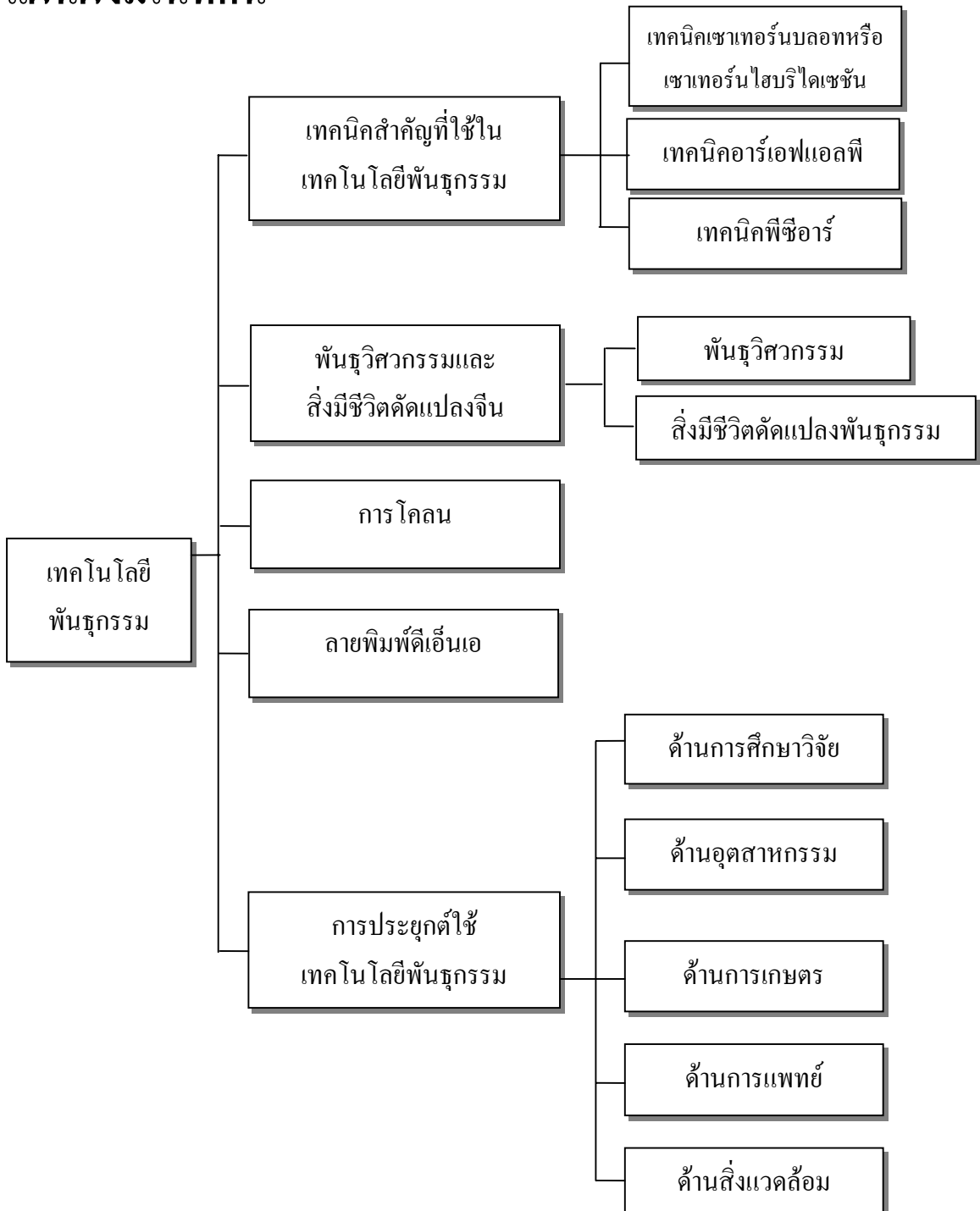


แผนผังมโนทัศน์



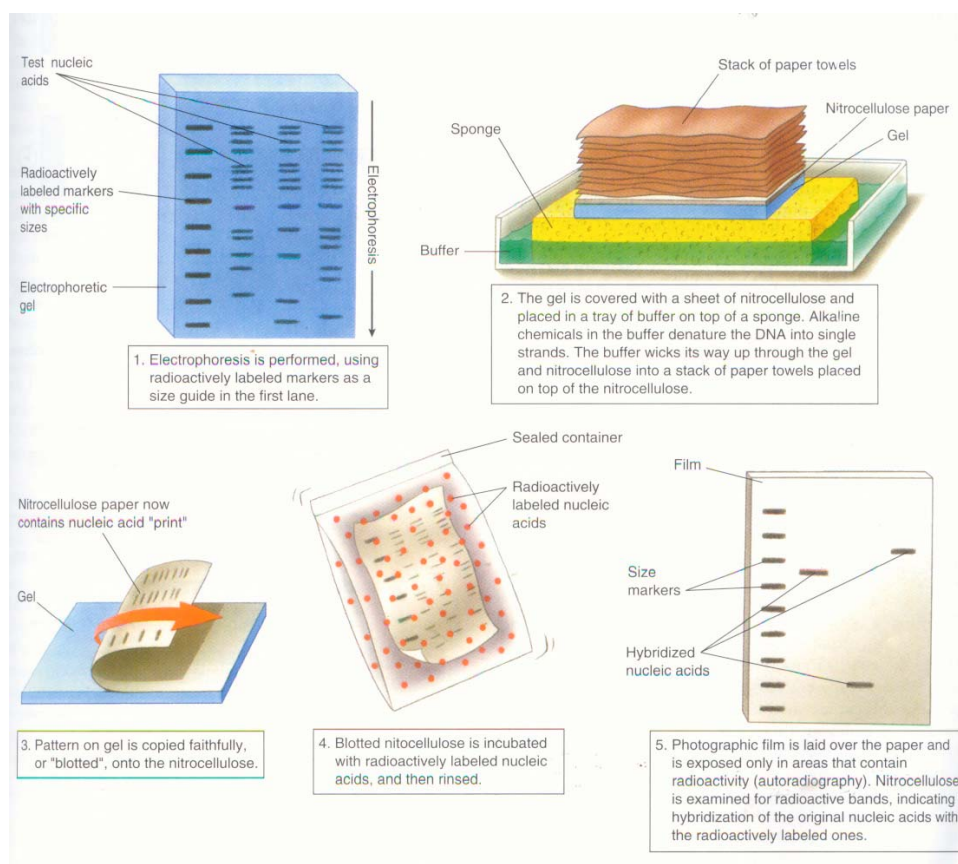
เทคนิคสำคัญที่ใช้ในเทคโนโลยีพันธุกรรม

นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบเทคนิคที่นำมาใช้ในเทคโนโลยีพันธุกรรมมากมายหลายเทคนิค ที่สำคัญและจะกล่าวถึงในบทเรียนนี้ ได้แก่ เทคนิคเซาเทอร์น บลอต หรือเซาเทอร์น ไฮบริไดเซชัน เทคนิคอาร์เอฟแอลพี และเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคเซาเทอร์น บลอต หรือเซาเทอร์น ไฮบริไดเซชัน

ปี ค.ศ. 1975 เอ็ดเวิร์ด เซาเทอร์น (Edward Southern) เป็นผู้ค้นพบเทคนิคเซาเทอร์น บลอต (Southern blotting) หรือเซาเทอร์น ไฮบริไดเซชัน (Southern hybridization) โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอเป้าหมาย แล้วตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากหรือมีสารกัมมันตรังสี และมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จึงทำให้เกิดไฮบริไดเซชัน (Hybridization) ของดีเอ็นเอ เทคนิคเซาเทอร์น บลอต หรือเซาเทอร์น ไฮบริไดเซชัน มีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้ (ดูภาพ 7-1 ประกอบ)

1. การแยกขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บนแผ่นวุ้น (Gel) ด้วยวิธีการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า (Electrophoresis)
2. การแยกดีเอ็นเอเป้าหมายสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยนำแผ่นวุ้นซึ่งมีแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางแนบอยู่ด้านบน วางบนแผ่นฟองน้ำซึ่งแช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใส่อยู่ในถาด สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างจะทำให้สายของดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว
3. ทำให้ดีเอ็นเอจากแผ่นวุ้นเคลื่อนที่ไปจับกับแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยอาศัยหลักการดูดซับทำให้สารละลายบัฟเฟอร์ด้านล่างซึมผ่านแผ่นวุ้น และแผ่นไนโตรเซลลูโลส ไปจนถึงชั้นกระดาษกรองแห้งด้านบน ขณะเดียวกันจะพาดีเอ็นเอจากแผ่นวุ้นไปติดกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย
4. การทำให้เกิดไฮบริไดเซชัน โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากกัมมันตรังสีจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากมีเบสคู่สมกัน
5. ตรวจสอบแถบกัมมันตรังสีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยเอาแผ่นไนโตรเซลลูโลสนำไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะปรากฏแถบที่แสดงถึงการเกิดไฮบริไดเซชันบนฟิล์มเอกซเรย์

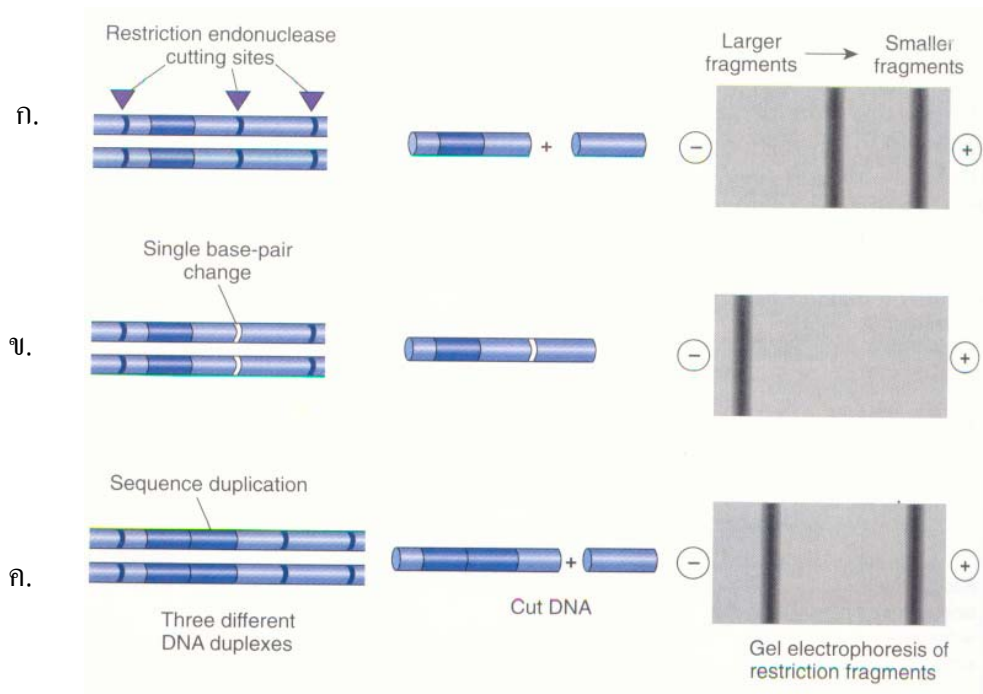


ภาพ 7-1 แสดงขั้นตอนของเทคนิคเซาเทอร์น บลอตไฮบริไดเซชัน

(Raven and Johnson. 2002 : 399)

เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

เทคนิคอาร์เอฟแอลพี เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอาศัยเทคนิคเซาเทอร์นบลอต ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างการใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (ดูภาพ 7-2 ประกอบ)



ภาพ 7-2 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพี

ก. ดีเอ็นเอปกติ

ข. ดีเอ็นเอที่เบสเปลี่ยนไปหนึ่งคู่

ค. ดีเอ็นเอที่มีชุดของเบสเพิ่มขึ้น

(Raven and Johnson, 2002 : 400)

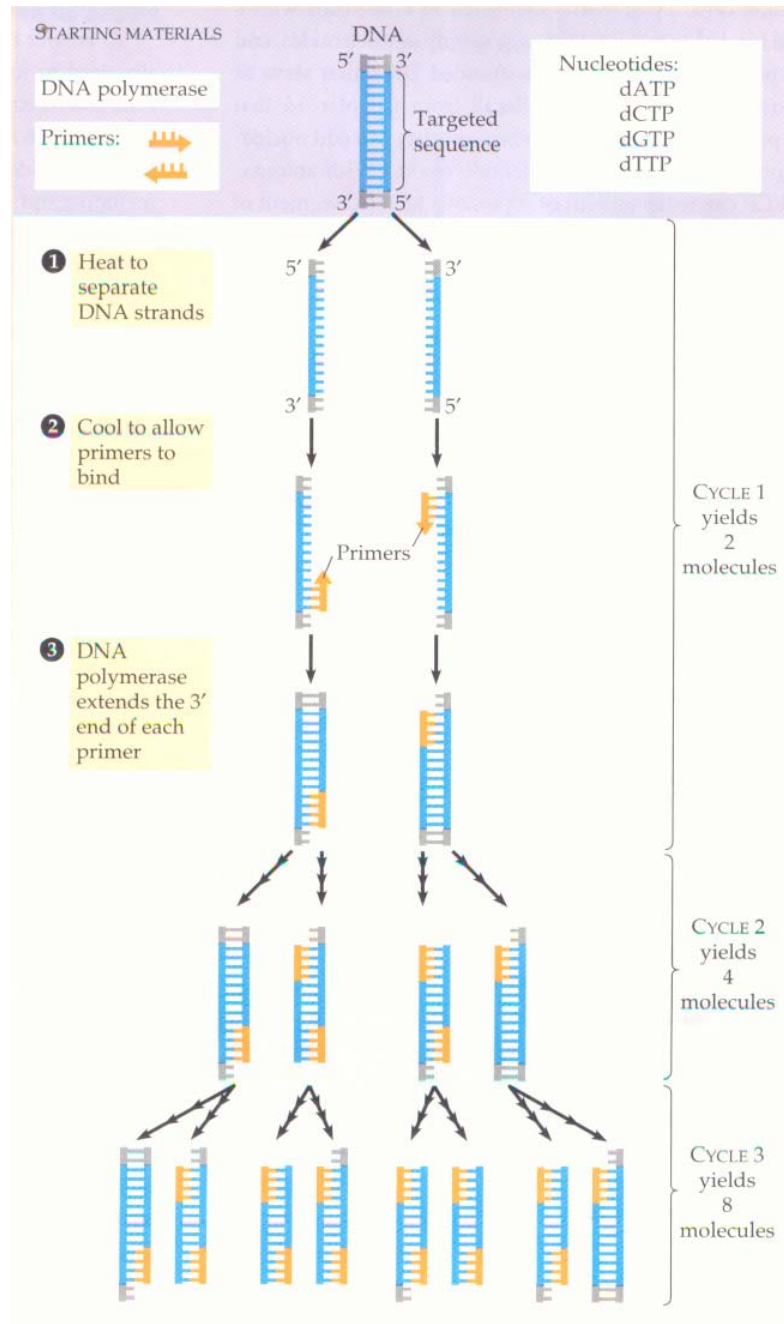
สมมติใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ **เอนโดนิวคลีเอส** (Endonuclease) ตัดดีเอ็นเอสายคู่ปกติ (ภาพ 7-2 ก.) สามารถตัดดีเอ็นเอออกได้เป็น 2 ชิ้นส่วน หรือมีจุดตัดของเอนไซม์ 3 จุด เมื่อเกิดการกลายที่เกิดจากเบสเปลี่ยนไปหนึ่งคู่ (ภาพ 7-2 ข.) มีผลทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะเอนโดนิวคลีเอสไม่สามารถตัดดีเอ็นเอได้ และเมื่อเกิดการกลายเนื่องจากมีชุดของเบสเพิ่มขึ้น (ภาพ 7-2 ค.) ทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะเอนโดนิวคลีเอสตัดดีเอ็นเอออกได้เป็น 2 ชิ้นส่วน หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอไปแยกขนาดด้วยการใช้กระแสไฟฟ้า เมื่อใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากกัมมันตรังสีทำการตรวจสอบโดยการทำให้เกิดไฮบริดเชชันกับดีเอ็นเอปกติและดีเอ็นเอที่เกิดการกลาย จะปรากฏแถบกัมมันตรังสี ดังภาพ 7-2 แถวขวา

เทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคพีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์(Polymerase chain reaction, PCR)ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1984 โดยดร.มัลลิส (Mallis) และคณะ ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกัน เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแบบวงจร โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ส ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เร็วกว่าการโคลน ที่ใช้พลาสมิดหรือเฟจมาก เทคนิคพีซีอาร์มีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนดังนี้ (ดูภาพ 7-3 ประกอบ)

1. การสลายดีเอ็นเอเป้าหมายสายคู่ซึ่งเป็นแม่แบบ ให้กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
2. การทำให้ไพรเมอร์ดีเอ็นเอจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ
3. การใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ส เช่น แทค พอลิเมอร์ส (Taq polymerase) เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์

ขั้นตอนทั้ง 3 รวมเป็นปฏิกิริยา 1 รอบ ถ้าเริ่มต้นปฏิกิริยาจากดีเอ็นเอแม่แบบ 1 โมเลกุล เมื่อปฏิกิริยานี้ผ่านไป 1 รอบ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นสายคู่ 2 โมเลกุล ถ้าปฏิกิริยานี้ผ่านไป 2 รอบ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นสายคู่ 2^2 หรือ 4 โมเลกุล และถ้าปฏิกิริยานี้ผ่านไป n รอบ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นสายคู่ 2^n โมเลกุล เทคนิคพีซีอาร์มักจะทำให้เกิดปฏิกิริยา 20-40 รอบ ดังนั้นจะได้ดีเอ็นเอ $2^{20} - 2^{40}$ โมเลกุล หลังจากนั้นนำไปแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าในแผ่นวุ้นอะกาโรส (Agarose) หรือ พอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) แล้วย้อมดูแถบดีเอ็นเอด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidiumbromide) หรือซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate)



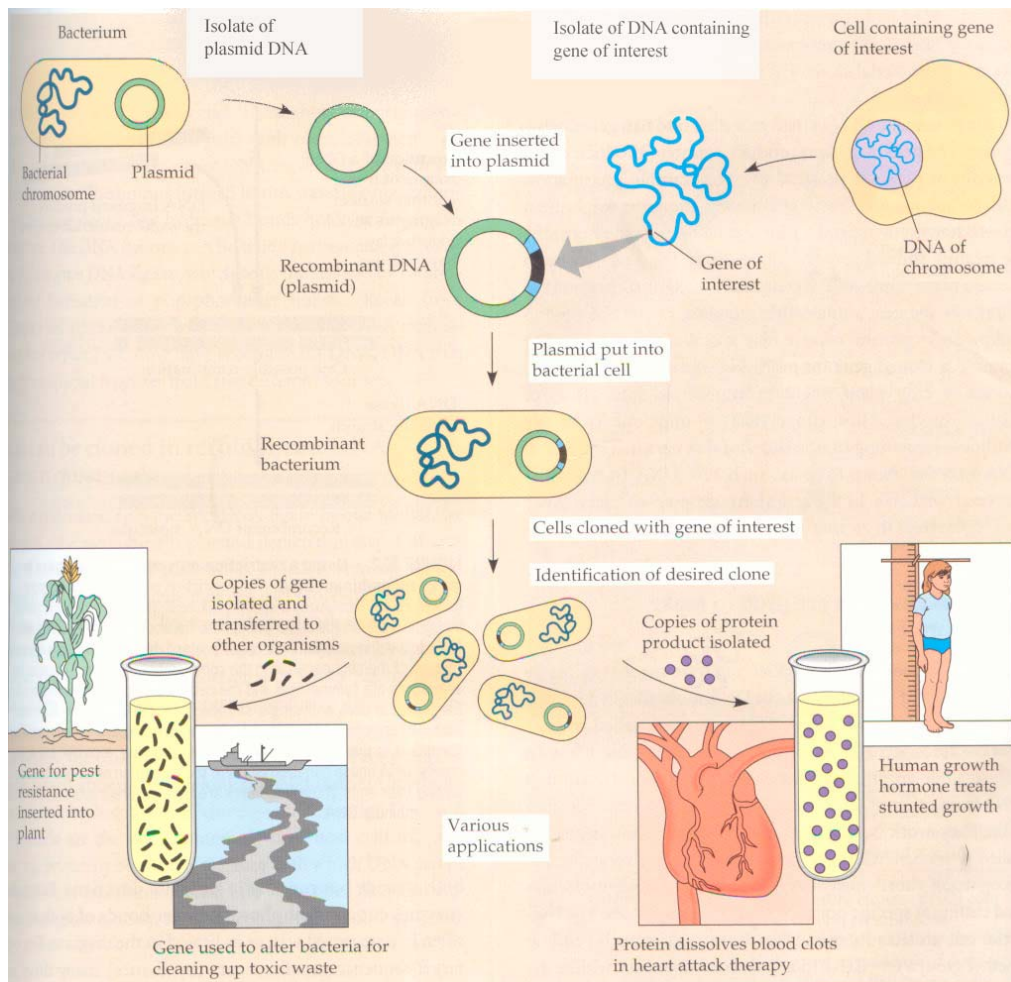
ภาพ 7-3 แสดงขั้นตอนของเทคนิคพีซีอาร์

(Campbell, Reece and Mitchell. 1999 : 371)

พันธุวิศวกรรมและสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม

พันธุวิศวกรรม

พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) หมายถึงเทคโนโลยีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยการตัดต่อจีน รวมทั้งการยับยั้ง การกระตุ้นการแสดงออกของจีน และการใส่สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเข้าไปในเซลล์ เริ่มจากปี ค.ศ. 1970 แฮมิลตัน สมิธ (Hamilton Smith) ค้นพบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดสายดีเอ็นเอ ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสจำเพาะ ต่อมาก็พบเอนไซม์ที่มีสมบัติอย่างเดียวกันนี้อีกหลายชนิด แต่ละชนิดทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอที่จุดจำเพาะต่าง ๆ กัน เอนไซม์เหล่านี้รวมเรียกว่า **เอนไซม์ตัดจำเพาะ** (Restriction enzyme) ต่อมาปี ค.ศ. 1973 เอส. โคเฮน (S.Cohen) และ เอช. บอยเออร์ (H.Boyer) ประสบความสำเร็จในการเชื่อมดีเอ็นเอท่อนสั้น ๆ ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ทำให้เกิดดีเอ็นเอใหม่ เรียกว่า **ดีเอ็นเอสายผสม** (Recombinant DNA, rDNA) การทำให้เกิดดีเอ็นเอสายผสมเปรียบเสมือนการทำงานของวิศวกร เพราะทำหน้าที่ออกแบบสร้างและตัดต่อจีนได้ เทคโนโลยีดังกล่าวจึงเรียกว่า **เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม** (Recombinant DNA technology) เป็นงานทางพันธุวิศวกรรมที่กระทำต่อจีนโดยตรง และถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน โดยมีการทำงานเป็นขั้นตอนดังนี้ (ดูภาพ 7-4 ประกอบ)



ภาพ 7-4 ขั้นตอนการทำเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมและการประยุกต์ใช้

(Campbell, Reece and Mitchell. 1999 : 365)

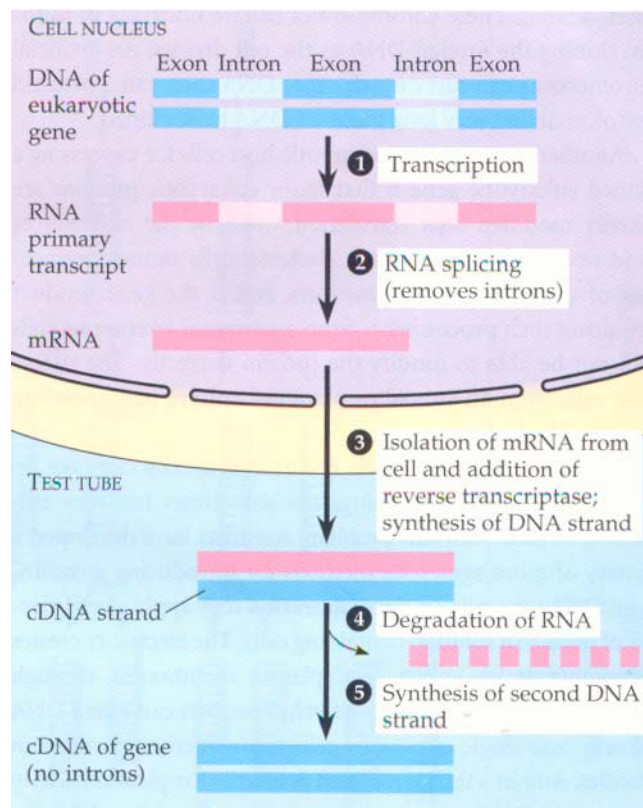
1. การเตรียมจีนหรือสารพันธุกรรม ใช้หลักการพิจารณาเลือกจากสิ่งทีหาง่ายและใช้วิธีการที่ง่าย แยกเป็น

1.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอ มีวิธีการเตรียมแตกต่างกัน ดังนี้

1.1.1 ดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เลือกเตรียมได้จากตับ ม้าม ไต เลือด หรือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร เป็นต้น ถ้าเป็นเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ต้องบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ก่อน ถ้าเป็นเลือดแยกเอาส่วนของเซลล์ก่อน แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกออกเหลือเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาว ถ้าเป็นเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารก็นำมาใช้ได้ทันที จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกโดยใช้สารประกอบพวกดีเทอร์เจนต์ (Detergent) สกัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกด้วยสารละลายฟีนอล แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ หากต้องการให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้นนำไปปั่น (Centrifuge) ในสารละลายซีเซียมคลอไรด์และเอทิลเดิมโบรไมด์

1.1.2 ดีเอ็นเอของพืชเตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ใบ กิ่ง ใบเลี้ยง ต้นอ่อน หรือ **กลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Callus)** เป็นต้น โดยนำส่วนของพืชมาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารดีเทอร์เจนต์อยู่ด้วย สำหรับสกัดดีเอ็นเอแล้วจึงเติมโพแทสเซียมอะซิเตตซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด เพื่อให้ส่วนต่าง ๆ ของเซลล์พืชตกตะกอน นำส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนมากรอง แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้แอลกอฮอล์ จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอของเซลล์สัตว์

1.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอาร์เอ็นเอ ใช้ mRNA ซึ่งสร้างจากจินบางจินที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาหนึ่งและอวัยวะหนึ่งเท่านั้น เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะแรกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ท่อน้ำไขของไก่ เป็นต้น โดยใช้เอนไซม์รีเวิร์ส **ทรานสคริปเทส (Reverse transcriptase)** สกัด mRNA จากเซลล์ดังกล่าวมาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ **คอมพลีเมนทารี ดีเอ็นเอ (Complementary DNA, cDNA)** แล้วจึงใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอช (Rnase H) เอนไซม์นี้จะตัดอาร์เอ็นเอแบบสุ่มภายในสาย จากนั้นใช้อาร์เอ็นเอที่ยังเกาะอยู่กับ cDNA สายแรกเป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA สายที่สอง โดยใช้เอนไซม์ **ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส I (DNA polymerase I)** และใช้เอนไซม์ **4 ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (T4 DNA polymerase)** ตัดอีกครั้ง จะได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่สมบูรณ์ (ภาพ 7-5)



ภาพ 7-5 การสังเคราะห์คอมพลิเมนทารี ดีเอ็นเอ

(Campbell, Reece and Mitchell. 1999 : 369)

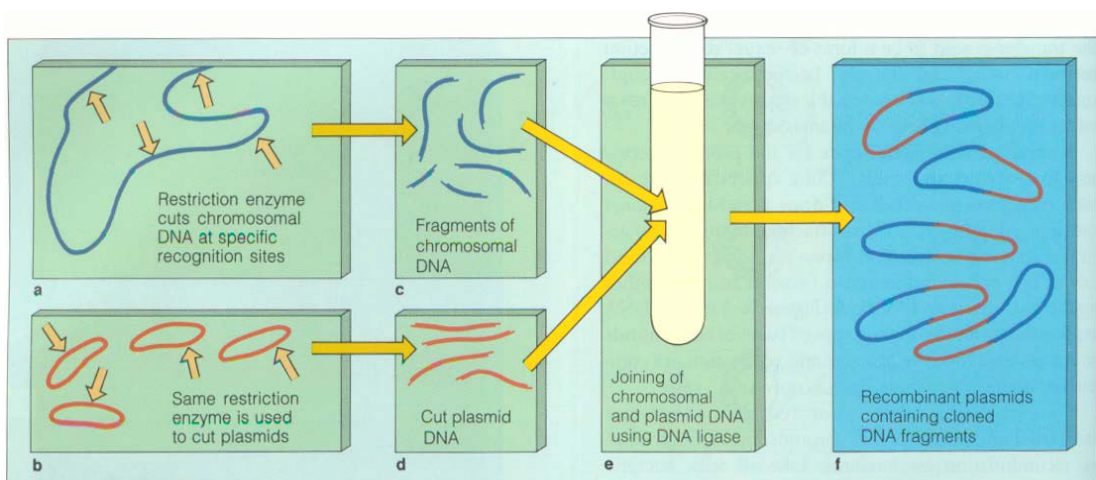
1.3 การเตรียมดีเอ็นเอด้วยการสังเคราะห์ทางเคมี โดยการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide) สายเดี่ยวสั้น ๆ ที่ต่อเนื่องกันสองสาย และมีลำดับเบสที่ซ้อนกันในส่วนที่มีเบสคู่สมกันขึ้นมาก่อน แล้วจึงใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอ **ไลเกส** (DNA ligase) เชื่อมต่อโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ถึง 50 นิวคลีโอไทด์

2. **การโคลนนิ่ง** (Gene cloning) หรือการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning) คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ เรียกว่า **ดีเอ็นเอเป้าหมาย** (Target DNA) ให้มีปริมาณมาก แต่ชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการโคลนนั่นมักจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวในเซลล์ผู้รับได้ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ คือ **ดีเอ็นเอที่เป็นพาหะหรือเวกเตอร์** (Vector) นั้นเอง โดยดำเนินการดังนี้

2.1 การนำชิ้นดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ เช่น พลาสมิด (Plasmid) โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ใช้ตัดดีเอ็นเอ แล้วใช้เอนไซม์ไลเกสเชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ได้เป็นดีเอ็นเอสายผสม

นอกจากใช้พลาสมิดเป็นเวกเตอร์แล้ว อาจใช้เฟจ ซึ่งเป็นไวรัสของแบคทีเรียก็ได้

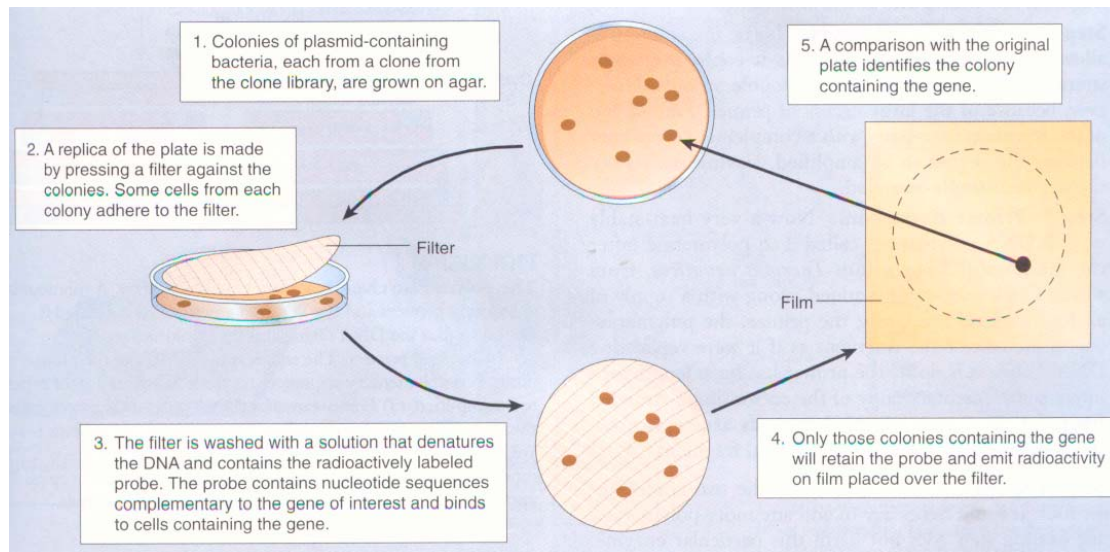
2.2 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ผู้รับที่เหมาะสม เช่น แบคทีเรียอี.โคไล (*E. coli*) โดยใช้สารเคมี เช่น แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 0-42 องศาเซลเซียส หรือใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) เป็นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อทำให้เกิดรูหรือช่องที่เชื่อมหุ้มเซลล์ แล้วจึงนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปในเซลล์ผู้รับ ทำให้เกิดการแปลง (Transformation) และเรียกเซลล์ผู้รับที่มีดีเอ็นเอสายผสมว่า **ทรานสฟอร์มเอนต์** (Transformant) ซึ่งจะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนทำให้เกิดการโคลนดีเอ็นเอ หรือการโคลนจีโนมได้ **ห้องสมุดดีเอ็นเอ** (DNA library) หรือ **ธนาคารยีน** (Gene bank) (ภาพ 7-6)



ภาพ 7-6 การทำห้องสมุดดีเอ็นเอ หรือธนาคารยีน โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม

(Starr and Taggart. 1992 : 248)

2.3 การตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากดีเอ็นเอที่เกิดจากการโคลนมีความแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องเลือกดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขึ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการ โดยการทำโคลนไฮบริไดเซชัน (Colony hybridization) (ภาพ 7-7)



ภาพ 7-7 การทำโคลนีไฮบริดเซชันเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายที่เกิดจากการโคลน

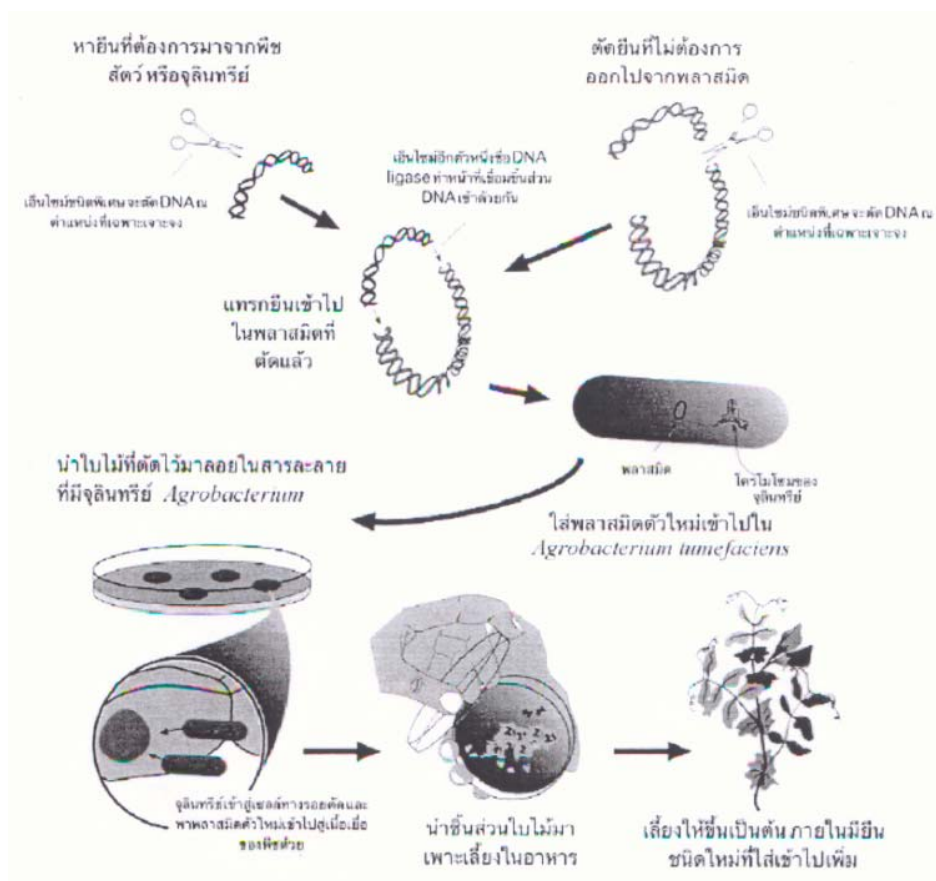
(Raven and Johnson. 2002 : 397)

2.4 สกัดพลาสมิดจากโคลนีดีเอ็นเอเป้าหมาย และนำดีเอ็นเอมาตรวจหาขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า

3. การถ่ายยีนเข้าไปในสิ่งมีชีวิต ต้องเติมโปรโมเตอร์ (Promoter) ซึ่งเป็นส่วนของยีนในยูคาริโอต โปรคาริโอต หรือไวรัสเข้าไปในชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ เพื่อให้ยีนแสดงออกหรือสามารถทำงานได้ในสิ่งมีชีวิตนั้น การถ่ายยีนเข้าไปในสัตว์และพืชจะมีวิธีการเฉพาะ ดังนี้

3.1 การถ่ายยีนในสัตว์ เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สามารถถ่ายยีนเข้าไปได้หลายวิธี เช่น **วิธีการทรานสเฟก** (Transfection) เป็นการใส่สารเคมีซึ่งคล้ายกับการถ่ายโอนในแบคทีเรีย หรือ **วิธีไลโปเฟกชัน** (Lipofection) เป็นการใส่เยื่อไขมันหุ้มชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนทำให้เยื่อไขมันไปรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์และถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์ได้ หรือ **วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน** (Electroporation) วิธีนี้จะเอายีนรวมกับเซลล์ โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูทำให้ยีนสามารถเข้าไปในเซลล์แบบสุ่มได้ หรือ **วิธีการใช้เข็มฉีดยา** (Microinjection) เป็นการใส่เข็มฉีดยาขนาดเล็กฉีดยีนที่ต้องการนำเข้าไปในเซลล์สัตว์โดยตรง เซลล์สัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะไม่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวสัตว์ได้ แต่สามารถสร้างสารบางอย่างหรือแสดงลักษณะบางอย่างออกมาได้ ต่อมาจึงมีการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนในไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว (Fertilized egg) ทำให้ไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว สามารถพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยได้ สัตว์ที่เจริญพัฒนาจากไข่ที่มีการถ่ายยีน เรียกว่า **สัตว์แปลงพันธุ์** (Transgenic animal)

3.2 การถ่ายยีนในพืช จะต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมด้วยโดยเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชตั้งแต่ระดับเซลล์ ใบ ราก ลำต้น กิ่ง ดอก อับเรณู เอ็มบริโอ จนพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ การถ่ายยีนในพืชทำได้หลายวิธี เช่น วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol , PEG) ช่วยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโทพลาสต์เกิดรูทำให้ยีนเข้าไปในเซลล์ได้ วิธีการใช้เข็มฉีดเข้าไปโดยตรงในเซลล์พืช แต่วิธีที่ค่อนข้างได้ผล ได้แก่ วิธีการใช้ปืนยิงหรือเครื่องยิง (Particle gun หรือ Microprojectile bombardment หรือ Biolistic technique) สามารถยิงยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อใด ๆ ของพืชก็ได้โดยไม่ต้องใช้โปรโทพลาสต์ จึงไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนนั้น นอกจากนี้การถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด อาจใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นสื่อในการถ่ายยีน (ภาพ 7-8)



ภาพ 7-8 การใช้ *Agrobacterium* sp. เพื่อถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์พืช

(นเรศ ดำรงชัย, 2543 : 4)

สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม

สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically modified organisms , GMOs) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ผ่านกระบวนการปลูกถ่ายยีน รวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่ถูกเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์เจาะจงไปยังยีนที่ต้องการโดยตรง ค้นหาจีโนมใหม่ หรือใช้ยีนที่ทราบอยู่แล้วว่ามีคุณลักษณะ (Traits) ตามที่ต้องการ ยีนตัวนี้อาจได้มาจากพืชหรือสัตว์ หรือจุลินทรีย์ก็ได้ เมื่อได้ยีนมาแล้วจึงถ่ายยีนดังกล่าวใส่เข้าไปในโครโมโซมที่อยู่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการใช้จุลินทรีย์อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะช่วยพาจีโนมเข้าไป วิธีการใช้ปืนยิงหรือเครื่องยิงยิงเข้าไป เมื่อยีนเข้าไปในเซลล์แล้ว ยีนที่เข้าไปใหม่จะแทรกตัวรวมกับยีนเดิมในโครโมโซม

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์นั้น นักวิทยาศาสตร์จะนำเอายีนที่ต้องการไปผ่านกระบวนการเสริมแต่งเพิ่มเติมตัวช่วย ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการทำงานและยีนที่เป็นตัวบ่งชี้การปรากฏของยีน เรียกว่า **ยีนบ่งชี้** (Marker gene) สำหรับยีนที่ควบคุมการทำงานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ โปรโมเตอร์ (Promoter) กับ เทอร์มิเนเตอร์ (Terminator)

ปัจจุบันนี้โลกมีผลิตภัณฑ์สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช โดยเฉพาะพืชมีการดัดแปลงสารพันธุกรรมค่อนข้างมาก เพราะเมื่อเทียบกับสัตว์แล้วทำได้ง่ายกว่าสามารถถ่ายยีนลักษณะให้แก่รุ่นต่อไปได้หลายรุ่น ใช้เวลาในการศึกษาน้อยกว่าสัตว์ ตัวอย่างพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น มะเขือเทศที่สุกช้า หรือสุกแต่ไม่งอม เนื้อยังแข็งและกรอบ ส้มหรือมะนาวที่มีวิตามินซีมากขึ้น หรือผลไม้ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม ให้ผลมากกว่าเดิม หรือพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคจุลินทรีย์ เป็นต้น ตัวอย่างสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม เช่น หนูดัดแปลงพันธุกรรมที่เกิดจากการเอาจีโนมสร้างฮอร์โมนการเจริญเติบโตของคนใส่เข้าไปจะทำให้มีขนาดใหญ่กว่าหนูปกติ (ภาพ 7-9)



ภาพ 7-9 เปรียบเทียบขนาดของหนูอายุ 10 สัปดาห์

(ซ้าย) หนูปกติ

(ขวา) หนูดัดแปลงพันธุกรรม ที่ถ่ายยีนสร้างฮอร์โมนการเจริญของมนุษย์

(Starr and Taggart. 1992 : 256)

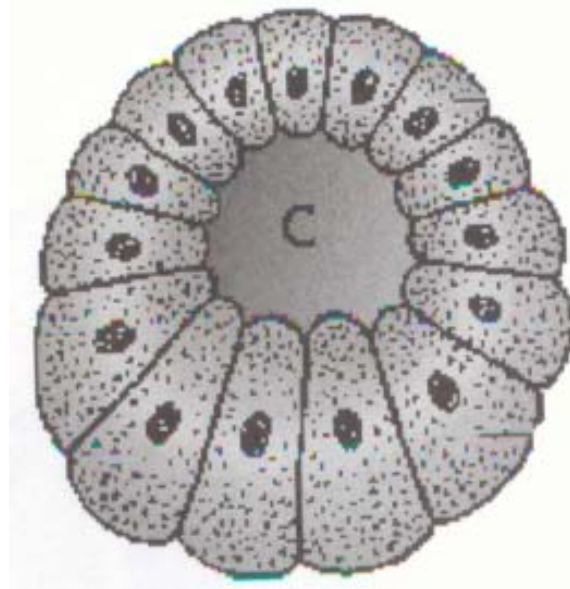
สำหรับมนุษย์กำลังอยู่ในระหว่างการทดลองและพัฒนาการปลูกถ่ายยีน เพื่อช่วยรักษาความผิดปกติทางพันธุกรรมให้แก่ผู้ป่วย เรียกว่า **พันธุกรรมบำบัด** หรือ **ยีนบำบัด** (Gene therapy) ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันโรค การตรวจวินิจฉัยหรือรักษาโรคโดยการนำยีนหรือสารพันธุกรรมปกติใส่เข้าไปภายในเซลล์ ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยโดยการบำบัดด้วยยีนจำเป็นต้องผ่านการรับรองทางคลินิก และต้องคำนึงถึงรายละเอียดต่าง ๆ ให้รอบคอบ เช่น ผลเสีย ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น สาเหตุของการแสดงอาการของโรค ต้องผ่านการทดลองในสัตว์ ต้องมีความปลอดภัย และไม่มีวิธีอื่นรักษาได้แล้ว

การโคลน

การโคลน (Cloning) หมายถึงเทคนิคหรือวิธีการสร้างสิ่งที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันหมด เริ่มตั้งแต่ระดับเล็กไปหาใหญ่ ได้แก่ การโคลนยีน โครโมโซม จีโนม เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ จนถึงสิ่งมีชีวิต เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจะต้องทำการโคลนยีนหรือดีเอ็นเอเสมอ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ปรากฏการณ์ของโคลนที่สามารถพบเห็นได้ทั่วไป ได้แก่ การแตกหน่อของยีสต์ กล้วยกล้วยไม้ ไข่ ข้าว อ้อย การแตกหัวของว่านสี่ทิศ การเกิดไหลของบัวบก การแยกข่า ตะไคร้ จิงไปปลุก การปักชำ ตอนกิ่ง ตัดตา หรือทาบกิ่ง นอกจากนี้ยังมีการโคลนที่ทำการค้า เช่น การปั่นตากกล้วยไม้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้เกิดต้นไม้จำนวนมาก

นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามทดลองการโคลนสัตว์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1952 โรเบิร์ต บริกกส์ (Robert Briggs) และทอมัส คิง (Thomas King) ได้ย้ายนิวเคลียสของเซลล์กบที่เป็นตัวอ่อนระยะบลาสตูลา (Blastula) (ภาพ 7-10) ใส่ในไข่กบที่เอานิวเคลียสออกแล้ว พบว่าสามารถสร้างลูกอ๊อดได้เป็นจำนวนมาก จากนั้นมีการโคลนกบโดยใช้เซลล์ลำไส้จากตัวอ่อนระยะบลาสตูลา เป็นเซลล์แม่แบบ

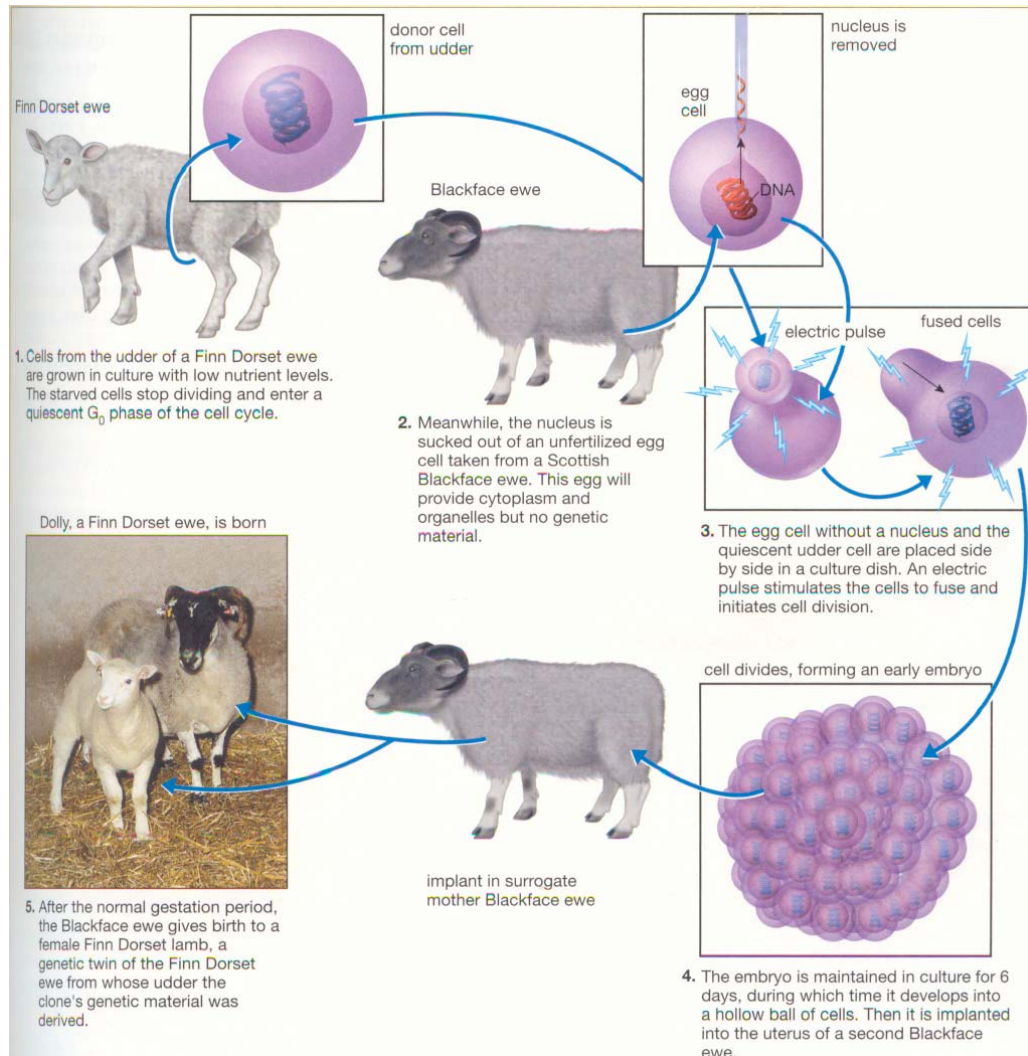


ภาพ 7-10 ตัวอ่อนระยะบลาสตูลาของกบ

(ขงยุทธ ยุทธวงศ์ และสุกชัช หล่อโลหการ. 2544 : 22)

จนกระทั่งปี ค.ศ. 1997 ดร.เอียน วิลมุต (Dr.Ian Wilmut) ประสบความสำเร็จในการโคลนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถโคลนแกะที่ชื่อว่า “ดอลลี่” (Dolly) ได้ครั้งแรกของโลก โดยนำเซลล์แม่แบบมาจากผิวหนังบริเวณเต้านมของแกะพันธุ์ฟินน์ ดอร์เซต (Finn Dorset) อายุ 6 ปีที่กำลังตั้งท้องมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนได้เซลล์จำนวนมากก่อน จากนั้นก็นำเซลล์ไข่มาจากแกะพันธุ์หน้าดำ (Blackface ewe) โดยเก็บมาจากท่อหน้าไข่ของแกะเพศเมีย หลังจากฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการสร้างไข่และการตกไข่ (Gonadotropin-releasing hormone , GnRH) 28-33 ชั่วโมง นำมาดูดเอานิวเคลียสออก แล้วนำมาหลอมรวมกับเซลล์ต้นแบบ โดยใช้วิธีกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

(Electric pulse) ทำให้ไข่ที่ได้รับนิวเคลียสใหม่กลายเป็นตัวอ่อน ซึ่งสามารถเจริญพัฒนาต่อไปได้ตามปกติ (ภาพ 7-11)

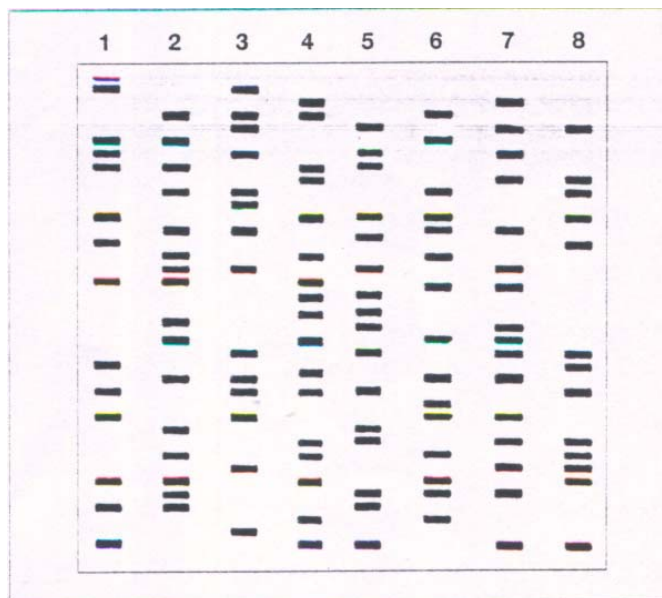


ภาพ 7-11 การโคลนแกะ “ดอลลี่” ของดร.เอียน วิลมุต โดยใช้เทคนิคการแยกนิวเคลียส (Audesirk and Audesirk, 1999 : 195)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) คือแถบของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ มีลักษณะเหมือนบาร์โค้ด (Bar code) (ภาพ 7-12) และมีลักษณะเฉพาะตัวทำสำเร็จครั้งแรก ปี ค.ศ. 1958 โดยศาสตราจารย์ ดร.อเล็ก เจฟฟรี (Alec Jeffreys) และคณะแห่งมหาวิทยาลัยเลสเตอร์ ประเทศอังกฤษ ได้จัดทำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคต่าง ๆ ทาง

พันธุกรรม เทคนิคที่นิยมใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมนุษย์ ได้แก่ เทคนิคอาร์เอฟแอลพี และ เทคนิคพีซีอาร์ โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ที่นิยมใช้คือเซลล์เม็ดเลือดขาว เนื่องจากสามารถสกัดดีเอ็นเอได้จำนวนมาก นำมาตรวจสอบโดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการเคลื่อนย้ายสู่หัวไฟฟ้า และตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกัน ได้แก่ มินิแซทเทลไลต์ หรือไมโครแซทเทลไลต์ หรือส่วนของดีเอ็นเอ M13 ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอส่วนซ้ำของคอน (ลำดับที่ 2283-2401 และ 1833-1894) ส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกันที่คู่กันเดียวกันไม่เท่ากันในแต่ละคน เรียกว่า **การผันแปรของจำนวนซ้ำ** (Variable number of tandem repeats, VNTR) ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

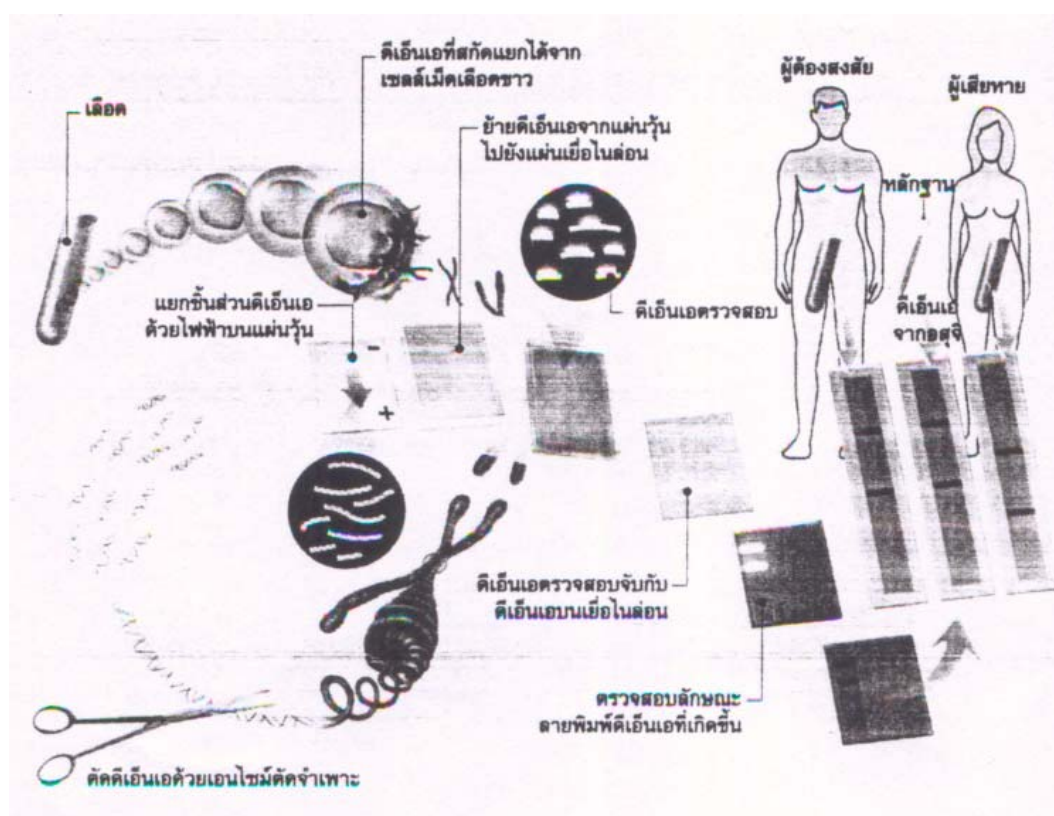


ภาพ 7-12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคน 8 คน ที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบมีลักษณะเหมือนบาร์โค้ดและมีลักษณะเฉพาะตัว
(วิชัย บุญแสง และคณะ. 2541 : 27)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพี ขั้นตอนดังนี้ (ดูภาพ 7-13 ประกอบ)

1. การเตรียมดีเอ็นเอ โดยการสกัดมาจากเซลล์เนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น เส้นผม อสุจิ เลือด หรือน้ำลาย เป็นต้น การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เหล่านี้ต้องคำนึงถึงชนิดและส่วนประกอบของเซลล์นั้น เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพ เลือดเป็นแหล่งที่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ง่ายและสะดวกที่สุด
2. การตัดและแยกดีเอ็นเอ เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้แล้ว นำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำชิ้นของดีเอ็นเอมาแยกตามขนาดบนแผ่นวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

3. การทำไฮบริไดเซชัน เริ่มจากการย้ายดีเอ็นเอเป้าหมายจากแผ่นวุ้นไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งเป็นแผ่นเยื่อไนลอน โดยการแช่แผ่นวุ้นในสารละลายต่าง เพื่อแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว สารละลายจากด้านล่างของวุ้นจะซึมผ่านแผ่นวุ้น และแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปยังชั้นของกระดาษกรองแห้งด้านบน เป็นผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้นทำการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดสารกัมมันตรังสี และฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์



ภาพ 7-13 แสดงการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพี

(วิชัย บุญแสง และคณะ. 2541 : 34)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบวงจร โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสซึ่งสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายหรือดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้เป็นจำนวนล้าน ๆ เท่า ในช่วงเวลาสั้น ๆ เพียง 2-3 ชั่วโมง การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การสกัดดีเอ็นเอ เซลล์ที่นำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอต่างกัน

(ตาราง 7-1) ที่นิยมใช้มากขณะนี้คือเซลล์เยื่อข้างแก้ว และสกัดด้วยสารละลายคีเล็กซ์ 100 เรซิน (Chelex 100 resin) โดยมีหลักการคือ เริ่มจากทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ให้นิวเคลียสออกจากเซลล์ และทำการต้มเพื่อให้ดีเอ็นเอออกจากนิวเคลียส ขณะต้มไอออนของโลหะหนักที่มีค่าประจุ 2^+ เช่น Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ที่อยู่ในเซลล์ จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ไปทำลายดีเอ็นเอได้ดีที่อุณหภูมิสูง ๆ แต่สารละลายคีเล็กซ์เรซินจะทำหน้าที่จับไอออนโลหะหนักดังกล่าวไว้ เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอให้มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 7 – 1 แหล่งที่มาของดีเอ็นเอ และค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อนิตต่างๆ

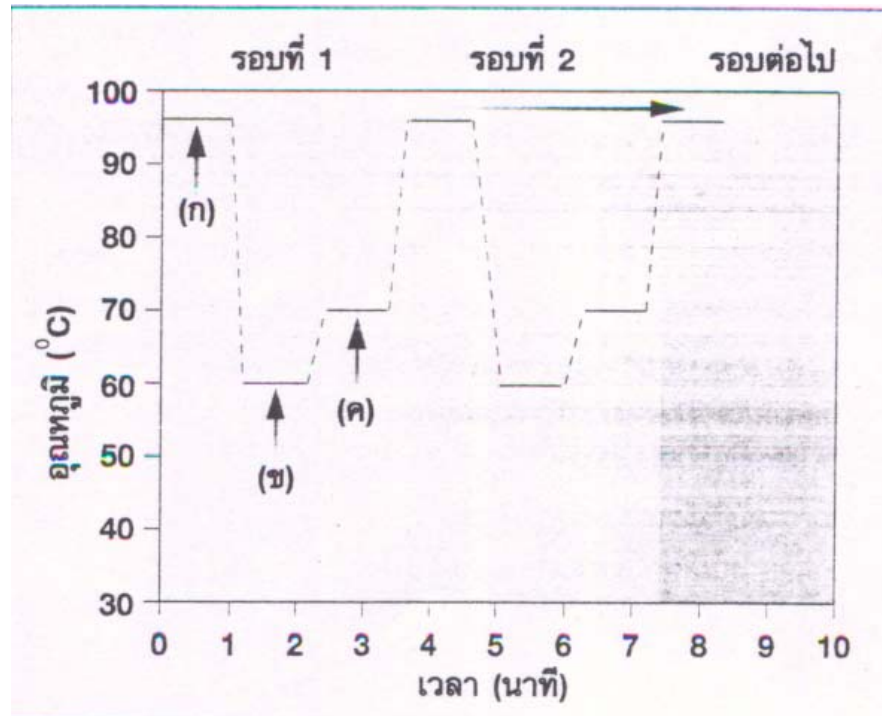
แหล่งที่มา	ปริมาณดีเอ็นเอ
เลือด	40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลือด 1 ไมโครลิตรประกอบด้วย เม็ดเลือดขาว จำนวน 4,000-11,000 เซลล์ เม็ดเลือดขาว 1 เซลล์ มีดีเอ็นเอ 606 พิโคกรัม
โครริโอนิกวิลลัส	8 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม
ตัวอสุจิ	3.3 พิโคกรัม/เซลล์
เยื่อข้างแก้ว	0.1-1 ไมโครกรัม/หนึ่งน้ำบ้วนปาก
เนื้อเยื่อ	0.1-10 ไมโครกรัม/50 มิลลิกรัม
รากผม	250 นาโนกรัม/ราก
น้ำคร่ำ	65 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (1000 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อมีอายุครรภ์ 16 สัปดาห์)
ตับ	15 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม

(วิชัย บุญแสง และคณะ. 2541 : 50)

2. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิ 3 ช่วง ได้แก่ (ดูภาพ 7-14 ประกอบ)

- 2.1 ช่วงอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบสลายจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว
- 2.2 ช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการจับคู่กัน ระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวและไพรเมอร์

2.3 ช่วงอุณหภูมิ 70-72 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิสำหรับการเติมเบสที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว



ภาพ 7-14 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

- ก. ช่วงอุณหภูมิในการแยกสารดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว
 - ข. ช่วงอุณหภูมิในการจับคู่กันระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับไพรเมอร์
 - ค. ช่วงอุณหภูมิในการเติมเบสทางปลาย 3' ของดีเอ็นเอสายใหม่
- (วิชัย บุญแสง และคณะ. 2541 : 54)

3. การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า และการบันทึกผล

หลังจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเกิดเสร็จสมบูรณ์แล้ว นำชิ้นดีเอ็นเอมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ คือ

- #### 3.1 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนมินิแซทเทลไลต์ โดยใช้ตัวกลางแผ่นวุ้น
- อะกาโรสความเข้มข้น 2-3 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีโวลต์ต่ำ ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ดี เมื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเสร็จสมบูรณ์แล้ว จึงนำตัวกลางมาย้อมด้วยสารละลายเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) แล้วนำไปบันทึกผลโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

3.2 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนไมโครแซทเทลไลต์ ใช้ตัวกลางแผ่นวุ้นพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide gel) ความเข้มข้น 4-6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตัวกลางที่มีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของเบสเพียง 1 ตัว ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 40 วัตต์ เมื่อแยกส่วนของดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว จึงตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารรังสี หรือสารฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) หรือการย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ที่มีความไวในการตรวจสอบสูงมาก

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีกับเทคนิคพีซีอาร์ปรากฏว่า การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีต้องใช้ดีเอ็นเอจำนวนมาก เช่น ใช้เลือดประมาณ 5-10 มิลลิลิตร เสียค่าใช้จ่ายสูง และวิธีการยุ่งยากต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ ปัจจุบันจึงนิยมตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น ใช้เลือด 1 หยด หรือคราบเลือด คราบอสุจิก็ได้ เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และวิธีการก็ไม่ยุ่งยากไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพันธุกรรม

นักวิทยาศาสตร์ได้นำเทคโนโลยีพันธุกรรมไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ การศึกษาวิจัย การเกษตร อุตสาหกรรม การแพทย์ และเริ่มเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของมนุษย์ โดยผ่านทางผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น พืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอาหารของมนุษย์

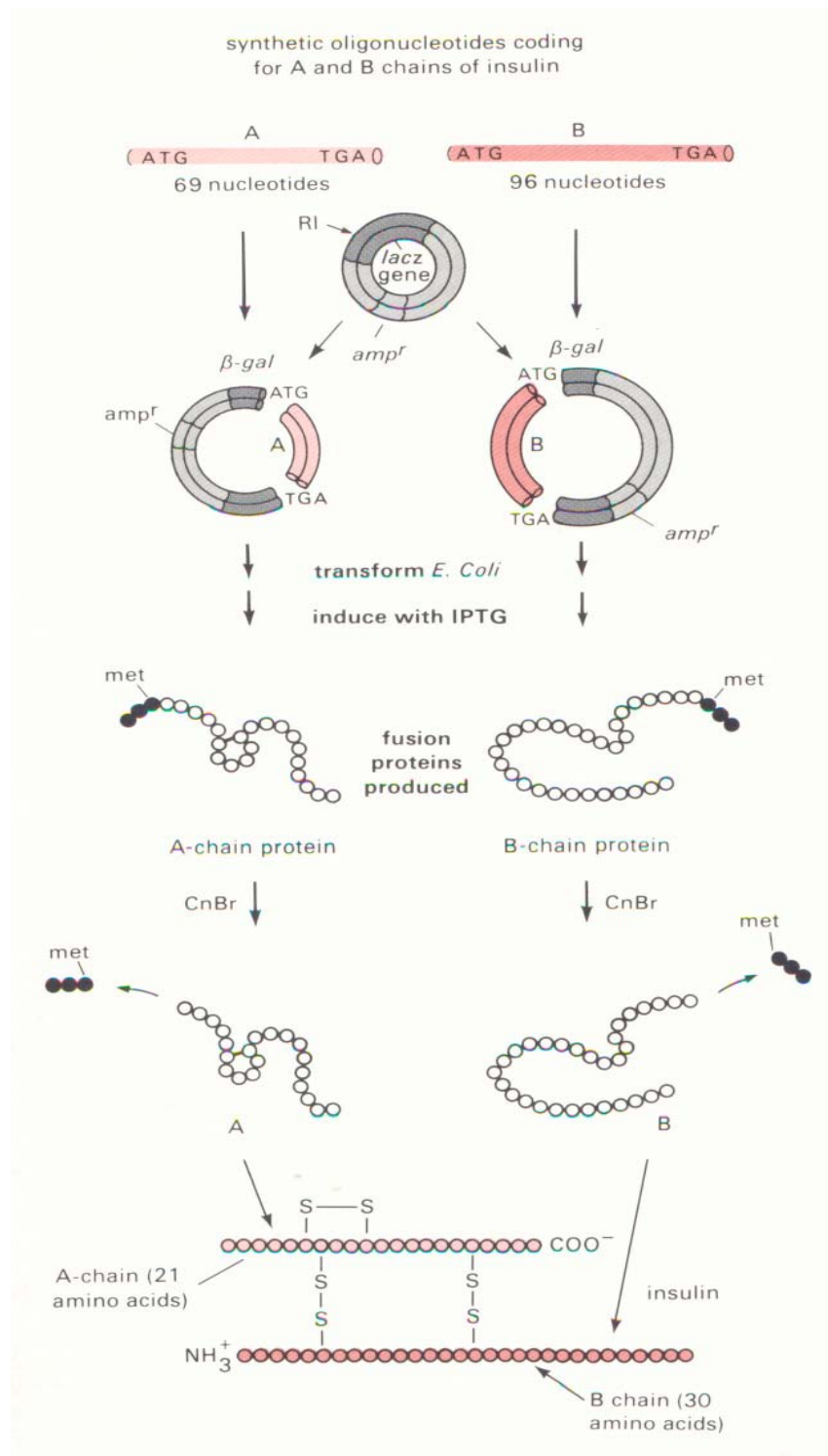
ด้านการศึกษาวิจัย

เทคโนโลยีพันธุกรรมสามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย เพื่อวิเคราะห์ตรวจสอบสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ โดยเฉพาะดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ทำให้สามารถอธิบายกลไกต่าง ๆ ในเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การแสดงออกของยีน ส่วนของดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีน การทำงานของยีนและเอนไซม์บางชนิดในเซลล์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น

ตัวอย่างการศึกษาการทำงานของยีน สามารถใช้เทคโนโลยีพันธุกรรมแยกสกัดยีนชนิดหนึ่งออกมา แล้วชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยนแปลงที่เบสใดเบสหนึ่ง แล้วจึงถ่ายยีนนี้กลับเข้าไปในเซลล์ ตรวจดูฟีโนไทป์หรือผลที่เกิดขึ้นจากการทำงานของยีนที่ถ่ายเข้า หรือนำไปสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนในหลอดทดลอง

ด้านอุตสาหกรรม

วัตถุประสงค์ประการหนึ่งของการโคลนจีน คือการให้จีนแสดงออกหรือสร้างผลผลิตได้ในเซลล์ผู้รับ ผลผลิตที่ได้นี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์และผลิตเป็นอุตสาหกรรมได้ เช่น การผลิตฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin) โดยการโคลนจีนแบคทีเรีย *E. coli* (ภาพ 7-15) ใช้รักษาคนที่เป็นโรคเบาหวาน สมัยก่อนใช้อินซูลินที่สกัดจากวัวหรือหมู ต้องฆ่าหมูหรือวัวหลายพันตัวเพื่อจะช่วยชีวิตคนเพียงคนเดียว นอกจากนี้อินซูลินที่สกัดจากวัวหรือหมูมีข้อเสียที่อาจทำให้เกิดอาการแพ้ในบางคน การผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของคนนำไปใช้รักษาเด็กที่เป็นโรคแคระทางพันธุกรรม (Hypopituitary dwarfism) ในอดีตใช้ฮอร์โมนที่สกัดจากต่อมใต้สมองของคนที่ตายแล้วจำนวนกว่า 70 คน สำหรับรักษาเด็ก 1 คน ค่าใช้จ่ายในการรักษาจึงสูงมาก นอกจากนี้การสกัดฮอร์โมนจากคนตาย บางครั้งอาจเกิดการปนเปื้อนจากสารอื่นที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสมองผู้รับได้ การผลิตฮอร์โมนโดยการโคลนจีนจะมีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า



ภาพ 7-15 การผลิตฮอร์โมนอินซูลินโดยการโคลนยีนในแบคทีเรีย *E. coli*

(Singer and Berg. 1991 : 885)

ในการสร้างวัคซีนที่ปราศจากสารแอนติเจนที่มีพิษ สามารถใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมสร้างวัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบ โรคเท้าเปื่อยในสัตว์ โรคกลัวน้ำ เป็นต้น ทำได้โดยการแยกดีเอ็นเอจากเชื้อโรค นำมาสร้างดีเอ็นเอสายผสมที่มีเฉพาะจีนแอนติเจน แล้วนำไปใส่ในแบคทีเรีย *E.coli* จากนั้น *E.coli* จะสร้างแอนติเจนขึ้นมา จึงนำไปแยกแอนติเจนเฉพาะที่ใช้ป้องกันโรคและทำให้บริสุทธิ์

นักวิทยาศาสตร์ยังได้ใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมดัดแปลงจีนแบคทีเรีย *E.coli* ใช้ในอุตสาหกรรมยา สอร์โอมอน อินเทอร์เฟียร์อน อื่นหลายชนิด ดังตาราง 7-2

ตาราง 7-2 สารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมและประโยชน์ทางการแพทย์

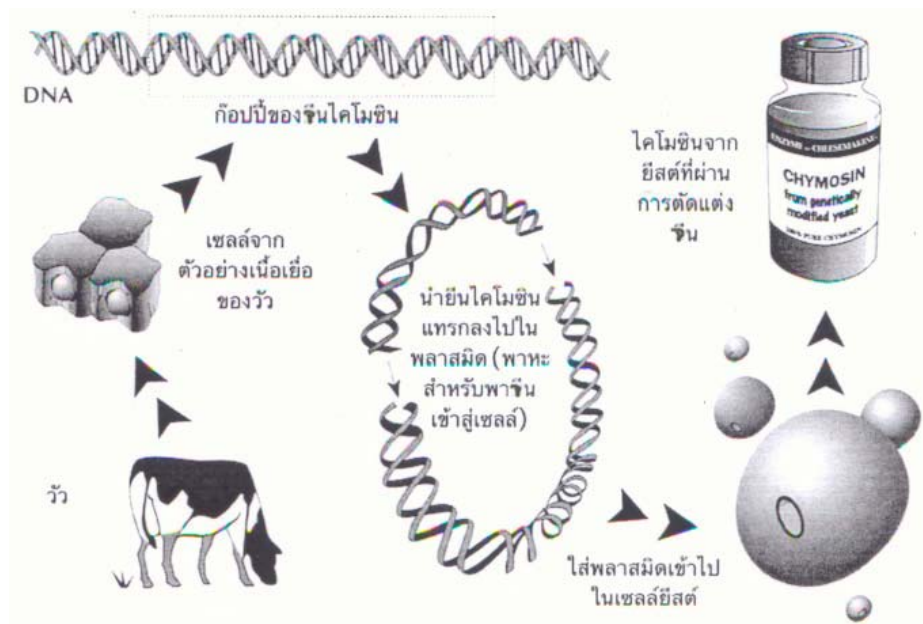
สารที่ผลิต	ประโยชน์
Trial natriuretic peptide	ขยายหลอดเลือด กระตุ้นปัสสาวะ
Colony stimulating factor	ช่วยฟื้นฟูไขกระดูกภายหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก
Deoxyribonuclease , Dnase	ช่วยลดน้ำหนองในปอดของคนที่เป็นโรค Cystic fibrosis
Epidermal growth factor	กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อเนื่องจากการเกิดบาดแผลหรือไฟไหม้ และคนที่เป็นโรคกระเพาะ
Erythropoietin , EPO	กระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับคนที่โลหิตจางเนื่องจากไตวาย
Factor VII	ช่วยในการแข็งตัวของเลือดสำหรับคนที่เป็นโรคฮีโมฟีเลีย
Follicle stimulating hormone, Luteinizing Hormone, Human chorionic gonadotropin	ช่วยรักษาการเป็นหมัน
Human growth hormone	ช่วยกระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อและกระดูกสำหรับคนที่ขาดฮอร์โมนชนิดนี้
Insulin	ช่วยในการควบคุมน้ำตาลกลูโคสสำหรับคนที่เป็นโรคเบาหวาน
Alpha interferon	ใช้กับคนที่เป็นเนื้องอกที่อวัยวะสืบพันธุ์ มะเร็งของเซลล์รูปม้วน ตับอักเสบชนิดบีและซี และ Kaposi's sarcoma
Beta interferon	ใช้กับคนที่เป็น Multiple sclerosis
Gamma interferon	ใช้รักษาคนที่เป็นโรคเลือดเรื้อรังชนิด Granulomatous
Interleukin-2	ใช้รักษาคนที่เป็นมะเร็งที่ไต

ตาราง 7 – 2 (ต่อ)

สารที่ผลิต	ประโยชน์
Lung surfactant protein	ช่วยให้ถุงลมในปอดขยายตัวสำหรับทารกที่ป่วยเป็นโรคทางเดินหายใจ
Renin inhibitor	ใช้สำหรับคนที่มีความดันเลือดต่ำ
Somatostatin	ฮอร์โมนสำหรับต่อมใต้สมอง ลดการพัฒนาของกล้ามเนื้อและกระดูกในกรณีที่มีฮอร์โมนการเจริญมากเกินไป
Superoxide dismutase	ป้องกันกล้ามเนื้อหัวใจไม่ให้ถูกทำลายในคนที่ป่วยโรคหัวใจ
Tissue plasminogen activator	ละลายเลือดที่แข็งตัวในคนที่ป่วยโรคหัวใจหรือเส้นเลือดอุดตัน

(สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วิชานิช. 2543 : 213)

นอกจากนี้เทคโนโลยีพันธกรรมสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นได้ เช่น ผลิตสารที่เป็นส่วนผสมในอาหาร สารให้ความหวาน ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) การใช้ยีสต์ *Saccharomyces pombe* ผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ การผลิตเนยแข็งโดยใช้เอนไซม์ โคโมซินจากยีสต์ที่ผ่านการตัดต่อจีน (ภาพ 7-16)

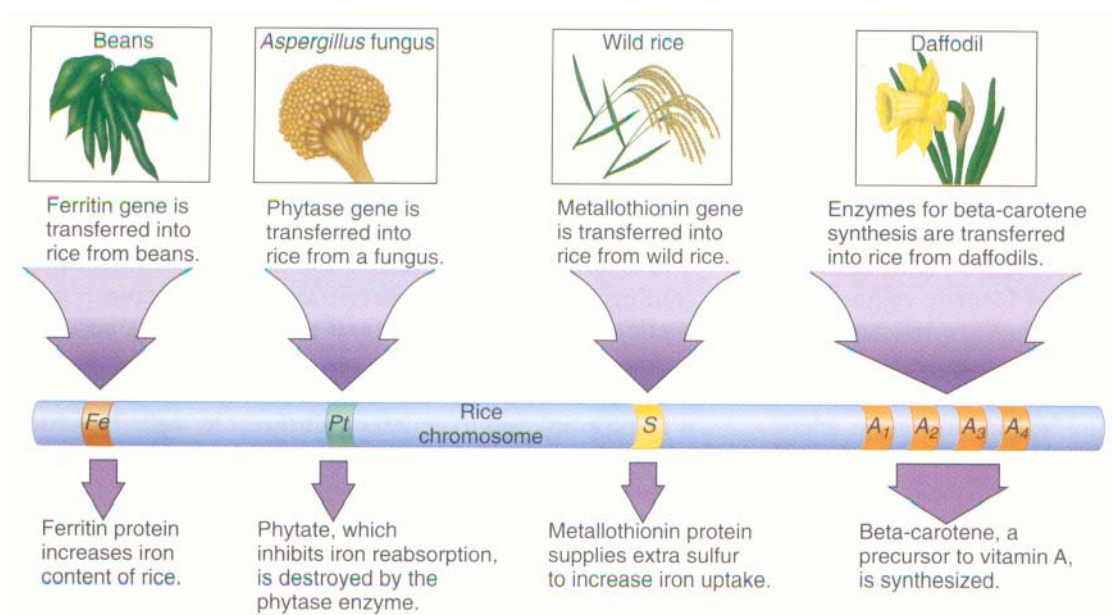


ภาพ 7-16 การผลิตเนยแข็งโดยผ่านกรรมวิธีตัดต่อจีน

(นเรศ ดำรงชัย. 2543 : 7)

ด้านการเกษตร

การเกษตรในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมเข้ามาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ ทำให้เกิดพืชและสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม ตัวอย่างพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น การสร้างพืชพวกลูกสูบ แตงกวา ส้มที่สามารถต้านทานต่อสภาพแห้งแล้ง ต้านทานสภาพดินเปรี้ยวหรือดินเค็ม ต้านทานต่อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ โดยการถ่ายยีนต้านทานการบุกรุกของไวรัสเข้าไปในพืช การสร้างพืชที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ การควบคุมการสุกของพืชพวงมะเขือเทศ โดยใช้เอนไซม์พอลิกลาแลกทูโรเนส (Polygalacturonase) ซึ่งจะทำให้ผลสุกแต่ไม่นิ่ม การสร้างพืชต้านแมลงโดยถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เข้าสู่ต้นพืช เช่น ลูกสูบ มะเขือเทศ ฝ้าย ข้าวโพด เมื่อแมลงมากินใบพืชที่มียีนนี้แมลงก็จะตาย หรือการสร้างพืชที่มีคุณค่าทางอาหารมากขึ้น เช่น การสร้างพันธุ์ข้าวที่เพิ่มธาตุเหล็ก (Iron) และวิตามินเอ (Beta-carotene) โดยการตัดต่อยีน (ภาพ 7-17)



ภาพ 7-17 การสร้างสายพันธุ์ข้าวที่เพิ่มธาตุเหล็กและวิตามินเอ

(Raven and Johnson. 2002 : 410)

ส่วนตัวอย่างสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นผลิตผลทางการเกษตร ได้แก่ การสร้างสัตว์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น มีปริมาณเนื้อมากขึ้น หรือให้น้ำนมมากขึ้น เช่น การนำยีนควบคุมการสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของวัว (Bovine growth hormone, BGH) และของคน (Human growth hormone, HGH) ฉีดเข้าไปในไข่ของหมูที่เพิ่งได้รับการผสม ทำให้หมูมีน้ำหนักตัวเพิ่มมากกว่าหมูปกติ หรือ

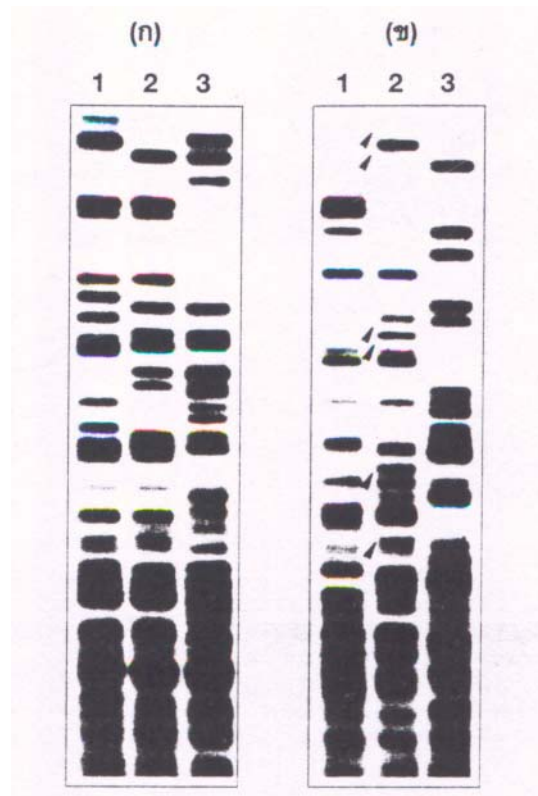
การนำจีนสร้างแฟกเตอร์ IX (Factor IX) ของมนุษย์ต่อเข้ากับโปรโมเตอร์ของจีนเบตาแลคโตโกลบูลิน (β -Lactoglobulin) ซึ่งเป็นจีนของโปรตีนในน้ำนมแกะ แล้วฉีดจีนสายผสมเข้าไปในไขของแกะ นำไปฝากในท้องแม่แกะ ได้แกะตัวเมียที่เมื่อนำไปผสมพันธุ์และมีลูกแกะจะให้น้ำนมที่มีแฟกเตอร์ IX ได้ จึงเป็นแนวทางการสร้างสารที่จะทำให้มนุษย์ผลิตน้ำนมได้มากขึ้นในอนาคต

ด้านการแพทย์

ปัจจุบันพบว่า ความผิดปกติทางพันธุกรรมจำนวนมากเกิดจากความผิดปกติของจีน จึงทำให้เกิดความคาดหวังในการนำเทคโนโลยีพันธุกรรมมาใช้ในการแพทย์ โดยเฉพาะในเรื่องของการทำแผนที่จีนของมนุษย์ เพื่อให้รู้จักจีนทั้งหมดว่ามีจีนใดอยู่ตรงไหน ทำหน้าที่อะไร มีอิทธิพลต่อร่างกายอย่างไร มีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย แก้ไขปัญหาหรือรักษาโรคด้วยพันธุกรรมบำบัดหรือจีนบำบัด (Gene therapy) ดังตัวอย่างต่อไปนี้

1. การตรวจวินิจฉัย แก้ไขปัญหาโรคสภาวะพันธุกรรมของเด็กก่อนเกิด โดยใช้น้ำคร่ำตรวจหาดีเอ็นเอที่ผิดปกติ จากนั้นจึงทำการแก้ไขดีเอ็นเอที่ผิดปกติ
2. การป้องกันรักษาโรคโดยใช้สารซึ่งอาจอยู่ในรูปของวัคซีน สอร์บอนหรืออินเทอเฟียรอน ดังได้กล่าวมาแล้ว
3. การรักษาโรคซิกเกิล เซลล์ อะนีเมีย ด้วยจีน โดยนำเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยออกมาเลี้ยง คัดเลือกจีนของฮีโมโกลบินปกติถ่ายเข้าไปในเซลล์ไขกระดูก เลี้ยงเซลล์ไขกระดูกต่อไปจนได้ปริมาณมากเพียงพอ กำจัดเซลล์ไขกระดูกที่สร้างฮีโมโกลบินผิดปกติของผู้ป่วยให้หมดด้วยการฉายรังสีเอกซ์ แล้วถ่ายเซลล์ไขกระดูกที่มีจีนปกติเข้าไปแทนที่
4. การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น การตรวจหาไวรัสเอดส์ในเลือดมนุษย์ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจได้ตั้งแต่ระยะแรก ๆ ไม่ต้องรอนานถึง 3 เดือน

นอกจากนี้ในทางนิติเวช สามารถใช้เทคโนโลยีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด เช่น กรณีการพิสูจน์ความเป็นพ่อลูกของเด็กที่ถูกอ้างว่าเป็นลูกของนักร้องลูกทุ่งชื่อดังมณฑลยี่ลี่ คำสร้อย และใช้เป็นหลักฐานในทางศาลได้ด้วย เนื่องจากอาศัยความจริงที่ว่า ลูกต้องได้รับดีเอ็นเอจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง หลักการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาแปลผล คือ เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกกับพ่อแม่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกต้องประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่เท่านั้น หากพบว่าแถบ ดีเอ็นเอของลูกมีเพียง 1 แถบไม่ตรงกับพ่อหรือแม่ สามารถสรุปได้ทันทีว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างพ่อและลูก หรือแม่และลูก (ภาพ 7-18)



ภาพ 7-18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ

(แถวที่ 1 =แม่ แถวที่ 2 = ลูก แถวที่ 3= พ่อ)

ก. มีความสัมพันธ์เพราะแถบดีเอ็นเอของลูกทุกแถบตรงกับของพ่อและแม่

ข. ไม่มีความสัมพันธ์เพราะดีเอ็นเอของลูกจำนวน 6 แถบ (ลูกศรแนวตั้ง)

ไม่พบในพ่อและแม่ แถบดีเอ็นเอที่เหลือตรงกับแถบดีเอ็นเอของแม่
บางแถบ แต่ไม่ตรงกับของพ่อ แสดงว่าไม่ใช่พ่อลูกกัน

(วิชัย บุญแสง และคณะ. 2541 : 67)

ด้านสิ่งแวดล้อม

การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสร้างแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และของเสียในสิ่งแวดล้อม หรือเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นแอลกอฮอล์ หรือสร้างแบคทีเรียที่มีพลาสมิดซึ่งสามารถย่อยสลายองค์ประกอบที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม เพื่อนำไปถ่ายให้แบคทีเรียที่อยู่ในทะเล ทำให้สามารถจัดกรบน้ำมันในน้ำได้ (ภาพ 7-19) หรือการสร้างแบคทีเรียที่ทำลายขยะแบคทีเรียกำจัดพลาสติก เป็นต้น



ภาพ 7-19 การใช้แบคทีเรียจัดกรบน้ำมัน

(Raven and Johnson. 2002 : 691)

สรุป

เทคนิคที่ใช้ในเทคโนโลยีพันธุกรรมมีมากมาย ที่สำคัญ ได้แก่ เทคนิคเซาเทอร์น บลอต หรือเซาเทอร์น ไฮบริไดเซชัน เทคนิคอาร์เอฟแอลพี และเทคนิคพีซีอาร์

พันธุวิศวกรรมเป็นเทคโนโลยีพันธุกรรม ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยการตัดต่อจีน รวมทั้งการยับยั้ง การกระตุ้น การแสดงออกของจีน และการใช้สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตใส่เข้าไปในเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 การเตรียมจีนหรือดีเอ็นเอ ขั้นที่ 2 การโคลนจีนหรือดีเอ็นเอ ขั้นที่ 3 การถ่ายจีนเข้าไปในสิ่งมีชีวิตสำหรับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม เป็นสิ่งมีชีวิตที่ผ่านกระบวนการปลูกถ่ายจีน รวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่ถูกเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม

การโคลน เป็นเทคนิคหรือวิธีการสร้างสิ่งที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันหมด เริ่มตั้งแต่ระดับเล็กไปหาใหญ่ ได้แก่ การโคลนจีน โครโมโซม จีโนม เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และการโคลนสิ่งมีชีวิต

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเฉพาะตัว สามารถตรวจได้โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพี หรือเทคนิคพีซีอาร์

นักวิทยาศาสตร์สามารถนำเทคโนโลยีพันธุกรรมไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์หลายด้าน เช่น ด้านการศึกษาวิจัย อุตสาหกรรม การเกษตร การแพทย์ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

คำถามท้ายบทที่ 7

1. เทคนิคเซาเทอร์น บลอตหรือเซาเทอร์น ไฮบริไดเซชันมีขั้นตอนอย่างไรบ้าง
 2. เทคนิคอาร์เอฟแอลพีเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาความแตกต่างของอะไร
 3. เทคนิคพีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขั้นตอนอย่างไร
 4. พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) จัดเป็นเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA) ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญกี่ขั้นตอน อะไรบ้าง
 5. การถ่ายยีนเข้าไปในสัตว์และพืชใช้วิธีการใดบ้าง
 6. สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically modified organisms หรือ GMOs) คืออะไร
 7. การโคลน (Cloning) คืออะไร
 8. จงยกตัวอย่างการโคลนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง
 9. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) คืออะไร
 10. เทคโนโลยีพันธุกรรมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านใดบ้าง
-