

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

**การตรวจสอบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์ชาแนน
DNA DETECTION OF SAANEN GOAT**



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน **73100**
วัน,เดือน,ปี - **3 ก.ค. 2550**

b. **1178343b**
i.

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรครุศาสตร์อุตสาหกรรมบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร — การผลิตสัตว์
ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

ปีการศึกษา 2549

| | |
|------------------|---|
| ชื่อเรื่อง | การตรวจสอบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์ซาแนน DNA Detection of Saanen Goat |
| ชื่อ – สกุล | นายฉัตรชัย ทองย่อย |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีการเกษตร – การผลิตสัตว์ ภาควิชา วิศวกรรมเกษตร |
| คณะ | วิศวกรรมอุตสาหกรรม |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ. ดร. กัญญา คันติวิสุทธิกุล |

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นเครือญาติของแพะพันธุ์ซาแนนในฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่ง โดยจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว นำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) และตรวจสอบผลด้วยการดูผลจากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส

วิธีการในการวิจัยเริ่มจาก เก็บเลือดแพะจากฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่ง ในเขตกรุงเทพมหานครนำมาสกัดดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อไปตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อตรวจสอบผลต่อไป

ผลการศึกษา พบว่า แพะที่มีความเกี่ยวข้องกันจะมีสายเบสของดีเอ็นเอที่เหมือนกันคือเมื่อนำมาเปรียบระหว่างพ่อแม่ลูกกันนั้นพ่อจะมีสายดีเอ็นเอแบบหนึ่งแม่อีกแบบหนึ่ง ลูกที่ออกมาจะมีสายเบสทั้งของพ่อและของแม่เป็นการบ่งบอกว่าแพะตัวนี้เป็นลูกของพ่อและแม่อย่างแน่นอน ส่วนพี่น้องกันนั้นจะมีสายเบสที่เหมือนกัน ไม่มีแตกต่างกันเพราะว่าเกิดมาจากพ่อแม่เดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่อง การตรวจสอบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์ชาแนนนี้ สำเร็จลงได้เพราะได้รับความช่วยเหลืออนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ผู้จัดทำขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อ รศ.ดร.กัญญา ตันติวิสุทธิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ นางสาวพรพิมล บุญวงศ์ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือตลอดจนแนะนำวิธีแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ และคุณปรีชา นุสและ เจ้าของฟาร์มแพะพันธุ์ชาแนนที่อนุเคราะห์เกี่ยวกับตัวอย่างเลือด ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ซึ่งผู้จัดทำปัญหาพิเศษขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ทำให้ปัญหาพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาครุศาสตร์เกษตรทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือ และขอขอบพระคุณรุ่นพี่ เพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจ และช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ประโยชน์อันเนื่องมาจากปัญหาพิเศษนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแต่บิดามารดาและขอกราบขอบพระคุณที่ให้การสนับสนุนด้านทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจในทุกเรื่อง

ฉัตรชัย ทองย่อย

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อปัญหาพิเศษ | ก |
| กิตติกรรมประกาศ | ข |
| สารบัญ | ค |
| สารบัญภาพ | จ |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของปัญหา..... | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| 2.1 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับพันธุ์แพะ | 3 |
| 2.2 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการสกัดดีเอ็นเอ..... | 6 |
| 2.3 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่ม DNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ | 8 |
| 2.4 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอ | 11 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ | 17 |
| 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย | 17 |
| 3.2 วิธีการ..... | 20 |
| 3.3 สถานที่การทำวิจัย | 23 |
| 3.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย | 23 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล | 24 |
| 4.1 ผลการวิจัย | 24 |
| 4.2 วิจารณ์ผล | 24 |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ | 26 |
| 5.1 สรุป..... | 26 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 26 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|-----------------|------|
| บรรณานุกรม..... | 27 |
| ภาคผนวก..... | 28 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|------------------------------------|------|
| 1 | แพะพันธุ์ซาแนน..... | 3 |
| 2 | แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน | 4 |
| 3 | แพะพันธุ์พื้นเมือง..... | 5 |
| 4 | ผลการทดลองการทำอิเล็กทรอนิกส์..... | 24 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในอะคาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส..... | 12 |
| 2 | ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่มีการเคลื่อนที่แปรผัน โดยตรงกับความเข้มข้น ของอะคาโรสเจล..... | 14 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดเมื่อเกิดมาก็จะมีการถ่ายทอดพันธุกรรมจากผู้ให้กำเนิดมาด้วย เมื่อเราต้องการทราบว่าสิ่งมีชีวิตชนิดนี้มีความเป็นเครือญาติกันหรือไม่ก็จะพิสูจน์จากการตรวจสอบดีเอ็นเอ การตรวจดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธี คือ การนำชิ้นส่วนต่าง ๆ มาทำให้เป็นชิ้นเล็กลงเพื่อย่อยสลายได้ง่ายเพื่อที่จะดึงดีเอ็นเอที่มีอยู่ในโครโมโซมออกมาได้

แพะพันธุ์ชาแนน มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ประเทศสวีเดนแลนด์ เป็นแพะพันธุ์นมที่มีขนาดใหญ่มีลักษณะเด่น คือ สีขาว ลักษณะรูปร่าง ทรวดทรงและเต้านมตรงตามลักษณะของแพะพันธุ์นมที่ดี ให้ผลผลิตนมสูงกว่าแพะนมพันธุ์อื่น ๆ ในยุโรป เมื่อโตเต็มวัยจะมีความสูงที่หัวไหล่ประมาณ 75-90 ซม. เทศเมียบและเพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 65 และ 75 กก. ตามลำดับ ประเทศไทยได้นำแพะพันธุ์นั้นเข้ามาเลี้ยง และผสมข้ามกับแพะพันธุ์พื้นเมืองของไทยเป็นเวลานานแล้ว ในสภาพการเลี้ยงดูและการจัดการ แพะพันธุ์นี้จะให้นมได้มากถึง 3 กก./วัน หากอาหารและการจัดการไม่ดีพอ ปริมาณนมจะลดลงตามส่วนและมักจะมีปัญหาเรื่องการผสมติดยาก มีโรคและพยาธิรบกวนสูง

การสกัดดีเอ็นเอจากสัตว์จะทำการสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีนิวเคลียส ซึ่งจะมีโครโมโซมจะสกัดเอาดีเอ็นเอออกมาได้ ซึ่งจะได้เส้นสายของดีเอ็นเอในปริมาณที่น้อย(สุมาลี ตั้งประดับกุล , 2533 : 15-19)

เมื่อต้องการเพิ่มให้ดีเอ็นเอมากขึ้น ต้องใช้เทคนิคที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction : (PCR) ซึ่งเป็นหลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA Polymerase หรือ Tag Polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ primer 1 คู่ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอนและหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (สุมาลี ตั้งประดับกุลและอำนาจ ชะนะมา, 2539 : 4-9)

จากการศึกษานี้จะทำให้เราทราบว่าดีเอ็นเอที่อยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตสามารถที่จะสกัดนำเอาออกมาเพื่อตรวจสอบว่า สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นมีรูปแบบของสายดีเอ็นเอเป็นอย่างไร จากการที่ถ่ายทอดดีเอ็นเอไปสู่ลูกหลานเป็นอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. สกัดดีเอ็นเอในเลือดแพะชาแมน
2. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)
3. ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของแพะ

1.3 ขอบเขตของปัญหา

1. เก็บตัวอย่างเลือดแพะพันธุ์ชาแมน
2. สกัดดีเอ็นเอ
3. เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)
4. ออกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วมาใช้งานทางด้านอื่น ได้อีก เช่น ตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูก
2. ทราบถึงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดแพะและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์
3. ทราบถึงวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอของแพะแต่ละตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง

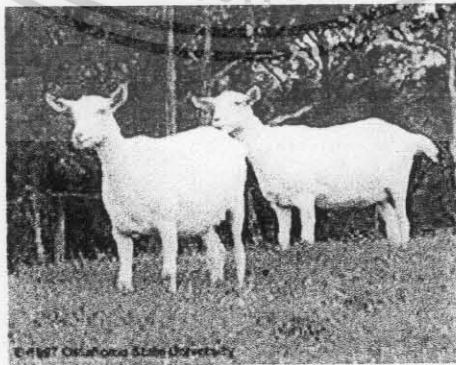
2.1 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับพันธุ์แพะ

2.1.1 พันธุ์แพะ

แพะทั้งหมดในโลกมีมากกว่า 74 พันธุ์ และมีลักษณะแตกต่างกันมากกว่า 300 ชนิด ซึ่งพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่จะอยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาในเขตร้อน (เช่น จีน อินเดีย ปากีสถาน บังกลาเทศ และแอฟริกา)

การจัดหมวดหมู่ของพันธุ์แพะนั้นอาจทำได้หลายวิธี เช่น จัดตามถิ่นกำเนิด ผลผลิตหลัก (เนื้อ นม และขน) น้ำหนักเมื่อโตเต็มวัย ความสูงที่หัวไหล่ ลักษณะและขนาดของใบหู เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแพะบางพันธุ์ที่เลี้ยงอยู่ในประเทศไทยเราเท่านั้น

1. พันธุ์ซาแนน มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ เป็นแพะพันธุ์นมที่มีขนาดใหญ่มีลักษณะเด่น คือ สีขาว ลักษณะรูปร่าง ทรวดทรงและเต้านมตรงตามลักษณะของแพะพันธุ์นมที่ดี ให้ผลผลิตนมสูงกว่าแพะนมพันธุ์อื่น ๆ ในยุโรป เมื่อโตเต็มวัยจะมีความสูงที่หัวไหล่ประมาณ 75-90 ซม. เพศเมียและเพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 65 และ 75 กก. ตามลำดับ ประเทศไทยได้นำแพะพันธุ์นั้นเข้ามาเลี้ยง และผสมข้ามกับแพะพันธุ์พื้นเมืองของไทยเป็นเวลานานแล้ว ในสภาพการเลี้ยงดูและการจัดการ แพะพันธุ์นี้จะให้นมได้มากถึง 3 กก./วัน หากอาหารและการจัดการไม่ดีพอ ปริมาณนมจะลดลงตามส่วนและมักจะมีปัญหาเรื่องการผสมติดยาก มีโรคและพยาธิรบกวนสูง



ภาพที่ 1 แพะพันธุ์ซาแนน

ที่มา : ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2537 : http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ .

2. พันธุ์แองโกลนูเบียน เดิมแพะพันธุ์นี้เป็นแพะนมในกลุ่มนูเบียน ของประเทศอินเดียและทวีปแอฟริกา ซึ่งอยู่ในเขตร้อน ต่อมามีการนำแพะกลุ่มนูเบียนนี้เข้าไปผสมกับแพะกลุ่มบริติชในประเทศอังกฤษซึ่งเป็นเขตอุ่น มีการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์เรื่อยมาจนได้แพะพันธุ์ใหม่ที่เรียกกันว่า "แองโกลนูเบียน" แพะพันธุ์นี้เป็นแพะที่มีลักษณะกึ่งเนื้อกึ่งนม ส่วนใหญ่จะมีสีน้ำตาล - แก่ประด้วยสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะสูงและเพรียวกว่าพันธุ์ซาแนน เมื่อโตเต็มวัยจะมีความสูงที่หัวไหล่ประมาณ 75-100 ซม. เพศเมียและเพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 60 และ 70 กก. ตามลำดับประเทศไทยได้นำแพะพันธุ์นี้เข้ามาเลี้ยงและผสมข้ามกับแพะพันธุ์พื้นเมืองของไทยเป็นเวลานานแล้วเช่นเดียวกับพันธุ์ซาแนน ซึ่งในสภาพการเลี้ยงดูและการจัดการที่ดีแพะพันธุ์นั้นจะให้นม 2-3 กก./วัน (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2537 : http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio37-38/37-380001.htm, 20)

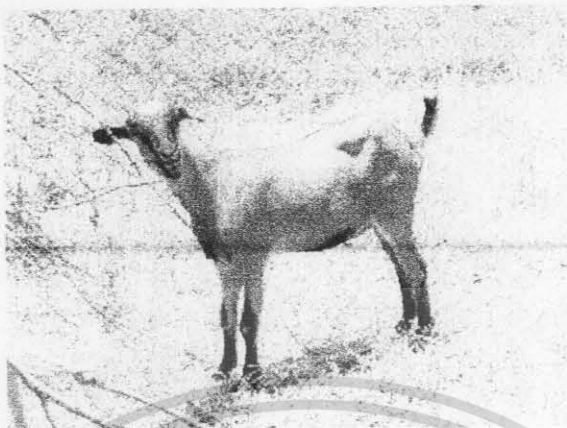


ภาพที่ 2 แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ที่มา : ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2537 : http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio

3. แพะพันธุ์พื้นเมืองของไทย เป็นแพะพันธุ์เนื้อที่มีขนาดเล็ก เช่นเดียวกับพันธุ์พื้นเมืองของมาเลเซีย แพะพันธุ์พื้นเมืองที่เลี้ยงกันทั่วไปในหมู่บ้าน เมื่อโตเต็มวัยเพศผู้หนักประมาณ 22 กก. และเพศเมียหนักประมาณ 20 กก. มีความสูงที่หัวไหล่ประมาณ 55 ซม. ซึ่งขนาดของแพะพันธุ์พื้นเมืองอาจจะแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่ หากได้รับการเลี้ยงดูและอาหารที่ดี แพะพันธุ์พื้นเมืองของเราอาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นมาก เช่น ที่ฟาร์มแพะของศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แพะพื้นเมืองเพศผู้โตเต็มวัยจะหนักประมาณ 40 กก. ส่วนเพศเมียจะหนักประมาณ 35 กก. เป็นต้น และหากมีการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้ดีแพะพันธุ์พื้นเมืองจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่านี้ได้อีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แพะพันธุ์พื้นเมือง

ที่มา : ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2537 : http://nates.psu.ac.th/radio/radio_article/radio

เป็นที่น่าสังเกตว่า แพะพันธุ์เอง โกลนุเบียนั้น แท้จริงแล้วเป็นแพะที่มีเชื้อสายมาจากเขตร้อน (แถบอินเดียและแอฟริกา) แล้วนำเข้าไปปรับปรุงพันธุ์ในยุโรป จึงมีความทนทานต่ออากาศร้อนได้ดีกว่าแพะยุโรปพันธุ์อื่น ๆ และเนื่องจากแพะพันธุ์นี้จะมีรูปทรงเจ้าเนื้อกว่าแพะนมยุโรปพันธุ์อื่น ๆ บางแห่งจึงนิยมเลี้ยงเป็นแพะพันธุ์กึ่งเนื้อกึ่งนม คือ จะให้ผลผลิตเนื้อและนมค่อนข้างสูง หรืออีกนัยหนึ่งคือจะเลี้ยงเพื่อเอาเนื้อหรือนม อย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ จึงพบว่าแพะพันธุ์นี้จะถูกนำเข้ามาผสมกับแพะพันธุ์พื้นเมืองในแถบเอเชียและประเทศที่กำลังพัฒนาทั้งหลายมากเป็นพิเศษ เพื่อให้ได้แพะลูกผสมที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและให้นมมากขึ้นกว่าแพะพันธุ์พื้นเมืองเดิม

ในอดีตนั้นมีการนำแพะพ่อ-แม่พันธุ์จากต่างประเทศ (โดยเฉพาะจากประเทศในเขตหนาวหรือเขตอบอุ่น เช่น จากยุโรป หรืออเมริกา) เข้ามาในประเทศไทย เพื่อวัตถุประสงค์หลัก 2 อย่าง คือ เพิ่ม ความสามารถในการให้ผลผลิต (เช่น การให้นม) และเพิ่มขนาดของแพะในบ้านเรา แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จมากนัก เพราะขาดความต่อเนื่องของโครงการ (ส่วนมากเป็นโครงการระยะสั้น) ขาดการถ่ายทอดเทคโนโลยี ควบคุมกันไม่และเกษตรกรขาดวัตถุประสงค์ในการลงทุนเลี้ยงให้ได้ผลตามที่คาดหวังไว้ ผลที่ได้ไม่คุ้มกับการลงทุน ในที่สุดก็เลิกเลี้ยงกันไป และพันธุกรรมของแพะพันธุ์ที่นำเข้ามานั้นก็กระจายสูญหายไป

พันธุ์แพะจากต่างประเทศที่นิยมนำเข้ามาในประเทศไทย (หรือแม้แต่เข้าไปในประเทศอื่นที่กำลังพัฒนาทั้งหลาย) มีอยู่ 4 พันธุ์ด้วยกัน คือ แองโกลนุเบียน ชาแนน แอลไพน์ และทอกเคนเบอร์ก ทั้งหมดนี้เป็นแพะพันธุ์นม หรือกึ่งเนื้อกึ่งนม ถึงแม้ว่าสถิติการให้นมของแพะพันธุ์เหล่านี้ในต่างประเทศจะสูง แต่เมื่อเรานำเข้ามาเลี้ยงในบ้านเรา อัตราการให้นม อัตราการสืบพันธุ์ และความสามารถในการให้ผลผลิตอื่น ๆ จะเปลี่ยนไป ขึ้นอยู่กับอาหารความสามารถใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดการ และการลงทุนลงแรงของเกษตรกรผู้เลี้ยงเป็นสำคัญ (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2537: http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio37-38/37-380001.htm, 20)

2.2 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการสกัดดีเอ็นเอ

2.2.1 ดีเอ็นเอ (DNA หรือ Deoxy ribonucleic acid)

ดีเอ็นเอ เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยกเว้น ไวรัส ซึ่งอาจมีดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป็นสารพันธุกรรม ดีเอ็นเอสามารถถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกหลาน โดยผ่านกระบวนการ DNA Replication หรือการจำลองตัวเอง จากการศึกษาด้านจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ พบว่าข้อมูลที่ถูกเก็บอยู่ในดีเอ็นเอ มีทั้งส่วนที่สามารถแปลรหัสออกมาเป็น โปรตีน (Coding region) และส่วนที่ไม่สามารถแปลรหัสได้ (Non-Coding region) แต่ก็ไม่ได้หมายความว่า ส่วนที่ไม่ได้ผลิตเป็น โปรตีนนี้ไม่มีประโยชน์ ดีเอ็นเอในส่วนนี้สามารถประยุกต์ใช้ ในการหาความเฉพาะเจาะจง เช่น เทคนิค DNA fingerprint และการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้

โครงสร้างของดีเอ็นเอ ประกอบด้วย โพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ 2 สาย พันกันเป็นเกลียวคู่ (Double helix) โดยแต่ละสายของดีเอ็นเอประกอบด้วย น้ำตาล deoxy ribose หมู่ฟอสเฟต และเบส ได้แก่ อะดีนีน (A) ไทมีน (T) ไซโตซีน (C) และกวานีน (G) ซึ่งเบสเหล่านี้ก็คือ รหัสพันธุกรรม ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน และสามารถแปลรหัสเหล่านี้ออกมาเป็น โปรตีนเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ โดยเราจะเรียก ช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่สามารถผลิตเป็น โปรตีนได้ว่า ยีน (Gene) ซึ่งในมนุษย์มีประมาณ 34,000-40,000 ยีน เส้นสายของดีเอ็นเอเกลียวคู่จะหดตัวและพันรอบกับโปรตีนฮิสโตน เพื่อเก็บรักษาข้อมูลไม่ให้ถูกทำลาย และมีขนาดเล็กจนสามารถบรรจุอยู่ในนิวเคลียสได้ ดังจะเห็นได้จากขณะที่เซลล์ทำการแบ่งตัว จะเห็นเป็นโครงสร้างที่เรียกว่าโครโมโซม

ดีเอ็นเอขณะที่อยู่ในเซลล์มักไม่อยู่ในรูปโมเลกุลอิสระ แต่จะรวมตัวเป็นสารเชิงซ้อนกับอาร์เอ็นเอและโปรตีน โปรตีนที่รวมตัวกับดีเอ็นเอในเซลล์แบ่งได้เป็นหลายพวก ได้แก่

ก. โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการแสดงออกของยีน (Gene Expression) เช่น อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) และ โปรตีนควบคุมต่างๆ (Regulatory Proteins)

ข. โปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดรีคอมบิเนชัน (Recombination) และการซ่อมแซม ดีเอ็นเอ เช่น ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA Polymerase) และดีเอ็นเอไลเกส

ค. โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการถ่ายแบบดีเอ็นเอ เช่น ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ดีเอ็นเอไลเกส และเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างและคลายเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่ไจเรส (Gyrase) หรือโทโปไลโซเมอเรส (Topoisomerase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. ฮิสโตน (Histones) และโปรตีนที่ไม่มีฤทธิ์เป็นเบส (Nonbasic Proteins) ซึ่งโปรตีนพวกนี้จะพบจับอยู่กับดีเอ็นเอของเซลล์ยูคาริโอตเท่านั้น (ศิริพร สิริทธิประณีต, 2531:43)

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในการแยกดีเอ็นเอจากโครโมโซมของเซลล์ชนิดหนึ่ง ๆ จะต้องผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ทำให้ผนังเซลล์ (Cell wall) และ/หรือ เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของเซลล์โพรคาริโอตแตก หลังจากกำจัดเศษเซลล์ (Cell debris) ออกไป ก็จะได้ดีเอ็นเอในโครโมโซมที่อยู่ในรูปที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight DNA) อยู่ในส่วนลอย (Supernatant) แต่ในกรณีที่ต้องการแยกดีเอ็นเอจากโครโมโซมของเซลล์ยูคาริโอต หลังจากเซลล์แตกแล้วจะต้องแยกนิวเคลียสออกมาก่อน ติดตามด้วยการทำให้นิวเคลียสแตก จึงจะได้ดีเอ็นเอในโครโมโซมซึ่งอยู่ในรูปที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงในส่วนลอย เหตุที่ต้องแยกเฉพาะนิวเคลียสออกมาก่อน เพราะในออร์แกเนลล์ (Organelle) อื่นเช่น ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) จะมีดีเอ็นเออยู่ด้วย ถ้าไม่แยกเฉพาะนิวเคลียสออกจะทำให้ได้ดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นปนมากับดีเอ็นเอของโครโมโซม (ศิริพร สิริทธิประณีต, 2531:44)

2. ทำให้สารเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนเกิดการแตกตัว โดยการย่อยทำลายอาร์เอ็นเอและโปรตีน โดยใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอเอส (RNase, ribonuclease) โปรตีนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ฟีนอล หลังจากโปรตีนถูกดีเนเจอร์แล้วจะเข้าไปรวมตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือตกตะกอนอยู่ในอินเตอร์เฟส (Interphase) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำ (ศิริพร สิริทธิประณีต, 2531:44)

3. แยกดีเอ็นเอออกจากชีวโมเลกุลอื่น ๆ การแยกดีเอ็นเอออกมักทำโดยการเติมแอลกอฮอล์ลงไปเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนอยู่ในรูปของสายใย (Fibrous material) จากนั้นจึงพันสายดีเอ็นเอออกโดยใช้แท่งแก้ว (ศิริพร สิริทธิประณีต, 2531:44)

ในการสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของคนนั้น เซลล์ที่จะนำมาสกัดสามารถนำมาได้จากผิวหนัง เส้นผม ต่อมสุจิ เลือด และอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น ตับ เป็นต้น แต่แหล่งที่นำมาสกัดได้ง่ายและสะดวกที่สุดก็คือ เซลล์เม็ดเลือด โดยที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีนิวเคลียสซึ่งมีโครโมโซมบรรจุอยู่ภายใน

ในกรณีที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น ยุง แมลงหวี่ แมลงต่าง ๆ ฯลฯ เราสามารถนำสิ่งมีชีวิตนั้นมาสกัดดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน โดยนำเอาส่วนหนึ่งส่วนใดหรืออวัยวะทั้งหมดมาสกัด ในขั้นตอนแรกคือ การบดส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะให้ละเอียดมากที่สุด เพื่อให้ นิวเคลียสหลุดออก ขั้นตอนนี้จะอาศัยเครื่องช่วยบด เช่น เครื่องบดไฟฟ้า homogenizer หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครก อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่ต้องป้องกัน nuclease ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ ออกมาหลายดีเอ็นเอเอง จึงต้องควบคุมให้อยู่ในภาวะที่เย็นจัด โดยอาศัยน้ำแข็งแห้ง (dry ice ซึ่งมี อุณหภูมิตั้งที่ -40 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นก็สามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้เช่นเดียวกับการสกัด ดีเอ็นเออื่น ๆ ที่กล่าวมาแล้ว (สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2533 : 17)

การสกัดดีเอ็นเอสายยาวจากโครโมโซมอีกวิธีหนึ่ง วิธีนี้เป็นวิธีการหลีกเลี่ยงการใช้ฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง โดยที่วิธีนี้สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น ได้เช่นเดียวกัน โดยอาศัยหลักการของความเข้มข้นของเกลือทำให้โปรตีนต่าง ๆ ตกตะกอน ลงมาแยกจากสารละลายดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอหลังจากที่ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol จะแยกเอาสารละลายของอาร์เอ็นเอซึ่งสามารถแยกออกจากอาร์เอ็นเอได้

วิธีนี้มีข้อควรระวังเช่นกัน เนื่องจากโปรตีนตกตะกอนในภาวะที่หยาบ (crude) โอกาสที่จะมีโปรตีนหรือเอ็นไซม์บางชนิดเช่น nuclease ปะปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอได้ (สุมาลี ตั้งประดับกุล, 2533 : 18)

ดีเอ็นเอที่แยกออกมาจากโครโมโซม จะอยู่ในรูปดีเอ็นเอปลายเปิด (Linear DNA) ที่มี น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยเป็นเพียง 50×10^6 ดาลตัน (78 กิโลเบส) ทั้งนี้เพราะโมเลกุลของ ดีเอ็นเอในโครโมโซมมีขนาดที่ยาวมาก และอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างน้อยมาก จึงทำให้ โมเลกุลเกิดการขาดได้ง่ายเมื่อมีแรงเฉือน ดังนั้นทุกขั้นตอนในการแยกดีเอ็นเอจากโครโมโซม ต้องทำให้เกิดแรงเฉือนน้อยที่สุด เช่น เขย่าหรือคนสารละลายให้ค่อยที่สุด หรืออาจทำโดยเติม 10 – 25 % ซูโครสลงไปในบัฟเฟอร์ที่ใช้ขณะที่ทำให้เซลล์หรือนิวเคลียสแตก เพื่อลดการขาดของดีเอ็นเอขณะที่หลุดออกจากเซลล์หรือนิวเคลียส (ศิริพร สิริประณีต, 2531:44)

วิธีที่ใช้ในการทดลองในปัญหาพิเศษครั้งนี้คือการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

2.3 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

2.3.1 อุปกรณ์

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่ง เครื่องนี้มีอยู่หลายแบบ และหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัท ผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอน ตามที่จัดไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนักระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที่ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง (Barascientific.com, ม.ป.ป. : <http://www.barascientific.com/bscnews/>)

2.3.2 สารเคมี

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมี และสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR ได้แก่

1. Template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือชิ้นส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่าง ดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ
2. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
3. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อ นิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
4. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการ เพื่อใช้ในการสร้าง ไพรเมอร์จำเพาะ
5. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

2.3.3 วิธีการ

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

พีซีอาร์ (PCR) ย่อมาจาก polymerase chain reaction พอลิเมอร์เชน-รีแอคชัน หรือพีซีอาร์เป็นเทคนิคการโคลนดีเอ็นเอในหลอดทดลองเพื่อเพิ่มจำนวน โมเลกุลของดีเอ็นเอในปริมาณมาก โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เทอร์โมไซเคิลอร์กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำได้โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สที่แยกได้จากแบคทีเรียดีเอ็นเอแม่แบบ ไพรเมอร์ และนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ นิวคลีโอไทด์ที่มีเบส A T G C ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา การเกิดปฏิกิริยาใน 1 รอบ ซึ่งผู้คิดค้นเทคนิคพีซีอาร์คือ Kary Mullis พีซีอาร์ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆดังต่อไปนี้

1. เพิ่มอุณหภูมิให้สูง ทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว
2. ลดอุณหภูมิลง ทำให้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบด้วยพันธะไฮโดรเจน
3. ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ส ทำให้เกิดการจำลองสายดีเอ็นเอจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ทำให้สายดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากปฏิกิริยารอบที่ 1 แยกออกจากกัน

5. ดีเอ็นเอสายคู่ การต่อ ไพรเมอร์เข้ากับสายดีเอ็นเอ

6. ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว

7. ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสทำให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอจากสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ DNA สายคู่สองสาย 95°C 60°C 72°C ไพรเมอร์

ขั้นตอนการเพิ่มสายดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

การทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เริ่มจากทำการผสมสารเคมีต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองเล็ก (microtube) ปริมาตร 20-100 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอด microtube ไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (เครื่อง PCR) ที่ตั้ง อุณหภูมิตามที่โปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อ เกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก (BSC News, น.ป.ป. : <http://www.barascientific.com/bscnews/>)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอ (DNA) ต้นแบบด้วยเอนไซม์ DNA polymerase นิยมใช้ Tag DNA polymerase เทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ได้โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอนหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

PCR มี 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation)

เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพสายคู่ให้เป็น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว ใช้ อุณหภูมิ $92 - 95^{\circ}\text{C}$

ขั้นตอนที่ 2 การเข้าจับของไพรเมอร์ (Annealing)

เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง ทำให้ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ขนาด 15 – 25 นิวคลีโอไทด์ หรือไพรเมอร์ (primer) เข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยลดอุณหภูมิจัดต่ำลงในระดับที่ใกล้เคียงกับ Melting temperature (TM) ของไพรเมอร์ใช้ อุณหภูมิ $50^{\circ}\text{C} - 65^{\circ}\text{C}$

ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension)

เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ตามข้อมูล บนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ $72^{\circ}\text{C} - 75^{\circ}\text{C}$ ผลจากการปฏิบัติการสังเคราะห์ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสคู่ผสมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบและมีไพรเมอร์เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

จากขั้นตอนที่ 1-3 จำนวน PCR 1 รอบ ได้ผลผลิตเป็นสายดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นเบสคู่ผสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอเป็นทวีคูณ เมื่อเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ จากขั้นตอนที่ 1-3 หมุนเวียนต่อเนื่องกันไป 30-35 รอบจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่า

$$* \text{จำนวนดีเอ็นเอที่ได้} = 2^n \text{ copies (n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา)}$$

2.4 ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอ

2.4.1 อุปกรณ์

เจลแชมเบอร์ (gel chamber)

เจลแชมเบอร์จะทำจากพลาสติก มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมมีขนาด ต่าง ๆ กัน ประกอบขึ้นด้วยส่วนต่าง ๆ คือ

1. ขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว เป็นส่วนที่ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จากขั้วไฟฟ้าจะมีลวดแพลตตินัม (platinum wire) ต่อยังด้านในของเจลแชมเบอร์
2. แผ่นพลาสติกซึ่งจะใช้เป็นฐานรองอะกาโรสเจล แผ่นพลาสติกนี้จะยึดติดแน่นกับขอบสองด้านของเจลแชมเบอร์ ระดับของแผ่นพลาสติกนี้จะอยู่ต่ำกว่าขอบบนสุดของเจลแชมเบอร์ 2-3 ซม. แต่อยู่สูงกว่าลวดแพลตตินัม (ส่วนของขั้วไฟฟ้า)
3. แถบพลาสติก 2 แถบ ซึ่งมีขนาดพอดีกับปลายเปิดของแผ่นพลาสติกที่ใช้เป็นฐานรองอะกาโรสเจล แถบพลาสติกนี้สามารถใส่หรือถอดจากเจลแชมเบอร์ได้เมื่อต้องการ
4. ราวพลาสติกรูปตัวยู 1 อัน ราวนี้สามารถครอบลงพอดีกับด้านกว้างของเจลแชมเบอร์ใช้เป็นที่ยึดขั้ว
5. หวีเป็นอุปกรณ์ที่จะทำให้เกิดช่องหรือหลุมบนอะกาโรสเจลเพื่อใช้สำหรับหยอดสารตัวอย่างที่ต้องการแยก หวีแต่ละอันจะมีจำนวนซี่หวีและขนาดกว้างยาวของซี่หวีต่าง ๆ กันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับความต้องการในการใช้สอย (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 80)

2.4.2 สารเคมี

บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีหลายชนิด โดยปกติเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไประยะเวลาหนึ่งขั้วบวกจะเพิ่มความเป็นด่าง (pH สูงขึ้น) ส่วนขั้วลบจะเพิ่มความเป็นกรด (pH ต่ำลง) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งจะเกิดขึ้นให้ได้มากที่สุด จึงนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง (capacity) สูง แต่เมื่อจำเป็นที่จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิสจะต้องทำการผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองเข้าด้วยกันโดยสม่ำเสมอหรือตลอดเวลา เพื่อปรับ pH ของบัฟเฟอร์ทั้งสองให้เท่ากัน

ตารางที่ 1 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

| บัฟเฟอร์ | ความเข้มข้น | จำนวนสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่เข้มข้น | |
|-----------------------------------|-------------------|--|---|
| | | | 1 ลิตร |
| Tris – acetate, pH 8.0 (TAE) | 40 mM Tris – OH | 50X : | 242 g Tris base |
| | 20 mM acetic acid | | 57.1 ml glacial acetic acid |
| | 2 mM EDTA | | 37.2 g Na ₂ EDTA |
| Tris – borate, pH 8.3 (TBE) | 89 mM Tris – OH | 10X* : | 108 g Tris base |
| | 89 mM boric acid | | 55 g boric acid |
| | 2.5 mM EDTA | | 9.3 g Na ₂ EDTA |
| Tris – phosphate, pH 8.5 (TPE) | 40 mM Tris – OH | 10X : | 108 g Tris base |
| | 20 mM acetic acid | | 15.5 ml 85% H ₃ PO ₄ (1.679 g/ml) |
| | 2.5 mM EDTA | | 9.3 g Na ₂ EDTA |

* คือบัฟเฟอร์ที่ใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในปัญหาพิเศษครั้งนี้

ที่มา : สุมาลี ดั่งประดับกุล, 2533 : 92

Tris – borate (TBE) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุกสูง แดบดีเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) จะเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานประจำคดยทั่วไป (ศิริพร สติธิประณีต, 2531 : 81)

อะกา (Agar) และอะกาโรส (Agarose)

อะกาที่มีขายอยู่ทั่วไปแยกได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายชนิดต่าง ๆ ความบริสุทธิ์และองค์ประกอบทางเคมีของอะกาแต่ละชนิดที่เตรียมได้จะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการและชนิดของเซลล์ที่ใช้เตรียม ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนของอะกา แต่ทราบว่าประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide) อย่างน้อย 2 ชนิดคือ อะกาโรส (Agarose) และอะกาโรเพกติน (Agaropectin) ซึ่งสามารถแยกจากกันได้หลังการทำอะเซตทิลเลชัน (Acetylation) เพราะเฉพาะอะกาโรสอะซิเตต (Agarose acetate) เท่านั้นที่ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม (Chloroform) (ศิริพร สติธิประณีต, 2531 : 83)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 วิธีการ

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัด นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ โดยที่เทคนิคอื่นๆ เช่น การหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (Density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจสอบหาสารเชิงซ้อนของเอทิดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (Ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการวาวแสง (Fluorescence) ของมันเมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอ ที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 75)

หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะทำการแยกโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH ประมาณ 8 ซึ่ง pH นี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบเนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราส่วนระหว่างประจุต่อมวลของโมเลกุล (Charge/Mass ratio) ของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหรือใหญ่มีค่าเท่ากัน ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าบนอะกาโรสเจลจะขึ้นอยู่กับปัจจัยของขนาดและ โครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นหลักดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลจะเคลื่อนที่ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเออยู่ในโครงสร้างแบบเดียวกันดีเอ็นเอที่ขนาดโมเลกุลเท่ากัน แต่โครงสร้างต่างกันจะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่ การเคลื่อนที่ของพลาสมิดในขณะที่มีโครงสร้างต่าง ๆ กัน พลาสมิดที่อยู่ในรูปเกลียวขดแน่นที่เรียกว่าซูเปอร์คอยล์ (Supercoil) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าพลาสมิดที่อยู่ในรูปปลายเปิด (Linear form) และรูปรีแลกซ์ (Relaxed form) ตามลำดับ นอกจากนี้ปัจจัยของขนาดและ โครงสร้างดีเอ็นเอแล้ว ความเข้มข้นของอะกาโรสและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ก็มีบทบาทต่อการแยกดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสและความต่างศักย์ไฟฟ้าด้วย กล่าวคือเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนภายในอะกาโรสเจลจะมีขนาดเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำดีเอ็นเอที่มีขนาดและ โครงสร้างเหมือนกันจะวิ่งในกระแสไฟฟ้าได้เร็วกว่าในความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำๆ เพราะขนาดของรูพรุนจะกว้างกว่านั่นเอง (นภา ศิวรังสรรค์, 2547 : 22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ขนาดและ โครงสร้าง (conformation) ของดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดเจนว่า ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (Mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเออันอยู่ในโครงสร้างแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงสร้างต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่ การเคลื่อนที่ของพลาสมิดในขณะที่มีโครงสร้างต่าง ๆ กัน พลาสมิดที่อยู่ในรูปเกลียวขดแน่นที่เรียกว่าซูเปอร์คอยล์ (Supercoil) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าพลาสมิดที่อยู่ในรูปปลายเปิด (Linear form) และรูปร่างผ่อนคลาย (Relaxed form) ตามลำดับ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 76)

2. ความเข้มข้นของอะกาโรส (agarose concentration)

ขณะอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่ อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูง ๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำ ๆ ดังนั้นจะเห็นได้จากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง เป็นค่าที่คงที่ขึ้นกับขนาดและ โครงสร้างของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ ในอะกาโรสเจลนั้น ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดมีรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว ค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ นั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่ง ๆ ของอะกาโรสเจล ค่า log ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับการเคลื่อนที่

ตารางที่ 2 ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด ที่มีการเคลื่อนที่แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ

อะกาโรสเจล

| ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล | ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด |
|--------------------------|-------------------------|
| (%) | (กิโลเบส) |
| 0.3 | 60 – 5 |
| 0.6 | 20 – 1 |
| 0.7 | 10 – 0.8 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล | ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด |
|--------------------------|-------------------------|
| (%) | (กิโลเบส) |
| 0.9 | 7 – 0.5 |
| 1.2 | 6 – 0.4 |
| 1.5 | 4 – 0.2 |
| 2.0 | 3 – 0.1 |

ที่มา : ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 78

3. ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5 – 5 โวลต์/ซม. แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์/ซม.) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากเป็นสาเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากโดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 79)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ในบัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่าง ๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4 – 30° ซ แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5% มักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 4° ซ ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำ เจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 80)

การเตรียมอะกาโรสเจล

อะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะมี ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.5 – 1.8 % เตรียมอะกาโรสเจลได้โดยเติมผงอะกาโรสลงในบัฟเฟอร์ นำไปต้มในอ่างน้ำจนเดือด (ไม่ควรต้มสารละลายอะกาโรสบนเตาโดยตรงเพราะจะไหม้หรือเค็ดกลิ่นภาชนะได้ง่าย) ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50° ซ จึงนำไปเทในเจลแชนเบอร์ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 84)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอ

ปริมาณของดีเอ็นเอที่จะใช้แยกควรจะไม่ต่ำกว่า 50 นาโนกรัมต่อหนึ่งแถบ จึงจะเห็นแถบวาวแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าหลังเชื่อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ แต่ปริมาณที่ใช้อาจต่ำลงเป็น 1 – 10 นาโนกรัมต่อหนึ่งแถบ เมื่อตรวจแถบของดีเอ็นเอโดยการถ่ายภาพ ถ้าใส่ดีเอ็นเอต่อหนึ่งแถบมากเกินไป (> 300 นาโนกรัม) แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะไม่คมชัดและเกิดหาง (Tailing) ขึ้นได้ ผลของการใส่สารตัวอย่างดีเอ็นเอมากเกินไปนี้จะแสดงผลกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากกว่าขนาดเล็ก (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 86)

การย้อมดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

ในทางปฏิบัติการย้อมเอทิลเดียมโบรไมด์จะทำโดย แช่อะกาโรสเจลลงในเอทิลเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 – 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 – 60 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลสูงกว่า 1% ใช้เวลาเพียง 15 นาทีก็เพียงพอ แต่ถ้าความเข้มข้นของเจลสูงกว่า 1% ต้องใช้เวลา 30 – 60 นาทีถึงจะเพียงพอ หลังย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อขจัดเอทิลเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอออก (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 86)

ข้อควรระวัง เอทิลเดียมโบรไมด์และเมแทบอไลต์ (Metabolite) เป็นมิวทาเจน (Mutagen) ดังนั้นควรสวมถุงมือขณะทำการทดลอง

การถ่ายภาพ

เนื่องด้วยการจับระหว่างเอทิลเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอเป็นการจับที่ไม่ถาวร ดังนั้นหลังจากย้อมเจลแล้ว จะต้องเก็บผลการทดลองที่ต้องการในรูปของภาพถ่าย ในการถ่ายภาพอาจใช้กล้องธรรมดาหรือกล้องโพลาไรซ์ก็ได้ ส่วนฟิล์มที่ใช้กับกล้องธรรมดานั้น จะเป็นฟิล์มที่มีความไวแสงสูง (เช่น ฟิล์ม Tri - X , Kodak) การถ่ายภาพมักทำโดยใช้ฟิลเตอร์ (Filter) สีแดงหรือสีส้มช่วย (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531 : 88)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์ในการเก็บเลือดแพะ

| | |
|-------------------------|----------------|
| 1. เข็มฉีดยา เบอร์ 18 | จำนวน 1 กล่อง |
| 2. syringe 5 ml | จำนวน 2 กล่อง |
| 3. Ependrop tube 1.5 ml | จำนวน 120 หลอด |
| 4. Micropipette | จำนวน 1 ชุด |
| 5. ปากคีบ | จำนวน 1 อัน |
| 6. สำลี | จำนวน 1 ห่อ |
| 7. กล้องใสตัวอย่าง | จำนวน 4 กล่อง |
| 8. กล้องใส่น้ำแข็ง | จำนวน 1 กล่อง |

3.1.2 สารเคมีในการเก็บเลือดแพะ

| | |
|----------------|--------|
| 1. EDTA 10% | 100 ml |
| 2. แอลกอฮอล์ | 500 ml |
| 3. น้ำ sterile | 500 ml |

3.1.3 อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

| | |
|--|------------------|
| 1. Pipette tip | |
| 2. Micropipette | จำนวน 1 ชุด |
| 3. เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) | จำนวน 1 เครื่อง |
| 4. Vortex | จำนวน 1 เครื่อง |
| 5. Heating block | จำนวน 1 เครื่อง |
| 6. Ependrop tube 1.5 ml | จำนวน 1 ถัง |
| 7. ที่วางหลอดทดลอง | จำนวน 3 อัน |
| 8. กระดาษทิชชู | จำนวน 1 แพ็ค |
| 9. บีกเกอร์ | จำนวน 3 บีกเกอร์ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ของนักศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

73100

10.ขวดเก็บสาร 500 ml จำนวน 6 ใบ

3.1.4 สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

| | |
|---|---------|
| 1. Buffer A | 200 ml. |
| 2. Buffer B | 200 ml. |
| 3. Proteinnase K | 500 µl. |
| 4. 5.3 M NaCl | 200 ml. |
| 5. Isopropanol | 200 ml. |
| 6. 70% Ethanol | 500 ml. |
| 7. 10% SDS (10% Sodium Dodecyl: Stock Solution) | 200 ml. |
| 8. น้ำกลั่น sterile | 500 ml |

การวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ

การวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ก่อนที่จะทำ PCR (เมื่อวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอแล้ว จะสามารถหาปริมาณดีเอ็นเอที่จะใช้ในการ ทำ PCR ในแต่ละหลอด)

3.1.5 อุปกรณ์ในการวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ

1. Pipette tip ขนาด 500 µl
2. Micropipette ขนาด 1000 µl
3. กระจกยทิชชู
4. ที่วางหลอดทดลอง
5. บีกเกอร์

3.1.6 สารเคมีในการวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ

1. ดีเอ็นเอที่เจือจาง
2. น้ำกลั่น

3.1.7 อุปกรณ์ในการเพิ่มดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

| | |
|---|-----------------|
| 1. Pipette tip | |
| 2. Tube PCR | |
| 3. Micropipette | จำนวน 1 ชุด |
| 4. เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) | จำนวน 1 เครื่อง |
| 5. Vortex | จำนวน 1 เครื่อง |
| 6. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) | จำนวน 1 เครื่อง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.8 สารเคมีในการเพิ่มดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

| | |
|--------------------------------|---------|
| 1. sterilized H ₂ O | |
| 2. 10X buffer | 1.5 µl |
| 3. 25 mM MgCl ₂ | 2.4 µl |
| 4. 10 mM dNTP | 0.3 µl |
| 5. Primer | |
| HSC F | 0.45 µl |
| HSC R | 0.45 µl |
| SRCRSP 0024 F | 0.6 µl |
| SRCRSP 0024 R | 0.6 µl |
| 6. 5U/ µl Tag polymerase | 0.6 µl |
| 7. DNA | |

* จำนวนสารที่ใช้จะนำจำนวนหลอดดีเอ็นเอที่จะทำ PCR มาบวกหนึ่งหลอดด้วยจำนวนสารจะออกมาเป็นสารที่ใช้แต่ละตัว ส่วนดีเอ็นเอและ sterilized H₂O จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ถ้าดีเอ็นเอเข้มข้นน้อยต้องใส่ดีเอ็นเอมากและน้ำน้อยถ้าดีเอ็นเอมีความเข้มข้นมากก็ใส่ดีเอ็นเอน้อย(ไม่ต่ำกว่า 1 µl)น้ำมาก เมื่อนำสารทุกตัวมารวมกันจะต้องมีจำนวน 15 µl

3.1.9 อุปกรณ์ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 1. ขวดรูปชมพู่ | จำนวน 1 ใบ |
| 2. ข้อนตักสาร | จำนวน 1 อัน |
| 3. กระบะเทเจล | จำนวน 1 ชุด |
| 4. เจลแซมเบอร์ | จำนวน 1 เครื่อง |
| 5. ขวดเก็บสาร 1000 ml | จำนวน 2 ใบ |
| 6. ตราชั่ง | จำนวน 1 เครื่อง |
| 7. ไมโครเวฟ | จำนวน 1 เครื่อง |

3.1.10 สารเคมีในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. Ethidium bromide
2. Marker 100 Basepair
3. Agarose
4. TBE 1X Buffer (Tris - borate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการ

3.2.1 วิธีการในการเก็บเลือดแพะ

เตรียม EDTA ให้เป็น EDTA พร้อมใช้ 10% โดยการนำ EDTA มาชั่งจำนวน 10 กรัม และนำมาละลายด้วยน้ำ sterile 90 ml หลังจากนั้นเอาไป Autocave ที่อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารไปใส่ใน Ependrop tube 1.5 ml จำนวน 30 ไมโครลิตรก่อนนำไปเก็บเลือด

การเก็บเลือดจะต้องทำด้วยความสะอาดเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเลือดตัวอย่างที่เก็บมาและเพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อบริเวณแผลที่เราเจาะเลือดมาจากแพะ เราจะเก็บเลือดจากบริเวณเส้นเลือดดำใหญ่ (Jugular vein) ที่คอของแพะ โดยการใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดบริเวณคอที่ตำแหน่งของเส้นเลือดก่อนที่จะใช้เข็มเจาะดูดเอาเลือดออกมา ดูดเลือดออกมาประมาณ 4 ml แบ่งใส่ Ependrop tube 1.5 ml ที่มี EDTA อยู่จำนวน 3 หลอดต่อ 1 ตัวแพะ

3.2.2 วิธีการในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

1. Cell lysis

ใช้ไมโครปิเปตต์ดูด Buffer A มา 150 μ l ใส่ลงใน Ependrop tube 1.5 ml และดูดเลือดแพะที่เราเก็บมาเอาตรงส่วนชั้นกลางระหว่างน้ำกับเม็ดเลือดแดงจะเป็นส่วนที่มีลักษณะออกสีขาวเพราะเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเออยู่ดูดมา 150 μ l ลงใน Ependrop tube เดียวกัน หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่น sterile 300 μ l ใส่ลงไป ใน Ependrop tube invert (เขย่าขึ้นลงเบาๆ) ประมาณ 3 นาที หลังจากนั้นปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) จำนวน 13000 รอบ นาน 2 นาที พอครบเอาออกจากเครื่องเหวี่ยงทิ้งจะเหลือตะกอนที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดกว่าทิ้งไว้ให้น้ำแห้งพอสมควร ให้ทำวิธีการเดิมซ้ำอีกครั้งจนสีแดงของเลือดจางลง

2. การย่อยโปรตีน

ละลายตะกอนด้วย Buffer B 300 μ l และใส่ 10% SDS 30% ลงไป และเอาไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที เติม Proteinase K 5 μ l และนำไปใส่ลงในเครื่อง Heating block ที่อุณหภูมิ 65° ซ 5 นาที พอครบเติม 5.3 M NaCl 200 μ l นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex อีก 30 วินาที ปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 13000 เป็นเวลา 2 นาที พอครบใช้ ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำส่วนใสใส่ไว้ใน Ependrop tube อันใหม่ส่วนตะกอนเอาทิ้ง

3. ตกตะกอนดีเอ็นเอ

นำ Ependrop tube ที่มีน้ำส่วนใสมาเติม Cole Isopropanol 500 μ l

Invert แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 5 นาที พอครบปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 13000 เป็นเวลา 5 นาที พอครบหน้าทิ้งจะเห็นดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอดคอนเทนเนอร์อย่างแข็งแรง เพราะจะทำให้ดีเอ็นเอหลุดมาด้วยพอหน้าทิ้งแล้วถ้า Ependrop tube ทิ้งไว้ให้น้ำแห้ง

4. ล้างดีเอ็นเอ

พอดีเอ็นเอแห้งแล้วนำมาเติม 70% Ethanol 500 μ l invert แล้วนำไปปั่น 13000 รอบ 5 นาที เท 70% Ethanol ทิ้งกว่า Ependrop tube ให้ดีเอ็นเอแห้ง พอแห้งแล้วละลาย ดีเอ็นเอด้วยน้ำ sterile 50 μ l ก่อนที่จะนำไปเก็บในตู้ -20° C

3.2.3 วิธีการในการวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ

ก่อนที่เราจะนำดีเอ็นเอไปวัดเราต้องเจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นก่อนวิธีเจือจางคือ ทำให้ดีเอ็นเอและน้ำกลั่นมีจำนวน 300 μ l โดยใช้การเจือจาง 1:50 คือดีเอ็นเอ 1 μ l ค่อน้ำกลั่น 50 μ l จะเท่ากับดีเอ็นเอ 6 μ l ผสมกับน้ำกลั่น 294 μ l

ขั้นตอนการวัดคือเราต้องเปิดเครื่องเพื่ออุ่นเครื่องก่อนเป็นเวลา 45 นาทีหลังจากนั้นเซตเครื่องตามคู่มือและคูดน้ำกลั่นใส่ในหลอด Cuvect ของเครื่อง Spectrophotometer เพื่อเป็นตัวมาตรฐาน หลังจากนั้นก็คว่ำน้ำทิ้งแล้วคูดดีเอ็นเอใส่ Cuvect เอาใส่เครื่อง เครื่องจะอ่านค่าให้เรา พอเสร็จก็คว่ำ Cuvect ทิ้งดีเอ็นเอล้างด้วยน้ำกลั่นหลังจากนั้นก็ทำเหมือนเดิมแต่ใช้ดีเอ็นเอตัวใหม่ทำจนหมดทุกตัวจดค่าเอาไว้ (ดีเอ็นเอที่จะนำมาทำ PCR จะต้องมีความเข้มข้นมากกว่า 50 μ g/ μ l ขึ้นไปจึงจะทำ PCR ได้)

3.2.4 วิธีการในการเพิ่มดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ก่อนที่เราจะทำ PCR เราต้องมาคิดค่าดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงให้มีความเข้มข้นอยู่ที่ 200 μ g/ μ l ก่อน โดยการนำมาเจือจางด้วยน้ำ steriled โดยใช้สูตร

$$m_1v_1 = m_2v_2$$

m_1 = ความเข้มข้นดีเอ็นเอ

v_1 = จำนวนดีเอ็นเอที่จะใช้เจือจาง

m_2 = ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (200 μ g/ μ l)

v_2 = จำนวนดีเอ็นเอเมื่อเจือจางแล้ว

เมื่อได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วก็จะมาทำ Marker โดยการคิดจากจำนวนหลอดดีเอ็นเอที่จะทำ PCR แล้วคูดใส่หลอดที่จะใช้เป็น Marker โดยคูดตามลำดับคือ steriled H₂O, 10X buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, INRA 0023 F, INRA 0023 R, Oar FCB 0020 F, Oar FCB 0020 R, SRCRSP 0023 F, SRCRSP 0023 R, 5U/ μ l Tag polymerase,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA เมื่อทำ Marker เรียบร้อยแล้วก็จะนำมาแบ่งใส่ Tube PCR ตามจำนวนดีเอ็นเอที่จะทำ PCR เมื่อแบ่งเสร็จก็ใช้ไมโครปิเปตต์ดึงดีเอ็นเอมาใส่ Tube PCR ที่มี Marker อยู่(ก่อนจะดึง ดีเอ็นเอควรเอาดีเอ็นเอไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex ก่อน)เมื่อเติมดีเอ็นเอครบทุกหลอดก็นำ Tube PCR ที่ทำเสร็จแล้วไปใส่ในเครื่อง PCR เครื่อง PCR จะทำงาน 3 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 การแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation)

เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพสายคู่ให้เป็น ดีเอ็นเอสายเดี่ยวใช้ อุณหภูมิ 92 – 95° ซ

ขั้นตอนที่ 2 การเข้าจับของไพรเมอร์ (Annealing)

เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิต่ำลง ทำให้ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ขนาด 15 – 25 นิงคลีโอไทด์หรือไพรเมอร์ (primer) เข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยลดอุณหภูมิต่ำลงในระดับที่ใกล้เคียงกับ Melting temperature (TM) ของไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิ 50 – 65° ซ

ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension)

เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ใช้ อุณหภูมิ 72 – 75 องศาเซลเซียส ผลจากการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มี ลำดับเบสคู่ผสมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบและมีไพรเมอร์เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

เมื่อครบ 3 ขั้นตอนจะถือเป็น 1 รอบ เครื่อง PCR จะทำงานวนไปประมาณ 30 – 35 รอบ จะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่า

เมื่อเครื่องหยุดทำงานให้นำ Tube PCR ไปเก็บไว้ที่ตู้ -20° ซ เพื่อรอนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.2.5 วิธีการในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อดูว่าดีเอ็นเอของแพะแต่ละตัวว่าเหมือนหรือแตกต่างกันหรือไม่เพื่อตรวจว่าแพะตัวไหนมีความสัมพันธ์กันบ้าง

อิเล็กโทรโฟรีซิสจะเริ่มจากการประกอบกระบะเทเจลโดยกระบะเทเจลจะประกอบด้วยตัวกระบะแผ่นรองเจลและหัวเมื่อประกอบเสร็จก็จะมาเตรียมอะกาโรสเจลที่จะใช้ในการรันเจลคือจะชั่งอะกาโรส 2 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่และเติม TBE 1X Buffer ลงไป 200 ml ต้มให้เจลละลายจนใสด้วยไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้เย็นแต่อย่าทิ้งไว้นานเพราะเจลจะแข็งทึบไม่ได้ เมื่อเจลอุ่นลงให้เทเจลใส่ลงในกระบะเทเจลที่เตรียมไว้ เมื่อเทเจลเรียบร้อยแล้วรอให้เจลแห้งก็นำออกจากกระบะมาใส่ยังเครื่องเจลแซมเบอร์พอใส่เรียบร้อยแล้วเท TBE 1X Buffer ลงไปให้ท่วมเจลจนหมดแต่อย่าท่วมมาก หลังจากนั้นก็นำกระดาษพาราฟิล์มมาหัด Ethidium bromide ลงไป 2 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้ไมโครปิเปตต์ และนำดีเอ็นเอ 4 μ l มา Mix รวมกัน นำดีเอ็นเอที่ Mix แล้วมาหยอดลงใน หลุมโดยเว้นหลุมที่ 1 ไว้เพื่อหยอด Marker เมื่อหยอดดีเอ็นเอจนหมดทุกหลุมหมดแล้วก็จะหยอด Marker เป็นตัวสุดท้ายก็ปิดฝาเปิดเครื่องเจลแอมเบอร์ โดยตั้งที่ไฟฟ้า 100 vol นาน 40 นาที จึงนำ เจลที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไปถ่ายภาพเพื่อดูผลที่ได้

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เกษตร (ค.142) อาคารปฏิบัติการพิเศษจอมไตร ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

วันที่ 1 สิงหาคม 2549 - 31 มีนาคม 2550

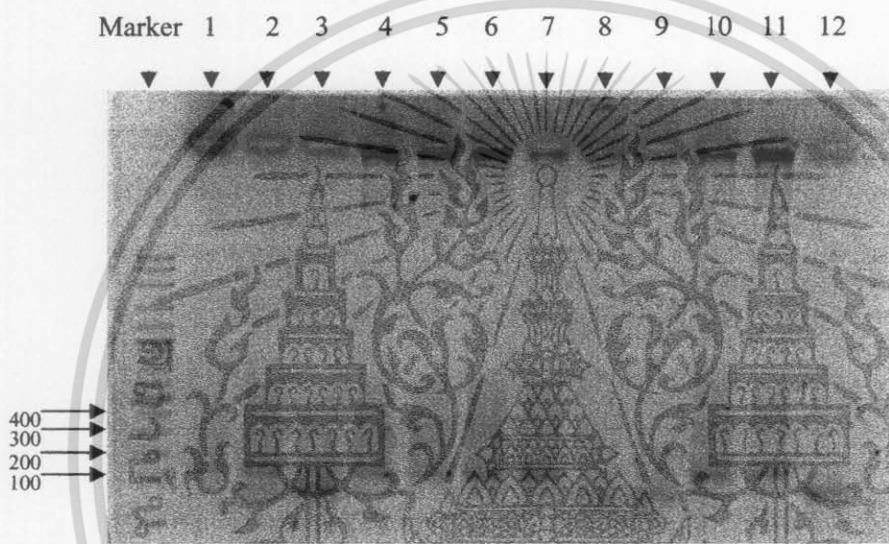
| ขั้นตอนดำเนินงาน | พ.ศ. 2549 | | | | | พ.ศ. 2550 | | |
|---|-----------|------|------|------|------|-----------|------|-------|
| | ส.ค. | ก.ย. | ต.ค. | พ.ย. | ธ.ค. | ม.ค. | ก.พ. | มี.ค. |
| 1. ติดต่อประสานงานกับ เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ | ← | → | | | | | | |
| 2. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มา สกัด DNA | | ← | → | | | | | |
| 3. นำตัวอย่างที่สกัด DNA แล้ว มาเพิ่มจำนวนสาย DNA ด้วย เทคนิค PCR | | | | ← | → | | | |
| 4. สรุปผลการทดลอง | | | | | | ← | → | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการวิจัย



ภาพที่ 4 ผลการทดลองการทำอิเล็คโตรโฟริซิส

จากผลการทดลองปรากฏว่าแพะตัวที่ 3, 8, 9 และ 12 อาจมีความเกี่ยวข้องเป็นพ่อแม่พี่น้อง หรือมีความเกี่ยวข้องกันทางพ่อหรือแม่ทางใดทางหนึ่งซึ่งโดยดูได้จากสายคู่เบสที่ถูกไพริเมอร์ HSC ตัดที่ขนาด 271-304 ดังภาพที่ 4 ส่วน 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10 และ 11 จะถูกตัดด้วยไพริเมอร์ ด้วย SRCRSP 0024 ตัดที่ขนาด 139-175 โดยดูได้จากภาพจะปรากฏว่าสายคู่เบสนั้นอยู่ใกล้เคียง กันมาก

4.2 วิจารณ์ผล

จากผลการทดลองที่ปรากฏนั้นเราจะเห็นได้ว่าผลที่ออกมามีความเป็นจริงในบางส่วนที่ว่า แพะแต่ละที่นำมาทำการตรวจสอบมีความเป็นญาติกันจริง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการสัมภาษณ์เจ้าของฟาร์ม (ภาคผนวก) ที่ได้ทำการนำเลือดตัวอย่างมาตรวจสอบ คือ แพะตัวที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8, 9 และ 12 มีความเกี่ยวข้องกันจริงคือ 3, 8 และ 9 มีพ่อชาแนนที่มาจากปากช่องเป็นพ่อแต่ต่างแม่กันทำให้สายคู่เบสออกมาตรงกันเพราะทั้งสามตัวเป็นพี่น้องกัน ส่วนตัวที่ 12 ที่มีสายคู่เบสตรงกับอีกสามตัวเพราะว่าแพะตัวที่ 12 เป็นลูกของตัวที่ 8 เมื่อตรวจสอบจากข้อมูลจากทางฟาร์ม ส่วนแพะตัวที่ 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10 และ 11 ที่มีสายคู่เบสที่ตรงกันนั้นน่าจะมีสาเหตุมาจากที่ทุกตัวเป็นแพะลูกผสมพันธุ์ชาแนนโดยน่าจะมีแพะตัวที่ 1 เป็นพ่อหรือไม่ก็ปู่เนื่องจากคู่สายตรงกันแต่จากข้อมูลที่เก็บมาไม่ละเอียดพอทำให้เราไม่ทราบว่าจะจริงหรือไม่ เพราะข้อมูลบอกแล้วว่าพ่อเป็นชาแนน ส่วนแม่เป็นพันธุ์อื่น แต่มีที่แตกต่างก็คือแพะตัวที่ 11 เป็นลูกของแพะตัวที่ 8 และเป็นพี่น้องกับตัวที่ 12 เป็นลูกผสมระหว่างชาแนนกับอัลไพน์ แต่จากผลที่ปรากฏนั้นสายคู่เบสไม่ตรงกับอีกสองตัวอาจเป็นไปได้จากเลือดอัลไพน์ที่มีจากแม่นั้นมากทำให้สายคู่เบสที่ปรากฏจะเหมือนแม่นมากกว่าพ่อโดยดูจากลักษณะภายนอกคือ สีลำตัวและเขา จะออกไปทางพันธุ์อัลไพน์มากกว่าพันธุ์ชาแนน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นเครือญาติของแพะพันธุ์ชาแนนในฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่ง โดยจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว นำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) และตรวจสอบผลด้วยการดูผลจากการทำอเล็กโทรโฟรีซิส

วิธีการในการวิจัยเริ่มจาก เก็บเลือดแพะจากฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่ง ในเขตกรุงเทพมหานครนำมาสกัดดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อไปตรวจสอบผลด้วยการทำอเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบผล

จากผลการวิจัยจะพบว่าแพะที่มีความเกี่ยวข้องกันนั้น ไม่ว่าจะเป็นพ่อแม่พี่น้องหรือมีความเกี่ยวข้องกันในทางเครือญาติ จะมีสายคู่เบสของดีเอ็นเอที่เหมือนกัน คืออยู่ในระดับเดียวกันไม่ว่าจะเป็นเพศใดก็ตามแต่ และจะปรากฏออกมาเด่นชัดทั้งลักษณะภายนอกและคู่สายดีเอ็นเอที่ปรากฏ ดังการทดลองนี้ที่มีแพะตัวที่ 3, 8, 9 และ 12 ที่มีสายคู่เบสที่เหมือนกันและเป็นญาติกันจริง

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเก็บเลือดควรเก็บในTube ที่มีการเตรียมสารป้องกันเลือดแข็งตัว (EDTA) ไว้ในหลอด เมื่อนำตัวอย่างเลือดที่ได้มาใส่ลงไปให้ทำการเขย่าขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้เลือดและสารเคมีผสมกัน นำมาใส่แช่ในน้ำแข็งก่อนที่จะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20° ซ เพื่อรอนำไปทำการทดลองต่อไป หากระหว่างเก็บทำถูกต้องหรือขาดขั้นตอนใดไปอาจทำให้เลือดเกิดการแข็งตัวและตกตะกอนทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ได้ และการทำงานทุกขั้นตอนต้องทำงานด้วยความละเอียดรอบคอบเพราะการทดลองนี้จะใช้จำนวนสารเป็นไมโครลิตร ซึ่งมีจำนวนน้อยมากหากผิดพลาดก็จะส่งผลให้การทดลองผิดพลาดไปด้วย ทำให้เสียเวลาและในการทดลองทางด้านการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ จะมีค่าใช้จ่ายทางด้านวัสดุและสารเคมีสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2537. “เรื่อง พันธุ์แพะ”. บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร.
แหล่งที่มา : http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio37-38/37-380001.htm, 20
กุมภาพันธ์ 2550.
- นภา ศิวรังสรรค์. 2547. ปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. 135 น.
- ศิริพร สิริประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรมปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ ส. วิชาญ-
การพิมพ์. 134 น.
- สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพนิชกิจ. 2547. ชีวโมเลกุล. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่ง -
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 305 น.
- สุมาลี ตั้งประดับกุล. 2533. คู่มือปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม 1 การขยายยีนและการตัดต่อยีนจาก
โครโมโซม. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และโครงการอนุพันธุศาสตร์ พันธุ -
วิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 114 น.
- สุมาลี ตั้งประดับกุล และอำนาจ ชะนะมา. 2539. “เทคนิคการโคลนยีนที่เพิ่มขยายโดยวิธีพีซีอาร์”
การประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม. น. 4-9. สุมาลี ตั้งประดับกุล, นครปฐม :
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา. น. 4-9.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 น.
- BSC News. ม.ป.ป. “เรื่อง DNA”. DNA มหัศจรรย์พันกันเป็นคู่. แหล่งที่มา : [Online
Available] : http://www.barascientific.com/bscnews/forum/DNA/dna_6.php. 7 มีนาคม
2550.




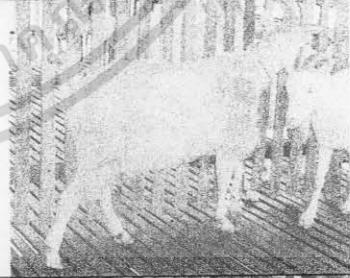
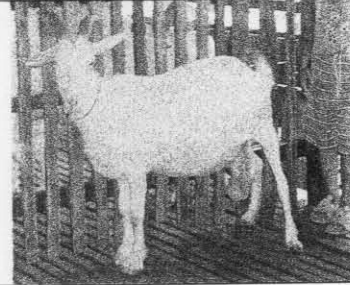
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



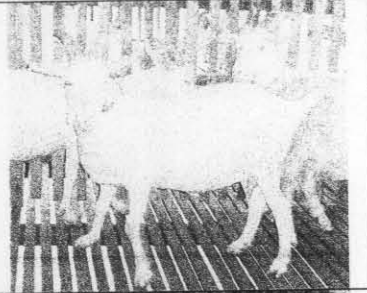



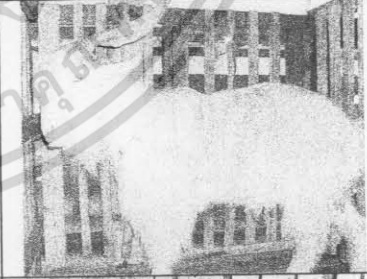

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพแพะพันธุ์ชาแนนที่เก็บตัวอย่าง

ข้อมูลแพะพันธุ์ชาแนนที่มาจากฟาร์มของคุณปรีชา นุสและ ตั้งอยู่เลขที่ 38/1 ม. 6 ซอย นุสและ ถ.ประชาสโมสร แขวงทรายกองดินใต้ เขตคลองสามวา กรุงเทพฯ (01-617 9820) ตรงข้าม กับกฤษฎานคร เป็นฟาร์มแพะนมที่ใหญ่ที่สุดในละแวกนั้น มีแพะชาแนนเกือบทั้งหมด แต่มีหลาย สายพันธุ์ พ่อพันธุ์ที่ใช้งานได้อยู่ในขณะนี้มีประมาณ 10 ตัว แพะที่เป็นกลุ่มตัวอย่างมีทั้งหมด 12 ตัว มีรายละเอียด ดังนี้

| | |
|--|--|
| 1. เพศผู้ พันธุ์ชาแนนเลือด 100 จากออสเตรเลีย (No.207) |  |
| 2. เพศเมีย ลูกผสม พ่อชาแนนกับแม่ลูกผสมชาแนน*อัลไพน์ (No.016) |  |
| 3. เพศเมีย ลูกผสม พ่อชาแนนกับแม่ลูกผสมชาแนน(No.017) |  |
| 4. เพศเมีย ลูกผสม พ่อชาแนนกับแม่ลูกผสม (No. 045) |  |
| 5. เพศเมีย ลูกผสม (No.018) |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|--|
| 6. เพศเมีย ลูกผสม (No.029) |  |
| 7. เพศผู้ ลูกผสมระหว่าง พ่อเลลาซานกับแม่ซาแนน(No.204) |  |
| 8. เพศผู้ ซาแนน เกิดในฟาร์ม โดยพ่อมาจากศูนย์ปากช่อง (No.201) |  |
| 9. เพศผู้ ซาแนน เกิดในฟาร์ม โดยพ่อมาจากศูนย์ปากช่อง (No.202) |  |
| 10. เพศผู้ ลูกผสมซาแนน พ่อมาจากนิวซีแลนด์ (No.211) |  |
| 11. เพศผู้ ลูกผสม ระหว่างพ่อลูกผสมซาแนนสีขาวยกับแม่ ลูกผสมซาแนนสีขาว โดยมีเลือดอัลไพน์ทั้งพ่อและแม่ 11 เป็น ลูกของ 8 (No.201) |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. เพศเมีย ชาแนน เตมีสีอัลไพน์ เป็นพี่น้องกับ 11
(No.1036) อายุ 8 ค.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้