สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กระบวนการวิเคราะห์ภาพถ่าย DNA

DNA IMAGE ANALYSIS

โดย

นายกันต์ธร จารุมา

นายพงศ์พันธ์ วิชาผง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....103078
วัน,เดือน,ปี.....27 ส.ค. 2552

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

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมสารสนเทศ

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สภาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA IMAGE ANALYSIS

BY

Mr. KANTORN JARUMA

Mr. PONGPUN WICHAPONG

A PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

BACHLOR IN DEPARTMENT OF INFORMATION ENGINEERING

FACULTY OF EMGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปริญญานิพนธ์	กระบวนการวิเคราะห์ภาพถ่าย DNA
ชื่อนักศึกษา	นายกันต์ธร จารุมา รหัสประจำตัว 47010031
	นายพงศ์พันธ์ วิชาผง รหัสประจำตัว 47010031
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. ปีติเขต สู้รักษา
	ดร.สุชาติ ชนะมา
ระดับการศึกษา	ปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต
	สาขาวิศวกรรมสารสนเทศ
ภาควิชา	วิศวกรรมสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2551

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบจากอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

.....

(รศ.ดร.ปีติเขต สู้รักษา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปริญญานิพนธ์ กระบวนการวิเคราะห์ภาพถ่าย DNA
ชื่อนักศึกษา นายกันต์ธร จารุมา รหัสประจำตัว 47010031
นายพงศ์พันธ์ วิชาผง รหัสประจำตัว 47010467
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. ปีติเขต สู้รักษา
ดร.สุชาติ ชนะมา
ระดับการศึกษา ปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิศวกรรมสารสนเทศ
ภาควิชา วิศวกรรมสารสนเทศ
ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นการออกแบบระบบและขั้นตอนในการวิเคราะห์ภาพ DNA ที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis โดยสร้างโปรแกรม C++ ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายที่ได้จากการทดลองและคำนวณหามวลโมเลกุล ซึ่งการคำนวณด้วยโปรแกรมนี้จะลดขั้นตอนในการคำนวณมวลโมเลกุล โดยไม่ต้องนำมาคำนวณเองเช่นในอดีต ทำให้เพิ่มความสะดวกในการศึกษาด้านชีวภาพของ DNA ได้เป็นอย่างมาก โครงงานนี้สามารถพัฒนาต่อโดยเพิ่มการเก็บข้อมูลในรูปแบบฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบว่าเป็น DNA ของสิ่งมีชีวิตอะไรได้ต่อไป

อนึ่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้อาจจัดได้ว่าเป็นสหวิทยาการในการศึกษาร่วมระหว่างศาสตร์ด้านชีววิทยาเคมีและศาสตร์ด้านวิศวกรรมสารสนเทศ ซึ่งอาจนับได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาด้านชีวสารสนเทศในยุคต้นๆของประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THESIS TITLE	DNA IMAGE ANALYSIS	
STUDENT	MR.KANTORN JARUMA	ID. 47010031
	MR.PONGPUN WICHAPONG	ID. 47010467
ADVISOR	ASSOC.PROF.DR.PITIKHATE SOORAKSA	
	DR. SUCHART CHANAMA	
GRADUATE LEVEL	BACHELOR DEGREE OF INFORMATION ENGINEERING	
DEPARTMENT	INFORMATION ENGINEERING	
YEAR	2008	

ABSTRACT

This thesis is about designing the procedure for analyzing DNA photograph acquired from Agarose Gel Electrophoresis experiment. Instead of manual calculation, a C++ program is developed for reduction of molecule calculation steps, provided an easy way to study biology of the DNA. This project can be extended by adding DNA database management function.

Furthermore, this project may be considered as an interdisplinary between biochemistry and information engineering called "Bio-informatics". This work may be a pioneer investigation on this issues in Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้คงมิอาจสำเร็จได้ ถ้าปราศจากความร่วมมืออย่างยิ่งจากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ซึ่งผู้จัดทำใคร่ขอขอบคุณทุกๆท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ปิติเขต สู้รักษา และ ดร. สุชาติ ชนะมา อาจารย์จากคณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาทั้งสองท่านที่ได้ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งเอื้อเฟื้อข้อมูลต่างๆในการจัดทำโครงงาน จึงทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานนี้ ทางผู้จัดทำขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

นายกันต์ธร จารุมา

นายพงศ์พันธ์ วิชาผง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของโครงงาน	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
1.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงาน	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับลำดับเบสของ DNA	3
2.1.1 โครงสร้างโมเลกุลใน DNA	3
2.1.2 ดีเอ็นเอในยีโนมมนุษย์	7
2.1.3 ฐานข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ	7
2.2 หลักการและเทคนิคที่ใช้ Agarose Gel Electrophoresis	8
2.3 การประมวลผลภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ DNA	10
2.3.1 แบบจำลองสี RGB	11
2.3.2 การแปลงภาพสี RGB ให้เป็นภาพระดับเทา (Grayscale color conversion)	11
2.3.3 การปรับความสว่างและความคมชัดของภาพ (Brightness and contrast adjustment)	12
2.3.4 การทำเทรสโชลด์ (Thresholding)	13
2.3.5 ตัวกรองความถี่มัธยฐาน (Median Filter)	14
2.3.6 ตัวกรองแบบเกาส์เซียน (Guassian Filter)	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง	หน้า
2.3.7 การลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion)	15
2.3.8 การขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation)	16
2.3.9 การหาขอบของวัตถุในภาพ (Edge Detection)	16
2.3.10 การหาโครงร่างขอบภาพ (Contour Detection)	17
2.4 วิธีการ Least Square	18
บทที่ 3 การออกแบบโครงงาน	21
3.1 การทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis	21
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis	21
3.1.2 ขั้นตอนการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis	29
3.1.2.1 ขั้นตอนการทำเจล	29
3.1.2.2 ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า	29
3.2 ขั้นตอนการคำนวณหาปริมาณโมเลกุลของแต่ละแถบสี	37
3.3 การประมวลภาพ Agarose Gel	40
บทที่ 4 การทดลองและผลการทดลอง	41
4.1 การทดลองการทำงานของ Algorithm ที่ใช้วิเคราะห์ภาพ Agarose Gel	41
4.2 การคำนวณหาปริมาณมวลโมเลกุล	44
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	47
5.1 สรุปผลการทดลอง	47
5.2 ปัญหาที่ประสบในการทดลอง	47
5.3แนวทางการแก้ไขปัญหา	47
5.4 ข้อเสนอแนะในการพัฒนา	48
บรรณานุกรม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

ภาพ	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ	5
รูปที่ 2.2 เบส 4 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์	6
รูปที่ 2.3 การหาลำดับเบสจากลายภาพพิมพ์ดีเอ็นเอ	8
รูปที่ 2.4 ขั้นตอนในการทดลองโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	9
รูปที่ 2.5 ไดอะแกรมของสี	11
รูปที่ 2.6 ภาพก่อนและหลังผ่านกระบวนการแปลงภาพสีให้เป็นภาพระดับเทา	12
รูปที่ 2.7 แสดงการทำเทรสโฮลด์	13
รูปที่ 2.8 วิธีการคำนวณตัวกรองความถี่มัธยฐาน หรือ Median Filter	14
รูปที่ 2.9 ภาพก่อนและหลังผ่านกระบวนการ Median Filter ขนาด 3x3	15
รูปที่ 2.10 กระบวนการขยาย/ลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ	16
รูปที่ 2.11 ภาพต้นฉบับและภาพที่ได้หลังจากการทำ Edge Detection	17
รูปที่ 2.11 ภาพระดับความเข้มเทาและภาพที่ได้หลังจากการหา Contour Detection	18
รูปที่ 3.1 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell	22
รูปที่ 3.2 เครื่อง Electrophoresis MAXI CELL EC360M DNA Cell	23
รูปที่ 3.3 สาร DNA ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลายเพื่อตัดส่วนของ DNA แล้ว	23
รูปที่ 3.4 Pipette	24
รูปที่ 3.5 Power Supply	24
รูปที่ 3.6 สาร Agarose ที่ใช้ในการทดลอง	25
รูปที่ 3.7 สาร Agarose Gel ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน	25
รูปที่ 3.8 Tips อุปกรณ์ที่ใช่สำหรับวางหลอด	26
รูปที่ 3.9 สาร Tris-acetate-EDTA (TAE)	26
รูปที่ 3.10 สีที่ใช้ย้อม DNA ในที่นี้เราได้ใช้ Bromophemol Blue หรือ Xylene Cyanol	27
รูปที่ 3.11 DNA Ladder	27
รูปที่ 3.12 ถาดวางเจล	28
รูปที่ 3.13 เครื่อง UVP Trasilluminator และเครื่อง UV Transilluminator	28
รูปที่ 3.14 เจลที่แข็งตัวพร้อมใช้งานแล้ว	29
รูปที่ 3.15 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ที่เทสารละลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) แล้ว	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ หน้า

รูปที่ 3.16 นำเจลมาวางลงในเครื่องElectrophoresis Mini SUB™ DNA Cell แล้วเทสารสะลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) จนท่วมเจล 30
รูปที่ 3.17 ทำความสะอาดเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell โดยการใช้ Pipette 31
รูปที่ 3.18 นำสาร DNA แต่ละชนิดที่มีปริมาตรตามที่กำหนด แล้วนำมาผสมกับน้ำโดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 6 µl 32
รูปที่ 3.19 การใช้ Pipette ในการช่วยปรับปริมาตรของสารตามที่ต้องการ 32
รูปที่ 3.20 การหยดสาร DNA ที่ผสมน้ำจนมีปริมาตรรวมเท่ากับ 6 µl ลงในแต่ละหลุมของเจลในเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell 33
รูปที่ 3.21 เจลที่มีการใส่สาร DNA ลงในแต่ละหลุมเรียบร้อยแล้ว 33
รูปที่ 3.22นำเครื่องเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ต่อกับ Power Supply โดยให้ Power Supply ให้ไฟประมาณ 80 V 34
รูปที่ 3.23การวิ่งของ DNA เมื่อมีการปล่อยกระแสไฟฟ้าในเจล 35
รูปที่ 3.24 นำเจลที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis มาดูผ่านเครื่อง UV Transilluminator ซึ่งเครื่อง UV Transilluminator ข้างใต้จะมีหลอด UV อยู่เพื่อสามารถดูเจลได้ 35
รูปที่ 3.25 ภาพจากหน้าจอคอมพิวเตอร์เมื่อดูผ่านเครื่อง UVP Trasilluminator 36
รูปที่ 3.26 ภาพ DNA ที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้ว 36
รูปที่ 3.27 การวัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงแถบสีแต่ละแถบ 37
รูปที่ 3.28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log (size) และระยะทางที่วัดได้ 39
รูปที่ 3.29 กราฟเส้นตรงจากการประมาณความสัมพันธ์ 39
รูปที่ 3.30 Intensity profile ตามแนวตั้งของภาพถ่ายอะกาโรสเจลใน 1 เลน 40
รูปที่ 4.1 ภาพ Agarose Gel ที่ได้จากการทดลอง 41
รูปที่ 4.2 [ก] ภาพ Agarose Gel เมื่อผ่านกระบวนการปรับแสงก่อนลดสัญญารบกวน 42
รูปที่ 4.2 [ข] ภาพ Agarose Gel เมื่อผ่านกระบวนการปรับแสงและลดสัญญารบกวนเรียบร้อยแล้ว 42
รูปที่ 4.3 ภาพ Agarose Gel ที่มีการตรวจจับในแต่ละเลนแล้ว 43
รูปที่ 4.4 ภาพ Agarose Gel ที่มีการตรวจจับเลนโดยใช้แบบจุด 43
รูปที่ 4.5 ภาพการ plot Graph โดยใช้วิธีการตรวจจับเลนแบบเส้น 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ หน้า

รูปที่ 4.6 ภาพการ plot Graph โดยใช้วิธีการตรวจจับเลนแบบจุด 45

รูปที่ 4.7 ก Matrix ระดับบิต 45

รูปที่ 4.7 ข ผลคำนวณ น้ำหนักมวลโมเลกุล 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงการคำนวณหาปริมาตรมวลโมเลกุลของแต่ละแถบสี	40
ตารางที่ 4.1 ตารางแสดง Distance Vector	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของโครงงาน

เทคโนโลยีการวิเคราะห์ DNA ในปัจจุบันได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว และก่อให้เกิดประโยชน์ต่อมวลมนุษยชาติอย่างมหาศาล ส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีนี้เป็นการวิเคราะห์ภาพถ่ายอะกาโรสเจล ภาพถ่ายอะกาโรสเจลเป็นภาพที่แสดงการแยกตัวของ DNA บนแผ่นวุ้นอะกาโรสเจลที่ผ่านกระบวนการแยกสารประกอบด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis) เมื่อได้ภาพถ่ายอะกาโรสเจลมานักวิเคราะห์จะต้องนำภาพนั้นมาคำนวณมวลโมเลกุลและความเข้มข้นของ DNA ซึ่งในยุคแรกของการวิเคราะห์ DNA นักวิเคราะห์จะต้องคำนวณด้วยมือ ก่อให้เกิดความยุ่งยากและเสียเวลาพอสมควรอีกทั้งข้อมูลที่ได้อาจมีความผิดพลาดซึ่งเกิดขึ้นจากตัวบุคคล ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายอะกาโรสเจลขึ้นใช้งานแต่โปรแกรมนี้มีราคาสูงมากและต้องนำเข้าจากต่างประเทศจึงได้มีความคิดที่จะพัฒนาโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์ภาพถ่ายดังกล่าวเพื่อทดแทนโปรแกรมที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อนำความรู้ทางทฤษฎีสารสนเทศนำมาใช้ในปฏิบัติการทางชีววิทยาได้จริง
2. เพื่อเปรียบเทียบโปรตีน Fragment และ DNA Fragment ของจุลชีพ ในเชิง Molecular Weight และขนาด
3. เพื่อพัฒนา Algorithm ในการเก็บข้อมูลในการเปรียบเทียบ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับความรู้และความชำนาญในการนำทฤษฎีสารสนเทศมาใช้จากการทำโครงงานนี้
2. สามารถนำความรู้ที่ได้จากโครงงานนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆได้
3. สามารถนำโปรแกรมไปใช้ประโยชน์ได้จริง
4. สามารถนำโปรแกรมไปพัฒนาต่อให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

1. ค้นคว้าหาข้อมูลเกี่ยวกับ Bioinformatics และ DNA Fragment
2. วางแผนการทำงานเกี่ยวกับภาพ Agarose Gel
3. วิเคราะห์ข้อมูลภาพ Agarose Gel เพื่อนำไปประมวลผลในเชิง matrix
4. ออกแบบ Algorithm ที่ใช้ในการจัดเก็บข้อมูล ที่ได้จากการวิเคราะห์ภาพ Agarose Gel
5. เริ่มทำการพัฒนาระบบ Algorithm ที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ภาพ
6. วางแผนการทำงานเกี่ยวกับส่วนแสดงผลที่ได้จากข้อมูลที่ได้
7. แก้ไขปัญหาข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นกับ Algorithm
8. บันทึกผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงาน

1.5.1 ซอฟต์แวร์

1. Microsoft Visual Studio C++
2. OpenCV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้จะขอกล่าวถึงทฤษฎีที่เกี่ยวข้องในการประมวลผลภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA และโปรตีน Fragment ของจุลชีพ โดยจะแบ่งเป็นสองส่วนหลักๆ คือ ในส่วนของความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับลำดับเบสของ DNA หลักการและเทคนิคที่ใช้ Agarose Gel Electrophoresis การประมวลผลภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ DNA และในส่วนของการคำนวณมวลโมลเลกุลของ DNA

2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับลำดับเบสของ DNA

สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ล้วนมีประกอบขึ้นมาจากเซลล์โดยแต่ละเซลล์จะมีลักษณะพื้นฐานที่มีลักษณะคล้ายๆกัน ก็คือมีเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบและมีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางซึ่งภายในนิวเคลียสก็จะมีสารพันธุกรรมอยู่ สารพันธุกรรมนี้มีชื่อเรียกว่า “โครโมโซม” โครโมโซมแต่ละโครโมโซมนั้นประกอบขึ้นจากสารพันธุกรรมที่เรียกว่า DNA ซึ่ง DNA นั้นมีโครงสร้างเป็นเส้นคู่บิดเข้าหากันเป็นเกลียว ภายใน DNA นั้นจะประกอบไปด้วยการจับตัวกันของสารเคมี 4 ชนิด ที่เรียกว่า เบส ได้แก่ A G C T ซึ่งสารเคมีทั้ง 4 ชนิดนี้จะจับเรียงตัวกันเป็นลักษณะของการเข้ารหัสโดยเรียงลำดับสลับไปสลับมาซึ่งมีความยาวกว่า 3,000 ล้านต่อเส้น ซึ่งการจับเรียงตัวของสารเคมีทั้ง 4 ชนิดนี้เองที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นเราจึงเรียกสิ่งเหล่านี้ว่า รหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็จะมีรหัสพันธุกรรมที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งในการแพทย์ การสืบสวนสอบสวน เช่น ใช้แทนลายนิ้วมือที่เรียกว่า DNA Fingerprint นอกจากนี้ยังช่วยให้การศึกษาด้านชีววิทยาทำได้ง่ายขึ้นด้วย ดร.เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความเห็นกับเรื่องนี้ว่า DNA จะช่วยเสริมข้อมูลให้กับนักชีววิทยาในการหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด วิวัฒนาการของมัน หรือแม้กระทั่งถิ่นที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ

2.1.1 โครงสร้างโมเลกุลใน DNA

โมเลกุล DNA หรือ Deoxyribonucleic Acid เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสพันธุกรรม (Genetic codes) DNAนั้นจะทำหน้าที่เก็บสะสมและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งในแต่ละบุคคลจะมีรหัสพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้ประยุกต์ใช้เทคนิคต่างๆจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความรู้เรื่องคุณสมบัติอันอันนี้ นำไปใช้ในเพื่อประโยชน์ในด้านต่าง อาทิ เช่น การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (Human Identification) นิติวิทยาศาสตร์ (Forensic Science) และโบราณคดี (Molecular Paleontology) เป็นต้น

DNAนั้นเราสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด ซึ่งพบอยู่อยู่ 2 แห่งในเซลล์ที่มีชีวิต คือ นิวเคลียร์ (Nuclear DNA) และไมโตคอนเดรียล DNA (Mitochondrial DNA)

เซลล์นิวเคลียร์เป็นศูนย์ควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งภายในเราจะสามารถพบนิวเคลียส DNA นิวเคลียส DNAนี้บรรจุลักษณะที่ถูกสืบทอดต่อกันมาของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเช่น สีนัยน์ตา ความสูง เส้นผม สีผิว ฯลฯ ซึ่งเป็นผลผลิตของ DNAนี้ครึ่งหนึ่งได้มาจากพ่อส่วนอีกครึ่งหนึ่งได้มาจากแม่ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เราสามารถพิสูจน์ความสัมพันธ์ของพ่อ แม่ ลูป และเครือญาติได้

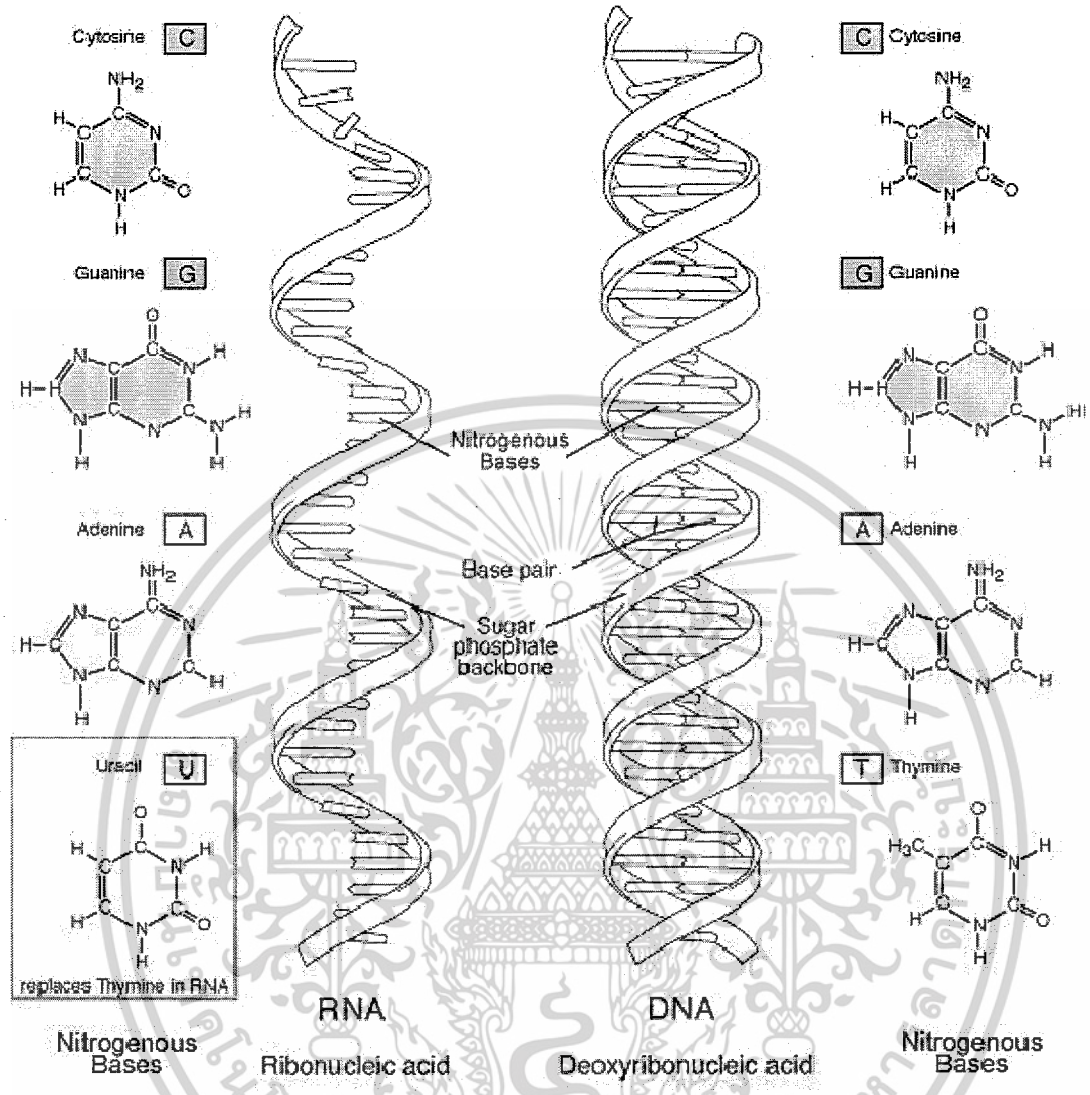
ส่วนไมโตคอนเดียล DNAจะได้รับการสืบทอดมาจากทางแม่เท่านั้น โดยถูกส่งผ่านจากยายมาสู่แม่ และแม่สู่ลูก จะมีลักษณะเหมือนกับไมโตคอนเดรียล DNAของแม่ทุกประการ ดังนั้นจึงเป็นเครื่องหมายทางลักษณะที่ดีสำหรับการพิสูจน์ว่าเป็นญาติฝ่ายแม่ได้ ซึ่งไมโตรคอนเดียล DNA นั้นจะพบภายในเซลล์ไมโตรคอนเดียลเท่านั้น ซึ่งหน้าที่หลักของไมโตรคอนเดรียลคือเป็นแหล่งผลิตพลังงานของเซลล์

โครงสร้างโมเลกุลของ DNAโดยทั่วไปจะมีสายนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) สายยาว 2 ยาวควั่นกันเป็นเกลียวคู่ (Double helix) โดยมีทิศทางสวนกันแบบทิศทางตรงกันข้าม (Antiparallel) โดยนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาลไรโบส (Ribose) ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม ฟอสเฟส และ ออร์แกนิคเบส (Organic base) ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ

สาย DNA จะมีฟอสเฟตและน้ำตาลเป็นแกนสันหลัง คล้ายราวบันไดที่บิดเป็นเกลียว และมีเบสยื่นออกมาจากแกนสันหลังแต่ละข้างคล้ายขั้นบันได ซึ่งความแตกต่างของแต่ละนิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับเบสบางครั้งจึงเรียกว่าเบสแทนนิวคลีโอไทด์

เบสที่เป็นส่วนประกอบของ DNAมี 2 ชนิด คือ เพียวรีน (Purine) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนคู่ และไพริมิดีน (Pyrimidine) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเดี่ยว เบสที่เป็นพัวรีนได้แก่ อะดินีน กับ กวานีน ส่วนเบสที่เป็นไพริมิดีน ได้แก่ ไทมีน กับไซโตซิน และเบสจะจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1' ของน้ำตาลไรโบส (คาร์บอนในตำแหน่งต่างๆของน้ำตาลใส่เครื่องหมาย ' (Prime) ก็เพื่อความแตกต่างจากตำแหน่งคาร์บอนในเบส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

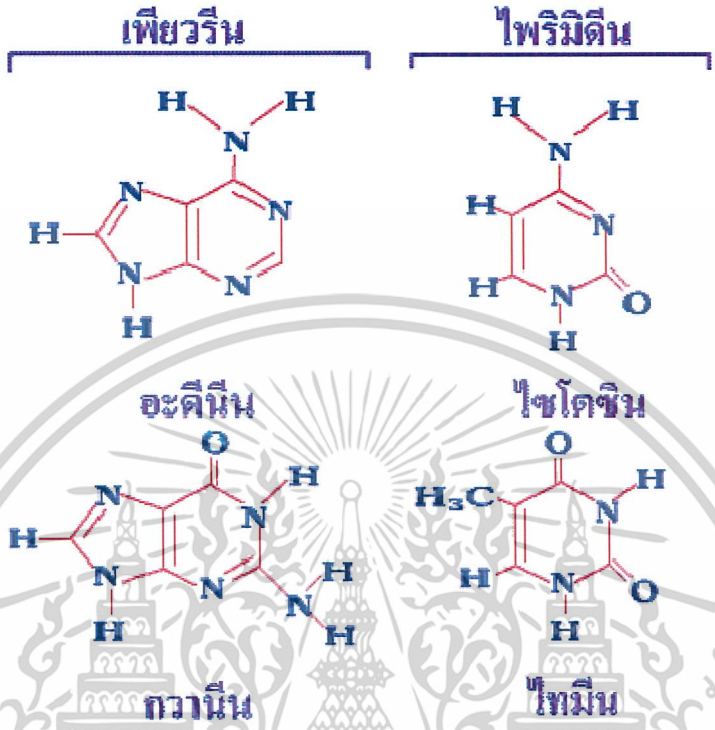


รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ DNA (ที่มาจาก [1])

สาย DNA จะมีฟอสเฟตและน้ำตาลเป็นแกนสันหลัง คล้ายราวบันไดที่บิดเป็นเกลียว และมีเบสยื่นออกมาจากแกนสันหลังแต่ละข้างคล้ายขั้นบันได ซึ่งความแตกต่างของแต่ละนิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับเบสบางครั้งจึงเรียกว่าเบสแทนนิวคลีโอไทด์

เบสที่เป็นส่วนประกอบของ DNAมี 2 ชนิด คือ เพียวรีน (Purine) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนคู่ และไพริมิดีน (Pyrimidine) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเดี่ยว เบสที่เป็นพัวรีนได้แก่ อะดินีน กับ กวานีน ส่วนเบสที่เป็นไพริมิดีน ได้แก่ ไทมีน กับไซโตซิน และเบสจะจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1' ของน้ำตาลไรโบส (คาร์บอนในตำแหน่งต่างๆของน้ำตาลใส่เครื่องหมาย ' (Prime) ก็เพื่อความแตกต่างจากตำแหน่งคาร์บอนในเบส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 เบส 4 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ (ที่มาจาก [1])

นอกจากนี้ DNAยังเป็นหน่วยควบคุมลักษณะนิสัยของบุคคลต่างๆเนื่องจาก DNAมีลักษณะที่สำคัญที่บ่งชี้ดังนี้

- DNAส่วนใหญ่จะปรากฏที่โครโมโซม ส่วนโปรตีน ส่วนอาร์เอ็นเอนั้นมักจะพบในไซโตพลาสซึม

- ปริมาณของ DNAจะสัมพันธ์กับจำนวนชุดของโครโมโซม กล่าวคือ ปริมาณของ DNAในเซลล์ร่างกาย (diploid) จะเป็น 2 เท่าของปริมาณ DNAในหน่วยสืบพันธุ์ (haploid)

- องค์ประกอบของ DNA หรือปริมาณของนิวคลีโอไทด์ จะคงที่ในเซลล์ของทุกส่วนของร่างกาย แต่องค์ประกอบของโปรตีนและอาร์เอ็นเอจะแปรปรวนขึ้นลงในแต่ละเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุผล 2 ประการหลังนี้เป็นคุณสมบัติที่หน่วยควบคุมลักษณะจะต้องมี ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะพบแต่ใน DNAเท่านั้น แต่ในโปรตีนและอาร์เอ็นเอนั้นไม่พบ ซึ่งนอกเหนือจากคุณสมบัติข้างต้นแล้วยังมีการทดลองที่พิสูจน์ได้ว่า DNAคือหน่วยควบคุมลักษณะนิสัยของมนุษย์

2.1.2 DNA ในยีโนมมนุษย์

ยีโนม (Genome) คือหน่วยพันธุกรรมทั้งหมดของมนุษย์ซึ่งประกอบด้วยสาย DNAที่มีเบสนิวคลีโอไทด์เรียงต่อกัน ปริมาณของ DNAทั้งหมดในยีโนมมนุษย์มีประมาณ $3x10^9$ หรือ 3 พันล้านนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 10% ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (Coding DNA) แต่ส่วนเหลือยังไมทราบแน่ชัดว่าทำหน้าที่อะไร ซึ่งคาดว่ายีโนมของมนุษย์นั้นบรรจุยีนทั้งหมดประมาณ 70,000 ยีน โดยสาย DNAนี้จะพันขดกันอยู่ในโครโมโซมทั้งหมด 23 คู่ และอีกประมาณ 16,000 นิวคลีโอไทด์จะอยู่ในไมโตคอนเดรีย

จะเห็นได้ว่ายีโนมของมนุษย์นี้เป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลมหาศาลมากมาย ซึ่งข้อมูลต่างๆเหล่านี้ได้รวบรวมข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวกับชีวิประจำวัน เช่น การเจริญเติบโต การแก่ การตาย บุคลิกภาพ ความฉลาด ความสูง รูปร่าง หน้าตา เป็นต้น

DNAในยีโนมมนุษย์นั้นสามารถแบ่งประเภทออกเป็นชนิดได้โดยดูที่การเรียงตัวของเบสซึ่งแบ่งเป็นลักษณะใหญ่ๆได้ 2 แบ่ง คือ

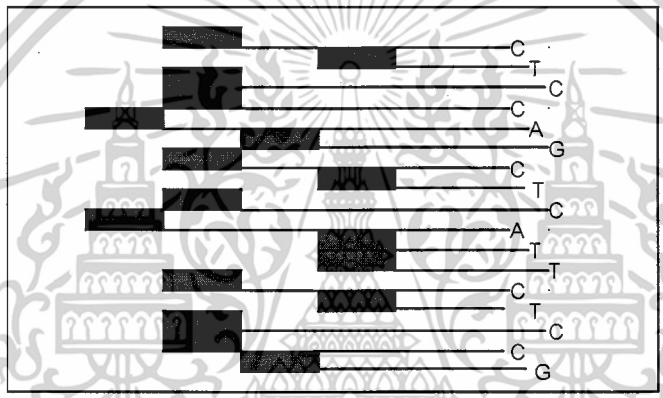
1. DNAที่มีเพียงชุดเดียว (Single-copy DNA) 75% พบในยีโนม DNAลักษณะเหล่านี้เป็น DNAที่มีการเรียงตัวของเบสทั่วๆไป โดยการเรียงตัวของเบสไม่ซ้ำกัน ไม่มีลักษณะเฉพาะเจาะจง
2. DNAซึ่งพบซ้ำๆกันได้หลายชุด (Repetitive DNA) ในยีโนมพบได้ใน 25% มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆกัน แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ อาจจับกันอยู่เป็นกลุ่มที่เรียกว่า Satellite DNA หรือกระจายอยู่ทั่วไปที่เรียกว่า Dispersed repetitive DNA

2.1.3 ฐานข้อมูลลำดับเบสของ DNA

DNAในบุคคลเดียวกันจะมีลายพิมพ์เหมือนกันไม่ว่าจะได้จากเซลล์ส่วนใดของร่างกาย เช่น เม็ดเลือดขาว เส้นผม ตัวอสุจิ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการนำสาย DNAไปตรวจวิเคราะห์ และได้ภาพแถบ DNAออกมาซึ่งมีลักษณะคล้ายบาร์โคด (Bar-code) บาร์โคดนี้สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์บุคคลคล้ายกับภาพลายพิมพ์นิ้วมือได้ ซึ่งได้บัญญัติคำศัพท์ไว้ว่า DNA Fingerprint หรือลายพิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA ในกรณีฝาแฝดที่เกิดจากการปฏิสนธิจากไข่ฟองเดียวกัน (Monozygotic Twins) จะมีลายพิมพ์ DNAเหมือนกัน ในการนำสาย DNAไปใช้ในงานต่างๆ เช่น พิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก พิสูจน์ในคดีฆาตกรรม นักพันธุศาสตร์จะนำสาย DNAไปตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะชนิดที่กำหนดไว้แล้วตามช่วงของสาย DNAที่ต้องการพิสูจน์ และทำลายพิมพ์ DNAออกมา จะเห็นว่าในการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับ DNAหากเก็บเป็นภาพลายพิมพ์ DNAของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก จะได้ฐานข้อมูลที่มีขนาดใหญ่มาก ดังนั้นการเก็บข้อมูล DNAจึงเก็บในรูปของตัวอักษรเรียงต่อกันเป็นลำดับเบส ซึ่งมีตัวอักษรอยู่ 4 ตัว คือ A G C และ T ซึ่งเป็นชนิดของเบสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และตัวอักษร N แทนลำดับเบสที่ไม่รู้จัก

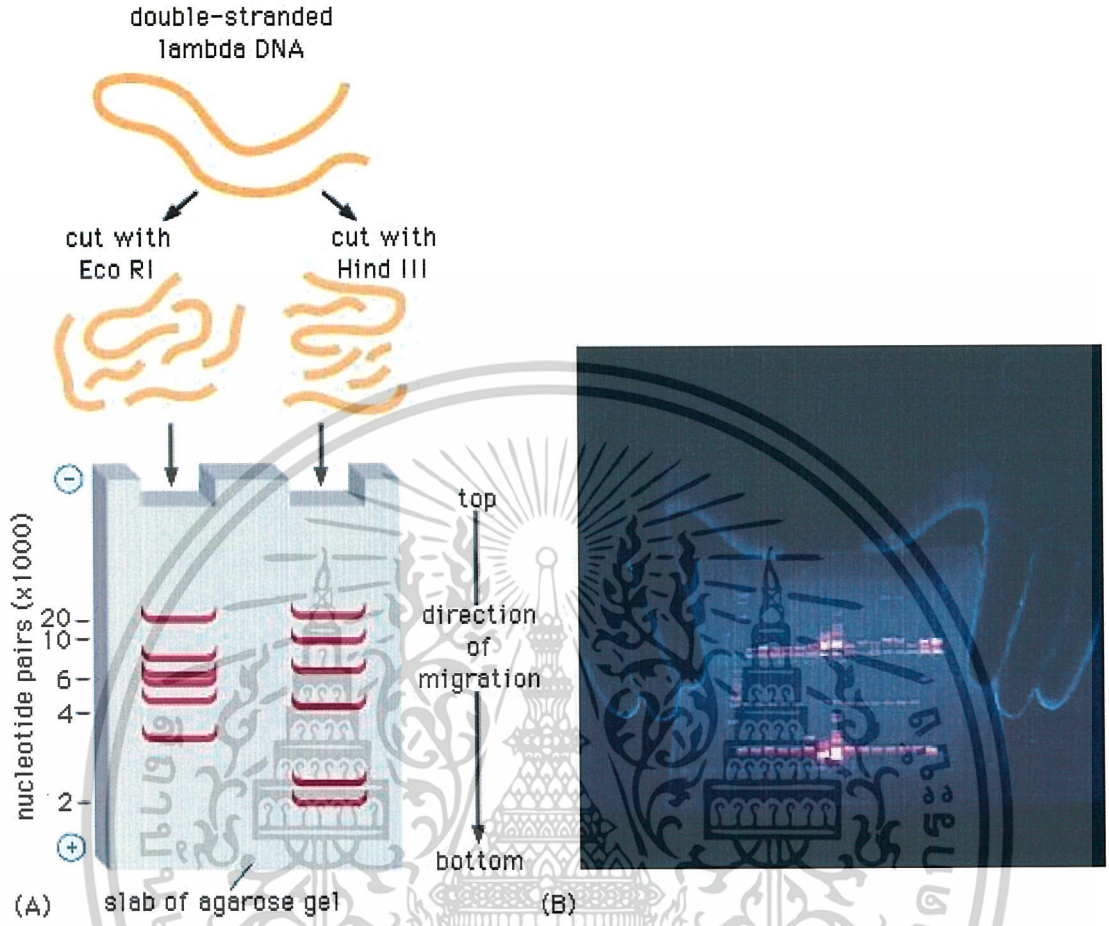


รูปที่ 2.3 การหาลำดับเบสจากลายภาพพิมพ์ DNA (ที่มาจาก [1])

2.2 หลักการและเทคนิคที่ใช้ Agarose Gel Electrophoresis

Agarose Gel Electrophoresis เป็นเทคนิคการแยกชิ้น DNAที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะ DNAที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวล DNAแล้วจะเป็นค่าคงที่ Agarose Gel Electrophoresis แยก DNAออกจากกันได้โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของ DNA แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของ DNA โดยที่ DNAที่มีรูปร่างอัดแน่นอย่าง Super Coiled DNA จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า Circular DNA และ DNA รูปร่างเป็นแท่ง DNA ที่มีรูปร่างเหมือนกัน อย่างชิ้น DNAรูปแท่งนั้น DNAที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNAที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนในการทดลองโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis (ที่มาจาก [5])

ดังนั้นเมื่อตัด DNAเป็นชิ้น ๆด้วย Restriction Endonuclease เราจึงสามารถแยกชิ้น DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันได้ด้วย Agarose Gel Electrophoresis กระทำโดยเตรียม Agarose Gel ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม หยดสารละลาย DNAลงในช่องบน Agarose Gel แล้วเปิดสนามไฟฟ้า DNA จะวิ่งจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวก เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมก็ปิดสนามไฟฟ้าแล้วย้อม DNAใน Agarose Gel ด้วยสี Acridine แล้วนำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต Ethidium Bromide ที่ย้อมติด DNAอยู่จะเรืองแสงสีส้มเป็นแถบ DNAซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การประมวลผลภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ DNA

การประมวลผลภาพเชิงดิจิตอล (Digital image processing) เป็นการนำคอมพิวเตอร์มาใช้ในการประมวลผลภาพในรูปดิจิตอลฟอร์แมต ซึ่งมีหมวดหมู่ใหญ่ๆ ดังนี้

Image acquisition เป็นขั้นตอนแรกสุดของการประมวลผลภาพ คือการรับภาพที่ต้องการประมวลผลเข้ามา

Image enhancement เป็นการปรับปรุงภาพเพื่อให้ภาพมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการประมวลผลขั้นต่อไปโดยใช้กระบวนการทางคณิตศาสตร์ต่าง ๆ

Image restoration เป็นกระบวนการปรับปรุงภาพออกมาให้เหมือนภาพตั้งต้น ข้อแตกต่างระหว่าง

Image restoration กับ Image enhancement คือ Image restoration เป็นการทำให้ภาพเหมือนภาพเดิมมากที่สุด แต่ Image enhancement ไม่สนใจว่าภาพที่ออกมาจะเหมือนภาพเดิมหรือไม่แต่ต้องการให้ภาพมีคุณภาพที่เหมาะสมที่จะนำไปประมวลผลในขั้นตอนถัดไป

Image compression เป็นเทคนิคในการลดเนื้อที่ในการจัดเก็บรูปภาพ หรือลด Bandwidth ในการส่งข้อมูลภาพผ่านสื่อกลางต่างๆ

Morphological processing เป็นกระบวนการในการประมวลภาพตามรูปร่างของวัตถุในภาพ ส่วนมากเป็นการเปลี่ยนรูปร่างของวัตถุ

Image segmentation เป็นกระบวนการในการแยกแยะส่วนประกอบของรูปภาพออกเป็นส่วนต่างๆเพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ภาพ

Image representation and description เป็นการอธิบายรูปภาพหรือแทนข้อมูลภาพด้วยข้อมูลที่สามารถสื่อความหมายได้

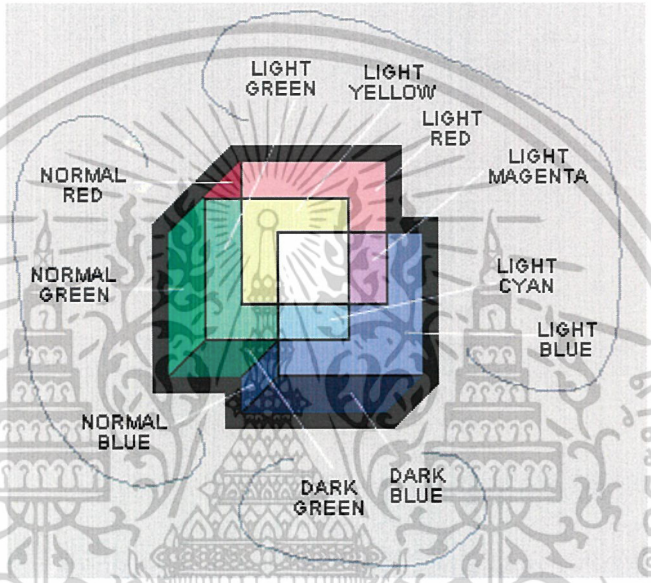
Image recognition เป็นกระบวนการในการจดจำรูปภาพซึ่งเกี่ยวข้องกับความรู้ขั้นสูงในการตีความหมายของรูปภาพ

การประมวลผลภาพดิจิตอลหรือ Digital image processing เกี่ยวกับการแปลงข้อมูลภาพให้อยู่ในรูปแบบข้อมูลดิจิตอลซึ่งสามารถที่จะนำเอาข้อมูลนี้จัดการผ่านกระบวนการต่างๆด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้ภาพดิจิตอลเป็นภาพที่ประกอบด้วยจุดภาพเล็กๆจำนวนมากเรียกว่าพิกเซล(Pixels)เราใช้ตัวเลขจำนวนหนึ่งแทนค่าของระดับสีหรือระดับความสว่างของแต่ละพิกเซลซึ่งสิ่งนี้เองที่เราสามารถปรับแต่งเพื่อการแสดงผลภาพได้ซึ่งในแต่ละพิกเซลก็จะมีตัวเลขบอกระดับความสว่างหรือระดับสีบรรจุอยู่ข้อดีของภาพดิจิตอลก็คือสามารถนำมาประมวลผลต่างๆด้วยคอมพิวเตอร์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แบบจำลองสี RGB

แบบจำลองสีเป็นวิธีที่กำหนดสีต่างๆให้เป็นแบบมาตรฐาน ซึ่งแบบจำลองสีแบบ RGB นั้นเป็นแบบจำลองของแม่สีหลักทั้งสามสี ซึ่งเป็นสีที่เกิดจากการรวมกันของแสงประกอบด้วยสีสำคัญ 3 สีได้แก่ สีแดง (Red) สีเขียว (Green) และสีน้ำเงิน (Blue) ถูกนำมาใช้ในด้านการแสดงผลข้อมูลบนจอภาพ รวมไปถึงการเก็บข้อมูลภาพในระบบคอมพิวเตอร์



รูปที่ 2.5 ไดอะแกรมของสี

2.3.2 การแปลงภาพสี RGB ให้เป็นภาพระดับเทา (Grayscale color conversion)

ในการประมวลผลภาพนั้นเพื่อการหาลักษณะเด่นหรือวัตถุภายในภาพ ส่วนใหญ่มักจะทำการประมวลผลบนภาพระดับเทาหรือ Grayscale image เนื่องจากเป็นการแปลงข้อมูลค่าสีของแต่ละ pixel ให้เหลือเพียงค่าเดียว เมื่อนำไปทำกระบวนการประมวลผลภาพอื่นๆจะทำให้สามารถทำได้ง่ายและมีความรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

กระบวนการในการแปลงภาพสีในแบบจำลองสี RGB ไปเป็นภาพระดับเทา (Grayscale) สามารถทำได้โดยใช้สมการ

$$g(x,y) = (red \times 0.299) + (green \times 0.587) + (blue \times 0.114) \quad (2.1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

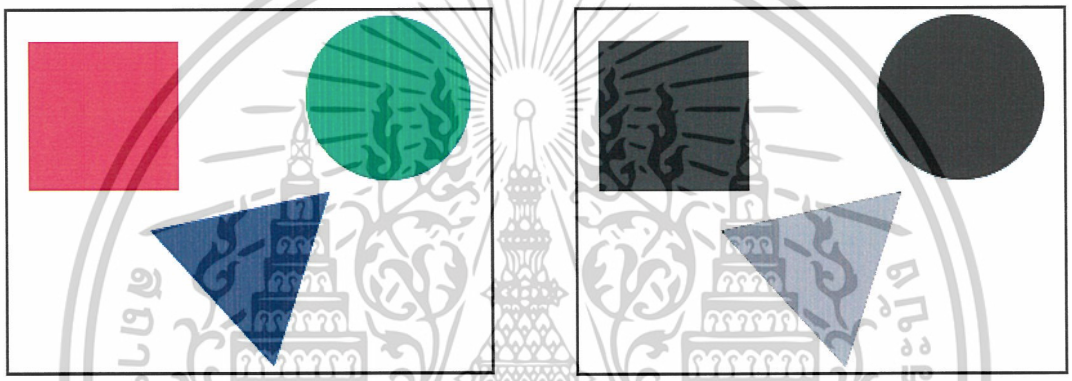
เมื่อ $g(x,y)$ คือ ภาพผลลัพท์ที่ได้จากการแปลงเป็นภาพระดับเทา

red คือ ค่าระดับของสีแดงของ Pixel ณ ตำแหน่ง X,Y

$green$ คือ ค่าระดับของสีเขียวของ Pixel ณ ตำแหน่ง X,Y

$blue$ คือ ค่าระดับของสีน้ำเงินของ Pixel ณ ตำแหน่ง X,Y

ค่าน้ำหนักที่ใช้ในการคำนวณในสมการนั้น คือค่าความถี่ของแสงสีต่างๆจากไดอะแกรมของสี ดังแสดงรูปที่ 10 ที่มนุษย์สามารถรับได้ (Color perception)



รูปที่ 2.6 ภาพก่อนและหลังผ่านกระบวนการแปลงภาพสีให้เป็นภาพระดับเทา (ที่มาจาก [8])

2.3.3 การปรับความสว่างและความคมชัดของภาพ (Brightness and contrast adjustment)

การปรับความสว่างและความคมชัดของภาพ สามารถอธิบายตามสมการได้ดังนี้

$$o(x,y) = [a \times I(x,y)] + b \tag{2.2}$$

เมื่อ $o(x,y)$ คือ ภาพผลลัพท์ที่ได้

$I(x,y)$ คือ ภาพต้นฉบับ

a คือ ตัวแปรสำหรับปรับค่าความคมชัดของภาพ (Contrast)

b คือ ตัวแปรสำหรับปรับค่าความสว่างของภาพ (Brightness)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 การทำเทรสโชลด์ (Thresholding)

การทำเทรสโชลด์ คือ การกำหนดค่าระดับความเข้มเทาคงที่ค่าหนึ่งเพื่อแยกสิ่งที่ต้องการ (Object) ออกมาจากพื้นหลังของภาพ (Background) และเป็นอีกวิธีการหนึ่งเพื่อใช้ในการสร้างภาพขาวดำ หรือภาพแบบไบนารี (Binary) ซึ่งในการกำหนดค่าเทรสโชลด์นั้นจะต้องกำหนดให้มีความเหมาะสม เพราะถ้าหากใช้ค่าเทรสโชลด์มากหรือน้อยเกินไปอาจทำให้รายละเอียดบางส่วนของภาพวัตถุที่ต้องการขาดหายไป หรือภาพจะมีสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ปนมาด้วย เช่นสัญญาณรบกวน (Noise) โดยการหาค่าเทรสโชลด์ที่เหมาะสมนั้นวิธีหนึ่งที่นิยมกันคือการพิจารณาจากฮิสโตรแกรม (Histogram) ของภาพเนื่องจากค่าของกลุ่มข้อมูลของฉากหลังและตัววัตถุจะแยกออกจากกัน ทำให้ง่ายแก่การกำหนดค่าเทรสโชลด์

รูปที่ 2.7 แสดงการทำเทรสโชลด์

กระบวนการทำเทรสโชลด์สามารถทำได้โดยใช้สมการ

$$B(x,y) = \begin{cases} 1 & if\ I(x,y) \geq t \\ 0 & \end{cases} \tag{2.3}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

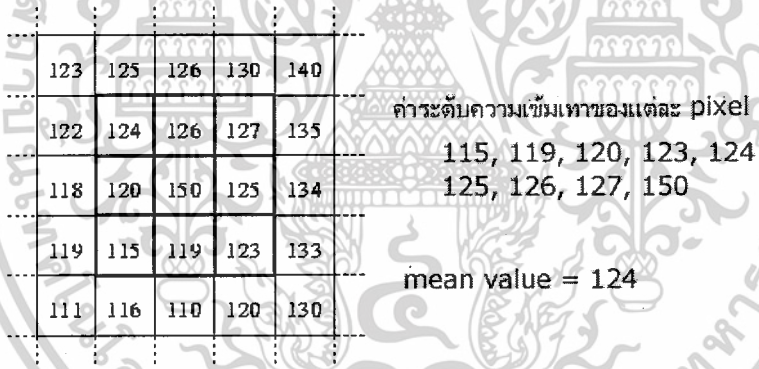
เมื่อ $B(x,y)$ คือ ภาพผลลัพท์ที่ได้

$I(x,y)$ คือ ระดับความเข้มของเทา ณ จุด x,y ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 255

t คือ ค่าระดับที่จะใช้ในการทำเทรสโชลด์

2.3.5 ตัวกรองความถี่มัธยฐาน (Median Filter)

ตัวกรองความถี่มัธยฐาน หรือ Median Filter คือ ตัวกรองความถี่ที่พิจารณาข้อมูลทางสถิติโดยใช้ค่ามัธยฐาน (Median) มีประโยชน์ในการช่วยลดสัญญาณรบกวนที่ไม่เป็นเชิงเส้น (Non-Linear) เช่น สัญญาณรบกวนแบบจุดขาว-ดำ (Salt and Pepper Noise) โดยในการหาค่ามัธยฐานนั้นทำได้โดยการนำข้อมูลในมาร์ค (Mask) มาทำการเรียงค่าจากน้อยไปมากตามค่าระดับความเข้มเทาของข้อมูลซึ่งค่ามัธยฐานจะเป็นค่าตำแหน่งกึ่งกลาง จากนั้นจึงนำค่าที่ได้แทนกลับลงไปในตำแหน่งกึ่งกลางของ Template ดังรูป

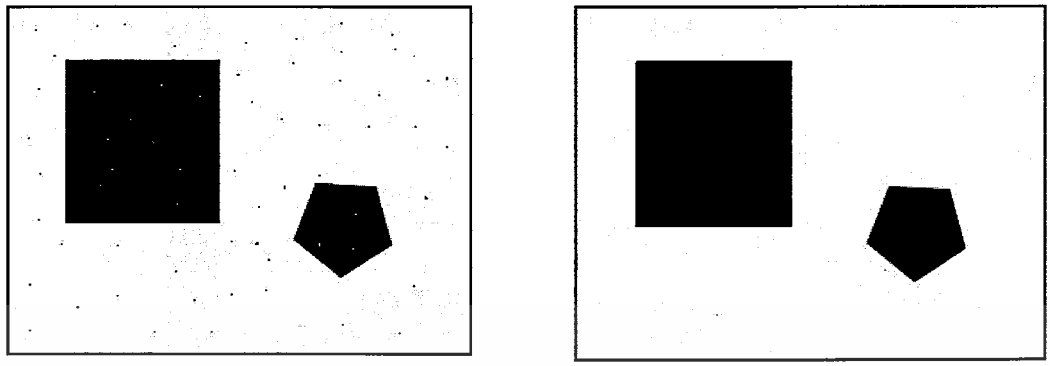


รูปที่ 2.8 วิธีการคำนวณตัวกรองความถี่มัธยฐาน หรือ Median Filter (ที่มาจาก [8])

ตัวกรองความถี่แบบมัธยฐานนั้นจะพิจารณาในลักษณะของมาร์คหน้าต่าง (Template) ซึ่งสามารถทำได้หลายระดับโดยการกำหนดขนาดตามความเหมาะสมกับปริมาณสัญญาณรบกวน เช่น 3x3, 5x5, 7x7 ไปจนถึง NxN

อนึ่งการใช้ตัวกรองความถี่มัธยฐานนั้นจะส่งให้ความคมชัดของภาพลดลงหรือจะทำให้ภาพเบลอตามขนาดของขนาดมาร์คหน้าต่างที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ภาพก่อนและหลังผ่านกระบวนการ Median Filter ขนาด 3x3 (ที่มาจาก [8])

2.3.6 ตัวกรองแบบเกาส์เซียน (Gaussian Filter)

ตัวกรองประเภทนี้สามารถที่จะออกแบบประสิทธ์ของตัวกรองได้หลายรูปแบบ โดยที่สัมประสิทธิ์ของตัวกรองแบบ 2 มิติ จะมีสมการเป็น

$$G(x,y) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \tag{2.4}$$

2.3.7 การลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion)

การลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ หรือ Erosion จัดเป็นเป็นกระบวนการประมวลผลภาพที่เกี่ยวกับรูปทรงของภาพ (Morphology) โดยการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพนั้นจะลดข้อมูลของภาพทิ้งเหลือไว้แต่ตรงจุดกึ่งกลางของวัตถุที่มีลักษณะรูปทรงที่เหมือนกับในมาร์ค (Mask) ที่กำหนดไว้เท่านั้น

$$B = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

การทำกระบวนการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพสามารถแทนได้ด้วยสัญลักษณ์

$$(A \Theta B) \tag{2.5}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

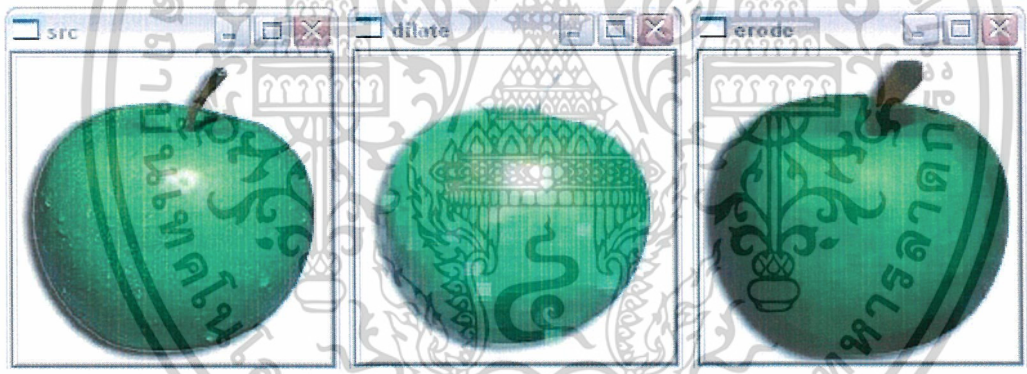
2.3.8 การขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation)

การขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ หรือ Dilation จัดเป็นเป็นกระบวนการประมวลผลภาพที่เกี่ยวกับรูปทรงของภาพ (Morphology) เช่นเดียวกับกระบวนการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion) โดยการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพนั้นจะทำการหาตำแหน่งของรูปจากนั้นจึงทำการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุให้เหมือนกับในมาร์ค (Mask) ที่กำหนดไว้

$$B = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

การทำกระบวนการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพสามารถแทนได้ด้วยสัญลักษณ์

$$(A \oplus B) \tag{2.6}$$



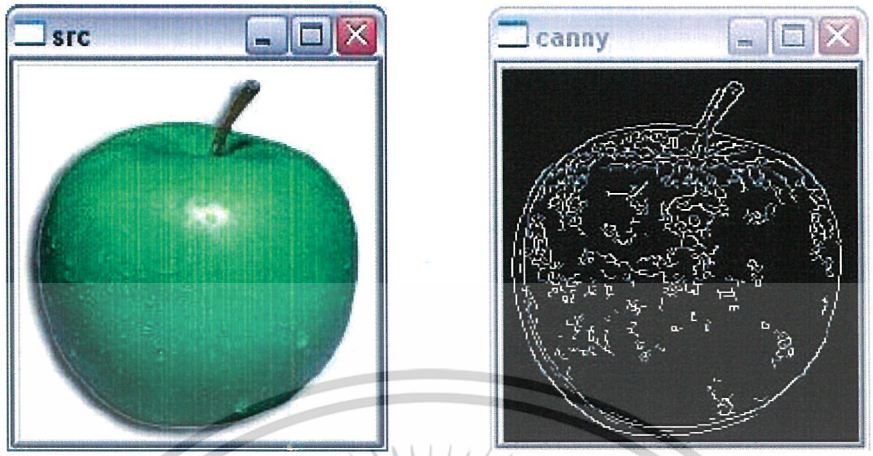
รูปที่ 2.10 กระบวนการขยาย/ลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ

2.3.9 การหาขอบของวัตถุในภาพ (Edge Detection)

การหาเส้นรอบวัตถุที่อยู่ในภาพ คือ การหาความแตกต่างระหว่างพื้นหน้ากับพื้นหลัง ขอบภาพนั้นจะเกิดจากความแตกต่างของความเข้มแสงจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่ง หากความแตกต่างนี้มีค่ามาก ขอบภาพก็จะเห็นได้ชัด ถ้าความแตกต่างมีค่าน้อย ขอบภาพก็จะไม่ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.11 ภาพต้นฉบับและภาพที่ได้หลังจากการทำ Edge Detection

โดยการหาความแตกต่างของความเข้มแสงจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่ง นั้นจะหาได้จากการหาอนุพันธ์ของภาพ ซึ่งหากไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าอนุพันธ์ที่ได้จะเท่ากับศูนย์ แต่ในทางตรงกันข้ามหากค่าระดับความเข้มแสงเกิดการเปลี่ยนแปลงก็จะทำให้ค่าอนุพันธ์ที่ได้ไม่เท่ากับศูนย์ตามค่าระดับความเข้มเทาของภาพต้นฉบับ

สำหรับภาพที่มีลักษณะเป็นระนาบสองมิตินั้น จะทำการหาขอบด้วยการหาอนุพันธ์แบบแยกส่วน (Partial Derivative) หรือการหาค่าอนุพันธ์ในแนวแถว (แกน X) และแนวหลัก (แกน Y) แยกกัน ผลลัพธ์ของอนุพันธ์ที่ได้

ส่วนการทำ Edge Detection แบบ Sobel นั้นเราจะใช้ Mask ขนาด 3x3 ที่มีลักษณะดังนี้

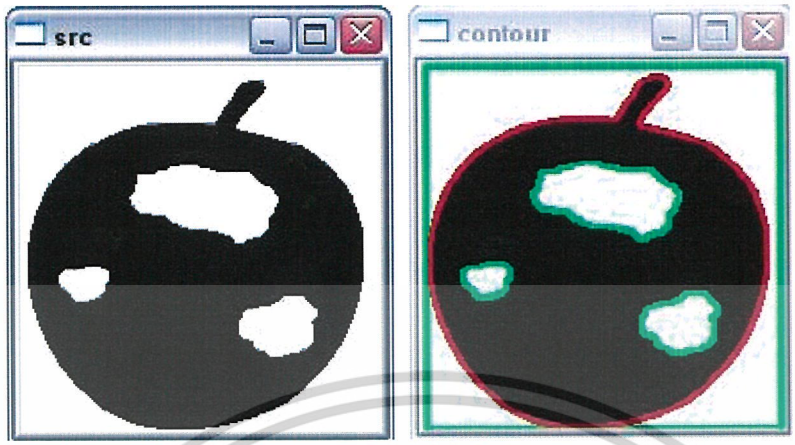
$$m_{horizontal} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \qquad m_{yetical} = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

โดยจะทำการ Convolution ทั้งในแกนตั้งและแกนนอนจากนั้นจึงนำภาพที่ได้ทั้งสองมารวมกันเพื่อให้ได้ขอบของภาพทั้งในแกนตั้งและแกนนอน

2.3.9 การหาโครงร่างขอบภาพ (Contour Detection)

โครงร่างของภาพจะเป็นตัวกำหนดแบนที่อยู่ในเลนนั้นๆ การหาโครงร่างเพื่อจะนำแบนที่ตรวจวัดได้ไปทำการ plot graph โดยจะให้เลือกข้อมูลที่มีอยู่เฉพาะ ในโครงร่างที่เราต้องการ เพื่อป้องกันข้อมูลรบกวนที่อาจจะเกิดอยู่ภายในรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
103078



รูปที่ 2.12 ภาพระดับความเข้มเทาและภาพที่ได้หลังจากการหา Contour Detection

ซึ่งจากทฤษฎีการประมวลผลภาพที่ได้กล่าวมานั้นจะถูกนำมาใช้ในการประมวลผลภาพที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ภาพดังที่จะกล่าวในบทต่อไป

2.4 วิธีการ Least Square

หลังจากได้ตำแหน่งของแถบสีใน DNA ซึ่งได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis ขั้นต่อไปคือการคำนวณหามวลโมเลกุลของ DNA โดยใช้ระยะทางของแถบสีมาคำนวณโดยการประมาณฟังก์ชัน เพื่อหาเส้นตรงที่เหมาะสม เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง $\log_{10}$ ของมวลโมเลกุล กับ $\log_{10}$ ของระยะทางของแถบสี วิธีการที่ใช้ในการประมาณเส้นตรงที่ใช้ในโครงงานนี้ก็คือการ Least Square ซึ่งมีหลักการดังนี้

เมื่อมีข้อมูลมา n ชุด ได้แก่ $(x_1, f(x_1)),(x_2, f(x_2)),(x_3, f(x_3)),...(x_n, f(x_n))$ ต้องสร้างฟังก์ชัน $g(x)$ เพื่อใช้ประมาณ $f(x)$ ในรูปแบบPolynomial degree m ซึ่งจะได้

$$g(x) = a_0 + a_1 x + a_2 x^2 + ... + a_n x^n \tag{2.7}$$

ค่าความผิดพลาดในการประมาณคำนวณได้จาก

$$e(x) = f(x) - g(x) \tag{2.8}$$

ผลรวมกำลังสองของความผิดพลาดจะเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$E = \sum_{i=1}^{n} e^2(x_i)$$

$$E = \sum_{i=1}^{n} | f(x_i - g(x_i) |^2$$

$$E = \sum_{i=1}^{n} (g(x_i - f(x_i))^2$$

หรือ

$$E = \sum_{i=1}^{n} (a_0 + a_1 x_i + a_2 x_i^2 + ... + a_n x_{i_i}^m - f(x_i))^2 \quad (2.9)$$

เพื่อให้มีค่า E ที่ต่ำที่สุด เราจะเลือกค่า $a_0, a_1, ..., a_n$ ที่เหมาะสมโดยการหาอนุพันธ์ของ E ในเทอม a_i ให้เท่ากับ 0

$$\frac{\partial E}{\partial a_j} = \frac{\partial}{\partial a_j} \sum (a_0 + a_1 x_i + a_2 x_i^2 + ... + a_n x_{i_i}^m - f(x_i))^2 = 0 \quad (2.10)$$

$$\frac{\partial E}{\partial a_j} = 2 \sum_{i=1}^{n} (a_0 + a_1 x_i + a_2 x_i^2 + ... + a_n x_{i_i}^m - f(x_i)) x_i^j = 0 \quad (2.11)$$

จะได้

$$a_0 \sum_{i=1}^{n} x_i^j + a_1 \sum_{i=1}^{n} x_i^{j+1} + ... + a_m \sum_{i=1}^{n} x_i^{j+m} = \sum_{i=1}^{n} x_i^j f(x_i) \quad (2.12)$$

เนื่องจากตัวแปรไม่ทราบค่า $a_0, a_1, ..., a_m$ อยู่ $m+1$ ตัว จะต้องมีสมการ $m+1$ สมการ ได้แก่

$$\frac{\partial E}{\partial a_0} = 0, \frac{\partial E}{\partial a_1} = 0, ..., \frac{\partial E}{\partial a_m} = 0 \quad (2.13)$$

จะได้สมการที่ (1) เป็น

$$a_0 \sum_{i=1}^{n} x_i^0 + a_1 \sum_{i=1}^{n} x_i^1 + ... + a_m \sum_{i=1}^{n} x_i^m = \sum_{i=1}^{n} x_i^0 f(x_i) \quad (2.14)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือ

$$na_{0+}a_1\sum_{i=1}^{n}x_i+a_2\sum_{i=1}^{n}x_i^2+\ldots+a_m\sum_{i=1}^{n}x_i^m=\sum_{i=1}^{n}f(x_i) \tag{2.15}$$

สมการอื่นๆจะได้

$$a_0\sum_{i=1}^{n}x_i^j+a_1\sum_{i=1}^{n}x_i^{j+1}+\ldots+a_m\sum_{i=1}^{n}x_i^{j+m}=\sum_{i=1}^{n}x_i^j f(x_i) \tag{2.16}$$

$j=1,2,3,\ldots,m$

เมื่อจัดในรูป Matrix จะได้

$$\begin{bmatrix} n & \sum_{i=1}^{n}x & \sum_{i=1}^{n}x^2 & \ldots\sum_{i=1}^{n}x^m \\ \sum_{i=1}^{n}x & \sum_{i=1}^{n}x^2 & \sum_{i=1}^{n}x^3 & \ldots\sum_{i=1}^{n}x^{m+1} \\ \ldots & \ldots & \ldots & \ldots \\ \sum_{i=1}^{n}x^m & \sum_{i=1}^{n}x^{m+1} & \sum_{i=1}^{n}x^{m+2} & \ldots\sum_{i=1}^{n}x^{2m} \end{bmatrix}\begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ \ldots \\ a_n \end{bmatrix}=\begin{bmatrix} \sum_{i=1}^{n}f(x_i) \\ \sum_{i=1}^{n}x_i f(x_i) \\ \ldots \\ \sum_{i=1}^{n}x_i^m f(x_i) \end{bmatrix} \tag{2.17}$$

จากนั้นจึงทำการแก้สมการโดยวิธีการเชิงตัวเลขเพื่อ หาค่า $a_0,a_1,\ldots,a_m$ ออกมาในกรณีของสมการเชิงเส้นเราจะให้ $g(x)$ อยู่ในรูป $g(x)=a_0+a_1x$ แล้วจึงใช้วิธีการ Least square ในการประมาณค่า a_0 และ a_1

ในบทหน้าเราจะอธิบายถึงวิธีการและรายละเอียดของการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis วิธีการคำนวณมวลโมเลกุลจากภาพที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis และการนำภาพที่ได้จากการทดลองมาประมวลผลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การออกแบบโครงงาน

บทนี้เป็นการอธิบายวิธีการและรายละเอียดของการทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis วิธีการคำนวณเพื่อหามวลโมเลกุลของ DNA ที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis และในส่วนของการนำภาพที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis มาประมวลผลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

3.1 การทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis

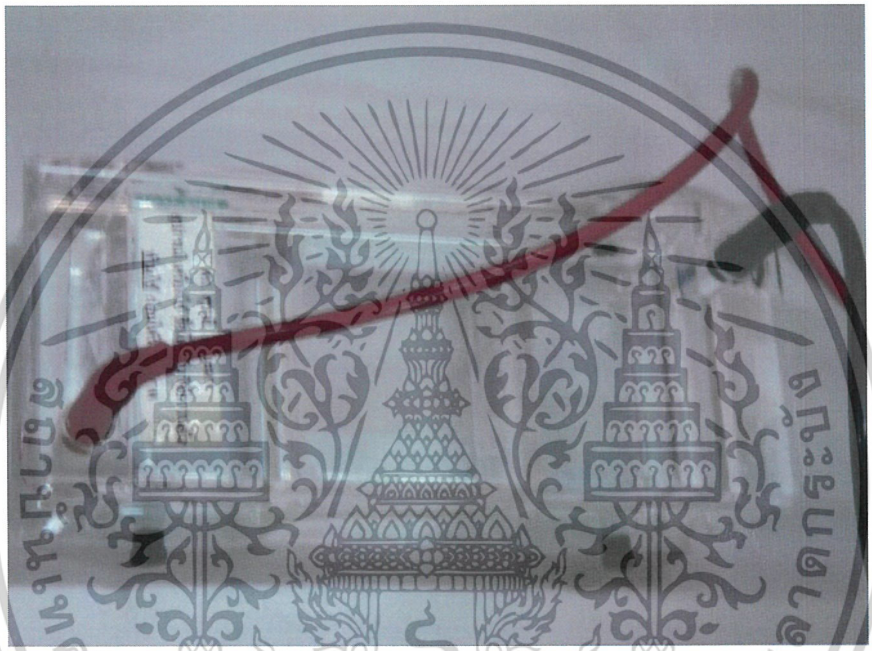
Agarose Gel Electrophoresis เป็นกระบวนการที่ใช้แยก DNAของสารตัวอย่างโดยใช้ไฟฟ้าเพื่อตรวจหาองค์ประกอบของ DNAในสารตัวอย่าง เพื่อประโยชน์ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของสารตัวอย่าง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis

1. เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell (รูปที่ 3.1)ใช้แยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยที่ DNA จะมีองค์ประกอบที่มีประจุลบ(หมู่ฟอสเฟต) ดังนั้นเราจึงสามารถแยกส่วนของ ACTG ออกมาได้
2. DNA ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง (รูปที่ 3.3) ในการทดลองนี้เราได้ใช้ DNA ที่มีชนิดเดียวกันแต่มีสารละลายที่ใช้ในการตัด DNA ที่ต่างกัน
3. Power Supply (รูปที่ 3.5)
4. Pipette ใช้ในการดูดสารที่อยู่ในหลุม (รูปที่ 3.4)
5. Tips (รูปที่ 3.8)
6. ถาดวางเจล (รูปที่ 3.12)
7. DNA Ladder คือ DNAที่มีการตัดเป็นชิ้นให้แล้วเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ DNA ที่เราได้ใช้ในการทดลอง(รูปที่ 3.11)
8. สีที่ใช้ย้อม DNA ในที่นี้เราได้ใช้ Bromophemol Blue หรือ Xylene Cyanol (รูปที่ 3.10)
9. เครื่อง UVP Trasilluminator และเครื่อง UV Transilluminator (รูปที่ 3.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Electrophoresis buffer ในการทดลองนี้เราได้ใช้สาร Tris-acetate-EDTA (TAE) ที่นิยมใช้ สารนี้เนื่องจากเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดีนอกจากนี้ยังมีค่า PH ที่ 8.2 ทำให้ DNA มีประจุเป็นลบ (รูปที่ 3.9)
11. Ethidium bromide ใช้เพื่อใช้ในการย้อมสีเจลให้ติดทำให้สามารถเห็นผ่าน UV ได้ สารตัวนี้อันตรายอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้เวลาทดลองควรระวัง



รูปที่ 3.1 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell

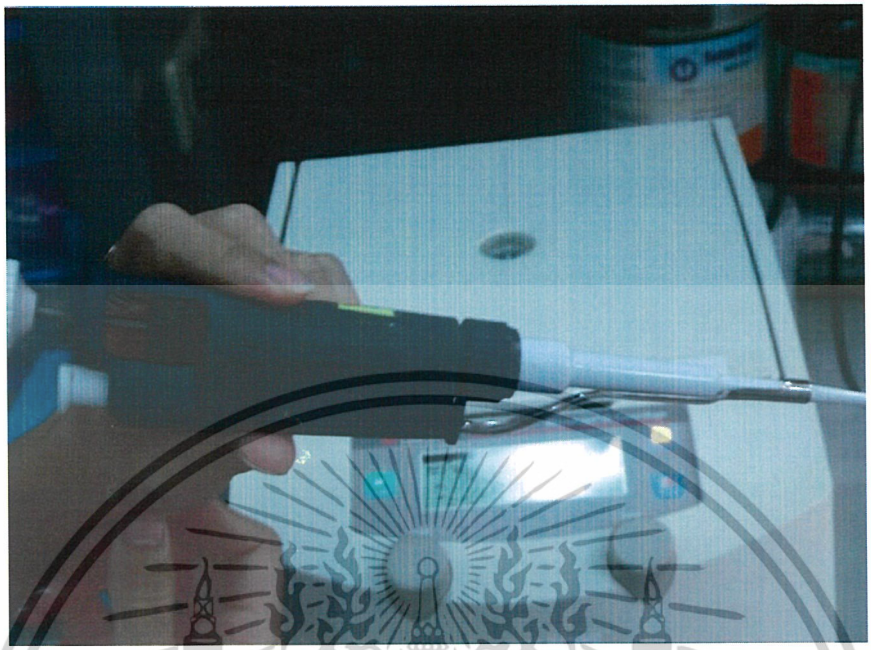
เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ เป็นระบบ Electrophoresis ใช้แยกโปรตีนและกรดนิวคลิอิกออกจากกันเพื่อที่จะใช้ตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีนที่ได้จากการรัน Gel ในแต่ละครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.2 เครื่อง Electrophoresis MAXI CELL EC360M DNA Cell

รูปที่ 3.3 สาร DNA ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลายเพื่อตัดส่วนของ DNA แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 Pipette

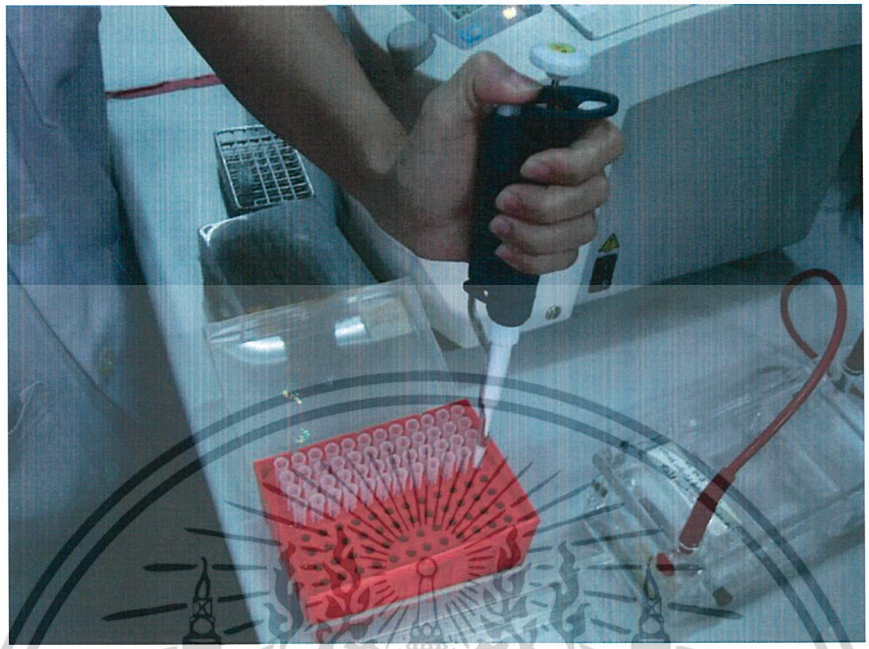
รูปที่ 3.5 Power Supply

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.6 สาร Agarose ที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3.7 สาร Agarose Gel ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน

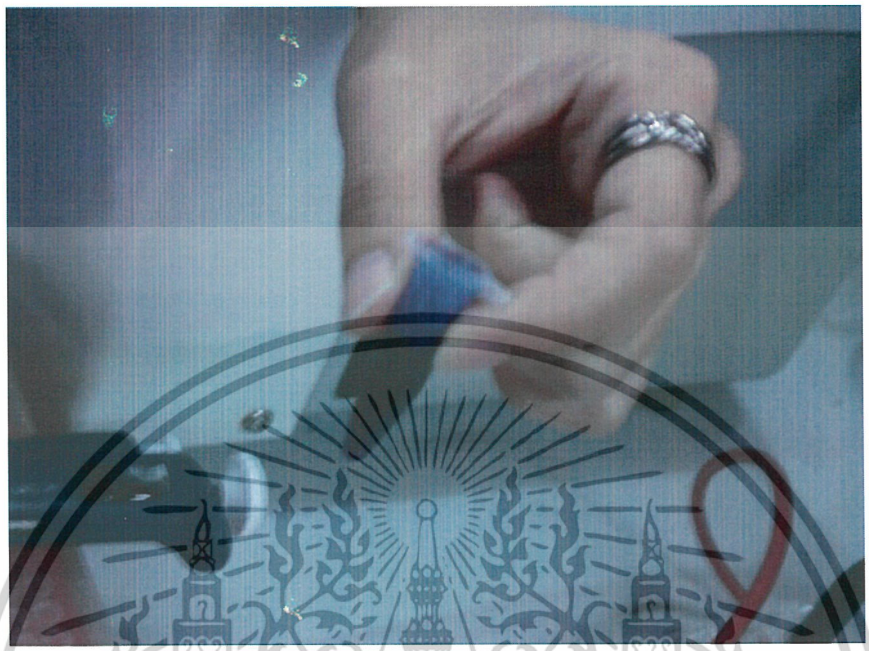
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



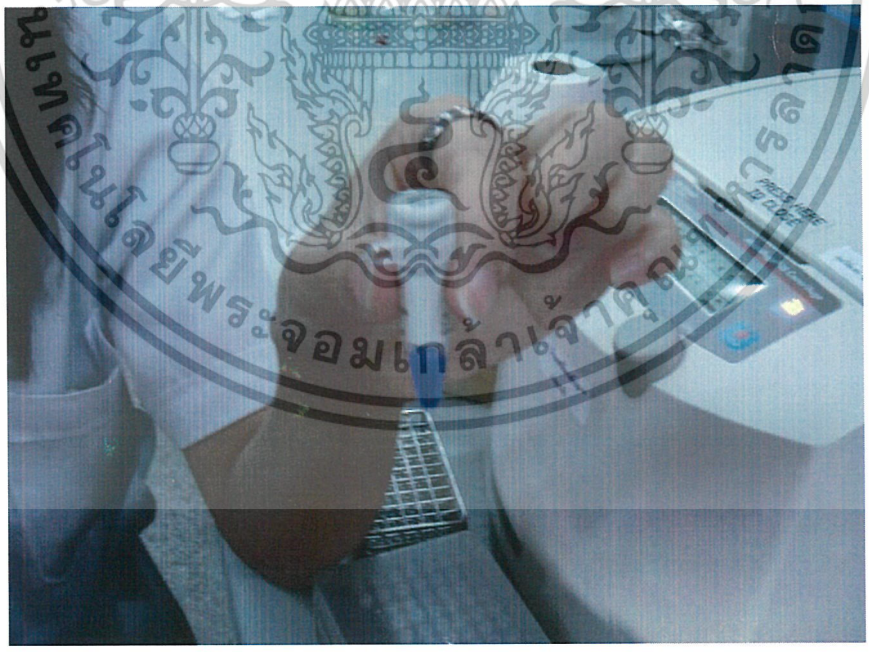
รูปที่ 3.8 Tips อุปกรณ์ที่ใช่สำหรับวางหลอด

รูปที่ 3.9 สาร Tris-acetate-EDTA (TAE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

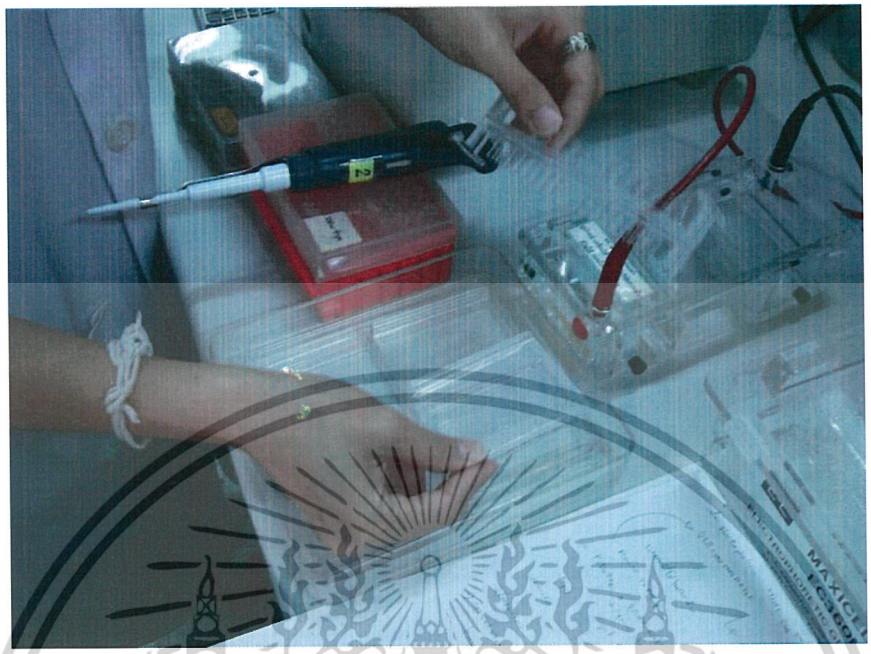


รูปที่ 3.10 สีที่ใช้ย้อม DNA ในที่นี้เราได้ใช้ Bromophemol Blue หรือ Xylene Cyanol



รูปที่ 3.11 DNA Ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.12 ถาดวางเจล

รูปที่ 3.13 เครื่อง UVP Trasilluminator และเครื่อง UV Transilluminator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 ขั้นตอนการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis

ในขั้นตอนนี้จะแบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือ ขั้นตอนการทำเจล กับ ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยไฟฟ้า

3.1.2.1 ขั้นตอนการทำเจล

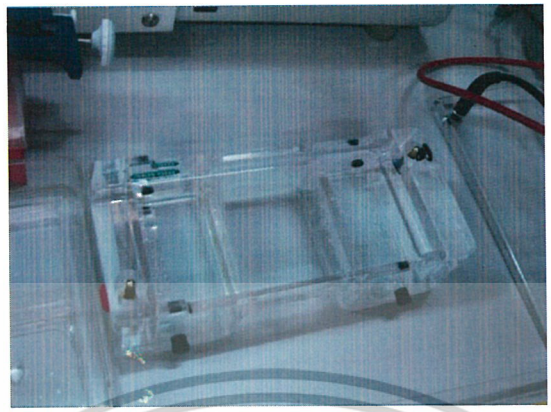
นำผง Agarose Gel ผสมกับ Electrophoresis buffer (1xTAE) จากนั้นก็นำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนกว่า ผง Agarose Gel กับ สาร Electrophoresis buffer (1xTAE) จะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อผสมเป็นเนื้อเดียวกันเรียบร้อยแล้ว เทลงแท่นพิมพ์ แล้วปล่อยรอให้เย็นประมาณ 30 นาที เจลจะแข็งตัวมีลักษณะคล้ายพลาสติกดังรูปที่ 3.14

รูปที่ 3.14 เจลที่แข็งตัวพร้อมใช้งานแล้ว

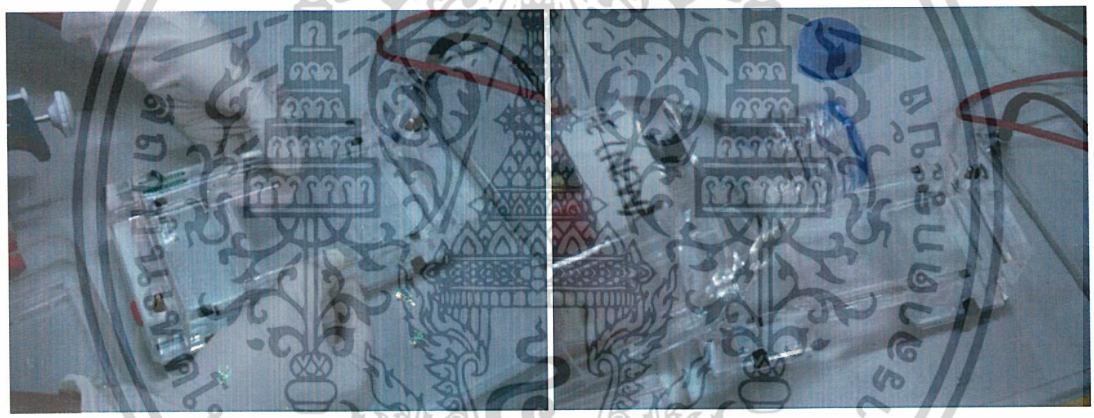
3.1.2.2 ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า

เทสาร Electrophoresis buffer (1xTAE) ลงในเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ดังรูปที่ 3.15 แล้วนำเจลที่ได้จากการทดลองในขั้นตอนมาวางในเครื่องโดยให้ด้านลบอยู่ด้านบน หลังจากนั้นที่จะเทสารละลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) จนท่วมเจลดังรูปที่ 3.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.15 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ที่เทสารละลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) แล้ว

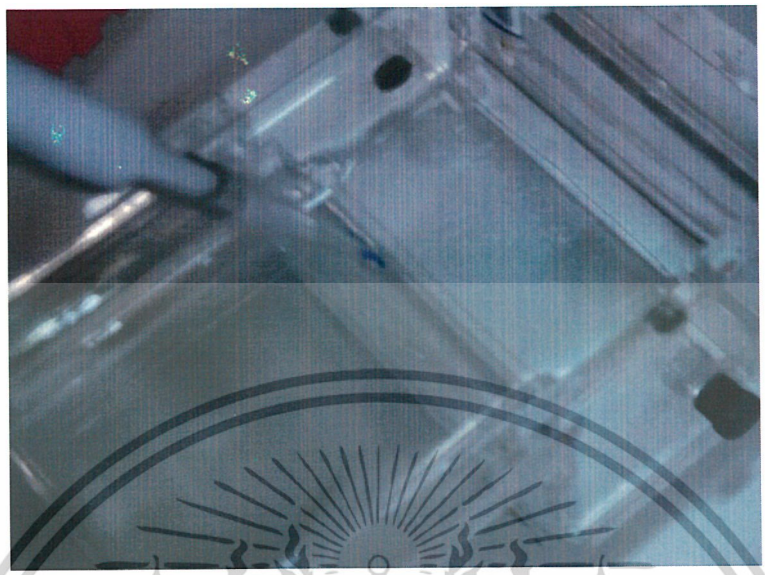


<ก> <ข>

รูปที่ 3.16 นำเจลมาวางลงในเครื่องElectrophoresis Mini SUB™ DNA Cell แล้วเทสารสะลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) จนท่วมเจล

หลังจากนั้นทำความสะอาดเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ที่มีสารละลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) ท่วมเจลโดยใช้ Pipette ที่แสดงดังรูปที่ 3.17 เพื่อป้องกันฝุ่นละออง ที่มีในเครื่องElectrophoresis Mini SUB™ DNA Cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.17 ทำความสะอาดเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell โดยการใช้ Pipette

หลังจากนั้นเราจะมาดูว่าในเจลนั้นมีหลุมที่เราจะใช้ทดลอง 6 หลุมซึ่งในแต่ละหลุมเราจะใส่ DNA ที่ต่างชนิดต่างสารละลายที่ใช้ตัด DNA แล้วก็ต่างความเข้มข้นกันดังนี้

ในหลุมที่ 1 จะใส่ 1kb DNA Ladder 3 µl

ในหลุมที่ 2 จะใส่ λ hind III digested 1.5 µl

ในหลุมที่ 3 จะใส่ λ hind III digested 1 µl

ในหลุมที่ 4 จะใส่ λ hind III digested 0.5 µl

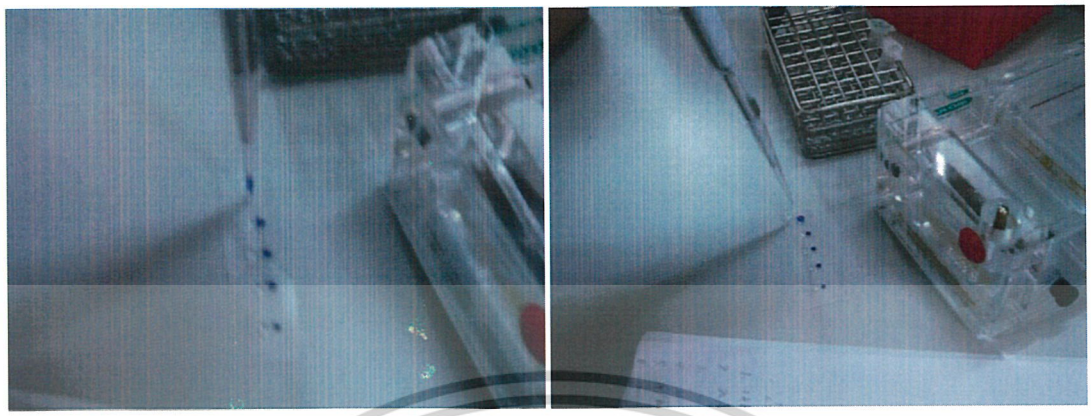
ในหลุมที่ 5 จะใส่ λ BanHI digested 1.5 µl

ในหลุมที่ 6 จะใส่ λ BanHI digested 1 µl

*** λ คือชนิดของ DNA hind III, BanHI คือสารละลายที่ใช้ในการตัดDNA

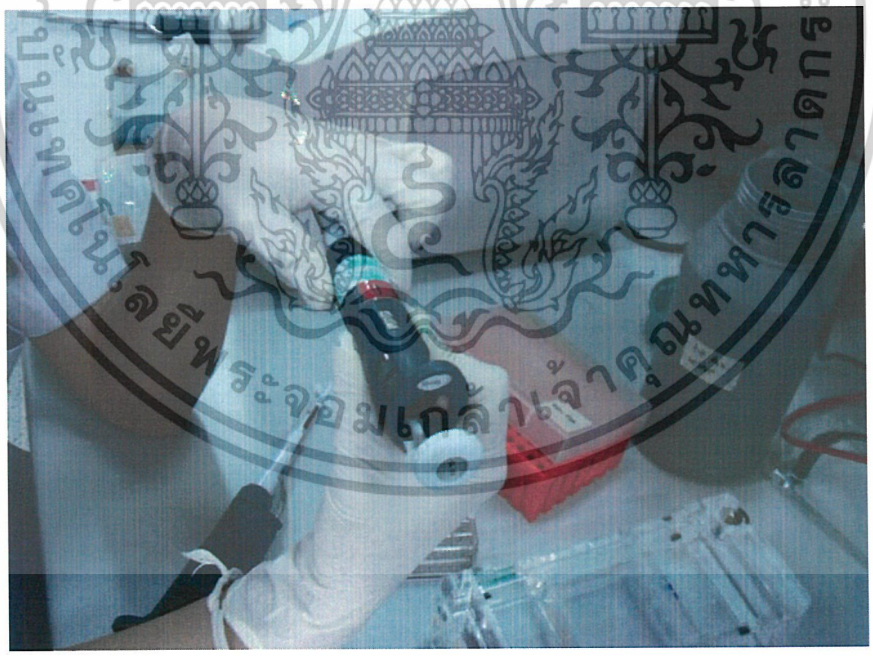
ก่อนที่เราจะนำ DNA มาใส่หลุมของช่องในเจล จะมีการนำมาผสมน้ำเพื่อให้ปริมาตรได้เท่ากับ 6 ul โดยใช้ Pipette เป็นอุปกรณ์ช่วยดังรูปที่ 3.18 ถึงรูปที่ 3.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<ก> <ข>

รูปที่ 3.18 นำสาร DNA แต่ละชนิดที่มีปริมาตรตามที่กำหนด แล้วนำมาผสมกับน้ำโดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 6 µl



รูปที่ 3.19 การใช้ Pipette ในการช่วยปรับปริมาตรของสารตามที่ต้องการ

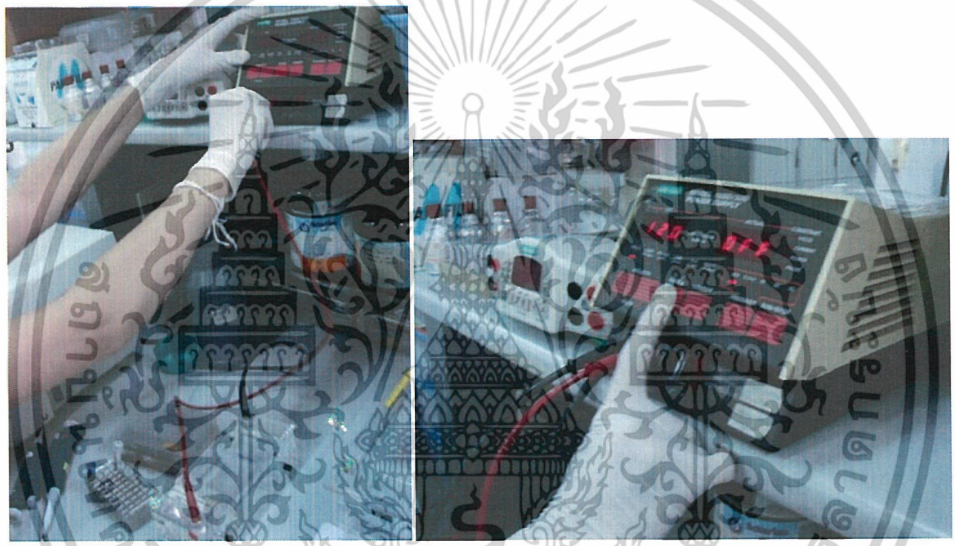
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.20 การหยดสาร DNA ที่ผสมน้ำจนมีปริมาตรรวมเท่ากับ 6 ul ลงในแต่ละหลุมของเจลในเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell

รูปที่ 3.21 เจลที่มีการใส่สาร DNA ลงในแต่ละหลุมเรียบร้อยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

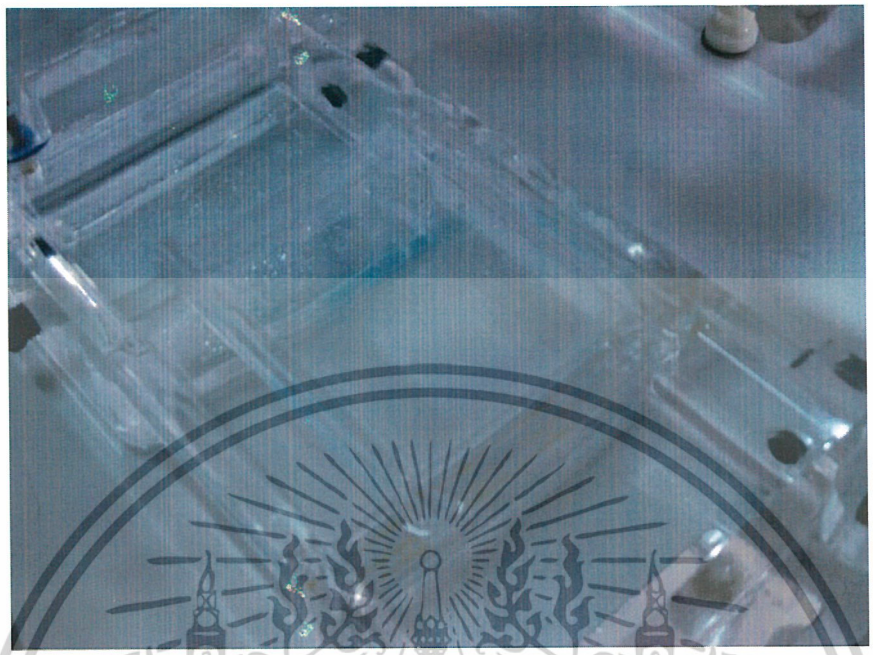
นำเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ต่อกับ Power Supply โดยให้ Power Supply ให้ไฟประมาณ 80 V ดังรูปที่ 3.22 หลังจากนั้นก็รอประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ระยะเคลื่อนที่ในเจลสามารถเห็นได้ชัดเจน ดังรูปที่ 3.23 เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำเจลไปย้อมสี (Ethidium bromide) เพื่อให้เรืองแสง รอประมาณ 10 นาที



<ก> <ข>

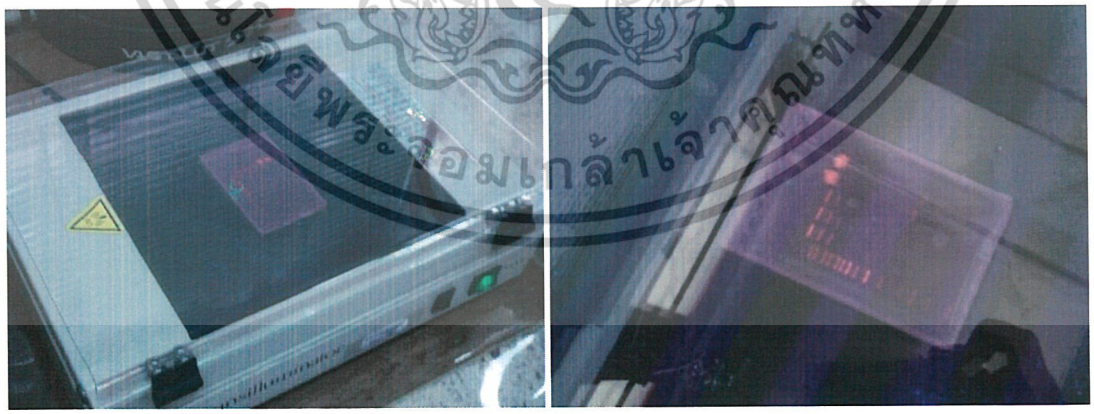
รูปที่ 3.22นำเครื่องเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ต่อกับ Power Supply โดยให้ Power Supply ให้ไฟประมาณ 80 V

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.23 การวิ่งของ DNA เมื่อมีการปล่อยกระแสไฟฟ้าในเจล

หลังจากผ่านกระบวนการข้างต้นเรียบร้อยแล้วเราก็จะได้เจลที่มีการวิ่งของ DNA เรียบร้อย หลังจากนั้นเราต้องนำไปดูผ่านเครื่อง UV Transilluminator และเครื่อง UVP Trasilluminator ดังรูปที่ 3.24 ถึง 3.26

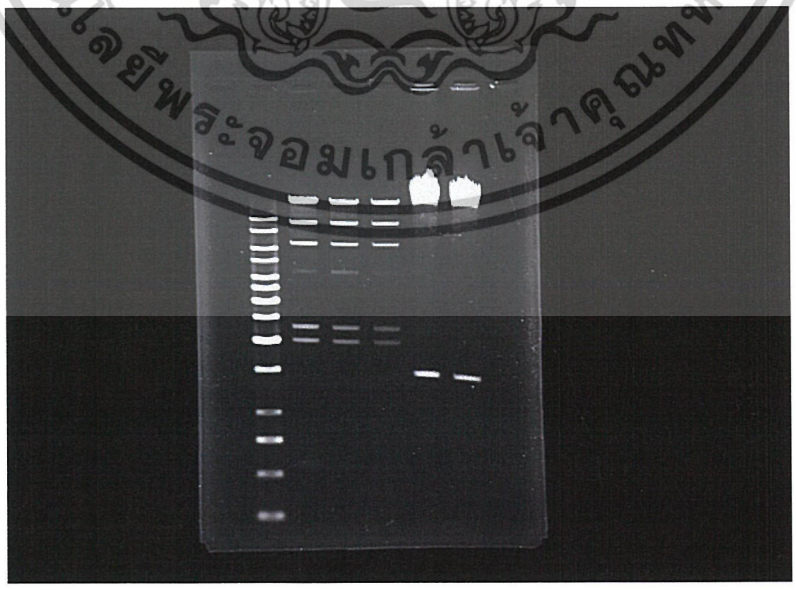


<ก> <ข>

รูปที่ 3.24 นำเจลที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis มาดูผ่านเครื่อง UV Transilluminator ซึ่งเครื่อง UV Transilluminator ข้างใต้จะมีหลอด UV อยู่ เพื่อสามารถดูเจลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.25 ภาพจากหน้าจอคอมพิวเตอร์เมื่อดูผ่านเครื่อง UVP Trasilluminator



รูปที่ 3.26 ภาพ DNA ที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้ว

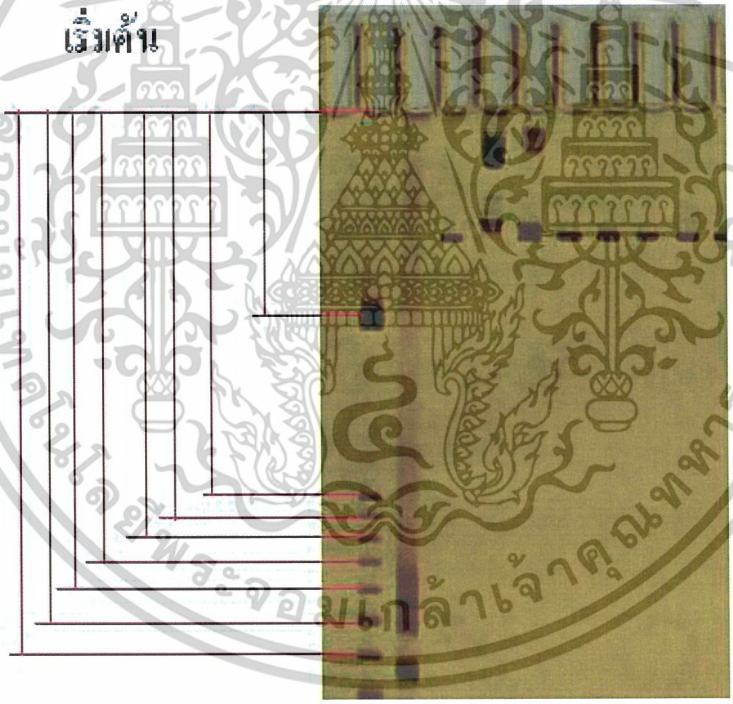
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทางปฏิบัตินักวิเคราะห์จะต้องวัดระยะทางระหว่างช่องใส่ตัวอย่าง DNA ถึงตำแหน่งของแถบสีเพื่อนำไปคำนวณน้ำหนักโมเลกุล นอกจากนี้ยังต้องวัดความเข้มข้นของแถบสีเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ DNAอีกด้วย

3.2 ขั้นตอนการคำนวณหาปริมาณโมเลกุลของแต่ละแถบสี

เมื่อนำ DNA ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis เรียบร้อย ภาพ Agarose Gel ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโมเลกุลตามหลักการดังต่อไปนี้

ขั้นตอนแรกทำการวัดระยะทาง (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) จากจุดเริ่มต้นจนถึงแถบสี นั้น ๆ ของสารตัวอย่าง โดย 1 สารตัวอย่างจะวัดระยะทางของแถบสี ไม่เกิน 15 ค่า ดังแสดงในรูปที่ 3.27



รูปที่ 3.27 การวัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงแถบสีแต่ละแถบ (ที่มาจาก [7])

ขั้นตอนที่สอง บันทึกค่า Size ของ DNA ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานและคำนวณหาค่า Log (size) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

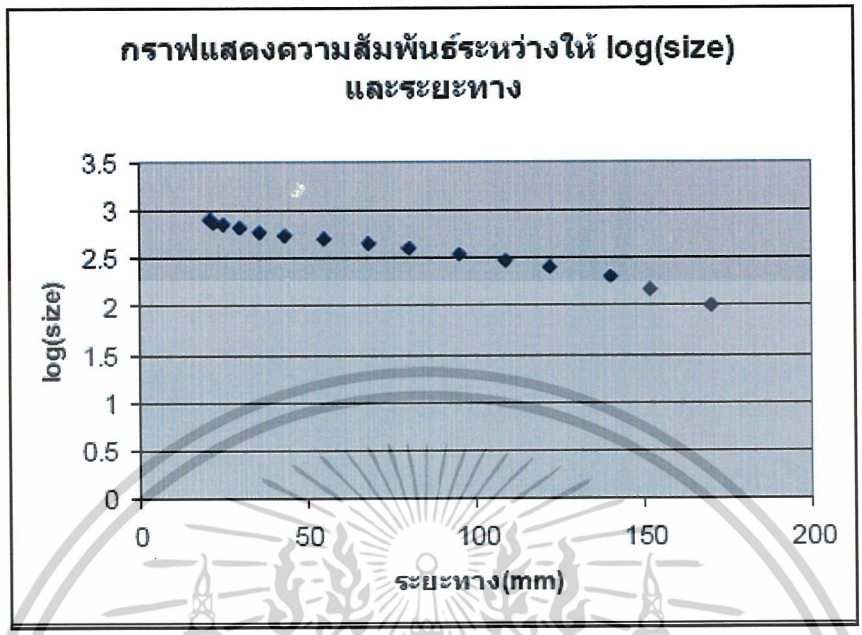
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั้น DNA ที่	ระยะทาง(mm)	Size(bp)	Log(size)
1	21	800	2.903
2	22	750	2.875
3	25	700	2.845
4	30	650	2.813
5	36	600	2.778
6	43	550	2.74
7	55	500	2.699
8	68	450	2.653
9	80	400	2.602
10	95	350	2.544
11	109	300	2.477
12	122	250	2.398
13	140	200	2.301
14	152	150	2.176
15	170	100	2

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงการคำนวณหาปริมาตรมวลโมเลกุลของแต่ละแถบสี

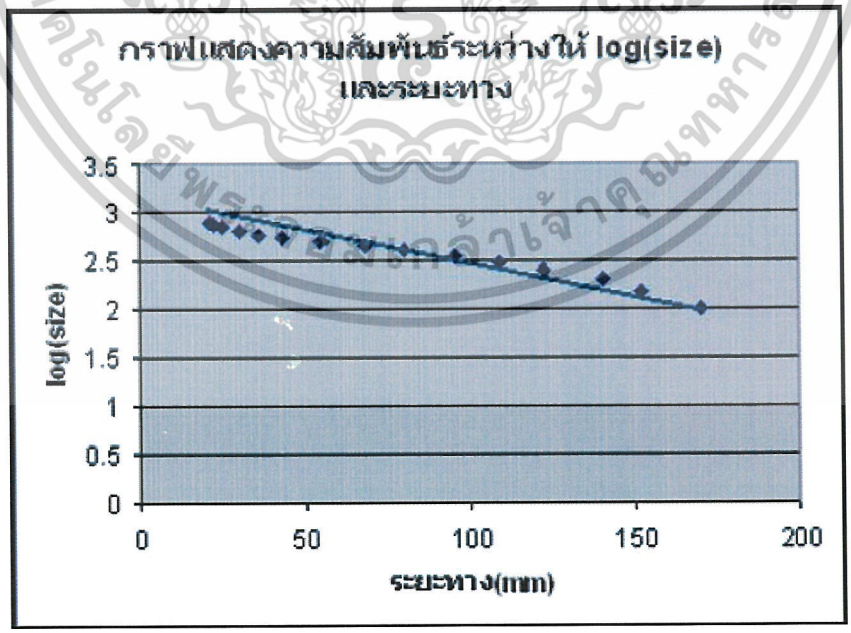
ขั้นตอนที่สาม นำค่า Log (size) และระยะทางที่วัดได้ไปวัดกราฟ โดยให้ Log (size) อยู่แกน y และระยะทางอยู่แกน x ดังรูปที่ 3.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log (size) และระยะทางที่วัดได้ (ที่มาจาก [7])

ขั้นตอนที่สี่ ประมาณค่ากราฟให้รูปที่ออกมาเป็นสมการเส้นตรงและหาค่าสมการนั้นออกมาดังรูป 3.29



รูปที่ 3.29 กราฟเส้นตรงจากการประมาณความสัมพันธ์ (ที่มาจาก [7])

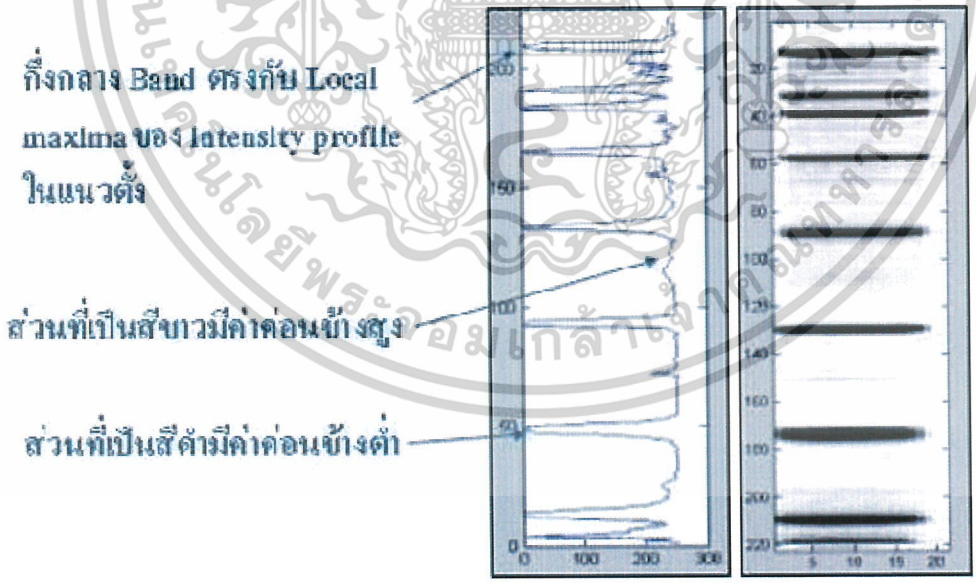
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ห้า นำค่าระยะทางที่ได้แต่ละค่าแทนในสมการเส้นตรงที่ได้คำนวณในขั้นตอนที่สี่ผลลัพธ์ที่ได้คือ ค่า Log(Size) ของ DNA ในแต่ละแถบสี

ขั้นตอนสุดท้ายทำการปลดค่า Log ออกก็จะได้ค่ามวลโมเลกุลของแต่ละแถบสีตามที่ต้องการ

3.3 การประมวลภาพ Agarose Gel

หลังจากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis เราจะได้ภาพ Agarose Gel ซึ่งเราจะนำภาพที่ได้มาผ่านการประมวลผลโดยใช้หลักการประมวลผลภาพเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ DNA (อธิบายไว้ในบทที่สอง) ช่วยในการประมวลผลภาพ Agarose Gel ในส่วนของ Algorithm ที่ใช้ในการวิเคราะห์ภาพนั้นจะมีขั้นตอนในการปรับแต่งภาพ การปรับภาพเป็นขาวดำ การปรับแสงของภาพ การลดสัญญาณรบกวนในภาพ การตรวจหา กำหนดขอบของเลนแต่ละเลนในภาพ และยังมีการหาจุดกึ่งกลางของแถบภาพในแต่ละเลนอีกด้วย ซึ่งผลสำเร็จของการประมวลผลภาพ Agarose Gel จะเป็นดังรูปที่ 3.30



รูปที่ 3.30 Intensity profile ตามแนวตั้งของภาพถ่ายอะกาโรสเจลใน 1 เลน (ที่มาจาก [7])

ในบทต่อไปเราจะกล่าวในส่วนของผลการทดลองเมื่อมีการนำภาพที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis มาภาพกระบวนการวิเคราะห์ภาพเพื่อคำนวณหามวลโมเลกุลของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

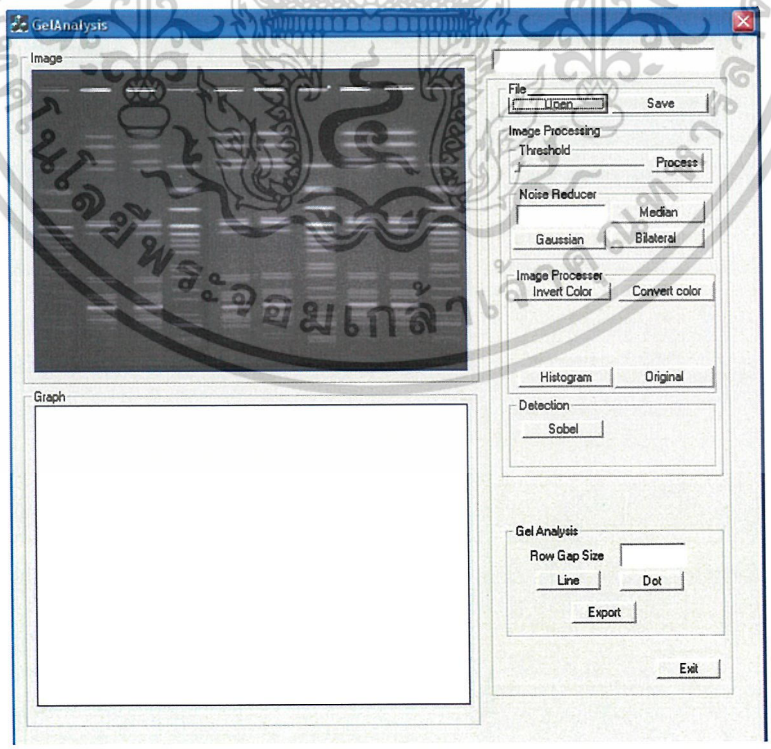
บทที่ 4
การทดลองและผลการทดลอง

บทนี้กล่าวถึงการอธิบายผลการทดลองที่ได้จากโครงงานเมื่อนำภาพ Agarose Gel ไปประมวลผลและวิเคราะห์ในคอมพิวเตอร์เพื่อให้ได้ค่าที่ออกมาเป็นกราฟเพื่อที่จะเก็บบันทึกลงในฐานข้อมูลได้

4.1 การทดลองการทำงานของระบบที่ใช้วิเคราะห์เลนแต่ละเลนของภาพ Agarose Gel

เมื่อเราทำการทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis เสร็จสมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว เราจะได้ภาพ Agarose Gel แสดงดังรูปที่ 3.33 ในบทที่ 3 เราจะเห็นว่าภาพ Agarose Gel ที่ได้จากการทดลองนั้นจะมีลักษณะเป็นเลนย่อยๆหลายเลน แล้วในแต่ละเลนจะประกอบไปด้วยแถบสีขาวหลายแถบ แล้วจากภาพที่ได้นี้เราสามารถแยกดูว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใดได้ แล้วในขั้นตอนต่อไปเราจะทำการประมวลผลภาพ Agarose Gel

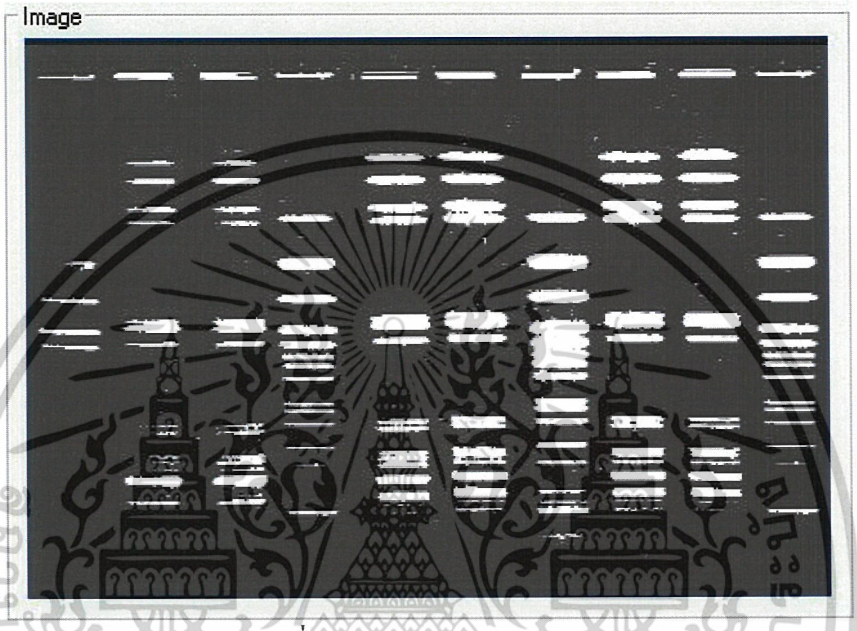
ขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ภาพ Agarose Gel คือการ Load ภาพเข้ามาในโปรแกรม



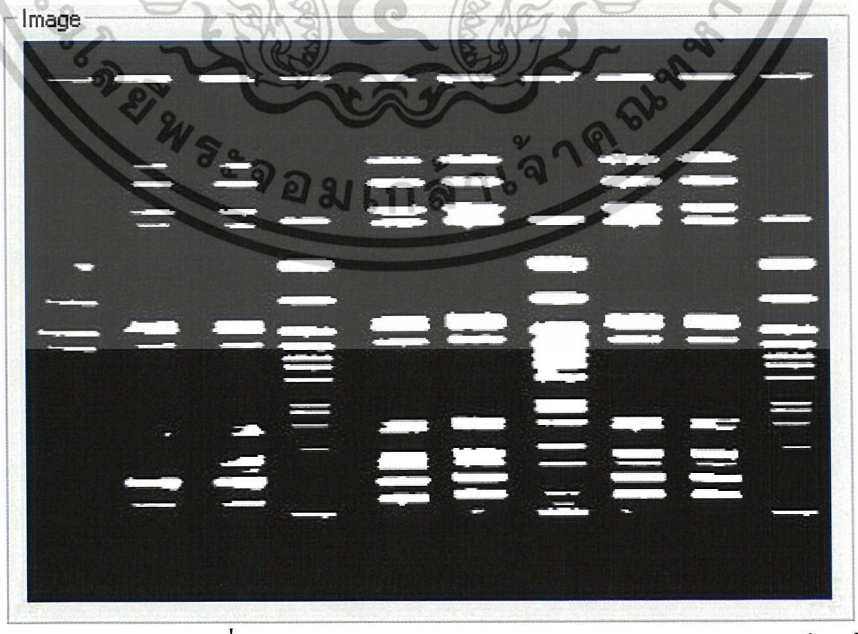
รูปที่ 4.1 ภาพ Agarose Gel ที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นต่อไปในการประมวลภาพต้องมีการปรับแสงของภาพและลดสัญญาณรบกวนก่อน เพื่อให้ภาพ Agarose Gel เพื่อให้ความคมชัดมากยิ่งขึ้น เพื่อที่จะได้แสดงผลค่าออกมาได้ค่าที่สมบูรณ์มากที่สุด โดยใช้วิธีการทำ Threshold และ Median Filter



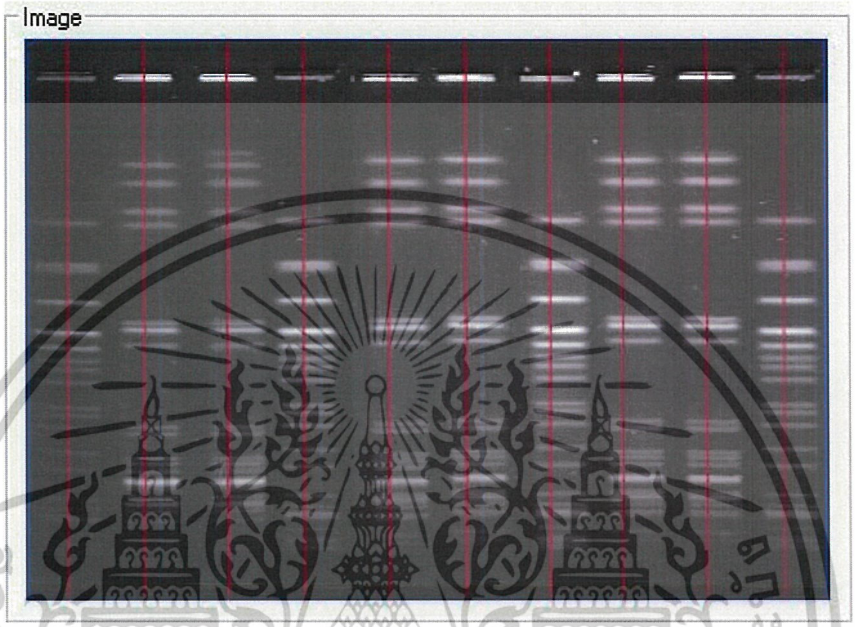
รูปที่ 4.2 [ก] ภาพ Agarose Gel เมื่อผ่านกระบวนการปรับแสงก่อนลดสัญญารบกวน



รูปที่ 4.2 [ข] ภาพ Agarose Gel เมื่อผ่านกระบวนการปรับแสงและลดสัญญารบกวนเรียบร้อยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากผ่านขั้นตอนในการปรับแสงและลดสัญญาณรบกวนของภาพเรียบร้อยแล้ว ดังแสดงรูปที่ 4.2 จะนำภาพที่ได้มาทำการหาจุดกึ่งกลางของของแถบในแต่ละเลนเมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วจะได้ผลดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ภาพ Agarose Gel ที่มีการตรวจจับในแต่ละเลนแล้ว

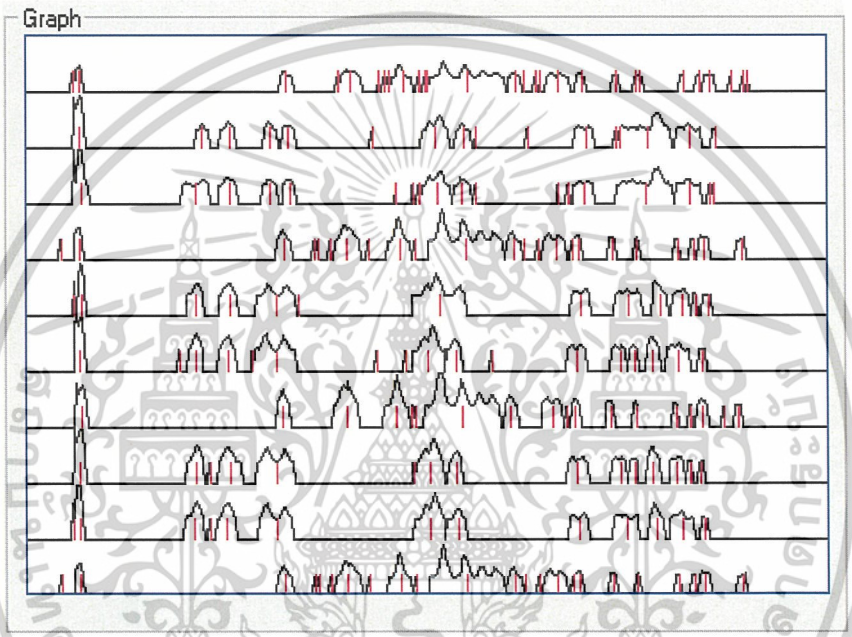
Algorithm อีกตัวคือการตรวจสอบเลนแต่ละเลนโดยใช้จุด ในการ ตรวจสอบ ดังรูปที่ 4.4

รูปที่ 4.4 ภาพ Agarose Gel ที่มีการตรวจจับเลนโดยใช้แบบจุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนต่อไปจะมีการตรวจจับเลนแต่ละเลนต่างๆออกมาเพื่อทำการวิเคราะห์แถบสีในแต่ละเลน เพื่อแสดงออกมาเป็นกราฟ หลังจากนั้นจะมีการนำกราฟที่ได้ไปลบพื้นหลังของภาพเพื่อให้ผลที่ออกมาสามารถคำนวณมวลโมเลกุลได้อย่างถูกต้องสมบูรณ์ที่สุด

จากผลที่ได้ข้างต้นเราจะนำข้อมูลมา นำเสนอในรูป กราฟความหนาแน่นของข้อมูล ดังแสดงในรูปที่ 4.5

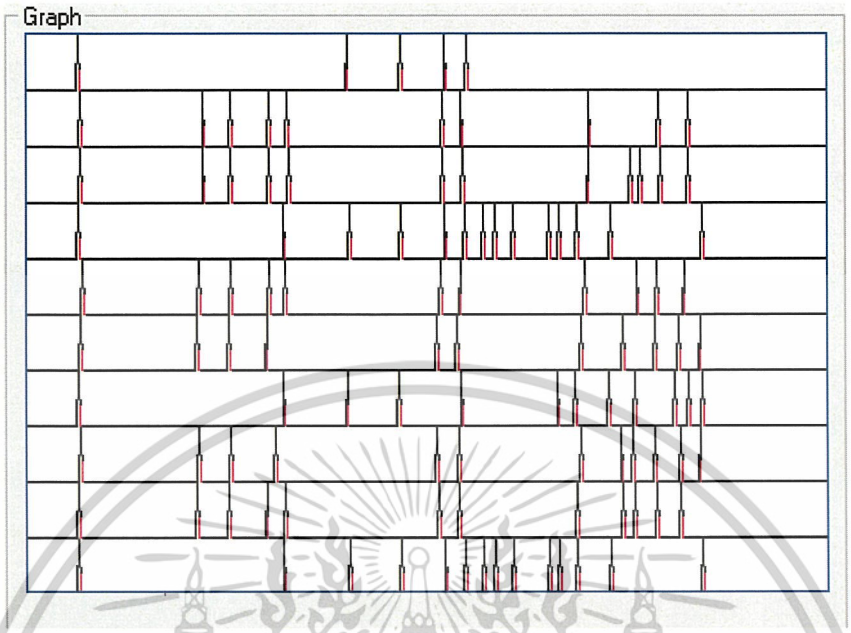


รูปที่ 4.5 ภาพการ plot Graph โดยใช้วิธีการตรวจจับแบบเส้น

จากรูปที่ 4.3 กราฟที่แสดงในรูป 4.5 จะสลับกัน โดยข้อมูลที่ได้จากการตรวจจับข้อมูลในแต่ละเลนจะนำมา Plot ในลักษณะแนวนอน เพื่อเปรียบเทียบ ว่าในแต่ละเลนนั้นมีความเหมือนหรือต่างกันเพียงใด โดยก่อนที่จะนำข้อมูลดังกล่าวไปเรียบเทียบ การสังเกตด้วยตาเปล่าจะเป็นการยืนยันถึงข้อมูลนั้นๆว่าออกมาถูกต้องหรือไม่

หากรูปภาพนั้นมีลักษณะเบี้ยว ก็จะใช้การตรวจจับแบบ จุดแทน ภาพด้านล่างเป็น กราฟของการตรวจจับแบบจุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ภาพการ plot Graph โดยใช้วิธีการตรวจจับแบบจุด

ซึ่งการทดลองแสดงให้เห็นว่า การตรวจจับแบบเส้น จะให้ข้อมูลที่ละเอียดกว่าแบบจุด หากภาพต้นแบบนั้น เป็นภาพที่ดี เลนแต่ละเลนเรียงเป็นแถวซึ่งแบบเส้นนี้สามารถตรวจจับได้ง่าย ส่วนแบบจุดนั้น จะให้ข้อมูลที่มากกว่า แบบเส้นถ้าภาพต้นแบบนั้นมีลักษณะบิดเบี้ยว

ข้อมูลที่จะได้จะแบ่งออกเป็น สองส่วน คือ

1. Matrix ระดับบิตของเลน
2. ผลคำนวณ น้ำหนักมวลโมเลกุล

```
    10      21
0    10000111100000000000
1    11111001100001000101O
2    11111001100001011101O
3    10001111110000000000
4    11111001100010001110O
5    11110001100010010111O
6    10001110100110110011O
7    11110001100010010000O
8    11111001100010010000O
9    10001111110000000000
```

รูปที่ 4.7 [ก] Matrix ระดับบิต

```
summass 1 = 976.187
summass 2 = 1716.15
summass 3 = 1744.73
summass 4 = 1187.46
summass 5 = 1738.89
summass 6 = 1606.47
summass 7 = 1198.35
summass 8 = 1552.89
summass 9 = 1745.86
summass 10 = 1187.46
```

รูปที่ 4.7 [ข] ผลคำนวณ น้ำหนักมวลโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำค่าที่ได้จากรูปที่ 4.7 ก ไปคำนวณ ด้วยโปรแกรม restdist ของ phylip จะได้ผลลัพธ์ออกมาในรูป Distance Vector ดังตารางที่ 4.1

0	0.000000 0.159097 0.181945 0.030621 0.170859 0.170859 0.119106 0.133345 0.146646 0.030621
1	0.159097 0.000000 0.015949 0.129888 0.045850 0.045850 0.167974 0.068763 0.051564 0.129888
2	0.181945 0.015949 0.000000 0.149883 0.041280 0.041280 0.144067 0.060360 0.045850 0.149883
3	0.030621 0.129888 0.149883 0.000000 0.140112 0.192466 0.100518 0.159097 0.119106 0.000000
4	0.170859 0.045850 0.041280 0.140112 0.000000 0.033735 0.136084 0.051564 0.037542 0.140112
5	0.170859 0.045850 0.041280 0.192466 0.033735 0.000000 0.103740 0.028850 0.037542 0.192466
6	0.119106 0.167974 0.144067 0.100518 0.136084 0.103740 0.000000 0.149883 0.119106 0.100518
7	0.133345 0.068763 0.060360 0.159097 0.051564 0.028850 0.149883 0.000000 0.010137 0.159097
8	0.146646 0.051564 0.045850 0.119106 0.037542 0.037542 0.119106 0.010137 0.000000 0.119106
9	0.030621 0.129888 0.149883 0.000000 0.140112 0.192466 0.100518 0.159097 0.119106 0.000000

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดง Distance Vector

เราจะนำค่าที่ได้นี้ไปประมวลผลหาความแตกต่างระหว่างเลนได้ Dendrogram ในโปรแกรมอื่นๆอีกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนั้นเราพบว่าภาพ Agarose gel ที่ได้ทำการทดสอบนั้นหากรายละเอียดของภาพไม่ชัดเจนพอ ค่าที่ออกมาจะมีความคลาดเคลื่อนได้ ซึ่งภาพที่จะต้องนำมาประมวลผลนั้นต้องมีความสมบูรณ์ไม่ต่ำกว่า 80 % จึงสามารถประมวลผลได้

5.2 ปัญหาที่ประสบในการทดลอง

ในเบื้องต้นเราพบว่ารูปภาพของ Agarose Gel ที่ได้จากการถ่ายรูปนั้น มีคุณภาพแย่มาก ส่งผลให้ไม่สามารถประมวลผลตามขั้นตอนได้ และถึงแม้จะทำการปรับแต่งอื่นๆแล้วก็ยังคงมีผลทำให้ข้อมูลที่ได้มีผลที่ไม่น่าพึงพอใจ ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจาก

- ฉากพื้นหลังของรูปภาพของ Agarose Gel ที่ถ่ายนั้นไม่มีความเหมาะสม ทำให้เกิดการสะท้อนของแสงและมีสีที่ผิดเพี้ยนไปจากเดิมมาก ซึ่งแม้จะทำการปรับความสว่างและความคมชัดของภาพแล้ว ก็ยังคงมีปัญหาอยู่บ้าง
- สภาพแวดล้อมในการถ่ายรูปเบื้องต้นนั้นไม่มีการควบคุม อย่างเข้มงวด จึงทำให้เกิดสิ่งรบกวนในภาพมีมาก
- มีความผิดพลาดเนื่องจากระบบซึ่งเกิด bug ทำให้มีการเลื่อนของในแต่ละแถบ(ดังรูปที่ 4.7) ทำให้การคำนวณมวลโมเลกุลเกิดความผิดพลาด

และในการวิเคราะห์ภาพ Agarose Gel ด้วยวิธีการพิจารณาจากลักษณะของขอบยังไม่เพียงพอต่อการให้ได้ผลการประมวลอย่างเที่ยงตรงและชัดเจน

5.3 แนวทางการแก้ไขปัญหา

ทำการถ่ายรูปภาพของ Agarose Gel ใหม่ โดยทำการควบคุมสภาพแวดล้อมและฉากพื้นหลังของตัวผลการทดลองในแผ่นทดลอง DNAให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น และต้องมีการแก้ไขความผิดพลาดที่เกิดจากระบบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ข้อเสนอแนะในการพัฒนา

หลังจากที่ทำการทดลองเราพบว่า ในการถ่ายรูปภาพของ Agarose Gel นั้นมีการควบคุมสภาพแวดล้อมและฉากพื้นหลังของภาพให้มีความสมบูรณ์มากขึ้นจะทำให้สามารถลดกระบวนการในการแยกแถบขาวออกจากฉากหลังได้ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทำการ Edge Detection เพราะการทำ Threshold ก็เพียงพอที่จะแยกส่วนของแถบขาวออกจาก Background ได้ และต้องมีการปรับปรุง Algorithm ที่ใช้ในการลบพื้นหลังเพื่อไม่ให้มีการเลื่อนของแถบเมื่อมีการลบพื้นหลังแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

[1] ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2539. โปรตีนและกรดนิวคลีอิค. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ. 11น.

[2] Rafael C. Gonzalez And Richard E. Woods, Digital Image Processing, New Jersey:Prentice Hall, 2001, Page 25-28.

[3] BIO-RAD Technical Service Department, Quantity one User Guide for Version 4.4, USA

[4] www.bio-rad.com.

[5] www.prenhall.com/gonzalezwoods.

[6] www.vcharkarn.com/include/article/showarticle.php?Aid=296.

[7] กฤตนันท์ วงศ์วนากุล. 2550. ชีวสารสนเทศสำหรับการตรวจสอบ DNA ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ภาพ

[8] สมเกียรติ อุดมหรรษากุล. 2550. การประมวลผลภาพเบื้องต้น Fundamental of Digital Image Processing, ห้างหุ้นส่วนจำกัด วี.เจ.พริ้นติ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้