ความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์

Gibthai Traning Center

กรดนิวคลิอิก

กรดนิวคลีอิกค้นพบครั้งแรกโดยนักเคมีชาวสวิส กล่าวคือสารนี้ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต เป็นสารที่ทำหน้าที่เก็บหน้าเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและ
สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ (ดังรูปที่ 1) กรดนิวคลีอิกเป็นโพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) คือในโมเลกุลของมันประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายๆ หน่วยต่อเข้าด้วยกันเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) เมื่อนำมาสลายให้เป็นโมเลกุลเล็กลงไปอีกจะได้ผลผลิต 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบเสมอคือ เบสไนโตรเจน (nitrogeneous base) น้ำตาลเพนโทส (pentose) และกรดฟสฟอริก ในธรรมชาติมีชีวโมเลกุลกลุ่มหนึ่งมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยเบส น้ำตาล และฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบเรียกว่า กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) กรดนิวคลิกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทซึ่งแตกต่างกันที่น้ำตาล กรดนิวคลีอิกที่มีน้ำตาลไรโบส (ribose) เป็น 0 ส่วนประกอบเรียกว่า กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรือเรียกย่อๆว่า อาร์เอ็นเอ (RNA) พวกที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซิไรโบส เรียกว่า กรดดีออกซิไรโบส (deoxyribonucleic acid) หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งมีอยู่ในนิวเคลียสไมโตรคอนเดรีย และคลอโรพลาสท์ ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม (genetic material)

จากการศึกษาองค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบว่ามีปริมาณเบสต่างๆ แตกต่างกัน และวิเคราะห์โครงสร้างดีเอ็นเอด้วยวิธีการหักเหกระจายของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction) ของ James Watson และ Francis Crick พบว่าอะดีนีนจะจับคู่กับไธมีน และกวานีนจะจับคู่กับไซโตซีน (complementary base pairing) การจับคู่กันอย่างจำเพาะนี้อาศัยพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างดีเอ็นในธรรมชาติมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix) ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ 2 สาย ที่กลับทิศทางกัน (anti parallel) ดีเอ็นเอทั้ง 2 ย จะพันเป็นเกลียววนขวาในลักษณะรอบแกนร่วมเดียวกัน ถ้าสายหนึ่งวางตัวจากปลาย 5’ ไป 3’ (5’ -3’) อีกสายหนึ่งจะวางตัวจากปลาย 3’ ไปปลาย 5’(3’-5’) การพันเป็นเกลียวคู่เช่นนี้จะก่อให้เกิดร่อง (groove) ในสายของดีเอ็นเอซึ่งมี 2 ขนาด (minor groove และร่องขนาด (minor groove และร่องขนาดใหญ่ (major groove) ทั้ง 2 สายจะเอาส่วนที่เป็นแกนหลักไว้ด้านนอก และหันส่วนที่เป็นเบสเข้าไปไว้ตรงกลาง โดยเบสแต่ละตัวจะยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

ในปัจจุบันเป็นที่ยอกรับกันว่า DNA เกลียวคู่ตามที่เสนอโดย Watson และ Crick นี้เป็นโครงสร้างตามธรรมชาติของดีเอ็นเอ และเป็นโครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่ไม่สลายได้ง่าย ดังนั้นการอธิบายเกี่ยวกับปรากฏการณ์และการทำงานของ DNA ส่วนใหญ่จะใช้โครงสร้างเกลียวคู่เป็นหลัก

คุณสมบัติของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอมีสมบัติเฉพาะตัวหลายอย่าง เช่น

1. การเป็นกรด ดีเอ็นเอแสดงสมบัติเป็นกรด เนื่องจากมีหมู่ฟอสเฟตเป็นจำนวนมาก
2. ความหนืด ความหนืดของดีเอ็นเอจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อรูปร่างของมันเปลี่ยนแปลงไป ถ้าแยกเป็นสายเดี่ยวความหนืดก็ลดลง

3. การเสียสภาพและการกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติ การเสียสภาพธรรมชาติ หมายถึง การทำให้ดีเอ็นเอ สองสายแยกออกเป็นสายเดี่ยวปัจจัยที่ทำให้เสียสภาพธรรมชาติคือ ความร้อน กรดด่าง รังสีเอกซ์ และสารเคมีบางชนิด ถ้าปรับสภาพแวดล้อมเสียใหม่ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะสามารถกลับเข้าคู่กันและประกอบกันขึ้นเป็นเกลียวคู่ใหม่อีกครั้งได้
4. สมบัติในการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ เนื่องจากเบสในดีเอ็นเอจะสามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ทฤษฎีและหลักการของเทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction

เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเยาวออกไปโดยเลือกจับเอา 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 และบัพเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้

ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ดังรูปที่ 2) คือ

1. ขั้นตอน denaturation : เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน Primer annealing : เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอ ต้นแบบายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
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 ของทุกๆรอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า

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 ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของายดีเอ็นเอ 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) ในดีเอ็นเอต้นแบบนั่นคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ

5). หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง

6). ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละ Primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง

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

8). Primer ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

4. Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ Thermus aquaticuse *(Taq)* ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72 องศาเซลเซียส

Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase อยู่ในช่าง 1.0-2.5 units ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นกับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ, primer

รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ด้วยการใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

ความเข้นข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 uM ของแต่ละ dNTP 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 0.5-1.0 mM โดยทั่วไปมักใช้ magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของ mahnesium ion ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า magnesium ion ก็ช่วยให้ primer มีการanneal 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 muj pH8.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 50 mMKCL, 1.5 mM $MgCL_2$ 0.01% gelatin (W/V) หรืออาใช้ non-ionic detergent อื่นแทน gelatin ได้ เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSO ใส่ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อลด secondary structure ขอ DNA แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่น้อยลง Gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 ug/ml) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและอาตกตะกอนกับ *Taq* DNA polymerase

Temperature cycling

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

2. ขั้นตอน Primer annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 55-72 องศาเซลเซียสซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่ต่ำกว่า Tm ของ Primer ประมาณ 5 องศาเซลเซียสการใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที

3. ขั้นตอน Primer extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของ DNA ต้นแบบ โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยปกติ Taq DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสาย DNA ได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 72 อาศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนแรกจะมีประโยชน์สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย

จำนวนรอบในการทำ PCR (cycle number)

จำนวนรบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิ PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลง และ Background มากขึ้น แต่ใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR Product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ

1. 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 แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน อาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimmer

2. Nucleic acid hybridization ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจน สามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรึงกับแผ่น nitrocellulose หรือ แผ่น nylon แล้วนำมาทำ southern blot , dot blot หรือ slot blot โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี แล้วจึงนำผลไปดูการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตามได้

3. Direct sequencing ในกรณีต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรืออาจจะ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single stranded PCR products)

ข้อควรระวังในการทำ PCR

การปนเปื้อน (Contamination)

ถึงแม้ว่าเทคนิค PCR นี้จะเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากหลายล้านเท่า แต่ก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น การสกัดแยกดีเอ็นเอ หรือจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน (carry over contamination)

ซึ่งมักจะอยู่ในรูปละอองลอย (aerosol) ที่มักเกิดขึ้นขณะการเปิด-ปิดฝาหลอด และการปั่นตกตะกอน ละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆ ในห้องปฏิบัติการทั้งอุปกรณ์เครื่องมือและวัสดุต่างๆ รวมทั้งผิดหนัง ผม และมือผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้น จึงควรมีการระวังการปนเปื้อนให้มากโดยเฉพาะการปนเปื้อนชนิด carry-over contamination

วิธีการที่จะป้องกันการปนเปื้อนมีด้วยกันหลายอย่างเช่น

1) ควรแบ่งพื้นหรือห้องทำงานในช่วงก่อนและหลังทำ PCR (separate workspace)

2) แบ่งสารเคมีหรือน้ำยาลงในหลอดเล็กๆ (Aliquot) เพื่อให้การนำมาใช้แต่ละครั้งไม่ปนกัน

3) ใช้ Micropipette และ Filter tip ซึ่งเป็นทิปชนิดพิเศษที่ป้องกันการแพร่กระจายของละอองลอย โดยมีลักษณะสำคัญคือมีไส้กรอง (membrane) อยู่ภายใน

4) มีตัวควบคุมที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยตัวควบคุมจะมีด้วยกัน 3 แบบ คือ แบบแรกเป็นตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (no template) เพื่อเป็นการควบคุมการปนเปื้อนของสารที่ใช้ (negative control) แบบที่สองเป็นตัวควบคุมที่มี DNA ชนิดที่ไม่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (negative control) และแบบที่สามเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องต้อง (positive control)

5) การปฏิบัติงานด้วยขบวนการปราศจากเชื้อ (Sterile technique) และด้วยความระมัดระวังเช่นการสวมถุงมือและเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ

6) ลดขั้นตอนย้ายถ่ายสารละลาย (Minimize handling of the solutions) เช่นลดขั้นตอนการใช้ปิเปต โดยการทำ master mix เมื่อต้องทำ PCR หลายตัวอย่าง

ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของวิธี PCR

แม้ว่าเทคนิค PCR จะมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดบางอย่างเช่น

1. ข้อผิดพลาดในการทำงานของเอนไซม์ taq DNA polymerase มีความผิดพลาดในการนำเบสที่ไม่ใช่ คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอ ที่กำลังสร้างขึ้นมาเท่ากับ 10-5 error/base เมื่อทำ PCR ไป 30 รอบ โอกาสที่จะผิดพลาดจะพบ 1 ใน 3000 bp ของผลผลิต PCR

2. ความยาวของขนาด PCR ถึงแม้ว่า PCR จะสามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาว 10 kb ได้แต่ส่วนใหญ่จะได้ผลดีที่สุด เมื่อขนาดของ PCR ไม่มากกว่า 2 kb เพราะถ้ายาวกว่านี้ความผิดพลาดจะมากขึ้น เนื่องจาก primer และ taq DNA polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ โดยจะมีการจับ dNTPs ที่ไม่ถูกต้องมาต่อเข้าภายในสาย DNA มากขึ้น

ปัจจุบันพบว่า PCR เป็นเทคนิคที่นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายสาขาทั้งการแพทย์, การเกษตร, โบราณคดี, อุตสาหกรรม และอื่นๆ อีกมากมาย จึงนับว่าเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มหาศาล ปัจจุบัน PCR มีเทคนิคใหม่ๆ ที่เพิ่มขึ้นมากมายจึงเรียกว่า Advanced PCR อันได้แก่ Nested PCR, Reverse transcriptase PCR (RT-PCR-SSCP, Multiplex PCR, Random Amplified Polymorphism of DNA (PAPD) และ Realtime PCR เป็นต้น ทำให้มีความหลากหลายในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงานและได้ประโยชน์ยิ่งขึ้น

Advanced Techniques of PCR

Polymerase Chain Reactions (PCR) ได้ถูกนำประยุกต์ใช้และการพัฒนาปรับปรุงวิธีต่างๆเพื่อให้สามารถนำไปศึกษาค้นคว้า วิจัย ความรู้ใหม่ๆ ตลอดจนการแก้ไขปัญหาที่ไม่อาจทำได้ในอดีต เนื่องจากเทคโนโลยีของ PCR ได้ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว โดยเริ่มต้นต้นแต่มีการรายงานการเกิด PCR ครั้งแรกในปี 1985

ซึ่งเป็น simple PCR จนกระทั่งในปัจจุบันมีเทคนิคชั้นสูง (Advanced techniques of PCR) ออกมาใหม่ๆ ให้นำมาใช้อยู่มากมาย ในบทนี้จะขอกล่าวถึงโดยย่อเฉพาะเทคนิค PCR ชั้นสูงที่พบมากได้นาประยุกต์ใช้ในงาต่างๆ โดยจะขอกล่าวถึงคุณสมบัติพิเศษของวิธี
PCR นั้นๆ ข้อบ่งที่จะนำไปใช้ PCR ชั้นสูงที่ได้มีการพัฒนาดัดแปลงเฉพาะเทคนิคพื้นฐานดังต่อไปนี้

1. Multiplex PCR

เป็นเทคนิคการทำ PCR ซึ่งทำการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันโดย primer แต่ละคู่ที่นำมาต้องออกแบบให้ดี ไม่มี complementary กัน และเมื่อนำไปทำ PCR จะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ multiplex PCR ต้องปรับสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุก Primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากัน และเนื่องจากในปฏิกิริยานี้จะมี primer หลายคู่

2. Nested PCR

เป็นเทคนิค PCR ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัย PCR 2 ขั้นตอนด้วย Primer 2 คู่ โดย primer คู่แรกจะใช้ในตอน PCR ขั้นตอนแรก และPrimer คู่แรกจะอยู่รอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายแต่มีดีเอ็นเป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นตนที่สอง โดยใช้ primer คู่ที่ 2 ซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจาก primer คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่สองนั้นอาจทำปฏิกิริยา 25-30 รอบ ในที่สุดก็ได้ผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามที่ต้องการเทคนิคนี้นิยมนำไปใช้ในการประยุกต์เรื่องชันสูตรโรค

3. PCR cloning

คุณสมบัติของ PCR ทำให้เราสามารถสร้างดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาได้เป็นจำนวนมาก ดีเอ็นเอดังกล่าวนี้สามารถนำไปทำ cloning เข้าไปใน plasmid vector, M13 vector หรือ vector ชนิดอื่นๆได้อาศัยคุณสมบัติการออกแบบ primer ที่เหมาะสม เช่นเพิ่มส่วนที่เป็น restriction site ก็ทำให้เราสามารถนำเอา PCR นั้นมาตัดด้วย restriction enzyme แล้ว clone เข้าสู่ vector ที่ต้องการได้ การ cloning อาจจะอาศัย primer ที่ออกแบบเป็น blunt end หรือ sticky end ก็ได้ข้อดีของการใช้ PCR ในการ cloning ก็คือสามารถ clone ได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น โดยได้ fragment ที่ต้องการประหยัดเวลาในการเตรียมดีเอ็นเอตั้งต้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการ clone gene ที่มีดีเอ็นเอ ตั้งต้นปริมาณน้อยๆ ส่วนข้อเสียนั้นการโคลน ด้วยวิธีนี้ และจำเป็นต้องรู้ลำดับหัว-ท้ายของจีนที่เรากำลังจะโคลน

4. PCR-SSCP

เป็นเทคนิคที่ผสมเอาหลักการของ Single-strand conformation polymorphism (SSCP) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเพียง 1 bp (base pair) ในสายของดีเอ็นเอสั้นๆ เข้ากับวิธีขง PCR ดังนั้นการทำ PCR-SSCP นั้นจะเริ่มจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ เป้าหมายต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับ

เบสเพียง 1 bp ในสายของดีเอ็นเอประมาณ 100-500 bp ด้วยวิธี Simple PCR จากนั้นนำเอา PCR จากนั้นนำเอา PCR product มาทำ SSCP นั้นจะอาศัยหลักการที่ว่า denature PCR product ให้เป็น single strand แล้วจึงนำเอาดีเอ็นเอ นี้ไปแยกด้วย non-denaturing gel เพื่อดูการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ถ้าดีเอ็นสายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเพียง 1 bp ก็จะทำให้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลแตกต่างไปจากเดิม ส่วนใหญ่ของการทำ SSCP นั้นมักจะใช้วิธีการ labeled labeled PCR product ด้วย และแยกบน5% non-denaturing polyacrylamide gel แล้วทำ ^{32}P autoradiography

5. RT-PCR

เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายจีนที่สนใจจาอาร์เอ็นเอแม่แบบ โดยหลักการคือ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเข้าสู่ขั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยอาศัย enzyme reverse transcriptase (RT) เอนไซม์นี้ทำงานโดยสามารถสร้างสายดีเอ็นเอได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไป RT ที่ใช้ในงาน cDNA เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจาก retroviruses สองตัว Avian myeloblastosis (AMV) และ Moloney murine leukemia virus (MMIV) ซึ่ง RT จากไวรัสทั้งสองตัวมีประสิทธิ์ภาพในการสร้าง cDNA ไม่แตกต่างกัน โดยขั้นตอนนี้อาจใช้ primer ที่เป็นgene specific primer (GSP) ซึ่งเป็น Primers ที่สามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุด หรือจะใช้ Oligo (Dt) primer ซึ่งการใช้ primer ประเภทนี้จะมีอาร์เอ็นเอจำเพาะที่เป็น Poly $(A)^+$ RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย cDNA หรือการใช้ Random primer เป็น primer ที่ไม่มีความจำเพรา จึงสามารถเข้าจับกับอาร์เอ็นเอทุกชนิด ดังนั้น cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายมากที่สุด

จากนั้นเข้าสู่ขึ้นตอนสุดท้ายในการทำ PCR โดยอาศัยแม่แบบจาก cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแล้ว โดยสร้างสายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่มีลักษณะรูปแบบการทำเหมือน PCR ธรรมดา ในท้ายที่สุดจะได้สายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสายอาร์เอ็นเอตั้งต้น ดังรูปที่ 10

6. เทคนิค RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ โดยการตัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมด้วย Restriction enzyme ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพราะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดย restriction enzyme เหล่านี้จุถูกนำมาวิเคราะห์ agarose gel electrophoresis

ในบางกรณีการดูแบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอจากเจลไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของแบบแผนเหล่านั้นได้อย่างชัดเจน สามารถนำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีน หรือลำดับเบสที่จำเพราะมาเป็นตัวตรวจสอบ (Probe) โดยวิธี southern blot hybridization เช่นการทำ Ribotyping หรือ DNA fingerprinting ทั้ง 2 วิธีสามารถนำมาบ่งบอกความแตกต่างของชนิด หรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ได้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของ Restriction enzyme ที่เหมาะสม

7. เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)\

เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่ม ชนิดและเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกัน แต่อาศัยเทคนิคหรือวิธีการที่แตกต่างจาก RFLP กล่าวคือจะอาศัยการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัย PCR ที่มีการเลือกใช้ primer ของการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นชนิดสุ่ม (random primer) หลังจากการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแล้ว แบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกนำมาวิเคราะห์โดย agagrose gel electrophoresis เช่นเดียวกันความสามารถในการบ่งบอกความแตกต่าง หรือความผันแปรในกลุ่มชนิดของ

สิ่งมีชีวิตได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของ primer ที่ใช้ ซึ่งถ้าการสุ่มมีความจำเพาะในส่วนของดีเอ็นเอที่ผันแปรมาก ก็จะได้แบบแผนที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้มากนั่นเอง

ในปัจจุบันได้มีการเลือกใช้ Primer ที่มีความจำเพาะจากส่วนของ intergenic region ของจีนไรโบโซม และการเลือกใช้ repetitive region ซึ่งมักพบกระจายอยู่กลังจีนโครงสร้างในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เมื่อนำมาใช้เป็นตัวเกาะใน PCR แล้วจะให้แบบแผนที่สามารแยกความแตกต่างของกลุ่มและชนิดของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้

8. เทคนิค Quantitative Realtime PCR

เป็นการนำเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปพร้อมกับกรคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลองในระยะเวลาอันสั้น โดยจะตรวจตามผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขั้นระหว่างทำ PCR นอกจากนี้ยังสามรถทำ Melting curve analysis สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ (Mutation detection) และหาคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ PCR ได้ในเวลาอันรวดเร็วอีกด้วย

นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการใช้งานเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น การตรวจหาและแก้ไขการเกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบริเวณที่ไม่จำเพาะ (Non-specific amplification), การจำแนก Genotype ได้โดยไม่ต้องทำการแยกหาลำดับนิวคลีโดไทด์ (Sequencing Electrophoresis), การตรวจหาการเกิด Point Mutation และปัจจุบันยังเพิ่มคุณสมบัติ Dual-color detection เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ Color-compensation software ทำให้สามรถศึกษาการเกิดการกลายพันธุ์ที่มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้นได้อีกด้วย

สรุป

การแพทย์ PCR ได้ให้คุณประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค การรักษาโรค และการป้องกันโรคหลายชนิด เช่น การใช้ตัวตรวจดีเอ็นเอจากยีนของเชื้อมาเลเรียหรือไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเทคนิค PCR จะช่วยวินิจฉัยว่ามีเชื้อมาเลเยหรือไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคหรือไม่ วิธีนี้จะสามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็วใช้ตัวอย่างเลือดน้อยและมีความแม่นยำดี เช่น การตรวจหาไวรัสโรคเอดส์ (AIDS) ปัจจุบันได้มีการใช้ตัวตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคพันธุกรรมบ่งบอกความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น บ่งบอกความเป็นพ่อ-แม่ ลูกกันได้ ใช้ในการศึกษา DNA polymorphism และการทำ genetic mapping ใช้ในการจำแนกสายพันธ์ของไวรัสและใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งประโยชน์ที่กล่าวมานั้นล้วนแล้วแต่ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อยงานวิจัยและพัฒนาหลายด้าน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็วและให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือและแม่นยำ

เอกสารอ้างอิง

1. มนตรี จุฬาวัฒนทล,ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ยงยุทธ ยุทวงศ์ และคณะ: ชีวเคมี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร, 2542
2. พจน์ ศรบุญลือ, โสพิศ วงศ์คำ, พัชรี บุญศิริ และคณะ: ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์คลัง นานาวิทยา ขอนแก่น, 2540
3. จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลายวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไพบูรย์ และคณะ: PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น, 2540
4. วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย, วาสนา ศิริรังษี และคณะ: วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์ เชียงใหม่, 2539.