ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 10X Taq Buffer

500 mM Tris pH 8.4	20.0	ml
2 M KCI	12.5	ml
150 mM MgCI2	5.0	ml
1% Bovine Serum Albumin	5.0	ml
100% Tween 20	0.25	ml
เติมน้ำให้ครบ	50.0	ml

2. การเตรียม 1 mM Each Solution of dNTPs

100 mM dATP	10.0	µl
100 mM dCTP	10.0	µl
100 mM dGTP	10.0	µl
100 mM dTTP	10.0	µl
น้ำ	960.0	µl

ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1000.0 µl

3. การเตรียม Sus Scrofa Cytochorme b Primer Mix

Primer F (100 mM)	5	µl
Primer R (100 mM)	5	µl
เติมน้ำให้ครบ	100	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียม 0.5X TBE Buffer

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

(รศ.อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

5. วิธีเตรียมสารละลาย Ethidium Bromide

Ethidium Bromide	10	µl
0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer	200	ml

เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด

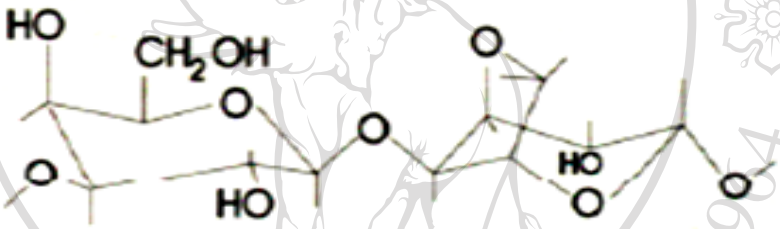
(ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังโดยตรง เนื่องจาก Ethidium Bromide เป็นสารก่อมะเร็ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose Gel Electrophoresis

เจลอะกาโรส



D-galactose 3,6-anhydro L-galactose

ภาพ 14 สูตรโครงสร้างของ Agarose

ที่มา (Sambrook te al., 1989, p. 6.3)

เจลอะกาโรสเป็นพอลิเมอร์ของ **D-galactose** สลับกับ **3, 6-anhydrogalactose** แยกได้จากสาหร่ายทะเลเช่นเดียวกับวุ้น (agar) องค์ประกอบหรือหน่วยย่อยโดยรวมจะเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกับบ้างที่หมู่ R ที่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ของน้ำตาลกาแล็กโทส โดยชื่ออะกาโรสเป็นชื่อเรียกโดยรวม จึงประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิด และอาจมีสารประกอบอื่นเจือปน เช่น ซัลเฟต โปรตีน สารที่เจือปนนี้ถ้าเป็นสารที่มีประจุ จะทำให้เกิดเหตุการณ์ที่เรียกว่า electroendosmosis (EEO) ซึ่งขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก เช่น ถ้ามีหมู่ที่มีประจุลบในเนื้อเจล จะทำให้โมเลกุลของน้ำที่จับตัวกับไฮโดรเจนไอออน (H_3O^+) เข้ามาเกาะกับประจุลบดังกล่าว เมื่อเปิดกระแสไฟฟ้า H_3O^+ จะถูกผลักให้เคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ซึ่งจะสวนทางกับสารที่มีประจุลบ ขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารหรือดีเอ็นเอที่ต้องการแยก เปรียบเทียบได้กับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพายเรือทวนน้ำ ดังนั้น เจลอะกาโรสที่ดีควรมีค่า EEO ต่ำ ซึ่งสังเกตได้จากฉลากที่ข้างขวด นอกจากนี้การแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสบางวิธี สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเหล่านี้จะติดปนมาพร้อมกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิด เช่น พอลิเมอเรส ไลเกส เอนไซม์ตัดจำเพาะ การเลือกอะกาโรสจึงต้องใช้ชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับใช้ในงานระดับโมเลกุล

อิเล็กโตโฟริซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอตเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุลบที่ PH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอตเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอตเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้น จะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (Linear) เกลียวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล

2. โครงแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีโครงแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด

3. เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือ เจลพอลิอะครีลาไมด์ และ เจลอะกาโรส โดยเจลอะครีลาไมด์ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1,000 คู่เบส ส่วนเจลอะกาโรสใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลอะกาโรส

ความเข้มข้นของเจล (%)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
0.3	5,000-60,000
0.6	1,000-20,000
0.7	800-10,000
0.9	500-7,000
1.2	400-6,000
1.5	200-4,000
2.0	100-3,000

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดีแต่ถ้าต่ำดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของพัปเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TEA (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris- borate, EDTA), และ TPE (Tris- phosphate, EDTA) สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลอะกาโรสได้ มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว ดังนี้การเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์

ขั้นตอนการทำ Agarose Gel Electrophoresis

1.เตรียม 2% Agarose Gel โดยมีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่ง Agarose Powder 0.8 g
- ต้มใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer ที่ 60 °C จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันแต่มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ml
- เทใส่แม่พิมพ์ เสียบหวีไว้เพื่อให้เกิดหลุมแล้วทิ้งไว้ให้เจลแห้ง

2.เตรียมเครื่อง Agarose Electrophoresis เปิดและปรับการทำงานที่ 100V นาน 20 นาที

3.วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่องแล้วเติม 0.5X TBE Buffer ให้ท่วมเจลพอดี

4.เติม loading dyes 1 µl ลงใน PCR product และเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.โหลด ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder 5 µl, Positive Control, Negative Control และ PCR product อย่างละ 5 µl ลงในหลุมเจล

6.เมื่อครบเวลาจึงแช่เจลด้วยสารละลาย Ethidium Bromide นาน 30 นาที

7.นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Ultraviolet Visible Transilluminator เพื่อตรวจสอบผล

หมายเหตุ การตรวจสอบดีเอ็นเอหลังจากการทำอิเล็กโตโฟริซิสด้วยการย้อมเจลโดยสีเรืองแสง สีเหล่านี้เมื่ออยู่อย่างอิสระในสารละลายจะเรืองแสงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ถ้าจับตัวกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ จะเรืองแสงเพิ่มขึ้นมาก เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งเป็นสีที่จะสอดแทรกตัวเข้าไปอยู่ระหว่างชั้นของคู่เบส (Intercalating dye) แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 10 เท่า สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอและเอธิเดียมโบรไมด์จะดูดแสงอัลตราไวโอเลตเกิด excitation และปล่อยพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งจะเห็นเป็นสีแดงส้ม หลอดแสงอัลตราไวโอเลตในเครื่องถ่ายภาพเจลบางรุ่น จะให้แสงที่มีความยาวคลื่นถึง 3 ความยาวคลื่น คือ 254, 302 และ 366 นาโนเมตร แสงที่ความยาวคลื่นต่ำจะมีพลังงานสูงกว่าและทำให้เกิดการเรืองแสงได้ดีกว่า ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนกว่าแต่ก็มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอมากกว่าด้วย เช่น เกิดการขาดของพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (nick) หรือ เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimmer) หรือโมเลกุลของดีเอ็นเอ จึงไม่เหมาะสมถ้าต้องการแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากเจลเพื่อนำไปใช้ต่อ แต่ถ้าต้องการตรวจดูอย่างเดียว หรือดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ต้องการย้ายจากเจลไปบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (blotting) การขาดของสายดีเอ็นเอจะช่วยให้การย้ายจากเจลมีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยทั่วไปนิยมใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร เพราะไม่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหายมากนัก แม้ว่าการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์หรือสีเรืองแสงที่ใช้จะลดลงบ้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของสุกรในส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย

ที่มา http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X56295

S.scrofa mitochondrion cytb gene for cytochrome b

GenBank: X56295.1

LOCUS X56295 1140 bp DNA linear MAM 04-SEP-1991
DEFINITION S.scrofa mitochondrion cytb gene for cytochrome b.
ACCESSION X56295
VERSION X56295.1 GI:13678
KEYWORDS cytb gene; cytochrome b.
SOURCE mitochondrion Sus scrofa (pig)

1 atgaccaaca tccgaaaatc acacccacta ataaaaatta tcaacaacgc attcattgac
61 ctcccagccc cctcaaacat ctcatcatga tgaaacttcg gttccctctt aggcatctgc
121 ct**aatcttgc aaatcctaac aggcc**tgttc ttagcaatac attacacatc agacacaaca
181 acagctttct catcagttac acacatttgt cgagacgtaa attacggatg agtt**attcgc**
241 **tatctacatg caaacgg**agc atccatattc tttatttgcc tattcatcca cgtaggccga
301 ggtctatact acggatccta tatattccta gaaacatgaa acattggagt agtcctacta
361 tttaccgtta tagcaacagc cttcataggc tacgtcctgc cctgaggaca aatatcattc
421 tgaggagcta cggtcatcac aaatctacta tcagctatcc cttatatcgg aacagacctc
481 gtagaatgaa tctgaggggg cttttccgtc gacaaagcaa ccctcacacg attcttcgcc
541 ttccacttta tcctgccatt catcattacc gccctcgcag ccgtacatct catattcctg
601 cacgaaaccg gatccaacaa ccctaccgga atctcatcag acatagacaa aattccattt
661 cacccatact acactattaa agacattcta ggagccttat ttataatact aatcctacta
721 atccttgtac tattctcacc agacctacta ggagacccag acaactacac cccagcaaac
781 ccactaaaca ccccacccca tattaaacca gaatgatatt tcttattcgc ctacgctatt
841 ctacgttcaa ttcctaataa actaggtgga gtgttggccc tagtagcctc catcctaatc
901 ctaattttaa tgcccatact gcacacatcc aaacaacgag gcataatatt tcgaccacta
961 agtcaatgcc tattctgaat actagtagca gacctcatta cactaacatg aattggagga

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1021 caacccgtag aacacccgtt catcatcatc ggccaactag cctccatctt atacttccta

1081 atcattctag tattgatacc aatcactagc atcatcgaaa acaacctatt aaaatgaaga

หมายเหตุ อักษรสีเขียวและสีแดงที่ขีดเส้นใต้แสดงลำดับเบสที่ใช้เป็นดีเอ็นเอตัวเริ่ม (Primers) สำหรับงานค้นคว้าแบบอิสระนี้ ซึ่งได้แก่

Primer Forward: 5’ -AATCTTGCAAATCCTAACAGGCC- 3’
Primer Reverse: 5’ -CCGTTTGCATGTAGATAGCGAAT- 3’

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

เทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) และ เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Nested Polymerase Chain Reaction

เป็นเทคนิค PCR ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น โดยอาศัยการทำ PCR 2 ขั้นตอน ด้วย Primer 2 คู่ โดย Primer คู่แรกจะใช้กับ PCR ขั้นตอนแรกโดยเกาะคร่อม DNA Segment ที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายแต่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นตอนที่สองโดยใช้ Primer คู่ที่สองซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจาก Primer คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่สองนั้นอาจทำปฏิกิริยา 25-30 รอบ ในที่สุดก็ได้ผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามที่ต้องการ เทคนิคนี้นิยมนำไปใช้ในการประยุกต์เรื่องชันสูตรโรค

Loop-Mediated Isothermal Amplification

ในปี ค.ศ. 2000 ได้มีการพัฒนาวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ขึ้นมาโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะ ซึ่งได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR กล่าวคือ ไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีน สามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 °C และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน เทคนิคนี้จึงเหมาะกับประเทศที่กำลังพัฒนา หรือห้องปฏิบัติการเล็กๆ หรือสำหรับปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักการของเทคนิค LAMP

โดยพื้นฐานของเทคนิค LAMP จะเพิ่มขยายยีนโดยใช้ Primer จำนวน 4 เส้น ที่สามารถตรวจสอบยีนที่มีความจำเพาะถึง 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมาย การเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิคงที่และใช้ปฏิกิริยา Strand Displacement ของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase การตรวจสอบยีนที่เพิ่มขยายได้ สามารถทำในขั้นตอนเดียวไปพร้อมๆ กันไม่จำเป็นต้องใช้เจลอิเลคโตรโฟลิซิส ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มขยายยีนในเทคนิค LAMP ทำให้มีสาร Pyrophosphate เป็น by product สารดังกล่าวสามารถจับกับ Magnesium กลายเป็น Magnesium Pyrophosphate ซึ่งจะตกตะกอนเป็นสีขาวสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณการเพิ่มขยายยีนนั้นๆ

Primers ในเทคนิค LAMP

Primers ที่ใช้มีจำนวน 4 เส้นจะถูกออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ทั้ง 6 ตำแหน่ง

การเพิ่มขยายยีนของเทคนิค LAMP

กลไกการทำงานของ LAMP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1. Starting Structure Producing Step เพื่อสร้าง Stem-Loop ทั้งสองข้างของยีนเป้าหมาย

2. Cycle Amplification Step เป็นการเพิ่มขยายยีนจาก Stem-Loop โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase with strand displacement activity

วิธีการตรวจวัดยีนที่เพิ่มขยายขึ้น

1. การดูความขุ่น

สามารถดูผลของปฏิกิริยาจากตะกอนสีขาวของ Magnesium Pyrophosphate โดยนำหลอดทดสอบไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่มขยายยีน จะพบตะกอนสีขาวมาก

2. การดูสีฟลูออเรสเซนต์

โดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์เช่น SYBR Green I เติมหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP แล้ว ถ้ามี Product เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียวเมื่อดูภายใต้แสง UV (302nm.) หรืออาจดูภายใต้แสงธรรมชาติ วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องเปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อเติมสารฟลูออเรสเซนต์ ทำให้ Product มีโอกาสฟุ้งกระจายสูง เกิด Carry Over ได้ง่าย จึงได้มีผู้ดัดแปลงใช้สาร Calcein แทน สารนี้สามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบ สาร Calcein จะจับกับ Magnesium ดังนั้นเมื่อมี Product เกิดขึ้น จะมีสาร Pyrophosphate เกิดขึ้นตาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สาร Pyrophosphate จะแย่งจับกับ Magnesium ทำให้สาร Calcein เป็นอิสระจึงให้แสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา

3. การใช้ Gel Electrophoresis

สามารถนำ Product จากเทคนิค LAMP ไป run gel electrophoresis เพื่อดูยีนที่เพิ่มขยายได้ Product ที่ได้จะให้ Band หลายๆ ขนาด ต่างจากปฏิกิริยาของ PCR Product ทั่วไปที่ให้เพียง 1 band ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอน Cycle Amplification จะได้ขนาดของดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ข้อดีของเทคนิค LAMP

1. มีประสิทธิภาพในการเพิ่มขยายยีนได้สูง ภายใต้สภาวะเดียวกัน ที่อุณหภูมิประมาณ 60-65° C มีความไวสูงในการตรวจจับ DNA สามารถตรวจจับ DNA จำนวนน้อยๆ ได้ถึง 6 Copies ในการตรวจหาเชื้อไวรัส เทคนิค LAMP มีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10-100 เท่า

2. LAMP มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ Specific Sites ถึง 6 ตำแหน่ง โดยใช้ Primers ถึง 4 เส้น ดังนั้นจะช่วยลด Background จากการเพิ่มขยายยีนที่ไม่จำเพาะได้

3. เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบ ถ้าสามารถสร้าง Primer ที่เหมาะสมได้ ใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วๆ ไปเช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ Heat Block

4. การตรวจวัดผลการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก และสามารถเลือกวิธีการตรวจวัดได้ ปัจจุบันสามารถวัดแบบ Real Time ได้

5. สามารถใช้ร่วมกับปฏิกิริยา Reverse Transcription ก็จะสามารถเพิ่มขยายยีน RNA ได้ในประสิทธิภาพสูง

ข้อด้อยของเทคนิค LAMP

1. การออกแบบ Primer จะค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายถึง 6 ตำแหน่ง

2. ใช้ Primer ในปริมาณที่มากกว่าปรกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวศิวพร อินต๊ะหล่อ
วัน เดือน ปี เกิด	9 กุมภาพันธ์ 2527
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย ปีการศึกษา 2544 สำเร็จการศึกษานิติศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved