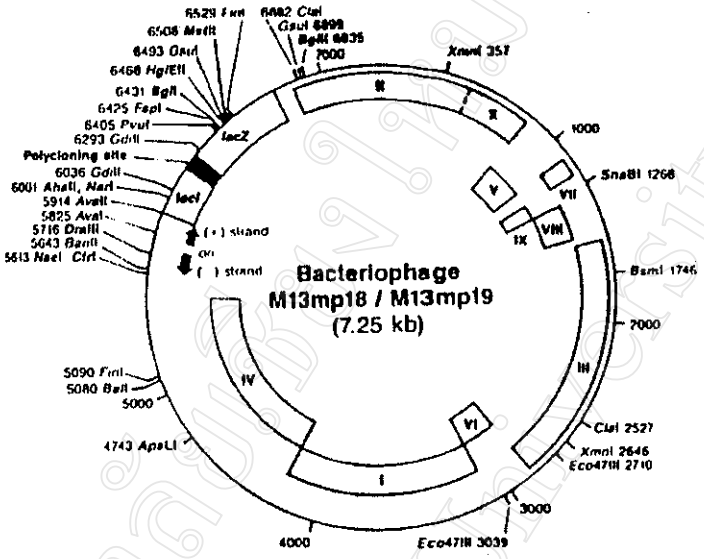
ฝาจที่มีดีเอ็นเอเป็นวงแหวนสายเดี่ยวที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะ ได้แก่ ฝาจ f1, fd และ M13 ฝาจที่นิยมใช้ คือ ฝาจ M13 ฝาจนี้มีรูปร่างเป็นเส้นยาว (filamentous phage) ขนาด 9x900 นาโนเมตร มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอวงแหวนสายเดี่ยวขนาด 6,407 เบส ดังรูป 1.11 มีโปรตีนห่อหุ้ม 1 ชนิดจำนวน 2,710 หน่วย ฝาจ M13 จะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยทาง sex pilus จึงบุกรุกได้เฉพาะเซลล์ที่เป็น F+ หรือ Hfr เท่านั้น เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วดีเอ็นเอของฝาจซึ่งเป็นสาย + จะจำลองตัวเองสร้างสาย – ขึ้น เกิดเป็นดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่เรียกว่า replicative form (RF) RF จะมีการจำลองโมเลกุลจนได้ประมาณ 100 – 200 โมเลกุลต่อเซลล์ เมื่อได้ RF ประมาณ 100 โมเลกุลแล้ว การจำลองโมเลกุลจะเปลี่ยนเป็นแบบ rolling circle และจะเกิดแบบไม่สมมาตรโดยมีการสังเคราะห์เฉพาะสาย + เท่านั้น เนื่องจากมีการสะสมโปรตีนจำเพาะซึ่งกำหนดการสร้างโดยยีน V ของฝาจโปรตีนนี้จะไปเกาะกับ ดีเอ็นเอสาย + ของฝาจ ทำให้มีการสร้างสาย – การประกอบเป็นอนุภาคฝาจจะเกิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อดีเอ็นเอและโปรตีนที่จับอยู่มาถึงเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนจะมาห่อหุ้มดีเอ็นเอแทน แล้วอนุภาคไวรัสจึงออกมาจากเซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์แตก



รูป 1.11 จีโนมของฝาจ [21]

การใช้ฝาจ M13 เป็นดีเอ็นเอพาหะจะใช้ในรูปที่เป็น RF ซึ่งมีโครงสร้างเป็นดีเอ็น-เอวงแหวนเกลี่ยวคู่เหมือนกับพลาสมิด เช่น M13 mp มีส่วนของ polylinker หรือ multiple cloning site อยู่ในส่วนของยีน lac Z เหมือนกับพลาสมิด pUC M13mp มีหมายเลขต่างๆ เป็นคู่ แต่ละหมายเลขมี multiple cloning site เหมือนกันกับพลาสมิด pUC เช่น M13 mp 18 ดังรูป 1.12 จะเหมือนกับ pUC 18 เป็นต้น ส่วนของ lac Z และใส่ชิ้นดีเอ็นเอลงไปในบริเวณ intergenic region ของฝาจจะไม่รบกวนการเจริญเติบโตของฝาจ ขนาดของดีเอ็นเอที่บรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจมีจำนวนจำกัด ถ้ามีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกยาวจะไม่เสถียรโดยทั่วไปจะใส่ไม่เกิน 1 กิโลเบส จึงไม่เหมาะสมกับการโคลนยีนขนาดยาว แต่ใช้กับดีเอ็นเอที่ย้ายมาจากดีเอ็นเอพาหะอื่นๆ (subclone) เพื่อวัตถุประสงค์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว

เมื่อนำยีนเข้าไปในเวคเตอร์ M13 แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี trans-formation เช่นเดียวกับพลาสมิดแต่เมื่อดีเอ็นเอเข้าเซลล์แล้ว จะจำลองแบบฝาจ M13 และผลิตอนุภาคไวรัสที่มีดีเอ็นเอเป็นวงแหวนสายเดี่ยวออกมา ทำให้เกิด plaque ได้ แต่ plaque ที่ได้จะไม่ใสแบบฝาจแลมบ์ดา เพราะฝาจ M13 ไม่ทำให้เซลล์แตกแต่บริเวณที่มีไวรัสการเจริญเติบโตของเซลล์ช้าลงเท่านั้น จึงได้ plaque ที่ทึบแสง แม้ว่าวิธีนำ RF ของฝาจ M13 เข้าสู่เซลล์จะเหมือนกับการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ แต่ผลที่ได้ต่างกันจึงเรียกวิธีการนำดีเอ็นเอของฝาจเข้าสู่เซลล์โดยวิธีนี้ว่า transfection



รูป 1.12 เวคเตอร์ M13 mp RF[21]

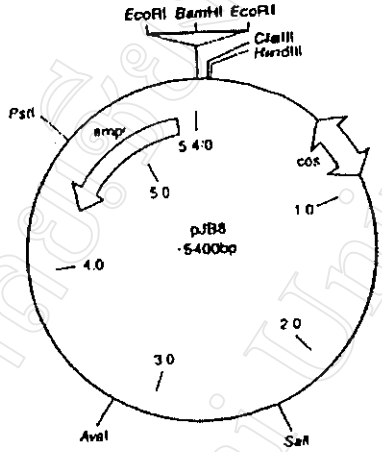
เหตุผลในการเตรียมดีเอ็นเอให้อยู่ในสภาพสายเดี่ยวจากฝาจ M13 ก็เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการหาลำดับเบสโดยวิธีของ Sanger และคณะ (1987)[22] โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ได้เป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายที่มีเบสคู่สม การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่นี้จะใช้สารพวกไดดีออกซินิวคลีโอไทด์ (dideoxy nucleotide) มาช่วยให้เกิดการหยุดปฏิกิริยาที่เบสต่างๆ ทำให้ทราบลำดับเบสของยีนที่สนใจได้

นอกจากนี้ยังใช้ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (oligonucleotide tridedirected mutagenesis หรือ sitedirected mutagenesis) โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีเบสต่างไปจากที่ควรจะเป็นตรงตำแหน่งที่ต้องการ โดยการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสผิดไปจาก 1 เบส เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะมีเบสผิดไป 1 เบส แล้วจึงแยกเอามิวแตนท์ที่ได้นี้ออกมาอีกทีหนึ่ง มิวแตนท์ที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนในหลอดทดลองได้

1.5.3 **คอสมิด** (Cosmid)

คอสมิดเป็นดีเอ็นเอพาหะที่รวมเอาข้อดีของพลาสมิดและฝาจแลมบ์ดาเข้าด้วยกัน ซึ่งเกิดขึ้นจากการตัดต่อเอาตำแหน่งคอสจากฝาจแลมบ์ดาแทรกเข้าไปในพลาสมิด ทำให้สามารถใช้ คอสมิดในทำนองเดียวกับการใช้พลาสมิดได้ และสามารถตัดดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด

ตั้งแต่ 35 – 45 กิโลเบสเข้ากับคอสมิด แล้วบรรจุดีเอ็นเอสายผสมนั้นเข้าไปในปลอกหุ้มฝาจทำนองเดียวกับแลมบ์ดา คอสมิดสามารถรองรับดีเอ็นเอขนาดใหญ่ได้เพราะคอสมิดมีขนาดประมาณ 5 กิโลเบสเท่านั้น และปลอกหุ้มฝาจจะบรรจุดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 35 – 53 กิโลเบส ดังนั้น คอสมิดจะใช้ได้เฉพาะกับ ดีเอ็นเอขนาดใหญ่เท่านั้น เช่น คอสมิด pJB 8 ดังรูป 1.13 มีขนาด 5.4 กิโลเบส



รูป 1.13 คอสมิด pJB 8[24]

เมื่อตัดต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ากับคอสมิดแล้ว จึงบรรจุในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจในหลอดทดลองเช่นเดียวกับฝาจแลมบ์ดาแล้วจึงนำคอสมิดสายผสมที่อยู่ในรูปอนุภาคฝาจนี้ใส่ลงในเซลล์โดยวิธี transduction เมื่อดีเอ็นเอของคอสมิดเข้าสู่เซลล์แล้วจะไม่สามารถสร้างอนุภาคได้ แต่จะจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอและคัดเลือกโดยใช้ยีนเครื่องหมายแบบเดียวกับพลาส-มิด เช่น ในคอสมิด pJB 8 นี้จะคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

ต่อมาได้มีการพัฒนาการสร้างคอสมิดที่มี cos site 2 ตำแหน่ง (double cos site vector) และมียีนเครื่องหมาย 2 ยีน ช่วยในการโคลนยีนในคอสมิดทำได้ง่ายขึ้น

1.6 การเตรียมพลาสมิดดีเอนเอ

1.6.1 การเตรียมพลาสมิดปริมาณน้อยๆ จากแบคทีเรีย (Minipreps of plasmid DNA)[24,26]

ในการทดลองที่ต้องการปริมาณพลาสมิดเพียงเล็กน้อย และต้องการความรวดเร็วในการเตรียมพลาสมิดจะใช้ปริมาตรของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเหลว เพียง 0.5 – 1.5

ml วิธีการเตรียมพลาสมิดโดยทั่วไปมี 3 วิธี วิธีแรก คือ การเตรียมพลาสมิดโดยอาศัยสารละลายด่างทำให้เซลล์แตก (Alkaline lysis method) วิธีที่สอง คือ การเตรียมพลาสมิดโดยการต้ม (Boiling method) วิธีสุดท้าย คือ การเตรียมพลาสมิดโดยใช้ลิเทียม (Lithium miniprep method)

ก. การเตรียมพลาสมิดโดยอาศัยสารละลายด่างทำให้เซลล์แตก

เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดและใช้ได้กับพลาสมิดทุกชนิดทุกขนาด รวมทั้ง *E.coli* เจ้าบ้านเกือบทุกสายพันธุ์ โดยใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) ทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียและทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน ส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำลายสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอทั้งพลาสมิดและโครโมโซม แต่เมื่อทำให้เป็นกลางด้วยโปแตสเซียมอะซิเตต เฉพาะพลาสมิดดีเอ็น-เอซึ่งเป็นวงกลมขนาดเล็กจะ re – anneal เหมือนเดิม ส่วนโครโมโซมและโปรตีนจะตกตะกอน จึงสามารถแยกพลาสมิดออกได้โดยการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) แล้วจึงตกตะกอนพลาสมิดด้วย 95% เอทธานอล

ข. การเตรียมพลาสมิดโดยการต้ม

วิธีนี้จะใช้ lysozyme, triton X – 100 และความร้อนเป็นตัวทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแตกและโครโมโซมอลดีเอ็นเอจะยังคงติดอยู่กับผนังเซลล์ แล้วจึงตกตะกอนแยกจากพลาสมิดดีเอ็นเอได้ง่าย วิธีนี้ทำได้ง่ายแม้ผู้มีประสบการณ์น้อย แต่ไม่เหมาะกับ *E.coli* สายพันธุ์ที่มี Endonuclease A อยู่มาก เช่น HB – 101 เนื่องจากการต้มไม่สามารถทำลาย Endonuclease A ได้หมด

ค. การเตรียมพลาสมิดโดยใช้ลิเทียม

วิธีนี้จะใช้ triton X – 100 LiCl และ phenol/chloroform ซึ่งจะทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอละลายแต่ไปตกตะกอนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ออกมาจากเศษเซลล์ วิธีนี้จะใช้ได้เฉพาะกับพลาสมิดดีเอ็นเอขนาดเล็ก (<10 Kb) แต่ใช้เวลาสั้นที่สุด

โดยทั่วไปทั้ง 3 วิธี จะให้พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 – 5 μg จากปริมาตรของแบคทีเรียตั้งต้น 1.5 ml พลาสมิดดีเอ็นเอสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ได้หลายสัปดาห์ หรือ –20°C หรือ –70°C ได้นานหลายปี

1.6.2 การตกตะกอนดีเอ็นเอ[24]

ในการแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์ หรือการทดลองขั้นตอนต่างๆ ในงานพันธุ-วิศวกรรม จะต้องมีการตกตะกอนดีเอ็นเอเสมอ ซึ่งนิยมใช้อัลกอฮอล์ เช่น เอทธานอล (ethanol) และไอโซโพรพานอล (Isopropanol) นอกจากนี้ยังใช้ CTAB (Cetyl – trimethylammonium bromide) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเออีกด้วย

ก. การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลหรือไอโซโพรพานอล

การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล หรือ ไอโซโพรพานอล มักทำภายใต้อุณหภูมิต่ำที่ 0°C ซึ่งเดิมนิยมใช้ –20°C ซึ่งพบว่าไม่จำเป็นในภายหลัง และมีเกลือเช่น โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate), แอมโมเนียมอะซิเตต (Ammomium acetate) หรือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ตัวใดตัวหนึ่งผสมอยู่ด้วย โดยเติมเอทธานอลแช่เย็นปริมาตร 2 เท่า หรือเติมไอโซโพรพานอลแช่เย็นปริมาตร 0.6 – 1 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตกตะกอนลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็ง 15 – 30 นาที ถ้าดีเอ็นเอมีขนาดเล็กหรือปริมาณน้อยอาจต้องเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้น 10 mM ก่อนเติมอัลกอฮอล์และแช่ในน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง การเก็บตะกอนดีเอ็นเอทำได้โดยการเซนติฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง ทำตะกอนให้แห้งแล้วจึงนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris – HCl และ EDTA (TE buffer) ต่อไป

การเลือกใช้ไอโซโพรพานอลจะใช้ในกรณีที่ต้องการปริมาตรของสารละลายไม่ใช้เกินกำหนดปริมาตรของหลอดเนื่องจากเติมลงไปปริมาตรน้อยกว่าเอทธานอล ข้อเสียของไอโซ-โพรพานอล คือ ระเหยยาก แก้ไขโดยล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล 70% และมักจะตกตะกอนซูโครส (Sucrose) และโซเดียมคลอไรด์ปะปนกับดีเอ็นเอออกมาด้วย

ข. การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย CTAB

CTAB (Cetyl – trimethylammonium bromide) เป็น Cationic detergent ที่สามารถนำมาใช้ตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสะอาดขึ้น โดยที่สารละลายดีเอ็นเอที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่า 0.6 M ถ้าใส่ CTAB ลงไปดีเอ็นเอจะจับตัวกับ CTAB แล้วตกตะกอนลงมา ขณะที่โปรตีนหรือโพลีแซคคาไลด์ที่ปะปนอยู่ยังคงค้างในสารละลาย ถ้านำตะกอนของดีเอ็นเอที่จับตัวกับ CTAB มาละลายใน 0.12 M โซเดียมคลอไรด์ ดีเอ็นเอจะละลายออกมาและสามารถตกตะกอนดีเอ็นเอได้โดยง่ายด้วยอัลกอฮอล์ วิธีนี้สามารถใช้ในการตกตะกอนอาร์เอ็นเอได้อีกด้วย

วิธีการตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วย CTAB จะนิยมใช้เพื่อทำให้กรดนิวคลีอิคที่ได้สะอาดขึ้นและจะไม่ใช้วิธีนี้ในระหว่างขั้นตอนการเตรียมกรดนิวคลีอิคจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เพราะขั้นตอนเหล่านั้นมีสารเคมีอื่นๆ หลายชนิดปะปนอยู่

1.6.3 การทำกรดนิวคลีอิคให้บริสุทธิ์[24,26]

การทำกรดนิวคลีอิคให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนที่สำคัญในงานทางด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการสกัดโปรตีนที่ปะปนกับกรดนิวคลีอิคออกด้วยสารละลายฟีนอล – คลอโรฟอร์มอิ่มตัว โปรตีนที่ปะปนกับกรดนิวคลีอิคนั้นอาจมาจากโปรตีนภายในเซลล์ หรือจากเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของการโคลน เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ อาร์เอ็นเอสเอ (RNaseA) เป็นต้น การเตรียมฟีนอล

อิ่มตัวกระทำโดยหลอมละลายฟีนอลที่อุณหภูมิ 65°C แล้วเติม 0.1% ไฮดรอกซีควินโนลิน (hydroxyquinoline) ซึ่งเป็นสารพวกแอนติออกซิแดนซ์ และ 0.2% เมอแคปโตเอทธานอล (β - mercaptoethanol) ก่อนนำใช้ต้องผสมกับคลอโรฟอร์ม (chloroform) และไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ อัตราส่วน ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ 25:24:1 โดยเติมสารละลายฟีนอล/คอลโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ลงไปปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ 24:1 และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยอัลกอฮอล์ต่อไป

1.7 การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิค[24,27]

การวัดปริมาณกรดนิวคลีอิค เช่น ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไปมี 2 วิธี ดังนี้

1.7.1 การวัดปริมาณกรดนิวคลีอิคจากค่าการดูดกลืนแสง

เนื่องจากกรดนิวคลีอิค เช่น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงเหนือม่วง (Ultra violet) ได้ดี จึงใช้คุณสมบัติดังกล่าวในการวัดปริมาณดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ กระทำได้โดยง่าย โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ในสภาพสารละลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ (Double strand) ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml มีการดูดกลืนแสง $A^{1cm}_{260nm} = 1$ โดยที่ % G และ C content จะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อค่านี้

นอกจากนี้ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ (Double strand, D/S) และสายเดี่ยว (Single strand, S/S) ของสารละลายดีเอ็นเอชนิดเดียวกันจะต่างกันมาก จึงสามารถใช้ค่าการดูดกลืนดังกล่าวในการศึกษาสภาวะการเปลี่ยนแปลงของสารละลายดีเอ็นเอที่สนใจจาก D/S เป็น S/S หรือจาก S/S เป็น D/S ได้

การคำนวณหาปริมาณกรดนิวคลีอิค

ดีเอ็นเอใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm. ($A_{260\ nm.}$) = 1 หมายถึงมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เท่ากับ 50 μg/ml

อาร์เอ็นเอใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm. ($A_{280\ nm}$) = 1 หมายถึงมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ เท่ากับ 40 μg/ml

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm. = 1 หมายถึงมีความเข้มข้นของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 20 μgIml

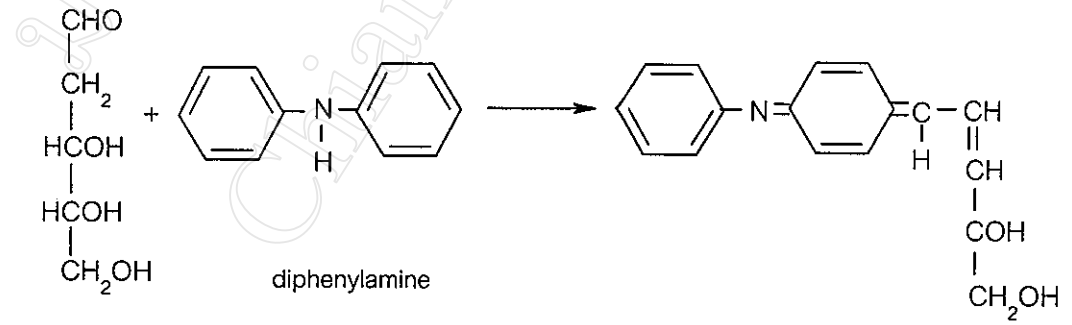
การตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิคจากการวัดเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm. (A_{260}/A_{280}) หากมีค่าอยู่ระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์ หากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในดีเอ็นเอนั้นมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ ถ้าหากมีค่าน้อยกว่า

1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดปะปนอยู่ สำหรับอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรได้ค่า A_{260}/A_{280} ประมาณ 2 นอกจากนี้การตรวจสอบคุณภาพยังกระทำได้โดยการ scanning วัดความเข้มข้นตั้งแต่ความยาวคลื่น 230 – 320 nm. ซึ่งควรได้พีคเดียวที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 nm.

นอกจากการวัดปริมาณกรดนิวคลีอิคโดยวัดการดูดกลืนแสงแล้ว อาจจะวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยดูจากการเรืองแสง (Fluoresence) โดยอาศัยสารเคมีเอทธิเดียมโบไมด์ (Ethidium bromide) ที่แทรก (Intercalate) เข้าไปในสายดีเอ็นเอ และกระตุ้น (Excited) ด้วยแสงเหนือม่วง ให้ปล่อยแสงที่มองเห็นได้และเปรียบเทียบความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่เห็นกับดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นจึงทำให้ทราบปริมาณดีเอ็นเอในสารตัวอย่างที่ต้องการวัดได้

1.7.2 การวัดปริมาณกรดนิวคลีอิคจากปฏิกิริยาการเกิดสี

การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ จะอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่เกิดกับไดฟีนิลามีน (diphenylamine) ในสารละลายดีเอ็นเอที่เป็นกรด ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ดังรูป 1.14 ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงมากสุดที่ 595 nm. สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลดีออกซี่ไรโบส (2 –deoxyribose) กับไดฟีนิลามีน สำหรับโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีเพียงน้ำตาลดีออกซี่ไรโบสของเพียวรีนนิวคลีโอไทด์เท่านั้นที่เข้าทำปฏิกิริยากับไดฟีนิลามีน ดังนั้นจะมีเพียงครึ่งหนึ่งของน้ำตาลดีออกซี่ไรโบสในดีเอ็นเอเท่านั้นที่ทำปฏิกิริยากับไดฟีนิลามีน นั่นคือปริมาณของน้ำตาลที่หาได้จะเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในโมเลกุลดีเอ็นเอ

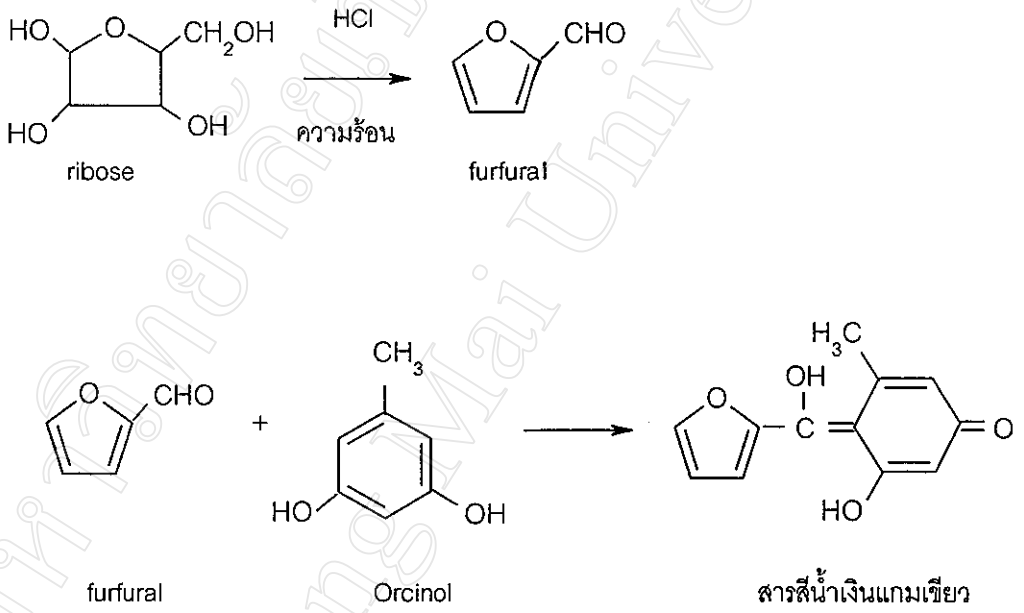


2-deoxy D - ribose

ω - hydroxylevulic aldehyde diphenylamine

รูป 1.14 ปฏิกิริยาการเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Deoxyribose กับ Diphenylamine

การวิเคราะห์หาปริมาณอาร์เอ็นเอ กระทำได้โดยน้ำตาลไรโบสในโมเลกุลของอาร์เอ็นเอจะทำปฏิกิริยากับกรดเกลือเข้มข้นได้ เฟอเฟอรอล (furfural) ซึ่งเมื่อเติมออร์ซินอล (orcinol) ลงไป ปฏิกิริยาจะเกิดต่อให้สารประกอบเชิงซ้อนสีเขียวที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 665 nm. ดังรูป 1.15 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นถูกเร่งโดยเฟอริคคลอไรด์ (ferric chloride) น้ำตาลไรโบสในหน่วยนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอ โมเลกุลที่มีเบสเพียวรีนเท่านั้นจะเกิดปฏิกิริยานี้ส่วนน้ำตาลไรโบสในพิริมิดีนนิวคลีโอไทด์ในอาร์เอ็นเอจะทำปฏิกิริยาได้น้อยมาก



รูป 1.15 ปฏิกิริยาการเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Ribose กับ Orcinol

1.8 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ[23,28]

ในงานด้านพันธุวิศวกรรมมีการใช้เอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) เอนโดนิวคลีเอส (Endonucleases) เอคโซนิวคลีเอส (Exonucleases) และเอนไซม์อีกหลายชนิดที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เรียกรวมๆ กันว่า DNA หรือ RNA modifying enzymes ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เอนไซม์เหล่านี้มีเพิ่มมากขึ้นทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ จึงทำให้การทดลองด้านพันธุวิศวกรรม ทำได้ง่ายและมีขอบเขตกว้างขวางมากขึ้น

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ของดีเอ็นเอทั้งสองสายในบริเวณตำแหน่งจำเพาะเอนไซม์ตัดจำเพาะทุกชนิดหลังตัดดีเอ็นเอแล้ว จะให้ปลาย 5′- phosphate และ 3′- hydroxyl ของแต่ละสายดีเอ็นเอในธรรมชาติจะพบเอนไซม์เหล่านี้ในแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งมีหน้าที่ทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามา แต่จะไม่ตัดดีเอ็นเอของตัวเซลล์แบคทีเรียเอง เนื่องจากเบสบางตัวมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิล (modification methylase) ที่เบสจำเพาะนั้น เป็นผลทำให้บริเวณนั้นไม่ใช่บริเวณจดจำของเอนไซม์นั้นๆ อีกต่อไป

การเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการโคลนยีน จะเลือกใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเออยู่ในตำแหน่ง Multicloning site (MCS) ของดีเอ็นเอพาหะเพื่อง่ายต่อการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant clone) ได้ง่าย บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ดังตาราง 1.4 แต่มักมีลักษณะเป็นลำดับเบสที่สมมาตร (palindromic) ยาว 4 – 6 คู่เบส เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ซึ่งได้จาก *Bacillus amyloliquefaciens* H หลังถูกตัดปลายของชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองไม่เท่ากัน เรียกว่าปลายเหนียว (sticky end หรือ cohesive end) โดยปลายที่ยื่นออกมาจะเป็นปลาย 5′ หรือ 3′ ก็ได้ เช่นในกรณี *Bam* HI จะได้ปลาย 5′ ยื่นออกมา (5′- protruding end) แต่ถ้าการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ของสายทั้งสองตรงกัน เช่น *Hpa* I จะได้ปลายทู่ (blunt end) การเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ปลายต่างกันจะมีความสำคัญในการนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้งานต่อ เช่น เมื่อต้องการเปลี่ยนปลายเหนียวให้เป็นปลายทู่โดยใช้ DNA polymerase จะทำได้เฉพาะในชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายยื่นทางด้าน 5′ เท่านั้น

การตัดดีเอ็นเออย่างไม่สมบูรณ์ (partial digestion) จะใช้ในการโคลนยีนจากดีเอ็นเอชิ้นใหญ่ๆ เช่น โครโมโซม ซึ่งไม่ทราบตำแหน่งการตัดของยีนเลย จึงควรเลือกใช้เอนไซม์ตัดยีนที่เหมาะสมและไม่ตัดบริเวณยีนที่ต้องการ และให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ใหญ่พอเหมาะอีกด้วย จึงนิยมทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีการจดจำเพียง 4 คู่เบส ตัวที่นิยมใช้กันมากคือ *Sau*3AI ซึ่งจะได้ปลายเป็น ↓GATC ซึ่งสามารถต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Bgl* I การตัดดีเอ็นเออย่างไม่สมบูรณ์อาจทำได้โดยวิธีจำกัดปริมาณเอนไซม์แต่ไม่จำกัดเวลา หรือจำกัดเวลาแต่ไม่จำกัดปริมาณเอนไซม์ก็ได้

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์หลายชนิด เราสามารถตัดดีเอ็นเอโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 – 3 ตัว ไปพร้อมๆ กัน โดยมีเงื่อนไขคือ ต้องเลือกใช้เอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน และที่อุณหภูมิเดียวกันหรือ อาจเลือกใช้บัฟเฟอร์ชนิดที่อาจเหมาะกับเอนไซม์ตัวหนึ่งมาก (ทำงานได้ 100% ในบัฟเฟอร์นั้น) แต่ไม่เหมาะกับเอนไซม์อีกชนิดที่ใช้ตัดดีเอ็นเอร่วมกัน (อาจทำงานได้ 50 – 80% ในบัฟเฟอร์แรก) แก้ไขโดยอาจใช้เอนไซม์ตัวที่สองมากกว่าตัวแรกเล็ก

น้อย แต่ปริมาณเอนไซม์ไม่มากเกินไป เพราะสิ้นเปลืองและอาจเกิดการตัดชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่งอื่นที่มิใช่ตำแหน่งจดจำ เรียกว่า Star activity

ตาราง 1.5 ตัวอย่างบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ[21]

Enzyme	Recognition site	Type of cut end
Eco RI	G↓A-A-T-T-C	5'-Phosphate extension
	C-T-T-A-A↑G	
Bam HI	G↓G-A-T-C-C	5'-Phosphate extension
	C-C-T-A-G↑G	
Pst I	C-T-G-C-A↓G	3'-Phosphate extension
	G↑A-C-G-T-C	
Sau 3I	↓G-A-T-C	5'-Phosphate extension
	C-T-A-G↑	
Pvu II	C-A-G↓C-T-G	Blunt end
	G-T-C↑A-T-C	
Hpa I	G-T-T↓A-A-C	Blunt end
	C-A-A↑T-T-G	
Hae III	G-G↓C-C	Blunt end
	C-C↑G-G	
Not I	G↓C-G-G-C-C-G-C	5'-Phosphate extension
	C-G-C-C-G-G-C↑G	

1.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ[28]

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้เมื่อมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตบนปลาย 5′ กับหมู่ไฮดรอกซิลบนปลาย 3′ ของโมเลกุลดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาการสร้างพันธะดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ไลเกส (Ligases) เป็นตัวเร่ง พบว่ามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ i และ j

เมื่อ i คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอทั้งหมด โดยจะหมายถึงทั้งปลาย 5′ และ 3′ ของดีเอ็นเอทุกโมเลกุลในปฏิกิริยา

j คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอปลายหนึ่ง (5′ หรือ 3′) เฉพาะที่อยู่ใกล้กับปลายตรงข้าม (5′ หรือ 3′) ของโมเลกุลเดียวกัน ค่า j จึงเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอยิ่งโมเลกุลดีเอ็นเอยาวเท่าใดยิ่งทำให้ปลายทั้งสองมีโอกาสเข้าใกล้กันน้อยลงเท่านั้น และค่า j ยังเป็นค่าคงที่เฉพาะสำหรับโมเลกุลหนึ่งๆ และไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยานั้นๆ

ทางทฤษฎีสามารถใช้ค่า i และ j เข้าช่วยในการทำนายผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอในแต่ละปฏิกิริยา คือ

เมื่อ i = j (j/i = 1)	เป็นภาวะที่โอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองเป็นวงกลมมีสูงเท่าๆ กับโอกาสที่โมเลกุลดีเอ็นเอทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมกันเป็นเส้นตรง
เมื่อ j > i (j/i > 1)	เป็นภาวะซึ่งโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกันจะมาเชื่อมต่อกันเองมีมากกว่า
เมื่อ j < i (j/i < 1)	เป็นภาวะซึ่งโอกาสที่ปลายของโมเลกุลทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงมีมากกว่า

ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสมซึ่งเป็นการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จะต้องคำนึงถึงค่า i และ j ของทั้งดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอนั้นๆ โดยทั่วไปค่า i ต้องสูงกว่าค่า j ประมาณ 2 ถึง 3 เท่า และความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายต้องมากกว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอพาหะ 2 เท่า จึงจะได้ดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ แต่ในทางปฏิบัติการคำนวณค่า i และ j เป็นเรื่องไม่ง่าย เพราะบางครั้งผู้ทดลองมีปริมาณดีเอ็นเออยู่น้อยเกินกว่าจะวัดปริมาณได้แน่นอน และในการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการเชื่อมต่อ อาจทำให้ปลายบางปลายของดีเอ็นเอชำรุดไม่สมบูรณ์สำหรับเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะได้ จึงไม่สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอได้อย่างถูกต้อง

ดังนั้นในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั่วๆไป จึงมักคะเนให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอเป้าหมายมีอัตราส่วนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 กล่าวคือ ใช้ดีเอ็นเอพาหะในปริมาณเท่ากับหรือน้อยกว่าดีเอ็นเอเป้าหมายนั่นเอง

1.9.1 **ไลเกส**[21,28]

ไลเกสเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างกลุ่มฟอสเฟตบนปลาย 5′ กับกลุ่มไฮดรอกซิลบนปลาย 3′ ของโมเลกุลดีเอ็นเอ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ดีเอ็นเอไลเกส (DNA Ligase) และอาร์เอ็นเอไลเกส (RNA Ligase)

ก. ดีเอ็นเอไลเกส (DNA Ligase)

เอนไซม์ไลเกสชนิดนี้อาจแยกมาจาก *E.coli* เรียกว่า *E.coli* ligase หรืออาจแยกจาก *E.coli* ที่ถูกบุกรุกด้วยฝาจ T_4 เรียกว่า T_4 DNA Ligase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างปลายดีเอ็นเอสายคู่อย่างน้อยสองปลาย เอนไซม์ชนิดนี้สามารถเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้งชนิดปลายเหนียวและปลายทู่ได้ และสามารถซ่อมแซมรอยแหว่ง (Nick) บนสายใดสายหนึ่งบนโมเลกุลดีเอ็นเอได้อีกด้วย ในกรณีที่ต้องการเชื่อมต่อดีเอ็นเอชนิดปลายทู่เข้าด้วยกัน จะต้องให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเอนไซม์ไลเกสในปริมาณที่สูงกว่ากรณีของดีเอ็นเอปลายเหนียว เพราะค่า K_m ของไลเกสเมื่อใช้กับดีเอ็นเอปลายทู่จะมีค่าสูงกว่าเป็น 100 เท่า

ข. อาร์เอ็นเอไลเกส (RNA Ligase)

เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการเชื่อมต่ออย่างเดียวกับดีเอ็นเอไลเกส แต่ที่พิเศษกว่า คือ สามารถเชื่อมต่อกรดนิวคลีอิค ทั้งที่เป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่ได้ และมักนิยมใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอชนิดปลายทู่เข้าด้วยกัน เพราะมีประสิทธิภาพสูงกว่าดีเอ็นเอไลเกส อาร์เอ็นเอไลเกสที่นิยมใช้คือ ทีโฟร์อาร์เอ็นเอไลเกส (T_4 RNA Ligase)

1.9.2 **การเชื่อมต่อดีเอ็นเอโดยไม่มีการดัดแปลงปลายของโมเลกุล**

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั่วๆ ไปมักเป็นการเชื่อมต่อลักษณะต่างๆ ดังต่อไปนี้

ก. การเชื่อมต่อระหว่างปลายเหนียว ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดปลายเหนียวชนิดหนึ่งๆตัดทั้งดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้ปลายทั้งสองของโมเลกุลดีเอ็นเอมีปลายซึ่งเป็นคู่สม (Complementary) กันอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นการเชื่อมต่อปลายเหนียวประเภทนี้จึงกระทำได้ง่ายและรวดเร็ว

ข. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิดกัน แต่ให้ปลายเหนียวอันเป็นคู่สมกันได้

เอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดตัดดีเอ็นเอแล้วให้ปลายเหนียวซึ่งสามารถเป็นคู่สมกับปลายเหนียวที่เกิดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นได้ แม้มีการจดจำลำดับเบสที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ *Bam* HI และ *Bgl* II ปลายเหนียวที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสองสามารถเชื่อมต่อกันได้

สนิทแต่หลังจากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแล้วผลิตภัณฑ์จะสูญเสียตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองไป เพราะลำดับเบสที่ตำแหน่งนั้นๆ ได้ผิดจากเดิมแล้ว

ค. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่

ดีเอ็นเอปลายทู่สามารถเชื่อมต่อกันได้โดยไม่จำกัดว่าเป็นปลายทู่ที่เกิดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด เพราะไม่ต้องอาศัยปัจจัยการเป็นเบสคู่สมซึ่งกันและกัน การเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอปลายทู่จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าดีเอ็นเอปลายเหนียว แต่สามารถกระทำได้โดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเกส และหรือการลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อลงหรือใช้เอนไซม์ทีโฟร์อาร์เอ็นเอไลเกสแทน

1.10 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน[21,24]

การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้ยีนเป้าหมายเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้านที่ต้องการและทำให้ยีนแสดงออก (Express) เพื่อสร้างโปรตีนที่ต้องการ เทคนิคการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันออกไปแต่สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยตรง (transformation) และใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

1.10.1 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยตรง

เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยตรง โดยทำให้เซลล์เจ้าบ้านให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอกก่อน (competent cell) โดยใช้สารเคมีบางชนิด เช่น แคลเซียมคลอไรด์หรือไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+}, Rb^{+}, Co^{2+}, K^{+} และไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) เป็นต้น นำเซลล์ที่อยู่ในสภาวะพร้อมนี้มาใส่รวมกับพลาสมิดที่ตัดต่อกับดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 0°C ดีเอ็นเอจากพลาสมิดจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) จากผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน แล้วจึงทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยนำไปแช่ที่อ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอจะแทรกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้

ประสิทธิภาพของการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น รูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอสายผสม ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ และวิธีที่ทำให้เซลล์เป็น competent เป็นต้น ดีเอ็นเอสายผสมที่รูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันเป็นเกลียวซ้อน (supercoil) จะเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าดีเอ็นเอสายผสมที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรงหรือวงแหวนปลายเปิดและดีเอ็นเอสายผสมที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอสายผสมที่มีขนาด

ใหญ่ ถ้าดีเอ็นเอสายผสมใหญ่กว่า 15 กิโลเบส ประสิทธิภาพจะต่ำมาก ระยะของเซลล์ที่ดีที่สุดสำหรับการทำเป็นคอมพิเทน คือ เซลล์เจริญในระยะลอคเฟส (log phage)

ดีเอ็นเอของฝาจที่มีขนาดเล็ก เช่น M13 การนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธีทรานสฟอร์มเมชัน เช่นเดียวกับพลาสมิด แต่เรียกว่า ทรานเฟคชัน (transfection) เนื่องจากวิธีการเลี้ยงเซลล์หลังจากใส่ดีเอ็นเอและผลที่ได้ต่างกัน คือ เกิด plaque แทนที่จะเป็นโคโลนี

สำหรับฝาจแลมบ์ดาหรือคอสมิด ซึ่งมีขนาดใหญ่จึงไม่สามารถใส่ชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรงได้เพราะประสิทธิภาพต่ำ จึงใช้วิธีการบรรจุในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจก่อนเพื่อสร้างอนุภาคฝาจ แล้วจึงนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธีบุกรุกเข้าสู่เซลล์เหมือนฝาจทั่วไป เรียกว่า ทรานส-ดักชัน (transduction)

1.10.2 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยวิธีกระแสไฟฟ้า

เป็นการนำกระแสไฟฟ้ามาทำให้เซลล์เจ้าบ้านเกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ เพื่อให้ดีเอ็นเอมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้เรียกว่า electroporation ซึ่งจะต้องใช้กระแสไฟฟ้าและเวลาที่พอเหมาะ ถ้ากระแสไฟฟ้าสูงหรือนานเกินไปเซลล์เจ้าบ้านอาจตายได้ แต่ถ้าใช้ขนาดของกระแสไฟฟ้าและเวลาที่พอเหมาะ ดีเอ็นเอจะมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการจะนำเข้าสู่เซลล์ไม่จำกัดเหมือนทรานสฟอร์มเมชันแบบเดิม และมีประสิทธิภาพดีกว่า

1.11 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์[28]

หลังจากการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้ว เซลล์เจ้าบ้านที่รับดีเอ็น-เอเข้าไปเรียกว่า ทรานสฟอร์มแมนท์ (Transformants) วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการจากเซลล์ทั้งหมดนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับดีเอ็นเอพาหะที่ใช้และที่มาของโคลน ในขั้นตอนแรกจะต้องคัดเลือกโคโลนี ทรานสฟอร์มแมนท์ออกจากโคโลนีของเซลล์ที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอ (Non – transformed cell) โดยการผสมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมตาม marker gene บนดีเอ็นเอพาหะที่เลือกใช้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขั้นตอนที่สอง จะต้องคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมออกจากโคโลนีที่ได้รับเฉพาะดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งทำโดยการใช้ marker gene อีกยีนบนดีเอ็นเอพาหะเข้าช่วยในการคัดเลือก โดยอาศัยคุณสมบัติ Insertion activation หรือ Insertion inactivation ของ marker gene นั้น หรืออาจใช้วิธีดูสีของโคโลนี หลังจากนั้นจึงคัดเลือกหาโคโลนีที่มียีนที่ต้องการต่อไป

การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนที่ต้องการสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การคัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic selection) การใช้วิธีทางอิมมิวโนเคมี (Immunochemical method) และการคัดเลือกโดยวิธีตรวจหาดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม (Colony hybridization)

1.11.1 การคัดเลือกจากฟีโนไทป์

การคัดเลือกจากฟีโนไทป์จะใช้กับยีนที่ใส่เข้าไปในดีเอ็นเอพาหะแล้วสามารถแสดงออกได้ในเซลล์เจ้าบ้านนั้นๆ และมีลักษณะที่ปรากฏแตกต่างไปจากลักษณะเดิมของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น การอาศัยดูดโซนใสรอบโคโลนี การเจริญได้หรือไม่บนอาหารพิเศษสำหรับเชื้อที่มียีนนั้นๆ เป็นต้น ทั้งนี้ในการโคลนยีนต้องเลือกใช้ดีเอ็นเอพาหะที่เอื้อให้ยีนที่ต้องการสามารถแสดงออกได้ในเซลล์เจ้าบ้าน คือ มีส่วนของดีเอ็นเอที่จำเป็นในการลอกรหัสและแปลรหัสของยีนดังกล่าว ซึ่งเกิดขึ้นโดยกระบวนการภายในเซลล์เจ้าบ้าน เรียกว่า expression vector เช่น การโคลนยีนใน *E.coli* ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ต้องมีส่วนของโปรโมเตอร์ที่จำเพาะกับการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอร์เรส (RNA polymerase) และมีส่วนการแปลรหัสของ *E.coli* เป็นต้น

1.11.2 การใช้วิธีทางอิมมูโนเคมี

การคัดเลือกโคลนโดยวิธีนี้ ทำได้เมื่อโคลนที่ต้องการแสดงออกได้โดยผลิตโพลีเปปไทด์ หรือโปรตีนที่ถูกต้องซึ่งคล้ายกับวิธีแรก แต่โปรตีนดังกล่าวไม่แสดงฟีโนไทป์ที่เด่นชัด จึงไม่สามารถคัดเลือกได้โดยตรงต้องมีแอนติบอดีและสารรังสี คือ I^{125} การติดตามหาโปรตีนหนึ่งๆ จะใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนนั้นเป็นตัวติดตามตัวแรก แล้วตามด้วยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยสารรังสี I^{125} หรือใช้โปรตีนเอ (Protein A) ที่ติดฉลากสารรังสี I^{125} เป็นตัวติดตามแอนติบอดีตัวแรกอีกครั้งหนึ่ง โปรตีนที่สนใจนั้นจะให้สัญญาณของสารรังสีเป็นจุดดำบนฟิลม์เอ็กซเรย์หลังผ่านขบวนการออโตเรดิโอกราฟฟี (Autoradiography) ซึ่งสามารถเลือกโคโลนีนั้นมาผลิตโปรตีนจำนวนมากต่อไป

1.11.3 การคัดเลือกโดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม

การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งต่อเชื่อมอยู่กับดีเอ็นเอพาหะที่เพิ่มจำนวนอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย ทำโดยใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนใดส่วนหนึ่งของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นตัวตรวจสอบ เรียกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอนี้ว่า probe วิธีนี้ใช้เมื่อโคลนที่ต้องการไม่แสดงลักษณะใดๆ หรืออาจจะผลิตโพลีเปปไทด์จำเพาะได้หรือไม่ก็ตามและอยู่ในดีเอ็นเอพาหะชนิดใดก็ได้ โดยขั้นตอนแรกจะเป็นการย้ายโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบไปไว้บนแผ่นเมมเบรนแล้วจะย่อยสลายโคโลนีของแบคทีเรียให้เหลือเฉพาะดีเอ็นเอเกาะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรน ขั้นตอนที่สองอาศัย probe ติดฉลากเข้าติดตามและเกาะยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ปะปนอยู่กับดีเอ็นเอของแบคทีเรียบนแผ่นเมมเบรน ขั้นตอนที่สามเป็นการตรวจหา probe ที่เกาะติดกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Probe – DNA hybrids) ด้วยขบวนการออโตเรติโอกราฟฟี หรือ การตรวจสอบสารปลอดรังสี (Colorimetric & Chemiluminescent detection)

แผ่นเมมเบรนสามารถใช้แผ่นเมมเบรนไนลอน (Nylon), แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) หรือกระดาษกรอง Whatman 541

1.12 เทคนิคอื่นๆ ทางพันธุวิศวกรรม

ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ หรือยีนที่โคลนได้สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการหรือเทคนิคต่างๆ ทางพันธุวิศวกรรม ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์หรือยีนเป้าหมายมากขึ้น

1.12.1 การทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส[27]

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีประจุบนโมเลกุล โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าไปยังอิเล็กโทรดด้วยอัตราเร็วไม่เท่ากัน ขึ้นกับประจุและขนาดของโมเลกุลนั้นๆ ประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปตามทิศทางของสนามไฟฟ้าและประจุลบจะเคลื่อนที่สวนทางกับสนามไฟฟ้า สำหรับกรดนิวคลีอิคที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นประจุลบในโมเลกุล เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะถูกแรงเคลื่อนไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก นอกจากนี้ยังขึ้นกับสารตัวกลางที่กรดนิวคลีอิคเคลื่อนผ่าน โดยตัวกลางนี้จะแช่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่าน บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น Tris – glycine, Tris – acetate, Tris – phosphate และ Tris – borate ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.05 M ส่วนสารตัวกลางที่นิยมใช้แยกดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ มี 2 ชนิด คือ

ก. Agarose gel เป็นอนุพันธ์ของ galactopyranose ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล นิยมใช้แยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ สามารถแยกกรดนิวคลีอิคที่มีขนาดตั้งแต่ 150 – 50,000 เบส และมักทำในแนวราบ (Horizontal gel electrophoresis)

ข. Polyacrylamide เป็นโพลิเมอร์ของ Acrylamide ซึ่งสามารถแยกสารชีวโมเลกุลขนาดกลางถึงขนาดเล็ก จึงนิยมใช้แยกกรดนิวคลีอิคที่มีขนาดตั้งแต่ 5 – 600 เบส โดยทำในแนวตั้ง (Vertical gel electrophoresis)

อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิคจะขึ้นอยู่กับ

- ขนาดของกรดนิวคลีอิค กรดนิวคลีอิคที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ช้ากว่าขนาดเล็ก โดยระยะทางที่กรดนิวคลีอิคเคลื่อนที่จะผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิค
- รูปร่างของกรดนิวคลีอิค แม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน กรดนิวคลีอิคที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน โดยรูปร่างวงกลมที่ขดเป็นเกลียว (superhelical

circular DNA) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้น (linear DNA) ส่วนดีเอ็นเอวงกลมที่คลายเกลียว (open circular หรือ nick circular DNA) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด

- ความเข้มข้นของเจล เจลที่มีความเข้มข้นน้อยจะมีช่องระหว่างโมเลกุลใหญ่ ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้เร็วกว่าเจลที่มีความเข้มข้นมาก ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นน้อยจึงเหมาะสมที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และเจลที่มีความเข้นข้นมากเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก ดังตาราง 1.6

ตาราง 1.6 ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Agarose และ Acrylamide ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิคโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส[27]

ชนิดของ matrix	Percentage (%w/v)	Optimal range of separation linear DNA (bases)
Agarose	0.6	1000 – 20000
	0.8	600 – 8000
	1.0	400 – 7000
	1.2	300 – 6000
	1.5	200 – 3000
Acrylamide	3.5	100 – 1500
	5.0	80 – 500
	8.0	60 – 400
	12.0	40 – 200
	15.0	25 – 150
	20.0	6 – 100

1.12.2 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing)[28]

การหาลำดับเบสมี 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีใช้เอนไซม์ วิธีทั้งสองอาศัยหลักการแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเมื่อมีสารยูเรียอยู่ด้วย เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ และทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เป็นสัดส่วนกับขนาดของโมเลกุล โดยไม่ขึ้นกับชนิดของเบสที่มีในชั้นดีเอ็นเอนั้นๆ โดยบอกความแตกต่างได้ แม้ว่าดีเอ็นเอแต่ละชิ้นจะมีขนาดต่างกันเพียง 1 เบส เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอดังกล่าวยาวไม่มากนัก ประมาณไม่เกิน 500 เบส

ก. การหาลำดับเบสโดยวิธีเคมี (Chemical sequencing)

เป็นการใช้ปฏิกิริยาที่จำเพาะสำหรับเลือกตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบสใดเบสหนึ่งหรือสองเบส โดยทำลายเบสเหล่านั้นออกจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์แล้วจึงตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ออกภายหลัง ขั้นตอนแรกนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสมาแยกให้บริสุทธิ์ ติดฉลากที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งแล้วแยกดีเอ็นเอมา 1 สาย เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ติดปลายข้างหนึ่งจำนวนมากพอแล้ว จึงนำมาแบ่งออกเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนนำมาทำปฏิกิริยาเพื่อตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะ ที่เบส G, G และ A, C และ T หรือ C ตามลำดับ โดยปฏิกิริยาแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- นำดีเอ็นเอในแต่ละส่วน มาทำปฏิกิริยากับสารจำพวกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสใดเบสหนึ่งหรือ 2 เบส ดังตาราง 1.7
- กำจัดเบสนั้นออกจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์
- ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ตรงตำแหน่งที่ไม่มีเบสออก

ตาราง 1.7 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเพื่อตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะ[22]

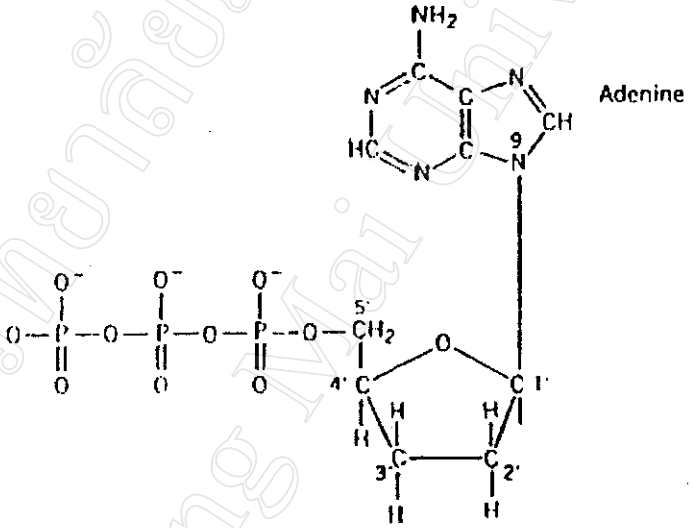
ชนิดของเบส	สารที่ทำปฏิกิริยากับเบส	สารที่ใช้กำจัดเบส	สารที่ใช้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์
1. G	dimethyl sulfate	piperidine	piperidine
2. G+A	acid	acid	piperidine
3. T+C	hydrazine	piperidine	piperidine
4. C	hydrazine+NaCl	piperidine	piperidine

จากการทำปฏิกิริยาแบบสุ่มในแต่ละหลอด ทำให้เกิดการตัดสายโพลีคลีโอไทด์ได้ขนาดต่างๆ กัน เมื่อนำผลที่เกิดขึ้นในหลอดทั้ง 4 ไปแยกโดยทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์ในแถวติดกัน แล้วถึงนำเจลที่ได้ไปทำให้แห้งบนกระดาษกรอง ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละแถวโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟจะปรากฏแถบสีดำในแต่ละแถวซึ่งแปลผลเป็นลำดับต่างๆ เรียงจากปลายที่ติดสลากไว้ โดยอ่านจากแถบล่างสุดไปยังด้านบนตามลำดับ

ข. การหาลำดับเบสโดยวิธีใช้เอนไซม์ (Enzymatic sequencing)

เป็นการใช้เอนไซม์ DNA polymerase I สร้างดีเอ็นเอสายคู่สมขึ้นมา การทำงานของเอนไซม์ต้องอาศัยไพรเมอร์ (primer) ในการเริ่มต้น แล้วจึงค่อยๆ ต่อเบสเข้าไปทางปลาย 3′

ของไพรเมอร์ การต่อสายนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์นี้จะหยุดที่เบสจำเพาะแต่ละเบสโดยเติมสาร 2′, 3′ - ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ดังรูป 1.16 ลงไป โดยปกติการต่อสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ต้องอาศัยไพรเมอร์หรือชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลาย 3′ เป็นหมู่ไฮดรอกซี ในการใช้นิวคลีโอไทด์ที่เป็นไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์จะทำให้การสังเคราะห์สิ้นสุดลงเนื่องจากขาดหมู่ไฮดรอกซี วิธีนี้อาจเรียกอย่างหนึ่งว่า dideoxy chain terminating method เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ DNA polymerase I สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 5′ ได้ด้วย (5′→3′ exonuclease) ต่อมาจึงนิยมใช้เอนไซม์ Klenow ทำปฏิกิริยา วิธีปฏิบัติทำดังนี้



รูป 1.16 ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต ddATP[21]

- เตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสให้อยู่ในรูปสายเดี่ยว เช่น จากการโคลนในฝาจ M13 หรือในพลาสมิดที่สร้างพลาสมิดสายเดี่ยวได้

- เตรียมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ โดยมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ถ้าโคลนยีนในฝาจ M13 หรือพลาสมิดดังกล่าว โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพร-เมอร์ สามารถสังเคราะห์จากส่วนของดีเอ็นเอพาหะในบริเวณข้างเคียงกับตำแหน่งที่ใช้โคลนยีน ซึ่งมีจำหน่ายเป็นการค้า อาจจะติดฉลากที่ปลาย 5′ ของไพรเมอร์หรือติดฉลากที่นิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้

- แบ่งดีเอ็นเอที่เตรียมได้เป็น 4 ส่วน นำมาทำปฏิกิริยาให้จับคู่กับไพรเมอร์ในหลอด 4 หลอดที่มีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด และไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่ง และใส่เอนไซม์ จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในทั้ง 4 หลอด โดยมีการหยุดสังเคราะห์แบบสุ่มที่เบสชนิดใดชนิดหนึ่งในแต่ละหลอด เนื่องจากมีการแข่งขันระหว่างดีออกซีนิวคลีโอไทด์และไดดีออกซี-นิวคลีโอไทด์ชนิดนั้นๆ ดังรูป 1.19 นำผลที่ได้จากปฏิกิริยาทั้ง 4 หลอดมาแยกวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วตรวจสอบด้วยออโตเรดิโอกราฟเช่นเดียวกับวิธีทางเคมี

ปัจจุบันได้พัฒนาการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งมีความรวดเร็วและสะดวกมากขึ้น ซึ่งพัฒนามาจากการหาลำดับเบสโดยวิธีใช้เอนไซม์ โดยประยุกต์ใช้สารเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถจะตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติอ่านลำดับเบส และบันทึกผลโดยคอมพิวเตอร์

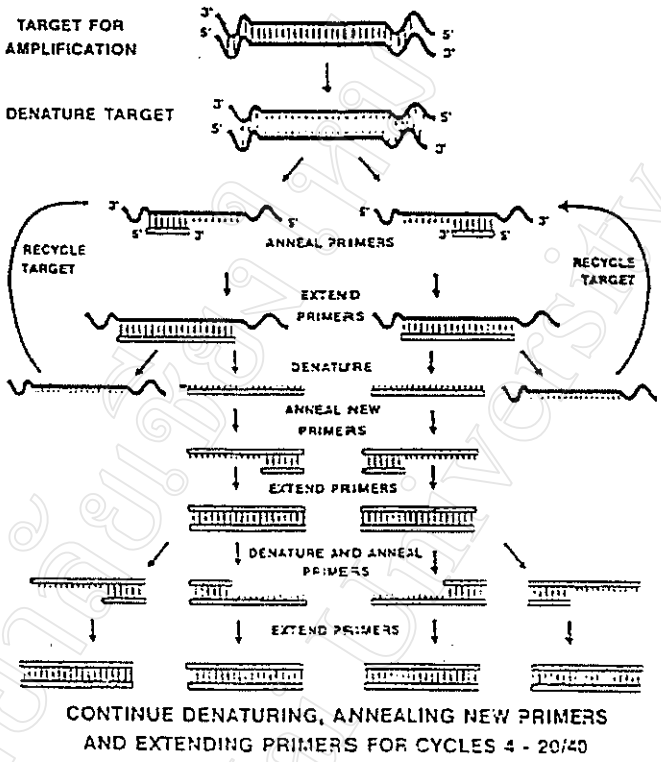
1.12.3 **เทคนิคการทำ PCR**[27]

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือเรียกอีกชื่อว่า In Vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาไม่นานนัก ใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง หลักการทำ PCR แสดงดังรูป 1.17 คือขั้นตอนแรกต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจก่อน อาจทราบเฉพาะช่วงปลายของยีนนั้นก็ได้ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ 2 สาย แต่ละชนิดจะมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3′ ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ ไพรเมอร์อาจมีความยาว 20 - 35 เบส ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Template DNA), เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxyribonucleotide triphosphate : dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

ก. ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน (Denaturation) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95°C

ข. ขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 – 55 °C เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกัน (Annealing)

ค. ขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจากปลาย 5′ ไป 3′ (Primer extension) อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70 - 75°C



รูป 1.17 PCR Amplification ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ Denaturation, Annealing และ Primer extension

การสังเคราะห์ดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 - 30 รอบทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งเรียกว่า แอมพิคอน (Amplicon) เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากเป็นล้านๆ เท่า (2^n)