



คู่มือประกอบสื่อการสอนวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย

วิชาชีววิทยา

เรื่อง
ขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม

โดย
อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนียจิต
พุทธศักราช 2554



กองบรรณาธิการ

รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์
รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พัทธรา ลิ้มปะนะเวช
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์
นางปริญญนุช กลิ่นรัตน์
นางฐปนา บางยี่ขัน

**สถานที่ให้ความอนุเคราะห์ภาพ/
ข้อมูล**

ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ให้ความอนุเคราะห์ภาพ/ข้อมูล

อาจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ (ภาพปก)



คำชี้แจง

สื่อการสอนวิชาชีววิทยาเรื่องขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม เป็นตอนหนึ่งของสื่อประกอบการสอนเรื่องพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีดีเอ็นเอ ซึ่งมีสื่อทั้งหมด 9 ตอน คือ

1. แนะนำพันธุวิศวกรรม
2. ขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม
3. กิจกรรมประกอบการเรียนเรื่องพันธุวิศวกรรม
4. ยีนบำบัด (Gene therapy)
5. สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม (Genetically modified organisms: GMOs)
6. การโคลนนิ่ง
7. พืชอาร์
8. การประยุกต์ในเชิงนิติวิทยาศาสตร์
9. การศึกษาจีโนม (Genome Project)

คู่มือประกอบการสอน เรื่อง ขั้นตอนของพันธุวิศวกรรมนี้ จัดทำขึ้นเพื่อช่วยให้ผู้สอนเข้าใจจุดประสงค์และขอบเขตของเนื้อหาของสื่อประกอบการสอนที่ผลิตขึ้น อีกทั้งเป็นแนวทางให้ผู้สอนนำสื่อการสอนไปใช้ได้เหมาะสม รวมถึงช่วยให้ผู้เรียนเข้าใจและกระตุ้นความสนใจเนื้อหาของบทเรียน นอกจากนี้ ยังสร้างความเข้าใจที่ถูกต้องเกี่ยวกับศัพท์ทางวิชาการที่ควรทราบ และเปิดโอกาสให้ผู้เรียนได้บูรณาการความรู้ที่ได้รับโดยการอภิปรายร่วมกัน ซึ่งหากบรรลุวัตถุประสงค์ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว จะทำให้การจัดการเรียนการสอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนียจิต ผู้จัดทำคู่มือ

อาจารย์ ดร.

. ชีรดา หวังสมบูรณ์ดี

ผู้ตรวจคู่มือ



สารบัญ

	หน้า
จุดประสงค์	5
ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง	5
เนื้อหา	6
แนวทางในการจัดการเรียนรู้	30
ภาคผนวก	34
ก. คำอธิบายศัพท์	
ข. แหล่งเรียนรู้เพิ่มเติม	
รายชื่อสื่อการสอนวิชาชีพวิทยาจำนวน 92 ตอน	36



จุดประสงค์

เพื่อให้ผู้เรียนสามารถอธิบาย

1. หลักการของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
2. ขั้นตอนการตัดต่อยีน

ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง

เมื่อผู้เรียนได้ดูสื่อประกอบการสอนตอนนี้แล้วสามารถอธิบาย

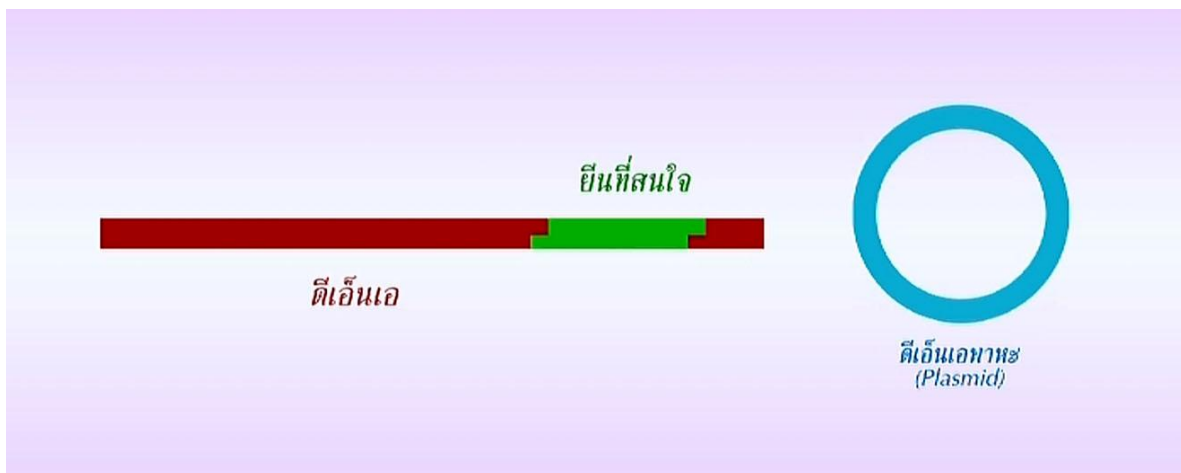
1. ขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม
2. คุณสมบัติพาลินโดรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
3. หลักการของการจดจำและตัดลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
4. หลักการการสร้างดีเอ็นเอสายผสม
5. หลักการของทรานสฟอร์มเมชัน
6. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี White Blue Colony



เนื้อหา

ขั้นตอนในการตัดต่อยีน

ก่อนที่จะนำยีนเข้าไปในเซลล์นั้นจะต้องนำยีนที่สนใจต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (Plasmid) ที่จะเป็นตัวนำพาที่ยีนที่สนใจนี้เข้าไปในเซลล์ ตามปกติแล้วดีเอ็นเอพาหะมีรูปร่างเป็นวงแบบปิด (รูปที่ 1) ซึ่งไม่สามารถนำยีนที่สนใจเข้ามาต่อกับดีเอ็นเอพาหะได้ ดังนั้นจึงต้อง ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอพาหะในตำแหน่งเดียวกันนี้ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเดียวกันตัดยีนที่สนใจออกมาจากสายดีเอ็นเอ (รูปที่ 2) เพื่อให้ดีเอ็นเอพาหะเปิดออกพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอหรือยีนอื่นๆ จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีน ที่สนใจที่ตัดได้ไปต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ จนในที่สุดจะได้ดีเอ็นเอสายผสม หรือ recombinant DNA ตามที่ต้องการ (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 ซ้าย : ยีนที่สนใจ (บริเวณสีเขียว) ที่อยู่บนดีเอ็นเอสายยาว (บริเวณสีแดง)
ขวา: ดีเอ็นเอพาหะที่เป็นวงกลมปลายปิด



รูปที่ 2 ยีนที่สนใจที่ตัดออกมาจากดีเอ็นเอสายยาวแล้ว และดีเอ็นเอพาหะที่เปิดออกพร้อมที่จะเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน



รูปที่ 3 ดีเอ็นเอสายผสมภายหลังจากการเชื่อมต่อกันของยีนที่เราสนใจกับดีเอ็นเอพาหะ

หลักการของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ในการเปิดวงดีเอ็นเอพาหะและแยกยีนที่สนใจออกมาจากสายดีเอ็นเอนั้นนักวิทยาศาสตร์ใช้เอนไซม์เป็นตัวตัด ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีความสามารถในการจดจำลำดับเบสที่จำเพาะในช่วง 4 ถึง 6 เบส ขึ้นอยู่กับ ชนิดของเอนไซม์ จึงเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ



หรือ restriction enzyme ลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จดจำได้จะมีการเรียงตัวแบบพิเศษที่เรียกว่า พาลินโดรม (palindrome)

พาลินโดรมคืออะไร

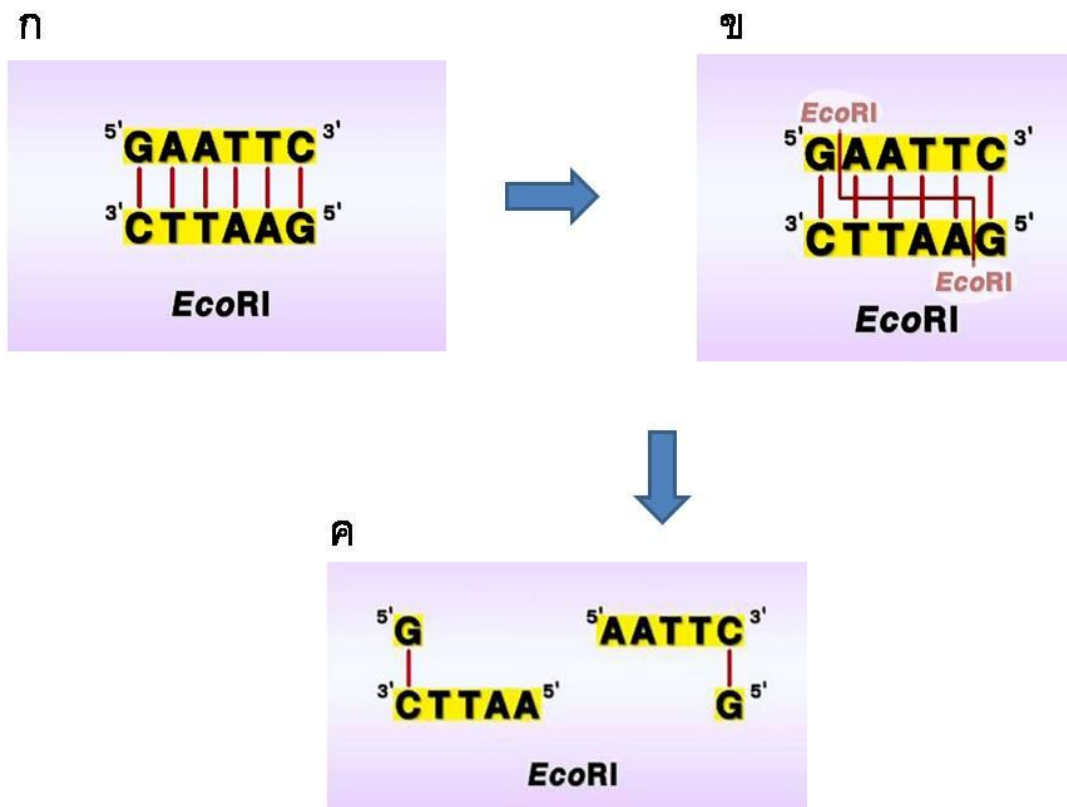
พาลินโดรม หมายถึง คำที่ไม่่ว่าจะอ่านจากหน้าไปหลังหรือหลังไปหน้าจะยังคงมีความหมายที่เหมือนกัน ตัวอย่าง เช่น DAD MOM RACECAR และ Tarzan raised Desi Arnaz rat เป็นต้น ซึ่งลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะจดจำได้จะเป็นแบบพาลินโดรมเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ยกมา เพียงแต่การอ่านจากหน้าไปหลังและจากหลังไปหน้านั้นจะต้องอ่านคนละสายของดีเอ็นเอเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอมีสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สาย ที่มีทิศทางตรงข้ามกัน นั่นเอง ดังตัวอย่างลำดับเบสที่เอนไซม์ *EcoRI* สามารถจดจำได้ดังนี้



ให้สังเกตลำดับเบสของดีเอ็นเอสายบนเมื่ออ่านเรียงจาก 5' ไป 3' สามารถอ่านลำดับเบสได้ดังนี้ GAATTC หากอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอสายล่าง จาก 5' ไป 3' เช่นเดียวกัน ลำดับเบสที่อ่านได้เป็น GAATTC เช่นเดียวกัน จะเห็นได้ว่าลำดับเบสจดจำนี้เป็นพาลินโดรมและการอ่านเบสนั้นเอนไซม์จะอ่านลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจาก 5' ไป 3' เสมอ

เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะ

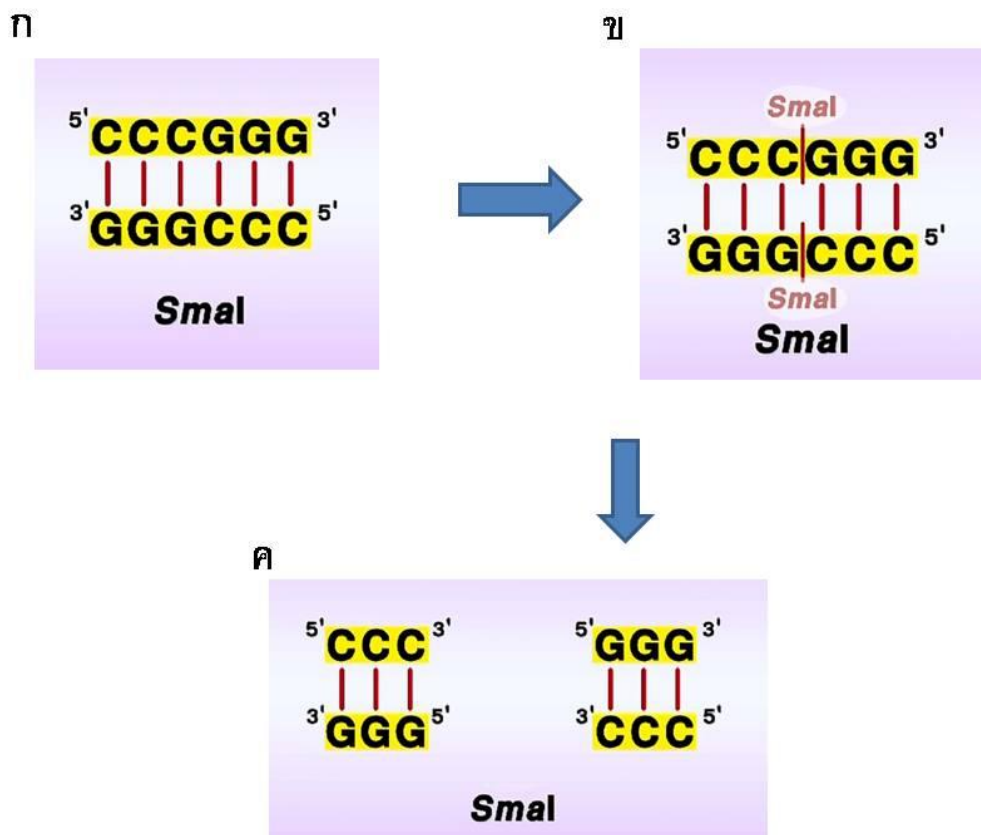
ในการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะเอนไซม์จะตัดโครงสร้างดีเอ็นเอส่วนที่เป็นพันธะเชื่อมระหว่างน้ำตาลและฟอสเฟต โดยตัดที่ตำแหน่งจำเพาะเท่านั้น ดังตัวอย่างลำดับเบสที่ *EcoRI* จดจำและตัดได้นั้นคือ $5' \text{GAATTC} 3'$ เมื่อเอนไซม์พบลำดับเบสเป็น $5' \text{GAATTC} 3'$ แล้วเอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอบริเวณระหว่างเบส G กับ A และได้ผลผลิตสายดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 (ก) ลำดับเบสที่เอนไซม์ *EcoRI* จดจำได้ บริเวณที่เอนไซม์จดจำ มีความยาว 6 คู่เบส
(ข) ตำแหน่งที่เอนไซม์ *EcoRI* ตัดสายดีเอ็นเอออกเป็น 2 ส่วน (ค) ผลจากการตัดดีเอ็นเอด้วย
เอนไซม์ *EcoRI*



เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ *Sma*I ซึ่งมีลำดับเบสจดจำเป็น 5' CCGGG 3' และเอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอ บริเวณระหว่างเบส C กับ G โดยได้ผลผลิตสายดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 5

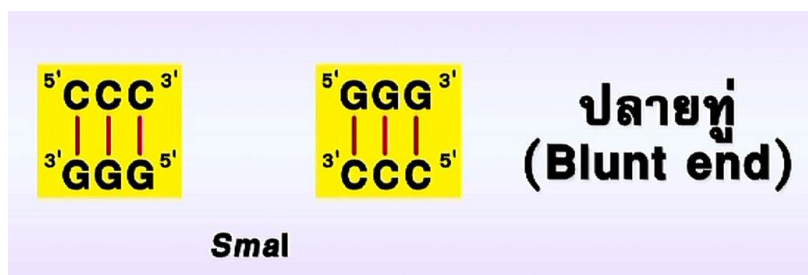


รูปที่ 5 (ก) ลำดับเบสที่เอนไซม์ *Sma*I จดจำได้ โดยบริเวณที่เอนไซม์จดจำมีขนาด 6 คู่เบส (ข) ตำแหน่งที่เอนไซม์ ตัดสายดีเอ็นเอ ออกเป็น 2 ส่วน (ค) ผลจากการตัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ *Sma*I

จะเห็นได้ว่าเมื่อเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอแต่ละครั้งแล้วจะได้ปลายดีเอ็นเอ 2 ปลาย นอกจากนี้จะเห็นว่าจากการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Sma*I จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีปลายแตกต่างกัน ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *Eco*RI ได้ปลายของดีเอ็นเอ 2 ปลาย มีความยาวไม่เท่ากันโดยมีปลายดีเอ็นเอด้านหนึ่งยื่นออกมาเรียกปลายแบบนี้ว่า ปลายเหนียว หรือ sticky end ดังรูป 6 ส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *Sma*I ไม่มีส่วนปลายยื่นออกมา เรียกปลายแบบนี้ว่า ปลายทู่ หรือ blunt end ดังรูป 7 ตัวอย่างของ เอนไซม์ตัดจำเพาะอื่น ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 6: รูปแบบของปลายสายดีเอ็นเอแบบปลายเหนียว (sticky end)



รูปที่ 7 รูปแบบของปลายสายดีเอ็นเอแบบปลายทู่ (blunt end)

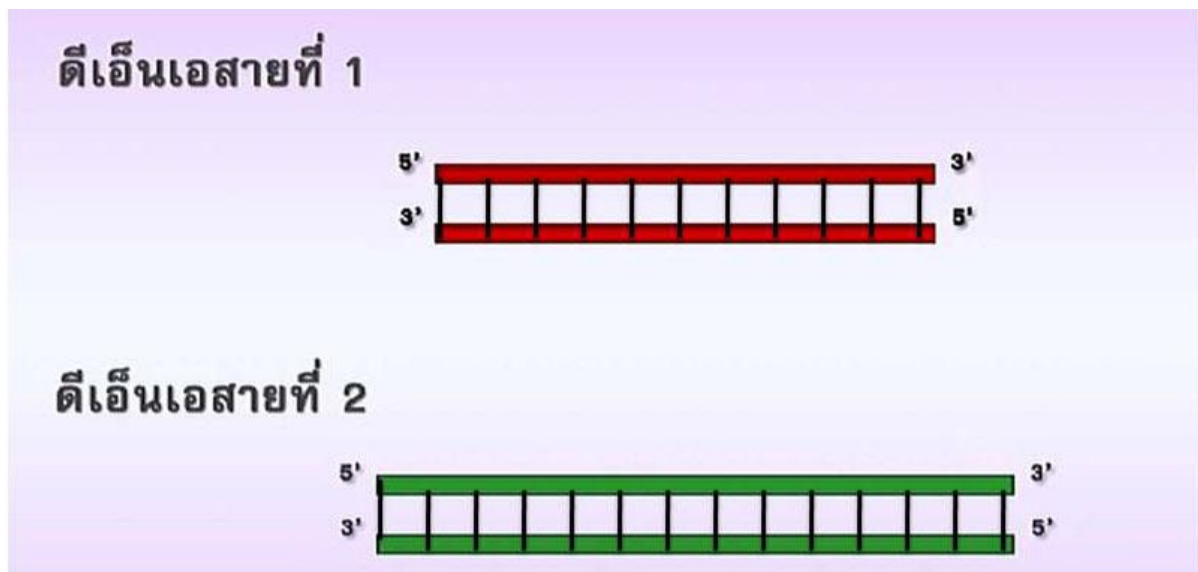
ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (รูปแบบของ ปลายดีเอ็นเอ)	บริเวณที่เอนไซม์ จดจำและตัด	ผลจากการตัด
<i>Bam</i> HI (ปลายเหนียว)	5'GGATCC 3' 3'CCTAGG 5' (Cuts between G and A on both strands)	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'
<i>Taq</i> I (ปลายเหนียว)	5'TCGA 3' 3'AGCT 5' (Cuts between T and C on both strands)	5'-T CGA-3' 3'-AGC T-5'
<i>Not</i> I (ปลายเหนียว)	5'GCGGCCGC 3' 3'CGCCGGCG 5' (Cuts between G and C on both strands)	5'-GC GGCCGC-3' 3'-CGCCGG CG-5'
<i>Hae</i> III (ปลายทู่)	5'GGCC 3' 3'CCGG 5' (Cuts between G and C on both strands)	5'-GG CC-3' 3'-CC GG-5'
<i>Alu</i> I (ปลายทู่)	5'AGCT 3' 3'TCGA 5' (Cuts between A and G on both strands)	5'-AG CT-3' 3'-TC GA-5'



การสร้างดีเอ็นเอสายผสม

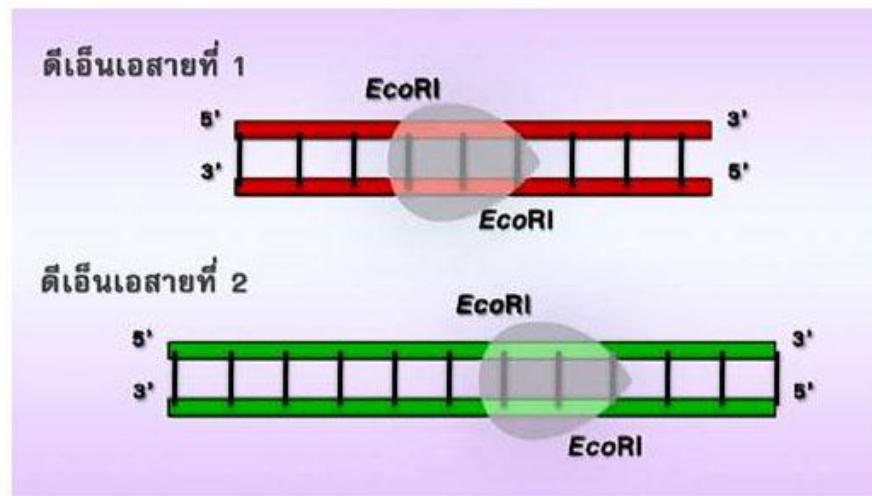
การสร้างดีเอ็นเอสายผสมเป็นการนำดีเอ็นเอจากแหล่งต่างกันมาตัดต่อเข้าด้วยกันเพื่อให้ได้เป็น ดีเอ็นเอรูปแบบใหม่ตามที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น การสร้างดีเอ็นเอสายผสมจากดีเอ็นเอ 2 สาย ซึ่งแทน ด้วยดีเอ็นเอสีแดงและดีเอ็นเอสีเขียว ดังรูปที่ 8 ดังที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้นว่าการที่ดีเอ็นเอ 2 สาย จะต่อกันได้นั้นดีเอ็นเอทั้งสองจะต้องถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีคุณสมบัติดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว และที่สำคัญก็คือในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้น ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันหรือถ้า ต้องการใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน ต้องเลือกใช้เอนไซม์ที่เมื่อตัดแล้วได้ปลายเหนียวที่มีลำดับเบสที่เป็นเบส คู่สมกัน เพื่อให้ ดีเอ็นเอทั้งสองสามารถเชื่อมต่อกันได้ จากรูปที่ 9 ก เมื่อตัด ดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แล้วได้เป็นปลายเหนียว จะเห็นว่าส่วนปลายของดีเอ็นเอ ทั้งสองมีปลาย เหนียว (รูปที่ 9 ข) ที่ประกอบด้วยเบสคู่สมซึ่งสามารถเข้าคู่กันได้ ทำให้ดีเอ็นเอทั้งสองสามารถเชื่อมต่อกันได้ง่าย จากนั้นทำการเชื่อมปลายทั้งสองด้วยเอนไซม์ไลเกสซึ่งเปรียบเสมือนกาวที่ยึดติดดีเอ็นเอที่ถูก ตัดเข้าด้วยกัน โดยเอนไซม์ไลเกสจะไปเชื่อมต่อพันธะโควาเลนต์ระหว่างดีเอ็นเอ 2 โมเลกุล ดังรูปที่ 10



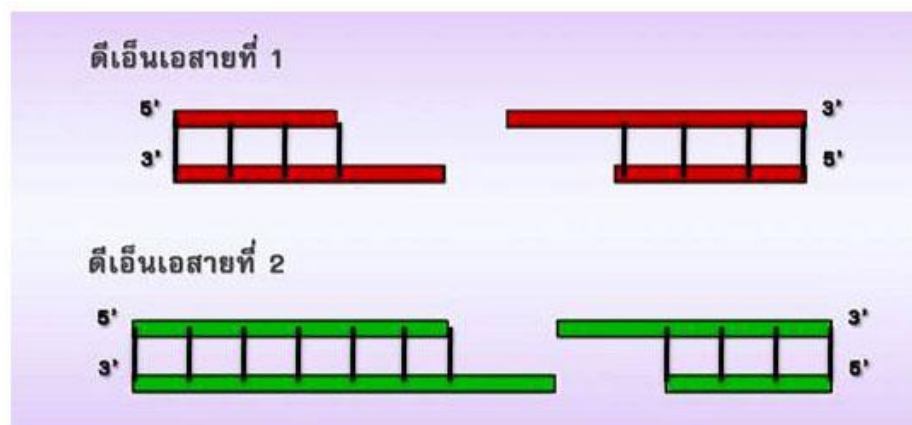
รูปที่ 8 ดีเอ็นเอ 2 สาย ที่ต้องการนำมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน ซึ่งดีเอ็นเอแต่ละสายจะมีรูปร่างเป็นเกลียวคู่ ที่มีสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สาย เรียงตัวในทิศทางสลับกัน ในที่นี้ไม่ได้แสดงการพันกันเป็นเกลียวคู่ของทั้ง 2 สายนิวคลีโอไทด์



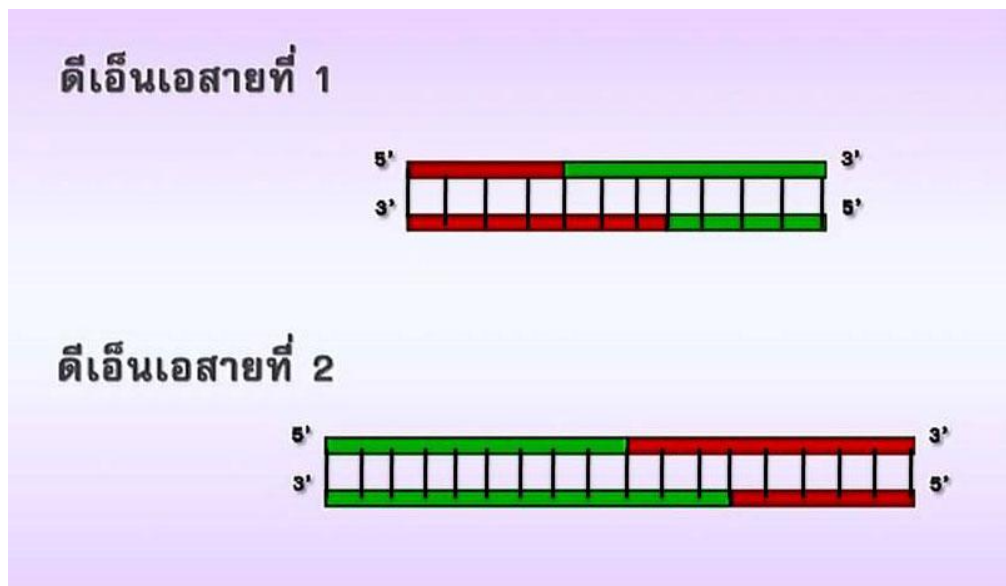
ก



ข



รูปที่ 9 (ก) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันเพื่อให้ดีเอ็นเอสายที่ 1 และสายที่ 2 เชื่อมต่อเข้าด้วยกันได้ ตำแหน่งที่เอนไซม์ *EcoRI* จดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย (ข) ผลจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*



รูปที่ 10 ดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอสายที่ 1 และสายที่ 2 (จากรูปที่ 9 ข) เข้าด้วยกัน ด้วยเอนไซม์ไลเกส โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เชื่อมต่อพันธะโควาเลนต์ระหว่างดีเอ็นเอ 2 โมเลกุล

ตัวอย่างการสร้างดีเอ็นเอสายผสม

สมมติให้ดีเอ็นเอสายที่ 1 มีลำดับเบสดังรูปที่ 11 ก ดีเอ็นเอสายนี้มีลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* สามารถจดจำและตัดได้ ดังนั้นให้หาลำดับเบสที่เอนไซม์ชนิดนี้สามารถจดจำได้ในสายดีเอ็นเอนี้ ลำดับเบสนั้นคือ GAATTC เมื่อเอนไซม์พบลำดับเบสที่จำเพาะจะตัดระหว่างเบส G และ A ของดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย จนได้เป็นดีเอ็นเอทั้งสั้น 2 โมเลกุล ดังรูป 11 ข และ 11 ค



ก

5'CACTGTATTAAGGCGATGAATTCAAACGTGACATAATTCC3'
3'GTGACATAATTCCGCTACTTAAGTTTGCCTGTATTAAGG5'

ข

EcoRI

5'CACTGTATTAAGGCGATGAATTCAAACGTGACATAATTCC3'
3'GTGACATAATTCCGCTACTTAAGTTTGCCTGTATTAAGG5'

EcoRI

ค

5'CACTGTATTAAGGCGATG3' 5'AATTCAAACGTGACATAATTCC3'
3'GTGACATAATTCCGCTACTTAA5' 3'GTTTGCCTGTATTAAGG5'

รูปที่ 11 ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายที่ 1 (ก) ลำดับเบสก่อนถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ข) บริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จดจำ (ค) ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

สมมติให้ดีเอ็นเอสายที่ 2 มีลำดับเบสดังรูปที่ 12 ก ดีเอ็นเอสายนี้มีลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* สามารถจดจำและตัดได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอสายที่ 1 ดังนั้นให้หาลำดับเบสที่เอนไซม์ชนิดนี้สามารถจดจำได้ในสายดีเอ็นเอนี้ ลำดับเบสนั้นคือ GAATTC เช่นเดียวกัน เมื่อเอนไซม์หาลำดับเบสเจอแล้วจะตัดที่บริเวณระหว่างเบส G และ A ของบริเวณจดจำทั้ง 2 สาย ได้ดีเอ็นเอทั้งสิ้น 2 โมเลกุล ดังรูปที่ 12 ข และ ค



5'CACAGTATTGACGCGATGAATTCTACTGTACGAACTTTGAC3'
3'GTGTCATAACTGCGCTACTTAAGATGACATGCTTGAAACTG5'

EcoRI

5'CACAGTATTGACGCGATGAATTCTACTGTACGAACTTTGAC3'
3'GTGTCATAACTGCGCTACTTAAGATGACATGCTTGAAACTG5'

EcoRI

5'CACAGTATTGACGCGATG3' 5'AATTCTACTGTACGAACTTTGAC3'
3'GTGTCATAACTGCGCTACTTAA5' 3'GATGACATGCTTGAAACTG5'

รูปที่ 12 ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายที่ 2 ก) ลำดับเบสก่อนถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ข)
บริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จดจำ ค) ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะเห็นว่าทั้งสายที่ 1 และสายที่ 2 จะได้ดีเอ็นเอ
สายละ 2 โมเลกุล ซึ่งปลายของดีเอ็นเอทั้ง 4 โมเลกุล มีลำดับเบสที่เหมือนกันทำให้ดีเอ็นเอที่มีปลายที่
เป็นเบสคู่สมของแต่ละโมเลกุลสามารถมาเข้าคู่กันได้ จากนั้นดีเอ็นเอทั้งสองจะถูกเชื่อมต่อไปให้สนิทด้วย
เอนไซม์ไลเกสได้เป็นดีเอ็นเอสายผสมดังรูปที่ 13

CACTGTATTAAGGCGATGAATTCTACTGTACGAACTTTGAC
GTGACATAATTCCGCTACTTAAGATGACATGCTTGAAACTG

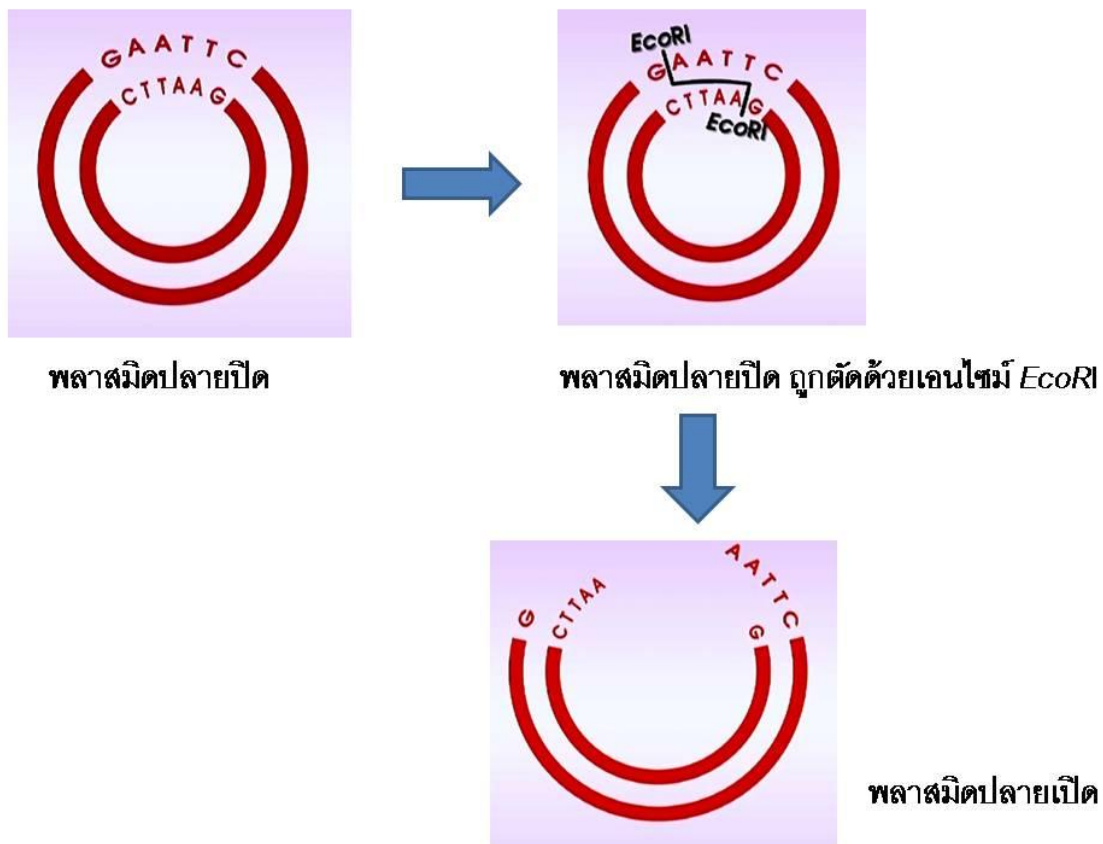
CACAGTATTGACGCGATGAATTCAAACGTGACATAATTCC
GTGTCATAACTGCGCTACTTAA GTTTGCACTGTATTAAGG

รูปที่ 13 ดีเอ็นเอสายผสมจาก การเชื่อมต่อของ ชิ้นดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอสายที่ 1 และสายที่ 2 (บน) และ
จากดีเอ็นเอสายที่ 2 และสายที่ 1 (ล่าง)



การตัดต่อยีนที่สนใจเข้ากับพลาสมิด

โดยทั่วไปพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอโมเลกุลวงปิด และสามารถทำให้เป็นโมเลกุลวงเปิดพร้อมที่จะรับยีนที่สนใจแทรกเข้าไปได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถจดจำลำดับเบสที่อยู่บนพลาสมิดนั้น จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันตัดแยกยีนที่สนใจจากดีเอ็นเออีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งจะได้ปลายที่เหมือนกับปลายของพลาสมิดปลายเปิดทุกประการ ทำให้ยีนที่สนใจนั้นสามารถต่อเข้ากับพลาสมิดได้ เพราะมีปลายที่เป็นเบสคู่สมกัน จากนั้นจึงใช้เอนไซม์ไลเกสเชื่อมต่อปลายทั้งสองของพลาสมิดและยีน จึงเป็นการสิ้นสุดการตัดต่อยีนเข้ากับพลาสมิด การตัดต่อยีนมีลำดับขั้นตอนดังภาพที่ 14-17 เช่น เมื่อพลาสมิดถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ที่ตัดระหว่าง G กับ A ของลำดับจดจำ 5'GAATTC3' ได้เป็นพลาสมิดปลายเปิด ดังรูปที่ 14 และหากตัดดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจด้วย *EcoRI* เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 15 จะเห็นว่าปลายของทั้งพลาสมิดและดีเอ็นเอจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สม หรือที่เรียกว่า complementary base ดังรูปที่ 16 จึงทำให้ปลายของทั้ง 2 โมเลกุล สามารถเข้าคู่กันได้ จากนั้นเอนไซม์ไลเกสจะทำหน้าที่เสมือนกาวมาเชื่อมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอทั้ง 2 โมเลกุล ซึ่งในที่นี้คือยีนที่สนใจกับพลาสมิด และได้ดีเอ็นเอสายผสมหรือ recombinant DNA ตามที่ต้องการ ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จนได้เป็นพลาสมิดปลายเปิด



ดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เช่นเดียวกับพลาสมิด



ดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้ว

รูปที่ 15 ดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เช่นเดียวกับพลาสมิด

ก

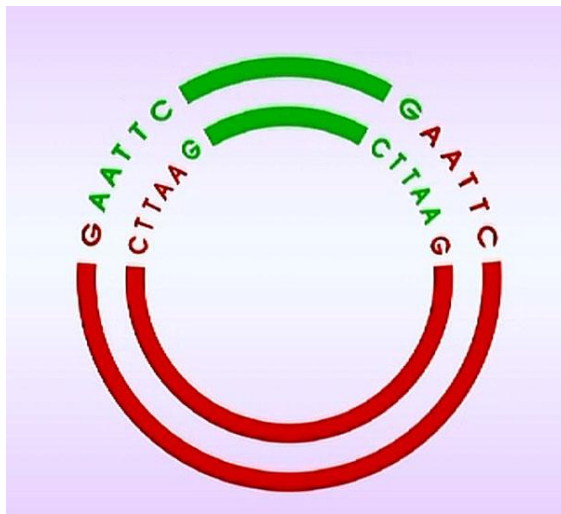


ข



รูปที่ 16 (ก) ปลายของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

(ข) ปลายของยีนที่สนใจที่ตัดออกจากดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI*



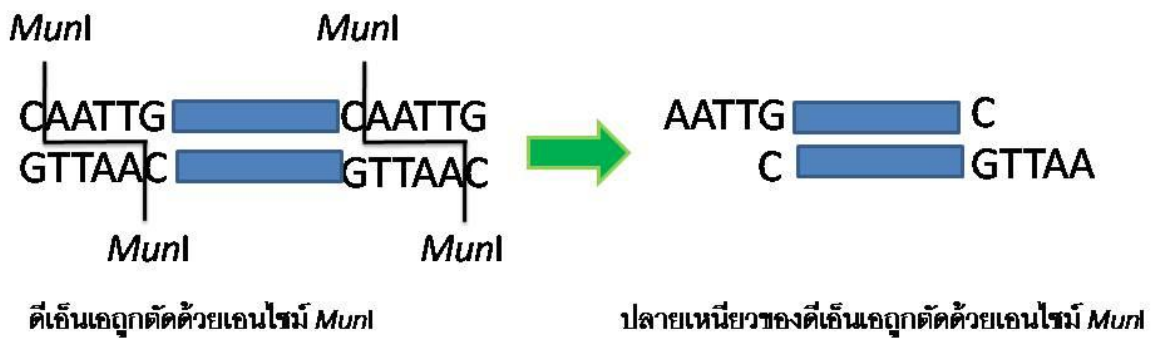
รูปที่ 17 ดีเอ็นเอสายผสมระหว่างพลาสมิดกับดีเอ็นเอที่สนใจ

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิดกันสามารถสร้างดีเอ็นเอสายผสมได้หรือไม่

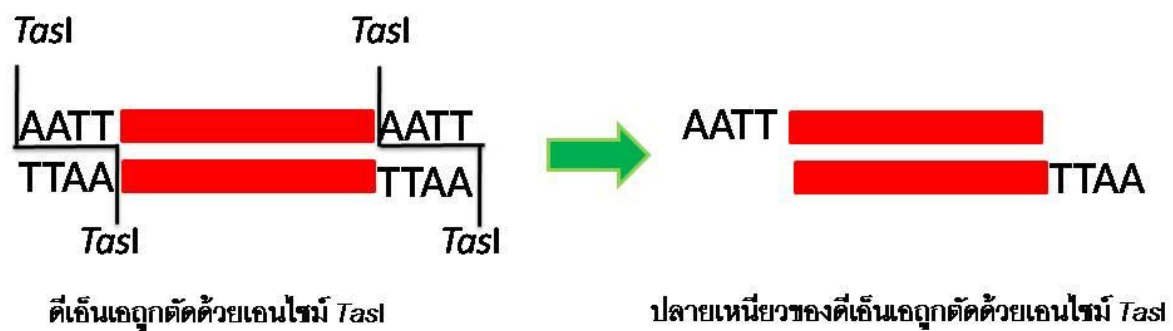
ถ้าใช้เอนไซม์ต่างชนิดในการตัดดีเอ็นเอจากสองแหล่ง โดยปลายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น มีลำดับเบสที่เหมือนกันแล้วก็สามารถสร้างดีเอ็นเอสายผสมได้ดังรูปที่ 18 แสดงถึงเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *MunI* ดังรูปที่ 18ก และ *TasI* ดังรูปที่ 18ข ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดนี้จัดจำลำดับเบสที่ไม่เหมือนกันแต่สามารถตัดสายดีเอ็นเอแล้วทำให้มีปลายเหนียวที่มีลำดับเบสที่เหมือนกันได้คือ $5'AATT^3$ แต่ถ้าปลายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลำดับเบสต่างกันจะไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอสายผสมได้ เนื่องจากจะไม่มีปลายที่เป็นเบสคู่สมที่ทำให้ปลายที่ถูกตัดสามารถมาเข้าคู่กันได้ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้เอนไซม์ *EcoRI* ตัดพลาสมิดจะได้พลาสมิดที่มีปลายดังรูป 19 ก และถ้าใช้เอนไซม์ *BamHI* ตัดยีนที่สนใจจะทำให้ยีนนี้มีปลายดังรูปที่ 19 ข ซึ่ง จะเห็นได้ว่าปลายของพลาสมิดและยีนที่สนใจมีลำดับเบสที่ไม่เหมือนกัน และไม่มีปลายใดที่เป็นคู่สมกัน ทำให้ไม่สามารถต่อเข้ากันได้เลย ดังนั้นในกรณีนี้จึงไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอสายผสมได้



ก



ข



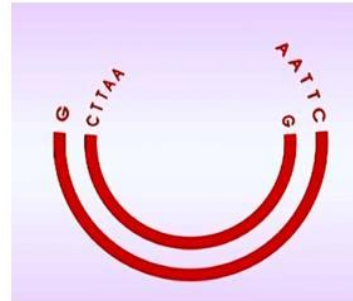
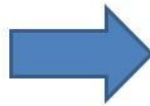
รูปที่ 18 ปลายเหนียวที่มีลำดับเบสที่เหมือนกันของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน
(ก) ปลายดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MnlI* (ข) ปลายดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ *TasI*



ก



พลาสมิดถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

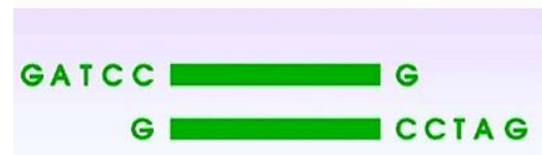


ปลายพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

ข



ดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*



ดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*

รูปที่ 19 ก) ปลายของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ข) ปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายผสม

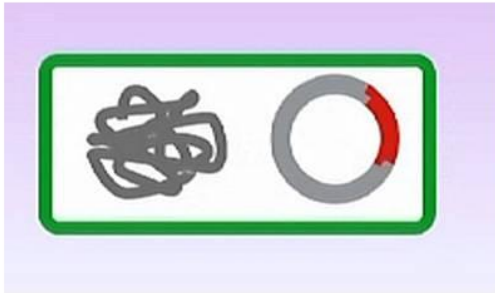
เมื่อทำการตัดต่อยีนจนได้ดีเอ็นเอสายผสมตามที่ต้องการแล้ว ก่อนที่จะนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ไปใช้ประโยชน์นั้น จะต้องทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายผสมให้ได้ปริมาณที่เพียงพอก่อน ซึ่งขั้นตอนนี้คือ การโคลนดีเอ็นเอ

การโคลนดีเอ็นเอสายผสมนั้น จะต้องมีกระบวนการที่เรียกว่า ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ซึ่งเป็นกระบวนการนำดีเอ็นเอสายผสมใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย การทำทรานสฟอร์เมชันที่ประสบความสำเร็จนั้น ดีเอ็นเอสายผสมต้องเข้าสู่เซลล์ได้ (รูปที่ 20 ก) แต่บางครั้งอาจพบว่าการ



ทำการทรานสฟอร์มเมชันไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากดีเอ็นเอสายผสมไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ (รูปที่ 20 ข) หรือพบเพียงแต่พลาสมิดเปล่าๆที่ไม่มียีนที่สนใจเท่านั้นที่เข้าไปในเซลล์ (รูปที่ 20 ค)

ก



ข



ค



รูปที่ 20 (ก) ผลของการทรานสฟอร์มเมชันที่ประสบความสำเร็จ ดีเอ็นเอสายผสมสามารถเข้าสู่เซลล์ได้
(ข)-(ค) การทำการทรานสฟอร์มเมชันไม่สำเร็จเพราะ ไม่สามารถนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ได้
หรือมีเพียงแต่พลาสมิดเปล่าๆเท่านั้นที่เข้าไปในเซลล์

การตรวจสอบความสำเร็จในการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การตรวจสอบความสำเร็จในการทำการทรานสฟอร์มเมชันสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในครั้งนี้จะขอ
ยกตัวอย่างวิธีที่ง่ายต่อความเข้าใจและการตรวจสอบ นั่นคือวิธีที่เรียกว่า “White blue colony
screening” ซึ่งมีหลักการดังต่อไปนี้

การตรวจสอบโดยวิธี White blue colony screening เริ่มจากการเลือกใช้พลาสมิดที่มี marker 2
ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งของยีนที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะ 1 ตำแหน่ง เพื่อเป็น selectable marker และ



ตำแหน่งของยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) อีก 1 ตำแหน่ง เพื่อเป็น screening marker ดังตัวอย่างของพลาสมิดที่มีชื่อว่า pGEM®-T Vector ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 21 (ความหมายของ selectable maker และ screening marker อธิบายในภาคผนวก) จากรูป จะเห็นได้ว่า ดีเอ็นเอพาหะมีส่วนประกอบของยีนที่ต้านทานต่อยาแอมพิซิลลิน และยีนที่สร้างเบต้ากาแลคโตซิเดส หรือเรียกว่า *lac Z* ซึ่งทั้ง 2 ยีนนี้จะถูกใช้เป็น marker สำหรับการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่เราต้องการ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การตรวจสอบว่าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้หรือไม่

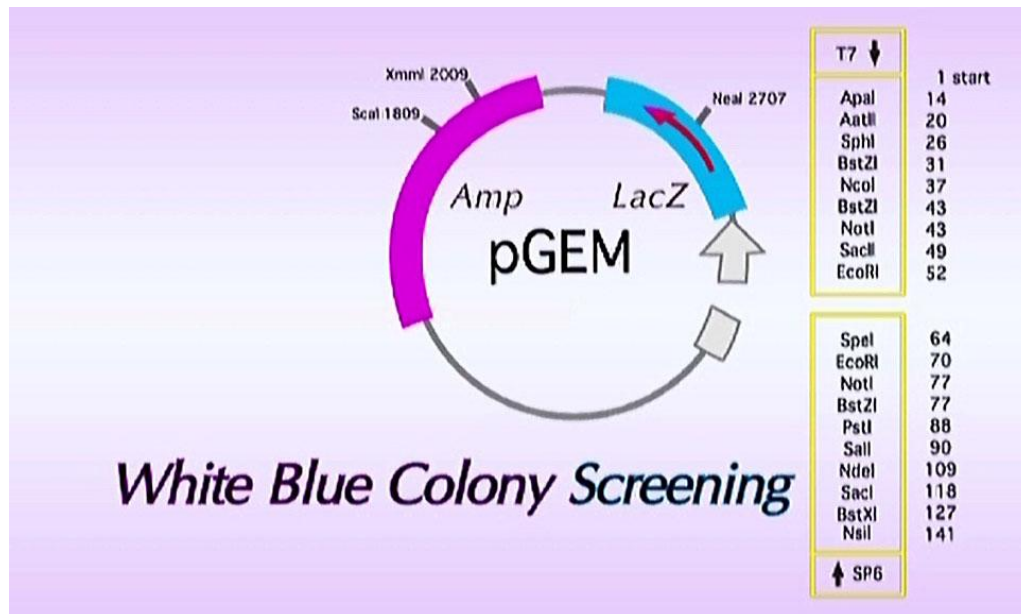
การคัดเลือกในขั้นตอนนี้เป็นการคัดเลือกระหว่างแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่มียีนต้านทานต่อยาแอมพิซิลลิน และแบคทีเรียที่ไม่สามารถนำเอาพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ได้ การตรวจสอบทำได้โดยใช้ marker ที่เป็นยีนต้านทานต่อแอมพิซิลลินในพลาสมิด โดยอาศัยหลักการที่ว่าแอมพิซิลลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับฆ่าแบคทีเรีย ถ้าแบคทีเรียมียีนต้านยาปฏิชีวนะ แบคทีเรานั้นจะอยู่รอดได้ ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มียาปฏิชีวนะอยู่ นักวิทยาศาสตร์ใช้ความรู้นี้ในการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอพาหะที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะนี้ในเซลล์ ซึ่งจะมีทั้งเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมและเซลล์แบคทีเรียที่มีเพียงดีเอ็นเอพาหะเปล่าออกจากเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดอยู่ได้ โดยการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

ขั้นตอนที่ 2 : การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสม

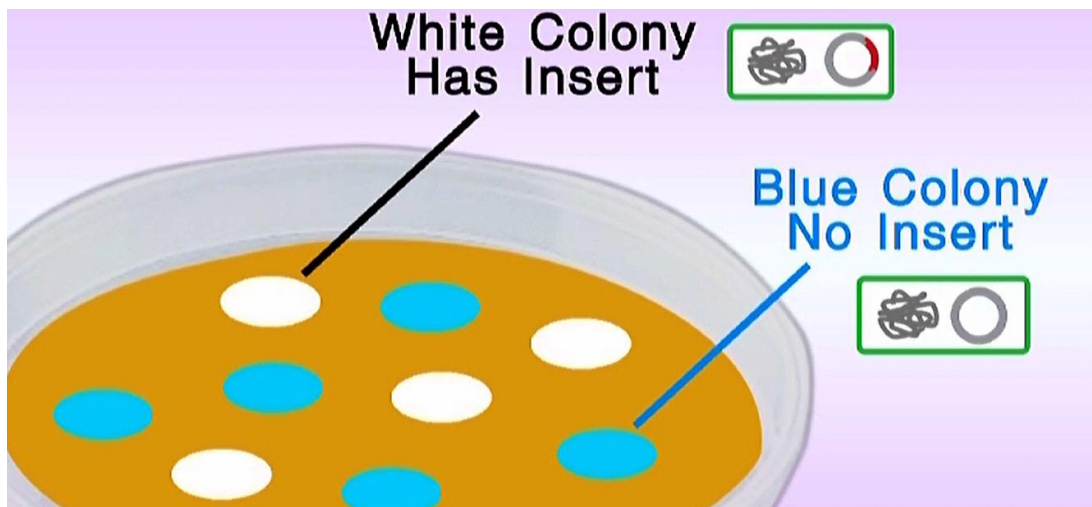
การคัดเลือกในขั้นตอนนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียที่มีเพียงพลาสมิดเปล่า ออกจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งตรวจสอบได้โดยใช้ marker ที่เป็นยีนสร้างเบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) หรือยีน *lac Z* จะสังเกตได้จากรูปที่ 21 ว่าที่บริเวณ *lac Z* ของพลาสมิดนี้จะเป็นบริเวณที่สามารถสอดแทรกยีนที่สนใจเข้าไปได้ ตามปกติแล้วยีน *lac Z* จะสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งย่อยน้ำตาลกาแลคโตส แต่ถ้ายีนนี้ถูกทำลายลงโดยการสอดแทรกด้วยยีนที่สนใจเข้าไปก็จะทำให้ยีน *lac Z* นี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้อีก ด้วยคุณสมบัติข้อนี้ ในการแยกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดเปล่ากับเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่ออกจากกัน โดยใส่สารที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งมีชื่อว่า x-gal ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และสีที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าหากน้ำตาล x-gal ถูกย่อย ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับยาแอมพิซิลลิน ถ้า มีแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในจานอาหาร สาร x-gal ก็จะถูกย่อย ทำให้เห็นโคโลนีของแบคทีเรียที่โตขึ้นมาเป็นสีฟ้า แต่ถ้า มีแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้จะเห็นโคโลนีเป็นสีขาว อัน



เนื่องจากยีน *lac Z* ถูกแทรกด้วยยีนที่สนใจทำให้ยีน *lac Z* ถูกทำลายจึงไม่มีเอนไซม์เกิดขึ้นและไม่มี
การย่อย x-gal (รูปที่ 22)



รูปที่ 21 โครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ในการคัดเลือกโดยวิธี white blue colony screening



รูปที่ 22 ผลของการตรวจสอบความสำเร็จในการทำทรานสฟอร์มเมชันโดยวิธี white blue colony screening คือจากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและสาร x-gal เซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีดีเอ็นเอพาหะจะตายไปเพราะไม่มียีนต้านทานต่อแอมพิซิลลิน ส่วนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตเพราะมีพลาสมิดที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะและมียีน *lacZ* ด้วยจะสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสาร x-gal ปรากฏโคโลนีเป็นสีฟ้า และสำหรับเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตเพราะมีพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะและมียีนที่สนใจแทรก (insert) อยู่ที่บริเวณยีน *lac Z* ทำให้ยีน *lac Z* ไม่ทำงาน ส่งผลให้ x-gal ไม่ถูกย่อย สีฟ้าที่เป็น indicator จึงไม่ปรากฏ ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสีขาว

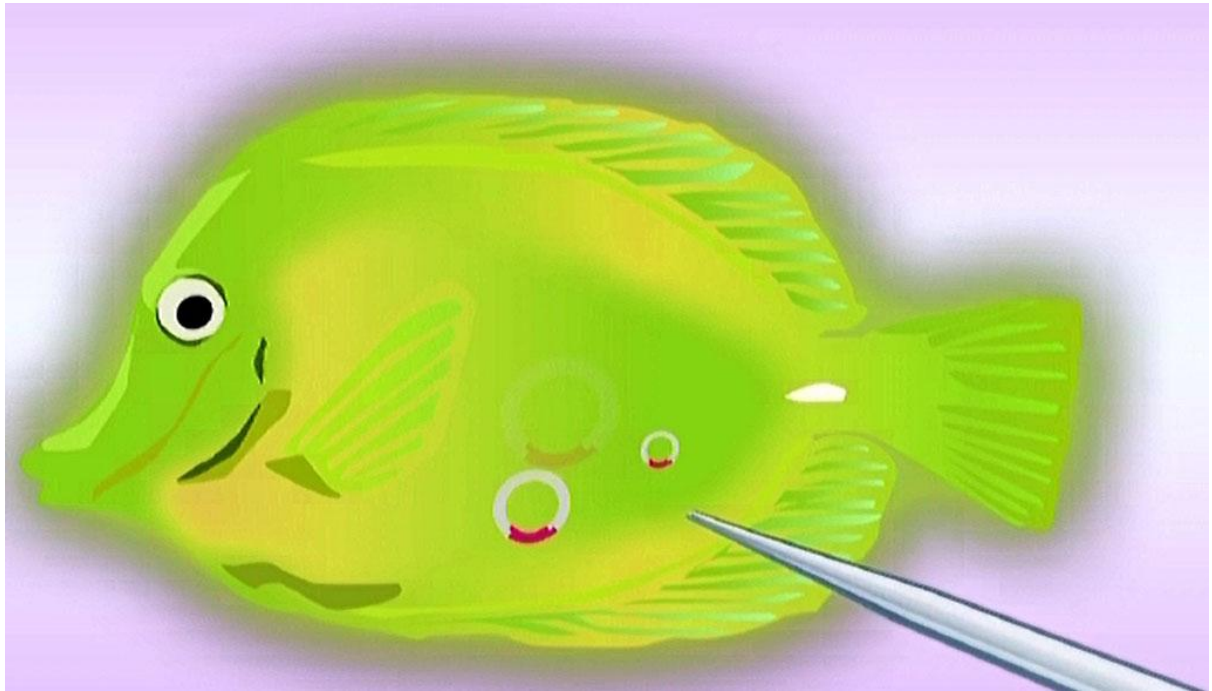


สรุปขั้นตอนการทำโคลนนิ่งดีเอ็นเอสายผสม

1. เมื่อได้ดีเอ็นเอสายผสมตามที่ต้องการแล้วจะต้องทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายผสมนั้น โดยการ
ทำ transformation ซึ่งเป็นการนำเอาดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย
2. เพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีทั้งเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่เรา
ต้องการอยู่ เซลล์แบคทีเรียที่มีแต่พลาสมิดเปล่าและเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดใด ๆ เลย
3. คัดเลือกเซลล์ที่มีเพียงดีเอ็นเอสายผสมที่เราต้องการโดยทาแอมพิซิลลินและ x-gal ให้ทั่วอาหาร
เลี้ยงเชื้อที่ใส่อยู่ในจานอาหาร จากนั้นจึงใส่เซลล์แบคทีเรียลงไปและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากนั้นจะเห็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมา
แบ่งเป็น 2 สี คือ สีฟ้าและสีขาว ซึ่งเราจะคัดเลือกกลุ่มที่เป็นสีขาวมาเพิ่มจำนวนต่อไป เนื่องจาก
เป็นกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น
4. เพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกออกและนำดีเอ็นเอสายผสมออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปผ่าน
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จนได้ดีเอ็นเอสายผสมที่มีปริมาณมากตามที่ต้องการ ซึ่งพร้อมที่จะ
นำเข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิตเป้าหมายให้มีลักษณะตามที่ต้องการ

สรุปขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม

1. ตัดดีเอ็นเอพาหะและยีนที่สนใจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ทำให้มีปลายที่
เป็นเบสคู่สม (complementary base) เพื่อให้ปลายทั้งสองของดีเอ็นเอพาหะและยีนที่สนใจต่อ
เข้าด้วยกันได้ จากนั้นจึงใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสเชื่อมดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย เข้าด้วยกัน ได้เป็น
ดีเอ็นเอสายผสม
2. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายผสมด้วยการทำโคลนนิ่ง
3. เมื่อได้ดีเอ็นเอสายผสมปริมาณตามที่ต้องการแล้วสามารถนำไปฉีดเข้าไปยังสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย
ที่ต้องการให้มีลักษณะนั้น ๆ ต่อไป (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 การนำดีเอ็นเอสายผสมไปใช้ประโยชน์ โดยฉีดเข้าสู่สิ่งมีชีวิตเป้าหมายให้มีลักษณะ ตามที่ต้องการ



แนวทางในการจัดการเรียนรู้

ก่อนที่ผู้สอนจะให้ผู้เรียนศึกษาสื่อการสอนเรื่องนี้ ผู้เรียนควรจะได้ดูสื่อการสอนตอนที่ 63 เรื่อง แนะนำพันธุวิศวกรรมมาแล้ว ในคราวนี้ผู้สอนอาจแบ่งกลุ่มนักเรียนกลุ่มละ 3-5 คน เพื่อทำกิจกรรมต่างๆ ไปด้วยกันเพื่อความเข้าใจในบทเรียนมากยิ่งขึ้น จากนั้นให้ผู้เรียนทำกิจกรรมต่างๆ เป็นระยะๆ ดังต่อไปนี้

กิจกรรมที่ 1: พาลินโดรม

ผู้สอนให้ผู้เรียนอ่านลำดับเบสที่เป็นพาลินโดรมดังต่อไปนี้

ลำดับเบสที่เอนไซม์ *PvuI* สามารถจดจำได้คือ

5' CGATCG 3'
3' GCTAGC 5'

สายบนเมื่ออ่านจาก 5' ไป 3' คือ.....

สายล่างเมื่ออ่านจาก 5' ไป 3' คือ.....

ลำดับเบสที่เอนไซม์ *BamHI* สามารถจดจำได้คือ

5' GGATCC 3'
3' CCTAGG 5'

สายบนเมื่ออ่านจาก 5' ไป 3' คือ.....

สายล่างเมื่ออ่านจาก 5' ไป 3' คือ.....

ลำดับเบสที่เอนไซม์ *HindIII* สามารถจดจำได้คือ

3' AAGCTT 5'
5' TTCGAA 3'

สายบนเมื่ออ่านจาก 5' ไป 3' คือ.....

สายล่างเมื่ออ่านจาก 5' ไป 3' คือ.....

กิจกรรมที่ 2: รูปแบบของปลายดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผู้สอนให้ผู้เรียนลองเปรียบเทียบผลการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทำให้เกิดปลายเหนียว กับปลายทู่ของสายดีเอ็นเอ แล้วให้ลองคิดว่าปลายเหนียวหรือปลายทู่ที่จะสามารถนำมาต่อเข้าให้เป็น ดีเอ็นเอตามเดิมแบบใต้ง่ายกว่ากัน



คำตอบ ปลายเหนียวเนื่องจากปลายเหนียวนี้มีส่วนปลายยื่นออกมาซึ่งเมื่อมีการต่อกันของ 2 ยีน นักเรียนจะเห็นว่าส่วนปลายของดีเอ็นเอปลายเหนียวทั้งสองจะประกอบไปด้วยเบสคู่สมซึ่งสามารถเข้าคู่กันได้ ทำให้ทั้ง 2 ยีน สามารถเชื่อมต่อกันได้อย่างง่ายดาย

กิจกรรมที่ 3 : หลักการพิจารณาเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ให้ผู้เรียนตอบคำถามต่อไปถ้ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียง 1 เบส ในบริเวณที่เอนไซม์สามารถจดจำได้นั้น 1 เบส เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะยังจดจำและสามารถตัดได้อยู่หรือไม่ ให้เหตุผลประกอบด้วย

คำตอบ ไม่ได้ เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ ดังนั้นถ้ามีลำดับเบสเปลี่ยนไปเพียง 1 เบส จะส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถจดจำและไม่สามารถตัดได้ ยกตัวอย่างเช่น ลำดับเบส **GAATTC** ซึ่งเป็นลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* สามารถจดจำได้ และทำการตัดที่บริเวณระหว่างเบส G กับ A แต่ถ้าเมื่อใดลำดับเบสกลายเป็น **TAATTC** ซึ่งจะทำให้เกิดจากการแทนที่จากเบส G ด้วยเบส T ส่งผลให้ *EcoRI* ไม่สามารถจดจำได้อีกต่อไป ลำดับเบส **TAATTC** นี้จะไม่ถูกตัด หรือเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกชนิดหนึ่งคือ *HindIII* ซึ่งสามารถจดจำลำดับเบส **AAGCTT** และตัดที่บริเวณระหว่างเบส A กับ A ถ้ามีการกลายเกิดขึ้นลำดับเบสเปลี่ยนไปเป็น **AACCTT** ซึ่งมีการเปลี่ยนจากเบส G ไปเป็น C จะทำให้ *HindIII* ไม่สามารถจดจำและตัดได้ จากตัวอย่างที่ยกมาให้ดู จะเห็นว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะจะจดจำลำดับเบสที่จำเพาะ แม้จะดูเหมือนว่าลำดับเบสคล้ายกัน ต่างกันเพียง 1 เบส ก็ไม่สามารถทำให้เอนไซม์สามารถจดจำได้แล้ว และนี่คือคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

กิจกรรมที่ 4: การสร้างดีเอ็นเอสายผสม

มีกิจกรรมให้นักเรียนได้ลงมือทำด้วยตนเองดังนี้

ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม ผู้สอนให้ผู้เรียนสร้างดีเอ็นเอสายผสมด้วยตัวเอง โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งตัวอย่างต่อไปนี้ (ผู้สอนอาจกำหนดขึ้นมาเองได้)

ดีเอ็นเอสายที่ 1

GGATCC เป็นบริเวณที่ เอนไซม์ *BamHI* จดจำได้

5 ATCGTGTGTGATGTGTGTGATAGT**GGATCC**TTTTGTGTAATGTCTGCTGCTGCTGC 3

3 TAGCACACACTACACACACTATCA**CCTAGG**AAAACACATTACAGACGACGACGACG 5

ดีเอ็นเอสายที่ 2

TCGA เป็นบริเวณที่ เอนไซม์ *TaqI* จดจำได้

5 CACGTGTGAGATGTCTGTGATAGT**TCGA**CATTGCGTAGTGTCTGCTGCTGCCGC 3

3 GTGCACACTCTACAGACACTATCA**AGCT**GTAACGCATCACAGACGACGACGGCG 5



ดีเอ็นเอสายที่ 3

GGATCC เป็นบริเวณที่ เอนไซม์ *Bam*HI จดจำได้

5 TGTGTGATGTGTGTGATAGTGGATCCCCCCGTGTGGTGTCTGCTGCTGCCAT 3

3 ACACACTACACACACTATCACCTAGGGGGGCACACCACAGACGACGACGGTA 5

ดีเอ็นเอสายที่ 4

TCGA เป็นบริเวณที่ เอนไซม์ *Taq*I จดจำได้

5 TCTATGTGAGATGTCTGTGATAACTCGACTTTGCGTAGTGTCTGCTGCTGCCCT 3

3 AGATACACTCTACAGACACTATTGAGCTGAAACGCATCACAGACGACGACGGGA 5

ผู้สอนให้ผู้เรียน 1 กลุ่ม ได้รับดีเอ็นเอ 1 สาย จากนั้นให้ผู้เรียนหาลำดับเบสที่เอนไซม์สามารถจดจำได้ด้วยตัวเองและทำการตัดลำดับเบสนั้นๆ ตามตารางที่ 1 ที่ให้ไว้ในส่วนของเนื้อหา จากนั้นให้แต่ละกลุ่มหาปลายที่สามารถต่อเข้าด้วยกันได้จากกลุ่มอื่น (เฉลยคำตอบของกิจกรรม: กลุ่มที่จะสามารถต่อเข้าด้วยกันได้คือกลุ่มที่ได้ดีเอ็นเอสาย 1 กับ สาย 3 เนื่องจากมีลำดับเบสที่เอนไซม์ *Bam*HI จดจำได้ และกลุ่มที่มีดีเอ็นเอสาย 2 กับสาย 4 สามารถเชื่อมต่อเข้าด้วยกันได้เนื่องจากมีลำดับเบสที่เอนไซม์ *Taq*I จดจำ)

กิจกรรมที่ 5: การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมในเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธี **White blue colony screening**

เนื่องจากเป็นเรื่องที่เข้าใจค่อนข้างยาก ดังนั้น ผู้สอนควรให้ผู้เรียนดูสื่อการสอน 1 รอบ จากนั้นผู้สอนอธิบายอีก 1 รอบ และท้ายสุดให้ผู้เรียนอภิปรายกันในกลุ่มและออกมารายงานหน้าชั้นเพื่อตรวจสอบความเข้าใจ

กิจกรรมที่ 6: การนำพันธุ์วิศวกรรมไปใช้ประโยชน์

เมื่อผู้เรียนได้ทำความเข้าใจเกี่ยวกับพันธุวิศวกรรมแล้วผู้สอนให้ผู้เรียนไปค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติมถึงการนำพันธุวิศวกรรมไปใช้ประโยชน์ต่างๆ (ทั้งนี้ ผู้สอน อาจให้ผู้เรียนได้ดูสื่อการสอนเรื่องสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมก่อนได้ เพื่อให้ผู้เรียนได้มองเห็นภาพชัดเจนยิ่งขึ้น)



ภาคผนวก

ก. คำอธิบายศัพท์

ดีเอ็นเอพาหะ ดีเอ็นเอที่ใช้ทำหน้าที่พาชิ้นส่วนของยีนหรือดีเอ็นเออื่นๆ ที่	ต้องการศึกษาเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อให้ยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษานั้น สามารถเข้าไปสอดแทรกยังโครโมโซมหรือยีนเป้าหมายได้
ดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA)	ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดต่อยีนในห้องปฏิบัติการ เป็นการนำยีนหรือสารพันธุกรรมจากแหล่งต่างกันเข้ามาเชื่อมต่อกัน เพื่อให้ได้ยีนหรือสารพันธุกรรมในรูปแบบใหม่ที่ไม่มีในธรรมชาติแต่เป็นในรูปแบบที่เราต้องการ
ทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)	กระบวนการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แบคทีเรียมีความพร้อมที่จะเปิดรับดีเอ็นเอสายผสมนั้นๆ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ยกตัวอย่างเช่นวิธี heat-shock ซึ่งเป็นการใช้ความร้อนเพื่อให้รูของเยื่อหุ้มเซลล์เปิด ส่งผลให้ดีเอ็นเอสายผสมสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ จากนั้นปิดรูผนังเซลล์โดยใช้ความเย็น
White blue colony screening	วิธีการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ โดยวิธีนี้เป็นการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งคือยีน <i>lacZ</i> ที่จะสามารถย่อยสารที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลกาแลคโตส โดยผสมกับสีที่จะใส่เป็น indicator ทำให้ปรากฏผลเป็นสีฟ้า โดยยีน <i>lacZ</i> นี้จะมีบริเวณที่สามารถแทรกยีนที่สนใจได้ ซึ่งเมื่อมียีนที่สนใจสอดแทรกเข้าสู่ยีน <i>lacZ</i> จะทำให้ยีนนี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ ทำให้ไม่มีสีฟ้าปรากฏขึ้น จะเห็นโคโลนีแบคทีเรียเป็นสีขาว
Selectable marker	ยีนที่เมื่อแสดงออกจะสามารถใช้แยกแยะระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีและไม่มี selectable marker นี้ได้ โดยการมีชีวิตรอดหรือไม่รอด ยกตัวอย่างเช่น ยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในพลาสมิด ถ้าแบคทีเรียมีพลาสมิดนี้อยู่



Screening marker

แบคทีเรียจะสามารถเจริญเติบโตได้แม้จะอยู่ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะนั้นก็ตาม

ยีนที่เมื่อแสดงออกจะสามารถใช้คัดแยกระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีและไม่มี screening marker นี้ได้โดยลักษณะที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ยีนที่สร้างสารเรืองแสง ถ้าสิ่งมีชีวิตมียีนนี้อยู่จะทำให้สามารถตรวจพบการเรืองแสงได้เมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่ไม่มียีนนี้อยู่ภายใน เป็นต้น ซึ่งยีน *lacZ* ที่ใช้ใน white blue colony screening technique ก็เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งของ screening marker

ข. แหล่งเรียนรู้เพิ่มเติม

1. Hartwell, L.H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E., Lee M.S. and Veres R.C. 2008. Genetics: From Genes to Genomes. 3rd edition. McGraw Hill, Inc, USA.
2. Tropp, B.E. 2008. Molecular Biology: Genes to Proteins. 3rd edition. Jones and Bartlett, Massachusetts.



รายชื่อสื่อการสอนวิชาชีววิทยาจำนวน 92 ตอน

ตอนที่	ชื่อตอน	อาจารย์ผู้จัดทำสื่อ
1	ชีววิทยาคืออะไร	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล
2	ชีวจริยธรรม	รศ.ดร.สุจินดา มัลย์วิจิตรนนท์
3	การวางแผนการทดลอง และการตรวจสอบสมมติฐาน	ผศ.ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร
4	ตัวอย่างการทดลองทางชีววิทยา	ผศ.ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร
5	ส่วนประกอบและวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	อ.ดร.จิรารักษ์ กิตนะ
6	การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาและประมาณขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	อ.ดร.จิรารักษ์ กิตนะ
7	ปฏิกิริยา polymerization และ hydrolysis	อ.ดร.จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์
8	โปรตีน	ผศ.ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร
9	กรดนิวคลีอิก	ผศ.ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร
10	การดำรงชีวิตของเซลล์	ผศ.ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร
11	การสื่อสารระหว่างเซลล์; บทนำ	ผศ.ดร.อรรณณ สัตยาลัย
12	การสื่อสารระหว่างเซลล์; การสื่อสารระยะไกลในพืชและสัตว์	ผศ.ดร.อรรณณ สัตยาลัย
13	การสื่อสารระยะไกลในสัตว์	ผศ.ดร.อรรณณ สัตยาลัย
14	องค์ประกอบของการสื่อสารระหว่างเซลล์	ผศ.ดร.อรรณณ สัตยาลัย
15	ทางเดินอาหารและกระบวนการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง	ผศ.ดร.พัชนี สิงห์อาษา
16	การย่อยอาหารในลำไส้เล็ก	ผศ.ดร.พัชนี สิงห์อาษา
17	ภาพรวมของการสลายอาหารระดับเซลล์	อ.ดร.จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์
18	ลูกโซ่หายใจ	อ.ดร.จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์
19	oxidative phosphorylation	อ.ดร.จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์
20	การแลกเปลี่ยนแก๊สของสัตว์น้ำและสัตว์บก	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล
21	เรื่องกลไกการหายใจและศูนย์ควบคุมการหายใจในคน	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล
22	ไต: หน่วยไต และการสร้างปัสสาวะของไตคน	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล



ตอนที่	ชื่อตอน	อาจารย์ผู้จัดทำสื่อ
23	ระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิด (open circulatory system) และแบบปิด (closed circulatory system)	รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด
24	องค์ประกอบของเลือด หมู่เลือด และ การแข็งตัวของเลือด	รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด
25	การป้องกันตนเองของร่างกาย และ ระบบภูมิคุ้มกัน	รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด
26	การเคลื่อนที่ของปลา	รศ.วีณา เมฆวิชัย
27	กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อโครงร่าง	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล
28	การทำงานของเซลล์ประสาท	อ.ดร.นพดล กิตนะ
29	การถ่ายทอดกระแสประสาทระหว่างเซลล์ประสาท	อ.ดร.นพดล กิตนะ
30	เซลล์รับความรู้สึก	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล
31	หูและการได้ยิน	รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล
32	ฮอร์โมนคืออะไร	รศ.ดร.สุจินดา มัลย์วิจิตรนนท์
33	ชนิดของฮอร์โมนและชนิดของเซลล์เป้าหมาย	รศ.ดร.สุจินดา มัลย์วิจิตรนนท์
34	การสืบพันธุ์ระดับเซลล์ 1 วัฏจักรเซลล์ อินเทอร์เฟส และ division phase	ผศ.ดร.อรรณพ สัตยาลัย
35	การสืบพันธุ์ระดับเซลล์ 2 วัฏจักรเซลล์ division phase mitosis	ผศ.ดร.อรรณพ สัตยาลัย
36	การสืบพันธุ์ระดับเซลล์ 3 วัฏจักรเซลล์; division phase; meiosis	ผศ.ดร.อรรณพ สัตยาลัย
37	เซลล์พืช	ผศ.ดร.มานิต คิตอยู่
38	เนื้อเยื่อพืช	ผศ.ดร.มานิต คิตอยู่
39	ปากใบและการควบคุมการเปิด-ปิดของปากใบ	อ.ดร.อัญชลี ใจดี
40	การลำเลียงน้ำของพืช	รศ.ดร.ปรีดา บุญหลง
41	พลังงานชีวิต	รศ.ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์
42	ปฏิกิริยาแสง (Light reaction)	รศ.ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์
43	ปฏิกิริยาคาร์บอน (carbon reaction) – Calvin cycle	ผศ.ดร.บุญธิดา โฆษิตทรัพย์
44	กลไกการเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในพืช C_4	ผศ.ดร.บุญธิดา โฆษิตทรัพย์
45	กลไกการเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในพืช CAM	ผศ.ดร.บุญธิดา โฆษิตทรัพย์
46	ปัจจัยจำกัดในการสังเคราะห์ด้วยแสง	รศ.ดร.ปรีดา บุญหลง



ตอนที่	ชื่อตอน	อาจารย์ผู้จัดทำสื่อ
47	โครงสร้างของดอก (Structure of Flower)	ผศ.ดร.ต่อศักดิ์ สีลำนันท์
48	การปฏิสนธิในพืชดอก	ผศ.ดร.ต่อศักดิ์ สีลำนันท์
49	การเกิดและโครงสร้างผล	อ.ดร.สร้อยนภา ญาณวัฒน์
50	การงอกของเมล็ด	รศ.นันทนา อังกินันท์
51	การวัดการเจริญเติบโตของพืช	อ.ดร.อัญชลี ใจดี
52	ออกซิน	ผศ.ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ
53	การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในการเกษตร	ผศ.พัชรา ลิมปะนะเวช
54	การเคลื่อนไหวของพืช	ผศ.ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ
55	ความน่าจะเป็นและกฎแห่งการแยก	ผศ. เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์
56	กฎแห่งการรวมกลุ่มอย่างอิสระ	ผศ. เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์
57	มัลติเปิลแอลลีล (Multiple alleles)	อ.ดร.วรลักษณ์ เกษตรนันท์
58	พอลิยีน (Polygene)	อ.ดร.วรลักษณ์ เกษตรนันท์
59	โครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA structure)	อ.ดร.เพลินพิศ โชคชัยชานาญกิจ
60	โครงสร้างของโครโมโซม (Chromosome structure)	อ.ดร.เพลินพิศ โชคชัยชานาญกิจ
61	การถอดรหัส (Transcription)	อ.ดร.ธนะกาญจน์ มัญชุพานี
62	การแปลรหัส (Translation)	อ.ดร.ธนะกาญจน์ มัญชุพานี
63	แนะนำพันธุวิศวกรรม	อ.ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต
64	ขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม	อ.ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต
65	สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม (Genetically modified organisms: GMOs)	อ.ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
66	ชาร์ล ดาร์วิน คือใคร	ผศ.ดร.เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์
67	หลักฐานการเกิดวิวัฒนาการ	ผศ.ดร.เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์
68	ทฤษฎีวิวัฒนาการของดาร์วิน	ผศ.ดร.เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์
69	วิวัฒนาการของเชื้อดื้อยา	ผศ.ดร.เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์
70	วิวัฒนาการของมนุษย์	ผศ.ดร.เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์



ตอน ที่	ชื่อตอน	อาจารย์ผู้จัดทำสื่อ
71	อาณาจักรมอเนอรา	ผศ.ดร.รสริน พลวัฒน์
72	อาณาจักรโพรทิสตา	ผศ.ดร.รสริน พลวัฒน์
73	อาณาจักรฟังไจ	ผศ.ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว
74	ความหลากหลายของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	ผศ.ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร
75	ความหลากหลายของสัตว์มีกระดูกสันหลัง	รศ.วีณา เมฆวิชัย
76	กลไกของพฤติกรรม	รศ.ดร.อุษณีย์ ยศยิ่งยวด
77	พฤติกรรมการเรียนรู้แบบต่าง ๆ	รศ.ดร.อุษณีย์ ยศยิ่งยวด
78	การสื่อสารระหว่างสัตว์	รศ.ดร.อุษณีย์ ยศยิ่งยวด
79	แนวคิดเกี่ยวกับระบบนิเวศ	ผศ.ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร
80	ไบโอมบนบก	ผศ.ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร
81	การสำรวจระบบนิเวศบนบก	ผศ.ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร
82	ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตกับปัจจัยทางกายภาพ	ผศ.ดร.วิเชษฐ کنชื่อ
83	ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ในระบบนิเวศ	ผศ.ดร.วิเชษฐ کنชื่อ
84	โซ่อาหารและใยอาหาร	ผศ.ดร.วิเชษฐ کنชื่อ
85	วัฏจักรสาร	ผศ.ดร.วิเชษฐ کنชื่อ
86	ความหมายของคำว่าประชากร(population) และประวัติการศึกษาประชากร	รศ.ดร.กำธร ชีรคุปต์
87	วิธีการหาความหนาแน่นของประชากรโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบวางแปลง (quadrat sampling method)	รศ.ดร.กำธร ชีรคุปต์
88	การเพิ่มขนาดของประชากร (population growth)	รศ.ดร.กำธร ชีรคุปต์
89	โครงสร้างอายุ (age structure) ของประชากร	รศ.ดร.กำธร ชีรคุปต์
90	ประเภทของทรัพยากร	อ.ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา
91	ปัญหาที่มีต่อทรัพยากรธรรมชาติและสภาพแวดล้อม	อ.ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา
92	หลักการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ	อ.ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา