บทปฏิบัติการที่ 7
การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

หลักการ

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) หรืออีกชื่อหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคของการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลองให้ได้ปริมาณมากๆในเวลาอันสั้น ซึ่งต่างจากการโคลนยีนที่จำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นเกิดขึ้นในเซลล์เจ้าบ้าน PCR อาศัยหลักการลอกแบบของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต (DNA replication) เป็นการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในธรรมชาติ จนกระทั่งในปัจจุบันสามารถพัฒนาเทคนิคทำให้เป็นวิธีการที่ใช้กับเครื่องอัตโนมัติหรือเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (thermal cycler) และปรับปรุงให้มีการทำ PCR ให้มีความจำเพาะมากขึ้นเป็นการทำ PCR ในรูปแบบต่างๆ เช่น nested PCR, multiplex PCR เป็นต้น ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองจำเป็นต้องมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), ดีเอ็นเอตั้งต้น (primer strand หรือ oligonucleotide primer) 2 สาย เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary sequences) กับดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้สำหรับเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่, เอนไซม์ DNA polymerase, ดีออกซิไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟท (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด เป็นสับสเตรท (substrate), สารละลายเกลือและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรหลายๆรอบ เรียกว่า เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denature step) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95°C
2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55°C (ต่ำกว่า Tm ของไพรเมอร์ 5-15°C) เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (primer annealing)

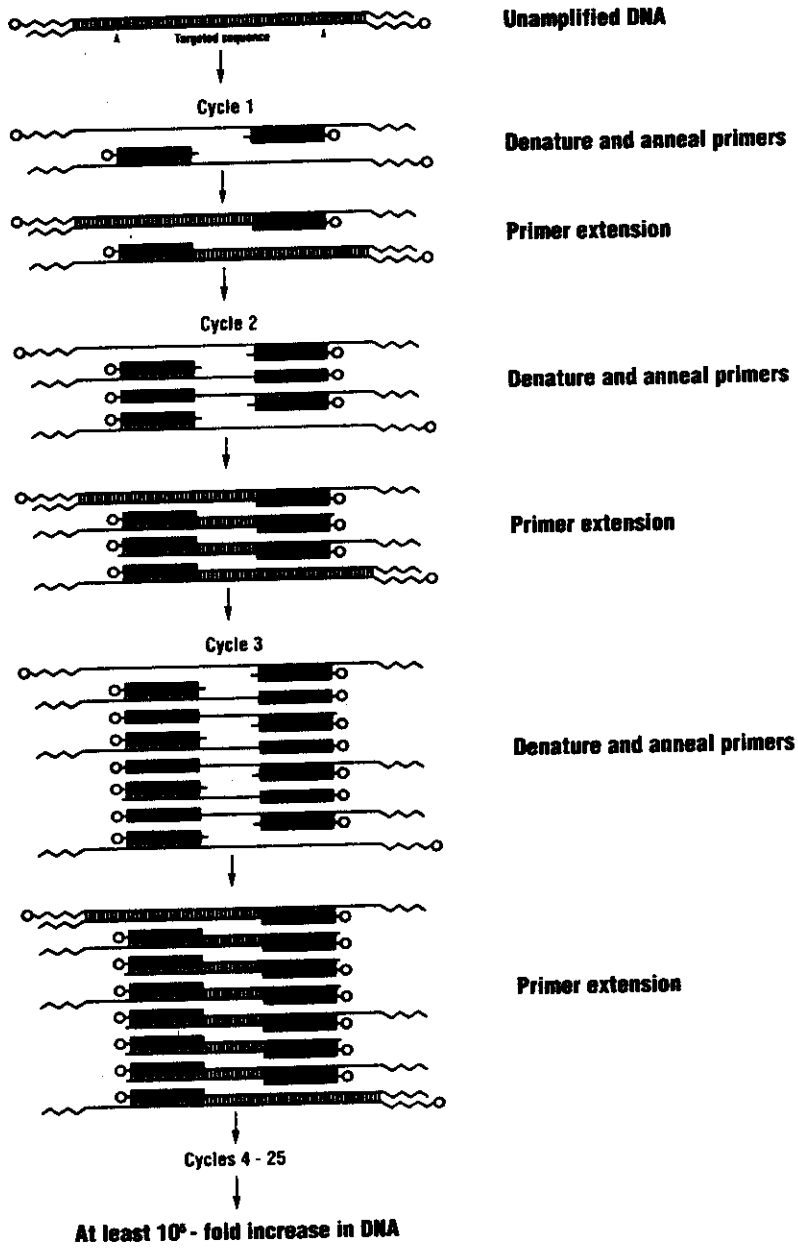
3. ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างหรือสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (synthesis หรือ extension) ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75°C

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะต้องมีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี ซึ่งเมื่อเทคนิคได้มีการพัฒนาและค้นพบเอนไซม์ที่ทนความร้อน เรียก *Taq* DNA polymerase ซึ่งไม่มี proof reading ต่อมาก็มีการพัฒนามากขึ้นมีชนิดของเอนไซม์ที่ทนความร้อนและมี proof reading ได้แก่ Vent DNA polymerase เป็นต้น การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำๆกันหลายรอบ โดยมีดีเอ็นเอเกลียวคู่ในแต่ละสายทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสร้างสายใหม่ในปฏิกิริยารอบต่อๆไป การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจึงเป็นแบบทวีคูณในปริมาณ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา เช่น เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้น ทำให้ได้ amplified product หรือที่เรียกว่า amplicon เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ในการทดลองการเลือกอุณหภูมิ เวลาที่ใช้ในแต่ละอุณหภูมิ และจำนวนรอบของปฏิกิริยา จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของไพรเมอร์ ชนิดของดีเอ็นเอต้นแบบ ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มขยาย เป็นต้น โดยปกติจะต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาแต่ละชนิดของดีเอ็นเอ ในปัจจุบันเทคนิค PCR ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานต่างๆ ดังนั้นวิธีการทำ PCR สามารถปรับปรุงดัดแปลงบางส่วนของวิธีการเพื่อให้เหมาะสมกับงานนั้นๆ ได้

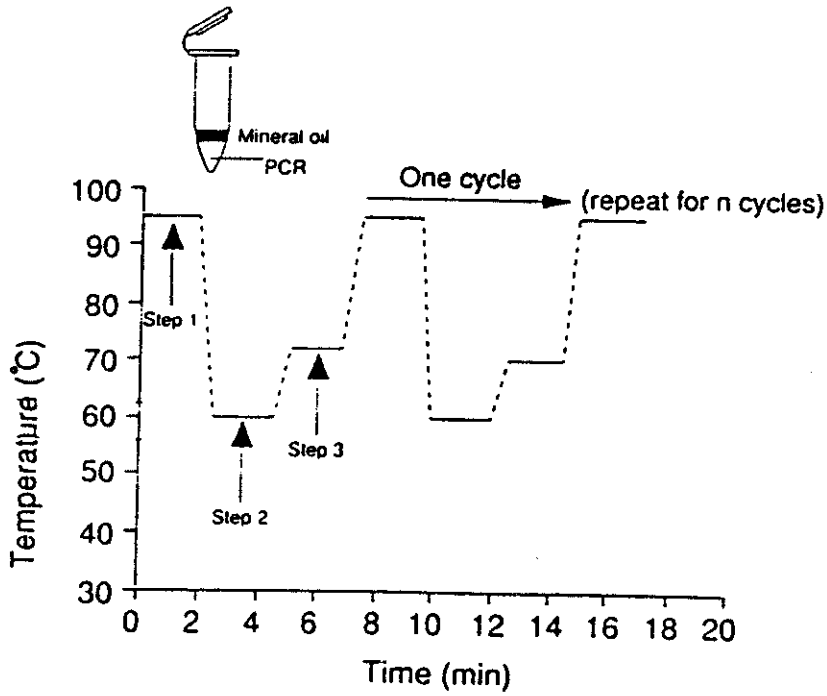
ปัญหาและแนวทางแก้ไขจากการทำ PCR

1. การเพิ่มขยายปริมาณ amplicon หรือ PCR product ไม่ได้หรือไม่ดี มีปัจจัยหลายอย่าง ดังต่อไปนี้

   1.1 ปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมไม่เหมาะสม ถ้าในตัวอย่างมี EDTA อยู่มาก จะต้องเพิ่มปริมาณของแมกนีเซียมในบัฟเฟอร์ให้มากขึ้น การปรับเปลี่ยนต้องให้เหมาะสมในแต่ละการทดลอง เช่น ถ้าความเข้มข้นน้อยไปจะทำให้เกิด amplicon ที่ไม่ต้องการมีมากขึ้น



รูปที่ 7-1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ในหลอดทดลอง สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้หลายล้านเท่าในเวลาอันสั้น



รูปที่ 7-2 อุณหภูมิ 3 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR และเวลาที่ใช้ต่อรอบ (จาก Newton และ Graham, 1997)

1.2 โปรแกรมอุณหภูมิ และ/หรือเวลาไม่เหมาะสม

1.2.1 ในขั้น Denaturation การตั้งอุณหภูมิและ/หรือเวลาสั้นไป ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ไม่แยกหรือแยกจากกันไม่สมบูรณ์ แต่ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมี GC content สูงมาก อาจต้องใช้อุณหภูมิสูงมาก แต่ถ้าสูงมากเกินไป และ/หรือเวลานานเกินไป มีผลให้ Taq polymerase สูญเสียแอคติวิตีเร็วเกินไป

1.2.2 ในขั้น Annealing อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในช่วงนี้จะขึ้นกับ GC content ความยาวและความเข้มข้นของไพรเมอร์ การใช้อุณหภูมิต่ำ เช่น ที่ 37°C การ annealing จะมีประสิทธิภาพดีมาก แต่โอกาสการเกิด mispriming ก็จะสูงด้วย ทำให้ได้ amplicon ที่ไม่ต้องการมีมากขึ้น

1.2.3 ในขั้น Primer extension ช่วงเวลาสำหรับใช้จะขึ้นกับความยาวและความเข้มข้นของ target sequence รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา

1.2.4 จำนวนรอบที่ใช้ จำนวนรอบของการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณของ target sequence ที่มีอยู่ โดยทั่วไปจะใช้ไม่เกิน 40 รอบ การใช้จำนวนรอบมากเกินไปจะทำให้เกิด amplicon ไม่จำเพาะขึ้น ถ้าต้องการ amplicon ในปริมาณมาก ควรนำ amplicon ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรกมาเจือจาง $10^3 - 10^4$ เท่า แล้วนำมาทำ PCR ใหม่เป็นครั้งที่สอง

1.3 ไพรเมอร์ไม่เหมาะสม การใช้ไพรเมอร์ที่ไม่เหมาะสม จะทำให้ไม่มี amplicon เกิดขึ้นหรือเกิด amplicon แบบไม่จำเพาะเกิดขึ้น วิธีการแก้ไขที่ดีที่สุดคือ การเลือกไพรเมอร์ใหม่ แต่ควรตรวจสอบให้แน่ใจว่าปัจจัยอื่นๆอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

1.4 Amplicon มีความยาวเกินไป เนื่องจาก *Taq* polymerase มีขีดจำกัดในการทำงาน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเพิ่มขยาย amplicon ที่ขนาดยาวเกินกว่า 2 กิโลเบส จะไม่ดีนัก ดังนั้นจึงควรเลือกทำการเพิ่มขยาย amplicon ให้มีขนาดไม่เกิน 2 กิโลเบส และถ้าต้องการ amplicon ที่มีความยาวมากกว่า 5 กิโลเบส ควรใช้ Vent DNA polymerase

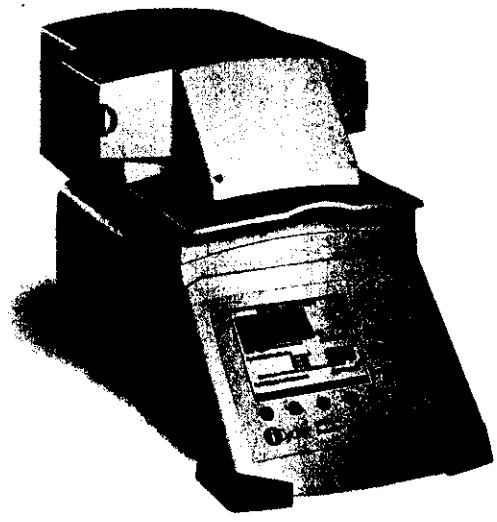
2. การเกิด amplicon แบบไม่จำเพาะอาจเกิดเนื่องมาจาก อุณหภูมิช่วง annealing ต่ำไป ควรเพิ่มให้สูงขึ้น และปริมาณแมกนีเซียมหรือ *Taq* polymerase ไม่เหมาะสม

3. การเกิดผลบวกเท็จ ซึ่งเกิดจากสาเหตุการปนเปื้อน 2 ลักษณะ คือ carry over contamination เป็นการปนเปื้อนจาก amplicon จากหลอดหนึ่งข้ามไปอีกหลอดหนึ่ง และ cross contamination เป็นการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างตรวจ การป้องกันและการแก้ไข ได้แก่ เปลี่ยนน้ำยาต่างๆสำหรับการทำ PCR ใหม่ เพิ่มความระมัดระวังการปนเปื้อนในงาน PCR เช่น การแยกพื้นที่ทำงานสำหรับงานก่อนและหลังการทำ PCR การสวมและเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ การใช้ tip ชนิดมีไส้กรอง เป็นต้น

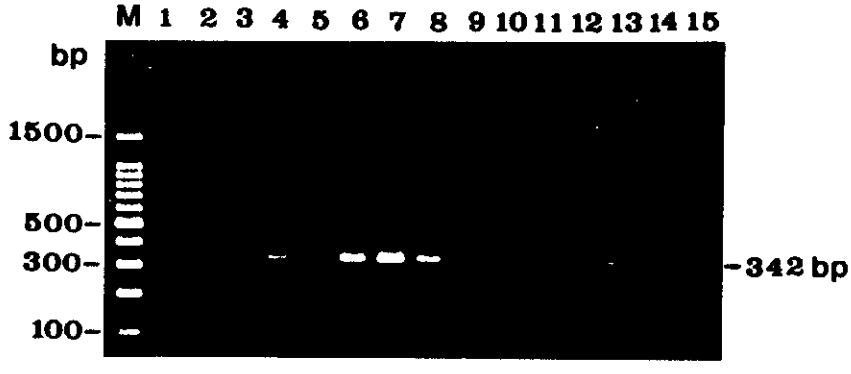
4. ผลการทดลองได้ไม่แน่นอนสม่ำเสมอ สาเหตุเกิดจาก

4.1 ความผิดพลาดหรือคลาดเคลื่อนในเทคนิคการทำ เนื่องจากสารต่างๆที่ใช้มีปริมาณน้อยๆเป็นส่วนใหญ่ การเติมปริมาตรผิดพลาดหรือคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อย อาจทำให้ผลที่ได้เปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงต้องมีความระมัดระวังในการทำ

4.2 ความสะอาดของวัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆที่ใช้ ควรจะมีความสะอาดมาก ของที่ใช้ครั้งเดียวทิ้งอย่านำกลับมาใช้อีก นอกจากนี้น้ำที่ใช้ในงาน PCR ก็ควรมีความบริสุทธิ์ในระดับ tissue culture grade ต้องสะอาดไม่ให้มีการปนเปื้อน



รูปที่ 7-3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler; BIO-RAD)



รูปที่ 7-4 PCR product หรือ amplified product ขนาด 342 bp จากตัวอย่าง HSV DNA type I และ II บน 2% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เข้าใจกลไกในการเพิ่มขยายยีนและการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR
2. เพื่อให้เข้าใจหลักการและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR

สารเคมีที่ใช้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการเพิ่มขยายปริมาณ 10^5-10^6 โมเลกุล ของ target sequence ได้แก่ 1 μg ของ human single copy genomic DNA, 10 ng ของ yeast DNA, และ 1 ng ของ *E. coli* มี target sequence ประมาณ 3 x 10^5 โมเลกุล
2. ไพรเมอร์ที่จำเพาะในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่ต้องการทั้ง 2 สาย (forward primer และ reverse primer) 80 pmole/μl : ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของไพรเมอร์ จะอยู่ในช่วง 0.1-1 μM ถ้าไพรเมอร์มากเกินไปโอกาสเกิด mispriming และ primer dimer จะเพิ่มขึ้น และมีความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอยด้วย G+C ประมาณ 50-60% ในการออกแบบไพรเมอร์ (design primer) สามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปหรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่มีบริการทางเครือข่ายอินเตอร์เน็ต
3. เอนไซม์ Taq DNA polymerase 5 units/μl : โดยทั่วไป 1-2.5 units ต่อ 100 μl ของ reaction mixture ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) กับไพรเมอร์ที่ใช้ หากปริมาณของเอนไซม์มากเกินไปจะก่อให้เกิด amplicon ไม่จำเพาะเกิดขึ้น
4. 10x PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% Triton x-100)
5. 25 mM $MgCl_2$; โดยทั่วไปความเข้มข้นสุดท้ายของ Mg^{2+} ควรอยู่ในช่วง 0.5-3 mM
6. 2 mM dNTPs ; ทำโดยการผสม dNTPs ทุกตัว ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTPs ในแต่ละชนิดควรอยู่ในช่วง 50-200 μM การใช้ dNTPs มากเกินไป จะทำให้เกิด mispriming ของไพรเมอร์ และ misincorporation ของ dNTPs
7. Mineral oil (ขึ้นกับชนิดของเครื่อง thermal cycler)
8. Agarose gel electrophoresis set
9. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน : 100 bp ladder DNA

อุปกรณ์

1. DNA Thermal Cycler
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง microtube (microcentrifuge)
3. Microtube
4. Micropipette พร้อม tips
5. เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
6. Agarose gel apparatus และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)
7. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)
8. กล่องย้อมเจล
9. กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม หรือเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Imaging)

วิธีทำการทดลอง

1. เตรียม Reaction mixture ใน 50 μl โดยเติมสารละลายต่างๆดังนี้ (วิธีมาตรฐานของ PCR)

สารละลาย	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่น	26.8	-
10 x PCR buffer	5	1 x
25 mM $MgCl_2$	3	1.5 mM
2 mM dNTPs mixer	5	200 μM
Primer 1	1	40 pmole
Primer 2	1	40 pmole
ดีเอ็นเอต้นแบบ	8	$10^5 - 10^6$ โมเลกุล
Taq DNA polymerase	0.2	1 unit

2. ผสมส่วนผสมในข้อ 1 ให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง 3 วินาที เติม mineral oil 1-2 หยด (ขึ้นกับแบบหรือรุ่นของเครื่อง thermal cycler ซึ่งรุ่นใหม่ๆ ไม่ต้องใส่) ประมาณ 25-50 μl แล้วใส่ในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

รอบที่ 1 : 94°C 6 นาที, 53°C 1 นาที, 74°C 1 นาที จำนวน 1 รอบ

รอบที่ 2 : 97°C 1 นาที, 53°C 1 นาที, 74°C 1 นาที จานวน 30 รอบ

รอบที่ 3 : 97°C 1 นาที, 53°C 1 นาที, 72°C 10 นาที จำนวน 1 รอบ

และตั้งโปรแกรมให้เก็บที่ 4°C จนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่อง

3. วิเคราะห์ผลิตผลที่ได้โดย agarose gel electrophoresis ที่ 2% agarose
4. บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายรูป

หมายเหตุ :

1. โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในแต่ละรอบของการทำ PCR นั้นขึ้นกับ target sequence ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อให้มีความจำเพาะและมีปริมาณมากๆ จึงต้องมีการหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมก่อน แล้วจึงนำมาใช้ในการทำ PCR
2. Reaction mixture ของสารละลายต่างๆ สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามสภาวะเหมาะสม เพื่อให้ได้ target sequence ที่มีความจำเพาะและปริมาณมากๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ PCR product ที่ได้จากการทดลอง
3. ในการทำ PCR ทุกครั้ง จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมี Positive และ Negative control ที่เหมาะสมร่วมไปกับตัวอย่างตรวจเสมอ เพื่อป้องกันการผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้

ในกรณีของ Positive control ควรเลือกใช้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกอ่อนๆ (weakly positive) แต่สม่ำเสมอ อย่าเลือกใช้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกมากๆ (strongly positive) เพราะจะให้ amplicon มากเกินความจำเป็นและเกิดการปนเปื้อนง่าย

สำหรับ Negative control ควรมี 2 ชนิด คือ

1. Well-characterized negative control เป็น control ที่มีดีเอ็นเอซึ่งรู้อย่างแน่นอนว่าไม่มี target sequence อยู่
2. Multiple reagent control เป็น control ที่มีส่วนประกอบทุกอย่างอยู่ครบถ้วน แต่จะไม่มีดีเอ็นเออยู่เลย control นี้จะทำให้ทราบว่าน้ำยาและสารเคมีต่างๆที่ใช้อยู่ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อน

ผลการทดลอง

ดีเอ็นเอ	จำนวนดีเอ็นเอที่เห็น	ระยะทางที่เคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอ (ซม.)	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (เบส)
1. 100 bp ladder	11		1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
2. ดีเอ็นเอตัวอย่าง			

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 7

1. ในการทำ PCR ถ้าได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non-specific DNA) เกิดขึ้น จะมีวิธีแก้ไขอย่างไร เพื่อไม่ให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ
2. จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ถ้าไม่ได้ PCR product ที่ต้องการ จะต้องมีการปรับปรุงแก้ไขอย่างไร
3. วิธี PCR สามารถนำไปใช้ประโยชน์อะไร