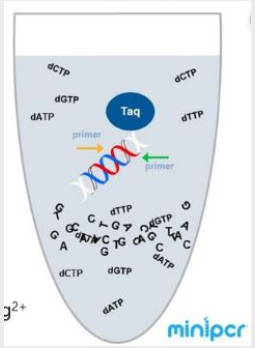
Timeline of DNA technology

(1856-1863)

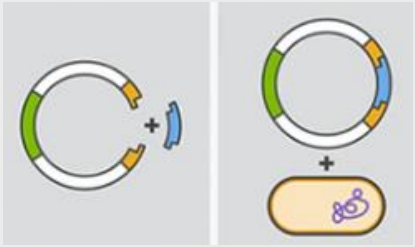
early 1970s



Mendel | Genetic Engineering/GMOs | PCR | Human genome Project | Gene editing (2020)

(1993)

(2003)



การพัฒนาเทคโนโลยีเกิดขึ้นรวดเร็วมาก

Theory → → → → → → CRISPR baby (2 y old)

สังเกตสิ่งที่ปรากฏอยู่แล้วในธรรมชาติ → ศึกษาทดลองเพื่อหาคำอธิบาย → นำไปใช้ประโยชน์

DNA technology

- DNA technology = DNA + technology
- -the way in which genetic material from one organism is artificially introduced into the genome of another organism and then replicated and expressed by that other organism-
- เพื่อทำ/สร้างสิ่งมีชีวิตหรือองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตให้มีลักษณะตามที่ต้องการ
- ลักษณะอย่างไรบ้างคือ “ลักษณะที่ต้องการ” ?
- ‘Trait’

what is genetic engineering

what is genetic modification

ความก้าวหน้าทางชีววิทยา

classical biology

ระบบของสิ่งมีชีวิตมันก็เป็นเหมือนเครื่องจักรหนึ่งชิ้น

การคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดี จัดการอย่างง่าย เช่น ให้ยา ผ่าตัด ใส่ปุ๋ย ตอนกิ่ง

classical biotechnology

molecular biology

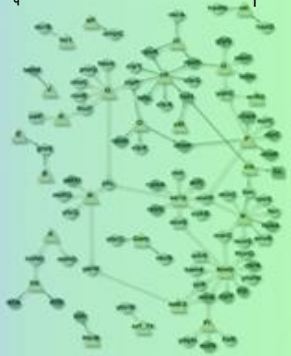
การถ่ายทอดและแสดงออกทางพันธุกรรมโดยดีเอ็นเอ

การตัดต่อยีนง่ายๆ เช่น recombinant insulin, BT-tobacco

genetic engineering

system biology

เครือข่ายความสัมพันธ์อันยุ่งเหยิงของยีนหลายๆตัว



การวิศวกรรม “ระบบของยีน” หลายๆ ยีนที่ต้องทำงานร่วมกันเพื่อสร้างฟีโนไทป์ที่ซับซ้อน

synthetic biology

1) ชีววิทยาดั้งเดิม (classical biology),
2) เทคโนโลยีชีวภาพดั้งเดิม (classical biotechnology)
3) ชีวโมเลกุล (molecular biology)
4) วิศวพันธุกรรม (genetic engineering)
5) ชีววิทยาระบบ (system biology)
6) ชีววิทยาสังเคราะห์ (synthetic biology)

เครดิต: Biology Beyond Nature: ชีววิทยาเหนือธรรมชาติ

แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)

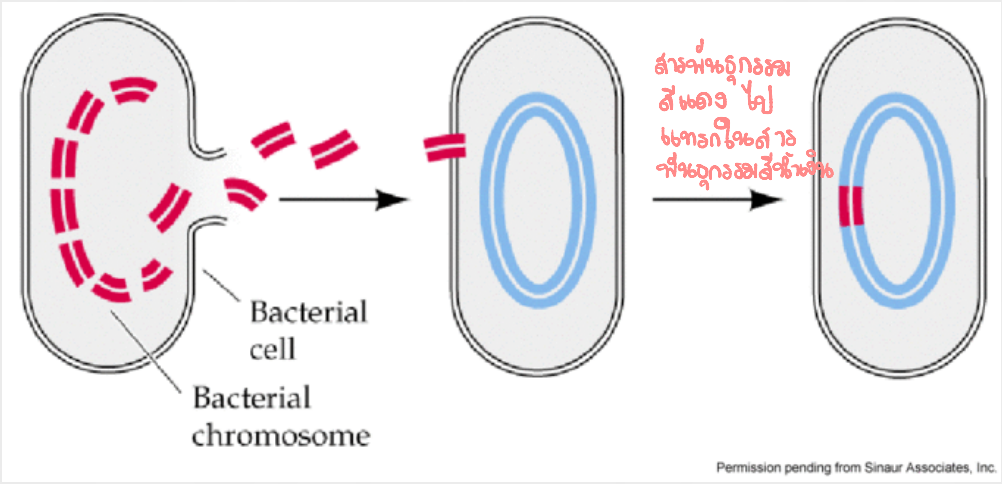
– our best friend!!!

100x Light microscope

g-/short rod/ gut of warm blooded

เลี้ยงง่าย โตไว (overnight/16h) ไม่สร้างสารพิษ

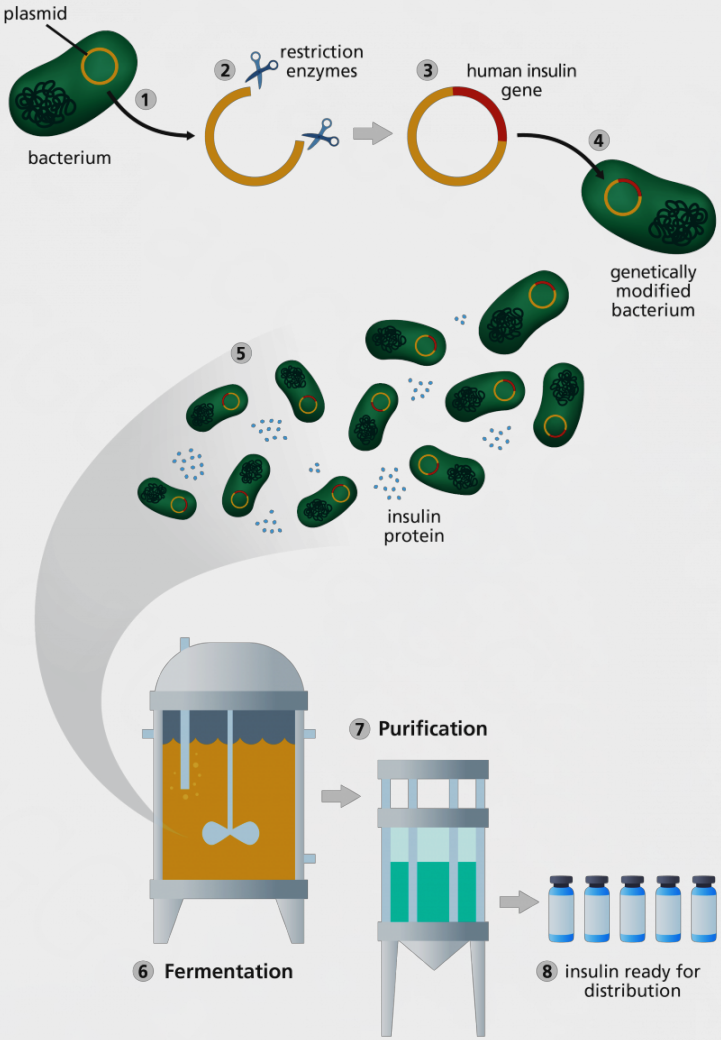
SEM



Transformation

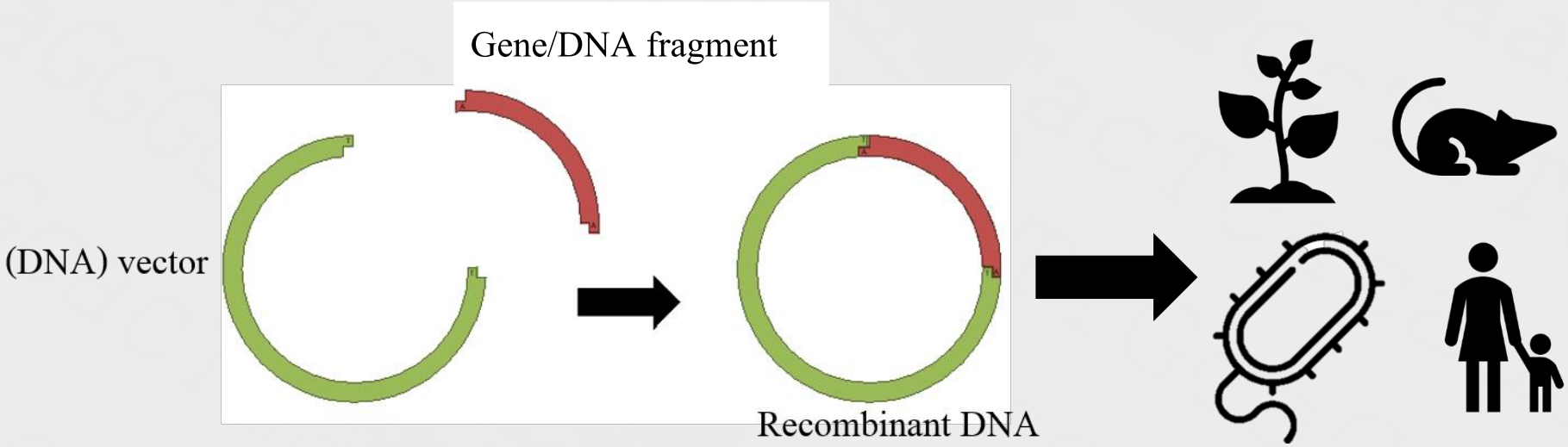
ในธรรมชาติ-กระบวนการที่ทำให้เกิดการส่งผ่านสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง

DNA technology – การทำให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะตามต้องการโดยอาศัยการส่งถ่าย DNA ที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวเข้าไปในสิ่งมีชีวิตนั้น



แผนภาพการสร้างแบคทีเรียที่ผลิตฮอร์โมนอินซูลินสำหรับผู้ป่วยเบาหวานด้วยการใช้เทคนิคการตัดต่อยีนจากคนใส่เข้าไปในแบคทีเรีย

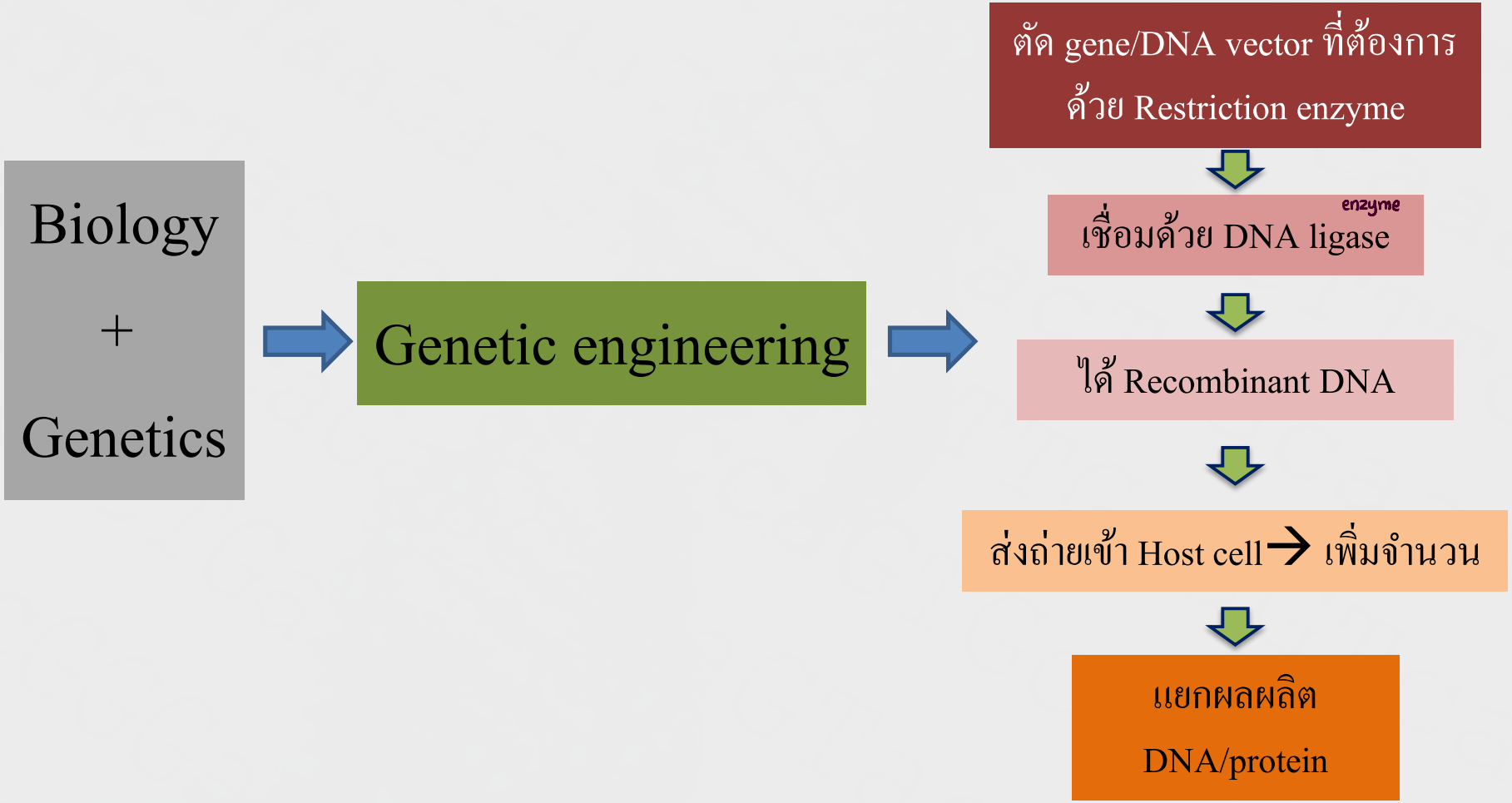
DNA technology = Genetic engineering = Recombinant tech.



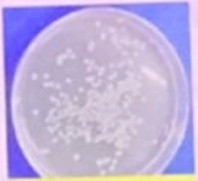
DNA fragment = ชิ้นส่วนดีเอ็น หรือ ยีน (บางครั้งเรียก insert)

DNA vector = ดีเอ็นเอพาหะที่สามารถขนส่งชิ้นดีเอ็นเอ/ยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้

Recombinant DNA = โมเลกุลดีเอ็นเอที่เกิดจากการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน (บางครั้งเรียก ดีเอ็นลูกผสม)


Biology
+
Genetics
Genetic engineering
ตัด gene/DNA vector ที่ต้องการ
ด้วย Restriction enzyme
เชื่อมด้วย DNA ligase
enzyme
ได้ Recombinant DNA
ส่งถ่ายเข้า Host cell → เพิ่มจำนวน
แยกผลผลิต
DNA/protein

3 ตัวอย่างที่เห็นกันชัดๆ บ่อยๆ!!!



E.coli ธรรมดาๆ

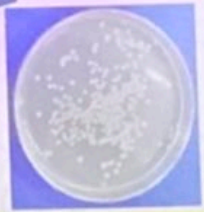
ส่งถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ
แอมพิซิลินเข้าไปในเซลล์

E.coli ที่เปลี่ยนไป
เจริญได้บนอาหาร
ที่ผสมยาแอมพิซิลิน

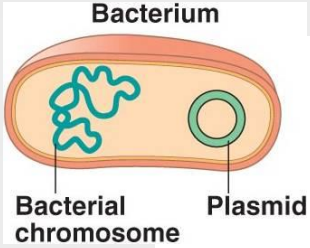
ส่งถ่ายยีน green fluorescent protein เข้าไปในเซลล์

E.coli ที่เปลี่ยนไปเป็นเรืองแสงได้

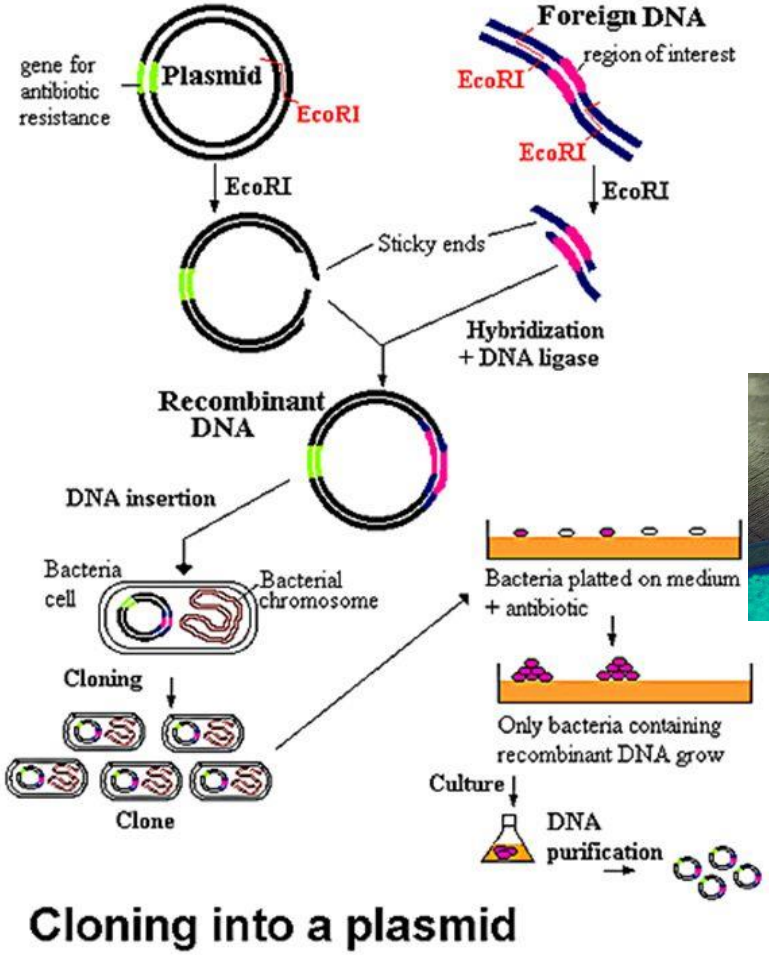
ส่งถ่ายยีนควบคุมการสร้างอินซูลินเข้าไปในเซลล์



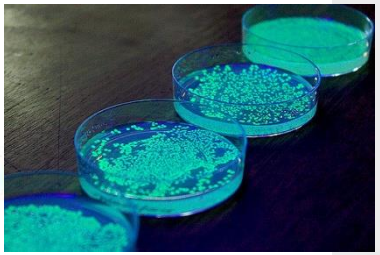
E.coli ที่เปลี่ยนไปเป็นสังเคราะห์สอร์โมนอินซูลินได้

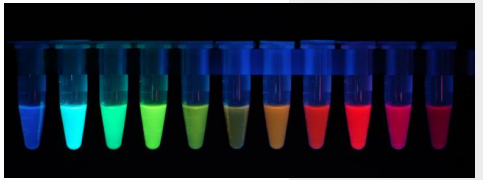


กระบวนการ Genetic engineering ตัด (แล้ว) ต่อยีน

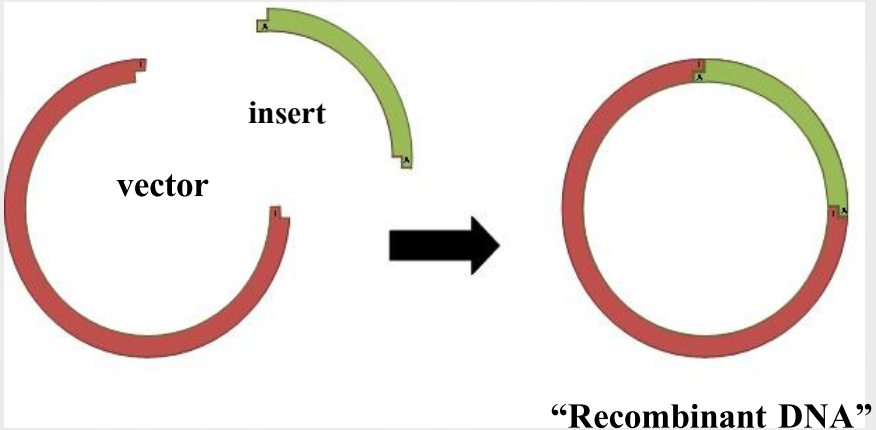


Cloning into a plasmid





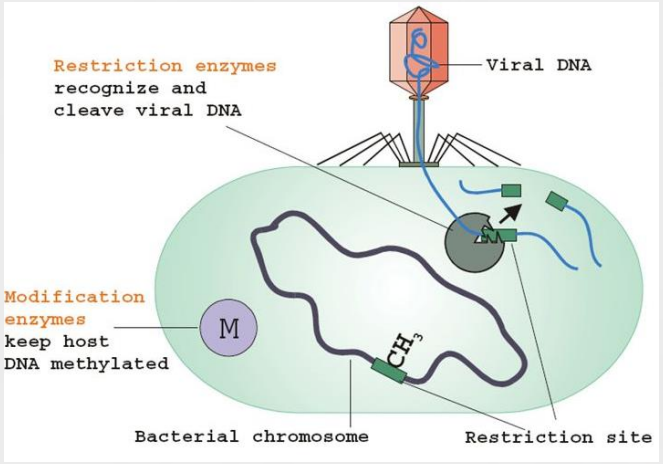
ตัด (แล้ว) ต่อยีน



ตัด

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

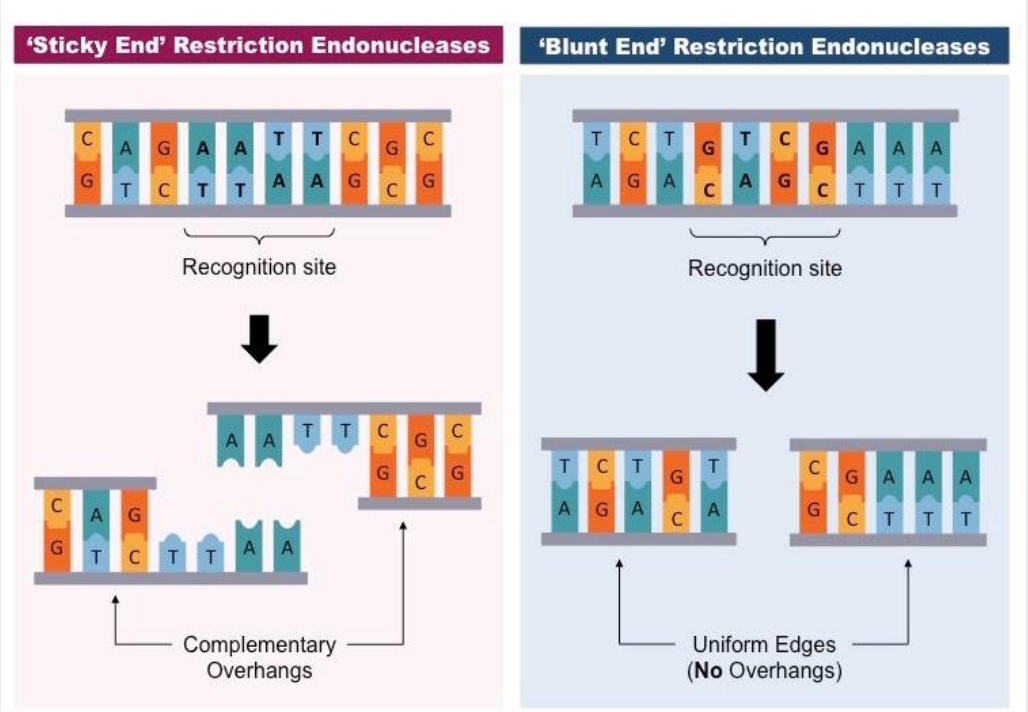
* กลไกทางชีวภาพ



- มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ชนิด Endonuclease
- พบในแบคทีเรีย ใช้สำหรับตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแปลกปลอมของไวรัสที่พยายามส่งเข้ามาในเซลล์
- มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์ในการตัดชิ้นดีเอ็นเอ
- **Molecular scissors** that cut double stranded DNA molecules at specific points - Restriction site

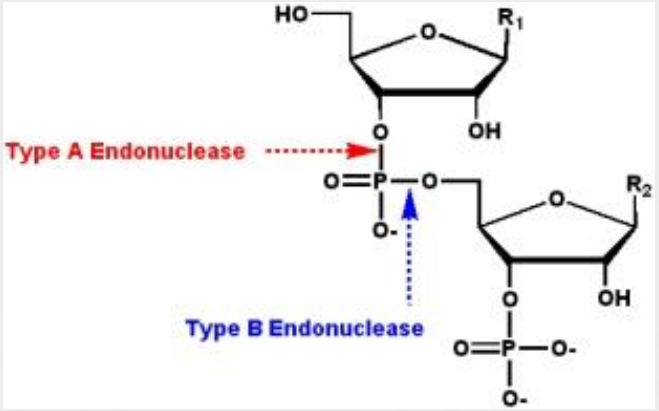
"Restriction endonuclease" → an important tool for manipulating DNA

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)



Sticky end/ปลายเหนียว

Blunt end/ปลายทู่

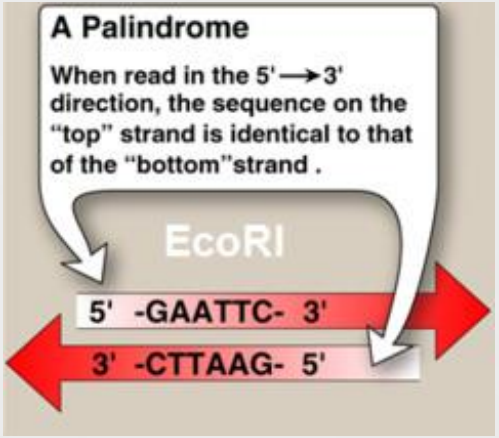


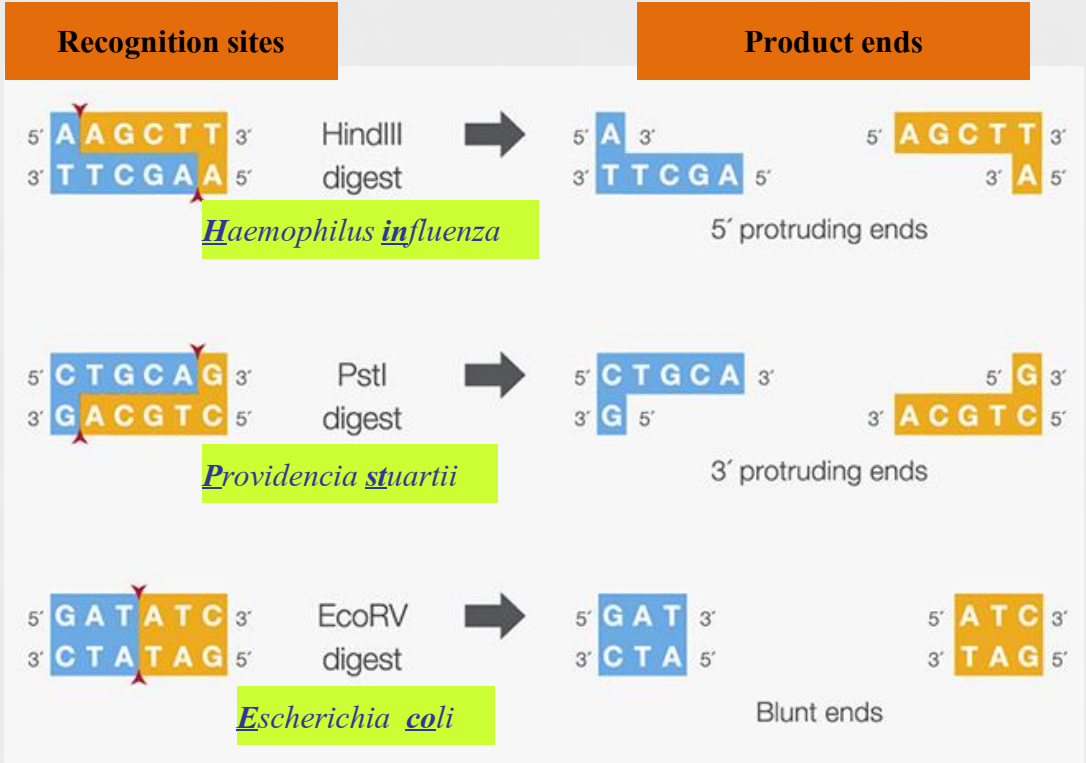
MECHANISM OF ACTION: when enzyme recognizes **a specific sequence** and makes one cut in each of the sugar phosphate backbones of the double helix – by **hydrolyzing** the **phoshphodiester bond**. Specifically, the bond between the 3' O atom and the P atom is broken , 3'OH and 5' PO_4^{3-} are produced

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอด้วยการจดจำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเจาะจง

ตัดที่ลำดับจดจำแตกต่างกัน

Recognition sites
ลำดับจดจำ

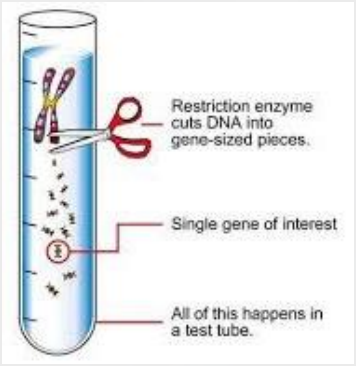




เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) มีมากมายหลายชนิด

How to cut DNA vector/plasmid with restriction enzyme

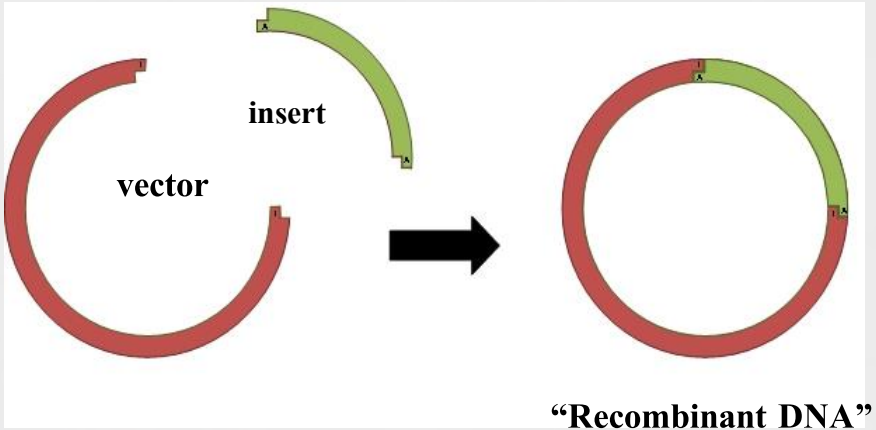
Restriction enzyme มีจำหน่าย



ผสมเอ็นไซม์กับดีเอ็นเอที่ต้องการตัด + บัฟเฟอร์

YouTube

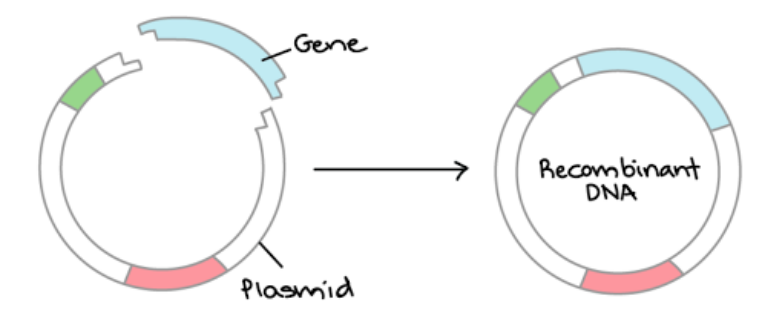
ตัด (แล้ว) ต่อยีน

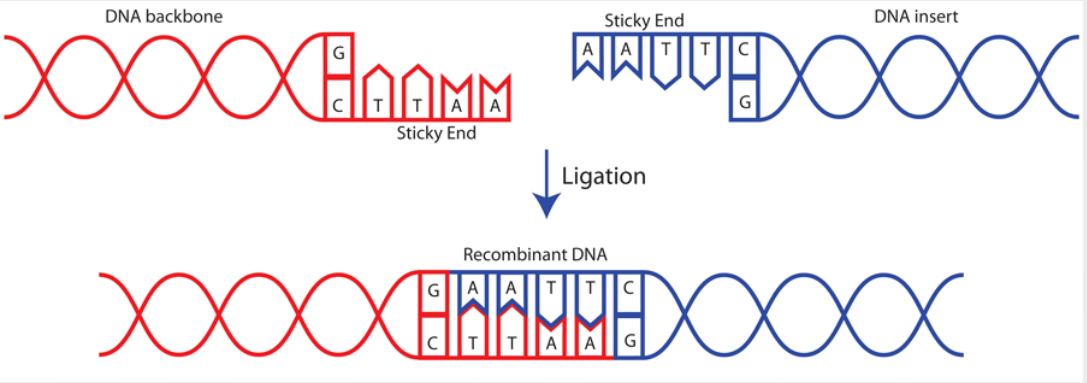


(เชื่อม) ต่อ

DNA Ligase

การเชื่อมต่อของชิ้น DNA ทำได้กับทั้ง sticky ends และ blunt ends
โดยที่การเชื่อมกันของ sticky ends จะง่ายกว่ามาก



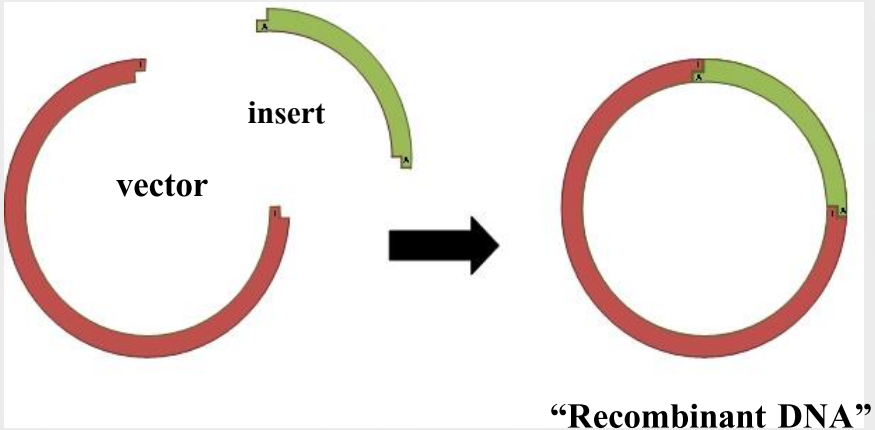


- covalently joins the phosphate backbone of DNA with blunt or compatible cohesive ends
- repairing double strand breaks in DNA molecules
- two steps of the DNA ligation reaction
    1) DNA ends have to collide by chance and stay together long enough for the ligase to join them
    2) joining of the 3′-OH to the 5′-phosphate

Restriction enzyme & ligase: Commercial products

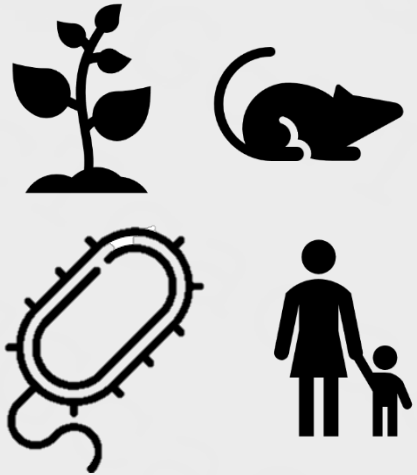
เอ็นไซม์ที่มีใช้ในห้องแลปปัจจุบันนี้เกือบ 300 ชนิด ผลิตด้วย recombinant DNA technology เพื่อให้คุณภาพบริสุทธิ์ คุณภาพดี ผลิตได้จำนวนมาก และราคาถูก

ตัด (แล้ว) ต่อยีน จนได้ ‘recombinant’ DNA แล้วไงต่อ?



ส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์

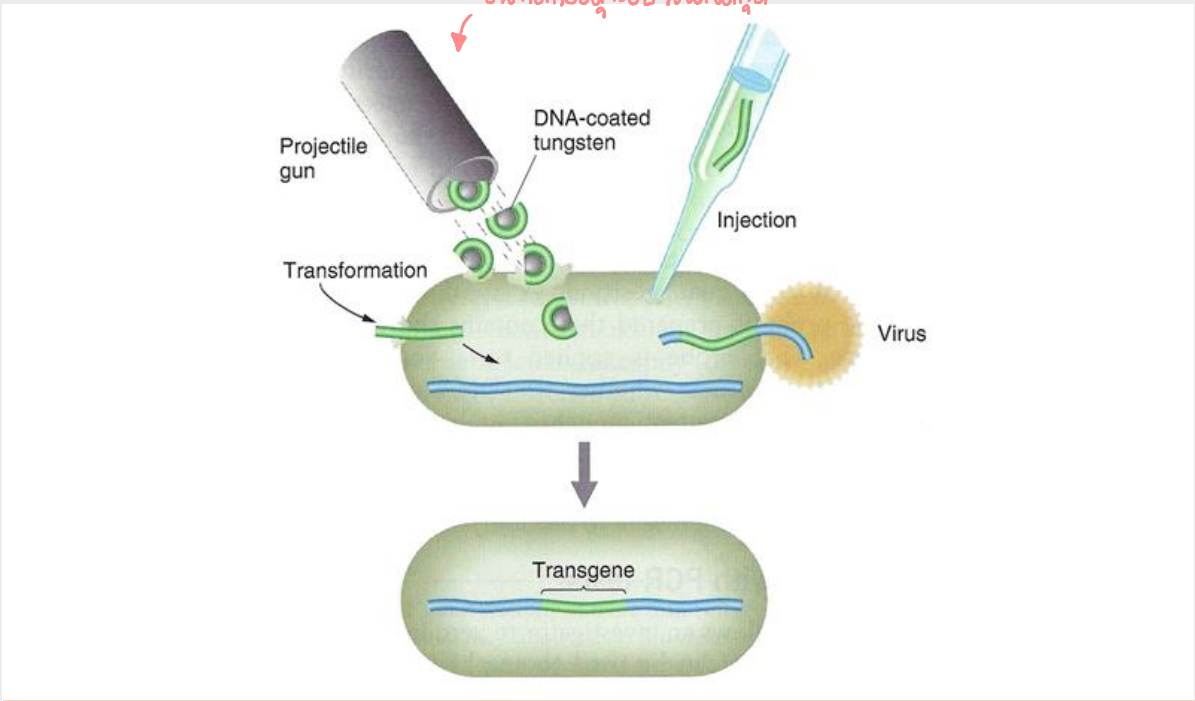
ด้วยวิธีการต่างๆ



สิ่งมีชีวิตที่ต้องการดัดแปลงให้เกิดลักษณะที่ต้องการ

(Host)

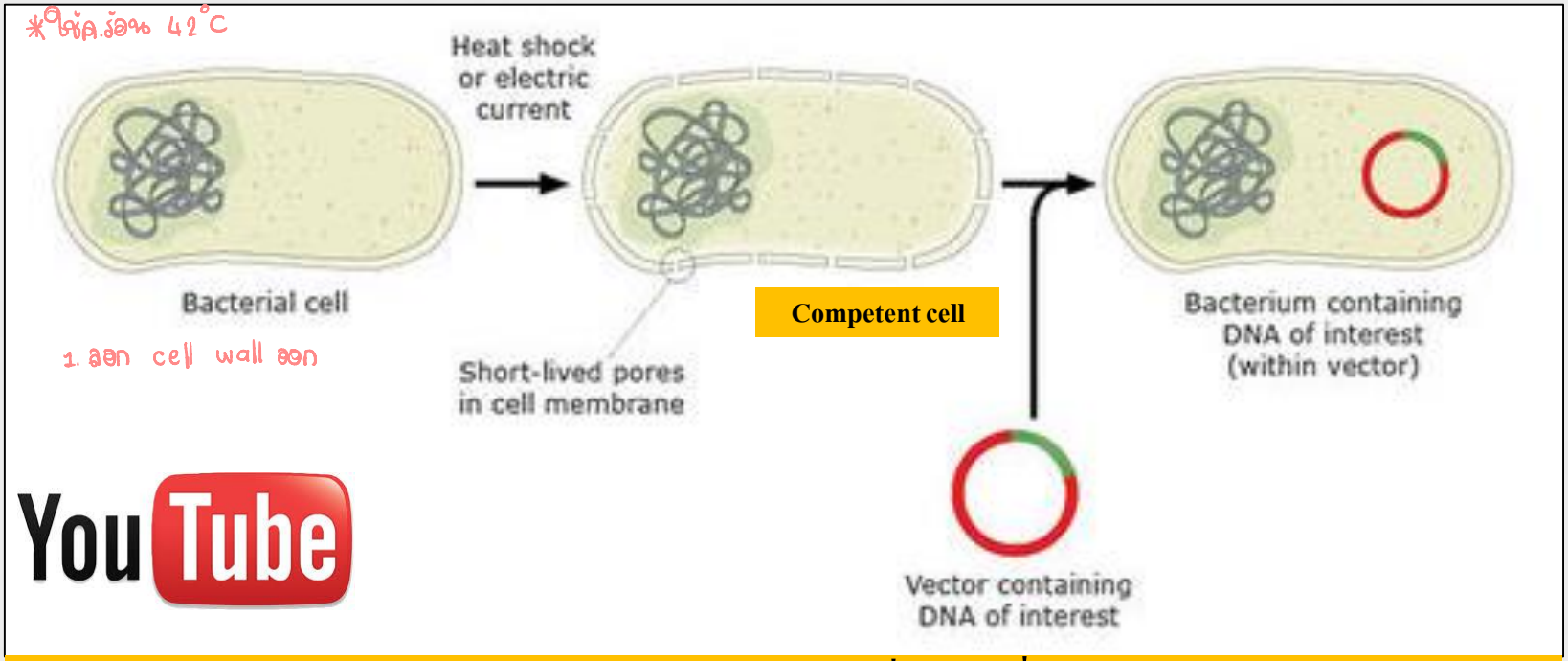
Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell: Bacteria



การส่งถ่าย Recombinant DNA molecule เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียทำได้หลายวิธี

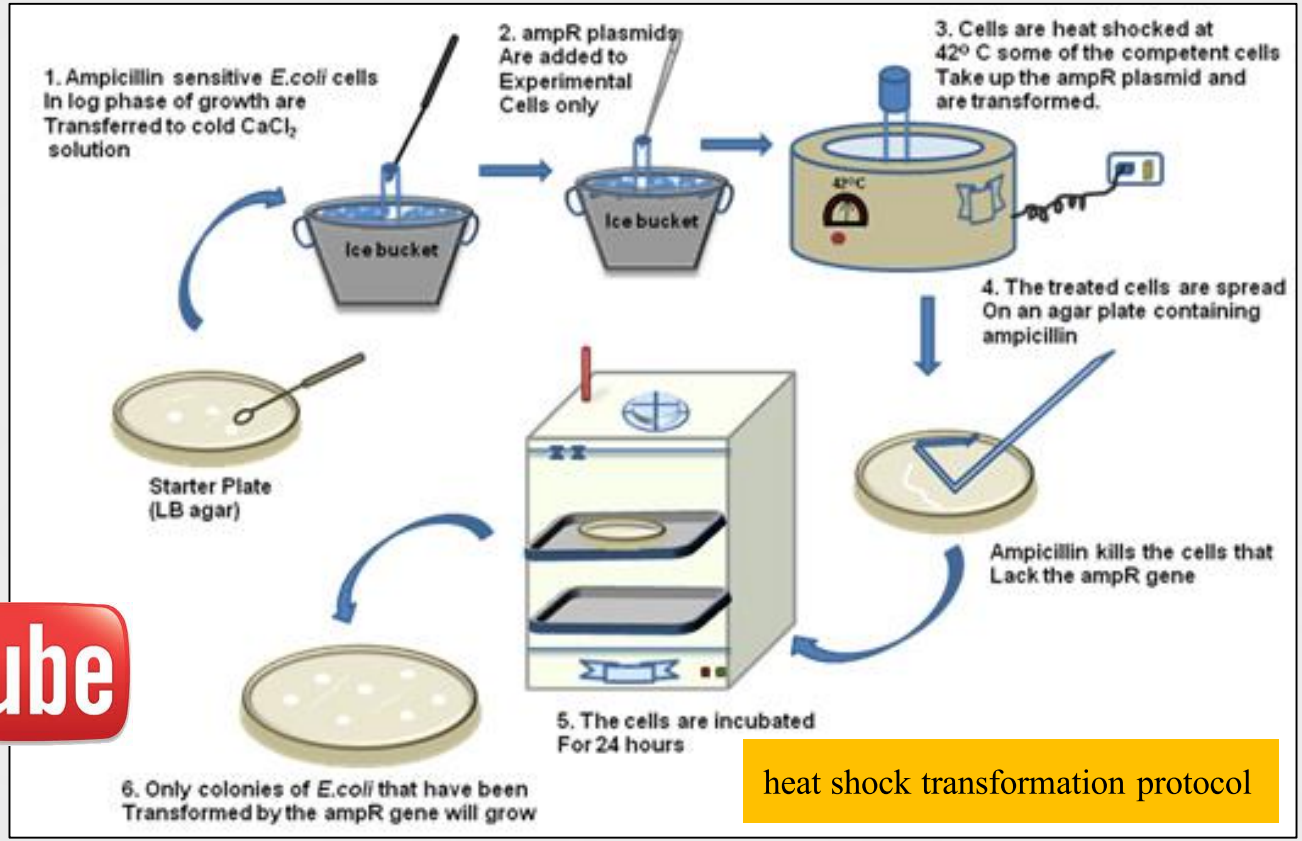
YouTube

Bacterial transformation-ทำได้ง่ายและรวดเร็ว



ใช้ heat shock (42 C) หรือกระแสไฟฟ้า ทำให้เกิดรูชั่วคราวที่ cell membrane ของแบคทีเรีย แล้วชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอจึงผ่านเข้าไปได้

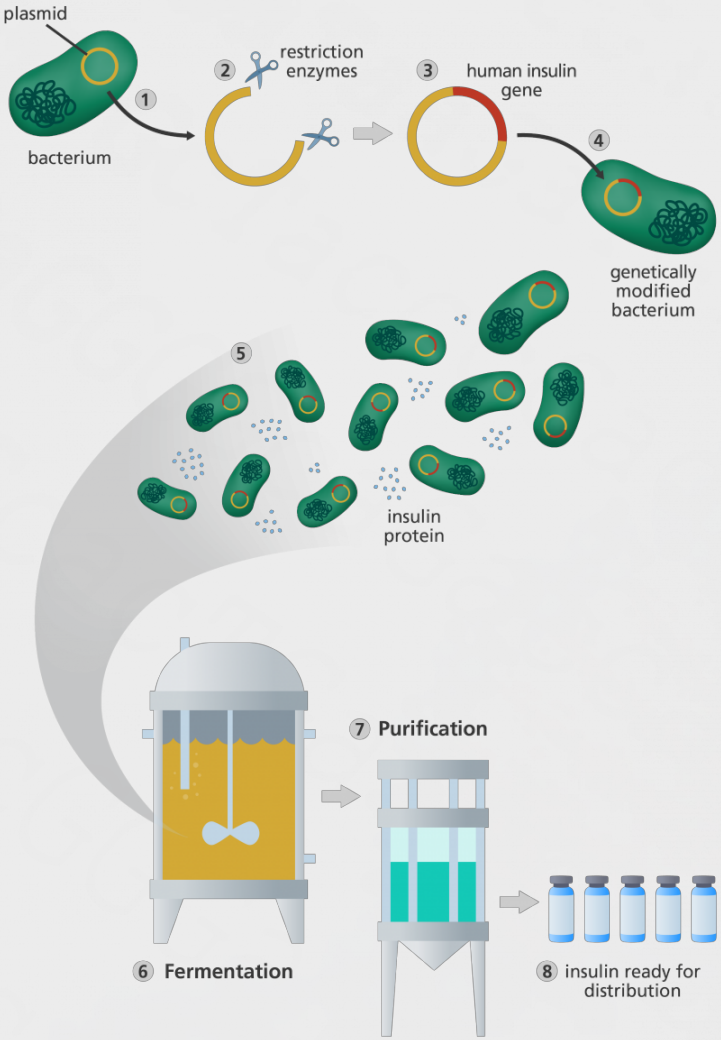
Bacterial transformation-ทำได้ง่ายและรวดเร็ว



YouTube

heat shock transformation protocol

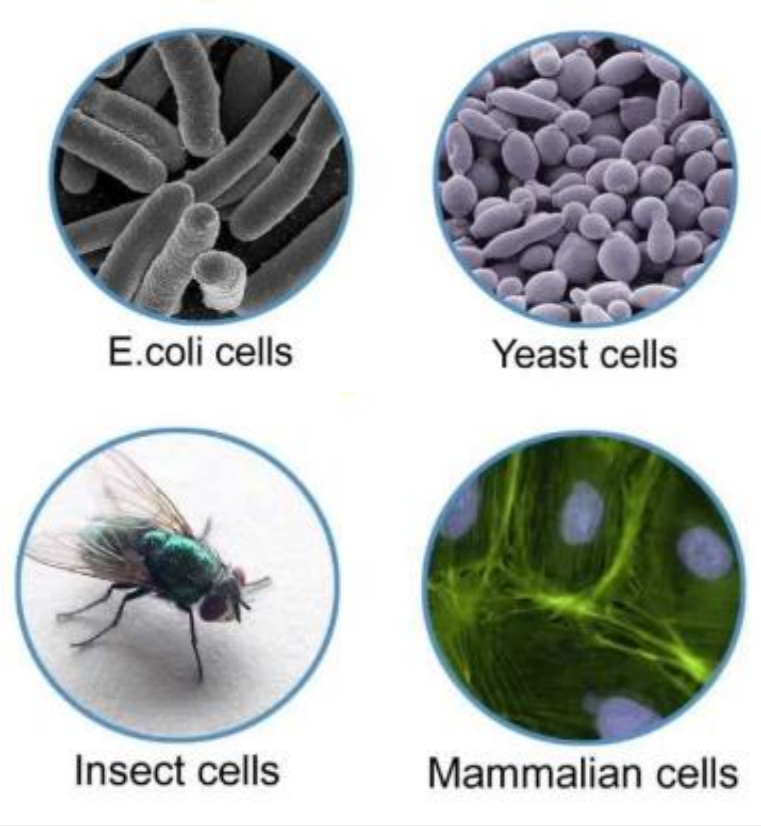
Transgenic bacteria



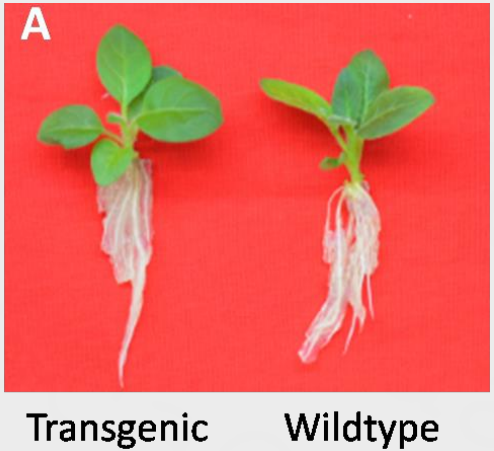
Commercial Recombinant Insulin Production

สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน

Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell



- Host cell เป็นอะไรได้บ้าง?
  - Archaea
  - **Bacteria**
  - Eukarya
    - Protists
    - Fungi
    - **Plant**
    - **Animal**
    - Organelles: Chloroplast & Mitochondria

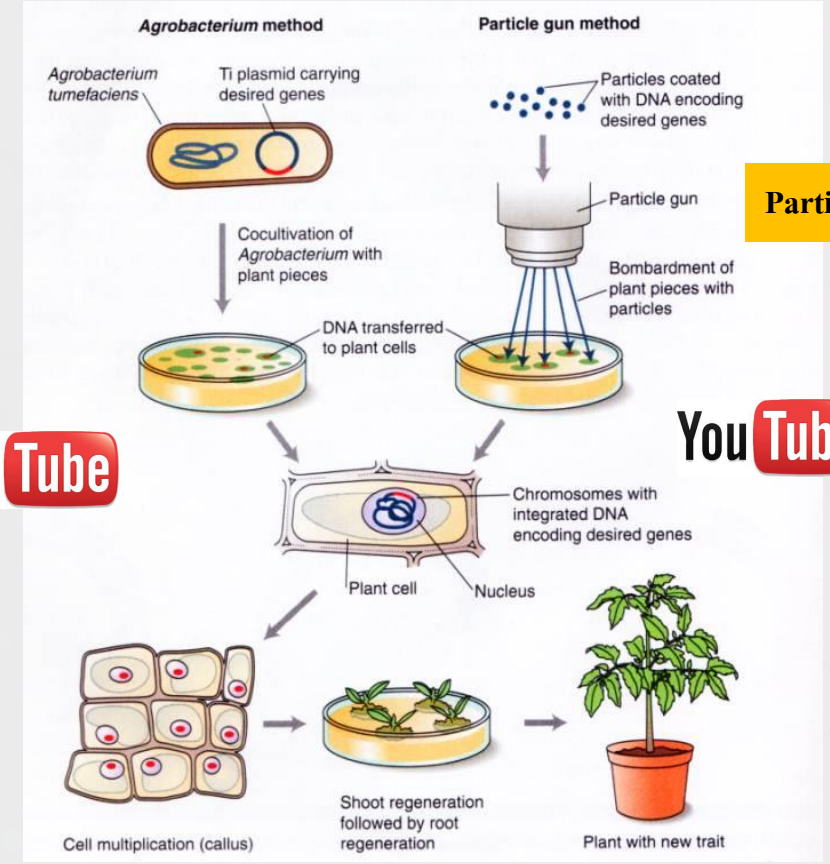


Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell: พืช

ที่ของมัน bacterium

***Agrobacterium*-mediated**

Particle gun/gene gun/particle bombardment

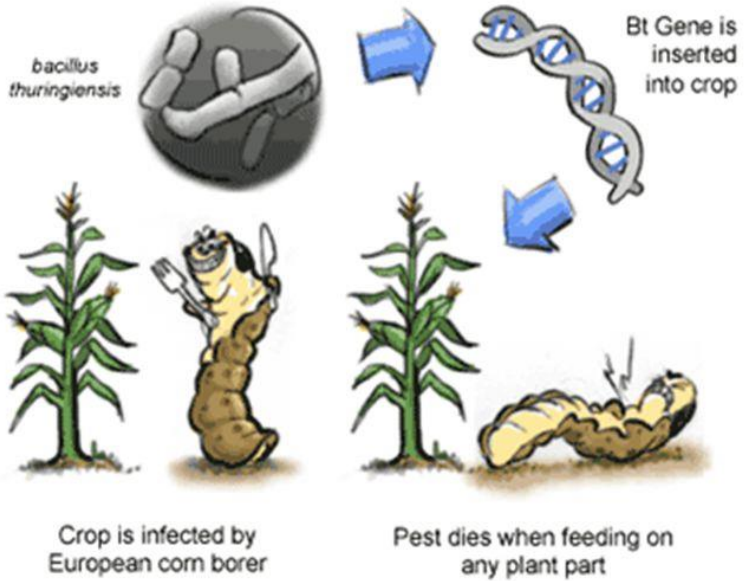


Transgenic plant- พืชดัดแปรพันธุกรรม

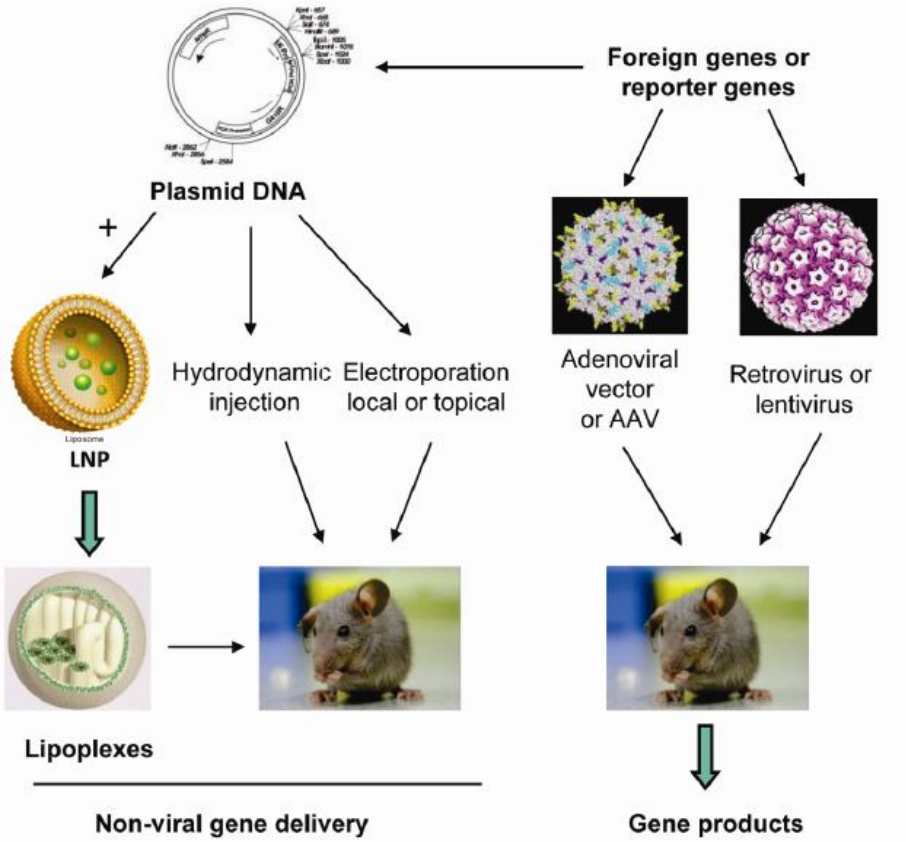
*Bt corn

ข้อดี : เกษตรกรปลูกได้โดยไม่ใช้ยาฆ่าแมลง

- Insert a bacteria (***Bacillus thuringiensis***) gene that makes a toxin into corn.
- Greater yield
- No use of pesticides



Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell: สัตว์

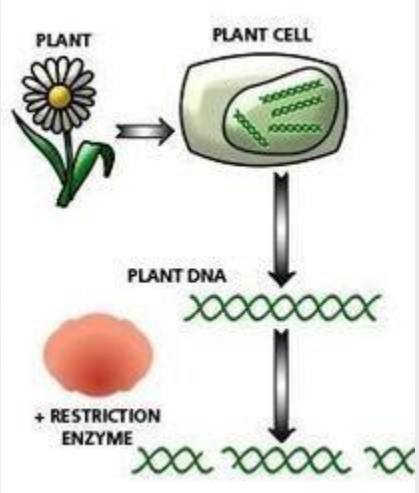


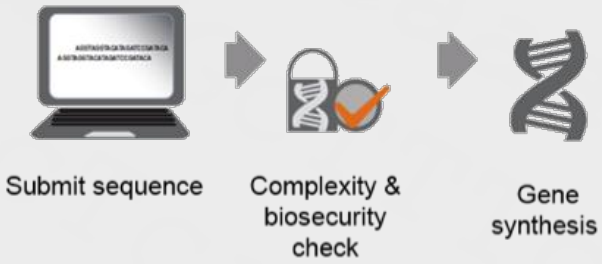
Transgenic animals-สัตว์ดัดแปรพันธุกรรม

หนูเรืองแสง

ปลาแซลมอนโตเร็ว

ยีน/ชิ้นดีเอ็นเอ หรือ Insert มาจากไหนได้บ้าง?





DNA extraction then cut

Old school

สกัดดีเอ็นเอ

Amplification of insert then cut

Classic

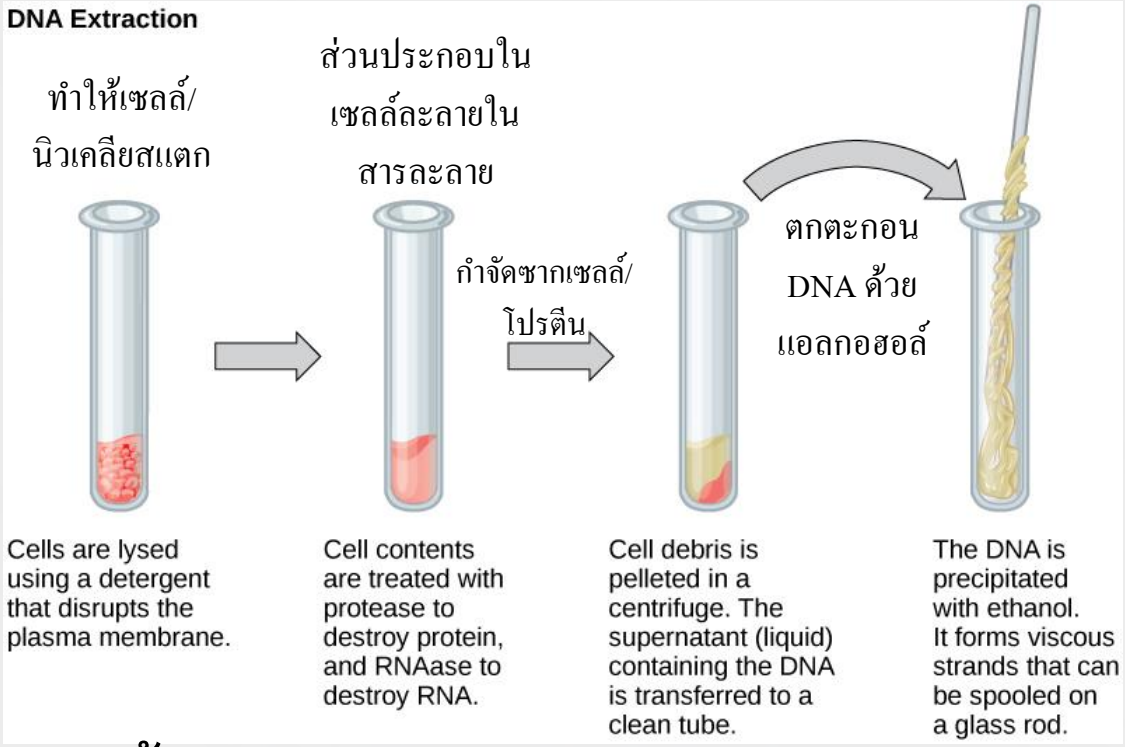
เพิ่มจำนวนในหลอดด้วย PCR

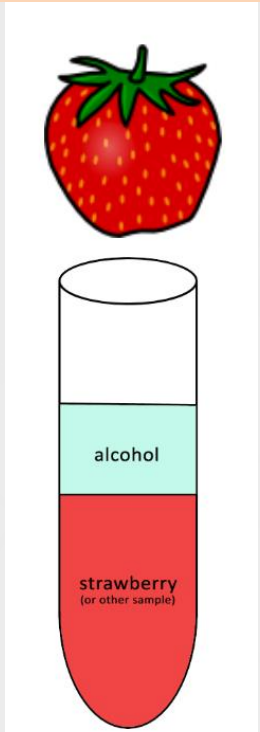
DNA synthesis then cut

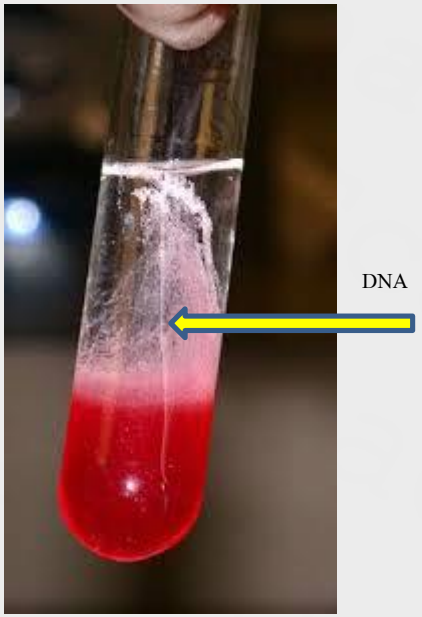
Modern

สังเคราะห์ทางเคมี

DNA extraction-แยกดีเอ็นเอจากส่วนอื่นของเซลล์

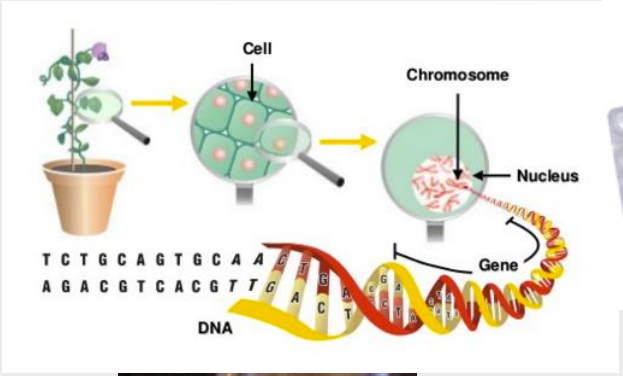


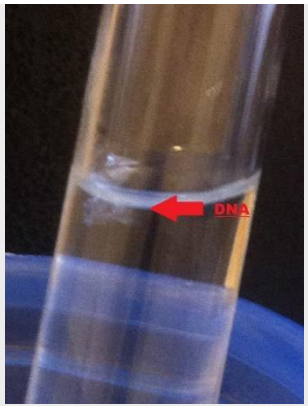




ขั้นตอนหลักของการสกัดดีเอ็นเอ

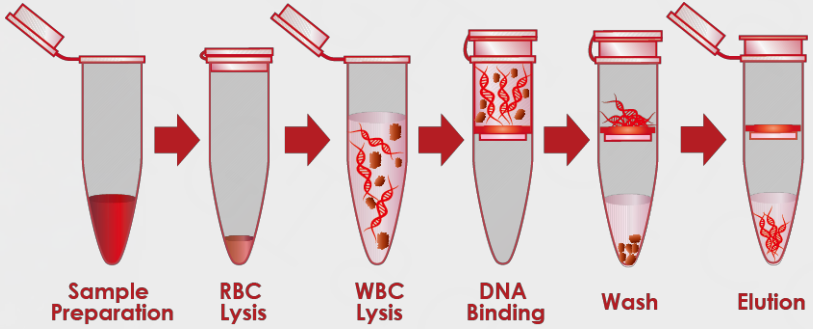
ชุดเครื่องมือสำเร็จรูป Genomic DNA/ plasmid isolation





ตัวอย่างชุดสกัดดีเอ็นเอที่มีขายในเชิงพาณิชย์

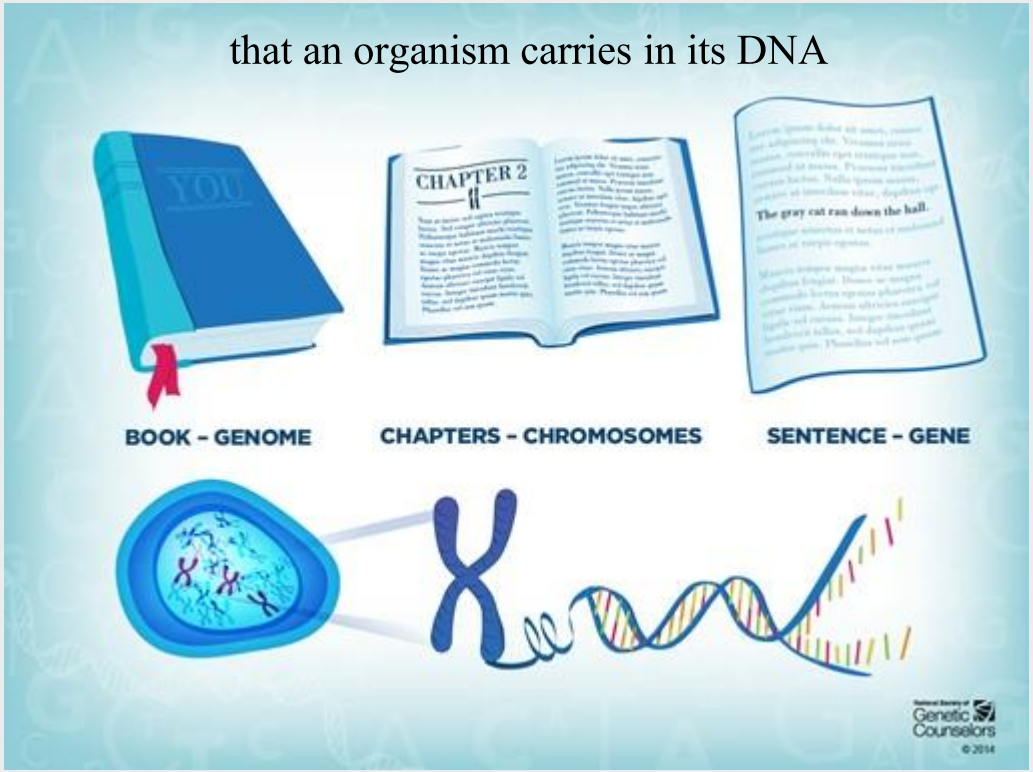
DNA extraction kit



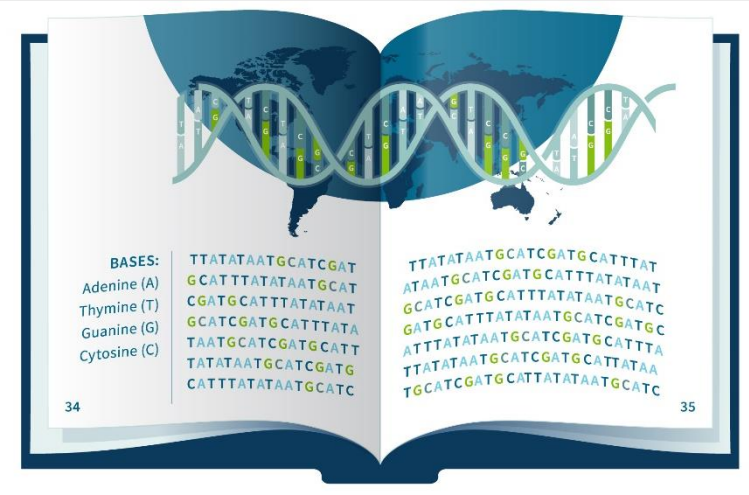
A full set of DNA = Genome

A genome is the full set of genetic information

that an organism carries in its DNA



Genome = A book

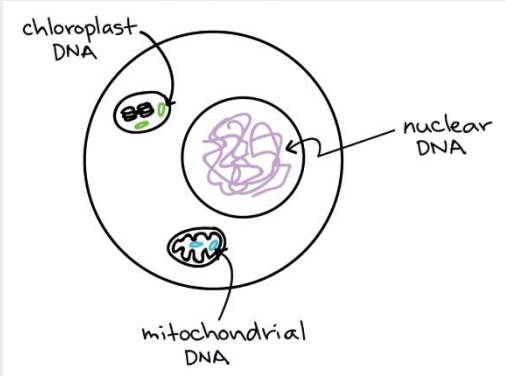


a book with only 4 letters

A T G C

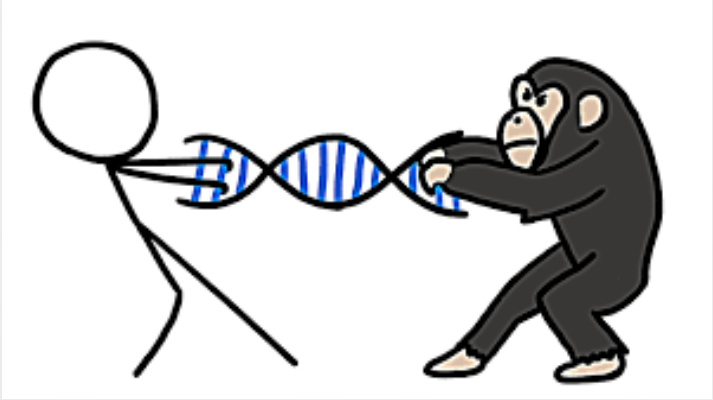
การศึกษาจีโนม (genome)

- จีโนม (Genome) หมายถึง ข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ โดยอาจอยู่ในรูปของ DNA หรือ RNA (ในกรณีของ RNA virus) ก็ได้ โดยนับรวมทั้งส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสด้วย
  - **Genomics** is the study of whole sets of genes and their interactions
  - **Bioinformatics** is the application of computational methods to the storage and analysis of biological data
- จีโนม (Genome) ของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันและสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีขนาดของจีโนมแตกต่างกัน
- จีโนมของแบคทีเรีย = chromosomal DNA + plasmid DNA
- จีโนมของพืช = chromosomal DNA + plastid DNA + mitochondrial DNA



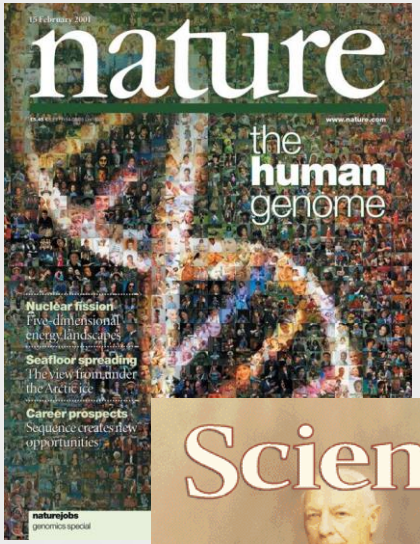
Species	*T2 phage*	*Escherichia coli*	*Drosophila melanogaster*	*Homo sapiens*	*Paris japonica*
Genome Size	170,000 bp	4.6 million bp	130 million bp	3.2 billion bp	150 billion bp
Common Name	Virus	Bacteria	Fruit fly	Human	Canopy Plant

The genetic similarity between a human and a chimpanzee is……%



https://en.wikipedia.org/wiki/Human_genome

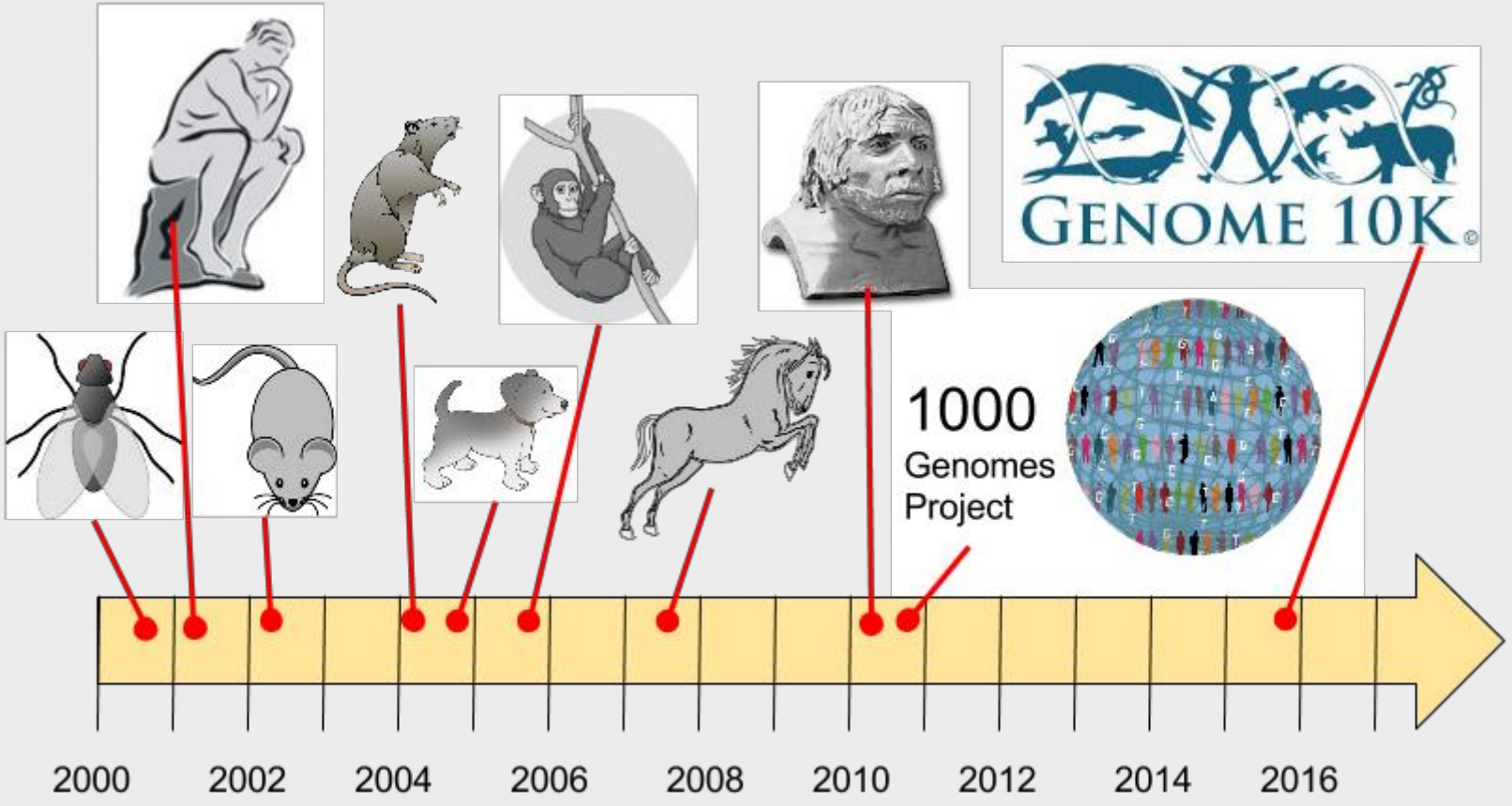
Human genome Project



- โครงการจีโนมมนุษย์ (The Human Genome Project; HGP) เป็นอภิมหาโครงการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ศึกษาจัดทำแผนที่ของจีโนมของมนุษย์ ซึ่งมีความละเอียดระดับนิวคลีโอไทด์ หรือ คู่เบส เพื่อที่จะวิเคราะห์ตำแหน่งของหน่วยพันธุกรรม หรือ ยีนของมนุษย์ complete genome sequences ใช้เวลาตั้งแต่ คศ.1990-2003 หลายประเทศช่วยกัน
- 23 chromosome pairs
- 3,100 Mbp (mega-basepairs) per haploid genome
- Coding (<2%) vs. noncoding DNA (98%)
- **how many gene are in a human genome**?

https://www.youtube.com/watch?v=MvuYATh7Y74

การศึกษาจีโนม- from Bacteriophage to Human



นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาข้อมูลของสารพันธุกรรมได้ในเชิงลึก อีกทั้งเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

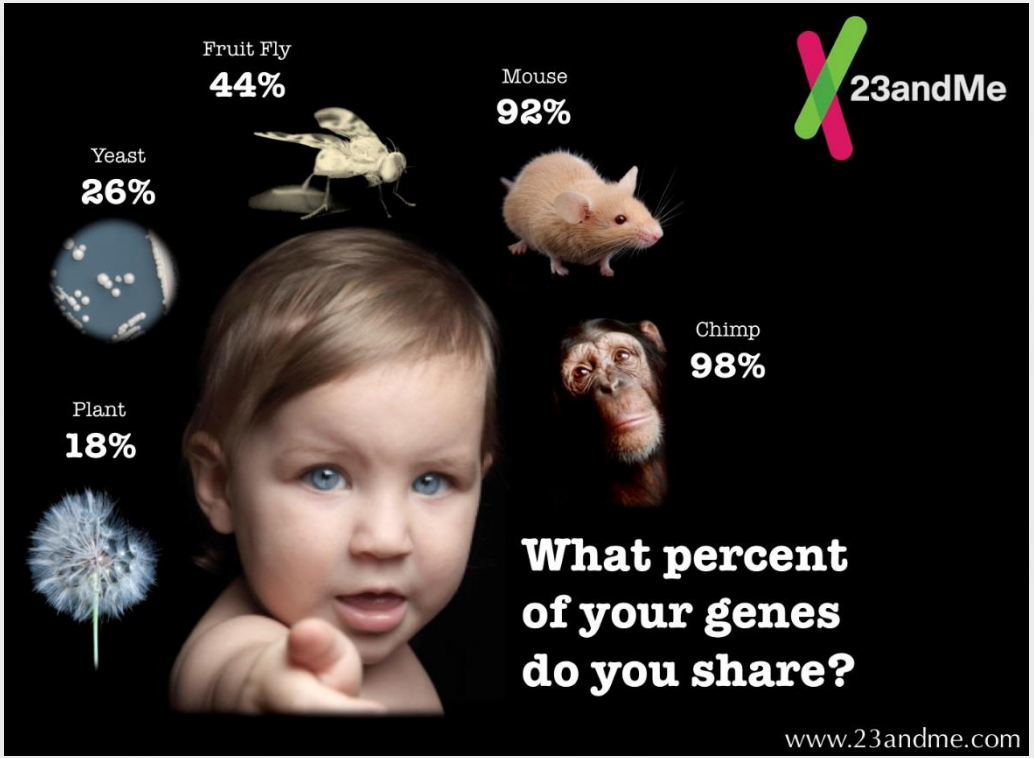
Genome size comparison

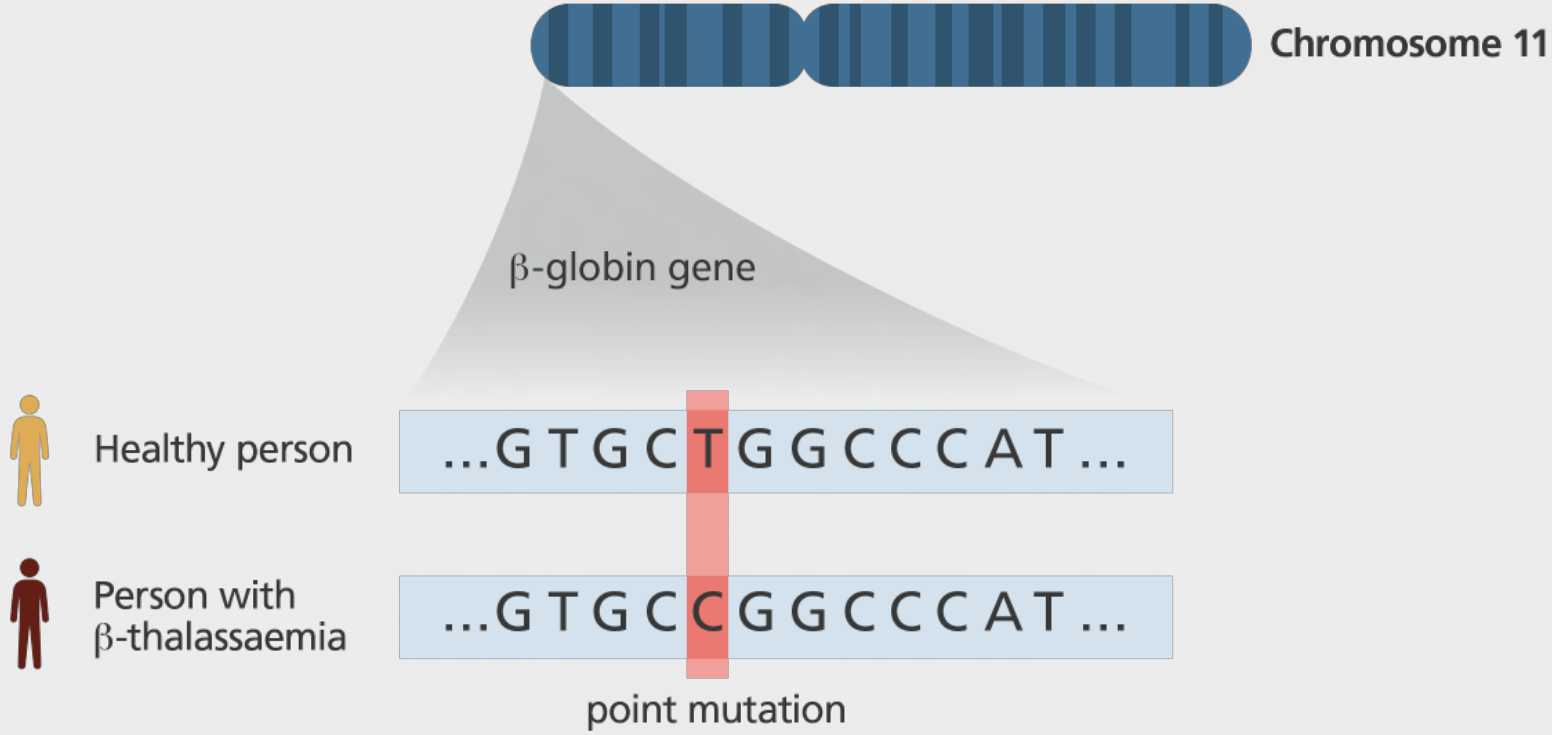
*19,000-20,000 genes

Species	Chromosomes	Genes	Base pairs
Human *(Homo sapiens)*	46 (23 pairs)	28-35,000	3.1 billion
Mouse *(Mus musculus)*	40	22.5-30,000	2.7 billion
Puffer fish *(Fugu rubripes)*	44	31,000	365 million
Malaria mosquito *(Anopheles gambiae)*	6	14,000	289 million
Fruit fly *(Drosophila melanogaster)*	8	14,000	137 million
Roundworm *(C. elegans)*	12	19,000	97 million
Bacterium* *(E. coli)*	1	5,000	4.1 million

*Bacterial chromosomes are chromonemes, not true chromosomes

JOHN BLANCHARD / *The Chronicl*





เปรียบเทียบข้อมูลจีโนมของคนปกติกับคนป่วยเพื่อศึกษาสาเหตุของโรคในระดับ DNA

Q: DNA technology ทำอย่างอื่นได้อีกไหม?

A: ได้ ได้หลายอย่างเลยล่ะ

Genome = A book

A book with only 4 letters

Cut DNA into fragment at precise location → Restriction enzyme

Join DNA fragment → DNA ligase

Transport DNA into cells → Vector

Produce millions of DNA fragment → Polymerase Chain reaction; PCR

Separate DNA fragment by size → Gel electrophoresis

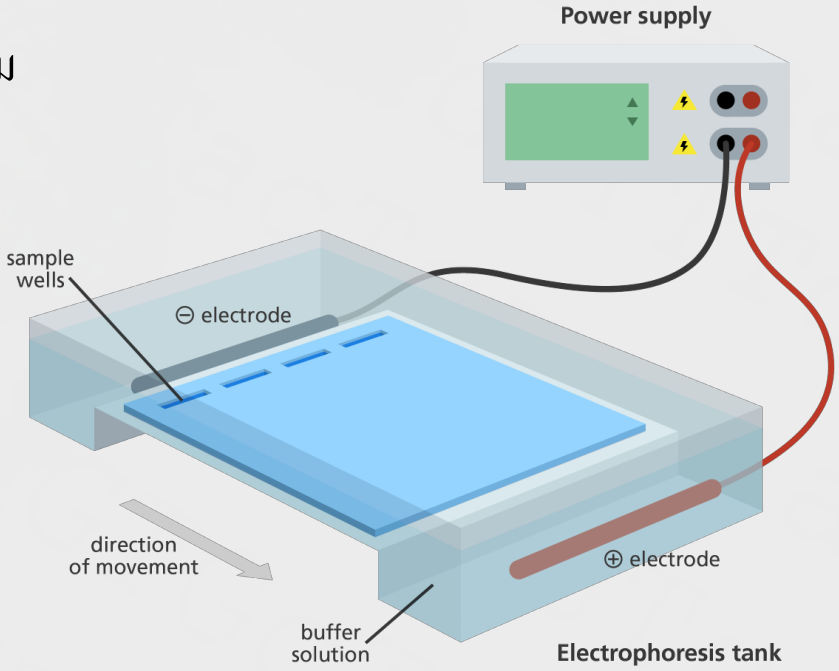
Writing a sentence → DNA synthesis สังเคราะห์

Reading a book → DNA sequencing หาลำดับ

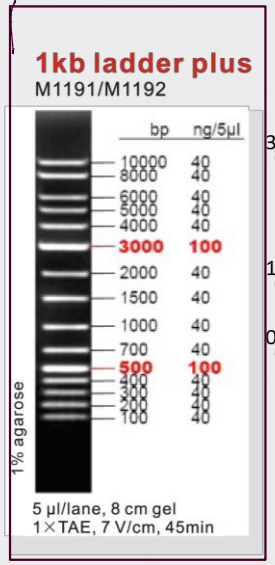
Editing a book → DNA editing ปรับแต่ง

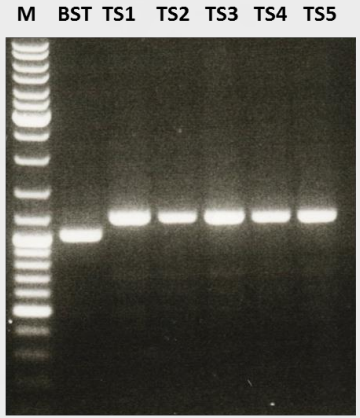
Only way to see DNA is by Gel electrophoresis

- DNA ละลายน้ำได้ดี ใส ไม่มีสี มองเห็นได้ด้วยการย้อมด้วยสีที่เรืองแสงภายใต้รังสี UV
- DNA เคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นแผ่นวุ้น เช่น agarose gel หรือ polyacrylamide gel ที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าและบัฟฟอร์ (pH~ 8.3)
- DNA molecule จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก โดยโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลใหญ่
- เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบขนาด ที่เรียก DNA ladder จะทำให้ทราบขนาดคร่าวๆ ของดีเอ็นเอที่สนใจจากแถบ (band)



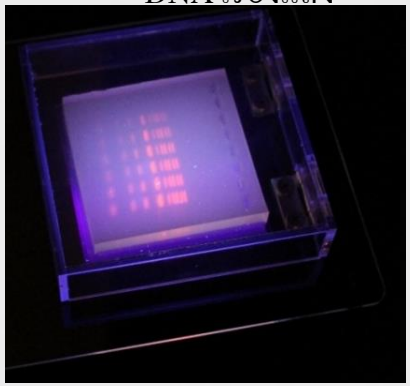
Gel electrophoresis





ภาพถ่าย DNA

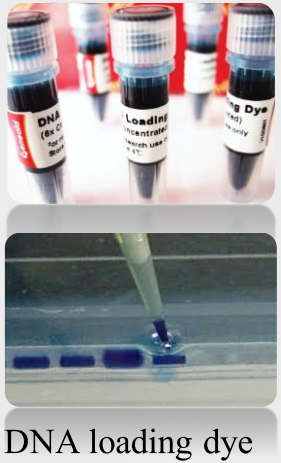
DNA เรืองแสง



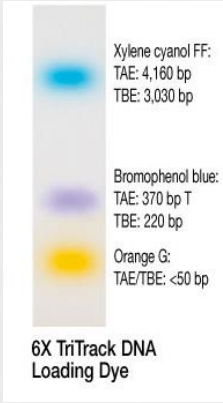
UV illuminator

- ดีเอ็นเอละลายน้ำได้ดี ใส ไม่มีสี
- มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น
- ย้อม DNA ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ ตรวจสอบภายใต้ UV สารย้อมเหล่านี้สามารถแทรกเข้าไปจับกับโมเลกุลของ double –stranded DNA ทำให้มนุษย์สามารถตรวจสอบดีเอเอ็นเอได้
- สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับทำงานกับดีเอ็นเอมีขายเพื่อให้สามารถศึกษา/วิจัยได้

DNA Ladder

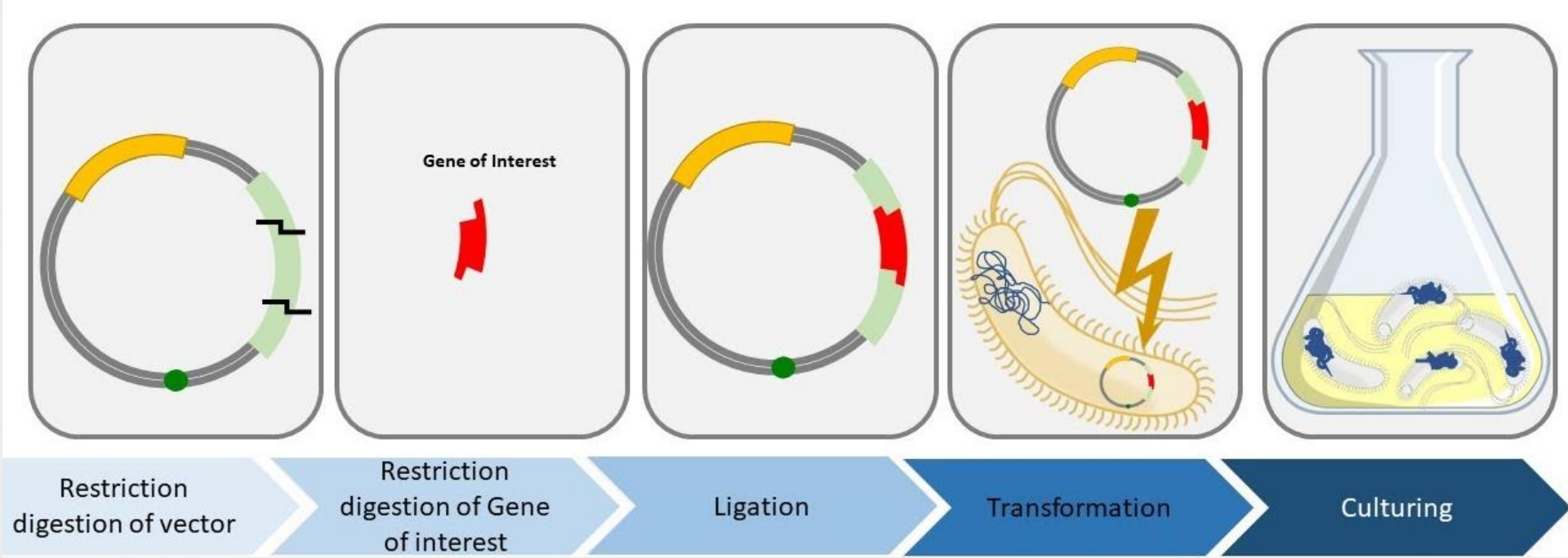


DNA loading dye



Ethidium bromide

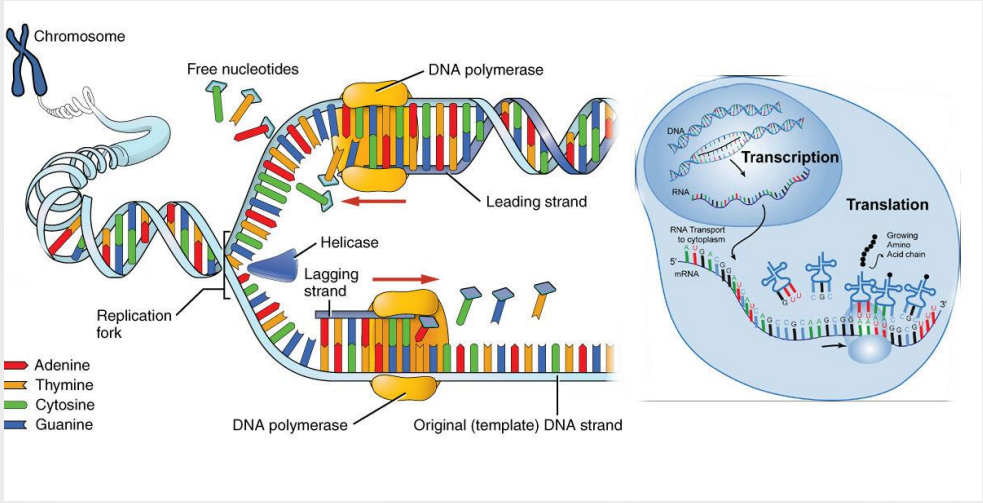
(Classical) DNA cloning: เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ/ยีนที่ต้องการ (เพราะมีน้อยเอาไปใช้ศึกษา/ทำประโยชน์ยาก)



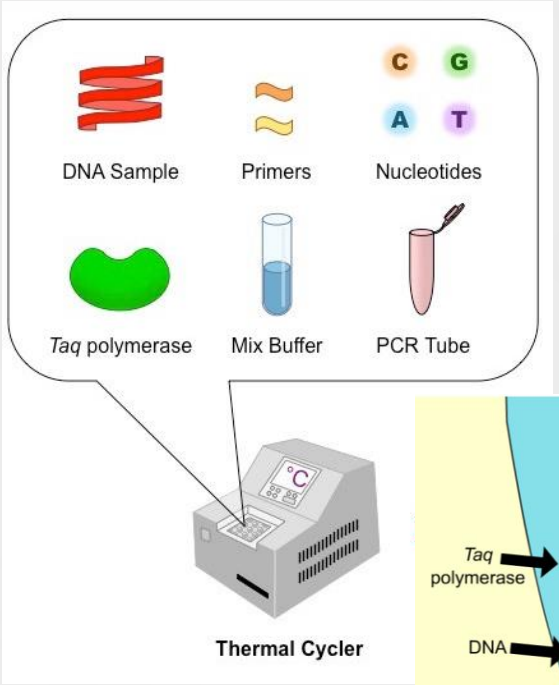
DNA cloning ในแบคทีเรีย/ยีสต์ต้องใช้เวลา ทรัพยากร แรงงานบุคคล (ที่มีความเชี่ยวชาญ) มาก

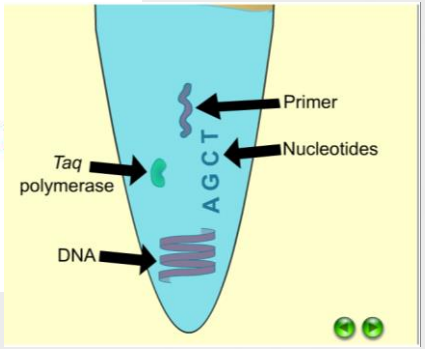
Polymerase **C**hain **R**eaction; PCR

DNA replication inside the cell



DNA replication outside the cell





การเพิ่มชิ้นส่วน DNA ในหลอดแก้วโดยไม่ต้องใช้เซลล์สิ่งมีชีวิตใดๆ อาศัยเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตด้วยเอ็นไซม์ DNA polymerase

การโคลน DNA/ยีนในหลอดทดลองโดยใช้เทคนิคพอลิเมอเรสเชนรีแอคชัน

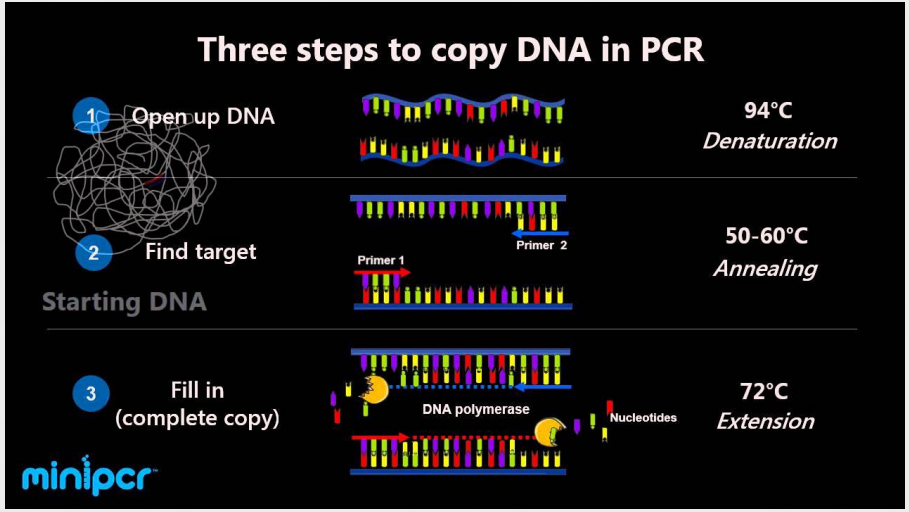
DNA/gene cloning via polymerase chain reaction (PCR)

- อาศัยการทำงานของ Thermophilic DNA polymerase + Thermocycler

1) **<u>การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation)</u>** อุณหภูมิประมาณ 94 °C จากดีเอ็นเอแม่แบบเกลียวคู่ การเพิ่มอุณหภูมิถึง~ 94 °C จะทำ H-bond ระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ดีเอ็นเอแยกจากกันเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้แตกต่างจากการสังเคราะห์ DNA ในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ Helicase ช่วยในการแยกและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2) **<u>การจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)</u>** ใช้อุณหภูมิ 40-62 °C เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาด 15-25 เบส ที่เรียกว่า ไพร์เมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน เริ่มการสังเคราะห์ที่ปลาย-OH ของด้าน 3‘ โดยการนำนิวคลีโอไทด์ (A, G, T, C) มาต่อ

3) **<u>การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension)</u>** ใช้อุณหภูมิประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส ขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพร์เมอร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับการทำงานของ DNA polymerase

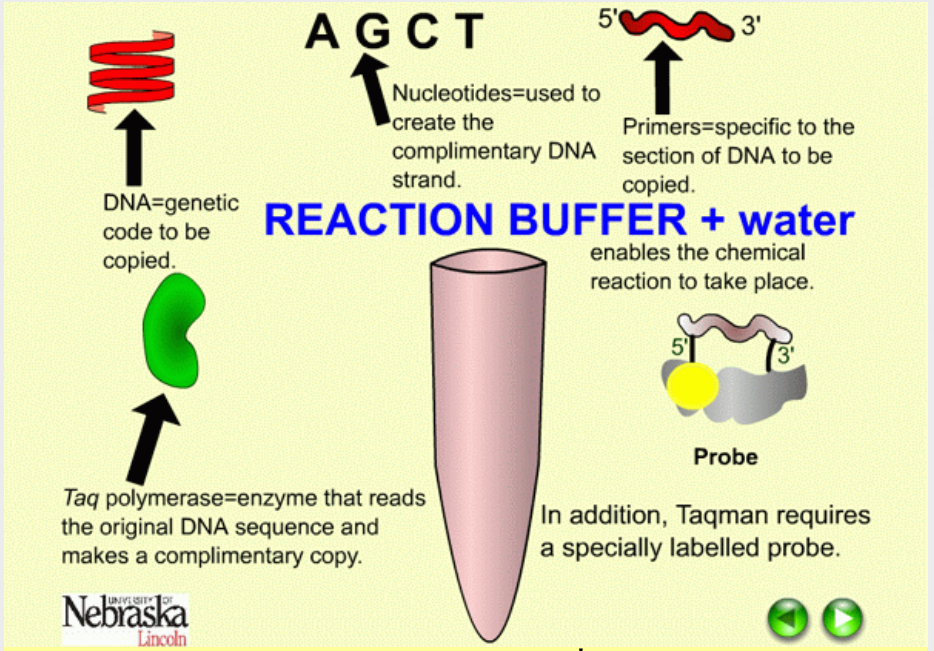


thermocycler

PCR components & reactions

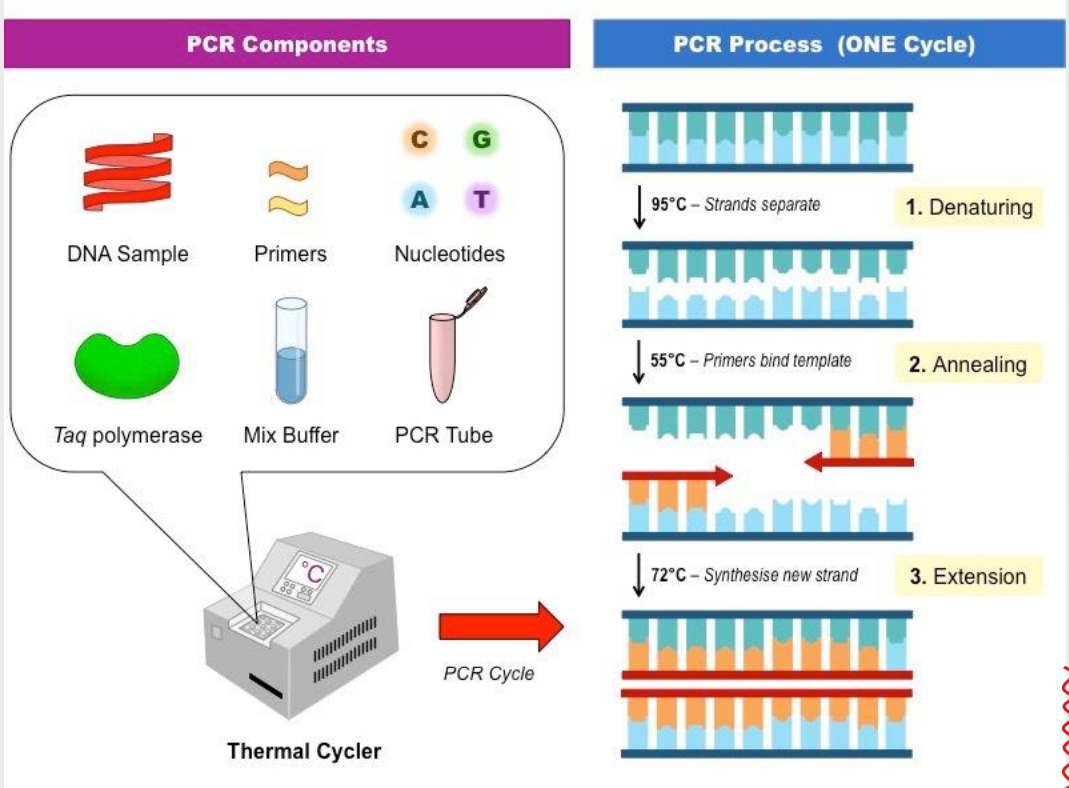
- **การเกิดปฏิกริยาในหลอดทดลองต้องอาศัยองค์ประกอบต่อไป**

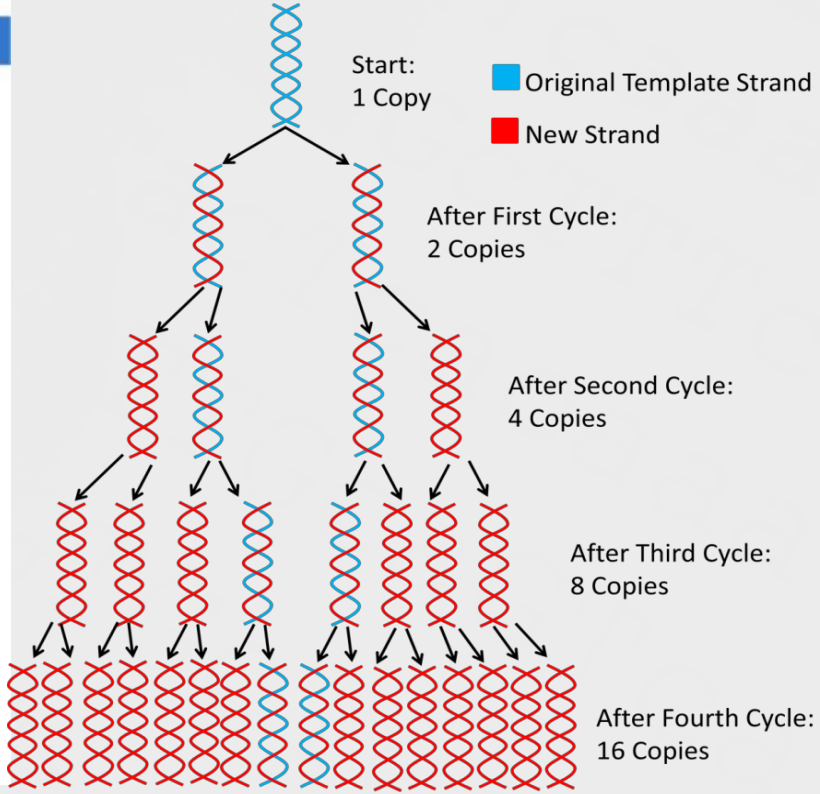
1) DNA แม่แบบ (DNA template) ที่มีส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน
2) Oligonucleotide ซึ่งทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ (primer) ที่จะเกาะกับชิ้นส่วนของ DNA เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้าง DNA สายใหม่ มักมี forward และ reverse primer
3) Nucleotides: A, G, T และ C
4) เอนไซม์ DNA polymerase (และบัฟเฟอร์)
5) น้ำฆ่าเชื้อ และ nuclease-free



มักเรียก *Taq* polymerase เพราะเอ็นไซม์ที่นำมาใช้ยุคแรกๆ แยกได้จาก ***Thermus aquaticus*** ปัจจุบันมี DNA polymerase มากมายที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

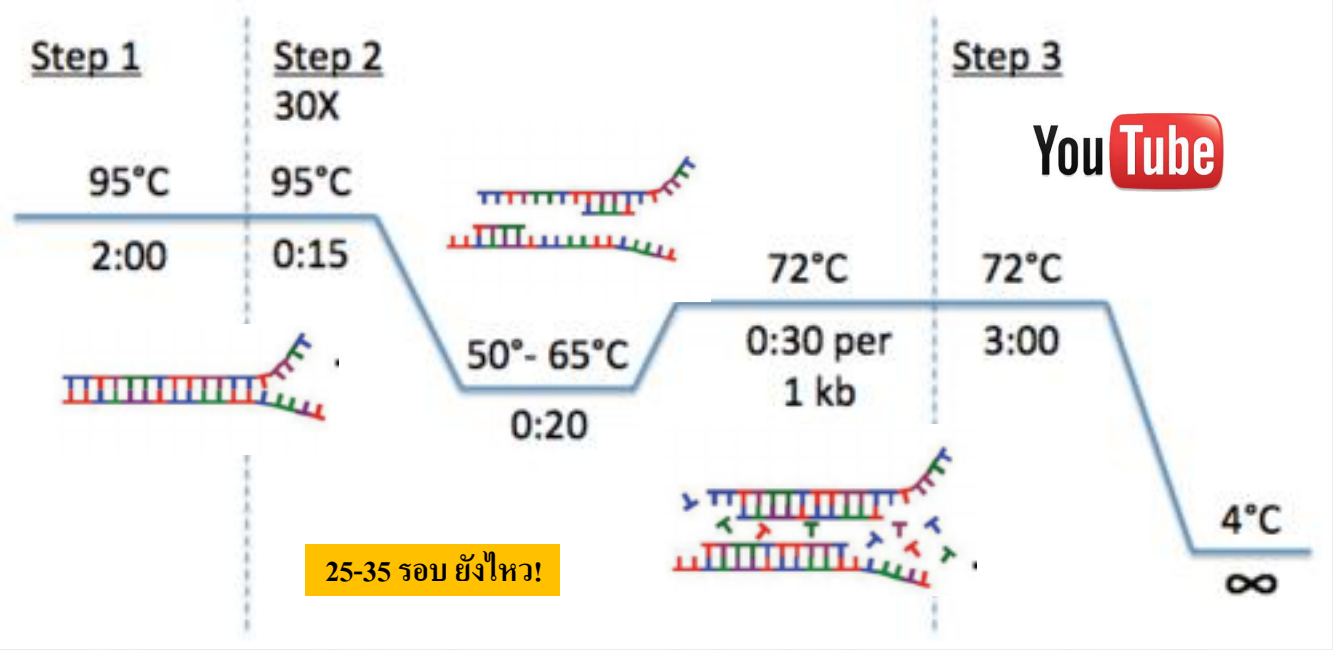
PCR processing





ทำ PCR วนไปค่ะ!

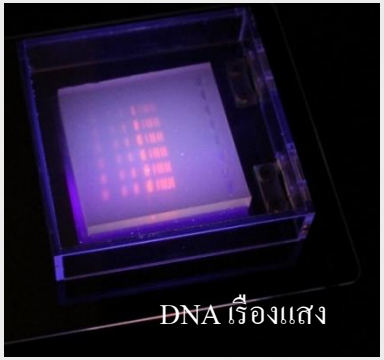
- สามารถเพิ่มจำนวน DNA molecule ที่ต้องการจาก DNA template ปริมาณน้อยมากๆ เพียง 10-20 นาโนกรัม ได้ในเวลาอันรวดเร็ว
- ไม่สามารถศึกษาการแสดงออกของยีน
- อาจเกิดความผิดพลาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA สายใหม่



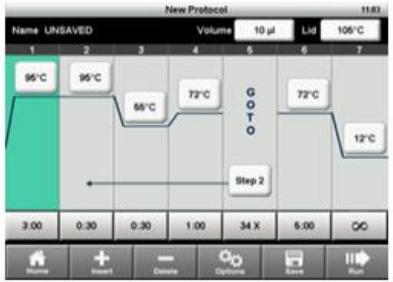
PCR process

YouTube

UV illuminator

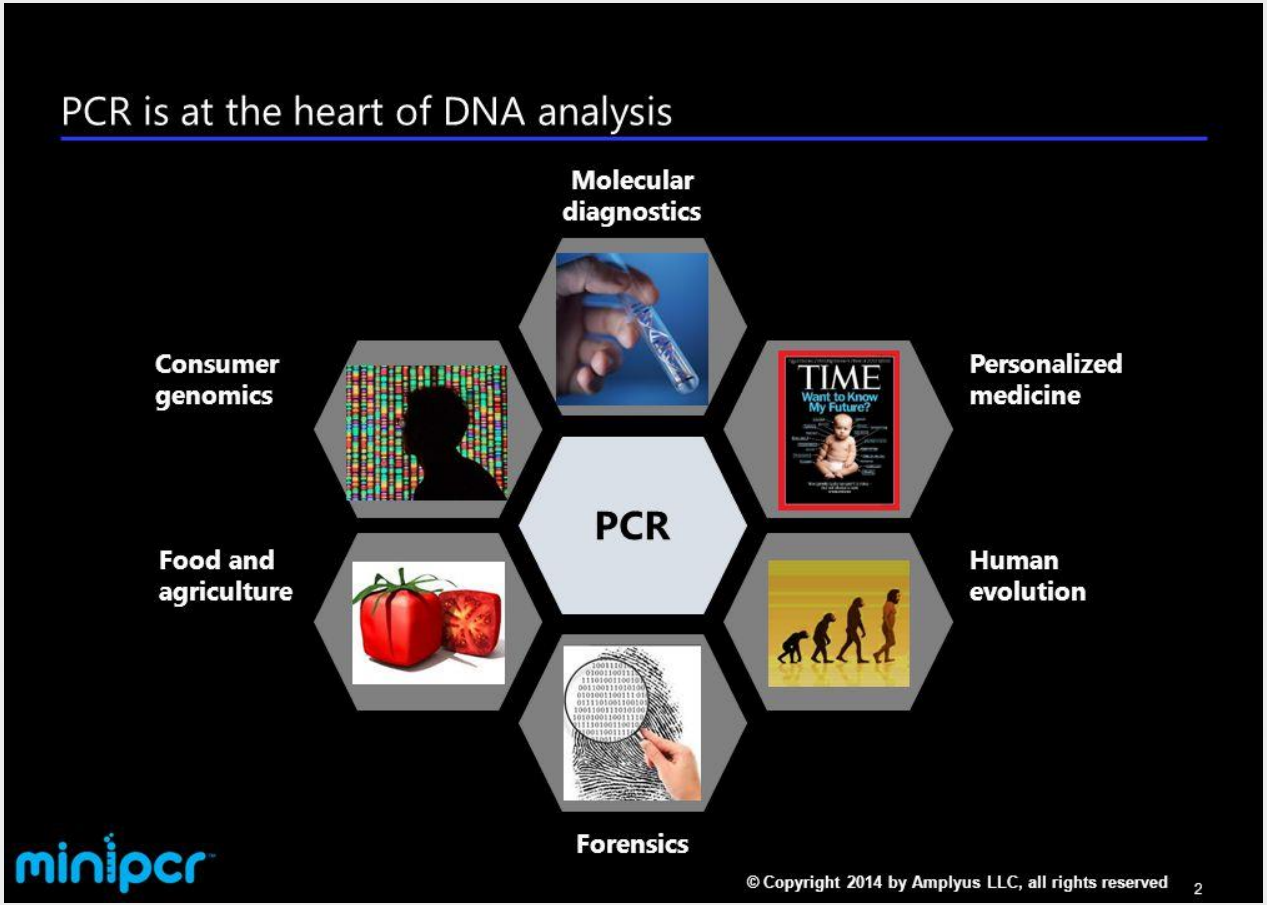


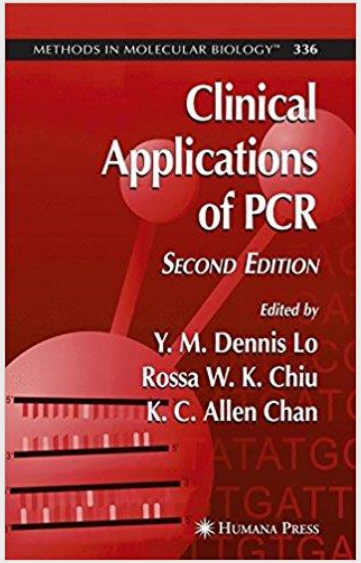
Home screen.



New Protocol screen.

Application of PCR





PCR is just a tool.

How to use it, definitely up to you!!

Mosquito Preserved in Amber

(Photo by Karen Fiorino.)