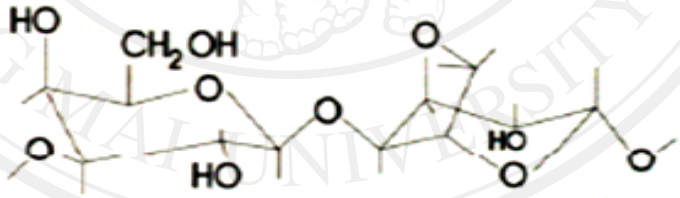
ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย Agarose Gel Electrophoresis และการเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอนการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย Agarose Gel Electrophoresis

Agarose Gel Electrophoresis เป็นเทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต ดีเอ็น เอ ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลดีเอ็นเอแล้วจะเป็นค่าคงที่ Agarose Gel Electrophoresis แยกดี เอ็นเอออกจากกันได้โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดี เอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า



D-galactose 3,6-anhydro L-galactose

ภาพ 13 สูตรโครงสร้างของ Agarose

ที่มา (Sambrook te al., 1989, p. 6.3)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอนเอบนเจลอะกาโรส

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (Linear) เกลียวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล

2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป

ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดีแต่ถ้าต่ำดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าการแยกตัวได้ดีแต่แถบดีเอ็นเอจะไม่ชัด เพราะเกิดการแพร่

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของพัปเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TEA (Tris-acetate), TBE (Tris- borate), และ TPE (Tris- phosphate) นิยมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้คือ TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็วการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์

ตาราง 4 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้เจลอะกาโรสที่มีปริมาณอะกาโรสต่างๆกัน

ปริมาณอะกาโรสในเจล (% w/v)	ช่วงการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอ (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

ขั้นตอนการทำ Agarose Gel Electrophoresis

1. เตรียม 2% Agarose Gel โดยมีวิธีเตรียมดังนี้
   - ชั่ง Agarose Powder 0.8 g
   - ละลายใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer 40 ml
   - ต้มที่ 60 °C จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน
   - เทใส่แม่พิมพ์ ทิ้งไว้ให้แห้ง
2. เตรียมเครื่อง Agarose Electrophoresis โดยปรับเครื่อง ดังนี้ 50 mA, 100V, นาน 20 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ใส่ 2% Agarose Gel ที่เตรียมเอาไว้ลงในเครื่อง แล้วเติม 0.5X TBE Buffer ให้ท่วมเจลพอดี
4. โหลด DNA Product ที่เตรียมไว้ลงไปบนเจล แล้วเปิดเครื่อง Agarose Electrophoresis
5. เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide ที่เตรียมไว้ นาน 10 นาที
   - วิธีเตรียมสารละลาย Ethidium Bromide
     - Ethidium Bromide 10 µl
     - 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer 200 ml
     - เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด (ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังโดยตรง เนื่องจาก Ethidium Bromide เป็นสารก่อมะเร็ง)
6. เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลมาส่องดูความเข้มของแถบ DNA ด้วยเครื่อง Ultraviolet-visible

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 0.5X TBE Buffer

- Tris	5.4	g
- Boric Acid	2.75	g
- EDTA	0.373	g
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

(รศ.อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

2. การเตรียม 3 µM Primers mix (ตำแหน่ง cyt b Bovine)

Primer F (100 mM)	3 µl
Primer R (100 mM)	3 µl
เติม H_2O ให้ครบ	100 µl

3. Jump Start : ใช้น้ำยาสำเร็จจากบริษัท SIGMA® ซึ่งในตัวน้ำยาจะประกอบไปด้วย 20 mM Tris-HCl,pH8, 100 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0.002% Gelatin, 0.4 mM each dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Inert dye, Stabilizers, 0.06 unit/µl Taq DNA Polymerase, JumpStart Taq antibody.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

Real -time Polymerase Chain Reaction (rtPCR) และ

Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR)

Real-time PCR

เป็นกาวิเคราะห์ด้านคุณภาพและปริมาณ โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในเวลาต่างๆ เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจดีเอ็นเอในด้านปริมาณต่อระยะเวลาด้วย กรรมวิธีในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆ นั้นทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. DNA-binding agent: SYBR Green คือการใช้ไซเบอร์กรีน (SYBR Green) เป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ สามารถจับกับสายคู่ของดีเอ็นเอแต่จะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดังนั้น กระบวนการทำ PCR เริ่มต้นจากการแยกดีเอ็นเอสายเดี่ยว เมื่อมีการสังเคราะห์สายคู่ของดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR ผลผลิตดีเอ็นเอสายคู่จึงสามารถจับกับสีย้อมเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ไซเบอร์กรีน และตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอจากการตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นนี้ได้
2. DNA hydrolysis probes คือการนำ DNA probes ติดสารที่เรียกว่า Reporter ที่ปลาย 5’ ซึ่งสามารถปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ แต่สามารถถูกยับยั้งการปล่อยแสงด้วยสารที่เรียกว่า Quencher ซึ่งติดอยู่ที่ปลาย 3’ ของ DNA Probes สายเดียวกัน เมื่อมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยอาศัยเอนไซม์ DNA taq poymerase ตามปกติ ขณะที่เอนไซม์นี่เคลื่อนมาถึง DNA probes ที่เข้าคู่อยู่บนสายดีเอ็นเอแม่แบบ จะสามารถย่อยปลาย 5’ ของ DNA probes ด้วยสมบัติของ 5’ Exonuclease activity ซึ่งทำให้แยก Quencher ออกจาก Reporter ดังนั้น Reporter สามารถปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์และตรวจวัดได้ ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอย่อมทำให้การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ได้มากขึ้น ตรวจวัดได้มากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. DNA hybridizing probes อาศัยการย้ายที่ของพลังงานที่เรียกว่า Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) โดยใช้ Oligonucleotide probes 2 สาย สายหนึ่งติด Donor fluorochrome ที่ปลาย 3' อีกสายหนึ่งติด Acceptor fluorochrome ที่ปลาย 5’ เมื่อมีกระบวนการ PCR ในช่วง Annealing ทำให้ Oligonucleotide probes เกิด Hybridization กับสายดีเอ็นเอแม่แบบ และเมื่อ Oligonucleotide probes ทั้งสองสายมาอยู่ใกล้กัน (ในช่วง 1-5 คู่เบส) สามารถทำให้ Donor fluorochromes ส่งพลังงานไปยัง Acceptor fluorochrome แล้วเกิดการปล่อยแสงที่วัดได้ ซึ่งจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ ทำให้เกิดการ Hybridization มาขึ้นนั่นเอง

Nested PCR

เป็นเทคนิค PCR ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัย PCR 2 ขั้นตอนด้วย primer คู่แรก และ primer คู่แรกจะอยู่รอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นแรกไปทำ PCR ขั้นตอนที่สอง โดยใช้ primer คู่ที่สอง ซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายเฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจาก primer คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่สองนั้นอาจทำปฏิกิริยา 25 – 30 รอบ ในที่สุดก็ได้ผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามที่ต้องการ เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มความไว(Sensibility) มากยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของวัวในส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย

Cytochrome b Bovine มีดีเอ็นเอตัวเริ่ม (Primers) สองตัว คือ

Primer F : 5'-CAAGAACACTAATGACTAACATTCG-3'

Primer R : 5'-AAATGTTTGATGGGGCTGGA-3'

(Andreo et al., 2005)

มีลำดับเบสดังนี้

AAAATAACGCTTAGAATAAATACAATGTATAGTATCATTATTCTTACATGGAATCTA

ACCATGACTAATGATATGAAAAACCATCGTTGTCATTCAACTACAAGAACACTAATG

ACTAACATTCGAAAGTCCCACCCACTAATAAAAATTGTAAACAATGCATTCATCGAC

CTTCCAGCCCCATCAAACATTTCATCATGATGAAATTTCGGTTCCCTCCTGGGAATCT

GCCTAATCCTACAAATCCTCACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTACACATCCGACA

ที่มา

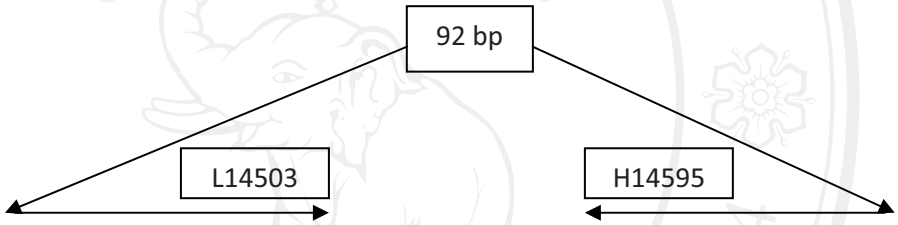
NCBI Blast Reference Sequence: NC_001567 (14503 – 14594)

>ref|NC_006853.1| Bos Taurus Mitochondrion, Complete Genome, Length=16338

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของวัวในส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรียกับลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นในส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย



Cow	CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG - - - TTCCAGCCCCATCAAACATTT
Human	□□□□□□□□□C□□□□□□CCCA□□A□□C□□A- - - □C□□CA□□□□□□□C□□□□□C□
Chicken	AT□A□CT□A□GGCAC□C□□□□□□□□□□□A- - - C□□□CAG□□□CATCC□ACA□C
Dog	TCCATT□□GCA□□□□□□□□TTCAACT□□C - - - □G□GCT□T□ATA□TT□T□□CA
Pig	T□CCC□□□□□□□□TATC□T□□CA□□CTGA - - - □CTACA□□□T□G□□GGATCCC

□□

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล นางสาวอธิชา ปัญญาโกญ

วัน เดือน ปี เกิด 22 มิถุนายน 2526

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนดำรงราษฎร์สงเคราะห์ ปีการศึกษา 2544

สำเร็จการศึกษานิติศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved