บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ที่ใช้เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต ลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตที่แสดงออกมาก็มาจากการถอดรหัสของดีเอ็นเอในตำแหน่งต่าง ๆ ของแผงยีน (Genome) ของสิ่งมีชีวิตนั้น ทำให้สิ่งมีชีวิตต่างๆดำรงชีพได้อย่างเป็นระบบ และอีกนัยหนึ่งทำให้ระบบต่างๆของสิ่งมีชีวิตทั้งหลายมีความสามารถในการดำรงชีพที่มีความแตกต่างกันในรายละเอียด แต่ยังคงมีกระบวนการและหลักการของระบบต่างๆไปในทำนองเดียวกัน หน่วยพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ถูกถอดรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนเรียกว่า ยีน (Genes) ซึ่งประมาณกันว่าในแผงยีนของมนุษย์มีประมาณ 50,000-100,000 ยีน ยีนหนึ่งอาจมีความยาวของลำดับเบสได้ตั้งแต่ 1,000 เบสไปจนถึงมากกว่า 2,000,000 เบส อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับแผงยีนของมนุษย์ที่มีลำดับเบสทั้งหมดประมาณ 3,000 ล้านเบสแล้ว ส่วนที่ถูกถอดรหัสออกมาจะมีเพียงประมาณ 5-10 % เท่านั้น [3]

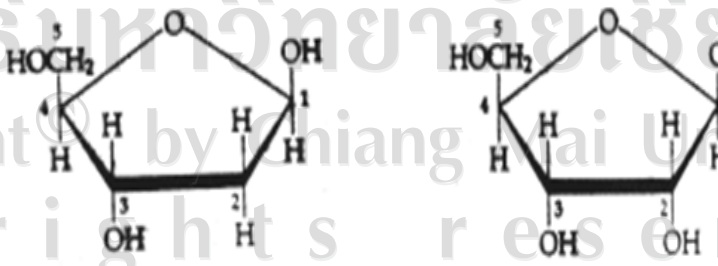
ดีเอ็นเอจัดเป็นสารประกอบประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ซึ่งมีทั้งหมด 2 ชนิดคือ ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ดีเอ็นเอเป็นชื่อย่อมาจากคำเต็มว่า ดีออกซีไรโบนิวคลีอิก แอสิด (Deoxyribonucleic acid; DNA) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสาย (Double-strand) มาพันกันเป็นเกลียวฮีลิกซ์ โดยนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสชนิดดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) ชนิดเพียวรีน คือ เบสอะดีนีน (Adenine) และเบสกัวนีน (Guanine) ชนิดไพริมิดีน คือ เบสไทมีน (Thymine) และเบสไซโทซีน (Cytosine) ในขณะที่อาร์เอ็นเอเป็นชื่อย่อมาจากคำเต็มว่า ไรโบนิวคลีอิก แอสิด (Ribonucleic acid; RNA) ประกอบด้วย พอลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว (Single-strand) นิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอประกอบด้วย น้ำตาลไรโบส (Ribose) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และไนโตรจีนัสเบสชนิดเพียวรีน คือ เบสอะดีนีน(Adenine) และเบสกัวนีน (Guanine) ชนิดไพริมิดีน คือ เบส ยูราซิล (Uracil) และเบสไซโทซีน (Cytosine) โดยทั่วไปดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสัตว์ชั้นต่ำและสัตว์ชั้นสูง และมีการถ่ายทอดข้อมูลออกไปให้อยู่ในรูปของอาร์เอ็นเอ ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระบวนการถอดรหัส (Transcription) ซึ่งจะมีกระบวนการแปลรหัส (Translation) จากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีนสำหรับทำหน้าที่ต่างๆ อีกทีหนึ่ง สารพันธุกรรมเหล่านี้ถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมให้อยู่ในรูปโปรตีน ซึ่งมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญและการควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิต ทำให้เซลล์ทำหน้าที่ต่างๆ ได้เป็นปรกติ นอกจากนั้นสารพันธุกรรมเหล่านี้ยังมีความสามารถในการจำลองตัวเองด้วยวิธีการต่างๆ เป็นการรักษาเผ่าพันธุ์และสืบทอดข้อมูลเหล่านี้ไปยังลูกหลาน [1]

เกลียวฮีลิกซ์ของดีเอ็นเอ (Double-stranded DNA) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสายมาพันกันเป็นเกลียว โดยทั่วไปจะเป็นเกลียวเวียนขวา (Right-handed Helix) พอลิเมอร์นิวคลีโอไทด์แต่ละสายประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยย่อยเรียงต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ มีปลาย 5’-phosphase และ 3’-OH โดยนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายเรียงตัวกันในทิศทางตรงกันข้าม (Antiparallel) สายหนึ่งเรียงตัวจาก 5’-phosphase ไปยัง 3’-OH อีกสายหนึ่งเรียงจาก 3’-OH ไปยัง 5’-phosphase แกนของของทั้งสองสายเป็นส่วนของน้ำตาลเพนโทสต่อกับหมู่ฟอสเฟสด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ส่วนเบสนั้นจะยื่นเข้าหากันโดยมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่ระหว่างเบสที่จำเพาะคือ อะดีนีนจะจับคู่กับไทมีนด้วยพันธะไฮโดรเจนสองพันธะ (A-T base pair) กัวนีนจะจับคู่กับไซโทซีนด้วยพันธะไฮโดรเจนสามพันธะ (G-C base pair) จึงแข็งแรงกว่าคู่เบสอะดีนีนกับเบสไทมีน การจับตัวของเบสในลักษณะนี้ ทำให้ได้โครงสร้างดีเอ็นเอที่บิดเป็นเกลียวฮีลิกซ์ เนื่องจากการจัดตัวของอะตอมในโมเลกุลของเบสแต่ละตัวมีโครงสร้างที่แน่นอน และเมื่อจับคู่กับเบสอีกชนิดหนึ่งจึงทำให้เกิดการบิดตัวของโมเลกุลของดีเอ็นเอ สำหรับตัวเบสนั้นเป็น Heterocyclic Nitrogenous Base จะเกิดพันธะไฮโดรโฟบิกระหว่างเบสที่อยู่ซ้อนกันในแต่ละสาย (Stacking base) ดังนั้น พันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิกจึงเป็นพันธะหลักที่ช่วยให้เกลียว ฮีลิกซ์ของดีเอ็นเอคงรูปอยู่ได้

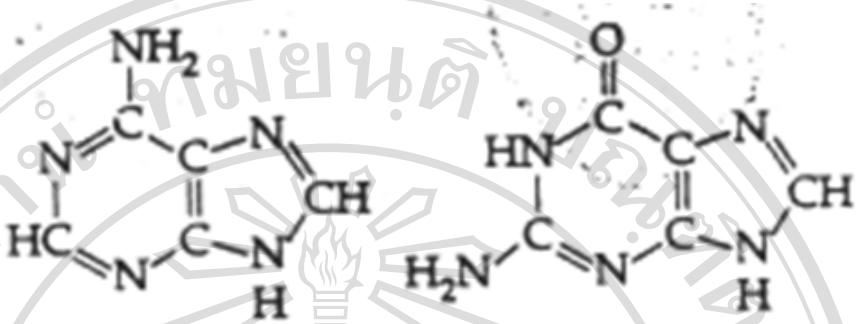
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



Deoxyribose Ribose

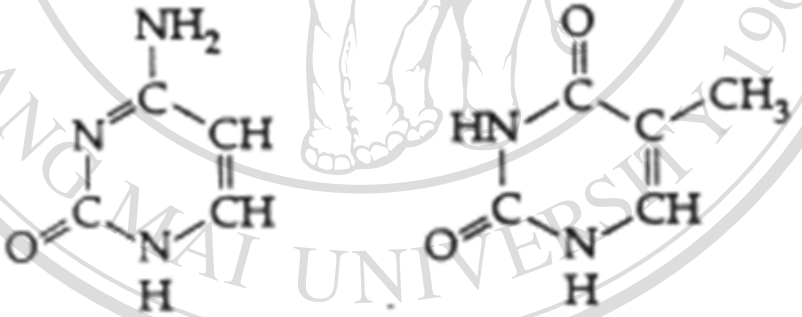
ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลเพนโทสที่เป็นองค์ประกอบในดีเอ็นเอคือ ดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) และในอาร์เอ็นเอคือไรโบส (Ribose)

Purine



Adenine (A) Guanine (G)

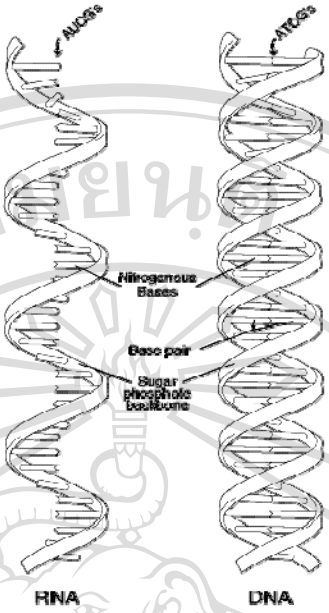
Pyrimidine



Cytosine (C) Thymine (T)

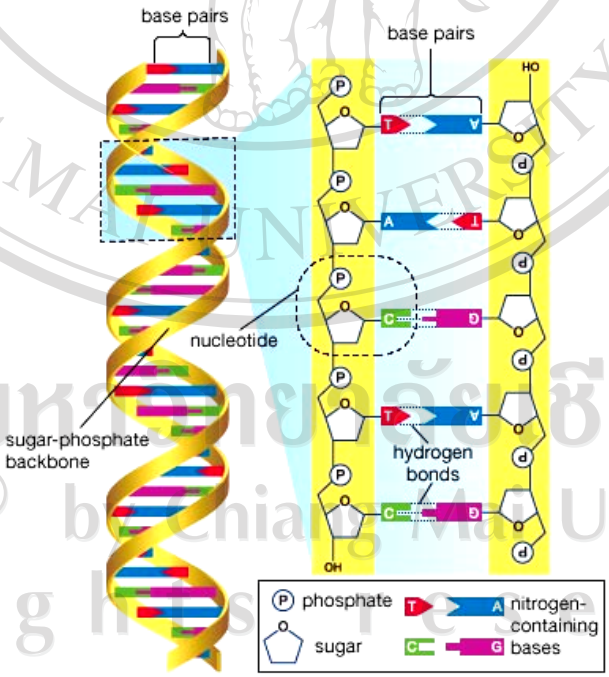
ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของไนโตรจีนัสเบส ชนิดเพียวรีนและไพริมิดีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3 ลักษณะพอลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวของ RNA และพอลินิวคลีโอไทด์สายคู่ของ DNA

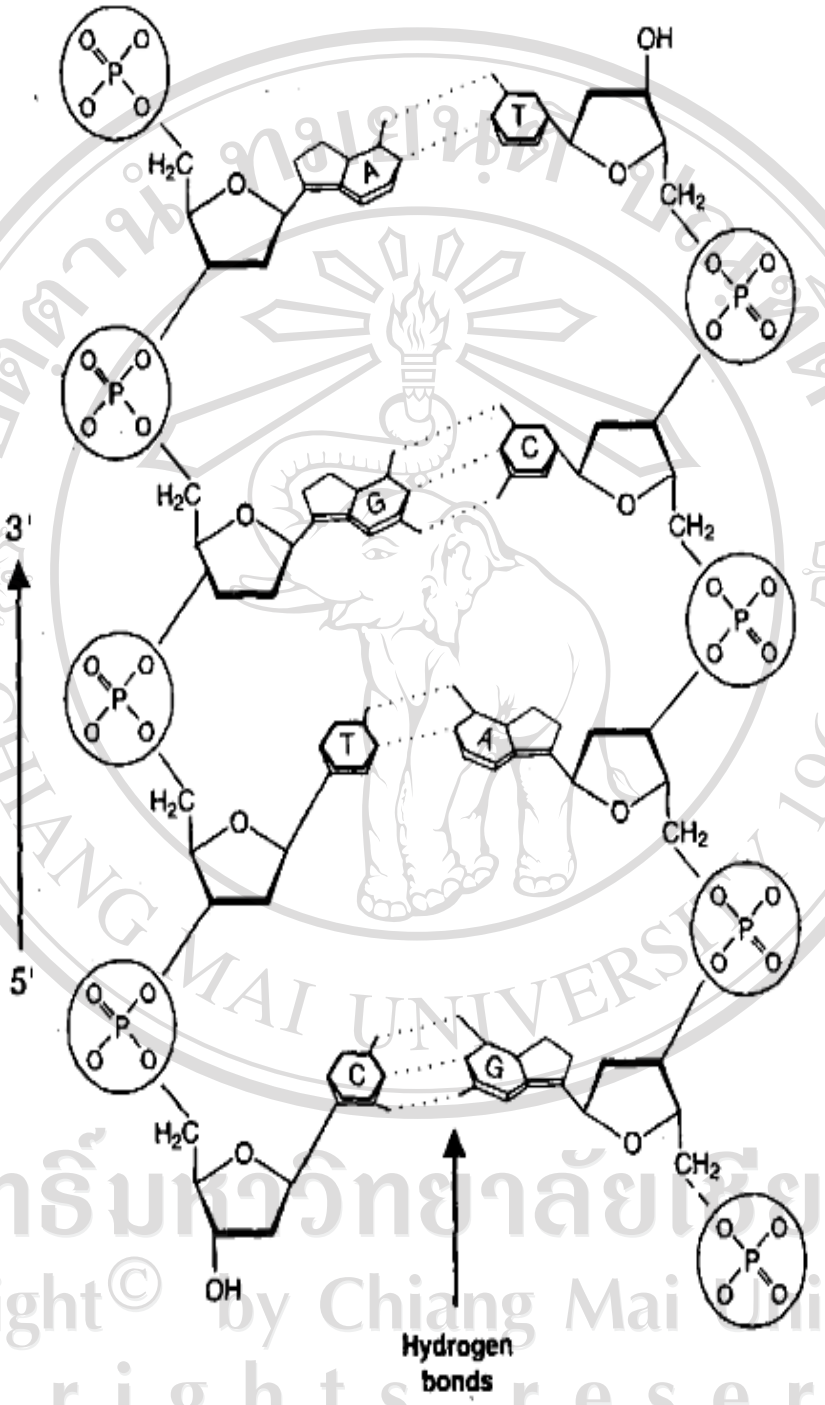
ที่มา: http://www.accessexcellence.org



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 4 โครงสร้างเกลียวฮีลิกซ์ของดีเอ็นเอ แสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส (AT หรือ GC)

ที่มา: http://www.biogang.com/images/dnastructure2.jpg



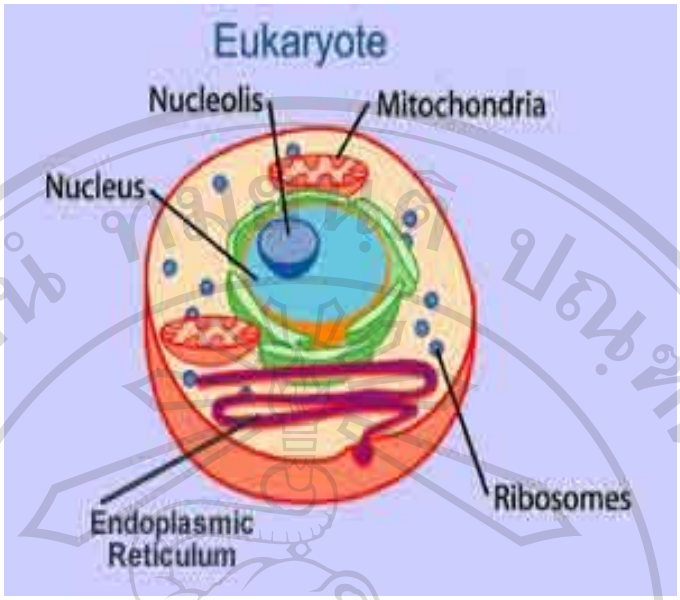
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 5 การจัดตัวของสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายของดีเอ็นเอไปในทิศทางตรงกันข้าม

ที่มา: http://upload.vipulg.com/Zoology/759/Chapter4_files/Chapter4-42.png

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตของสัตว์ชั้นสูง(Eukaryotic Cell)และของสัตว์ชั้นต่ำ (Prokaryotic Cell) ต่างมีหน้าที่หลักในการจำลองตัวเองและการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมให้ได้โปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ ทำนองเดียวกัน แต่ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตทั้งสองกลุ่มมีลักษณะและกลไกการทำงานแตกต่างกัน สัตว์ชั้นต่ำเช่นแบคทีเรียไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear Membrane) ดีเอ็นเอในเซลล์ของสัตว์ชั้นต่ำจึงอยู่ร่วมกับออร์แกเนลล์อื่นๆในไซโทพลาซึม โดยดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลมประกอบด้วย พอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวต่อเนื่องกัน ไม่มีปลายเปิด อยู่ในลักษณะเดี่ยว เรียกว่า แฮพลอยด์ (Haploid) (มีโครโมโซม 1 ชุด) ส่วนสัตว์ชั้นสูงเช่นพืชหรือสัตว์นั้นมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีดีเอ็นเอหลักอยู่ภายในนิวเคลียส ลักษณะดีเอ็นเอภายในนิวเคลียสจะเป็นเส้นตรง ภายในประกอบด้วยพอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวและมีปลายเปิดที่หัวท้าย อยู่ในลักษณะเป็นคู่เรียกว่า ดิพลอยด์ (Diploid) (มีโครโมโซม 2 ชุด) เป็นที่น่าสนใจว่า นอกจากมีดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้วยังมีดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกนิวเคลียส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่พบในไซโทพลาซึม พบในออร์แกเนลล์บางชนิดเท่านั้น เช่น ในไมโตคอนเดรียและในคลอโรพลาสต์ ดีเอ็นเอภายนอกนิวเคลียสนี้จะมีลักษณะเป็นวงกลม คล้ายกับดีเอ็นเอที่พบในแบคทีเรียหรือพลาสมิดของแบคทีเรีย จัดเป็นสายเปลือยดีเอ็นเอ คือมีพอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวฮีลิกซ์ (circular double-stranded DNA) แต่ไม่มีการพันล้อมรอบฮิสโทนเช่นเดียวกับดีเอ็นเอภายในนิวเคลียส โดยพืชมีดีเอ็นเออยู่ในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ส่วนสัตว์มีดีเอ็นเออยู่ในไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) ดีเอ็นเอในไซโทพลาซึมนั้นมีลักษณะต่างจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสแต่คล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของสัตว์ชั้นต่ำ นั่นคือเป็นเกลียวฮีลิกซ์ที่เป็นวงกลมปลายปิด ซึ่งมีกระบวนการจำลองตัวเองและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นอิสระจากกระบวนการของดีเอ็นเอในนิวเคลียส แต่ผลผลิตที่ได้ระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียสและดีเอ็นเอในไซโทพลาสซึมทำหน้าที่ร่วมกันคือ ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นๆสามารถใช้ชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นปกติ [1]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 องค์ประกอบภายในเซลล์ยูแคริโอต

ที่มา http://th.wikipedia.org/

ไมโตคอนเดรีย เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ในการหายใจ และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอตที่หายใจแบบใช้ออกซิเจนทั้งพืชและสัตว์ พบครั้งแรกโดย คอลลิกเกอร์ (Kollicker) ไมโตคอนเดรียมีรูปร่างกลม ท่อนสั้น ท่อนยาว หรือกลมรีคล้ายรูปไข่ โดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2–1 ไมครอน และยาว 5-7 ไมครอน ประกอบด้วยสารโปรตีนร้อยละ 60–65 และลิพิดประมาณร้อยละ 35-40 ไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มียูนิตเมมเบรนหุ้ม 2 ชั้น (Double Unit Membrane) โดยชั้นนอกเรียบมีความหนาประมาณ 60–70 อังสตรอม เยื่อชั้นในพับเข้าด้านในเรียกว่า คริสตี (Cristae) ภายในของไมโตคอนเดรียมีของเหลวซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดเรียกว่า เมทริกซ์ (Matrix) ในไมโตคอนเดรีย นอกจากมีสารประกอบเคมีหลายชนิดแล้วยังมีเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างพลังงานจากการหายใจระดับเซลล์

โครงสร้างของไมโตคอนเดรีย มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ดังนี้

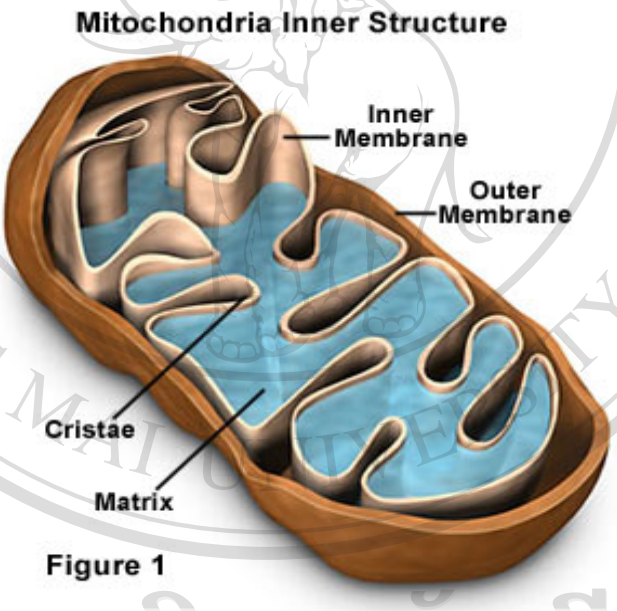
1. เยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer Membrane) มีลักษณะเรียบหน้าที่คอยควบคุมการผ่านเข้าออก ของสาร

2. เยื้อหุ้มชั้นใน (Inner Membrane) มีลักษณะหยักไปมาคล้ายวิลลัสในลำไส้คน เรียกว่า คริสตา (Crista) ที่เยื่อชั้นในมีโครงสร้างเล็กๆ ลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ เรียกว่า Inner

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Membrane Particle ติดอยู่เต็มไปหมด โครงสร้างเล็กๆ มีหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสารที่เป็นตัวรับไฮโดรเจนและตัวรับอิเล็กตรอน

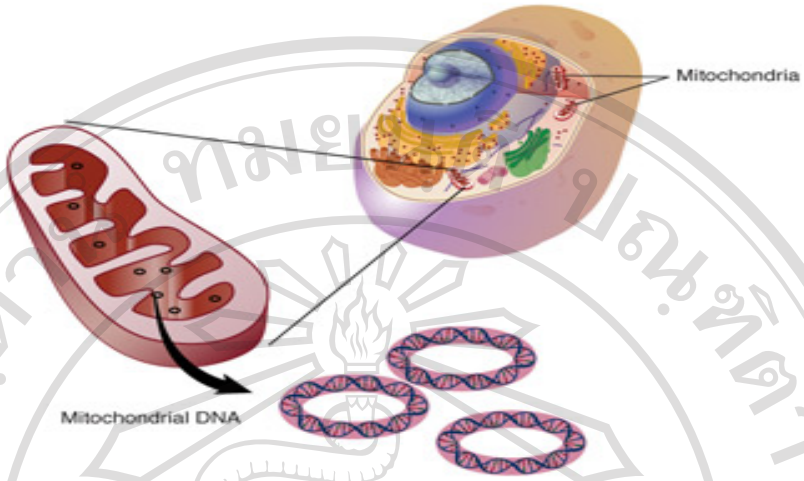
ปริมาณของไมโตคอนเดรียในแต่ละเซลล์จะต่างกันตั้งแต่ไม่มีไมโตคอนเดรียเลย จนมีมากกว่า 2,000 อัน เซลล์ที่ต้องการพลังงานสูงหรือมีเมแทบอลิซึมสูงจะมีไมโตคอนเดรียมาก เช่น เซลล์สมอง เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์หัวใจ เนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งของการสร้างพลังงานในรูปแบบของเอทีพี เซลล์ที่ไม่มีไมโตคอนเดรียเลยได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่โตเต็มวัย โดยทั่วไปในไมโตคอนเดรียมีลักษณะเป็นวงรีรูปไข่ แต่อาจมีลักษณะแตกต่างกันออกไปได้ เช่น เซลล์สมองมีไมโตคอนเดรียลักษณะเป็นทรงกลม เซลล์หัวใจมีไมโตคอนเดรียลักษณะเป็นทรงกระบอกเป็นต้น



ภาพ 7 โครงสร้างภายในของไมโตคอนเดรีย

ที่มา : www.cartage.org.lb

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 แสดงลักษณะดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย

ที่มา : http://ocw.mit.edu

ทั้งนี้ในไมโตคอนเดรียพบว่ามีดีเอ็นเอเป็นของตัวเอง มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง โครงสร้างของจีโนมในไมโตคอนเดรียของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงกลมประกอบไปด้วยพอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวคู่แบบวงแหวน (Circular Double-Stranded DNA) ไม่มีการพันล้อมรอบฮิสโทนเหมือนดีเอ็นเอในนิวเคลียส ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีขนาดเล็ก เช่นในสัตว์มีขนาดประมาณ 16,000-20,000 คู่เบส ส่วนพืชนั้นมีดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียใหญ่มากคือประมาณ 100 กิโลเบส ของมนุษย์มีความยาว 16,569 คู่เบสเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสของมนุษย์มีความยาวประมาณ 6,000 ล้านคู่เบส และในหนึ่งไมโตคอนเดรียจะมีดีเอ็นเอประมาณ 5-10 วง ซึ่งรหัสบนดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียนั้น ทุกเบสมีความหมายทั้งหมด (ไม่มีอินทรอน) และเท่าที่พบในขณะนี้คือมี 37 ยีน ซึ่งในจำนวนนี้เป็นยีนที่สร้างโปรตีนได้ (polypeptides) จำนวน 13 ยีน เช่น Cytochrome b, ND1-6, ND4L, Cytochrome Oxidase และ ATP synthase เป็นต้น ทั้งนี้ความน่าสนใจของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียคือ รหัสพันธุกรรมมีลักษณะเฉพาะตัว โดยปกติแล้วรหัสพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (universal codon) หมายถึงเบส 3 ตัวที่เรียงต่อกันของ mature mRNA แล้วบ่งบอกความหมายถึง กรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยสิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นสัตว์ชั้นสูงหรือสัตว์ชั้นต่ำ พืชหรือสัตว์ การเรียงตัวของเบสสามตัวจะบ่งบอกถึงกรดอะมิโนชนิดเดียวกันแต่สำหรับดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของไมโตคอนเดรียนี้พบว่า บางรหัสไม่ได้บ่งบอกถึงกรดอะมิโนตามกฎของ universal codon แต่ให้ความหมายต่างออกไป โดยรหัสที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นเพียงบางรหัสเท่านั้น

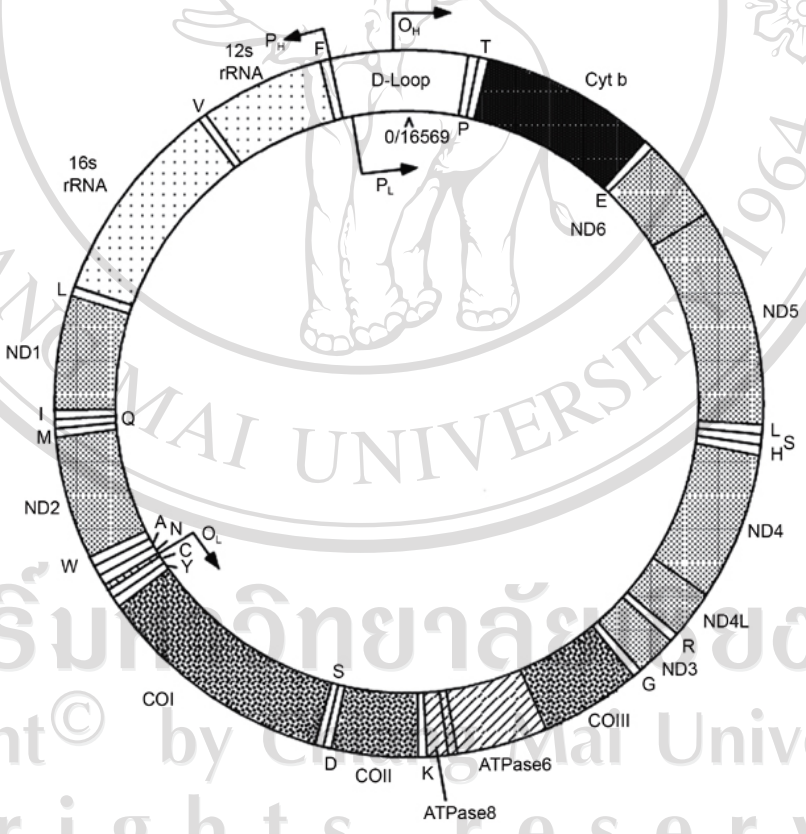
ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียนี้มีสมมติฐานว่าเดิมเป็นสิ่งมีชีวิตอิสระ เข้ามาอยู่ในเซลล์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (endosymbiont hypothesis) โดยไมโตคอนเดรียเป็นโพรแคริโอตในกลุ่ม **α** – purple bacteria ถูกกลืนโดยเซลล์ที่เป็นบรรพบุรุษของยูแคริโอตเมื่อประมาณ 1,200 ล้านปีมาแล้ว และอาศัยอยู่ในเซลล์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยได้รับอาหารจากเซลล์ ส่วนเซลล์ก็ได้รับพลังงานในรูปของ ATP ตอบแทน และต่อมามีบางเซลล์ได้กลืนเอาแบคทีเรียในกลุ่ม cyanobacteria เข้าไปจนได้เป็นสาหร่ายและพืชที่มีการสังเคราะห์แสงได้ ไมโตคอนเดรียสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยการแบ่งตัว อาศัยอยู่ในเซลล์เป็นเวลานานจนไม่สามารถกลับไปอยู่แบบอิสระได้อีก เนื่องจากมีการถ่ายยีนบางตัวเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ จึงต้องอาศัยโปรตีนหลายชนิดจากไซโทพลาสซึม โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีส่วนของพอลิเปปไทด์ที่เป็นสัญญาณนำมายังออร์แกเนลล์ และเข้าไปทำงานในไมโตคอนเดรีย โดยที่มาของไมโตคอนเดรียมิได้มีที่จากการเกิดใหม่ขึ้นเอง (De Novo) แต่ต้องได้รับการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษ ซึ่งปกติแล้วอาศัยกฎของเมนเดล คือมาจากพ่อและแม่ แต่เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของไมโตคอนเดรียในไซโตพลาซึม เซลล์สืบพันธุ์ของพ่อซึ่งอยู่ในรูปของอสุจินั้นเอาเฉพาะส่วนหัวของอสุจิซึ่งมีนิวเคลียสอยู่เข้าไปผสมกับไข่ของเพศแม่ แต่สลัดเอาส่วนที่เหลือซึ่งมีไมโตคอนเดรียอยู่เป็นจำนวนมากออกไป ดังนั้น เซลล์ของลูกที่ได้จึงมีแต่ไมโตคอนเดรียที่ได้จากแม่เท่านั้น การถ่ายทอดจากบรรพบุรุษสู่ลูกหลานจึงไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Non-Mendelian Inheritance) แต่เป็นการถ่ายทอดลักษณะจากเพศแม่เท่านั้น (Maternal Inheritance) นั่นคือความผิดปกติของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียที่เกิดขึ้น หากเกิดกับเพศพ่อก็จะไม่ถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานแต่หากเกิดกับเพศแม่จึงจะถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้

สรุปการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย มีลักษณะดังนี้

- การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ uniparental inheritance โดยเป็นชนิด maternal inheritance จัดเป็น Non-Mendelian inheritance
- ไม่มีกระบวนการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางพันธุกรรมโดยกระบวนการรีคอมบิเนชั่น (recombination) ระหว่างดีเอ็นเอจากพ่อและแม่
- มีกระบวนการจำลองตัวเอง (DNA replication) เพื่อเพิ่มจำนวนด้วยอัตราเร็วของมันเอง ไม่ขึ้นกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในนิวเคลียส การจำลองตัวของดีเอ็นเอตามมาด้วยการเพิ่มจำนวนของไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

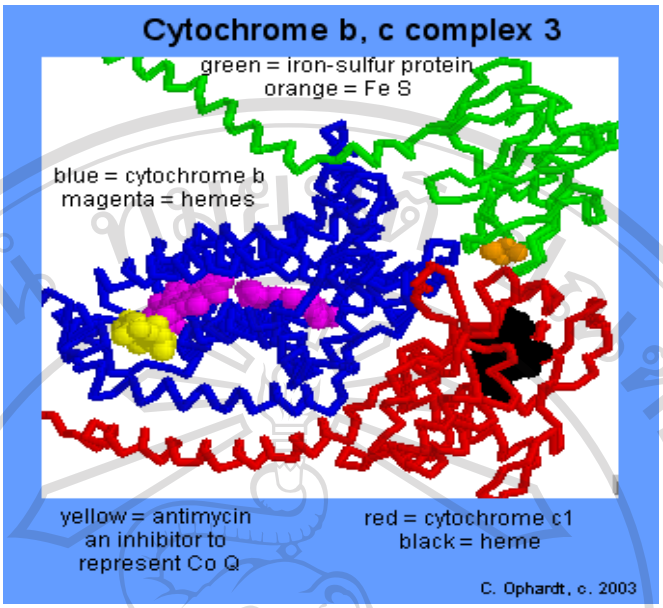
ไซโตโครม (Cytochrome) คือรงควัตถุในรูปโปรตีน ซึ่งมีธาตุเหล็ก(Fe)เป็นองค์ประกอบ มีหน้าที่สำคัญ คือเป็นตัวรับและถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจคือ Cytochrome b Cytochrome c และ Cytochrome a ตามลำดับ [2] ไซโตโครมจะรับและส่งอิเล็กตรอนจากไซโตโครมหนึ่งไปยังอีกไซโตโครมหนึ่งจนถึงออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและไม่ส่งต่ออิเล็กตรอนให้แก่สารตัวใด ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายภายในไมโตคอนเดรีย กลายเป็นน้ำ ดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของยีนไซโตโครมบีเป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1140 เบส และพบอยู่ในสัตว์ทุกชนิด แต่มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิด จึงมีการนำเอาดีเอ็นเอในส่วนของยีน ไซโตโครม บี มาใช้ในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดในสัตว์ (Species Identification)



ภาพ 9 ผังของยีนต่างๆ ในจีโนมของไมโตคอนเดรีย

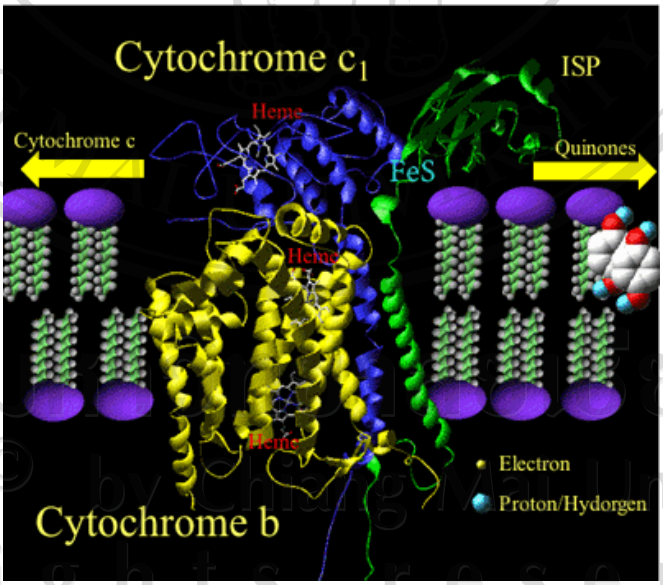
ที่มา: http://www.nature.com/cr/journal/v17/n3/images/7310124f2.jpg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 10 รูปร่างของไซโตโครม

ที่มา : www.bangkokcity.com



ภาพ 11 ไซโตโครมบนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย

ที่มา : www.emc.maricopa.edu/.../BIOBK/lactferm.gif

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยีนบนไมโตคอนเดรีย (mtDNA) นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีข้อได้เปรียบมากกว่ายีนที่ปรากฏบนนิวเคลียส (Nuclear DNA) ดังนี้

1.ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่รวดเร็วมากเป็นพิเศษ (มากกว่าดีเอ็นเอในโครโมโซม)

2.ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียเป็นเพียงสายสั้นๆและอยู่ในช่วงที่ใช้เทคนิค PCR ได้เหมาะสมที่สุด ต่างจากดีเอ็นเอในโครโมโซมที่ยาวมากกว่าและมีความเร็วในการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในแต่ละส่วนของสายดีเอ็นเอไม่เท่ากัน

3.ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสัตว์มีขนาดเล็ก จึงง่ายต่อการศึกษา ประกอบกับการเรียงตัวของยีนที่มีการอนุรักษ์ จึงสามารถใช้ไพรเมอร์ร่วมกันได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยไม่ต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน

4.มีกระบวนการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวนด้วยอัตราเร็วของมันเองไม่ขึ้นกับนิวเคลียส เมื่อจำนวนไมโตคอนเดรียมีมากขึ้น ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียจึงมีมากขึ้นตามไปด้วย

5.แม้ว่าการเรียงตัวของยีนจะเป็นแบบอนุรักษ์ แต่อัตราการกลายพันธุ์โดยรวมค่อนข้างสูง ซึ่งสูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ในนิวเคลียสถึง 10 เท่า บริเวณที่ไม่ได้เป็นส่วนของยีน ซึ่งรวมถึงบริเวณควบคุมการจำลองโมเลกุลและการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ ที่เรียกว่า control region หรือ displacement (D) loop หรือ hypervariable region ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงเกิดจากผลผลิตที่มาจากปฏิกิริยาการหายใจ และกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ไม่เข้มงวดเท่ากับในนิวเคลียส การที่ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงนี้ ทำให้พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ พอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ได้มาก จึงใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ดีทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร

6.ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนและรวมตัวกันใหม่ (recombination) ลูกจึงมีจีโนมในไมโตคอนเดรียที่เหมือนกับแม่เสมอ คือ มีแฮโพลไทป์เพียงแบบเดียวที่ถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก ทำให้สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดได้โดยตรง ง่ายกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสซึ่งลูกได้รับมาจากทั้งพ่อและแม่ ซึ่งอาจมีการรวมตัวกันใหม่ได้อีก สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียจากเพศเมียไปยังลูกหลานที่เกี่ยวข้อง จากชั่วรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้โดยไม่จำกัดเวลา

7.มีลักษณะเป็น Neutral marker เนื่องจากบทบาทหน้าที่ของไมโตคอนเดรียเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ไม่ใช่เป็นลักษณะที่มีการพัฒนาขึ้นเฉพาะสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หนึ่ง ดังนั้น mutation ที่เกิดขึ้นจึงไม่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต และลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่ (new genotype) จะไม่สูญเสียไปในระหว่างกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติ

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน Cytochrome b อย่างกว้างขวางโดยเป็นประโยชน์มากที่สุดในการกำหนดความสัมพันธ์ภายในครอบครัวและสกุลและการจำแนกสกุลสัตว์แบบใหม่ ดังนี้จึงนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษาเพื่อแยกมนุษย์ออกจากสัตว์ชนิดอื่นได้ เช่น Bataille และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกแยะความแตกต่างระหว่างมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นออกจากกันด้วยดีเอ็นเอไมโตคอนเดรีย โดยทำการศึกษาดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์อื่นอีกจำนวน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ หมู ไก่ ม้า และวัว โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของมนุษย์และตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งสี่ชนิด และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ผลจากการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอของมนุษย์จะเกิดการแยกตัวออกเป็นสองแถบจากการทำ agarose gel electrophoresis ส่วนดีเอ็นเอของสัตว์จะเกิดเพียงหนึ่งแถบเท่านั้น แถบแรกจะปรากฏที่ตำแหน่ง 309 bp ส่วนแถบที่สองจะอยู่ที่ตำแหน่ง 259 bp ซึ่งเป็นช่วงสายดีเอ็นเอที่เรียกว่า ไซโตโครม บี ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ในด้านนิติวิทยาศาสตร์เนื่องจากสามารถพิสูจน์เบื้องต้นโดยการแยกแยะดีเอ็นเอของมนุษย์ออกจากสัตว์ที่ทำการศึกษาทั้งสี่ชนิดได้[13]

Caine และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงการชี้เฉพาะเพื่อระบุสปีชี่โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไซโตโครม บี โดยวิธีนี้ได้ถูกใช้กับตัวอย่างจากกรณีศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสืบสวนสอบสวนคดีอาชญากรรม โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจากกรณีศึกษา 2 กรณี คือ กรณีศึกษาที่ 1 เป็นกรณีศึกษาเกี่ยวกับร่างของเด็กผู้หญิงอายุ 8 ขวบที่หายสาบสูญไป ซึ่งเจ้าหน้าที่ตำรวจได้ชี้ประเด็นการสืบสวนไปในแนวทางฆาตรกรรม โดยอาจมีการอำพรางศพ เพื่อเป็นการยืนยันถึงการกระทำผิดดังกล่าวซึ่งสอดคล้องกับแนวทางการสืบสวนว่าอาจมีการโยนศพลงไปในเล้าสุกร และจากการตรวจสอบเล้าหมูได้พบชิ้นส่วนเล็กๆที่มีปริมาณของ แคลเซียม และฟอสฟอรัสที่อยู่ภายในร่างกายมนุษย์ (กระดูก) รวมอยู่ด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจาก การวิเคราะห์ด้วยวิธี STR นั้นประสบผลล้มเหลว หลักฐานตัวอย่างจึงถูกนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไซโตโครมบี โดยลำดับนิวคลิโอไทได้ส่งไปค้นหายังฐานข้อมูล Blast บนพื้นฐานของลำดับไซโตโครมบี ที่แสดงในฐานข้อมูลของ Gen Bank ผลของการหาข้อมูลนั้นได้ให้รายชื่อของฐานข้อมูลโดยการแบ่งประเภทด้วยการลดลำดับความเหมือนกันไปยังลำดับที่ได้ส่งไป ลำดับของไซโตโครมบีของ Sus Scrofa (สุกร) ได้มีความเหมือนลำดับของงานซึ่งผู้วิจัยได้ทำถึง 100 % จากผลการศึกษานั้นได้คลี่คลายข้อสงสัยทั้งหมด บนพื้นฐานของหลักฐานที่เก็บได้ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเด็กหญิงคนดังกล่าวอาจถูกกินโดยสุกรในเล้าดังกล่าว กรณีศึกษาที่ 2 เป็นกรณีศึกษารายงานที่มา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการพบเจอชิ้นส่วนลำไส้ในป่า การศึกษาทางสรีระวิทยานั้นไม่สามารถค้นหาความจริงว่ามีแหล่งที่มาจากวัตถุทางพันธุกรรมใด โดยห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยได้ถูกร้องขอให้ดำเนินกระบวนการตรวจสอบถึงลักษณะเฉพาะ หลักฐานดังกล่าวนั้นถูกศึกษาในแนวทางเช่นเดียวกับกรณีศึกษาที่ 1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี STR นั้นประสบความล้มเหลว ลำดับนั้นได้ถูกส่งไปค้นหายัง Blast ผลคือสามารถระบุได้ว่าเป็นลำดับไซโตโครมบีของ Sus Scrofa (สุกร) ถึง 100% จึงสามารถตัดข้อสันนิษฐานก่อนหน้านั้นที่ว่ามีความเป็นไปได้ว่าเป็นลำไส้ของมนุษย์ออกไป[14]

Li-Chin และคณะ (2007) ได้ถูกร้องขอให้เข้าร่วมในการตรวจสอบพยานวัตถุที่ได้จากการกระทำความผิดเกี่ยวสัตว์ป่าสงวน จากกระทรวงการเกษตรให้ทำการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์จากวัตถุพยานจำนวน 5 ชิ้น ได้แก่ หนังสัตว์จำนวน 2 ชิ้น อวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ อัณฑะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อีกจำนวน 1 ชิ้น Li-Chin และคณะ ได้ทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นในส่วนที่เรียกว่า ไซโตโครม บี ที่สามารถใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ที่ต้องสงสัยได้โดยเป็นการทำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอถึงสองครั้งเพื่อความแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการทำ PCR ครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด DNA segment 486 bp และครั้งที่สองใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด DNA segment 251 bp หลังการการตรวจสอบพบว่า หนังสัตว์ทั้งสองชิ้นนั้นเป็นหนังของแมว ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ อัณฑะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อีกจำนวน 1 ชิ้นนั้นเป็นของวัว โดยไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบขึ้นนั้นให้ความแม่นยำในการตรวจไม่ต่ำกว่า 99.7% จากผลดังกล่าวเป็นหลักฐานที่ใช้ยืนยันการกระทำความผิดและช่วยให้สามารถดำเนินการตามกฎหมายเพื่อเอาผิดกับผู้กระทำความเกี่ยวกับการลักลอบล่าสัตว์ป่าได้[16]

Aida และคณะ (2004) ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับวิธีการในการวิเคราะห์เพื่อระบุสปีชี่สุกร โดยมีวัตถุประสงค์ในการตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรดิบ และ ไขมันสุกร โดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบอาหารฮาลาล โดยใช้ตัวอย่างเนื้อ และ ไขมัน ของสุกร แกะ วัว ไก่ และสุกร จากตลาดสดในเมืองเซลังงอร์ ประเทศมาเลเซีย เมื่อทำการตรวจสอบผลด้วยกระบวนการ Agarose Gel Electrophoresis ผลที่ปรากฏคือเกิดแบนดีเอ็นเอทั้งบนช่องที่เป็นตัวอย่างจากเนื้อสุกรดิบ และ ไขมันสุกร ที่ตำแหน่ง 360 bp คณะผู้วิจัยจึงได้สรุปว่าในการนำวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอบนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรียของสุกรโดยตรวจเนื้อดิบ และไขมันด้วยเทคนิค PCR นั้นเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจหาส่วนประกอบที่มาจากสุกรในอาหารฮาลาล[12]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Tanabe และคณะ (2007) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเนื้อสุกรในอาหาร และตรวจหาส่วนประกอบที่มาจากสุกรซึ่งถูกใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตอาหาร โดยผู้วิจัยได้มุ่งทำการทดลองเพื่อหาไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะและเหมาะสมที่สุดในการนำมาวิเคราะห์เนื้อสุกรจากยีนไซโตโครม บี จาก 6 คู่ไพรเมอร์จนได้คู่ไพรเมอร์ที่ผู้วิจัยเห็นว่ามีความเหมาะสมที่สุดคือ f (5'-TCTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3') R(5'-TTTGCATGTAGATAGCGAATAAC- 3') โดยมีขนาด 130bp และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรโดยเปรียบเทียบกับ วัว ไก่ แกะ ม้า และหมูป่า ซึ่งมีน้ำเป็นตัวควบคุมเชิงลบ และได้ทดลองตรวจสอบดีเอ็นเอของสุกรภายในชิ้นเนื้อสุกรที่ถูกทำด้วยความร้อน ผู้วิจัยทำการทดสอบด้วยการนำเนื้อสุกรมาต้ม , ใช้ความร้อน , อบ และทอด ผลที่ได้รับคือปรากฏแบนดีเอ็นเอที่ขนาด 130bp ได้อย่างชัดเจน ปรากฏเฉพาะช่องที่เป็นสุกรและหมูป่าเท่านั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการใช้ความร้อนนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อวิธีนี้ และคณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความไวของวิธีการโดยผสมตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวสาลี(10 ng/µl) ผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรโดยเจือจางที่ 0, 10fg/µl, 100fg/µl, 1pg/µl, 10pg/µl, 100pg/µl, 1ng/µl, และ 10ng/µl ตามลำดับ ผลที่ได้คือสามารถปรากฏแบนดีเอ็นเอที่ขนาด 130bp ได้ที่การเจือจางระดับ 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, และ 1pg ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นมาแล้ว โดยนำมาใช้กับรูปแบบการผลิตอาหารสำเร็จรูป คือ เกี๊ยวซ่า (ไส้หมู กับ ผัก) โดยนำเกี๊ยวซ่ามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นเติมน้ำลงไปและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน(10% homogenate)แล้วจึงทำการเจือจาง Homogenate 10% ในน้ำกลั่น ให้ได้ระดับ 1 % , 1000 ppm , 100 ppm , 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb , 10 ppb, และ 1 ppb homogenates. และทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ F2/R1 ผลที่ได้รับคือปรากฏแบนดีเอ็นเอของสุกรในเกี๊ยวซ่าในระดับที่สูงกว่า 100 ppb [17]

นอกจากนี้ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบส่วนประกอบในตัวยาที่ใช้ในการแพทย์แผนจีนที่อาจมีส่วนผสมของกระดูกเสือ ซึ่งเป็นสัตว์ที่อยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์ Wan และ Fang จึงได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณส่วนของยีนไซโตโครมบีเฉพาะเสือ (Panthera tigris) ซึ่งสามารถตรวจสอบเนื้อ หนังแห้ง หรือแม้แต่ในส่วนผสมที่มีกระดูกเสือเป็นส่วนประกอบเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ได้ หรือในประเทศไทยเองโดย ศรัณย์ และคณะ ก็ได้ทำการตรวจดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย เพื่อแยกชนิดระหว่างจระเข้น้ำเค็ม (Crocodylus porosus) กับจระเข้ไทย (C. siamensis) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับจระเข้แต่ละชนิดได้เช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) [1], [3], [6]

เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอา นิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP ,dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotice , triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด , Oligonuclotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation: เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. ขั้นตอน Primer annealing: เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอ ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม

3. ขั้นตอน Primer extension: เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ Primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆ รอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของทุกๆ รอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^{n} เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมและขั้นตอนการ PCR

1. การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเช่น เลือด สารน้ำต่างๆ ชิ้นเนื้ออาจเป็น Fixed paraffin-embedded tissue สามารถเอามาสกัดสารพันธุกรรมที่เป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ โดยใช้วิธีง่ายๆ และรวดเร็ว ซึ่งมีหลายวิธีซึ่งสามารถสกัดเอา DNA ปริมาณน้อยๆ ได้เนื่องจากเทคนิค PCR มีความไวสูงและอาศัย DNA ปริมาณน้อยๆ ได้ ทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวน DNA ช่วงสั้นๆ ได้ดี จึงสามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานทางด้านโบราณคดีหรืองานนิติเวชได้

2. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) DNA ต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA Target) สามารถจะใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะ DNA สายเดี่ยวหรือ DNA สายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิดจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเพราะ primer จะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิต DNA ที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณ DNA ต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

3. นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (Primer) การเลือกออกแบบ Primer ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอ ที่ต้องการตรวจหากับ primer โดยลำดับนิวคลีไทด์ของ primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ primer

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบ primer ได้แก่

1). ความยาวของ primer: ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้

2). ควรเลือก primer ที่มีการกรายของเบสอย่างสม่ำเสมอ

3). ควรเลือก primer ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือก primer ที่มีปริมาณ GC content ที่สูงเกินไป

4). Primer ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ

5). หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง

6). ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละ Primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7). ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส

8). Primer ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

4. Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ Thermus aquaticuse (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอมไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72 องศาเซลเซียส Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Taq DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0 - 2.5 unit ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ (primer) รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ด้วยการใช้เอมไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้นข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 uM ของแต่ละ dNTPs แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 uM ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นที่สูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วแบ่ง aiquot เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

6. บัฟเฟอร์ (Buffer) ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCL, KCL, $MgCl_2$ และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสามของส่วนประกอบต่างๆ ในบัฟเฟอร์มีดังนี้

1) ความเข้มข้นของ Magnesium ion (Mg^{2+}) *Taq* DNA polymerase ต้องการ magnesium ion เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดย magnesium ion จะทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น magnesium ion ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ anneal ของ primer ความเข้มข้นของ Magnesium ion ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะของ magnesium ion คือต้องเหลือ magnesium ในรูปอิสระประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.5-1.0 mM โดยทั่วไปมักใช้ magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของ magnesium ion ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า magnesium ion ก็ช่วยให้ primer มีการ anneal ที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

2) pH pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ Taq DNA polymerase คือที่ pH 7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส แต่ปกติ Taq DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจาก pH ของ Tris-buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส จะได้ pH 7.3

7. องค์ประกอบอื่นในปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไปส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน PCR คือ 10-15 mM Tris-HCL ที่ pH 8.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 50 mMKCL, 1.5 mM $MgCL_2$ 0.01% gelatin (W/V) หรืออาจใช้ non-ionic detergent อื่นแทน gelatin ได้ เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSO ใส่ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อลด secondary structure ของ DNA แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่น้อยลง Gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 ug/ml) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและอาจตกตะกอนกับ Taq DNA polymerase

Temperature cycling

1. ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30-60 วินาที อย่างไรก็ตาม การใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากันได้ไม่ดี ทำให้ผลผลิต PCR ลดลง กรณีที่ DNA ต้นแบบมีปริมาณ G+C content ที่สูงมาก ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย

2. ขั้นตอน Primer annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 55-72 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่ต่ำกว่า Tm ของ Primer ประมาณ 5 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที

3. ขั้นตอน Primer extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของ DNA ต้นแบบ โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลเซียส โดยปกติ Taq DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสาย DNA ได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 72 อาศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนแรกจะมีประโยชน์สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย

จำนวนรอบในการทำ PCR (cycle number)

จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิต PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลง และ Background มากขึ้น แต่ใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR Product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี โดย Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาด DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมชิ้น ดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนอาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimmer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved