สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ชีวสารสนเทศสำหรับการตรวจสอบ DNA ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ภาพ

SIMPLE DNA FRAGMENT DETECTION ALGORITHM

โดย

นายกฤดนันท์ วงศ์วนากุล

วศ
ก974ค
2550

เลขหมู่ 83155
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี - 6 ส.ค. 2551

b 11961252
i

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมสารสนเทศ

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สภาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SIMPLE DNA FRAGMENT DETECTION ALGORITHM

BY

MR. KRITTANUN WONGWANAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

BACHELOR IN DEPARTMENT OF INFORMATION ENGINEERING

FACULTY OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปริญญานิพนธ์	ชีวสารสนเทศสำหรับการตรวจสอบ DNA ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ภาพ Simple DNA Fragment Detection Algorithm
รายชื่อนักศึกษา	นายกฤตนันท์ วงศ์วนากุล 47010019
อาจารย์ผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์	รศ.ดร.ปิติเขต สู้รักษา
ระดับการศึกษา	ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมสารสนเทศ
ภาควิชา	วิศวกรรมสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2550

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

.....

(รศ.ดร.ปิติเขต สู้รักษา)
อาจารย์ผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปริญญานิพนธ์	ชีวสารสนเทศสำหรับการตรวจสอบ DNA ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ภาพ
ชื่อนักศึกษา	นายกฤตนันท์ วงศ์วนากุล รหัสประจำตัว 47010019
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. ปิติเขต สู้รักษา
ระดับการศึกษา	ปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมสารสนเทศ
ภาควิชา	วิศวกรรมสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นการออกแบบระบบและขั้นตอนในการวิเคราะห์ภาพ DNA ที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้โปรแกรม MATLAB ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายที่ได้จากการทดลองและคำนวณหามวลโมเลกุล ซึ่งการคำนวณด้วยโปรแกรมนี้จะลดขั้นตอนในการคำนวณมวลโมเลกุล โดยไม่ต้องนำมาคำนวณเองเช่นในอดีต ทำให้เพิ่มความสะดวกในการศึกษาด้านชีวภาพของ DNA ได้เป็นอย่างมาก โครงงานนี้สามารถพัฒนาต่อโดยเพิ่มการเก็บข้อมูลในรูปแบบฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบว่าเป็น DNA ของสิ่งมีชีวิตอะไรได้ต่อไป

อนึ่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้อาจจัดได้ว่าเป็นสหวิทยาการในการศึกษาร่วมระหว่างศาสตร์ด้านชีววิทยาและศาสตร์ด้านวิศวกรรมสารสนเทศ ซึ่งอาจนับได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาด้านชีวสารสนเทศในยุคต้นๆของประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THESIS TITLE	SIMPLE DNA FRAGMENT DECTECTION ALGORITHM
STUDENT	MR.KRITTANUN WONGWANKUL ID. 47010019
ADVISOR	ASSOC.PROF.DR.PITIKHATE SOORAKSA
GRADUATE LEVEL	BACHELOR DEGREE OF INFORMATION
DEPARTMENT	INFORMATION ENGINEERING
YEAR	2007

ABSTRACT

This project is about designing the procedure of analyzing DNA photograph acquired from Agarose Gel Electrophoresis experiment. Using MATLAB instead of manual calculating reduces 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 biology and information engineering called "Bio-informatics". This work may be a pioneer investigation on this issues in Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้คงมิอาจสำเร็จได้ ถ้าปราศจากความร่วมมืออย่างยิ่งจากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ซึ่งผู้จัดทำใคร่ขอขอบคุณทุกๆท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ในทุกๆด้าน

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

คุณประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานนี้ ทางผู้จัดทำขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

นายกฤตนันท์ วงศ์วนากุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 การลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion)	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง	หน้า
2.3.7 การขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation)	16
2.3.8 การลดและขยายรูปทรงวัตถุในภาพ (Opening morphology)	17
2.3.9 การแยกขอบวัตถุจากภาพ (Boundary Extraction)	17
2.3.10 การทำ Convolution ในเชิงการประมวลผลภาพ (Image convolution)	18
2.3.11 การหาขอบของวัตถุในภาพ (Edge Detection)	19
2.4 วิธีการ Least Square	19
บทที่ 3 การออกแบบโครงงาน	23
3.1 การทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis	23
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis	23
3.1.2 ขั้นตอนการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis	31
3.1.2.1 ขั้นตอนการทำเจล	31
3.1.2.2 ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า	31
3.2 ขั้นตอนการคำนวณหาปริมาณโมเลกุลของแต่ละแถบสี	39
3.3 การประมวลภาพ Agarose Gel	42
บทที่ 4 การทดลองและผลการทดลอง	43
4.1 การทดลองการทำงานของ Algorithm ที่ใช้วิเคราะห์ภาพ Agarose Gel	43
4.2 การคำนวณหาปริมาณมวลโมเลกุล	52
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
5.1 สรุปผลการทดลอง	54
5.2 ปัญหาที่ประสบในการทดลอง	54
5.3แนวทางการแก้ไขปัญหา	54
5.4 ข้อเสนอแนะในการพัฒนา	55
บรรณานุกรม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ค่าฮิสโตรแกรมของภาพวัตถุและพื้นหลัง	13
รูปที่ 2.8 วิธีการคำนวณตัวกรองความถี่มัธยฐาน หรือ Median Filter	14
รูปที่ 2.9 ภาพก่อนและหลังผ่านกระบวนการ Median Filter ขนาด 3x3	15
รูปที่ 2.10 กระบวนการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion) ด้วยมาร์ค B	15
รูปที่ 2.11 กระบวนการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation) ด้วยมาร์ค B	16
รูปที่ 2.12 กระบวนการลดและขยายรูปทรงวัตถุในภาพ (Opening morphology) ด้วยมาร์ค B	17
รูปที่ 2.13 ภาพต้นฉบับและภาพที่ซ้อนทับกันหลังการทำกระบวนการ Erosion (สีแดง) และส่วน ของขอบภาพจากภาพต้นฉบับ (สีดำ)	18
รูปที่ 3.1 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell	24
รูปที่ 3.2 เครื่อง Electrophoresis MAXI CELL EC360M DNA Cell	25
รูปที่ 3.3 สาร DNA ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลายเพื่อตัดส่วนของ DNA แล้ว	25
รูปที่ 3.4 Pipette	26
รูปที่ 3.5 Power Supply	26
รูปที่ 3.6 สาร Agarose ที่ใช้ในการทดลอง	27
รูปที่ 3.7 สาร Agarose Gel ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน	27
รูปที่ 3.8 Tips อุปกรณ์ที่ใช่สำหรับวางหลอด	28
รูปที่ 3.9 สาร Tris-acetate-EDTA (TAE)	28
รูปที่ 3.10 สีที่ใช้ย้อม DNA ในที่นี้เราได้ใช้ Bromophemol Blue หรือ Xylene Cyanol	29
รูปที่ 3.11 DNA Ladder	29
รูปที่ 3.12 ถาดวางเจล	30
รูปที่ 3.13 เครื่อง UVP Trasilluminator และเครื่อง UV Transilluminator	30
รูปที่ 3.14 เจลที่แข็งตัวพร้อมใช้งานแล้ว	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ หน้า
รูปที่ 3.15 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ที่เทสารละลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) แล้ว 32
รูปที่ 3.16 นำเจลมาวางลงในเครื่องElectrophoresis Mini SUB™ DNA Cell แล้วเทสารสะลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) จนท่วมเจล 32
รูปที่ 3.17 ทำความสะอาดเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell โดยการใช้ Pipette 33
รูปที่ 3.18 นำสาร DNA แต่ละชนิดที่มีปริมาตรตามที่กำหนด แล้วนำมาผสมกับน้ำโดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 6 µl 34
รูปที่ 3.19 การใช้ Pipette ในการช่วยปรับปริมาตรของสารตามที่ต้องการ 34
รูปที่ 3.20 การหยดสาร DNA ที่ผสมน้ำจนมีปริมาตรรวมเท่ากับ 6 µl ลงในแต่ละหลุมของเจลในเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell 35
รูปที่ 3.21 เจลที่มีการใส่สาร DNA ลงในแต่ละหลุมเรียบร้อยแล้ว 35
รูปที่ 3.22นำเครื่องเครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ต่อกับ Power Supply โดยให้ Power Supply ให้ไฟประมาณ 80 V 36
รูปที่ 3.23การวิ่งของ DNA เมื่อมีการปล่อยกระแสไฟฟ้าในเจล 37
รูปที่ 3.24 นำเจลที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis มาดูผ่านเครื่อง UV Transilluminator ซึ่งเครื่อง UV Transilluminator ข้างใต้จะมีหลอด UV อยู่เพื่อสามารถดูเจลได้ 37
รูปที่ 3.25 ภาพจากหน้าจอคอมพิวเตอร์เมื่อดูผ่านเครื่อง UVP Trasilluminator 38
รูปที่ 3.26 ภาพ DNA ที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้ว 38
รูปที่ 3.27 การวัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงแถบสีแต่ละแถบ 39
รูปที่ 3.28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log (size) และระยะทางที่วัดได้ 41
รูปที่ 3.29 กราฟเส้นตรงจากการประมาณความสัมพันธ์ 41
รูปที่ 3.30 Intensity profile ตามแนวตั้งของภาพถ่ายอะกาโรสเจลใน 1 เลน 42
รูปที่ 4.1 ภาพ Agarose Gel ที่ได้จากการทดลอง 43
รูปที่ 4.2 ภาพ Agarose Gel เมื่อผ่านกระบวนการปรับแสงและลดสัญญารบกวนเรียบร้อยแล้ว 44
รูปที่ 4.3 ภาพ Agarose Gel ที่มีการตรวจจับกึ่งกลางของแถบในแต่ละเลนแล้ว 45
รูปที่ 4.4 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนแรก ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่สอง ก่อนและหลัง การลบพื้นหลัง 47
รูปที่ 4.6 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่สาม ก่อนและหลัง การลบพื้นหลัง 48

ภาพ

หน้า

รูปที่ 4.7 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่สี่ ก่อนและหลัง การลบพื้นหลัง 49
รูปที่ 4.8 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่ห้า ก่อนและหลัง การลบพื้นหลัง 50
รูปที่ 4.9 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่หก ก่อนและหลัง การลบพื้นหลัง 51
รูปที่ 4.10 สมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log(size) กับระยะทางของแถบสี 52
รูปที่ 4.11 รายงานค่าปริมาณมวลโมเลกุลของแต่ละแถบสี โดยโปรแกรม MATLAB 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงการคำนวณหาปริมาตรมวลโมเลกุลของแต่ละแถบสี	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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. MATLAB
2. Microsoft Visual Studio 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.เขษฎา เด่นดวงบริพันธ์ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความเห็นกับเรื่องนี้ว่า DNA จะช่วยเสริมข้อมูลให้กับนักชีววิทยาในการหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด วิวัฒนาการของมัน หรือแม้กระทั่งถิ่นที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ

2.1.1 โครงสร้างโมเลกุลใน DNA

โมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA) หรือ Deoxyribonucleic Acid เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสพันธุกรรม (Genetic codes) ดีเอ็นเอนั้นจะทำหน้าที่เก็บสะสมและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งในแต่ละบุคคลจะมีรหัสพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้ประยุกต์ใช้เทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

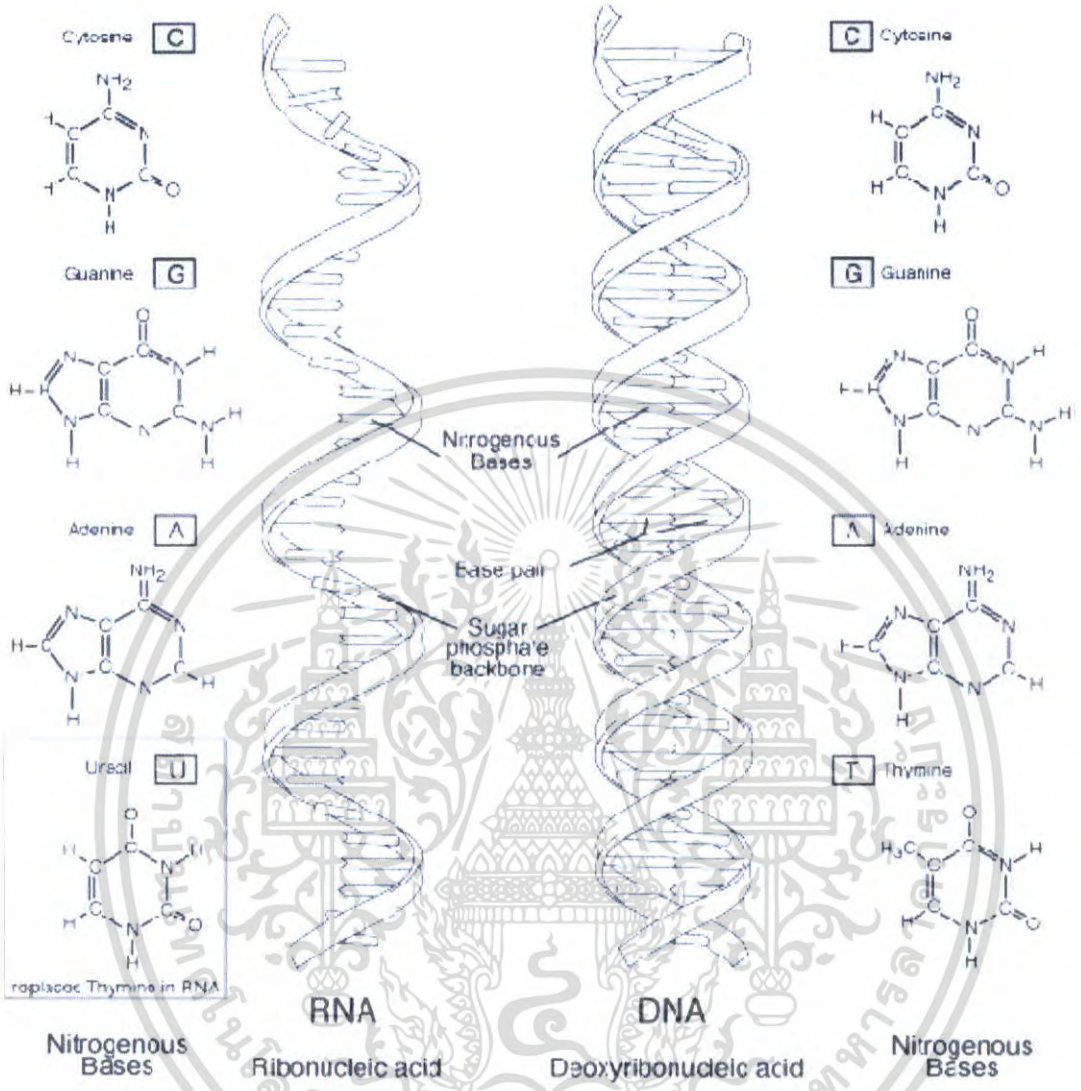
ดีเอ็นเอนั้นเราสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด ซึ่งพบอยู่อยู่ 2 แห่งในเซลล์ที่มีชีวิต คือ นิวเคลียร์ (Nuclear DNA) และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA)

เซลล์นิวเคลียร์เป็นศูนย์ควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งภายในเราจะสามารถพบนิวเคลียสดีเอ็นเอ นิวเคลียสดีเอ็นเอนี้บรรจุลักษณะที่ถูกสืบทอดต่อกันมาของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น สีนัยน์ตา ความสูง เส้นผม สีผิว ฯลฯ ซึ่งเป็นผลผลิตของดีเอ็นเอนี้ครึ่งหนึ่งได้มาจากพ่อส่วนอีกครึ่งหนึ่งได้มาจากแม่ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เราสามารถพิสูจน์ความสัมพันธ์ของพ่อ แม่ ลูป และเครือญาติได้

ส่วนไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอจะได้รับการสืบทอดมาจากทางแม่เท่านั้น โดยถูกส่งผ่านจากยายมาสู่แม่ และแม่สู่ลูก จะมีลักษณะเหมือนกับไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของแม่ทุกประการ ดังนั้นจึงเป็นเครื่องหมายทางลักษณะที่ดีสำหรับการพิสูจน์ว่าเป็นญาติฝ่ายแม่ได้ ซึ่งไมโตรคอนเดียล-ดีเอ็นเอนั้นจะพบภายในเซลล์ไมโตรคอนเดียลเท่านั้น ซึ่งหน้าที่หลักของไมโตรคอนเดรียลคือเป็นแหล่งผลิตพลังงานของเซลล์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

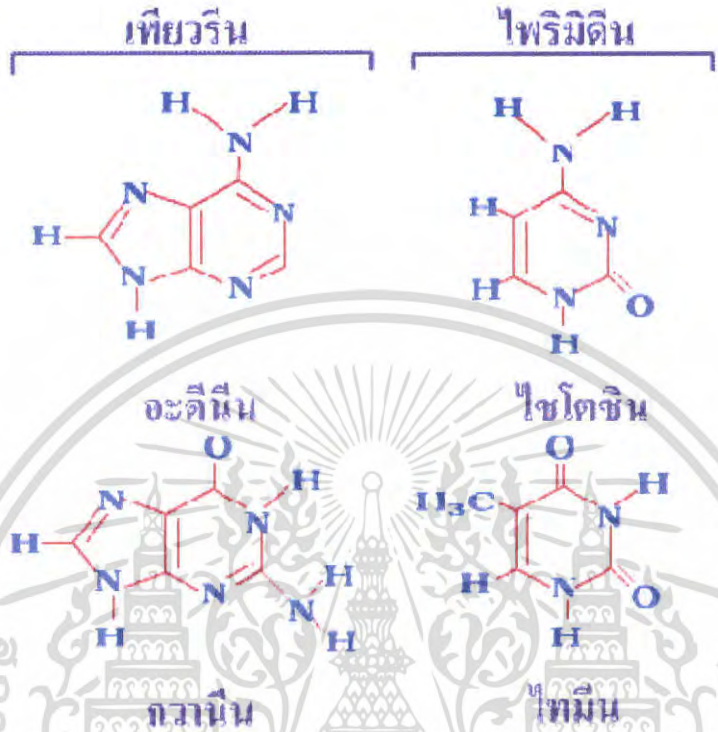


รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ (ที่มาจาก [1])

สายดีเอ็นเอ จะมีฟอสเฟตและน้ำตาลเป็นแกนสันหลัง คล้ายราวบันไดที่บิดเป็นเกลียว และมีเบสยื่นออกมาจากแกนสันหลังแต่ละข้างคล้ายขั้นบันได ซึ่งความแตกต่างของแต่ละนิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับเบสบางครั้งจึงเรียกว่าเบสแทนนิวคลีโอไทด์

เบสที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ เพียวรีน (Purine) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนคู่ และไพริมิดีน (Pyrimidine) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเดี่ยว เบสที่เป็นพิวรีนได้แก่ อะดินีน กับ กวานีน ส่วนเบสที่เป็นไพริมิดีน ได้แก่ ไทมีน กับไซโตซีน และเบสจะจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1' ของน้ำตาลไรโบส (คาร์บอนในตำแหน่งต่างๆของน้ำตาลใส่เครื่องหมาย ' (Prime) ก็เพื่อความแตกต่างจากตำแหน่งคาร์บอนในเบส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 เบส 4 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ (ที่มาจาก [1])

นอกจากนี้ดีเอ็นเอยังเป็นหน่วยควบคุมลักษณะนิสัยของบุคคลต่างๆเนื่องจากดีเอ็นเอมีลักษณะที่สำคัญที่บ่งชี้ดังนี้

- ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะปรากฏที่โครโมโซม ส่วนโปรตีน ส่วนอาร์เอ็นเอนั้นมักจะพบในไซโตพลาสซึม

- ปริมาณของดีเอ็นเอจะสัมพันธ์กับจำนวนชุดของโครโมโซม กล่าวคือ ปริมาณของดีเอ็นเอในเซลล์ร่างกาย (diploid) จะเป็น 2 เท่าของปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยสืบพันธุ์ (haploid)

- องค์ประกอบของดีเอ็นเอ หรือปริมาณของนิวคลีโอไทด์ จะคงที่ในเซลล์ของทุกส่วนของร่างกาย แต่องค์ประกอบของโปรตีนและอาร์เอ็นเอจะแปรปรวนขึ้นลงในแต่ละเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุผล 2 ประการหลังนี้เป็นคุณสมบัติที่หน่วยควบคุมลักษณะจะต้องมี ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะพบแต่ในดีเอ็นเอเท่านั้น แต่ในโปรตีนและอาร์เอ็นเอนั้นไม่พบ ซึ่งนอกเหนือจากคุณสมบัติข้างต้นแล้วยังมีการทดลองที่พิสูจน์ได้ว่าดีเอ็นเอคือหน่วยควบคุมลักษณะนิสัยของมนุษย์

2.1.2 ดีเอ็นเอในยีโนมมนุษย์

ยีโนม (Genome) คือหน่วยพันธุกรรมทั้งหมดของมนุษย์ซึ่งประกอบด้วยสายดีเอ็นเอที่มีเบสนิวคลีโอไทด์เรียงต่อกัน ปริมาณของดีเอ็นเอทั้งหมดในยีโนมมนุษย์มีประมาณ $3x10^9$ หรือ 3 พันล้านนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 10% ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (Coding DNA) แต่ส่วนเหลือยังไมทราบแน่ชัดว่าทำหน้าที่อะไร ซึ่งคาดว่ายีโนมของมนุษย์นั้นบรรจุยีนทั้งหมดประมาณ 70,000 ยีน โดยสายดีเอ็นเอนี้จะพันขดกันอยู่ในโครโมโซมทั้งหมด 23 คู่ และอีกประมาณ 16,000 นิวคลีโอไทด์จะอยู่ในไมโตคอนเดรีย

จะเห็นได้ว่ายีโนมของมนุษย์นี้เป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลมหาศาลมากมาย ซึ่งข้อมูลต่างๆ เหล่านี้ได้รวบรวมข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวกับชีวิประจำวัน เช่น การเจริญเติบโต การแก่ การตาย บุคลิกภาพ ความฉลาด ความสูง รูปร่าง หน้าตา เป็นต้น

ดีเอ็นเอในยีโนมมนุษย์นั้นสามารถแบ่งประเภทออกเป็นชนิดได้โดยดูที่การเรียงตัวของเบส ซึ่งแบ่งเป็นลักษณะใหญ่ๆได้ 2 แบ่ง คือ

1. ดีเอ็นเอที่มีเพียงชุดเดียว (Single-copy DNA) 75% พบในยีโนม ดีเอ็นเอลักษณะเหล่านี้เป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสทั่วๆไป โดยการเรียงตัวของเบสไม่ซ้ำกัน ไม่มีลักษณะเฉพาะเจาะจง
2. ดีเอ็นเอซึ่งพบซ้ำๆกันได้หลายชุด (Repetitive DNA) ในยีโนมพบได้ใน 25% มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆกัน แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ อาจจับกันอยู่เป็นกลุ่มที่เรียกว่า Satellite DNA หรือกระจายอยู่ทั่วไปที่เรียกว่า Dispersed repetitive DNA

2.1.3 ฐานข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอในบุคคลเดียวกันจะมีลายพิมพ์เหมือนกันไม่ว่าจะได้จากเซลล์ส่วนใดของร่างกาย เช่น เม็ดเลือดขาว เส้นผม ตัวอสุจิ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการนำสายดีเอ็นเอไปตรวจวิเคราะห์ และได้ภาพแถบดีเอ็นเอออกมาซึ่งมีลักษณะคล้ายบาร์โคด (Bar-code) บาร์โคดนี้สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

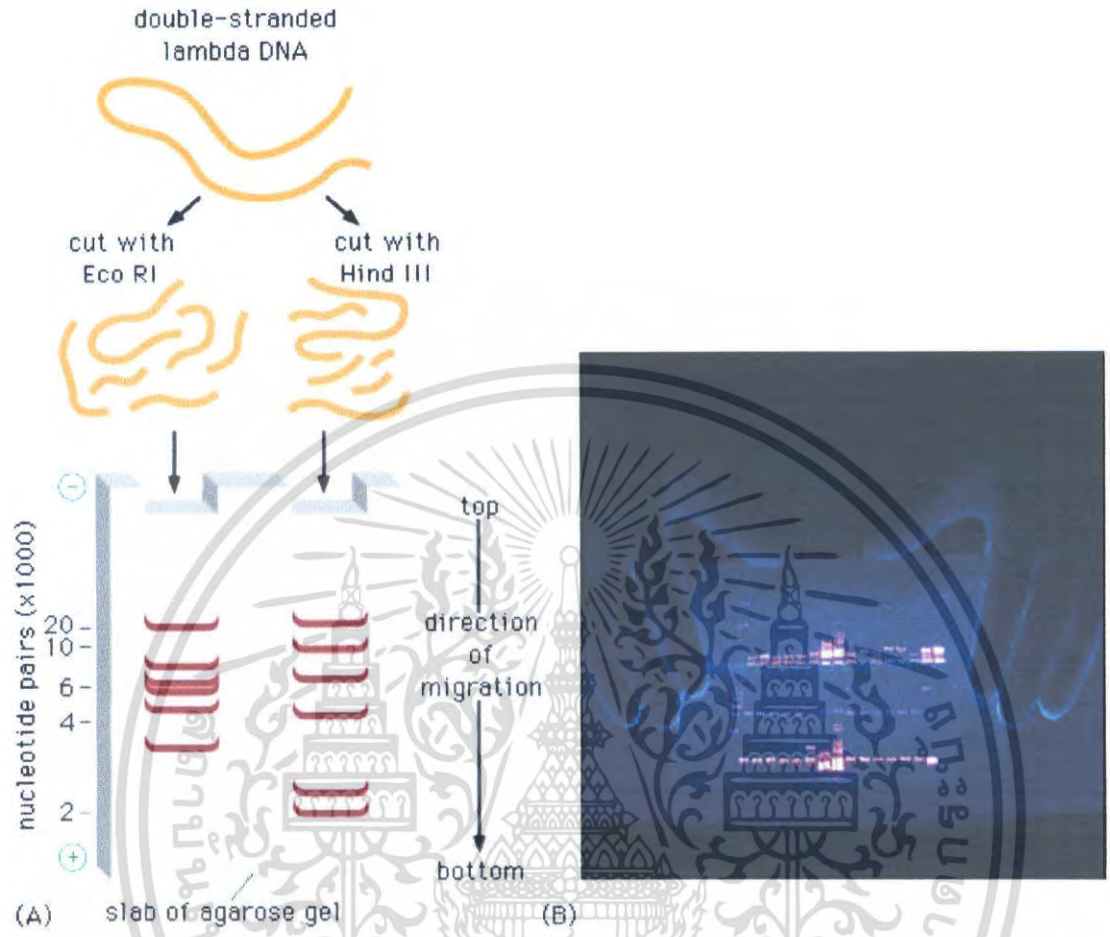
บุคคลคล้ายกับภาพลายพิมพ์นิ้วมือได้ ซึ่งได้บัญญัติคำศัพท์ไว้ว่า DNA Fingerprint หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในกรณีฝาแฝดที่เกิดจากการปฏิสนธิจากไข่ฟองเดียวกัน (Monozygotic Twins) จะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน ในการนำสายดีเอ็นเอไปใช้ในงานต่างๆ เช่น พิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก พิสูจน์ในคดีฆาตกรรม นักพันธุศาสตร์จะนำสายดีเอ็นเอไปตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะชนิดที่กำหนดไว้แล้วตามช่วงของสายดีเอ็นเอที่ต้องการพิสูจน์ และทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอออกมา จะเห็นว่าในการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับดีเอ็นเอหากเก็บเป็นภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก จะได้ฐานข้อมูลที่มีขนาดใหญ่มาก ดังนั้นการเก็บข้อมูลดีเอ็นเอจึงเก็บในรูปของตัวอักษรเรียงต่อกันเป็นลำดับเบส ซึ่งมีตัวอักษรอยู่ 4 ตัว คือ A G C และ T ซึ่งเป็นชนิดของเบสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และตัวอักษร N แทนลำดับเบสที่ไม่รู้จัก

รูปที่ 2.3 การหาลำดับเบสจากลายภาพพิมพ์ดีเอ็นเอ (ที่มาจาก [1])

2.2 หลักการและเทคนิคที่ใช้ Agarose Gel Electrophoresis

Agarose Gel Electrophoresis เป็นเทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลดีเอ็นเอแล้วจะเป็นค่าคงที่ Agarose Gel Electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากกันได้โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอัดแน่นอย่าง Super Coiled DNA จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า Circular DNA และ ดีเอ็นเอรูปร่างเป็นแท่ง ดีเอ็นเอ ที่มีรูปร่างเหมือนกัน อย่างชิ้นดีเอ็นเอรูปแท่งนั้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

ดังนั้นเมื่อตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้น ๆด้วย Restriction Endonuclease เราจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ด้วย Agarose Gel Electrophoresis กระทำโดยเตรียม Agarose Gel ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม หยดสารละลายดีเอ็นเอลงในช่องบน Agarose Gel แล้วเปิดสนามไฟฟ้าดีเอ็นเอจะวิ่งจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวก เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมก็ปิดสนามไฟฟ้าแล้วย้อมดีเอ็นเอใน Agarose Gel ด้วยสี Acridine แล้วนำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต Ethidium Bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้มเป็นแถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

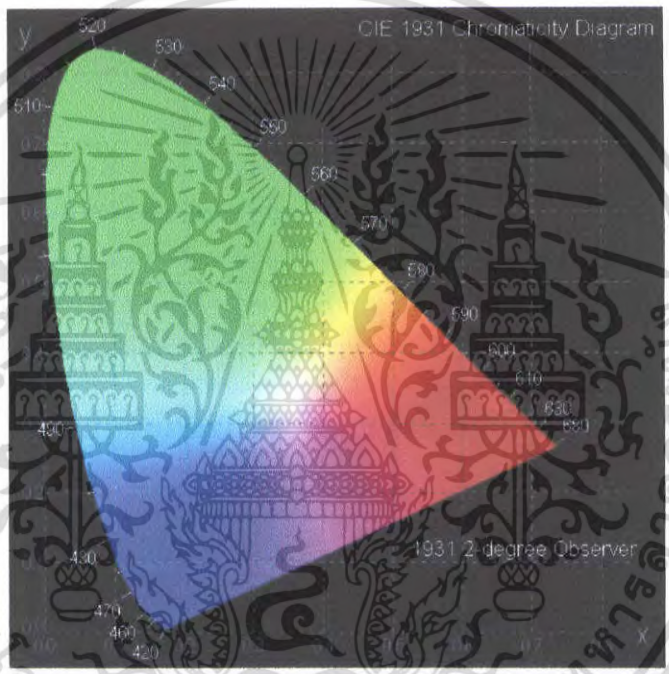
Image recognition เป็นกระบวนการในการจดจำรูปภาพซึ่งเกี่ยวข้องกับความรู้ขั้นสูงในการตีความหมายของรูปภาพ

การประมวลผลภาพดิจิตอลหรือ Digital image processing เกี่ยวกับการแปลงข้อมูลภาพให้อยู่ในรูปแบบข้อมูลดิจิตอลซึ่งสามารถที่จะนำเอาข้อมูลนี้จัดการผ่านกระบวนการต่างๆด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้ภาพดิจิตอลเป็นภาพที่ประกอบด้วยจุดภาพเล็กๆจำนวนมากเรียกว่าพิกเซล(Pixels)เราใช้ตัวเลขจำนวนหนึ่งแทนค่าของระดับสีหรือระดับความสว่างของแต่ละพิกเซลซึ่งสิ่งนี้เองที่เราสามารถปรับแต่งเพื่อการแสดงผลภาพได้ซึ่งในแต่ละพิกเซลก็จะมีตัวเลขบอกระดับความสว่างหรือระดับสีบรรจุอยู่ข้อดีของภาพดิจิตอลก็คือสามารถนำมาประมวลผลต่างๆด้วยคอมพิวเตอร์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แบบจำลองสี RGB

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



รูปที่ 2.5 ไดอะแกรมของสี (ที่มาจาก [8])

2.3.2 การแปลงภาพสี RGB ให้เป็นภาพระดับเทา (Grayscale color conversion)

ในการประมวลผลภาพนั้นเพื่อการหาลักษณะเด่นหรือวัตถุภายในภาพ ส่วนใหญ่มักจะทำการประมวลผลบนภาพระดับเทาหรือ Grayscale image เนื่องจากเป็นการแปลงข้อมูลค่าสีของแต่ละ pixel ให้เหลือเพียงค่าเดียว เมื่อนำไปทำกระบวนการประมวลผลภาพอื่นๆจะทำให้สามารถทำได้ง่ายและมีความรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

กระบวนการในการแปลงภาพสีในแบบจำลองสี RGB ไปเป็นภาพระดับเทา (Grayscale) สามารถทำได้โดยใช้สมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

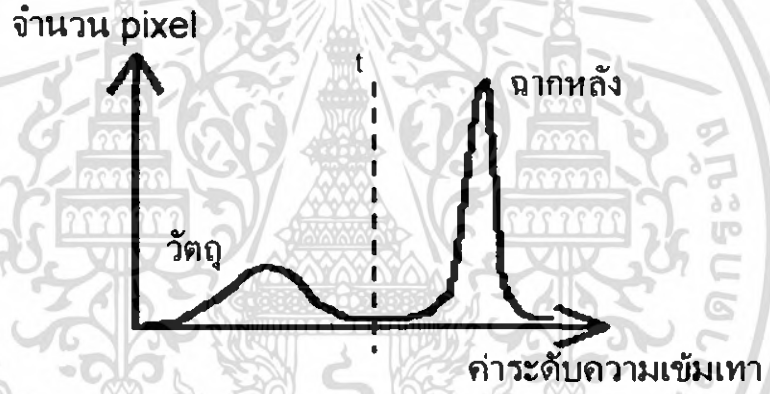
a คือ ตัวแปรสำหรับปรับค่าความคมชัดของภาพ (Contrast)

b คือ ตัวแปรสำหรับปรับค่าความสว่างของภาพ (Brightness)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ค่าฮิสโตรแกรมของภาพวัตถุและพื้นหลัง(ที่มาจาก [8])

กระบวนการทำเทรสโชลด์สามารถทำได้โดยใช้สมการ

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

เมื่อ $B(x,y)$ คือ ภาพผลลัพท์ที่ได้

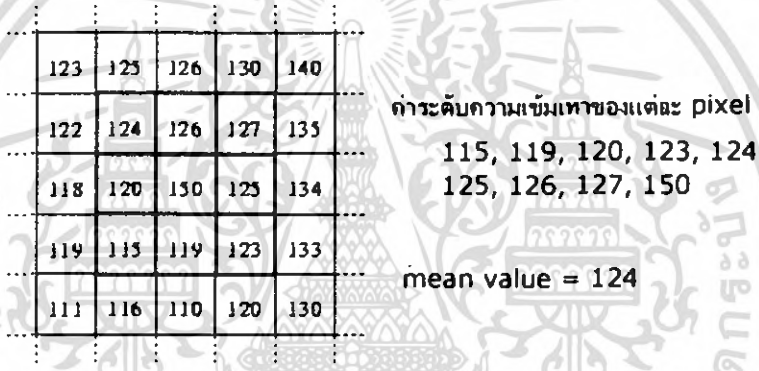
$I(x,y)$ คือ ระดับความเข้มของเทา ณ จุด x,y ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 255

t คือ ค่าระดับที่จะใช้ในการทำเทรสโชลด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

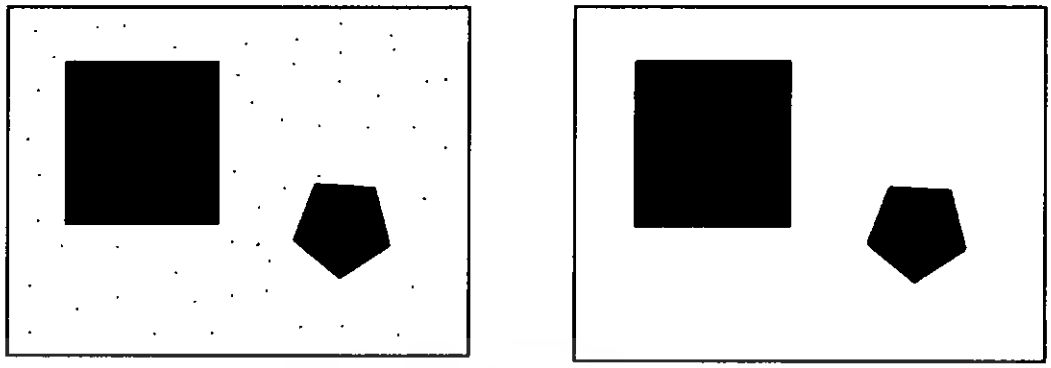


รูปที่ 2.8 วิธีการคำนวณตัวกรองความถี่มัธยฐาน หรือ Median Filter (ที่มาจาก [8])

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

อนึ่งการใช้ตัวกรองความถี่มัธยฐานนั้นจะส่งให้ความคมชัดของภาพลดลงหรือจะทำให้ภาพเบลอตามขนาดของขนาดมาร์คหน้าต่างที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

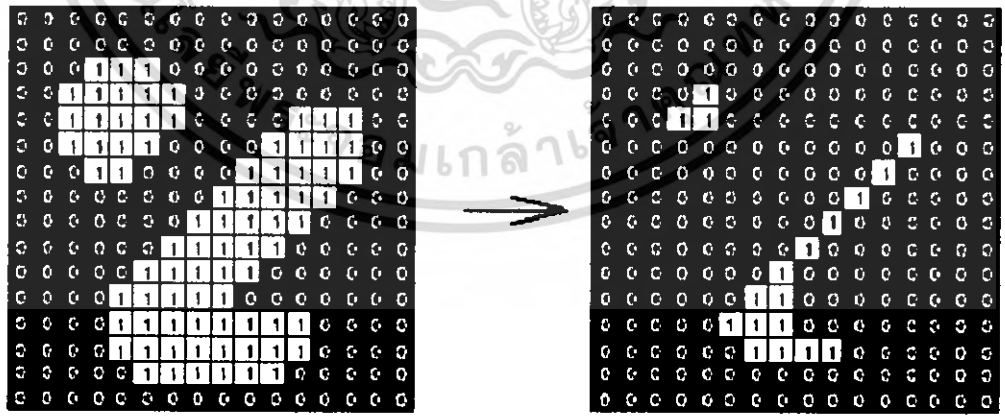


รูปที่ 2.9 ภาพก่อนและหลังผ่านกระบวนการ Median Filter ขนาด 3x3 (ที่มาจาก [8])

2.3.6 การลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion)

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

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



รูปที่ 2.10 กระบวนการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion) ด้วยมาร์ค B (ที่มาจาก [8])

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

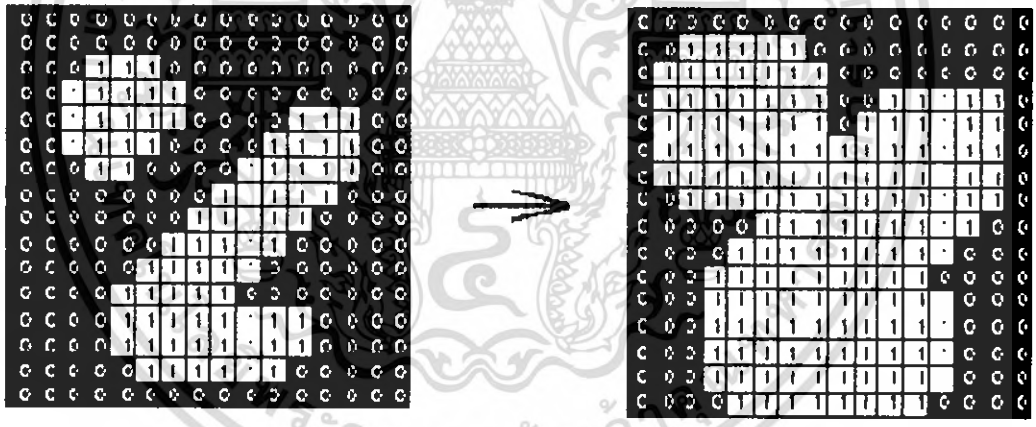
การทำกระบวนการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพสามารถแทนได้ด้วยสัญลักษณ์

$$(A \Theta B) \tag{2.4}$$

2.3.7 การขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation)

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

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



รูปที่ 2.11 กระบวนการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation) ด้วยมาร์ค B (ที่มาจาก [8])

การทำกระบวนการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพสามารถแทนได้ด้วยสัญลักษณ์

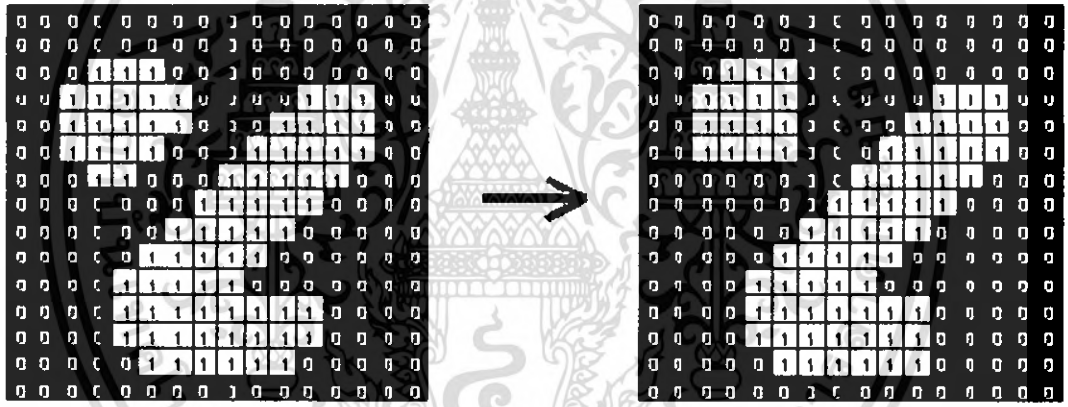
$$(A \oplus B) \tag{2.5}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.8 การลดและขยายรูปทรงวัตถุในภาพ (Opening morphology)

การลดและขยายรูปทรงวัตถุในภาพ หรือ Opening morphology จัดเป็นการนำกระบวนการประมวลผลภาพที่เกี่ยวกับรูปทรงของภาพ (Morphology) มาประยุกต์ ด้วยการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion) ก่อนจากนั้นจึงทำการขยายขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Dilation) คืน โดยการใช้มาร์คเดียวกันในการลดและขยายขนาดรูปทรงทำให้รายละเอียดที่ไม่เหมือนกับในมาร์คที่กำหนดไว้หายไป คงเหลือไว้เฉพาะวัตถุที่รูปทรงที่ต้องการ

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



รูปที่ 2.12 กระบวนการลดและขยายรูปทรงวัตถุในภาพ (Opening morphology) ด้วยมาร์ค B (ที่มาจาก [8])

กระบวนการลดและขยายรูปทรงวัตถุในภาพสามารถแสดงได้ด้วยสัญลักษณ์

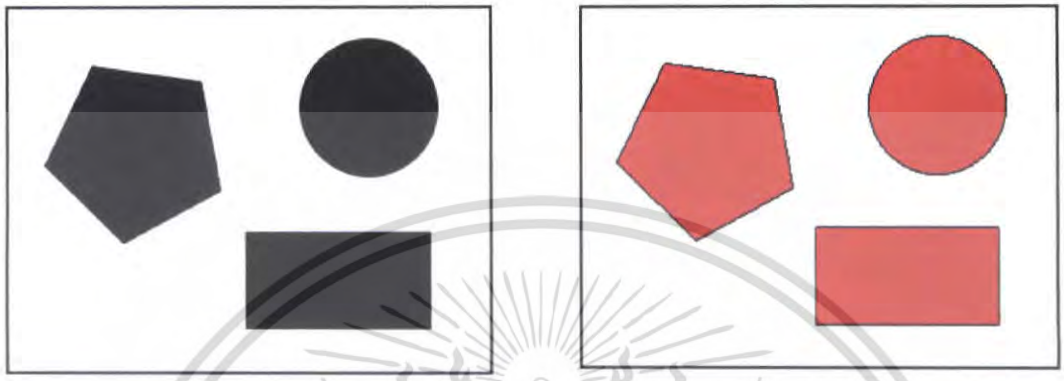
$$A \circ B = (A \oplus B) \Theta B \tag{2.6}$$

2.3.9 การแยกขอบวัตถุจากภาพ (Boundary Extraction)

การแยกขอบวัตถุจากภาพ หรือ Boundary Extraction จัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำกระบวนการประมวลผลภาพที่เกี่ยวกับรูปทรงของภาพ (Morphology) มาประยุกต์ใช้ โดยการนำภาพวัตถุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83155

ต้นฉบับกับภาพวัตถุที่ทำการลดขนาดรูปทรงของวัตถุในภาพ (Erosion) แล้วมาลบกัน ผลที่ได้จะทำให้เหลือเพียงขอบของวัตถุในภาพเท่านั้น



รูปที่ 2.13 ภาพต้นฉบับและภาพที่ซ้อนทับกันหลังการทำกระบวนการ Erosion (สีแดง) และส่วนของขอบภาพจากภาพต้นฉบับ (สีดำ) (ที่มาจาก [8])

การทำกระบวนการแยกขอบวัตถุในภาพสามารถแทนได้ด้วยสัญลักษณ์

$$\beta(A) = A - (A \Theta B) \tag{2.7}$$

เมื่อ $\beta(A)$ คือ ภาพขอบของภาพ A

$(A \Theta B)$ คือ ผลของการทำ Erosion ของภาพ A ด้วยรูปแบบ B

2.3.10 การทำ Convolution ในเชิงการประมวลผลภาพ (Image convolution)

การทำ Convolution ในเชิงการประมวลผลภาพ คือ การกระทำการระหว่างภาพ $f(x,y)$ ที่มีขนาด NxN กับมาส์ค (Mask) $m(x,y)$ ซึ่งเป็นภาพที่มีขนาด MxM โดยที่ M นั้นมีขนาดน้อยกว่า N มากๆ โดยขั้นตอนการทำ Convolution จะเป็นไปตามสมการ

$$g(x,y) = \sum_{x=0}^{N-1}\sum_{y=0}^{N-1}\sum_{i=0}^{M-1}\sum_{j=0}^{M-1} f(i,j) \times m(x-i, y-j) \tag{2.8}$$

เมื่อ $g(x,y)$ คือ ค่าที่ได้จากการทำ Convolution ระหว่างภาพและมาร์คที่กำหนดไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.11 การหาขอบของวัตถุในภาพ (Edge Detection)

การหาเส้นรอบวัตถุที่อยู่ในภาพ คือ การหาความแตกต่างระหว่างพื้นหน้ากับพื้นหลัง ขอบภาพนั้นจะเกิดจากความแตกต่างของความเข้มแสงจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่ง หากความแตกต่างนี้มีค่ามาก ขอบภาพก็จะเห็นได้ชัด ถ้าความแตกต่างมีค่าน้อย ขอบภาพก็จะไม่ชัดเจน

โดยการหาความแตกต่างของความเข้มแสงจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่ง นั้นจะหาได้จากการหาอนุพันธ์ของภาพ ซึ่งหากไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าอนุพันธ์ที่ได้จะเท่ากับศูนย์ แต่ในทางตรงกันข้ามหากค่าระดับความเข้มแสงเกิดการเปลี่ยนแปลงก็จะทำให้ค่าอนุพันธ์ที่ได้ไม่เท่ากับศูนย์ ตามค่าระดับความเข้มเทาของภาพต้นฉบับ

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

ส่วนการทำ Edge Detection แบบ Sobel นั้นเราจะใช้ Mask ขนาด 3x3 ที่มีลักษณะดังนี้

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

โดยจะทำการ Convolution ทั้งในแกนตั้งและแกนนอนจากนั้นจึงนำภาพที่ได้ทั้งสองมารวมกันเพื่อให้ได้ขอบของภาพทั้งในแกนตั้งและแกนนอน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

$$g(x) = a_0 + a_1 x + a_2 x^2 + ... + a_n x^n \tag{2.9}$$

ค่าความผิดพลาดในการประมาณคำนวณได้จาก

$$e(x) = f(x) - g(x) \tag{2.10}$$

ผลรวมกำลังสองของความผิดพลาดจะเป็น

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

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

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

หรือ

$$E = \sum_{i=1}^{n} (a_0 + a_1 x_i + a_2 x_i^2 + ... + a_n x_i^m - f(x_i))^2 \tag{2.11}$$

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

$$\frac{\partial E}{\partial a_j} = \frac{\partial}{\partial a_j} \sum (a_0 + a_1 x_i + a_2 x_i^2 + ... + a_n x_i^m - f(x_i))^2 = 0 \tag{2.12}$$

$$\frac{\partial E}{\partial a_j} = 2 \sum_{i=1}^{n} (a_0 + a_1 x_i + a_2 x_i^2 + ... + a_n x_i^m - f(x_i)) x_i^j = 0 \tag{2.13}$$

จะได้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

$$\frac{\partial E}{\partial a_0} = 0, \frac{\partial E}{\partial a_1} = 0, ..., \frac{\partial E}{\partial a_m} = 0 \tag{2.15}$$

จะได้สมการที่ (1) เป็น

$$a_0 \sum_{i=1}^{n} x_i^0 + a_1 \sum_{i=1}^{n} x_i^1 + ... + a_m \sum_{i=1}^{n} x_i^m = \sum_{i=1}^{n} x_i^0 f(x_i) \tag{2.16}$$

หรือ

$$na_{0+} a_1 \sum_{i=1}^{n} x_i + a_2 \sum_{i=1}^{n} x_i^2 + ... + a_m \sum_{i=1}^{n} x_i^m = \sum_{i=1}^{n} f(x_i) \tag{2.17}$$

สมการอื่นๆจะได้

$$a_0 \sum_{i=1}^{n} x_i^j + a_1 \sum_{i=1}^{n} x_i^{j+1} + ... + a_m \sum_{i=1}^{n} x_i^{j+m} = \sum_{i=1}^{n} x_i^j f(x_i) \tag{2.18}$$

$j = 1,2,3,...,m$

เมื่อจัดในรูป Matrix จะได้

$$\begin{bmatrix} n & \sum_{i=1}^{n} x & \sum_{i=1}^{n} x^2 & ... \sum_{i=1}^{n} x^m \\ \sum_{i=1}^{n} x & \sum_{i=1}^{n} x^2 & \sum_{i=1}^{n} x^3 & ... \sum_{i=1}^{n} x^{m+1} \\ ... & ... & ... & ... \\ \sum_{i=1}^{n} x^m & \sum_{i=1}^{n} x^{m+1} & \sum_{i=1}^{n} x^{m+2} & ... \sum_{i=1}^{n} x^{2m} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ ... \\ a_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^{n} f(x_i) \\ \sum_{i=1}^{n} x_i f(x_i) \\ ... \\ \sum_{i=1}^{n} x_i^m f(x_i) \end{bmatrix} \tag{2.19}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ในบทหน้าเราจะอธิบายถึงวิธีการและรายละเอียดของการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis วิธีการคำนวณมวลโมเลกุลจากภาพที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis และการนำภาพที่ได้จากการทดลองมาประมวลผลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การออกแบบโครงงาน

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

3.1 การทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis

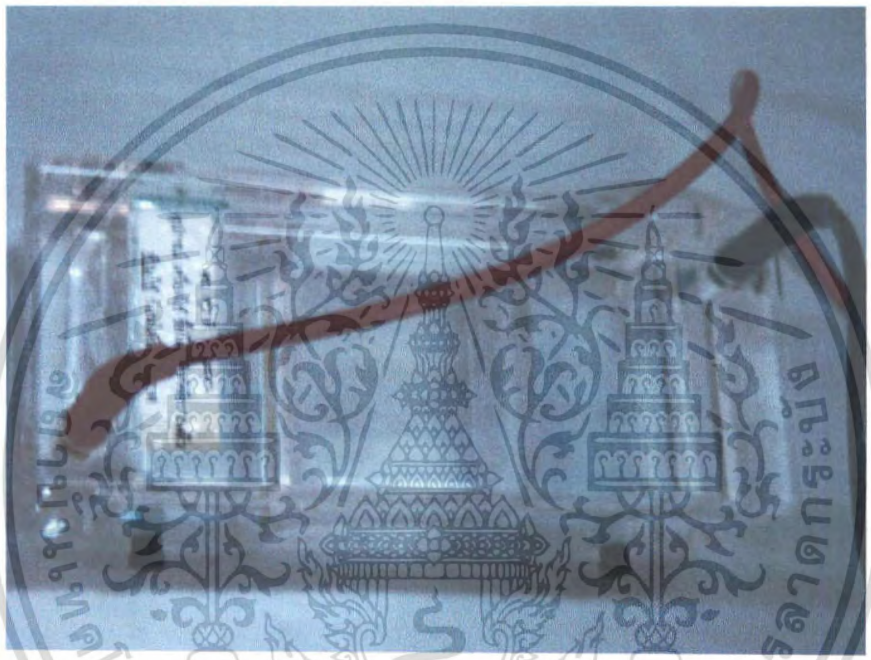
Agarose Gel Electrophoresis เป็นกระบวนการที่ใช้แยกดีเอ็นเอของสารตัวอย่างโดยใช้ไฟฟ้าเพื่อตรวจหาองค์ประกอบของดีเอ็นเอในสารตัวอย่าง เพื่อประโยชน์ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของสารตัวอย่าง

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)

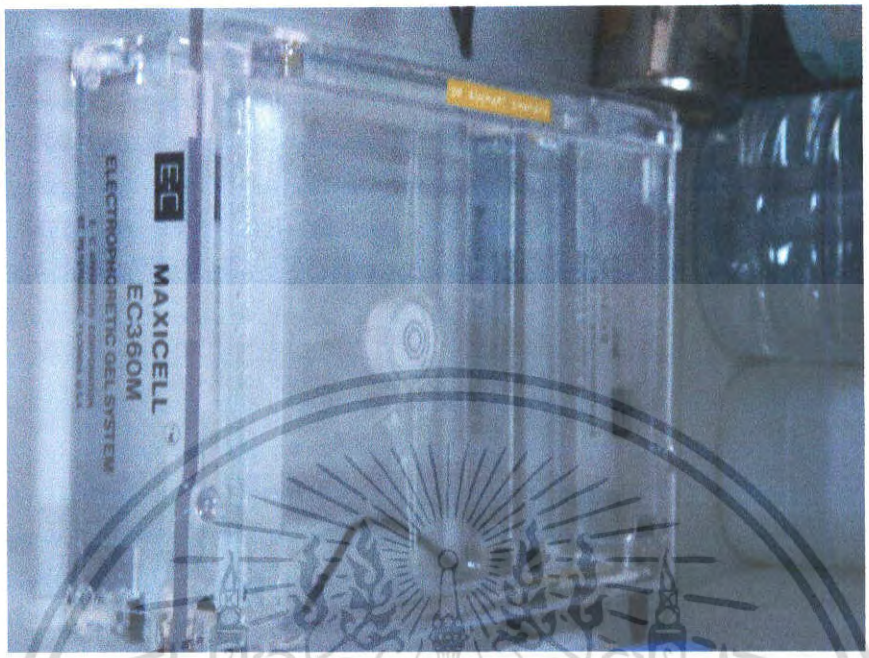
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

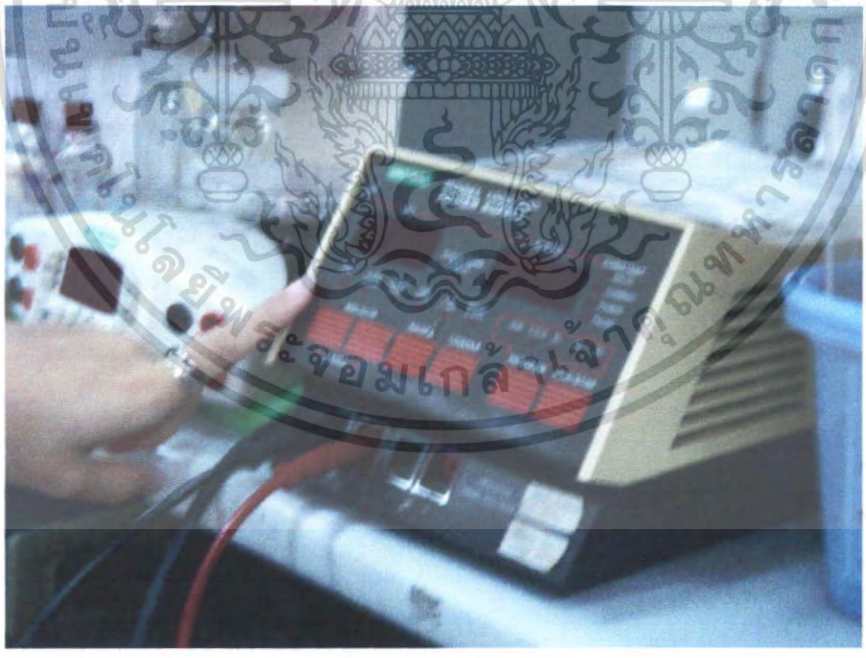


รูปที่ 3.2 เครื่อง Electrophoresis MAXI CELL EC360M DNA Cell

รูปที่ 3.3 สาร DNA ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลายเพื่อตัดส่วนของ DNA แล้ว

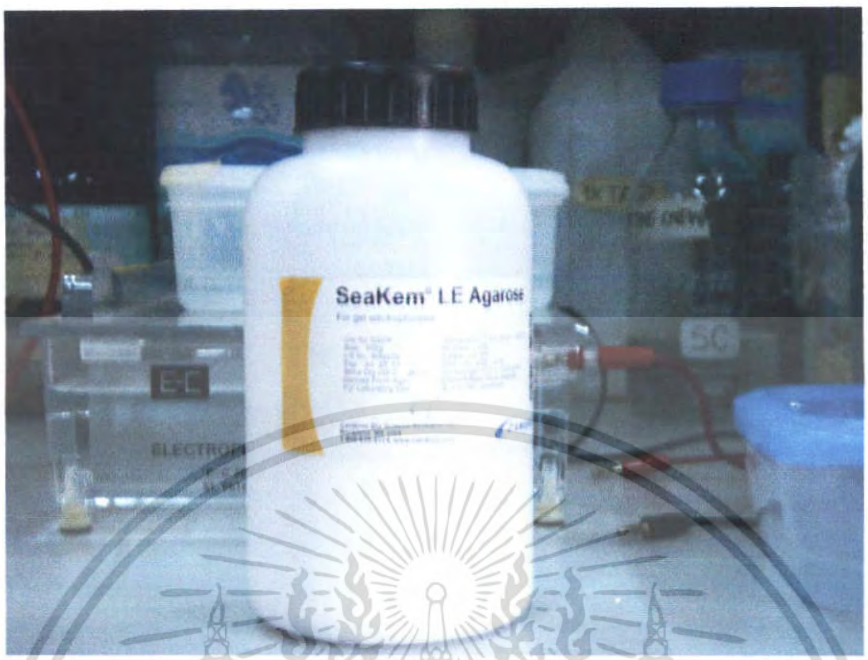
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.4 Pipette



รูปที่ 3.5 Power Supply

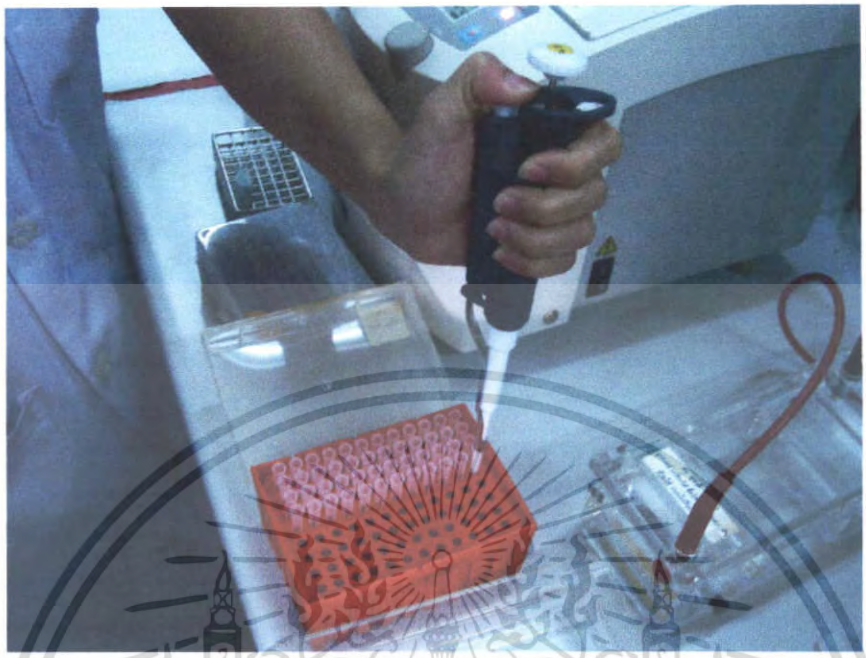
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



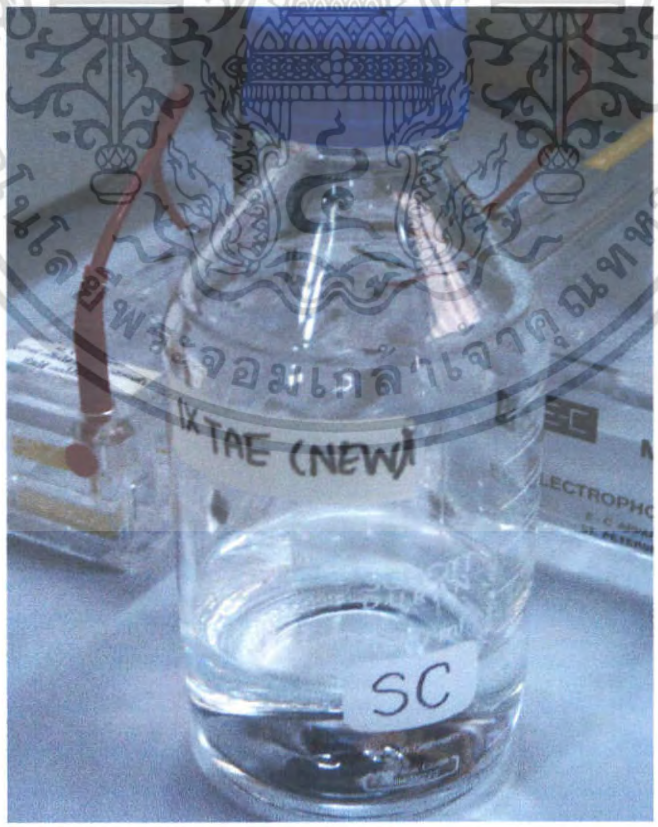
รูปที่ 3.6 สาร Agarose ที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3.7 สาร Agarose Gel ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

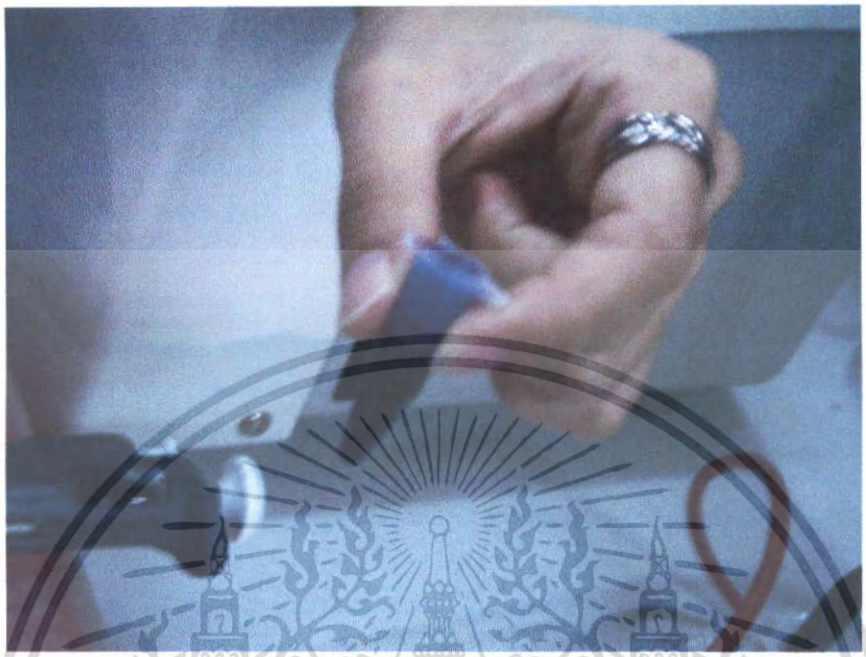


รูปที่ 3.8 Tips อุปกรณ์ที่ใช่สำหรับวางหลอด



รูปที่ 3.9 สาร Tris-acetate-EDTA (TAE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.10 สีที่ใช้ย้อม DNA ในที่นี้เราได้ใช้ Bromophemol Blue หรือ Xylene Cyanol

รูปที่ 3.11 DNA Ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.12 ถาดวางเจล

รูปที่ 3.13 เครื่อง UVP Trasilluminator และเครื่อง UV Transilluminator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 ขั้นตอนการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis

ในขั้นตอนนี้จะแบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือ ขั้นตอนการทำเจล กับ ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยไฟฟ้า

3.1.2.1 ขั้นตอนการทำเจล

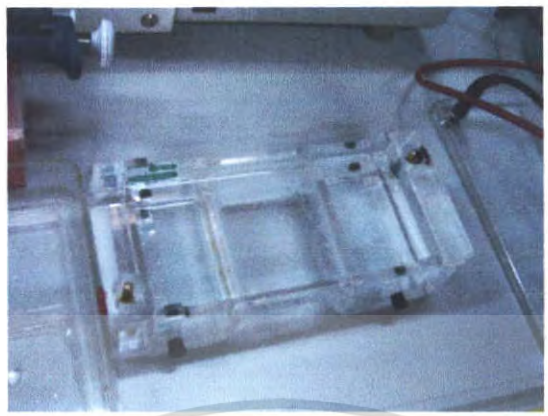
นำผง Agarose Gel ผสมกับ Electrophoresis buffer (1xTAE) จากนั้นก็นำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนกว่า ผง Agarose Gel กับ สาร Electrophoresis buffer (1xTAE) จะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อผสมเป็นเนื้อเดียวกันเรียบร้อยแล้ว เทลงแท่นพิมพ์ แล้วปล่อยรอให้เย็นประมาณ 30 นาที เจลจะแข็งตัวมีลักษณะคล้ายพลาสติกดังรูปที่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



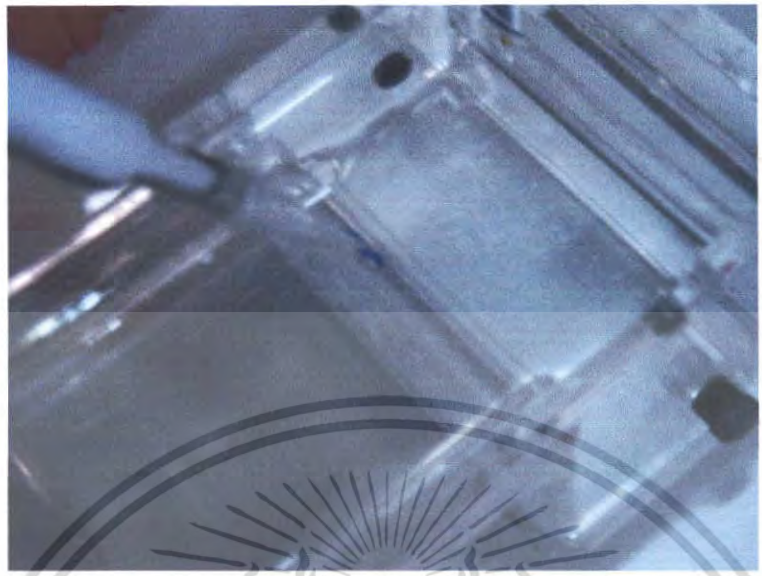
รูปที่ 3.15 เครื่อง Electrophoresis Mini SUB™ DNA Cell ที่เทสารละลาย Electrophoresis buffer (1xTAE) แล้ว

<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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

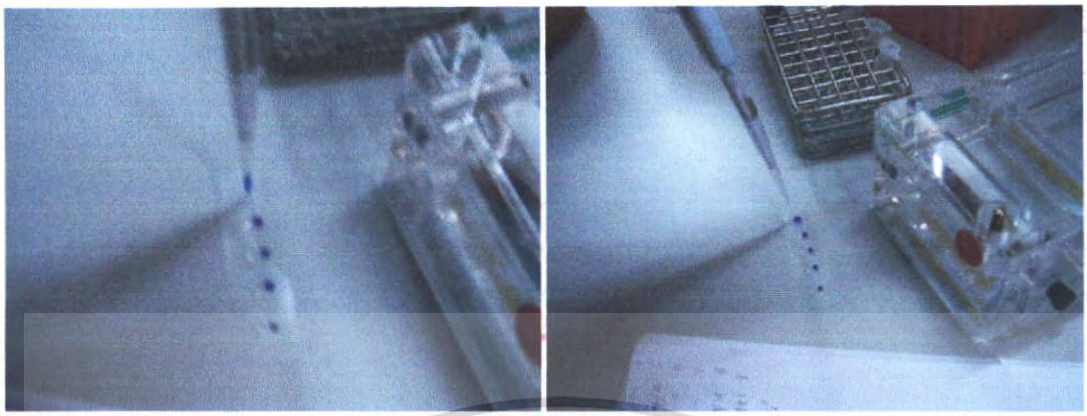
ในหลุมที่ 5 จะใส่ λ BanHI digested 1.5 µl

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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

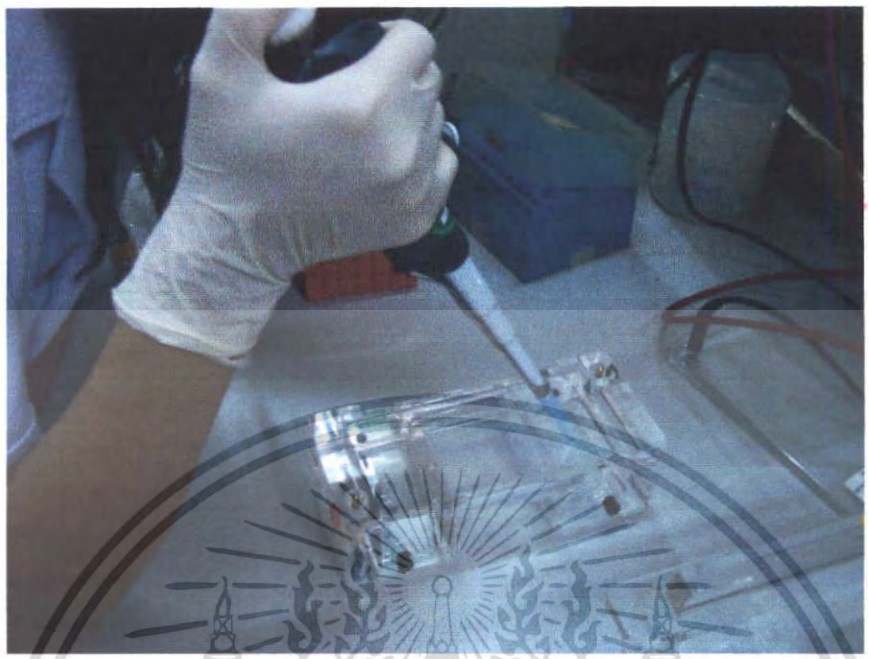


<ก> <ข>

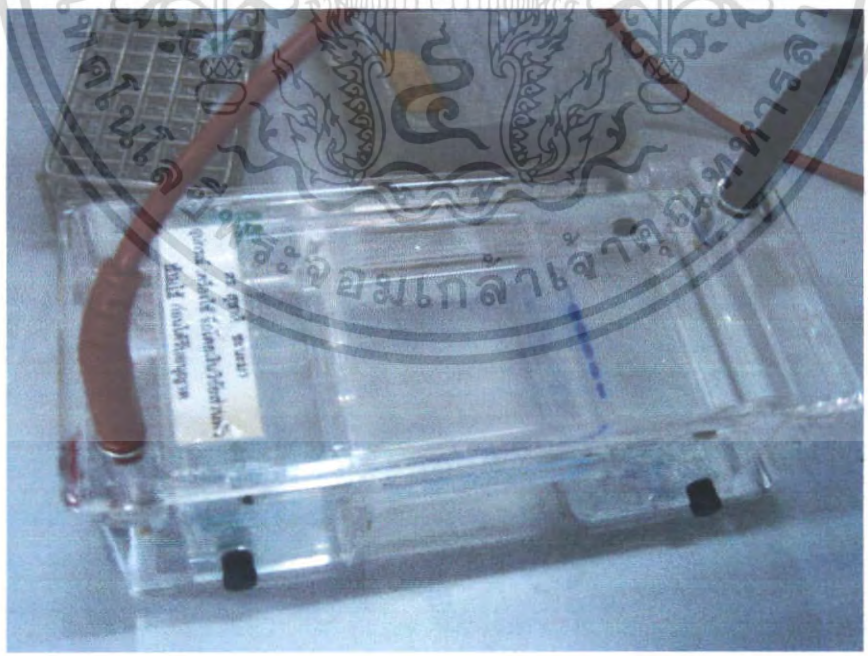
รูปที่ 3.18 นำสาร DNA แต่ละชนิดที่มีปริมาตรตามที่กำหนด แล้วนำมาผสมกับน้ำโดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 6 µl

รูปที่ 3.19 การใช้ Pipette ในการช่วยปรับปริมาตรของสารตามที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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



รูปที่ 3.21 เจลที่มีการใส่สาร DNA ลงในแต่ละหลุมเรียบร้อยแล้ว

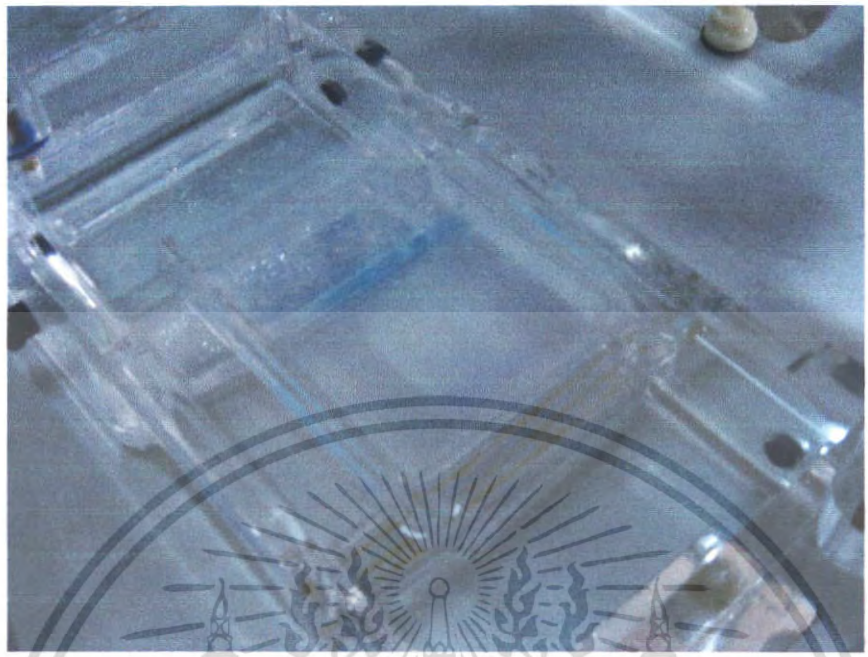
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



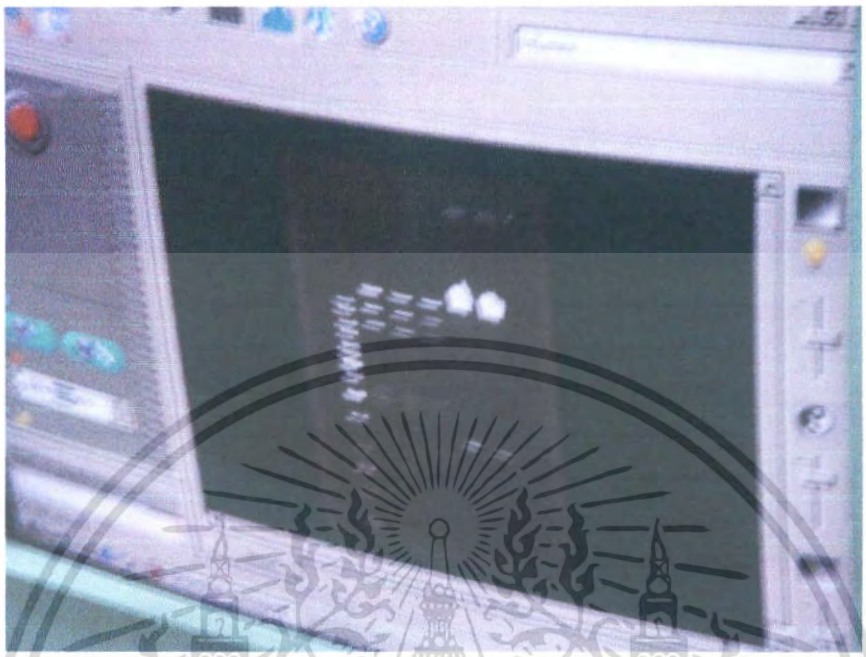
รูปที่ 3.23 การวิ่งของ DNA เมื่อมีการปล่อยกระแสไฟฟ้าในเจล

หลังจากผ่านกระบวนการข้างต้นเรียบร้อยแล้วเราก็จะ ได้เจลที่มีการวิ่งของ 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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.25 ภาพจากหน้าจอคอมพิวเตอร์เมื่อดูผ่านเครื่อง UVP Trasilluminator

รูปที่ 3.26 ภาพ DNA ที่ผ่านกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทางปฏิบัตินักวิเคราะห์จะต้องวัดระยะทางระหว่างช่องใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ ถึงตำแหน่งของแถบสีเพื่อนำไปคำนวณน้ำหนักโมเลกุล นอกจากนี้ยังต้องวัดความเข้มข้นของแถบสีเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเออีกด้วย

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 [9])

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

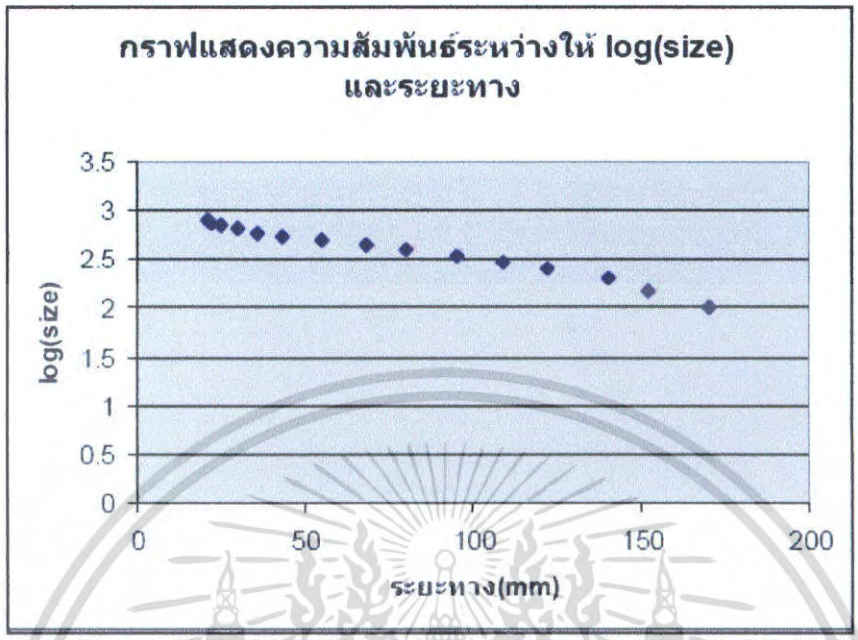
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

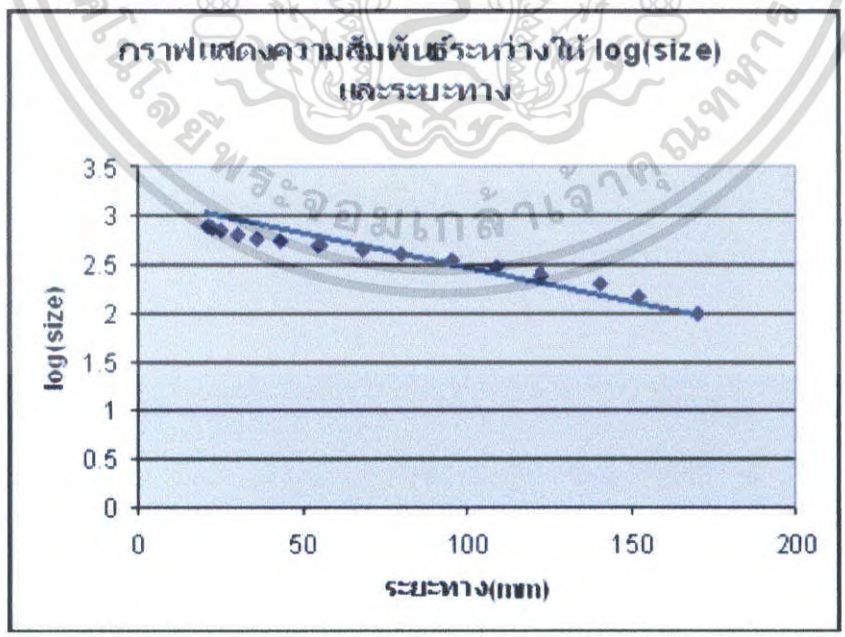
ขั้นตอนที่สาม นำค่า Log(size) และระยะทางที่วัดได้ไปวัดกราฟ โดยให้ Log(size) อยู่แกน y และระยะทางอยู่แกน x ดังรูปที่ 3.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log (size) และระยะทางที่วัดได้ (ที่มาจาก [9])

ขั้นตอนที่สี่ ประมาณค่ากราฟให้รูปที่ออกมาเป็นสมการเส้นตรงและหาค่าสมการนั้นออกมาดังรูป 3.29



รูปที่ 3.29 กราฟเส้นตรงจากการประมาณความสัมพันธ์ (ที่มาจาก [9])

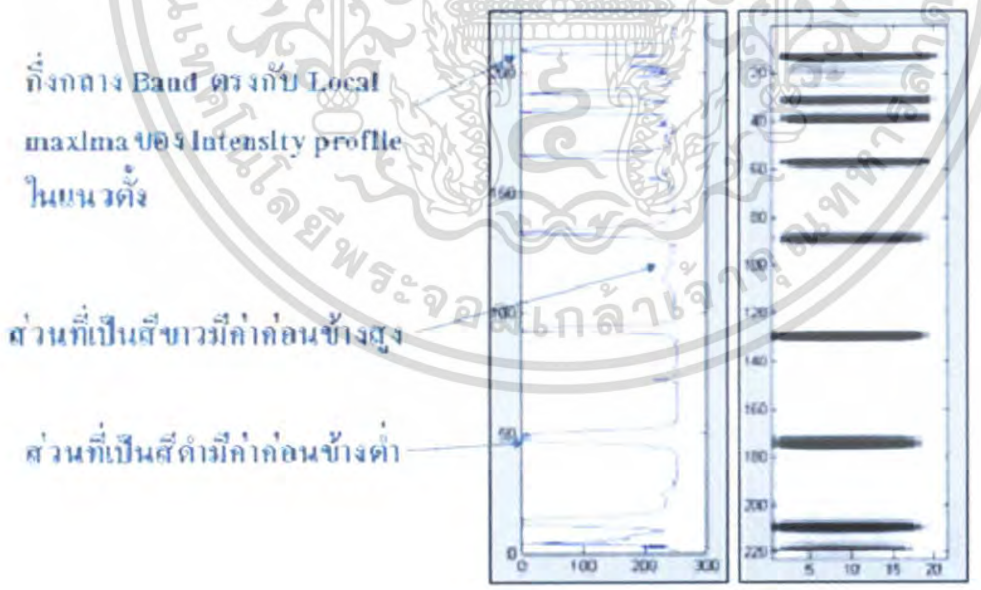
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 และยังมีการหาจุดกึ่งกลางของแทบภาพในแต่ละเลนอีกด้วย ซึ่งผลสำเร็จของการประมวลผลภาพ Agarose Gel จะเป็นดังรูปที่ 3.30



รูปที่ 3.30 Intensity profile ตามแนวตั้งของภาพถ่ายอะกาโรสเจลใน 1 เลน (ที่มาจาก [9])

ในบทต่อไปเราจะกล่าวในส่วนของผลการทดลองเมื่อมีการนำภาพที่ได้จากการทดลอง Agarose Gel Electrophoresis มาภาพกระบวนการวิเคราะห์ภาพเพื่อคำนวณหามวลโมเลกุลของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

การทดลองและผลการทดลอง

บทนี้กล่าวถึงการอธิบายผลการทดลองที่ได้จากโครงงานเมื่อนำภาพ Agarose Gel ไปประมวลผลและวิเคราะห์ในคอมพิวเตอร์เพื่อให้ได้ค่าที่ออกมาเป็นกราฟเพื่อที่จะเก็บบันทึกลงในฐานข้อมูลได้

4.1 การทดลองการทำงานของระบบที่ใช้วิเคราะห์เลนแต่ละเลนของภาพ Agarose Gel

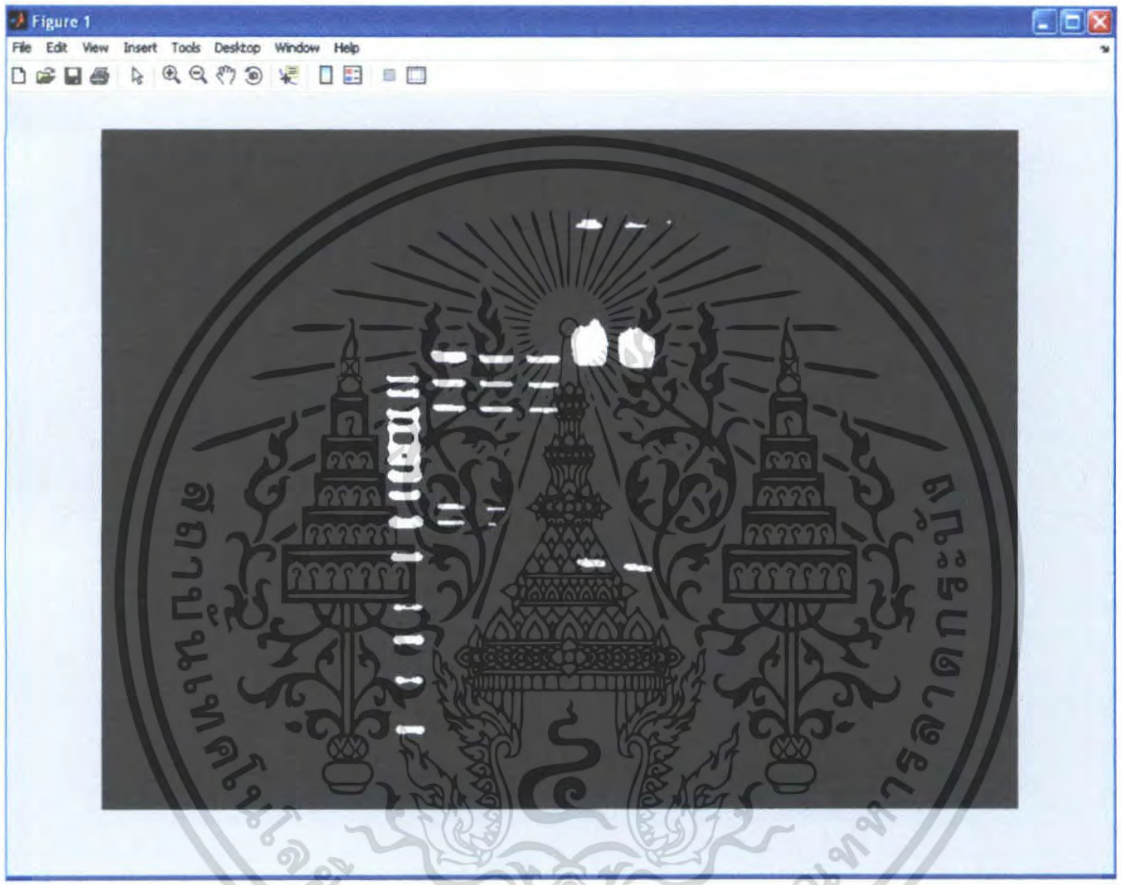
เมื่อเราทำการทดลองในส่วนของ Agarose Gel Electrophoresis เสร็จสมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว เราจะได้ภาพ Agarose Gel แสดงดังรูปที่ 3.33 ในบทที่ 3 เราจะเห็นว่าภาพ Agarose Gel ที่ได้จากการทดลองนั้นจะมีลักษณะเป็นเลนย่อยๆหลายเลน แล้วในแต่ละเลนจะประกอบไปด้วยแถบสีขาวหลายแถบ แล้วจากภาพที่ได้นี้เราสามารถแยกดูว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใดได้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

ขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ภาพ Agarose Gel คือการ Load ภาพเข้ามาในโปรแกรม

รูปที่ 4.1 ภาพ Agarose Gel ที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

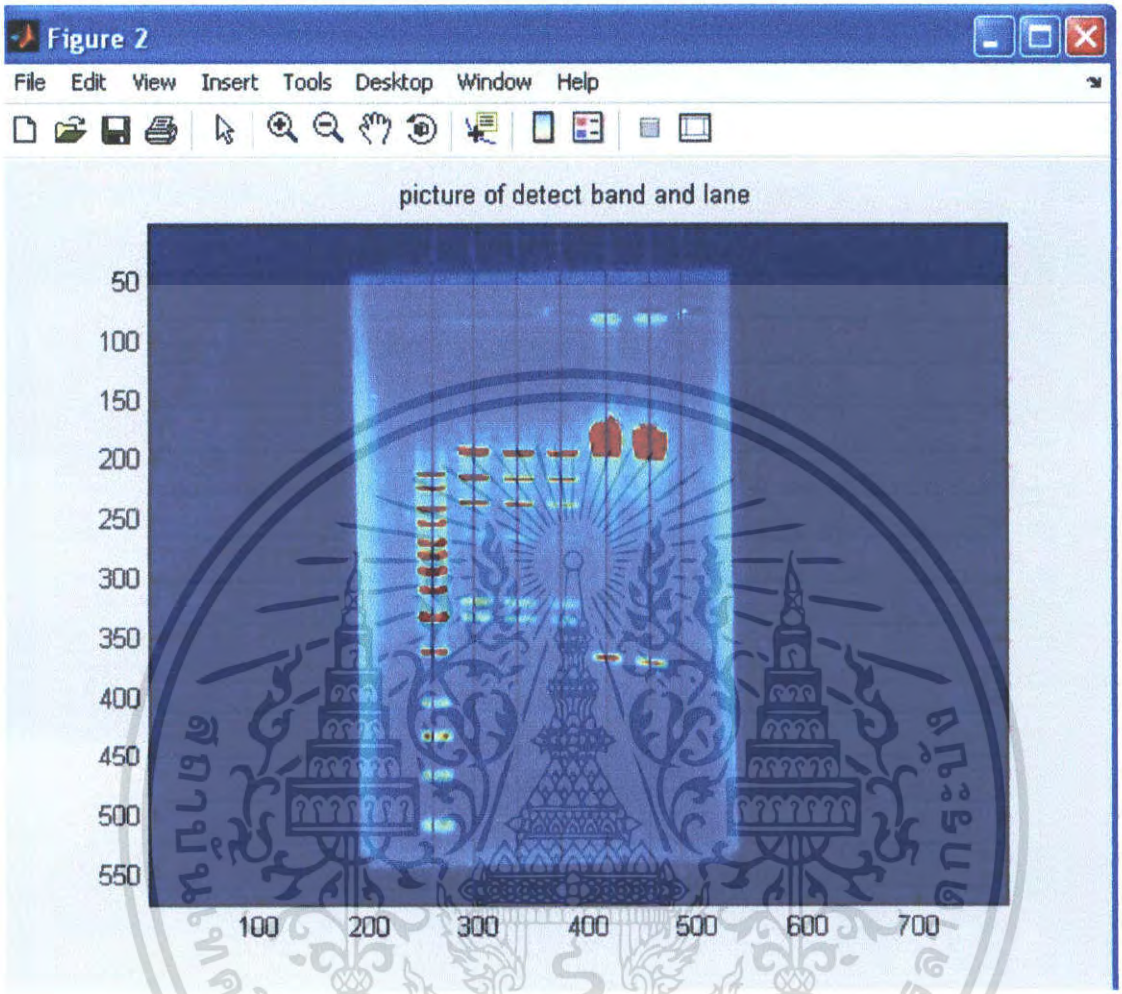
ในขั้นต่อไปในการประมวลภาพต้องมีการปรับแสงของภาพและลดสัญญาณรบกวนก่อน เพื่อให้ภาพ Agarose Gel เพื่อให้ความคมชัดมากยิ่งขึ้น เพื่อที่จะได้แสดงผลค่าออกมาได้ค่าที่สมบูรณ์มากที่สุด โดยใช้วิธีการทำ Threshold และ Median Filter



รูปที่ 4.2 ภาพ Agarose Gel เมื่อผ่านกระบวนการปรับแสงและลดสัญญารบกวนเรียบร้อยแล้ว

หลังจากผ่านขั้นตอนในการปรับแสงและลดสัญญาณรบกวนของภาพเรียบร้อยแล้ว ดังแสดงรูปที่ 4.2 จะนำภาพที่ได้มาทำการหาจุดกึ่งกลางของของแถบในแต่ละเลนเมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วจะได้ผลดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

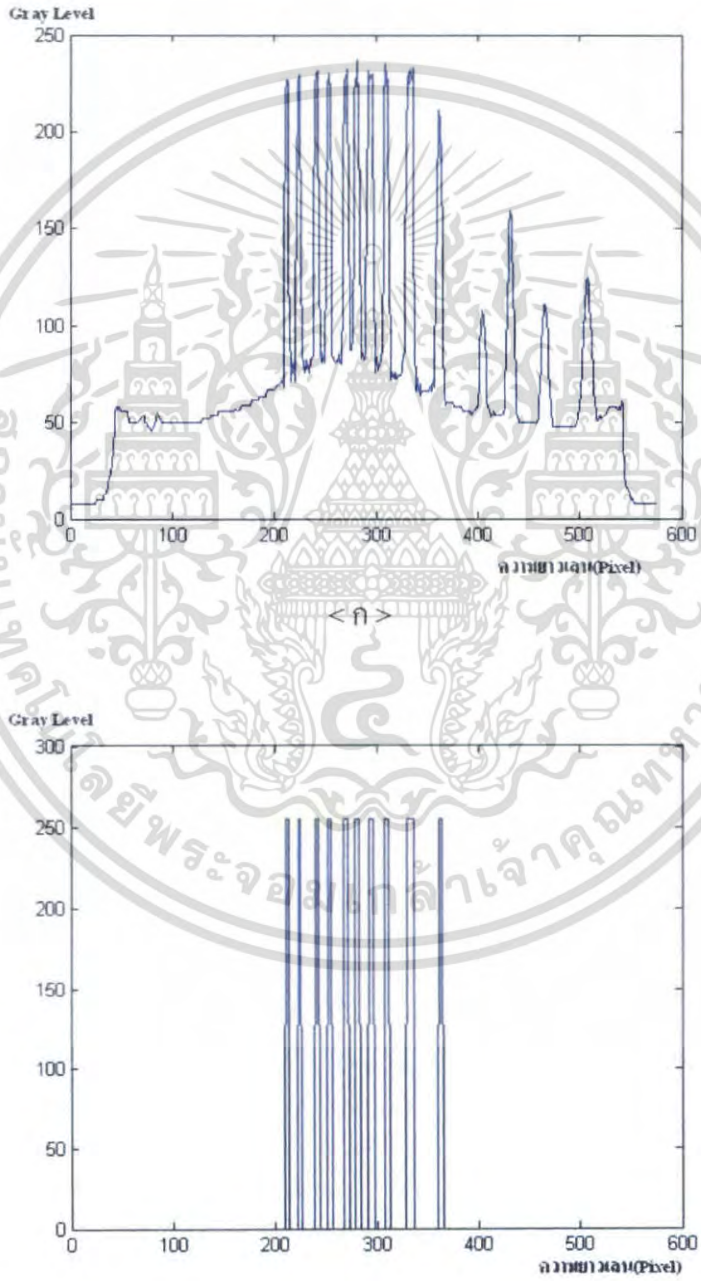


รูปที่ 4.3 ภาพ Agarose Gel ที่มีการตรวจจับกึ่งกลางของแถบในแต่ละเลนแล้ว

ในขั้นตอนต่อไปจะมีการตรวจจับเลนแต่ละเลนต่างๆออกมาเพื่อทำการวิเคราะห์แถบสีในแต่ละเลน เพื่อแสดงออกมาเป็นกราฟ หลังจากนั้นจะมีการนำกราฟที่ได้ไปลบพื้นหลังของภาพเพื่อให้ผลที่ออกมาสามารถคำนวณมวลโมเลกุลได้อย่างถูกต้องสมบูรณ์ที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลนแรกของการวิเคราะห์ภาพAgarose Gel ที่ได้จากการทดลองพบว่าระบบมีการตรวจจับหาแถบในเลนแรกและมีการลบแถบที่มีความไม่ชัดเจนออกทำให้แสดงออกแต่แถบที่ชัดเจนดังที่จะแสดงในรูปที่ 4.4 จะเห็นว่ามีการลบแถบตั้งแต่ Pixel ที่ 400 เนื่องจากว่าแถบเหล่านั้นมีค่าความเข้ม Threshold ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในเลนนี้ดังนั้นจึงมีการตัดออกเนื่องจากระบบได้วิเคราะห์ว่าเป็นพื้นหลัง



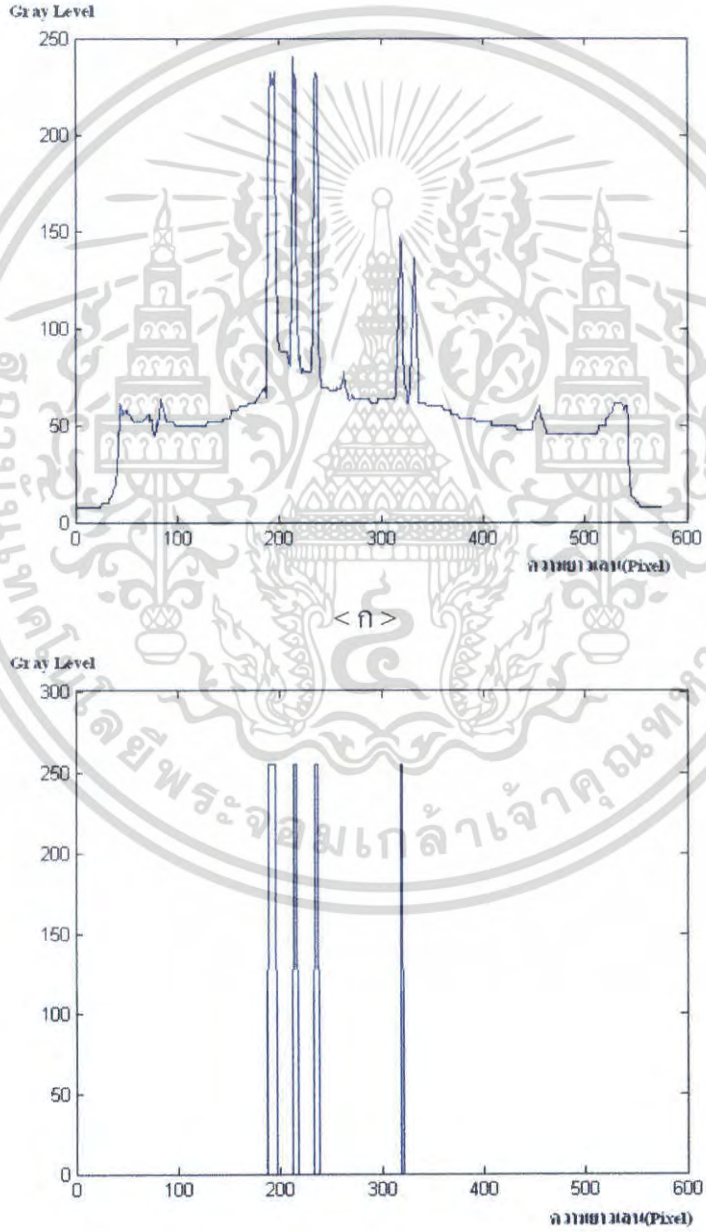
< ก >

< ข >

รูปที่ 4.4 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนแรก ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลนที่สองของการวิเคราะห์ภาพAgarose Gel ที่ได้จากการทดลองพบว่าระบบมีการตรวจจับหาแถบในเลนที่สองและมีการลบแถบที่มีความไม่ชัดเจนออกทำให้แสดงออกแต่แถบที่ชัดเจนดังที่จะแสดงในรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าในช่วง Pixel ที่ 300-330 จะมีแถบที่มีความเข้มของ Threshold ที่สูงกว่าค่าเฉลี่ย แต่เนื่องจากมันอยู่ใกล้กันและมีความไม่ชัดเจนสูงจึงทำให้ระบบมองว่าเป็นแถบเดียวกัน ส่วนแถบที่มีความเข้มของค่า Threshold ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในเลนนี้ระบบจะมีการตัดออกเนื่องจากระบบวิเคราะห์ได้ว่าเป็นพื้นหลัง



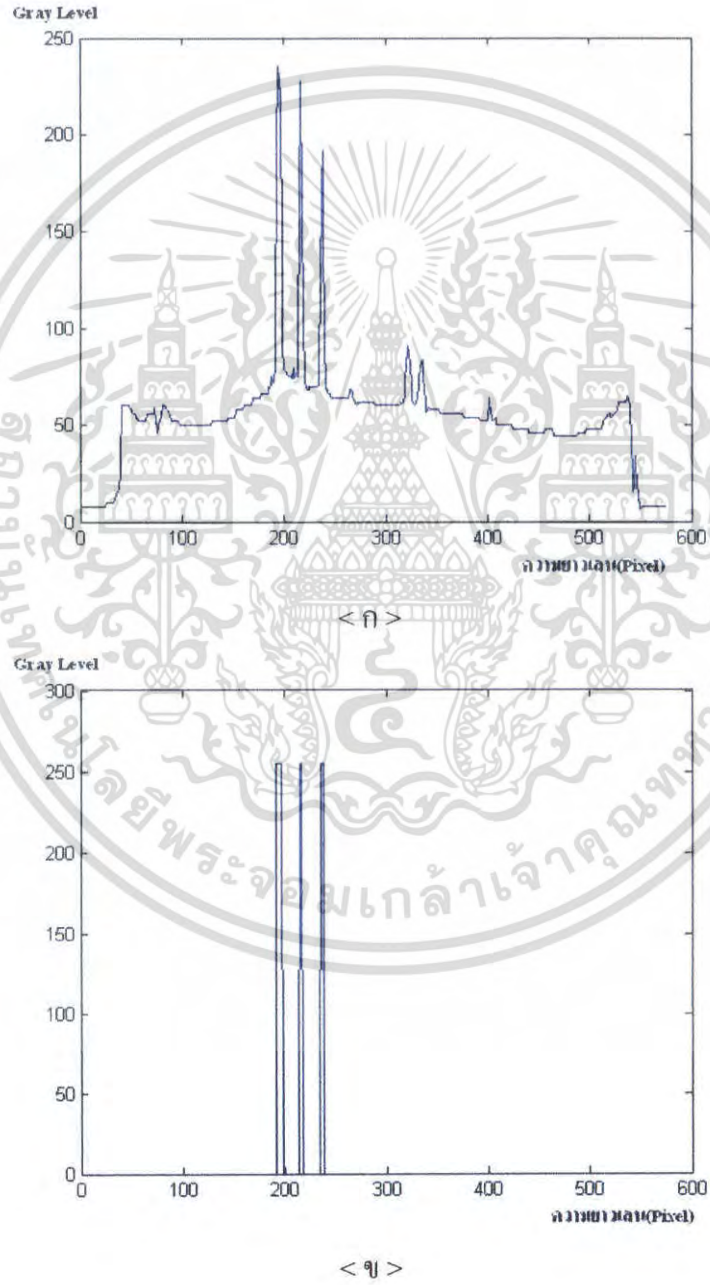
< ก >

< ข >

รูปที่ 4.5 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่สอง ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลนที่สามของการวิเคราะห์ภาพAgarose Gel ที่ได้จากการทดลองพบว่าระบบมีการตรวจจับหาแถบในเลนที่สามและมีการลบแถบที่มีความไม่ชัดเจนออกทำให้แสดงออกแต่แถบที่ชัดเจนดังที่จะแสดงในรูปที่ 4.6 เนื่องจากว่าแถบเหล่านั้นมีค่าความเข้ม Threshold ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในเลนนี้ดังนั้นจึงมีการตัดออกเนื่องจากระบบได้วิเคราะห์ว่าเป็นพื้นหลัง



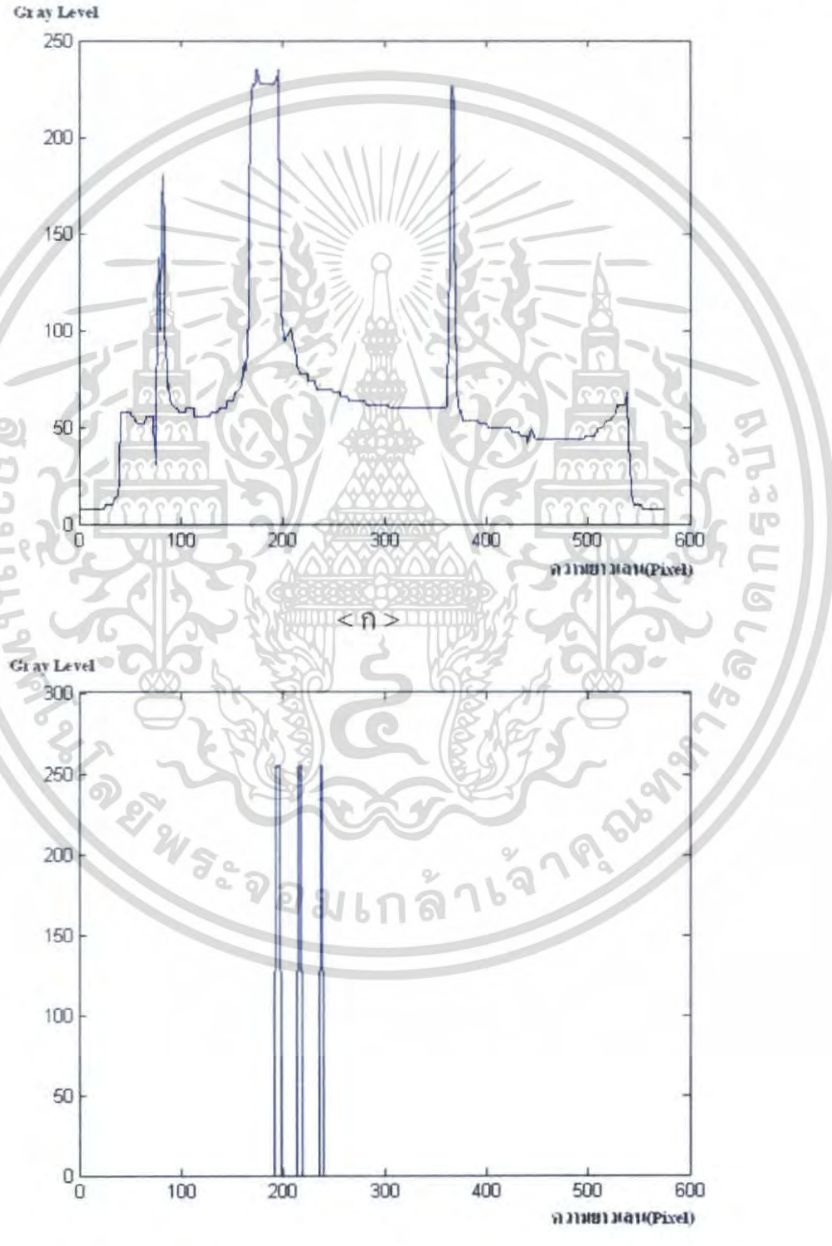
< ก >

< ข >

รูปที่ 4.6 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่สาม ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

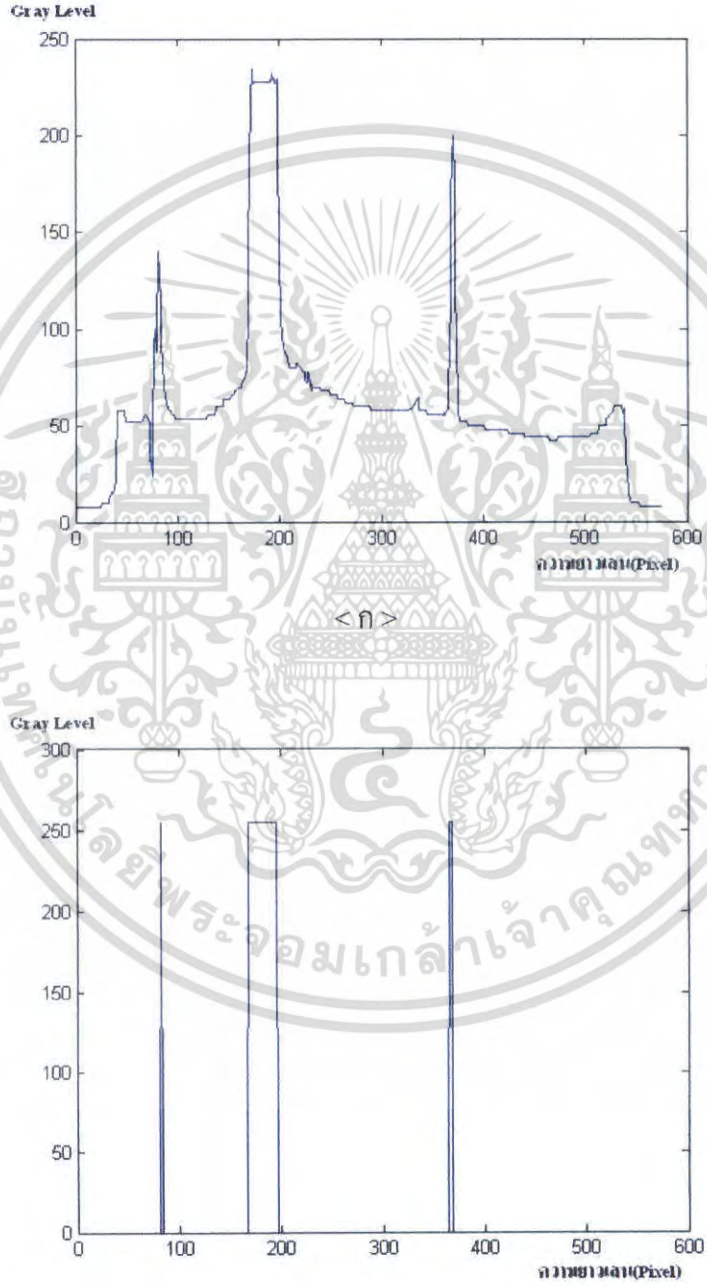
ในเลนที่สี่ของการวิเคราะห์ภาพAgarose Gel ที่ได้จากการทดลองพบว่าระบบมีการตรวจจับหาแถบในเลนที่สี่และมีการลบแถบที่มีความไม่ชัดเจนออกทำให้แสดงออกแต่แถบที่ชัดเจนดังที่จะแสดงในรูปที่ 4.7 เนื่องจากว่าแถบเหล่านั้นมีค่าความเข้ม Threshold ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในเลนนี้ดังนั้นจึงมีการตัดออกเนื่องจากระบบได้วิเคราะห์ว่าเป็นพื้นหลัง นอกจากนี้ภาพที่แสดงเมื่อมีการลบพื้นหลังออกจะพบว่าตำแหน่งของแถบมีการผิดพลาดซึ่งถือว่าเป็นความผิดพลาดของระบบ



รูปที่ 4.7 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่สี่ ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลนที่ห้าของการวิเคราะห์ภาพAgarose Gel ที่ได้จากการทดลองพบว่าระบบมีการตรวจจับหาแถบในเลนที่ห้าและมีการลบแถบที่มีความไม่ชัดเจนออกทำให้แสดงออกแต่แถบที่ชัดเจนดังที่จะแสดงในรูปที่ 4.8 เนื่องจากว่าแถบเหล่านั้นมีค่าความเข้ม Threshold ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในเลนนี้ดังนั้นจึงมีการตัดออกเนื่องจากระบบได้วิเคราะห์ว่าเป็นพื้นหลัง



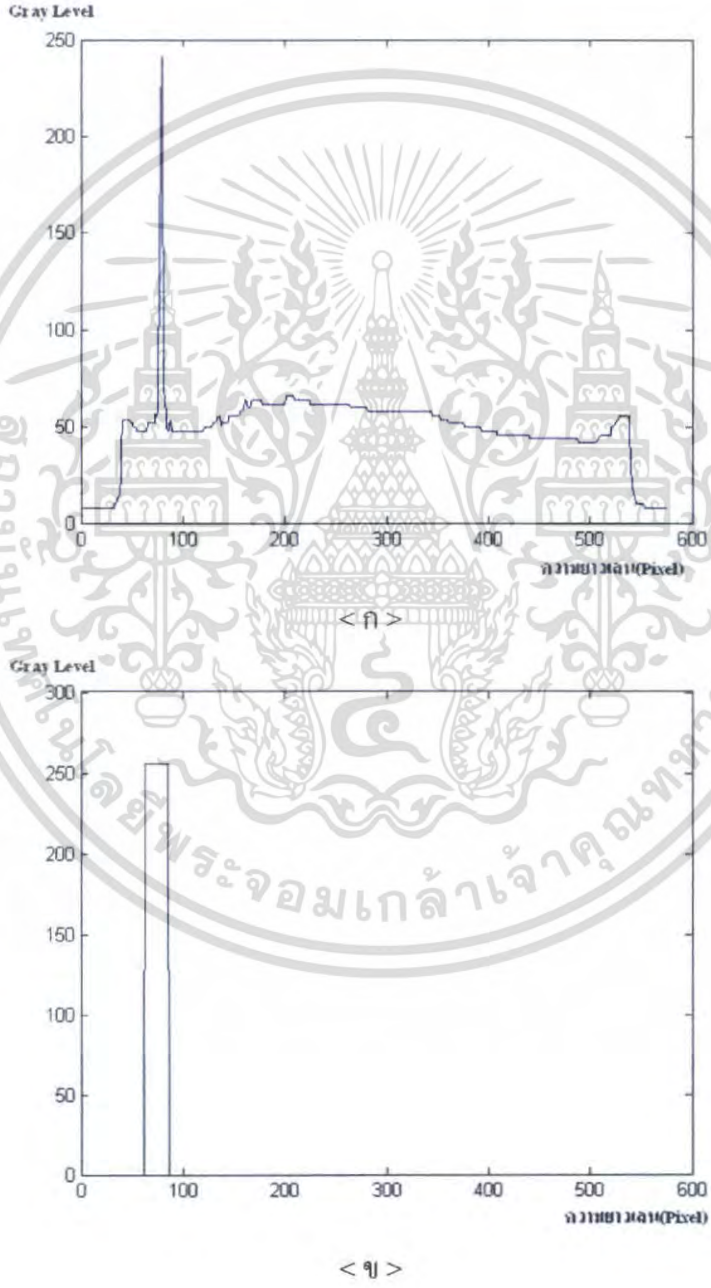
< ก >

< ข >

รูปที่ 4.8 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่ห้า ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลนที่หกของการวิเคราะห์ภาพAgarose Gel ที่ได้จากการทดลองพบว่าระบบมีการตรวจจับหาแถบในเลนที่หกและมีการลบแถบที่มีความไม่ชัดเจนออกทำให้แสดงออกแต่แถบที่ชัดเจนดังที่จะแสดงในรูปที่ 4.9 เนื่องจากว่าแถบเหล่านั้นมีค่าความเข้ม Threshold ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในเลนนี้ดังนั้นจึงมีการตัดออกเนื่องจากระบบได้วิเคราะห์ว่าเป็นพื้นหลัง



< ก >

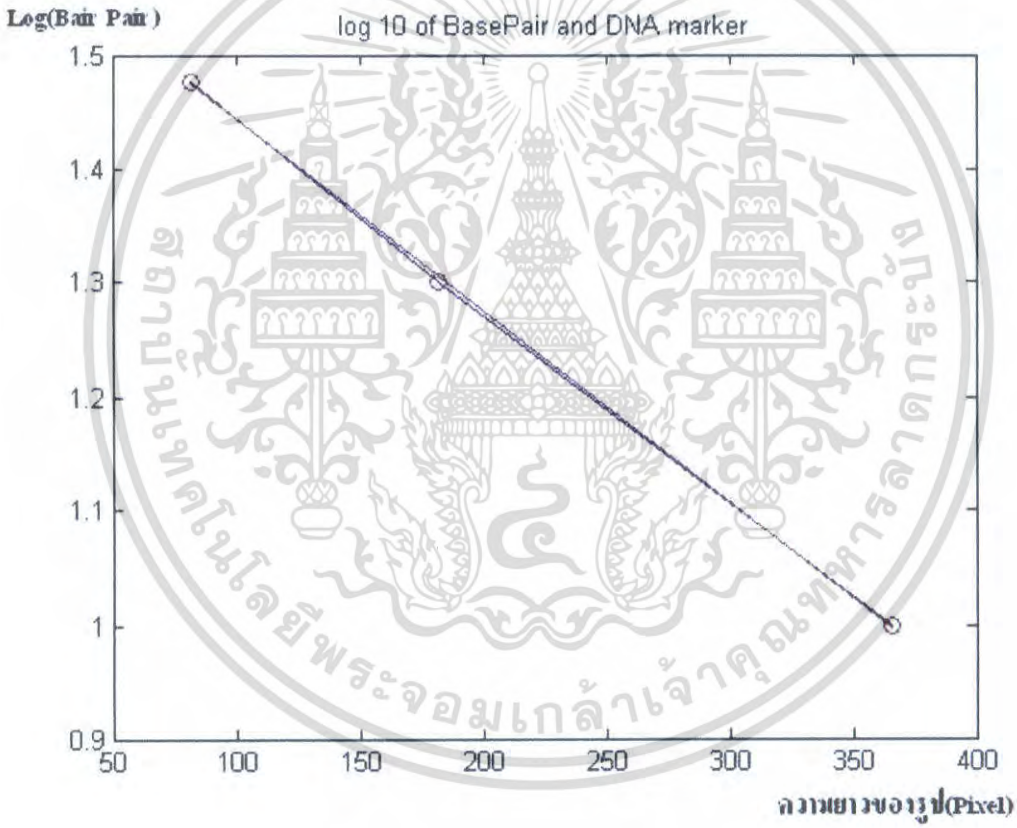
< ข >

รูปที่ 4.9 ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่ได้จากภาพ Agarose Gel ในเลนที่หก ก่อนและหลังการลบพื้นหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคำนวณหาปริมาณมวลโมเลกุล

ในการแปลงจากระยะทางที่ปรากฏบนภาพถ่ายในหน่วย Pixel ไปเป็นระยะทางจริงนั้น ผู้ใช้จะต้องกำหนด Calibration factor หรือขนาดของ Pixel ในหน่วยมิลลิเมตรขึ้นมาเอง สำหรับภาพที่ถ่ายโดยใช้อุปกรณ์ถ่ายภาพที่พัฒนาขึ้นในโครงการนี้จะมี Calibration factor เป็น 3.47 มิลลิเมตรต่อ พิกเซล ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองจริง ในการคำนวณมวลโมเลกุลเราสามารถหาได้โดยหาความสัมพันธ์ของสมการเชิงเส้นระหว่าง $\log_{10}$ของมวลโมเลกุล กับ $\log_{10}$ของระยะทางแถบสี



รูปที่ 4.10 สมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log(size) กับระยะทางของแถบสีที่ได้จากวิธีการ Least square

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการคำนวณมวลโมเลกุลนั้นสามารถหาได้ตามขั้นตอนดังที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 3 หัวข้อที่ 3.2 เรื่อง ขั้นตอนการคำนวณหามวลโมเลกุลของแต่ละแถบสี สมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log(size) และ ระยะทางของแต่ละแถบสีของStandard เลน ที่ได้จากวิธีการ Least square แสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งค่าของมวลโมเลกุลในแต่ละเลนที่ได้จากการวิเคราะห์จะแสดงดังรูปที่ 4.11

Array Editor - mass_cal

Stack:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	13.4515	18.0316	19.4772	19.3275	19.2532	29.7664	20.0100	13.3997	25.0248
2	0	17.2163	17.8242	17.7556	17.7556	20.2428	9.7675	0	23.3469
3	0	16.1240	16.5014	16.3746	16.3116	9.9576	0	0	22.9011
4	0	15.3949	11.9360	0	0	0	0	0	22.4638
5	0	14.4182	0	0	0	0	0	0	21.9501
6	0	13.8195	0	0	0	0	0	0	21.6142
7	0	13.1438	0	0	0	0	0	0	21.2015
8	0	12.3575	0	0	0	0	0	0	20.9576
9	0	11.3087	0	0	0	0	0	0	20.7166
10	0	10.1124	0	0	0	0	0	0	19.8563
11	0	0	0	0	0	0	0	0	19.5524
12	0	0	0	0	0	0	0	0	19.1791
13	0	0	0	0	0	0	0	0	18.3119
14	0	0	0	0	0	0	0	0	17.4166
15	0	0	0	0	0	0	0	0	16.8226
16	0	0	0	0	0	0	0	0	12.2625
17	0	0	0	0	0	0	0	0	9.0425
18	0	0	0	0	0	0	0	0	8.7679
19	0	0	0	0	0	0	0	0	8.5344
20	0	0	0	0	0	0	0	0	8.4038
21	0	0	0	0	0	0	0	0	8.0548
22	0	0	0	0	0	0	0	0	7.9010
23	0	0	0	0	0	0	0	0	7.7801
24	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5147
25	0	0	0	0	0	0	0	0	7.3712
26	0	0	0	0	0	0	0	0	7.2305
27	0	0	0	0	0	0	0	0	6.7717

รูปที่ 4.11 รายงานค่าปริมาณมวลโมเลกุลของแต่ละแถบสี โดยโปรแกรม MATLAB

ในบทต่อไปเราจะสรุปผลการวิเคราะห์ภาพที่ได้รวมทั้งวิเคราะห์ถึงปัญหาที่ได้ประสบในการวิเคราะห์ว่าทำไม มีสาเหตุอะไรที่ทำให้ค่ามวลโมเลกุลที่คำนวณมีความคลาดเคลื่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ข้อเสนอแนะในการพัฒนา

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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] รศ.ดร.มนัส สังวรศิลป์ และวรรัตน์ ภัทรอมรกุล, คู่มือการใช้ MATLAB ฉบับสมบูรณ์, สำนักพิมพ์อินโฟเพรส, 2543

[5] www.bio-rad.com.

[6] www.prenhall.com/gonzalezwoods.

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

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

[9] อทิตยา มณีวรรณ และกิตติพงษ์ ฐานะสุนทรกุกษ์ "ระบบวิเคราะห์ภาพถ่ายอะกาโรสเจล" ภาควิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้