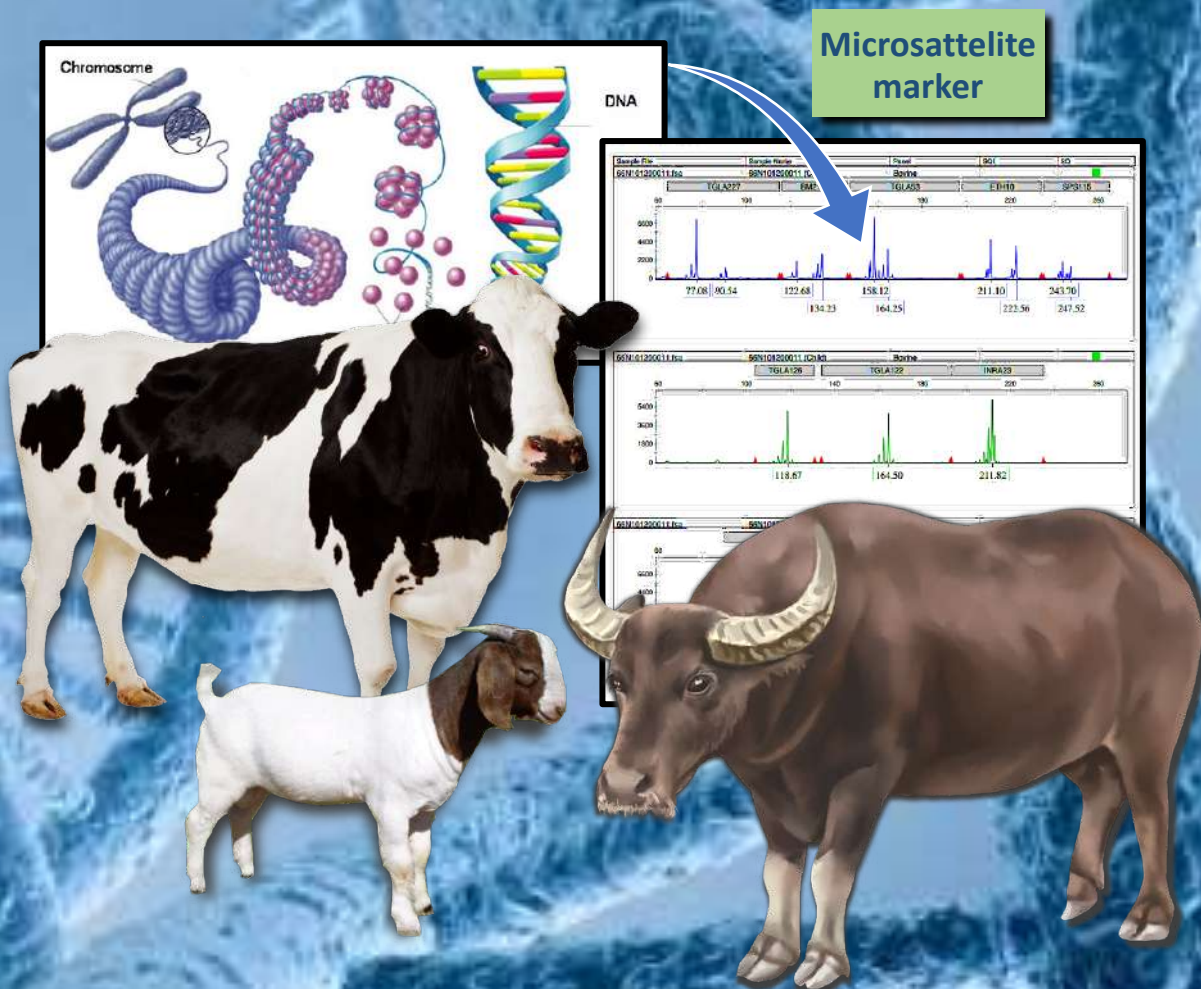




คู่มือการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในปศุสัตว์ด้วยเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์

Manual of DNA fingerprint in Livestock with microsatellite analysis



นายสัตวแพทย์ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญะกุล
กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ISBN: 978-974-682-445-3



คู่มือการตรวจวินิจฉัยและให้คำปรึกษาแก่ผู้ป่วยที่มีไข้ในปอดด้วยเครื่องหมายไม่โครแซทเทลไลต์ นายสัตวแพทย์พันธุ์นนท์ ศิริรัตน์วิทยะกุล

คู่มือการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
ในปศุสัตว์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

เลขทะเบียนผลงานทางวิชาการ	66(2)-0208-015
จัดพิมพ์และเผยแพร่โดย	สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ISBN	978-974-682-445-3
จำนวนหน้า	156 หน้า
ปีที่พิมพ์	มีนาคม 2566
พิมพ์ครั้งที่	1 จำนวน 40 เล่ม
พิมพ์ที่	โรงพิมพ์ด่วน.com 43/1 หมู่ 8 ต.บางพูด อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี 11120

คำนำ

สารพันธุกรรมหรือที่รู้จักกันคือ “ดีเอ็นเอ” พบได้ในโครงสร้างของเซลล์ 2 ส่วนคือ ภายในโครโมโซม ในนิวเคลียสซึ่งเป็นการถ่ายทอดจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งไปสู่ลูกและอีกส่วนอยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งอยู่ในไซโทพลาสซึม ดีเอ็นเอส่วนนี้ถ่ายทอดมาจากแม่สู่ลูกร้อยเปอร์เซ็นต์ ดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรมของลูก สารพันธุกรรมนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก ความสัมพันธ์ทางสายเลือด การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิต การกลายพันธุ์ (mutation) และโรคทางพันธุกรรม โดยการนำเทคโนโลยีชีวโมเลกุลซึ่งเป็นเทคนิคทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ที่มีการวิวัฒนาการมาอย่างต่อเนื่อง การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอถูกค้นพบครั้งแรกโดย ศาสตราจารย์ ดร. อเล็ก เจฟฟรี (Alec Jeffreys) และคณะจากมหาวิทยาลัยไลเชสเตอร์ (Leicester) ประเทศอังกฤษ ในปี พ.ศ. 2527 นับได้ว่าเป็นผู้บุกเบิกเทคโนโลยีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลก วิธีการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีหลายวิธีเช่น RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (rapid amplified polymorphic DNA), minisatellite DNA และ microsatellite DNA เป็นต้น

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนำไปใช้ประโยชน์ในทางอนุนิติวิทยาศาสตร์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของบุคคล พิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก ในทางปศุสัตว์มีการนำเอาเทคนิคการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ได้หลายกรณี เช่น นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายเลือด ความหลากหลายทางพันธุกรรม ศึกษาภาวะเลือดชิด ศึกษาโครงสร้างของประชากร เป็นต้น ผลตรวจดีเอ็นเอยังมีความสำคัญมากในกระบวนการยุติธรรม เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ระบุผู้กระทำผิดและผู้เสียหายในกรณีที่มีการฟ้องร้องเป็นคดีความทางกฎหมาย ดังนั้นกระบวนการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานจะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีคุณภาพ มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2017 เป็นระบบบริหารคุณภาพพื้นฐานที่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล และห้องปฏิบัติการอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตวใช้เป็นแนวทางในการดำเนินงาน

เนื้อหาแต่ละบทในหนังสือคู่มือเล่มนี้ จะบรรยายเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปศุสัตว์ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ เริ่มตั้งแต่ ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสารพันธุกรรม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอ กระบวนการตรวจวิเคราะห์และเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจ การวิเคราะห์และการแปลผล รวมทั้งมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025: 2017 เป็นต้น เพื่อให้เป็นความรู้กับผู้สนใจทุกท่านและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสาทความรู้ด้านพันธุศาสตร์และพันธุศาสตร์ชีวโมเลกุล ขอบคุณนายสัตวแพทย์ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อดีตผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนการพัฒนางานพันธุศาสตร์ชีวโมเลกุล จนมีความก้าวหน้ามั่นคง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลทางสัตวทุกท่าน ที่ได้มีส่วนร่วมและช่วยให้ทำงานชิ้นนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายสัตวแพทย์ณัฐนันท์ ศิริรัตนชัยญกุล

กรมปศุสัตว์

พ.ศ. 2565

สารบัญ

คำนำ	1
บทที่ 1 ความรู้เบื้องต้นด้านชีวโมเลกุล	5
เซลล์และทฤษฎีเซลล์	5
จีโนม	16
โครโมโซม	19
ยีน	23
กระบวนการลอกรหัส	24
กระบวนการแปลรหัส	25
รหัสพันธุกรรม	27
ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ	27
โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ	28
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	35
เอกสารอ้างอิง	38
บทที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์	42
เครื่องหมายดีเอ็นเอ	42
การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	42
• การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริดเซชัน	43
• การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์	44
เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	46
• ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน	46
• ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน	47
คุณสมบัติของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	50
เอกสารอ้างอิง	50
บทที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ	52
การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางอณูชีววิทยา	52
ชนิดของตัวอย่างในการส่งตรวจ	52
• ตัวอย่างเลือด	53
• ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสด	60
• ตัวอย่างเซลล์รากขน	61
• ตัวอย่างเนื้อเยื่อ (ชิ้นเนื้อ)	62

การสกัดดีเอ็นเอ	64
• การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ด้วยชุดสกัด QIAGEN®	65
• การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ ด้วยชุดสกัด QIAGEN®	67
• การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเชื้อ ด้วยชุดสกัด QIAGEN®	70
• การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ด้วยการใช้สารคีเล็กซ์	73
• การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากขน ด้วยเทคนิค Salting Out	74
• การสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดดีเอ็นเอ แบบอัตโนมัติ	76
การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ	82
การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปศุสัตว์ด้วยไมโครแซทเทลไลต์	82
การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) โค	82
การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) กระบือ	85
การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แพะ	89
การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) สุนัข	93
การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แมว	96
เอกสารอ้างอิง	99
บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูลและการแปลผล	101
การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GeneMapper	101
การแปลผลรูปแบบของอิเล็กโทรฟีโรแกรม	104
การลบ - เพิ่มตำแหน่งพีคของ electropherogram	107
การบันทึกข้อมูลและถ่ายโอนข้อมูล	108
การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ	111
• การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) โค	111
• การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกโค	111
• การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) กระบือ	116
• การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกกระบือ	116
• การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แพะ	122
• การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกแพะ	122
• การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) สุนัข	127
• การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกสุนัข	127

• การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แมว	132
• การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกแมว	132
• การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ที่ไม่ใช่ลูกพ่อหรือลูกแม่โค	137
เอกสารอ้างอิง	142
บทที่ 5 มาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025: 2017	143
ระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017	143
ข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2017	143
วิธีการตรวจอัตลักษณ์โค โดยใช้ StockMarks® for Cattle Bovine Genotyping Kit	147
• การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี	147
• การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	148
• การตรวจติดตามคุณภาพ	153
• การตรวจติดตามคุณภาพภายใน	154
• การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ	155
เอกสารอ้างอิง	156

บทที่ 1

ความรู้เบื้องต้นด้านชีวโมเลกุล

การศึกษางานด้านชีวโมเลกุล จะต้องมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับองค์ประกอบของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การถ่ายทอดสารพันธุกรรม ยีน โครโมโซม ตลอดจนโครงสร้างเซลล์ นำไปสู่การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ จีโนม เช่น การหาลำดับคู่เบสในสายดีเอ็นเอ การถอดรหัส การแปลรหัส รหัสพันธุกรรม รวมทั้งการศึกษา หน้าที่การทำงานของยีน การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำความรู้ไปใช้ ประโยชน์ในด้านพัฒนาคุณภาพ เทคนิคและกระบวนการในการปรับปรุงสายพันธุ์สัตว์ การตรวจสอบและ การวิเคราะห์ผลในงานพันธุศาสตร์โมเลกุลและอนุพันธุศาสตร์

เซลล์และทฤษฎีเซลล์ (cell and cell theory)

เซลล์เป็นหน่วยโครงสร้างพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิตเซลล์รวมกันเป็นเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อรวมกันเป็นอวัยวะ สิ่งมีชีวิตบางชนิดมีเพียงเซลล์เดียว บางชนิดมีหลายเซลล์ เซลล์ของสิ่งมีชีวิตมี รูปร่าง ขนาด และโครงสร้างแตกต่างกัน ในปี ค.ศ. 1665 นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ โรเบิร์ต ฮุก (Robert Hooke) ได้ประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบมาใช้ศึกษาเนื้อเยื่อของไม้คอร์กพบว่า ประกอบด้วยช่องว่างเล็ก ๆ จำนวนมาก และได้เรียกช่องนี้ว่า "เซลล์" เซลล์ดังกล่าวนี้เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว แต่ยังคงรูปร่างอยู่ได้เพราะมีผนังเซลล์ซึ่งมีความแข็งจากนั้นก็มีการค้นคว้าศึกษาเรื่องเซลล์ของพืช สัตว์และ จุลินทรีย์อื่น ๆ เรื่อยมาจนกระทั่งใน พ.ศ. 2381 มัตทีอัส ชไลเดนนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันค้นพบว่าพืช เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีหลายเซลล์ ในปี พ.ศ. 2382 เทโอดอร์ ชวันน์นักสัตววิทยาชาวเยอรมันค้นพบว่าสัตว์ทั้งหลาย มีเซลล์เป็นองค์ประกอบ ทั้ง 2 คน จึงร่วมกันก่อตั้ง ทฤษฎีเซลล์ (cell theory) มีใจความว่า “สิ่งมีชีวิตทั้งหลายประกอบด้วยเซลล์ และผลิตภัณฑ์ของเซลล์” สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีโครงสร้างเหมือนกันคือ ประกอบขึ้น ด้วยเซลล์ เซลล์คือหน่วยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยสรุปใจความสำคัญของทฤษฎีเซลล์ มีด้วยกัน 3 ประการดังนี้

1. สิ่งมีชีวิตทั้งหลายอาจมีเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ซึ่งภายในมีสารพันธุกรรมและมีกระบวนการ เมแทบอลิซึมทำให้เซลล์ดำรงชีวิตอยู่ได้
2. เซลล์เป็นหน่วยพื้นฐานที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต ที่มีการจัดระบบการทำงานภายในเซลล์โครงสร้าง ของเซลล์
3. เซลล์มีกำเนิดมาจากเซลล์แรกเริ่ม เซลล์เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์เดิม

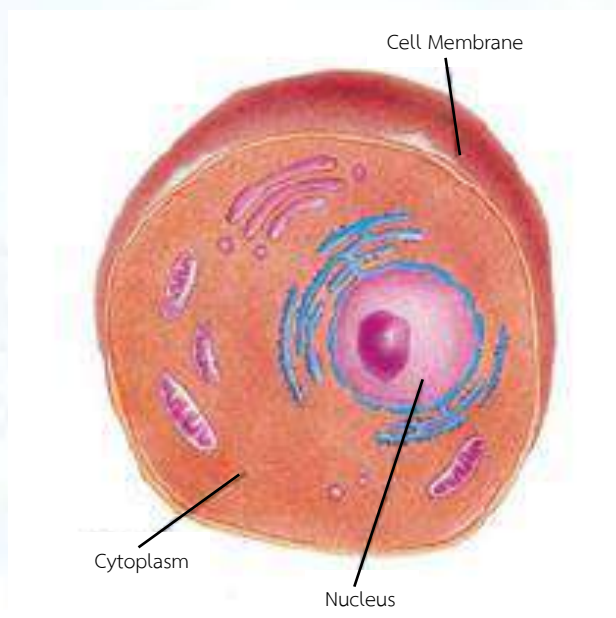
แม้ว่าชีวิตแรกเริ่มจะมีวิวัฒนาการมาจากสิ่งไม่มีชีวิตแต่นักชีววิทยายังคงถือว่าการเพิ่มขึ้นของ จำนวนเซลล์เป็นผลสืบเนื่องมาจากเซลล์รุ่นก่อนเซลล์มีส่วนที่เหมือนกัน เซลล์หลายชนิดมีรูปร่างและลักษณะ พิเศษที่แตกต่างกันไปตามตำแหน่งที่อยู่และหน้าที่การทำงานแต่มีโครงสร้างสำคัญ 3 ส่วน ที่เหมือนกัน คือ เยื่อหุ้มเซลล์ ไซโทพลาซึม และนิวเคลียส (รูปที่ 1 - 1) โดยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เป็นส่วนที่ ห่อหุ้มเซลล์และกั้นเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ภายในเซลล์มีโครงสร้างเล็ก ๆ เรียกว่า ออร์แกเนลล์

(organelle) ล่องลอยอยู่ในส่วนของเหลวที่เรียกว่าไซโทพลาซึม (cytoplasm) ออร์แกเนลล์เหล่านี้มีหลายชนิด ซึ่งมีรูปร่าง จำนวน และหน้าที่ต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ สำหรับนิวเคลียสเป็นศูนย์กลางควบคุมกระบวนการเมตาโบลิซึมต่าง ๆ และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ประเภทของเซลล์

เซลล์ของสิ่งมีชีวิตสามารถแบ่ง ออกเป็น 2 ชนิด โดยแบ่งตามลักษณะความซับซ้อนของโครงสร้างภายในเซลล์ คือ

1. โพรคาริโอติกเซลล์ (prokaryotic cell) เป็นเซลล์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีขนาดเล็กมาก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1-10 ไมครอน มีผนังเซลล์ที่แข็งมีความหนา ประมาณ 15-100 นาโนเมตร เยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่คือขนส่ง เช่น ขนส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์ เป็นตัวรับมีเฉพาะไรโบโซม และสารพันธุกรรม (genetic material) มีแฟลกเจลลา (flagella) ใช้ในการเคลื่อนที่ ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างจากยูคาริโอตได้แก่ เซลล์ของแบคทีเรีย ริกเก็ตเซีย และสาหร่าย สีน้ำเงินแกมเขียว



รูปที่ 1 - 1 โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ นิวเคลียส ไซโทพลาซึมและส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ (Gammaco, 2019)

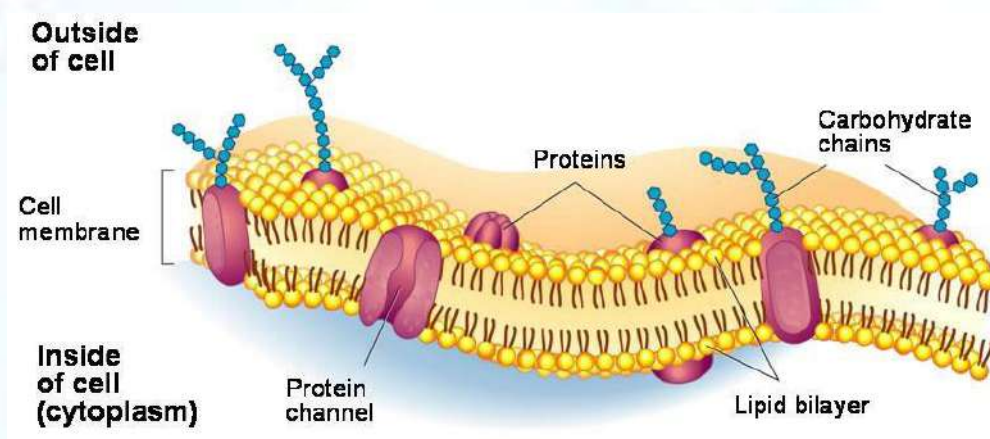
2. ยูคาริโอติก เซลล์ (eukaryotic cell) เป็นเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีนิวเคลียสที่แท้จริง มีออร์แกเนลล์ทั้งที่มีเยื่อหุ้มและไม่มีเยื่อหุ้ม มีสารพันธุกรรม ได้แก่ เซลล์ของ ยีสต์ รา โปรโตซัว พืช และสัตว์ต่าง ๆ

ส่วนประกอบของเซลล์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นส่วนที่อยู่ติดกับผนังเซลล์อาจมีลักษณะเรียบ หรือพับไปมา เพื่อขยายขนาดเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์เรียกว่า มีโซโซม (mesosome) หรือที่เรียกกันอีกอย่างว่า "เซลล์คัม"

มีหน้าที่ ควบคุม การเข้าออกของน้ำ สารอาหาร และอิออนโลหะต่าง ๆ เป็นตัวแสดงขอบเขตของเซลล์ เซลล์ทุกชนิดต้องมีเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) หรือบางครั้งเรียกว่า พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) เป็นเยื่อบาง ๆ ประกอบด้วยสารประกอบสองชนิด คือไขมันชนิดฟอสโฟลิพิด (phospholipid) กับ โปรตีน เยื่อหุ้มเซลล์จะประกอบไปด้วย ไขมัน เป็นส่วนใหญ่เรียงตัว 2 ชั้น โดยหันส่วนของฟอสเฟต หรือส่วนที่มีขั้ว (ชอบน้ำ) ออกด้านนอก และหันส่วนที่เป็นลิพิด หรือ ส่วนที่ไม่มีขั้ว(ไม่ชอบน้ำ) เข้าด้านใน โดยในชั้นฟอสโฟลิพิด (พวกไขมัน) จะมีโปรตีน (protein) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) แทรกอยู่ด้วย ลักษณะที่แสดงส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์นี้ต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจึงจะเห็นได้ (รูปที่ 1 - 2) เยื่อหุ้มเซลล์มีหน้าที่ห่อหุ้มส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ไว้ ทำให้แต่ละเซลล์แยกออกจากกัน และสามารถทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) ที่ยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกระหว่างเซลล์



รูปที่ 1 - 2 แสดงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (กระทรวงศึกษาธิการ, 2021)

2. ผนังเซลล์ (cell wall) คือ ชั้นที่ล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนโครงสร้าง ปกป้องเซลล์ และกลไกคัดกรองสาร เป็นส่วนที่อยู่ภายนอกสุดของเซลล์ พบได้เฉพาะในพืช สาหร่าย รา และแบคทีเรีย แต่ไม่พบในสัตว์ และโปรทิสต์ผนังเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันและเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เซลล์ ผนังเซลล์ของพืชจะมีรูไ่ว์แลกเปลี่ยนสารระหว่างเซลล์พืชสองเซลล์ เรียกว่า พลาสโมเดสมตา (plasmodesmata)

3. สารเคลือบเซลล์ (cell coat) เป็นสารที่เคลือบเยื่อหุ้มเซลล์ไว้อีกชั้นหนึ่ง ทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรง ลดการสูญเสียน้ำ และทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้ ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีสารเคลือบเซลล์ที่ต่างกันไปด้วย เช่น ในเซลล์สัตว์จะเป็นพวกไกลโคโปรตีน ในเห็ด-ราจะเป็นพวกไคติน (chitin) และในไดอะตอมจะเป็นพวกซิลิกา

ส่วนของโปรโทพลาสซึม (protoplasm) เป็นสารกึ่งของเหลวอยู่ภายในของเซลล์ทั้งหมด เป็นส่วนที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การเจริญและการดำรงชีวิตของเซลล์เราสามารถแบ่งโปรโทพลาสซึมออกเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และนิวเคลียส (nucleus)

1. ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) คือ เป็นส่วนที่เป็นของเหลวที่อยู่ภายในเซลล์ประกอบ ด้วยส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ หรือ ไซโตซอล (น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ แร่ธาตุ สารชีวโมเลกุล) และส่วนที่เป็นออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ซึ่งถือว่ามีชีวิตเพราะมีคุณสมบัติของสิ่งมีชีวิต

1.1 ไซโตซอล (cytosol) หรือของเหลวภายในเซลล์

1.1.1 น้ำ (H_2O) พบว่าประมาณร้อยละ 99 ของโมเลกุลทั้งหมดในเซลล์จะเป็นโมเลกุลของน้ำ โครงสร้างทางเคมีของน้ำประกอบด้วยธาตุไฮโดรเจน (H) 2 อะตอม และออกซิเจน (O) 1 อะตอม ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำมุมต่างกัน 104.5 องศา

1.1.2 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นสารประกอบที่พบในร่างกายซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเผาผลาญภายในเซลล์ เลือดจะเป็นตัวขนส่งเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากเซลล์ เพื่อนำไปกำจัดออกจากร่างกายที่ปอด โดยจะมีน้ำที่เป็นสารประกอบในเลือดมาเกี่ยวข้อง จึงเป็นกลไกสำคัญในการรักษาความเป็นกรดเป็นด่างของเลือดให้คงที่

1.1.3 ธาตุ (elements) ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด ธาตุที่พบได้ในเซลล์สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มธาตุหลักและกลุ่มธาตุรอง

1) กลุ่มธาตุหลัก (principal elements) เป็นกลุ่มของธาตุที่พบปริมาณมากในเซลล์ ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) แคลเซียม (Ca) และ ฟอสฟอรัส (P) เป็นต้น

2) กลุ่มธาตุรอง (trace elements) เป็นกลุ่มของธาตุที่พบใน เซลล์เป็นจำนวนไม่มากนัก แต่มีความสำคัญต่อกิจกรรมภายในเซลล์ ร่างกายขาดไม่ได้ถ้าขาดจะทำให้เกิดผลต่อการทำงานภายในเซลล์ ได้แก่ สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) ไอโอดีน (I) และ เหล็ก (Fe) เป็นต้น

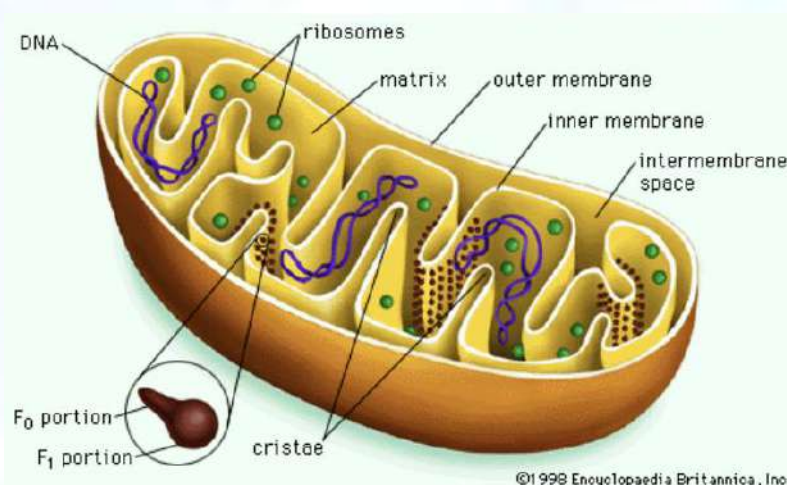
1.1.4 สารชีวโมเลกุล (biomolecule) สารชีวโมเลกุลเป็นสารประกอบที่มีขนาดใหญ่ (macromolecule) มีบทบาทหน้าที่หลายอย่างภายในเซลล์ สามารถจำแนก 4 กลุ่ม ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ลิพิด โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก

1.2 ออร์แกเนลล์ (organelles) เป็นองค์ประกอบที่ทำหน้าที่คล้ายอวัยวะของเซลล์ สามารถแบ่งออกได้เป็นสองชนิด ดังต่อไปนี้

1.2.1 ออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม (membrane bounded organelles) ได้แก่

1) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีรูปร่างกลมรีคล้ายรูปไข่ โครงสร้างของไมโทคอนเดรียจะมีเมมเบรนหุ้ม 2 ชั้น โดยชั้นนอกจะมีลักษณะเรียบ แต่ชั้นในจะพับทบไปมา

เข้าด้านใน เรียกว่า คริสตี (cristae) นอกจากนี้ภายในไมโทคอนเดรียมีของเหลวซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิด เรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) โดยหน้าที่ของไมโทคอนเดรียเปรียบว่าเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เพราะมีเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และยังมีการพบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) บนคริสตีของเยื่อหุ้มชั้นใน จำนวนของไมโทคอนเดรียจะมากในเซลล์ที่มีเมแทบอลิซึมสูง นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีดีเอ็นเอเป็นของตัวเองทำให้เพิ่มจำนวนและสังเคราะห์โปรตีนได้เองอีกด้วย การสังเคราะห์โปรตีนและการจำลองตัวของไมโทคอนเดรียระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอก เป็นส่วนที่แคบ เรียกว่า intermembrane space ภายในไมโทคอนเดรียสามารถพบดีเอ็นเอ ได้เช่นเดียวกับในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ โดย เรียกว่า mtDNA (ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย) เป็นดีเอ็นเอที่มาจากแม่โดยตรง ส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสนั้นจะเป็นที่ดีเอ็นเอที่รวมกันจากพ่อและแม่ นอกจากนี้ยังมี RNA (ribonucleic acid) เอนไซม์ และไรโบโซมอยู่ภายใน ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 1 - 3)



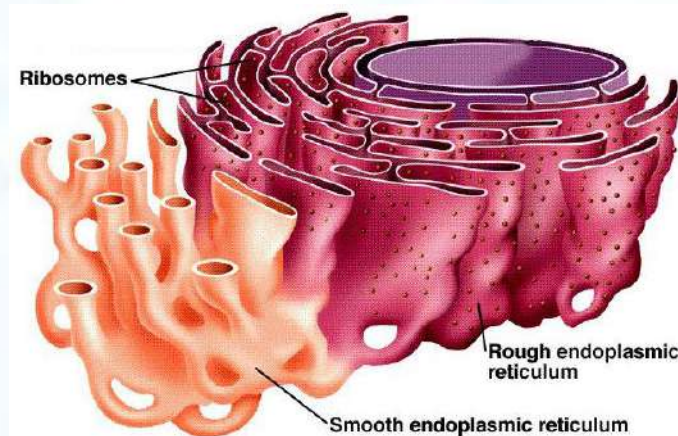
รูปที่ 1 - 3 แสดงโครงสร้างของ ไมโทคอนเดรีย (กระทรวงศึกษาธิการ, 2021)

2) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า ER เป็นออร์แกเนลล์ที่มีผนังบาง 2 ชั้น มีความหนาน้อยกว่าเยื่อหุ้มเซลล์โครงสร้างเป็นระบบท่อเชื่อมประสานกัน นอกจากนี้ส่วนของท่อยังติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียสและกอลจิบอดีอีกด้วย สามารถแบ่งเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมได้เป็น 2 ชนิด (รูปที่ 1 - 4) คือ

2.1) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดเรียบ (smooth endoplasmic reticulum) หรือ SER เป็นชนิดที่ไม่มีไรโบโซมเกาะ พบมากในเซลล์ที่มีหน้าที่กำจัดสารพิษ และสร้างสาร สเตอรอยด์ จึงพบได้ในเซลล์ที่ต่อมหมวกไต เซลล์คอร์ปัสลูเทียมในรังไข่ และในเซลล์ของตับ และยังทำหน้าที่ คือ ลำเลียงสารต่างๆ เช่น RNA ไขมัน โปรตีน เนื่องจากผนังของ ER ยอมให้สารประกอบโมเลกุลใหญ่บางชนิด รวมทั้ง

ไขมัน เอนไซม์ และโปรตีนผ่านเข้าออกได้ จึงเป็นทางผ่านของสาร และเกลือแร่เข้าไปกระจายทั่วเซลล์ รวมทั้งสารต่างๆ ยังอาจสะสมไว้ใน ER อีกด้วยและการขับของเสียออกจากเซลล์ โดยผ่านทาง ER เรียกว่า เอกโซไซโทซิส (exocytosis)

2.2) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดขรุขระ (rough endoplasmic reticulum) หรือ RER เป็นชนิดที่มีไรโบโซมมาเกาะ ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน



รูปที่ 1 - 4 แสดงโครงสร้าง เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (กระทรวงศึกษาธิการ, 2021)

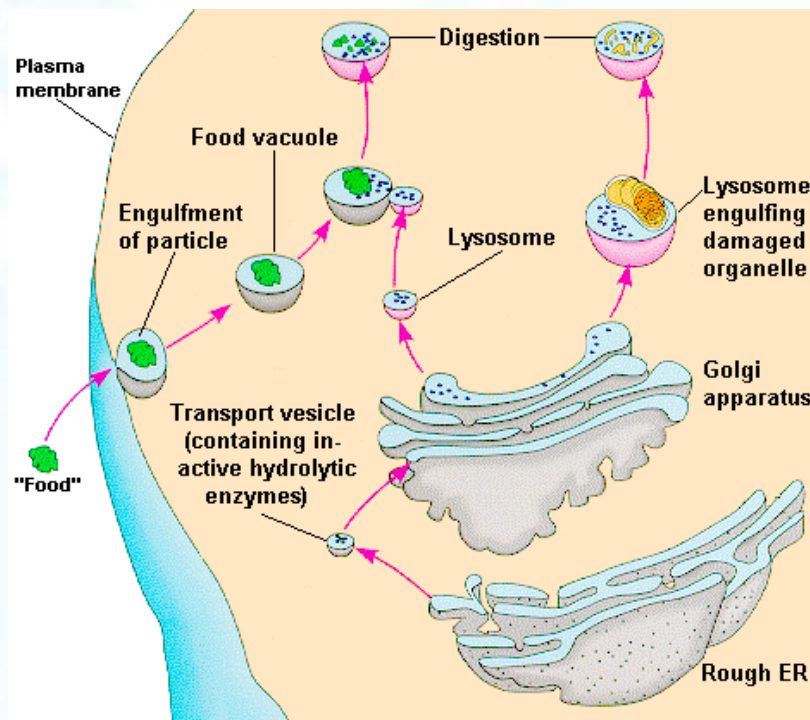
10

3) กอลจิบอดี (golgi body) หรือกอลจิคอมเพลกซ์ (golgi complex) หรือกอลจิแอฟ พาราตัส (golgi apparatus) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีลักษณะเป็นถุงแบน ๆ ซ้อนกันเป็นชั้น ทำหน้าที่เก็บสะสมสารที่เซลล์สร้างขึ้นก่อนจะปล่อยออกนอกเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นสารพวกโปรตีน นอกจากนี้กอลจิบอดียังทำหน้าที่ตัดแต่งโปรตีนให้มีสภาพที่เหมาะสมกับการใช้งานอีกด้วย (รูปที่ 1 - 5)



รูปที่ 1 - 5 แสดงโครงสร้าง กอลจิแอฟ พาราตัส (กระทรวงศึกษาธิการ, 2021)

4) ไลโซโซม (lysosome) เป็นออร์แกเนลล์ ที่มีเมมเบรนห่อหุ้ม เพียงชั้นเดียว ซึ่งไม่ยอมให้ เอนไซม์ต่าง ๆ ผ่านออก แต่เป็นเยื่อหุ้มที่สลายตัวหรือรั่วได้ง่าย เมื่อเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อหรือขณะที่มี การเจริญเติบโต เยื่อหุ้มนี้มีความทนทานต่อปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์ที่อยู่ภายในได้ เป็นออร์แกเนลล์ที่ พบเฉพาะในเซลล์สัตว์เท่านั้น ส่วนมากจะพบในเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytic cell) เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น นอกจากนี้ภายในไลโซโซมยังประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ในการย่อยสารต่าง ๆ เช่น ทางของลูกอ๊อด เชื้อโรค หรือเซลล์ที่ตายแล้ว เป็นต้น (รูปที่ 1 - 6)



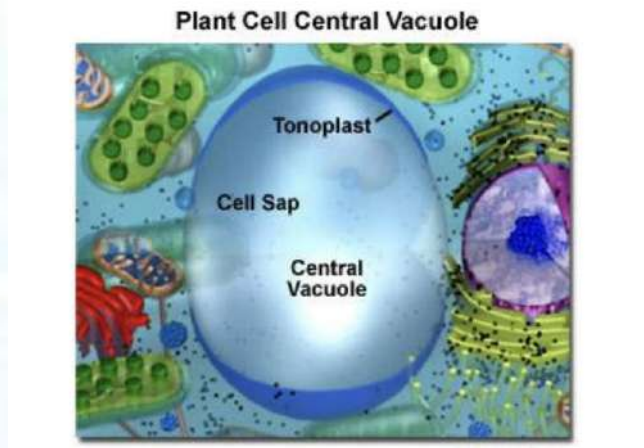
รูปที่ 1 - 6 แสดงโครงสร้าง ไลโซโซม (กุลนาถ, 2563)

5) แวกิวโอล (vacuole) เป็นช่อง ๆ ล้อมรอบด้วยเมมเบรนชนิดเยื่อชั้นเดียว อยู่ภายใน เซลล์ยูแคริโอต (eukaryotic cell) บางชนิด พบในเซลล์พืชส่วนใหญ่และสัตว์หลายชนิด โดยแวกิวโอลในสัตว์ ส่วนใหญ่เล็กกว่าในพืช (รูปที่ 1 - 7) แวกิวโอลสามารถทำหน้าที่เป็นที่เก็บ แหล่ง และถ่ายของเหลวภายใน เซลล์ สามารถแบ่งแวกิวโอลได้ 3 ชนิด ดังนี้

5.1) แซปแวกิวโอล (sap vacuole) พบเฉพาะในเซลล์พืชเท่านั้น ทำหน้าที่สะสมสีน้ำตาล กรดอะมิโนและผลึกสารพิษในเซลล์

5.2) ฟูดแวกิวโอล (food vacuole) พบในพวกโพรโทซัว เช่น อะมีบา นอกจากนี้ยัง พบใน เซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ฟาโกไซต์เมื่อเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ทำการกินแบบฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) จะเกิดการสร้างเป็นฟูดแวกิวโอลขึ้น

5.3) คอนแทรกไทล์แวคิวโอล (contractile vacuole) พบในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว พวกอะมีบาและพารามีเซียม ทำหน้าที่ขจัดน้ำส่วนเกินและของเสียออกจากเซลล์ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมสมดุลน้ำภายในเซลล์อีกด้วย



รูปที่ 1 - 7 แสดงโครงสร้างแวคิวโอล (กระทรวงศึกษาธิการ, 2021)

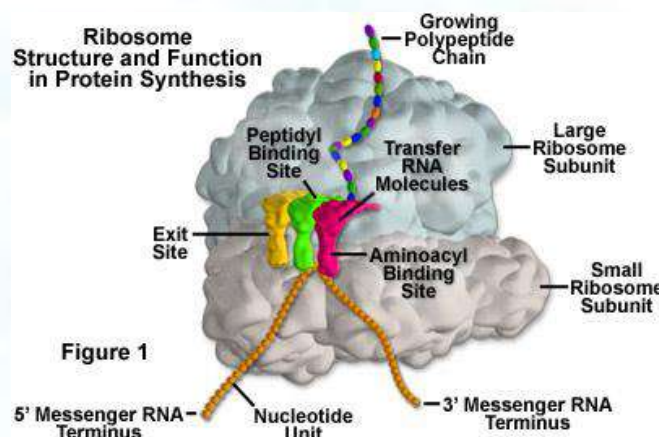
1.2.2 ออร์แกเนลล์ที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-membrane bounded organelles) ได้แก่

1) ไรโบโซม (ribosome)

โครงสร้างและหน้าที่ ไรโบโซมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยใหญ่ (60 S) และหน่วยเล็ก (40S) ซึ่งสร้างขึ้นจาก rRNA และ โปรตีน สร้างในนิวคลีโอลัส เป็นที่สร้างโปรตีน (รูปที่ 1 - 8) มี 2 ชนิด คือ

1.1) ไรโบโซมที่อยู่เป็นอิสระในไซโทพลาสซึม (ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่อยู่ในไซโทพลาสซึม)

1.2) ไรโบโซมที่ติดอยู่บนร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ทำหน้าที่สร้างโปรตีนและส่งโปรตีนออกไปยังนอกเซลล์)

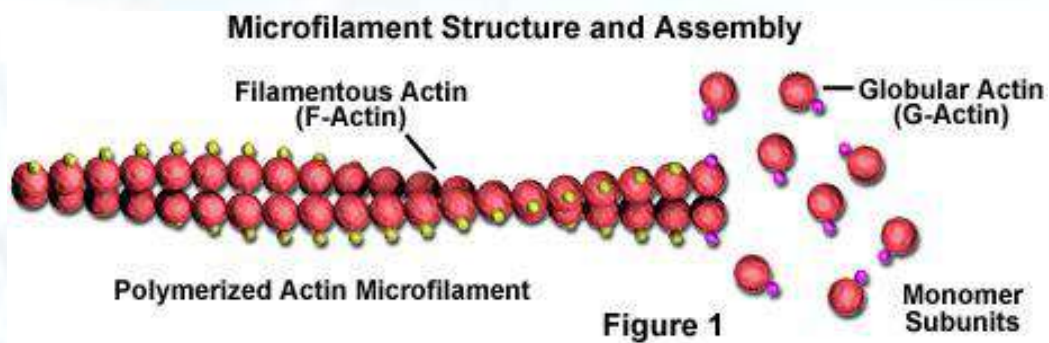


รูปที่ 1 - 8 แสดงโครงสร้างไรโบโซม (ณัฐพัฒน์, 2016)

2) โครงเซลล์ (cytoskeleton)

พบในโครงสร้างของเซลล์บางชนิด แบ่งเป็น 3 ชนิด มีหน้าที่ค้ำจุนโครงสร้างของเซลล์ และลำเลียงออร์แกเนลล์ให้เคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์

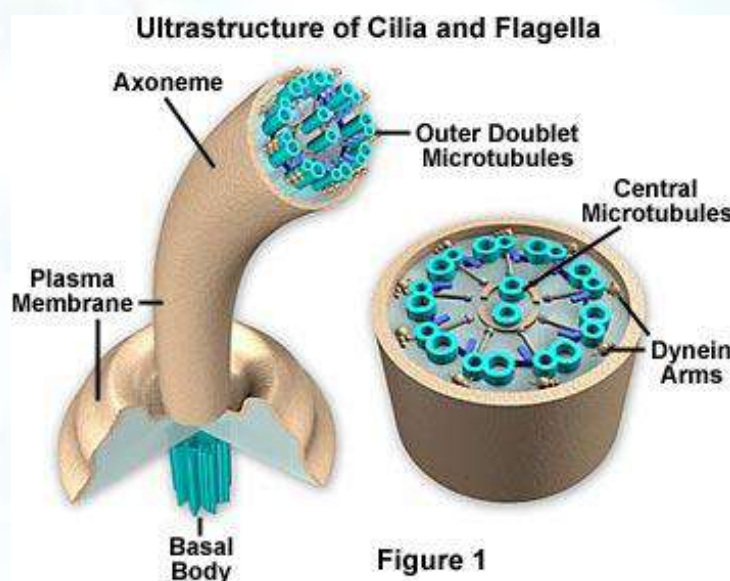
2.1) ไมโครฟิลาเมนต์ (microfilament) เกิดจากโปรตีนแอกติน ลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กบิดเป็นเกลียวๆ ช่วยในการเคลื่อนไหวของอะมีบาและเม็ดเลือดขาว เกิดเป็น pseudopodium (เท้าเทียม) ทำให้เกิดการไหลภายในของไซโทพลาสซึมของพืช (cyclosis) ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (รูปที่ 1 - 9)



รูปที่ 1 - 9 แสดงโครงสร้างไมโครฟิลาเมนต์ (ณัฐพัฒน์, 2016)

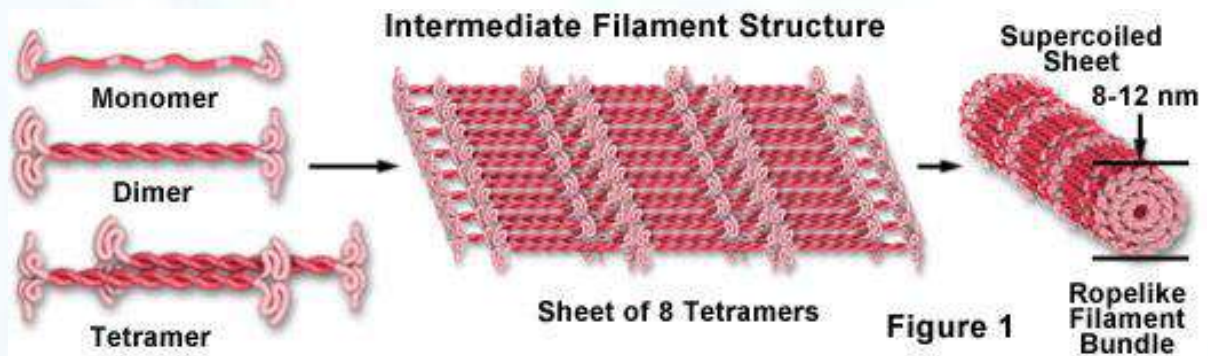
13

2.2) ไมโครทิวบูล (microtubule) เกิดจากโปรตีน ทิวบูลินมี 2 แบบ คือ 9+0 (centriole) ทำหน้าที่ เกี่ยวกับการแบ่งโครโมโซมและ 9+2 (cilia + flagellum) ทำหน้าที่ ยึดเซลล์ให้คงที่ ช่วยในการเคลื่อนไหว (รูปที่ 1 - 10)



รูปที่ 1 - 10 แสดงโครงสร้างไมโครทิวบูล แบบ 9+2 (นราวิชญ์, 2558)

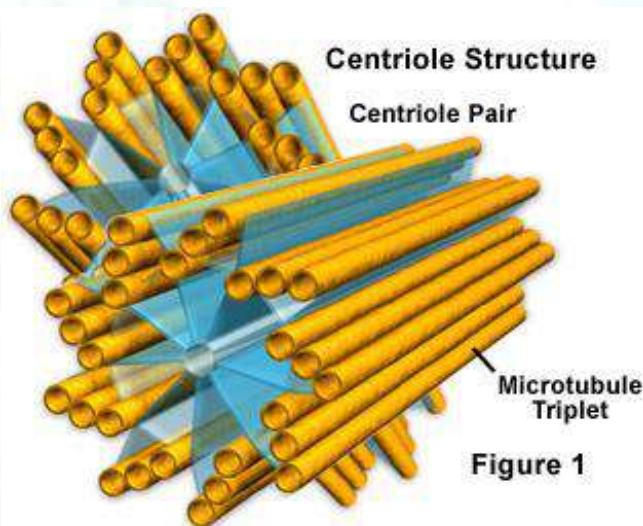
2.3) อินเทอร์มีเดียฟิลาเมนต์ (intermediate filament) เกิดจากโปรตีน เคอราติน เป็นแค่เส้นใยขนาดเล็ก เรียงตัวเป็นร่างแหตามลักษณะของเซลล์ ทำให้ออร์แกเนลล์ต่างๆอยู่คงที่พบที่ ผิวหนัง เล็บ ขน (รูปที่ 1 - 11)



รูปที่ 1 - 11 แสดงโครงสร้างอินเทอร์มีเดียฟิลาเมนต์ (ณัฐพัฒน์, 2016)

3) เซนทริโอ (centriole)

พบเฉพาะในสัตว์และสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวทำหน้าที่ ช่วยในการแบ่งเซลล์ โดยการปล่อยเส้นใยออกมาในการแบ่งเซลล์ ทำให้โครโมโซมแยกออกจากกัน โครงสร้างประกอบไปด้วย ไมโครทิวบูลเรียงตัวกันเป็น 3 หลอด จำนวน 9 กลุ่ม ตรงกลางกลวงๆ เลยเรียก โครงสร้างแบบ 9+0 และในการแบ่งเซลล์ทุกออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเส้นใยสปินเดอร์ คือ เซนโทโซม เกิดจากการนำ เซนทริโอสองอันมารวมกัน (รูปที่ 1 - 12)

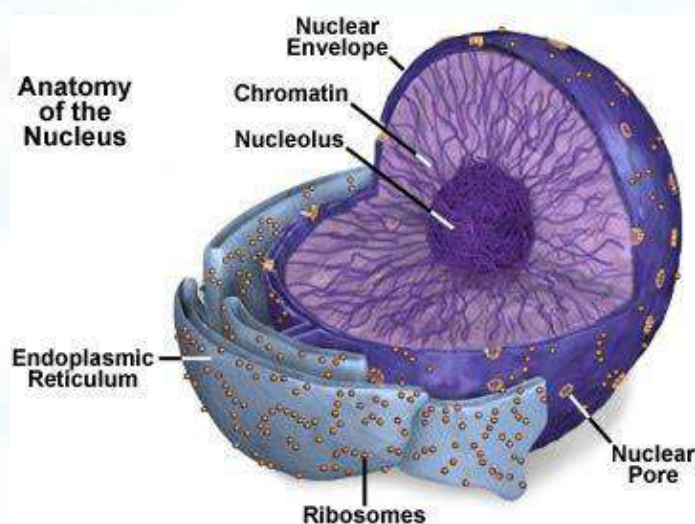


รูปที่ 1 - 12 แสดงโครงสร้างเซนทริโอ (ณัฐพัฒน์, 2016)

2. นิวเคลียส (nucleus) นิวเคลียสเป็นแหล่งสะสมพลังงานของเซลล์ทั้งหมด นิวเคลียสสามารถควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ได้ทั้งหมด โดยการทำงานของนิวเคลียสจะมีความสัมพันธ์กับออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เป็นส่วนที่อยู่ในสุดของเซลล์ เป็นออร์แกเนลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เซลล์ปกติจะมีนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ รูปร่างกลมหรือรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมครอน และมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ 1-13) ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

2.1 เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) มีลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ สองชั้นล้อมรอบ บนเยื่อดังกล่าวมีรูเล็ก ๆ ที่กระจายอยู่ทั่วไป เพื่อใช้เป็นที่แลกเปลี่ยนสารระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาซึม มีสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน เยื่อชั้นนอกมีไรโบโซมเกาะติดอยู่ โดยทั่วไปเซลล์จะมีนิวเคลียส 1 อัน ยกเว้นเซลล์ของกล้ามเนื้อลาย หรือสัตว์ชั้นต่ำ เช่น พารามีเซียม จะมีนิวเคลียสหลายอัน เซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่มีนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะต่อกับเยื่อหุ้มของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม กอลจิบอดี และไมโทคอนเดรีย ภายในชั้นของเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นใน จะมีนิวเคลียร์ลามินา (nuclear lamina) เป็นโครงสร้างของอินเตอร์มีเดียทฟิลาเมนต์ (intermediate filament) ที่สานกันเป็นร่างแหทำหน้าที่ คำจุนรักษารูปร่างของนิวเคลียสไว้

2.2 นิวคลีโอลัส (nucleolus) เป็นสารที่มีลักษณะคล้ายวุ้น เป็นกลุ่มของเส้นใยที่ขดเป็นก้อนกลมฝังตัวอยู่ในเนื้อนิวเคลียส มีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่มีเยื่อหุ้ม จำนวนและขนาดแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ภายในประกอบไปด้วย RNA และโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ RNA ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว นิวคลีโอลัสจะหายไป เซลล์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนจะมีนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่ โดยทั่วไปจะพบนิวคลีโอลัสอยู่ใกล้เยื่อหุ้มนิวเคลียส



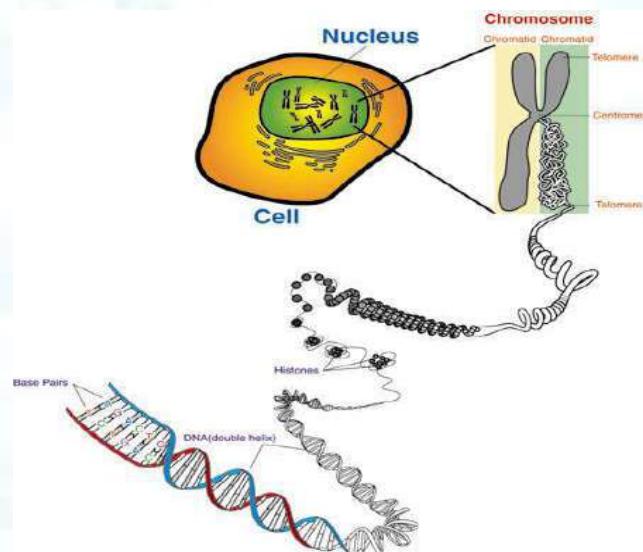
รูปที่ 1 - 13 แสดงโครงสร้างของ นิวเคลียส (กุลนาถ, 2564)

2.3 โครมาติน (chromatin) เป็นเส้นใยเล็กๆ พันเกี่ยวเป็นร่างแห แต่ละเส้นใยจะประกอบด้วยโปรตีนและสารพันธุกรรม เป็นกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid หรือ DNA) เป็นองค์ประกอบเมื่อมีการแบ่งเซลล์ โครมาตินจะขดตัวโดยการบิดเป็นเกลียวสั้นลงและหนาขึ้น มองเห็นได้

ชุดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เรียกว่า โครโมโซม (chromosome) ซึ่งมีแขน 2 แขน แต่ละแขนเรียกว่า โครมาติด (chromatid) โครมาติดประกอบไปด้วย สายดีเอ็นเอ (DNA) เกลียวคู่รวมกับโปรตีนฮิสโตนเป็นส่วนใหญ่ และโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนฮิสโตน บนสายดีเอ็นเอจะเป็นที่อยู่ของยีน ซึ่งยีนจะเป็นตัวกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตที่จะเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

จีโนม (genome)

คำว่า จีโนม (genome) มาจากคำว่า gene รวมกับคำว่า chromosome เริ่มใช้ครั้งแรกโดย ฮานส์ วินเคเลอร์ (Hans Winkler) นักพฤกษศาสตร์ ชาวเยอรมัน ในปี ค.ศ. 1920 หมายถึง ยีนทั้งหมดที่มีอยู่ในโครโมโซม 1 ชุด (haploid) ปัจจุบัน คำว่า จีโนม มีความหมายขยายออกจากเดิมที่มีความหมาย คือ สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยที่ดีเอ็นเอของสัตว์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามแหล่งที่พบ คือ จีโนมที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear genome) และจีโนมที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome) สารพันธุกรรม 1 จีโนม หมายถึง สารพันธุกรรมทั้งหมดของเซลล์ที่อยู่ในสภาพ แฮพลอยด์ (haploid) ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะอยู่ในสภาพ ดิพลอยด์ (diploid) โดยแต่ละเซลล์ ประกอบด้วยโครโมโซมจำนวน 2 ชุด ($2n$) ซึ่งหนึ่งชุดได้รับมาจากพ่อ และอีกชุดหนึ่งได้รับมาจากแม่ เป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรมของลูก ในขณะที่เซลล์สืบพันธุ์ (gamete cell) นั้น มีจำนวนโครโมโซมเพียง 1 ชุด ($1n$) อยู่ในสภาพแฮพลอยด์ ดังนั้นเซลล์สืบพันธุ์ 1 เซลล์ จึงมีสารพันธุกรรมเท่ากับ 1 ชุดของจีโนม ขนาดจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกัน โดยมีหน่วยวัดเป็นจำนวนคู่เบส (base pairs, bp) กิโลเบส (kilobase pairs, kb) เมกะเบส (mega base pairs, Mb) หรือ กิกะเบส (giga base pairs, Gb) เมื่อ $1 \text{ kb} = 1,000 \text{ bp}$; $1 \text{ Mb} = 1,000 \text{ kb} = 1,000,000 \text{ bp}$ และ $1 \text{ Gb} = 1,000 \text{ Mb} = 1,000,000 \text{ kb} = 1,000,000,000 \text{ bp}$ ตามลำดับ



รูปที่ 1 - 14 แสดงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ ที่พบอยู่ในนิวเคลียส (กุลนาถ, 2563)

จีโนมยูนิตดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง DNA มีอยู่ในส่วนของนิวเคลียสภายในเซลล์ มีโครงสร้างเป็น 2 สาย ไขว้กันเป็นเกลียว แต่ละสายประกอบด้วยน้ำตาลและเบส 4 ชนิดคือ A, T, G และ C จับคู่กัน เรียกว่าคู่เบส เรียงต่อกันไปเป็นเส้นยาว เส้นของ DNA โดยมากจะปะปนอยู่กับโปรตีนบางชนิด ขดตัวรวมกันอยู่เรียกว่า โครโมโซม (ดังรูปที่ 1 - 14) ในแต่ละเซลล์ของมนุษย์มีโครโมโซมอยู่ 23 คู่ (46 แท่ง) ซึ่งชุดของ DNA ทั้งหมดนี้เรียกกันว่า จีโนม (จะประกอบด้วยคู่เบสประมาณ 3.1 พันล้านคู่เบส)

การศึกษาจีโนมส่วนมากศึกษาการหาลำดับคู่เบสในสาย DNA ทั้งหมด (genome sequencing) ซึ่งส่วนใหญ่กระทำในสิ่งมีชีวิตคือมนุษย์ จีโนมมนุษย์ประกอบด้วยคู่เบสประมาณ 3 พันล้านคู่ และมียีนประมาณ 60,000 – 70,000 ยีนบนโครโมโซมทั้งหมด จีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น หนู มีจีโนมขนาดเล็กกว่ามนุษย์เล็กน้อยขนาดของจีโนมประมาณ 3 พันล้านคู่เบส บรรจุอยู่ในโครโมโซม 20 คู่ แมลงหวี่ *Drosophila* มีจีโนมขนาดประมาณ 160 ล้านคู่เบส และมีโครโมโซม 4 คู่ หนอนตัวกลม *C. elegans* มีจีโนมขนาดประมาณ 100 ล้านคู่เบส ยีสต์ *S. cerevisiae* มีจีโนมขนาดประมาณ 12.5 ล้านคู่เบส แบคทีเรีย *E. coli* มีโครโมโซมเดี่ยว และมีจีโนมขนาดเล็กเพียง 5 ล้านคู่เบส

การถอดลำดับจีโนม มีกรรมวิธีที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

1. หากการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) ทำโดยตัดเส้น DNA เป็นชิ้น ๆ แล้วป้อนเข้าไปให้เครื่องอ่านอัตโนมัติอ่านเหมือนกับการแกะตัวอักษรทีละตัว
2. ประกอบเข้าด้วยกันใหม่ (assembly) นำตัวอักษรที่แกะแล้วในแต่ละชิ้นของเส้น DNA มาประกอบเรียงกันใหม่จนกระทั่งได้ลำดับคู่เบสของ DNA ทั้งหมด
3. ระบุตำแหน่งของยีน (annotation) เมื่อทราบการเรียงลำดับของ DNA ทั้งหมดแล้ว จึงค้นหาตำแหน่งของยีน ซึ่งมีอยู่เพียงประมาณ 3% ในข้อมูลจีโนมทั้งหมด ทั้งนี้อาจทำโดยการค้นหา รหัสংশชี้การเริ่มต้นและสิ้นสุดของยีน หรือโดยการเปรียบเทียบกับยีนที่รู้จักแล้ว

การศึกษาจีโนมของสัตว์

การศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิต เรียกว่าจีโนมิกส์ (genomics) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารพันธุกรรม (structural genomics) ได้แก่
 - 1.1 การศึกษาแผนที่จีโนม (genome mapping) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่งที่ตั้งของยีนบนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ
 - 1) แผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) เป็นการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลในประชากรกลุ่มเป้าหมาย ซึ่งบางครั้งเรียกว่า linkage mapping แผนที่ทางกายภาพ (physical mapping) เป็นการระบุตำแหน่งที่ตั้งยีนบนโครโมโซม โดยอาศัยวิธีการต่าง ๆ เช่น in situ hybridization, somatic cell hybrid panel, radiation hybrid mapping รวมถึงการถอดรหัสพันธุกรรม

แบบ whole genome sequencing ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาในสัตว์เลี้ยงชนิดต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น ไก่ สุกร โค แพะ แกะ และสัตว์น้ำอีกหลายชนิด

2) แผนที่ยีนเชิงเปรียบเทียบ (comparative mapping) เป็นการสร้างแผนที่ยีน โดยอาศัยการเปรียบเทียบข้อมูลการเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดที่มีข้อมูลรายละเอียด เพื่อใช้ทำนายการเรียงตัวของยีนในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ที่ยังไม่มีข้อมูลรายละเอียด เช่นการศึกษาแผนที่ยีนของสุกรโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลการเรียงตัวของยีนในมนุษย์

1.2 การถอดรหัสพันธุกรรม (genome sequencing) เป็นการศึกษาการตรวจหาลำดับเบสทั้งหมดของดีเอ็นเอที่ได้มาทั้งจีโนม

2. การศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของจีโนม (functional genomics)

2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression) หรือ (transcriptomics) เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเป้าหมาย เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกยีนภายใต้สภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกันหรือมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

2.2 การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์ (proteomics) เป็นการศึกษาโปรตีนทุกชนิดที่เป็นผลผลิตของยีนทั้งหมด โดยศึกษาโครงสร้างการทำงานบริเวณและภาวะที่พบโปรตีนเหล่านั้นรวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในวิธีการสร้างและสลายสารเคมีภายในเซลล์ ซึ่งใช้เทคนิคจำเพาะต่อการแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน จากนั้นเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน ซึ่งทำให้ทราบชนิดของโปรตีนที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ในปัจจุบันโปรตีโอมิกส์มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการศึกษาปฏิกิริยาการจับกันของยาหรือสารเคมีและโปรตีนเป้าหมาย

2.3 การศึกษาทางด้านเมแทบอลิโอมิกส์ (metabolomics) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของสารเคมี ในเซลล์ในขณะใดขณะหนึ่งว่ามีวิถีและกลไกที่สัมพันธ์กันอย่างไร ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้จำลองระบบเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยอาศัยคอมพิวเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อทำนายผลกระทบและพฤติกรรมของเซลล์ภายใต้เวลาและภาวะแวดล้อมหนึ่ง ๆ

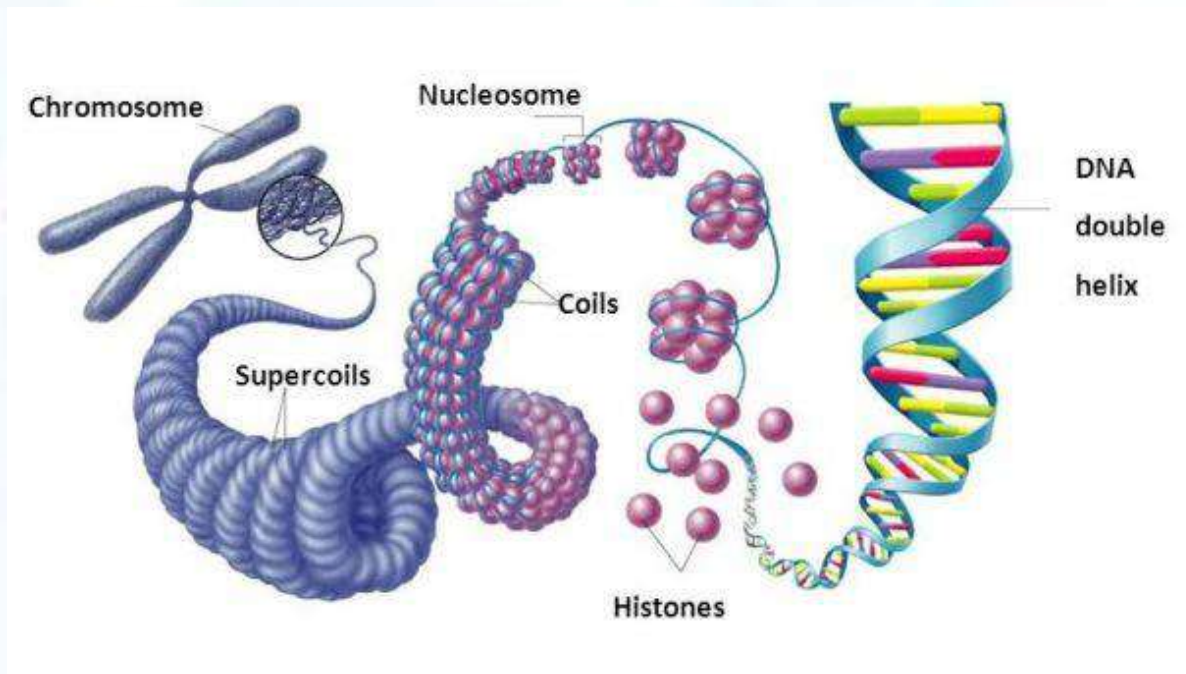
2.4 การศึกษาทางด้านโภชนพันธุศาสตร์ (nutrigenomics) เป็นการศึกษาโภชนะในเชิงพันธุศาสตร์ เพื่อศึกษาปัจจัยของสารอาหารที่มีผลต่อการทำงานของยีน ในขณะที่การศึกษาทางนิวทริจีเนติกส์ (nutrigenetics) เป็นการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของสารอาหาร

2.5 การศึกษาทางด้านอีพิจีโนมิกส์ (epigenomics) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของกระบวนการเติมหมู่ methyl บนลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA methylation) ที่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิต

2.6 การศึกษาทางด้านไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุล RNA ขนาดเล็กที่ควบคุมการแสดงออกของ mRNA โดยการขัดขวางการแปลรหัสพันธุกรรมไปเป็นโปรตีน ซึ่งส่งผลกระทบต่อความผันแปรลักษณะปรากฏของสิ่งมีชีวิต

โครโมโซม (chromosome)

สิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต (eukaryote) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์เป็นจำนวนมาก ภายในนิวเคลียสของเซลล์แต่ละเซลล์มีสารพันธุกรรมซึ่งทำหน้าที่ควบคุมลักษณะพันธุกรรมที่แสดงออกและถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรม สารพันธุกรรมในระดับโมเลกุล คือ ดีเอ็นเอ ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยบางและยาว โดยปกติดีเอ็นเอจะขดตัวร่วมกับโปรตีนเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า โครมาติน (chromatin) และเมื่อเซลล์เข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์ โครมาตินจะขดตัวมากขึ้นจึงมีความหนาแน่นมากขึ้นและความยาวสั้นลงเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า โครโมโซม (chromosome) (รูปที่ 1 - 15)



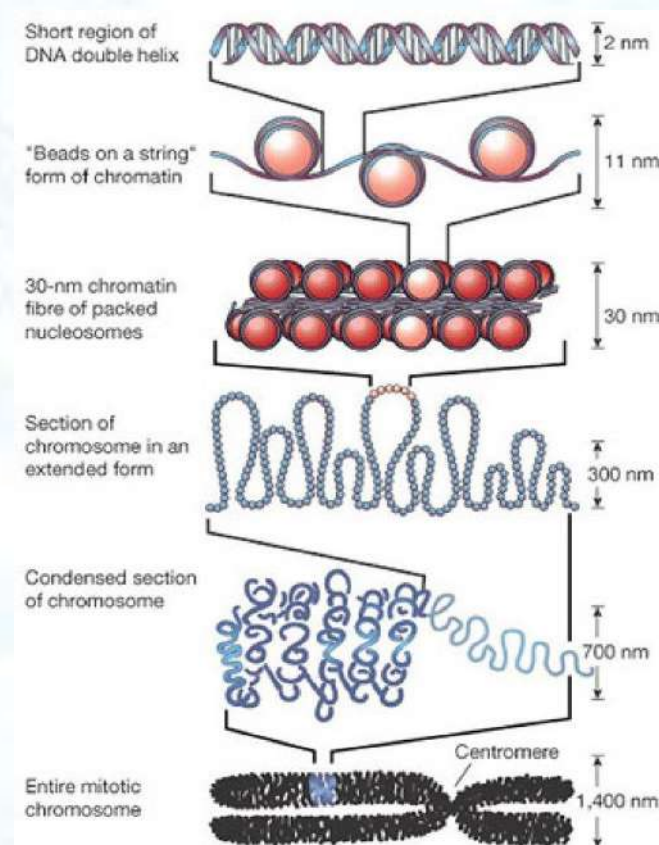
รูปที่ 1 - 15 แสดงรูปร่างและส่วนประกอบของโครโมโซม (คัดค้านัฐ, 2019)

ส่วนประกอบของโครโมโซม

โครโมโซม ประกอบด้วยดีเอ็นเอและโปรตีน โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของโครโมโซม คือ โปรตีนฮิสโตน (histone protein) ซึ่งมีอยู่ 5 ชนิด คือ H1, H2A, H2B, H3 และ H4 ลักษณะการขดตัวของดีเอ็นเอและโปรตีนจนกระทั่งเป็นโครโมโซมเริ่มจากดีเอ็นเอซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นาโนเมตร พันรอบออกทามาเมอร์ (octamer) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนฮิสโตน 4 ชนิด คือ H2A, H2B, H3 และ H4 โดยมีชนิดละ 2 โมเลกุล รวมเป็น 8 โมเลกุล สายดีเอ็นเอที่พันรอบออกทามาเมอร์จะประกอบกับโปรตีนฮิสโตน

ชนิด H1 เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า นิวคลีโอโซม (nucleosome) ดีเอ็นเอ 1 โมเลกุล จะพันกับโปรตีนฮิสโตนเกิดเป็นนิวคลีโอโซมจำนวนมากเรียงต่อกันคล้ายกับสายลูกปัดทำให้เกิดเป็นสายที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากขึ้นเป็น 11 นาโนเมตร

สายดีเอ็นเอและโปรตีนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 นาโนเมตร จะขดตัวแบบซิกแซก (zigzag) เกิดเป็นเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร แล้วจึงขดและพันตัวร่วมกับโปรตีน สคอฟโฟลด์ (scaffold protein) เกิดเป็นเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มมากขึ้นเป็น 300 นาโนเมตร เรียกว่า โครมาทิน (chromatin) โดยโครงสร้างนี้จะพบในเซลล์ระยะอินเทอร์เฟส (interphase) หากเซลล์ไม่ได้แบ่งตัว สารพันธุกรรมในนิวเคลียสก็จะอยู่ในรูปของโครมาทินนี้โดยไม่ขดตัวเป็นโครโมโซม จนกว่าจะเริ่มเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์ เมื่อเซลล์นั้นเกิดการแบ่งเซลล์ โครมาทิน 1 โครมาทิน ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 นาโนเมตร จะขดตัวจนมีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มมากขึ้นเป็น 700 นาโนเมตร ซึ่งเรียกว่า โครโมโซม พบได้ในระยะเมทาเฟส (metaphase) ของการแบ่งเซลล์ อย่างไรก็ตาม โครโมโซมที่พบในระยะเมทาเฟสนั้นประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 โมเลกุล หรือ โครมาทิน 2 โครมาทิน จึงทำให้โครโมโซมมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 1,400 นาโนเมตร (รูปที่ 1 - 16)

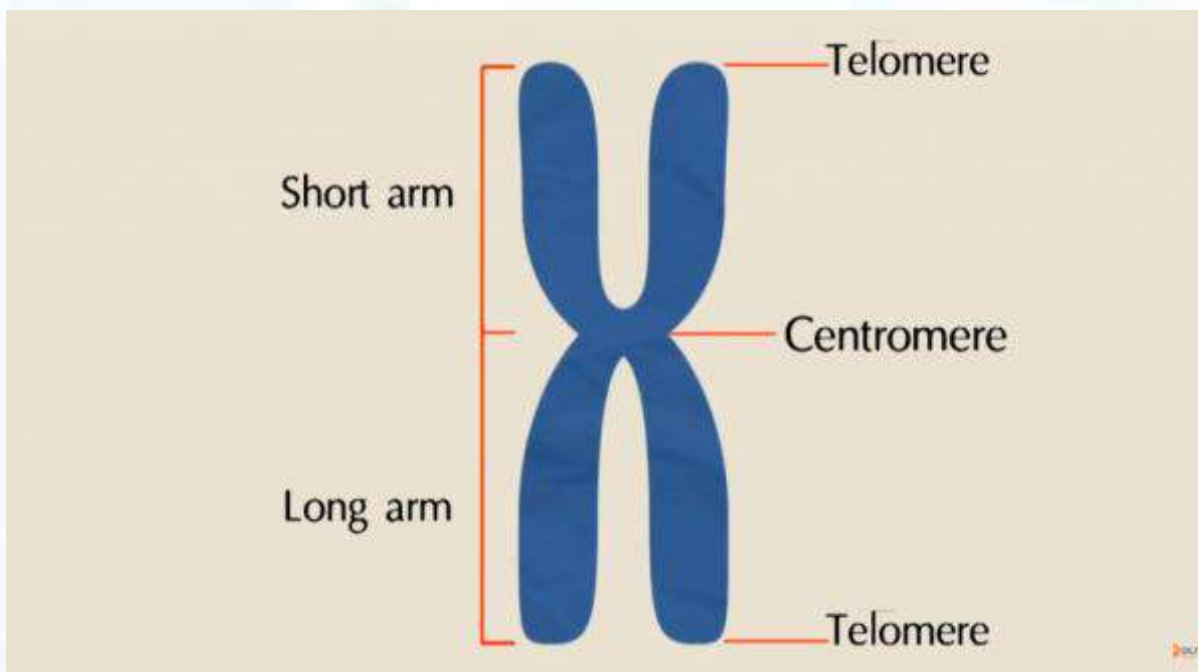


รูปที่ 1 - 16 การจัดเรียงตัวของโครมาทินระดับต่าง ๆ (อนุรุทธิ์, 2560)

รูปร่าง ลักษณะ และจำนวนโครโมโซม

เมื่อเซลล์กำลังเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์ จะมีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ตั้งแต่ช่วงต้นของระยะอินเทอร์เฟส จึงทำให้ช่วงปลายของระยะอินเทอร์เฟส ดีเอ็นเอแต่ละโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็น 2 โมเลกุลหรือทำให้แต่ละโครมาทิดเพิ่มขึ้นเป็น 2 โครมาทิด โดยที่ดีเอ็นเอทั้ง 2 โมเลกุลหรือโครมาทิดทั้ง 2 โครมาทิด ยังยึดติดกันอยู่ที่ตำแหน่งที่เรียกว่าเซนโทรเมียร์ (centromere) เมื่อกระบวนการแบ่งเซลล์ดำเนินไปถึงระยะเมทาเฟส ดีเอ็นเอจะขดตัวตั้งที่กล่าวมาข้างต้นจนกระทั่งเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า โครโมโซม ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 โมเลกุล หรือโครมาทิด 2 โครมาทิด โดยในระยะเมทาเฟสนี้จะเรียกแต่ละโครมาทิดของโครโมโซมว่า ซิสเทอร์โครมาทิด (sister chromatid) หรืออาจเรียกสั้น ๆ ว่า โครมาทิด ดังนั้น แต่ละโครโมโซมจึงประกอบด้วย 2 ซิสเทอร์โครมาทิด

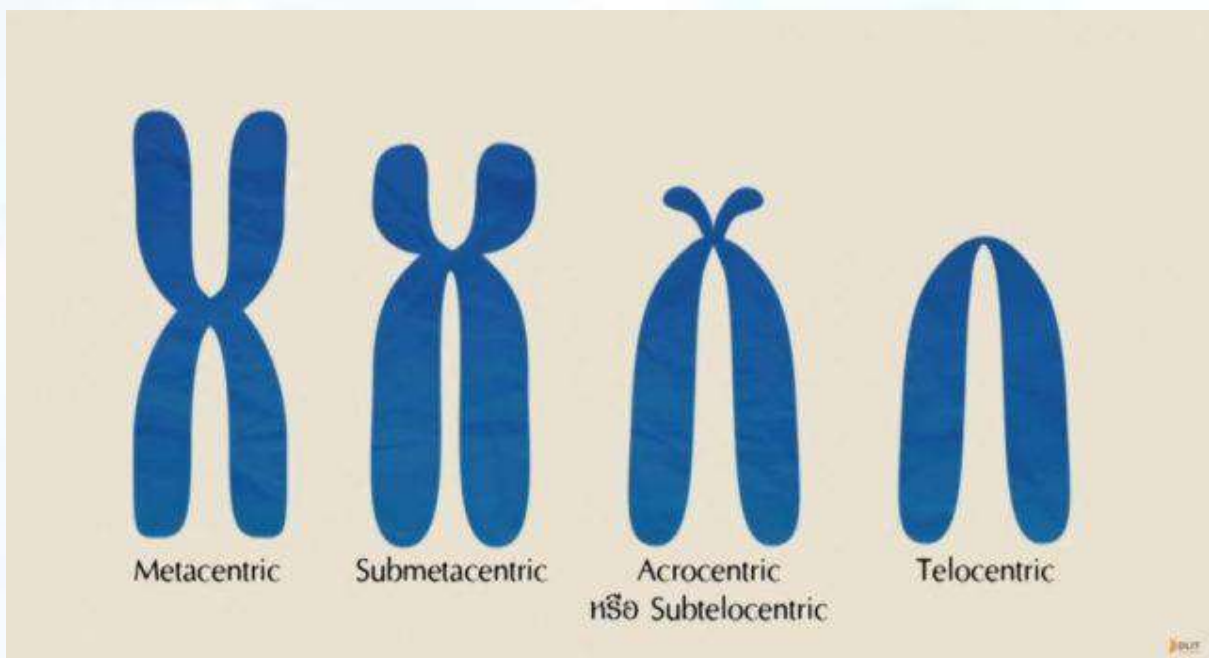
โครโมโซมมีโครงสร้างที่สำคัญประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ เซนโทรเมียร์ (centromere) แขนของโครโมโซม (chromosome arm) และส่วนปลายของโครโมโซม (telomere) การจำแนกโครโมโซมสามารถจำแนกได้ตามขนาดของโครโมโซมและตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ เซนโทรเมียร์ เป็นบริเวณที่ซิสเทอร์โครมาทิดทั้งสองเชื่อมติดกัน เห็นเป็นรอยคอดเข้า และเป็นตำแหน่งที่แบ่งแขนของโครโมโซมออกเป็น 2 ส่วน คือ แขนข้างสั้น (short arm) และแขนข้างยาว (long arm) โดยแขนของโครโมโซมจะเป็นตำแหน่งที่อยู่ของยีนต่าง ๆ ในขณะที่ส่วนปลายของโครโมโซมทำหน้าที่ช่วยป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลาย (รูปที่ 1 - 17)



รูปที่ 1 - 17 ส่วนประกอบสำคัญของโครโมโซมคือ เซนโทรเมียร์ แขน และส่วนปลายของโครโมโซม

(คัตคณัฐ, 2019)

รูปร่างของโครโมโซมสามารถจำแนกโดยอาศัยชนิดและตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ ได้เป็น 4 ชนิด คือ หากเซนโทรเมียร์อยู่กึ่งกลางโครโมโซมจะทำให้แขนของ โครโมโซมทั้ง 2 ข้าง ยาวเท่ากัน จัดเป็นโครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก (metacentric chromosome) หรือหากเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนข้างใกล้ด้านใดด้านหนึ่ง ทำให้เกิดเป็น แขนข้างสั้นและแขนข้างยาว จัดเป็น โครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) หากเซนโทรเมียร์อยู่เกือบปลายสุดของโครโมโซม จะทำให้แขนข้างที่สั้นมีขนาดสั้นมาก และแขนข้างยาวมีความยาวมากกว่าแขนข้างที่สั้นมาก จัดเป็นโครโมโซมแบบอะโครเซนทริก (acrocentric chromosome) หรือ ซับเทโลเซนทริก (subtelocentric chromosome) และหากเซนโทรเมียร์อยู่ปลายสุดของโครโมโซม จะทำให้โครโมโซมมีแขนข้างยาวเพียงอย่างเดียว จัดเป็นโครโมโซมแบบเทโลเซนทริก (telocentric chromosome) (รูปที่ 1 - 18)



รูปที่ 1 - 18 แสดงตำแหน่งของ เซนโทรเมียร์ เป็นผลทำให้โครโมโซมมีรูปร่างที่แตกต่างกัน
(คัตคณัฐ, 2019)

เมื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ พบว่า สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม มีสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันอาจมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน เช่น สุนัขและแมว ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 38 โครโมโซมเท่ากัน แต่เมื่อศึกษาขนาดและรูปร่างของ โครโมโซมแล้วจะพบว่า โครโมโซมของสุนัขและแมว มีขนาดและรูปร่างต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาโครโมโซมจึงต้องศึกษาทั้งจำนวน ขนาด และรูปร่างของโครโมโซม (รูปที่ 1 - 19)

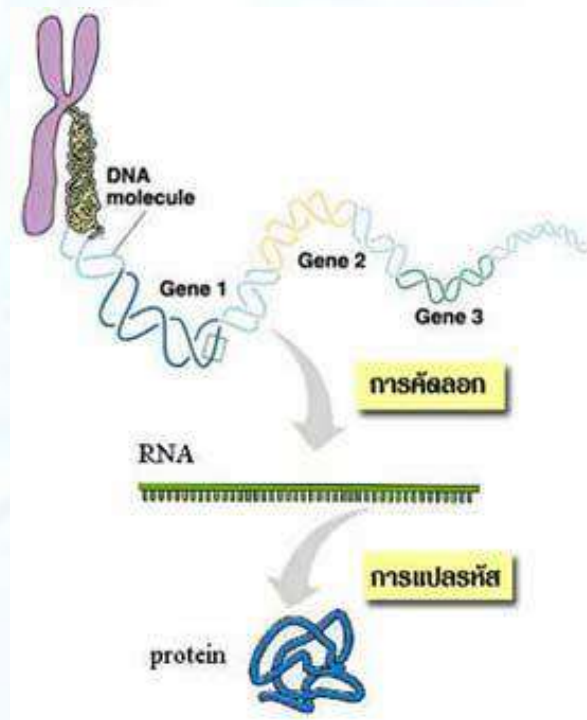
Chromosome number of domestic animals		
ANIMAL	CHROMOSOME NUMBER (2N)	
Cattle	60	
River buffalo	50	
Swamp buffalo	48	
Horse	64	
Donkey	62	
Swine	38	
Cat	38	
Dog	78	
Fowl	78	
Goat	60	
Sheep	54	
Camel	74	

รูปที่ 1 - 19 จำนวนโครโมโซมของสัตว์เลี้ยงชนิดต่าง ๆ (Veterinary science hub, 2018)

ยีน (gene)

ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจะมีหน่วยควบคุมลักษณะ (genetic unit) ควบคุมสิ่งมีชีวิตให้มี รูปร่างและลักษณะเป็นไปตามเผ่าพันธุ์ของพ่อแม่ เรียกว่า ยีน (gene) ดังนั้น ยีนจึงทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายทอด ลักษณะต่างๆ จากบรรพบุรุษไปสู่รุ่นหลาน ลักษณะต่างๆ ที่ถ่ายทอดไปนั้นพบว่าบางลักษณะไม่ปรากฏในรุ่นลูก แต่อาจจะปรากฏในรุ่นหลานก็ได้ จึงมีผลทำให้เกิดความแตกต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรมจนมีผลทำให้ สิ่งมีชีวิตเกิดความหลากหลาย แต่การสะสมลักษณะทางพันธุกรรมจำนวนมากทำให้เกิดสปีชีส์ต่าง ๆ และสามารถ ดำรงเผ่าพันธุ์ไว้ได้จนถึงปัจจุบัน

ยีน คือ ส่วนหนึ่งของโครโมโซม (chromosome segment) ที่ถอดรหัส (encode) ได้เป็นสายพอลิเพปไทด์หนึ่งสายที่ทำงานได้ (single functional polypeptide) หรือได้เป็นอาร์เอ็นเอ (mRNA) ยีน ประกอบด้วยส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอได้ เรียกว่า exon และ บริเวณที่ไม่สามารถถอดรหัสได้ เรียกว่า intron เป็นหน่วยที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ที่ถ่ายทอดจากพ่อ แม่ ไปสู่ลูกหลานที่ปรากฏอยู่บนโครโมโซม (chromosome) โดยทำหน้าที่กำหนดลักษณะ ทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวนยีนแตกต่างกัน ยีนสามารถเป็นได้ทั้งดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอก็ได้ (รูปที่ 1 - 20) แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้นจะเป็นดีเอ็นเอ (DNA) หมดเพราะเสถียรมากเหมาะแก่การเก็บข้อมูล ขณะที่อาร์เอ็นเอจะพบในพวกไวรัส (virus) ยีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์จะรวมอยู่ในส่วนที่เรียกว่า จีโนม (genome) และโครงสร้างของจีโนม (genome structure) ในพวกโพรคาริโอตและยูคาริโอตจะแตกต่างกัน



รูปที่ 1 - 20 การทำงานของยีนบนโครโมโซม (ภิญโญ และคณะ, 2022)

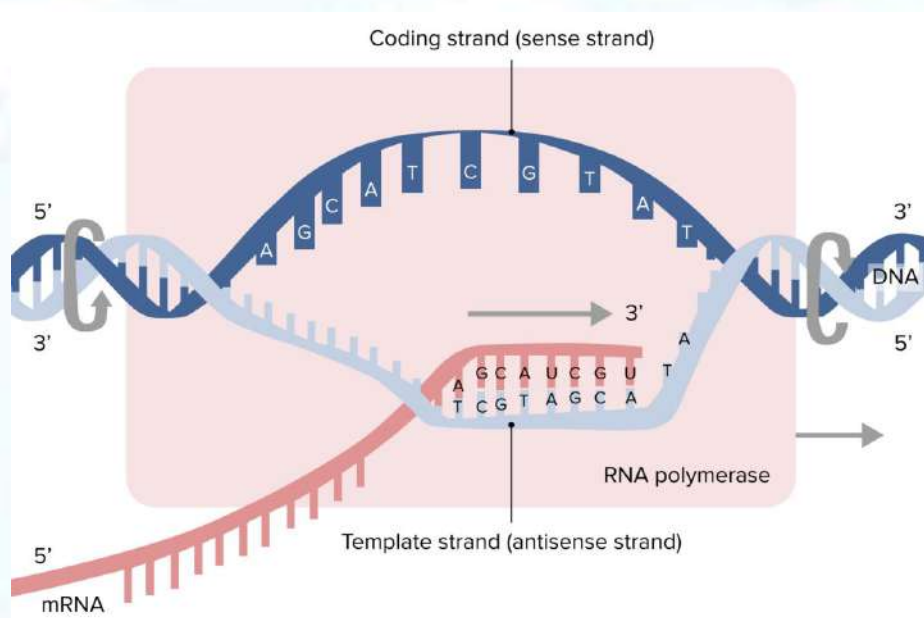
กระบวนการลอกรหัส (transcription)

กระบวนการลอกรหัส (transcription) คือกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA synthesis) หรือเป็นการแสดงออกของยีน (คือส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เก็บรหัสของโปรตีน 1 ชนิด) ที่มีการส่งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอไปสู่อาร์เอ็นเอ ซึ่งเกิดในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตในยูคาริโอต โดยอาศัยการทำงานของ DNA depended (directed) RNA polymerase หรือเรียกว่า RNA polymerase ที่ใช้สายใดสายหนึ่งของ ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ (DNA template หรือ antisense strand) เพื่อเป็นแม่แบบในการลอกรหัสหรือสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ซึ่ง antisense strand ของแต่ละยีนไม่จำเป็นต้องอยู่บนดีเอ็นเอสายเดียวกัน กล่าวคือสายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเออาจเป็นทั้ง antisense strand ของยีนหนึ่งแต่เป็น sense strand ของอีกยีนหนึ่งก็ได้ ในกระบวนการลอกรหัสของยีนบนสายดีเอ็นเอ พบว่ายีนต้องมีองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ตำแหน่ง คือ (1) ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ (promoter) (2) ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่กำหนดรหัสพันธุกรรมในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA coding sequence) และ (3) ตำแหน่งของจุดสิ้นสุดการลอกรหัส (termination) นอกจากนี้ 3 ตำแหน่งดังกล่าวแล้วยังมีลำดับเบสที่อยู่บริเวณด้านหน้าของตำแหน่งเบสที่ตัวแรกที่ใช้ในการสังเคราะห์ของอาร์เอ็นเอ (transcription initiation site หรือ ตำแหน่ง +1) ที่เรียกว่า upstream of gene หรือ upstream region และลำดับเบสที่อยู่บริเวณ ด้านหลังของตำแหน่งเบสที่ตัวแรก (+1) เรียกว่า downstream of gene หรือ downstream region

ขั้นตอนการลอกรหัส

1. DNA คลายเกลียวออกจากกันเฉพาะตำแหน่งที่เป็นยีนเด่นที่จะแสดงออกโดยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างคู่เบส A กับ T และ C กับ G จะสลายไป

2. เมื่อ DNA คลายเกลียวแยกจากกันแล้ว จะมีการนำนิวคลีโอไทด์ของ RNA เข้าจับกับเบส ของสายที่ใช้เป็นต้นแบบ หรือสายแอดิโคดิง โดยมีการจับคู่กันแบบเดียวกับ DNA แต่ใน RNA ไม่มี T มีแต่ U ดังนั้น ถ้าเบสของ DNA เป็น A นิวคลีโอไทด์ของ RNA ที่เข้าไปจับจะเป็น U และการสังเคราะห์ mRNA นี้จะเริ่มปลาย 3' ไปยัง 5' ของ DNA ดังนั้น การสังเคราะห์โมเลกุลของ mRNA จึงเริ่มจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' นิวคลีโอไทด์ของ mRNA จะเชื่อมต่อกันโดยอาศัยเอนไซม์ชื่อ อาร์เอ็นเอ พอลิเมอเรส (RNA polymerase)



รูปที่ 1 - 21 แสดงการสังเคราะห์ RNA จาก DNA (Baniya, 2022)

3. โมเลกุล mRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะเคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสไปยังไซโทพลาซึมและขณะเดียวกัน DNA บริเวณคลายเกลียวก็จะพันรอบกันตามเดิม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าบริเวณคลายเกลียวของ DNA ที่เป็นต้นแบบสร้าง RNA ชนิดหนึ่ง ก็คือ ตำแหน่งที่เป็นยีนเด่น 1 ยีนนั่นเอง (รูปที่ 1 - 21)

กระบวนการแปลรหัส (translation)

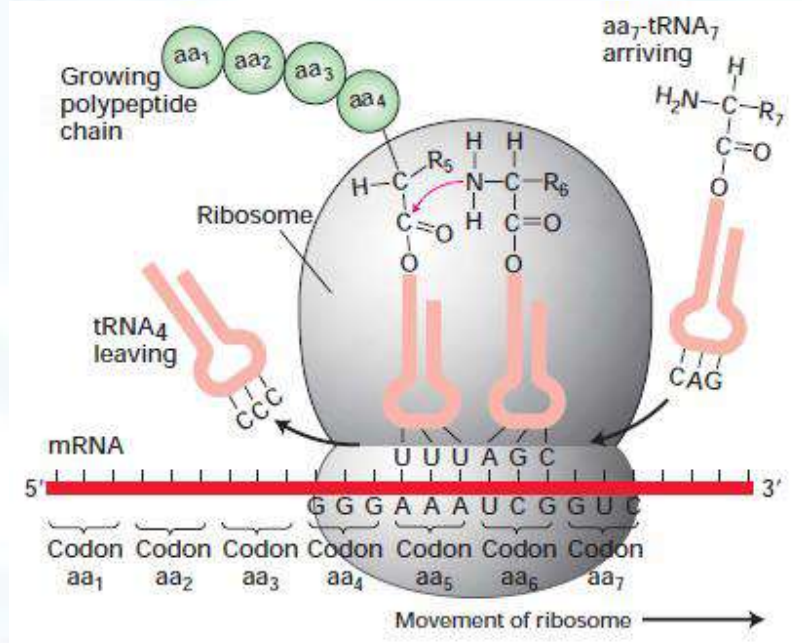
กระบวนการทรานสเลชัน เป็นขั้นตอนการแปลรหัสพันธุกรรม ใน mRNA ออกมาเป็นลำดับกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ โดยประกอบด้วยกระบวนการดังนี้

1. โรโบโซมจะแยกออกเป็น 2 หน่วยย่อย (subunit) แล้วโรโบโซมหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) จะเข้าเกาะทางปลายด้าน 5' ของ mRNA

2. tRNA โมเลกุลแรกที่ทำหน้าที่นำกรดอะมิโนมา จะเข้าจับกับ mRNA ในโรโบโซม โดยอ่านรหัสพันธุกรรมบน mRNA ครึ่งละ 3 นิวคลีโอไทด์ รหัสตัวแรกบน mRNA ทุกชนิดเหมือนกันหมด คือ AUG เรียกว่า Initiating codon ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโนเมไทโอนีน (met) ดังนั้น กรดอะมิโนเมไทโอนีน จึงเป็นกรดอะมิโนตัวแรกสุดที่ tRNA นำไปทางปลาย 5' ของ mRNA

3. โรโบโซมหน่วยใหญ่ (large subunit) เข้าไปรวมตัวกับหน่วยเล็ก แล้ว tRNA โมเลกุลที่สองจะเข้าอ่านรหัสพันธุกรรมรหัสต่อมาบน mRNA

4. โปรตีนในโรโบโซมจะกระตุ้นให้เกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 1 และตัวที่ 2 ที่ tRNA นำมาพร้อมทั้งกรดอะมิโนในตัวที่ 1 หลุดจาก tRNA และ tRNA โมเลกุลแรกจะหลุดออกจาก mRNA



รูปที่ 1 - 22 แสดงกระบวนการทรานสเลชัน (Nigel, 2012)

5. โรโบโซมจะเคลื่อนต่อไปบน mRNA โดยเคลื่อนจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' tRNA โมเลกุลใหม่จึงเข้าจับกับ mRNA ต่อไป แล้วมีการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนที่ tRNA นำมาอีกเป็นเช่นนี้เรื่อย ๆ จึงได้สายพอลิเพปไทด์ที่มีลำดับของกรดอะมิโนตามรหัสบน mRNA

6. เมื่อไรโบโซมเคลื่อนที่ไปพบรหัสที่ทำหน้าที่หยุดการสังเคราะห์โปรตีนบน mRNA ได้แก่ รหัส UAA, UGA หรือ UAG ไรโบโซมก็จะแยกออกมาจาก mRNA การสังเคราะห์พอลิเพปไทด์จึงสิ้นสุดลง

ในการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ mRNA แต่ละโมเลกุลอาจจะพาดเกาะอยู่บนไรโบโซมหลายๆ ไรโบโซม แต่ละไรโบโซมจะทำการสังเคราะห์สายของพอลิเพปไทด์ 1 สาย กลุ่มของไรโบโซมเหล่านี้เรียกว่าพอลิไรโบโซม (polyribosome) เนื่องจากในปัจจุบันมีกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง ทำให้สามารถมองเห็นภาพของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของโพลิไรโบโซมได้ ดังนั้น ลำดับเบสใน mRNA จะถูกถอดออกมาเป็นลำดับกรดอะมิโน ในสายพอลิเพปไทด์ ดังรูปที่ 1 – 22

รหัสพันธุกรรม (genetic code)

รหัสพันธุกรรม 1 รหัส ประกอบด้วยเบส 3 โมเลกุล (triplet code) ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโน 1 โมเลกุล เราเรียกแต่ละรหัสว่า โคดอน (codon) ดังนั้นจึงมีรหัสพันธุกรรมทั้งหมด 64 รหัส (รูปที่ 1 - 23) แต่ใช้เป็นพันธุกรรมสำหรับกรดอะมิโน 20 ชนิด เพียง 61 รหัสเท่านั้น ดังนั้นกรดอะมิโน 1 ชนิด สามารถมีรหัสพันธุกรรมได้มากกว่า 1 รหัส และจากการศึกษาพบว่า รหัสเริ่มต้น (initiating codon/start codon) ในการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ คือ AUG ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโนเมไทโอนีน และรหัสอีก 3 รหัส คือ UAA, UGA และ UAG ซึ่งไม่เป็นรหัสของกรดอะมิโนใด ๆ แต่เป็นรหัสสำหรับหยุดการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ (terminating codon/stop codon) เมื่อพบรหัสเหล่านี้ใน mRNA การแปลรหัสจะสิ้นสุดลง

ในการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ tRNA จะเป็นตัวนำกรดอะมิโนมายัง mRNA โดย tRNA จะเข้าจับกับ mRNA โดย tRNA แต่ละโมเลกุลจะมีเบส 3 โมเลกุลอยู่ที่ปลายข้างหนึ่งของโมเลกุลที่จะเข้าคู่ (complementary) กับโคดอนของ mRNA เช่น tRNA ที่มี anticodon เป็น CGU จะเข้าคู่จำเพาะกับ Codon GCA บน mRNA

ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA and RNA)

กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) คือ สารพันธุกรรม (genetic material) ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญโดยทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรมและสามารถถ่ายทอดไปยังชั่วรุ่นต่อไปได้ ถ้าเกิดความผิดพลาดในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะส่งผลกระทบต่ออาร์เอ็นเอ และการสังเคราะห์โปรตีน มีผลทำให้เกิดความผิดปกติในรุ่นต่อไป ในรูปของโรคทางพันธุกรรมหรือการแสดงออกทางความผิดปกติทางร่างกาย ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในรูปโครโมโซม (chromosome) วางตัวอยู่ในส่วนนิวเคลียสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สำหรับสิ่งมีชีวิตพวกโพรแคริโอต (prokaryote) นั้น สารพันธุกรรมที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตภายในเซลล์มักประกอบด้วยดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุล ส่วน สิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต (eukaryote) สารพันธุกรรมที่อยู่ภายในเซลล์ถูกบรรจุอยู่ในนิวเคลียส โดยในแต่ละนิวเคลียสมักประกอบด้วยดีเอ็นเอหลายโมเลกุล ดีเอ็นเอแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยยีนหลายยีนเรียงตัวอยู่ นอกจากนี้ ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดอาจมีกรด ไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นสารพันธุกรรม

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

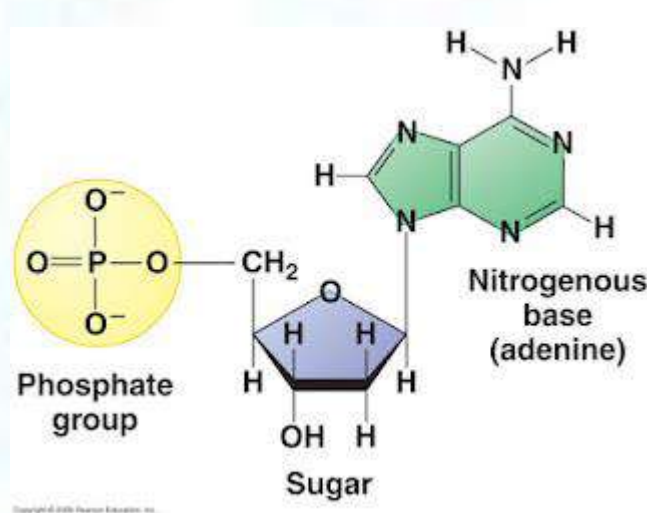
รูปที่ 1 - 23 รหัสพันธุกรรม (Genetic code)

Phe คือ ฟีนิลอะลานีน	Leu คือ ลิวซีน	Ile คือ ไอโซลิวซีน	Met คือ เมไทโอนีน	Val คือ วาลีน
Ser คือ ซีรีน	Pro คือ โพรลีน	Thr คือ ทรีโอนีน	Ala คือ อะลานีน	Tyr คือ ไทโรซีน
His คือ ฮิสทีดีน	Gln คือ กลูตามีน	Asn คือ แอสพาราจีน	Lys คือ โลซีน	Asp คือ กรดแอสปาดิก
Glu คือ กรดกลูตามิก	Cys คือ ซิสเทอีน	Trp คือ ทริปโตเฟน	Arg คือ อาร์จินีน	Gly คือ ไกลซีน

(ธนภุต และวัชรินทร์, 2022)

โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

กรดนิวคลีอิกเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (รูปที่ 1 - 24) แต่ละโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทส (pentose sugar) หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) และไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) เมื่อโมเลกุลนิวคลีโอไทด์มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวที่เรียกว่า โพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) โดยโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สาย ส่วนอาร์เอ็นเอประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์เพียงสายเดียว



รูปที่ 1 24 องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส หมู่ฟอสเฟต และไนโตรจีนัสเบส (MedTech, 2558)

น้ำตาลเพนโทส (pentose sugar)

คือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างเป็นวงแหวน น้ำตาลเพนโทสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (รูปที่ 1 - 25) คือ

1. น้ำตาลไรโบส (ribose sugar) เป็นน้ำตาลเพนโทสที่ได้มาจากเซลล์พืชเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของนิวคลีโอไทด์ในอาร์เอ็นเอ
2. น้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose sugar) เป็นน้ำตาลเพนโทสที่มีหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy; OH) ของคาร์บอนอะตอมในตำแหน่งที่ 2 หายไปแต่มี ไฮโดรเจน (hydrogen; H) มาแทนที่ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลที่พบในเซลล์สัตว์ และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ

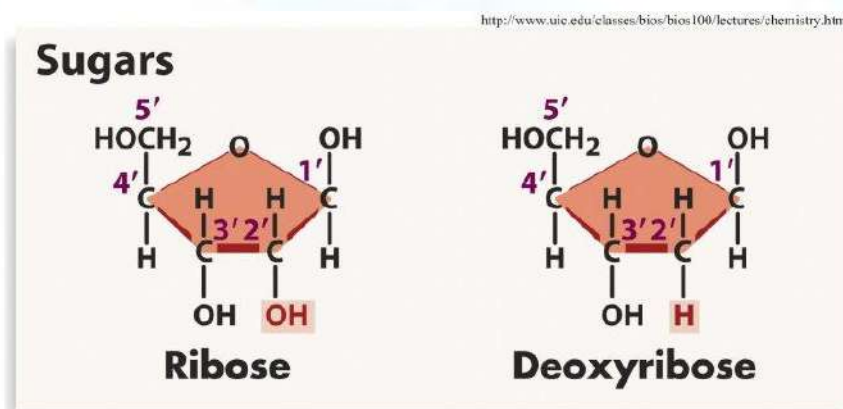


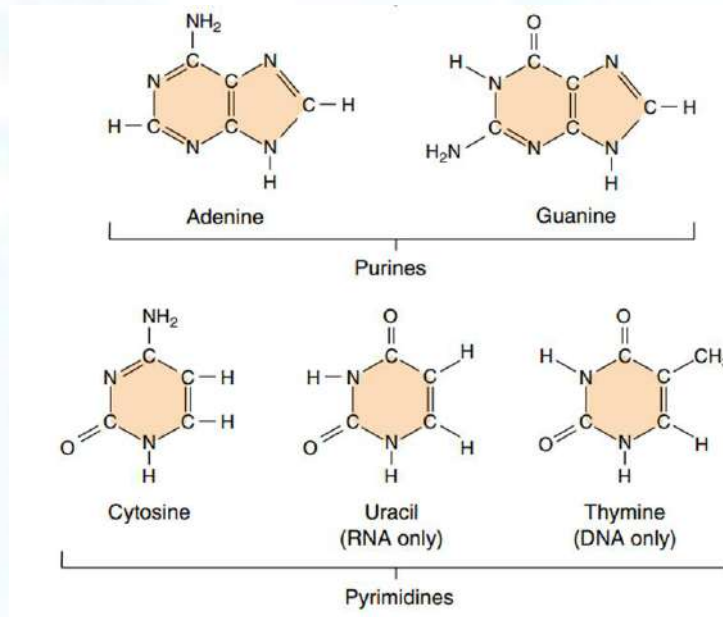
Figure 4-1b Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

รูปที่ 1 - 25 โครงสร้างของน้ำตาลไรโบส และดีออกซีไรโบส (อาภรณ์, 2560)

ไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base)

แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ พิวรีน (purine) เป็นเบสที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 2 วง พบทั้งในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ มี 2 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) และกัวนีน (guanine; G) ส่วน ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นเบสที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 1 วง ซึ่งเบสในกลุ่มนี้มี 3 ชนิด ได้แก่ ไทมีน (thymine; T) พบเฉพาะในดีเอ็นเอ ไซโตซีน (cytosine; C) พบทั้งในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ส่วนยูราซิล (uracil; U) พบเฉพาะในอาร์เอ็นเอเท่านั้น (รูปที่ 1 - 26)

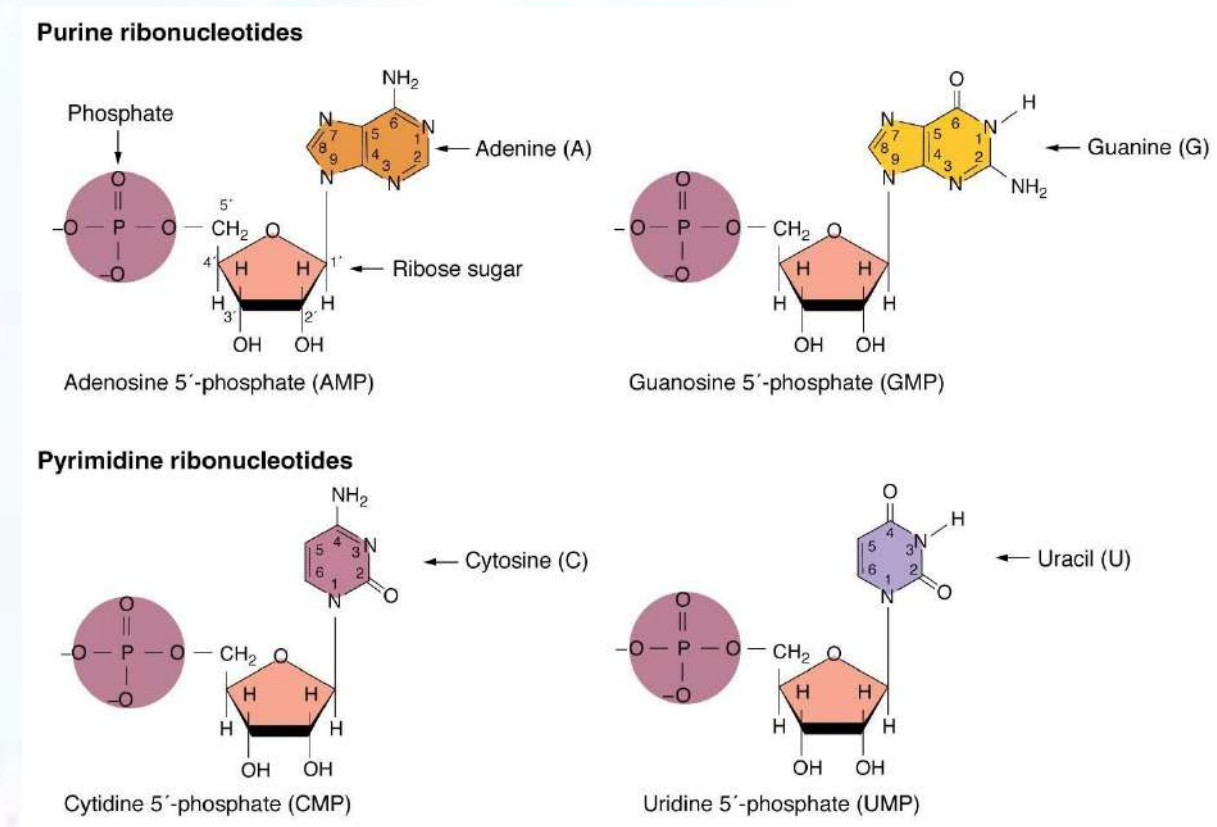


รูปที่ 1 - 26 โครงสร้างของไนโตรจีนัสเบสปิวรีนและไพริมิดีน (Raven and Johnson, 2002)

น้ำตาลเพนโตสกับไนโตรจีนัสเบสจะมาเชื่อมต่อกันได้เป็นสารประกอบที่ เรียกว่า นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) โดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 (C1) ของน้ำตาลเพนโตสเชื่อมต่อกับไนโตรเจน ตำแหน่งที่ 1 (N1) ของเบสกลุ่มไพริมิดีน หรือเชื่อมต่อกับไนโตรเจนตำแหน่งที่ 9 (N9) ของเบส กลุ่มพิวรีน ด้วยพันธะไกลโคซิด หรือพันธะไกลโคซิดิก (glycosyl หรือ glycosidic bond) รูปที่ 1 - 27

หมู่ฟอสเฟต (phosphate group)

หมู่ฟอสเฟต (-P) 1 หมู่ เข้าจับกับอะตอมของออกซิเจน (O) ของหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่ อะตอมของ คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 หรือ 3 หรือ 2 ของน้ำตาลเพนโตส (C5หรือ C3 หรือ C2) ด้วยพันธะเอสเทอร์ กลายเป็น สารประกอบที่ เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของดีเอ็นเอและ อาร์เอ็นเอ



รูปที่ 1 - 27 การเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลกับเบสด้วย 1-9 glycosidic bond ของอะดีโนไซด์ (อาร์เอ็นเอ) และ 1-glycosidic bond ของดีออกซีไทมิโนไซด์ (ดีเอ็นเอ) (PDF Word Slide, n.d)

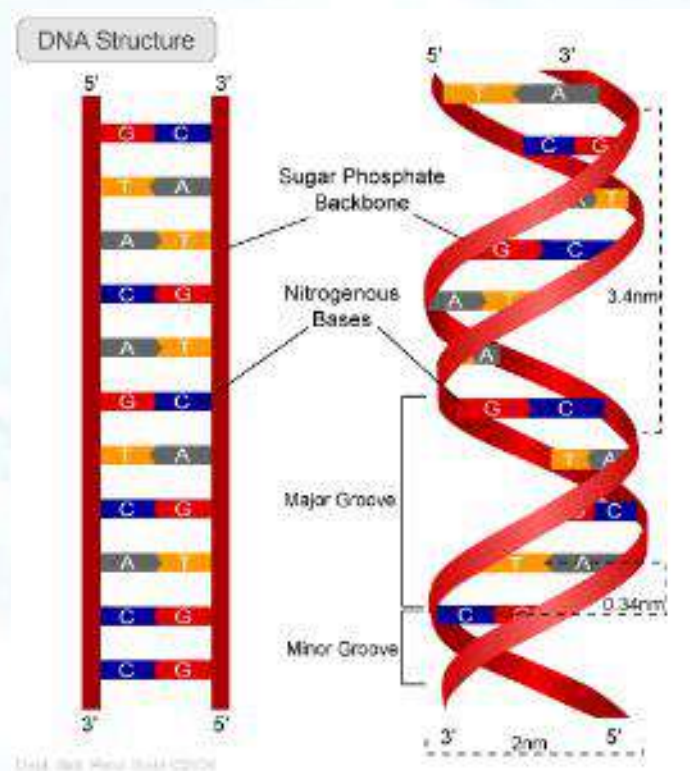
31

โครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA structure)

DNA เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญที่สุดต่อการคงอยู่ของสิ่งมีชีวิต ต่างๆ กล่าวคือ DNA ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด ยกเว้นไวรัสบางชนิดเท่านั้น ที่ใช้ RNA เป็นสารพันธุกรรม สารพันธุกรรมนี้จะเป็นที่เก็บและถ่ายทอด (transmission) ข้อมูลทางพันธุกรรม หรือลักษณะทางพันธุกรรม ต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต จากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลาน จากเซลล์รุ่นหนึ่งไปสู่เซลล์อีกรุ่นหนึ่ง เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต

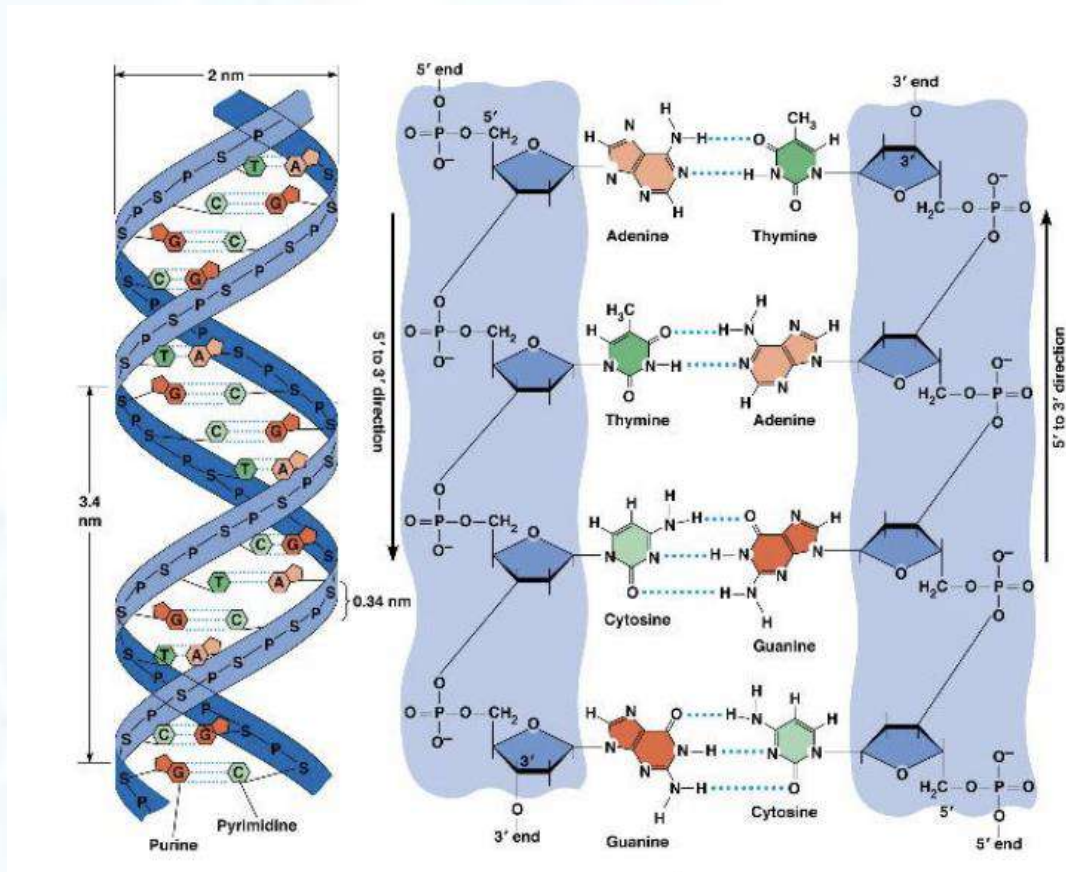
โครงสร้างของ DNA ประกอบด้วยสายพอลินิวคลีโอไทด์ 2 สายพันกันเป็นเกลียว การค้นพบโครงสร้างเกลียวคู่ (double helix) ของ DNA ในปี ค.ศ. 1953 โดยเจมส์ วัตสัน (James Watson) และ ฟรานซิส คริก (Francis Crick) ได้เสนอแบบจำลองโครงสร้างโมเลกุลของ DNA (DNA structure) ในหัวข้อ “โครงสร้างระดับโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก (Molecular Structure of Nucleic Acids)” ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Nature ฉบับวันที่ 25 เมษายน ค.ศ. 1953” โดยอธิบายโครงสร้างของดีเอ็นเอว่า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นสาย

พอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) 2 สายเข้าคู่กันเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเกลียวเวียนขวาหรือหมุนตามเข็มนาฬิกาการอบแกน และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นาโนเมตร เกลียวดีเอ็นเอที่เวียนครบ 1 รอบหรือ 360 องศา จะมีความยาว 3.4 นาโนเมตร และประกอบด้วยเบสคู่สมจำนวน 10 คู่เบส จึงทำให้เบสแต่ละคู่อยู่ห่างกัน 0.34 นาโนเมตร โดยที่สายพอลินิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สายเรียงสลับสวนทิศทางกัน (antiparallel) คล้ายบันไดเวียน คือ พอลินิวคลีโอไทด์สายหนึ่งมีทิศทางจากปลาย 5' → 3' แต่พอลินิวคลีโอไทด์อีกสายหนึ่งมีทิศทางจากปลาย 3' → 5' โดยมีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นราวบันได และบันไดแต่ละขั้น คือ เบส 1 คู่ ที่จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะดีนีน กับไทมีน (A-T) และกวานีนกับไซโทซีน (G-C) แสดงดังรูปที่ 1 - 28 การสังเคราะห์ DNA จะทำให้ได้สารพันธุกรรมที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการจำนวนมากขึ้นเป็น 2 เท่า การเกิดสายพอลินิวคลีโอไทด์จะมีการสร้างสายใหม่ขึ้นมาหนึ่งสาย และมีสายเก่าอยู่หนึ่งสายทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ ในขณะที่มีการสังเคราะห์สายใหม่ขึ้นมา



รูปที่ 1 - 28 โครงสร้างของ DNA เป็นโครงสร้างเกลียวคู่ สายพอลินิวคลีโอไทด์ 2 สายจับกันโดยมีทิศสวนทางกัน (MedTech, 2558)

เบสที่เรียงตัวอยู่ภายในเกลียวคู่หรือเบสบนสายพอลินิวคลีโอไทด์หนึ่ง มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสบนอีกสายพอลินิวคลีโอไทด์หนึ่ง เกิดเป็น purine-pyrimidine base pair โดยพิวรีนจะจับกับไพริมิดีนเสมอ คือเบสอะดีนีนจับกับเบสไทมีนด้วย 2 พันธะไฮโดรเจน (A=T) และ เบสกวานีนจับกับเบสไซโทซีนด้วย 3 พันธะไฮโดรเจน (G≡C) แสดงดังรูปที่ 1 - 29



รูปที่ 1 - 29 การเรียงตัวในทิศทางตรงข้ามกัน (antiparallel) ของ 2 สายโพลีนิวคลีโอไทด์ การเข้าคู่หรือการเชื่อมต่อของเบสระหว่าง 2 สายโพลีนิวคลีโอไทด์ ด้วยพันธะไฮโดรเจน (คลังข้อมูลทางวิชาการ BRU, 2017)

โครงสร้างของอาร์เอ็นเอ (RNA structure)

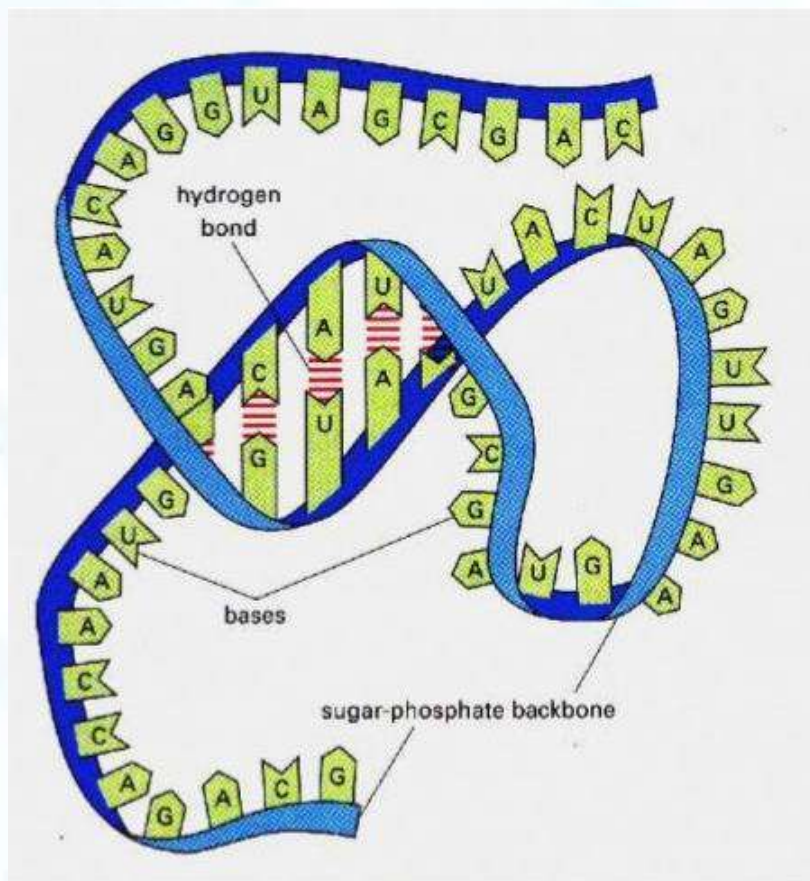
อาร์เอ็นเอ หรือกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) เป็นกรดนิวคลีอิกที่ประกอบด้วย ไรโบนิวคลีโอไทด์หลาย ๆ โมเลกุลมาต่อกัน ในเซลล์ยูคาริโอตจะพบ RNA ได้ในนิวเคลียส ไซโทพลาสซึม และไมโทคอนเดรีย สำหรับในนิวเคลียสจะพบ RNA บริเวณนิวคลีโอลัส ในธรรมชาติ RNA แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ mRNA tRNA และ rRNA

1. mRNA หรือ messenger RNA ทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจาก DNA เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน โดย mRNA จะถูกสังเคราะห์ขึ้นที่นิวเคลียสโดยมี DNA เป็นแม่แบบ จากนั้น mRNA จะไปไซโทพลาสซึมเพื่อเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ข้อมูลพันธุกรรมที่ mRNA นำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนก็คือลำดับเบสนั่นเอง mRNA มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 75 - 3,000

2. tRNA หรือ transfer RNA ทำหน้าที่นำกรดอะมิโนไปยังไรโบโซมเพื่อเรียงต่อกันเป็นโปรตีน tRNA แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนนั้น คือ tRNA สามารถนำกรดอะมิโนไปได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น tRNA มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 75 – 90

3. rRNA หรือ ribosomal RNA เป็นส่วนประกอบของไรโบโซม โดยจะรวมกับโปรตีนสร้างเป็นไรโบโซม rRNA มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 100 – 3,100

โครงสร้างของ RNA ประกอบด้วยสายพอลินิวคลีโอไทด์ 1 สาย ซึ่งจะแตกต่างจาก DNA ที่เป็นเกลียวคู่ 2 สาย นอกจากนี้ RNA ยังแตกต่างจาก DNA ที่น้ำตาลและเบสที่เป็นองค์ประกอบ โดยใน RNA จะเป็นน้ำตาลไรโบส ส่วนเบสใน RNA จะเป็นยูราซิลแทนไทมีน แม้ว่า RNA จะมีโครงสร้างเป็นสายพอลินิวคลีโอไทด์เพียงสายเดียวแต่อาจมีการม้วนพับสายเข้าหากันและพันกันเองได้เป็นรูปเกลียว โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสอะดีนีนกับยูราซิลและเบสกวานีนกับไซโทซีน ดังรูปที่ 1 - 30 การเข้าคู่กันของเบสใน RNA นี้บางครั้งทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นห่วงเหมือนกับติดผม (hairpin loop)



รูปที่ 1 - 30 การม้วนพับของสายพอลินิวคลีโอไทด์ใน RNA (คลังข้อมูลทางวิชาการ BRU, 2017)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นใน ปี ค.ศ. 1983 โดย Kary Mullis และคณะ ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้เข้ามามีบทบาทในงานทางด้านเทคนิค การแพทย์ ไม่ว่าจะเป็น การใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา หรือไวรัส ใช้ในการเพิ่มจำนวนของยีนดื้อยา เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับสารพันธุกรรม ตรวจสอบความผิดปกติของยีน รวมถึงการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมต่างๆ โรคเลือด โรคมะเร็ง เป็นต้น

หลักการของเทคนิค PCR

เทคนิค PCR เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมที่สนใจให้มีความมากมายในระยะเวลาอันสั้นในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยอาศัยหลักการแบบเดียวกันกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่ใช้เอนไซม์พอลิเมอร์ (polymerase) ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะเป็นลักษณะแบบ exponential curve คำนวณได้เท่ากับ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของการทำ PCR จนถึงระยะหนึ่งที่ปริมาณของ PCR product คงที่ และองค์ประกอบในการทำ PCR ลดลง ซึ่งการดำเนินไปของปฏิกิริยาจะไม่ให้ product ตามสูตร 2^n จะเรียกสิ่งที่เกิดขึ้นนี้ว่าปรากฏการณ์ “plateau effect”

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

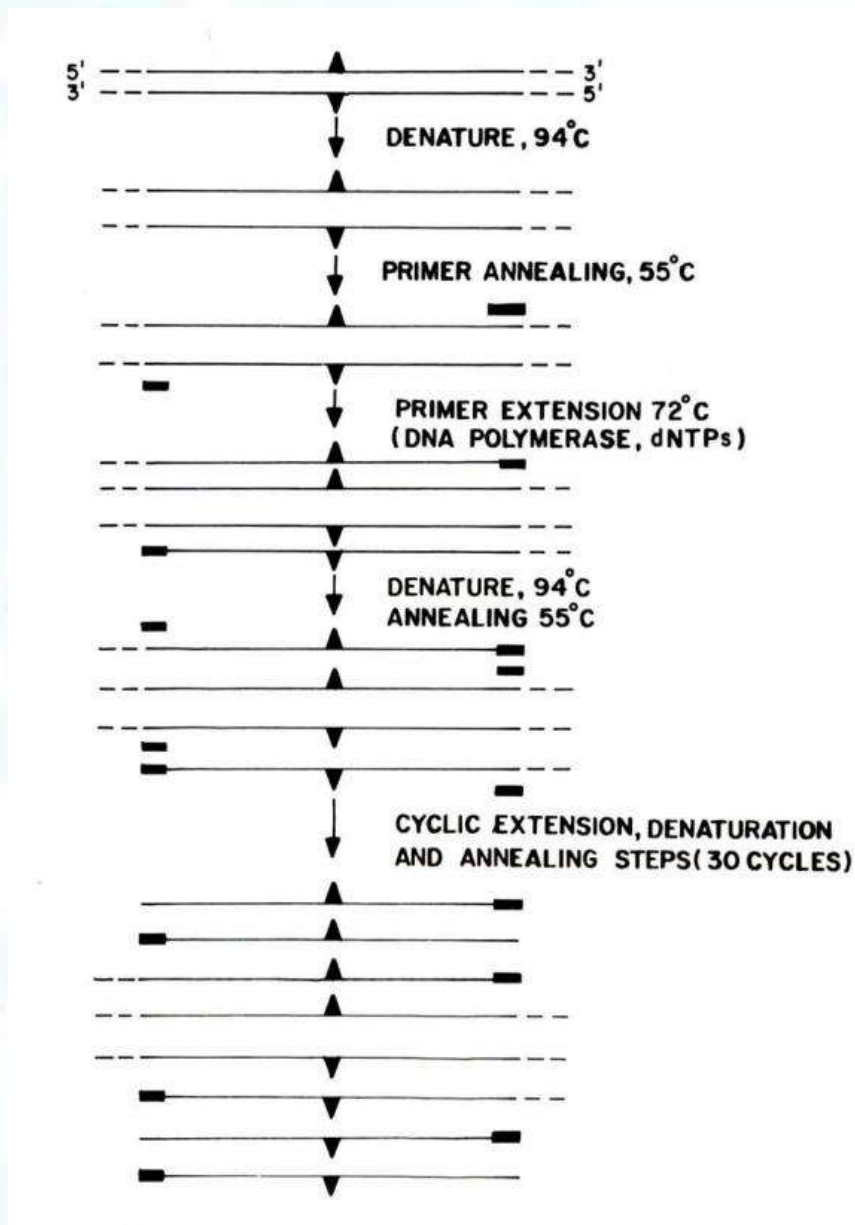
การทำปฏิกิริยา PCR 1 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน (ดังรูปที่ 1 - 31) คือ

1. ขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation) เป็นการใช้ความร้อนทำให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจากดีเอ็นเอสายคู่ที่มีคู่เบสจับกันพันเป็นเกลียวคู่แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ส่วนใหญ่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส นาน 30 – 60 วินาที ในการทำลายพันธะไฮโดรเจน
2. ขั้นตอนไพรเมอร์เข้าจับที่ตำแหน่งเป้าหมาย (annealing) เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวประมาณ 20 – 25 นิวคลีโอไทด์ เข้าจับกับสายดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอน denaturation ในตำแหน่งเบสคู่สมได้อย่างจำเพาะ ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 50 – 66 องศาเซลเซียส นาน 30 – 60 วินาที โดยอุณหภูมิในช่วงนี้จะขึ้นกับค่า T_m ของ primers ที่ใช้โดยทั่วไป annealing temperature จะมีค่าต่ำกว่า T_m เฉลี่ยของ primers ทั้งสองประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส
3. ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยเริ่มจากจุดตั้งต้นของไพรเมอร์ในดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละข้าง โดยการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ในทิศทางจาก 5' ไป 3' โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ (Taq DNA polymerase) จะใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 70 – 75 องศาเซลเซียส นาน 1 – 2 นาที โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้คือ 72 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบในการทำ PCR

การทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR มีองค์ประกอบที่สำคัญดังนี้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เป็นดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีส่วนของสายดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการศึกษา โดยสกัดมาจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ความบริสุทธิ์และความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัด และปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา โดยในปฏิกิริยา PCR จะใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นในช่วง 10-50 ng/reaction



รูปที่ 1 - 31 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (อำไพวรรณ และคณะ, 2534)

2. ไพรมเมอร์ (primer) เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (oligonucleotides) ที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ นิยมใช้ความยาวประมาณ 20 – 24 bp และมีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ชนิด G และ C ระหว่าง 40 – 60 % จะเป็นตัวเริ่มต้นของการสร้าง DNA สายใหม่ในบริเวณช่วง DNA template หรือยีนที่เราต้องการ โดย primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดจะมี 2 เส้นคือ forward primer และ reverse primer โดย primers ที่ใช้จะต้องมีค่า T_m ของทั้งสองเส้นเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ต่างกันไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR ของ primer แต่ละเส้นอยู่ในช่วง 0.1-2.0 μM

3. deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) คือ นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย 4 ชนิด คือ dATP dTTP dGTP และ dCTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ชนิด A T C และ G ที่ทำหน้าที่เป็นวัตถุดิบการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยจะเตรียมเป็นสารผสมที่มีความเข้มข้นในช่วง 20-200 μM

4. เอนไซม์ DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยจะมีการเติมนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ของดีเอ็นเอ ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนนี้จะมีการใช้อุณหภูมิที่สูง ทำให้ต้องใช้เอนไซม์ที่ทนต่อความร้อนได้สูงโดยไม่มีการเสียสภาพ ปัจจุบันจึงนิยมใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ทนความร้อน คือ *Thermus aquaticus* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยตามบ่อน้ำพุร้อน เอนไซม์ที่ได้จะเรียกว่า Taq DNA polymerase นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติอีกประการหนึ่ง คือ การตรวจสอบความผิดพลาดของการสร้าง DNA สายใหม่ (5' $\rightarrow$ 3' exonuclease) หรือ proofreading activity โดยเอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงโดยเอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุดในงาน PCR คือ Taq DNA polymerase แต่ถ้าต้องการความถูกต้องของการสร้างสาย DNA อาจใช้ Pfu DNA polymerase (แยกได้จากแบคทีเรีย *pyrococcus furiosus*) ในปฏิกิริยา PCR ปกติ จะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ 2.5-5 unit/100 μl ของ PCR reaction

5. PCR Buffer เป็นสารละลายที่ช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย buffer จะช่วยในการรักษาค่า pH ให้เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ซึ่งปกติ buffer จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้น 10 เท่าของที่ใช้จริง (10X) ซึ่งผู้ใช้จะใช้เวลาเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

6. Magnesium ion (Mg^{2+}) เป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับปฏิกิริยา PCR ทำหน้าที่เป็น co-factor ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในการสร้างสายดีเอ็นเอ และช่วยในการจับกันของดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอที่สร้างใหม่ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการปฏิกิริยา PCR หากมีความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะ หรือถ้าน้อยเกินไปจะทำให้ปริมาณผลผลิต PCR น้อยในการทำงานจริงผู้ปฏิบัติการสามารถปรับความเข้มข้นได้โดยให้อยู่ในช่วง 1-5 mM โดยคำนึงถึงลักษณะของ template และ primers ที่ใช้ โดยทั่วไปความเข้มข้นของ MgCl_2 เริ่มทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในครั้งแรกที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 1.5 mM

7. น้ำ ใช้สำหรับปรับปริมาตรให้ครบตามจำนวนของปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยา PCR น้ำที่ใช้จะต้องเป็นน้ำที่ปราศจาก DNase หรือ RNase และไม่มีการปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจาก

เชื้อแบคทีเรียที่อาจมี enzyme nuclease ที่ทำลาย DNA template และ primers รวมถึงรบกวนปฏิกิริยา PCR ด้วย

8. เครื่อง Thermocycler เป็นเครื่องมือสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยการปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีโปรแกรมที่สามารถควบคุมการดำเนินงานตามขั้นตอนและปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้ตามที่ต้องการแบบอัตโนมัติ

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงศึกษาธิการ. 2021. เซลล์ ตอนที่1: สรุปเนื้อหารายการที่3. ศูนย์เทคโนโลยีทางการศึกษาแหล่งที่มา:

http://etvthai.tv/Download/Schedule_Document/25112557_1356328475.pdf, June 23, 2022.

กระทรวงศึกษาธิการ. 2021. พันธุศาสตร์ (ตอนที่ 2). ศูนย์เทคโนโลยีทางการศึกษา. แหล่งที่มา:

http://www.etvthai.tv/download/Schedule_Document/03102554_1139201382.pdf, June 28, 2022

กุลนาถ ทิปประพันธ์ณี. 2563. ชีววิทยา: โครงสร้างและองค์ประกอบเซลล์. แหล่งที่มา:

<https://tuemaster.com/blog/%E0%B9%82%E0%B8%84%E0%B8%A3%E0%B8%87%E0%B8%AA%E0%B8%A3%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%84%E0%B9%8C%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%AD%E0%B8%9A/>, June 26, 2022.

กุลนาถ ทิปประพันธ์ณี. 2563. ชีววิทยา: จีโนม. แหล่งที่มา: <https://tuemaster.com/blog/%E0%B8%88%E0%B8%B5%E0%B9%82%E0%B8%99%E0%B8%A1-genome/>, June 26, 2022.

กุลนาถ ทิปประพันธ์ณี. 2564. ชีววิทยา: เรื่องของเซลล์. แหล่งที่มา:

<https://tuemaster.com/blog/%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%82%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B9%80%E0%B8%8B%E0%B8%A5%E0%B8%A5%E0%B9%8C/>, June 23, 2022.

คัตคณัฐ ชื่นวงศ์อรุณ. 2019. National geographic ฉบับภาษาไทย. โครงสร้างโครโมโซม. แหล่งที่มา:

<https://ngthai.com/science/24674/chromosomestructurefeature/>, June 23, 2022.

คลังข้อมูลทางวิชาการBRU. 2017. กรดนิวคลีอิก. มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์. แหล่งที่มา:

<http://dspace.bru.ac.th/xmlui/bitstream/handle/123456789/6970/%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%88%207%20%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B8%99%E0%B8%B4%E0%B8%A7%E0%B8%84%E0%B8%A5%E0>

[%B8%B5%E0%B8%AD%E0%B8%B4%E0%B8%81.pdf?sequence=3&isAllowed=y](#), July 15, 2022.

ณัฐพัฒน์ หอมทอง. 2016. ออร์แกนเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์: เซลล์ หน่วยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต. แหล่งที่มา: <https://sites.google.com/site/nattapat45303/home/xxr-kae-nell-tang-phayni-sell>, July 15, 2022.

ดาวัลย์ ฉิมภู. 2548. ชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ธนกฤต ศรีวิลาศ และวัชรินทร์ อันเวช. 2022. นิตยสารสาระวิทย์. เลขเปลี่ยนโลก ฉบับที่ 117 สวทช. แหล่งที่มา: <https://www.nstda.or.th/sci2pub/number-change-the-world-117/>, January 5, 2023.

นราวิชญ์ เลิศประเสริฐกุล. 2558. องค์ประกอบของ ซีเลีย แฟลกเจลลัม. แหล่งที่มา: <http://aomwipatchakit.blogspot.com/2015/01/blog-post.html>, January 8, 2023.

เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์. 2019. เซลล์: หน่วยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. แหล่งที่มา: <http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/806/1/bib565.pdf>, June 23, 2022.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2554. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร, กรุงเทพฯ.

ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ และนเรศ ดำรงชัย. 2543. จีโนม : เรื่องที่ทุกคนควรรู้ (Understanding Genome). พิมพ์ครั้งที่ 1. หน่วยเผยแพร่เทคโนโลยีและประชาสัมพันธ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

พัชรี บุญศิริ เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์ อุบล ขาอ่อนและปิติ ธวัชจิตต์. 2550. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 5. คลังน่านาวิทยา, ขอนแก่น.

ภิญโญ พานิชพันธ์. พิมพ์ รื่นวงษา. ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย. วชิร ใจภักดี และ ปิยะฉัตร จิตต์ธรรม. 2022. ดีเอ็นเอ: เจ้าชีวิต. แหล่งที่มา: <https://il.mahidol.ac.th/e-media/dna/index-chapter1.html>, June 25, 2022.

ภัทธิดา ประเสริฐศิลป์. 2020. Amplification : Genomic. แหล่งที่มา: [learning/index.php/blog/genomics/patiya-prasertsilp](#), July 15, 2022.

เมธี ศรีประพันธ์. 2008. เอกสารประกอบคำบรรยาย เรื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. แหล่งที่มา: http://www.mtc.or.th/pdf_que/pdf1_14.pdf, May 8, 2021.

ลลิตภัทร ดีรักษา. 2559. เอกสารประกอบการสอนชีววิทยาในการสาธารณสุข (Biology in Public Health). สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

วิสุทธิ ไบไม้. 2563. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เรือนแก้วการพิมพ์, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: <https://www.si.mahidol.ac.th /department/Biochemistry/home /SIBB505/PCR%20reference%203.pdf>, May 8, 2021.

ศุภมิตร เมฆฉาย. 2011. การประยุกต์ใช้จีโนมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์, น. 36-39. ใน Proceedings of the 17th National Genetic Conference 7-9 April, 2011, Chiang Mai, Thailand. แหล่งที่มา : https://web.agri.cmu.ac.th/rdunit/Be_utilized/Academic_7.pdf, June 24, 2022

ศุภศิษฐ์ อรุณรุ่งสวัสดิ์. 2552. ชีวเคมีพื้นฐาน. ท้อป, กรุงเทพฯ.

สถาพร ภูพาใจ. 2563. จีโนม: ชีววิทยา. คลังความรู้ SciMat แหล่งที่มา: <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/8801-2018-09-21-02-13-37>, February 04, 2022

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนรุทธิ์ หมดเส้น. 2560. โครโมโซม: ชีววิทยา. คลังความรู้ SciMat แหล่งที่มา : <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/6894-2017-05-14-03-59-30>, February 04, 2022.

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ. 2534. ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. วารสารโลหิตวิทยา และ เวชศาสตร์บริการโลหิต. ปีที่ 1 (ฉบับที่ 4) : 469-477. แหล่งที่มา: http://www.tsh.or.th/file_upload/files/v1%20n4%20469.pdf, June 24, 2022

อาภรณ์ รัชไช. 2560. สารเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิต: ชีววิทยา. คลังความรู้ SciMat แหล่งที่มา: <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/6982-2017-05-16-13-22-26>, February 04, 2022

Baniya, S. 2022. DNA Transcription: Stept and Mechanism. Molecular Biology. Available source : <https://microbeonline.com/dna-transcription/>, July 07, 2022.

Brooker, R.J. 2009. Genetics: analysis and principle. 3rd edition. Addison-Wesley. California, USA.

Campbell Farrell. 2006. Biochemistry. 5nded. Thomson Brooks, USA.

Gammaco. 2019. การศึกษาเซลล์พืชและเซลล์สัตว์. แหล่งที่มา: https://gammaco.com/gammaco /blog/การศึกษาเซลล์พืชและเซลล์สัตว์_3.html, June 25, 2022

MedTech X. 2558. DNA ตอนที่ 1: DNA คืออะไร และโครงสร้างของ DNA. แหล่งที่มา :

<https://medtechx.blogspot.com/2015/01/dna.html>, January 05, 2023.

Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2008. Leininger Principles of Biochemistry: DNA & RNA

Metabolism. 5th edition. W. H. Freeman and Company, New York.

Nigel. 2012. Protein Synthesis. Available source: <http://biochemistrycourse.blogspot.com/>

[2012/12/protein-synthesis.html](http://biochemistrycourse.blogspot.com/2012/12/protein-synthesis.html), July 07, 2022.

PDF Word Slide. n.d. Nucleic acid. Available source: [https://pdfslide.tips/documents/unit-](https://pdfslide.tips/documents/unit-1-558462f2abc5c.html?page=1)

[1-558462f2abc5c.html?page=1](https://pdfslide.tips/documents/unit-1-558462f2abc5c.html?page=1), September 29, 2022.

Raven, P.H. and G.B. Johnson. 2002. Biology 6th edition. McGraw-Hill Higher Education, Inc.,

New York.

Reece, J.B., L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, R.V. Minorsky. and R.B. Jackson. 2011.

Campbell Biology. 9th edition (Global Edition). Pearson Education, Inc., San

Francisco.

Snustad, D.P. and M.J. Simmous. 2010. Principles of Genetics. 5th edition. John Wiley &

Sons, Inc., New York.

Veterinary science hub. 2018. Animal Genetics and Breeding: Chromosome number of

domestic animals. Available source: [http://veterinarysciencehub.com/do-](http://veterinarysciencehub.com/d-memorised-the-chromosome-numbers-of-domestic-animals-in-a-simple-way/#google_vignette)

[memorised-the-chromosome-numbers-of-domestic-animals-in-a-simple-](http://veterinarysciencehub.com/d-memorised-the-chromosome-numbers-of-domestic-animals-in-a-simple-way/#google_vignette)

[way/#google_vignette](http://veterinarysciencehub.com/d-memorised-the-chromosome-numbers-of-domestic-animals-in-a-simple-way/#google_vignette), February 04, 2022.

บทที่ 2

เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

เทคโนโลยีชีวโมเลกุล เป็นเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่กำลังมีบทบาทสำคัญในวงการเกษตร โดยเฉพาะในงานปรับปรุงพันธุ์ปศุสัตว์ให้มีพันธุกรรมที่ดียิ่งขึ้นตอบสนองความต้องการของตลาดและมีผลผลิตสูง เพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร ในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์กรรมที่ดีเด่นจากการคัดเลือก จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกของสายพันธุ์ ความผิดปกติทางพันธุกรรม ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือด ตลอดจนตรวจสอบความสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นลูกได้ โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องมือใช้ในการตรวจสอบที่เรียกว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ในคู่มือนี้จะกล่าวถึงเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์เนื่องจากใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปศุสัตว์ของห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลสัตว์สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์หรือบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (mutation) หรือเกิดความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอนั่นเอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการตรวจสอบ

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดี คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอ มีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจาก เนื้อเยื่อใด ๆ ก็ได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต หรือ ในสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับ สภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ทำให้การใช้ดีเอ็นเอ เป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้โดยไม่จำกัด

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) คือ การตรวจสอบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการที่ว่า โครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอในมนุษย์มีลักษณะเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ลำดับของคู่เบส (base pairs) ซึ่งมีจำนวนหลายล้านคู่ในดีเอ็นเอของมนุษย์แต่ละคน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้จึงสามารถนำมาตรวจพิสูจน์บุคคลได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ และมีการพัฒนาใช้เป็นครั้งแรกโดย Alec Jeffreys ในปี ค.ศ. 1985 เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อบ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคลหรือสิ่งมีชีวิตด้วยดีเอ็นเอ โดยพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ มีลักษณะคล้ายบาร์โค้ด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละบุคคล โอกาสที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ของคนจะซ้ำกันมีน้อยมาก ๆ เท่ากับ 1 ใน 9,340 ล้าน ซึ่งสูงกว่าจำนวนประชากรในโลกนี้ จึงอาจกล่าวได้ว่าไม่มีโอกาสที่บุคคลจะมีดีเอ็นเอซ้ำกันเลย และดีเอ็นเอที่ปรากฏในลายพิมพ์นั้นมีการถ่ายทอดตามกฎเมนเดล จึงสามารถใช้บอกความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่กับลูกได้ด้วย ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างกว้างขวาง

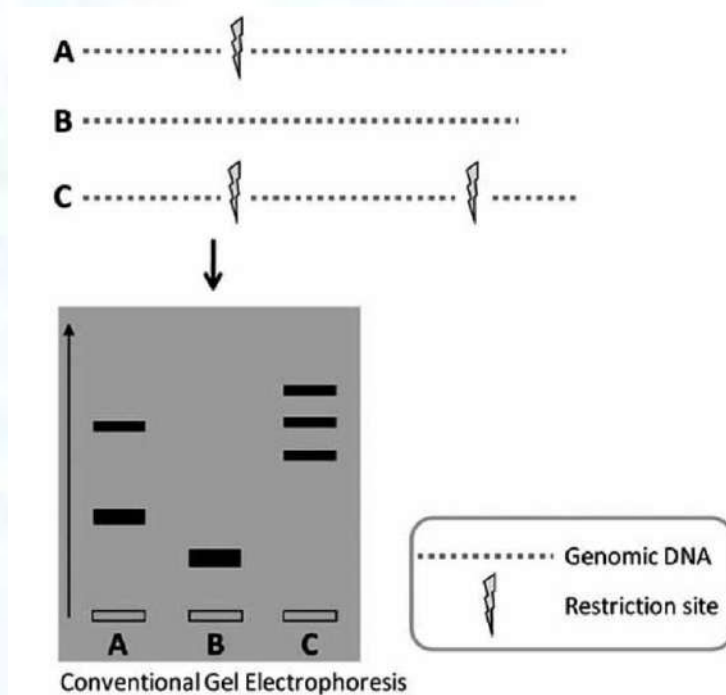
การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะสามารถตรวจสอบ polymorphism ได้ เดิมได้จากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้ายขึ้นดีเอ็นเอที่แยกแล้วทั้งหมดไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) ไฮบริไดซ์กับโพรบ (probe) ซึ่งมาจากดีเอ็นเอส่วนที่เป็นมิโนแซทเทลไลต์ สามารถตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอได้จากหลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อม ๆ กัน เกิดเป็นลายพิมพ์ที่จำเพาะกับแต่ละบุคคล

จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization-based marker) และวิธี polymerase chain reaction (PCR-based marker)

1. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization-based marker)

เป็นวิธีการเดียวกับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบดั้งเดิม คือ ใช้ตัวตรวจสอบ (probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยว และมีความสามารถในการเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมร่วมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) โดยอาศัยหลักการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอคู่สม (DNA hybridization) ความแตกต่างจะอยู่ที่ชนิดของโพรบว่าเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะใช้ตัวตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียงตำแหน่งเดียว (single-locus) ความแตกต่างที่ตรวจพบแสดงถึงความหลากหลายของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนจีโนมนั้น ๆ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันที่ใช้กันมาก คือเครื่องหมาย RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กัน จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ RFLP จะแสดงในลักษณะ co-dominant และสามารถใช้ในการตรวจตำแหน่ง (locus) หนึ่งของโครโมโซมได้ แต่มีข้อจำกัดคือ เป็นวิธีที่ต้องใช้แรงงาน และเวลามาก

เอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะ เรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิมเรียกว่าเกิด polymorphism (รูปที่ 2 - 1)



รูปที่ 2 - 1 แสดงการตัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง (A B และ C) ด้วยเอนไซม์ 1 ชนิด ตัวอย่าง A พบการตัดด้วยเอนไซม์ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ตัวอย่าง B ไม่พบการตัดของเอนไซม์ ได้ชิ้นดีเอ็นเอเหมือนเดิม ส่วนตัวอย่าง C พบการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น (Pereira et al., 2008)

2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีพีซีอาร์ (PCR-based marker)

เป็นการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการศึกษาโดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนเพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ 2 คู่ โดยมีองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด เป็นองค์ประกอบในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ไพรเมอร์ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน คือ การทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เสื่อมสภาพ (denature) จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สม (complementary) กับส่วนปลายของ ดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับดีเอ็นเอนั้น (annealing) และขั้นตอนสุดท้ายเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์โพลีเมอร์เรส เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) มีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน หรือ 1 รอบ โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะ เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (2^n) เมื่อ n คือ จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับเทคนิคที่อาศัยหลักการ PCR มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่

2.1 AFLP (amplified fragment length polymorphisms) คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ซึ่ง adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ และเพิ่มเบสอื่น ๆ อีก 1-4 เบสทางปลาย 3' เป็นส่วนของเบสคัดเลือก ทำให้สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวนมาก ซึ่งสามารถควบคุมจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าป็นตัวเอง เทคนิค AFLP ถูกพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos ในปี ค.ศ. 1993 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะเป็นลักษณะข่ม (Dominant) โดยปรากฏเป็นการมีแถบและไม่มีแถบดีเอ็นเอ

2.2 RAPD (random amplified polymorphic DNA) ถูกพัฒนาขึ้นโดย Welsh and McClelland (1990) และ Williams et al. (1990) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์สายสั้น ๆ ขนาด 10 ถึง 12 เบส ที่เข้าเกาะแบบสุ่มบนส่วนของจีโนม ที่ต้องการตรวจสอบมีข้อดีคือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย มีความสะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย นอกจากนี้ polymorphism ของ RAPD มักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ และแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้

2.3 SSCP (single strand conformational polymorphism) ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสใน PCR product ที่มีขนาดเท่ากัน เทคนิค SSCP สามารถตรวจสอบได้แม้มีความแตกต่างเพียงแค่ 1 เบส โดยนำ PCR product มาทำให้เสียสภาพ (denature) จนอยู่ในสภาพสายเดี่ยวซึ่งแต่ละสายจะมีคุณสมบัติในการจัดเรียงตัวต่างกัน จากนั้นนำไปแยกขนาดใน neutral polyacrylamide gel โดยจะแยกความแตกต่างจากการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างกันแม้เพียง 1 เบส

2.4 SCAR (sequence characterized amplified region) เครื่องหมายชนิดนี้พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดย PCR แบบสุ่มหลายตำแหน่ง เช่น RAPD หรือ AFLP โดยการตัดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD หรือ AFLP แยกออกมา เพื่อนำมาโคลนแล้วหาลำดับเบส ออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่ได้ และเพิ่มปริมาณโดย PCR เมื่อทำการตรวจสอบจะพบความแตกต่างในลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอแบบเดียวกับเครื่องหมายเดิม แต่เป็นการเพิ่มปริมาณ โดย PCR เพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีความแม่นยำ และรวดเร็วกว่า

2.5 SSR (simple sequence repeat) หรือ microsatellite DNA คือ ลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ ความยาว 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกันส่วนใหญ่จะเป็นชุดซ้ำ 2 คู่เบส (dinucleotide) แต่บางครั้งอาจพบชุดซ้ำที่เป็น 3 (trinucleotide) ถึง 4 (tetranucleotide) คู่เบสก็ได้มีการกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช้ยีน (non-coding region) โดยลำดับเบส

ไมโครแซทเทลไลต์มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียวในจีโนม ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลต์เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominant) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ เทคนิค SSR นั้นมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เพื่อการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาด้านจีโนม การสร้างแผนที่จีโนม ทั้งนี้ เพราะ SSR มีอยู่เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนมาก อีกทั้งจำนวนซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์ในชนิด (species) เดียวกัน จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้เป็นอย่างดี ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต

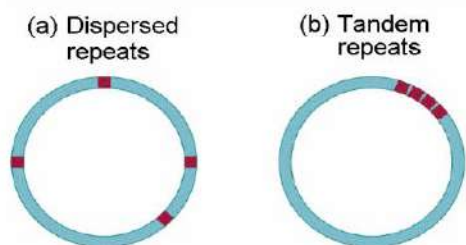
เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite maker)

จีโนมหรือดีเอ็นเอของมนุษย์ประกอบด้วย จีโนมในไมโทคอนเดรียและจีโนมในนิวเคลียส จีโนมในไมโทคอนเดรียมีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่รูปวงแหวนมีขนาด 16,569 คู่เบส โดยเบสเกือบทั้งหมดทำหน้าที่เป็นยีนจำนวน 37 ยีน ส่วนจีโนมในนิวเคลียสมีขนาด 3 พันล้านคู่เบส ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน (gene) มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมดในมนุษย์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

1.1 ส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรม (codon sequence) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีรหัสพันธุกรรม (exon) ที่สามารถถอดรหัสและแปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ได้ โดยส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรมจะน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของส่วนที่เป็นยีน

1.2 ส่วนที่ไม่เป็นรหัส (non-codon sequence) ซึ่งเป็นส่วนของ intron มีจำนวนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของส่วนที่เป็นยีน

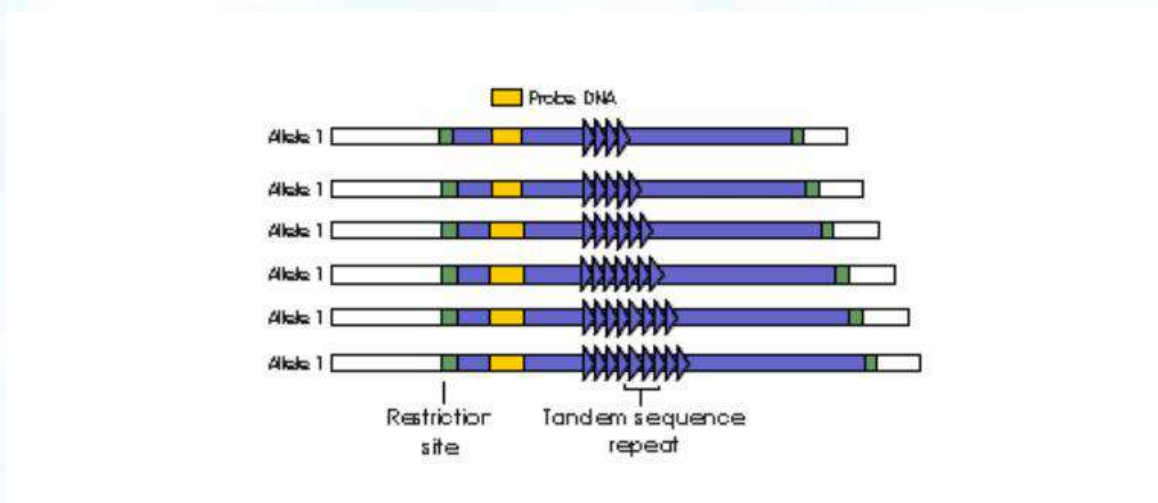


รูปที่ 2 - 2 ลักษณะของดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) และเบสซ้ำกระจาย (dispersed/interspersed repeat) (Klug and Cummings, 2000)

2. ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non gene) พบว่ามีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของ DNA ทั้งหมดในมนุษย์ แบ่งออกได้

2.1 ดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) มีประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของ DNA ส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่ง repetitive DNA แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) และ เบสซ้ำกระจาย (dispersed/interspersed repeat) ดังรูปที่ 2 - 2

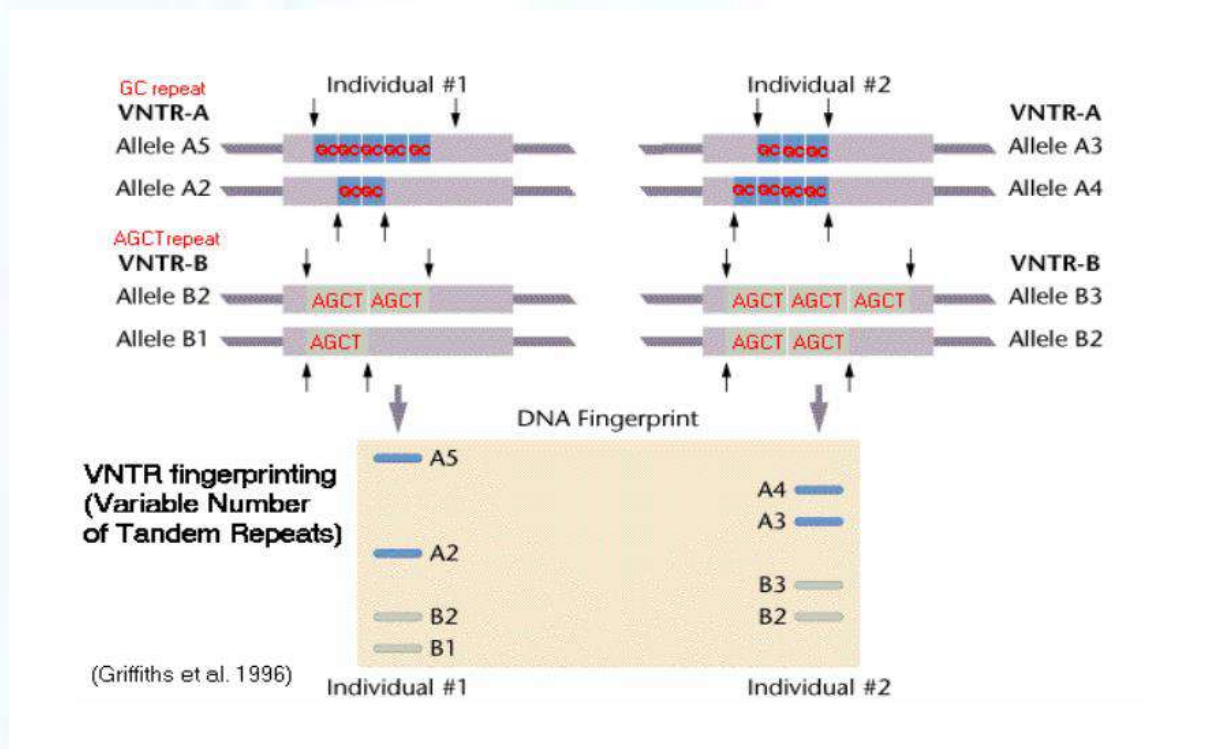
2.1.1 เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) คือ เบสซ้ำที่มีลำดับการเรียงตัวของเบสซ้ำต่อกันเป็น ช่วงยาว ได้แก่ satellite, minisatellite และ microsatellite ซึ่งแบ่งตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ดังนี้ (รูปที่ 2 - 3)



รูปที่ 2 - 3 ความแปรปรวนของจำนวนซ้ำของเบสซ้ำต่อเนื่อง (PDF Word Slide, 2017)

1) satellite (highly repetitive DNA) คือเบสซ้ำยาวขนาด 100-6,500 คู่เบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3 - 10^7 ซ้ำ มักพบบริเวณเซนโทรเมียร์และเทโลเมียร์ ซึ่งพบเพียง 1-2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม

2) minisatellite (moderately repetitive DNA หรือ variable number of tandem repeat; VNTR) คือเบสขนาด 9-100 คู่เบส ที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10 - 1,000 ซ้ำ (รูปที่ 2 - 4) อยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำปานกลาง ส่วนใหญ่อยู่ที่บริเวณเทโลเมียร์ หรือใกล้เทโลเมียร์ และพบกระจายอยู่บนทุกโครโมโซม มินิแซทเทลไลต์ในโลคัสเดียวกันในจีโนมมนุษย์มีความหลากหลายสูง เนื่องจากมีความแตกต่างของจำนวนชุดซ้ำ ทำให้มีชื่อเรียกว่า วีเอ็นทีอาร์ (VNTR) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่นำมาใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism; RFLP) โดย Jeffreys และคณะ ในปี ค.ศ. 1985



รูปที่ 2 - 4 ลักษณะเบสซ้ำต่อเนื่องแบบ Minisatellite DNA หรือ variable number of tandem repeat (PDF Word Slide, 2017)

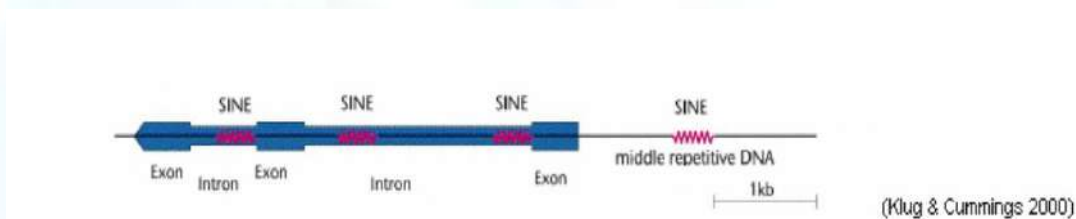
48

3) microsatellite (simple sequence repeats; SSR หรือ short tandem repeats; STR) คือ เบสซ้ำขนาด 1-6 คู่เบส โดยมีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ซ้ำ จึงอาจเรียกว่า เอสเอสอาร์ (simple sequence repeats; SSR) หรือ เอสทีอาร์ (short tandem repeats; STR) พบกระจายอยู่ในบริเวณต่าง ๆ ของจีโนม ไมโครแซทเทลไลต์มีความหลากหลายกว่าดีเอ็นเอเบสซ้ำแบบอื่น ๆ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

2.1.2 เบสซ้ำกระจาย (dispersed/interspersed repeats) คือกลุ่มของเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ในจีโนม ในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มเบสซ้ำแบบต่อเนื่องคือจะไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่องแต่ จะอยู่ในลักษณะเดี่ยว (individual unit) กระจายทั่วไปหลายๆ แห่งในจีโนม ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำ

1) short interspersed elements (SINES) คือ เบสกระจายแบบสั้น มีขนาดประมาณ 130-300 คู่เบส มีจำนวนชุดซ้ำหลายพันชุดกระจายทั่วจีโนม (รูปที่ 2 - 5)

2) long interspersed elements (LINES) คือ เบสกระจายแบบยาว มีขนาดตั้งแต่ 500 คู่เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของจีโนม

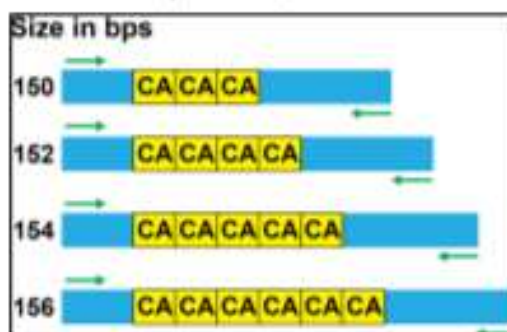


รูปที่ 2 - 5 แสดง Short interspersed element (SINES) เบสซ้ำกระจายแบบสั้น

(Klug and Cummings, 2000)

2.2 ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะ มีประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ของ DNA ส่วนที่ไม่ใช่ยีน

ไมโครแซเทลไลต์เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดยที่โพลีเมอร์พืชมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซเทลไลต์ในโลกัสหนึ่ง ๆ (Powell et al., 1996) โดยทั่วไปไมโครแซเทลไลต์ จะประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) มีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)_n ซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)_n ดังรูปที่ 2 - 6 ซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)_n และ ซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)_n โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ เบสซ้ำเหล่านี้พบกระจายอยู่บริเวณต่าง ๆ ของจีโนม ประมาณ 10⁴ -10⁵ โลกัส เบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบ ๆ เบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า “ไมโครแซเทลไลต์ไพรเมอร์หรือเอสเอสอาร์ไพรเมอร์” ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ซึ่งเป็น ผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ หรือนำมาใช้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ได้ (Morgante and Oliveieri, 1993, Brown et al., 1996, Paterson, 1996, Powell et al., 1996)



รูปที่ 2 - 6 เบสซ้ำต่อเนื่องชนิด ซ้ำสองเบส (di-nucleotide repeat) จำนวนซ้ำที่ต่างกันนำไปสู่ชิ้นส่วน PCR ที่มีความยาวต่างกัน (ลูกศรระบุไพรเมอร์forwardและreverse) (Applied Biosystems, 2014)

คุณสมบัติของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของขนาดโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตแต่ละบุคคล เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยในปี ค.ศ. 1984 Jeffreys และคณะ ใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีและไฮบริโดเซชันโดยใช้ส่วนมินิแซทเทลไลต์หรือ VNTR เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ (restriction enzyme) ทำให้ขนาด และจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดมีรูปแบบแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ยกเว้นในแฝดร่วมไข่ (identical twin) แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้มีหลายประการเช่น ดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบต้องมีคุณภาพดีและสภาพสมบูรณ์ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอมาก ระยะเวลาในการทดสอบนาน อีกทั้งต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์สูงในการทำทดสอบ จึงทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยม ในปัจจุบันนิยมตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะตำแหน่งที่สนใจในบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ หรือเครื่องหมาย short tandem repeats (STR) เนื่องจากทั้งคุณสมบัติของเทคนิคและตำแหน่งดีเอ็นเอมีความเหมาะสมมากกว่าวิธีเดิม กล่าวคือ สามารถใช้ตรวจได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำ ไม่สมบูรณ์และมีปริมาณน้อย ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับสิ่งส่งตรวจในลักษณะเช่นนี้ โดยเฉพาะในปัจจุบันใช้ร่วมกับการตรวจสอบด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) และเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และวิเคราะห์ผลได้ง่ายขึ้น สำหรับคุณสมบัติของเครื่องหมาย STR เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากตำแหน่งต่าง ๆ ของเครื่องหมาย STR ที่นำมาทดสอบอยู่บนโครโมโซมหลายแห่งทำให้มีความสามารถในการแยกแยะบุคคลได้ดี อีกทั้งเครื่องหมาย STR มีขนาดเล็กกว่า VNTR ซึ่งเหมาะสมกับการทดสอบในสิ่งตรวจที่มีคุณภาพต่ำ ไม่สมบูรณ์และมีปริมาณน้อย นอกจากนี้การใช้ VNTR จะทำให้เกิด allelic dropout ได้ง่ายกว่าเครื่องหมาย STR

เอกสารอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Applied Biosystems. 2014. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide. USA. 220 pp. source: <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/4474504.pdf> (accessed 30.07.22)
- Brown, S.M., A. K. Szewc-McFadden and S. Kresovich. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. In. Methods of plant genome analysis: Their merits and pitfalls. Jauhar, P.P. (ed.). CRS Press, Boca raton, FL. U.S.A. Pp. 147-159.

- Butler, J.M. 2001. Forensic DNA Typing: Biology & Technology behind STR markers. Academic Press
- Klug, W.R. and M.R. Cummings. 2000. Concepts of genetics. 6th edition. Prentice Hall. USA. 816 pp.
- Morgante, M. and A.M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3:175-182
- Paterson, A.H. 1996. Genome Mapping in Plants. Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A. 330 p.
- PDF Word Slide. 2017. Nucleic acid. Available source : <https://pdfslide.tips/documents/unit-1-558462f2abc5c.html?page=1>, September 29, 2022.
- Pereira, F. J., A. Carneiro and Amorim. 2008. Identification of species with dna-base technology: current progress and challenges. Recent Pat DNA Gene Seq 2:187-200.
- Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Sci. 1: 215-222.

บทที่ 3

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ

การเก็บสิ่งส่งตรวจเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากขึ้นตอนหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นไม่ว่าจะมีเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ดี ใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยหรือมีผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีความเชี่ยวชาญมากเพียงใดก็ตาม ถ้าสิ่งส่งตรวจเก็บมาไม่ถูกต้องหรือไม่เหมาะสมก็จะทำให้ผลตรวจวิเคราะห์ที่ได้ผิดพลาด ไม่มีความหมายเพราะไม่ได้สะท้อนถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นในตัวอย่างจริงตามที่ผู้ส่งตรวจต้องการ มากกว่านั้นหากนำผลตรวจวิเคราะห์ที่ได้ไปใช้ อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดและอาจเกิดผลเสียต่อการดำเนินงานอื่นที่นำผลไปใช้ได้

จากการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างควรคำนึงถึงข้อปฏิบัติและหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้ ได้แก่ การเก็บตัวอย่างจะต้องมีข้อมูลตัวสัตว์ ชื่อ /หมายเลขประจำตัวสัตว์ อายุ พันธุ์ประวัติ ข้อมูลเจ้าของสัตว์ ที่อยู่/สถานที่ตั้งฟาร์ม ชนิดของตัวอย่าง จำนวนและปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการเก็บ วิธีการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องตามที่ห้องปฏิบัติการกำหนด การติดฉลากสิ่งส่งตรวจให้ถูกต้องตรงกันกับใบนำส่ง การนำส่งตัวอย่างระยะเวลาและการเก็บรักษาตัวอย่างให้ถูกวิธีตามข้อกำหนดและหลักเกณฑ์ของห้องปฏิบัติการ เพื่อหวังผลความถูกต้องของผลตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บที่ถูกต้องวิธี

การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางอณูชีววิทยา (molecular biology)

การตรวจทางอณูชีววิทยาหรือชีวโมเลกุล เป็นการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม (genetic material) โดยเทคนิคเพิ่มจำนวนชุดยีน DNA หรือ RNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เทคนิค real time PCR และ การตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) เป็นต้น ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง ดังนั้นการเก็บตัวอย่างจึงต้องระวังการปนเปื้อนเป็นพิเศษ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างจะต้องสะอาดระวังการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และการปนเปื้อนกันระหว่างตัวสัตว์เอง โดยเฉพาะตัวอย่างสำหรับการตรวจวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นการตรวจที่อาศัยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม ในหลอดทดลองจึงอาจเกิดผลบวกлож (false positive) ได้ง่าย
2. ตัวอย่างจะต้องสด เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงหลังการตายที่อาจจะทำให้เกิดการ เสื่อมสภาพของของสารพันธุกรรม ซึ่งจะมีผลต่อการตรวจทั้งวิธี PCR และ in situ hybridization (ISH)
3. กรณีที่มีปัญหาหรือข้อสงสัยในการเก็บตัวอย่างควรติดต่อห้องปฏิบัติการ

ชนิดของตัวอย่างในการส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการมีหลายชนิด เช่น เลือด น้ำเชื้อแช่แข็ง/น้ำเชื้อสด รากขน เนื้อเยื่อ/ชิ้นเนื้อ เป็นต้น โดยมีรายละเอียดและวิธีการเก็บดังนี้

1. ตัวอย่างเลือด

ชนิดของหลอดเก็บเลือด

ปัจจุบันในทางการแพทย์หลอดสำหรับเก็บตัวอย่างเลือดนั้นถูกพัฒนามาหลายรูปแบบด้วยกัน เพื่อให้มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจทางห้องปฏิบัติการรวมถึงระยะในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดให้มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดตามวัตถุประสงค์ของการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ในการเลือกหลอดเก็บเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับการทดสอบอาจอยู่ในรูป clotted blood, serum หรือ plasma เพื่อให้ได้รูปแบบตัวอย่างเลือดตามที่ต้องการ และเป็นการลดความผิดพลาดในการเก็บตัวอย่างเลือดจึงต้องมีความเข้าใจสิ่งที่อยู่ข้างในหลอดเลือดสีต่างๆ เป็นสารเคมีที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (สารกันเลือดแข็ง) คนละชนิดกันเพราะสารกันเลือดแข็งตัวสามารถที่จะไปรบกวนในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการได้แล้วส่งผลต่อค่าการตรวจวิเคราะห์ได้ โดยแต่ละชนิดก็จะส่งผลการตรวจที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้ทำการเจาะเลือดจึงต้องเก็บสิ่งตัวอย่างให้ถูกต้องตามชนิดการตรวจเพื่อให้การตรวจวิเคราะห์ได้ประสิทธิภาพสูงสุด รายละเอียดเกี่ยวกับสีจุกยางสารกันเลือดแข็งที่ใช้และชนิดของการใช้งานในห้องปฏิบัติการได้ในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3 - 1 แสดงสีจุกหลอดเลือด, สารกันเลือดแข็งที่ใช้ และชนิดของการใช้งานในห้องปฏิบัติการ

สีของจุกหลอดเลือด	ชนิดสารกันเลือดแข็ง	รูปแบบ	การใช้งานทางห้องปฏิบัติการ	หมายเหตุ
แดง	ไม่มี	Clotted Blood 	Chemistry, Immunology Blood Bank (แยกหลอด)	คว่ำหางายหลอดเบา ๆ 6 – 8 ครั้ง (กระตุ้นการแข็งตัวของเลือด)
ม่วง	EDTA	EDTA Blood 	งานโลหิตวิทยา CBC, Hb, Hct, Platelet Count, Hb Typing	คว่ำหางายหลอดเบา ๆ 6 – 8 ครั้ง (ป้องกันเลือดแข็งตัว)
เทา	Fluoride	NaF Blood 	ตรวจหา glucose Lactate และ alcohol	คว่ำหางายหลอดเบา ๆ 6 – 8 ครั้ง (ป้องกันเลือดแข็งตัว)
ฟ้า	Sodium Citrate	Citrate Blood 	ตรวจเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (Coagulation studies) PT, PTT, TT, Fibrinogen, D-Dimer	คว่ำหางายหลอดเบา ๆ 4 ครั้ง (ป้องกันเลือดแข็งตัว)
เขียว	Lithium Heparin	Heparinized Blood 	Chemistry (ยกเว้น Acid Phosphatase), Chromosome, Troponin-T	คว่ำหางายหลอดเบา ๆ 6 – 8 ครั้ง (ป้องกันเลือดแข็งตัว)

(ศูนย์ผลิตและพัฒนาสื่อคอมพิวเตอร์เพื่อการศึกษา, 2021)

ตำแหน่งในการเจาะเก็บเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์แต่ละชนิดจะต้องเลือกเก็บจากตำแหน่งที่เหมาะสมกับชนิดสัตว์นั้น ๆ (ตามตารางที่ 3 - 2) เนื่องจากสัตว์แต่ละชนิดมีรูปร่างและโครงสร้างทางกายวิภาคที่แตกต่างกัน ซึ่งในการเก็บตัวอย่างสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงคือจะต้องไม่ทำให้เกิดความเครียดและความเจ็บปวดต่อสัตว์ ในการบังคับสัตว์ต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่างถูกวิธี เหมาะสมกับสัตว์ชนิดนั้น ๆ และต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวผู้เก็บตัวอย่างรวมทั้งตัวสัตว์เอง ซึ่งจะต้องปฏิบัติตามหลักสวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare) คือ สัตว์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความรู้สึก ต้องไม่ทำให้สัตว์เจ็บปวด ทรมานโดยไม่จำเป็น และการปฏิบัติต่อสัตว์เป็นไปอย่างมีมนุษยธรรม

ตารางที่ 3 - 2 ตำแหน่ง และขนาดเข็มในการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด ซึ่มีในสัตว์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดสัตว์	ตำแหน่ง	เข็มหรืออุปกรณ์การเก็บ	
		ขนาดเข็ม (Gauge)	ความยาว (นิ้ว)
สุนัข	cephalic, saphenous, or jugular vein or femoral artery	21- 26	1.0-1.5
แมว	cephalic, saphenous, or jugular vein or femoral artery	21- 26	1.0
ม้า	jugular vein	18- 20	1.5
โค, กระบือ	jugular, coccygeal, or mammary vein	18- 20	1.5-2.0
แพะ, แกะ	jugular vein	18-20	1.5-2.0
สุกร	anterior vena cava, jugular, or ear vein	18-21	1.0-4.0
ไก่	wing or jugular vein or heart	24-26	1.0-1.5
หนู	orbital sinus, tail clipping	capillary tube	-
กระต่าย	orbital sinus, ear or jugular vein	capillary tube, 22	1.0
ปลา	caudal vein, heart	26	1.0

(เปล่งศรี และคณะ, 2560)

การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้ไซริงค์ (syringe method)

อุปกรณ์ (ดังรูปที่ 3 - 1)

1. เข็มและไซริงค์ชนิดปลอดเชื้อ ขนาดตามที่ต้องการและชนิดของสัตว์
2. สำลีและแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อโรค
3. ถุงมือ หลอดเก็บเลือด เลือกใช้ให้เหมาะสมกับการทดสอบ
4. ภาชนะเก็บรักษาตัวอย่าง rack ใส่ตัวอย่าง ice pack
5. ปากกา permanent



รูปที่ 3 - 1 แสดง อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มและไซริงค์

ขั้นตอนการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด (ดังรูปที่ 3 - 2)

1. บังคับสัตว์ให้อยู่นิ่ง
2. ผู้เจาะล้างมือ เช็ดให้แห้ง สวมถุงมือ และเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ให้พร้อม วางไว้ให้หยิบฉวย ได้สะดวก
3. ตรวจสอบชื่อสัตว์ หมายเลข อายุ เพศ เพื่อป้องกันการผิดพลาดในเก็บตัวอย่างผิดตัว และเขียนลงบนป้ายข้างหลอดเก็บตัวอย่างเลือด

4. หากจำเป็นต้องโกนขนเพื่อความสะดวกในการเจาะเก็บสามารถทำได้หลังจากนั้นทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคบริเวณที่เจาะ โดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์โดยเช็ดลงมาทิศทางเดียวด้วยเทคนิค aseptic technique ห้ามแตะต้องบริเวณที่เช็ดอีก

5. นำเข็มติดเข้ากับไซริงจ์ให้แน่น ดึงปลอกเข็มออก เช็คลูกสูบโดยดึงลูกสูบเข้าออก 1 ครั้ง

6. ใช้นิ้วหัวแม่มือ ข้างหนึ่งกดตึงผิวหนังให้ตึงตรงบริเวณต่ำกว่าจุดที่จะเจาะประมาณ 1 – 2 นิ้ว มืออีกข้างหนึ่งจับไซริงจ์และเข็มที่เตรียมไว้ หายปลายตัดของเข็มขึ้น วางเข็มและไซริงจ์ ท่ามุม 15 - 30 องศากับตำแหน่งที่จะเจาะในทิศทางเดียวกับเส้นเลือด แทะเข็มผ่านผิวหนังเข้าสู่เส้นเลือด หากปลายเข็มอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมเลือดจะไหลเข้าสู่ไซริงจ์

7. เมื่อเลือดไหลเข้าสู่ไซริงจ์ จับไซริงจ์ให้แน่นดึงลูกสูบออกช้าๆ จนได้ปริมาตรเลือดตามที่ต้องการ (พยายามอย่าให้เลือดมีฟองอากาศ)

8. ถอนเข็มออกจากเส้นเลือดพร้อมใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์กดปิดปากแผล

9. ผู้เจาะรับนำเลือดที่เจาะได้ใส่ในหลอดเลือดที่เตรียมไว้โดย

9.1 ในกรณีที่ใช้หลอดเก็บเลือดเป็นหลอดสุญญากาศ ให้แทงเข็มผ่านจุกยางเข้าไป ปลดให้แรงดันสุญญากาศดูดเลือดเข้าไปในหลอดเลือดเอง โดยไม่ต้องดันกระบอกสูบ เมื่อเลือดหยุดไหลเข้าหลอดเลือดให้ดึงเข็มออกจากจุกยาง หลังใส่เลือดลงในหลอดเลือดแล้วให้พลิกหลอดคว่ำลง 6 - 8 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าเลือดไม่แข็งตัว

9.2 ในกรณีที่ใช้หลอดเก็บเลือด ที่ไม่ใช่หลอดสุญญากาศ เปิดจุกหลอด ปลดเข็มออกจากไซริงจ์ก่อนที่จะฉีดเลือดลงในหลอดเลือดโดยดันลูกสูบ เช่น หลอดเลือดที่มีจุกสีฟ้า สีเขียว สีม่วง และสีเทา เป็นต้น หลังใส่เลือดลงในหลอดเลือดแล้ว ให้พลิกหลอดคว่ำลง 6 - 8 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าเลือดไม่แข็งตัว

10. หลังจากสิ้นสุดการถ่ายเลือดลงในหลอดเก็บเลือดแล้ว ให้ปลดเข็มทิ้งในภาชนะหรือกระป๋อง ทิ้งเข็มที่ฝามีรูล็อกเป็นที่ปลดเข็ม

11. ตรวจสอบรายชื่อสัตว์ และรายละเอียดอื่นอีกครั้ง เพื่อเช็คความถูกต้อง

12. เก็บหลอดเลือดใส่ไว้ในกล่องโฟมที่มี ice pack บน rack เก็บตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

13. รวบรวมตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บนำส่งพร้อม เอกสารที่มีรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลตัวอย่างสัตว์ที่เก็บตัวอย่างเลือด โดยนำส่งในกล่องโฟมที่มีความเย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นำส่งห้องปฏิบัติการ ไม่ควรเกิน 7 วันหลังการเก็บตัวอย่างเลือด



รูปที่ 3 - 2 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มและใช้ไซริงค์

การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้ระบบหลอดสุญญากาศ (evacuated tube method)

เป็นการเจาะเลือดโดยเลือด จะถูกดูดเข้าหลอดเลือดที่ใช้เก็บโดยตรง

อุปกรณ์ (รูปที่ 3 - 3)

1. เข็ม 2 ปลาย (multisampling needle) ขนาดตามที่ต้องการและชนิดของสัตว์
2. Holder
3. หลอดเก็บเลือด (evacuated tube) ชนิดต่างๆ เลือกใช้ให้เหมาะสมกับการทดสอบ
4. สำลีและแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อโรค
5. ถุงมือ
6. ภาชนะเก็บรักษาตัวอย่าง rack ใส่ตัวอย่าง ice pack
7. ปากกา permanent



รูปที่ 3 - 3 แสดงอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้ระบบเข็มและหลอดเก็บเลือดสุญญากาศ

58

ขั้นตอนการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด (รูปที่ 3 - 4)

1. บังคับสัตว์ให้อยู่นิ่ง
2. ผู้เจาะล้างมือ เช็ดให้แห้ง สวมถุงมือ และเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ให้พร้อม วางไว้ให้หยิบฉวย ได้สะดวก
3. ตรวจสอบชื่อสัตว์ หมายเลข อายุ เพศ เพื่อป้องกันการผิดพลาดในการเก็บตัวอย่างสัตว์ และเขียนลงบนป้ายข้างหลอดเก็บตัวอย่างเลือด
4. หากจำเป็นต้องโกนขนเพื่อความสะดวกในการเจาะเก็บสามารถทำได้หลังจากนั้นทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคบริเวณที่เจาะ โดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์โดยเช็ดลงมาทิศทางเดียวด้วยเทคนิค aseptic technique ห้ามแตะต้องบริเวณที่เช็ดอีก
5. นำเข็ม 2 ปลายประกอบเข้ากับ holder โดย ใช้ด้านสั้นของเข็ม (ด้านที่มีปลอกยางหุ้มเข็ม และเป็นเกลียว) ใส่เข้าไปใน holder หมุนตามเข็มนาฬิกาจนแน่นสนิท
6. ถอดปลอกเข็มออกใช้นิ้วหัวแม่มือ ข้างหนึ่งกดตึงผิวหนังให้ตึงตรงบริเวณต่ำกว่าจุดที่จะเจาะประมาณ 1 – 2 นิ้ว มืออีกข้างหนึ่งจับ holder และเข็มที่เตรียมไว้ หายปลายตัดของเข็มขึ้น วางเข็มและ holder ทำมุม 15 - 30 องศากับตำแหน่งที่จะเจาะในทิศทางเดียวกับเส้นเลือด แทะเข็มผ่านผิวหนังเข้าสู่เส้นเลือด

7. จับ holder ให้มั่นคงใส่หลอดเลือดด้านที่มีจุกยางเข้าไปใน holder ขณะที่มือข้างถนัดตรงเข็มที่แทงอยู่ในเส้นเลือดไม่ให้ขยับ ส่วนมืออีกข้างเกี่ยวปากของ holder ด้วยนิ้วชี้และนิ้วกลาง ใช้นิ้วโป้งตะก้นหลอดเลือดแล้วดันเข้าโดยให้เข็มที่มียางหุ้มอยู่แทงผ่านจุกยางของหลอดเลือดสุญญากาศ ถ้าเข็มอยู่ในเส้นเลือดในตำแหน่งที่เหมาะสมเลือดจะถูกดูดเข้าหลอดเลือดเองจนถึงปริมาณที่กำหนดและหยุดไหลให้ดึงหลอดเลือดออกจาก holder

8. เมื่อหลอดเลือดแรกมีเลือดไหลเข้าจนถึงปริมาณที่กำหนดและหยุดไหลให้ดึงหลอดเลือดนั้น ออกจาก holder ขณะกำลังจะเปลี่ยนหลอดเลือดต้องจับเข็มให้มั่นคงเพื่อไม่ให้เข็มหลุดออกจากเส้นเลือด จากนั้นให้ใส่หลอดเลือดหลอดใหม่ หลังเจาะเลือดใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง ต้องพลิกหลอดคว่ำขึ้นคว่ำลง 6 - 8 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าเลือดไม่แข็งตัว

9. ถอนเข็มออกจากเส้นเลือดพร้อมใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์กดปิดปากแผล

10. หลังจากสิ้นสุดการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว ให้ปลดเข็มออกจาก holder โดยใช้ปลอกเข็มปลดออกแล้วทิ้งในภาชนะหรือกระป๋อง ทิ้งเข็มที่ฝามีรูล๊อคเป็นที่ปลดเข็ม (ไม่ควรใช้มือใส่ปลอกเข็มคืนก่อนทิ้ง)

11. ตรวจสอบรายชื่อสัตว์ และรายละเอียดอื่นอีกครั้ง เพื่อเช็คความถูกต้อง

12. เก็บหลอดเลือดใส่ไว้ในกล่องโฟมที่มี ice pack บน rack เก็บตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

13. รวบรวมตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บนำส่งพร้อม เอกสารที่มีรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลตัวอย่างสัตว์ที่เก็บตัวอย่างเลือด โดยนำส่งในกล่องโฟมที่มีความเย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นำส่งห้องปฏิบัติการ ไม่ควรเกิน 7 วันหลังการเก็บตัวอย่างเลือด

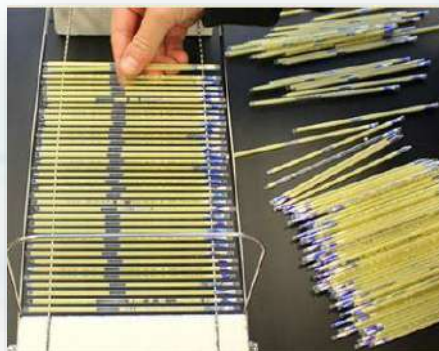


รูปที่ 3 - 4 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้ระบบเข็มและหลอดสุญญากาศ

2. ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสด

อุปกรณ์ (รูปที่ 3 - 5)

1. ปากคีบ
2. กล่องโฟม/กระติกน้ำแข็ง
3. ice pack หรือน้ำแข็งหรือถัง liquid Nitrogen
4. micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (สำหรับน้ำเชื้อสด)
5. หลอดน้ำเชื้อแช่แข็ง



รูปที่ 3 - 5 แสดงอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสด

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็ง

1. ตรวจสอบหมายเลขน้ำเชื้อที่ต้องการส่งตรวจให้ถูกต้อง
2. เก็บตัวอย่างหลอดน้ำเชื้อน้ำแข็งหรือน้ำเชื้อสดใส่ในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทเขียนชื่อ-หมายเลขให้ถูกต้องชัดเจน ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งหรือ ice pack หรือ ถัง liquid nitrogen

3. รวบรวมตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งนำส่งพร้อม เอกสารที่มีรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลตัวอย่างสัตว์ที่เก็บตัวอย่าง โดยนำส่งในกล่องโฟมที่มีความเย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียสหรือในถัง liquid nitrogen นำส่งห้องปฏิบัติการไม่ควรเกิน 7 วันหลังการเก็บตัวอย่าง

3. ตัวอย่างเซลล์รากขน

อุปกรณ์ (รูปที่ 3 - 6)

1. ถุงซิปล็อค หรือ ซองยา สำหรับใส่ตัวอย่างขนหาง
2. สำลี
3. แอลกอฮอล์ 70 %
4. กระติกน้ำแข็งหรือกล่องโฟม
5. น้ำแข็งหรือ ice pack
6. ปากกา permanent
7. กรรไกร



รูปที่ 3 - 6 แสดงอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างเซลล์รากขน

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างรากขน (รูปที่ 3 - 7)

1. บังคับสัตว์ให้อยู่นิ่ง

2. ผู้เก็บตัวอย่างลำมือ เช็ดให้แห้ง สวมถุงมือ และเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ให้พร้อม วางไว้ให้หยิบฉวย ได้สะดวก
3. ตรวจสอบชื่อสัตว์ หมายเลข อายุ เพศ เพื่อป้องกันการผิดพลาดในเก็บตัวอย่างผิดตัว
4. เขียนชื่อโคหรือหมายเลขโค วันที่เก็บตัวอย่างบนถุงซิບหรือซองยา
5. ใช้น้ำล้างทำความสะอาดขนบริเวณพู่หางให้สะอาดและเช็ดให้แห้งก่อนทำการเก็บตัวอย่าง
6. เมื่อขนบริเวณพู่หางแห้ง ทำการเก็บตัวอย่างขนโดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดที่โคนขนทางบริเวณที่จะเก็บตัวอย่าง
7. ดึงขนหางที่ละประมาณ 5 – 10 เส้น โดยจะต้องดึงในทิศทางลง เพื่อให้ได้เซลล์รากขนที่สมบูรณ์ มีคุณภาพดี จำนวนไม่น้อยกว่า 50 เส้น
8. ตัดปลายขนหางที่ดึงมาให้มีความยาวเหลือประมาณ 2 – 3 นิ้ว
9. เก็บขนหางที่มีปลายขนใสในถุงซิບหรือซองยาที่เตรียมไว้ ปิดปากถุงซิບให้สนิทเพื่อไม่ให้น้ำซึมเข้าได้และป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อน (contaminate)
10. เก็บถุงซิບหรือซองยาที่ใส่ตัวอย่างรากขนไว้ในกระติกหรือกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งหรือ ice pack โดยวางไว้ด้านบน
11. รวบรวมตัวอย่างรากขนนำส่งพร้อม เอกสารที่มีรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลตัวอย่างสัตว์ที่เก็บตัวอย่าง โดยนำส่งในกล่องโฟมที่มีความเย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นำส่งห้องปฏิบัติการไม่ควรเกิน 7 วันหลังการเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 3 - 7 แสดงการเก็บเซลล์รากขน

4. ตัวอย่างเนื้อเยื่อ (ชิ้นเนื้อ)

อุปกรณ์ (รูปที่ 3 - 8)

1. ถุงซิปลาสติก หรือ ซองยา สำหรับใส่ตัวอย่างเนื้อเยื่อ
2. กระติกน้ำแข็งหรือกล่องโฟม
3. น้ำแข็งหรือ ice pack
4. ปากกา permanent
5. กรรไกรหรือใบมีดผ่าตัดพร้อมด้าม
6. ปากคีบ



รูปที่ 3 - 8 แสดงอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ (รูปที่ 3 - 9)

1. ผู้เก็บตัวอย่างล้างมือ เช็ดให้แห้ง สวมถุงมือ และเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ให้พร้อม วางไว้ให้หยิบฉวยได้สะดวก

2. ตรวจสอบชื่อสัตว์ หมายเลข อายุ เพศ เพื่อป้องกันการผิดพลาดในเก็บตัวอย่างติดตัว
3. เขียนรายละเอียดของตัวอย่างบนถุงซิปลาสติกให้ชัดเจน เช่น ชื่อ/ หมายเลขสัตว์ ชนิดสัตว์ ชื่อเจ้าของตัวอย่าง เป็นต้น
4. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อขนาดไม่น้อยกว่า $2.5 \times 2.5 \times 1.0$ ซม. (กว้าง x ยาว x หนา) จำนวนไม่น้อยกว่า 2 ชิ้นต่อหนึ่งตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อในถุงซิปลาสติกที่เตรียมไว้ข้างต้น ปากถุงปิดสนิท เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
5. กรณีไม่ได้นำส่งทันที ให้แช่แข็งตัวอย่าง
6. กรณีส่งทันที ให้เก็บรักษาตัวอย่างในภาชนะเก็บความเย็น เช่น กระติกน้ำแข็งหรือกล่องโฟมที่มีฝาปิดสนิท บรรจุน้ำแข็งหรือ ice pack โดยมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง $2 - 15^{\circ}\text{C}$ เพื่อไม่ให้ตัวอย่างเสื่อมสภาพ
7. นำส่งพร้อมเอกสารที่มีรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลตัวอย่างสัตว์ที่เก็บตัวอย่าง



รูปที่ 3 - 9 แสดงการเก็บเนื้อเยื่อ (ชิ้นเนื้อ)

การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยหลักการดังนี้

- 1) ทำลายผนังเซลล์ (cell wall lysis) โดยใช้สาร lysozyme (นิยมใช้ในโปรคาริโอต) หรือใช้สาร detergent (นิยมใช้ในยูคาริโอต) อาทิ sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium lauroyl sarcosinate

2) การย่อยโปรตีน และอาร์เอ็นเอ โดยใช้ protease และ RNase ตามลำดับ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform (บางครั้งอาจเติมเกลือเช่น sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน)

3) ตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ cool absolute ethanol (อาจเติมเกลือ sodium acetate ด้วย) โดยเกิด dehydrate water ออกจากสายดีเอ็นเอจากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer เก็บที่ -20°C

การสกัดดีเอ็นเอไม่ว่าจากเซลล์พืช เซลล์สัตว์หรือเซลล์แบคทีเรียมีหลักการคล้ายๆ กันคือ ต้องทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีหรือวิธีการต่างๆ แล้วค่อยๆ กำจัดส่วนต่างๆ ที่ไม่ต้องการออกไปให้เหลือเฉพาะดีเอ็นเอไว้ ตกตะกอนดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ พยายามให้มีสารปนเปื้อนอยู่น้อยที่สุดและต้องเตรียมดีเอ็นเอให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะนำไปใช้ได้ต่อไป ดีเอ็นเอที่แยกออกมาได้จะต้องมีปริมาณมากและมีคุณภาพดีซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีต่างๆ ซึ่งทำได้ไม่ยากนักเช่น วัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm. diphenyl amine test และ agarose gel electrophoresis เป็นต้น

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ด้วยชุดสกัด QIAGEN®

หลักการ

การทำให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแตกโดยใช้ proteinase K และ buffer AL แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol กำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ ผ่านตัวกรอง โดยดีเอ็นเอจะติดอยู่ที่ตัวกรอง และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการล้างด้วย buffer AW1 และ buffer AW2 จากนั้นละลาย ดีเอ็นเอด้วย buffer AE

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
4. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาณน้อย (microvolume spectrophotometer)
5. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)
6. ตู้แช่แข็ง -20°C
7. ตู้เย็น $2-8^{\circ}\text{C}$

อุปกรณ์

1. QIAamp mini spin column (มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ)
2. collection tube ขนาด 2 ml (มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ)

3. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
4. micropipette ขนาด 0.5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 10-100 µl, 20-200 µl และ 100-1,000 µl
5. pipette tips ขนาด 0.5-20 µl, 1-10 µl, 1-200 µl และ 1,000 µl

สารเคมี

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วย
 - 1.1 proteinase K
 - 1.2 buffer AL
 - 1.3 buffer AW1
 - 1.4 buffer AW2
 - 1.5 buffer AE
2. ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (รูปที่ 3 - 10)

1. นำตัวอย่างเลือดตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 - 20 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิของตัวอย่างให้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง
2. นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 x g (RCF) หรือ 4,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส
3. ดูด buffy coat ประมาณ 200 µl ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
4. เติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
5. เติมสารละลาย buffer AL ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 15 วินาทีและ spin down ให้สารละลายมา รวมกันที่ก้นหลอด
6. บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เพิ่มเวลาบ่มได้ตามความเหมาะสม) แล้ว spin down ให้สารละลาย มารวมกันที่ก้นหลอด
7. เติม ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%) ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 15 วินาที และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
8. ดูดสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ใน QIAamp mini spin column (อยู่ใน collection tube ขนาด 2 ml)

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที หากยังมีสารละลายเหลืออยู่ใน column ให้เพิ่มความเร็วรอบ แล้วปั่นจนกว่าเมมเบรนแห้งหรือไม่มีสารละลาย
10. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer AW1 ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที
11. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer AW2 ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที
12. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อให้เมมเบรนแห้ง
13. ทิ้ง collection tube แล้วนำ QIAamp mini spin column ไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่
14. เติมสารละลาย buffer AE ปริมาตร 50 - 200 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 - 5 นาที
15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที
16. วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer) โดยค่าความบริสุทธิ์ (260/280) ควรมีค่าประมาณ 1.8 - 2.0 และคำนวณการเตรียมความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10 ng/ μ l หรือความเข้มข้นของแต่ละวิธีที่ระบุ ลงในแบบบันทึกผลการวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ



รูปที่ 3 - 10 แสดงการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ ด้วยชุดสกัด QIAGEN®

หลักการ

การทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้ม nucleus แตก ด้วย buffer ATL, proteinase K และ buffer AL แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol กำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการผ่านตัวกรอง โดยดีเอ็นเอจะติดอยู่ที่ตัวกรอง และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการล้างด้วย buffer AW1 และ buffer AW2 จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย buffer AE

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก (electronic balance)
2. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (thermoblock)
6. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
7. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)
8. ตู้แช่แข็ง -20°C
9. ตู้เย็น $2-8^{\circ}\text{C}$

68

อุปกรณ์

1. QIAamp mini spin column (มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ)
2. collection tube ขนาด 2 ml (มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ)
3. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
4. micropipette ขนาด 0.5-10 μl , 2-20 μl , 5-50 μl , 10-100 μl , 20-200 μl และ 100-1,000 μl
5. pipette tips ขนาด 0.5-20 μl , 1-10 μl , 1-200 μl และ 1,000 μl

สารเคมี

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วย
 - 1.1 proteinase K
 - 1.2 buffer ATL
 - 1.3 buffer AL
 - 1.4 buffer AW1
 - 1.5 buffer AW2

1.6 buffer AE

2. ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที เพื่อปรับอุณหภูมิของตัวอย่างให้ใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง

2. เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ ขนาดไม่เกิน 25 mg แล้วตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

3. เติม buffer ATL ปริมาตร 180 µl และ proteinase K ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ผสมสาร (vortex mixer) และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

4. บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จนเกิดการย่อยโดยสมบูรณ์ (ใช้เวลาประมาณ 1-3 ชั่วโมง) สามารถ vortex ระหว่างบ่มได้ เป็นระยะ ๆ

5. เติม buffer AL ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 15 วินาที แล้ว spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

6. บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไป spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

7. เติม ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%) ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 15 วินาที แล้วนำไป spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

8. ดูดสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ใส่ใน QIAamp mini spin column (อยู่ใน collection tube ขนาด 2 ml) นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

9. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer AW1 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

10. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer AW2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

11. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด buffer AW2 ที่ยังคงอยู่ในตัวอย่าง

12. ทิ้ง collection tube แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่

13. เติม buffer AE ปริมาตร 50 - 200 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที

14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

15. วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer) โดยค่าความบริสุทธิ์ (260/280) ควรมีค่าประมาณ 1.8 - 2.0 และคำนวณการเตรียมความเข้มข้น ดีเอ็นเอ 10 ng/ μ l หรือความเข้มข้นของแต่ละวิธีที่ระบุ ลงในแบบบันทึกผลการวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเชื้อ ด้วยชุดสกัด QIAGEN®

หลักการ

การสกัดดีเอ็นเอ ให้ทำการล้างและกำจัดสิ่งปนเปื้อนในน้ำเชื้อออก จากนั้นทำการย่อยโปรตีนที่อยู่ในส่วนหัวของสเปิร์ม ด้วยสารละลายไดไธโอไธรีทอล (dithiothreitol, DTT) proteinase K, buffer ATL และ buffer AL แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol กำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการผ่านตัวกรอง โดยดีเอ็นเอจะติดอยู่ที่ตัวกรอง และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการล้างด้วย buffer AW1 และ buffer AW2 จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย buffer AE

เครื่องมือ

1. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (thermoblock)
5. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
6. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)
7. ตู้แช่แข็ง -20°C
8. ตู้เย็น $2-8^{\circ}\text{C}$

อุปกรณ์

1. QIAamp mini spin column (มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ)
2. collection tube ขนาด 2 ml (มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ)
3. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
4. micropipette ขนาด 0.5-10 μ l, 2-20 μ l, 5-50 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l และ 100-1,000 μ l

5. pipette tips ขนาด 0.5-20 μ l, 1-10 μ l, 1-200 μ l และ 1,000 μ l

สารเคมี

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

- 1.1 proteinase K
- 1.2 buffer ATL
- 1.3 1M DTT (dithiothreitol)
- 1.4 buffer AL
- 1.5 buffer AW1
- 1.6 buffer AW2
- 1.7 buffer AE

2. ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1. นำตัวอย่างน้ำเชื้อจำนวน 1 หลอด ประมาณ 250 - 500 μ l ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

2. เติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 20 μ l และ buffer ATL ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) นาน 10 วินาที และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

3. บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทุกๆ 10 นาทีให้นำมา vortex นาน 10 วินาที จากนั้น spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือส่วนที่เป็นตะกอนประมาณ 30 μ l

5. เติม buffer ATL ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้งให้เหลือประมาณ 30 μ l โดยไม่รบกวนส่วนที่เป็นตะกอน

6. ทำซ้ำข้อ 5 ไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง

7. เติม buffer ATL ปริมาตร 280 μ l สารละลาย proteinase K ปริมาตร 10 μ l และสารละลาย 1M DTT ปริมาตร 10 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 10 วินาทีและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

8. บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทุกๆ 10 นาทีให้นำมา vortex นาน 10 วินาที จากนั้น spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

9. เติม buffer AL ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 10 วินาที และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

10. บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทุกๆ 3 นาที นำมา vortex นาน 10 วินาที จากนั้น spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูตัวอย่างส่วนที่เป็นของเหลวใสลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ กรณีไม่เหลือตะกอนให้ใช้ microcentrifuge tube เดิม

12. เติม ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%) ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 15 วินาที แล้วนำไป spin down เพื่อไม่ให้ตัวอย่างติดกับฝาหลอด

13. ดูดสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ใน QIAamp mini spin column (อยู่ใน collection tube ขนาด 2 ml) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

14. เทสารละลายทิ้งแล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer AW1 ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

15. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer AW2 ปริมาตร 700 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

16. เทสารละลายทิ้งแล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ เติม ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%) ปริมาตร 700 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

17. เทสารละลายทิ้ง แล้วนำ QIAamp mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เมมเบรนแห้ง

18. ทิ้ง collection tube แล้วนำ QIAamp mini spin column ไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หรือบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

19. เติม buffer AE ปริมาตร 20 - 50 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 - 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 1 นาที

20. วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาณน้อย (microvolume spectrophotometer) โดยค่าความบริสุทธิ์ (260/280) ควรมีค่าประมาณ 1.8 - 2.0 และ

คำนวณการเตรียมความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10 ng/μl หรือความเข้มข้นของแต่ละวิธีที่ระบุ ลงในแบบบันทึกผลการวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

4. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดด้วยการใช้สารคีเล็กซ์ (chelex)

หลักการ

การทำให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแตกโดยใช้ proteinase K หรือ protease และ ใส่ 5% chelex เพื่อเข้าไปจับกับ Mg^{2+} เป็นการกำจัด Mg^{2+} ออกให้หมด หลังจากนั้นนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเพื่อทำลายเอนไซม์ proteinase K หรือ protease และโปรตีน หลังจากนั้นนำส่วนใสไปหาปริมาณดีเอ็นเอและนำไปใช้งานต่อไป

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer)
4. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)
5. ตู้แช่แข็ง -20°C
7. ตู้เย็น $2-8^{\circ}\text{C}$

อุปกรณ์

1. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 – 2.0 ml
2. micropipette ขนาด 0.5-10 μl, 2-20 μl, 5-50 μl, 10-100 μl, 20-200 μl และ 100-1,000 μl
3. pipette tips ขนาด 0.5-20 μl, 1-10 μl, 1-200 μl และ 1,000 μl

สารเคมี

1. proteinase K
2. น้ำกลั่น
3. 5% chelex

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1. นำตัวอย่างเลือดตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 - 20 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิของตัวอย่างให้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง

2. นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 x g (RCF) หรือ 4,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 15 - 25 องศาเซลเซียส
3. ดูด buffy coat ประมาณ 200 µl ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
4. เติมน้ำกลั่น 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยการคว่ำหลอดไปมา และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 - 5 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทน้ำใส่ออกให้มากที่สุด (เหลือตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่ที่ก้นหลอด)
6. เติมน้ำกลั่น 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยการคว่ำหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทน้ำใส่ออกให้มากที่สุด
7. เติม 5% chelex 100 µl ลงในหลอด เขย่าเบา ๆ
8. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที
9. ตั้งทิ้งไว้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปวัดปริมาณดีเอ็นเอ
10. วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer) โดยค่าความบริสุทธิ์ (260/280) ควรมีค่าประมาณ 1.8 - 2.0 และ คำนวณการเตรียมความเข้มข้น ดีเอ็นเอ 10 ng/ul หรือความเข้มข้นของแต่ละวิธีที่ระบุ ลงในแบบบันทึก ผลการวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 °C

5. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากขน ด้วยเทคนิค salting out

หลักการ

ทำการย่อยผนังเซลล์รากขนด้วย 10% SDS, proteinase K และ white cell lysis buffer แล้ว ตกตะกอนโปรตีนด้วย 5.3 M NaCl หลังจากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยการล้างด้วย 70% ethanol จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย buffer AE

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
2. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (thermoblock)
5. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer)
6. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)

7. ตู้แช่แข็ง -20°C

8. ตู้เย็น $2 - 8^{\circ}\text{C}$

อุปกรณ์

1. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

2. micropipette ขนาด 0.5 - 10 μl , 2 - 20 μl , 10 - 100 μl , 20 - 200 μl และ 100 - 1,000 μl

3. pipette tips ขนาด 0.5 - 20 μl , 1 - 200 μl และ 1,000 μl

สารเคมี

1. proteinase K

2. white cell lysis buffer ประกอบด้วย

2.1 potassium chloride (KCl)

2.2 tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-HCl)

2.3 magnesium chloride (MgCl_2)

3. sodium dodecyl sulfate (SDS)

4. sodium Chloride (NaCl)

5. buffer AE

6. ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%)

7. hydrochloric acid

8. น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ (deionized water: DW)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1. นำเส้นขนมาล้างด้วยน้ำ deionized water (DW) และ absolute alcohol เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมา แล้วซับให้แห้ง

2. ตัดส่วนที่มีปมรากขนจำนวน 20 - 30 รากขน ให้มีความยาวประมาณ 0.5 ซม. ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

3. เติมสารละลาย white cell lysis buffer (WCLB) ปริมาตร 350 μl

4. เติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 50 μl และ proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 μl ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
5. บ่มที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง แล้ว spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
6. เติมสารละลายเกลือ 5.3 M NaCl ปริมาตร 175 μl ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที
7. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน ประมาณ 300 μl ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม ethanol (ความเข้มข้น 96 - 100%) ปริมาตร 1,000 μl ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือส่วนที่เป็นตะกอน ประมาณ 30 μl
9. เติม 70% ethanol ปริมาตร 1,000 μl เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือส่วนที่เป็นตะกอน
10. ทำซ้ำข้อ 8.9 ไม่น้อยกว่า 2 ครั้ง
11. ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 - 15 นาที หรือจนกว่า microcentrifuge tube แห้ง
12. เติมสารละลาย buffer AE ปริมาตร 50 μl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 - 5 นาที ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้ว spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
13. นำไปวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (microvolume spectrophotometer) โดยค่าความบริสุทธิ์ (260/280) ควรมีค่าประมาณ 1.8 - 2.0 และคำนวณการเตรียมความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10 ng/ μl หรือความเข้มข้นของแต่ละวิธีที่ระบุลงในแบบบันทึกผลการวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

6. การสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดดีเอ็นเอ แบบอัตโนมัติ (รูปที่ 3 - 11)

หลักการ

ใช้หลักการ magnetic particle technology ในการสกัดสารพันธุกรรม โดยทำให้เซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์แตกโดยใช้ lysis/binding จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกนำพาไปด้วยแม่เหล็กทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างด้วย wash solution 1 และ wash solution 2 จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย elution buffer

เครื่องมือ

1. เครื่องสกัดสารพันธุกรรม แบบอัตโนมัติ

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
3. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
4. เครื่องบดสลายตัวอย่างเนื้อเยื่อและเซลล์ (homogenizer)
5. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)
6. ตู้แช่แข็ง -20°C
7. ตู้เย็น $2-8^{\circ}\text{C}$
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก (electronic balance)

อุปกรณ์

1. tip combs (มาพร้อมกับชุดสกัด)
2. plates and elution strips (มาพร้อมกับชุดสกัด)
3. เม็ดปิดบดขนาดเล็ก (มาพร้อมกับชุดสกัด)
4. microcentrifuge tube ขนาด 0.6 ml และ 1.5 ml
5. centrifuge tube ขนาด 15 ml และ 50 ml
6. micropipette ขนาด 0.5-10 μl , 2-20 μl , 10-100 μl , 20-200 μl และ 100-1,000 μl
7. pipette tips ขนาด 0.5-20 μl , 1-200 μl และ 1,000 μl

สารเคมี

1. ชุดสกัด ประกอบด้วย
 - 1.1 nucleic acid binding beads
 - 1.2 lysis/binding solution concentrate
 - 1.3 wash solution 1 concentrate
 - 1.4 wash solution 2 concentrate
 - 1.5 elution buffer
 - 1.6 carrier RNA
 - 1.7 lysis enhancer
2. isopropanol (ความเข้มข้น 100%)
3. 1X PBS pH 7.4

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

การสกัดในตัวอย่าง เลือด

1. การเตรียม lysis/binding solution ตามส่วนผสมดังตารางที่ 3 – 3

ตารางที่ 3 - 3 การเตรียม lysis/binding solution

สารเคมี	ปริมาตร
lysis/binding solution concentrate	200 µl
carrier RNA (µg/µl)	2 µl
100% isopropanol	200 µl
total volume (1 reaction)	402 µl

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

2. การเตรียม bead mix ตามส่วนผสมดังตารางที่ 3 – 4

ก่อนการเตรียม นำ nucleic acid binding beads มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

ตารางที่ 3 - 4 การเตรียม bead mix (เตรียมบนน้ำแข็ง)

สารเคมี	ปริมาตร
nucleic acid binding beads	10 µl
lysis enhancer	10 µl
total volume (1 reaction)	20 µl

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

3. การเตรียมตัวอย่างเลือด

กลับหลอดเก็บเลือดไปมา ประมาณ 5-6 รอบ

4. การเตรียม plate (use 96 DW plate) ทั้งหมด 7 plate

4.1 plate 1 sample : เติม 20 µl bead mix, เติมเลือด 100 µl เติม lysis/binding solution 400 µl ในแต่ละหลุม

4.2 plate 2 & 3 wash 1 : เติม 300 µl washing solution 1

4.3 plate 4 & 5 wash 2 : เติม 450 µl washing solution 2

4.4 plate 6 standard: เติม elution buffer 90 µl

4.5 plate 7 standard: วาง tip comb

5. นำเข้าเครื่อง KingFisher Apex เลือกโปรแกรม “MagMAX Pathogen Std Volume Apex”

6. เมื่อเครื่องทำงานเสร็จนำ plate ออกจากเครื่อง และเปิด UV 30 นาที

การสกัดในตัวอย่างน้ำเชื้อ

1. การเตรียม lysis/binding solution ตามส่วนผสมดังตารางที่ 3 – 5

ตารางที่ 3 - 5 การเตรียม lysis/binding solution

สารเคมี	ปริมาตร
lysis/binding solution concentrate	150 µl
carrier RNA (µg/µl)	1 µl
total volume (1 reaction)	151 µl

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

2. การเตรียม bead mix ตามส่วนผสมดังตารางที่ 3 – 6

ก่อนการเตรียม นำ nucleic acid binding beads มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

ตารางที่ 3 - 6 การเตรียม bead mix (เตรียมบนน้ำแข็ง)

สารเคมี	ปริมาตร
nucleic acid binding beads	10 µl
lysis enhancer	10 µl
total volume (1 reaction)	20 µl

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

3. การเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อ

- 3.1 เติม lysis/binding solution ปริมาตร 150 µl ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
- 3.2 ทำการ vortex น้ำเชื้อที่จะสกัดด้วยความแรงสูงสุด 15 วินาที
- 3.3 เติมน้ำเชื้อ 100 µl ลงในหลอด lysis/binding solution
- 3.4 ทำการ vortex น้ำเชื้อที่จะสกัดด้วยความแรงสูงสุด 3 นาที (ใช้เครื่อง Binder Bullet vortex ตั้ง speed 2 time 3 min)
- 3.5 นำไป centrifuge at 16,000 x g (หรือความเร็วสูงสุด) 2 นาที เพื่อให้ได้ส่วนใสด้านบน

4. การเตรียม plate (use 96 DW plate) ทั้งหมด 7 plate

- 4.1 plate 1 sample : เติม 20 µl bead mix, เติม 115 µl ของส่วนใสน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ และ เติม 65 µl 100% Isopropanol ในแต่ละหลุม (เตรียมที่หลัง)
- 4.2 plate 2 & 3 wash 1 : เติม 150 µl washing solution 1
- 4.3 plate 4 & 5 wash 2 : เติม 150 µl washing solution 2
- 4.4 plate 6 standard: เติม elution buffer 60 µl
- 4.5 plate 7 standard: วาง tip comb

5. นำเข้าเครื่อง KingFisher Apex เลือกโปรแกรม “MagMAX Pathogen Std Volume Apex”

6. เมื่อเครื่องทำงานเสร็จนำ plate ออกจากเครื่อง และเปิด UV 30 นาที

การสกัดในตัวอย่างชิ้นเนื้อ และซีรัม

1. การเตรียม lysis/binding solution ตามส่วนผสมดังตารางที่ 3 – 7

ตารางที่ 3 - 7 การเตรียม lysis/binding solution

สารเคมี	ปริมาตร
lysis/binding solution concentrate	350 µl
carrier RNA (µg/µl)	2 µl
100% isopropanol	350 µl
total volume (1 reaction)	702 µl

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

2. การเตรียม bead mix ตามส่วนผสมดังตารางที่ 3 - 8

ก่อนการเตรียม นำ nucleic acid binding beads มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

ตารางที่ 3 - 8 การเตรียม bead mix (เตรียมบนน้ำแข็ง)

สารเคมี	ปริมาตร
nucleic acid binding beads	10 µl
lysis enhancer	10 µl
total volume (1 reaction)	20 µl

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

3. การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ

3.1 ตัดชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเล็กๆ ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วเติม of 1X PBS, pH7.4 ปริมาตร 1 ml

3.2 ใส่เม็ดปิดบดขนาดเล็ก นำเข้าเครื่อง homogenizer (ใช้เครื่อง binder bullet vortex ตั้ง speed 10 time 5 min)

3.3 นำไป centrifuge at 16,000 x g (หรือความเร็วสูงสุด) 1 นาที เพื่อให้ได้น้ำส่วนใสด้านบน

4. การเตรียม plate (use 96 DW plate) ทั้งหมด 7 plate

4.1 plate 1 sample : เติม 20 µl bead mix เติมน้ำส่วนใสของชิ้นเนื้อหรือซีรัม 300 µl
เติม lysis/binding solution 700 µl ในแต่ละหลุม

4.2 plate 2 & 3 wash 1 : เติม 300 µl washing solution 1

4.3 plate 4 & 5 wash 2 : เติม 450 µl washing solution 2

4.4 plate 6 standard: เติม elution buffer 90 μ l

4.5 plate 7 standard: วาง tip comb

5. นำเข้าเครื่อง KingFisher Apex เลือกโปรแกรม “MagMAX Pathogen Std Volume Apex”

6. เมื่อเครื่องทำงานเสร็จนำ plate ออกจากเครื่อง และเปิด UV 30 นาที



รูปที่ 3 - 11 เครื่องสกัดดีเอ็นเออัตโนมัติ

การเตรียมสารละลาย PBS 10X และ 1X pH 7.4

1. การเตรียมสารละลาย 10X PBS pH 7.4

ชั่ง 80 g NaCl + 2 g KCl + 14.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 2.4 g KH_2PO_4



ละลายน้ำ(DW) ประมาณ 800 ml (ปรับ pH 7.4 ด้วย 1N NaOH หรือ 20% HCl)



ปรับปริมาตรด้วยน้ำ(DW) ครบ 1,000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. การเตรียมสารละลาย 1X PBS pH 7.4

ตวง 10X PBS pH 7.4 มาปริมาตร 100 ml



ปรับปริมาตรด้วยน้ำ(DW) ครบ 1,000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงดึงดูด (Nanodrop spectrophotometer: Nanodrop ND-1000, USA) ดังรูปที่ 3 - 12 โดยใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง โดยทำการวัดที่ค่าการดูดซับแสง (Absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้คือนาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงควรมีค่าเท่ากับ 1.8 – 2.0 ($A260/A280 = 1.8 - 2.0$) หากค่า สัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน ฟีนอล หรือสารเคมี อื่น ๆ



รูปที่ 3 - 12 เครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงดึงดูด (Nanodrop spectrophotometer: Nanodrop ND-1000, USA)

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปศุสัตว์ด้วยไมโครแซทเทลไลต์

การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรืออัตลักษณ์ในปศุสัตว์โดยใช้โดยใช้เครื่องหมายโครแซทเทลไลท์ที่ได้รับการอ้างอิงจาก ISAG (international society for animal genetics) ซึ่งเป็นการตรวจหาลำดับเบสซ้ำ (short tandem repeats, STR) ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ซิงเกิ้ล และตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยประมวลผลออกมาเป็นขนาดของลำดับเบสซ้ำในแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม GeneMapper ทั้งนี้การวิเคราะห์และแปลผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอใช้หลักการเดียวกันในปศุสัตว์แต่ละชนิดโดยมีความแตกต่างกันที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้สำหรับสัตว์แต่ละชนิด และการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescents dye) ของเครื่องหมาย STR ในแต่ละชุดตรวจ

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) โค

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ เช่น ตัวอย่างเลือด น้ำเชื้อ ชี้นเนื้อ รากขน เป็นต้น ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ พร้อมเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง ให้ความเข้มข้นประมาณ 10 ng/ μ l

2. ชุดควบคุมผลบวก (positive control) bovine control DNA (20 ng/ μ l) ใช้ที่เตรียมเป็น working solution ในอัตราส่วน 1:8 (bovine control DNA 1 μ l: DW 7 μ l) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 ถึง -25 °C

3. ชุดควบคุมผลลบ (negative control) (ใช้ตัวอย่างน้ำ DW ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix)

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR (PCR amplification)

4.1 คำนวณสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR master mix) ตามการคำนวณในตารางที่ 3 - 9 ให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้งเพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น จำนวนตัวอย่าง ทดสอบ 10 ตัวอย่าง ให้คำนวณปริมาณสารละลายเป็น 11.0 ตัวอย่าง และบันทึกลงแบบบันทึกการทำ PCR และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 3 - 9 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
StockMarks PCR buffer	-	1.5 μ l	16.50 μ l
dNTP mix	1.25 mM	2.0 μ l	22.0 μ l
Amplification primer mix	-	2.75 μ l	30.25 μ l
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	5 U/ μ l	0.25 μ l	2.75 μ l
DW	-	0.5 μ l	5.5 μ l
Total Volume	-	7.0 μ l	77.0 μ l

4.2 เตรียมสารละลาย PCR master mix ในตู้เตรียมสารสำหรับงาน PCR โดยใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามที่คำนวณได้ในข้อ 4.1 (ตารางที่ 3-9) ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

4.3 ใช้ micropipette ดูด PCR master mix ในข้อ 4.2 ปริมาตร 7.0 μ l / 1 ตัวอย่างทดสอบ ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml

- 4.4 ใช้ micropipette ดูด น้ำ DW (negative control) ในข้อ 3 ปริมาตร 0.5 µl ลงใน PCR tube 0.2 ml ในข้อ 4.3
- 4.5 ใช้ micropipette ดูด control DNA ในข้อ 2 ปริมาตร 0.5 µl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3
- 4.6 ใช้ micropipette ดูดดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 10 ng/µl ในข้อ 1 ปริมาตร 0.5 µl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3
- 4.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
- 4.8 ตั้งค่า PCR condition ตามตารางที่ 3 - 10 และบันทึกลงในแบบบันทึกการทำ PCR ใช้ mode 9600 ในการทำงาน (run)
- 4.9 นำ PCR tube จากข้อ 4.7 ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม กดปุ่ม start

ตารางที่ 3 - 10 พารามิเตอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

step	Temp. (°C)	Ramp rate	time	cycles
initial denaturation	95	-	10 min	1
denaturation	94	-	45 sec	} 31
annealing	61	50%	45 sec	
extension	72	80%	1 min	
hold	72	-	60 min	1
initial denaturation	4	-	Hold	∞

5. การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิด 8 เส้น รุ่น 3500

- 5.1 เตรียม PCR product ที่ได้ในข้อ 4.9 เจือจางในอัตราส่วน 1:7 (DW 6 µl : PCR product 1 µl)
- 5.2 เตรียม MicroAmp® Opital 96-Well Reaction Plate และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze
- 5.3 เตรียมส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 ROX
 - 5.3.1 คำนวณส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 ROX โดยใช้ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 12.0 µl /1 ตัวอย่าง และ GeneScan™ 500 ROX ปริมาตร 0.15 µl /1 ตัวอย่าง (ในการคำนวณให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของ

จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้ง) เพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น มีจำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในการคำนวณปริมาตรจะต้องคูณด้วย 5.5 ตัวอย่าง เป็นต้น บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

5.3.2 ใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามปริมาณที่คำนวณได้ในข้อ 5.3.1 ลงใน microcentrifuge tube นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

5.4 ใช้ micropipette ดูดสารละลายในข้อ 5.3.2 ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.2 หลุมละ 12.15 μL

5.5 ดูด PCR product ที่เตรียมในข้อ 5.1 ปริมาตร 1.0 μL ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.2

5.6 ปิดเพลทด้วย septa และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อให้สารละลายมารวมกันที่ก้นเพลท

5.7 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้ว นำมาวางบนน้ำแข็งทันทีหรือ cooling box เป็นเวลา 3 นาที

5.8 นำเพลทข้อ 5.7 ลงในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม แบบอัตโนมัติ ชนิด 8 เส้น และตั้งค่าพารามิเตอร์วิธีการใช้ตามคู่มือวิธีปฏิบัติงาน เครื่องจะหยุดการทำงานอัตโนมัติหลังจากสิ้นสุดการทำงาน ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMappers ซึ่งจะกล่าวในบทที่ 4 ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) กระป๋อง

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

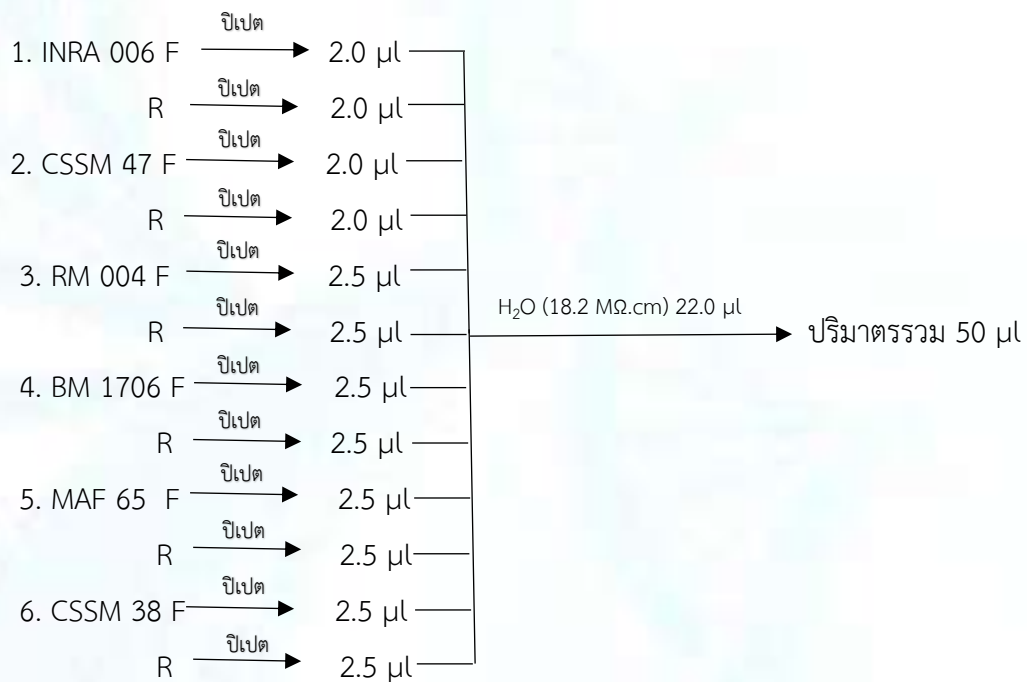
1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ เช่น ตัวอย่างเลือด น้ำเชื้อ ชี้น้ำ รากขน เป็นต้น ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ พร้อมเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง ให้ความเข้มข้นประมาณ 10 ng/ μL

2. ชุดควบคุมผลบวก (positive control) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ในช่วงขนาดที่กำหนดของแต่ละไพรเมอร์ทั้ง 10 ตำแหน่ง

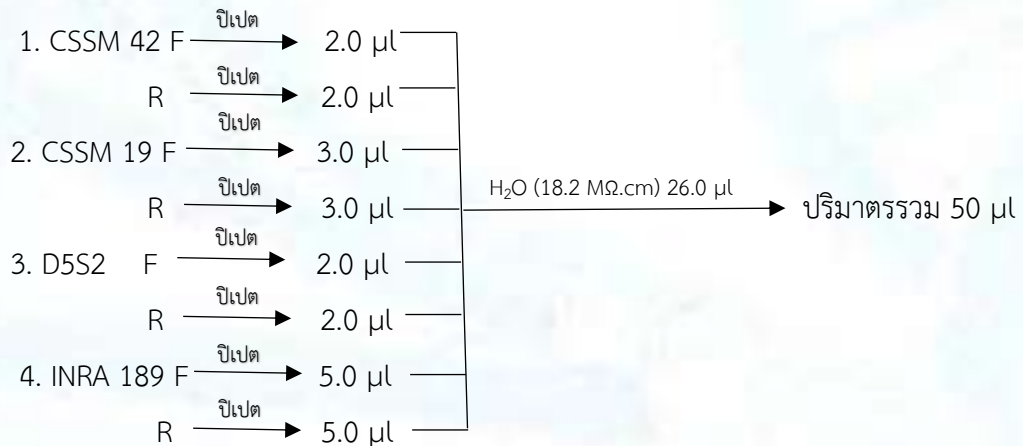
3. ชุดควบคุมผลลบ (negative control) ใช้ตัวอย่างน้ำ DW ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix)

4. การเตรียม primer สำหรับการทดสอบ

4.1 multiplex 6 เตรียมจาก primer ตั้งต้น ที่มีความเข้มข้น 100 μM ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 5 μM ปริมาตร 50 μl (สำหรับเป็น working primer)



4.2 multiplex 4 เตรียมจาก primer ตั้งต้น ที่มีความเข้มข้น 100 μM ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 5 μM ปริมาตร 50 μl (สำหรับเป็น working primer)



5. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR (PCR amplification)

5.1 คำนวณสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR master mix) ตามการคำนวณในตารางที่ 3 – 11 และ 3 - 12 ให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้ง เพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น จำนวนตัวอย่าง ทดสอบ 10 ตัวอย่าง

ให้คำนวณปริมาณสารละลายเป็น 11.0 ตัวอย่าง บันทึกลงแบบบันทึกการทำ PCR และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 3 - 11 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix (multiplex 6)

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
PCR buffer platinum	10X	1.0 µl	11.0 µl
dNTPs	2 mM	1.0 µl	11.0 µl
MgCl ₂	50 mM	0.6 µl	6.6 µl
primer 6 plex (working primer)	5 µM	0.2 µl	2.2 µl
Taq DNA Platinum	5 U/µl	0.2 µl	2.2 µl
DW	-	5.0 µl	55.0 µl
Total Volume	-	8.0 µl	88.0 µl

ตารางที่ 3 - 12 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix (multiplex 4)

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
PCR buffer platinum	10X	1.0 µl	11.0 µl
dNTPs	2 mM	1.0 µl	11.0 µl
MgCl ₂	50 mM	0.6 µl	6.6 µl
primer 4 plex (working primer)	5 µM	0.2 µl	2.2 µl
Taq DNA platinum	5 U/µl	0.2 µl	2.2 µl
DW	-	5.0 µl	55.0 µl
Total Volume	-	8.0 µl	88.0 µl

5.2 เตรียมสารละลาย PCR master mix ในตู้เตรียมสารสำหรับงาน PCR โดยใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามที่ได้คำนวณได้ในข้อ 5.1 (ตารางที่ 3 - 11 และ 3 - 12) แต่ละ multiplex ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

5.3 ใช้ micropipette ดูด PCR master mix ในข้อ 5.2 ปริมาตร 8.0 µl/ 1 ตัวอย่างทดสอบลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml

- 5.4 ใช้ micropipette ดูด น้ำ DW (negative control) ในข้อ 3 ปริมาตร 2.0 µl ลงใน PCR tube 0.2 ml ในข้อ 5.3
- 5.5 ใช้ micropipette ดูด (positive control) ในข้อ 2 ปริมาตร 2.0 µl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 5.3
- 5.6 ใช้ micropipette ดูดดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 10 ng/µl ในข้อ 1 ปริมาตร 2.0 µl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 5.3
- 5.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
- 5.8 ตั้งค่า PCR condition ตามตารางที่ 3 - 13 และบันทึกลงในแบบบันทึกการทำ PCR
- 5.9 นำ PCR tube จากข้อ 5.7 ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม กดปุ่ม start

ตารางที่ 3 - 13 พารามิเตอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

step	Temp. (°C)	time	cycles
initial denaturation	94	5 min	1
denature	94	30 sec	} 30
annealing	58	30 sec	
extension	72	1 min	
final extension	72	60 min	1
Final step	25	120 min	1
hold	4	hold	α

6. การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิด 8 เส้น รุ่น 3500

6.1 เตรียม MicroAmp® Optal 96-Well Reaction Plate และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze

6.2 เตรียมส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 LIZ

6.2.1 คำนวณส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 LIZ โดยใช้ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 12.0 µl /1 ตัวอย่าง และ GeneScan™ 500 LIZ ปริมาตร 0.15 µl /1 ตัวอย่าง (ในการคำนวณให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้ง) เพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น มีจำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในการคำนวณปริมาตรจะต้องคูณด้วย 5.5 ตัวอย่าง เป็นต้น บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์

ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

6.2.2 ใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามปริมาณที่คำนวณได้ในข้อ 6.2.1 ลงใน microcentrifuge tube นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

6.3 ใช้ micropipette ดูดสารละลายในข้อ 6.2.2 ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.1 หลุมละ 12.15 μl

6.4 ดูด PCR product ที่ได้จากข้อ 5.9 ในการรัน plex 6 และ plex 4 อย่างละ 1.0 μl ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.1

6.5 ปิดเพลทด้วย septa และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อให้สารละลายมารวมกันที่ก้นเพลท

6.6 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีหรือ cooling box เป็นเวลา 3 นาที

6.7 นำเพลทข้อ 6.6 ลงในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม แบบอัตโนมัติชนิด 8 เส้น และตั้งค่าพารามิเตอร์วิธีการใช้ตามคู่มือวิธีปฏิบัติงาน เครื่องจะหยุดการทำงานอัตโนมัติหลังจากสิ้นสุดการทำงาน ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMappers ซึ่งจะกล่าวในบทที่ 4 ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แพะ

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ เช่น ตัวอย่างเลือด น้ำเชื้อ ขี้ฉี่ รากขน เป็นต้น ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ พร้อมเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง ให้ความเข้มข้นประมาณ 50 ng/ μl

2. ชุดควบคุมผลบวก (positive control) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ในช่วงขนาดที่กำหนดของแต่ละไพรเมอร์ทั้ง 12 ตำแหน่ง

3. ชุดควบคุมผลลบ (negative control) ใช้ตัวอย่างน้ำ DW ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR (PCR amplification)

4.1 คำนวณสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR master mix) ตามการคำนวณในตารางที่ 3 – 14, 15 และ 16 ให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้งเพื่อให้มีปริมาณสาร

เพียงพอต่อการทดสอบ เช่น จำนวนตัวอย่างทดสอบ 10 ตัวอย่าง ให้คำนวณปริมาณสารละลายเป็น 11.0 ตัวอย่าง และบันทึกลงแบบบันทึกการทำ PCR และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 3 - 14 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix (multiplex 1)

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
HotStart PCR	10X	10.0 µl	110.0 µl
Primer SRCRSP3 (F/R)	10 µM	0.4 µl	4.4 µl
Primer ILST005 (F/R)	10 µM	0.2 µl	2.2 µl
Primer ILST011 (F/R)	10 µM	0.4 µl	4.4 µl
Primer SRCRSPS (F/R)	10 µM	0.4 µl	4.4 µl
DW	-	6.6 µl	72.6 µl
Total Volume	-	18.0 µl	198.0 µl

ตารางที่ 3 - 15 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix (multiplex 2)

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
HotStart PCR	10X	10.0 µl	110.0 µl
Primer MAF65 (F/R)	10 µM	0.4 µl	4.4 µl
Primer CSRD247 (F/R)	10 µM	0.1 µl	1.1 µl
Primer SPS113 (F/R)	10 µM	0.4 µl	4.4 µl
Primer MAF70 (F/R)	10 µM	0.6 µl	6.6 µl
DW	-	6.5 µl	71.5 µl
Total Volume	-	18.0 µl	198.0 µl

ตารางที่ 3 - 16 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix (multiplex 3)

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
HotStart PCR	10X	10.0 µl	110.0 µl
Primer ILST87 (F/R)	10 µM	0.2 µl	2.2 µl
Primer SRCRSD9 (F/R)	10 µM	0.2 µl	2.2 µl
Primer OarFCB48 (F/R)	10 µM	0.2 µl	2.2 µl
Primer INRA23 (F/R)	10 µM	0.6 µl	6.6 µl
DW	-	6.8 µl	74.8 µl
Total Volume	-	18.0 µl	198.0 µl

- 4.2 เตรียมสารละลาย PCR master mix ในตู้เตรียมสารสำหรับงาน PCR โดยใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามที่คำนวณได้ในข้อ 4.1 (ตารางที่ 3 – 14, 15 และ 16) แต่ละ multiplex ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
- 4.3 ใช้ micropipette ดูด PCR master mix ในข้อ 4.2 ปริมาตร 18.0 μL / 1 ตัวอย่างทดสอบ ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml
- 4.4 ใช้ micropipette ดูด น้ำ DW (negative control) ในข้อ 3 ปริมาตร 2.0 μL ลงใน PCR tube 0.2 ml ในข้อ 4.3
- 4.5 ใช้ micropipette ดูด (positive control) ในข้อ 2 ปริมาตร 2.0 μL ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3
- 4.6 ใช้ micropipette ดูดดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 50 ng/ μL ในข้อ 1 ปริมาตร 2.0 μL ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3
- 4.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด
- 4.8 การใช้ PCR condition สำหรับ multiplex 1 ตามตารางที่ 3 - 17 และบันทึกลงในแบบบันทึกการทำ PCR ใช้ mode 9600 ในการทำงาน (Run)
- 4.9 นำ PCR tube จากข้อ 4.7 ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม กดปุ่ม start

ตารางที่ 3 - 17 พารามิเตอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (multiplex 1)

step	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Ramp rate	time	cycles
initial denaturation	95	-	2 min	1
denature	95	-	30 sec	5
annealing	65	50%(-1 $^{\circ}\text{C}$)	30 sec	
extension	72	-	30 sec	
denature	95	-	30 sec	25
annealing	56	-	30 sec	
extension	72	-	30 sec	
final extension	72	-	30 min	1
Final step	24	-	α	1
hold	-	-	-	-

4.10 การใช้ PCR condition สำหรับ multiplex 2-3 ตามตารางที่ 3 - 18 และบันทึกลงแบบบันทึกการทำ PCR ใช้ mode 9600 ในการรัน

4.11 นำ PCR tube จากข้อ 4.7 ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม กดปุ่ม star

ตารางที่ 3 - 18 พารามิเตอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (multiplex 2-3)

step	Temp. (°C)	Ramp rate	time	cycles
initial denaturation	95	-	2 min	1
denature	95	-	30 sec	5
annealing	65	50%(-1°C)	30 sec	
extension	72	-	30 sec	
denature	95	-	30 sec	25
annealing	58	-	30 sec	
extension	72	-	30 sec	
final extension	72	-	30 min	1
Final step	24	-	α	1
hold	-	-	-	-

5. การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิด 8 เส้น รุ่น 3500

5.1 เตรียม MicroAmp® Opital 96-Well Reaction Plate และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze

5.2 เตรียมส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 LIZ

5.2.1 คำนวณส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 LIZ โดยใช้ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 12.0 µl /1 ตัวอย่าง และ GeneScan™ 500 LIZ ปริมาตร 0.15 µl /1 ตัวอย่าง (ในการคำนวณให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้ง) เพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น มีจำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในการคำนวณปริมาตรจะต้องคูณด้วย 5.5 ตัวอย่าง เป็นต้น บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

5.2.2 ใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามปริมาณที่คำนวณได้ในข้อ 5.2.1 ลงใน microcentrifuge tube นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

- 5.3 ใช้ micropipette ดูดสารละลายในข้อ 5.2.2 ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.1 หลุมละ 12.15 μ l
- 5.4 ดูด PCR product ที่ได้จากข้อ 4.9 และ 4.11 ปริมาตร 1.0 μ l ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.1
- 5.5 ปิดเพลทด้วย septa และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อให้สารละลายมารวมกันที่ก้นเพลท
- 5.6 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีหรือ cooling box เป็นเวลา 3 นาที
- 5.7 นำเพลทข้อ 5.6 ลงในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม แบบอัตโนมัติ ชนิด 8 เส้น และตั้งค่าพารามิเตอร์วิธีการใช้ตามคู่มือวิธีปฏิบัติงาน เครื่องจะหยุดการทำงานอัตโนมัติหลังจากสิ้นสุดการทำงาน ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMappers ซึ่งจะกล่าวในบทที่ 4 ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) สุนัข

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ เช่น ตัวอย่างเลือด น้ำเชื้อ ขี้เนื้อ รากขน เป็นต้น ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ พร้อมเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง ให้ความเข้มข้นประมาณ 10 ng/ μ l
2. ชุดควบคุมผลบวก (positive control) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีช่วงขนาดเท่ากับคู่มือ StockMarks® Kits for Horses, Cattle, and Dog Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits Revision F โดยทราบช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่ง
3. ชุดควบคุมผลลบ (negative control) (ใช้ตัวอย่างน้ำ DW ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix)
4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR (PCR amplification)
 - 4.1 คำนวณสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR master mix) ตามการคำนวณในตารางที่ 3 - 19 ให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้งเพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น จำนวนตัวอย่างทดสอบ 10 ตัวอย่าง ให้คำนวณ

ปริมาณสารละลายเป็น 11.0 ตัวอย่าง และบันทึกลงแบบบันทึกการทำ PCR และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

4.2 เตรียมสารละลาย PCR master mix ในตู้เตรียมสารสำหรับงาน PCR โดยใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามที่คำนวณได้ในข้อ 4.1 (ตารางที่ 3 - 19) ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

4.3 ใช้ micropipette ดูด PCR master mix ในข้อ 4.2 ปริมาตร 9.0 μL 1 ตัวอย่างทดสอบลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml

ตารางที่ 3 - 19 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
PCR buffer	10X	1.4 μL	15.4 μL
dNTPs	1.25 mM	2.2 μL	24.2 μL
MgCl ₂	25 mM	0.36 μL	3.96 μL
primer canine mix 10 plex		2.8 μL	30.8 μL
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	5 U/ μL	0.36 μL	3.96 μL
DW	-	1.9 μL	20.9 μL
Total Volume	-	9.0 μL	99.0 μL

4.4 ใช้ micropipette ดูด น้ำ DW (negative control) ในข้อ 3 ปริมาตร 1.0 μL ลงใน PCR tube 0.2 ml ในข้อ 4.3

4.5 ใช้ micropipette ดูด (positive control) ในข้อ 2 ปริมาตร 1.0 μL ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3

4.6 ใช้ micropipette ดูดดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 10 ng/ μL ในข้อ 1 ปริมาตร 1.0 μL ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3

4.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

4.8 ตั้งค่า PCR condition ตามตารางที่ 3 - 20 และบันทึกลงในแบบบันทึกการทำ PCR ใช้ mode 9600 ในการทำงาน (Run)

4.9 นำ PCR tube จากข้อ 9.4.7 ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม กดปุ่ม start

ตารางที่ 3 - 20 พารามิเตอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

step	Temp. (°C)	Ramp rate	time	cycles
initial denaturation	95	-	10 min	1
denature	95	-	30 sec	} 28
annealing	58	50%	30 sec	
extension	72	80%	60 sec	
denature	95	-	30 sec	} 15
annealing	56	50%	30 sec	
extension	72	80%	60 sec	
final extension	72	-	30 min	1
Final step	4	-	α	1
hold	-	-	-	-

5. การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิด 8 เส้น รุ่น 3500

5.1 เตรียม PCR product ที่ได้ในข้อ 4.9 เจือจางในอัตราส่วน 1:2 (DW 2 μ l : PCR product 1 μ l)

5.2 เตรียม MicroAmp® Opital 96-Well Reaction Plate และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze

5.3 เตรียมส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 ROX

5.3.1 คำนวณส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 ROX โดยใช้ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 11.5 μ l /1 ตัวอย่าง และ GeneScan™ 500 ROX ปริมาตร 0.5 μ l /1 ตัวอย่าง (ในการคำนวณให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้ง) เพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น มีจำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในการคำนวณปริมาตรจะต้องคูณด้วย 5.5 ตัวอย่าง เป็นต้น บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

5.3.2 ใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามปริมาณที่คำนวณได้ในข้อ 5.3.1 ลงใน microcentrifuge tube นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร

(vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

5.4 ใช้ micropipette ดูดสารละลายในข้อ 5.3.2 ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.2 หลุมละ 12.0 µl

5.5 ดูด PCR product ที่เตรียมในข้อ 5.1 ปริมาตร 1.0 µl ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.2

5.6 ปิดเพลทด้วย septa และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อให้สารละลายมารวมกันที่ก้นเพลท

5.7 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีหรือ cooling box เป็นเวลา 3 นาที

5.8 นำเพลทข้อ 5.7 ลงในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม แบบอัตโนมัติ ชนิด 8 เส้น และตั้งค่าพารามิเตอร์วิธี การใช้ตามคู่มือวิธีปฏิบัติงาน เครื่องจะหยุดการทำงานอัตโนมัติ หลังจากสิ้นสุดการทำงาน ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMappers ซึ่งจะกล่าวในบทที่ 4 ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แมว

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ เช่น ตัวอย่างเลือด น้ำเชื้อ ขี้นํ้า รากขน เป็นต้น ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ พร้อมเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่าง ให้ความเข้มข้นประมาณ 2 ng/µl

2. ชุดควบคุมผลบวก (positive control) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีช่วงขนาดเท่ากับคู่มือ Information on the Cat STR Multiplex Developed at NIST and a Protocol for Its Use on the ABI 310 and ABI 3100 Instruments โดยทราบช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่ง

3. ชุดควบคุมผลลบ (negative control) ใช้ตัวอย่างน้ำ DW ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix)

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR (PCR amplification)

4.1 คำนวณสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR master mix) ตามการคำนวณในตารางที่ 3 - 21 ให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้งเพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น จำนวนตัวอย่างทดสอบ 10 ตัวอย่าง ให้คำนวณปริมาณสารละลายเป็น 11.0 ตัวอย่าง และบันทึกลงแบบบันทึกการทำ PCR และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

4.2 เตรียมสารละลาย PCR master mix ในตู้เตรียมสารสำหรับงาน PCR โดยใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามที่คำนวณได้ในข้อ 4.1 (ตารางที่ 3 - 21) ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

4.3 ใช้ micropipette ดูด PCR master mix ในข้อ 4.2 ปริมาตร 19.0 μl / 1 ตัวอย่างทดสอบ ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml

ตารางที่ 3 - 21 ตัวอย่างการคำนวณสารละลาย PCR master mix

สารเคมี	ความเข้มข้น	1 ตัวอย่าง	11.0 ตัวอย่าง
PCR Gold buffer	10X	2.0 μl	22.00 μl
dNTPs	10 mM	0.4 μl	4.4 μl
MgCl ₂	25 mM	1.2 μl	13.2 μl
primer mix		4.0 μl	44.0 μl
BSA	20 ng/ml	0.16 μl	1.76 μl
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	5 U/ μl	0.4 μl	4.4 μl
DW	-	10.84 μl	119.24 μl
Total Volume	-	19.0 μl	209.0 μl

4.4 ใช้ micropipette ดูด น้ำ DW (negative control) ในข้อ 3 ปริมาตร 1.0 μl ลงใน PCR tube 0.2 ml ในข้อ 4.3

4.5 ใช้ micropipette ดูด (positive control) ในข้อ 2 ปริมาตร 1.0 μl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3

4.6 ใช้ micropipette ดูดดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 2 ng/ μl ในข้อ 1 ปริมาตร 1.0 μl ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml ในข้อ 4.3

4.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

4.8 ตั้งค่า PCR condition ตามตารางที่ 3 - 22 และบันทึกลงในแบบบันทึกการทำ PCR ใช้ Mode 9600 ในการทำงาน (Run)

4.9 นำ PCR tube จากข้อ 4.7 ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมกดปุ่ม start

5. นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 4.9 มาทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up Gel extraction kit

6. การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิด 8 เส้น รุ่น 3500

ตารางที่ 3 - 22 พารามิเตอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

step	Temp. (°C)	Ramp rate	time	cycles
initial denaturation	95	-	10 min	1
denature	94	-	1 min	} 28
annealing	59	50%	1 min	
extension	72	80%	1 min	
final extension	60	-	45 sec	1
Final step	25	-	α	1
hold	-	-	-	-

6.1 เตรียม MicroAmp® Optal 96-Well Reaction Plate และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze

6.2 เตรียมส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 ROX

6.2.1 คำนวณส่วนผสม Hi-Di™ Formamide และ GeneScan™ 500 ROX โดยใช้ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 9.5 μ l /1 ตัวอย่าง และ GeneScan™ 500 ROX ปริมาตร 0.1 μ l /1 ตัวอย่าง (ในการคำนวณให้คิดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% ของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ หรือคิดเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบในแต่ละครั้ง) เพื่อให้มีปริมาณสารเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น มีจำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในการคำนวณปริมาตรจะต้องคูณด้วย 5.5 ตัวอย่าง เป็นต้น บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกตารางแสดงตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyze และแบบบันทึกเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

6.2.2 ใช้ micropipette ดูดสารเคมีตามปริมาณที่คำนวณได้ในข้อ 6.2.1 ลงใน microcentrifuge tube นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและ spin down ให้สารละลายมารวมกันที่ก้นหลอด

6.3 ใช้ micropipette ดูดสารละลายในข้อ 6.2.2 ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.1 หลุมละ 9.6 μ l

6.4 ดูด PCR product ที่เตรียมในข้อ 5 ปริมาตร 0.5 μ l ลงในเพลทที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.1

- 6.5 ปิดเพลทด้วย septa และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที่ นาน 1 นาที เพื่อให้สารละลายมารวมกันที่ก้นเพลท
- 6.6 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีหรือ cooling box เป็นเวลา 3 นาที
- 6.7 นำเพลทข้อ 6.6 ลงในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม แบบอัตโนมัติ ชนิด 8 เส้น และ ตั้งค่าพารามิเตอร์วิธีการใช้ตามคู่มือวิธีปฏิบัติงาน เครื่องจะหยุดการทำงานอัตโนมัติ หลังจากสิ้นสุดการทำงาน ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย โปรแกรม GeneMappers ซึ่งจะกล่าวในบทที่ 4 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิติลกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม . 2547. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล ฉบับปรับปรุงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, ปทุมธานี.
- นิത്യศรี แสงเดือน. 2536. พันธุวิศวกรรม. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. โรงพิมพ์มิตรสยาม, กรุงเทพฯ.
- เปล่งศรี อิงคินันท์, อัจฉริยา ไชยะสุต, วิจิตร บรรณารุรา, อรัญญา พลพรพิสิฐ, นลิน อารียา, คกฤษ เทียน คำ, ณทยา เจริญวิศาล, ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ และ ธานินทร์ พัฒนเศรษฐ์. 2560. งานบริการและ ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ในประเทศไทย. สมาคมเวชศาสตร์ชั้นสูงทางสัตวแพทย์ไทย, กรุงเทพฯ.
- แหล่งที่มา : <http://www.cac-ru.vet.chula.ac.th/wp-content/uploads/2017/11/TAVLD-Book.pdf>, August 15, 2022.
- ศูนย์ผลิตและพัฒนาสื่อคอมพิวเตอร์เพื่อการศึกษา. 2021. ชนิดและการเลือกใช้หลอดเก็บเลือด. คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. แหล่งที่มา: <https://www.nursesoulciety.com/2021/02/19/selection-sequence-blood-tubes/>, August 08, 2022.
- Applied Biosystems. 2004. คู่มือโปรแกรม GeneMapper® Software v.3.7 User Guide, USA.
- John Butler. 2002. คู่มือ Information on the Cat STR Multiplex Developed at NIST and a Protocol for Its Use on the ABI 310 and ABI 3100 Instruments, NIST., pp. 10
- QIAGEN. 2020. QIAamp® MinElute® Virus Spin Handbook 02/2020 (Protocol: Purification of Viral Nucleic Acids from Plasma or Serum). pp. 32.

Thermo Fisher Scientific. 2014. คู่มือ StockMarks® Kits for Horses, Cattle, and Dog Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits Revision F, USA.

Thermo Fisher Scientific. 2018. MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit. USER GUIDE. for use with: KingFisher™ Flex Purification System. Publication Number 4463379. Revision C., USA.

Thermo Fisher Scientific. 2021. คู่มือการใช้งานเครื่อง KingFisher™ Apex Purification System User Guide and Bindlx Software version 1.0, USA.

บทที่ 4

การวิเคราะห์ข้อมูลและการแปลผล

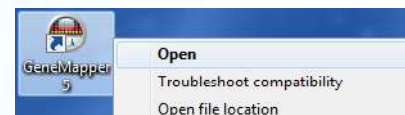
ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GeneMapper ในการตรวจวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสัตว์ โดย GeneMapper เป็นโปรแกรมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนม โดยมีส่วนที่สามารถวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (DNA sizing) สำหรับวิเคราะห์ผลไมโครแซเทลไลต์ (microsatellite analysis) และแสดงผลออกมาเป็นรูปอเล็กโทรโฟโแกรมตามตำแหน่ง (loci) ของคู่อัลลีลของยีน ใช้ในงานตรวจวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสัตว์ได้หลายชนิดได้แก่ โค กระบือ แพะ สุนัข แมว เป็นต้น รวมทั้งของคน โดยในตัวอย่างที่แสดงเป็นตัวอย่างของโค (bovine)

การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GeneMapper

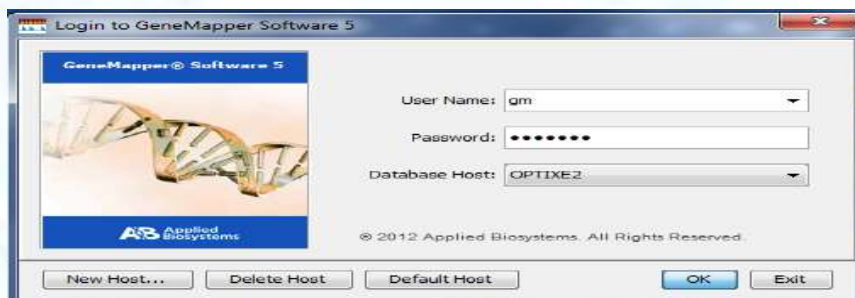
ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1. การเข้าโปรแกรม GeneMapper เพื่อวิเคราะห์ผลหลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนี้

1.1 ดับเบิลคลิกเข้าโปรแกรม GeneMapper 5 หรือคลิกขวา Open

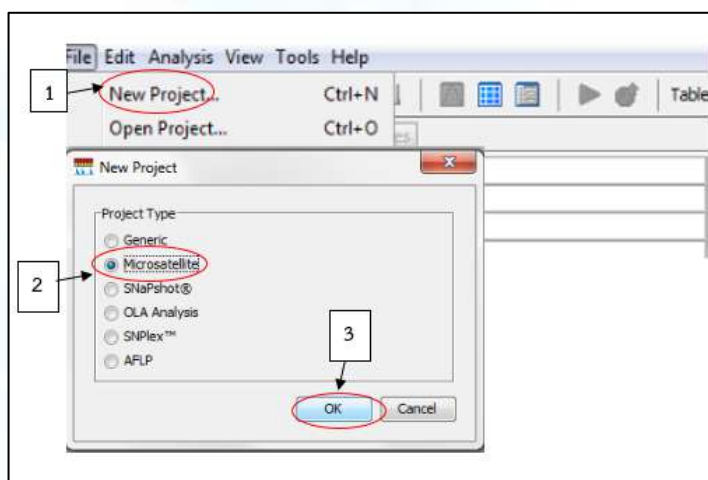


1.2 จะปรากฏหน้าจอ ให้ใส่ Password s3rvic3 ตามรูปที่ 4 - 1 เมื่อใส่เสร็จ คลิก OK



รูปที่ 4 - 1 แสดงการใส่ Password

1.3 คลิกเลือก File ตามรูปที่ 4 - 2 เลือก New Project (หมายเลข 1) เลือก Microsatellite (หมายเลข 2) และคลิก OK (หมายเลข 3)



รูปที่ 4 - 2 แสดงการเลือก Project Type

1.4 เลือก File ตามรูปที่ 4 - 3 เลือก Add sample to project (หมายเลข 1) ไปที่ Drive:D AB SW & DATA (D:) → Applied Biosystems → 3500_data → แล้วเลือก Folder ที่เก็บข้อมูล เช่น stockmark (หมายเลข 2) เลือก Folder วันที่สั่ง Run เช่น Inj1 2018-04-04-12-20-01-638 (หมายเลข 3) เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์

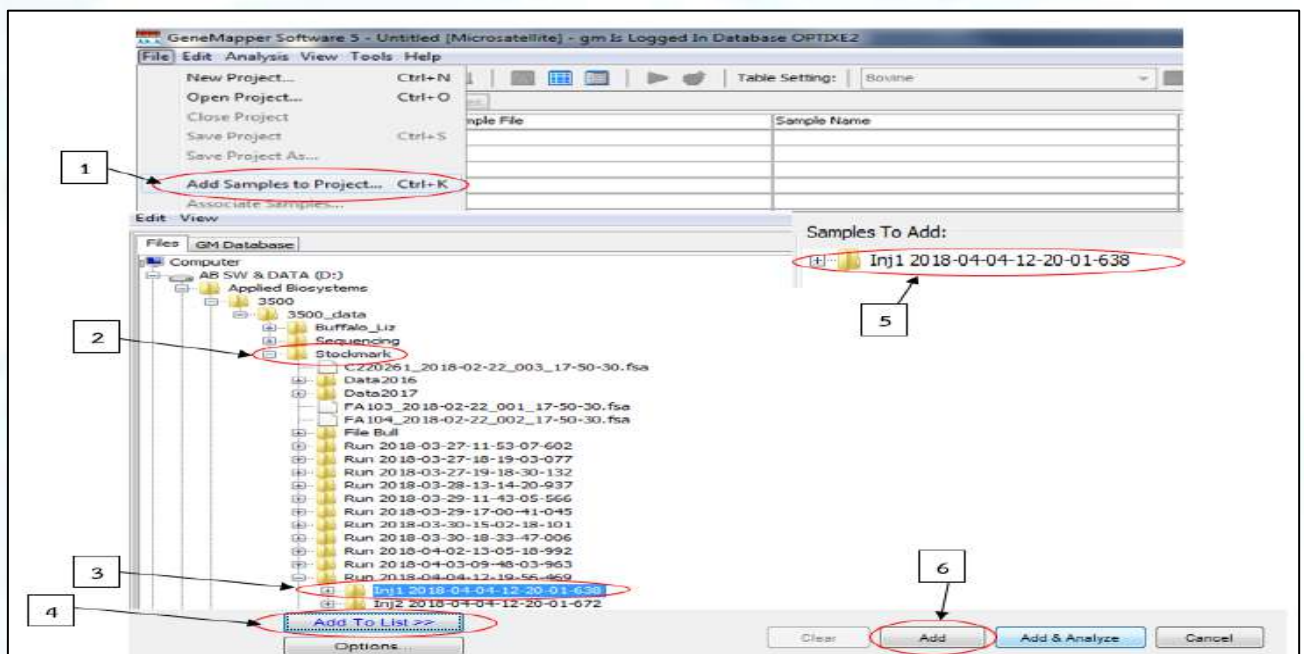
1.5 กดเลือก Add To List (หมายเลข 4) จะมีชื่อ Sample ที่เลือกปรากฏด้านขวามือ (หมายเลข 5) จากนั้นกด Add (หมายเลข 6)

1.6 จะปรากฏชื่อ sample ที่ได้ทำการ Add ตามรูปที่ 4-4 กำหนดพารามิเตอร์ ดังนี้

Analysis Method เลือก Bovine_3500 (หมายเลข 1)

Panel เลือก Stockmark เลือก Bovine (หมายเลข 2)

Size Standard เลือก GS500(-35, -250) ROX (หมายเลข 3)



รูปที่ 4 - 3 แสดงการ Add sample to project

1.7 เมื่อเลือกครบทุกพารามิเตอร์คลิกสัญลักษณ์ (Analyze) (หมายเลข 4) เมื่อทำการ Analyze เสร็จสัญลักษณ์ สีเขียวที่ตำแหน่ง status (หมายเลข 5) จะหายไป ตามรูปที่ 4-4

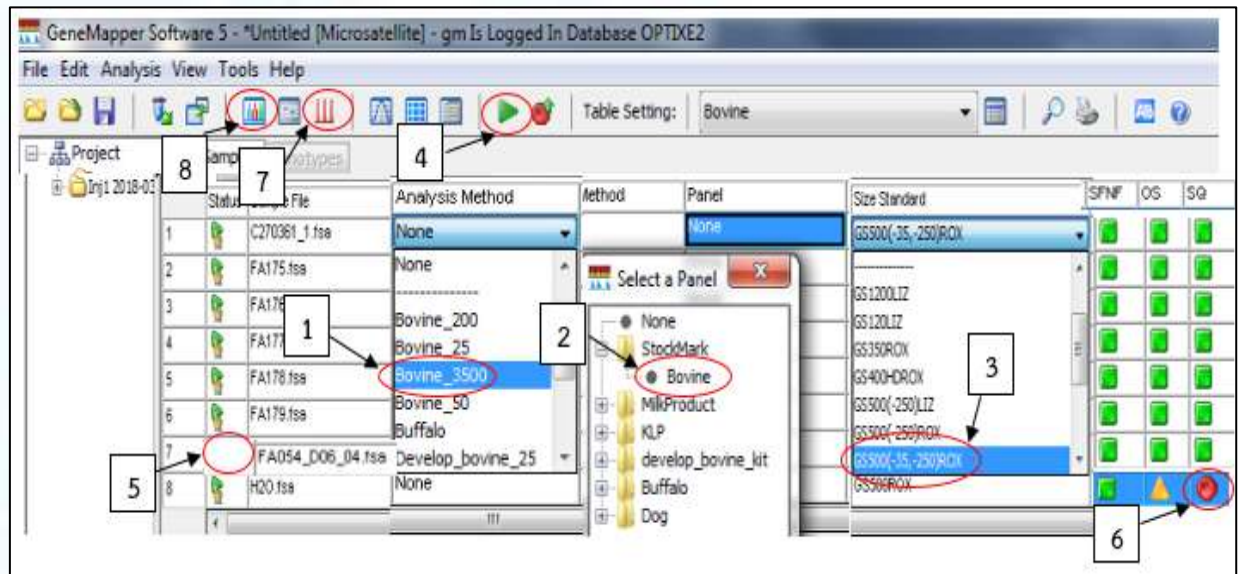
1.8 จะปรากฏ Save Project ให้ตั้งชื่อ Project แล้วคลิก OK ตามรูป



1.9 ตัวอย่างที่ Analyze ผ่านจะขึ้นสัญลักษณ์สีเขียวและตัวอย่างที่ไม่ผ่านจะขึ้นสัญลักษณ์สีแดงตรงตำแหน่ง SQ (หมายเลข 6) ตามรูปที่ 4-4 ให้ตรวจสอบค่า Rox Size Standard

1.10 ตรวจสอบค่า Rox Size Standard

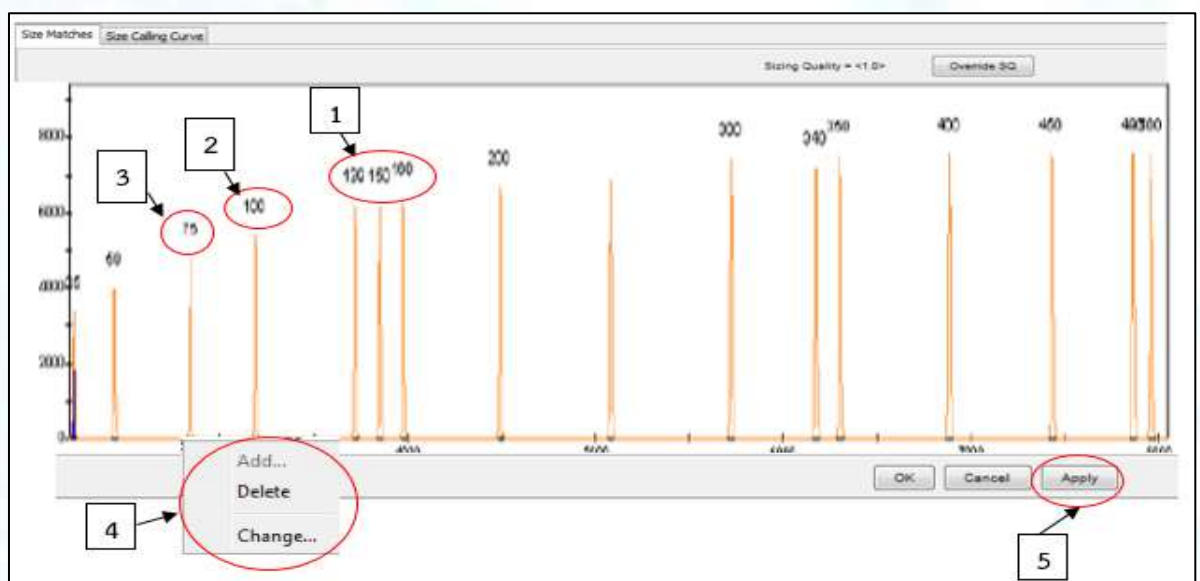
1.10.1 โดยคลิกสัญลักษณ์ (Size Standard) (หมายเลข 7) ตามรูปที่ 4 - 4



รูปที่ 4 - 4 แสดงการตั้งค่าพารามิเตอร์

1.10.2 ปรากฏหน้าต่าง Size Match Editor ขึ้น ตามรูปที่ 4 - 5 แสดง peak ของ Size Standard ซึ่งเรียงลำดับตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยมีจุดสังเกตคือ 3 พิก ที่ติดกัน (หมายเลข1) โดย พิกแรกต้องมีค่า 139, 150, 160 ตามลำดับ และ 2 พิก ด้านหน้า ของหมายเลข 1 จะต้องเป็น 100 (หมายเลข 2) และถัดจาก 100 ไปทางด้านหน้าต้องเป็น 75 (หมายเลข 3) ส่วนพิกต่อจาก 160 (หมายเลข 1) จะเป็น 200 และ 300 ตามลำดับ

1.10.3 หากพบว่าการเรียงลำดับไม่ถูกต้อง ให้เลือกพิกนั้นและคลิกขวาจะปรากฏคำว่า Add และ Delete (หมายเลข 4) หากเลือก Add จะปรากฏค่าพิกเรียงตามลำดับ เลือกค่าพิกให้ถูกต้องตาม ตำแหน่ง แต่ถ้าต้องการลบค่าพิกให้เลือก Delete จากนั้นกด Apply (หมายเลข 5)



รูปที่ 4 - 5 แสดงการตั้งค่า Size Standard

1.10.4 จะปรากฏหน้าจอ ตามรูปที่ 4 - 4 ขึ้นมาอีกครั้งคลิกสัญลักษณ์  (Analyze) (หมายเลข 4) เพื่อทำการ Analyze เมื่อตั้งค่า Rox Size Standard ถูกต้องสัญลักษณ์ตรงตำแหน่ง SQ จะเป็นสีเขียว (หมายเลข 6) ตามรูปที่ 4 - 4

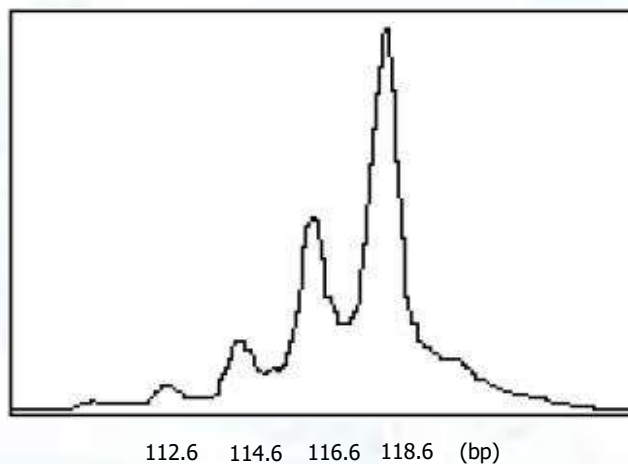
1.11 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเลือกแถวของ Sample File และเลือกสัญลักษณ์  (Display Plots) (หมายเลข 8) ตามรูปที่ 4 - 4 จะปรากฏหน้าต่าง Sample plot เพื่ออ่านผลพีค

การแปลผลรูปแบบของอิเล็กโทรโฟโรแกรม

การ amplification ที่สมบูรณ์นั้นจะได้ พีค (Peak) ของ capillaries electrophoresis ออกมาในรูปแบบอิเล็กโทรโฟโรแกรม (electropherogram) ซึ่งเปรียบเทียบกับแถบแบนด์ (band) ใน gel electrophoresis โดยการซ้ำของเบสไม่เกิน 8 bp ใน 1 อัลลีลพีค รูปแบบอัลลีลพีคที่เกิดขึ้น ขึ้นกับยีนที่นำมาทดสอบว่าเป็นชนิด homozygous คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน หรือ heterozygous คือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่เท่ากัน อธิบายดังต่อไปนี้

(1) homozygous individual : 2-bp stutter

ตัวอย่าง โปรแกรม GeneScan™ ที่แสดงรูปกราฟ electropherogram ของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด 2 ซ้ำ ของ nucleotide (dinucleotide repeat marker) จากรูปแบบ homozygous Individual พบ อัลลีล เท่ากัน คือ 118.6 bp, 118.6 bp ตามรูปที่ 4 - 6

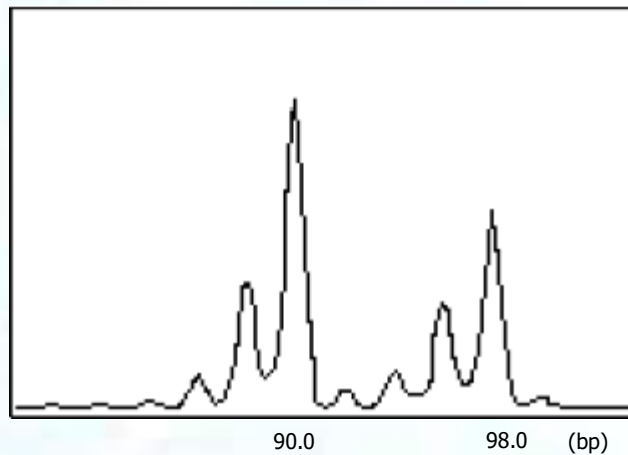


รูปที่ 4 - 6 รูปแบบของ electropherogram ชนิด dinucleotide repeat homozygote แสดง 2 bp stutter

จากภาพพีคสูงสุดเป็น 118.6 bp (true allele) และมีพีคถัดมาเป็น 116.6 bp, 114.6 bp และ 112.6 bp ซึ่งมีการลดลงของขนาดทีละ 2 bp เป็นไปตามรูปแบบของลักษณะ dinucleotide repeats

(2) heterozygous individual : 2-bp stutter

ตัวอย่าง โปรแกรม GeneScan™ ที่แสดงรูปกราฟ electropherogram ของเครื่องหมายพันธุกรรม ชนิด 2 ซ้ำของ nucleotide (dinucleotide repeat marker) จากรูปแบบ heterozygous individual พบอัลลีลที่ไม่เท่ากัน คือ อัลลีล 1 : 90 bp, อัลลีล 2 : 98 bp โดยมีขนาดอัลลีลต่างกัน 8 bp ตามรูปที่ 4 - 7

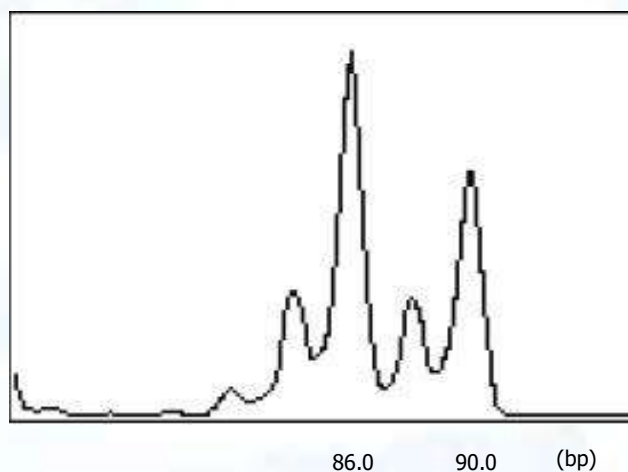


รูปที่ 4 - 7 รูปแบบของ electropherogram ชนิด dinucleotide repeat heterozygote แสดง 2 bp stutter

จากภาพพิกที่ติดกันมีความต่าง 2 bp โดยพิกด้านซ้ายของแต่ละพิกจะมีค่า intensity ของสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ต่ำกว่าอัลลีลของพิกของตัวเอง พิกอัลลีล 98 bp มีขนาดใหญ่ มี intensity ต่ำกว่า พิกอัลลีล 90 bp ซึ่งมีขนาดเล็ก ใน heterozygote อัลลีลที่มี molecular weight มาก จะส่งสัญญาณจากสีฟลูออเรสเซนซ์ได้น้อยกว่าอัลลีลที่มี molecular weight น้อย เนื่องจากอัลลีลที่มีขนาดใหญ่ ทำให้ประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวน (amplification) ลดน้อยลง

(3) heterozygous individual : 4-bp stutter

ตัวอย่าง โปรแกรม GeneScan™ ที่แสดงรูปภาพ electropherogram ของเครื่องหมาย พันธุกรรม ชนิด 2 ซ้ำของ nucleotide (dinucleotide repeat marker) จากรูปแบบ heterozygous individual พบอัลลีลที่ไม่เท่ากัน คือ อัลลีล 1 : 86 bp, อัลลีล 2 : 90 bp โดยมีขนาดอัลลีลต่างกัน 4 bp ตามรูปที่ 4 - 8

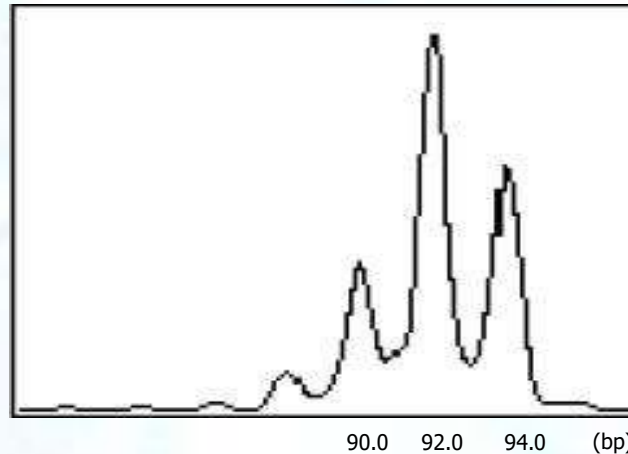


รูปที่ 4 - 8 รูปแบบของ electropherogram ชนิด dinucleotide repeat heterozygote แสดง 4 bp stutter

จากภาพเมื่อขนาดอัลลีลต่างกัน 4 bp จะมีการรวมอัลลีลพิกของ อัลลีล 2 (90 bp) จำนวน 2 พิกและไปรวมอยู่กับ อัลลีลพิกของอัลลีล 1 (86 bp) ทำให้สัญญาณของสีฟลูออเรสเซนซ์ของ อัลลีล 1 มีขนาดเพิ่มขึ้นด้วย (ดูเทียบกับรูปที่ 4 - 7)

(4) heterozygous individual : 2-bp and 4-bp stutter

ตัวอย่าง โปรแกรม GeneScan™ ที่แสดงรูปภาพ electropherogram ของเครื่องหมาย พันธุกรรม ชนิด 2 ซ้ำของ nucleotide (dinucleotide repeat marker) จากรูปแบบ heterozygous individual พบอัลลีลที่ไม่เท่ากัน คือ อัลลีล 1 : 92 bp, อัลลีล 2 : 94 bp โดยมีขนาดอัลลีลต่างกัน 2 bp ตามรูป ที่ 4 - 9



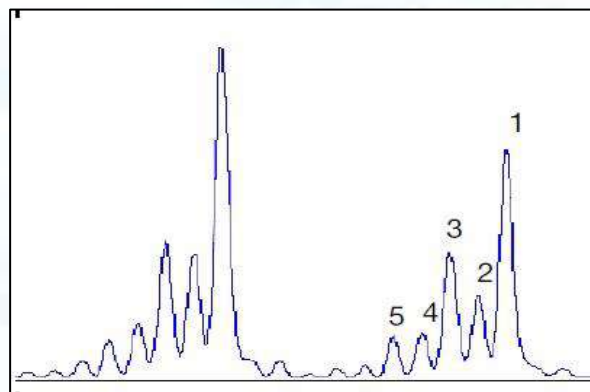
รูปที่ 4 - 9 electropherogram ลักษณะของ heterozygous แสดง 2 bp และ 4-bp stutter

106

จากภาพสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ของอัลลีล 94 bp ที่ลบออก 2 bp จะไปเพิ่มให้กับ สัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ของอัลลีล 92 bp สัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ของอัลลีล 94 bp ที่ลบออก 4 bp จะไปเพิ่มให้กับอัลลีล 92 bp ที่ลบออก 2 bp พบลักษณะ “triangle pattern” เมื่อขนาดของอัลลีลต่างกัน 2 bp ของ heterozygous Individual ของ dinucleotide repeat marker

(5) heterozygous individual : 1-bp stutter

ตัวอย่าง โปรแกรม GeneScan™ ที่แสดงรูปภาพ electropherogram ของเครื่องหมาย พันธุกรรม ชนิด 2 ซ้ำของ nucleotide (dinucleotide repeat marker) จากรูปแบบ heterozygous individual เมื่อ peak มีช่วงห่างกัน 1 bp ตามรูปที่ 4 - 10



รูปที่ 4 - 10 รูปแบบของ electropherogram ชนิด dinucleotide repeat heterozygote แสดง 1 bp stutter

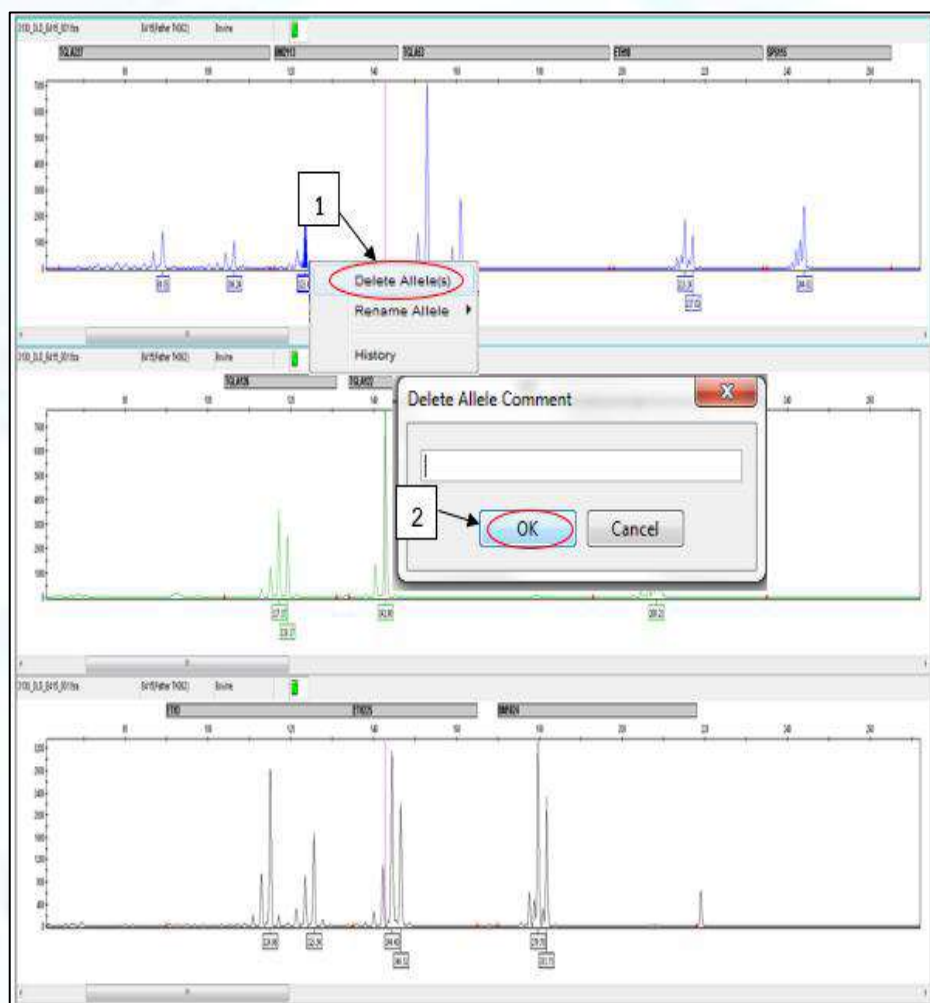
จากรูปที่ 4 - 10 จะอ่านผลได้ ดังนี้

PEAK	Origin
1	+A Product of allele peak
2	True allele peak on DNA sequence
3	-2 bp stutter of +A peak
4	-2 bp stutter to true allele peak
5	-4 bp stutter of +A peak

การลบ - เพิ่มตำแหน่งพีคของ electropherogram ที่ไม่ตรงตามรูปแบบที่กำหนด

การลบ

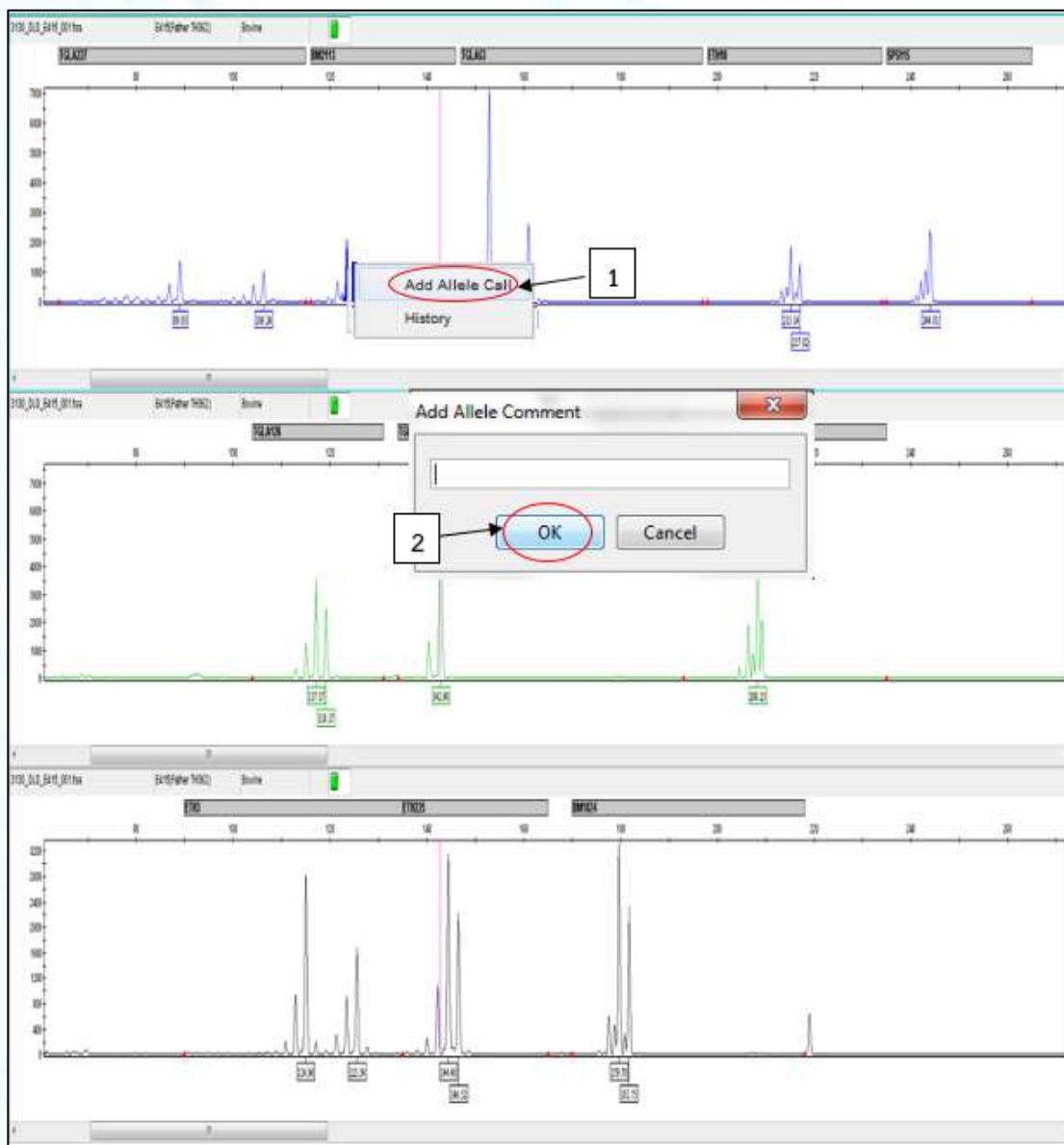
เลือกที่รูปพีคแล้วคลิกซ้าย เลือก Delete Allele(s) (หมายเลข 1) ตามรูปที่ 11 จะปรากฏข้อความ Delete Allele Comment แล้วกด OK (หมายเลข 2) ตามรูปที่ 4 - 11



รูปที่ 4 - 11 การลบตำแหน่งพีคของ electropherogram

การเพิ่ม

เลือกที่รูปฟิคแล้วคลิกซ้าย เลือก Add Allele Call (หมายเลข 1) ตามรูปที่ 12 จะปรากฏข้อความ Add Allele Comment แล้วกด OK (หมายเลข 2) ตามรูปที่ 4 - 12

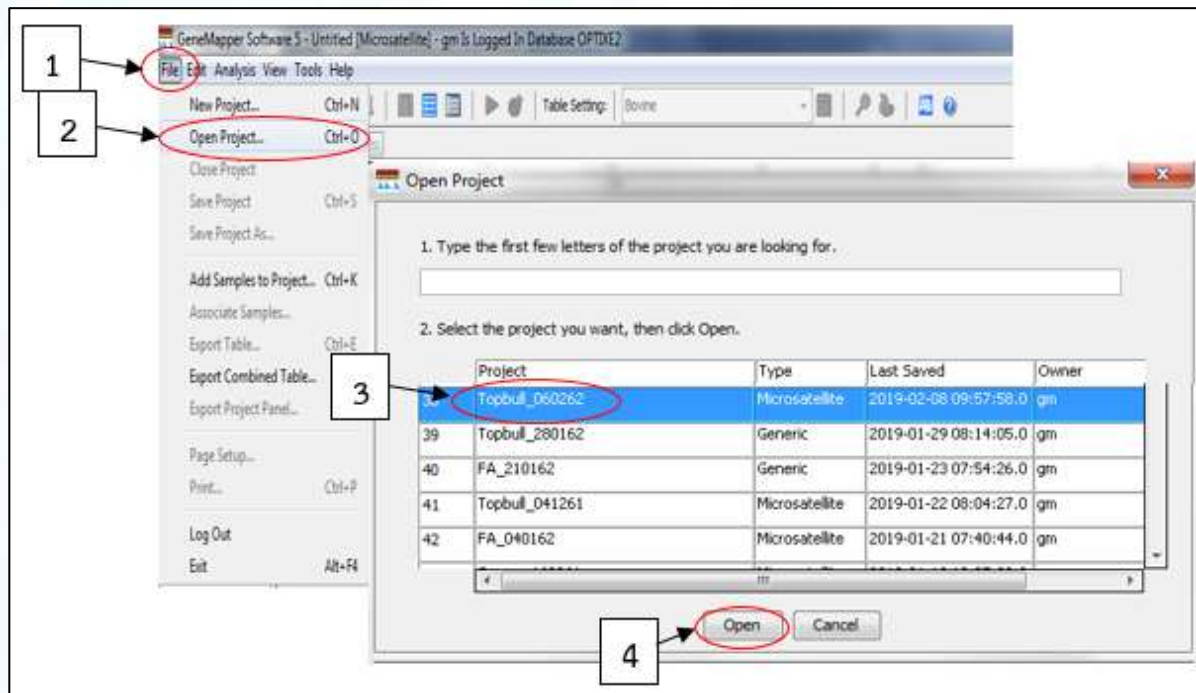


รูปที่ 4 - 12 การเพิ่มตำแหน่งพิกของ electropherogram

การบันทึกข้อมูลและถ่ายโอนข้อมูล

การบันทึกข้อมูล

1. เลือก File (หมายเลข 1) ตามรูปที่ 4 - 13 เลือก Open Project (หมายเลข 2) แล้วเลือก Project เก็บข้อมูลที่ต้องการ เช่น Topbull_060262 (หมายเลข 3) เลือก Open (หมายเลข 4)



รูปที่ 4 - 13 การเลือก Project ที่ต้องการ

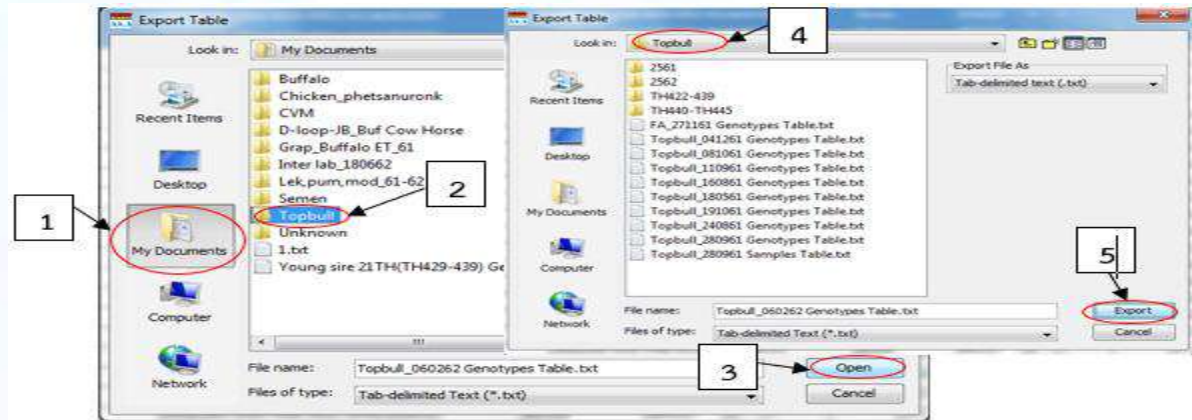
2. จะปรากฏหน้าจอข้อมูลทั้งหมดที่อยู่ใน Project ตามรูปที่ 4 - 14 เลือก Genotypes (หมายเลข 1) และเลือก Export Tabel (หมายเลข 2) เพื่อนำข้อมูลที่เป็นตารางออกไปเก็บไว้ตามแหล่งที่ต้องการ



รูปที่ 4 - 14 ข้อมูลทั้งหมดใน Project และการ Export Table

3. เลือกแหล่งที่ต้องการเก็บข้อมูล ตามรูปที่ 4 - 15 เช่น My Documents (หมายเลข 1)/ Folder : Topbull (หมายเลข 2) เลือก Open (หมายเลข 3) ข้อมูลที่อยู่ใน Folder : Topbull จะปรากฏ (หมายเลข 4) จากนั้นเลือก Export (หมายเลข 5) ข้อมูลจะถูกเก็บไว้ใน My Documents/ Folder : Topbull

ชื่อ File Topbull_060262 Genotypes Table.txt เป็นต้น เรียบร้อย

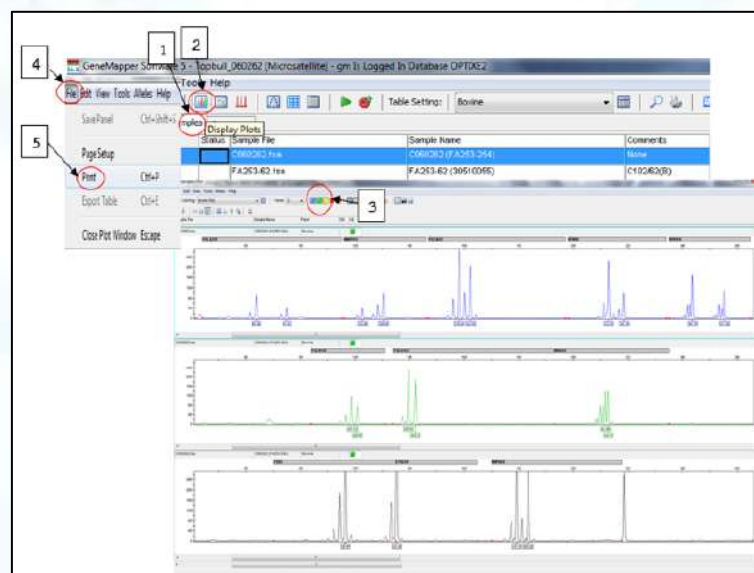


รูปที่ 4 - 15 การนำข้อมูลที่เป็นตาราง (Table) เก็บไว้ตามแหล่งที่ต้องการ

การถ่ายโอนข้อมูล

1. copy ข้อมูลที่เป็นตารางจากการบันทึกข้อมูลในขั้นตอนที่ 8.1.12.1.3 เช่น ชื่อ File Topbull_060262 Genotypes Table.txt เพื่อนำไปประกอบการทำรายงานผลการทดสอบ

2. พิมพ์กราฟ electropherogram โดยเลือกที่ Sample ของแต่ละ sample (หมายเลข 1) ตามรูปที่ 4 - 16 เลือกสัญลักษณ์  (Display Plot) (หมายเลข 2) จะปรากฏหน้าต่าง Sample plot เลือกสีทั้ง 3 สี คือสีน้ำเงิน สีเขียว สีเหลือง (หมายเลข 3) จากนั้นเลือก File (หมายเลข 4) เลือก Print (หมายเลข 5) จะได้ข้อมูลที่เป็นกราฟ electropherogram ที่สมบูรณ์ของ sample แต่ละตัวอย่าง เพื่อนำมาประกอบการทำรายงานผลการทดสอบ



รูปที่ 4 - 16 การพิมพ์กราฟ electropherogram ของแต่ละตัวอย่าง

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ

1. การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) โค

1.1 วิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม GeneMapper ตามวิธีปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ ด้วยโปรแกรม GeneMapper

ตารางที่ 4 - 1 แสดงชื่อ ไพร์เมอร์จำนวน 11 ตำแหน่ง (locus) ฟลูออเรสเซนต์ (dye) สี (colour) และช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (expected size range) ในการตรวจอัตลักษณ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกในโค

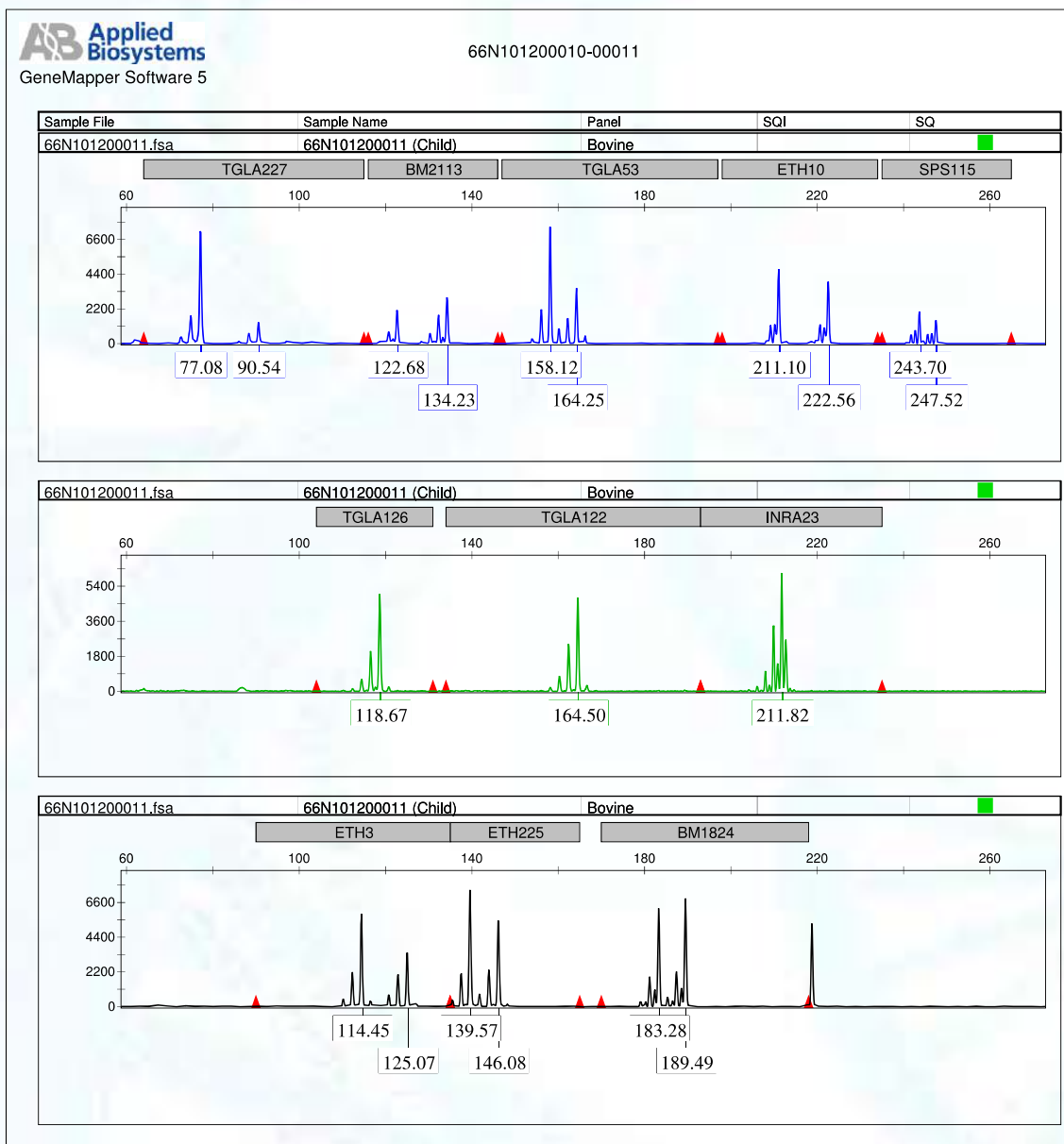
Locus	Dye	Colour	Expected Size Range (± 2 bp)
TGLA227	FAM	BLUE	64 - 115
BM2113	FAM	BLUE	116 - 146
TGLA53	FAM	BLUE	147 - 197
ETH10	FAM	BLUE	198 - 234
SPS115	FAM	BLUE	235 - 265
TGLA126	JOE	GREEN	104 - 131
TGLA122	JOE	GREEN	134 - 193
INRA23	JOE	GREEN	193 - 235
ETH3	NED	YELLOW	90 - 135
ETH225	NED	YELLOW	165 - 165
BM1824	NED	YELLOW	170 - 218

111

1.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper V3.7 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 11 ตำแหน่ง ต้องมีช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งเท่ากับคู่มือชุดน้ำยา StockMarks® Kits for Horses, Cattle, and Dog Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits (StockMarks® Kits.) ดังตารางที่ 4 - 1 และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือ ชุดน้ำยา StockMarks® Kits. ตามรูปที่ 4 - 17 (แสดงลักษณะรูปแบบของ electropherogram ทั้ง 11 ตำแหน่ง)

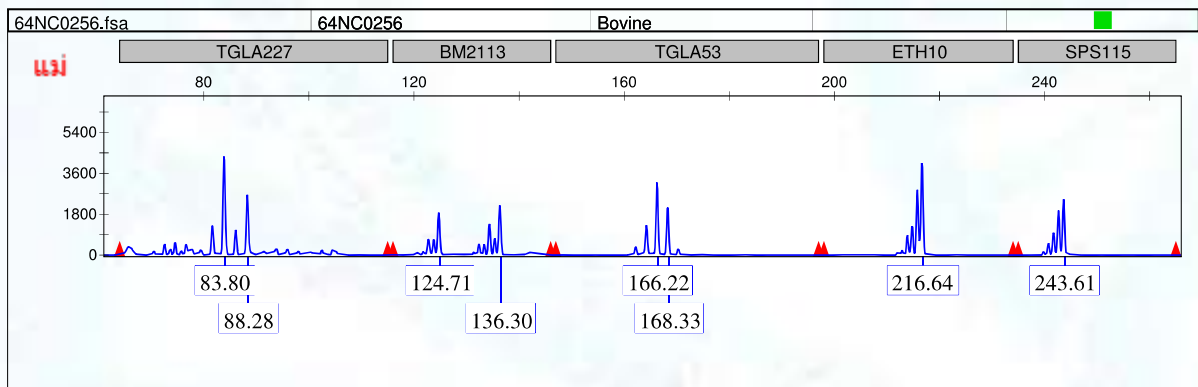
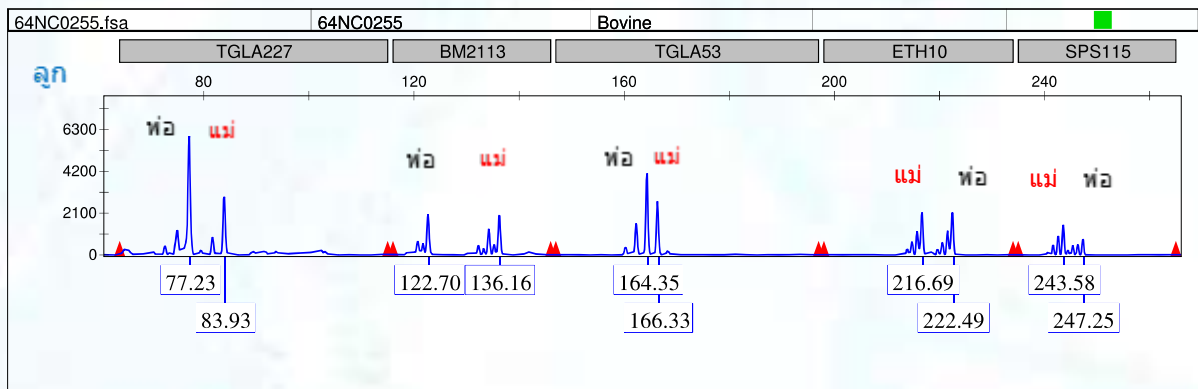
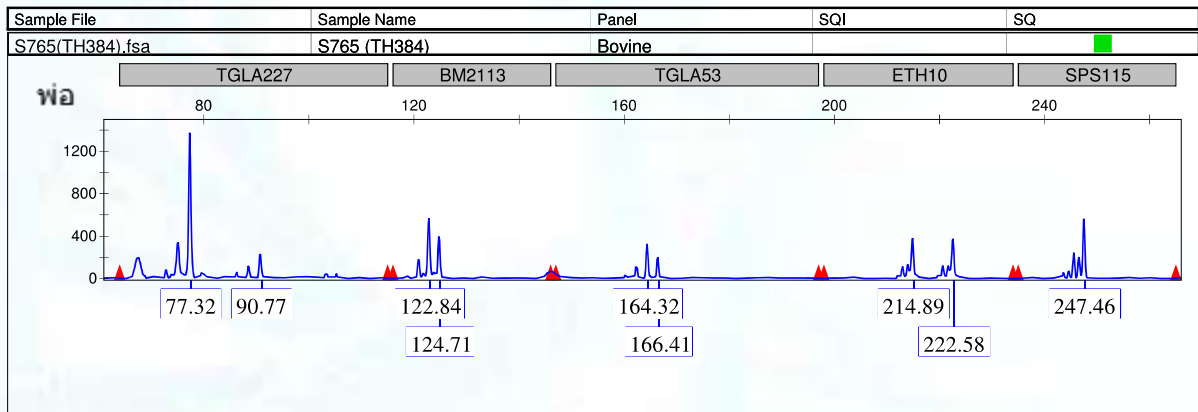
2. การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกโค

2.1 การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซเทลไลต์จำนวน 11 คู่ ตามมาตรฐาน ISAG (the international society of animal genetics) ต้องมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงที่กำหนด และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks® Kits



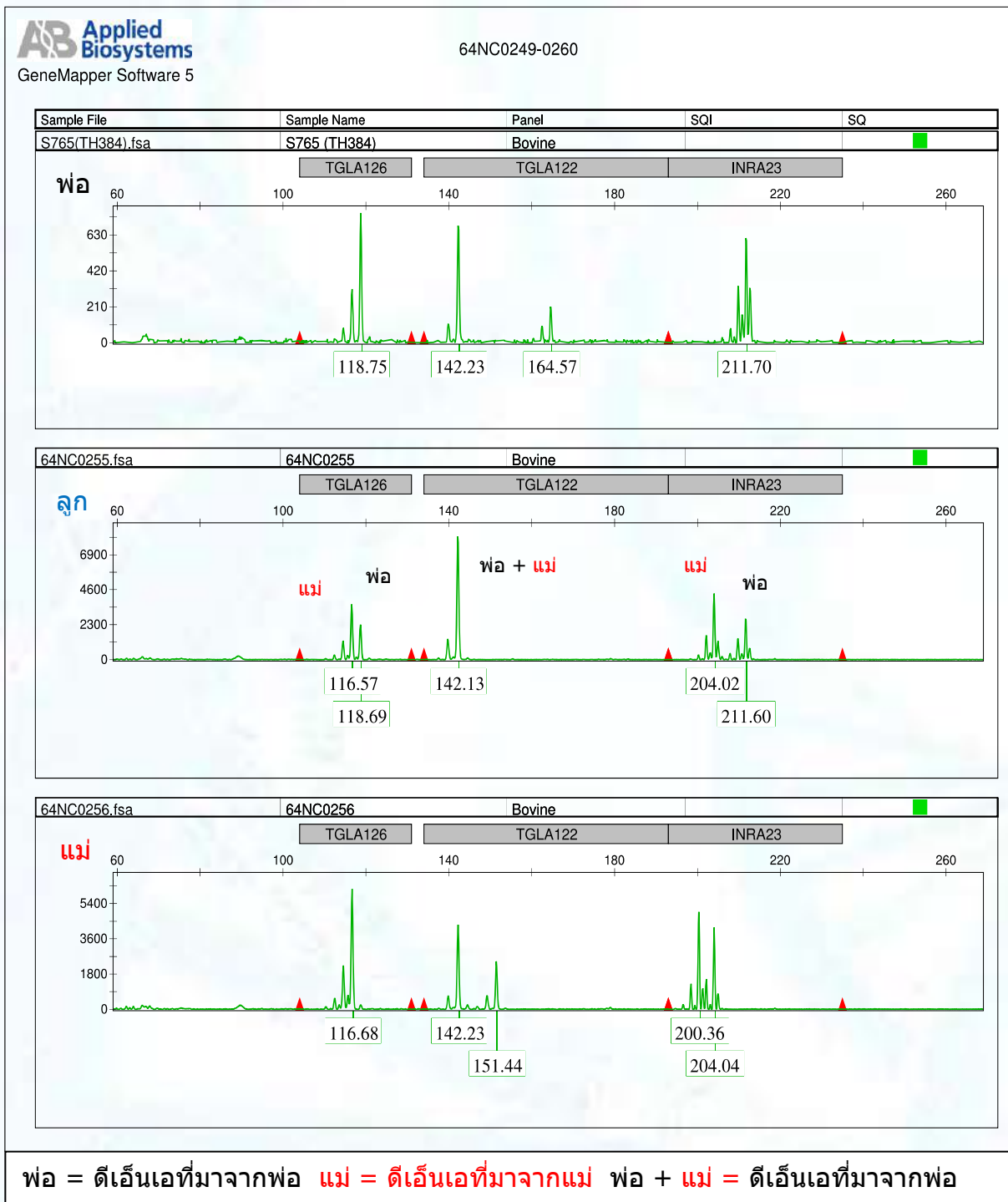
รูปที่ 4 - 17 แสดงรูปภาพ electropherogram ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 11 ตำแหน่งของตัวอย่างโค โดยมีกราฟสีน้ำเงิน (blue) 5 ตำแหน่ง สีเขียว (green) 3 ตำแหน่ง และ สีดำ (yellow) 3 ตำแหน่ง (ตามตารางที่ 4 - 1) ในแต่ละตำแหน่งจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อัลลีลที่เหมือนกันจะแสดงค่าตัวเลขเดียว)

2.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำจะต้องมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอครบทั้งพ่อ-แม่-ลูก ตามมาตรฐานสากลของ international society of animal genetics (ISAG) ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอลูกจะต้องได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งทั้ง 11 ไพรเมอร์ตามรูปที่ 4 - 18, 19 และ 20 โดยขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจากพ่อหรือแม่ มีความแตกต่างกันของอัลลีลมีค่า $\pm$ ไม่เกิน 2 bp



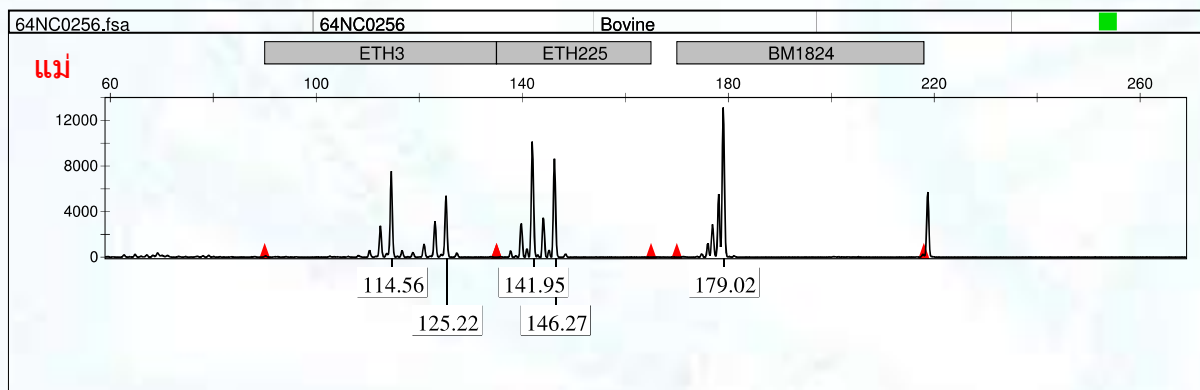
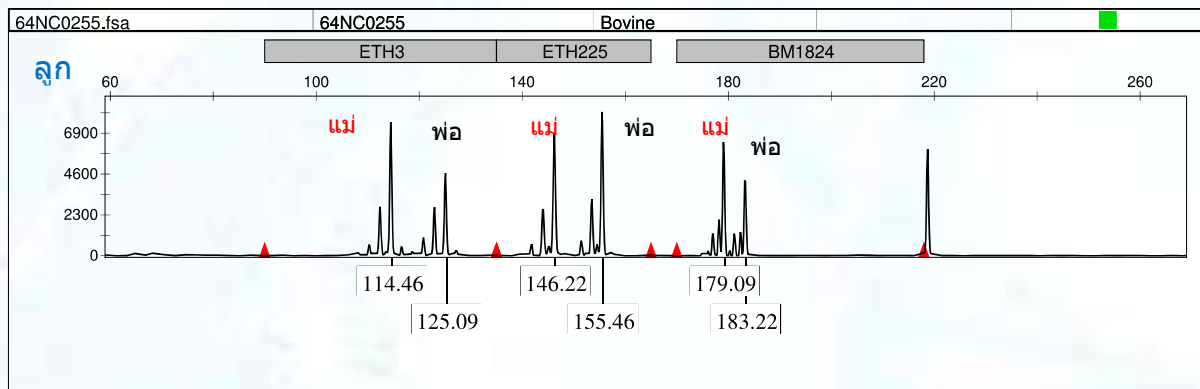
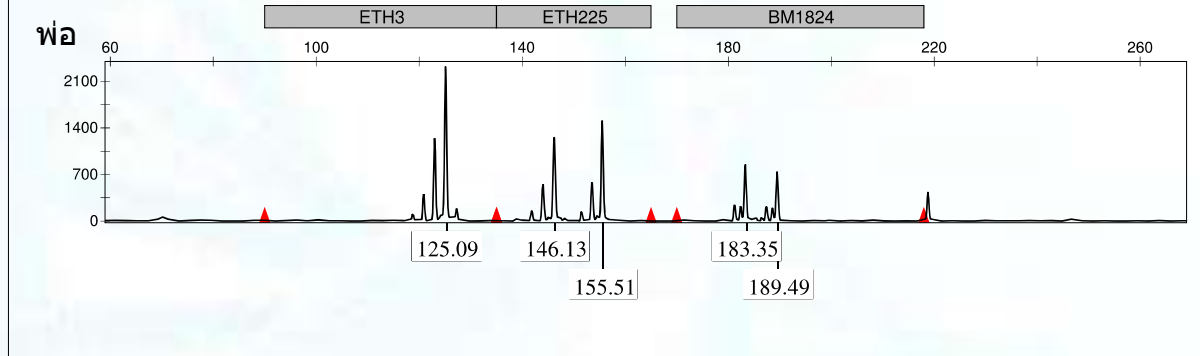
พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 18 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 ตำแหน่ง ดังนี้ TGLA227 BM2113 TGLA53 ETH10 และ SPS115 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAM™ (BLUE) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกโค โดยทั้ง 5 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่าง 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง TGLA227 พบ อัลลีล 77.23 bp และ 83.93 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 77.32 bp ของพ่อและอัลลีล 83.80 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



รูปที่ 4 - 19 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ TGLA126 TGLA122 และ INRA23 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด JOE™ (GREEN) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกโค โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่าง 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง TGLA126 พบอัลลีล 116.57 bp และอัลลีล 118.69 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 116.68 bp ของแม่และอัลลีล 118.75 bp ของพ่อ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

Sample File	Sample Name	Panel	SQI	SQ
S765 (TH384).fsa	S765 (TH384)	Bovine		



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 20 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ETH3 ETH225 และ BM1824 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด NED™ (YELLOW) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกโค โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่าง 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง ETH3 พบอัลลีล 114.46 bp และอัลลีล 125.09 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 114.56 bp ของแม่และอัลลีล 125.09 bp ของพ่อ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

3. การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) กระบือ

3.1 วิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMapper ตามวิธีปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ ด้วยโปรแกรม GeneMapper

ตารางที่ 4 – 2 แสดงชื่อไพรเมอร์จำนวน 10 ตำแหน่ง (locus) ฟลูออเรสเซนต์ (dye) สี (colour) และช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (expected size range) ในการตรวจอัตลักษณ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูก ในกระบือ

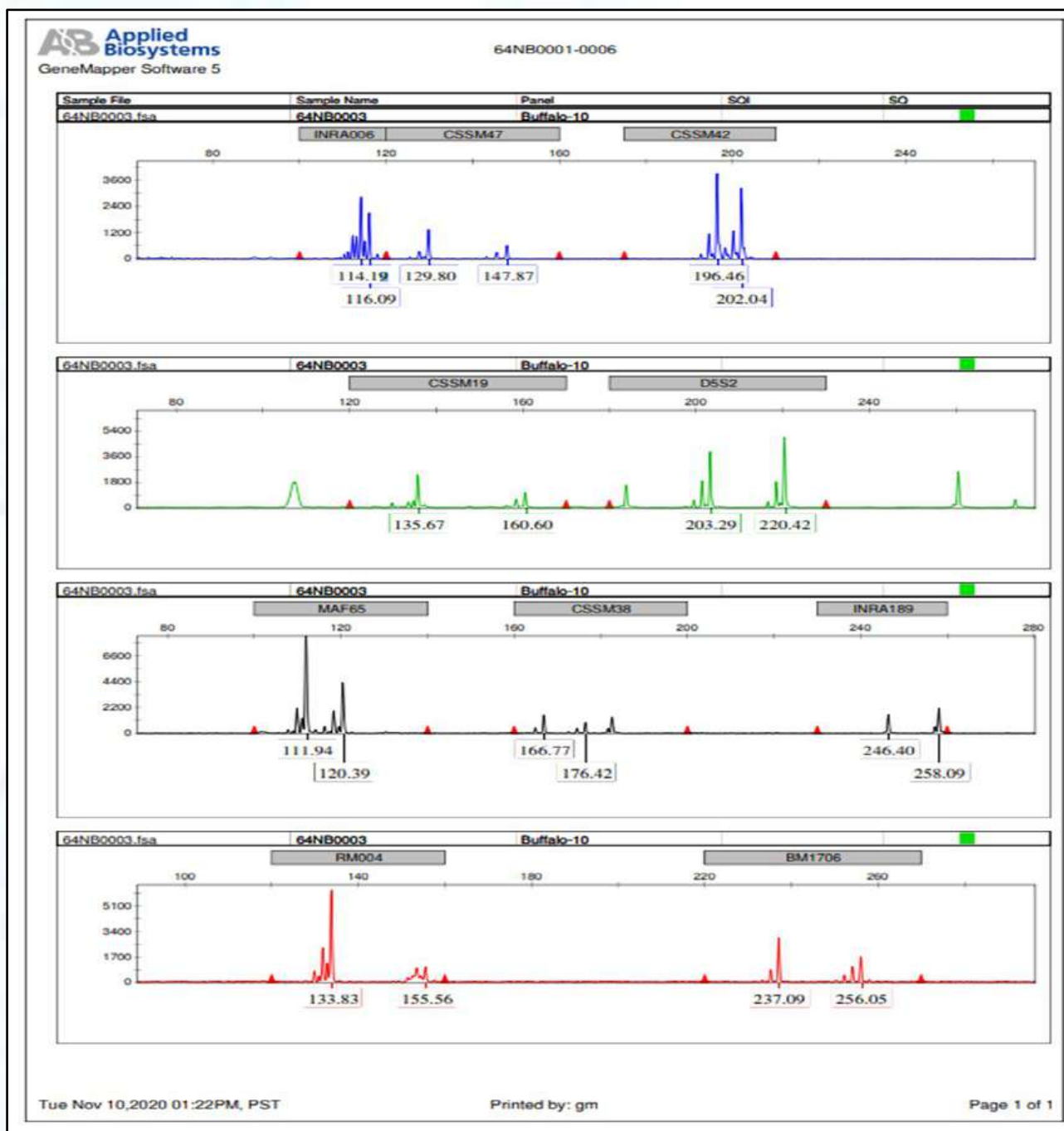
Locus	Dye	Colour	Expected size range (bp)*
INRA006	FAM TM	Blue	110-121
CSSM47	FAM TM	Blue	120-153
CSSM42	FAM TM	Blue	179-208
CSSM19	JOE TM	Green	126-163
D5S2	JOE TM	Green	194-220
MAF65	NED TM	Yellow	110-133
CSSM38	NED TM	Yellow	161-183
INRA189	NED TM	Yellow	244-258
RM004	PET	Red	123-159
BM1706	PET	Red	237-264

3.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper V3.7 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 10 ตำแหน่ง ต้องมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่กำหนดตามดังตารางที่ 4 - 2 และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits. ตามรูปที่ 4 - 21 (แสดงลักษณะรูปแบบของ electropherogram ทั้ง 10 ตำแหน่ง)

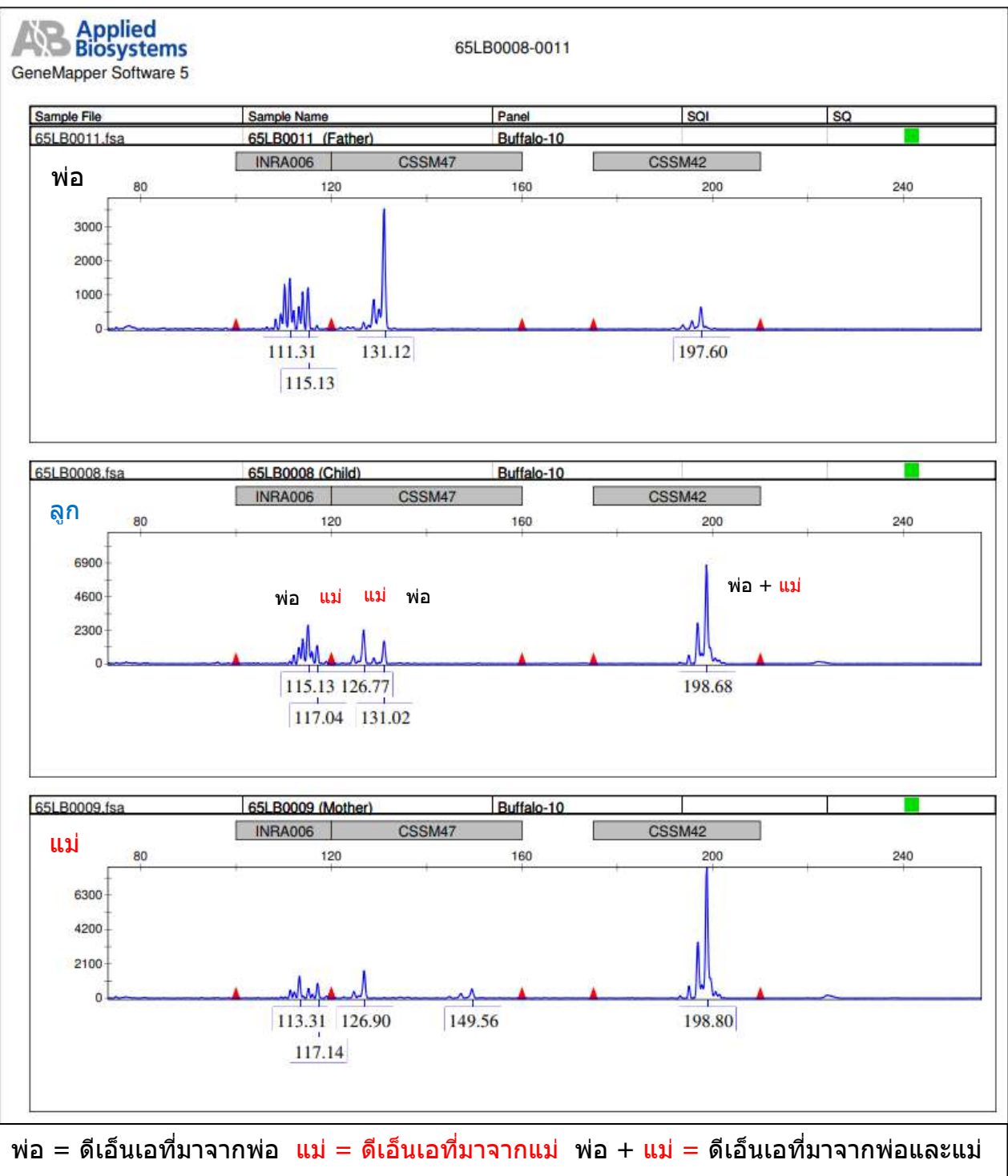
4 การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกกระบือ

4.1 การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซเทลไลต์ จำนวน 10 คู่ ตามมาตรฐาน ISAG (the international society of animal genetics) ต้องมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 10 ตำแหน่งอยู่ในช่วงที่กำหนด และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits

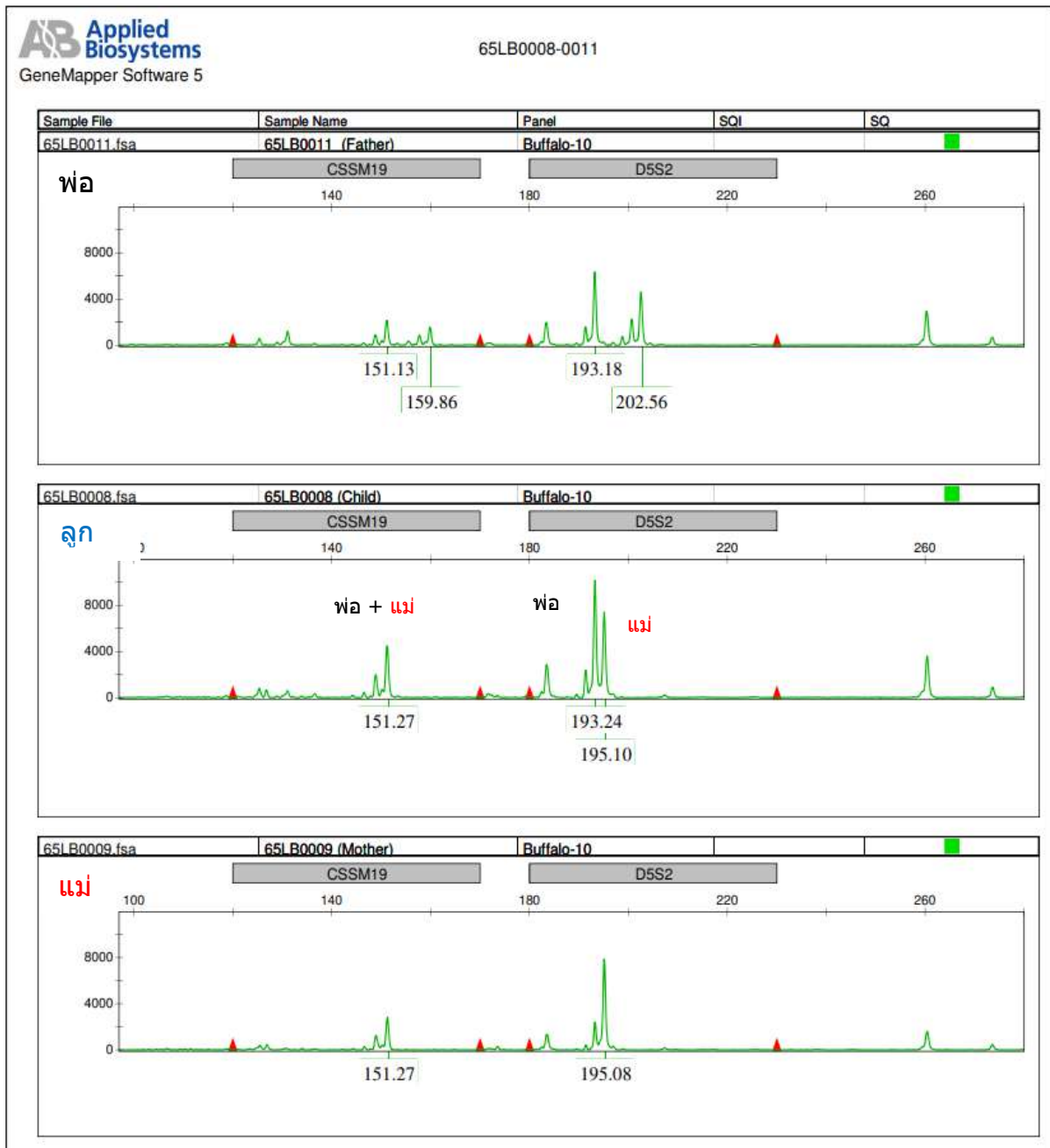
4.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำจะต้องมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอครบทั้ง พ่อ-แม่-ลูก ตามมาตรฐานสากลของ international society of animal genetics (ISAG) ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอลูกจะต้องได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งทั้ง 10 ไพรเมอร์ตามรูปที่ 4 - 22, 23, 24 และ 25 โดยขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจากพ่อหรือแม่มีความแตกต่างกันของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



รูปที่ 4 - 21 แสดงรูปภาพ electropherogram ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 10 ตำแหน่งของตัวอย่างกระบือ โดยมีกราฟสีน้ำเงิน (blue) 3 ตำแหน่ง สีเขียว (green) 2 ตำแหน่ง สีดำ (yellow) 3 ตำแหน่ง และสีแดง (red) 2 ตำแหน่ง (ตามตารางที่ 4 - 2) ในแต่ละตำแหน่งจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อัลลีลที่เหมือนกันจะแสดงค่าตัวเลขเดียว)

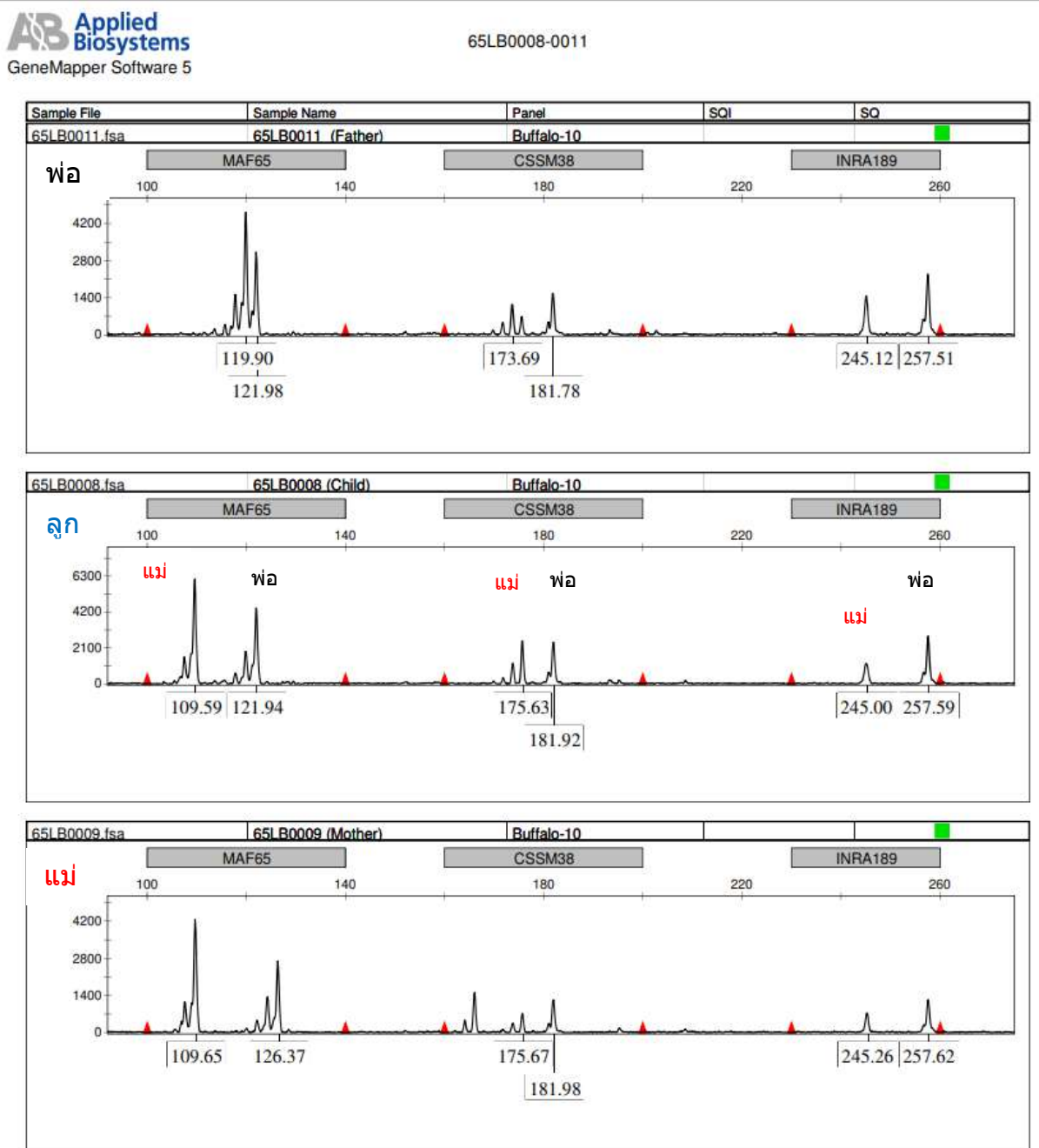


รูปที่ 4 - 22 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ INRA006 CSSM47 และ CSSM42 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAM™ (BLUE) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกกระป๋อง โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง INRA006 อัลลีล 115.13 bp และอัลลีล 117.04 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 115.13 bp ของพ่อและอัลลีล 117.14 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



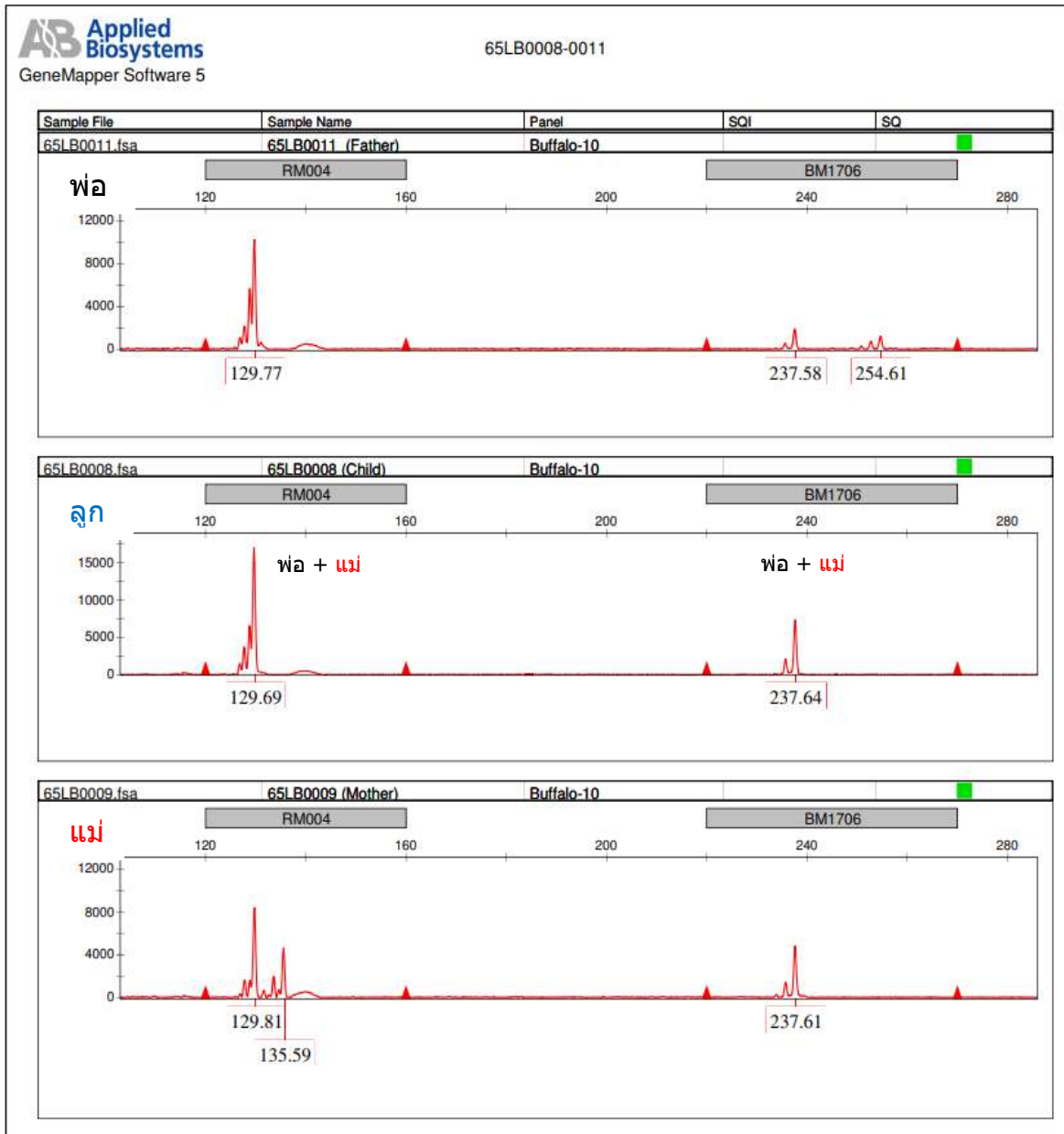
พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 23 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่ง ดังนี้ CSSM19 และ D5S2 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด JOE™ (GREEN) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก กระบือ โดยทั้ง 2 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง CSSM19 อัลลีล 151.27 bp และอัลลีล 151.27 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 151.13 bp ของพ่อและอัลลีล 151.27 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 24 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ MAF65 CSSM38 และ INRA189 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด NED™ (YELLOW) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกกระป๋อง โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง MAF65 อัลลีล 109.59 bp และอัลลีล 121.94 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 109.65 bp ของแม่และอัลลีล 121.98 bp ของพ่อ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 25 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่ง (RM004 และ BM1706) ที่ติดด้วย fluorescent dye ชนิด PET (RED) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก กระบือ โดยทั้ง 2 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง RM004 อัลลีล 129.69 bp และ 129.69 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 129.77 bp ของพ่อและอัลลีล 129.81 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

5. การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แพะ

5.1 วิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม GeneMapper ตามวิธีปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ ด้วยโปรแกรม GeneMapper

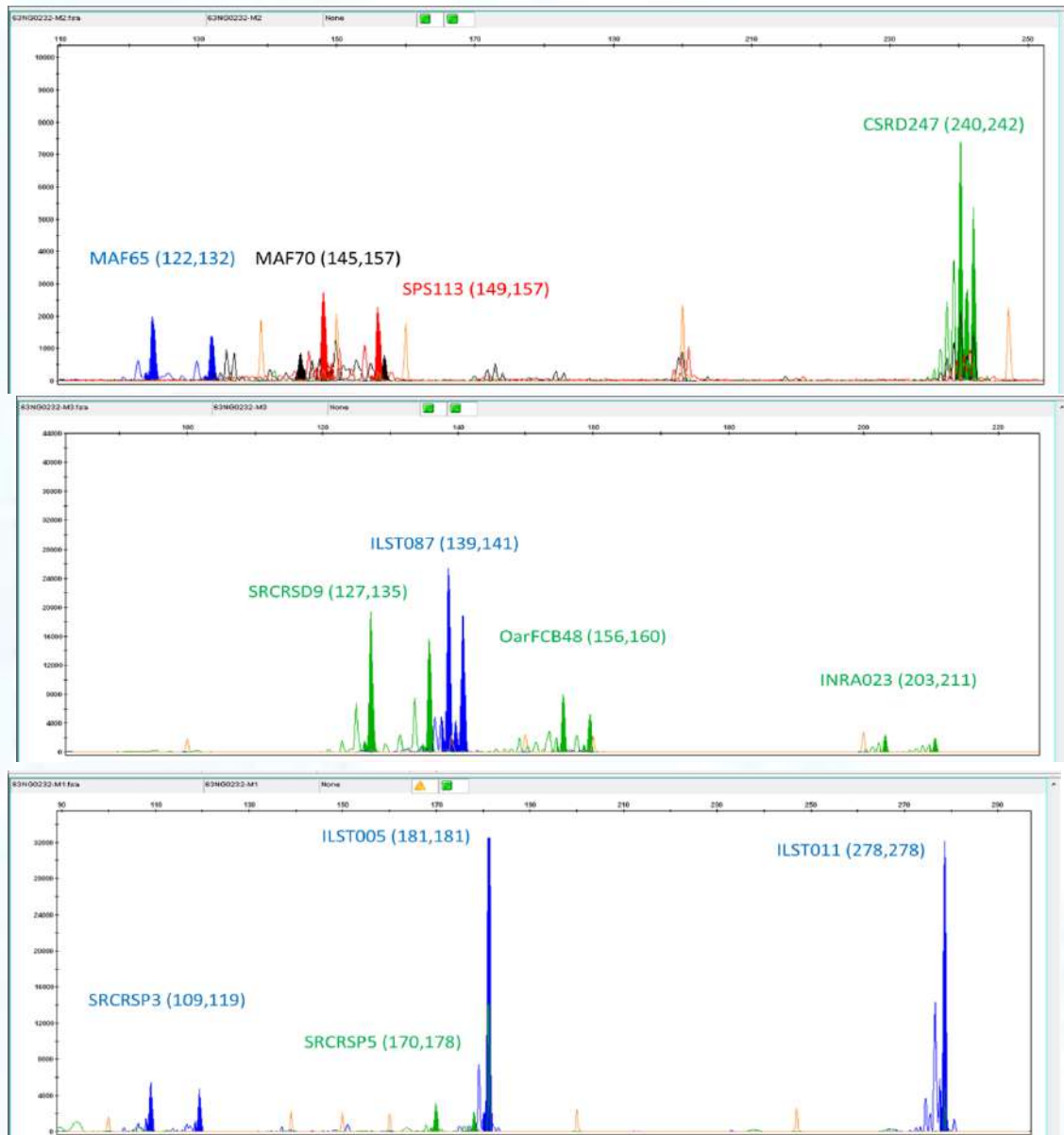
ตารางที่ 4 - 3 แสดงชื่อไพรเมอร์ จำนวน 12 ตำแหน่ง (locus) ฟลูออเรสเซนต์ (dye) สี (colour) และช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (expected size range) ในการตรวจอัตลักษณ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกในแพะ

Locus	Dye	Colour	Expected size range (bp)*
SPS113	PET TM	Red	134-158
MAF70	NED TM	Yellow	120-190
OarFCB48	VIC TM	Green	149-173
INRA023	VIC TM	Green	196-215
CSRD247	VIC TM	Green	220-247
SRCRSD9	VIC TM	Green	99-135
SRCRSP5	VIC TM	Green	156-178
MAF065	FAM TM	Blue	116-158
SRCRSP3	FAM TM	Blue	95-135
ILSTS005	FAM TM	Blue	160-230
ILSTS011	FAM TM	Blue	250-300
ILST087	FAM TM	Blue	135-155

5.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper V3.7 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 12 ตำแหน่ง ต้องมีขนาดดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่กำหนดตามตารางที่ 4 - 3 และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits. ตามรูปที่ 4 - 26 (แสดงลักษณะรูปแบบของ electropherogram ทั้ง 12 ตำแหน่ง)

6. การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกแพะ

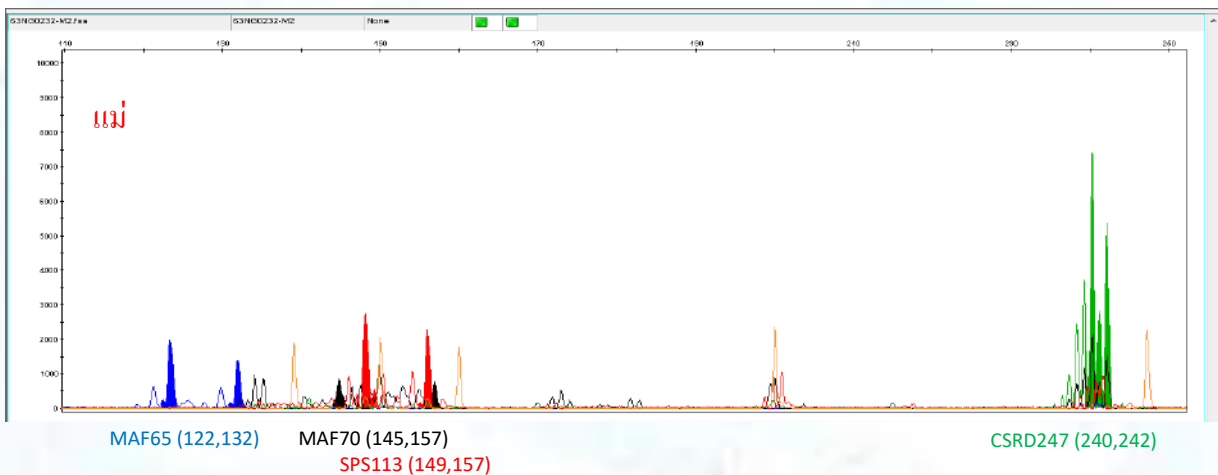
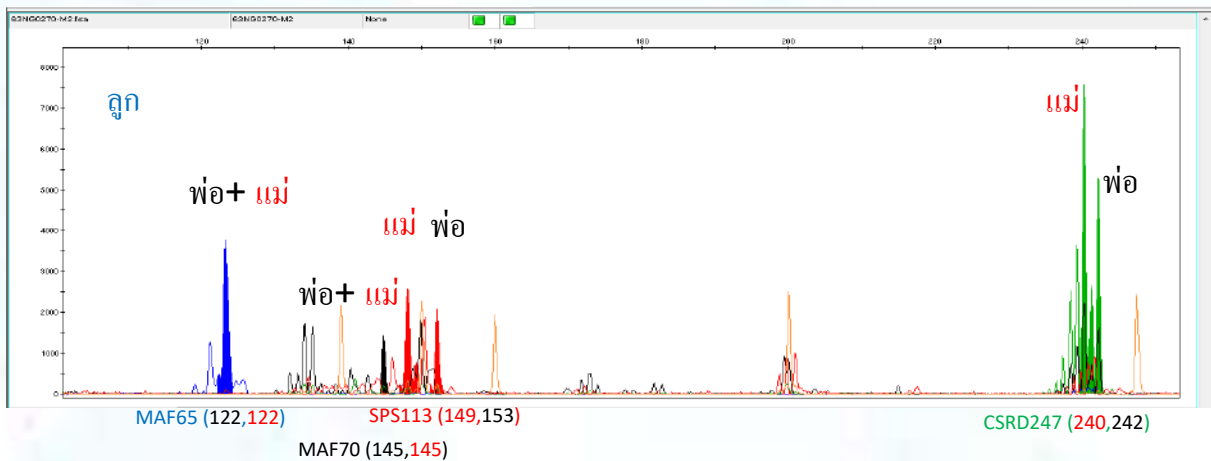
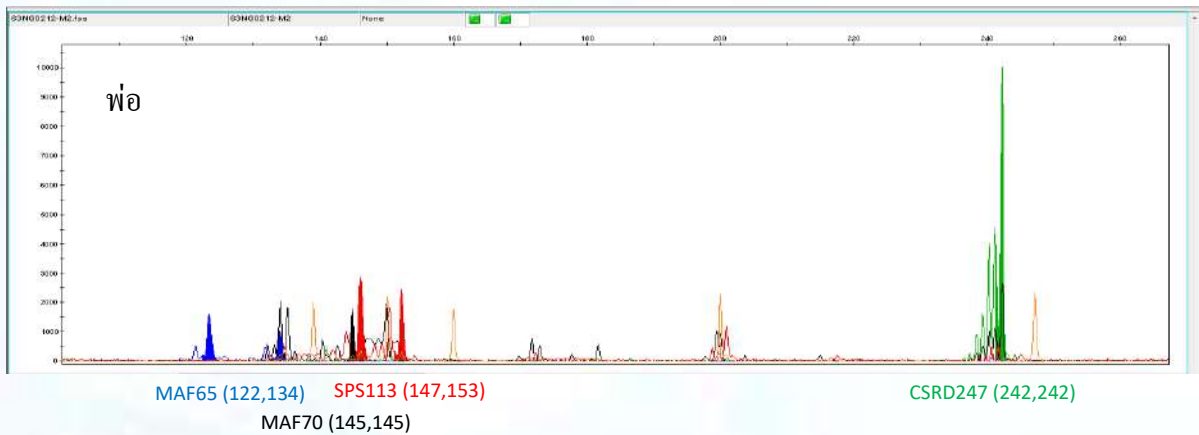
6.1 การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 12 คู่ ตามมาตรฐาน ISAG (the international society of animal genetics) ต้องมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 12 ตำแหน่งอยู่ในช่วงที่กำหนด และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits



รูปที่ 4 - 26 แสดงรูปภาพ electropherogram ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 12 ตำแหน่งของตัวอย่างแพะ โดยมีกราฟสีน้ำเงิน (blue) 5 ตำแหน่ง สีเขียว (green) 5 ตำแหน่ง แดง (red) 1 ตำแหน่งและ สีดำ (yellow) 1 ตำแหน่ง (ตามตารางที่ 4 - 3) ในแต่ละตำแหน่งจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อัลลีลที่เหมือนกันจะแสดงค่าตัวเลขเดียว)

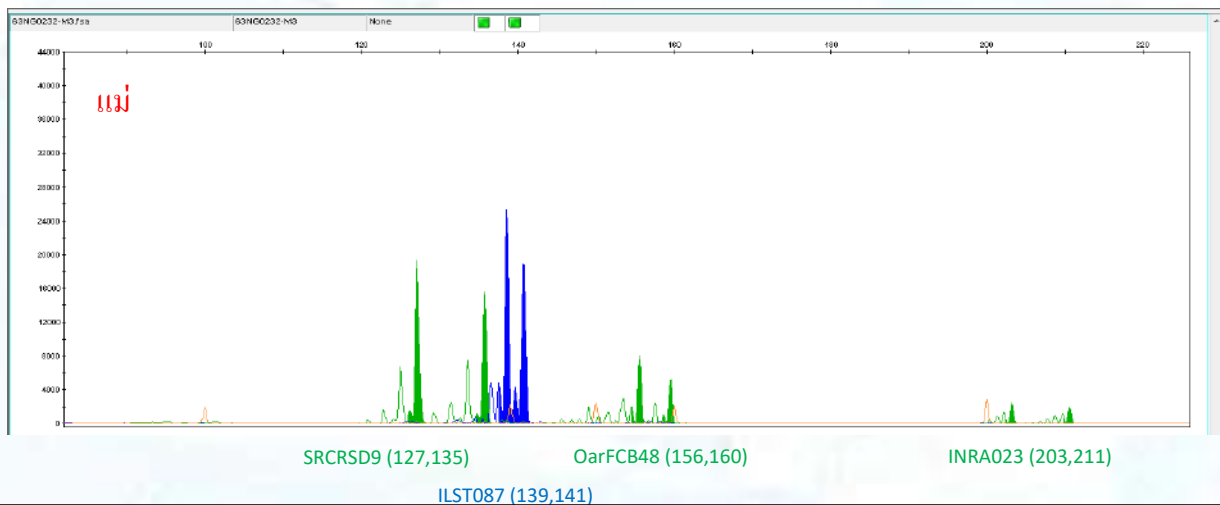
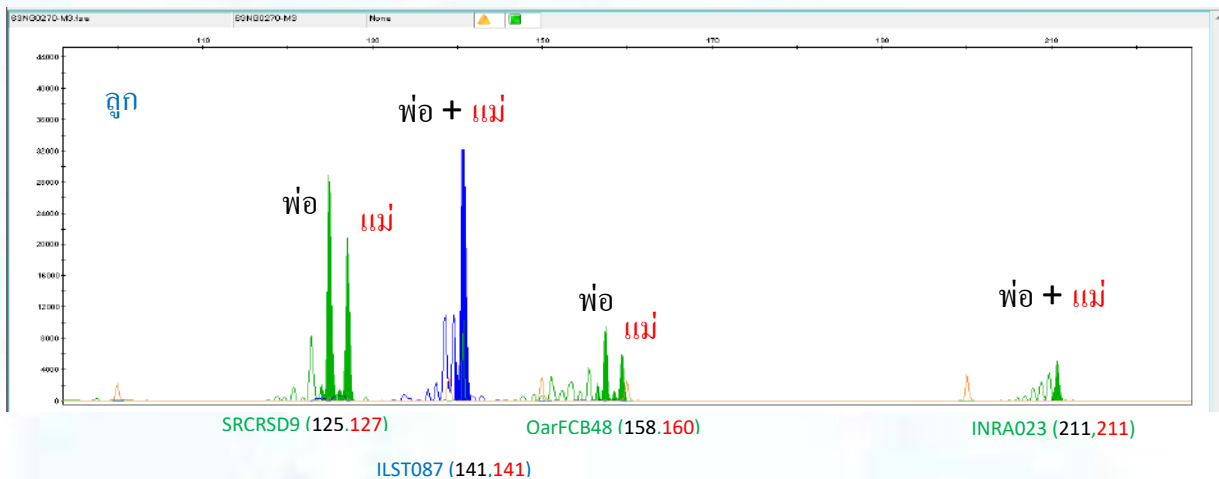
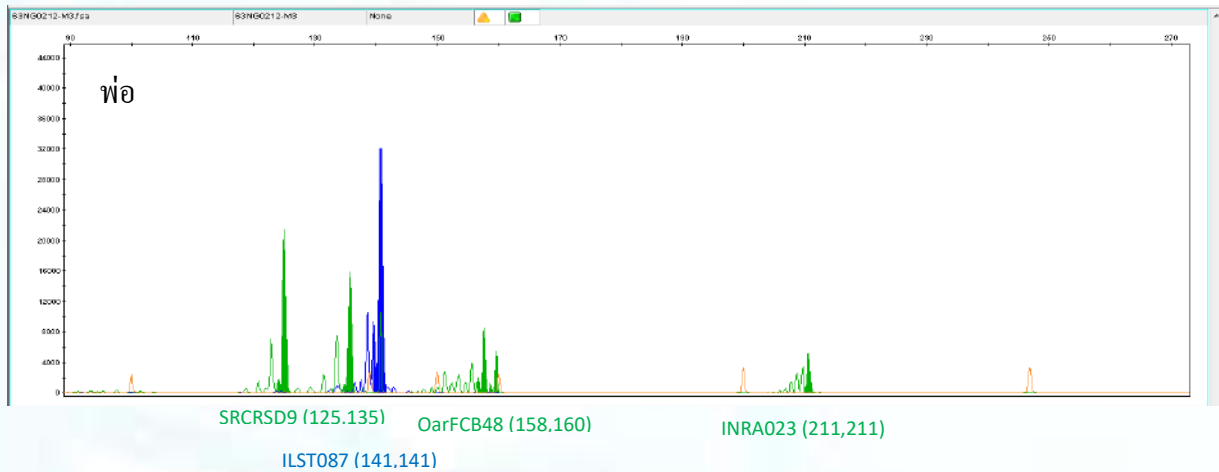
6.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำจะต้องมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอครบทั้ง พ่อ-แม่-ลูก ตามมาตรฐานสากลของ international society of animal genetics (ISAG) ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอลูกจะต้องได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งทั้ง 12 ไพรเมอร์ ตามรูปที่ 4 - 27, 28 และ 29 โดยขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจากพ่อหรือแม่ มีความแตกต่างกันของอัลลีลมีค่า $\pm$ ไม่เกิน 2 bp

คู่มือการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปศุสัตว์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์



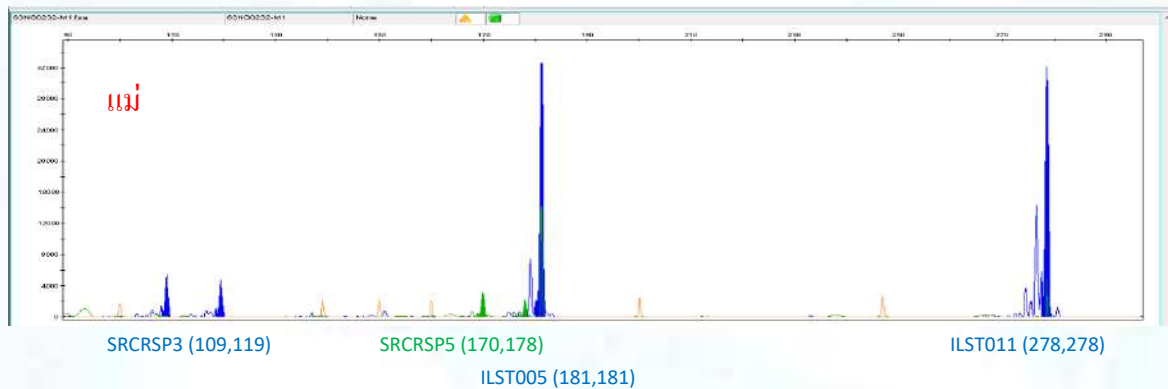
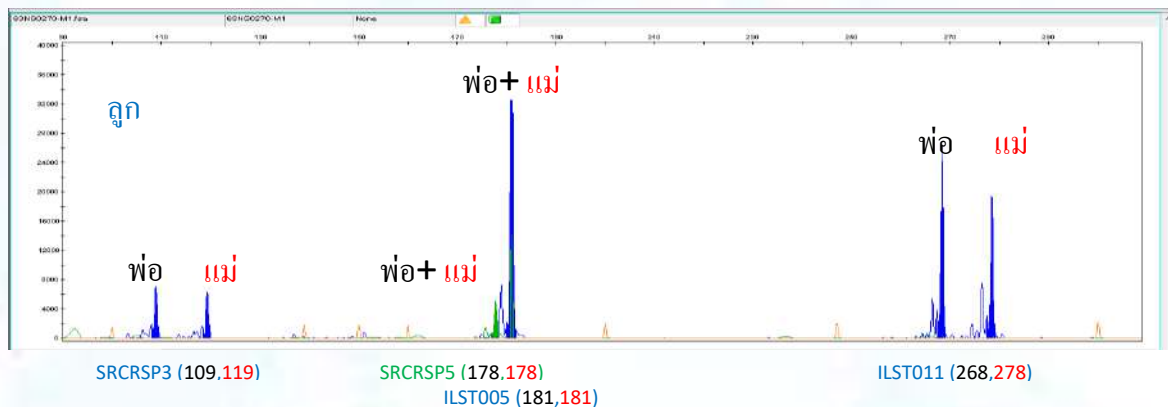
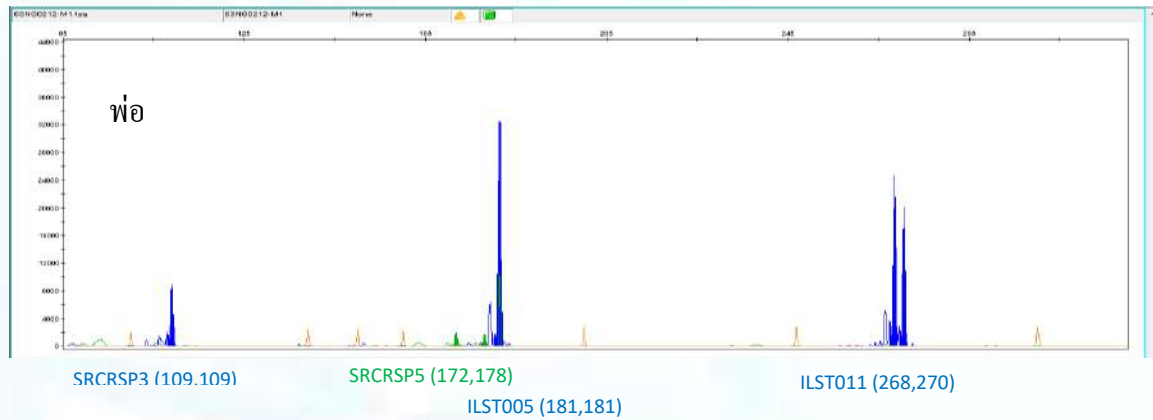
พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 27 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ดังนี้ MAF65 ที่ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAMTM (BLUE) MAF70 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด NEDTM (YELLOW) SPS113 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด PETTM (RED) และ CSRD247 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด VICTM (GREEN) เปรียบเทียบ ความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกแพะ โดยทั้ง 4 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่ อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง MAF65 อัลลีล 122 bp และ อัลลีล 122 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 122 bp ของพ่อและอัลลีล 122 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 28 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ดังนี้ SRCRSD9 OarFCB INRA023 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด VIC™ (GREEN) และ ILST087 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAM™ (BLUE) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกแพะ โดยทั้ง 4 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่ อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง SRCRSD9 อัลลีล 125 bp และอัลลีล 127 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 125 bp ของพ่อและอัลลีล 127 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 29 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ดังนี้ SRCRSP3 ILST005 ILST011) ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAMTM (BLUE) และ SRCRSP5 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด VIC TM (GREEN) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกแพะโดยทั้ง 4 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่ อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง SRCRSP3 อัลลีล 109 bp และอัลลีล 119 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 109 bp ของพ่อและอัลลีล 119 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

7. การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) สุนัข

7.1 วิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม GeneMapper ตามวิธีปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ ด้วยโปรแกรม GeneMapper ตารางที่ 4 - 4 แสดงชื่อไพรเมอร์ จำนวน 10 ตำแหน่ง (locus) ฟลูออเรสเซนต์ (dye) สี (colour) และช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ(expected size range)ในการตรวจอัตลักษณ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกในสุนัข

Locus	Dye	Colour	Expected size range (bp)*
PEZ 1	FAM TM	Blue	92-136
FHC 2054	FAM TM	Blue	140-183
FHC 2010	FAM TM	Blue	210-260
PEZ 5	JOE TM	Green	97-121
PEZ 20	JOE TM	Green	170-201
PEZ 12	JOE TM	Green	250-320
PEZ 3	NED TM	Yellow	95-154
PEZ 6	NED TM	Yellow	164-214
PEZ 8	NED TM	Yellow	222-260
FHC 2079	NED TM	Yellow	263-299

127

7.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper V3.7 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 10 ตำแหน่ง ต้องมีช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งเท่ากับคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits for Horses, Cattle, and Dog Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits (StockMarks[®] Kits.) ดังตารางที่ 4 - 4 และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือ ชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits. ตามรูปที่ 4 - 30 (แสดงลักษณะรูปแบบของ electropherogram ทั้ง 10 ตำแหน่ง)

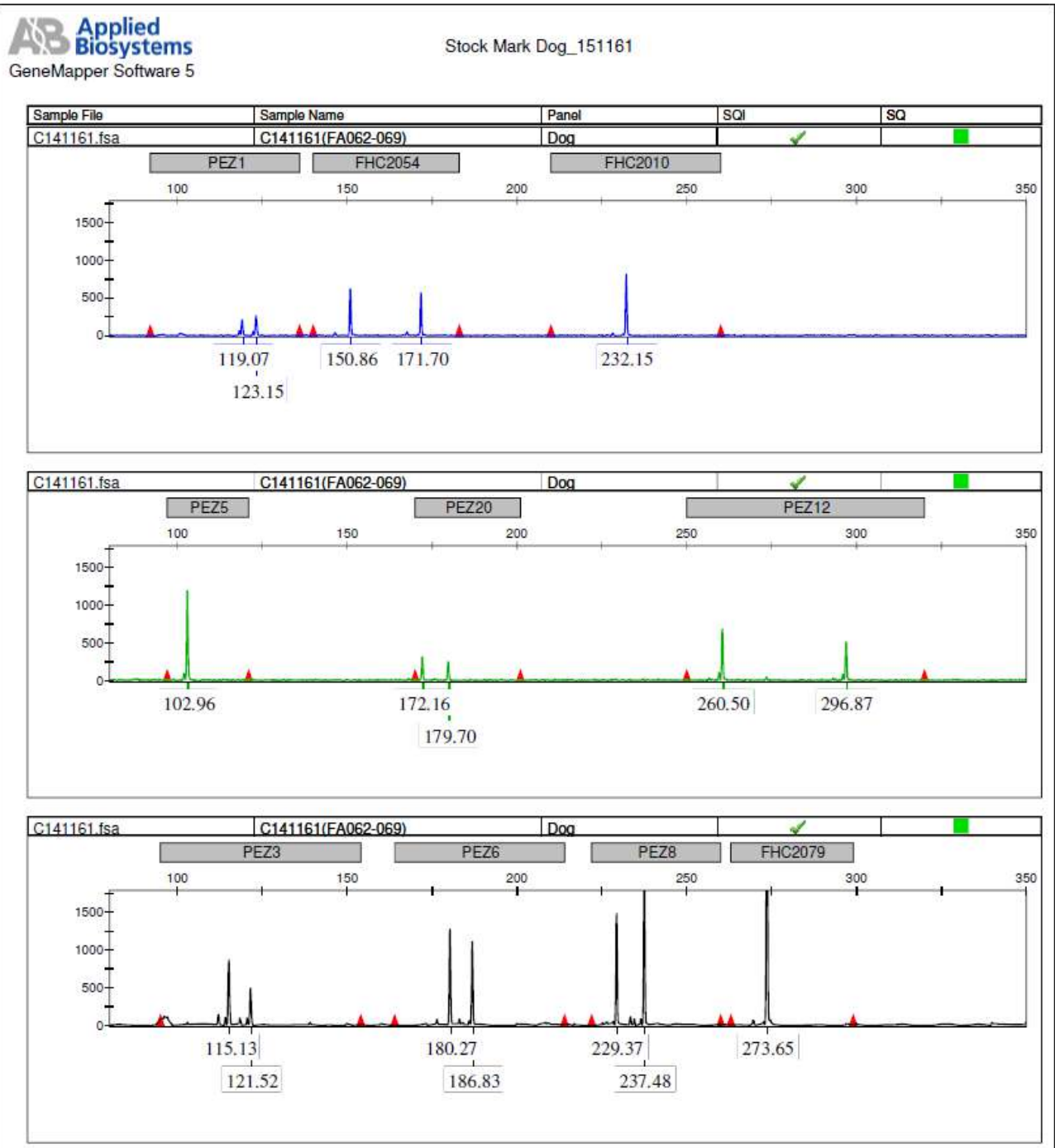
8. การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกสุนัข

8.1 การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ด้วยเครื่องมือดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 10 คู่ ตามมาตรฐาน ISAG (the international society of animal genetics) ต้องมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 10 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงที่กำหนดและลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits

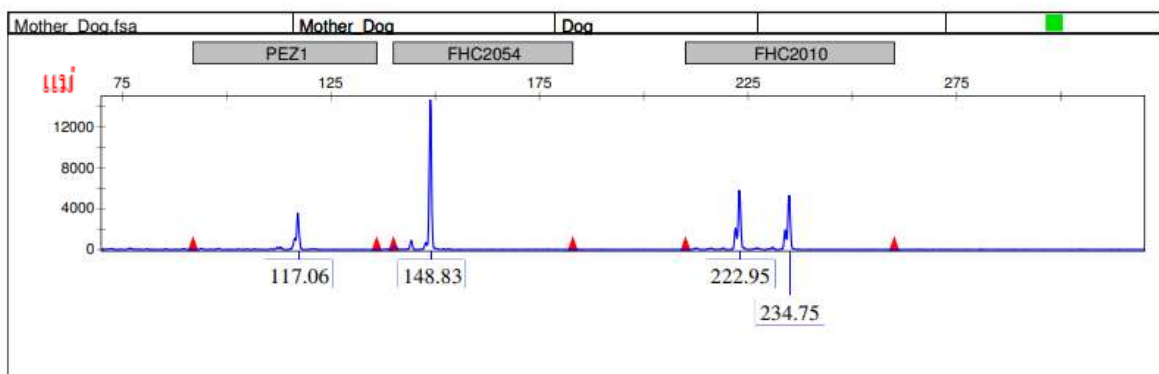
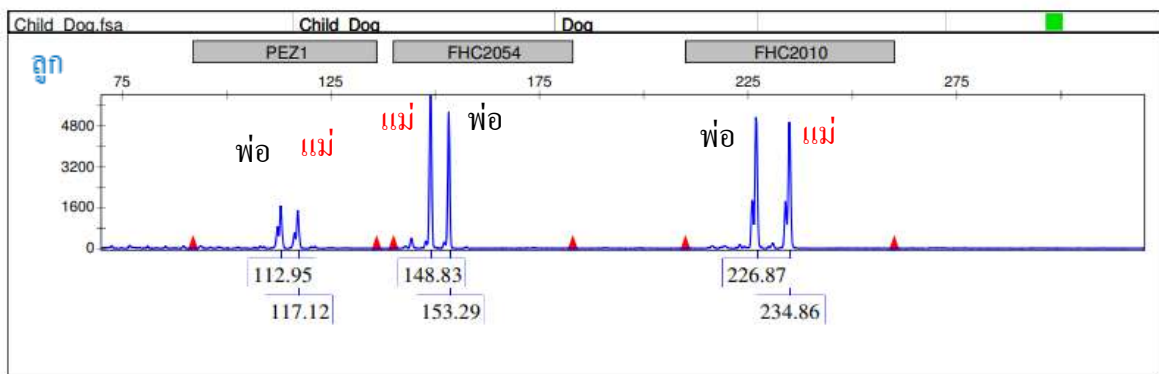
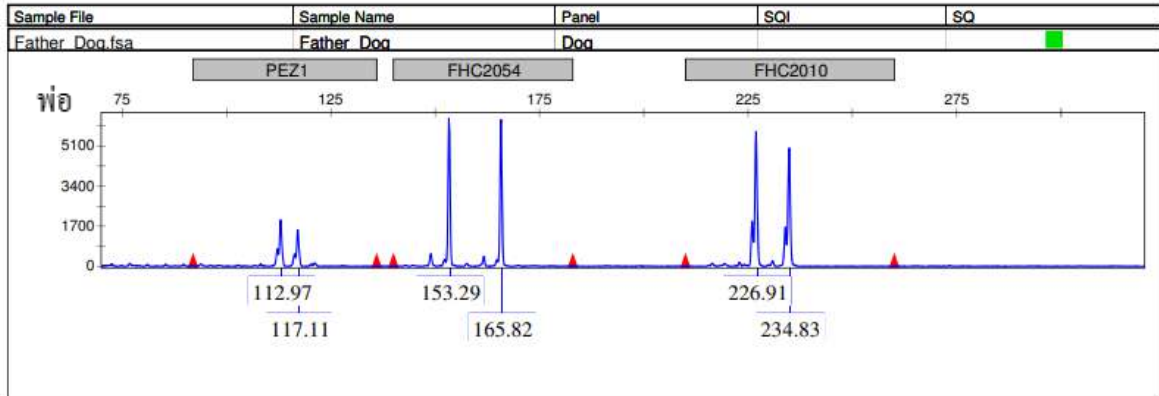
8.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำจะต้องมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอครบทั้งพ่อ-แม่-ลูก ตามมาตรฐานสากลของ international society of animal genetics (ISAG) ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอลูกจะต้องได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งทั้ง 10

คู่มือการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปศุสัตว์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ไพรเมอร์ ตามรูปที่ 4 – 31, 32, และ 33 โดยขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจากพ่อหรือแม่มีความแตกต่างกันของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

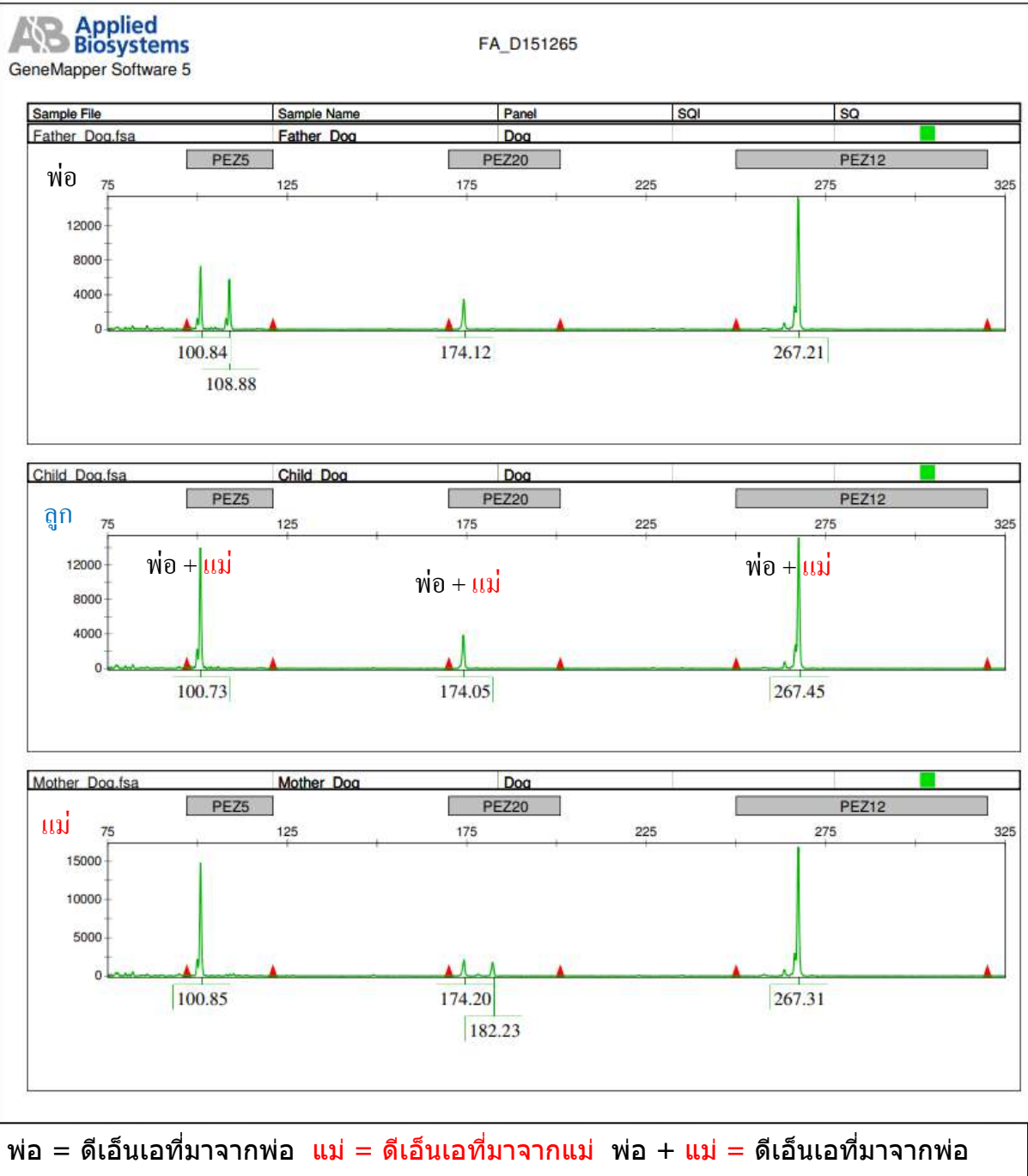


รูปที่ 4 - 30 แสดงรูปภาพ electropherogram ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 10 ตำแหน่งของตัวอย่างสุนัข โดยมีกราฟสีน้ำเงิน (blue) 3 ตำแหน่ง สีเขียว (green) 3 ตำแหน่งและสีดำ (yellow) 4 ตำแหน่ง (ตามตารางที่ 4 - 4) ในแต่ละตำแหน่งจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อัลลีลที่เหมือนกันจะแสดงค่าตัวเลขเดียว)

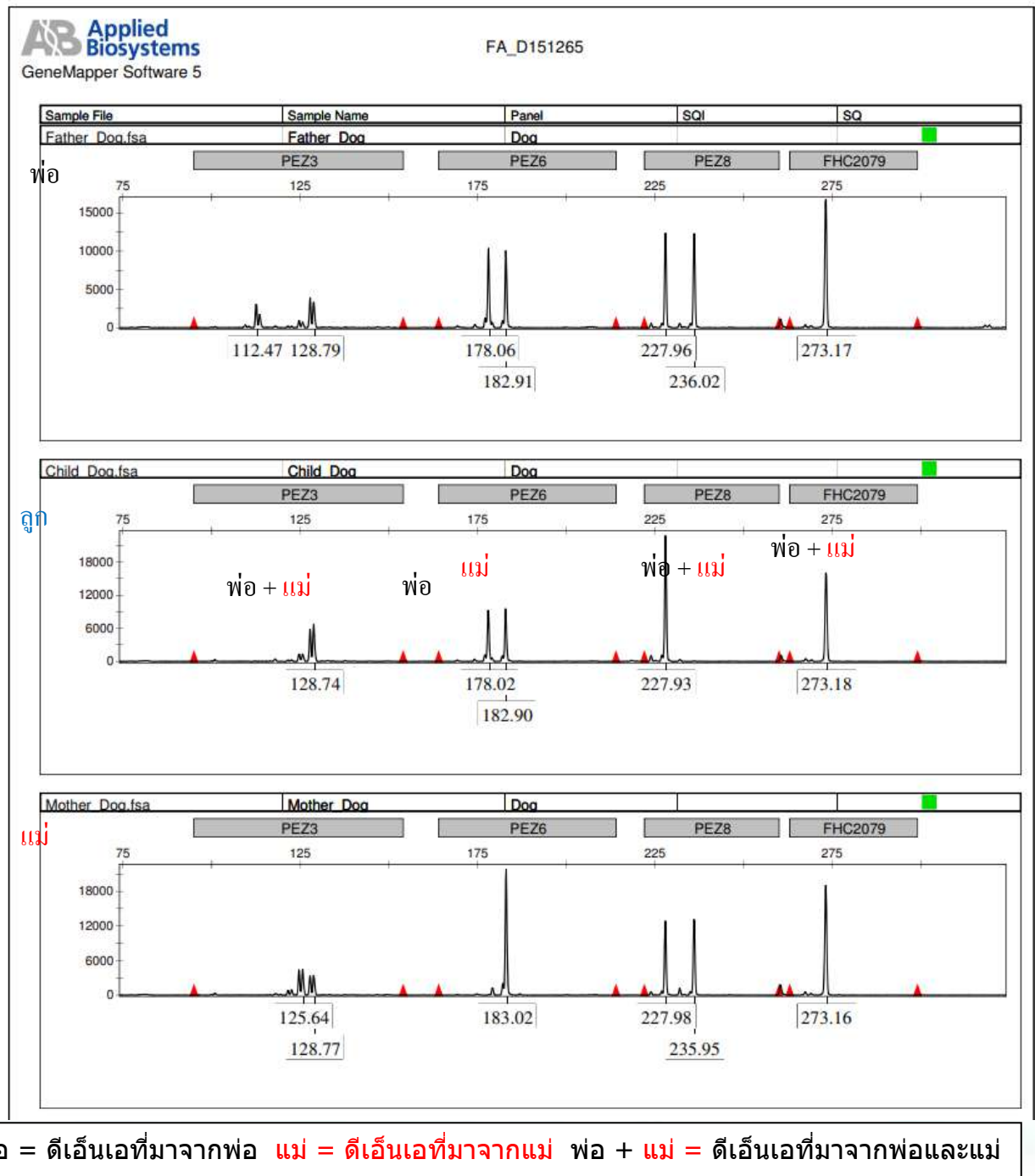


พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่

รูปที่ 4 - 31 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ PEZ 1, FHC 2054 และ FHC 2010 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAMTM (BLUE) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกสุนัข โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง PEZ1 อัลลีล 112.95 bp และอัลลีล 117.12 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 112.97 bp ของพ่อและอัลลีล 117.06 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



รูปที่ 4 - 32 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ PEZ 5, PEZ 20 และ PEZ 12 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด JOE™ (GREEN) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก สุนัข โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง PEZ5 อัลลีล 100.73 bp และอัลลีล 100.73 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 100.84 bp ของพ่อและอัลลีล 100.85 ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีล +/- ไม่เกิน 2 bp



รูปที่ 4 - 33 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ดังนี้ PEZ 3, PEZ 6, PEZ 8 และ FHC 2079 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด NED™ (YELLOW) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก สุนัข โดย ทั้ง 4 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง PEZ3 อัลลีล 128.74 bp และอัลลีล 128.74 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 128.79 bp ของพ่อและอัลลีล 128.77 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

9. การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (อัตลักษณ์) แมว

9.1 วิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม GeneMapper ตามวิธีปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ ด้วยโปรแกรม GeneMapper

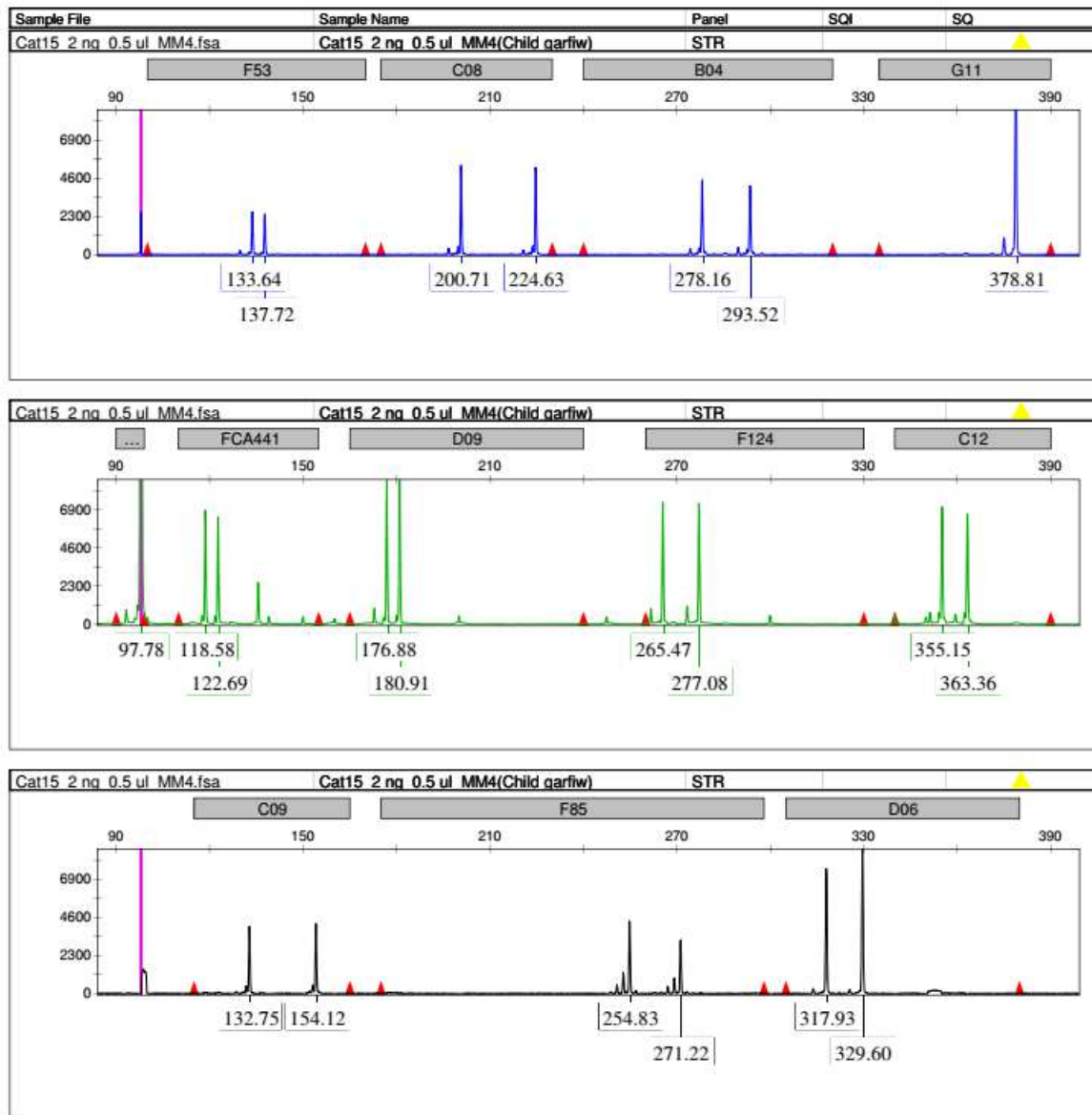
ตารางที่ 4 - 5 แสดงชื่อไพรเมอร์ จำนวน 12 ตำแหน่ง(locus) ฟลูออเรสเซนต์ (dye) สี (colour) และช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (expected size range) ในการตรวจอัตลักษณ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกในแมว

Locus	Dye	Colour	Expected size range (bp)*
F53	FAM TM	Blue	100-170
C08	FAM TM	Blue	175-230
B04	FAM TM	Blue	240-320
G11	FAM TM	Blue	350-390
SRY	JOE TM	Green	95-105
FCA441	JOE TM	Green	110-155
D09	JOE TM	Green	160-240
F124	JOE TM	Green	260-330
C12	JOE TM	Green	340-390
C09	NED TM	Yellow	115-160
F85	NED TM	Yellow	175-295
D06	NED TM	Yellow	305-380

9.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper V3.7 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 12 ตำแหน่ง ต้องอยู่ในช่วงที่กำหนดของแต่ละตำแหน่งเท่ากับคู่มือ Information on the Cat STR Multiplex Developed at NIST and a Protocol for Its Use on the ABI 310 and ABI 3100 Instruments ดังตารางที่ 4 - 5 และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือ ชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits ตามรูปที่ 34 (แสดงลักษณะรูปแบบของ electropherogram ทั้ง 12 ตำแหน่ง)

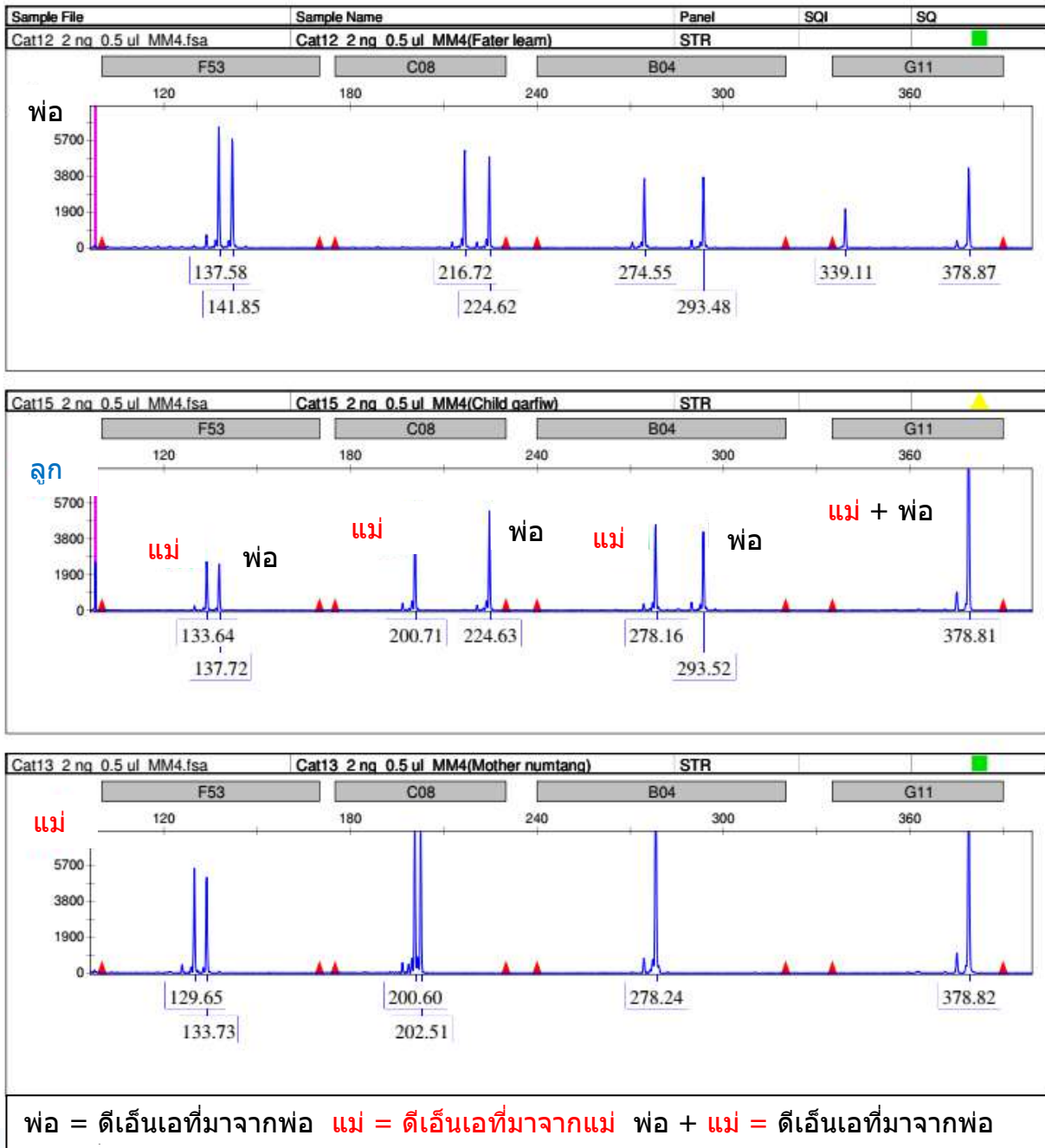
10. การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์พ่อแม่-แม่-ลูกแมว

10.1 การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 12 คู่ ตามมาตรฐาน ISAG (the international society of animal genetics) ต้องมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 12 ตำแหน่งอยู่ในช่วงที่กำหนด และลักษณะรูปแบบของ electropherogram มีลักษณะตามคู่มือชุดน้ำยา StockMarks[®] Kits ตามรูปที่ 4 - 34

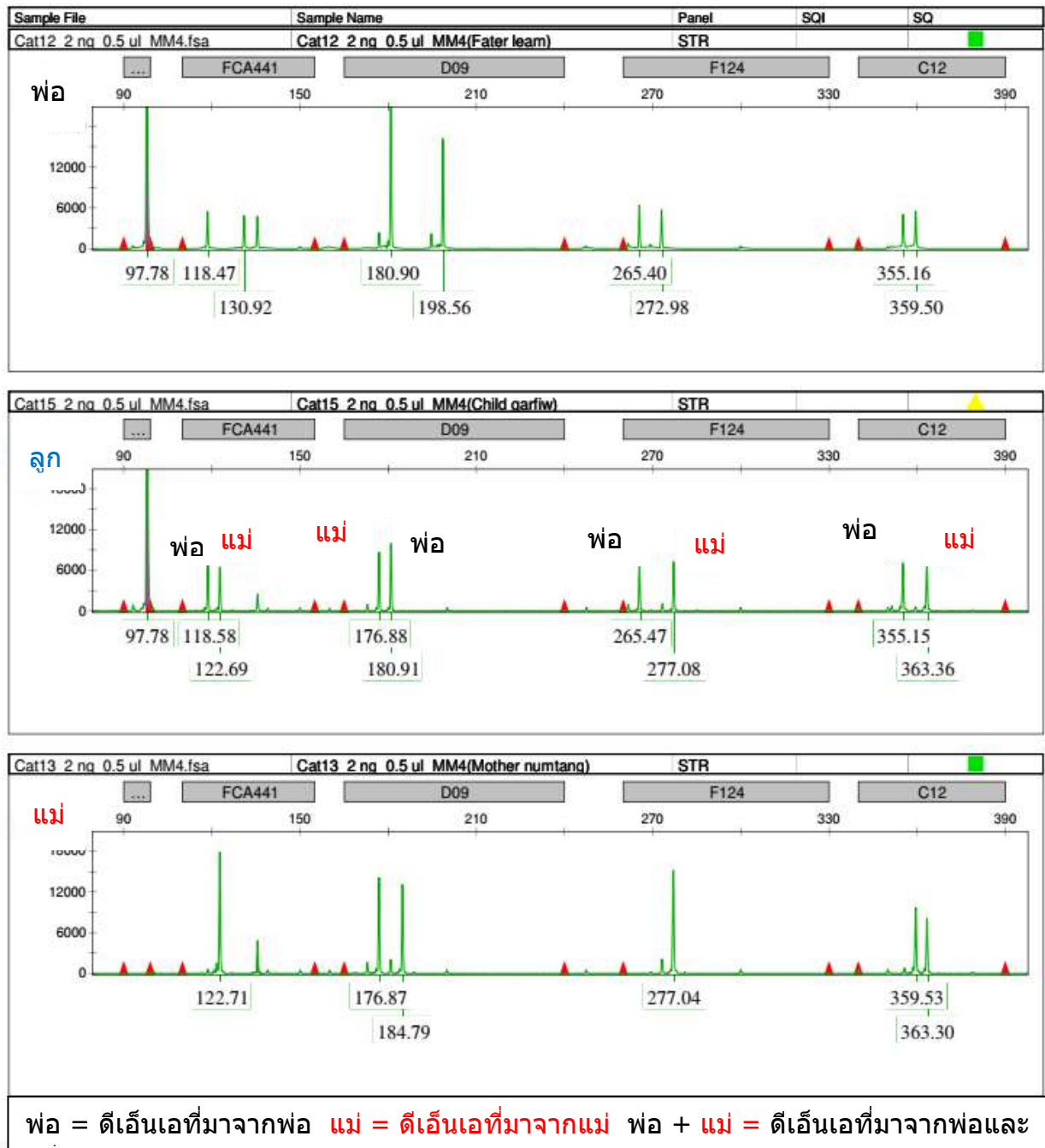


รูปที่ 4 - 34 แสดงรูปภาพ electropherogram ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 12 ตำแหน่งของตัวอย่างแมว โดยมีกราฟสีน้ำเงิน (blue) 4 ตำแหน่ง สีเขียว (green) 5 ตำแหน่ง และสีดำ (yellow) 3 ตำแหน่ง (ตามตารางที่ 4 - 5) ในแต่ละตำแหน่งจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อัลลีลที่เหมือนกันจะแสดงค่าตัวเลขเดียว) ยกเว้น ตำแหน่ง SRY เป็นตำแหน่งบ่งบอกเพศผู้จะพบ 1 อัลลีล เพศเมียจะไม่พบ

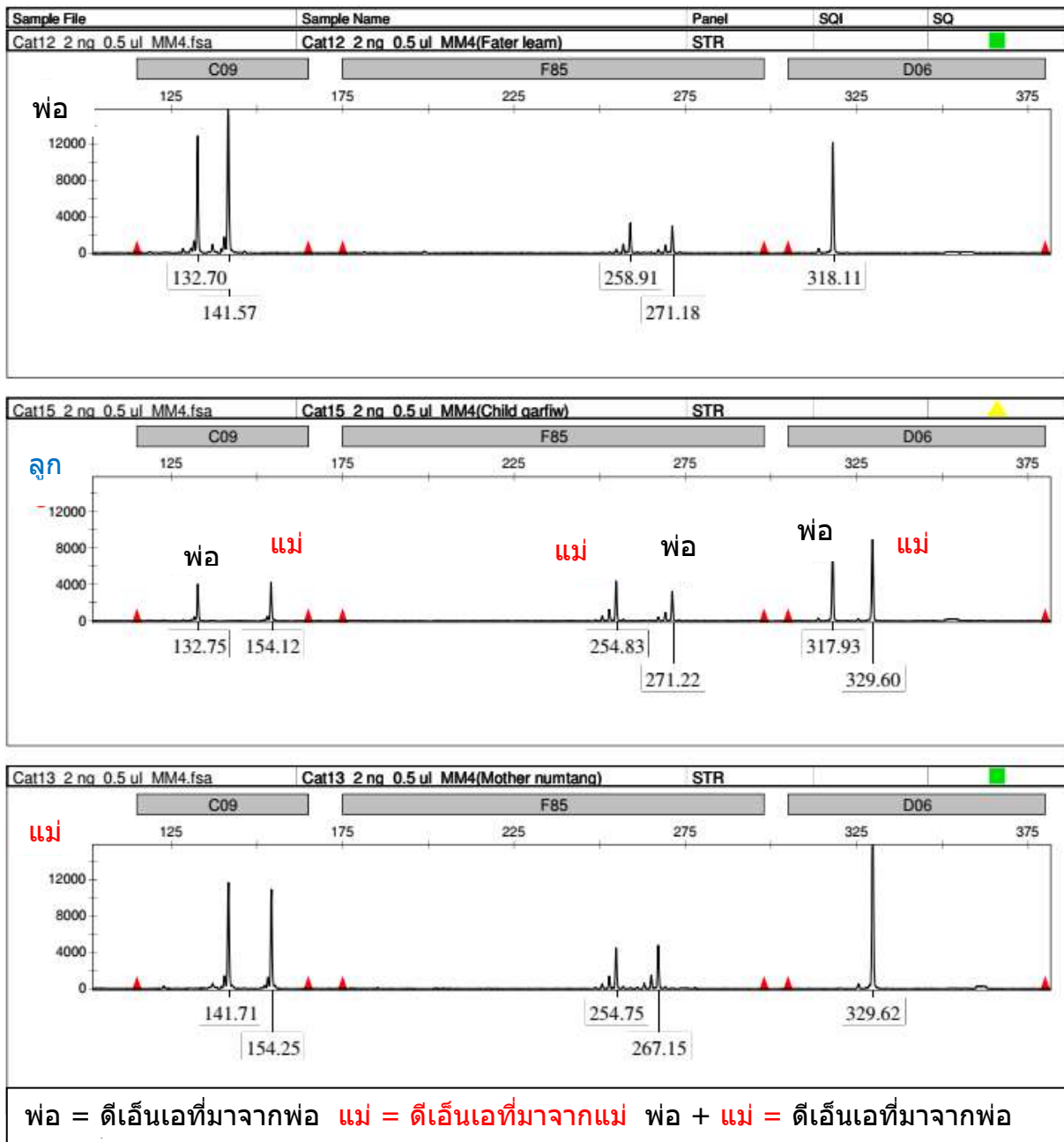
10.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำจะต้องมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอครบทั้งพ่อ-แม่-ลูก ตามมาตรฐานสากลของ international society of animal genetics (ISAG) ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอลูกจะต้องได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งทั้ง 12 ไพรเมอร์ ตามรูปที่ 4 - 35, 36 และ 37 โดยขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจากพ่อหรือแม่ มีความแตกต่างกันของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



รูปที่ 4 - 35 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ดังนี้ F53, C08, B04 และ G11 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAM™ (BLUE) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก แมว โดยทั้ง 4 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง F53 อัลลีล 133.64 bp และอัลลีล 137.72 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 133.73 bp ของแม่และอัลลีล 137.58 bp ของพ่อ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

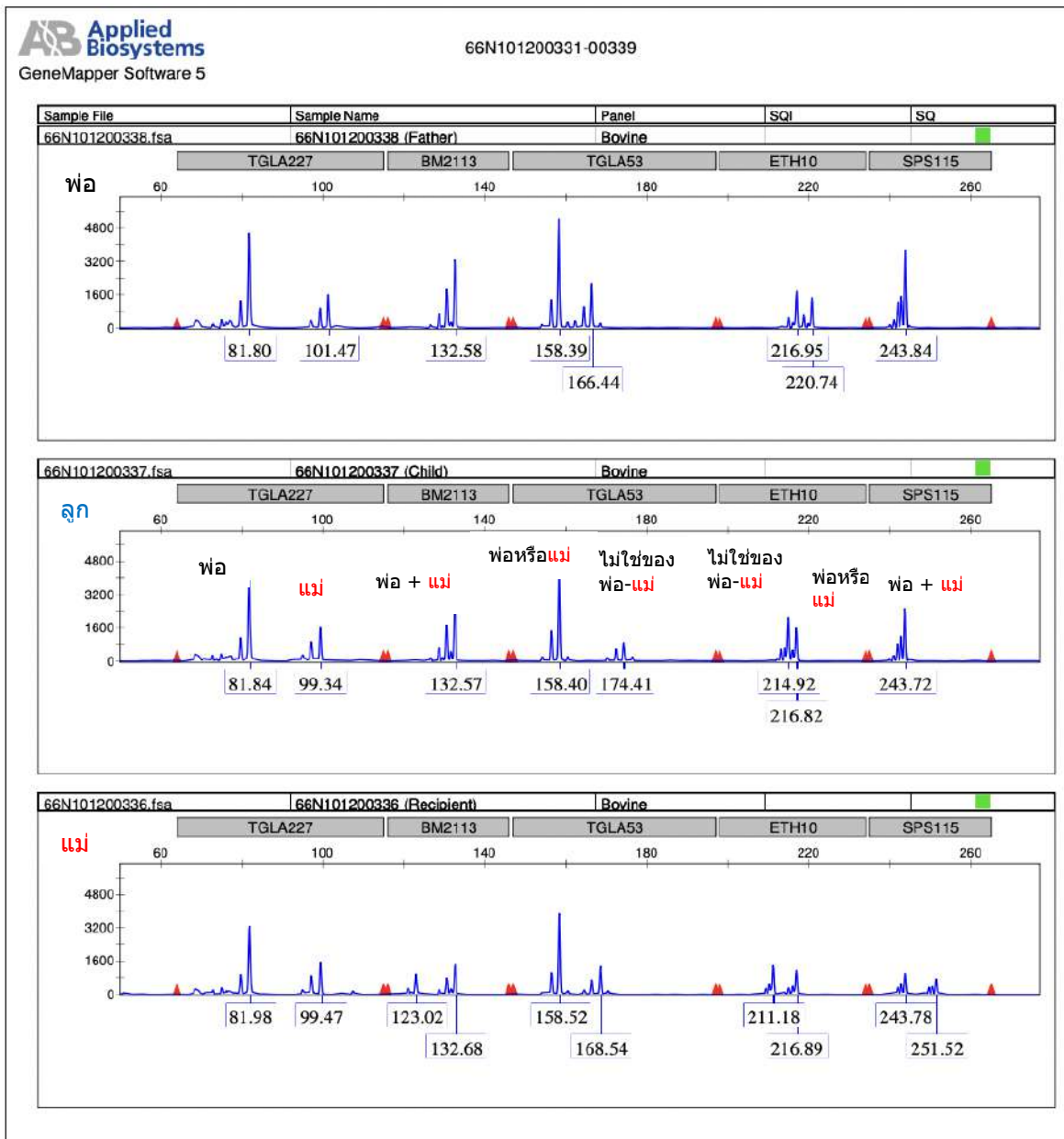


รูปที่ 4 - 36 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 ตำแหน่ง ดังนี้ SRY, FCA441, D09, F124 และ C12 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด JOE™ (GREEN) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก แมว โดยทั้ง 4 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล (ยกเว้น SRY เป็นตำแหน่งบ่งบอกเพศผู้) จากตัวอย่างตำแหน่ง FCA441 อัลลีล 118.58 bp และอัลลีล 122.69 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 118.47 bp ของพ่อและอัลลีล 122.71 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp



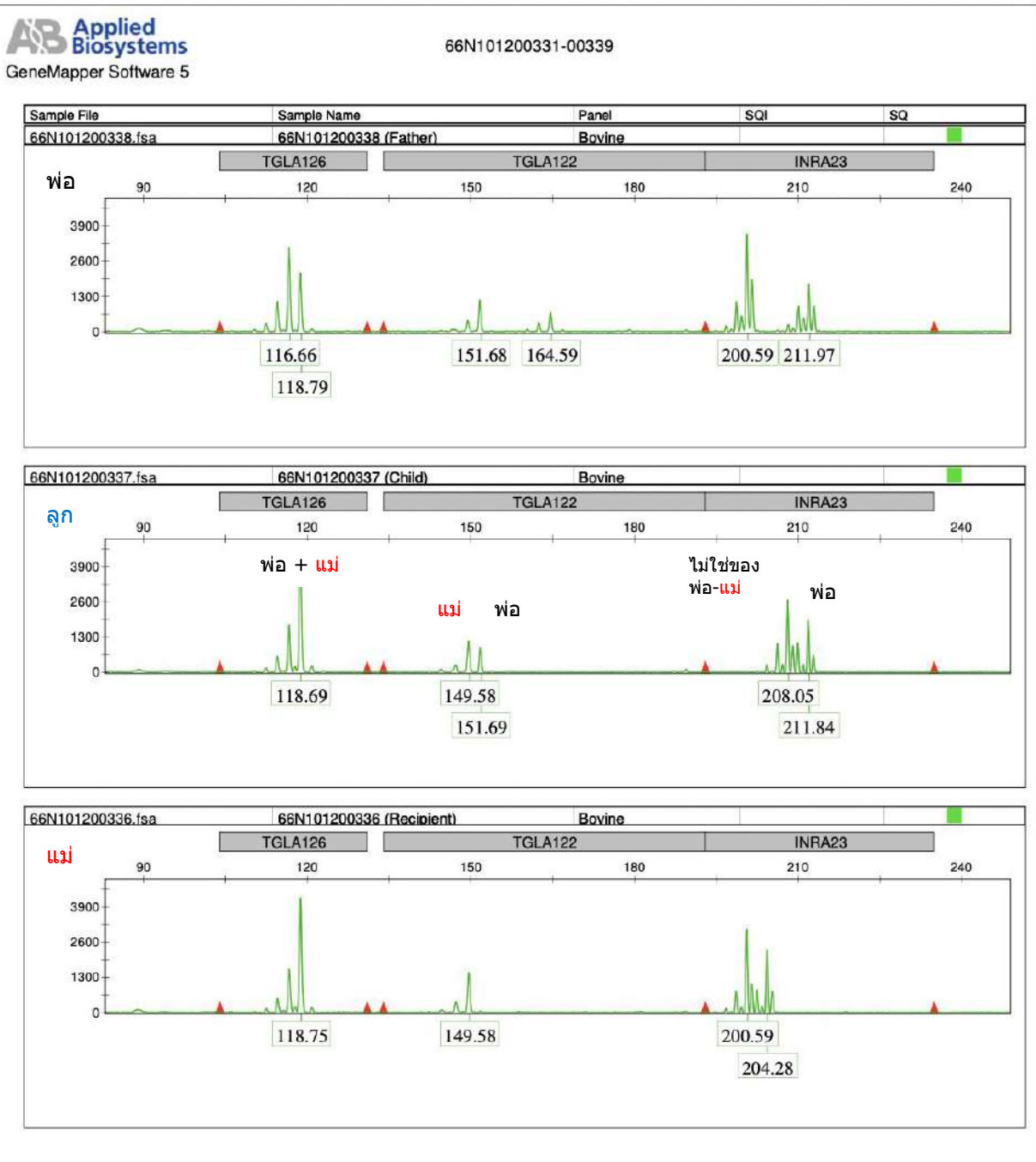
รูปที่ 4 - 37 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ C09, F85 และ D06 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด NED™ (YELLOW) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก แมว โดยทั้ง 3 ตำแหน่งของลูกได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 อัลลีล จากตัวอย่างตำแหน่ง C09 อัลลีล 132.75 bp และอัลลีล 154.12 bp ของลูกได้มาจากอัลลีล 132.70 bp ของพ่อและอัลลีล 154.25 bp ของแม่ เป็นต้น โดยความแตกต่างของอัลลีลมีค่า +/- ไม่เกิน 2 bp

11. การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ที่ไม่ใช่ลูกพ่อหรือลูกแม่โค



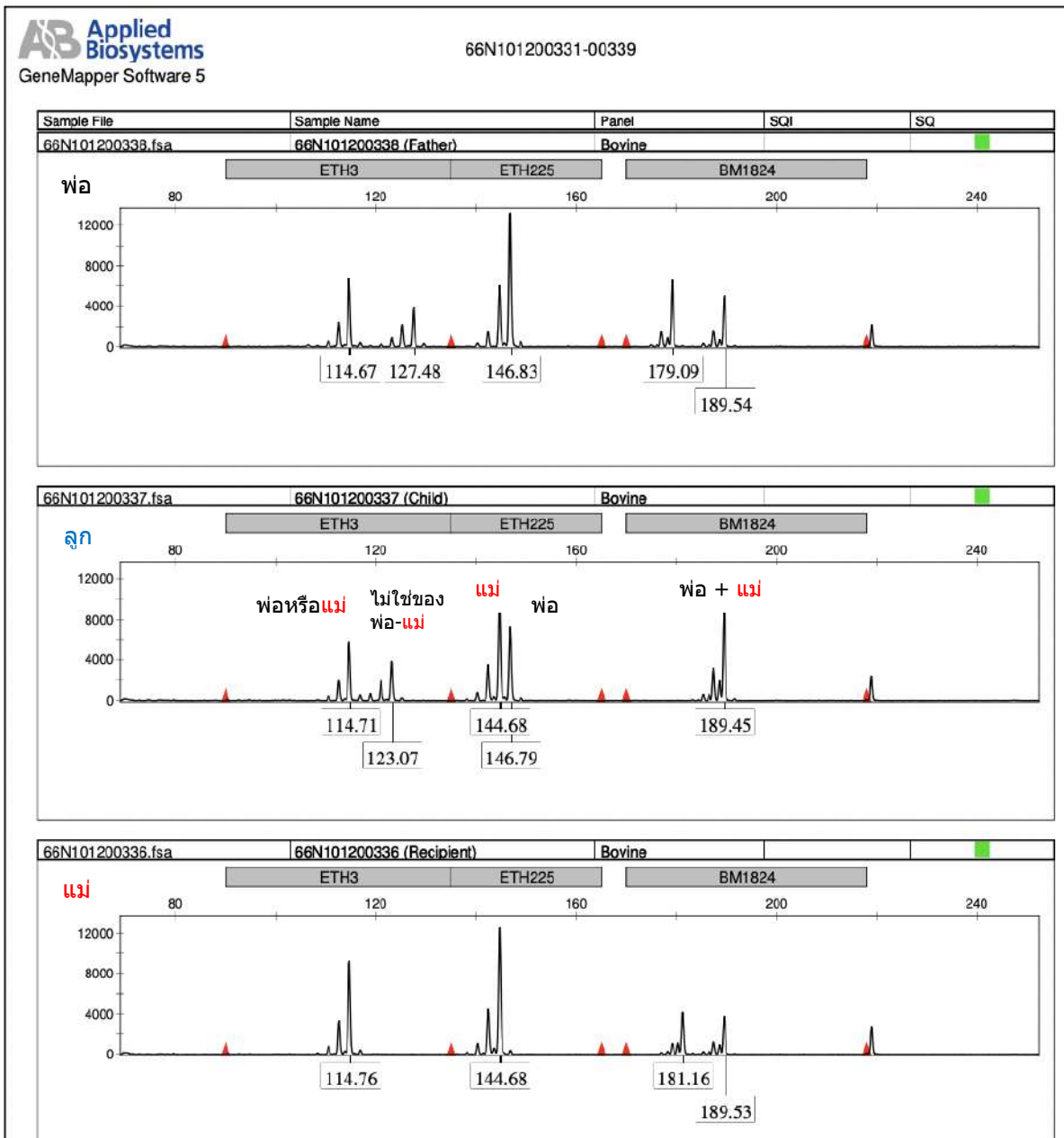
พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่
พ่อหรือแม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อหรือแม่ ไม่ใช่ของพ่อ-แม่ = ดีเอ็นเอที่ไม่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่

รูปที่ 4 - 38 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 ตำแหน่ง ดังนี้ TGLA227 BM2113 TGLA53 ETH10 และ SPS115 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด FAMTM (BLUE)) พบว่า อัลลีลของลูกที่ไม่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่มีด้วยกัน 2 ตำแหน่งคือ TGLA53 คือ อัลลีล 174.41 bp และ ETH10 คือ อัลลีล 214.92 บ่งชี้ว่า ดีเอ็นเอลูกมีความน่าจะเป็นพ่อลูกหรือแม่ลูกกัน แต่มีอัลลีลของลูกที่มาจากพ่อหรือแม่ บ่งชี้ว่า ดีเอ็นเอลูกมีความน่าจะเป็นพ่อลูกหรือแม่ลูกกัน



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อ + แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่
พ่อหรือแม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อหรือแม่ ไม่ใช่ของพ่อ-แม่ = ดีเอ็นเอที่ไม่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่

รูปที่ 4 - 39 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ TGLA126 TGLA122 และ INRA23 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด JOE™ (GREEN) พบว่า อัลลีลของลูกที่ไม่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่มีด้วยกัน 1 ตำแหน่ง คือ INRA23 คือ อัลลีล 208.05 bp บ่งชี้ว่า ดีเอ็นเอลูกมีความน่าจะเป็นพ่อลูกหรือแม่ลูกกัน แต่มีอัลลีลที่ได้รับจากพ่อ คือ อัลลีล 211.84 บ่งชี้ว่า ดีเอ็นเอของลูกมีความน่าจะเป็นลูกพ่อ แต่ไม่ใช่ลูกแม่



พ่อ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ แม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากแม่ พ่อและแม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อและแม่
พ่อหรือแม่ = ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อหรือแม่ ไม่ใช่ของพ่อ-แม่ = ดีเอ็นเอที่ไม่ได้รับจากพ่อหรือแม่

รูปที่ 4 - 40 กราฟแสดงตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ETH3 ETH225 และ BM1824 ติดด้วย fluorescent dye ชนิด NED™ (YELLOW) พบว่า อัลลีลของลูกที่ไม่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่มีด้วยกัน 1 ตำแหน่ง คือ ETH3 คือ อัลลีล 123.07 bp บ่งชี้ว่า ดีเอ็นเอลูกมีความน่าจะเป็นพ่อลูกหรือแม่ลูกกัน แต่มีอัลลีลที่ได้รับจากพ่อหรือแม่ คือ อัลลีล 114.71 บ่งชี้ว่า ดีเอ็นเอของลูกมีความน่าจะเป็นลูกพ่อหรือลูกแม่กัน

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูก โดยหลักการแล้วลูกจะต้องได้รับดีเอ็นเอจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งเพื่อมารวมกันอยู่ในตัวลูก ดังนั้นในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกโค ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 11 คู่ ตามมาตรฐาน ISAG (The International Society of Animal Genetics) ลูกโคต้องมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 11 ตำแหน่ง ต้องได้รับมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งทั้ง 11 ตำแหน่ง หากพบว่ามีเพียง 1 ตำแหน่งที่อัลลีลของลูกไม่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่ สามารถบ่งชี้ได้ว่าลูกโคชิ้นไม่ได้เป็นลูกของพ่อหรือลูกของแม่ ดังตัวอย่างที่ในรูปที่ 4 – 38, 39 และ 40 ผลจากตัวอย่างการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 7 ตำแหน่งมี 2 อัลลีลที่มาจากพ่อและแม่ (SPS115 BM2113 TGLA227 TGLA122 TGLA126 BM1824 และ ETH225) บ่งชี้ได้ว่าเป็นลูกพ่อและแม่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่งมี 1 อัลลีลมาจากพ่อหรือแม่ และ 1 อัลลีลไม่ได้มาจากพ่อหรือแม่ (ETH3 ETH10 และ TGLA53) บ่งชี้ได้ว่าเป็นลูกพ่อหรือเป็นลูกแม่ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่งมี 1 อัลลีลมาจากพ่อ และ 1 อัลลีลไม่ได้มาจากแม่ (บ่งชี้ได้ว่าเป็นลูกพ่อ) ดังนั้นผลการประเมินพบว่าโอกาสที่จะเป็นลูกพ่อเนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รับมาจากพ่อครบทั้ง 11 ตำแหน่ง มากกว่าเป็นลูกแม่เนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รับจากแม่ 10 ตำแหน่ง (ตามตารางที่ 4 - 6)

ตารางที่ 4 - 6 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกโคที่ได้รับจากพ่อและแม่เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกโค

ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจาก			หมายเหตุ
	พ่อ	พ่อหรือแม่	แม่	
TGLA227	/	-	/	ผลการประเมินพบว่าโอกาสที่จะเป็นลูกพ่อเนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รับมาจากพ่อครบทั้ง 11 (8+3) ตำแหน่งมากกว่าเป็นลูกแม่เนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รับจากแม่ 10 ตำแหน่ง (7+3)
BM2113	/	-	/	
TGLA53**	-	/	-	
ETH10**	-	/	-	
SPS115	/	-	/	
TGLA126	/	-	/	
TGLA122	/	-	/	
INRA23*	/	-	-	
ETH3**	-	/	-	
ETH225	/	-	/	
BM1824	/	-	/	
จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	8	3	7	

* = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ ไม่ได้มาจากแม่

** = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อหรือแม่

จากผลการประเมินนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูก สรุปได้ว่า มีความน่าจะเป็นลูกพ่อ เนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาจากพ่อ 11 ตำแหน่ง ไม่ได้เป็นลูกแม่เพราะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาจากแม่เพียง 7 ตำแหน่ง โดยพบว่ามียายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อเท่านั้น 1 ตำแหน่ง (INRA23) แสดงให้เห็นว่าโอกาสที่จะเป็นลูกพ่อเนื่องจากไม่พบว่ามีดีเอ็นเอมาจากแม่ พบมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 7 ตำแหน่งที่มาจากพ่อและแม่ และพบมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่งที่มาจากพ่อหรือแม่ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง (INRA23) ที่พบว่ามาจากพ่อเท่านั้นทำให้พิจารณาว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่งที่มาจากพ่อหรือแม่ นั้นเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากพ่อ จึงวิเคราะห์ผลว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกโคได้รับจากพ่อ 11 ตำแหน่ง (1+7+3) รับจากแม่ 7 ตำแหน่ง (สำหรับ 4 ตำแหน่งที่เหลือของแม่ที่ไม่พบในลูกเพราะไม่ได้ถ่ายทอดไปสู่ตัวลูกเนื่องจากไม่ใช่ลูกของแม่โค) สรุปได้ว่า มีโอกาสความน่าจะเป็นลูกพ่อแต่ไม่เป็นลูกแม่ รายละเอียดตามตารางที่ 4 - 7

ตารางที่ 4 - 7 แสดงสรุปผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกโค

ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกที่ได้รับจาก		หมายเหตุ
	พ่อ	แม่	
TGLA227	/	/	ผลการวิเคราะห์พบว่ามียายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รับมาจากพ่อครบทั้ง 11 ตำแหน่งได้รับจากแม่ 7 ตำแหน่ง สรุปได้ว่า มีโอกาสเป็นลูกพ่อ แต่ไม่เป็นลูกแม่
BM2113	/	/	
TGLA53	/	-	
ETH10	/	-	
SPS115	/	/	
TGLA126	/	/	
TGLA122	/	/	
INRA23	/	-	
ETH3	/	-	
ETH225	/	/	
BM1824	/	/	
จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตำแหน่ง)	11	7	

เอกสารอ้างอิง

Applied Biosystems. 2004. คู่มือโปรแกรม GeneMapper Version 3.7. USA.

John Butler. 2002. คู่มือ Information on the Cat STR Multiplex Developed at NIST and a Protocol for Its Use on the ABI 310 and ABI 3100 Instruments, Based on research conducted by (NIST).

Thermo Fisher Scientific. 2014. คู่มือ StockMarks® Kits for Horses, Cattle, and Dog Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits Revision F.

บทที่ 5

มาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025: 2017

การควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพ (quality control and quality assurance) เป็นสิ่งที่สำคัญที่ห้องปฏิบัติการทดสอบควรดำเนินการ เพื่อสร้างความมั่นใจในผลของการทดสอบว่า ถูกต้องตามขอบข่ายที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 รวมทั้งทำให้เกิดระบบการบริหารงานห้องทดสอบที่มีคุณภาพ บุคลากร การจัดการตัวอย่าง ความชำนาญในการวิเคราะห์ทดสอบ การเก็บบันทึกและรายงานผลการควบคุมเอกสาร การปฏิบัติการแก้ไขและป้องกัน การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และอื่น ๆ โดยมีเป้าหมายหลักในการทำงานให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ สร้างความน่าเชื่อถือ พัฒนาประสิทธิภาพ อันส่งผลให้ผู้ใช้บริการมีความมั่นใจในใบรายงานผลที่ได้รับและได้รับประโยชน์สูงสุด

ระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017

ISO/IEC 17025 เป็นมาตรฐานสากลที่ร่วมระหว่าง international organization for standardization กับ international electrotechnical commission เป็นหน่วยงานอิสระที่ไม่ได้อยู่ภายใต้การควบคุม หรือกำกับดูแลของรัฐบาล มีสมาชิกเป็นหน่วยที่ให้การรับรองคุณภาพประมาณ 162 แห่งทั่วโลก เพื่อกำหนดข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการสอบเทียบและห้องปฏิบัติการทดสอบให้มีมาตรฐานไปในทางเดียวกัน ถือเป็นเกณฑ์มาตรฐานสากลที่หลายประเทศทั่วโลกยึดถือปฏิบัติ

ขอบข่ายของ ISO/IEC 17025: 2017 เป็นการระบุข้อกำหนดทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถ ความเป็นกลางหรือความเป็นธรรม (impartiality) และการรักษาความลับ (confidentiality) ของห้องปฏิบัติการที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์ในทุกองค์กร โดยไม่คำนึงถึงจำนวนของบุคลากรที่มีในห้องปฏิบัติการนั้น ๆ ซึ่งลูกค้าหน่วยงานกำกับดูแล และองค์กรของห้องปฏิบัติการ สามารถใช้การตรวจประเมินเบื้องต้น ใช้การตรวจประเมินของหน่วยงานที่มีอำนาจตามกฎหมายในการรับรอง และอื่น ๆ ในการยืนยัน หรือยอมรับความสามารถของห้องปฏิบัติการ โดยข้อกำหนดทั่วไปกำหนดให้ห้องปฏิบัติการมีการดำเนินงานที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นกลางหรือความเป็นธรรมของห้องปฏิบัติการ ไม่ให้ความกดดันเชิงพาณิชย์ ความกดดันทางการเงิน หรืออื่น ๆ มีผลกระทบต่อความเป็นกลางหรือความเป็นธรรมของห้องปฏิบัติการ ในส่วนของการรักษาความลับของห้องปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการจะต้องมีความรับผิดชอบมุ่งมั่นในการบริหารจัดการข้อมูลทุกชนิดที่ได้รับหรือที่เกิดขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการต้องแจ้งลูกค้าล่วงหน้าเมื่อจะเปิดเผยข้อมูลสาธารณะ ยกเว้นข้อมูลที่ลูกค้าให้เปิดเผยข้อมูลแก่สาธารณะได้ หรือได้ตกลงระหว่างห้องปฏิบัติการและลูกค้าแล้ว ข้อมูลอื่นทุกข้อมูลถือว่าเป็นความลับของลูกค้า หากกฎหมายให้ห้องปฏิบัติการเปิดเผยความลับ ห้องปฏิบัติการต้องแจ้งลูกค้า ยกเว้นมีข้อห้ามตามกฎหมาย

ข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2017

ข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ มีหัวข้อหลักที่ควรทราบ ดังนี้

1. ขอบข่าย (scope)
2. เอกสารอ้างอิง (normative references)
3. คำศัพท์และคำจำกัดความ (term and definition)
 - 3.1 ความเป็นกลาง (impartiality)
 - 3.2 ขอร้องเรียน (complaint)
 - 3.3 การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison)
 - 3.4 การเปรียบเทียบผลภายในห้องปฏิบัติการ (intralaboratory comparison)
 - 3.5 การทดสอบความชำนาญ (proficiency testing)
 - 3.6 ห้องปฏิบัติการ (laboratory)
 - 3.7 เกณฑ์การตัดสินใจ (decision rule)
 - 3.8 การทวนสอบ (verification)
 - 3.9 การยืนยันความใช้ได้ (validation)
4. ข้อกำหนดทั่วไป (general requirements)
 - 4.1 ความเป็นกลาง (impartiality)
 - 4.2 การรักษาความลับ (confidentiality)
5. ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (structural requirement)
6. ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (resource requirements)
 - 6.1 ทั่วไป (general)
 - 6.2 บุคลากร (personnel)
 - 6.3 สิ่งอำนวยความสะดวกและภาวะแวดล้อม (facilities and environmental condition)
 - 6.4 เครื่องมือ (equipment)
 - 6.5 การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability)
 - 6.6 ผลิตภัณฑ์และบริการจากภายนอก (externally provided products and services)
7. ข้อกำหนดด้านกระบวนการ (process requirements)
 - 7.1 การทบทวนคำขอ ข้อเสนอการประมูล และข้อสัญญา (review of requests, tenders and contracts)
 - 7.2 การเลือก การทวนสอบและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (selection, verification and validation of methods)
 - 7.2.1 การเลือก และการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (selection and verification of methods)
 - 7.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (validation method)
 - 7.3 การชักตัวอย่าง (sampling)
 - 7.4 การจัดการตัวอย่างทดสอบหรือสอบเทียบ (handling of test or calibration items)

- 7.5 บันทึกทางด้านวิชาการ (technical records)
- 7.6 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (evaluation of measurement uncertainty)
- 7.7 การมั่นใจความใช้ได้ของผล (ensuring the validity of results)
- 7.8 การรายงานผล (reporting of results)
 - 7.8.1 ทัวไป (general)
 - 7.8.2 ข้อกำหนดทัวไปสำหรับรายงาน (ทดสอบ สอบเทียบ การชักตัวอย่าง) [common requirements for reports (test, calibration or sampling)]
 - 7.8.3 ข้อกำหนดเฉพาะสำหรับรายงานผลการทดสอบ (specific requirements for test reports)
 - 7.8.4 ข้อกำหนดเฉพาะสำหรับใบรับรองการสอบเทียบ (specific requirements for calibration certificates)
 - 7.8.5 รายงานการชักตัวอย่าง – ข้อกำหนดเฉพาะ (reporting sampling – specific requirements)
 - 7.8.6 การรายงานโดยระบุความสอดคล้อง (reporting statements of conformity)
 - 7.8.7 การรายงานข้อคิดเห็นและการแปลผล (reporting opinions and interpretations)
 - 7.8.8 การแก้ไขรายงาน (amendments to reports)
- 7.9 ขอร้องเรียน (complaints)
- 7.10 งานที่ไม่เป็นไปตามที่กำหนด (nonconforming work)
- 7.11 การควบคุมข้อมูลและการจัดการสารสนเทศ (control of data and information management)
- 8. ข้อกำหนดด้านระบบการบริหาร (management system requirements)
 - 8.1 ทางเลือก (options)
 - 8.1.1 ทัวไป (general)
 - 8.1.2 ทางเลือก A (option A)
 - 8.1.3 ทางเลือก B (option B)
 - 8.2 เอกสารระบบบริหาร (ทางเลือก A) [management system documentation (option A)]
 - 8.3 การควบคุมเอกสารระบบบริหารงาน (ทางเลือก A) [control of management system documents (option A)]
 - 8.4 การควบคุมบันทึก (ทางเลือก A) [control of records (option A)]
 - 8.5 การจัดการและป้องกันความเสี่ยง (ทางเลือก A) [actions to address risks and opportunities (option A)]
 - 8.6 การปรับปรุง (ทางเลือก A) [improvement (option A)]
 - 8.7 การปฏิบัติการแก้ไข (ทางเลือก A) [corrective action (option A)]

8.9 การทบทวนของฝ่ายบริหาร (ทางเลือก A) [management reviews (option A)]


สำนักงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
กระทรวงสาธารณสุข
 หนึ่งสีหนึ่งนับนี้ไว้เพื่อแสดงว่า
ห้องปฏิบัติการ
กลุ่มวิจัยทันตสุขภาพในวัย
และความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
เลขที่ 91 หมู่ที่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบงกะดี
อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000
 ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถ
 ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 และข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองความสามารถ
 ห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุขของสำนักงานกระทรวงห้องปฏิบัติการ
 ตามรายการและวิธีทดสอบที่กำหนดในเอกสารแนบท้ายใบขึ้น
การตรวจวินิจฉัยทางสัตวแพทย์

 (พ.ร.วิทย์ ชัยสวัสดิ์วงศ์)
 ผู้อำนวยการสำนักงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
 โทร ๒๖ ๖๒๖๖๖ 2564
 โทรสาร 5๓๖๖๖ 2566
 หมายเลขทะเบียน 1335/64

รูปที่ 5 - 1 หนังสือรับรอง การขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 จาก สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีการตรวจอัตลักษณ์โค โดยใช้ StockMarks® for Cattle Bovine Genotyping Kit

ในการดำเนินการขอรับรองเป็น ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 ในการทดสอบการตรวจวินิจฉัยทางสัตวแพทย์ 2 รายการทดสอบ คือ การตรวจอัตลักษณ์โคและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกโค ในตัวอย่างเลือดและน้ำเชื้อแช่แข็ง ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ได้ดำเนินการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification) และ การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังต่อไปนี้

1. การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification) คือ การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อยืนยันสมรรถนะของห้องปฏิบัติการว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ตามคุณลักษณะที่ระบุไว้ตามข้อกำหนดของผู้ผลิต การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดำเนินการในกรณีที่ห้องปฏิบัติการ นำวิธีมาตรฐาน หรือวิธีที่พัฒนาอย่างดีแล้ว หรือชุดทดสอบ/น้ำยาจากผู้ผลิตมาใช้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงมีหัวข้อดังนี้

1.1 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

1.2 ความแม่นยำ (precision) หมายถึง การวัดซ้ำหลายๆ ครั้งแล้วดูว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งการวัดที่ได้ ค่าใกล้เคียงกันไม่ได้หมายความว่าค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ถูกต้องเสมอไป

1.3 ความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

1.4 ความจำเพาะ (specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยที่สารนั้นเป็นส่วนประกอบหนึ่งในสารละลายนั้นๆ หรือวิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด

วิธีปฏิบัติงาน

1. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) อ้างอิงจาก guidelines for validation of qualitative real-time PCR method

1.1 เตรียมดีเอ็นเอของโคที่ได้จากการสกัด ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ 50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 และ 0.0032 ng/ μ l

1.2 การแปลผล ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีความสูงของพีคที่สามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจนทั้งพีคที่เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส แบบโฮโมไซกัส และมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง จึงสรุปว่าความเข้มข้นนั้นเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ของวิธีการตรวจอัตลักษณ์โค

2. ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความจำเพาะ (specificity) (อ้างอิงจาก SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods approved 12/5/2016)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบว่าเป็นโค 10 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอที่เป็นสัตว์ชนิดอื่น จำนวน 20 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบ การแปลผล

2.1 ความแม่นยำ (precision) ตัวอย่างดีเอ็นเอของโคจะพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่ง คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความแม่นยำ (precision)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอโค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ต้องตรวจพบดีเอ็นเอโค}} \times 100\%$$

2.2 ความถูกต้อง (accuracy) ตัวอย่างดีเอ็นเอของโคจะพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งตามตารางที่ 5 และดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความถูกต้อง (accuracy)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอโค} + \text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอโค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ}} \times 100\%$$

148

2.3 ความจำเพาะ (specificity) ตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความจำเพาะ (specificity)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอโค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ต้องตรวจไม่พบดีเอ็นเอโค}} \times 100\%$$

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) หมายถึง การยืนยันโดยการตรวจสอบและจัดทำข้อกำหนด เพื่อเป็นใช้หลักฐานที่เป็นรูปธรรม เพื่อนำไปใช้ตามจุดมุ่งหมายเฉพาะและสามารถบรรลุผลได้ครบถ้วนตามวิธีการ มีหัวข้อดังนี้

2.1 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

2.2 minimum threshold & contamination study หมายถึง ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้และการปนเปื้อน

2.3 ความแม่นยำ (precision) หมายถึง การวัดซ้ำหลายๆ ครั้งแล้วดูว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งการวัดที่ได้ ค่าใกล้เคียงกันไม่ได้หมายความว่าค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ถูกต้องเสมอไป

2.4 ความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียง กับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

2.5 ความจำเพาะ (specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์โดยที่สารนั้น เป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งในสารละลายนั้นๆ หรือวิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด

2.6 ความคงทน (robustness/ruggedness) หมายถึง ความแข็งแกร่งหรือความคงทนของวิธีเป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถของวิธีที่ผลการทดสอบจะไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ

2.7 การทดสอบกับตัวอย่างจริง (known sample) หมายถึง ตัวอย่างที่ทราบชนิดของตัวอย่าง

วิธีปฏิบัติงาน

1. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) อ้างอิงจาก Guidelines for validation of qualitative real-time PCR Method

1.1 เตรียมดีเอ็นเอของโคที่ได้จากการสกัด ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ 50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 และ 0.0032 ng/ μ l

1.2 การแปลผล

1.2.1 ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีความสูงของพีคที่สามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจนทั้งพีคที่เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส แบบโฮโมไซกัส และมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง จึงสรุปว่าความเข้มข้นนั้นเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ของวิธีการตรวจอัตลักษณ์โค

1.2.2 หาค่า Relative limit of detection (RLOD) ของการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจอัตลักษณ์โคโดยใช้ StockMarks® for Cattle Bovine Genotyping Kit หัวข้อขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) กับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจอัตลักษณ์โคโดยใช้ StockMarks® for Cattle Bovine Genotyping Kit หัวข้อขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) เพื่อดูว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กัน

2. minimum threshold & contamination study (อ้างอิงจาก SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods approved 12/5/2016)

2.1 ทำการทดสอบกับ negative control เพื่อดู noise ของระบบว่ามีความสูงเท่าใด วิเคราะห์โดยหาค่า average, SD และ average +3SD

2.2 การแปลผล จากการคำนวณ ค่า average +3SD ที่มีค่ามากที่สุดมากำหนดความสูงของพีคในการอ่านผลการวิเคราะห์

3. ความแม่นยำ (precision) (อ้างอิงจาก SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods approved 12/5/2016)

3.1 ความแม่นยำ (precision) ของการทำ repeatability โดยผู้ทดสอบคนเดียว เป็นเวลา 1 วัน

3.1.1 ทดสอบกับ sampleA 2ng รัน 8 capillaries 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลที่ได้

3.1.2 ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบว่าเป็นโค 10 ตัวอย่าง (2 ชนิด คือ เลือด 5 ตัวอย่าง น้ำเชื้อแช่แข็ง 5 ตัวอย่าง) และดีเอ็นเอที่เป็นสัตว์ชนิดอื่นจำนวน 30 ตัวอย่าง (2 ชนิด คือ เลือด 15 ตัวอย่าง น้ำเชื้อแช่แข็ง 15 ตัวอย่าง) (เพิ่มตัวอย่างในการแปลผลโดยใช้ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ปกติเลือดจำนวน 25 ตัวอย่าง น้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 25 ตัวอย่าง)

3.2 ความแม่นยำ (precision) ของการทำ reproducibility ทำการวิเคราะห์อีก 1 คน วิเคราะห์ต่างวันกัน โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบว่าเป็นโค 10 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอที่เป็นสัตว์ชนิดอื่น จำนวน 30 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบ

3.3 การแปลผล ความแม่นยำ (precision)

3.3.1 ทดสอบกับ sample A 2ng ดูค่าการคำนวณ maximum SD จากนั้นคำนวณเป็น 3SD เพื่อดูขนาดของอัลลีลที่อ่านได้มีความคลาดเคลื่อนไม่เกินกี่ bp ในการรันแต่ละ capillaries และการรันซ้ำ

3.3.2 ตัวอย่างดีเอ็นเอของโคจะพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งตามที่กำหนดและดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง

3.3.3 คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความแม่นยำ (precision)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอโค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ต้องตรวจพบดีเอ็นเอโค}} \times 100\%$$

3.3.4. การแปลผลทั้ง repeatability และ reproducibility ที่ตัวอย่างดีเอ็นเอโคตัวเดียวกัน ต้องมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันและอยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งเท่ากับคู่มือชุดน้ำยา StockMarks® Kits. และผลการคำนวณจากสูตรได้ 100% จึงสรุปได้ว่าวิธีมี precision ทั้งการทำ repeatability และ reproducibility

4. ความถูกต้อง (accuracy) (อ้างอิงจาก SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods approved 12/5/2016)

4.1 การทดสอบใช้ S-positive เพื่อดูค่าของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 11 ตำแหน่งของ 3 injection อยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งเท่ากับคู่มือชุดน้ำยา StockMarks® Bovine genotyping Kit.

4.2 ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอโดยนำข้อมูลจากการทดสอบในหัวข้อความแม่นยำ (precision) ของการทำ repeatability มาแปลผลและคำนวณผลในสูตร

4.3 การแปลผล ความถูกต้อง (accuracy)

4.3.1 การทดสอบกับ S-positive รัน 3 injection ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 11 ตำแหน่ง ขนาดของแต่ละตำแหน่งเท่ากับคู่มือชุดน้ำยา StockMarks® Bovine genotyping Kit.

4.3.2 ตัวอย่างดีเอ็นเอของโคจะพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งตามที่กำหนด และดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง

4.3.3 คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความถูกต้อง (accuracy)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอโค} + \text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอโค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ}} \times 100\%$$

ดังนั้นการทดสอบกับ S-positive จำนวน 3 injection และตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอโคมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งตามตารางที่ 1 (บทที่ 4) และดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง การคำนวณ โดยใช้สูตรต้องได้ 100% จึงสรุปว่าวิธีมีความถูกต้อง (accuracy)

5. ความจำเพาะ (specificity)

5.1 ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นโดยนำข้อมูลจากการทดสอบในหัวข้อความแม่นยำ (precision) ของการทำ repeatability มาแปลผลและคำนวณผลในสูตร

5.2 การแปลผล ความจำเพาะ (specificity)

5.2.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง

5.2.2 คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความจำเพาะ (specificity)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอโค}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ต้องตรวจไม่พบดีเอ็นเอโค}} \times 100\%$$

ตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ครบ 11 ตำแหน่ง การคำนวณ โดยใช้สูตรต้องได้ 100% จึงสรุปว่าวิธีมีความจำเพาะ (specificity)

6. ความคงทน (robustness/ruggedness) (อ้างอิงจาก Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Technical Note 17-June 2012)

6.1 ดำเนินการทดสอบ 3 สภาวะ (ตัวอย่างดีเอ็นเอโค สภาวะละ 5 ตัวอย่าง)

6.1.1 การปรับปริมาตรรวมทั้งหมดของการทำ PCR จาก 15 ไมโครลิตรเป็น 7.5 ไมโครลิตร โดยนำผลจาก precision ของการทำ repeatability

6.1.2 การเปลี่ยนแปลงโปรแกรมเครื่อง thermal cycle โดยยกเลิก step ที่เป็น final step ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 120 นาที ออก เพื่อลดเวลาในการทำปฏิกิริยา PCR โดยนำผลจากการ precision ของการทำ repeatability

- 6.1.3 การเปลี่ยนแปลงเครื่องมือวิเคราะห์จากเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ ชนิด 4 เส้น รุ่นเดิม ABI 3130 เป็น เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ ชนิด 8 เส้น รุ่น ABI 3500 โดยนำผลตัวอย่างที่เคยวิเคราะห์ผ่านมาแล้วมาวิเคราะห์ผล

6.2 การแปลผล

ตัวอย่างดีเอ็นเอโคในตัวอย่างเดียวกันเมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ใช้ในการทดสอบให้ผลลายพิมพ์ ดีเอ็นเอเหมือนกัน มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่งอยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งตามที่ กำหนด จึงสรุปว่าวิธีนี้มีความคงทน

7. known sample (อ้างอิงจาก SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods approved 12/5/2016)

7.1 การทดสอบใช้ตัวอย่าง จำนวน 30 ตัวอย่าง (2 ชนิด คือ เลือด 10 ตัวอย่างและน้ำเชื้อแช่แข็ง 20 ตัวอย่าง)

7.2 การแปลผล ตัวอย่างดีเอ็นเอโคมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอครบทั้ง 11 ตำแหน่งอยู่ในช่วงขนาดของแต่ละตำแหน่งตามที่กำหนด จึงสรุปว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็นโคที่ได้จากการสกัดด้วย เลือดและน้ำเชื้อแช่แข็งได้



สำนักงานปศุสัตว์กลางกรมปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
BBLP-DNA-F7.8-01
Date:28/03/65 Rev.03




หมายเลขทะเบียน 1335/64

รายงานผลการทดสอบการตรวจดีเอ็นเอโค																										
สำนักงานปศุสัตว์กลางกรมปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์																										
เลขที่ 91 หมู่ 4 ต.บ้านใหม่ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000 โทร. 0 2967 9719																										
ชื่อหน่วยงานที่ส่ง ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี										เลขที่หนังสืออ้างอิง กษ 0613.2/0564																
ชื่อผู้ติดต่อ นายจิรภัทร ศักดิ์เลิศชัยกุล โทร. 0 3820 1143 อีเมล air_cbr@dcd.go.th										ลงวันที่ 20 พฤษภาคม 2565																
ที่อยู่ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี หมู่ 8 ซอย - ถนน -										วันที่รับตัวอย่าง 23 พฤษภาคม 2565																
ตำบล คลองแก้ว อำเภอ บ้านบึง จังหวัด ชลบุรี รหัสไปรษณีย์ 20220										วันที่รายงานผล 6 มิถุนายน 2565																
สถานที่เก็บตัวอย่าง		ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี จังหวัด ชลบุรี								จำนวน 2 ตัวอย่าง																
ชนิดตัวอย่าง		☒ เลือด ☐ ชิ้นเนื้อ ☐ ขน ☐ น้ำเชื้อ ☐ อื่นๆ																								
สภาพและลักษณะตัวอย่าง		☒ ปกติ ☐ ไม่ปกติ เนื่องจาก																								
วิธีการสอบ		☒ In housed method BBLP-DNA-T-01 based on StockMarks Kits for Horses, Cattle, and Dogs (Equine, Bovine, and Canine) Genotyping Kits ☐ อื่นๆ																								
ผลการทดสอบ																										
ลำดับ	ชื่อ/หมายเลขสัตว์	DNA No.	สถานะ	Primers ที่ใช้ทดสอบ (Bovine Kit)										วันที่ทดสอบ												
				TGLA227 (64-115 bp)	BM2113 (116-146 bp)	TGLA53 (147-197 bp)	ETH10 (198-234 bp)	SPS115 (235-265 bp)	TGLA126 (104-131 bp)	TGLA122 (134-193 bp)	BMRA25 (193-235 bp)	ETH3 (90-135 bp)	ETH225 (136-165 bp)		BM1824 (170-218 bp)											
1	ใบหม่อน	65NC0900	แม่	80.40	91.47	135.11	139.15	165.00	177.03	210.24	215.89	246.24	253.99	117.82	117.82	140.92	140.92	210.88	210.88	133.28	123.94	142.85	144.88	178.33	188.69	31 พ.ค. 65
2	ทก (ลูกใบหม่อน)	65NC0901	ลูก	91.51	98.03	121.62	135.11	158.81	164.88	213.91	215.72	242.31	253.92	115.75	117.91	140.92	140.92	199.89	210.81	133.55	123.94	144.74	144.74	180.19	188.51	31 พ.ค. 65
หมายเหตุ *** หมายถึง รายการทดสอบที่ไม่ได้รับการรับรอง ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025																										
ลงชื่อ (นางสาวสุภาภรณ์ เอ็นทวี)		ผู้ทดสอบ		ลงชื่อ (นายณัฐนันท์ ศิริรัตนชัยกุล)		ผู้ทบทวน		ลงชื่อ (นายณัฐนันท์ ศิริรัตนชัยกุล)		ผู้อนุมัติ																
ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์				ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ระดับชำนาญการพิเศษ				ตำแหน่ง หัวหน้าศูนย์วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์																		
วันที่ 6 มิถุนายน 2565				วันที่ 6 มิถุนายน 2565				วันที่ 6 มิถุนายน 2565																		
ข้อบัญญัติการให้บริการรับรองความสามารถ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 รายงานฉบับนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ส่งมาทดสอบ และทำการทดสอบตามตัวอย่างที่ได้รับเท่านั้น ห้ามทำสำเนารายงานผลการทดสอบ (ฉบับนี้ที่ส่งมา) โดยไม่ได้รับอนุญาตจากห้องปฏิบัติการเป็นลายลักษณ์อักษร																										

หน้าที่ 1 / 2

☒ ใช้น้ำดี ☐ ใช้น้ำดีต่อ



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการนิติเวชศาสตร์ กรมปศุสัตว์
BBLP-DNA-F7.8-03
Date:28/03/65 Rev:03




หมายเลขทะเบียน 1335/64
Report No. 3211/65

รายงานผลการทดสอบการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกโค								
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการนิติเวชศาสตร์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์								
เลขที่ 91 หมู่ 4 ต.สีฐานนท์ อ.บางกะปิ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000 โทร. 0 2967 9719								
ชื่อหน่วยงานที่ส่ง ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี ชื่อผู้ติดต่อ นายจิรภัทร ศักดิ์ศรีชัยกุล โทร. 0 3820 1143 อีเมล airc_cbrg@ddp.go.th ที่อยู่ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี หมู่ 8 ซอย - ถนน - ตำบล กองกริ้ว อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี รหัสไปรษณีย์ 20220				เลขที่หนังสืออ้างอิง กษ 0613.2/0564 ลงวันที่ 20 พฤษภาคม 2565 วันที่รับตัวอย่าง 23 พฤษภาคม 2565 วันที่รายงานผล 6 มิถุนายน 2565				
สถานที่เป็นตัวอย่าง ชนิดตัวอย่าง ☒ เลือด ☐ ชิ้นเนื้อ ☐ ขน ☐ น้ำเชื้อ ☐ อื่นๆ จำนวน 2 ตัวอย่าง สภาพและลักษณะตัวอย่าง ☒ ปกติ ☐ ไม่ปกติ เนื่องจาก วิธีการสอบ ☒ In house method BBLP-DNA-T-01 based on StockMarks Kits for Horses, Cattle, and Dogs (Equine, Bovine, and Canine) Genotyping Kits ☐ อื่นๆ								
ลำดับ	ชื่อ/หมายเลขสัตว์	DNA No.	เพศ	หมายเลขคอ	หมายเลขแม่	ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูก	วันที่ทดสอบ	หมายเหตุ
1	ใบทอง	65NC0900	เมีย	-	-	-	-	-
2	ทก (ลูกใบทอง)	65NC0901	ผู้	TH368	152205882	เป็นพ่อ แม่ ลูกกัน	31 พ.ค. 65	-
หมายเหตุ *** หมายถึง รายงานการทดสอบที่ไม่ได้รับการรับรอง ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025								
ลงชื่อ ผู้ทดสอบ (นางสาวสุภาภรณ์ เลิศทวี) ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ วันที่ 6 มิถุนายน 2565		ลงชื่อ ผู้ทบทวน (นายณัฐนันท์ ศิริรัตนวิญญูกุล) ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ระดับชำนาญการพิเศษ วันที่ 6 มิถุนายน 2565		ลงชื่อ ผู้อนุมัติ (นายณัฐนันท์ ศิริรัตนวิญญูกุล) ตำแหน่ง หัวหน้ากลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ วันที่ 6 มิถุนายน 2565				
ต้องปฏิบัติตามการรับรองความชำนาญ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 รายงานฉบับนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ส่งมาทดสอบ และการทดสอบตามตัวอย่างที่ได้รับเท่านั้น ห้ามทำสำเนาหรือเผยแพร่บางส่วน (ยกเว้นคำชี้แจง) โดยไม่ได้รับอนุญาตจากห้องปฏิบัติการเป็นลายลักษณ์อักษร								

หน้า 2 / 2
☐ มีหน้าต่อ ☒ ไม่มีหน้าต่อ

รูปที่ 5 - 3 ตัวอย่างใบรายงานผลการทดสอบการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกโค ที่ได้รับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017

3. การตรวจติดตามคุณภาพ (quality audit)

เป็นการตรวจสอบระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการฯ อย่างมีระบบเพื่อให้มั่นใจว่าทุกกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการฯ ได้มีการนำไปปฏิบัติใช้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ การตรวจติดตามคุณภาพเป็นกระบวนการเก็บรวบรวมข้อมูลหลักฐานอย่างมีแผน (โดย ที่แผนการตรวจติดตามคุณภาพนั้นกระทำโดยรวบรวมข้อมูลและเงื่อนไขของการตรวจติดตามคุณภาพ เช่น วัตถุประสงค์ ชนิด ขอบเขต ระยะเวลา ผู้ร่วมงาน/ทีมผู้ตรวจติดตาม และหน้าที่รับผิดชอบของแต่ละบุคคล ตลอดจนผลของการตรวจ ติดตามในครั้งก่อนของกิจกรรมนั้นๆ นโยบายที่เกี่ยวข้องตามคู่มือคุณภาพ ขั้นตอนการดำเนินงานที่เกี่ยวข้อง คู่มือการปฏิบัติงานและการปฏิบัติ) และเป็นทางการ การตรวจติดตามคุณภาพเป็นการหาข้อมูลหลักฐานเพื่อให้ผู้บริหารใช้ในการตัดสินใจแก้ไขปัญหาเพื่อให้ได้คุณภาพของงานตามที่ต้องการ นอกจากนี้การตรวจติดตามคุณภาพยังเป็นสิ่งที่ช่วยให้เกิดแนวคิดใหม่ และทำให้เกิดการปรับปรุงงานอย่างต่อเนื่องในระบบบริหารคุณภาพโดยรวม โดยที่การตรวจติดตามของห้องปฏิบัติการฯ แบ่งเป็น

1. การตรวจติดตามคุณภาพแบบการตรวจติดตามตามแนวนอน (horizontal audit) ซึ่งเป็นการตรวจติดตามแต่ละกิจกรรมของระบบคุณภาพโดยครอบคลุมกิจกรรมทดสอบเช่น การตรวจสอบการฝึกอบรมบุคลากร มาตรฐานอ้างอิง การบำรุงรักษาและการสอบเทียบเครื่องมือ วิธีทดสอบและการสอบเทียบเครื่องมืออุปกรณ์ที่มีผลต่อการทดสอบ การจัดซื้อ การจัดการตัวอย่าง การรายงานผล เป็นต้น

2. การตรวจติดตามคุณภาพแบบการตรวจติดตามตามแนวตั้ง (vertical audit) ซึ่งเป็นการตรวจติดตามกิจกรรมในระบบคุณภาพทั้งหมดเพื่อแสดงให้เห็นว่าการปฏิบัติการทดสอบได้มีการปฏิบัติตามที่กำหนดไว้ โดยเป็นการสุ่มตัวอย่างทดสอบจากตัวอย่างที่รับเข้ามาในห้องปฏิบัติการฯ และครอบคลุมถึงการจัดการตัวอย่าง การสอบเทียบและการบำรุงรักษาเครื่องมือ วิธีการทดสอบ/สอบเทียบที่ใช้ ข้อกำหนดการควบคุมคุณภาพ สภาวะแวดล้อม การบันทึกผล และการรายงานผลการทดสอบ การจัดเก็บข้อมูลเก็บรักษา การทำลาย เป็นต้น

4. การตรวจติดตามคุณภาพภายใน (internal audit)

เป็นกิจกรรมการตรวจสอบคุณภาพที่ห้องปฏิบัติการ ต้องดำเนินการเป็นระยะ ๆ อย่างมีแบบแผน และเป็นระบบเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า กิจกรรมทุกส่วนที่เกี่ยวข้องกับระบบบริหารคุณภาพของห้องปฏิบัติการมีประสิทธิภาพ เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ สามารถปฏิบัติตามได้ทุกกิจกรรม และบุคลากรทุกระดับถือปฏิบัติได้ทุกคน กิจกรรมการตรวจติดตามคุณภาพภายใน ต้องครอบคลุมทุกส่วนของระบบบริหารคุณภาพรวมทั้งการสอบเทียบในกระบวนการทดสอบ และการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในงานบริการ

การวางแผนและจัดกิจกรรม รวมทั้งการกำหนดความถี่ของกิจกรรม ในการดำเนินกิจกรรมตรวจติดตามคุณภาพภายใน โดยมีผู้จัดการคุณภาพเป็นผู้รับผิดชอบในการดำเนินการ ซึ่งปฏิบัติการต้องตรวจติดตามคุณภาพภายในให้ครบทุกกิจกรรมอย่างน้อย 1 ครั้ง ในแต่ละปี ขั้นตอนการดำเนินงานตรวจติดตามคุณภาพภายในมีดังนี้

1. จัดทำโปรแกรม (แผน) การดำเนินงานตรวจติดตามคุณภาพภายใน
2. กำหนดผู้ตรวจติดตามคุณภาพ พร้อมทั้งแต่งตั้งคณะผู้ตรวจติดตามคุณภาพภายใน
3. แจกจ่ายกำหนดการตรวจติดตามคุณภาพ และจัดทำ checklist ที่จะใช้ในการตรวจติดตามคุณภาพภายใน
4. ประชุมผู้ตรวจติดตาม และดำเนินการตรวจตามคุณภาพตามกำหนดการ
5. บันทึกสิ่งที่ตรวจพบเหตุการณ์/หลักฐาน ระหว่างการตรวจติดตามคุณภาพภายใน
6. รายงานการตรวจติดตามคุณภาพ
7. ดำเนินการแก้ไขข้อบกพร่อง
8. ประชุมปิดการตรวจติดตามคุณภาพภายใน
9. จัดทำรายงานสรุปผลตรวจติดตามภายใน

5. การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison)

การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ เป็นกิจกรรมคุณภาพที่จัดขึ้น เพื่อใช้ในการตรวจสอบสมรรถนะหรือความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบ โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมกิจกรรม ว่าสามารถทำการทดสอบ หรือทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างและรายงานผลให้ผู้ใช้บริการได้อย่างถูกต้อง รวมทั้งดำเนินการวิธีการตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี ตรงตามวัตถุประสงค์เป็นส่วนหนึ่งในหลักประกันคุณภาพผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ ตามข้อกำหนด 4.9 (การประกันคุณภาพผลการทดสอบและการสอบเทียบ) ของมาตรฐานว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025 : 2017

รายงานผลการตรวจเอกลักษณ์โค (Bovine Identity Test)

ผู้ทดสอบ : นางรัชฎาพร วงษ์สมบัติ ตำแหน่ง : นักวิทยาศาสตร์
วันที่ได้รับตัวอย่าง : 31/01/2565 ชื่อห้องปฏิบัติการ : ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ
วันที่วิเคราะห์ : 02/02/2565

ผลการวิเคราะห์

ลำดับ	Sample no.	Primer ที่ใช้ทดสอบ (Bovine Kit)																					
		TGLA227 (64-115 bp)	BM2113 (116-146 bp)	TGLA53 (147-197 bp)	ETH10 (198-234 bp)	SP5115 (235-265 bp)	TGLA126 (104-131 bp)	TGLA122 (134-193 bp)	BM223 (193-235 bp)	ETH3 (90-135 bp)	ETH225 (136-165 bp)	BM1824 (170-218 bp)											
1	5	78.05	84.42	122.07	124.07	166.25	184.14	214.86	216.74	243.56	247.43	115.94	118.01	142.18	164.67	212.64	212.64	113.78	124.58	146.04	146.04	183.30	183.30
2	6	78.22	84.62	124.18	134.08	152.07	166.27	216.70	222.46	243.53	247.30	118.22	118.22	142.18	151.42	204.94	206.82	113.97	126.84	146.04	155.38	183.24	189.46
3	7	99.22	99.22	132.28	132.28	152.07	160.25	214.85	218.62	243.63	247.53	118.61	118.61	142.09	173.00	201.41	205.18	125.03	125.03	143.90	155.51	183.30	183.30
4	8	81.21	92.11	132.27	132.27	158.14	166.27	214.83	216.71	243.67	245.67	118.69	125.01	147.00	149.32	204.94	212.71	114.39	122.89	146.04	146.04	181.19	183.24
5	Pos.control	83.73	94.82	122.68	130.53	158.14	162.22	212.80	218.56	243.59	255.12	118.72	120.82	139.69	142.19	211.63	211.63	116.51	116.51	135.45	135.45	179.03	183.24
6	Neg.control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ/ ข้อเสนอแนะ

ลงชื่อ ผู้ทดสอบ
(นางรัชฎาพร วงษ์สมบัติ)
ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์
วันที่ 4 / 2 / 65

ลงชื่อ ผู้ตรวจสอบ
(นายบัณฑิต นวลศรีนาย)
ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
วันที่ 9 / 2 / 65

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ สทป. หน้า 1 จาก 1

155

รูปที่ 5 - 4 ตัวอย่างใบรายงานผลตรวจเอกลักษณ์โค ในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติกับสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์)

ขั้นตอนการทดสอบ การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ

ในการดำเนินการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการจะต้องคัดเลือกห้องปฏิบัติการที่จะเข้าร่วมดำเนินการทดสอบในระดับเดียวกันหรือเทียบเท่า และได้รับการรับรองความสามารถ ISO/IEC 17025

หรือ ISO 15189 หรือเทียบเท่า ในรายการทดสอบที่ต้องการเปรียบเทียบผลหรือได้รับการรับรองในเทคนิคเดียวกันหรือตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงกัน โดยห้องปฏิบัติการจะเป็นผู้จัดเตรียมตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่เตรียมนั้นจะต้องได้รับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity testing) และการทดสอบความเสถียร (stability testing) หลังจากนั้นจึงจะส่งตัวอย่างพร้อมเอกสารที่เกี่ยวข้องมายังห้องปฏิบัติการที่เป็นคู่เทียบ เมื่อห้องปฏิบัติการที่เป็นคู่เทียบได้รับตัวอย่าง จะดำเนินการทดสอบตัวอย่าง (ภายในระยะเวลาที่กำหนด) และรายงานผลการทดสอบตามแบบฟอร์มส่งกลับไปยังห้องปฏิบัติการที่เป็นผู้จัดการเปรียบเทียบ (รูปที่ 5 - 4)

เอกสารอ้างอิง

มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2562. ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ คู่มือ มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017. แหล่งที่มา :

<https://www.sci.nu.ac.th/chemistrys/all-files/20220316131634-2.pdf>, August 08, 2022.

สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2562. ข้อเสนอแนะประกอบ การตรวจประเมินตาม มอก. 17025-2561. แหล่งที่มา: https://www.tisi.go.th/data/lab/lab_pdf/GLA_23_00.pdf, August 08, 2022.

156

บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค. 2561. วิทยาการก้าวหน้าด้านนิติพันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท ปิยอนด์เอ็นเทอร์ไพรส์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

Broeders S., I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens and D. Morisset. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR Methods. Trends Food Sci. Technol. ;37: 115-126.

Cochran, W.G. and G.M. Cox. 1968. Experimental Designs. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

International standard ISO/IEC 17025. 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Switzerland.

SWGDM. 2016. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. Scientific working group on DNA analysis methods. Approved 12/5/2016.

Thermo Fisher Scientific. 2014. คู่มือ StockMarks® Kits for Horses, Cattle, and Dog Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits Revision F, pp. 52

ประวัติผู้เขียน

นายสัตวแพทย์ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล

การศึกษา :

สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งวิชาการ :

นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

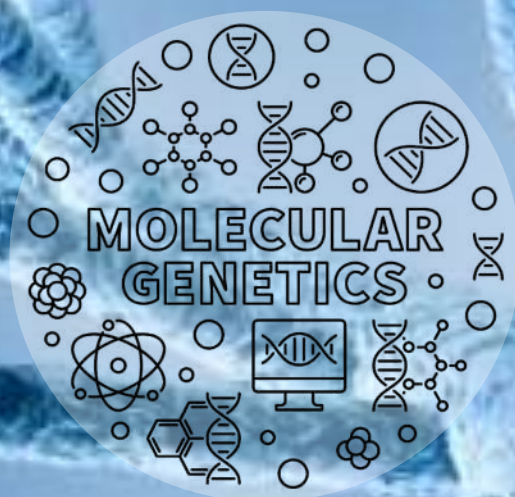
หัวหน้ากลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายชีวภาพปศุสัตว์

ที่ทำงาน :

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี

จังหวัดปทุมธานี 12000



กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

เลขที่ 91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมืองปทุมธานี

จังหวัดปทุมธานี 12000