สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาแนวทางการสร้างชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

T047314

นายณัฐ แต่แดงเพชร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47314
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2548

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of the Construction of Agarose Gel Electrophoresis Equipment

Mr. Nut Taedangpetch

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การศึกษาแนวทางการสร้างชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

นักศึกษา นาย ณัฐ แต่แดงเพชร

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. กนกพร สมพรไพลิน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม	.....
กรรมการ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	.....
กรรมการ ดร.กนกพร สมพรไพลิน	.....

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การศึกษาแนวทางการสร้างชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

นักศึกษา นายณัฐ แต่แดงเพชร

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2545

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

อะกาโรสอิเลคโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่สำคัญในงานอณูชีววิทยา ใช้สำหรับการแยกกรดนิวคลีอิกขนาดต่างๆ ผ่านตัวกลางในสนามไฟฟ้า ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงการสร้างเครื่องอิเลคโทรโฟรีซิสในแนวระนาบ โดยใช้วัสดุที่หาได้ง่าย ส่วนที่เป็นอ่างเก็บบัฟเฟอร์ (gel chamber) สร้างจากการนำแผ่นพลาสติกอะคริลิกมากดลงบนแม่แบบ และติดด้วยขั้วทองเหลืองวางขนานกัน ส่วนของอ่างเก็บบัฟเฟอร์นี้ได้เชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดสนามไฟฟ้าที่สร้างขึ้นมาเอง อุปกรณ์ชุดนี้จะแปลงไฟฟ้ากระแสสลับความต่างศักย์ 220 โวลต์ มาเป็นไฟฟ้ากระแสตรงความ ต่างศักย์ 65 โวลต์ จากการทดสอบพบว่าเครื่องมือที่สร้างขึ้นให้ประสิทธิภาพในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล ที่ใกล้เคียงกับเครื่องมือที่ผลิตเป็นการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spacial Project Title	A Study of the Construction of Gel Electrophoresis Equipment
Name	Mr.Nut Taedangpetch
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Acadimic Year	2002
Spacial Project Advisor	Dr. Kanokporn Sompornpailin

ABSTRACT

Agarose gel electrophoresis is an important technique in molecular biology for separation of various sizes of DNA molecules in electric field. In this work, horizontal electrophoresis equipment has been constructed from convenient available materials. The suitable electrophoresis chamber is made from acrylic plastic compressed into model and attached with parallel brass electrode. This chamber has been connected to the constructed power supply that output electric potential was constant DC 65 V at 220 V AC input. According to standard experiment condition, this equipment is capable to resolve several sizes of DNA fragments as similar as commercial electrophoresis equipments.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ดร.กนกพร สมพรไพลิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ อุปกรณ์ในการทำการทดลองต่าง ๆ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทาน แก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ในการทำโครงงานพิเศษนี้ ผศ.นวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการ สอบโครงงานพิเศษ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ และ รศ.ธีรวัฒน์ ประกอบผล ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านวงจรและกระแสไฟฟ้า รวมทั้ง คุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งคำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ และ คุณอุดม มั่งนาค เจ้าหน้าที่ประจำโรงปฏิบัติงานพลาสติก คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านพลาสติกด้วย

สุดท้าย ผู้จัดทำขอขอบคุณบิดามารดา รุ่นพี่และเพื่อน ๆ ที่ให้คำแนะนำ ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

ณัฐ แต่แดงเพชร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ช
คำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตการวิจัย	1
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	1
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 หลักการของอิเลคโทรโฟรีซิส	3
2.2 ส่วนประกอบของเครื่องมือ	5
2.2.1 อ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์	5
2.2.2 ระบบสร้างสนามไฟฟ้า	8
2.3 ระบบการทำงานของเครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	12
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	12
3.2 การสร้างอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์	13
3.3 การสร้างชุดสร้างสนามไฟฟ้า	14
3.4 การทดสอบการทำงานของอิเลคโทรโฟรีซิส	15
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	17
4.1 ผลการสร้างอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการสร้างชุดแหล่งกำเนิดสนามไฟฟ้า	18
4.3 ผลทดสอบการทำงานของอิเลคโทรโฟรีซิส	20
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.7, 1.0และ 1.5 ด้วยสนามไฟฟ้าที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 5 โวลท์ต่อเซนติเมตรนาน 60 นาที 11

รูปที่ 3.1 แสดงแบบสำหรับการเตรียมอ่างเก็บบัฟเฟอร์ 13

รูปที่ 3.2 แสดงการขึ้นรูปอ่างเก็บบัฟเฟอร์ 14

รูปที่ 3.3 วงจรไฟฟ้าที่แปลงไฟฟ้าให้เหมาะสมกับการทำอิเลคโทรโฟรีซิส 15

รูปที่ 3.4 แสดงการเตรียมอะกาโรสเจลสำหรับอิเลคโทรโฟรีซิสและการใส่สารตัวอย่าง 16

รูปที่ 4.1 อ่างเก็บบัฟเฟอร์ที่ได้จากพลาสติกอะคริลิกและพลาสติก ABS 18

รูปที่ 4.2 แสดงส่วนประกอบชุดจ่ายกระแสไฟฟ้า 19

รูปที่ 4.3 ตะกอนที่เกิดจากทองเหลืองและโลหะเงิน 20

รูปที่ 4.4 แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง 21

รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบกับแถบสารตัวอย่างที่ได้จากอ่างเก็บบัฟเฟอร์ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าจากทองเหลือง เงิน และเครื่องมาตรฐาน 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ	10
ตารางที่ 4.1การเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่สารตัวอย่างของโลหะเงินและทองเหลือง ที่ความต่างศักย์คงที่ที่ 56 V	22

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
V.	โวลท์ (Volt)
μF	ไมโครฟาหรัด(microfarad)
μl	ไมโครลิตร(microlite)
μg	ไมโครกรัม(microgram)
bp	คู่เบส(basepare)
ABS	อะครีโรไนไตร บิวตะไดอีน สไตรีน (Acrylonitrite Butabiene Styrene)
PE	โพลีเอทิลีน(Polyethylene)
PP	โพลีโพรพิลีน(polypropylene)
PS	โพลีสไตรีน(polystyrene)
PC	โพลีคาร์บอเนต(polycarbonate)
UV	อัลตราไวโอเรต (Ultra violet)
ซม.	เซนติเมตร(centimeter)
มม.	มิลลิเมตร(millimeter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันงานวิจัยมุ่งสู่งานทางด้านอณูชีววิทยามากขึ้น แต่เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัยด้านนี้มีราคาสูงและยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งเสียค่าใช้จ่ายสูงในการนำเข้า แนวทางการคิดประดิษฐ์เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์โดยใช้อุปกรณ์ซึ่งหาได้ง่ายในประเทศเพื่อรองรับการขยายตัวของงานวิจัยในประเทศและทดแทนการนำเข้าเครื่องมืออุปกรณ์จากต่างประเทศส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายจากการนำเข้าอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ จึงน่าจะเป็นการเพิ่มศักยภาพของการทำงานวิจัยของนักวิจัยในประเทศได้อีกทางหนึ่ง

เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิสเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่สำคัญต่องานอณูชีววิทยา และใช้กันอย่างกว้างขวางในการศึกษาสารชีวโมเลกุลเช่น โปรตีน (เอนไซม์) กรดนิวคลีอิก ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ ในการวิเคราะห์หาขนาดที่แน่นอน การวิเคราะห์สารผสมหาความบริสุทธิ์ของสารและเตรียมสารให้บริสุทธิ์ โดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างเพียงน้อย

อิเลคโทรโฟรีซิสเป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าผ่านสารตัวกลางที่มีความเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมีในสนามไฟฟ้า อนุภาคของสารชีวโมเลกุล ซึ่งส่วนใหญ่มีประจุจะสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ จากหลักการดังกล่าวจึงนำมาใช้ประดิษฐ์ชุดอุปกรณ์โดยใช้วัสดุที่สามารถหาได้ในประเทศเพื่อประกอบชุดอิเลคโทรโฟรีซิสสำหรับการใช้งานจริง

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาแนวทางการสร้างชุดเครื่องมืออิเลคโทรโฟรีซิสสำหรับการใช้งานจริง

1.3 ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาแนวทางการสร้างชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส โดยใช้วัสดุอุปกรณ์ภายในประเทศ เพื่อที่ให้สามารถใช้งานได้จริง

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

-ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมสำหรับสร้างส่วนของอ่างเก็บบัฟเฟอร์ (gel chamber) ของชุดอิเลคโทรโฟรีซิส

-ศึกษาระบบสร้างสนามไฟฟ้าของชุดอิเลคโทรโฟรีซิส

-การประกอบชุดอุปกรณ์และตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ผลที่คาดว่าน่าจะได้รับ

-แนวทางการสร้างเครื่องมืออิเลคโทรโฟรีซิสสำหรับใช้งานทางอณูชีววิทยา

-แนวทางการพัฒนาคุณภาพชุดเครื่องมือ

-ประหยัดงบประมาณในการซื้ออุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์

-ลดการนำเข้าสินค้าต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 หลักการของอิเลคโทรโฟรีซิส (อาภัสรา, 2537)

การทำอิเลคโทรโฟรีซิส นั้นเป็นเทคนิคหนึ่งทางชีวเคมีที่มีความสำคัญและให้ประโยชน์มากในการศึกษาสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน (เอนไซม์) และกรดนิวคลีอิก ทั้งคุณสมบัติ โครงสร้างของสาร การแยกสารผสม และการเตรียมสารให้บริสุทธิ์

เทคนิคที่สารละลายตัวอย่าง (sample solution) ถูกหยดเป็นจุดๆ หรือเคลือบเป็นแผ่นบางๆ บนตัวค้ำจุนที่เฉื่อยต่อสารเคมี ตรงบริเวณที่ห่างจากขั้วไฟฟ้าพอควร แล้วปล่อยอนุภาคให้เคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่อยู่ในสนามไฟฟ้า เรียกว่า อิเลคโทรโฟรีซิสแบบโซน (Zone Electrophoresis) ตัวกลางอาจเป็นกระดาษกรอง เซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate) หรือเจล (gel) อิเลคโทรโฟรี--ซิสแบบโซนนี้มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารผสมหาความบริสุทธิ์ของสารและเตรียมสารให้บริสุทธิ์ เนื่องจากโมเลกุลถูกเคลือบเป็นแถบบางๆบนตัวกลางจึงใช้ปริมาณของสารตัวอย่างน้อย อิเลคโทรโฟรีซิสแบบโซนแบ่งเป็นหลายชนิดตามตัวกลางค้ำจุนที่ใช้ดังนี้คือ

2.1.1 อิเลคโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ

สมัยก่อนนิยมใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสแบบกระดาษในการแยกโปรตีนและแมคโครโมเลกุลอื่นๆแต่ในปัจจุบันไม่นิยมใช่เทคนิคนี้ เพราะกระดาษกรองมีรูพรุนไม่สม่ำเสมอและสามารถดูดซับสารบางชนิดได้โดยเฉพาะโปรตีนได้ ซึ่งมีผลทำให้ได้แถบกว้าง ให้ผลการแยกต่ำและบางครั้งแถบที่ได้จะเป็นทางๆ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้อิเลคโทรโฟรีซิสแบบกระดาษแยกโปรตีนในซีรัม ปกติจะเห็นแถบของโปรตีนแค่ 5 แถบเท่านั้น ทั้งนี้เพราะแถบที่ได้ไม่คมชัด

การใช้กระดาษกรองเป็นตัวกลางสำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซิสในปัจจุบันมีขีดจำกัด โดยใช้แยกเฉพาะโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน เพพไทด์ และนิวคลีโอไทด์ และใช้ความต่างศักย์ค่อนข้างสูง ถ้าใช้ความต่างศักย์ต่ำจะมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะแยกโมเลกุลเล็กๆ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ได้เลย ทั้งนี้เพราะโมเลกุลเหล่านี้มีประจุน้อยทำให้มีการเคลื่อนที่ช้า การแยกโมเลกุลก็เกิดขึ้นช้าตามไปด้วย และเกิดการแพร่ได้เนื่องจากเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เมื่อใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำแยกกรดอะมิโน จะสามารถแยกกรดอะมิโนได้เพียง 3 กลุ่มเท่านั้น คือกลุ่มที่เป็นกรด กลุ่มที่เป็นกลาง และกลุ่มที่เป็นด่าง ถ้าใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงการแยกจะเกิดขึ้นเร็ว แต่จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงและเกิดความร้อนขึ้นจึงจำเป็นต้องมีระบบทำความเย็นระบายความร้อนที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 อิเลคโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซิเตต

ตัวกลางซึ่งเป็นแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมีขนาดความพรุนสม่ำเสมอ ไม่ดูดซับโมเลกุลชีวภาพ เช่น โปรตีน ในขณะที่เซลลูโลสในแผ่นกระดาษกรองมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) สามารถดูดซับสารได้ การดูดซับนี้จะขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารทำให้แถบหรือจุดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นหางยาวซึ่งมีผลลดประสิทธิภาพในการแยก แผ่นเซลลูโลสอะซิเตตมีหมู่ไฮดรอกซิลส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่อะซิเตต (acetate group) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ดูดซับสาร ทำให้ได้ผลที่ดีกว่าเมื่อใช้กระดาษกรองเป็นแผ่นตัวกลาง และการแยกเกิดขึ้นได้เร็วกว่าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ นอกจากนี้คุณสมบัติของเซลลูโลสอะซีเตตที่ไม่ดูดซับสารหรือดูดซับสารน้อยนี้ยังมีผลลดพื้นหลัง (background) หลังจากการย้อมสี (staining) ทำให้เพิ่มความไว ในการตรวจวัด ข้อดีของเซลลูโลส--อะซีเตต อีกข้อหนึ่งคือ เป็นสารโปร่งใสจึงช่วยในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรโฟโตมิทริ (spectrophotometry) และสามารถใช้สารละลายหลายชนิดในการชะล้างสารที่แยกออกมาจากเมมเบรนนั้นได้

การแยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น กรดอะมิโน เพพไทด์ นิวคลีโอไทด์ และไธออล (thiol) สามารถใช้แผ่นเซลลูโลสอะซีเตตโดยใช้วิธีเหมือนกับการทำอิเลคโทรโฟรีซิสแบบกระดาษทั้งบัฟเฟอร์ สภาวะต่างๆ และวิธีการตรวจวัดและลักษณะการทำเป็นแบบแนวนอน

2.1.3 อิเลคโทรโฟรีซิสแบบเจล

ตัวกลางค้ำจุนเจลมีหลายชนิด เช่น แป้ง พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) อะกาโรส (agarose) และอะกาโรส อะคริลาไมด์ (agarose acrylamide) เจลพวกนี้ถูกเคลือบเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นพลาสติกหรือแผ่นกระจก การใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลเหล่านี้จะให้ผลการแยกสารดีขึ้นโดยเฉพาะเมื่อใช้แยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก ทั้งนี้เนื่องจากตาข่ายร่างแหของเจลจะลดการแพร่และการแยกเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุล (molecular sieving) อิเลคโทรโฟริซิสแบบแป้งเจล (Starch Gel Electrophoresis) แป้งเป็นเม็ดเล็กๆ (granule) ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของอะมีโลส (amylose) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของหน่วยกลูโคส (glucose) ที่มีความยาวประมาณ 300 หน่วย แต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4-α-ไกลโคซิดิก (1,4-α-glycosidic bond) และอะมีโลเพกติน (amylopectin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของหน่วยกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-α-ไกลโคซิดิก แต่มีการแตกกิ่งก้านสาขาด้วยพันธะ 1,4-α-ไกลโคซิดิก เมื่อสารแขวนลอย (suspension) ของแป้งที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูงในน้ำหรือในบัฟเฟอร์ถูกความร้อนจะได้สารละลายที่ข้นหนืด ซึ่งถ้าปล่อยให้เย็นจะกลายเป็นเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ส่วนประกอบของเครื่องมือ

2.2.1 อ่างเก็บบัฟเฟอร์ (Gel chamber)

อ่างเก็บบัฟเฟอร์เป็นส่วนที่กักเก็บบัฟเฟอร์ในการทำอิเลคโทรโฟรีซิส ต้องเป็นส่วนที่สามารถทนต่างความร้อน สารเคมี และกระแสไฟฟ้าได้เป็นอย่างดี เนื่องการทำอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นจำเป็นที่จะต้องมีกระแสไฟฟ้าเข้ามาเกี่ยวข้อง ทนความเป็นกรด เบส ของสารละลายบัฟเฟอร์ได้ ระหว่างการให้กระแสไฟฟ้านั้นก็จะมีความร้อนเกิดขึ้น เพราะฉะนั้นวัสดุที่จะนำมาใช้เป็นส่วนของอ่างเก็บบัฟเฟอร์นั้นจะต้องมีคุณสมบัติดังกล่าว

2.2.1.1 วัสดุที่ใช้สร้างอ่างเก็บบัฟเฟอร์

2.2.1.1.1 พอลิเอทิลีน (Polyethylene, PE)

พอลิเอทิลีนมีชื่อย่อในวงการพลาสติกว่า PE เป็นพลาสติกที่มีการใช้งานมากที่สุดคือ 32% ของพลาสติกทั้งหมด โดยจะได้จากการพอลิเมอร ไรซ์แก๊สเอทีลีนจนกลายเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่มีโครงสร้างโมเลกุลได้ต่างๆกันคือ โครงสร้างแบบเชิงเส้น กับโครงสร้างแบบกิ่งก้านสาขา

การมีกิ่งก้านสาขาจะลดความสามารถในการเกิดผลึก ซึ่งมีผลไปถึงความหนาแน่นและสมบัติอื่นๆ ดังนั้น PE ที่ได้จึงมีสมบัติแตกต่างกัน โดย PE ที่กิ่งก้านสาขามาก จะมีความหนาแน่น, จุดหลอมเหลว, ความแข็งตึง (stiffness), ความแข็งของพื้นผิว (surface hardness) และจุดอ่อนตัว (softening point) ต่ำกว่า แต่จะยอมให้แก๊สหรือไอน้ำซึมผ่านได้มากกว่า ซึ่งสมบัติเหล่านี้ขึ้นกับการมีกิ่งก้านสาขาของโมเลกุล แต่สมบัติทางกายภาพอื่นๆ ยังต้องคำนึงถึงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและการกระจายน้ำหนักโมเลกุลอีกด้วย

PE เป็นฉนวนไฟฟ้าที่ดีเยี่ยม เพราะไม่มีขั้ว สมบัติต่างๆ เช่น ค่าคงที่ไดอิเลคทริก และเพาเวอร์แฟกเตอร์จะไม่ขึ้นกับอุณหภูมิและความถี่ของกระแสไฟฟ้าสลับ (แต่ค่าคงที่ไดอิเลคทริกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อความหนาแน่นเพิ่มขึ้น) ในทางเคมีอาจจัดว่า PE ว่าเป็นพาราฟิน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงเป็นวัสดุที่ค่อนข้างเฉื่อย เพราะไม่มีแรงดึงดูดพิเศษ เช่น พันธะไฮโดรเจนกับตัวทำละลาย และการมีผลึกทำให้ไม่ละลายในตัวทำละลายใด ๆ ที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 70°C จะบวมพองและละลายในตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอน หรือฮาโลจิเนตไฮโดรคาร์บอน เช่น โทลูอีน PE จะทนกรด ด่าง ได้ดี ใช้ทำภาชนะบรรจุกรดและด่าง ความทนทานต่อสารเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นสูงขึ้น PE มีจุดหลอมเหลวประมาณ 110°C และจุดอ่อนตัว 40-50°C จึงไม่ควรใช้งานที่อุณหภูมิสูง ไม่เหมาะจะใช้ในงานที่เกิดความร้อนสูง แต่สามารถที่จะใช้ในอุณหภูมิต่ำได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.1.2 พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP)

PP มีสมบัติเชิงกลที่ดี ได้แก่ ความแข็งแรง ความแข็งตึง และความทนความร้อน PP เปราะที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 0°C) และเสถียรภาพของ PP ต่อแสงอัลตราไวโอเลตและออกซิเจนต่ำกว่า PE ดังนั้น จึงไม่เหมาะใช้งานกลางแจ้งเนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้เปราะ แตกร้าว สีซีดจางได้ง่าย ก่อนนำ PP ไปใช้งานต้องใส่สารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) สารเพิ่มเสถียรภาพ UV และสารเพิ่มเสถียรภาพอื่นๆ จุดเด่นของ PP คือ มีสมบัติเชิงกลดีมาก เช่น มีความทนแรงดึงสูง มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า PE เหมาะกับงานอุณหภูมิสูง ทนอุณหภูมิน้ำเดือดได้ต่ำกว่า PE และยังใสกว่า PE อีกด้วย

การใช้งานของ PP งานฉีดแบบ ใช้ทำกล่องแบตเตอรี่ ถังน้ำมันในรถยนต์ กันชนรถยนต์ ลังใส่ขวด กระถางต้นไม้ ของเด็กเล่น ด้ามแปรงสีฟัน ฝาจุกพลาสติก เฟอร์นิเจอร์ เครื่องใช้ทางการแพทย์ เช่น กระบอกฉีดยาใช้ครั้งเดียวทิ้ง เป็นต้น งานเป่าฟิล์ม ที่ระบายความร้อนด้วยน้ำ ทำให้ได้ฟิล์มใส เนื่องจากเย็นตัวอย่างรวดเร็วจึงมีส่วนที่เป็นอสัณฐานมาก เกิดผลึกน้อย ทำให้ใส แต่ความแข็งแกร่งจะเสียไปบ้าง ใช้ทำพลาสติกหุ้มซองบุหรี่ ซองใส่เสื้อเชิ้ต ถุงร้อน ถุงเย็น งานเป่าฟิล์มที่ระบายความร้อนด้วยอากาศ จะค่อนข้างทึบแสง ขุ่นเล็กน้อย เนื่องจากโมเลกุลมีโอกาสจัดเรียงตัวได้มากกว่า จึงมีความแข็งแกร่งและความทนแรงดึงสูง

2.2.1.1.3 พอลิสไตรีน (Polystyrene, PS)

PS เป็นเทอร์โมพลาสติกชนิดหนึ่ง ได้จากการสังเคราะห์สไตรีนโมโนเมอร์ด้วยวิธีแบบรวมตัว (addition polymerization) ได้เป็นพอลิสไตรีนชนิดใช้งานทั่วไป การนำ PS มาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ได้รับความนิยม เนื่องจากขึ้นรูปง่าย และมีความใส ทำให้มองเห็นผลิตภัณฑ์ที่บรรจุได้ชัดเจน

PS มีความโปร่งใส แข็ง แต่เปราะ ไม่ดูดความชื้น ไม่นำไฟฟ้า เฉื่อยต่อสารเคมี ทนกรด ทนด่าง ผสมสีได้ง่าย ทนความร้อนได้ต่ำ และละลายได้ดีในตัวทำละลายอะโรมาติก เช่น เบนซีน และโทลูอีน จัดเป็นพลาสติกที่น้ำหนักเบาที่สุดในพลาสติกชนิดแข็ง สามารถเกิดเป็นโคพอลิเมอร์ได้ง่าย การใช้งาน มีลักษณะทั่วไป คือ ใส แข็ง และรักษารูปทรงได้ดี แต่เปราะ ถ้าถูกกระแทกอย่างแรงจะเกิดรอยแตกเป็นวงประกายสีรุ้งแวววาว PS ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส แต่ถ้าลนไฟจะติดอย่างช้าๆ มีควันเขม่าคลุ้งน่ากลัว เหมาะไปทำกล่องพลาสติก ตลับเทป ไม้บรรทัด ภาชนะใส่อาหาร และชิ้นส่วนรถยนต์

PS เป็นพลาสติกที่ไม่มีขั้ว จึงไม่ดูด ความชื้น ทำให้ไม่จำเป็นต้องอบเม็ดพลาสติกก่อนนำไปขึ้นรูป PS ถ้าใช้งานภายนอกต้องใส่สารเพิ่มความเสถียรภาพต่อแสงยูวี (UV stabilizer) มิฉะนั้นจะเปลี่ยนออกสีเหลืองและเกิดรอยแตกร้าวภายใน 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดอ่อนของ PS คือ ความเปราะ ทำให้มีการปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพขึ้น โดยการเติมยางบิวตะไดอีนลงไปช่วยเพิ่มความทนแรงกระแทกทั้งที่อุณหภูมิปกติและที่อุณหภูมิต่ำ วัสดุที่ได้จะเหนียว เหมาะกับงานที่ต้องรับแรงกระแทก แต่ความใสจะหายไป ขึ้นรูปได้ง่าย ทรงรูปได้ดี และเป็นโพลีเมอร์ที่ไม่มีขั้ว จึงไม่ทนสารเคมีบางประเภท เช่น เบนซีน โทลูอีน ไม่เหมาะกับการทำชิ้นงานที่ต้องสัมผัสกับตัวทำละลายเหล่านี้แต่จะมีข้อดี คือไม่ต้องอบเม็ดพลาสติกก่อนฉีดขึ้นรูป เหมาะสำหรับงานตู้เย็น เฟอร์นิเจอร์ ตู้โทรทัศน์ และวิทยุ

2.2.1.1.4 อะคริโลไนไตรด์ บิวตะไดอีน สไตรีนโคพอลิเมอร์

(Acrylonitrite Butadiene Styrene, ABS)

คือการนำ PS มาทำโคพอลิเมอร์กับอะคริโลไนไตรด์ก่อนแต่ก็ยังไม่ยืดหยุ่นพอ เลยเติมบิวตะไดอีนลงไปอีก มีสมบัติโดยรวมคือ ขึ้นรูปได้ง่าย มีความเงามัน มีความแกร่ง มีความต้านทานการขัดถู ทนแรงกระแทก ทนสารเคมีและความร้อนได้สูง ปัจจุบัน นิยมนำ เอบีเอสไปผสมสีให้มีสีสันสวยงาม สมบัติเด่นคือทนต่อการแตกหัก เมื่อชิ้นงานหักจะไม่เกิดความคม รวมทั้งมีความเงามันสูง และมีสีสันสวยงาม ทนความร้อน สามารถชุบโลหะได้ หน่วงการติดไฟได้ดี ความเงามันสูง ทนแรงกระแทกได้ และทนต่อสารเคมีโดยมีสัดส่วนของสารเคมีดังนี้ acrylonitrile ร้อยละ 20-30 , butadiene ร้อยละ 6-35, styrene ร้อยละ 45-70 โดยที่สมบัตินั้นจะขึ้นกับว่ามีสารเคมีตัวใดมากน้อยแค่ไหน styrene เป็นตัวที่ไม่มีขั้ว จึงทนกับสารเคมีที่ขั้วได้ดี acrylonitrile มีขั้ว เติมลงไปแล้ว ABS จะทนสารเคมีที่ไม่มีขั้วได้ดี ทนอุณหภูมิสูงได้ butadiene จะเหนียวและทนแรงกระแทกสมบัติที่สำคัญของ ABS ทนแรงกระแทกสูง ทนอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการอ่อนตัวได้สูง (80-90 °C) เนื่องจากเป็นสารโคพอลิเมอร์จึงไม่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอน

2.2.1.1.5 พอลิคาร์โบเนต (Polycarbonate, PC)

สมบัติของ PC ทนแรงกระแทกสูงสุด(เหนียว) เกิดจากมีออกซิเจนในโครงสร้างดูดซึมน้ำต่ำ ทำให้ความคงรูปดี ทำให้ใสได้ดี ทนแรงกระแทกได้สูงสุด หลอมเหลวยากเพราะ PC เกิด hydrogen bond ระหว่างโมเลกุลได้ ทำให้ขึ้นรูปยาก แล้วยังมีความหนืดสูงด้วยถูก UV จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเริ่มเปราะ ทนสารเคมีและพวกที่มีคลอรีนได้ไม่ดี

2.2.1.1.6 โพลีเมทิลเมตาคริเลท (Polymethymetacrylate, PMMA) หรืออะคริลิก(acrylics)

เป็นพลาสติกที่มีความใสมาก, มีความทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศกลางแจ้งได้ดีเยี่ยม แข็ง มีพื้นผิวเงามัน มีสมบัติทางไฟฟ้าดีเยี่ยม มีความทนทานสารเคมีปานกลาง นอกจากนี้ยังสามารถทำให้มีสีสดใสและโปร่งแสงได้ นิยมนำมาทำ ป้ายโฆษณา กระจกไฟรถยนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ระบบสร้างสนามไฟฟ้า

2.2.2.1 ระบบจ่ายไฟฟ้า (อาภัสรา, 2537)

เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่มีสนามไฟฟ้าเข้ามาเกี่ยวข้องเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ต้องให้สารที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางภายในสนามไฟฟ้าเนื่องจากสารที่ใช้แยกนั้นเป็นสารที่มีประจุไฟฟ้า

แรงไฟฟ้า (F) เป็นผลมาจากประจุสุทธิของอนุภาค (q) และความต่างศักย์ไฟฟ้า (E) หรือเกรเดียนต์ของความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential gradient) โดยเขียนเป็นสมการได้

$$F = Eq \qquad (1)$$

แรงเสียดทานของตัวกลาง (F') ขึ้นกับขนาดและรูปร่างของอนุภาครวมทั้งความหนืด (viscocity) ของสารละลายมีค่าเท่ากับ

$$F' = 6\pi rnv \qquad (2)$$

เมื่อ r = รัศมีของอนุภาคที่มีรูปร่างกลม

n = ความหนืดของสารละลาย

v = ความเร็วของการเคลื่อนที่ผ่านสารละลายที่มีความหนืดในสนามไฟฟ้า

เนื่องจาก $F = F'$

จะได้

$$Eq = 6\pi rnv \qquad (3)$$

$$v = Eq/6\pi rn \qquad (4)$$

Electrophoretic mobility (m) หมายถึงระยะทาง (d) ของการเคลื่อนที่ของอนุภาคต่อหน่วยเวลา (t) และหน่วยความต่างศักย์ไฟฟ้า

$$m = d/tE \quad \text{หรือ} \quad m = v/E \qquad (5)$$

เพราะฉะนั้นจะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$m = q/6\pi\eta rn \qquad (6)$$

จะเห็นได้ว่าค่า m เพิ่มขึ้นเมื่อ q เพิ่มขึ้น แต่เมื่อขนาดของอนุภาคและความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่า m จะลดลง และเมื่อมีค่าเป็นศูนย์เมื่ออนุภาคไม่มีประจุ

ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าเท่ากับอัตราส่วนระหว่างความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้า (current density หรือ J) ต่อการนำไฟฟ้าจำเพาะ (specific conductivity หรือ k) เพราะฉะนั้นความเร็วของการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุจะมีค่าเป็น

$$v = Em = mJ/k \qquad (7)$$

จากสมการที่ (3) สามารถบอกได้ว่ากระแสไฟฟ้าจะมีผลต่อความเร็วของการแยกขนาดของสารตัวอย่างในสารตัวกลาง ระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวกลางจะแปรผันตามค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าถ้าให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น อัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวกลางก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย ในกรณีที่ความหนืดของเจลและใช้อนุภาคตัวเดียวกัน

2.2.2.2. ขั้วไฟฟ้า

ขั้วไฟฟ้าแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ทำหน้าที่รับกระแสไฟฟ้าจากชุดจ่ายกระแสไฟฟ้ายึดติดอยู่กับอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์เรียกว่าขั้วต่อกระแสไฟฟ้า อีกส่วนหนึ่งทำหน้าที่เชื่อมต่อกระแสไฟฟ้าจากส่วนแรกไปสู่สารละลายบัฟเฟอร์เพื่อเป็นขั้วของสนามไฟฟ้า เพื่อใช้ในการแยกสารตัวอย่างเรียกว่าอิเลคโทรด คุณสมบัติของวัสดุที่จะนำมาใช้เป็นขั้วไฟฟ้านั้นจะต้องเป็นโลหะนำไฟฟ้า ไม่เกิดการออกซิไดซ์ได้ง่าย ทนต่อสารเคมี ระหว่างการทำอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นจะเกิดความร้อนที่มาจากการให้กระแสไฟฟ้าผ่านทางขั้วไฟฟ้า ซึ่งความร้อนนี้จะมีผลต่อเจลและวัสดุที่ใช้ในการสร้างอ่างเก็บบัฟเฟอร์

2.3 ระบบการทำงานของอิเลคโทรโฟรีซิส

2.3.1 อะกาโรสเจล อิเลคโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเป็นคอลลอยด์ธรรมชาติที่ได้จากการสกัดมาจากสาหร่ายทะเล เตรียมได้ง่ายและไม่เป็นอันตราย อะกาโรสเจลจะมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่และใช้แยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ (ขนาดประมาณ 200 kDa) การทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นจะทำได้สะดวกและง่ายกว่าการทำพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแต่ผลที่ได้จะด้อยกว่า แถบที่ได้จากการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นจะไม่ชัดเจนและกระจายออกมากกว่าพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส เพราะขนาดของรูพรุนมีขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะกาโรสเป็นโพลีแซ็คคาไรด์เส้นตรงที่มีโมเลกุลเฉลี่ย 12000 โมเลกุล ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า อะกาโรไบโอส (Agarobiose) ประกอบด้วย กาแล็คโตส (galactose) สลับกับ 3, 6 แอนไฮโดรกาแล็คโตส (3, 6 anhydrogalactose) โดยทั่วไปจะใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 – 3

2.3.2 ชนิดของอะกาโรส

อะกาโรสที่ใช้ในการทำอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นมีหลายชนิด แต่ไม่สามารถที่จะใช้ได้ทุกชนิด อะกาโรสที่เหมาะสมในการทำอิเลคโทรโฟรีซิสของกรดนิวคลีอิก จะต้องมีค่าอิเลคโทรเอนโดโม--ซิสต่ำ ซึ่งเจลจะมีลักษณะแข็ง โปร่งใส นอกจากนี้อะกาโรสที่ใช้นั้นยังต้องบริสุทธิ์ปราศจากเอ็นไซม์ไลเกส และ เอนโดนิวคลีเอส

2.3..2 ความเข้มข้นของอะกาโรส

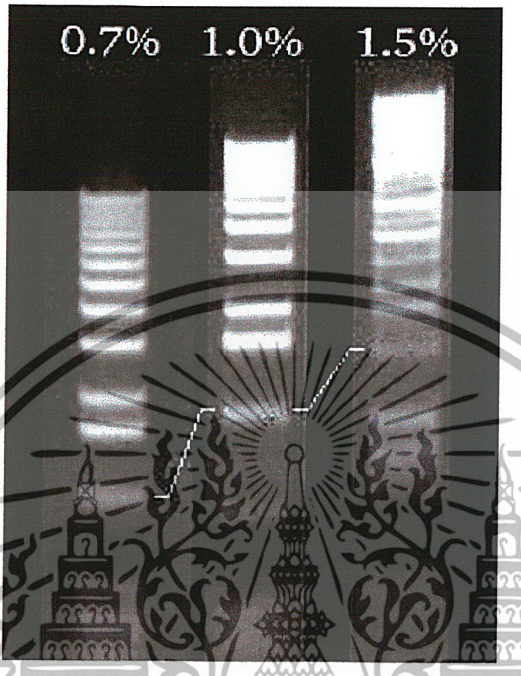
ในการแยกดีเอ็นเอนั้นจะใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันเพราะความเข้มข้นของอะกาโรสนั้นจะมีผลต่อรูพรุนของเจล ถ้าใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสสูงจะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ส่วนความเข้มข้น อะกาโรสต่ำจะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ (ที่มา : Bio-Rad Laboratory, 2000)

ความเข้มข้นอะกาโรส (%)	ขนาดดีเอ็นเอ (Kb)
0.50	1-30
0.75	0.8-12
1.00	0.5-10
1.25	0.4-7
1.50	0.2-3
2-5	0.01-0.5

ความเข้มข้นของอะกาโรสนั้นเมื่อมีความเข้มข้นสูงดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้น้อยกว่าความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำดังรูปที่ 2.1 เมื่อใช้ดีเอ็นเอขนาด 1000 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่2.1 แสดงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.7, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยสนามไฟฟ้าที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 5 v/cm นาน 60 นาที (ที่มา : http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html)

2.3.3 ชนิดของบัฟเฟอร์

โดยทั่วไปบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอนั้นมีสองชนิดคือ TAE (Tris-acetate-EDTA) and TBE (Tris-borate-EDTA) จะใช้ร่วมกับการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสในแนวนอน ดีเอ็นเอจะมีอัตราการแยกต่างกันในบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดเนื่องจากมีค่าไอออนิคสเตรงคท์ (ionic strength) ของบัฟเฟอร์จะไม่แน่นอน แต่จะกำหนดให้เหมาะสมต่อการแยกของดีเอ็นเอ

เนื่องจากบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง ถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง จะมีค่าไอออนิคเสตรงคท์สูง จะมีความต้านทานไฟฟ้าต่ำลง ทำให้ได้กระแสไฟฟ้าที่ที่สูงกว่าที่ความต่างศักย์ที่ใช้และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้น แต่จะได้แถบของสารตัวอย่างที่ชัดเจนขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. ไม้อัด
2. แผ่นพลาสติก ABS
3. แผ่นพลาสติกอะคริลิก
4. หม้อแปลงไฟฟ้าขนาด 24 V 1 แอมป์
5. ไดโอด
6. ตัวเก็บประจุ
7. ลวดโลหะเงินผสม, ลวดโลหะทองเหลือง
8. ขั้วโลหะทองเหลือง
9. แผ่นเขียนวงจร
10. เจลเมกเกอร์เพลท
11. เจลโคม
12. ปากคีบ
13. โวลท์มิเตอร์
14. ตะกั่วบัดกรี
15. หัวแร้งบัดกรี
16. ตะปู
17. กระดาษทราย
18. เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส Phamacia Biotech GNA 100

3.1.2 สารเคมี

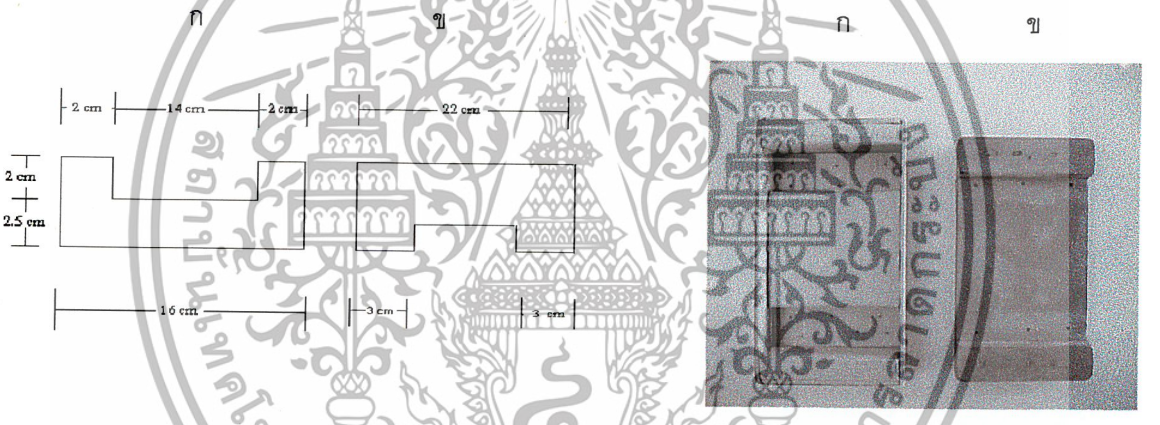
1. อะกาโรส
2. เอธิเดียมโบรไมด์
3. บัฟเฟอร์ 5x TBE (ภาคผนวก)
4. ดีเอ็นเอ แลมดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การสร้างอ่างเก็บบัฟเฟอร์

3.2.1 การออกแบบอ่างเก็บบัฟเฟอร์

การออกแบบอ่างเก็บบัฟเฟอร์นั้นได้ออกแบบของอ่างเก็บบัฟเฟอร์มีขนาดยาวกว่าเพื่อให้สามารถใช้กับเจลที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถที่จะใส่สารตัวอย่างได้มากในการทดลองแต่ละครั้ง หรือในกรณีที่ต้องการเพิ่มระยะทางในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างที่ใช้แยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร เช่นกรณีการแยกของดีเอ็นเอจากโครโมโซมในการทดลองได้ใช้ไม้อัดมาประกอบเพื่อเป็น โมเดลสำหรับการขึ้นรูปพลาสติก ทั้งนี้ได้ออกแบบแม่แบบ 2 แบบเพื่อให้เหมาะสมกับการขึ้นรูปพลาสติกในแต่ละชนิด แบบ ก จะใช้กับพลาสติกที่มีความยืดหยุ่นสูง สามารถขึ้นรูปได้ง่าย ส่วนแบบ ข จะใช้กับพลาสติกที่มีความยืดหยุ่นต่ำกว่า ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแบบที่เตรียมสำหรับการขึ้นรูปอ่างเก็บบัฟเฟอร์ทั้ง 2 แบบ

3.2.2 การเลือกวัสดุทำอ่างเก็บบัฟเฟอร์

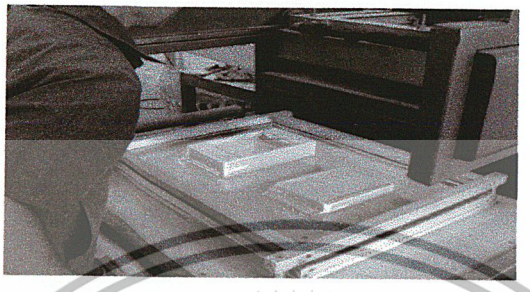
พลาสติกที่นำมาใช้ในการขึ้นรูปได้คัดเลือกตามลักษณะและคุณสมบัติที่ดีหลายประการคือ เป็นพลาสติกที่มีความทนทานรับแรงกระแทกได้สูง ทนความร้อนได้ดี และสามารถทนสารเคมีได้ทั้งกรด และ เบส อีกทั้งยังเป็นฉนวนไฟฟ้าไม่สามารถที่จะนำไฟฟ้าได้ จากการศึกษาได้เลือก ABS และ อะคริลิค มาใช้สำหรับการขึ้นรูปอ่างเก็บบัฟเฟอร์ เนื่องจากหาซื้อได้ตามท้องตลาด

3.2.3 การขึ้นรูปอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์

การขึ้นรูปพลาสติกนั้นเป็นกระบวนการที่ให้ความร้อนแก่แผ่นพลาสติกที่ต้องการให้เกิดการอ่อนตัว ซึ่งความร้อนที่ทำให้พลาสติกอ่อนตัวนั้นอยู่ที่ประมาณ 350°C ประมาณ 5 นาที จนกระทั่งพลาสติกที่เตรียมเริ่มอ่อนตัวดังรูปที่ 3.2 จึงกดแผ่นพลาสติกที่อ่อนตัวลงบนแม่แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก และ ข แล้วปล่อยให้พลาสติกเย็นลง สังเกตพลาสติกที่ได้หลังจากการขึ้นรูป และคัดเลือกสำหรับใช้ทำอ่างเก็บบัฟเฟอร์ แล้วทำการตัดและตกแต่งอ่างเก็บบัฟเฟอร์ให้ได้ขนาดตามต้องการ



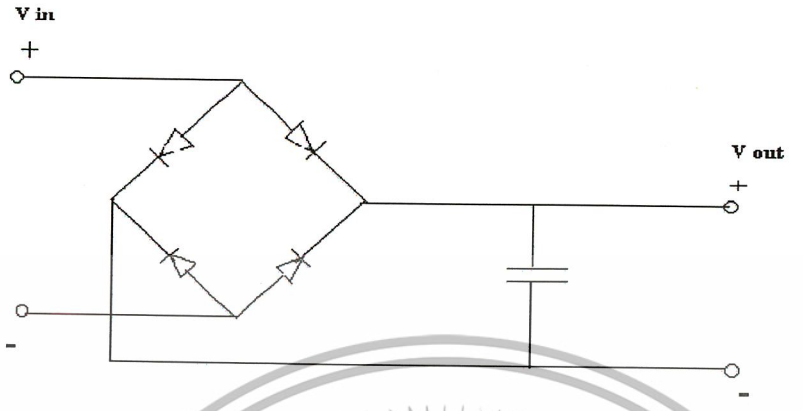
รูปที่ 3.2 แสดงการขึ้นรูปอ่างเก็บบัฟเฟอร์

3.3 การสร้างส่วนสร้างสนามไฟฟ้า

3.3.1 ชุดจ่ายกระแสไฟฟ้า

ส่วนกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นเป็นกระแสตรง เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่ใช้อยู่ทั่วไปเป็นไฟฟ้ากระแสสลับมีความต่างศักย์ขนาด 220 V จึงจำเป็นที่จะต้องแปลงกระแสไฟฟ้าให้เหมาะสมต่อการทำอิเลคโทรโฟรีซิส ด้วยหม้อแปลงขนาด 24 V 1 แอมป์ กระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการทำอิเลคโทรโฟรีซิสคือไฟฟ้ากระแสตรงที่มีความต่างศักย์ที่อยู่ในช่วง 50 ถึง 100 V จึงได้ออกแบบส่วนกระแสไฟฟ้า โดยใช้ไดโอดขนาด 3 แอมป์ และตัวเก็บประจุขนาด 10000 μF 100 V ต่อรวมกันตามวงจรดังรูป กระแสไฟฟ้าที่จ่ายออกมานั้นเป็นกระแสตรง โดยกระไฟฟ้าที่ได้นั้นจะทำการต่อออกจากชุดให้กระแสไฟฟ้าเข้าสู่ขั้วอิเลคโทรด ผ่านขั้วส่งกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ส่วนสารละลายบัฟเฟอร์ที่อยู่ในอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์อีกทีหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3. 3 วงจรไฟฟ้าที่แปลงไฟฟ้าให้เหมาะสมกับการทำอิเลคโทรโฟรีซิส (สามเหลี่ยมแทนไดโอด, เส้นขนานแทนด้วยตัวเก็บประจุ เมื่อ V_m เท่ากับ 48 V)

3.3.2 ขั้วไฟฟ้า

ในการทดลองนี้ใช้ทองเหลืองเป็นขั้วไฟฟ้า ได้จากการนำทองเหลืองเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. มากลึงให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm เป็นขั้วไฟฟ้านำไฟฟ้าจากชุดจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ระบบส่วนขั้ววัสดุที่นำกระแสไฟฟ้าลงสู่สารละลายบัฟเฟอร์ได้ทดลองใช้ลวดทองเหลืองและโลหะเงินผสม เชื่อมต่อกับโลหะทองเหลืองนำไฟฟ้าในช่วงแรก เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของวัสดุทั้ง 2 ชนิด ตรวจสอบความต่างศักย์ของขั้วทั้งสองหลังจ่ายกระแสไฟฟ้าจากชุดจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ประกอบขึ้น

3.4 การทดสอบการทำงานของอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

นำอ่างเก็บบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.2.1 และติดขั้วไฟฟ้าจากข้อ 3.2.2 แรกมาต่อรวมกับชุดให้กระแสไฟฟ้าทดสอบการทำงานของชุดเครื่องมือโดยใช้ความเข้มข้น ร้อยละ 1 แล้วศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องโดยดูจากแถบการแยกของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ

3.4.1 การเตรียมเจล

ใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 ละลายในบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่า (ภาคผนวก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรซึ่งมีส่วนผสมของเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเพื่อละลาย อะกาโรส จากนั้นเทเจลลงในเจลเมกเกอร์เพลทที่เตรียมไว้แล้ว รอให้เจลคงรูป ดังรูปที่ 3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การใส่สารตัวอย่าง

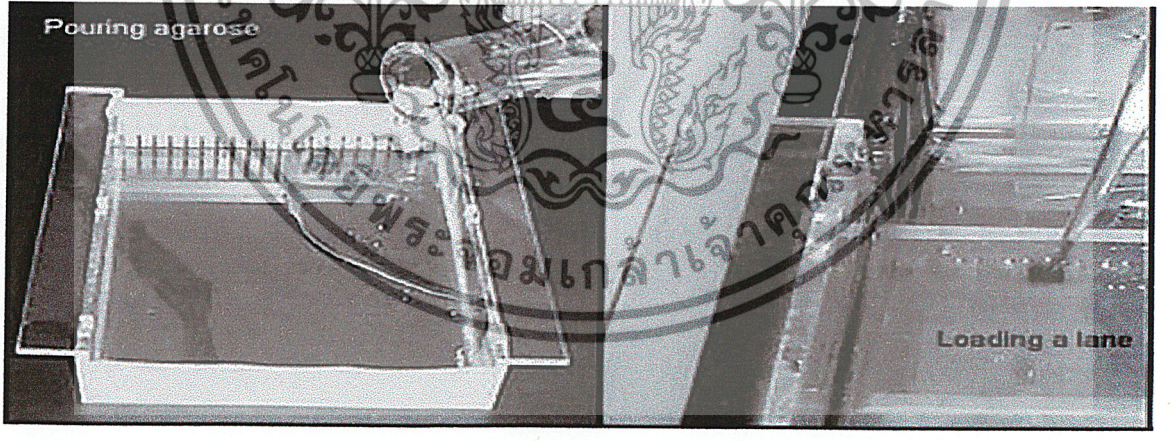
การใส่สารตัวอย่างลงในเจลนั้นจะใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่างที่เกิดจากหวีในเจลเมกเกอร์เพลท โดยสารตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ ดีเอ็นเอ λ ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I ความเข้มข้น 0.1 µg/µl (ภาคผนวก) ปริมาตร 6 µl หยดลงในช่องใสสาร

3.4.3 การทดลองเครื่องและเริ่มให้กระแสไฟฟ้า

เมื่อใส่สารตัวอย่างลงไปในช่องใส่สารตัวอย่างแล้ว จึงเริ่มให้กระแสไฟฟ้าเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส เนื่องจากดีเอ็นเอไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอโดยสังเกตุจากสีย้อมขนาดเล็ก (Xylene Cyanol) ใช้โวลท์มิเตอร์ตรวจสอบความต่างศักย์ บันทึกเวลา ความต่างศักย์และระยะทางการเคลื่อนที่ของสีย้อมขนาดเล็กในอ่างเก็บบัฟเฟอร์ซึ่งมีขั้วโลหะเงินผสมและทองเหลือง เป็นระยะทาง 4 cm

3.4.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

การตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโทรโฟรีซิสสามารถทำได้ นำเจลที่ได้จากข้อ 3.3.3 มาตรวจสอบโดยไปส่องดูกับรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์ที่จับอยู่กับดีเอ็นเอนั้นสามารถเรืองแสงได้ภายใต้รังสี UV จึงสามารถตรวจสอบ และบันทึกภาพโดยใช้เครื่อง Syngene Digital Imagine Station รุ่น genegenius บริษัท syngene



รูปที่ 3.4 แสดงการเตรียมอะการโรสเจลสำหรับอิเลคโทรโฟรีซิสและใส่สารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การสร้างอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์

4.1.1 การออกแบบอ่างเก็บสารละลาย

การออกแบบอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์ลักษณะนี้ สามารถที่ใช้เจลที่มีขนาดใหญ่ใช้สำหรับงานที่ต้องการระยะทางในการแยกมากกว่าปรกติและสามารถที่จะใส่สารตัวอย่างได้มากกว่าเดิมในแต่ละครั้ง โดยปริมาณบัฟเฟอร์ที่ใช้นั้นใกล้เคียงกับเครื่องมาตรฐานซึ่งในอ่างเก็บบัฟเฟอร์นี้จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 400 มิลลิลิตร เมื่อใช้ความหนาของเจล 1 เซนติเมตร

4.1.2 การใช้วัสดุในการสร้างอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์

วัสดุที่ ใช้คือพลาสติก ABS และ พลาสติกอะคริลิก ทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติที่คล้ายกัน เป็นพลาสติกที่มีความทนทานแข็งแรง ทนต่อแรงกระแทกสูง สามารถทนต่อกระแสไฟฟ้าได้เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นฉนวนไฟฟ้า และสามารถทนต่อความร้อนได้สูงประมาณ 220°C และทนต่อสารเคมีที่เป็นทั้งกรดและเบสเนื่องจากวัสดุทั้ง 2 ชนิดเป็นวัสดุที่ไม่มีขั้วจึงไม่เกิดปฏิกิริยากับสารเคมีที่มีขั้ว จะแตกต่างกันตรงที่พลาสติก ABS มีความยืดหยุ่นมากกว่าพลาสติกอะคริลิก แต่มีสีขาวขุ่น ส่วนอะคริลิกเป็นพลาสติกที่มีความใสมาก จะทำให้สามารถตรวจการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้โดยตรง เมื่อวางอ่างเก็บบัฟเฟอร์เหนือแหล่งกำเนิดแสง UV

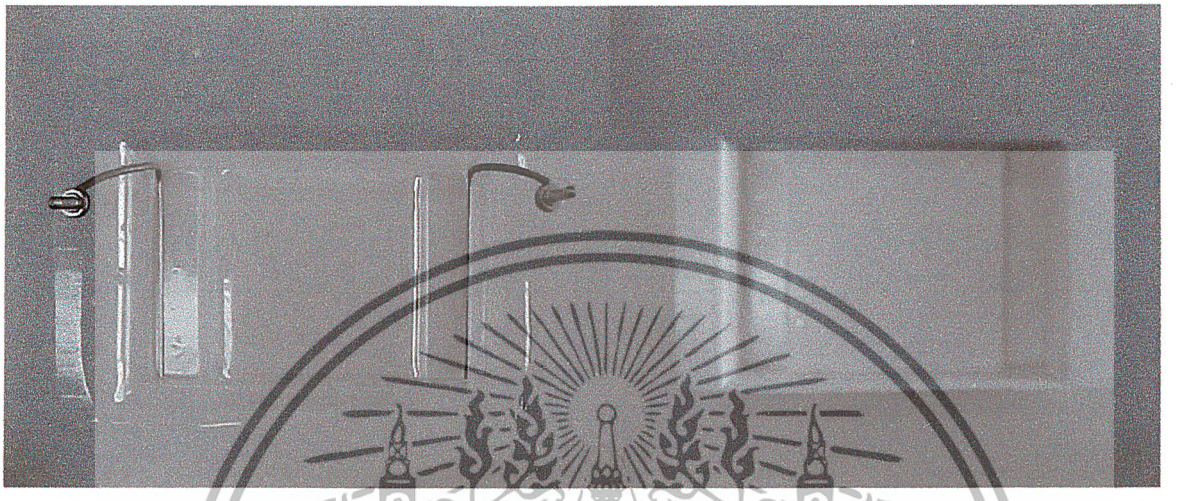
4.1.3 การขึ้นรูปอ่างเก็บสารละลายบัฟเฟอร์

ในการขึ้นรูปอ่างเก็บบัฟเฟอร์นั้นเมื่อนำ ABS มาผ่านกระบวนการให้ความร้อนและกดลงไปบนแบบที่เตรียมไว้ สามารถให้พลาสติกตามแบบที่ต้องการแต่เนื่องจากคุณสมบัติของพลาสติก ABS เป็นพลาสติกที่มีความยืดหยุ่นสูง เมื่อโดนความร้อนแล้วจะสามารถยืดออกทำให้ของพลาสติกบางลงจึงมีโอกาสที่จะเสียหายได้ง่าย

พลาสติกอะคริลิกนั้นเป็นพลาสติกที่มีความแข็งและมีความยืดหยุ่นปานกลางเมื่อผ่านความร้อนแล้วกดลงตามแบบที่ต้องการพลาสติกอะคริลิกจะมีการอ่อนตัวน้อยกว่าแผ่น ABS แต่เมื่อกดลงบนแบบ แผ่นพลาสติกอะคริลิกจะยังคงความหนาของแผ่น เนื่องจากมีความยืดหยุ่นน้อย แม้ว่าแผ่นพลาสติกที่ได้จากการกดลงบนแบบจะไม่เหมือนกับแบบที่สร้างขึ้นมากนัก เนื่องจากพลาสติกมีความยืดหยุ่นน้อย แต่รูปทรงที่ได้มีความแข็งแรงกว่า จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นอ่างเก็บบัฟเฟอร์ดังนั้นการออกแบบแม่แบบที่เหมาะสมกับคุณสมบัติของพลาสติกน่าจะมีส่วนให้ได้อ่างเก็บสารละลาย บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม รูปทรงที่มีความแข็งแรงเหมาะสมกับการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47314



ก ข

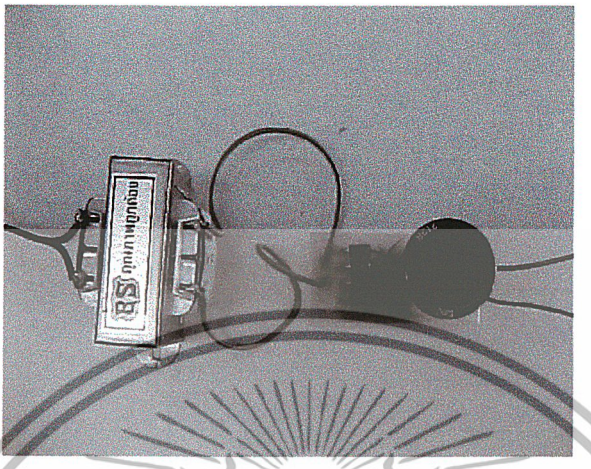
รูปที่ 4.1 อ่างเก็บบัฟเฟอร์ที่ได้จากพลาสติกอะคริลิก (ก) และพลาสติก ABS (ข)

4.2 กระแสไฟฟ้า

4.2.1 ระบบจ่ายกระแสไฟฟ้า

ระบบจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ออกแบบมานั้น จากที่กล่าวมาแล้วคือกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการทำอิเลคโทรโฟรีซิสจะเป็นไฟฟ้ากระแสตรงอยู่ในช่วง 50 ถึง 100 V มีความต่างศักย์ เมื่อทำการต่อวงจรไฟฟ้าตามที่ได้รับการออกแบบมา นำไปวัดด้วยโวลท์มิเตอร์ พบว่าให้กระแสตรงความต่างศักย์ 65 V ซึ่งเหมาะสมกับการทำอิเลคโทรโฟรีซิส เมื่อวัดค่าความต่างศักย์ในสารละลายบัฟเฟอร์ ณ ตำแหน่งเหนือขั้วอิเลคโทรดระหว่างการทำอิเลคโทรโฟรีซิสค่าที่วัดได้มีค่าคงที่ตลอดการทดลองเครื่องคือ 56 V

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข ค

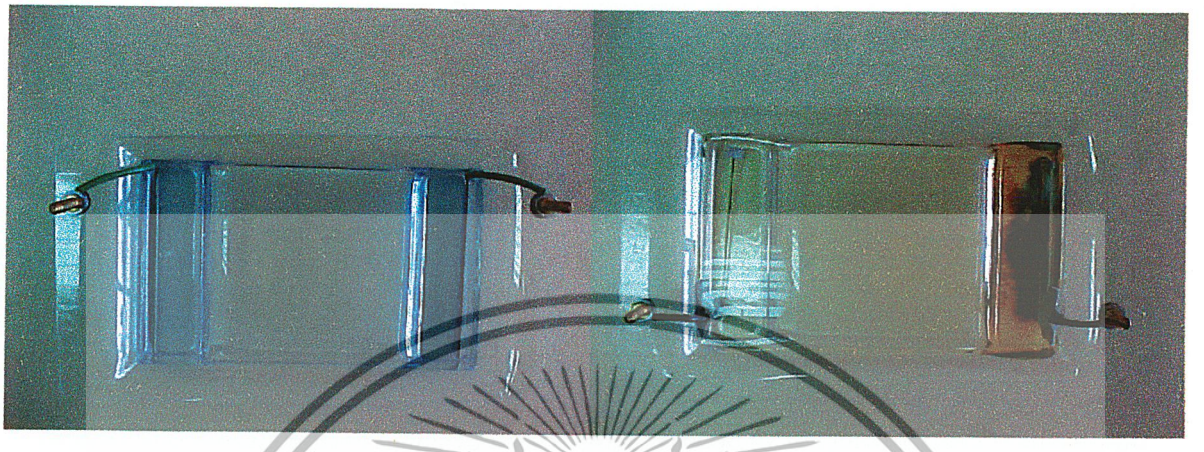
รูปที่ 4.2 แสดงส่วนประกอบชุดจ่ายกระแสไฟฟ้า (ก) หม้อแปลง 24 V 1 แอมป์, (ข) ไดโอด, (ค) ตัวเก็บประจุขนาด 10,000 μF

4.2.2 ขั้วไฟฟ้า

ส่วนของขั้วไฟฟ้าที่ใช้โลหะทองเหลืองและโลหะเงินผสมนั้นสามารถที่จะนำไฟฟ้าได้ดี เนื่องจากสามารถเชื่อมต่อกระแสไฟฟ้าจากชุดจ่ายกระแสไฟฟ้าและนำไฟฟ้าลงสู่สารละลายบัฟเฟอร์ได้มีผลให้สามารถแยกดีเอ็นเอสารตัวอย่างได้

ในการทำอิเลคโทรโฟรีซิสนั้นจะเกิดตะกอนภายในสารละลายบัฟเฟอร์เกาะอยู่บริเวณขั้วแอโนดหรือขั้วบวก โดยเมื่อใช้โลหะทองเหลืองเป็นขั้วไฟฟ้าตะกอนที่เกิดเป็นตะกอนสีเขียวอมฟ้า และเมื่อใช้โลหะเงินผสมเป็นขั้วไฟฟ้าจะเกิดตะกอนสีขาวและสีเขียวดังรูปที่ 4.3 ตะกอนที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากโลหะนำไฟฟ้าที่ใช้เป็นขั้วไฟฟ้านั้น คือโลหะทองเหลืองและโลหะเงินผสม อาจมีความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้าที่ใช้ไม่เพียงพอ จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์ของโลหะทำให้เกิดตะกอน อาจจะใช้โลหะนำไฟฟ้าชนิดอื่นที่มีความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้าเพียงพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



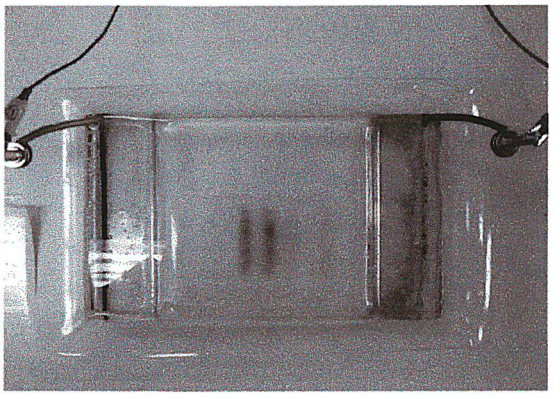
ก ข

รูปที่ 4.3 ตะกอนที่เกิดจากทองเหลือง (ก) และโลหะเงิน (ข)

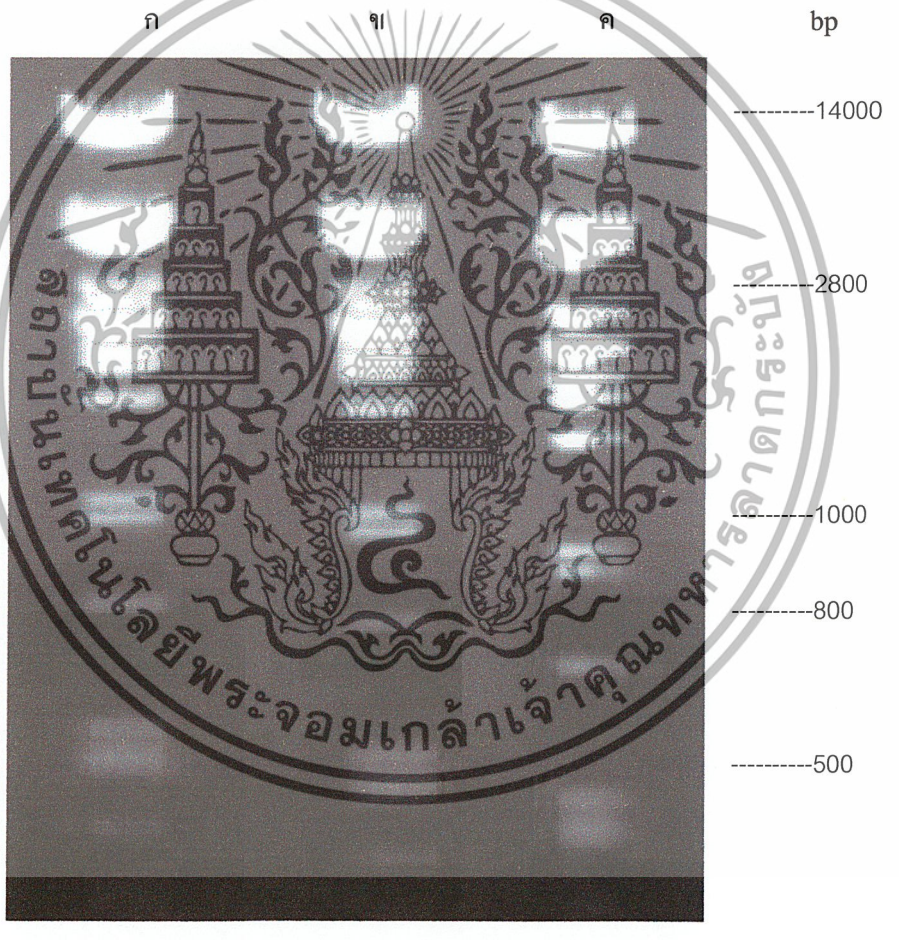
4.3 การทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

การทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 1 ในชุดเครื่องมือที่ได้จากการทดลองหลังจากจ่ายกระแสไฟฟ้าให้กับชุดทดลองจนกระทั่งสีย้อมขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้ประมาณ 4 ซม. ดังรูปที่ 4.4 แล้วจึงนำเจลที่ได้ไปตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้รังสี UV พบว่าชุดอุปกรณ์จากขั้วไฟฟ้าที่เป็นทองเหลืองและเงิน สามารถที่จะแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆให้เห็นได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 4.5 ในการทดลองความต่างศักย์ไฟฟ้าในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ขั้วไฟฟ้าคงที่ตลอดการทดลอง จึงอาจกล่าวได้ว่าชนิดของขั้วไฟฟ้าไม่มีผลต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าในการแยก และเมื่อดูเวลาเฉลี่ยในการแยกสารตัวอย่าง ทองเหลืองมีประสิทธิภาพในการแยกมากกว่าเงินมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง 15.25 นาทีต่อเซนติเมตร ซึ่งโลหะเงินมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง 16.5 นาทีต่อเซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องมาตรฐานแล้วแถบของสารตัวอย่างใกล้เคียงกับแถบของสารตัวอย่างที่ได้จากเครื่องมาตรฐานดังรูปที่ 4.5 แสดงว่าประสิทธิภาพของเครื่องอิเลคโทรโฟรีซิสเครื่องนี้อยู่ในเกณฑ์ไม่แตกต่างจากเครื่องที่ขายเป็นการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.4 แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบกับแถบสารตัวอย่างที่ได้จากอ่างเก็บบัฟเฟอร์ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าจากเครื่องมาตรฐาน (ก) ทองเหลือง (ข) เงิน (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.1 การเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างของโลหะเงินและทองเหลืองที่ความต่างศักย์ 56 V ตลอดการทดลอง

ระยะทาง (cm)	1		2		3		4	
ชนิดขั้วไฟฟ้า	เงิน	ทองเหลือง	เงิน	ทองเหลือง	เงิน	ทองเหลือง	เงิน	ทองเหลือง
ระยะเวลา (นาที)	15	15	33	31	49	46	66	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง วัสดุที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการสร้างเครื่องอิเลคโทรโฟรีซิสคือแผ่นพลาสติกอะคริลิกความหนาขนาด 2 มม. สามารถขึ้นรูปอ่างเก็บบัฟเฟอร์ได้ตามที่ต้องการและมีความทนทานต่อสารเคมี ความร้อนได้ดีมากจึงเหมาะสมอย่างยิ่งและเนื่องจาก เป็นพลาสติกที่มีความใส โปร่งแสงจึงเป็นการง่ายในการตรวจสอบด้วยแสง UV

ไฟฟ้ากระแสตรงที่ได้อยู่ในระดับมาตรฐานในการทำอิเลคโทรโฟรีซิสคือ มีความต่างศักย์ 65 V สามารถแยกแถบของดีเอ็นเอออกจากกันได้ดีระดับหนึ่งใช้เวลาในการแยกประมาณ 1 ชั่วโมง แต่ชุดอุปกรณ์ที่ได้ยังไม่สามารถที่จะควบคุมความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต้องการได้เกิดจากใช้หม้อแปลงที่ให้ค่าความต่างศักย์เพียงค่าเดียว อาจแก้ไขโดยการเปลี่ยนเป็นหม้อแปลงที่ให้ค่าความต่างศักย์ได้หลายค่า แนวทางการพัฒนาแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้าที่สามารถปรับความต่างศักย์ได้ เพื่อให้สามารถใช้กับสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดได้อย่างเหมาะสมหน้าจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของชุดเครื่องมือนี้

ในขณะทำอิเลคโทรโฟรีซิสจะที่ปรากฏตะกอนที่ขั้วบวกในบัฟเฟอร์ อาจเกิดมาจากอิออนที่อยู่ภายในบัฟเฟอร์ไปเกาะรวมตัวกันโดยกระแสไฟฟ้าเป็นตัวผลักดัน หรืออาจจะเป็นอิออนจากขั้วอิเล็คโทรดทั้ง 2 ข้างของเครื่องหลุดออกมาโดยกระแสไฟฟ้าเพราะความต้านทานกระแสไฟฟ้าของขั้วทั้งสองชนิดไม่เพียงพอจึงทำให้อิออนของขั้วไฟฟ้าออกมาเกาะที่ขั้วบวกของเครื่องอาจจะทำให้กระแสไฟฟ้าที่ไปสู่ขั้วแอโนดหรือขั้วบวกนั้นลดน้อยลงเพราะการขัดขวางของตะกอน อาจจะใช้วิธีการแก้ไขโดยใช้โลหะนำไฟฟ้าที่มีความต้านทานต่อกระไฟฟ้าขนาดที่ต้องการ แต่โลหะนำไฟฟ้าที่มีความต้านทานไฟฟ้าสูงค่อนข้างที่จะมีราคาแพง

จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเราสามารถประกอบเครื่องอะกาโรสอิเลคโทรโฟรีซิสจากการใช้วัสดุที่หาได้สะดวกในประเทศ ซึ่งชุดเครื่องมือที่ได้มีประสิทธิภาพในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ใกล้เคียงกับเครื่องที่ขายเป็นการค้า แต่ทั้งนี้ยังต้องการการพัฒนาปรับปรุงอุปกรณ์ที่ได้บางส่วนเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อการใช้งานสูงสุดหรือการพัฒนาเพื่อการค้าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์, เอกสารประกอบการเรียนการสอน selected topics in polymer science , ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 16-37

เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์,เอกสารประกอบการเรียนการสอน properties of polymers , ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 55-56

อาภัสรา ชมิดท์. 2537.เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์

Andrew, A.T., 1986. Electrophoresis Thory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications, Oxford University Press , Oxford , 2nd ed.

Dunn, M.J., 1986. Gel Electrophoresis of Proteins. IOP Publishing Limited , Bristal

Hames, B.D., 1990. Gel Electrophoresis of Proteins : A Pratical Approch, Oxford University Press, Oxford , 2nd ed.

Richwood , D. and Hames, B.D., 1990 Gel Electrophoresis of Nucleic acid : A Pratical Approch, Oxford University Press, Oxford , 2nd ed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สารละลายบัฟเฟอร์ 10x TBE (Tris – borate – EDTA)

Tris base	108	กรัม
Borate acid	55	กรัม
0.5 M EDTA	40	มิลลิลิตร
Water	1	ลิตร
pH	8.00	

ปรับเป็น 0.5 เท่า ก่อนใช้

สีย้อม

บัฟเฟอร์สำหรับหยดดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า

Bromophenol Blue	25	มิลลิกรัม
Xylene Cyanol	25	มิลลิกรัม
Ficoll 400	5	กรัม

ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมดีเอ็นเอแลมดา (λ) ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Pst*I

เตรียม 480 ไมโครลิตร

แลมดา(λ)ดีเอ็นเอ	48	ไมโครกรัม
บัฟเฟอร์ 10x H	40	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Pst*I	48	หน่วย

บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และบ่มที่ 60°c เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ เติมสีย้อมความเข้มข้น 6 เท่า 80 ไมโครลิตร จะได้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้