การผลิต DNA ladder โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA ladder Production using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique

นางสาวกรรณิกา รัตนวราหะ

นางสาววัชรายา มาศแจ้ง

นางสาวอรฤทัย แสนเสาร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

การผลิต DNA ladder โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA ladder Production using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique

นางสาวกรรณิกา รัตนวราหะ

นางสาววัชรายา มาศแจ้ง

นางสาวอรฤทัย แสนเสาร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA LADDER PRODUCTION USING
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUE

MISS KANNIKA RATTANAWARAHA

MISS WATCHALAYA MATJANK

MISS ONRUTHAI SANSAO

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL RESOURCE CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2013

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิต DNA ladder โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA ladder Production using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique

ชื่อนักศึกษา นางสาวกรรณิกา รัตนวราหะ 53051145

นางสาววัชรายา มาศแจ้ง 53051254

นางสาวอรฤทัย แสนเสาร์ 53051302

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2556

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิต DNA ladder โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรรณิกา	รัตนวราหะ	53051145
	นางสาววัชรายา	มาศแจ้ง	53051254
	นางสาวอรฤทัย	แสนเสาร์	53051302
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม		
ปีการศึกษา	2556		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์		

บทคัดย่อ

DNA ladder หรือ DNA marker for gel electrophoresis หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน(DNA molecular weight standard) คือชุดของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งทราบขนาดแน่นอน ในการผลิต DNA ladder ใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วและไม่ต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณมาก มีความจำเพาะสูงและประสิทธิภาพหรือผลผลิตที่ได้ถูกต้องแม่นยำ โดยผลิต DNA ladder ที่มีขนาด 100bp 200bp 300bp 400bp 500bp 600bp 700bp 800bp 900bpและ1kb ซึ่งใช้ pET-32a เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 15bp ที่มีความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดต่างๆ นำไปตรวจสอบด้วย 1.5% เจลอะกาโรส ปรากฏแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนที่ปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 15ng อีกทั้ง DNA ladder ยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ โดยยังคงสภาพการใช้งานได้ปกติ นอกจากนี้ยังสามารถนำ DNA ladder ที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจสอบโดยเทียบขนาดดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในกุ้งด้วยเทคนิค PCR

คำสำคัญ : DNA ladder PCR ไพรเมอร์ Gel Electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	DNA ladder Production using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique
Students	Miss Kannika Rattanawaraha
	Miss Watchalaya Matjank
	Miss Onruthai Sansao
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Environmental Resource Chemistry
Academic Year	2013
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn

ABSTRACT

DNA ladder, DNA marker for gel electrophoresis or DNA molecular weight standard is a set of different sizes of DNA that exactly know the exact size. In this project, DNA ladder was production using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The technique is quick and easy, do not require a large quantity of DNA template and produce a high specificity, efficiency and accurate. The DNA ladder contained DNA size of 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp and 1kb was produced using pET-32a plasmid as the DNA template and position specific primers for the various sizes at with size PCR product. Fifteen nanograms of the DNA ladder was produced clearly DNA bands on 1.5% agarose gel. Moreover, DNA ladder can be stored at room temperature for 1 week without DNA band defect. In addition, the DNA ladder was used to compare with the specific DNA band of the detection of viral infection in shrimp

Keywords : DNA ladder, PCR, Primer, Gel Electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำโครงงานพิเศษนี้จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ให้คำแนะนำและเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาเคมี ที่อำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ รวมถึงการติดต่อประสานงานกับภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือตลอดการการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี สถานที่ และคำแนะนำต่างๆตลอดการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงงานพิเศษ

กรรณิกา รัตนวราหะ
วัชรายา มาศแจ้ง
อรฤทัย แสนเสาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
สัญลักษณ์และคำย่อ	IX
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 DNA ladder	3
2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)	4
2.2.1 หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR	4
2.2.2 ขั้นตอนการทำ PCR	4
2.2.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในเทคนิค PCR	5
2.2.4 การคัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์	6
2.2.5 ข้อดีเทคนิค PCR	6
2.2.6 ข้อจำกัดเทคนิค PCR	7
2.2.7 ประโยชน์ของ PCR	7
2.2.8 การปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในเทคนิค PCR	7
2.2.9 มาตรการในการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในเทคนิค PCR	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3 เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis)	8
2.3.1 เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis)	8
2.3.2 อะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis)	8
2.3.3 หลักการ	9
2.3.4 ขั้นตอนการเตรียมเจล	9
2.3.5 ขนาดของ Marker สำหรับเจล	10
2.3.6 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ	10
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	12
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	12
3.2 สารเคมี	12
3.3 วิธีการปฏิบัติ	12
3.3.1 วิธีการออกแบบไพรเมอร์	12
3.3.2 การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)	14
3.3.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจาก PCR product (PCR Reamplification)	16
3.3.4 การวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis	16
3.3.5 การแยกดีเอ็นเอออกจาก PCR product	17
3.3.6 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR	17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	18
4.1การออกแบบไพรเมอร์	18
4.2การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	19
4.3การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ DNA ladder	23
4.4 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	26
5.1 สรุปผลการทดลอง	26
5.2 ข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก ก เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์	27
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ตารางแสดงสารผสมในการทำ PCR	15
3.2 ตารางแสดงสารผสมในการทำ PCR Reamplification	16
3.3 ตารางแสดงสารผสมในการทำ PCR	17
4.1 แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบได้	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	5
2.2 โครงสร้าง agarose ประกอบด้วย D-galactose และ 3,6-anhydroL-galactose	9
3.1 โครงสร้าง pET-32a	13
3.2 หน้าต่างในการกำหนดการออกแบบไพรเมอร์	13
3.3 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบ	14
3.4 แสดงอุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำ PCR	15
4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคPCR โดยใช้ pET-32a เป็น DNA template	19
4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA clean up เป็น DNA template	20
4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 200µl	21
4.4 ผลตรวจวิเคราะห์การ Reamplification โดยเทคนิคPCR ด้วย1.2%agarose gel electrophoresis	22
4.5 การตรวจดูผล DNA clean up ด้วย1.2%agarose gel electrophoresis	22
4.6 การตรวจดูผล DNA ladder ด้วย1.2%agarose gel electrophoresis	23
4.7 การตรวจดูผล DNA ladder ด้วย 1.5%agarose gel electrophoresis	24
4.8 การตรวจดูผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งด้วยเทคนิค PCR	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
PCR	Polymerase Chain Reaction (ปฏิกิริยาโพลิเมอเรส)
PCR product	ผลผลิตจากปฏิกิริยาโพลิเมอเรส
DNA Template	ดีเอ็นเอต้นแบบ
ไพรเมอร์	ดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสเป็นคู่ผสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งจะเข้าคู่กับด้าน 3'ของจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
standard DNA	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
WSSV	White Spot Syndrome virus โรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว
DI	น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
µM	ไมโครโมล
µL	ไมโครลิตร
mL	มิลลิลิตร
µm	ไมโครเมตร
nm	นาโนเมตร
bp	base pair
kb	kilobase pair
kDa	กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

DNA ladder หรือ DNA marker หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน(DNA molecular weight standard) คือชุดของดีเอ็นเอขนาดต่างๆซึ่งทราบขนาดแน่นอนของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นและเมื่อนำดีเอ็นเอมาแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ดีเอ็นเอจะเกิดการเคลื่อนที่ในแผ่นเจลการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้าโดยโมเลกุลที่มีประจุจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามจากประจุลบไปยังประจุบวกโดยที่ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ (ยานี,2551) จะปรากฏเป็นแถบขั้นบันไดของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ DNA ladder นี้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อประมาณขนาดของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

ดีเอ็นเอมาตรฐาน เป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านอณูชีววิทยา งานวิจัยทุกสาขาที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่ การแพทย์ การเกษตร อาหาร และรวมถึงการเรียนการสอนเกี่ยวกับดีเอ็นเอ โดยที่ขนาดช่วงของ standard DNA ที่นิยมกันโดยมากคือ ขนาดช่วง 100bp ถึง 1kb (บุญญานาถ,2556) การใช้ DNA ladder ในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ความแตกต่างที่เกิดขึ้นหมายถึงดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆสามารถตรวจสอบความแตกของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้ (สุรีพร,2546)

เทคนิคหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับมีการศึกษาการศึกษากันอย่างกว้างขวางและมีผู้นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรีย และไวรัสกันมากคือเทคนิค Polymerase Chain Reaction (วัชรีและมนตรี,2536) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำ มีประสิทธิภาพ สะดวก ใช้เวลาอันสั้นในการตรวจสอบ และสามารถตรวจสอบได้แม้มีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย PCR เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตและนำมาทำให้ปฏิกิริยาต่างๆเกิดขึ้นในหลอดทดลองโดยที่การควบคุมสารเคมีต่างๆและอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง DNA Thermal cycle (วัชรี,2536)

PCR เป็นเทคนิคที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองใช้หลักการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบโดยจะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านๆเท่า เทคนิค PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวิชาชีพแขนงต่างๆหลากหลายสาขาสามารถตรวจสอบหาเชื้อในสิ่งแวดล้อมเพื่อหาแนวทางป้องกันการแพร่ระบาดไปในวงกว้างของเชื้อต่างๆได้ (นันทยา,2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต DNA ladder
2. เพื่อนำ DNA ladder มาใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อทราบขนาดของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

1.3 ขอบเขตของโครงงานวิจัย

1. ผลิต DNA ladder ขนาด 100bp 200bp 300bp 400bp 500bp 600bp 700bp 800bp 900bp และ 1000bp (1kb) ด้วยเทคนิค PCR ใช้ pET-32a เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 15bp ที่มีความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดต่างๆ
2. ศึกษาปริมาณต่ำสุดของ DNA ladder ที่ผลิตได้เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน
3. ทดสอบประสิทธิภาพ DNA ladder ที่ผลิตได้โดยการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในกุ้งด้วยเทคนิค PCR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำ DNA ladder ไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต
2. สามารถประยุกต์ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อมโดยใช้จุลชีพในการบ่งชี้สภาวะสภาพแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 DNA ladder

DNA ladder หรือ DNA marker for gel electrophoresis หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA molecular weight standard) คือชุดของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งทราบขนาดแน่นอนของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นและเมื่อนำ DNA ladder มาแยกในแผ่นวุ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ดีเอ็นเอจะเกิดการเคลื่อนที่ในแผ่นเจลการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้าโดยโมเลกุลที่มีประจุโดยที่ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ จึงปรากฏเป็นแถบขั้นบันไดของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่ง DNA ladder นี้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อประมาณค่าขนาดของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

DNA ladder เป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทุกสาขาที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ รวมถึงการเรียนการสอนเกี่ยวกับดีเอ็นเอโดยที่ขนาดช่วงของดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมกันโดยมากคือขนาดช่วง 100bp ถึง 1kb

DNA ladder ที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) ชนิดนี้มีบริเวณจับบนสายดีเอ็นเอที่สนใจในตำแหน่งที่แน่นอน

2. ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดที่ไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) ชนิดนี้สามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้หลายๆตำแหน่ง

ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือ แถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจะถูกกำหนดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์จับบนดีเอ็นเอ จุดจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอที่ต่างกันจึงทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เป็นการศึกษาลึกลงไปถึงความแตกต่างในระดับของยีนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต DNA ladder จึงได้นำมาใช้ในงานหลายๆ ด้าน เช่น การสร้างเอกลักษณ์ ทางพันธุกรรม (DNA fingerprint) การแยกสายพันธุ์ (Varietal identification) การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic mapping) การหาตำแหน่งของยีน (Gene tagging) นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ นอกจากนี้นำสามารถหาจุลชีพในสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction:PCR)

ในปี ค.ศ. 1983 นักชีวเคมีชาวอเมริกันชื่อแครี่ มูลลีส (Kary Mullis) ได้พัฒนาปฏิกิริยา PCR ขึ้นเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่มีชื่อว่า ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยการคัดลอกจากดีเอ็นเอสายเดิม (DNA replication)

2.2.1 หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายในหลอดทดลอง โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในจำนวนน้อยมาก ใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบเป็นลูกโซ่ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอ ปริมาณเพิ่มขึ้นล้านๆเท่าเป็นทวีคูณ และสามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็ว

2.2.2 ขั้นตอนการทำ PCR

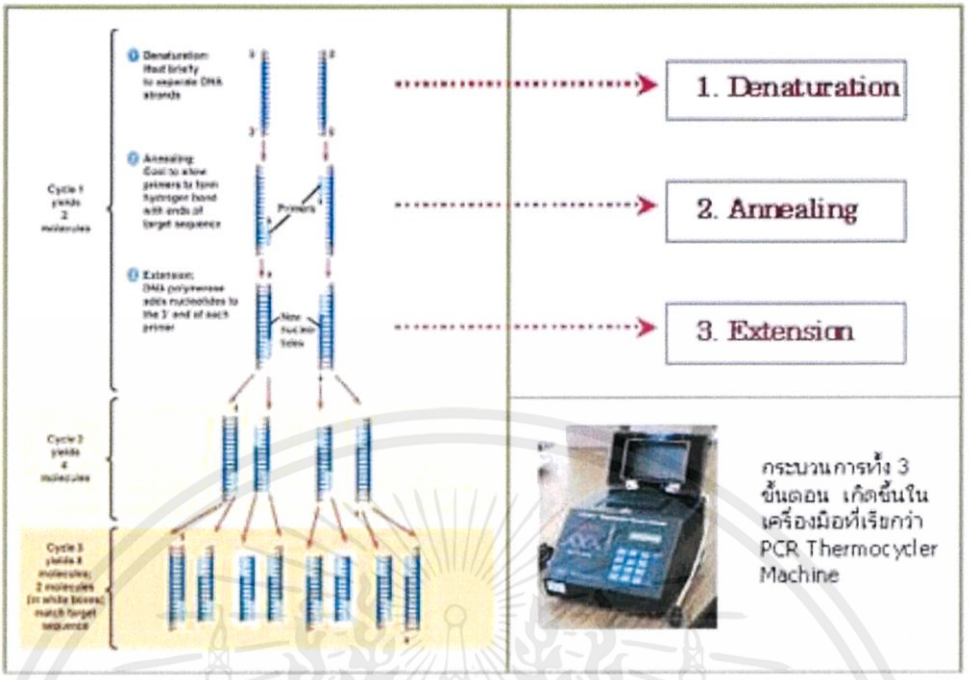
การเพิ่มดีเอ็นเอ ด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase)โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอนและหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (รูปที่ 1)

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอคู่สาย (double stranded DNA) ของแม่พิมพ์ที่ต้องการศึกษา ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA)โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C สาย ดีเอ็นเอที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ไพรเมอร์จับกันอย่างจำเพาะที่ปลาย 3′ ของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) สายเดี่ยวตรงบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน

3. ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ในทิศจาก 5′ไป 3′ อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

2.2.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในเทคนิค PCR

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

เป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ที่มีชิ้นส่วน DNA template ที่ต้องการและต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA template บริเวณช่วงปลายของส่วนที่เราต้องการเพิ่มจำนวนก่อนเพื่อนำมาสังเคราะห์ไพรเมอร์

2. ไพรเมอร์ (DNA primer)

เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary sequence) กับ DNA template และใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

3. ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase)

เทคนิค PCR จะใช้ *Taq* DNA polymerase ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 90°C เอนไซม์นี้แยกได้จากเชื้อ *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นพวกแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูง (thermophilic bacterium)

4. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟส (Deoxynucleotidetriphosphat, dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด

ประกอบด้วย ดีออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (dATP) ดีออกซีกวาโนซีนไตรฟอสเฟส (dGTP) ดีออกซีไซติดีนไตรฟอสเฟส (dCTP) และดีออกซีไทมิดีนไตรฟอสเฟส (dTTP) ซึ่งใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (PCR buffer)

2.2.4 การคัดเลือกและการออกแบบ ไพรเมอร์

ข้อแนะนำในการคัดเลือกหรือการออกแบบไพรเมอร์ที่สำคัญควรพิจารณา คือ

1. ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี random base distribution และมีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยาย ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurines polypyrimidines หรือลำดับการเรียงตัวที่ไม่ปกติ (unusual sequence) และควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 50-60%
2. หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3′(3′-end) ของไพรเมอร์ การตรวจสอบโครงสร้างของลำดับเบสทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ถ้ายังคงมี secondary structure ควรแทนที่ dGTP ด้วย 7-deaza-2-dGTP
3. ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementary) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3′-overlaps ในคู่ไพรเมอร์ ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเกิด “primer dimer”
4. ตามหลักเกณฑ์กำหนดให้มีความยาวระหว่าง 18-28 นิวคลีโอไทด์และมีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับ 3′-end ของดีเอ็นเอต้นแบบ
5. มี Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน (balance) อยู่ระหว่าง 55-80°C
6. ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 M ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปอาจส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) และมีการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะ (nonspecific product) มากขึ้น และอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด primer-dimer ซึ่งเป็น template-independent artifact ทั้งผลิตผลที่ไม่จำเพาะและ primer-dimer ต่างก็แย่งใช้เอนไซม์ dNTP และไพรเมอร์ทำให้ได้ผลิตผลที่ต้องการปริมาณลดลง

2.2.5 ข้อดีเทคนิค PCR

1. ดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (DNA template) ไม่จำเป็นต้องมีปริมาณมากหรือบริสุทธิ์มากหรืออยู่ร่วมกับดีดีเอ็นเออื่น และสามารถใช้ดีเอ็นเอจากเส้นผม 1เส้น ตัวอสุจิ 1ตัว หรือเซลล์ 1 เซลล์ เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณได้
2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้รวดเร็วมากประมาณ 1ล้านเท่า ภายในเวลา 1ชั่วโมงและสามารถนำดีเอ็นเอนั้นไปศึกษาต่อได้โดยตรง
3. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดยาวตั้งแต่ 50 คู่เบส ถึง 2,000 คู่เบส
4. เป็นปฏิกิริยาในหลอดทดลองจึงไม่ต้องเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้ยุ่งยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 ข้อจำกัดเทคนิค PCR

1. ต้องทราบลำดับเบสของที่ยีนที่ต้องการศึกษา
2. ต้องสังเคราะห์ไพรเมอร์
3. อาจเกิดผลบวกปลอมอันเนื่องจากการปนเปื้อน

2.2.6 ประโยชน์ของ PCR

1. ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยที่ไม่ต้องแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาให้บริสุทธิ์ก่อน และไม่ต้องใช้ปริมาณมาก เพียงดีเอ็นเอจากหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอก็สามารถทำได้
2. เพิ่มความไวของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และทำให้ตรวจได้ง่ายขึ้น เพราะดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถตรวจดีเอ็นเอจากตัวอย่างปริมาณน้อยมาก
3. ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR สามารถนำมาตรวจหรือศึกษาต่อด้วยวิธีง่ายๆ เช่น การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) แล้วย้อมดูแถบดีเอ็นเอโดยตรง
4. เป็นการโคลนดีเอ็นเอโดยไม่ต้องอาศัยเซลล์ตามปกติ (cell free molecular cloning) เนื่องจาก PCR สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างจำเพาะและเพิ่มได้มากตามต้องการ
5. มีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ช่วยในการตรวจวิเคราะห์การผ่าเหล่าของยีน (mutation) อันเป็นสาเหตุของโรคทางพันธุกรรม การตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งและใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม โรคติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัว รวมทั้งด้านนิติเวชวิทยาเพื่อพิสูจน์ว่ามีดีเอ็นเอตามลำดับเบสที่สงสัยอยู่ในหลักฐานที่เก็บได้ เช่น จากคราบเลือด ขน ผม หรืออสุจิ เป็นต้น

2.2.7 การปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในเทคนิค PCR

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงมาก ดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงไม่กี่โมเลกุลสามารถถูกเพิ่มจำนวนเป็นล้านๆโมเลกุลได้ในเวลา 1-2 ชั่วโมง ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยสามารถทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ง่าย (false positive) ซึ่งการปนเปื้อนอาจเกิดจาก

1. การปนเปื้อนระหว่างตรวจตัวอย่าง (cross-contamination) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงการเก็บ การเตรียม หรือการแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การปนเปื้อนแบบ carry-over contamination เป็นการปนเปื้อนจาก amplified product จากหลอดหนึ่งข้ามไปอีกหลอดหนึ่ง วิธีการแพร่กระจายเกิดจากละอองลอย (aerosal) เช่น การเปิดฝาหลอด การปั่นหลอด การดูดสารละลายโดยใช้ปิเปต

2.2.8 มาตรการในการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในเทคนิค PCR

1. แบ่งพื้นที่ หรือห้องสำหรับงานก่อนและหลังการทำ PCR และจำเป็นต้องแยกวัสดุอุปกรณ์เครื่องใช้ในการทำงานก่อนและหลังทำ PCR อย่างเด็ดขาด
2. การแบ่งน้ำยาลงขวดหรือหลอดเล็กๆ
3. ทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง เช่น การสวมและการเปลี่ยนถุงมือ การเปิดปิดหลอด อย่างระมัดระวัง การเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่ปฏิบัติงาน
4. การใช้ positive displacement pipette หรือการใช้ aerosol resistant tip เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก aerosol

2.3 เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis)

2.3.1 เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis)

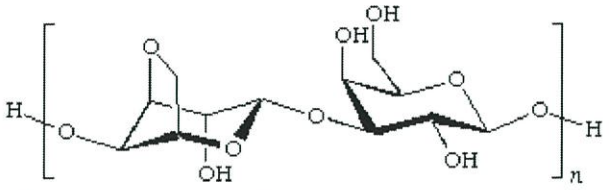
เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส คือการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียม-โบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากการผ่านกระบวนการ Electrophoresis แล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุด เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทราบขนาดแน่นอน และได้ผลิตภัณฑ์ PCR เพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้ agarose 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่สั้นกว่า 500 คู่เบส มักใช้ agarose 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.3.2 อะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis)

เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาดหรือ น้ำหนักโมเลกุลมากๆ ซึ่งไม่สะดวกหรือไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล agarose เป็นที่นิยมใช้แพร่หลายในการวิเคราะห์เพราะมีรูตาข่ายของเจลขนาดใหญ่ และการเตรียมก็ง่ายกว่าโพลีอะครีลาไมด์เจล

agarose gel (agar) ชนิดหนึ่ง ซึ่งได้จากส่วนนอกสุดของผนังเซลล์ (cell wall) หรือส่วน intercellular matrix ของสาหร่ายสีแดง (*Rhodophyta*) เมื่อเริ่มแรกมีการนำวุ้นมาใช้เป็นตัวค้ำจุนในการทำ electrophoresis แต่เนื่องจากตัววุ้นมีหมู่ประจุลบ เช่น ซัลเฟตและกลูโคเนต เป็นต้น จึงทำให้เกิดปัญหา ดังนั้นวุ้นที่ปราศจากประจุลบเหล่านี้เรียกว่า อะกาโรส ในปัจจุบันมีการนำ agarose มาใช้แทนวุ้นในงานวิเคราะห์ต่างๆมากมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 โครงสร้าง agarose ประกอบด้วย D-galactose และ 3,6-anhydroL-galactose

2.3.3 หลักการ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย Agarose Gel Electrophoresis นี้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) บนเจลจะวิเคราะห์ได้โดยการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะสอดแทรก (intercalate DNA) ระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและเรืองแสงในช่วงคลื่นของอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น295 nm)

ในการวิเคราะห์จะอาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่เคลื่อนใน agarose gel โดยขึ้นกับ

1. ขนาดของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าขนาดเล็ก
2. รูปร่างของดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวง จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างคล้ายเส้น

สำหรับบัฟเฟอร์ (buffers) ที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้าผ่าน gel electrophoresis ของดีเอ็นเอ จะใช้บัฟเฟอร์ pH8 เช่น This-acetate,Tris-borate และ Tris-phosphate บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด นี้มีความแตกต่างกันคือ

Tris-acetate เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุดจึงจำเป็นต้องอาศัยการหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจล

Tris-borate เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีกรดบอริคเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์จึงทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์ได้นาน

Tris-phosphate เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า Tris-borate ในกรณีที่จะนำเจลนั้นไปละลายโดยใช้ โปตัสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) หรือโซเดียมเปอร์คลอเรท (sodiumperchorate)

Agarose Gel Electrophoresis สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีลักษณะต่างกันออกจากกันได้ และผู้ใช้สามารถปรับรูตาข่ายของเจล ให้เหมาะสมกับงานโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเจลได้อีกด้วย

2.3.4 ขั้นตอนการเตรียมเจล

agarose gel ที่ใช้มีความหนาอย่างน้อยประมาณ 3 มิลลิเมตร ถ้าบางกว่านี้ทำให้เตรียมยาก

1. เตรียมพิมพ์สำหรับเท agarose โดยการต่อชิ้นส่วนต่างๆ ของอุปกรณ์โดยการวางcomb ลงใน gel chamber

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ชั่ง agarose จำนวนที่ต้องการลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำไปต้มให้ละลายจนหมด หรือเข้าไมโครเวฟ ทิ้งให้เย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 60°C)
3. เท agarose gel ลงใน gel chamber ที่วาง comb เพื่อให้เกิดช่องหรือหลุม (well) แล้วปล่อยให้แข็งตัวอย่างน้อย 30 นาที
4. หลังจากเจลแข็งตัวให้ดึง comb ออกแล้วนำถาดเจลไปวางในเครื่อง electrophoresis เทบัฟเฟอร์ TBE ลง ไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 mm
5. ผสม DNA sample กับ loading dyne แล้วปิเปตตัวอย่างลงในช่องหรือหลุม ในการทำ gel electrophoresis ทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะโหลดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด
6. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง electrophoresis ให้ด้านที่มีตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ทางขั้วลบ จากนั้นตั้งกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ที่ต้องการ (อย่าตั้งกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงขึ้นจะทำให้ผลการแยกต่ำลง จึงต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ขึ้น) เมื่อพบว่าสีน้ำเงินของของ loading dyne วิ่งไปอยู่ด้านล่างตรงกันข้าม จากนั้นให้หยุดกระแสไฟฟ้า
7. นำเจลออกจากถาด แช่ในสารละลาย ethidium bromide 1 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น
   ** ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ควรสวมถุงมือทุกครั้งในขณะทำการทดลอง
8. ตรวจดูแถบสีดีเอ็นเอโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

2.3.5 ขนาดของ Marker สำหรับเจล

ใช้สีย้อม เช่น Orange G และBromophenol blue เป็น marker สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กถ้าจะให้ได้ค่าขนาดที่แน่นอนต้องใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทราบขนาดโดยการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเอนไซม์จำเพาะ ใช้สารละลาย marker ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.1μg/μL ของสารตัวอย่างและปริมาณที่ใช้หยอดลงบนเจลคือ 2-3μLจะให้แถบที่เห็นได้จากการย้อมสี

2.3.6 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจะทำในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง ถ้าทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิร้อนจนเกินไปจะทำให้แถบดีเอ็นเอเกิดการบิดเบี้ยวได้ โดยพบว่าหลังจากที่ไม่มีการต่อเข้าแหล่งกำเนิดไฟฟ้าความร้อนจะเพิ่มขึ้นเหนือเจลแม่พิมพ์ ดังนั้นต้องนำเจลแช่ลงในบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นตัวช่วยในการถ่ายเทความร้อนทำให้เจลเย็นขึ้นเพื่อไม่ให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิมากมักซึ่งเป็นผลต่อแถบของดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บริษัท ไบโอเอกเซลเลนท (2013) ศึกษากระบวนการผลิต standard DNA marker ขนาด 100bp ถึง 1kb ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาดช่วง 100 คู่เบส ประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 100 200 310 420 500 520 600 700 800 900 1,000 และ 2,650 คู่เบส ส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาดช่วง 1 กิโลเบส ประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 1 2 2.65 3 4 5 6 7 8 9 10 11 และ12 กิโลเบส โดยที่ดีเอ็นเอแต่ละขนาดของทั้ง 2 ขนาดช่วง จะมีปลายที่เป็นปลายเหนียว (sticky end) จึงทำให้สามารถติดฉลาก (labelling) ดีเอ็นเอเหล่านั้นได้โดยวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอในงาน Southern blot analysis และอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอนอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ในงานวิจัยแล้ว ดีเอ็นเอมาตรฐานสามารถประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนสาขาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ ทั้งในระดับมัธยมต้น มัธยมปลาย อุดมศึกษา และแม้แต่การสาธิตเรื่องดีเอ็นเอให้กับสาธารณชนทั่วไป คุณสมบัติของ DNA marker ที่พัฒนาได้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน พบว่ามีคุณสมบัติเท่าเทียมกัน สามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความได้เปรียบด้านต้นทุนการผลิตราคาของ DNA marker ที่พัฒนาได้ถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

Tian-YunWang, Li Guo and Jun-he Zhang (2010) ศึกษาดีเอ็นเอมาตรฐานที่เรียกว่า DNA ladder ได้รับการใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดลองระดับชีวโมเลกุล งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคมัลติเพลกพีซีอาร์ในการผลิต DNA ladder ขนาด 100bp-1000bp โดยออกแบบไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 6631-7630 ของ lambda DNA เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR สกัดดีเอ็นเอด้วย phenol/chloroform การผลิต DNA ladder ขนาด 100bp-1000bp ที่ประสบผลสำเร็จด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีขนาดถูกต้องและชัดเจน สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการทดลองระดับชีวโมเลกุลได้ โดยวิธีนี้ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายไม่แพง สามารถทำได้รวดเร็วและง่ายเมื่อเทียบกับการผลิต DNA ladder อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง Thermal Cycler บริษัท BIO-RAD รุ่น T100
2. เครื่อง gel documentation บริษัท SynGene รุ่น GeneGenius
3. เครื่อง gel electrophoresis บริษัท Toyobo รุ่น GelMate 2000
4. เครื่อง mini-centrifuge บริษัท Tomos รุ่น ministar
5. ไมโครปิเปตพร้อม Tip บริษัท Nichiryo รุ่น NPX-100
6. หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL และ1.5mL
7. Microcentrifuge tube Rack

3.2 สารเคมี

1. ชุดคิตสำหรับทำ PCR บริษัท RBC Bioscience
2. PCR Clean-Up Kit บริษัท Axygen Bioscience รุ่น AP-PCR-50
3. ethidium bromide บริษัท Fluka
4. agarose gel บริษัท sigma ชนิด II-A; Medium EEO
5. Primer
6. 1X TBE
7. 6X Loading dye

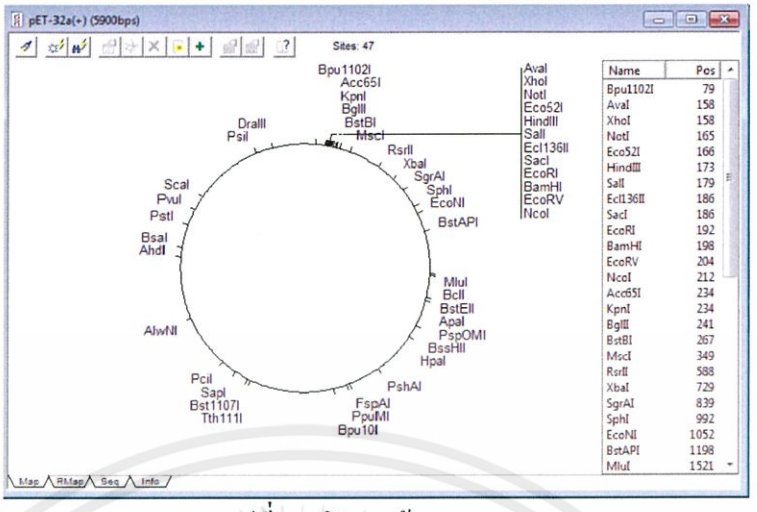
3.3 วิธีการปฏิบัติ

3.3.1 วิธีการออกแบบไพรเมอร์

ปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งของความสำเร็จในการทำ PCR ก็คือ การออกแบบไพรเมอร์ให้ได้ถูกต้องเหมาะสมการออกแบบไพรเมอร์ที่ดีจะช่วยทำให้การทำ PCR เกิดประสิทธิภาพสูงสุด (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์,2551) ในการออกแบบไพรเมอร์จะใช้โปรแกรม SECentral

วิธีการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม SECentral เริ่มต้นโดยการเปิด DNA template ขึ้นมาในโปรแกรม โดย DNA template ที่ใช้คือ pET-32a (รูปที่ 3.1) จากนั้นทำตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



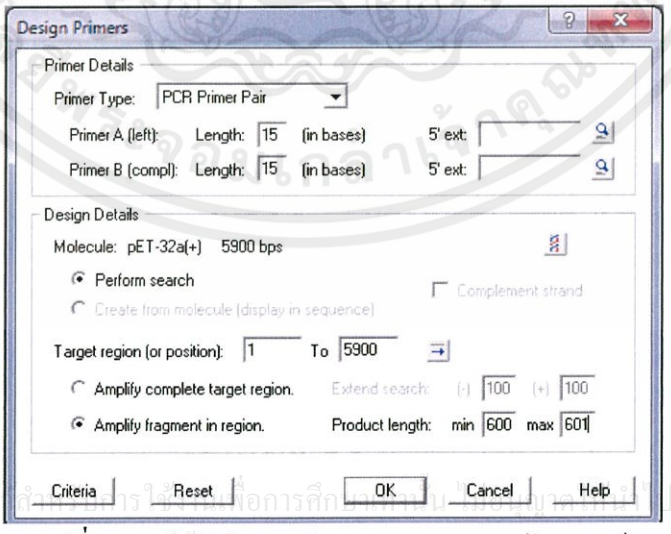
รูปที่ 3.1 โครงสร้าง pET-32a

1. เมื่อจะทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ไปเลือกที่ Primer แล้วคลิกที่ Design…
2. เริ่มทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยกำหนด ดังนี้ (รูปที่ 3.2)

Primer Type	เป็น PCR Primer Pair
กำหนดขนาดของไพรเมอร์	Primer A length โดยจะกำหนดที่ 15 base pairs
	Primer B length โดยจะกำหนดที่15 base pairs
กำหนด Target region	เป็น 1 – 5900
เลือก Amplify fragment in region	Product length คือ ขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการ

โดยจะตั้งให้มีขนาดได้คลาดเคลื่อนเท่ากับ 1 เช่น min 600

max 601



รูปที่ 3.2 หน้าต่างในการกำหนดการออกแบบไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เลือกไพรเมอร์แบบต่างๆที่โปรแกรมวิเคราะห์มาให้

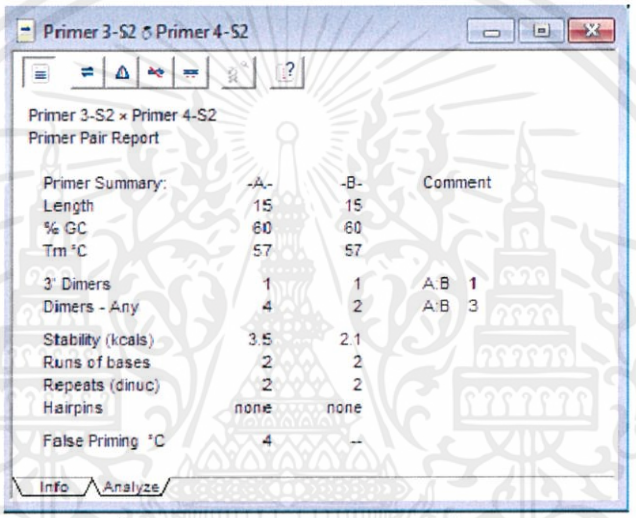
4. เมื่อเลือกไพรเมอร์ที่ต้องการได้แล้ว นำไพรเมอร์ที่ต้องการไปเก็บไว้ที่ Primer list โดยคลิกที่ primer ที่ต้องการแล้วคลิกที่ Enter to Primer List

5. ทำการเปิดไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ขึ้นมาดูโดยการคลิกที่ Primer List แล้วเลือกเปิดไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ขึ้นมาดู

6. ทำการวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยเลือกที่ Primer แล้วคลิกที่ Analyze…

7. เลือกไพรเมอร์ที่ต้องการวิเคราะห์ที่เก็บไว้ใน Primer List

8. ตรวจดูผลการวิเคราะห์โดยดูจากพารามิเตอร์ต่างๆ (ภาพที่ 5) ดังที่กล่าวในบทที่ 2



รูปที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบ

3.3.2 การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อย่างรวดเร็วและจำเพาะ โดยเตรียมสาร Master Mix ที่มีสารผสมตามตารางที่1 (ส่วนผสมสำหรับทำ PCR 1 ชุด) ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5mL โดยแบ่ง DI ออกมาก่อน 5µL (ต่อ 1 ชุด) และจะไม่ผสมไพรเมอร์ลงใน Master Mix

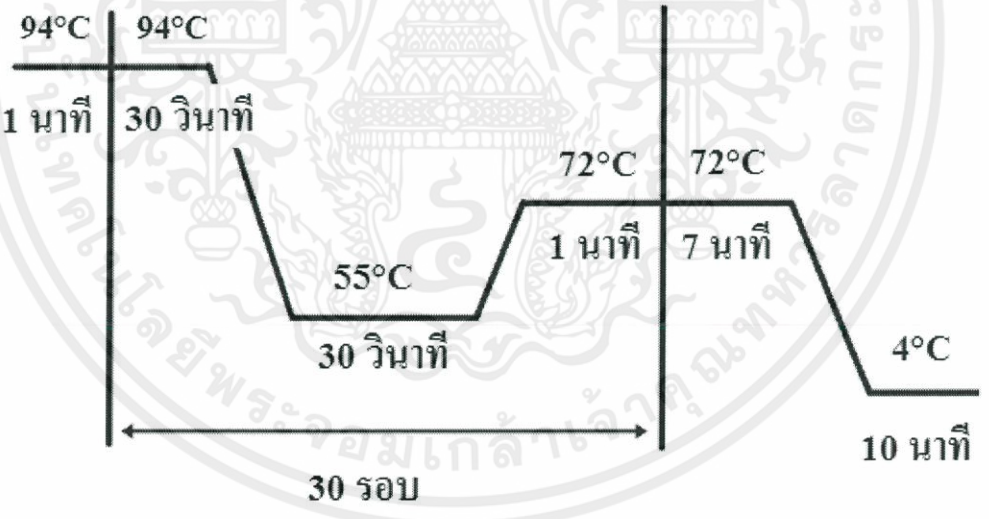
ในการทำ PCR ก่อนที่จะนำเข้าเครื่อง Thermal Cycle สารเคมีและเอนไซม์ต่างๆควรอยู่ที่อุณหภูมิ 4°C หรือควรแช่สารและเอนไซม์ต่างๆไว้ในน้ำแข็ง เพื่อรักษาประสิทธิภาพของสารเคมีและเอนไซม์ต่างๆให้ทำงานได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงสารผสมในการทำ PCR

สาร	ปริมาตร (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Reaction Buffer	5	1X
10mM dNTP mix	0.5	0.1 µM
Template DNA	1	0.2µM
RBC *Taq* Polymerase	0.25	n/a
Primer	0.5	1.25 units
DI	เติมจนมีปริมาตรรวม 50	n/a

จากนั้นผสมสารลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5mL โดยเติมDI ที่แบ่งออกมา 5µL ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5mL จากนั้นปิเปตไพรเมอร์ขนาดต่างๆผสมกับ DI แล้วปิเปต Master Mix ลงบนฝาหลอด Microcentrifuge ปิดฝา จากนั้นผสมสารด้วยเครื่องquick spin ก่อนนำไปเข้าเครื่อง Thermal Cycle โดยตั้งอุณหภูมิต่างๆ ดังรูป 3.4



รูปที่ 3.4 แสดงอุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำ PCR

หลังจากที่นำสารออกจากเครื่อง Thermal Cycle ควรเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรักษาสภาพของ PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจาก PCR product (PCR Reamplification)

การทำ PCR Reamplification คือ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR product มาใช้เป็น DNA template

การทำ PCR Reamplification นั้นมีวิธีการทำ และสารผสมที่ใช้เช่นเดียวกับการทำ PCR แต่จะแตกต่างกับการทำ PCR ที่ DNA template ที่ใช้ PCR product แทน pET-32aในการทำ PCR Reamplification จะผสมสารตามตารางที่ 2 โดยเตรียม DNA template ดังนี้ นำPCR product มาเจือจางแบบ 5 flow dilution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5^{-5} แล้วจึงใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR Reamplification

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงสารผสมในการทำ PCR Reamplification

สาร	ปริมาตร (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Reaction Buffer	5	1X
10mM dNTP mix	0.5	0.1µM
Template DNA	2	n/a
RBC *Taq* Polymerase	0.25	n/a
Primer	0.5	1.25units
น้ำกลั่น	ให้มีปริมาตรรวม 50	n/a

3.3.4 การวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์วิธี Agarose Gel Electrophoresis จะใช้ agarose gel เข้มข้น 1.2% (w/v) ในสารละลาย 1X TBE (agarose 0.48g ,1X TMB 40mL) จากนั้นให้ความร้อนโดยใช้เครื่อง Microwave เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 รอบ แล้วจึงนำเจลเทลงใน chamber ที่มี comb ประกอบอยู่ รอจนเจลแข็งตัวจากนั้นดึง comb ออก แล้วนำเจลพร้อม chamber ใสลงในเครื่องgel electrophoresis เท1X TBE ลงในเครื่อง gel electrophoresis ให้ท่วมเจลที่วางไว้ จากนั้นก็เตรียม sample โดยปิเปต Loading dye 1 µLลงบนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นปิเปตสารละลาย PCR product 5µL ผสมกับ Loading dye แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายไปใส่ไว้ใน well ของเจล ทำการ run gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100volts จนกระทั่งสีของ Loading dye เคลื่อนที่มาอยู่บริเวณกึ่งกลางเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 5นาทีก่อนตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation หรือ UV box โดยเปรียบเทียบกับ Standard DNA ladder

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การแยกดีเอ็นเอออกจาก PCR product

เตรียมสารละลาย buffer W2 โดยการเติม ethanol 56 mL ลงในสารละลาย Buffer W2 ปิเปต PCR – A ใส่ลงใน สารละลาย PCR product โดยเติม PCR – A ให้มีปริมาตรเป็น 3 เท่าของ PCR product แต่หากปริมาตรรวมระหว่าง PCR product และ PCR – A น้อยกว่า 100 µL ให้เติม PCR – A 100 µL แล้วผสมสารทั้งสองให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอด AxyPrep PCRใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.6 mL ปิเปตสารละลายผสมระหว่าง PCR product และ PCR – A ใส่ลงในหลอด AxyPrep PCR จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ AxyPrep PCR ออกจากเครื่อง centrifuge เทสารละลายที่อยู่ด้านล่างในหลอด Microcentrifuge ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย Buffer W2 700 µLจากนั้นนำหลอด AxyPrep PCR ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.6 mL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ด้านล่างในหลอดทิ้ง แล้วเติมเติมสารละลาย Buffer W2 400 µL ใส่ลงในหลอด AxyPrep PCRนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ด้านล่างในหลอดทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย Eluent 30 µLใส่ลงในหลอด AxyPrep PCR นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบเป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่อยู่ด้านล่างของหลอดไว้เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.6 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR

ในการตรวจกาเชื้อไวรัสในกุ้งจะทำการตรวจหาเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งในการตรวจหาเชื้อไวรัส WSSV ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากห้องปฏิบัติการชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งวิเคราะห์ตัวอย่างดังนี้ เชื้อไวรัส WSSV (ใช้เป็น standard) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อไวรัสเท่ากับ 10copies 10^2copies 10^3copies 10^4copies 10^5copies 10^6copies 10^7copies 10^8copies และเชื้อไวรัสที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และ และนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจาง10เท่า โดยในการทำ PCR ใช้สารผสมต่างๆ ดังตารางที่ 3.3 และเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง Annealing เป็น 58°C

ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงสารผสมในการทำ PCR

สาร	ปริมาตร (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Reaction Buffer	1.25	1X
10mM dNTP mix	0.125	0.1 µM
Template DNA	1	n/a
RBC *Taq* Polymerase	0.0625	n/a
Primer	0.5	1.25 units
น้ำกลั่น	เติมจนมีปริมาตรรวม 12.5	n/a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การออกแบบไพรเมอร์

จากการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม SECentral ได้ทำการวิเคราะห์และเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดดังตาราง

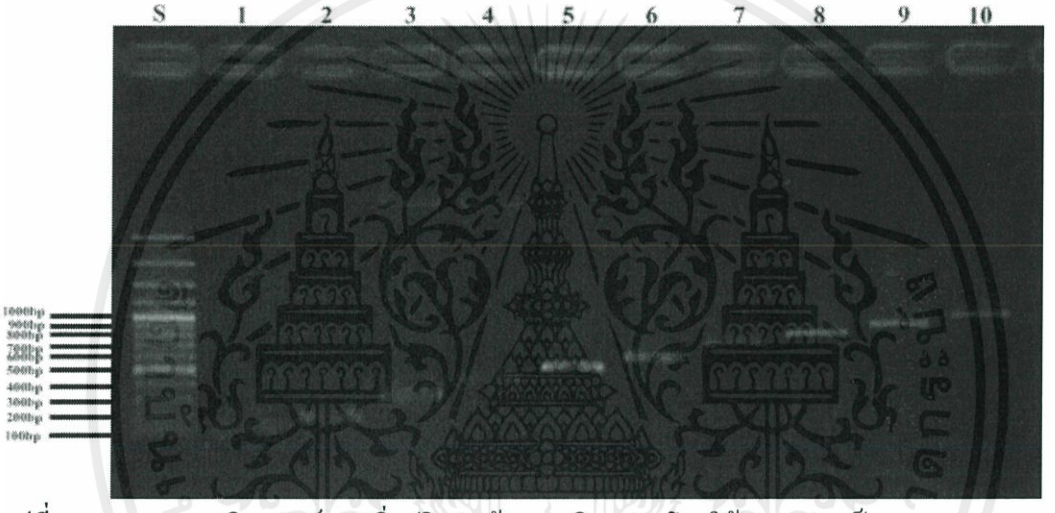
ตาราง 4.1 แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

Sequence	Forward	Reward
100bp	5' CCAGTGCTGCAATGA 3'	5' TGCAGGACCACTTCT 3'
200bp	5' CGTGGCACAACAACT 3'	5' GTTGCGCGAGAAGAT 3'
300bp	5' CTGGCACGACAGGTT 3'	5' GGCGTGCAAGATTCC 3'
400bp	5' CGCTTGCGGTATTCG 3'	5' CAATGCCAGCGCTTC 3'
500bp	5' AACGGCCTCAACCTA 3'	5' GTTGCGCGAGAAGAT 3'
600bp	5' CTGGACGCGGATGAA 3'	5' CGCCACCTCTGACTT 3'
700bp	5' GCGCATGATCGTGCT 3'	5' GGCATCCGCTTACAG 3'
800bp	5' TCTCGCGCCGATCAA 3'	5' CGTGCCAGCTGCATT 3'
900bp	5' CAACGGCCTCAACCT 3'	5' AGCGCCATCTGATCG 3'
1000bp	5' ACGCGGATGAACAGG 3'	5' GCAGAGCGCAGATAC 3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

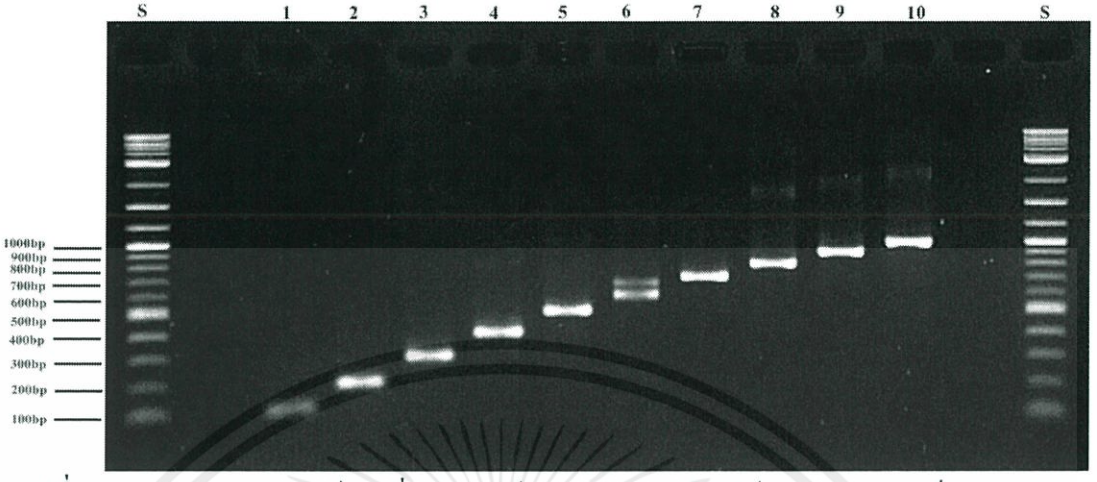
จากการทดลองดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่ใช้คือ pET-32a ปริมาตร 0.5µl และ DNA primer ขนาด100bp 200bp 300bp 400bp 500bp 600bp 700bp 800bp 900bp และ1000bp (1kb) โดยมีปริมาตรรวม 50µl มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ตรวจดูผลด้วย 1.2%Agarose Gel Electrophoresis ภายใต้แสง UV พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและความสมบูรณ์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาด 100bp ถึง 1000bp (1kb) ตามที่คาดหวังได้ทุกตัวอย่างจึงสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของเทคนิค PCR ได้ (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ pET-32a เป็น DNA template ช่องS: standard ladder ช่อง 1:100bp ช่อง 2:200bp ช่อง 3:300bp ช่อง 4:400bp ช่อง 5:500bp ช่อง 6:600bp ช่อง 7:700bp ช่อง 8:800bp ช่อง 9:900bp และช่อง 10:1000bp

ผลผลิตปฏิกิริยาโพลิเมอเรส (PCR product) ที่ได้จะถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ การสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA clean up) ด้วยชุด PCR Clean-Up Kit เมื่อทำการสกัดแล้วจะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคPCR โดยใช้ DNA template 0.5 µl ตรวจดูผลด้วย 1.2%agarose gel electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 100bp ถึง 1000bp (1kb) มีปริมาณและความสมบูรณ์สามารถใช้เป็น DNA templateในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.2)

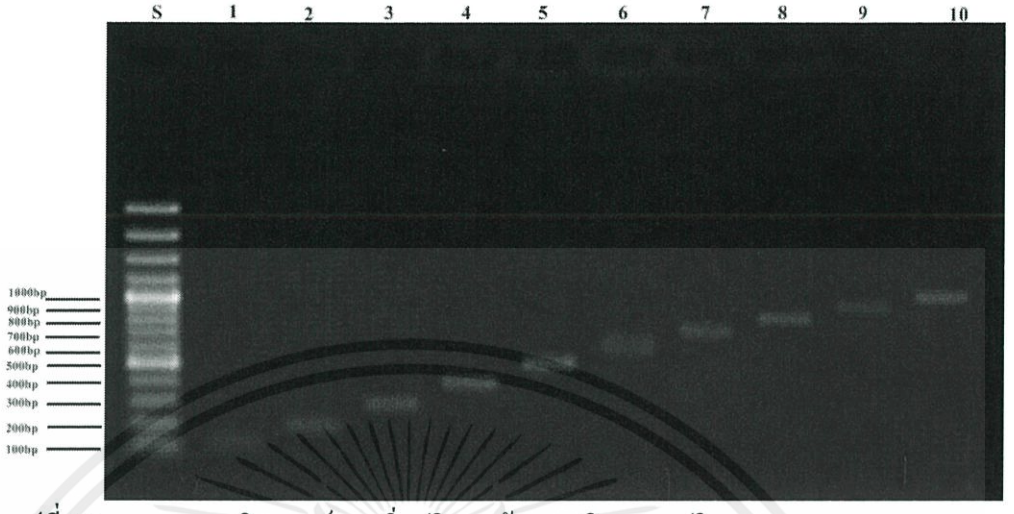
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA clean up เป็น template ช่อง S: standard ladder ช่อง 1:100bp ช่อง 2:200bp ช่อง 3:300bp ช่อง 4:400bp ช่อง 5:500bp ช่อง 6:600bp ช่อง 7:700bp ช่อง 8:800bp ช่อง 9:900bp และช่อง 10:1000bp

จากการทดลองการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคPCRในแต่ละครั้งจะได้ปริมาตรรวม 50 µL ของแต่ละขนาดดีเอ็นเอซึ่งมีปริมาณน้อย หากทำ DNA clean up ก็จะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นยังไม่เหมาะสมที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ จึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อีก เพื่อให้ได้ PCR product ปริมาตรรวมประมาณ 200µL ในแต่ละขนาดดีเอ็นเอ ซึ่งในการสกัดดีเอ็นเอ ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายชุด PCR Clean-Up Kit ที่มีราคาค่อนข้างสูง ก่อนทำการ DNA clean up ทุกครั้งควรเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณที่มากพอ เพื่อให้คุ้มค่าต่อการใช้ชุด PCR Clean-Up Kit ในการ clean แต่ละครั้ง เมื่อได้ PCR product ปริมาตรรวมประมาณ 200µL นำมาตรวจดูผลด้วย 1.2%Agarose Gel Electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV (รูปที่4.3)

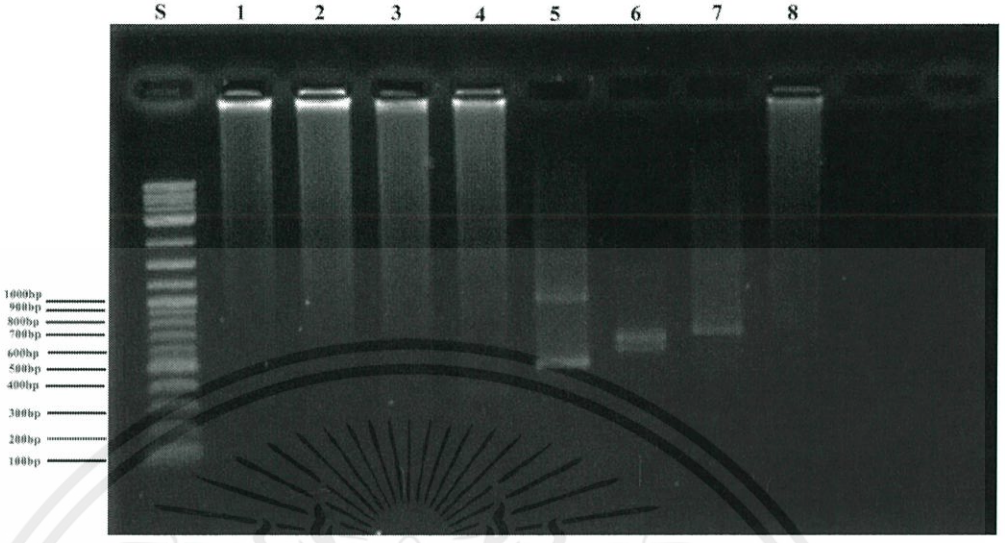
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 200 µL ช่อง S: standard ladder ช่อง 1:100bp ช่อง 2:200bp ช่อง 3:300bp ช่อง 4:400bp ช่อง 5:500bp ช่อง 6:600bp ช่อง 7:700bp ช่อง 8:800bp ช่อง 9:900bp และช่อง10:1000bp

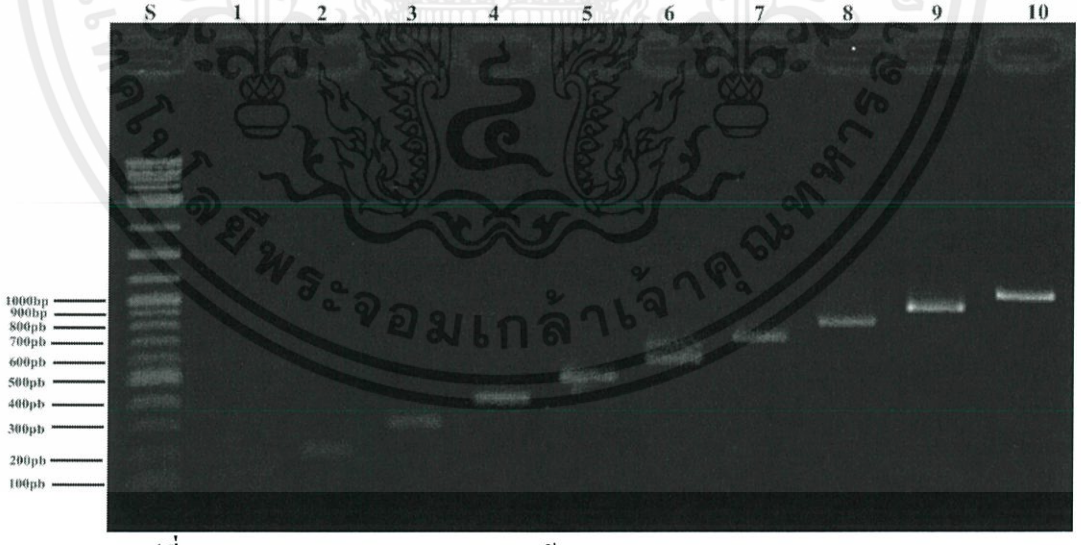
ผลที่ได้จากการรวมปริมาตรเป็น 200µL พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและความสมบูรณ์จึงทำ DNA clean up ด้วยชุดคิตสกัดดีเอ็นเอ บริสุทธิ์ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ PCR product ของปริมาตรรวม 200µL เป็น DNA template วิเคราะห์ด้วยเทคนิคPCRอีก หรือที่เรียกว่า "Reamplification" ทำการทดลองโดยการเตรียมสารทั้งหมดในอัตราส่วนเดิมคือ ใช้ DNA template 0.5 µL ปริมาตรรวม 50µL ในแต่ละขนาดดีเอ็นเอ ตรวจดูผลด้วย 1.2%Agarose Gel Electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอ ด้วยสารละลาย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV ผลจากการ Reamplification พบว่าเห็นแถบดีเอ็นเอ เอขนาด 500bp 600bp และ 700bp แต่ขนาดอื่นๆพบว่าแถบดีเอ็นเอ ไม่เคลื่อนที่จาก ช่องหรือหลุมที่ทำการ load ตัวอย่าง (รูปที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลตรวจวิเคราะห์การ Reamplification โดยเทคนิคPCRด้วย 1.2%Agarose Gel Electrophoresis ช่อง S: standard ladder ช่อง 1:100bp ช่อง 2:200bp ช่อง 3:300bp ช่อง 4:400bp ช่อง 5:500bp ช่อง 6:600bp ช่อง 7:700bp ช่อง 8:800bp ช่อง 9:900bp และช่อง10:1000bp

การ Reamplification ที่ได้ไม่สำเร็จเป็นไปตามความคาดหวัง ดังนั้นจึงทำการตรวจดูผลด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresisแล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV พบว่าดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้เป็น DNA ladder ได้ (รูปที่4.5)

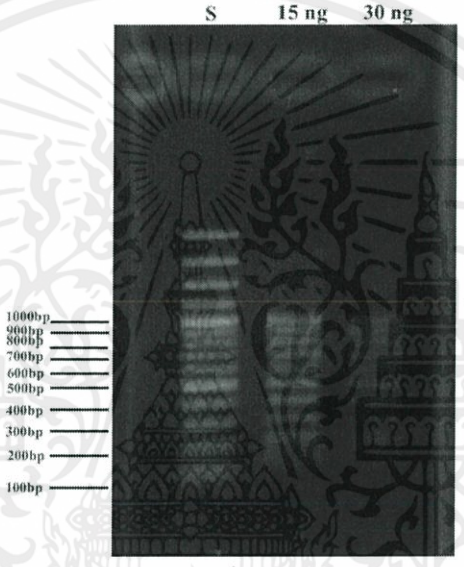


รูปที่ 4.5 การตรวจดูผล DNA clean up ด้วย 1.2%Agarose Gel Electrophoresis ช่อง S: standard ladder ช่อง 1:100bp ช่อง 2:200bp ช่อง 3:300bp ช่อง 4:400bp ช่อง 5:500bp ช่อง 6:600bp ช่อง 7:700bp ช่อง 8:800bp ช่อง 9:900bp และช่อง 10:1000bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ DNA ladder

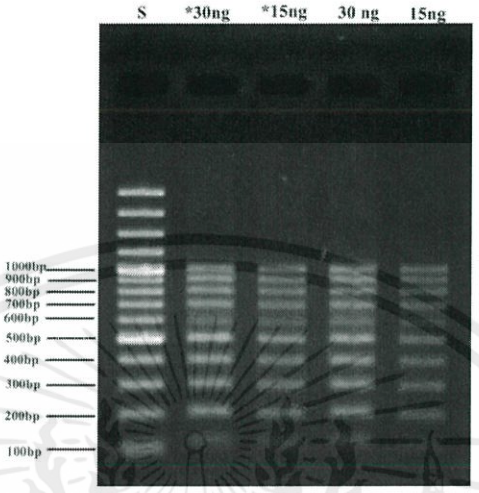
การทำ DNA ladderหรือ DNA marker for gel electrophoresis หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA molecular weight standard) คือชุดของดีเอ็นเอ ขนาดต่างๆซึ่งทราบขนาดแน่นอนโดยการรวมดีเอ็นเอทุกขนาด100bp ถึง 1kb แต่ละขนาดมีปริมาณดีเอ็นเอ 15ng และ 30ng ตรวจดูผลด้วย 1.2 % Agarose Gel Electrophoresis พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 200bp ถึง 1kb ตรงตามขนาดเมื่อเทียบกับ standard ladder DNA ขนาด 100bp ไม่ตรงตามขนาดเมื่อเทียบกับ standard ladder (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การตรวจดูผล DNA ladder ด้วย 1.2%Agarose Gel Electrophoresis ช่อง S: standard ladder ช่อง 30ng: DNA ladder size 100bp ถึง1kb มีปริมาณดีเอ็นเอ 30ng และช่อง 15ng: DNA ladder size 100bp ถึง 1kb มีปริมาณดีเอ็นเอ 15ng

การตรวจดูผลด้วย 1.2 % Agarose Gel Electrophoresis ที่ได้ประสิทธิภาพยังไม่ดีพอที่จะเป็น DNA ladder เมื่อทำการตรวจดูผลด้วย 1.5 % Agarose Gel Electrophoresis พบว่าแถบดีเอ็นเอ ขนาด 200bp ถึง 1kb ตรงตามขนาดส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 100bp มีความใกล้เคียงมากกว่าใช้ 1.2 % Agarose Gel Electrophoresis เมื่อเทียบกับ standard ladder นอกจากนี้ DNA ladder ยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ โดยยังคงสภาพการใช้งานได้ปกติ จึงสามารถใช้เป็น DNA ladder ในการใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้ง (รูปที่4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



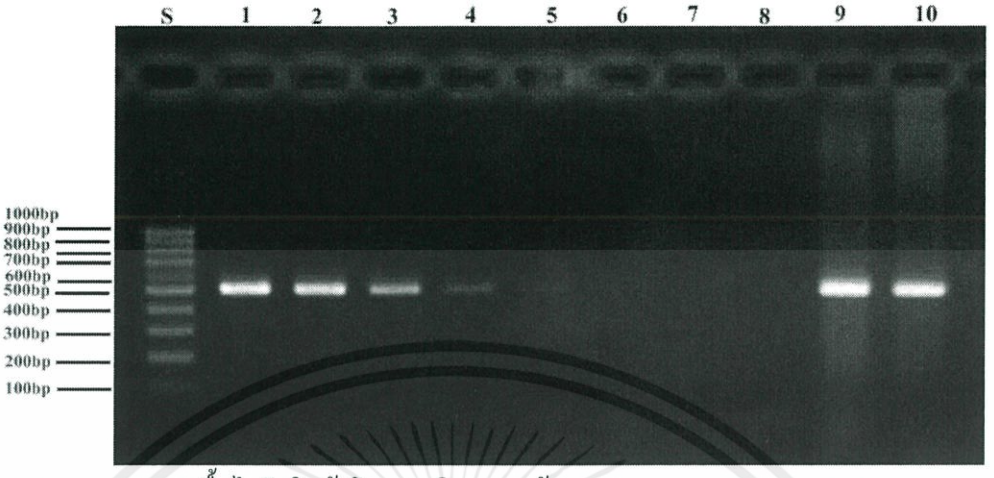
รูปที่4.7การตรวจดูผล DNA ladder ด้วย 1.5%Agarose Gel Electrophoresis

ช่องที่ Sคือ standard ladder ช่อง*30ng: DNA ladder size 100bp ถึง 1kb มีปริมาณดีเอ็นเอ 30ng ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1สัปดาห์ ช่อง*15ng: DNA ladder size 100bp ถึง 1kb มีปริมาณดีเอ็นเอ 15ng ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1สัปดาห์ ช่อง 30ng: DNA ladder size 100bp ถึง 1kb มีปริมาณดีเอ็นเอ 30ng ที่เตรียมใหม่ และช่อง15ng: DNA ladder size 100bp ถึง 1kb มีปริมาณดีเอ็นเอ 15ng ที่เตรียมใหม่

4.4 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR

จากการทดลองการตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCRโดยใช้ DNA template คือ เชื้อไวรัส WSSV (ใช้เป็น standard) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อไวรัส 10copies 10^2copies 10^3copies 10^4copies 10^5copies 10^6copies 10^7copies 10^8copies และเชื้อไวรัสที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจาง 10 เท่าโดยใช้ DNA template ปริมาตร 1µLโดยมีปริมาตรรวม 12.5µL จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ตรวจดูผลด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis ภายใต้แสง UV พบว่าไวรัส WSSV ที่ใช้เป็น standard นั้นสามารถตรวจหาด้วยเทคนิค PCR ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 10^4copies ซึ่งเพียงพอในการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้ง (ดังรูป 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป 4.8 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งโดยเทคนิค PCR ด้วย1.5%Agarose Gel Electrophoresis ช่อง S: standard ladder ช่อง 1: เชื้อไวรัส 10^8copies ช่อง 2: เชื้อไวรัส 10^7copies ช่อง 3: เชื้อไวรัส 10^6copies ช่อง 4: เชื้อไวรัส 10^5copies ช่อง 5: เชื้อไวรัส 10^4copies ช่อง 6: เชื้อไวรัส 10^3copies ช่อง7: เชื้อไวรัส 10^2copies ช่อง 8: เชื้อไวรัส 10copies ช่อง 9 : เชื่อไวรัสที่สกัดไก้จากกุ้งที่ติดเชื้อ และช่อง 10: เชื้อไวรัสที่สกัดจากกุ้งที่ติดเชื้อเจือจาง 10 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นำชัย ชิววิวรรธน์ และคณะ, 2546. ดีเอ็นเอปริศนาลับรหัสชีวิต, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 43-45,กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บุญญานาถ นาถวงษ์, 2556. การผลิต standard DNA maker

http://www.biotec.or.th/th/images/stories/document/technology/1.Standard%20DNA%20

บุญญานาถ นาถวงษ์, 2556. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

http://www.biotec.or.th/biosafety/download/3_dna_amplification.pdf

ยานี ตรองพาณิชย์, 2556. DNA extraction and agarose gel electrophoresis

http://www.champa.kku.ac.th/thanaset/DNA_extration_and_agarose_gel_electrophoresis_318306-2551_first.pdf

วัชรี อัตถทิพพหล,2536. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 5-10, โรงพิพม์เรือนแก้ว

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, 2556. การออกแบบ DNA primers

http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/%A1%D2%C3%CD%CD%A1%E1%BA%BA_PCR_Primers_June_08.pdf

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณทาว, 2556. พื้นฐานเทคนิค PCRhttp://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf

สุรินทร์ ปยะโชคณากุล,2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 10-44,กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรอนงค์ รัชตราเชนชัย, 2540. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ PCR, พิมพ์ครั้งที่ 1,หน้า 24-33,สำนักพิมพ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัญชลี ต้นสมบูรณ์, 2556. Technique in Parasitology

http://www.rsu.ac.th/medtech/Filesmolecular%20parasitic%20infection_55.pdf

อภิชาติ วรรณวิจิตร, 2556. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

http://guru.sanook.com/enc_preview.php?id=2193&source_location=2

A. Davis, Inna Gitelman and Claytus, 2013. A novel DNA molecular weight ladder

https://161.246.22.23/science/article/pii/,DanaInfo=.awxyCwholvloou4sr9Qu76+S1366212008700436#

Frederick M.Ausubel and group,1999. Short Protocals in Molecular Biology, fourth edition, New York,Wilay

F. Wang, T.-Y. Wang and L. Wang, 2013. Simplified preparation of a DNA ladder using PCR

http://www.geneticsmr.com//year2011/vol10-3/pdf/gmr1177.pdf

Joseph Sambrook, Michael R. Green, 2012. Molecular Cloning Vol.1, fourth edition, 455-540, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Joseph Sambrook, Michael R. Green, 2012. Molecular Cloning Vol.3, fourth edition, 1811-1829, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Jun-he Zhang,Tian-Yun Wang and Li Guo, 2013. Preparation of DNA Ladder Based on Multiplex PCR Technique

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2915804/#!po=8.33333

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์

เครื่องมือ

1. เครื่อง Thermal Cycler บริษัท BIO-RAD รุ่น T100
2. เครื่อง gel documentation บริษัท SynGene รุ่น GeneGenius
3. เครื่อง gel electrophoresis บริษัท Toyobo รุ่น GelMate 2000
4. เครื่อง centrifuge บริษัท Tomos รุ่น ministar
5. Micro wave บริษัท Samsung รุ่น GE87Q-S
6. เครื่องชั่งสาร บริษัท Shimadzu รุ่น Aux220
7. เครื่อง Auto clave
8. ตู้เย็น

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต ขนาด 20 µL
   ขนาด 20 µL
   ขนาด 200 µL
   ขนาด 1000 µL
2. กระบอกตวง ขนาด 50 mL
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 mL
4. แท่งแก้ว
5. ช้อนตักสาร
6. ที่วางหลอดทดลอง
7. Micro centrifuge tube ขนาด 0.5 mL
   ขนาด 2 mL
8. ถุงมือยางไนไทรต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ชุดเตรียมเจล
    - Chamber
    - Comb

สารเคมี

1. Tris-base
2. Boric acid
3. DNA loading dyne
4. น้ำกลั่น Clave
5. agarose gel
6. dNTP
7. Primer mix (10 μM each)
8. Template DNA
9. RBC *Taq* DNA Polymerase
10. ethidium bromide solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ electrophotoresis (Tris-borate buffer 10xTBE) สำหรับการทำ Agarose Gel Electrophotoresis

ชั่ง Tris-base 108 กรัม และboric acid55 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml เติม0.5 MEDTA pH 8 จำนวน 40 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางด้วยระดับความเข้มข้น 1:10 (TBE) และ 1:20 (0.5X TBE)

2. 1.2% agarose gel

ชั่งผง agarose 0.48 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE 40ml นำไปเข้าไมโครเวฟให้ละลาย รอให้เย็นแล้วเทใส่ถาดเตรียมเจล (Chamber) วางไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปใช้ต่อไป

3. Loading dye

1. 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
2. 0.03% bromophenol blue
3. 0.03% xylene cyanol FF
4. 60% glycerol
5. 60 mM EDTA

ผสมสารทั้งหมด ปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้