นิตยสาร
สสวท
สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี www.ipst.ac.th
IPST MAGAZINE
ปีที่ 44 ฉบับที่ 197 พฤศจิกายน - ธันวาคม 2558

ลูกเต๋าพิสดาร

- เมื่อเกิดความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างครูและนักเรียน
- ผลักดันนวัตกรรมน้ำของเด็กไทยสู่เวทีน้ำโลก
- การสอนเรื่องพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล
  และพันธุวิศวกรรมศาสตร์การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

ISSN 0857-2801
0 09 77085 72803 0
ราคา 50 บาท

ดร.สุนัดดา โยมญาติ
ผู้ชำนาญ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์มัธยมศึกษาตอนปลาย สสวท. / e-mail: syomy@ipst.ac.th

สื่อการสอนเรื่องพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ การโคลนยีน โดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

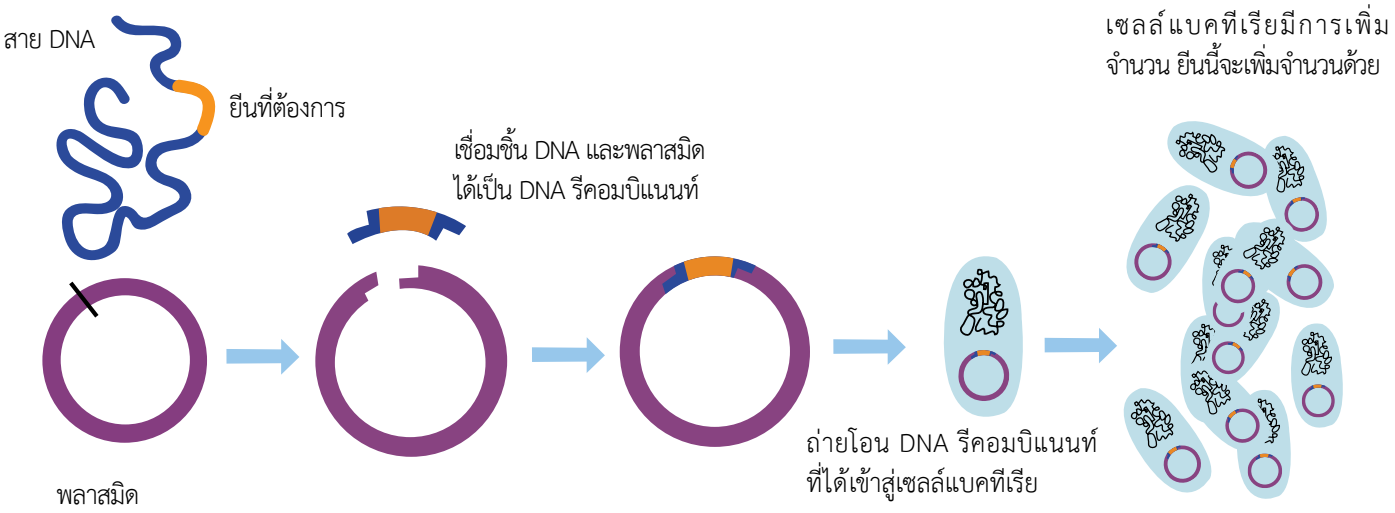
ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์มีความสำคัญต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์เนื่องจากถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ เช่น การแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม นอกจากนี้การศึกษาวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการก็มีอย่างต่อเนื่องและมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ อยู่เสมอ ในหนังสือเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายมีเนื้อหาเกี่ยวกับพันธุวิศวกรรมเบื้องต้นเพื่อสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม (GMOs) เช่น การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

บทเรียนเรื่องพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์เป็นเรื่องที่ยากต่อการจัดการเรียนการสอนของครูและยากต่อการเข้าใจของนักเรียนเนื่องจากเป็นเรื่องที่ค่อนข้างซับซ้อน การขาดวัสดุอุปกรณ์รวมทั้งครูผู้สอนไม่มีประสบการณ์ในการทำปฏิบัติการด้านนี้ทำให้ในห้องเรียนส่วนมากจะจัดการเรียนการสอนโดยใช้วิธีการบรรยายเพราะไม่สามารถทำปฏิบัติการด้านพันธุวิศวกรรมในชั้นเรียนได้

การจัดทำสื่อการเรียนการสอนเรื่องพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์จึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งบทความนี้ได้นำเสนอสื่อสำหรับทำกิจกรรมโดยจัดทำเป็นแบบจำลองการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรียในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อให้นักเรียนที่ได้ทำกิจกรรมมีความเข้าใจมากขึ้น

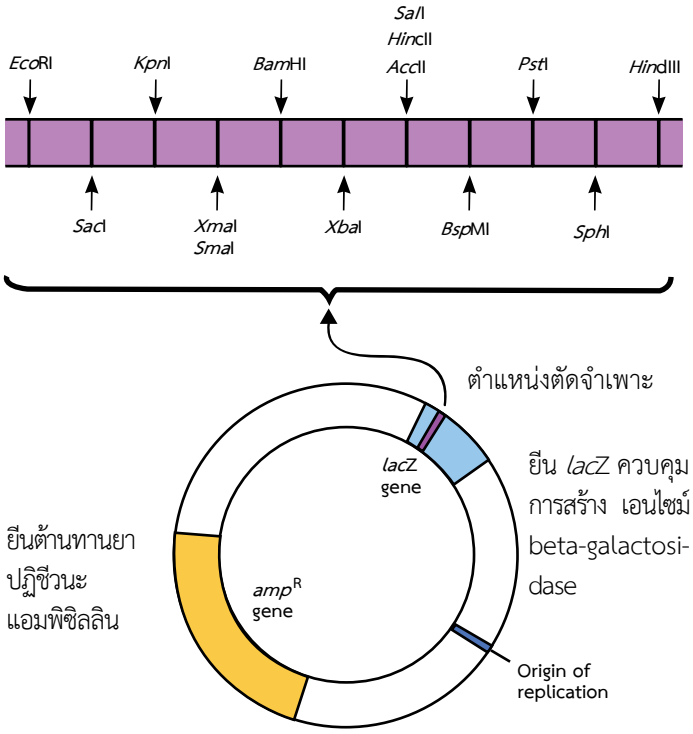
ความรู้พื้นฐานเรื่องการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรียเริ่มจาก การตัดยีนหรือ DNA ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเชื่อมต่อกับ DNA พาหะหรือเวกเตอร์ (vector) เช่น พลาสมิด ได้เป็น DNA รีคอมบิแนนท์ (recombinant DNA) แล้วถ่ายโอน DNA รีคอมบิแนนท์ที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เช่น แบคทีเรีย เมื่อเซลล์เจ้าบ้านมีการเพิ่มจำนวน ยีนหรือ DNA นี้จะเพิ่มจำนวนตามเซลล์เจ้าบ้านด้วย เซลล์เจ้าบ้านที่มี DNA รีคอมบิแนนท์เหมือน ๆ กันเรียกว่า โคลน (clone) ดังภาพที่ 1

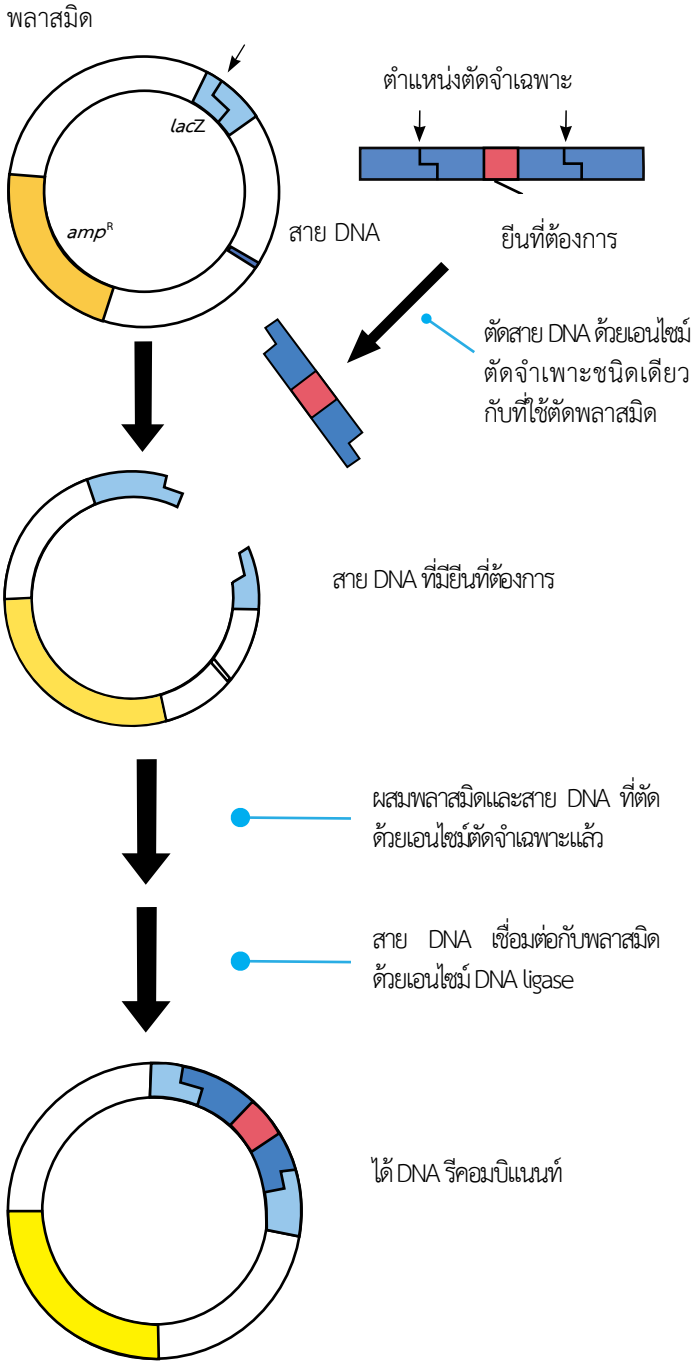


ภาพที่ 1 การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

ในปัจจุบันมีการสร้างพลาสมิดที่มีส่วนของยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะ เช่น แอมพิซิลลิน (*amp*^{R}) เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker) เซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด ซึ่งจะเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน อย่างไรก็ตามเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดทุกเซลล์จะเจริญได้แม้ว่าพลาสมิดที่อยู่ในเซลล์นั้นจะไม่มีชิ้น DNA ที่ต้องการแทรกอยู่ก็ตาม จึงไม่สามารถบอกได้ว่าโคลนใดมีชิ้น DNA หรือยีนที่ต้องการ ดังนั้นในการสร้างพลาสมิดจึงใส่ยีน *lacZ* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ beta-galactosidase เพื่อใช้เป็นยีนรายงานผล (reporter gene) ว่าพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียนั้นมีชิ้น DNA ที่ต้องการแทรกอยู่หรือไม่ ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับ DNA รีคอมบิแนนท์จะมีลักษณะที่ต่างไปจากเดิม นอกจากนี้ในยีน *lacZ* มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ ที่สามารถใส่ชิ้น DNA ที่ต้องการแทรกเข้าไปเพื่อให้สะดวกในการโคลนยีน ดังภาพที่ 2 และภาพที่ 3

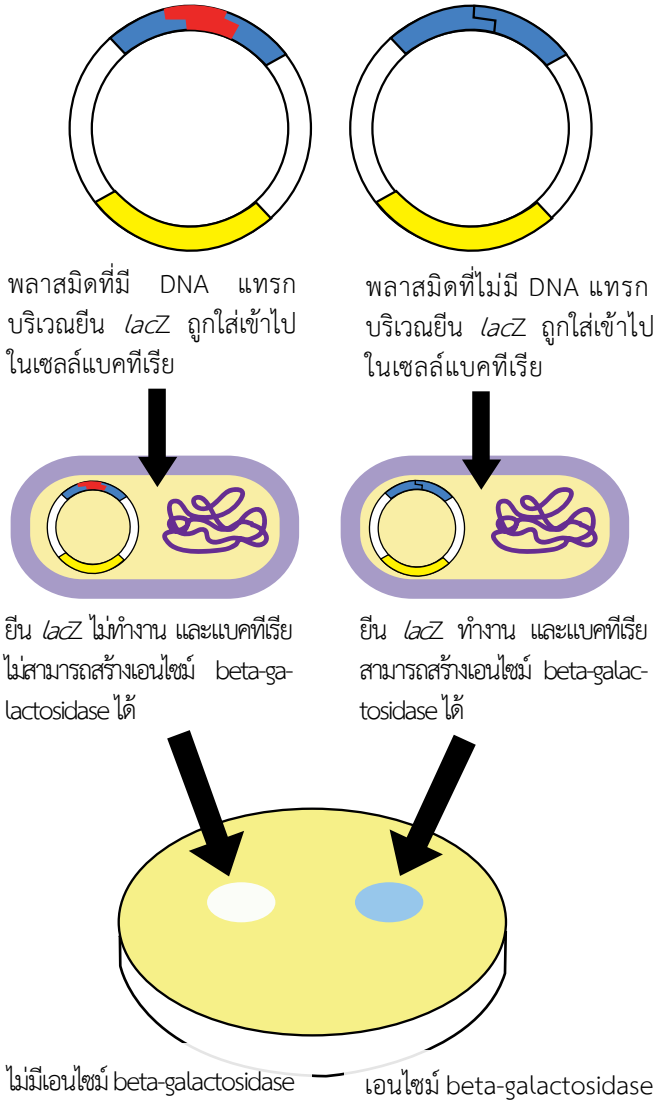


ภาพที่ 2 พลาสมิดที่มีเครื่องหมายในการคัดเลือกและยีนรายงานผล



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสร้าง DNA รีคอมบิแนนท์

เมื่อ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแทรกเข้าไปในพลาสมิดได้ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจะทำให้ยีน *lacZ* ไม่ทำงาน ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ beta-galactosidase ได้ เมื่อนำพลาสมิดใส่เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านแล้วเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำการสร้าง beta-galactosidase พร้อมกับใส่สาร X–gal ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้ เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นที่เจริญได้และเพิ่มจำนวนขึ้นจนมองเห็นเป็นโคโลนี และสีของโคโลนีแบคทีเรียจะบอกได้ว่าแบคทีเรียโคลนนั้นสร้าง beta-galactosidase ได้หรือไม่ และเป็นตัวรายงานผลว่าแบคทีเรียโคลนนั้นได้รับ DNA รีคอมบิแนนท์หรือมี DNA ที่ต้องการแทรกอยู่ในพลาสมิดหรือไม่ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ฟีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ได้รับและไม่ได้รับ DNA รีคอมบิแนนท์

ก่อนการทำกิจกรรมครูอาจจะเปิดสื่อวีดิทัศน์เรื่องการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย จาก http://www.scimath.org/ebook/sci/sci-sec4/14/eBook/ ซึ่งเป็นสื่อการสอนที่อยู่ในหนังสือเรียนอิเล็กทรอนิกส์ รายวิชาเพิ่มเติมชีววิทยา เล่ม 4 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เพื่อให้นักเรียนได้เรียนรู้เรื่องการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

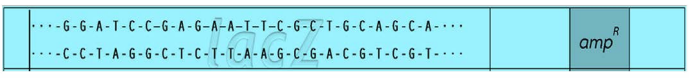
การจัดกิจกรรมเรื่องการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย

วัสดุอุปกรณ์ สำหรับ 1 กลุ่ม จำนวนสมาชิก 5 คน

1. กระดาษสีฟ้าขนาดกว้าง 2.5 cm ยาว 29 cm จำนวน 10 แผ่น
2. กระดาษสีเขียว กว้าง 2.5 cm ยาว 20 cm จำนวน 10 แผ่น
3. กระดาษสีขาว สีฟ้า และสีแดง ขนาดกว้าง 8 cm ยาว 8 cm สีละ 5 แผ่น
4. ถุงผ้าหรือถุงกระดาษทึบ 5 ถุง
5. ปากกา 5 อัน
6. เทปใส 2 อัน
7. กรรไกร 5 อัน
8. ถาดกระดาษ 6 ถาด

วิธีการทำกิจกรรม

1. นักเรียนแต่ละคนเขียนลำดับเบสและยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินลงแถบบนกระดาษสีฟ้าดังภาพ สำหรับใช้เป็นพลาสมิด หรือ download ได้จาก http://biology.ipst.ac.th/?p=2828



2. เขียนลำดับเบสและยืนลงบนแถบกระดาษสีเขียว ดังภาพ สำหรับใช้เป็นสาย DNA หรือ download ได้จาก http://biology.ipst.ac.th/?p=2828

3. นำกระดาษสีฟ้าที่เป็นพลาสมิดแต่ละชิ้น ม้วนติดกันเป็นวงกลมด้วยเทปใส

4. ใช้ปากกาวาดกรอบล้อมรอบลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI

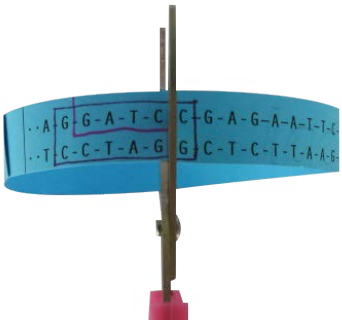
↓

G-G-A-T-C-C

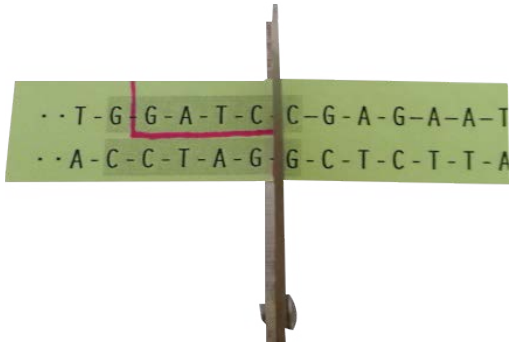
C-C-T-A-G-G

↑

5. จากนั้นใช้กรรไกรตัดกระดาษสีฟ้าที่จุดตัดจำเพาะ

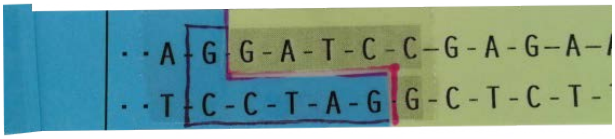


6. ใช้กรรไกรตัดกระดาษสีเขียวตรงตำแหน่งที่ตรงกับการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เช่นเดียวกัน

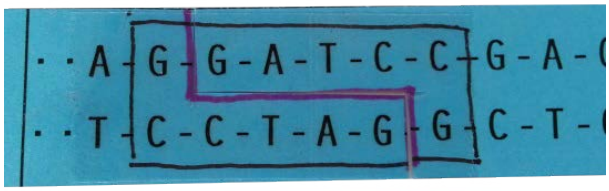


7. จากนั้นต่อแถบกระดาษให้เป็นวงดังนี้

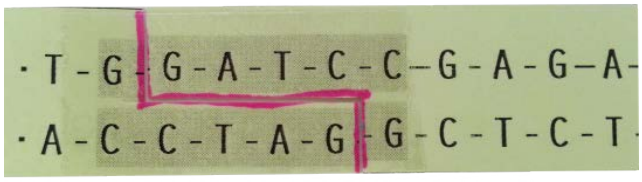
- ต่อพลาสมิดและ DNA ด้วยกัน



- ต่อปลายชิ้นพลาสมิดบริเวณที่ถูกตัดเข้าด้วยกัน

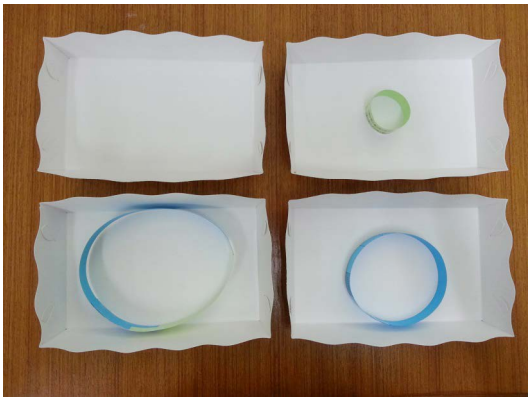


- ต่อปลายชิ้น DNA บริเวณที่ถูกตัดเข้าด้วยกัน



หลังจากต่อแถบกระดาษแล้วจะได้เป็น 3 วง และนำกระดาษทั้ง 3 วง ใส่ลงในถุงทึบ

8. จากนั้นให้จัดกิจกรรมเป็นกลุ่ม โดยมีกลุ่มละ 5 คน เตรียมถาดกระดาษซึ่งใช้แทนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านกลุ่มละ 6 ถาด วางไว้ตรงกลางโต๊ะ ให้นักเรียนแต่ละคนสุ่มหยิบชิ้นกระดาษจากถุงทึบของตนเองขึ้นมา 1 วง แล้วใส่ลงในถาดกระดาษ 1 ถาด ให้สมาชิกในกลุ่มร่วมกันพิจารณาเลือกถาดกระดาษที่ได้รับวงกระดาษที่มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งจะมี 3 ถาดและ 1 ถาดที่ไม่ได้รับวงกระดาษใด ๆ



9. ให้สมาชิกภายในกลุ่มร่วมกันพิจารณาว่าวงกระดาษที่เป็นพลาสมิดหรือ DNA ที่อยู่ในถาดกระดาษนั้น ทำให้ลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรียเป็นแบบใด แล้วใส่กระดาษสี่เหลี่ยมสีขาว ฟ้า หรือแดงแผ่นใดแผ่นหนึ่งซึ่งแทนลักษณะแต่ละฟีโนไทป์ลงในแต่ละถาดกระดาษ ดังนี้

- กรณีที่โคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีขาวให้ใส่กระดาษสีขาว
- กรณีที่โคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีฟ้าให้ใส่กระดาษสีฟ้า
- กรณีที่โคโลนีของแบคทีเรียไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใส่สีแดง

10. สรุปและอภิปรายผลการทำกิจกรรมเกี่ยวกับลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรียแต่ละเซลล์ว่าเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG ได้หรือไม่ และถ้าเจริญได้จะเกิดเป็นโคโลนีสีอะไร เพราะเหตุใด

จากการทำกิจกรรม นักเรียนควรสรุปได้ว่า ถาดกระดาษที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียจะมีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

- ได้รับพลาสมิดที่ต่อกับ DNA จะใส่กระดาษสีขาวลงไปในถาด ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียนี้เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่สามารถสร้างเอนไซม์ beta-galactosidase เนื่องจากมี DNA แทรกเข้าไปในพลาสมิดได้บริเวณตำแหน่งยีน *lacZ* บนพลาสมิดทำให้ยีนนี้ไม่ทำงาน
- ได้รับพลาสมิดที่ต่อปลายเข้าด้วยกัน จะใส่กระดาษสีฟ้าลงไปในถาด ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียนี้เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถสร้างเอนไซม์ beta-galactosidase เนื่องจากไม่มี DNA แทรกเข้าไปในพลาสมิดบริเวณตำแหน่งยีน *lacZ* ทำให้ยีนนี้สามารถทำงานได้ สร้างเอนไซม์ย่อย X-gal ให้ได้เป็นสีฟ้า
- ได้รับชิ้น DNA ที่ต่อปลายเข้าด้วยกัน จะใส่กระดาษสีแดงลงไปในถาด ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียนี้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากไม่ได้รับพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน
- ไม่ได้รับพลาสมิดหรือ DNA จะใส่กระดาษสีแดงลงไปในถาด ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียนี้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากไม่ได้รับพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

จากการทำกิจกรรมที่ให้ผู้เรียนได้ลงมือปฏิบัติเองและทำอย่างเป็นขั้นตอน จะทำให้เข้าใจเรื่องการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรียซึ่งมีความซับซ้อนได้ง่ายขึ้น และนอกจากกิจกรรมนี้แล้ว ผู้สอนอาจจะให้นักเรียนไปสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับการสร้าง GMOs อื่น ๆ หรือผลิตภัณฑ์จาก GMOs อื่น ๆ ที่นักเรียนสนใจหรือเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวัน เช่น อาหารและยา เพื่อนำมาเสนอหน้าชั้นเรียนหรือจัดทำป้ายนิเทศเพื่อเผยแพร่ความรู้ต่อไป

บรรณานุกรม

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.กระทรวงศึกษาธิการ. (2554). *หนังสือเรียนรายวิชาเพิ่มเติมชีววิทยา เล่ม 4.* กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การค้า สกสค.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. (2548). *สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์.* กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน จำกัด.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2548). *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.* พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.