



DNA technology and Cloning

วิทย์ชีวภาพ

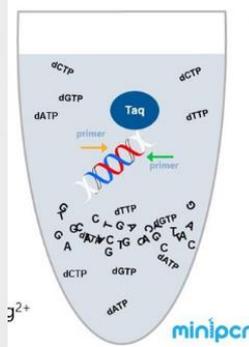
อ.ดร.ธัชชา ศุกระจันทร์

Timeline of DNA technology

(1856-1863)



early 1970s



Mendel

Genetic Engineering/GMOs

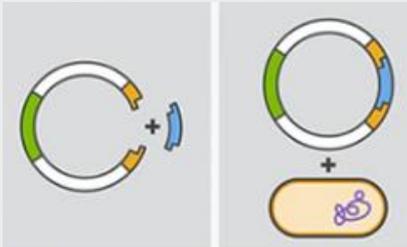
PCR

Human genome Project

Gene editing (2020)

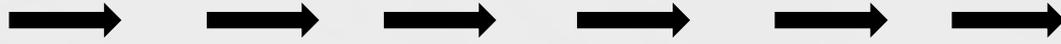
(1993)

(2003)



การพัฒนาเทคโนโลยีเกิดขึ้นรวดเร็วมาก

Theory



CRISPR baby

(2 y old)



สังเกตสิ่งที่
ปรากฏอยู่แล้ว
ในธรรมชาติ

นำไป
ใช้ประโยชน์

ศึกษาทดลอง
เพื่อหา
คำอธิบาย





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



การคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดีจัดการอย่างง่าย เช่น ให้อา ฆ่าตัดใส่ปุ๋ย ตอนกิ่ง

classical biotechnology

molecular biology

การถ่ายถอดและแสดงออกทางพันธุกรรมโดยดีเอ็นเอ

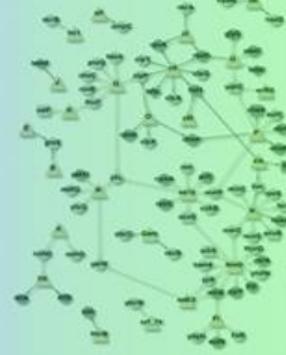


การตัดต่อยีนง่ายๆ เช่น recombinant insulin, BT-tobacco

genetic engineering

system biology

เครือข่ายความสัมพันธ์อันยุ่งเหยิงของยีนหลายๆตัว



การวิศวกรรม “ระบบของยีน” หลายๆ ยีนที่ต้องทำงานร่วมกันเพื่อสร้างฟีนอไทป์ที่ซับซ้อน

synthetic biology

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

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

– our best friend!!!

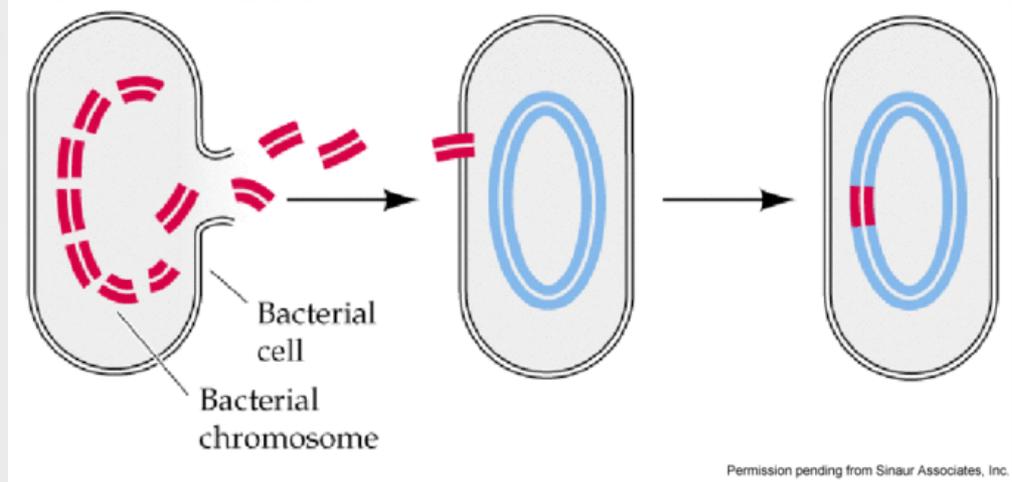
100x Light microscope



g-/short rod/ gut of warm blooded
เลี้ยงง่าย โตไว (overnight/16h) ไม่สร้างสารพิษ



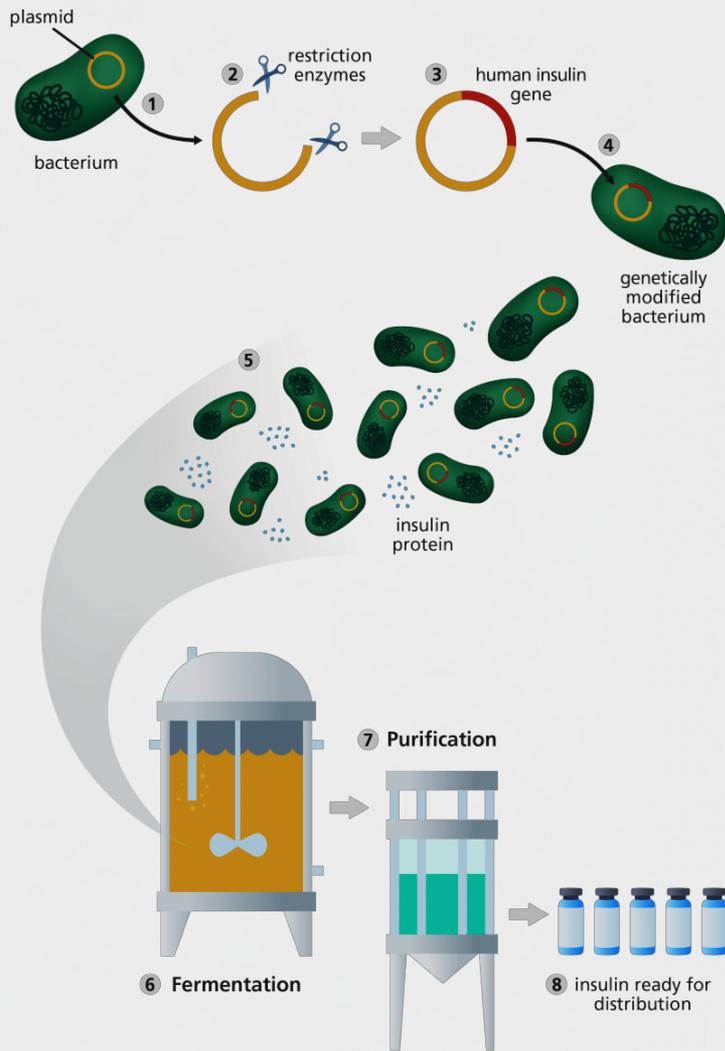
SEM



Transformation

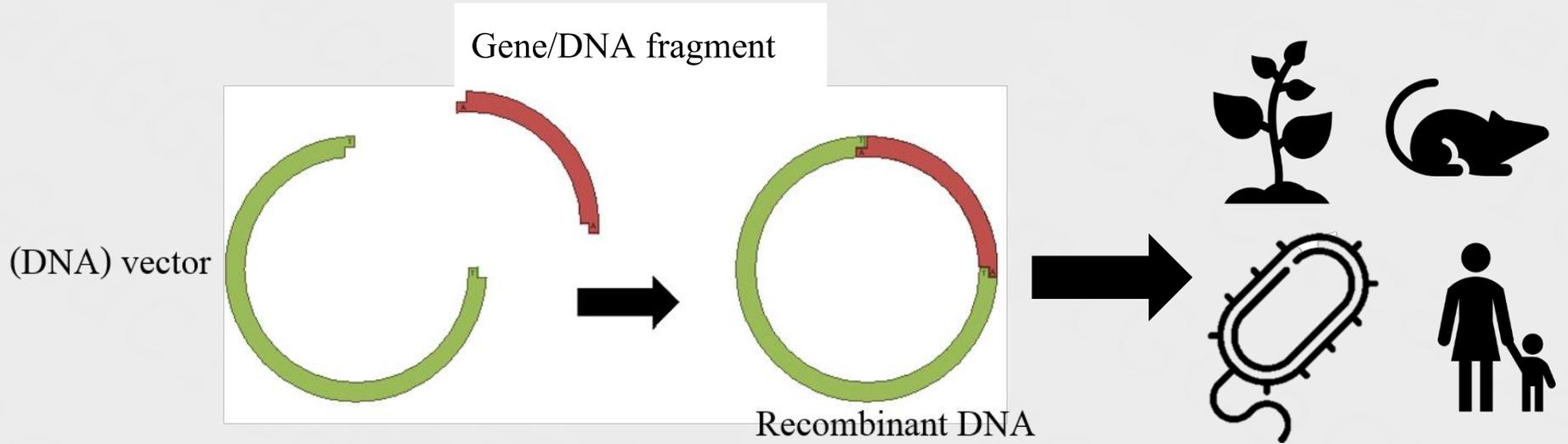
ในธรรมชาติ-กระบวนการที่ทำให้เกิดการส่งผ่านสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง

DNA technology – การทำให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะตามต้องการโดยอาศัยการส่งถ่าย DNA ที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวเข้าไปในสิ่งมีชีวิตนั้น



แผนภาพการสร้างแบคทีเรียที่ผลิต
ฮอร์โมนอินซูลินสำหรับผู้ป่วย
เบาหวานด้วยการใช้เทคนิคการตัด
ต่อยีนจากคนใส่เข้าไปในแบคทีเรีย

DNA technology = Genetic engineering = Recombinant tech.



DNA fragment = ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือ ยีน (บางครั้งเรียก insert)

DNA vector = ดีเอ็นเอพาหะที่สามารถขนส่งชิ้นดีเอ็นเอ/ยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้

Recombinant DNA = โมเลกุลดีเอ็นเอที่เกิดจากการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน (บางครั้งเรียก ดีเอ็นเอลูกผสม)

สิ่งมีชีวิตที่ต้องการดัดแปลง

Biology
+
Genetics



Genetic engineering



ตัด gene/DNA vector ที่ต้องการ
ด้วย Restriction enzyme



เชื่อมด้วย DNA ligase



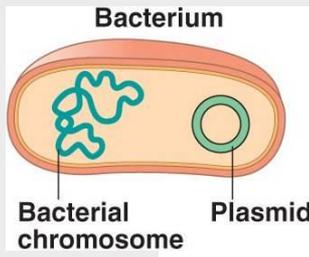
ได้ Recombinant DNA



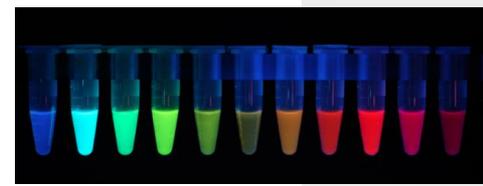
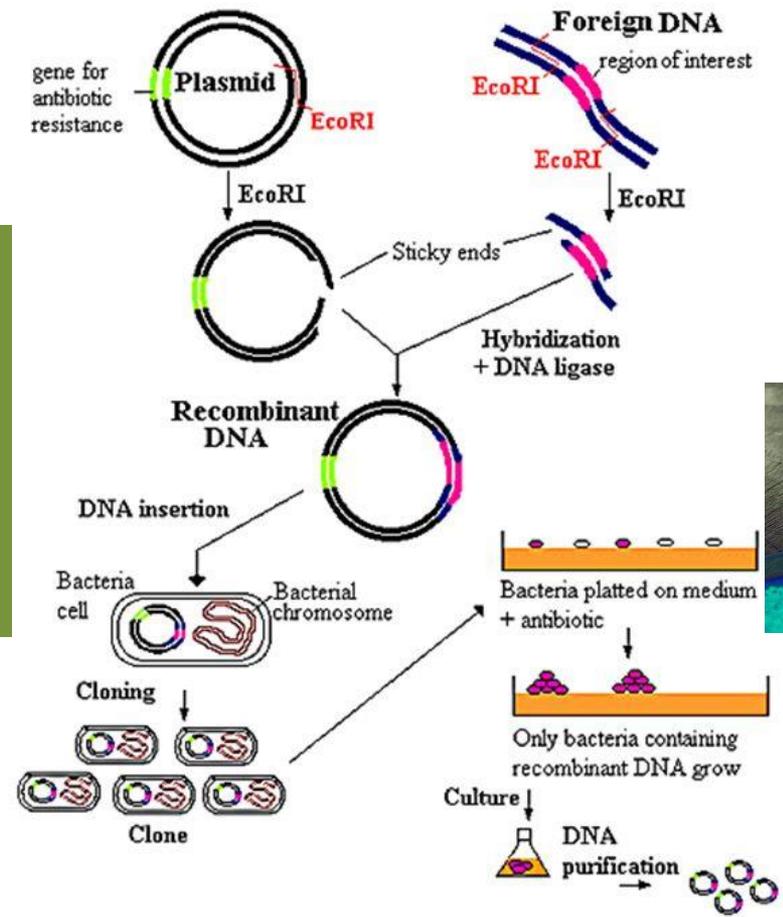
ส่งถ่ายเข้า Host cell → เพิ่มจำนวน



แยกผลผลิต
DNA/protein

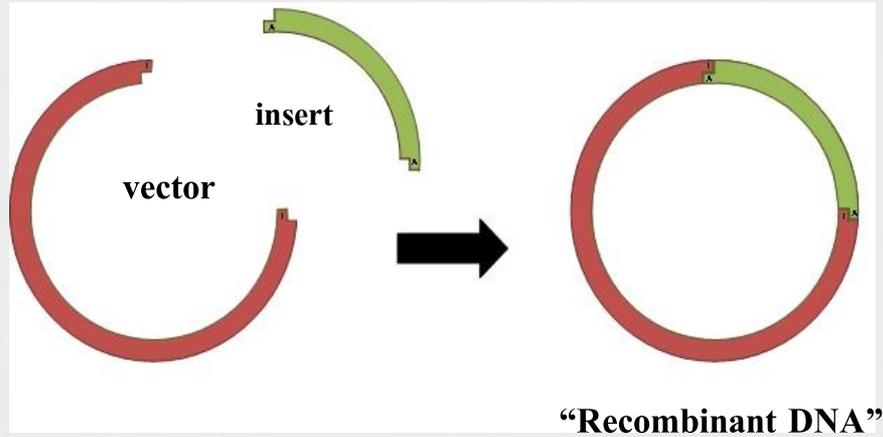


กระบวนการ
Genetic engineering
ตัด (แล้ว) ต่อขึ้น



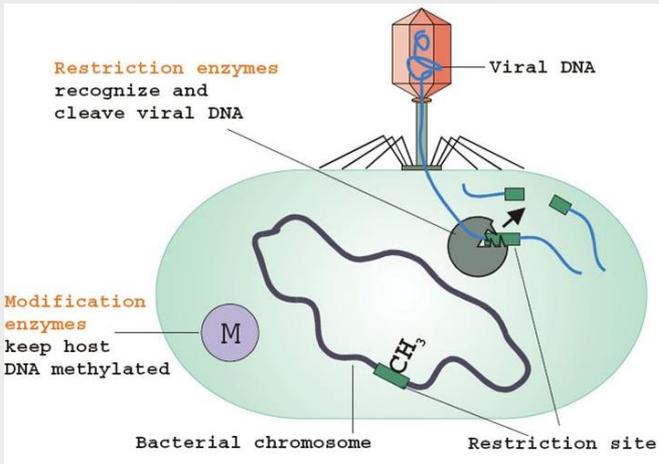
Cloning into a plasmid

ตัด (แล้ว) ต่อยีน



ตัด

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

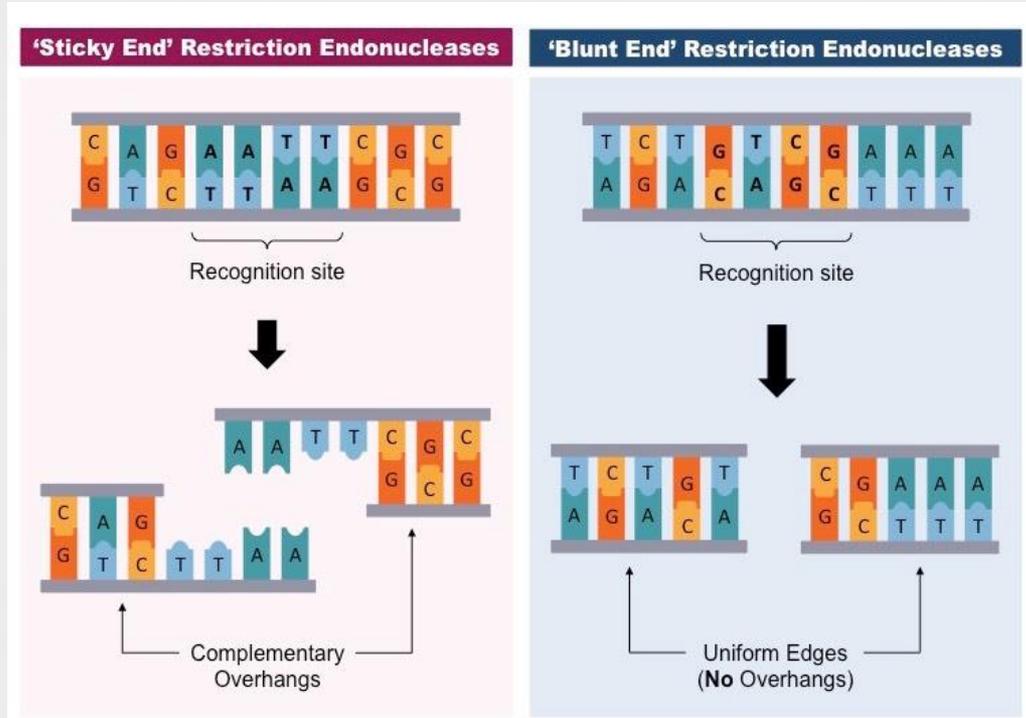


- มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ชนิด Endonuclease
- พบในแบคทีเรีย ใช้สำหรับตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแปลกปลอมของไวรัสที่พยายามส่งเข้ามาในเซลล์
- มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์ในการตัดชิ้นดีเอ็นเอ
- **Molecular scissors** that cut double stranded DNA molecules at specific points - Restriction site



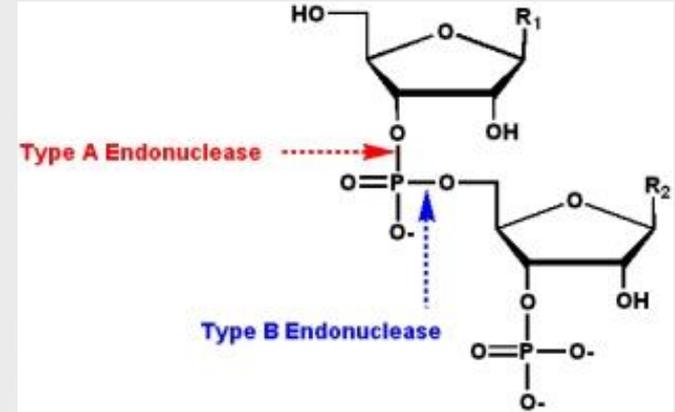
“Restriction endonuclease” → an important tool for manipulating DNA

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (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 **phosphodiester bond**. Specifically, the bond between the 3' O atom and the P atom is broken, 3'OH and 5' PO₄³⁻ are produced

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอด้วยการจดจำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเจาะจง

Recognition sites
ลำดับจดจำ

A Palindrome
When read in the 5' → 3' direction, the sequence on the "top" strand is identical to that of the "bottom" strand.

EcoRI

5' -GAATTC- 3'
3' -CTTAAG- 5'

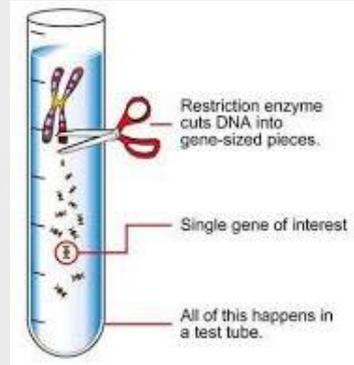
Recognition sites			Product ends	
5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'	HindIII digest	→	5' A 3' 3' TTCGA 5'	5' AGCTT 3' 3' A 5'
<i>Haemophilus influenzae</i>			5' protruding ends	
5' CTGCAG 3' 3' GACGTC 5'	PstI digest	→	5' CTGCA 3' 3' G 5'	5' G 3' 3' ACGTC 5'
<i>Providencia stuartii</i>			3' protruding ends	
5' GATATC 3' 3' CTATAG 5'	EcoRV digest	→	5' GAT 3' 3' CTA 5'	5' ATC 3' 3' TAG 5'
<i>Escherichia coli</i>			Blunt ends	

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) มีมากมายหลายชนิด

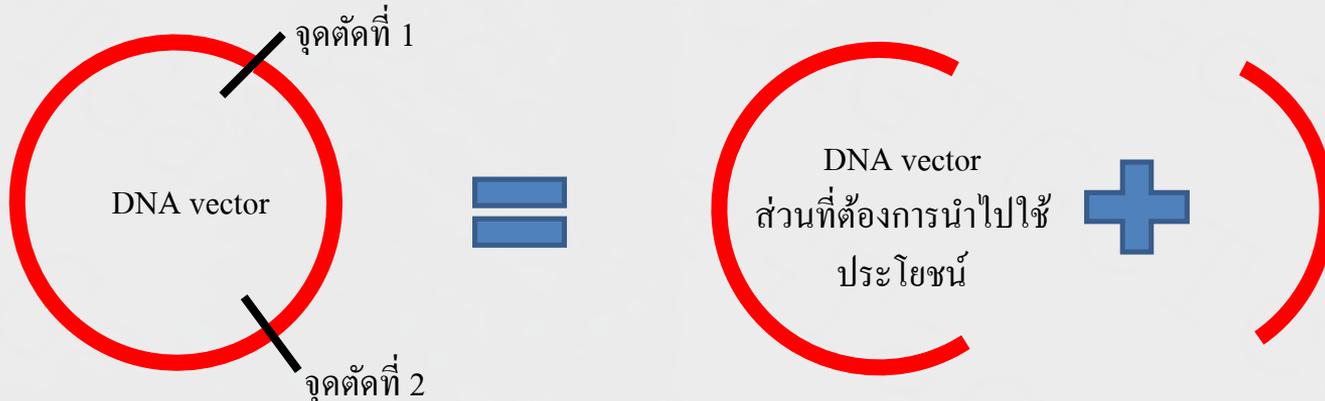
How to cut DNA vector/plasmid with restriction enzyme



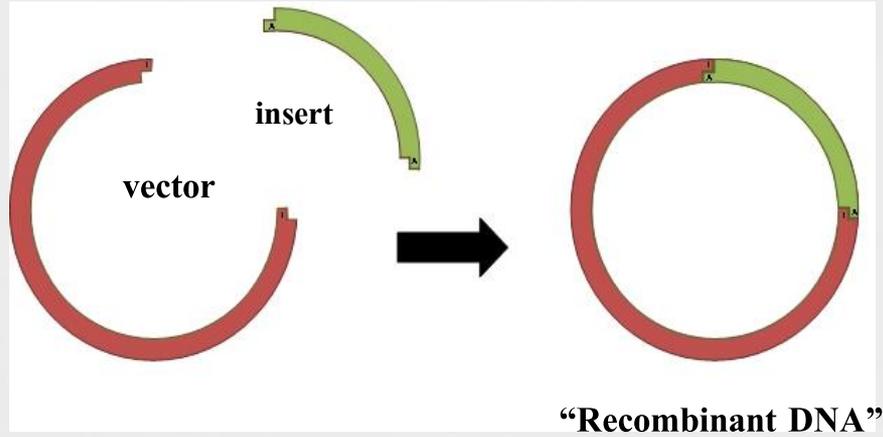
Restriction enzyme มีจำหน่าย



ผสมเอ็นไซม์กับดีเอ็นเอที่ต้องการตัด + บัฟเฟอร์



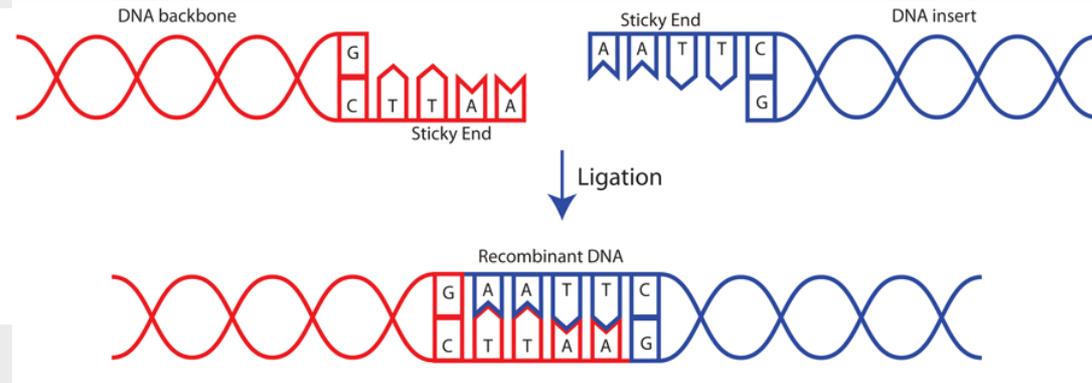
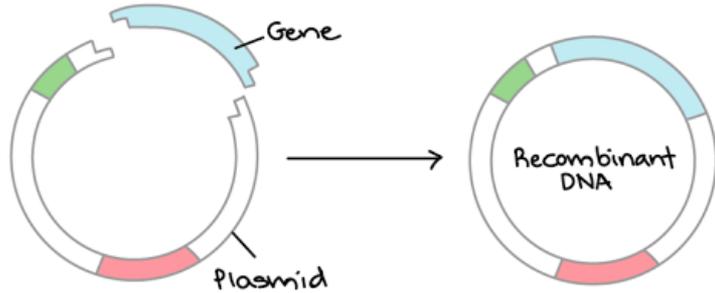
ตัด (แล้ว) ต่อยีน



(เชื่อม) ต่อยีน

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

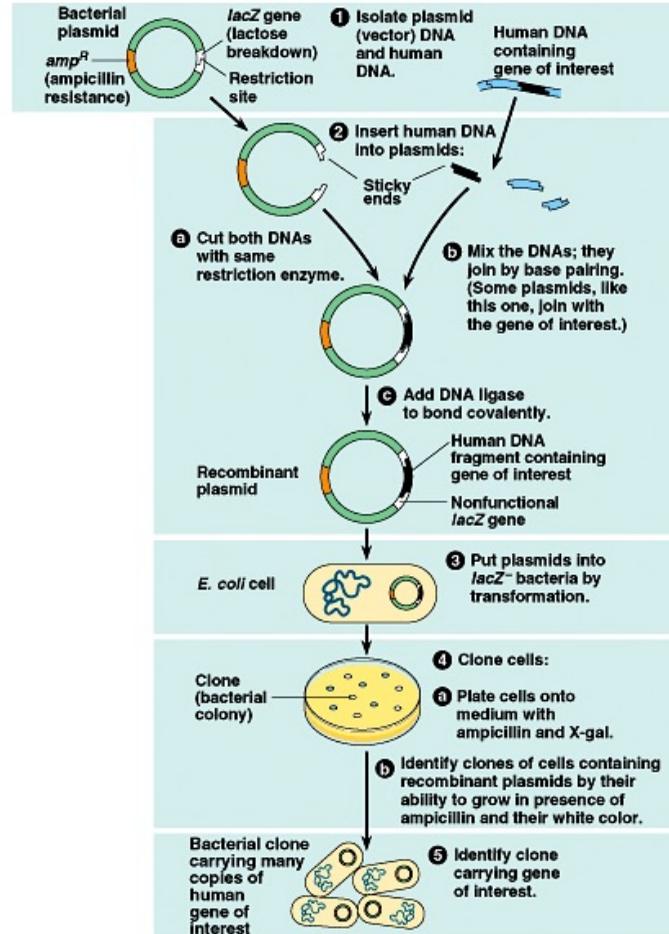


Restriction enzyme & ligase: Commercial products

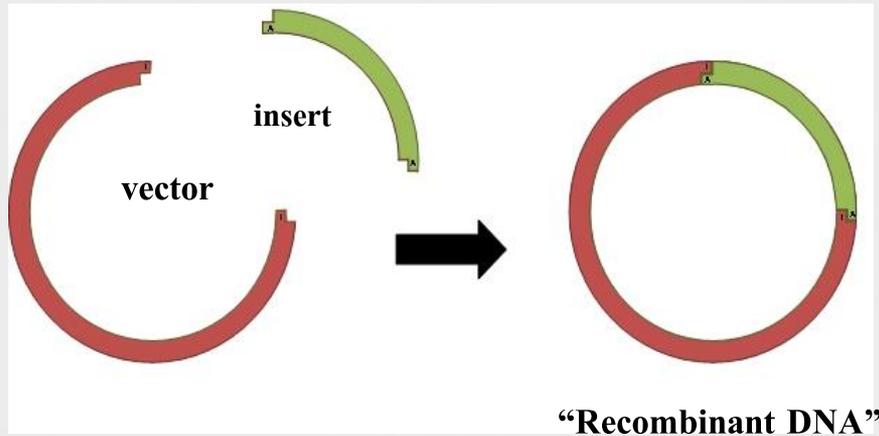


เอ็นไซม์ที่มีใช้ในห้องแลปปัจจุบันนี้เกือบ 300 ชนิด ผลิตด้วย recombinant DNA technology เพื่อให้คุณภาพบริสุทธิ์ คุณภาพดี ผลิตได้จำนวนมาก และราคาถูกลง

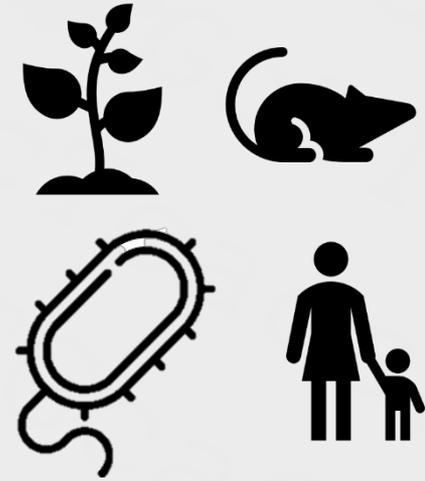
DNA cloning



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

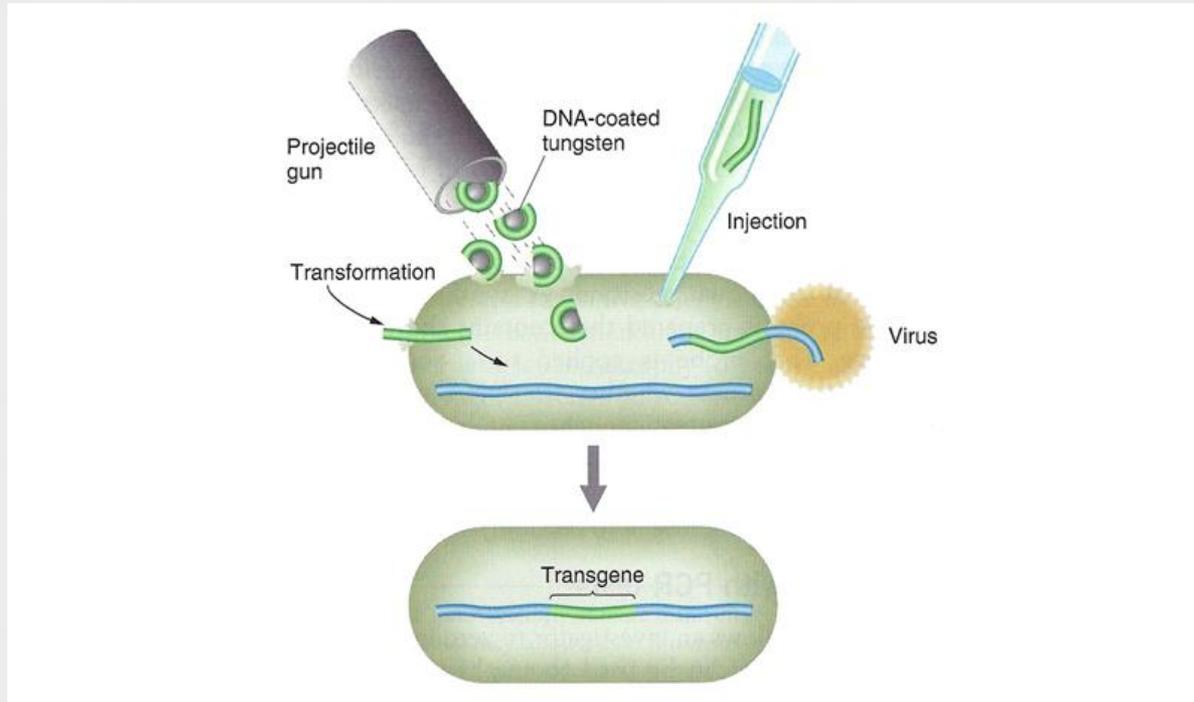


ส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์
ด้วยวิธีการต่างๆ



สิ่งมีชีวิตที่ต้องการตัดแปลง
ให้เกิดลักษณะที่ต้องการ
(Host)

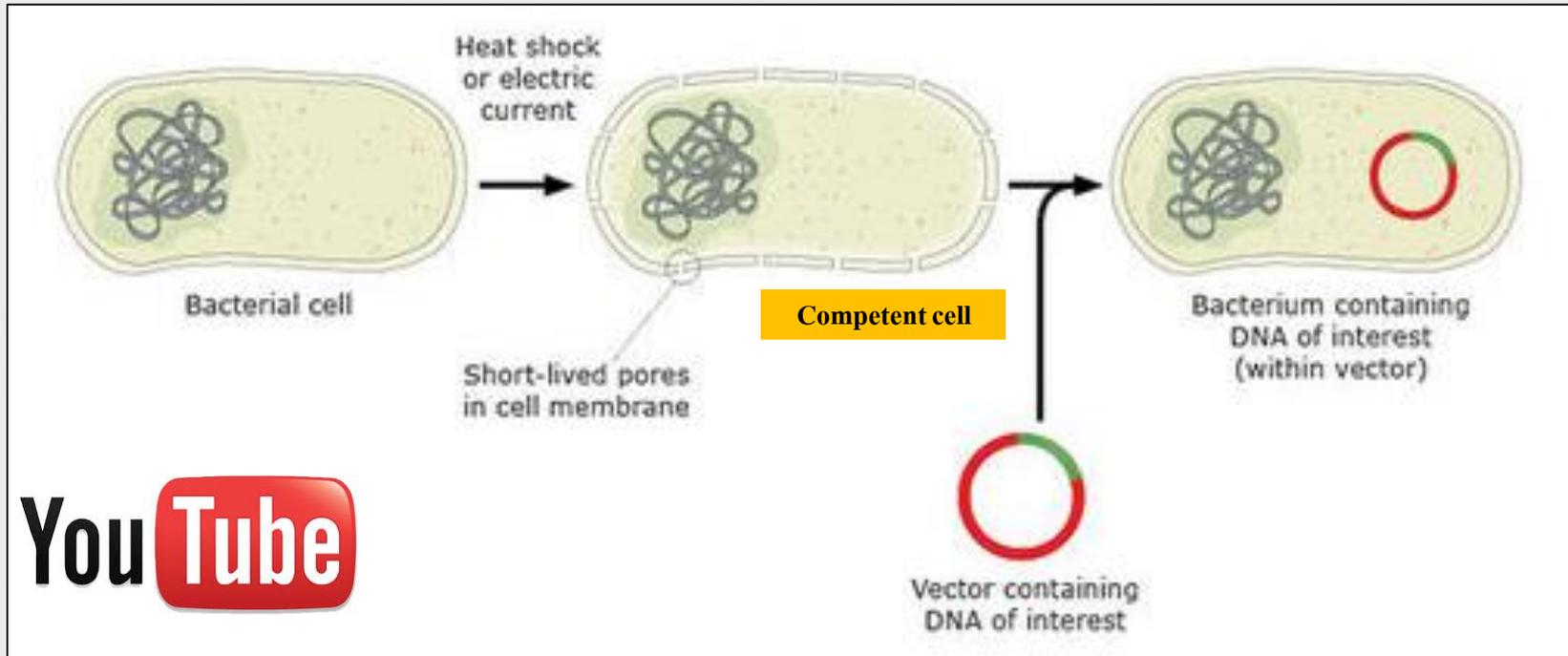
Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell: Bacteria



การส่งถ่าย Recombinant DNA molecule เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียทำได้หลายวิธี

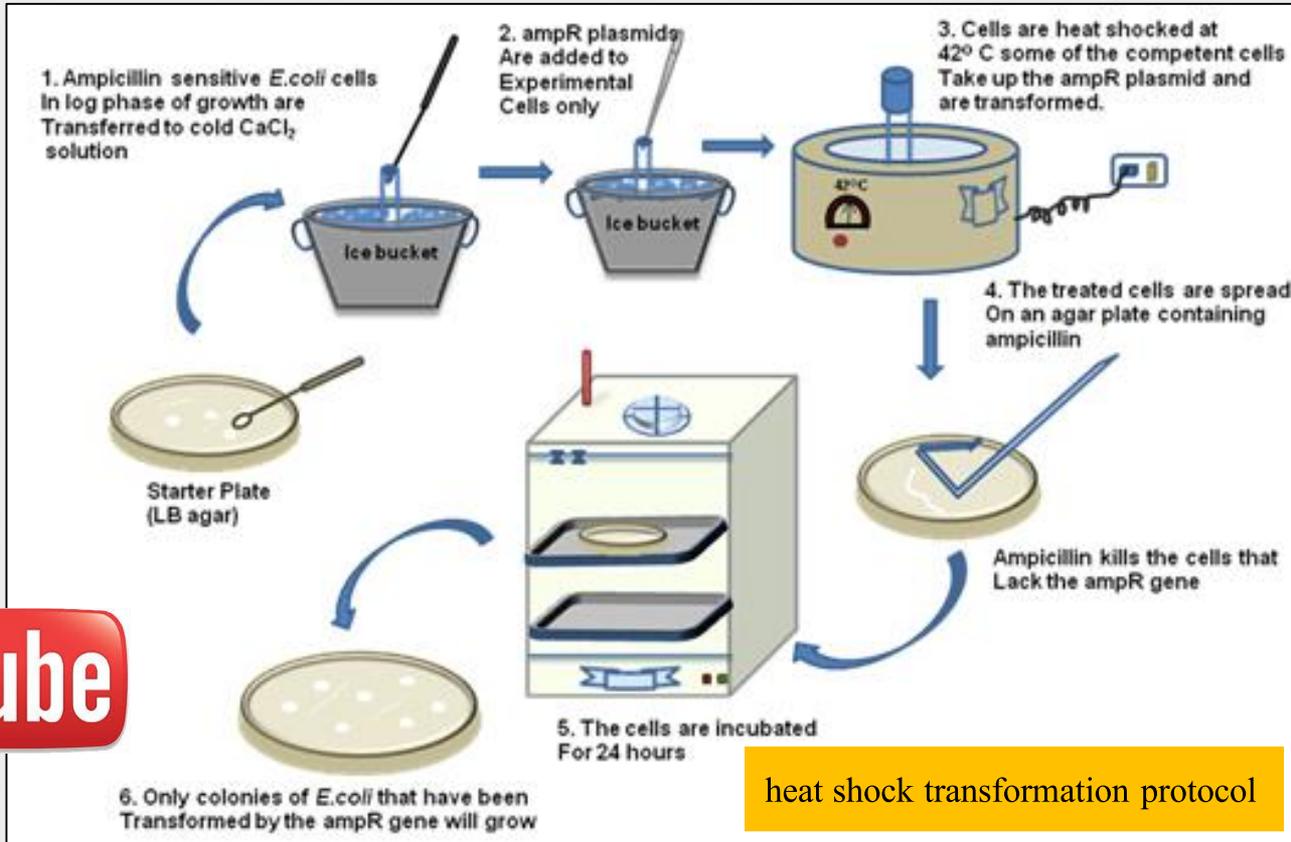


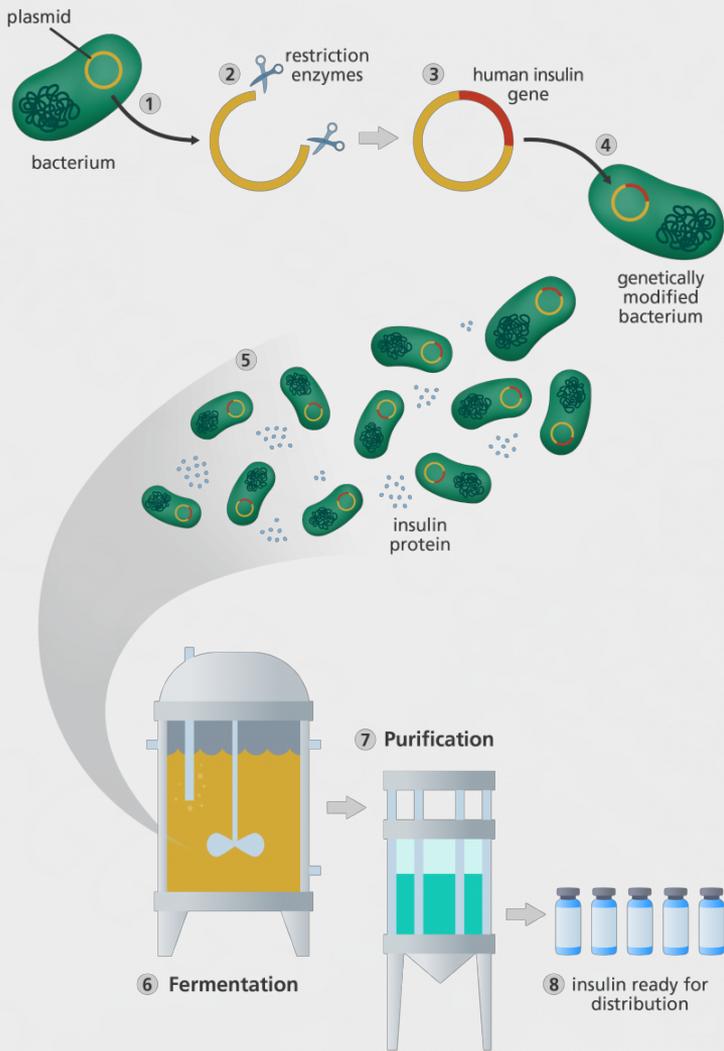
Bacterial transformation-ทำได้ง่ายและรวดเร็ว



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

Bacterial transformation-ทำได้ง่ายและรวดเร็ว





Transgenic bacteria



Commercial Recombinant Insulin Production

สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน

Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell



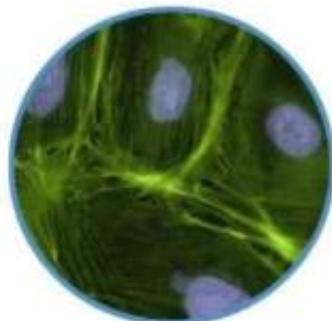
E.coli cells



Yeast cells



Insect cells



Mammalian cells

- Host cell เป็นอะไรได้บ้าง?

- Archaea

- **Bacteria**

- Eukarya

- Protists

- Fungi

- **Plant**

- **Animal**

- Organelles: Chloroplast & Mitochondria



Transgenic

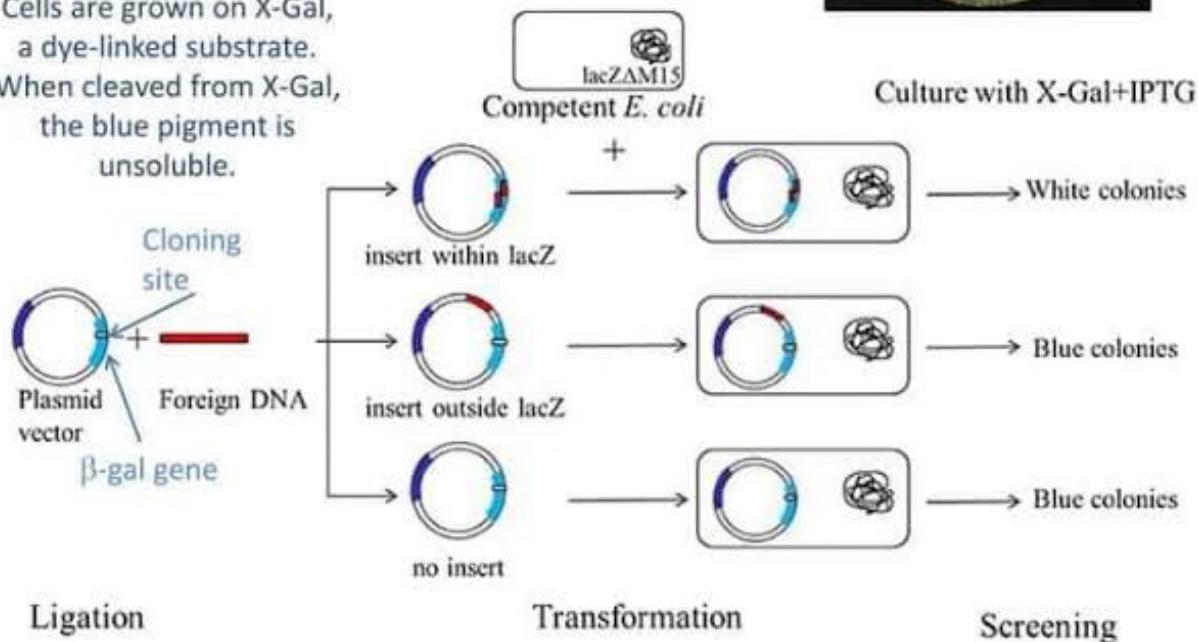
Wildtype

Blue-white screening

To select colonies that contain a plasmid with the insertion of the gene of interest in the correct position.

Uses an *E. coli* strain deficient for β -galactosidase function ($lacZ\Delta M15$) and a vector that can complement the β -gal function.

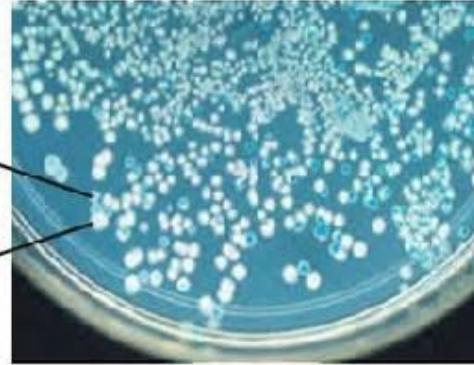
Cells are grown on X-Gal, a dye-linked substrate. When cleaved from X-Gal, the blue pigment is insoluble.





**Bacteria with
nonrecombinant
plasmids are blue**

**Bacteria with
recombinant
plasmids are white**



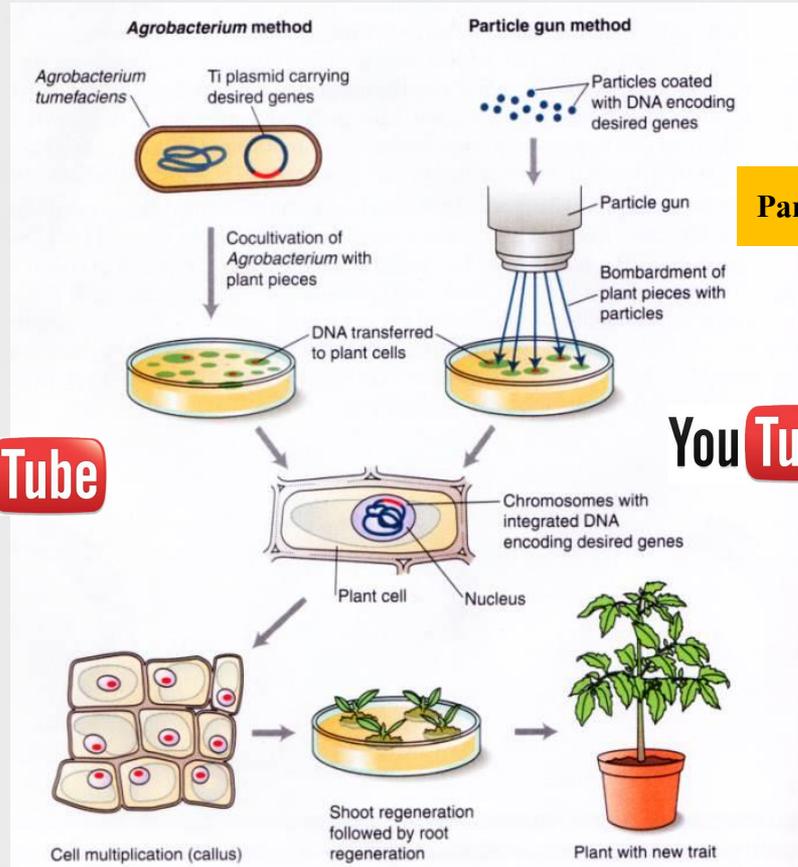
Recombinant DNA ส่งถ่ายสู่ Host cell: พืช

Agrobacterium-mediated

Particle gun/gene gun/particle bombardment

YouTube

YouTube

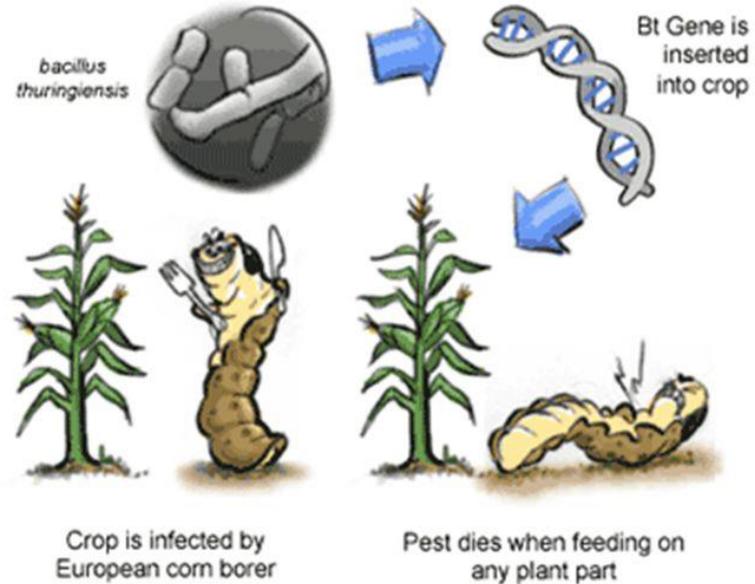


Transgenic plant- พืชตัดแปรพันธุกรรม



Bt corn

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



Transgenic animals-สัตว์ดัดแปรพันธุกรรม

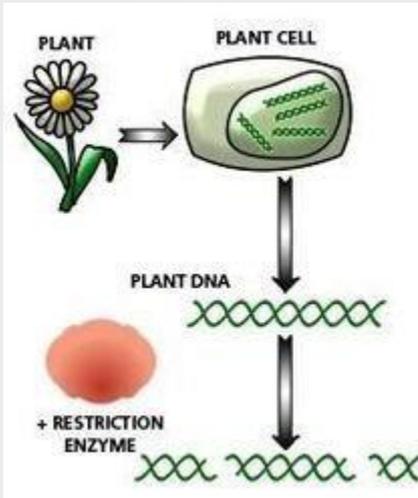


หนูเรืองแสง



ปลาแซลมอนโตเร็ว

ยีน/ชิ้นดีเอ็นเอ หรือ Insert มาจากไหนได้บ้าง?



DNA extraction then cut

Old school

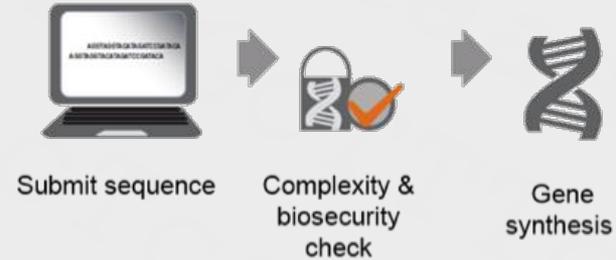
สกัดดีเอ็นเอ



Amplification of insert then cut

Classic

เพิ่มจำนวนในหลอดด้วย PCR



DNA synthesis then cut

Modern

สังเคราะห์ทางเคมี

DNA extraction-แยกดีเอ็นเอจากส่วนอื่นของเซลล์

DNA Extraction

ทำให้เซลล์/
นิวเคลียสแตก



Cells are lysed using a detergent that disrupts the plasma membrane.

ส่วนประกอบใน
เซลล์ละลายใน
สารละลาย



Cell contents are treated with protease to destroy protein, and RNAase to destroy RNA.

กำจัดซากเซลล์/
โปรตีน

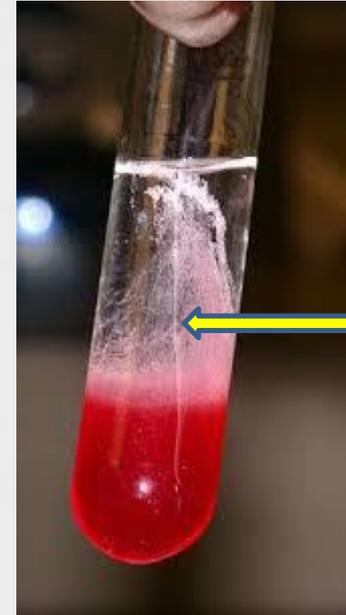


Cell debris is pelleted in a centrifuge. The supernatant (liquid) containing the DNA is transferred to a clean tube.

ตกตะกอน
DNA ด้วย
แอลกอฮอล์

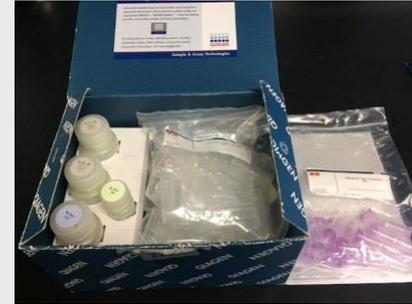
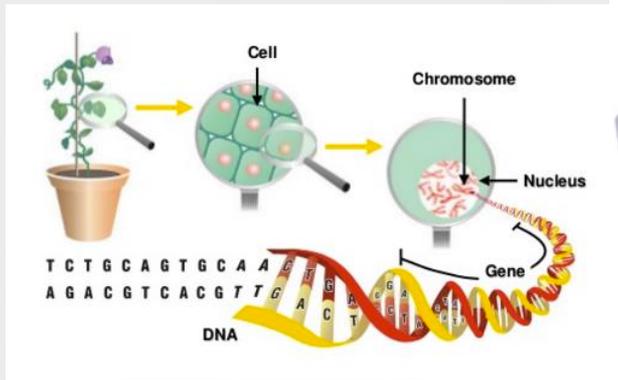


The DNA is precipitated with ethanol. It forms viscous strands that can be spooled on a glass rod.



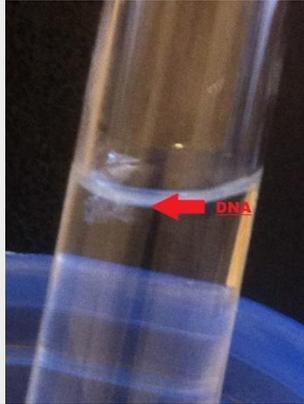
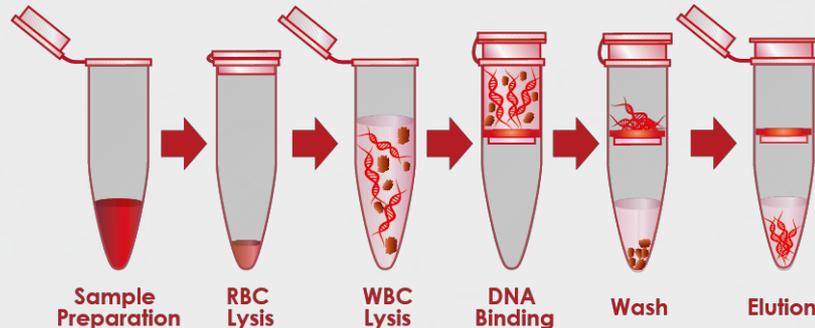
ขั้นตอนหลักของการสกัดดีเอ็นเอ

ชุดเครื่องมือสำเร็จรูป Genomic DNA/ plasmid isolation



ตัวอย่างชุดสกัดดีเอ็นเอที่มีขายในเชิงพาณิชย์

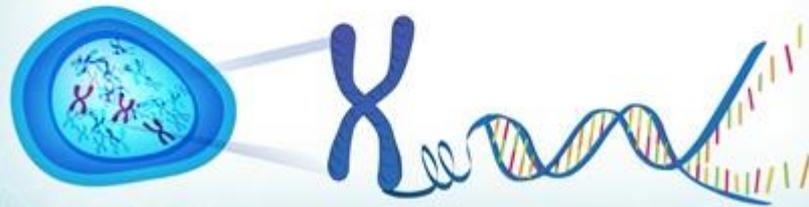
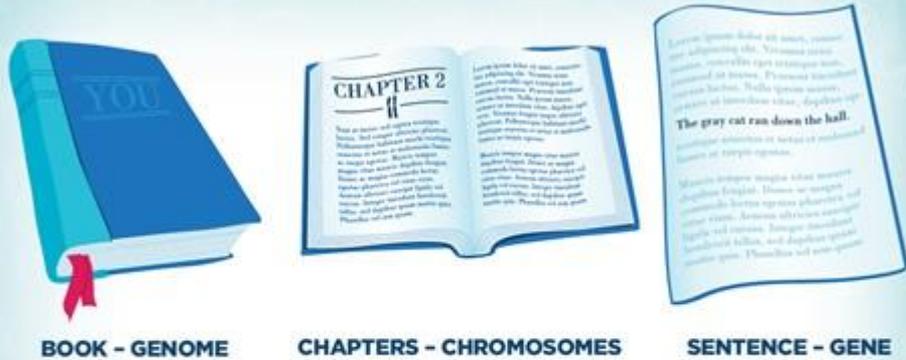
DNA extraction kit



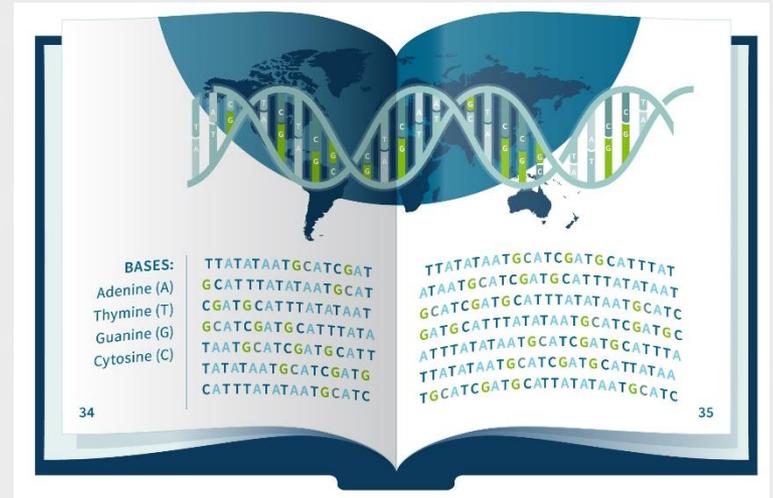
A full set of DNA = Genome

A genome is the full set of genetic information

that an organism carries in its DNA



Genome = A book

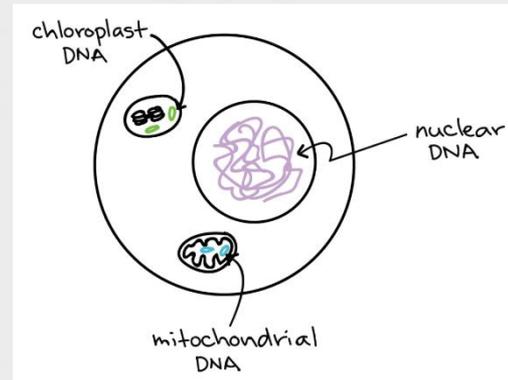


a book with only 4 letters

A T G C

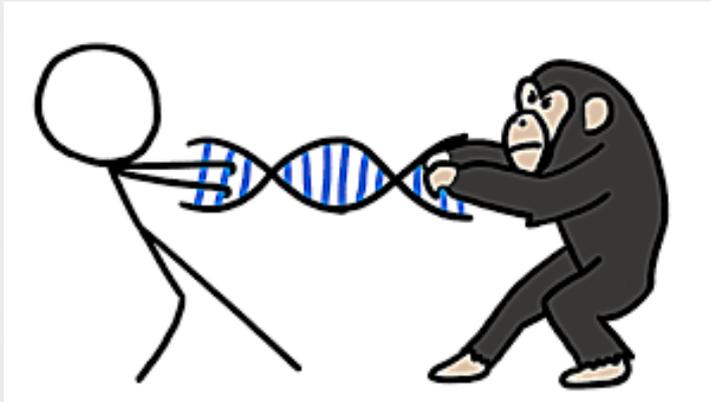
การศึกษาจีโนม (genome)

- 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

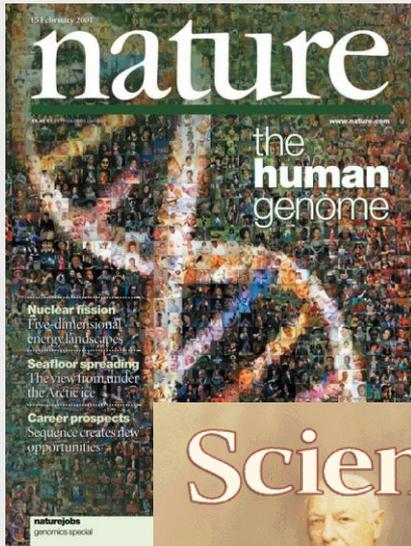


Species	<i>T2 phage</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Paris japonica</i>
Genome Size	170,000 bp	4.6 million bp	130 million bp	3.2 billion bp	150 billion bp
Common Name	 Virus	 Bacteria	 Fruit fly	 Human	 Canopy Plant

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



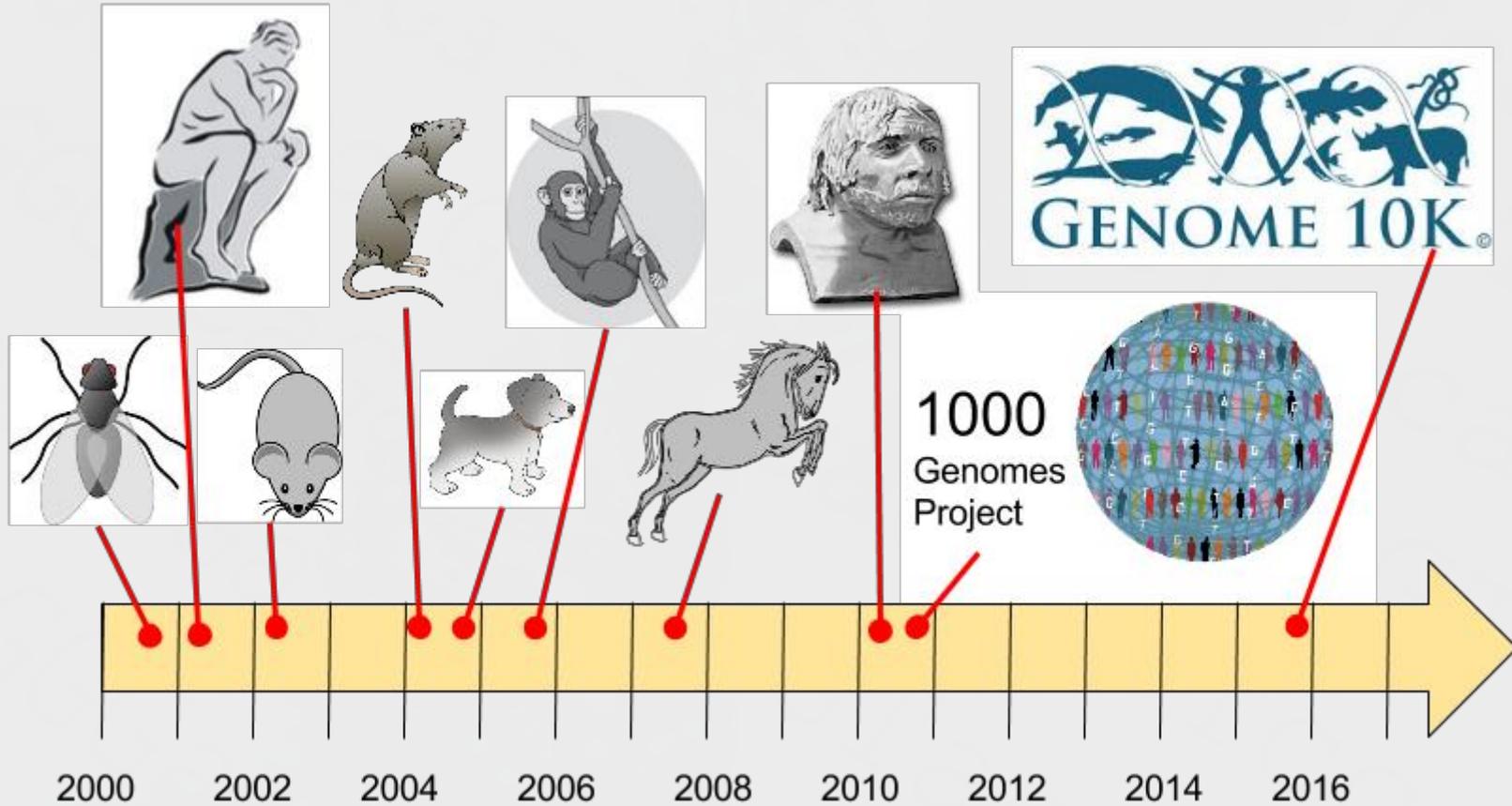
Human genome Project



- 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?**



การศึกษาจีโนม- from Bacteriophage to Human



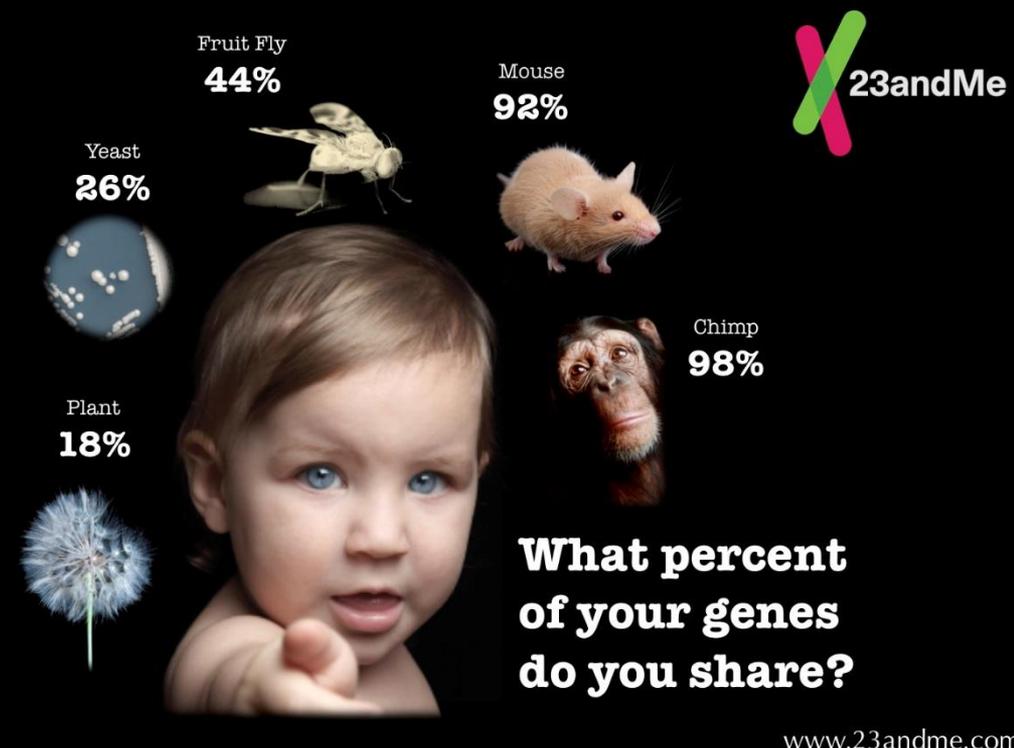
นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาข้อมูลของสารพันธุกรรมได้ในเชิงลึก อีกทั้งเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

Genome size comparison *19,000-20,000 genes

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

*Bacterial chromosomes are chromonemes, not true chromosomes

JOHN BLANCHARD / *The Chronicle*



Fruit Fly 44%

Mouse 92%

Chimp 98%

Yeast 26%

Plant 18%

23andMe

What percent of your genes do you share?

www.23andme.com



Chromosome 11

β -globin gene



Healthy person

...GTGCTGGCCCAT...



Person with
 β -thalassaemia

...GTGCCGGCCCAT...

point mutation

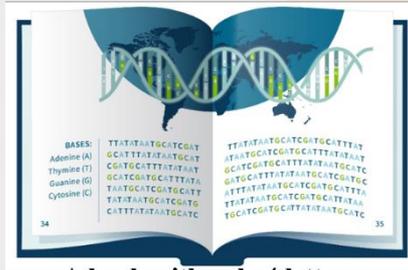
เปรียบเทียบข้อมูลจีโนมของคนปกติกับคนป่วยเพื่อศึกษาสาเหตุของโรคในระดับ DNA

Q: DNA technology ทำอย่างอื่นได้อีกไหม?

A: ได้ ได้หลายอย่างเลยละ



Genome = A book



A book with only 4 letters

Cut DNA into fragment at precise location →

Join DNA fragment →

Transport DNA into cells →

Produce millions of DNA fragment →

Separate DNA fragment by size →

Writing a sentence → DNA synthesis สังเคราะห์

Reading a book → DNA sequencing หารำดับ

Editing a book → DNA editing ปรับแต่ง