ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
หลักการของเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ส่วนประกอบของเครื่องมือ

เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. เครื่องกำเนิดแสง (light source)

แหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดที่สามารถให้ความยาวคลื่น 200-400 nm (อัลตราไวโอเลต) และ 400-750 nm (วิสิเบิล หรือแสงสีขาว)

2. ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator)

แสงจากแหล่งกำเนิด ถึงแม้ว่าจะมาจากหลอดที่ให้แสงเฉพาะ เช่น อัลตราไวโอเลต แต่ก็ยังเป็นแสงผสมหลายความยาวคลื่น ในการวัดการดูดกลืนแสงจำเป็นต้องใช้แสงเดียว ดังนั้นจำเป็นต้องมีเครื่องมือแยกแสงเพื่อให้ได้แสงสีเดียว คือ ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator ซึ่ง mono = หนึ่ง, chrome = สี, -or = ตัวกระทำ) การแยกแสงอาจทำได้โดยการกรอง โดยใช้ แผ่นกรองสี หรือการกระจายสี (light dispersion) เพื่อให้แสงผสมแยกออกจากกันจากนั้นจึงคัดเลือกแสงที่แต่ละความยาวคลื่นตามต้องการด้วยระบบการติดตั้งกระจก และช่องทางเดินแสง (slit)

3. ที่บรรจุตัวอย่าง (sample holder)

เป็นส่วนที่รองรับภาชนะบรรจุตัวอย่าง มีหน้าต่าง 2 ด้านตรงข้ามกัน และอยู่ในวิถีของแสงวิ่งจากแหล่งกำเนิดแสงสู่ตัวตรวจวัด มีขนาดแตกต่างกันไป แต่ขนาดมาตรฐานที่ใช้คือ ขนาด 1 × 1 cm ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายและส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ใช้เตรียมตัวอย่าง ซึ่งเราเรียกว่า blank หรือ reference เพื่อนำไปหักลบกับค่าที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่าง และผลที่ได้เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเท่านั้น โดยมากเครื่องจะปรับค่าการดูดกลืนแสงของ blank ให้เป็นศูนย์

ภาชนะบรรจุตัวอย่าง เรียกว่าเซลล์ (cell) หรือ คิวเวทท์ (cuvette) เซลล์จะต้องทำด้วยวัสดุที่แสงสามารถผ่านได้หมด ความหนาของเซลล์จะต้องสม่ำเสมอ เพราะมีผลต่อการดูดกลืนแสงของสารด้วย ลักษณะของเซลล์อาจเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ทรงสูง หรือสี่เหลี่ยมผืนผ้า 2 ด้านที่แสงผ่านจะใส ส่วนอีก 2 ด้านจะเป็นวัสดุขัด (ground glass) ซึ่งจะมีไว้สำหรับจับ

วัสดุที่ใช้ทำเซลล์

1. ควอทซ์เซลล์ ทำด้วยคลอทซ์ซึ่งเป็นวัสดุที่ยอมให้แสงทั้งอัลตราไวโอเลตและแสงสีขาวผ่านได้หมด เซลล์ชนิดนี้ราคาแพงมาก จะต้องซื้อเป็นคู่ที่มีการดูดกลืนแสงเท่ากัน (matched pair) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากใช้กับเครื่อง 2 ลำแสง เนื่องจากในการวัดเราจะต้องวัดสารละลายที่เป็น blank และตัวอย่าง ดังนั้นหากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งดูดกลืนแสงมากกว่าอีกอันหนึ่งแล้ว ผลต่างของการดูดกลืนแสงของทั้ง 2 สารละลายก็ไม่ใช่ผลของการดูดกลืนแสงของในสารละลายทั้งสอง

2. เซลล์แก้ว แก้วจะไม่ยอมให้แสงอัลตราไวโอเลตผ่าน ดังนั้นจะใช้กับแสงสีขาวเท่านั้น เซลล์ชนิดนี้ราคาถูกกว่า. พลาสติกเซลล์ เป็นพลาสติกทำด้วยพอลีสไตรีน (polystyrene) ซึ่งจะไม่ยอมให้แสง

อัลตราไวโอเลตผ่าน จะยอมให้แสงที่มีความยาวคลื่นสูงกว่า 300 nm ผ่าน เซลล์นี้เหมาะกับตัวอย่างที่มีการดูดกลืนแสงสูงกว่า 300 nm และอันตรายหรือเกาะแน่นกับภาชนะ ดังนั้นใช้แล้วทิ้งเลย

4. ตัวตรวจวัด (detector)

เป็นตัววัดความเข้มของแสง โดยเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานไฟฟ้า

5. ตัวบันทึกผล (recorder)

ปัจจุบันเราสามารถบันทึกสัญญาณด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งบันทึกได้อย่างรวดเร็ว สามารถบันทึกสารละลาย blank แล้วนำมาหักลบได้กับสารละลายตัวอย่าง ผลออกมาเป็นได้ทั้งค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นออกมาได้เลย

ลักษณะเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แบ่งได้ 3 ลักษณะคือ

1. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว (Single beam spectrophotometer)
2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ (Double beam spectrophotometer)
3. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบไดโอดอาร์เรย์ (Diode array spectrophotometer)

หลักการทำงานของเครื่องสเปกโตมิเตอร์ทุกชนิด มีหลักการทำงานแบบเดียวกันทั้งสิ้น เครื่องจะประกอบไปด้วย 5 ส่วนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับเครื่องทั้งสามชนิดแตกต่างกันดังนี้

1. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว แสงจากแหล่งกำเนิดแสง เมื่อผ่านช่องทางเดินแสงเข้า (entrance slit) แล้วตกลงบนตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator) แสงจะถูกแยกออกเป็นสเปกตรัม จากนั้นเราสามารถเคลื่อนสเปกตรัมที่ต้องการออกสู่ช่องทางเดินแสงออก (exit slit) ให้ส่งตรงไปยังเซลล์ที่บรรจุสารละลายที่ต้องการวัด แล้วผ่านออกเข้าสู่เครื่องตรวจวัด ในการวัดค่าแอบซอร์แบนซ์จะต้องวัดสารละลาย blank ก่อน

2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ การทำงานจะเป็นเช่นเดียวกับลำแสงเดี่ยวแต่ตรงที่วางตัวอย่าง จะมีที่ใส่เซลล์สองช่องสำหรับเซลล์เปรียบเทียบ (reference หรือ blank) และเซลล์ตัวอย่าง (sample cell) เมื่อแสงผ่านออกจากช่องทางเดินแสงออกแล้ว จะถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนหนึ่งจะเข้าเซลล์เปรียบเทียบ และอีกส่วนหนึ่งไปที่เซลล์ตัวอย่าง เครื่องจะวัดผลต่างของการดูดกลืนแสงระหว่างเซลล์ทั้งสอง ในการแยกแสงนั้น อาจทำได้โดยใช้ ตัวสลับแสง (chopper) ตัวสลับแสงจะมีส่วนที่ยอมให้แสงผ่านและส่วนที่ปิดกั้นแสง ตัวสลับแสงทำงานด้วยการหมุนสลับไปสลับมาอย่างรวดเร็ว ทำให้แสงส่งตรงไปที่ เซลล์เปรียบเทียบครั้งหนึ่งและที่เซลล์ตัวอย่างครั้งหนึ่ง ลักษณะลำแสงคู่แบบนี้เราเรียกว่า "double beam in time" ดังนั้นแสงที่ผ่านเข้าตัวตรวจวัด จะเป็นแสงที่ผ่านจากเซลล์เปรียบเทียบและเซลล์ตัวอย่าง สลับกันตลอดเวลา ซึ่งหากเซลล์ทั้งสองบรรจุสารละลายที่เหมือน ๆ กัน ความแตกต่างของปริมาณแสงที่ตัวตรวจวัดจับได้จะเท่ากัน สัญญาณเป็นศูนย์ แต่ถ้าเซลล์ทั้งสองบรรจุสารละลายที่ต่างชนิดกันจะเกิดความแตกต่างกัน ความแตกต่างกันนี้จะถูกส่งไปยังเครื่องรับสัญญาณทำให้ทราบปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้

นอกจากการแบ่งแสงด้วยตัวสลับแสงแล้วยังอาจมีการแยกแสง โดยอาศัยกระจกและเลนส์ช่วยโดยหลักการสะท้อนแสงทำให้ได้แสง 2 ลำ ลำหนึ่งตรงไปเซลล์เปรียบเทียบ อีกลำส่งไป เซลล์ตัวอย่างลักษณะนี้เราจะได้แสง 2 ลำ ส่งออกมาในบริเวณตัวอย่างตลอดเวลา เรียกเครื่องชนิดนี้ว่า "double beam in space" เราไม่นิยมใช้หลอดกำเนิดแสง 2 หลอด เพราะเป็นการยากที่จะให้แสงเปล่งออกมาเท่า ๆ กันตลอดอายุการใช้งานและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเนื้อที่ ซึ่งเมื่อผ่านออกมาจากเซลล์ทั้งสองแล้วถูกส่งไปตัวตรวจวัด ซึ่งตัวตรวจวัดอาจมี

เพียงตัวเดียวแล้วใช้ตัวสลับแสงวางหน้าตัวตรวจวัด คอยสลับแสงให้แสงแต่ละลำเข้าตัวตรวจวัด สลับกัน ซึ่งลักษณะสัญญาณ ที่ออกมาจะเป็นแบบ double beam in time นอกจากนี้บางเครื่องอาจมีตัวตรวจวัด 2 ตัว ที่ทำงานมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกันเพื่อรับแสงทั้ง 2 ลำพร้อมกัน

3. <u>เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบไดโอดอาร์เรย์</u> เครื่องมือชนิดนี้เรียกตามลักษณะของตัวตรวจวัด (detector)

หลักการของไดโอดอาร์เรย์ (ไดโอดเป็นเครื่องรับสัญญาณแสงแบบเดี่ยวกับโฟโตไดโอด array = การเรียงตัวเป็นแถวหน้ากระดาน) เมื่อแสงผ่านจากแหล่งกำเนิดแสง จะถูกส่งเข้าเซลล์ตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจากเซลล์จะถูกแยกออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน และแต่ละคลื่นจะเข้าสู่ไดโอดแต่ละตัวทำให้สามารถรับสัญญาณ ของคลื่นแสงทุกคลื่นได้ในเวลาเดียวกัน ทำให้การสแกนสเปกตรัมทำได้เร็วมาก

ในรูปแสงจากหลอดดิวเทอร์เรียม จะถูกส่งเข้าสู่เลนส์ที่เรียกว่า "source lens" ทำให้เกิดเป็นลำแสงขนาน แล้วผ่านเข้าตัวอย่างในบริเวณตัวอย่าง ก่อนเข้าสู่ตัวอย่างจะมีตัวสลับแสง คอยสลับแสงถ้าเปิดแสงก็ผ่านเข้าสู่เซลล์ตัวอย่างส่งต่อไปยังตัวตรวจวัด ก็จะวัดแสงที่ผ่านการดูดกลืน แต่ถ้าปิดตัวตรวจวัด ก็จะไม่ได้รับแสง เครื่องก็จะวัดความมืด ระหว่างเซลล์และตัวตรวจวัดจะมีตัวกระจายแสงให้เป็นสเปกตรัมเข้าสู่ตัวตรวจวัด คลื่นแสงแต่ละความถี่ก็จะตกลงบนตัวตรวจวัดที่วางเรียงหน้ากระดาน ตัวตรวจวัดแต่ละตัวก็จะบอกความเข้มของแสงตก แสงที่จะถูกดูกกลืนไปก็จะหายขาดไป หรือลดลงส่วนแสงที่ไม่ถูกดูดกลืนก็จะมีความเข้มข้นเท่าเดิม ดังนั้นเราจึงสามารถหาปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนได้

สำหรับข้อดีและข้อเสียของเครื่องมือทั้ง 3 ชนิดนั้นแตกต่างกันไป ซึ่งขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ของผู้ผลิตด้วย ซึ่งปัจจุบันพัฒนาการของด้านอิเล็กทรอนิกทำให้การแปลและบันทึกผลรวดเร็วมาก ไม่ได้ทำให้แบบลำแสงคู่หรือแบบลำแสงเดี่ยว ไม่มีข้อได้เปรียบหรือเสียเปรียบกับมากเท่าใดนัก และเครื่องบางชนิดอาจทำงานได้ทั้งสองแบบ

GEL ELECTROPHORESIS

หลักการ

เนื่องจาก กรดนิวคลิอิก มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวเราสามารถนำไปใช้ในการแยก หรือวิเคราะห์กรดนิวคลิอิกโดยเฉพาะ Deoxyribonucleic acid (DNA) ภายใต้สนามไฟฟ้า (eletrophoresis) โดยผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) gel ที่ใช้กันทั่วไปคือ agarose gel และ polyacrylamide gel หรือในบางงานอาจใช้ gel ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง agarose gel และ polyacrylamide gel โดยที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ มีความสามารถแยก DNA ที่มีขนาด >500-1,000 base pairs (bp) ในขณะที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูง และ polyacrylamide gel ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษา DNA ที่มีขนาดเล็กคือเล็กกว่า 500 bp

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน gel ของ DNA มีดังนี้

1. ขนาดโมเลกุลของ DNA (Molecular size of the DNA)

DNA ขนาดใหญ่จะผ่าน gel ได้ช้ากว่า DNA ขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากัน และสภาวะเดียวกัน DNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่า DNA ขนาดเล็ก

2. รูปร่างของ DNA (Conformation of the DNA)

DNA ที่มีรูปร่างต่างกัน (แม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน) ภายใต้สภาวะเดียวกัน จะเคลื่อนที่ผ่าน gel ด้วยความเร็วต่างกัน DNA ที่มีลักษณะเป็นวงกลม (Superhelical circular) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) และ linear DNA เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่คลายเกลียว (Oper circular หรือ Nick circular DNA)

3. ความเข้มข้นของ gel (Gel concentration: pore size of the gel

Gel ที่มีความเข้มข้นสูง จะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุล (pore)น้อย ทำให้ DNA เคลื่อนผ่านได้ช้ากว่า gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น gel ที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยก DNA ที่มีขนาดใหญ่

4. ส่วนประกอบของ electrophoresis buffer (Composition of electrophoresis buffer)

Buffer ที่ใช้ในกระบวนการ electrophoresis มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA เพราะส่วนประกอบของประจุหรืออิออน และ ionic strength ในแต่ละ buffer นั้น เมื่อไม่มีอิออน (กรณีใส่ buffer ไม่ท่วมแผ่น gel) การนำไฟฟ้าเกิดขึ้นน้อย ทำให้ DNA เคลื่อนที่ช้ามาก หรือไม่เคลื่อนที่เลย แต่ถ้าใช้ buffer ที่มี ionic strength สูง (กรณีเกิดการผิดพลาดใช้ 10X buffer แทน) การนำไฟฟ้าเกิดขึ้นอย่างมาก ทำให้เกิดความร้อนจนกระทั่งละลาย gel และทำลาย DNA ได้

Buffer ที่นิยมใช้ในกระบวนการ electrophoresis ประกอบด้วย EDTA กับ Tris-acetate (TAE) หรือ Tris-borate (TBE) ที่ pH ประมาณ 7.5-8.0 การเลือกใช้ buffer ชนิดใดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของ buffer ชนิดนั้น ๆ

TAE buffer นิยมใช้กันมากในงานวิจัยทั่วไป แต่ buffer ชนิดนี้มีความจุ (buffering capacity) ค่อนข้างต่ำ ในกรณีที่ต้องทำ electrophoresis เป็นเวลานาน ๆ เช่น ค้างคืน จะทำให้สารละลายด้านขั้วลบเป็นด่าง และสารละลายด้านขั้วบวกเป็นกรด สูญเสียความเป็น buffer ไป แต่ก็สามารถแก้ไขได้โดยใช้ระบบถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่างสารละลายทั้งสองด้านโดยใช้เครื่อง peristaltic pump ตลอดการทำ electrophoresis

TBE buffer เป็น buffer ที่มี buffering capacity สูง และ boric acid ก็เป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมใช้กันพอสมควร

5. กระแสไฟฟ้า (Voltage gradient)

โดยทั่วไปในการทำ electrophoresis มักจะทำในสภาวะแรงดันไฟฟ้าคงที่ (constant voltage) ดังนั้น ค่าของ voltage จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA โดยมีค่าความต้านทานของตัวกลาง (gel และ buffer) มาเกี่ยวข้องด้วย ดังสมการ Ohm's Las, $V = IR$ เมื่อ V คือค่าแรงดันไฟฟ้า หรือ voltage(volts), I คือค่ากระแสไฟฟ้า หรือ current (Miliamps) และ R คือค่าความต้านทาน หรือ resistance (Ohms) ของตัวกลางในสนามไฟฟ้านั้น ดังนั้นจากสมการ เมื่อผ่านแรงดันไฟฟ้า (voltage) จำนวนหนึ่งเข้าไปในวงจร จะส่งผลให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปในตัวกลาง แล้วแรงดันไฟฟ้าเมื่อผ่านตัวกลาง จะมีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความต้านทานของตัวกลางนั้น ทำให้เกิด voltage gradient ซึ่งผลักดันให้ DNA เกิดการเคลื่อนที่ขึ้น ทั้งนี้ความต้านทานของตัวกลาง แปรผกผันกับความหนาของตัวกลาง (gel) ตลอดจนปริมาณประจุใน buffer โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่า volt ที่พอเหมาะ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของ linear DNA จะแปรโดยตรงกับปริมาณ voltage (voltage เพิ่มขึ้น DNA เคลื่อนที่เร็วขึ้น) แต่ทว่าเมื่อใช้ voltage สูงเกินไป DNA ที่มีขนาดใหญ่ จะเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการแยก DNA fragment ลดลง ดังนั้นเพื่อให้การแยก DNA fragment ที่ขนาดใหญ่มากกว่า 2kb ได้ผลดี ควรจะใช้ voltage ไม่เกิน 5 volts/cm. (5 V ต่อ ระยะห่างระหว่าง 2 electrode ทุก ๆ 1 cm.)

ชนิดของ gel

1. Agarose gel การเตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้นเท่าใด ขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA fragment ที่จะศึกษาแต่โดยทั่วไปมักจะใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.8-1.0% Agarose gel ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมี 2 ชนิด คือ

Regular agarose ในปัจจุบันมีหลายบริษัทผลิต agarose ออกมาขาย ถ้าเป็นงานตรวจสอบทั่วไป (general screening) การใช้ standard low-endoosmotic agarose ก็เพียงพอ แต่ถ้าต้องการสกัด DNA จากเนื้อ gel ก็ควรจะใช้ ultra pure agarose ซึ่งปราศจาก agaropectin และ sulfated oligosaccharide ที่มักพบใน agarose ทั่วไป ซึ่งสารเหล่านี้จะเกาะกับ DNA และมักจะยับยั้งปฏิกิริยาของ restriction enzyme นอกจากนี้ agarose ที่มีความบริสุทธิ์สูงยังช่วยให้การเรืองแสง UV หลังจากย้อม DNA ด้วย ethidium bromide อยู่ได้นาน เป็นการเพิ่มความไวของการตรวจดวย

Low gelling/melting temperature agarose เป็น agarose ที่มีจุดหลอมละลายที่ 62-65 องศาเซลเซียส และเมื่อละลายแล้ว สามารถอยู่ในสภาวะเหลวที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานหลายชั่วโมงหรือที่ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที agarose ชนิดนี้มีประโยชน์ในแง่

- การแยก DNA fragment จาก gel โดยไม่ผ่านขบวนการ electroelution หรือทำลาย gel โดยที่สามารถละลาย DNA ออกมากับ gel เมื่อจุ่น gel ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และสามารถทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction ได้ที่อุณหภูมินี้ หลังจากปั่นแล้ว DNA ก็จะละลายอยู่กับสารสกัดส่วนบน ทำให้แยก DNA ออกจาก gel ได้
- การตัด DNA fragment ด้วย restriction enzyme หลังการทำ electrophoresis สามารถทำได้โดยตรง โดยละลายชิ้นส่วน gel ที่มี DNA อยู่ แล้วจุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับทำการตัด

DNA ด้วย enzyme ต่อมาเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำสารละลายนั้นไปหยอดลงใน gel แผ่นใหม่ รอ จน gel แข็ง ก็สามารถทำ electrophoresis อีกครั้งหนึ่งได้

2. Poly acrylamide gel electrophoresis Polyacrylamide gel เกิดจากการทำ polymerize ของ acrylamide monomer ไปเป็น polyacrylamide สายยาว ที่เกาะ (cross link) กันด้วยสาร cross-linking agent ได้แก่ N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis) โดยมี ammonium persulfate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พร้อมกับมีสารเริ่มต้นปฏิกิริยา (initiator) คือ N,N,N',N'- tetramethylenediamine (TEMED) อยู่ด้วย Gel ชนิดนี้ใช้ในการแยก DNA fragment ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 kb และใช้ในขบวนการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) หรือการวิเคราะห์โปรตีน ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของ gel ได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1 Nondenaturing polyacrylamide gel ใช้ในการแยก DNA สายคู่

2.2 Denaturing polyacrylamide gel ใช้ในการแยก DNA สายเดี่ยว และทำ DNA sequencing ซึ่ง gel สำหรับทำ DNA sequencing จะต่างจากชนิดแรกที่มีสารป้องกันการจับกันของกรดนิวคลิอิก คือ urea หรือ formamide

การย้อมสี DNA (DNA staining)

วิธีที่ง่ายที่สุดในการย้อม DNA fragment คือ การย้อมด้วย Ethidium bromide (stock solution = 10 mg/ml.) สารนี้โครงร่างแบน (planar) สามารถแทรก (intercelate) เข้าไประหว่าง base ของ DNA ทำให้เกิดการเรืองแสงสีส้ม (fluorescent radiation) เมื่อถูกส่องผ่านด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (Ultraviolet light) วิธีนี้มีความไวสูง DNA fragment ซึ่งมีปริมาณ 1-10 ng สามารถมองเห็นได้ด้วยวิธีนี้

ข้อควรระวัง : ethidium bromide เป็นสารอันตรายมาก ก่อให้เกิดการผ่าเหล่าในสิ่งมีชีวิต (เป็น mutagen และ carcinogen) ฉะนั้นควรสวมถุงมือ เมื่อต้องทำงานเกี่ยวข้องกับสารเหล่านี้ และไม่ควรทิ้งสารนี้ลงในท่อน้ำทิ้งโดยที่ยังไม่ได้ทำลายฤทธิ์เสียก่อน

การตรวจดู และการถ่ายภาพ DNA (Visualization and photography of stained DNA)

Ethidium bromide เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ultraviolet (UV) light ที่ความยาวคลื่น (wavelength) ประมาณ 300 nm. จะปล่องแสง fluorecent ออกมาให้มองเห็นได้ ในปัจจุบันได้มีผู้ผลิตเครื่องกำเนิดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254, 300 และ 366 nm ออกมาจำหน่าย แต่จากการทดสอบพบว่า ที่ 254 และ 300 nm. ให้แสง fluorescent ที่มีความเข้มกว่า 366 nm. แต่เนื่องจากที่ 254 nm. มีผลทำให้ Ethidium bromide หลุดออกจาก DNA ได้ง่าย เกิด potobleaching คือแสง fluorescent จางลงเร็ว และยังสามารถทำลาย DNA ได้มากกว่าความยาวคลื่นที่ 300 nm. ดังนั้นจึงมักเลือกใช้เครื่องกำเนิดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 300 nm.

DNA marker ที่มักใช้ในการทำ Agarose และ Polyacrylamide gel electrophoresis

โดยทั่วไปจะใช้ *Hind* III-digested λ DNA เป็น marker ในการเปรียบเทียบขนาดของ DNA fragment สำหรับการทดลองส่วนใหญ่ที่ทำ electrophoresis ใน 0.8-1.2% agarose gel แต่ถ้าต้องการทราบขนาดของ DNA fragment ที่ถูกต้องมากขึ้นในช่วง 1-8 kb ก็ควรจะใช้ *Bst* EII-digested λ DNA แทน

สำหรับ DNA marker ที่เหมาะสมกับ DNA fragment ขนาดเล็กซึ่งทำการแยก fragment ใน polyacrylamide gel electophoresis มีหลายชนิด เช่น *Bst* NI-digested pBR 322 vector DNA, *Msp* I-digested pBR 322 vector DNA เป็นต้น

นอกจากนี้ได้มีผู้ผลิต DNA marker ออกมาจำหน่าย Ladder DNA ของบริษัท BRL ซึ่งแบ่งออกเป็นหลายชนิด สามารถเลือกใช้ให้ตรงกับงานได้ เช่น oligo (dT) 4 - 22 ladder เหมาะสำหรับการทำ DNA sequencing หรือ ใช้ในงานสังเคราะห์ oligonucleotides โดยที่ marker ชนิดนี้ประกอบด้วย single stranded oligonucleotide 19 fragment มีขนาดตั้งแต่ 4 - 22 nucleotides

Polymerase Chain Reaction

หลักการ

วิธีการ PCR คิดขึ้นโดย Kary B. Mullis นักเคมีวิเคราห์ชาวอเมริกัน ในปี ค.ศ.1985 โดยทางทฤษฎี PCR คล้าย ๆ กับ DNA replication ภายในเซลล์ กว่าวคือ เป็นวิธีการที่ DNA Polymerase สร้าง DNA จาก DNA ต้นแบบโดยการต่อสาย oligonucleotide primer แต่ขบวนการ PCR อาศัย oligonucleotice primers 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะ hybridize หรือ anneal กับ DNA เส้นตรงข้ามกัน เนื่องจาก complementary โดย primer จะหันปลายด้าน 3'-OH ของ primer เข้าหากัน ถ้ามีเอ็นซัยม์ DNA polymerase อยู่ด้วยก็จะเกิดการสร้าง DNA ขึ้นโดยการต่อปลายจาก primer ทั้ง 2 เส้น ตาม DNA ต้นแบบจนกระทั่งสุดปลาย template โดยการสร้าง DNA จะทำได้ในทิศทางเดียวกันคือ จาก 5'→3' ผลที่ได้คือ DNA เส้นคู่ใหม่ที่เกิดจาก DNA เส้นที่สร้างใหม่ complementary กับ DNA เส้นที่เป็น template

ปัจจัยสำคัญในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA โดยเทคนิค PCR คือ DNA สายสั้นขนาดประมาณ 20-30 เบส จำนวน 2 เส้น เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งสามารถจับคู่กับสายตรงข้ามกันในบริเวณทั้งสองปลายของ DNA เป้าหมาย นอกจากนี้ในปฏิกิริยายังประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่จำเป็นทั้งสี่ชนิด เอ็นซัมม์ DNA polymerase และปัจจัยสำหรับการทำงาน กระบวนการเพิ่มจำนวนประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

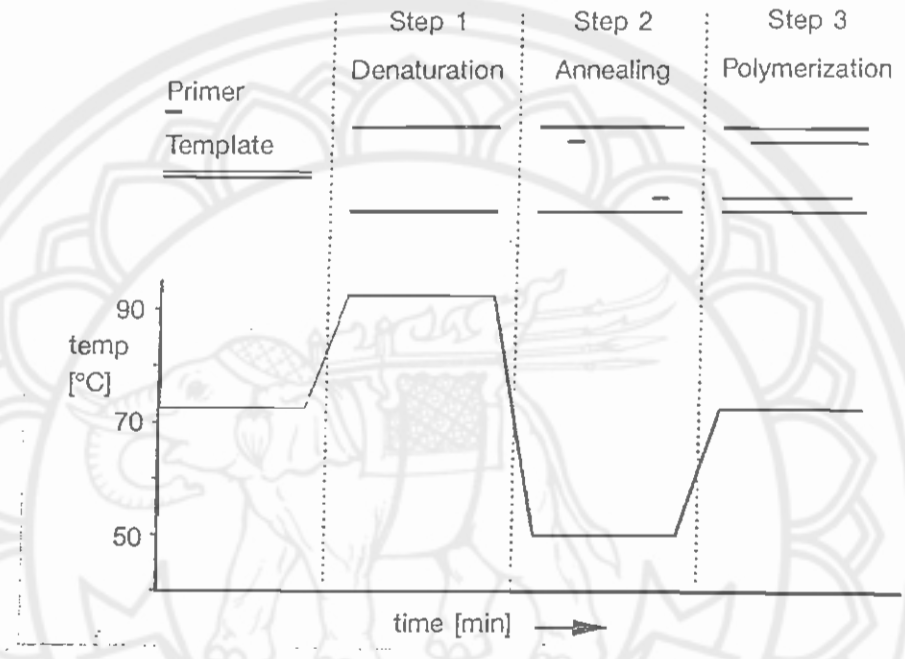
- Denaturation เป็นการใช้ความร้อนช่วยให้ DNA เป้าหมายแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว
- Primer annealing คือการลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ DNA สามารถกลับมาเข้าคู่กันได้เหมือนเดิม แต่เนื่องจาก primer มีขนาดเล็กและมีปริมาณมากกว่า ส่วนใหญ่ของ DNA เป้าหมายจึงถูกเข้าจับด้วย primer ทั้งสอง
- Primer extemsion เอ็นซัมย์ DNA polymerase สังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยเริ่มตั้งแต่ ปลาย 3' ของ primer แต่ละเส้น

หลังจากเสร็จขั้นตอน primer extension ถือเป็นหนึ่งรอบของกระบวนการ PCR สำหรับรอบต่อ ๆ ไปก็กลับไปเริ่มต้นขั้นตอน denaturation วนเวียนแบบเดิมอย่างนี้ประมาณ 20-40 รอบก็จะได้ชิ้น DNA จำเพาะจำนวนหลายล้านชิ้น PCR สามารถเพิ่มจำนวน DNA จำเพาะได้เร็วเนื่องจากการผลิตผล (PCR product หรือ amplicaon) ที่ได้จากแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นต้นแบบในกระบวนการถ่ายแบบในรอบต่อ ๆ ไปทุกครั้ง จำนวน DNA ที่ได้ในแต่ละรอบสามารถคำนวณได้โดยใช้สูตร 2^n (n คือจำนวนรอบของการทำ PCR)

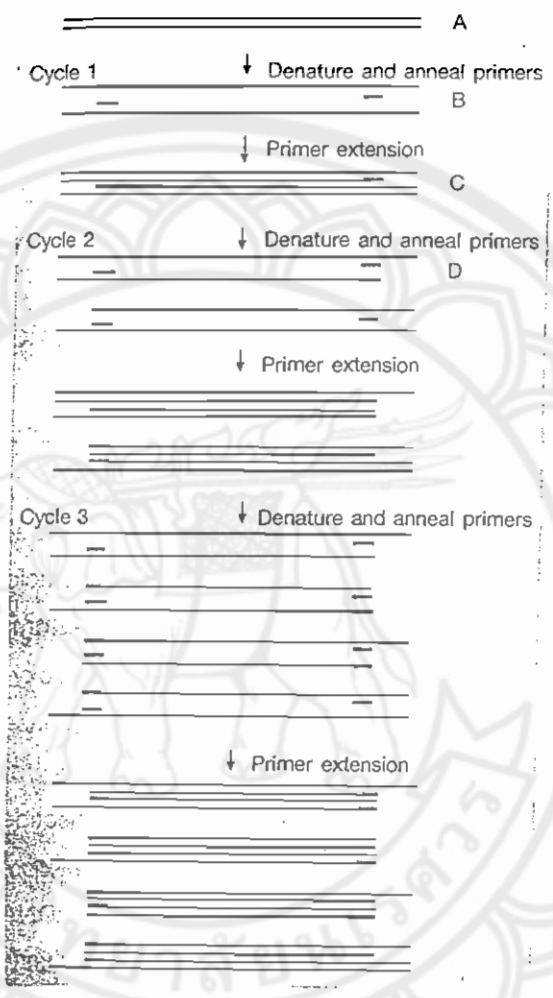
Component of PCR amplification

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้

1. DNA sample (จากสิ่งตัวอย่าง เช่น DNA จากเซลล์, serum เป็นต้น)
2. Oligonuclotide primer (ต้องสร้างด้วยเครื่อง oligonucleotide symthesizer)
3. Deoxynucleotide triphosphate
4. Buffer ที่เหมาะสม และ cation เช่น Mg^{2+}
5. Taq DNA polymerase



รูปที่ 1 PCR temperature cycling profile



รูปที่ 2 หลักการ Polymerase Chain Reaction

A : DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเป็น DNA เส้นคู่

B : แยก DNA ออกเป็นเส้นเดี่ยวด้วยความร้อนสูงและทำให้เย็นลงเพื่อที่จะให้ primer 1 และ 2 ไป anneal กับแต่ละเส้น DNA

C : Taq polymerase จะสร้าง DNA ซึ่ง complementary กับ template

D : เข้าวงจรที่สองของ PCR reaction

ภาคผนวก ช

ผลการทดลอง

name	beta-density	hnf-density 1	hnf-density 2	HNF	ratio	mean
control 1	492.5061151	1673.393563	1570.902043	1622.147803	3.293660227	3.745429798
control 2	496.380756	1982.599406	2184.218584	2083.408995	4.197199368	
glucose 7	504.1675893	1761.452836	1622.906763	1692.1798	3.356383543	3.192551328
glucose 9	573.5526783	1876.418314	1748.765146	1812.59173	3.160288145	
glucose 10	554.0975432	1696.08277	-	1696.08277	3.060982297	
ext 0.1-23	331.775087	1996.252749	-	1996.252749	6.016885615	6.227477836
ext 0.1-24	329.2966824	2351.61538	-	2351.61538	7.141327276	
ext 0.1-25	346.6079634	2302.509402	-	2302.509402	6.642978942	
ext 0.1-26	355.5281719	1816.293709	-	1816.293709	5.108719512	
ext 1-27	415.1157108	2062.68951	-	2062.68951	4.96895072	4.418836819
ext 1-28	368.1386771	1855.987603	-	1855.987603	5.041544718	
ext 1-29	369.2071904	2104.027381	-	2104.027381	5.698771411	
ext 1-30	1011.759201	1989.199961	-	1989.199961	1.966080427	
ext 3-31	668.6606035	2014.775729	-	2014.775729	3.013151543	3.191563701
ext 3-32	543.8084087	2025.254516	-	2025.254516	3.724205958	
ext 3-33	578.9669342	1642.722337	-	1642.722337	2.837333601	